

DOI: 10.18832/kp2016027

Senzorické stárnutí piva

Sensory Beer Aging

Jana OLŠOVSKÁ¹, Karel ŠTĚRBA¹, Tomáš VRZAL^{1,2}, Marie JURKOVÁ¹, Pavel ČEJKA¹¹Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, plc., Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2*²Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2 / *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, CZ 128 43 Prague 2*e-mail: olsovska@beerresearch.czRecenzovaný článek / *Reviewed Paper***Olšovská, J., Štěrba, K., Vrzal, T., Jurková, M., Čejka, P., 2016: Senzorické stárnutí piva.** Kvasny Prum. 62, č. 9, s. 250–257

Při transportu piva k zákazníkovi a skladování piva dochází k senzorickému stárnutí, které je způsobeno nevratnými chemickými procesy projevujícími se nepříznivou změnou organoleptického charakteru piva díky vývinu staré chuti a vůně piva, což je kombinace mnoha dílčích cizích chutí a vůní. Vývoj látek zodpovědných za tyto senzorické změny (zejména karbonylové sloučeniny) lze ovlivnit podmínkami skladování, zejména přístupem kyslíku, světla, otřesy a teplotou skladování. V předložené studii byly vytipovány karbonylové látky, které lze považovat za indikátory stárnutí českého ležáku, a to 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, furfural a fenylacetaldehyd. Byly získány časové profily jejich vývinu za různých podmínek skladování a korelace s vývinem staré chuti piva. Ze získaných časových závislostí vyplynul zajímavý fakt, že produkt Maillardových reakcí má během stárnutí piva lineární nárůst a obsahy látek vzniklých zejména díky Streckerově degradaci aminokyselin mají nelineární závislost na délce staření. Tyto poznatky budou využity pro vytvoření chemicko-statistické metody stanovení míry senzorického poškození piva. Metodu bude možno využít také při zpětném určení skladovaného, či dokonce špatným skladováním senzoricky havarovaného piva.

Olšovská, J., Štěrba, K., Vrzal, T., Jurková, M., Čejka, P., 2016: Sensory beer aging. Kvasny Prum. 62, No. 9, pp. 250–257

A sensory aging of beer occurs during the beer transport to a customer and its storage; this is due to irreversible chemical processes and is manifested by adverse change in the organoleptic character of the beer. Sensory beer aging results in the evolution of the old flavor of the beer, which is a combination of many foreign flavors and fragrances. The development of substances responsible for these sensory changes (especially carbonyl compounds) can be affected by storage, particularly by access to oxygen, light, vibrations, and temperature of storage. In our study we selected carbonyl compounds which can be regarded as indicators of aging of Czech lager, including 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, furfural and phenylacetaldehyde. We obtained temporal profiles of their evolution under various conditions of storage and the correlation with the development of the old beer flavor. The time dependences so obtained provided an interesting fact, namely that the product of Maillard reactions during beer aging exhibits a linear increase and the product of Strecker degradation of amino acids show a nonlinear dependence on the length of aging. These findings will be used to create chemico-statistical methods for determining the degree of sensory impairment of beer. The method will be used also for backward determination of storage conditions and even of beer sensorially damaged due to improper storage conditions.

Olšovská, J., Štěrba, K., Vrzal, T., Jurková, M., Čejka, P., 2016: Die sensorische Alterung des Bieres. Kvasny Prum. 62, Nr. 9, S. 250–257

Beim Transport des Bieres zum Kunde entsteht im Bier eine sensorische Alterung, die durch die irreversiblen chemischen Prozesse verbunden ist mit den ungünstigen Änderungen des organoleptischen Charakters des Bieres, aufgrund der Entwicklung der alten Aromen und Gerüche des Bieres, was ist eine Kombination der vielen teil- und fremden Aromen und Düfte. Die Entwicklung von für diese sensorische Änderungen verantwortlichen Stoffen (insbesondere Carbonylverbindungen) kann durch Lagerungsbedingungen, z.B. Sauerstoff- und Lichtzutritt, Erschütterungen und Temperatur während der Lagerung beeinflusst werden. In dem Artikel werden die folgende Stoffe genannt, die als Indikatoren der Alterung des Lagerbiers des tschechischen Typs betrachtet werden können: 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, Furfural und Phenylacetaldehyd. Es wurden unter verschiedenen Bedingungen der Bierlagerung und Korrelation mit der Entwicklung des alten Biergeschmacks die Zeitprofile erhalten. Aus den gewonnenen Zeitabhängigkeiten wurde ein interessantes Ergebnis festgestellt; der Produkt der Maillardreaktionen wies während der Alterung einen linearen Anstieg, Gehalt an aus insbesondere der Streckerdegradation von Aminosäuren entstehenden Stoffe wies eine unlineare Abhängigkeit an die Alterungszeit auf. Diese Ergebnisse werden zur Schaffung einer chemisch-statistischen Methode bei geholfen, den Grad einer sensorischen Beschädigung des Bieres zu bestimmen. Diese Methode kann auch für die Rückwärtsbestimmung des gelagerten Bieres oder sogar durch die schlechte Lagerung des beschädigten Bieres angewandt werden.

Klíčová slova: pivo, senzorické stárnutí, stará chuť, indikátory stárnutí, karbonylové látky**Keywords:** beer, sensory aging, old flavor, indicators of aging, carbonyl compounds

1 ÚVOD

Senzorické stárnutí piva je dnes považováno za jeden z nejdůležitějších problémů, kterým čelí pivovarský průmysl a tedy i pivovarská věda. Na rozdíl od koloidní stability piva, kterou se podařilo uspokojivě vyřešit již před 50 lety, je senzorické stárnutí piva komplexním jevem, kde hraje roli mnoho různých faktorů. Kromě toho, chemickým změnám způsobeným nejrůznějšími bakteriálními kontaminacemi, lze zabránit pasterací.

V užším slova smyslu se senzorické stárnutí týká hlavně piva uskladněného v malých obalech (lahvích, plechovkách), zatímco sudové pivo se uchovává převážně ve chlazených prostorách (do 5 °C) a jeho skladovací doba je stejně omezená. Naopak u lahvové-

1 INTRODUCTION

Sensory beer aging is now considered one of the most serious problems facing the brewing industry and thus also brewing science. Unlike the colloidal stability of beer, which has been satisfactorily resolved 50 years ago, the sensory beer aging is a complex phenomenon, in which many different factors play a role. Further, chemical changes caused by bacterial contamination are prevented by pasteurization.

In the strict sense sensory aging concerns beer stored in small containers (bottles, cans); keg beer is stored in refrigerated areas (5 °C) and its storage time is limited. In contrast, it is today common that the guarantee period of bottled and canned beer ranges from

ho a plechovkového piva je dnes běžné, že garanční doba se pohybuje v rozmezí několika měsíců až cca 1 roku. Na rychlost stárnutí má vliv jednak chemické složení piva a jednak skladovací podmínky, a to doba a teplota skladování.

Při stárnutí piva dochází k senzorickým změnám, jako jsou snížení hořkosti a změna jejího charakteru, snížení ovocného aroma, u některých piv stoupá aroma po košce, po černém rybízku, u jiných po vlhkém papíru nebo lepence. Dále se mohou vyvíjet další vůně a chutě jako sladká, karamelová, medová, chlebová, zemitá, slámová, po seně, po dřevě, vínová, sherry atd. (Dalgliesh, 1977; Nádaský a Šmogrovičová, 2010). Přitom platí, že zatímco piva stárnoucí přirozeným způsobem (při cca 20–25 °C) vykazují hlavně karamelové aroma, u piv stárnoucích při 30 °C a více převládá lepenkový charakter (Bamforth, 2009). Tyto změny jsou způsobeny různými chemickými procesy, při kterých vznikají zejména karbonylové látky. V minulosti byly dobře popsány mechanismy oxidace alkoholů, Streckerova degradace aminokyselin, aldolová kondenzace, oxidace nenasycených mastných kyselin, degradace hořkých kyselin, oxidace nenasycených mastných kyselin, vznik beta-damascenonu, Maillardovy reakce nebo syntéza a hydrolyza esterů, při kterých tyto sloučeniny vznikají (Nádaský a Šmogrovičová, 2010).

Oxidace alkoholů

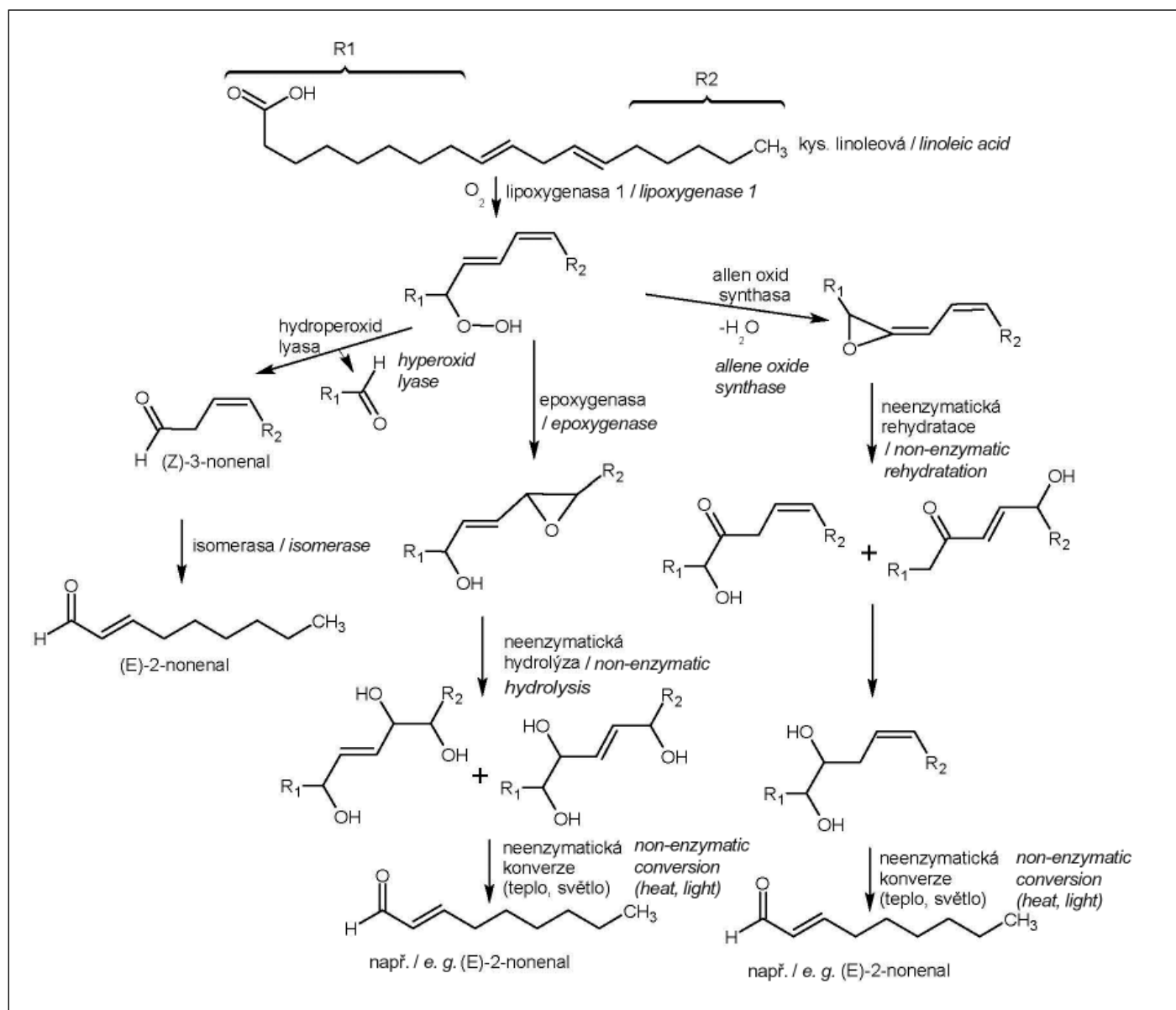
Oxidace alkoholů na aldehydy pomocí molekulárního kyslíku neprobíhá přímou cestou, ale zprostředkovávají ji zejména hydroxylové radikály. Nejvýznamnější je tento proces pro tvorbu acetaldehydu pomocí 1-hydroxyethylového radikálu (Andersen a Skibsted, 1998).

a few months to about 1 year. The rate of aging is affected by both chemical beer composition and beer storage conditions, and the time and temperature of storage.

Beer aging leads to sensory changes such as reduction of bitterness and a change of its character, reduction of fruit aroma, some beers develop cat or black currant aroma, along with moist paper or cardboard aroma. Other aromas and off-flavors that can also develop include a sweet, caramel, honey, bread, earthy, straw, hay, woody, burgundy, sherry etc. (Dalgliesh, 1977; Nádaský and Šmogrovičová, 2010). However, while a beer aging naturally (at 20–25 °C) exhibits mainly caramel aroma beer aging at 30 °C and above assumes a prevalent cardboard character (Bamforth, 2009). These changes are caused by various chemical processes which give rise especially to carbonyl compounds. The mechanisms of oxidation of alcohols, Strecker degradation of amino acids, aldol condensation, oxidation of unsaturated fatty acids, degradation of bitter acids, oxidation of unsaturated fatty acids, the formation of beta-damascenone, Maillard reaction or synthesis and hydrolysis of esters in which these compounds are formed have been well described in the past.

Oxidation of alcohols

Oxidation of alcohols to aldehydes by molecular oxygen does not occur in a direct way, but is mediated particularly by hydroxyl radicals. The process is the most important for the formation of acetaldehyde via 1-hydroxyethyl radical (Andersen and Skibsted, 1998).



Obr. 1 Mechanismus vzniku trans-2-nonenalu z linoleové kyseliny (Baert et al., 2012) / Fig. 1 The mechanism of trans-2-nonenal formation from linoleic acid (Baert et al., 2012)

Streckerova degradace aminokyselin

Dalším zdrojem aldehydů v pivu mohou být aminokyseliny, ze kterých vzniká reakcí aminokyseliny a alfa-dikarbonylové sloučeniny (meziprodukty Maillardových reakcí) s následnou transaminací a dekarboxylací alfa-ketokyselina. Finálním produktem je aldehyd o jeden uhlík kratší než původní aminokyselina. Tato reakce je katalyzována přítomností iontů železa a mědi. Předpokládá se, že Streckerova degradace je významným procesem pro vznik aldehydů pouze při vyšším obsahu aminokyselin v pivu, nikoli při běžných koncentracích na úrovni 1 mg/l (Thum et al., 1995).

Aldolová kondenzace

Pomocí aldolové kondenzace mohou vznikat aldehydy delších řetězců, než které jsou v pivu původně přítomny. Např. Hashimoto a Kuroiwa (1975) dokázali, že z heptanalů a acetaldehydu v přítomnosti prolinu vznikne trans-2-nonenal. Nebylo však dosud prokázáno, zda koncentrace takových produktů v pivu může překročit jejich senzorický práh vnímání (Bamforth, 1999).

Degradace hořkých kyselin

Iso-alfa-hořké kyseliny podléhají oxidativní degradaci i v nepřítomnosti molekulárního kyslíku (Huvaere et al., 2003) a formují se radikály, které se mohou zapojit do dalších oxidačních reakcí. Navíc degradací postranního karbonylového řetězce alfa a beta kyselin vznikají kyseliny 2-methylpropionová, 2-methylbutanová a 3-methylbutanová, které přispívají ke tvorbě esterů vznikajících při stárnutí piva (Williams a Wagner, 1979).

Oxidace nenasyčených mastných kyselin

Tento mechanismus je dalším možným způsobem vzniku jedné z nejvýznamnějších sloučenin spojených se stárnutím piva – trans-2-nonenal (obr. 1). Uvedený proces probíhá zejména během varního procesu. Vzniklý nonenal přechází buď na 3-hydroxynonenal, kyselinu nonenovou nebo tvoří Schiffovy báze s aminosloučeninami. Předpokládá se, že všechny uvedené sloučeniny mohou přejít do hotového piva a tam opět vytvořit trans-2-nonenal (Bamforth, 1999).

Vznik beta-damascenonu

Další sloučeninou spojenou se stárnutím piva je beta-damascenon. Jeho prekurzory jsou degradační produkty neoxanthinu (Chevance et al., 2002). Další možností jeho vzniku je chemická hydrolyza glykosidů (Biendl et al., 2003).

Maillardovy reakce

Maillardovy reakce během stárnutí piva jsou zodpovědné za vznik celé řady heterocyklických sloučenin, mezi nejvýznamnější patří furfural. Obsah furfuralu v pivu roste v závislosti na teplotě skladování (Čejka et al., 2013).

Syntéza a hydrolyza esterů

Během stárnutí piva dochází k reakci mezi ethanolem a organickými kyselinami přítomnými v pivu vedoucí k tvorbě esterů, např. ethyl-3-methylbutyrátu a ethyl-2-methylbutyrátu (Williams a Wagner, 1979). K urychlení tohoto procesu může dojít i díky uvolnění enzymů z kvasinek (Vanderhaegen et al., 2006).

V 70. letech byl považován trans-2-nonenal, udílející pivu lepenkové aroma, za hlavní příčinu staré chuti. Ostatní sloučeniny, zejména aldehydy, které jsou obsaženy ve starém pivu v koncentracích pod prahem vnímání, byly dlouho přehlíženy. Až vývoj nových instrumentálních technik s vysokou citlivostí (zejména hmotnostní detekce) umožnil popsat řadu látek vznikajících výše uvedenými mechanismy. V tab. 1 jsou uvedeny významné karbonylové sloučeniny, které vznikají během stárnutí piva a které způsobují vývin staré chuti piva, včetně jejich prahové hodnoty vnímání a obsahu v čerstvém pivu. Tyto látky mohou ovlivnit organoleptický charakter piva přímo, a to když jejich koncentrace v pivu přesáhne jejich senzorický práh vnímání (to je velmi ojedinělé), anebo nepřímo, když jejich koncentrace nepřesáhne práh vnímání, ale synergicky působí s ostatními látkami (Techakriengkrai et al., 2006). Tyto látky bývají v literatuře označovány jako „indikátory stárnutí“ (Čejka et al., 2013), v čerstvém pivu se vyskytují v nízkých koncentracích, ale ve starých pivech jejich obsah vzrůstá. Pomocí vhodné chemicko-statistické metody lze na základě koncentrace těchto látek zpětně určit podmínky skladování piva vykazujícího známky staré chuti (Čejka et al., 2013). Aby bylo možné učinit takový odhad co možná nejpřesněji, je zapotřebí dobře znát chemické složení a chování piva dané značky (pivního typu) během přirozeného stárnutí.

Strecker degradation of amino acids

Another source of aldehydes in beer can be amino acids which react with alpha-dicarbonyl compounds (intermediates of Maillard reactions) followed by transamination and decarboxylation to yield alpha-keto acid. The final product is an aldehyde one carbon atom shorter than the original amino acid. This reaction is catalyzed by the presence of iron and copper ions. It is believed that Strecker degradation is an important process in the formation of aldehydes only at higher amino acid content in beer but not at the common concentrations of about 1 mg/l (Thum et al., 1995).

The aldol condensation

Aldol condensation can give rise to aldehydes with longer chains than those originally present in the beer. Thus Hashimoto and Kuroiwa (1975) showed that heptanal and acetaldehyde in the presence of proline produce a trans-2-nonenal. However, it has not yet been shown whether the concentration of such products in beer may not exceed the threshold of sensory perception (Bamforth, 1999).

Degradation of bitter acids

Iso-alpha-bitter acids are subject to oxidative degradation even in the absence of molecular oxygen (Huvaere et al., 2003) and form radicals that can be involved in other oxidation reactions. Moreover, degradation of the carbonyl side chain of alpha and beta acids forms 2-methylpropionic acid, 2-methyl butanoic and 3-methyl butanoic acids which contribute to the formation of esters produced during beer aging (Williams and Wagner, 1979).

Oxidation of unsaturated fatty acids

This mechanism is another possible way to produce one of the most important compounds associated with beer aging - trans-2-nonenal (Fig. 1). This process takes place mainly during the brewing process. The resulting nonenal is converted either to 3-hydroxynonenal, nonenoic acid, or forms a Schiff base with amino compounds. It is assumed that all of the compounds can pass into the finished beer and there again create trans-2-nonenal (Bamforth, 1999).

The formation of beta-damascenone

Another compound associated with the beer aging is beta-damascenone. Its degradation products are precursors of neoxanthin (Chevance et al., 2002). Another possibility is the formation by chemical hydrolysis of glycosides (Biendl et al., 2003).

Maillard reaction

Maillard reactions during beer aging are responsible for the formation of a wide range of heterocyclic compounds. The most important include furfural. The content of furfural in beer increases depending on storage temperature (Čejka et al., 2013).

Synthesis and hydrolysis of esters

Beer aging involves reaction between ethanol and organic acids present in the beer, which leads to the formation of esters, e.g. ethyl 3-methylbutyrate and ethyl 2-methylbutyrate (Williams and Wagner, 1979). This process can be accelerated also due to the release of enzymes from yeast (Vanderhaegen et al., 2006).

In the 70's, trans-2-nonenal that imparts cardboard aroma to beer was considered the main cause of the old flavor. Other compounds, in particular aldehydes, which are contained in the aged beer at concentrations below the threshold of perception, have long been overlooked. The development of new instrumental techniques with high sensitivity (especially the mass detection) made it possible to describe a number of substances arising by the above mechanisms. Table 1 lists the major carbonyl compounds formed during beer aging that cause the development of old beer taste, including their thresholds of perception and their content in fresh beer. These substances may affect the organoleptic character of the beer directly, when their concentration in beer exceeds their sensory threshold of perception (this is very rare), or indirectly when their concentration does not exceed a threshold of perception but act synergistically with other compounds (Techakriengkrai et al., 2006). These substances are described in the literature as "aging indicators" (Čejka et al., 2013). They are present in fresh beer in low concentrations but their content increases in old beers. The conditions for storage of beer exhibiting signs of old flavor can be backwards determined using an appropriate chemical-statistical method based on the concentration of these substances (Čejka et al., 2013). In order to make such an estimate as accurately as possible, it is necessary to be familiar

Tab. 1 Vybrané sloučeniny, jejich prahové hodnoty vnímání a běžné koncentrace v pivu (Meilgaard, 1975) / Table 1 Selected compounds, their perception thresholds and current concentration in beer (Meilgaard, 1975)

Sloučenina / Compound	Prahová hodnota / Threshold (mg/l)	Obsah v čerstvém pivu / Content in fresh beer (mg/l)	Aroma / Aroma
Trans-2-nonenal	0.00011	0.00001–0.011	papír, oxidace, zvětralá, lepenka, okurka / paper, oxidation, stale, cardboard, cucumber
2-Furfural	150	0.007–1	papír, karamel, chléb, vařené maso / paper, caramel, bread, cooked meats
2-Methylbutanal	1.25	0.002–0.3	tráva, ovoce, jodoform, mandle, slad / grass, fruit, iodoform, almonds, malt
3-Methylbutanal	0.6	0.01–0.634	nezralé banány, jablka, třešně, višně, slad, čokoláda, mandle / unripe bananas, apples, cherries, malt, chocolate, almonds
Fenylacetaldehyd	1.6	0–0.075	hyacint, šerík / hyacinth, lilac
Beta-Damascenon	203 ^a	42–157 ^a 7–25 ^b	kokos, tabák, červené ovoce / coconut, tobacco, red fruits

a – Tato hodnota byla převzata z (Saison et al., 2009) / The value was taken from (Saison et al., 2009)

b – Tato hodnota byla převzata z (Chevance et al., 2002) / The value was taken from (Chevance et al., 2002)

Všechny ostatní hodnoty v tab. 1 jsou převzaty z literatury (Meilgaard, 1975) / All other values in Table 1 are taken from the literature (Meilgaard, 1975)

Hlavním úkolem této studie bylo podrobně popsat chování vybraných karbonylových látek během stárnutí piva, a to zejména během počátečních fází stárnutí a vybrat hlavní indikátory stárnutí českého piva. Podrobný popis vztahu mezi vznikem indikátorů stárnutí a vývojem staré chuti bude sloužit jako nástroj pro vývoj rychlé a efektivní chemické metody pro zpětné určení skladovacích podmínek senzory poškozeného piva.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Schéma experimentu

Experiment 1. 4 ležáky vyrobené v ČR byly ihned po stočení do lahví uloženy a skladovány při teplotách 0, 20, 30 a 40 °C. V dvouměsíčních intervalech (0, 2, 4, 6) byly vzorky odebírány ke stanovení karbonylů a současně k senzoričkému posouzení degustační komisí.

Experiment 2. V opakovaném experimentu byly tytéž ležáky (ale různých šarží) skladovány při teplotách 0, 20 a 30 °C. V časových údobích 1 týden, 2 týdny, 4 týdny, 6 týdnů, 8 týdnů, 12 týdnů, 16 týdnů, 20 týdnů a 24 týdnů byly odebírány vzorky k analýze karbonylových sloučenin a současně během prvních osmi týdnů i k senzoričkému hodnocení.

2.2 Základní chemické parametry experimentálního piva

Chemický parametr	Pivo 1	Pivo 2	Pivo 3	Pivo 4
Zdánlivý extrakt	2,32	2,69	2,51	3,54
Skutečný extrakt	4,03	4,48	4,17	5,13
Alkohol (obj.%)	4,68	4,93	4,58	4,38
Extrakt původní mladiny	11,17	11,95	11,16	11,76
Hořkost (j. EBC)	20	34	23	33
pH	4,77	4,68	4,58	4,60

Pivo 1 bylo pasterováno v tunelovém pasteru, piva 2, 3 a 4 byla pasterována průtokovým pasterem. Piva byla stabilizována pomocí PVPP.

2.3 Metodika stanovení karbonylů

Karbonylové sloučeniny acetaldehyd, aceton, 2-methylpropanal, 3-methyl-2-butanon, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, trans-2-butenal, hexanal, heptanal, oktanal, furfural, trans-2-oktenal, trans-2-nonenal, benzaldehyd a fenylacetaldehyd byly analyzovány metodou GC-MS (Čejka, 2013). Vzorek piva s pH upraveným na 4,4 je derivatizován pomocí PFBOA (O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin). Po ukončení derivatizace je vzorek vytřepán do hexanu a analyzován na GC-MS, na koloně TG-WAX MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), látky byly stanoveny v SIM modu. Rozšířená nejistota stanovení je 25 %.

2.4 Metodika senzoričkému stanovení

Piva byla hodnocena degustačním panelem VÚPS o počtu 12 členů. V pivech se hodnotila intenzita staré chuti a dalších chutí tvořících se při stárnutí piva (sirupová, cherry, medová, po rybízu, po

with the chemical composition and performance of the brand of beer (beer type) during natural aging.

The main goal of this study was to describe in detail the behavior of selected carbonyl compounds during aging of beer, especially during the initial stages of aging, and select the main indicators of Czech beer aging. A detailed description of the relationship between the emergence of the indicators of aging and the development of the old flavor will serve as a tool for the development of fast and efficient chemical methods for determining the backward conditions of storage of sensory damaged beer.

2 EXPERIMENTAL PART

2.1 Scheme of the experiment

Experiment 1. 4 lagers produced in CR were bottled and then immediately stored at temperatures of 0, 20, 30 and 40 °C. In two-month intervals (0, 2, 4, 6) samples were taken to determine the carbonyls and simultaneously sensorially assess by a tasting panel.

Experiment 2. In the repeated experiment, the same lagers (but from different batches) were stored at temperatures of 0, 20 and 30 °C. After 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks, 8 weeks, 12 weeks, 16 weeks, 20 weeks and 24 weeks, samples were taken for analysis of carbonyl compounds and simultaneous sensory evaluation during the first eight weeks.

2.2 Basic chemical parameters of experimental beers

Chemical parameter	Beer 1	Beer 2	Beer 3	Beer 4
Apparent extract	2.32	2.69	2.51	3.54
Actual extract	4.03	4.48	4.17	5.13
Alcohol (v/v.%)	4.68	4.93	4.58	4.38
The Extract of the original wort	11.17	11.95	11.16	11.76
Bitterness (EBCU)	20	34	23	33
pH	4.77	4.68	4.58	4.60

Beer 1 was pasteurized using a tunnel pasteur; beers 2, 3, and 4 were pasteurized using flow pasteurization. All beers were stabilized using PVPP.

2.3 Methodology for determining carbonyls

Carbonyl compounds, acetaldehyde, acetone, 2-methylpropanal, 3-methyl-2-butanone, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, trans-2-butenal, hexanal, heptanal, octanal, furfural, trans-2-octenal, trans-2-nonenal, benzaldehyde and phenylacetaldehyde were analyzed by GC-MS (Čejka, 2013). Beer sample with pH adjusted to 4.4 is derivatized using PFBOA (O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine). After completion of the derivatization the sample was extracted into hexane and analyzed on a GC-MS column TG-MS WAX (30 m, 0.25 mm, 0.25 mm) and the compounds were determined in the SIM mode. Expanded uncertainty of the determination is 25%.

Tab. 2 Míra korelace mezi vývojem staré chuti a obsahu vybraných karbonylů / Table 2 The degree of correlation between the development of the old flavor and content selected carbonyls

Sloučenina / Compound	Pivo / Beer 1	Pivo / Beer 2	Pivo / Beer 3	Pivo / Beer 4
2-Methylpropanal	0.96	0.96	0.98	0.96
2-Methylbutanal	0.94	0.91	0.96	0.96
3-Methylbutanal	0.95	0.91	0.95	0.94
Furfural	0.87	0.93	0.96	0.93
Fenylacetaldehyd / Phenylacetaldehyde	0.89	0.85	0.93	0.89

kožce, atd.) na škále 0 – 5, celkové hodnocení piva bylo hodnoceno na stupnici 1 – 9. Výsledná hodnota odpovídá ořezanému průměru daného parametru, tzn. nejvyšší a nejnižší hodnota se vždy vyloučila a průměr se spočítal ze zbylých hodnot. Vzorky byly komisi předkládány buď všechny v jeden den, nebo pokud počet vzorků překročil povolenou denní kapacitu, ve dvou po sobě následujících dnech vždy anonymně a v náhodném pořadí.

3 VÝSLEDKY

V prvním experimentu byla sledována závislost intenzity staré chuti na vzrůstajícím obsahu karbonylových sloučenin v uskladněném lahvovém pivu. Jak bylo uvedeno v experimentální části, vzorky byly odebírány a analyzovány v průběhu 6 měsíců, a to ve dvouměsíčních intervalech. Tím si lze vysvětlit poměrně vysoké hodnoty korelace u vybraných karbonylů (tab. 2), neboť se jedná o výsledky ze 4 měření.

Z časového průběhu vývoje indikátorů stárnutí vyplývá, že nárůsty vybraných karbonylových sloučenin jsou při vyšších teplotách rovnoměrné, pouze pro fenylacetaldehyd byl pozorován rychlejší nárůst během prvních 2 měsíců skladování, a poté jeho obsah narůstal s menší intenzitou. U ostatních sledovaných látek nebyl jasně definovatelný trend změny obsahu během délky staření, u některých

2.4 Methodology of sensory determination

Beer was evaluated by the 12-membered RIBM tasting panel. The beers were evaluated for the intensity of old flavor and other flavors produced during beer aging (syrupy, cherry, honey, after currant, after cat, etc.) on a scale from 0 to 5, the overall assessment of beer was rated on a scale from 1 to 9. The resulting value corresponds to the trimmed average of a given parameter, i.e. the maximum and minimum value is always excluded and the average is calculated from the remaining values. Samples were submitted to the panel either all in one day, or, if the number of samples exceeded the permitted daily capacity, in two consecutive days, always anonymously and at random.

3 RESULTS

In the first experiment we studied the dependence of intensity of the old flavor on the increasing content of carbonyl compounds in stored bottled beer. As mentioned in the experimental section, samples were collected and analyzed every two months within 6 months. This can explain the relatively high correlation values in selected carbonyls (Table 2), since they are the results of the 4 measurements.

As seen from the time course of development of aging indicators, the increase of selected carbonyl compounds at higher tempera-

Tab. 3 Vyjádření typu a míry závislosti vzniku karbonylových látek v čase (na délce staření piva) / Table 3 Types and degrees of dependence of formation of carbonyl compounds on the length of beer aging

Sloučenina / Compound	Korelační koeficient 20 °C / Correlation coefficient at 20 °	Korelační koeficient 30 °C / Correlation coefficient at 30 °C	Typ závislosti / Type of dependence
Acetaldehyd / Acetaldehyde	< 0.45	< 0.45	bez závislosti / without dependence
Aceton / Acetone	0.59–0.85	0.71–0.92	nárůst bez závislosti, lineární / growth without dependence, linear
2-Methylpropanal	> 0.97	> 0.98	rychlejší nárůst na začátku staření / faster growth at the beginning of aging
2-Methyl-3-butanon / Methyl-3-butanone	< 0.39	0.03–0.85	nárůst bez závislosti / growth without dependence
2-Methylbutanal	> 0.94	> 0.97	rychlejší nárůst na začátku staření / faster growth at the beginning of aging
3-Methylbutanal	0.87–0.92	> 0.96	rychlejší nárůst na začátku staření / faster growth at the beginning of aging
Trans-2-butenal	0.33–0.81	0.66–0.87	nárůst bez závislosti, lineární / growth without dependence, linear
Hexanal	0.42–0.84	0.46–0.92	nárůst bez závislosti / growth without dependence
Heptanal	0.59–0.85	0.65–0.88	nárůst bez závislosti, lineární / growth without dependence, linear
Oktanal	< 0.50	< 0.74	bez závislosti / without dependence
Furfural	> 0.97	> 0.98	lineární nárůst / linear rise
Trans-2-oktenal	< 0.50	0.33–0.79	bez závislosti / without dependence
Trans-2-nonenal	< 0.32	< 0.32	bez závislosti / without dependence
Benzaldehyd / Benzaldehyde	0.56–0.89	0.63–0.82	nárůst bez závislosti, lineární / growth without dependence, linear
Fenylacetaldehyd / Phenylacetaldehyde	> 0.91	> 0.98	rychlejší nárůst na začátku staření / faster growth at the beginning of aging

Pozn.: Uvedené korelační koeficienty platí pro lineární závislost pro jednotlivá piva, výjimkou jsou koeficienty pro 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal a fenylacetaldehyd, kde byla použita závislost polynomická. Existence závislosti definována pro korelační koeficient vyšší než 0,6 / Note: These correlation coefficients apply for linear dependence for each beer, except for coefficients for 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal and phenylacetaldehyde, in which polynomial dependence was used. Existence of dependence was defined for a correlation coefficient greater than 0.6.

Tab. 4 Korelace koncentrace sledovaných karbonylů se starou chutí piva / Table 4 Correlation of concentrations of carbonyls with the old flavor of beer

Sloučenina / Compound	Korelace koncentrace karbonylových látek se starou chutí piva / Correlation of concentration of carbonyl compounds with the old flavor of beer			
	Pivo / Beer 1	Pivo / Beer 2	Pivo / Beer 3	Pivo / Beer 4
Acetaldehyd / Acetaldehyde	0.14	0.34	0.36	0.40
Aceton / Acetone	0.47	0.60	0.45	0.27
2-Methylpropanal	0.80	0.72	0.87	0.71
2-Methyl-3-butanon / 2-Methyl-3-butanone	0.34	0.03	0.29	0.78
2-Methylbutanal	0.78	0.72	0.86	0.71
3-Methylbutanal	0.65	0.59	0.76	0.66
Trans-2-butenal	0.26	0.92	0.54	0.28
Hexanal	0.56	0.62	0.79	0.51
Heptanal	0.65	0.52	0.77	0.62
Oktanal	0.48	0.50	0.34	0.29
Furfural	0.91	0.84	0.94	0.72
Trans-2-oktenal	0.42	0.69	0.41	0.51
Trans-2-nonenal	0.37	0.18	0.31	0.30
Benzaldehyd / Benzaldehyde	0.72	0.45	0.11	0.53
Fenylacetaldehyd / Fenylacetaldehyde	0.85	0.80	0.93	0.80

byl pozorován nárůst, ale např. u acetaldehydu došlo k poklesu koncentrace během staření při všech teplotách (data nejsou uvedena).

Abychom měli jasnější představu o chování a vzniku látek podílejících se na staré chuti piva zejména v počáteční fázi stárnutí, byl proveden druhý experiment, a to se stejnými pivy a s jemnějším rozfázováním odběrů. Výsledky jsou znázorněny v *tab. 3*. U furfuralu byl pozorován lineární nárůst při teplotách 20 a 30 °C, 2-methylpropanal, 2- a 3-methylbutanal a fenylacetaldehyd vzrůstaly při těchto teplotách nelineárně, ale s definovatelnou závislostí. U dalších sledovaných látek buď docházelo k nárůstu obsahu v rámci lineární závislosti, k nárůstu bez definované závislosti nebo nešlo v rámci chyby stanovení určit změny během staření (viz *tab. 3*).

Senzorické hodnocení stařených piv ukázalo, že nejvýznamnější off-flavor ovlivňující vnímání piva je stará chuť. Zatímco ostatní sledované vady se objevovaly pouze příležitostně, stará chuť se projevovovala již od prvního týdne experimentu a vykazovala významnou korelaci s celkovým bodovým hodnocením piv (korelační koeficienty pro jednotlivá piva 0,78 až 0,96), celková závislost pro všechny vzorky je znázorněna na *obr. 2*.

Korelace koncentrací sledovaných látek s intenzitou staré chuti piva je uvedena v *tab. 4*. Z výsledků vyplývá, že vhodné indikátory pro sledování stárnutí piva jsou 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, furfural a fenylacetaldehyd, které měly všechny korelační koeficienty (s výjimkou piva 2 u 3-methylbutanalu) vyšší než 0,6 a lze tedy předpokládat závislost mezi jejich obsahy a starou chutí piva.

Z *tab. 4* je dále patrné, jak je vývin karbonylových látek závislý na chemickém složení piva (základní charakteristika piv je uvedena v experimentální části) a je pro každou značku mírně odlišný. Podobně si také lze vysvětlit odlišnosti v nalezených koncentracích aldehydů ve studii, která sledovala tvorbu těchto látek v šesti belgických ležácích (Malfliet et al., 2008). Vývoj aldehydů autoři studie sledovali v průběhu 2 měsíců při 30 °C, což jsou podmínky srovnatelné s naší studií. V českých ležácích byly zjištěny ve srovnání s ležáky belgickými mírně nižší obsahy 2-methylpropanalu, 2 až 3x nižší hodnoty furfuralu, ale přibližně dvojnásobné hodnoty 2- a 3-methylbutanalu a cca dvoj- až trojnásobné hodnoty fenylacetaldehydu.

Význam znalosti chemických procesů při stárnutí piva demonstruje i další studie zabývající se stárnutím belgických ležáků (Saison, 2009). Vzhledem k tomu, že autoři provedli experiment na pivech při 40 °C během 3 týdnů, nelze relevantně srovnat koncentrace vzniklých produktů stárnutí, nicméně opět potvrdili stejné spektrum látek podílejících se na staré chuti, které bylo předmětem naší pilotní (Čejka, 2013) i současné studie.

Z *tab. 3* a *obr. 3a-e* vyplývá zajímavý fakt, že obsah furfuralu vznikajícího během Maillardových reakcí má během stárnutí piva lineární nárůst, směrnice této křivky je závislá na teplotě stárnutí, přičemž při teplotách kolem 0 °C se jeho koncentrace mění jen minimálně.

ures are even, only phenylacetaldehyde was observed to evince faster growth during the first 2 months of storage, then its content increased with less intensity. Other controlled substances did not show a clearly definable trend of content changes during aging, the content of some increased but, e.g., acetaldehyde concentrations decreased during aging at all temperatures (data not shown).

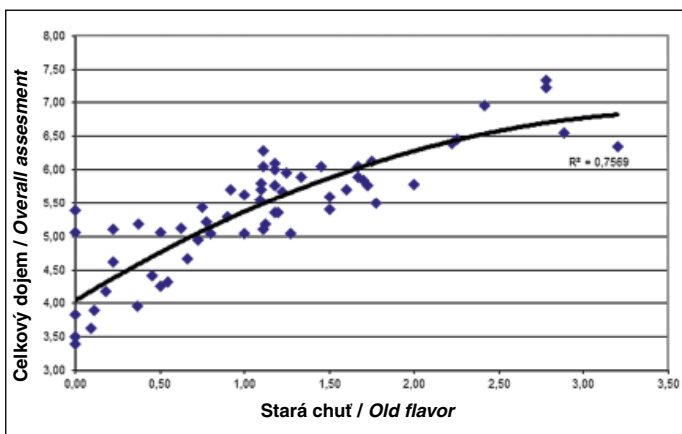
In order to have a clearer idea of the behavior and the development of substances involved in old beer flavor especially in the initial phase of aging, we performed a second experiment with the same beers and with finer sampling array. The results are shown in *Table 3*. A linear increase at temperatures between 20 and 30 °C was observed for furfural, 2-methylpropanal, 2- and 3-methylbutanal and phenylacetaldehyde increased at these temperatures nonlinearly but with a definable dependence. Other substances either increased with a linear dependence, increased without a defined relationship or their changes during aging could not be determined within the error of determination (see *Table 3*).

Sensory evaluation of aged beers revealed that the most significant off-flavor influencing the perception of beer is an old flavor. While other observed defects appeared only occasionally, the old flavor was evident from the first week of the experiment and showed a significant correlation with the total sensory score of beers (correlation coefficients for each beer 0.78 to 0.96), total dependence for all samples is shown in *Fig 2*.

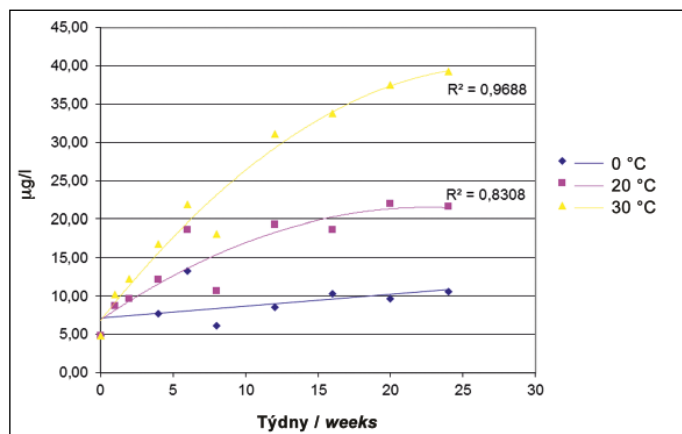
Correlation of the concentrations of individual substances with old beer flavor intensity is shown in *Table 4*. The results show that good indicators for monitoring of beer aging are 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, furfural and phenylacetaldehyde, all of which had correlation coefficients (with the exception of 3-methylbutanal in beer 2) higher than 0.6 and relationship between their contents and old flavor of beer can therefore be expected.

Table 4 also shows the dependence of the generation of carbonyl compounds on the chemical composition of beer (basic beer characteristics are shown in the experimental part), and is slightly different for each brand. Similarly, we can also explain differences in the concentrations of aldehydes found in a study of the formation of these substances in six Belgian lagers (Malfliet et al., 2008). The authors observed the development of aldehydes over 2 months at 30 °C, i.e. conditions comparable with our studies. Czech lagers exhibited slightly lower content of 2-methylpropanal, 2 to 3 times lower furfural, but approximately twice the 2- and 3-methylbutanal and about two to three times the value of phenylacetaldehyde compared to the Belgian lagers.

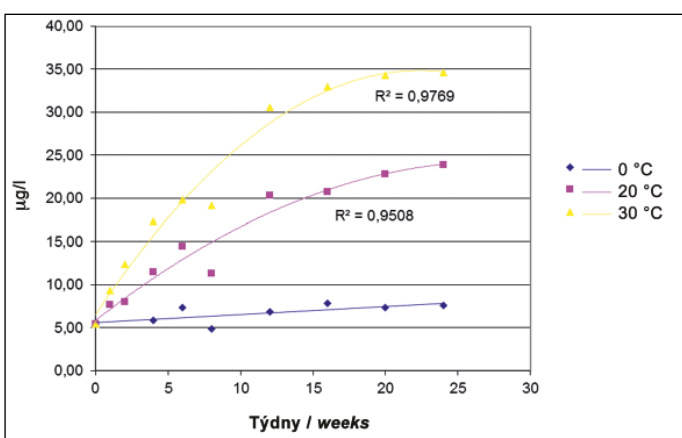
The importance of knowledge of chemical processes during beer aging is demonstrated by another study on aging Belgian lagers (Saison, 2009). Since the authors conducted an experiment on beers at 40 °C for 3 weeks, we cannot relevantly compare concentrations of the resulting aging products; still, the authors confirmed the same



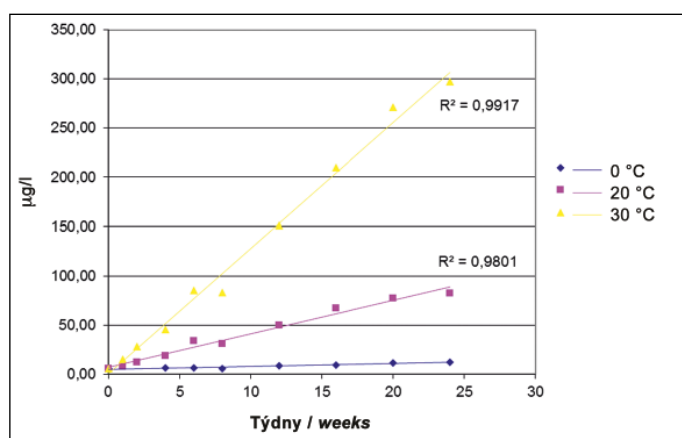
Obr. 2 Závislost celkového hodnocení piva na staré chuti / Fig. 2 Dependence of the overall assessment of the beer on old flavor



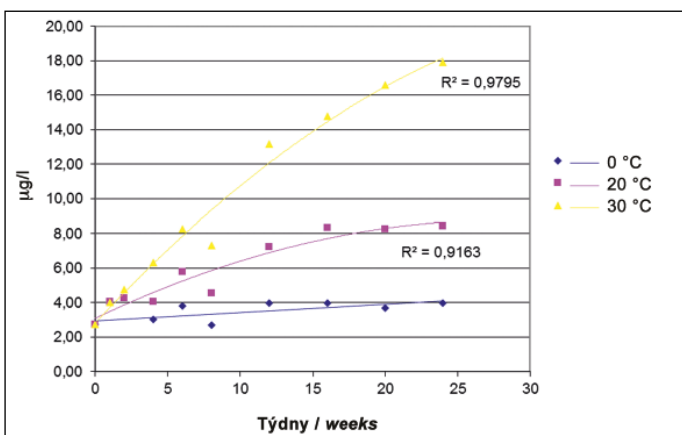
Obr. 3c Závislost obsahu vybraných sloučenin na délce staření – 3-Methylbutanal / Fig. 3c Dependence of the concentration of selected substances on the length of aging – 3-Methylbutanal



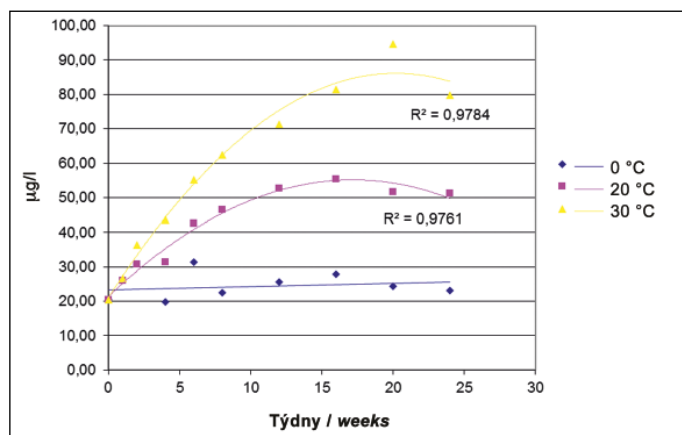
Obr. 3a Závislost obsahu vybraných sloučenin na délce staření – 2-Methylpropanal / Fig. 3a Dependence of the concentration of selected substances on the length of aging – 2-Methylpropanal



Obr. 3d Závislost obsahu vybraných sloučenin na délce staření – Furfural / Fig. 3d Dependence of the concentration of selected substances on the length of aging – Furfural



Obr. 3b Závislost obsahu vybraných sloučenin na délce staření – 2-Methylbutanal / Fig. 3b Dependence of the concentration of selected substances on the length of aging – 2-Methylbutanal



Obr. 3e Závislost obsahu vybraných sloučenin na délce staření – Fenylacetaldehyd / Fig. 3e Dependence of the concentration of selected substances on the length of aging – Fenylacetaldehyde

Obsahy látek vzniklých zejména díky Streckerově degradaci aminokyseliny (2-methylpropanal z valinu, 2-methylbutanal z isoleucinu, 3-methylbutanal z leucinu, fenylacetaldehyd z fenylalaninu) mají nelineární závislost na délce staření, přičemž rychleji a ve vyšších koncentracích vznikají při vyšších teplotách. Tyto poznatky budou ověřeny pro další česká piva. Pokud by se podařilo prokázat, že je tento model univerzální, bylo by možné ho použít jako základ budoucí metody pro přesné zpětné určení skladovaného, či dokonce špatným skladováním senzorycky havarovaného piva.

Z uvedených informací vyplývá jasná individuální závislost vývinu staré chuti na chemickém složení piva, tedy na použitých surovinách a technologii. Proto bude studie dále rozšířena tak, abychom metodu predikce stárnutí dokázali aplikovat na všechny značky českých ležáků běžně dostupných v české tržní síti. Zvláštní pozornost bude

spectrum of substances involved in the old flavor as found in our pilot (Čejka, 2013) and current studies.

Table 3 and Figures 3a-e show an interesting fact that the content of furfural formed during Maillard reactions exhibits linear growth during beer aging, while the slope of this curve depending on the aging temperature, while at temperatures around 0 °C, the concentration varies only minimally. The contents of substances generated mainly due to the Strecker degradation of amino acids (2-methylpropanal from valine, 2-methylbutanal from isoleucine, 3-methylbutanal from leucine, phenylacetaldehyde from phenylalanine) have a nonlinear dependence on the length of aging, with a faster rate and higher concentrations formed at higher temperatures. These findings will be validated in other Czech beers. If we could prove that this model is universal, it would be possible to use it as the basis for a future

také věnována stárnutí nealkoholických piv. Konečným krokem bude zjednodušení této metody pro běžnou praxi.

4 ZÁVĚR

Pro sledování stárnutí českého piva byly navrženy jako indikátory stárnutí 2-methylpropanal, 2- a 3-methylbutanal, furfural a fenylacetalddehyd, které mají jak definované změny v obsahu během stárnutí piva, tak i korelaci se starou chutí piva. Tyto poznatky budou využity pro vývoj jednoduché rutinní metody zpětného určení skladovacích podmínek senzoricky poškozeného piva.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie vznikla za podpory Technologické agentury České republiky v rámci projektu TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

method for accurately feedback determination of stored beer, or even beer sensorially failed due to improper storage.

These data show a clear dependence of individual old flavor development on the chemical composition of beer, namely the raw materials used and technology. Therefore, this study will be further extended so that the method of aging prediction could be applied to all brands of Czech lagers commonly available in Czech market network. Special attention will also be paid to aging nonalcoholic beers. The final step will be to simplify the method for routine practice.

4 CONCLUSION

For monitoring of Czech beer aging we proposed 2-methylpropanal, 2- and 3-methylbutanal, furfural and phenylacetaldehyde, as indicators of aging which show defined changes in their content during beer aging and also correlate with the old flavor of beer. These findings will be used to develop a simple routine method of backward determination of storage conditions of sensorially damaged beer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the project TE02000177 „Centre for Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products“ of the Technology Agency of the Czech Republic.

Translated by Karel Sigler

LITERATURA / REFERENCES

- Andersen, M. L., Skibsted, L. H., 1998: Electron spin resonance spin trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1272–1275.
- Baert, J. J., De Clippeleer, J., Hughes, P. S., De Cooman, L., Aerts, G., 2012: On the Origin of Free and Bound Staling Aldehydes in Beer. *J. Agric. Food Chem.*, 60: 11449–11472. DOI: 10.1021/jf303670z
- Bamforth, C. W., 1999: The science and understanding of the flavour stability of beer: a critical assessment. *Brauwelt Int.*: 98–110.
- Bamforth, C. W., 2009: The flavor stability of beer. In *Beer: A Quality Perspective*. Elsevier, Academic Press, Burlington, MA, USA. ISBN 978-0-12-669201-3
- Biendl, M., Kollmannsberger, H., Nitz, S., 2003: Occurrence of glycosidically bound flavour compounds in different hop products. *Proc. 29th EBC Congr.*, Dublin. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany. CD-ROM. 252–259. ISBN 90-70143-22-4
- Čejka, P., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M., Olšovská, J., 2013: Use of Chemical Indicators of Beer Aging for Ex-post Checking of Storage Conditions and Prediction of the Sensory Stability of Beer. *J. Agric. Food Chem.*, 61: 12670–12675. DOI: 10.1021/jf403361h
- Chevance, F., Guyot-Declerck, C., Dupont, J., Collin, S., 2002: Investigation of the beta-damascenone level in fresh and aged commercial beers. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3818–3821.
- Dalgliesh, C. E., 1977: Ageing of beer. *Proc. 16th EBC Congr.*, Amsterdam, May 30-31, Oxford University Press: 623–659.
- Hashimoto, N., Kuroiwa, Y., 1975: Proposed pathways for the formation of volatile aldehydes during storage of bottled beer. *Proceedings Am. Soc. Brew. Chem.*, 33: 104–111.
- Huvaere, K., Andersen, M. L., Olsen, K., Skibsted, L. H., Heyerick, A., De Keukeleire, D., 2003: Radicaloid-type oxidative decomposition of beer bittering agents revealed. *Chemistry - A European Journal*, 9: 4693–4699.
- Malfliet, S., Van Opstaele, F., De Clippeleer, J., Stryn, E., Goiris, K., De Cooman, L., Aerts, G., 2008: Flavour Instability of Pale Lager Beers: Determination of Analytical Markers in Relation to Sensory Ageing. *J. Inst. Brew.*, 114 (2): 180–192.
- Meilgaard, M. C., 1975: Flavor chemistry of beer; Part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 12: 151–168.
- Nádaský, P., Šmogrovičová, D., 2010: Senzorická stabilita piva. *Chem. Listy*, 104: 838–845.
- Saison, D., De Schutter, D. P., Uyttenhove, B., Delvaux, F., Delvaux, F. R., 2009: Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chem.*, 114 (4): 1206–1215.
- Techakriengkrai, I., Paterson, A., Taidi, B., Piggott, J. R., 2006: Relationship of Sensory Staleness in Two Lagers to Headspace Concentration of trans-2-Nonenal and Three Staling Aldehydes. *J. Inst. Brew.*, 112 (1): 36–40.
- Thum, B., Miedaner, H., Narziss, L., Back, W., 1995: Bildung von Alterungs-carbonylen - möglichen Mechanismen und Bedeutung bei der Bierlagerung. *Proc. 25th EBC Congr.*, Brussels, May 14–18: 491–498. ISBN 978-0-19963614-3
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G., 2006: The chemistry of beer ageing – a critical review. *Food Chem.*, 95: 357–381.
- Williams, R. S., Wagner, H. P., 1979: Contribution of hop bitter substances to beer staling mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 36: 27–31.

*Do redakce došlo / Manuscript received: 9/7/2016
Přijato k publikování / Accepted for publication: 7/8/2016*