

Z výzkumu a praxe

TVORBA ALDEHYDŮ ŘÍZENOU OXIDACÍ AMINOKYSELIN PIVA

Doc. Ing. JAN ŠAVEL, CSc., Ing. DANA ZDVIHALOVÁ, Ing. MARIE PROKOPOVÁ,
Budějovický Budvar, n. p., Č. Budějovice

Klíčová slova: pivo, aminokyseliny, oxidace, aldehydy, oxidační destrukční analýza

1. ÚVOD

Stárnutí piva úzce souvisí s tvorbou těkavých aldehydů, které mohou vznikat z nenasyčených mastných kyselin, vyšších alkoholů, hořkých kyselin, nebo aminokyselin. Při oxidaci těchto sloučenin se mohou uplatňovat aktivní formy kyslíku, mezi něž patří superoxidový, perhydroxylový a hydroxylový radikál. Oxidace se rovněž může zúčastnit singletový kyslík [1]. Aktivní formy kyslíku mohou vznikat za účinku světla, za tmy při účasti kovových iontů, popř. za současného působení obou mechanismů [2,3]. Vzhledem k tepelné inaktivaci enzymů v pasterovaném pivu se nepředpokládá účast enzymových reakcí.

Výskyt lepenkové nebo papírové chuti v prvních fázích stárnutí piva se obvykle přisuzuje *trans*-2-nonenalu, ačkoliv analyticky se mohou prokázat další příbuzné sloučeniny [4].

Nežádoucí oxidační reakce se mohou alespoň částečně potlačit přítomností antioxidantů, mezi něž patří kyselina askorbová, glutathion, vitamin E a polyfenolické látky [1].

Ačkoliv se těkavé aldehydy mohou tvořit tzv. Streckerovým odbouráváním aminokyselin, nepřikládá se v současnosti tomuto mechanismu větší význam. Při reakci se předpokládá přítomnost α -dikarbonylových látek, které předtím vznikají oxidací aromatických nebo alifatických sloučenin se sousedními hydroxylovými skupinami, popř. tzv. Amadoriho přesmykem v průběhu Maillardovy reakce [5].

Aminokyseliny jsou součástí sladiny, mladiny a piva. Při hlavním kvašení je možné aminokyseliny rozdělit do skupin podle rychlosti jejich využívání kvasinkami [6]. Rozdíl v zastoupení aminokyselin v meziproduktech a pivu mají význam vzhledem k rozdílnému působení aktivních forem kyslíku na jednotlivé aminokyseliny. V pivu se prokázalo více než 20 aminokyselin. Nejvíce byl zastoupen prolin (okolo 200 mg.l⁻¹), obsahy kyseliny α -aminomáslé, β -alaninu, fenylalaninu a valinu se dohromady pohybovaly okolo 50 až 100 mg.l⁻¹. Ostatní aminokyseliny se v pivu vyskytovaly pouze v malém množství [7].

Thum et al. zjistili po přidavku aminokyselin do piva a jeho uchovávání při vyšší teplotě vzrůst těkavých aldehydů teprve po silném přidavku aminokyselin. Z toho usuzují, že aldehydy se přednostně tvoří oxidací vyšších alkoholů [5].

V předchozí práci jsme zjistili, že typické příznaky stárnutí piva se mohou vyvolat chemickou oxidací peroxodisíranem amonným,

nebo draselným [8]. Změny absorpčních spekter chemicky i fotochemicky oxidovaných piv byly podobné [9].

Sledování změn spotřebitelky významných vlastností piva po působení různých oxidačních změn jsme nazvali oxidační destrukční analýzou (ODA). Po oxidaci piva a sladiny bylo možné identifikovat cizí vůně různého charakteru a prokázat přítomnost těkavých aldehydů [10].

Působením silných oxidačních činidel, např. chlornanu sodného, lze snadno připravit těkavé aldehydy přímo z aminokyselin [11]. Proto jsme oxidovali roztoky aminokyselin činidly, používanými při ODA.

2. MATERIÁL, METODY, PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

2.1 Chemikálie a činidla

N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiaminidiammoniumchlorid (RIEDEL-de HAËN, SRN), peroxodisíran amonný čistý, manganistan draselný, hydrogensířičitan sodný p.a. (LACHEMA Brno, ČR), 2,4-dinitrofenylhydrazin p.a., kyselina 2-thiobarbiturová, purum (FLUKA, Švýcarsko), DL- α -alanin, DL- β -alanin, DL-prolin, DL-methionin, DL-fenylalanin, fuchsin (SIGMA), dichroman draselný p.a., kyselina chlorovodíková 37 % (MERCK, SRN).

Pro oxidaci aminokyselin, sladiny a piva se připravily vodné roztoky manganistanu draselného ($c = 5 \%$), dichromanu draselného ($c = 10 \%$) a peroxodisíranu amonného ($c = 40 \%$) rozpuštěním v destilované vodě.

Roztok melanoidinů se připravil autoklá-

vováním roztoku 72 g maltosy, 18 g glukosy, 150 mg xylosy a 1,5 g glycinu v 1 litru fosfátového ústojného roztoku ($c = 0,02 \text{ mol.l}^{-1}$, pH = 5,5) 30 min při 120 °C. V původní práci se stejný roztok vařil 100 min pod zpětným chladičem [12]. Po ochlazení byla absorbance výsledného roztoku 0,177 (380 nm) a 0,070 (430 nm).

2.2 Stanovení aldehydů Schiffovým činidlem (upraveno podle [11])

Schiffovo činidlo : 0,2 g fuchsinu se rozpustilo za tepla ve 120 ml vody, po ochlazení se přidaly 2 g hydrogensířičitanu sodného, rozpuštěného ve 20 ml vody, 2 ml kyseliny chlorovodíkové a směs se zředila na 200 ml. K 1 ml vzorku se přidal 1 ml činidla a po 5 min se měřila absorbance při 560 nm proti slepému pokusu.

2.3 Stanovení aldehydů reakcí s kyselinou thiobarbiturovou (TBS) (upraveno podle [13])

Činidlo: Roztok kyseliny thiobarbiturové ($c = 0,025 \text{ mol.l}^{-1}$) v kyselině fosforečné ($c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$) se připravilo rozpuštěním 0,36 g TBS v roztoku 6,7 ml 85 % kyseliny fosforečné v 90 ml destilované vody a roztok se doplnil na 100 ml. Po smísení 5 ml vzorku s 2 ml činidla se roztok doplnil na 10 ml a po ohřevu ve vodní lázni 1 h při 60 °C se měřily absorbance při 450 a 530 nm proti slepému pokusu.

2.4 Stanovení karbonylových sloučenin

Karbonylové sloučeniny se prokazovaly smísením stejných objemů vzorku a 0,2 %

Tabulka 1. Těkavé látky po oxidaci aminokyselin peroxodisíranem amonným ve vodě a sladine

Aminokyselina	Prostředí	Popis vůně	Intenzita vůně	Absorbance		
				Schiffovo činidlo	Kyselina thiobarbiturová	
				560 nm	450 nm	530 nm
α -alanin	dest. voda	čerstvé máslo	2	0,215	0,015	0,012
α -alanin	sladina	štiplavá, lepenková	3	0,036	0,054	0,021
β -alanin	dest. voda	zatuchlá	1	0,009	0,009	0,002
β -alanin	sladina	štiplavá, lepenková	3	0,047	0,045	0,022
fenylalanin	dest. voda	štiplavá, květinová	5	1,399	0,081	0,011
fenylalanin	sladina	štiplavá, lepenková	3	0,230	0,076	0,020
methionin	dest. voda	zkažené zelí	5	0,021	0,047	0,948
methionin	sladina	štiplavá, lepenková	3	0,025	0,039	0,068
prolin	dest. voda	zatuchlá	2	0,001	0,019	0,048
prolin	sladina	štiplavá, lepenková	3	0,039	0,054	0,019
bez přidavku	sladina	štiplavá, lepenková	3	0,057	0,051	0,033

roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu v kyselině chlorovodíkové ($c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$) s následným zahřátím vzorku 30 min při 60°C . Intenzita zákalu se posuzovala vizuálně.

2.5 Přístroje a zařízení

Hodnoty absorpčních a absorpčních spektra se měřila spektrofotometrem CADAS 100 (Dr. B.Lange, SRN) v skleněné 1 cm kyvetě, s programy TEST, t-SCAN a PCSCAN s intervalem měření 10 nm. Zákal se měřil zákalometrem LTP 6B (Dr. B.Lange, SRN).

3. VÝSLEDKY

3.1 Příprava těkavých oxidačních produktů aminokyselin

K 100 ml roztoku aminokyseliny (500 mg.l^{-1}) v destilované vodě, nebo 12 % sladině se přidal 40 % roztok peroxodisíranu amonného do výsledné koncentrace 0,2 % a směs se přeháněla vodní párou (tab. 1). Do předlohy se jímalo prvních 50 ml destilátu. V destilátu se prokazovala přítomnost těkavých aldehydů reakcí se Schiffovým činidlem, kyselinou thiobarbiturovou a 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH).

Tabulka 4. Reakce oxidačních produktů aminokyselin s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH)

Aminokyselina	Prostředí	Činidlo	Reakce s DNPH
α -alanin	dest. voda	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	slabý opál
α -alanin	sladina	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	opál
β -alanin	dest. voda	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	čiré
β -alanin	sladina	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	opál
prolin	dest. voda	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	čiré
prolin	sladina	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	opál
fenylalanin	dest. voda	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	zákal
fenylalanin	sladina	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	zákal
methionin	dest. voda	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	slabý opál
methionin	sladina	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	opál
fenylalanin	dest. voda	KMnO_4	opál
fenylalanin	sladina	KMnO_4	opál
methionin	dest. voda	KMnO_4	čiré
methionin	sladina	KMnO_4	opál
fenylalanin	dest. voda	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	čiré
fenylalanin	sladina	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	opál
methionin	dest. voda	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	čiré
methionin	sladina	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	opál
bez přídavku	sladina	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	opál
bez přídavku	sladina	KMnO_4	opál
bez přídavku	sladina	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	opál

Stejným způsobem se připravily těkavé produkty aminokyselin po oxidaci manganistanem a dichromanem draselným ve výsledné koncentraci 0,2 % ve vodě (tab. 2 a 3). Intenzita cizí vůně se hodnotila v pěti stupních (1 - velmi slabá, 2 - slabá, 3 - střední, 4 - silná, 5 - velmi silná).

Aminokyseliny, oxidované ve vodném prostředí poskytovaly cizí vůně různého charakteru (tab. 1-3). Typická byla intenzivní vůně zkaženého zeli po oxidaci methioninu, nebo ostrá, štiplavá vůně s příznakem květinové vůně po oxidaci fenylalaninu. Některé

Tabulka 2. Těkavé látky po oxidaci aminokyselin manganistanem draselným ve vodě a sladině

Aminokyselina	Prostředí	Popis vůně	Intenzita vůně	Absorbance		
				Schiffovo činidlo	Kyselina thiobarbiturová	
				560 nm	450 nm	530 nm
fenylalanin	dest. voda	hořké mandle	3	0,002	0,007	0,005
fenylalanin	sladina	zatuchlá	3	0,003	0,108	0,032
methionin	dest. voda	zatuchlá	1	0,002	0,017	0,007
methionin	sladina	zatuchlá	4	0,000	0,103	0,031
bez přídavku	sladina	zatuchlá	4	0,009	0,099	0,036

Tabulka 3. Těkavé látky po oxidaci aminokyselin dichromanem draselným ve vodě a sladině

Aminokyselina	Prostředí	Popis vůně	Intenzita vůně	Absorbance		
				Schiffovo činidlo	Kyselina thiobarbiturová	
				560 nm	450 nm	530 nm
fenylalanin	dest. voda	zatuchlá	1	0,003	0,027	0,007
fenylalanin	sladina	zatuchlá	3	0,001	0,091	0,022
methionin	dest. voda	zkažené zeli	3	0,002	0,011	0,005
methionin	sladina	zatuchlá	3	0,001	0,085	0,026
bez přídavku	sladina	zatuchlá	3	0,001	0,072	0,022

aminokyseliny neposkytovaly po oxidaci žádnou cizí vůni, jiné cizí vůně se obtížně definovaly a označily se jako zatuchlá.

Oxidační produkty aminokyselin rozpuštěných ve sladině nevyskyzovaly cizí vůně, typické pro oxidace peroxodisíranem amonným ve vodném prostředí. Místo nich vznikala vždy charakteristická štiplavá vůně po lepence stejného charakteru, jako při oxidaci samotné sladině, nebo piva (tab. 2 a 3).

Oxidační produkty aminokyselin poskytovaly reakce na těkavé karbonylové sloučeniny s kyselinou thiobarbiturovou za tvorby žlutých, nebo růžových reakčních produktů. Sladina silně potlačovala tvorbu těchto produktů u některých aminokyselin, např. u fenylalaninu a methioninu. Většina oxidačních produktů také reagovala s 2,4-dinitrofenylhydrazinem, nejsilněji fenylalanin (tab. 4).

Z tab. 1 je rovněž patrná závislost intenzity barevné reakce na druhu aminokyseliny a činidla. Oxidační produkt methioninu např. poskytoval silnou reakci s kys. thiobarbiturovou při 530 nm, zatímco u fenylalaninu bylo vhodnější Schiffovo činidlo.

3.2 Oxidace fenylalaninu a methioninu v přítomnosti dalších látek

K roztokům aminokyselin ($c = 2000 \text{ mg.l}^{-1}$) ve vodě, ethanolu ($c = 4\%$), kyselině askorbové ($c = 100 \text{ mg.l}^{-1}$),

nebo v roztoku melanoidních látek se přidal peroxodisíran amonný ($c = 40\%$) do výsledné koncentrace 0,2 % a 150 ml roztoku se v 200 ml uzavřené láhvi ponechalo 24 h při 25°C . Po této době se posuzoval charakter cizí vůně (tab. 5).

Po oxidaci obou aminokyselin bylo možné již po 24 h při 25°C prokázat typickou vůni po květinách u fenylalaninu, nebo po zkaženém zeli u methioninu. Přítomnost doprovodných látek měla jen menší význam, přičemž melanoidiny a ethanol cizí vůně mírně zeslabovaly, kyselina askorbová cizí vůni neovlivnila. Charakter cizí vůně se u fenylalaninu v přítomnosti melanoidinů změnil, což zřejmě souvisí s oxidací glycinu i z něj vzniklých melanoidinů.

Těkavé produkty oxidace aminokyselin ($c = 500 \text{ mg.l}^{-1}$) peroxodisíranem amonným po přehánění vodní párou v přítomnosti melanoidních látek, ethanolu a kyseliny askorbové se připravily podle odst. 3.1 (tab. 6).

Při oxidaci fenylalaninu a methioninu v přítomnosti ethanolu a melanoidinů s přeháněním vodní párou se intenzita cizích vůní snížila, přičemž se u oxidačních produktů fenylalaninu změnil i charakter cizí vůně. Oxi-

Tabulka 5. Tvorba cizí vůně po oxidaci aminokyselin peroxodisíranem amonným při 25°C

Aminokyselina	Prostředí	Popis vůně	Intenzita vůně
fenylalanin	dest. voda	štiplavá, květinová	2
fenylalanin	ethanol	lihová, květinová	1
fenylalanin	melanoidiny	zatuchlá	1
fenylalanin	kyselina askorbová	štiplavá, květinová	2
methionin	dest. voda	zkažené zeli	4
methionin	ethanol	zkažené zeli	3
methionin	melanoidiny	zkažené zeli	3
methionin	kyselina askorbová	zkažené zeli	4

Tabulka 6. Tvorba cizí vůně po oxidaci aminokyseliny peroxodisíranem amonným při 100 °C

Aminokyselina	Prostředí	Popis vůně	Intenzita vůně
fenylalanin	dest. voda	štiplavá, květinová	5
fenylalanin	ethanol	lihová, citrusová	4
fenylalanin	melanoidiny	štiplavá, esterová	3
fenylalanin	kyselina askorbová	štiplavá, květinová	5
methionin	dest. voda	zkažené zeli	5
methionin	ethanol	lihová, zeli	4
methionin	melanoidiny	zkažené zeli	3
methionin	kyselina askorbová	zkažené zeli	5

dace za přítomnosti ethanolu poskytla např. výraznou citrusovou vůni. Je zajímavé, že přítomnost kyseliny askorbové neměla na tvorbu cizí vůně vliv.

3.3 Oxidace fenylalaninu a methioninu v 12 % piva a v destilované vodě

K 12 % piva, nebo destilované vodě v 0,5 l láhvích se přidal fenylalanin, nebo methionin, rozpuštěný v 5 ml dest. vody tak, aby výsledná koncentrace aminokyseliny byla 500 mg.l⁻¹ a peroxodisíran amonný ve výsledné koncentraci 0,05 % v pivu. V srovnávacích pokusech se místo roztoků aminokyselin, nebo peroxodisíranu amonného přidávala destilovaná voda. Láhve se uzavřely korunkou a po 3 dnech při 50 °C se po ochlazení posoudila vůně vzorků.

Také oxidace aminokyselin v uzavřených pivních láhvích při teplotě 50 °C prokázala intenzivní tvorbu cizích vůní ve vodných roztocích stejného charakteru jako při oxidaci při 25 °C (odst.3.2). Přítomnost piva opět potlačovala tvorbu cizích vůní z jednotlivých aminokyselin, zatímco typická ostrá, štiplavá vůně po lepence byla dobře patrná.

3.4 Barevná reakce vzorku s peroxodisíranem a tetramethyl-p-fenylendiaminem (TMPD)

Barevná reakce roztoku TMPD (c = 0,001 %) s peroxodisíranem amonným se měřila při 610 nm v závislosti na čase a na jeho koncentraci (obr. 1).

K 0,5 ml čerstvě připraveného roztoku

TMPD (c = 0,01 %) se přidalo 3,5 ml destilované vody, 0,5 ml vzorku (mladiny, piva, nebo dest. vody) a 0,5 ml čerstvě připraveného peroxodisíranu amonného (c = 0,01 %). Změny absorbance při 610 nm uvádí obr. 1.

3.5 Fotochemická oxidace fenylalaninu a methioninu

Roztok methioninu a fenylalaninu (c = 200 mg.l⁻¹) s přídavkem riboflavinu (c =

5 mg.l⁻¹) a bez něj se ozařoval ve válcovitých kyvetách (Dr.B.Lange, SRN) s vnějším průměrem 1,3 cm. Polovina nádobek se před naplněním vzorku obalila hliníkovou fólií.

Kyvety se umístily v horizontální poloze v ultratermostatu tak, aby je překrývala 5 mm silná vrstva vody a ze vzdálenosti 20 mm ozařovaly 150 min v kolmém směru 50 W halogenovou žárovkou. Po expozici se ve vzorcích posoudily změny vůně a prokazoval obsah karbonylových látek reakcí s kyselinou thio-barbiturovou a 2, 4-dinitrofenylhydrazinem.

Po fotochemické oxidaci se cizí vůně prokázala pouze u vzorku s methioninem, ozařovaným za přítomnosti riboflavinu. Vzorek s fenylalaninem nevykazoval ani cizí vůni, ani reakce na karbonylové látky.

4. DISKUSE

Aminokyseliny se v pivovarské literatuře považují za možné prekursorů těkavých aldehydů, jejichž přítomnost charakterizuje stárnutí piva. V poslední době se tvorba těchto sloučenin spíše spojuje s oxidačními produkty vyšších alkoholů, které jsou rovněž přítomné v pivu.

V minulém sdělení jsme prokázali, že oxidací piva nebo sladiny peroxodisíranem amonným lze získat těkavé aldehydy s ostrou, štiplavou vůní po lepence [10]. Podle našich zkušeností není tato cizí vůně shodná s vůní *trans*-2-nonenalu, ačkoliv podle charakteru cizí vůně nebylo možné vyloučit částečnou přítomnost této složky v oxidačních produktech piva.

Při posuzování vůně standardu *trans*-2-nonenalu jsme cizí vůni charakterizovali jako oxidační, papírovou, zatímco těkavé produkty oxidace peroxodisíranu amonného měly štiplavou vůni po lepence.

Rozdílné cizí vůně patrně souvisejí se vznikem těkavých karbonylových látek z aminokyselin, jak o tom svědčí barevné reakce s kyselinou thio-barbiturovou, Schiffovým činidlem a 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Květinová vůně byla podobná vůni fenylacetaldehydu, který by logicky vznikl oxidací fenylalaninu. Podobně lze očekávat vznik těkavých sirných sloučenin z methioninu podle výsledků, uvedených v tab. 1.

Při orientačních pokusech vznikaly další produkty s typickou cizí vůní i při oxidaci jiných aminokyselin, než je uvedeno v tab. 1.

Při působení oxidačního činidla na aminokyseliny ve sladince se tvorba typických cizí vůní potlačila, podobně jako množství vznikajících aldehydů. Sladina pravděpodobně obsahuje látky, které mohou významně inhibovat oxidaci aminokyselin. Přednostně se přitom tvoří oxidační produkt se štiplavou oxidační vůní po lepence. Vznik této látky, nebo směsi látek patrně není inhibován látkami sladiny. Vůně po lepence může rovněž překrývat vůně ostatních těkavých látek.

Podle předchozích orientačních výsledků, neuveřejněných v této práci, při modelové oxidaci sladiny, mladiny i piva peroxodisíranem amonným za laboratorní teploty se nejsilnější cizí vůně získá u piva. Schopnost bránit oxidaci aminokyselin během výroby piva a jeho skladování pravděpodobně klesá.

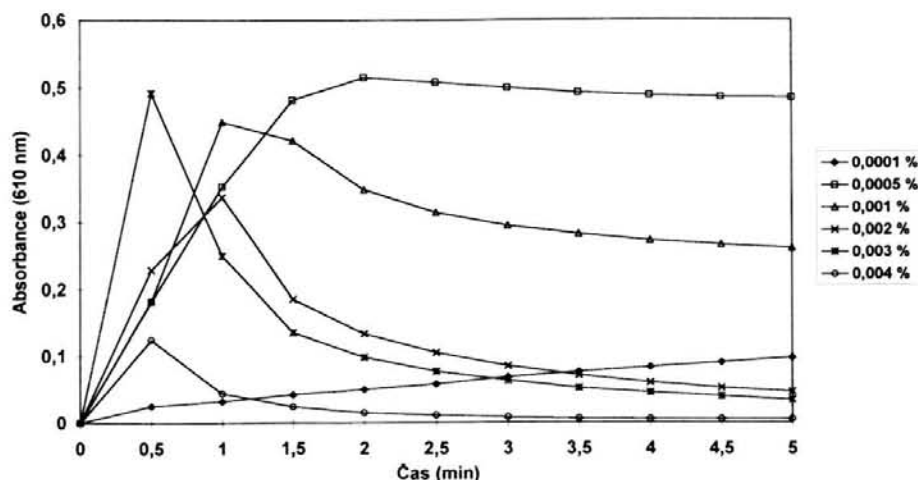
Podle literárních údajů se po přidavku aminokyselin do piva a jeho tepelném šokování zvýšil obsah těkavých aldehydů, autoři však nepovažovali toto zvýšení za významné. Obsah fenylacetaldehydu se po přidavku 3 mmol fenylalaninu po dlouhodobém skladování, kombinovaném s tepelným šokem zvýšil asi pětkrát [5].

Při oxidaci aminokyselin manganistanem a dichromanem draselným se pouze u methioninu prokázala vůně po zkaženém zeli po oxidaci manganistanem draselným. V ostatních případech se získala obtížně definovatelná zatuchlá cizí vůně (tab. 2 a 3).

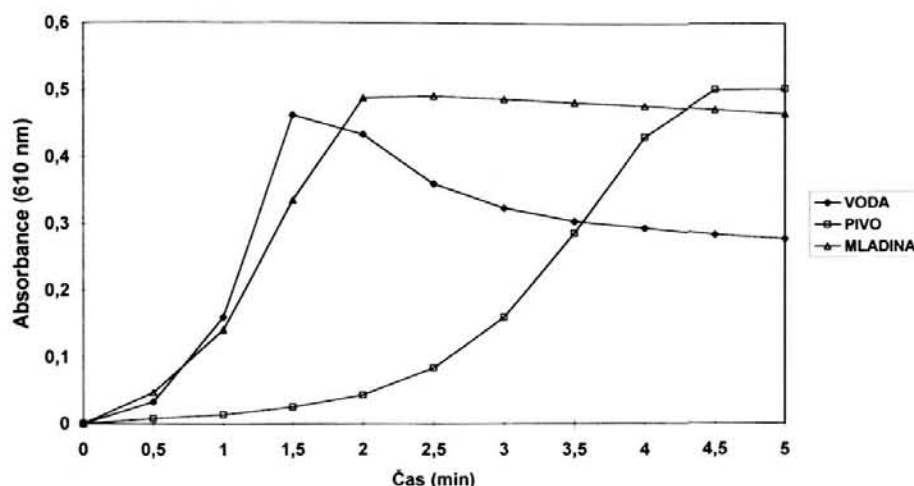
Také s těmito oxidačními činidly aminokyseliny poskytovaly těkavé karbonylové látky, reagující s 2, 4-dinitrofenylhydrazinem, s výjimkou dvou případů, kdy tato reakce nebyla patrně dostatečně citlivá (tab. 4).

Oxidační destrukční analýza piva prokázala různý charakter cizích vůní po oxidaci peroxodisíranem amonným, manganistanem draselným, nebo peroxidem vodíku [10]. Při oxidaci fenylalaninu manganistanem draselným se např. u fenylalaninu získala vůně po hořkých mandlích, připomínající benzaldehyd místo květinové vůně po oxidaci peroxodisíranem.

Je pravděpodobné, že přímá oxidace aminokyselin ve stárnoucím pivu závisí na druhu oxidačního činidla a přítomnosti látek, blokujících oxidaci. V pivu mohou pů-



Obr. 1 Závislost intenzity zbarvení reakce s TMPD (0,001 %) na koncentraci peroxodisíranu amonného (0,0001–0,004 %) a na čase



Obr. 2 Reakce TMPD (0,001 %) s peroxidisíranem amonným (0,001 %) s mladinou a pivem

sobit oxidační činidla s různou oxidační schopností, což souvisí s existencí různých aktivních forem kyslíku.

Podle získaných výsledků lze předpokládat tvorbu těkavých aldehydů přímou oxidací aminokyselin aktivními formami kyslíku se současným antioxidačním působením látek sladiny, mladiny, nebo piva. Na podílu obou reakcí by potom závisela intenzita vznikajících cizích vůní a chuti i tvorba těkavých karbonylových sloučenin. Jako druhou variantu vzniku těchto látek lze předpokládat i primární reakci aminokyselin se sacharidy a sekundární reakci směsi reakčních látek a produktů s aktivními formami kyslíku. Při poměrně širokém spektru aminokyselin v pivu a přítomnosti různých forem kyslíku by mohly vznikat cizí vůně nejrůznějšího charakteru.

Při modelové oxidaci obou aminokyselin v přítomnosti ethanolu a melanoidinů se ovlivnily intenzity a v některých případech i charakter cizích vůní. Na výsledné vůni a chuti piva se při stárnutí a patrně již při jeho výrobě mohou podílet oxidační produkty aminokyselin, alkoholů a melanoidinů.

Při uvážení velkého počtu možných kombinací vzájemných reakcí mezi přítomnými sacharidy a jednotlivými aminokyselinami si lze představit velké množství produktů melanoidního typu, kombinovaného s volnými aminokyselinami, které již ve sladidě mohou podléhat oxidaci molekulárním i aktivním kyslíkem.

Při oxidaci směsi melanoidních látek, vzniklých reakcí maltosy se směsí amino-

kyselin, se podařilo připravit produkty s vůní blízkou vůni, získané po oxidaci sladiny.

Při přirozeném stárnutí piva tyto procesy pokračují a přistupuje k nim oxidace ethanolu a vyšších alkoholů, které mohou opět výrazně změnit charakter cizích vůní (tab. 5, 6). Výsledkem je „koktejl“ nejrůznějších reakčních produktů (obr. 1).

Obecným modelem těchto reakcí je systém soutěživých oxidací, kde výsledek závisí na druhu a množství substrátů a na druhu a formě kyslíku. K posouzení schopnosti jednotlivých látek podléhat oxidaci jsme navrhli reakci peroxidisíranu amonného s tetramethyl-p-fenylendiaminem (TMPD). Účinnou oxidační složkou systému je patrně ozon, vznikající z peroxidisíranu amonného a reagující s TMPD. Oxidací TMPD vzniká modrofialové barvivo, které se podle podmínek reakce následně odbourává na bezbarvý produkt, jak je patrné z úbytku absorpce při 610 nm (obr. 1).

Za přítomnosti dalších látek lze posoudit míru soutěživé oxidace přidaných substrátů. Např. podle obr. 2 se více aktivního kyslíku vázalo v pivu, než v mladidě, jak vyplývá z měření absorpce při 610 nm. Reakce patrně nalezne uplatnění i pro výzkum přirozených antioxidantů.

Reakce podobného typu mohou poskytovat i jiná barviva, např. 4-amino-N,N-dimethylanilin, N, N-diethyl-p-fenylendiamin, N-ethyl-N-(2-hydroxyethyl)-p-fenylendiamin aj. Sírany obou posledních látek jsou součástí vývojek pro barevnou fotografii, známé pod označením T 22 a T 32. Na podobném principu se zakládá i známá Nadi-reakce, používaná k průkazu cytochromoxidasového systému [14].

Fotochemická oxidace byla úspěšná pouze u methioninu, nikoliv u fenylalaninu. Fotochemickým procesům pravděpodobně podléhají pouze některé aminokyseliny, jiné se přednostně oxidují jinou aktivní formou kyslíku. Je zajímavé, že charakter cizí

vůně po fotochemické oxidaci methioninu se shodoval s vůní po oxidaci peroxidisíranem amonným.

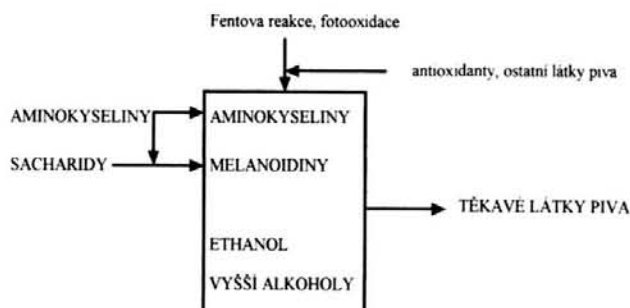
Lze předpokládat, že fotochemickým oxidacím budou podléhat nejspíše sírné aminokyseliny. Podle údajů literatury obsahuje pivo po fotochemické oxidaci methioninu kromě známého 3-methyl-2-buten-thiolu, udílejšího pivu letinkovou příchutí, také 3-(methylthiol)propionaldehyd, methylthiol, dimethylsulfid a sulfan. Jejich přítomnost lze rovněž teoreticky spojit s oxidací sírných aminokyselin piva [15].

Přítomnost barviv v pivu zajišťuje absorpci světelného záření a tvorbu singletového kyslíku. Všeobecně je známá úloha riboflavinu, jako senzitizeru při oxidaci ethanolu a aminokyselin v přítomnosti polyfenolových látek. Tato fotodegradace může probíhat i po skončení ozařování [16].

Podle nalezených výsledků chemické a fotochemické oxidace je pravděpodobné, že chemické reakce za tmy přednostně postihují jiné aminokyseliny, popř. melanoidní látky, než fotochemická oxidace.

LITERATURA

- [1] BAMFORTH, C.W., MULLER, R.E., WALKER, M.D.: J. Am.Soc. Brew. chem. **51**, 1993, s.79.
- [2] IRWIN, A.J., BARKER, R.L., PIPASTS, P.: J. Am.Soc.Brew.chem. **49**, 1991, s.140.
- [3] LUŇÁK, S., SEDLÁK, P.: J. Photochem. Photobiol. An.Chem. **68**, 1992, s.1.
- [4] BONTE, S., DUPIRE, S.: EBC Biochem. Microbiol. Group Bull. 1994, s.39.
- [5] THUM, B. et al.: Proc. Eur.Brew.Conv. Congr. 1995, s.491.
- [6] BENDOŮVÁ, O., KAHLER, M.: Pivovarské kvasinky. Vyd. I, SNTL, Praha 1981.
- [7] LHOTSKÝ, A.: Pivovarská enzymologie. Vyd. I, SNTL, ALFA, Praha, Bratislava 1971.
- [8] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M., ZDVIHALOVÁ, D.: Kvasny prum. **41**, 1995, s.374.
- [9] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasny prum. **43**, 1997, s.67.
- [10] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasny prum. **43**, 1997, s.132.
- [11] VEČEŘA, M., GASPARIČ, J.: Důkaz a identifikace organických látek. 2.vyd., Praha 1973.
- [12] HASHIMOTO, N., ESHIMA, T.: J. Am.Soc.Brew.Chem. **35**, 1977, s.145.
- [13] LANGE, B., VEJDELEK, Z.J.: Photo-metrische analyse. Verlagsgesellschaft Weinheim, SRN 1987.
- [14] ŠÍCHO, V.: Potravinařská biochemie. I.vyd., Praha 1969.
- [15] TEMPLAR, J., ARRIGAN, K., SIMPSON, W.J.: Brew. Dig. **70**, 1995, s.18.
- [16] BLOCKMANS, CH. et al.: Proc. Eur.Brew.Chem. Congr., 1981. s. 347.



Obr. 3 Oxidace sloučenin piva při tvorbě těkavých karbonylových látek piva

Fotochemická oxidace byla úspěšná pouze u methioninu, nikoliv u fenylalaninu. Fotochemickým procesům pravděpodobně podléhají pouze některé aminokyseliny, jiné se přednostně oxidují jinou aktivní formou kyslíku. Je zajímavé, že charakter cizí