

10-11

říjen-listopad 1969

ročník 15

Kvasný průmysl

ODBORNÝ ČASOPIS PRO PRACOVNÍKY V KVASNÝCH PRŮMYSLECH

Chemie polyfenolových látek (tříslovin) chmelu a jejich pивovarský význam

II. Tvorba polymerů s tříslovinnými vlastnostmi

JOSEF MOŠTEK, katedra kvasné chemie a technologie VŠCHT, Praha

663.423
547.98

Silbereisen a Ploman [1] před nedávnem experimentálně dokázali, že leukoantokyanidiny ani jiné polyfenoly (kromě kyseliny *m*-digallové a kyseliny elagové) nejsou schopny v monomerní formě srážet bílkoviny, nýbrž pravděpodobně teprve ve vyšemolekulární formě po přeměně varem (rmutů), resp. chmelovarem. Tím teprve vlastně nabývají tříslovinných vlastností [2, 3]. Předložená práce je proto věnována problematice chemismu tvorby vyšemolekulárních forem, resp. tříslovinných vlastností, hlavních složek polyfenolových látek pивovarských surovin a jejich technologickému významu, se zvláštěním zřetelem k výrobě piva českého typu.

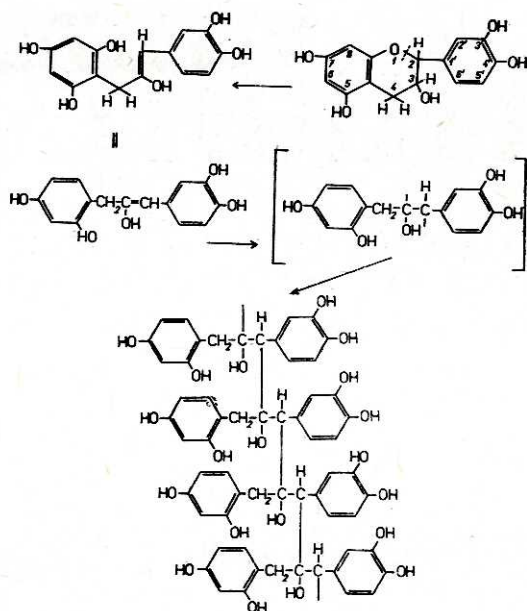
Ve funkci prekurzorů tříslovin mohou působit z polyfenolů pивovarských surovin, zejména chmelu, jak flavan-3-oly, tak i flavan-3,4-dioly. Flavan-3-oly (katechiny) mají ve smyslu vzniku charakteru vlastní třísloviny rovnocenného partnera v hydroxyflavan-3,4-dirolech, které jsou ve chmelu proti kátechinům podstatně více zastoupeny [4]. Obojí mohou působením enzymů, kyselin nebo pouhým zahřátím ve vodném roztoku nebo v suchém stavu za přítomnosti nebo i nepřítomnosti kyslíku kondenzovat nebo polymerovat v amorfní třísloviny, jejichž počáteční stupně — oligomery — jsou bezbarvé a ve vodě

rozpustné, kdežto poslední stupně polymerace jsou málo nebo vůbec nerozpustné a více nebo méně zbarvené (viz dále flobafeny). Při těchto změnách je nutno rozlišovat mezi polymerací a kondenzací, ať už jde o flavan-3-oly, nebo flavan-3,4-dioly [5].

Polymerace a kondenzace hydroxyflavanolů (tvorba třísloviny chmelu)

Výše bylo uvedeno, že monomerní formy hydroxyflavan-3,4-diolů ani monomerní formy katechinů nemají charakter tříslovin. K otázce doby vzniku tříslovinných vlastností polyfenolových látek při vývoji chmelové hlávky existuje názor [5, 6], že polymolekulární flavanoidní třísloviny vznikají z monomerů a oligomerů až v postmortálním stadiu chemickými reakcemi kondenzačního typu. Při vzniku již v živých pletivech by byly jen ztěžlivě transportovány membránami. Transportovány mohou být zpravidla jenom monomolekulární látky, jejichž „tříslovatění“ vzniká teprve na místě uložení. Zda vznikají neenzymatickou autokondenzací, nebo enzymatickou dehydrogenační polymerací, lze zatím těžko rozhodnout. Nejpravděpodobnější se zdá názor, že jde o celý komplex těchto typů reakcí (viz dále), které zde budeme postupně charakterizovat:

I. *Freudenberg* [7] navrhl a *Lebreton* [8] pro polyfenoly chmelu převzal tento hypotetický chemismus kondenzace katechinů za vzniku amorfni třísloviny flobafenového typu:



Obr. 1. Amorfni tříslovina flobafenového typu

Lebreton [8] soudil, že obdobně by se mohly tvořit flobafeny z flavonoidních leukoderivátů prostřednictvím katechinů. Chemismus možných vzájemných vztahů těchto látek je uveden na obr. 1 v první části [8a, 9].

Ve chmelu jsou leukoantokyanidiny přítomny v molekulární formě pouze asi z 10 %. V čerstvě načesaném chmelu jsou katechiny přítomny jen ve velmi malém množství. Leukoantokyanidiny představují kolem 80 % celkových tříslovin chmelu. Flobafeny, vzniklé kondenzací, zejména delším skladováním chmelu a v průběhu chmelovaru, jsou organolepticky velmi, až nepříjemně hořké. Tohoto typu hořkosti se pivovarníci právem obávají [8, 10].

Lebreton [8] stanovil pro francouzské a německé chmely průměrný obsah celkových flavonoidních leukoderivátů 2,1 % v sušině.

II. Mnohem podrobnější studie chemismu, polymerace a kondenzace přírodních flavonoidních látek podávají v posledních letech *Freudenberg* a *Weinges* [11, 12], *Kursanov* [13], *Hattewey* [14, 15, 16], *Vystrčil* [17] a *Stocker* [5]. Pro velkou pravděpodobnost průběhu podobných typů reakcí při zrání chmelu, jeho skladování, chmelovaru a dalším pivovarským výrobním procesem uvádíme ve stručnosti tyto další tři typy reakcí vzájemných vazeb a transformací flavan-3-olů a flavan-3,4-diolů jako významných polyfenolových stavebních složek chmelové třísloviny podle představ výše uvedených autorů.

A. Kyselá katalyzovaná polymerace

V rostlinách působením malých množství kyselin dochází ke katalyzované polymeraci flavanoidních látek [5, 18]. Podobný typ reakce lze vyvolat i v laboratorních a provozně technických podmínkách, zejména při chmelovaru. Reakce probíhá bez ztráty vody.

Pro kyselou polymeraci flavan-3-olů platí však nutný předpoklad [5, 18]:

a) typ seskupení *p*-hydroxybenzyléru (OH v poloze 4'),

b) volný rezorcylový systém (OH v poloze 7).

Přitom může být jeden z obou hydroxylů rovněž eterifikován (např. v poloze 4' nebo v poloze 7 — metoxyl).

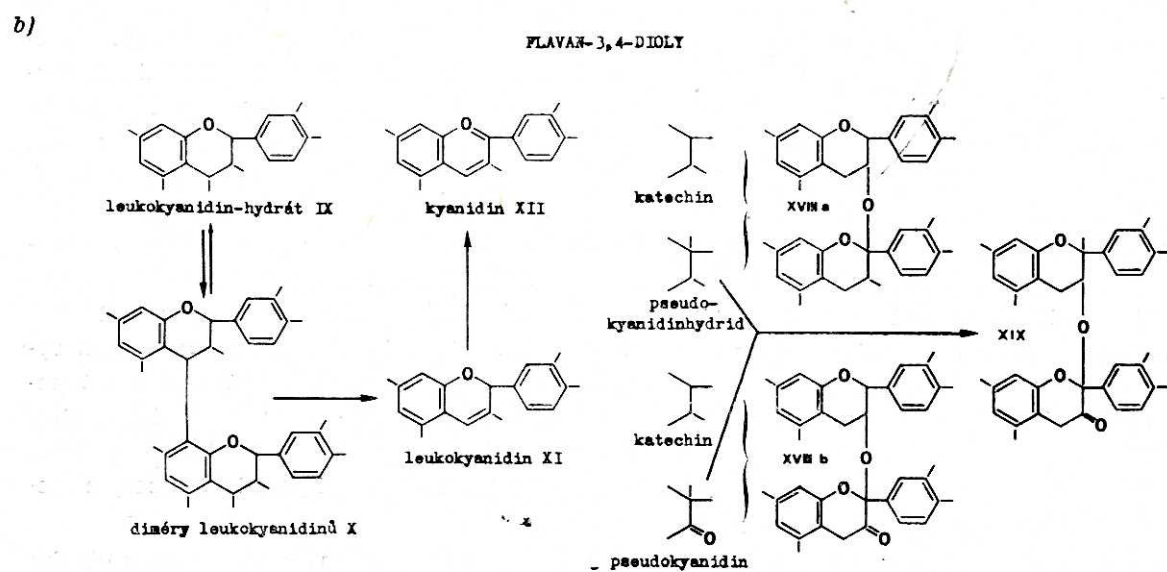
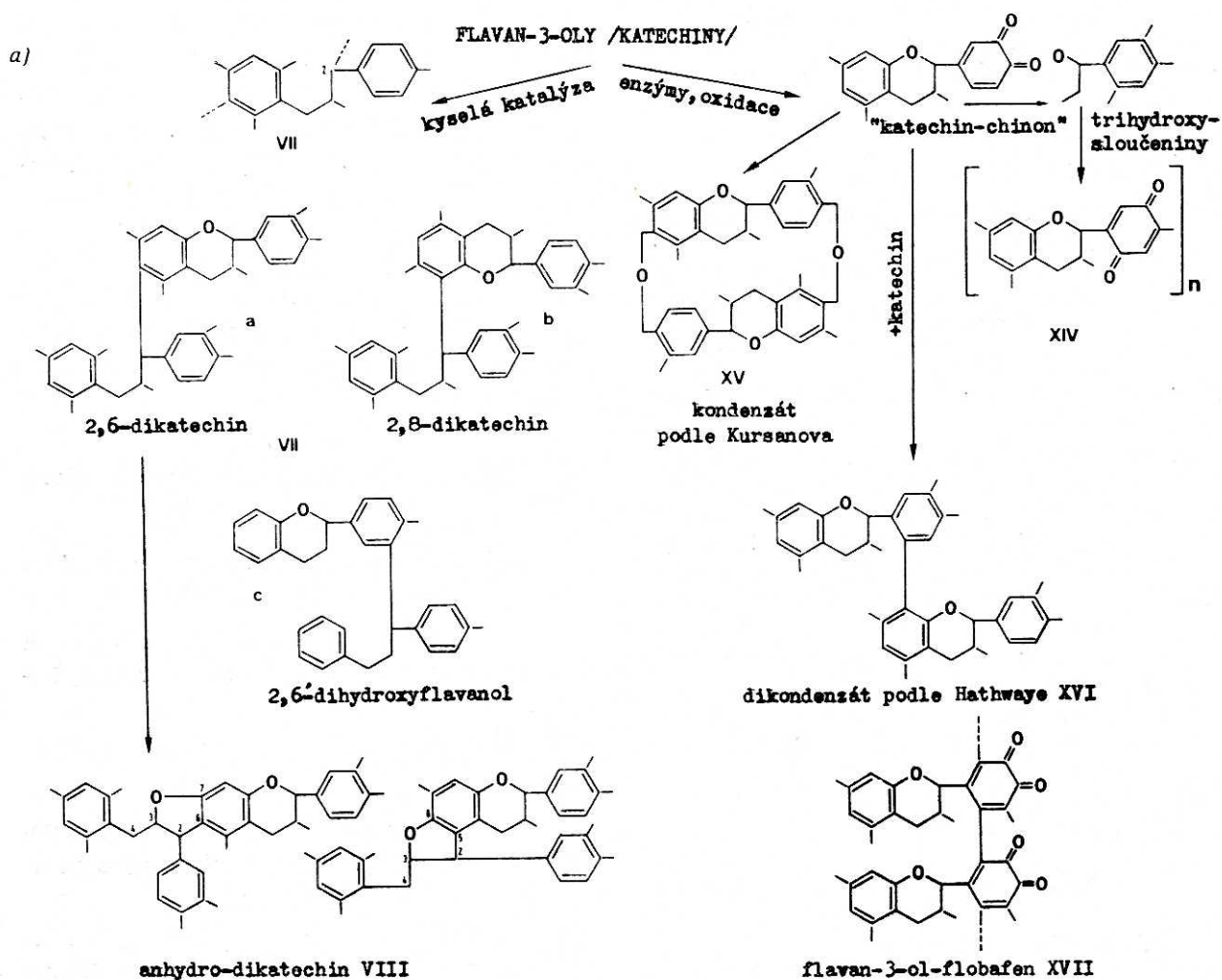
Za těchto předpokladů bude atom C v poloze 2 aktivován, heterogenní vazba v poloze —1,2— se zruší — otevře — a na atom C v poloze 2 se v důsledku toho přemístí jedna volná valence pro autopolymeraci s druhou molekulou. Tím je dán princip možné kontinuální polymerace jednotek VII. Obsahuje-li jádro A aktivní skupinu, tvoří se vazby mezi atomy uhlíku v poloze 2 první a v poloze 6 nebo 8 druhé molekuly za vzniku 2,6- nebo 2,8-dikatechinu (viz VIIa a VIIb). Chybí-li aktivní skupina v jádru A, tvoří se vazby 2,5'- za vzniku 2,5'-dihydroxyflavanolového typu (viz VIIc) (obr. 2a).

Tak např. u hydroxyflavonů (ketoskupina v poloze 4) není možná žádná polymerace, neboť ketoskupina tvoří se sousední hydroxyskupinou jádra A (OH v poloze 5) cheláty a je tudíž touto skupinou inaktivována pro polymerační vazby.

Při kyselá katalyzované polymeraci flavan-3-olů mohly až dosud vznikat jen produkty autopolymerace (většinou dimery). Tato reakce za tvorby libovolně velkých lineárních polymerátů dále nepokračuje [5, 13, 19—20], neboť v jejím dalším průběhu dochází mezi sekundárním hydroxylem v poloze 3 a jednou fenolickou hydroxyskupinou (např. na C v poloze 6) k odštěpení vody, což vede k anhydrokondenzačním produktům, např. typu anhydrodikatechinu (viz VIII).

B. Kyselá katalyzovaná kondenzace

Monomerní formy hydroxyflavan-3,4-diolů (jako např. leukokyanidinhydrát typu IX) i hydroxyflavan-3-olů mohou být vedle přeměny v antokyanidiny převedeny zředěnými minerálními kyselinami v amorfni, nejprve rozpustné a pak event. až nerozpustné kondenzační produkty. Kondenzace vedoucí k tvorbě rozpustných forem tříslovin probíhá plně již v horkém vodném roztoku, tj. i v kyselá reagující mladině při chmelovaru. Větší sklon ke kondenzaci flavan-3,4-diolů proti flavan-3-olům má hydroxyl v poloze 4, který s velkou pravděpodobností kondenzuje s vodíkovým atomem v poloze 4 a 8 za vzniku dvojfunkčního dimeru typu leukokyanidinhydrátu typu X. Intenzivním působením horké minerální kyseliny (HCl) se uhlíkaté vazby v poloze —4,8— mezi floroglucinovým jádrem (A) a heterocyklem rozštěpí. Přitom vzniká pravá leuko-



Obr. 2. Chemismus polymerace a kondenzace hydroxyflavanolů [a], sumarizovaný Stockerem [b] [5]
a) flavan-3-oly (katechiny), b) flavan-3,4-dioly

sloučenina flavenol [XI] a současně flavandiol [IX], které oba přecházejí v antokyanidin [XII]. Štěpení však neprobíhá jednostranně kvantitativně. Flavandiol odštěpený intenzivním působením kyseliny přechází z největší části ve vysokokondenzovaný flobafen.

C. Enzymatická a oxidativní kondenzace

Dehydratační kondenzace pomocí enzymů typu polyfenoldehydráz, popř. vzdušního kyslíku, probíhá zcela jinou cestou než kyselé katalyzovaný typ kondenzace, přičemž přicházejí v úvahu dvě základní možnosti zvětšování molekul:

- a) vazbou C—C, nebo
- b) éterickým kyslíkatým můstkem, resp. acetalovým typem vazby.

U obou jde o rozhodující primární oxidaci skupiny OH na druhém (B) aromatickém jádře pyrokatechinu na chinon. V dalším průběhu kondenzačního typu reakce je chinon redukován na trihydroxysloučeninu (kruh B), která reaguje s další molekulou *o*-chinonu a vede podle *Kursanova* ke kondenzátu typu XIV [14].

Druhá v úvahu přicházející možnost spočívá podle *Kursanova* v „chinonové vazbě“ přes kyslíkatý éterický můstek za vzniku kondenzátu typu XV. Tříslovinné extrakty obsahují také dehydrované kondenzáty s podstatně vyšší molekulární vahou. Podle představy *Hathwaye* a spol. [17] o velmi pravděpodobném mechanismu enzymatické kondenzace, jímž se atom C v poloze 8' chinonu, vytvořeného z katechinu, váže na atom C v poloze 8 druhé molekuly, čímž vzniká nová —8',8— C—C vazba a na kruhu B pyrokatechinu znovu vzniká benzoidní systém za tvorby kondenzátu typu XVI „předozadními“ aromatickými jádry. Druhou možnost vidí *Hathway* v tvorbě kondenzátu „zadozadními“ jádry typu XVII (gallokatechin).

Pro enzymatickou, resp. oxidativní kondenzaci flavan-3,4-diolů (leukoantokyanidinů) lze podle *Hathwaye* [17] uvažovat stejný mechanismus jako pro katechin (XVI) a gallokatechin (XVII).

V poslední době byla pečlivě studována skupina přírodních látek, tzv. proantokyanidiny, z nichž mnohé mají vlastnosti tříslovin [18, 21, 22]. Ty jsou bezbarvé, nebo žluté až hnědé, tvoří se směsí *n*-butanol — HCl antokyanidin a při opatrné hydrolýze se zředěnými kyselinami katechin a antokyanidin (biflavonoidy), popř. jen antokyanidin (monoflavonoidy). Podle většiny autorů se jim přisuzují strukturní vzorce typu XIX, XVIIIa a XVIIIb. V roce 1966 se *Weinges* [5] vyjádřil odmítavě k existenci éterických kyslíkatých můstků jako možných vazeb kondenzátů flavonoidních sloučenin. *Rollman* a *Van-craenenbroeck* [23] však tyto vazby neoznačují za éterické kyslíkaté můstky, nýbrž za vazby acetalové, které jsou hlavním typem vazby mezi jednotlivými základními složkami flavonoidních oligomerů, jako např. u hlavního antokyanogenu chmelu mezi ato-

mem C leukokyanidinu v poloze 2 a atomem C (+) — katechinu v poloze 3, obdobně jako je uvedeno u typu XVIIIa.

Chemismus přírodních látek obecně a látek tříslovinného typu zvláště je až dosud pro jejich neobyčejnou složitost málo prostudován a řada mechanismů, jako např. polymerace látek polyfenolového typu, je založena z větší nebo menší části na různých hypotézách a jen částečně experimentálně doložených faktech. Výše formulovaný chemismus flavonoidních tříslovin je ve své podstatě souhrnem nejnovějších poznatků, které však rovněž podléhají rychlému vývoji.

Pivovarský význam chmelových látek polyfenolového typu

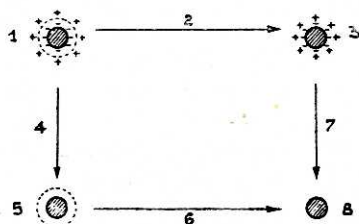
Chmelová tříslovina má z pivovarského hlediska v podstatě tři důležité funkce [24, 25]:

1. jako stabilizátor srážecího typu s vysokým účinkem vzhledem ke sladovým (i kvasničným) bílkovinám;
2. představuje účinnou složku redoxního systému mladiny a piva;
3. vzhledem k prvním dvěma fyzikálně chemickým vlastnostem se významně podílí na organoleptickém charakteru mladiny a piva.

K doložení první funkce uvedu z dřívějších let alespoň práce *Lüerse* a *Niedermayera* [26], *Bilgrama* [27], *Salače* a spol. [28] a *Moška* a *Tolara* [24]. Přestože žatecké chmely se proti zahraničním vyznačují nižším podílem α -hořkých kyselin, poskytují při tzv. racionálním způsobu chmelení hořkost piva výrazně harmoničtější a ušlechtlejší, která je zpočátku intenzivnější, ale postupně na jazyku sládně. Tato vlastnost piv vyrobených z žateckých chmelů je vedle jejich zvláštní skladby hořkých látek (zejména vysoký podíl resuponů) způsobována i obsahem tříslovin, resp. organolepticky významným systémem bílkovina—tříslovina—hořké látky [25, 26, 29]. Uzpůsobením chmelovaru cílí, aby se chmelovou tříslovinou vysráželo co nejvíce vysokomolekulárních koloidů, zejména dusíkaté povahy, zůstává pak v roztoku, tj. v mladině a pivě, větší obsah, resp. organoleptická účinnost, hořkých látek, takže lze dosáhnout i praktické úspory chmelu [30].

Z našich zkoušek vyplynulo, že snížením obsahu antokyanogenů jako důležité složky tříslovin sladu a chmelu se zvyšuje rH a obsah dusíkatých látek v pivě a snižuje obsah celkových hořkých látek a izohumulonů [24, 31].

Tříslovina chmelu vystupuje jako činitel hořkosti jednak z těchto důvodů, jednak pro svou vlastní hořkou chuť, která může podle druhu chmelu přecházet v trpkou až svíravou chuť. Reakce prostředí ovlivňuje podstatně jak jakost a charakter, tak i intenzitu hořkosti. Tříslovina chmelu svými dehydratačními účinky může mít vliv i na změny α -hořkých kyselin, zejména humulonů. Lze se o tom snadno přesvědčit tím, že k vařící destilované vodě s obsahem humulonů přidáme část třísloviny; intenzita hořkosti roztoku rychle vzrůstá [25]. Dehydratace bílkovinné micely tříslovinou je složitý děj, který přeměňuje stabilní koloid v nestabilní, jež pak snadněji aglutinuje (obr. 3). Zde má tříslovina



Obr. 3. Kruytovo schéma stálosti koloidních micel [32]

1 — hydratované a elektricky nabitě micely, 2 — dehydratace, 3 — dehydratované elektricky nabitě micely, 4 — ztráta elektrického náboje, 5 — neutrální hydratované micely, 6 — dehydratace, 7 — ztráta elektrického náboje, 8 — dehydratované neutrální nestálé micely

jako dehydratant důležitou úlohu, neboť při jejím přebytku se dehydratace dosáhne rychleji a úplněji. Kromě toho se tříslovina slučuje s některými proteiny mladiny za tvorby sloučenin rozpustných za tepla, avšak nerozpustných za studena. Tím umožňuje srážení skupiny dusíkatých látek, které samotné za varu nekoagulují, kvasinkami nejsou využívány a představují po oxidaci potenciální zákalotvornou složku extraktu piva. Tříslovina je v tomto smyslu stabilizátorem srážecího typu.

Podle našich varních zkoušek zde záleží hodně na kvalitě použitého sladu, resp. ječmene použitého k jeho přípravě, způsobu rmutovacího procesu a stupni chmelení. Technologický význam antokyano-genů chmelu je tím výraznější, čím jemnějších ječmenů se k výrobě zpracovávaného sladu použilo a čím větší je aplikovaná dávka chmelu, tj. zejména při výrobě českých piv [24, 32].

Oxidací chmelové třísloviny vzniká amorfni látka zv. flobafen (viz výše), která tvoří s bílkovinami koagulum nerozpustné ani za tepla, ani za studena. K dokonalé koagulaci těchto flobafeno-proteinových sloučenin je třeba minimálně půlhodinový intenzivní var [29, 33]. V praxi je proto nutno přidat poslední dávku chmelu nejméně půl hodiny před ukončením chmelovaru, aby v mladině nebyla pep-tizovaná forma flobafeno-proteinových komplexů, které pak jsou příčinou koloidní nestálosti piva

s chmelovou chuťovou syrovostí. Jsou známy případy, že piva, u nichž byla poslední dávka chmelu jen krátce povařena, a tím udrženy tříslobílkovinné komplexy nereverzibilního charakteru v roztoku, nevydržela koloidně ani pasteraci. Původní čerstvá tříslovina chmelu sráží bílkoviny na rozdíl od flobafenů až při ochlazení mladiny. Vyčerpaná mladina si uchovává svůj původní lesk až asi do teploty 60 °C. Při nižších teplotách se začíná již kalit. Maximální tvorba kalů vůbec je při 2 °C. V praxi se dosahuje nejlepší flokulace hořkých kalů tehdy, je-li zchlazení mladiny od 50 °C na nižší teplotu provedeno pokud možno rychle a za pohybu. Zde jsou v nesporné výhodě ty pivovary, které používají moderních deskových průtokových chladičů, neboť gradient poklesu teploty mladiny je velký a za turbulentního pohybu [33].

Souhrn

Je uveden přehled a zhodnocení soudobých názorů na chemismus tvorby polymerních forem látek polyfenolového typu pivovarských surovin, resp. tvorbu jejich tříslovin, zejména chmelových. Je zhodnocen význam polyfenolových látek chmelu a sladu, ve vztahu k fyzikálně chemickým a organoleptickým vlastnostem piva, se zvláštním zřetelem k pivu českého typu.

Lektoroval J. Hubáček

Literatura

- [1] SILBEREISEN K., PLOMAN L.: Monatsschrift f. Brau. **16**, 1963 : 41.
- [2] HARRIS G., RICKETTS R. W.: J. Inst. Brew. **65**, 1959 : 331.
- [3] HARRIS G., RICKETTS R. W.: J. Inst. Brew. **65**, 1959 : 418.
- [4] HUBÁČEK J.: Kandidát. disert. práce na VŠZ v Praze, 1934.
- [5] STOCKER R. H.: Schweitzer Brauerei Rundschau. **78**, 1937 : 33.
- [6] FREUDENBERG K.: Ber. d. deutsch. chem. Gess. **53**, 1920 : 1416.
- [7] FREUDENBERG K.: Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. **27**, 1953 : 153.
- [8] LEBRETON P.: Petit J. Brass. 1957 : 253.
- [8a] MOŠTEK J.: Kvasný průmysl **15**, 1969 : 169.
- [9] FREUDENBERG K., WEINGES K.: Lieb. Ann. Chem. **61**, 1958 : 613.
- [10] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A., LUKÁŠOVÁ-NOVOTNÁ M.: Kvasný průmysl **5**, 1959 : 153.
- [11] FREUDENBERG K., WEINGES K.: Fortschr. d. Chemie organ. Naturst., Bd. **16**, Wien 1958.
- [12] FREUDENBERG K., WEINGES K.: Lieb. Ann. Chem. **668**, 1963 : 92.
- [13] KURSANOV A. L. et al.: Biochimija **12**, 1947 : 421.
- [14] HATHWAY D. E., SEAKINS J. W. T.: Biochem. J. **65** 1957 : 32.
- [15] HATHWAY D. E., SEAKINS J. W. T.: Biochem. J. **65**, 1957 : 293.
- [16] HATHWAY D. E.: Biochem. J. **70**, 1958 : 34.
- [17] VYSTRČIL A.: Rostlinné glykosidy, Praha SNTL 1957.
- [18] FREUDENBERG K. et al.: Angew. Chem. (Internat. Ed.) **1**, 1962 : 158.
- [19] WEINGES K., NAYA Y., TORIBO F.: Chem. Ber. **96**, 1963 : 2870.
- [20] WEINGES K., TORIBO F.: Lieb. Ann. Chem. **681**, 1965 : 161.
- [21] HARRIS G., RICKETTS R. W.: J. Inst. Brew. **64**, 1958 : 22.
- [22] SILBEREISEN K., KRAFCZYK F.: Naturwiss. **52**, 1965 : 395.
- [23] ROLLMAN B., VANCRAENENBROECK R.: Arch. Inter. Physiol. et Biochem. **74**, 1966 : 715.
- [24] MOŠTEK J., TOLAR J.: Sborník VŠCHT v Praze, **E 16** Potraviny 1967 : 5.
- [25] MIKŠCHIK E.: Mitt. d. Versuchs. St.-Gär. gew. Wien 1933 : 153.
- [26] LÜERS H., NIEDERMAYER H.: Wochenschrift f. Brau. **122**, 1940 : 129.

[27] BILGRAM H.: Wochenschrift f. Brau. 1929 : 137.

[28] SALAČ V., KOTRLÁ-HAPALOVÁ M., VANČURA M.: Brauwiss. 7, 1954 : 28; 8, 1955 : 5.

[29] DEUYX Y.: Petit J. Brass. No 2444-46, 1953.

[30] Österr. Patent Nr. 191 823.

[31] MOŠTEK J.: Brauwiss. 21, 1968 : 253.

[32] CLERCK de J.: Lehrbuch der Brauerei, I. Bd., Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin 1964.

[33] MOŠTEK J., DYR J.: Sborník VŠCHT v Praze, Potravin. technol. 6, část 2, 1962 : 195.

CHEMISM OF POLYPHENOL COMPOUNDS (TANNING MATTERS) PRESENT IN HOPS AND THEIR IMPORTANCE FOR BREWING INDUSTRY. PART II. FORMATION OF POLYMERS WITH TANNING PROPERTIES

The author outlines modern views on the chemism of processes resulting in the formation of polymer forms of polyphenol matters used by brewing industry, i. e. essentially of the chemism of tanning matters present in hops. Polyphenol components of hops and malt are important factors of brewing technology, since they determine to a certain degree physical, chemical and organoleptic properties of beer. Specific properties of Czech beer are at this juncture discussed in detail.

ХИМИЗМ ПОЛИФЕНОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ (ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ) НАХОДЯЩИХСЯ В ХМЕЛЕ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ПИВОВАРЕННОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ. 2-АЯ ЧАСТЬ. ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРОВ С ДУБЯЩИМИ СВОЙСТВАМИ

В статье приведены современные взгляды на химизм образования полимерных форм соединений типа полифенолов, встречающихся в сырье, применяемом пивоваренной промышленностью, т. е. по существу на химизм образования дубильных веществ в хмеле. Подчеркивается значение полифеноловых составляющих хмеля и солода как факторов, влияющих на физические, химические и вкусовые свойства пива. Особое внимание уделяется в связи с рассматриваемой проблематикой специфике чехословацкого пива.

CHEMIE DER POLYPHENOLE (GERBSTOFFE) DES HOPFENS UND IHRE BRAUTECHNOLOGISCHE BEDEUTUNG. II. BILDUNG DER POLYMERE MIT GERBSTOFFEIGENSCHAFTEN

Der Artikel enthält eine Übersicht und Bewertung der gegenwärtigen Ansichten über den Mechanismus der Bildung der polymeren Formen der Polyphenolstoffe in Brauereirohstoffen, bzw. die Bildung ihrer Gerbstoffe, insb. Hopfengerbstoffe. Es wird die Bedeutung der Polyphenole des Hopfens und des Malzes im Verhältnis zu den physiko-chemischen und organoleptischen Eigenschaften des Bieres bewertet, und zwar mit besonderer Hinsicht auf die Biere des böhmischen Typs.