

# Z výzkumu a praxe

## METODY PRŮKAZU AKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU VE SLADINĚ A PIVU

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

**Klíčová slova:** kyslík, stárnutí piva, spektrofotometrie, chemiluminiscence

### 1. ÚVOD

Reakce piva s aktivními formami kyslíku se v současnosti považují za hlavní příčinu přirozeného stárnutí piva. Jejich reaktivita je mnohonásobně vyšší než reaktivita molekulárního kyslíku v základním tripletovém stavu. V tomto relativně málo reaktivním stavu se kyslík nachází v plynné fázi v hrdlovém prostoru láhvi i rozpuštěný v pivu ihned po jeho stočení.

Za aktivní formy kyslíku se v současnosti pokládají singletový kyslík, superoxidový anion, peroxohydroxylový a hydroxylový radikál, popř. i peroxid vodíku [1]. Tyto látky vznikají fotochemickou reakcí za přítomnosti fotosenzitizérů, např. riboflavinu, nebo reakcemi za nepřístupu světla s účastí kovových iontů, popř. kombinacemi těchto reakcí.

Aktivní formy kyslíku mohou reagovat s většinou složek piva. Některé z nich poskytují těkavé karbonylové látky, které lze považovat za příčinu cizích vůní a chuti nebo alespoň za indikátory jejich vzniku [2]. Jejich přítomnost se obvykle vysvětluje oxidací volných aminokyselin nebo alkoholů. Za významný oxidační produkt, senzoričky aktivní ve velmi nízkých koncentracích, se pokládá *trans*-2-nonenal a s ním příbuzné sloučeniny [3].

Průkazy aktivních forem kyslíku se dělí mezi přímé a nepřímé. Za přímou metodu lze považovat spinovou elektronovou spektroskopii, prokazující přítomnost hydroxylového radikálu v oxidovaném pivu [4]. Jeho tvorbu potlačují ostatní látky piva, po jejichž vyčerpání však dále pokračuje

oxidační destrukce přítomných složek.

Nepřímé metody využívají zachytu aktivních forem kyslíku specifickými sloučeninami a průkazu změn jejich vlastností, nebo vzniklých reakčních produktů. Patří mezi ně spektrofotometrické měření změn k pivu přidaného 1,1-difeny-2-pikrylhydrazylu (DPPH), odbourávání barviva p-nitrosodimethylanilinu, nebo jiných organických barviv, používaných v barevné fotografii [5,6,7]. Podskupinu těchto metod tvoří spektrofotometrické sledování změn látek přítomných v pivu, např. polyfenolů a melanoidinů [8].

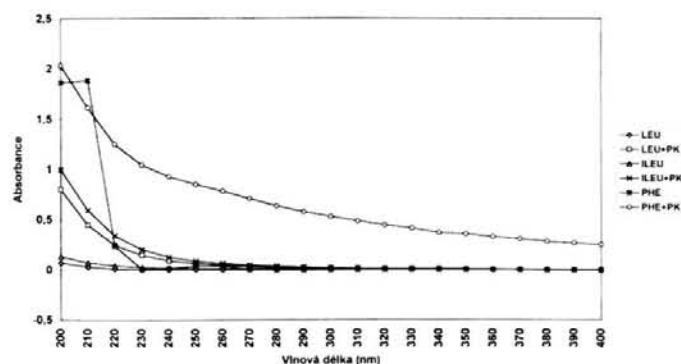
Za specifické metody průkazu přítomnosti aktivních forem kyslíku lze pokládat snadno čichově prokazatelný rozklad methioninu, nebo chemiluminiscenční metody [8, 9].

Tabulka 1. Oxidace aminokyselin a alkoholů ve vodném prostředí

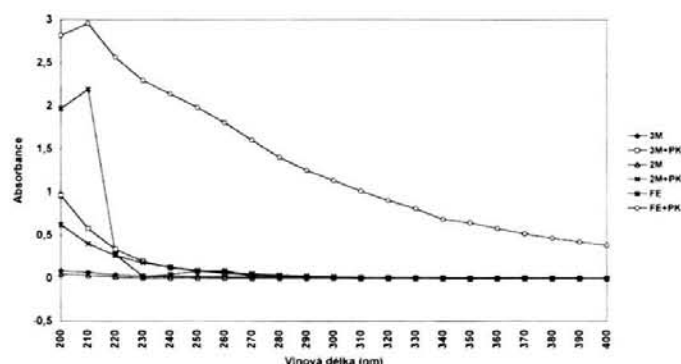
Sloučenina	Oxidační činidlo	Cizí vůně	Zákal j EBC	Absorbance			
				200 nm	800 nm	340 nm	430 nm
leucin	–	–	0,05	0,068	0,000	0,451	–0,001
leucin	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	zatuchlá	0,03	0,799	0,000	0,144	0,174
isoleucin	–	–	0,06	0,132	0,001	0,431	–0,002
isoleucin	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	nasládlá	0,07	0,995	0,001	0,061	0,180
fenylalanin	–	–	0,05	1,861	0,001	0,351	–0,001
fenylalanin	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	květinová	23,5	2,032	0,143	0,060	0,252
3-methyl-1-butanol	–	–	0,05	0,086	0,001	0,000	–0,005
3-methyl-1-butanol	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	zatuchlá	0,08	0,960	0,001	0,004	0,011
2-methyl-1-butanol	–	–	0,09	0,046	0,000	0,006	–0,002
2-methyl-1-butanol	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	nasládlá	0,11	0,619	0,002	0,001	0,025
2-fenyl-ethanol	–	květinová	0,06	1,966	0,003	0,004	–0,005
2-fenyl-ethanol	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	květinová	24,4	2,816	0,173	0,004	0,028
destilovaná voda	–	–	0,07	0,090	0,000	0,004	–0,004
destilovaná voda	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	–	0,06	1,029	0,000	0,002	–0,002

Tabulka 2. Oxidace aminokyselin a alkoholů v prostředí ethanolu

Sloučenina	Oxidační činidlo	Cizí vůně	Zákal j EBC	Absorbance			
				200 nm	800 nm	340 nm	430 nm
leucin	–	lihová	0,15	0,101	0,001	0,458	0,064
leucin	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	ovocná	0,16	0,112	0,001	0,416	2,876
isoleucin	–	lihová	0,13	0,117	0,002	0,452	0,066
isoleucin	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	ovocná	0,17	0,112	0,000	0,426	2,761
fenylalanin	–	lihová	0,11	1,894	0,002	0,315	0,060
fenylalanin	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	ovocná	0,18	2,097	0,004	0,155	2,635
3-methyl-1-butanol	–	lihová	0,04	0,152	0,002	0,009	0,053
3-methyl-1-butanol	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	ovocná	0,09	0,935	0,002	0,009	2,171
2-methyl-1-butanol	–	lihová	0,13	0,070	0,001	0,011	0,065
2-methyl-1-butanol	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	ovocná	0,17	0,085	0,001	0,009	2,758
2-fenyl-ethanol	–	květinová	0,11	2,061	0,002	0,012	0,078
2-fenyl-ethanol	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	květinová	0,69	2,394	0,003	0,013	2,888
destilovaná voda	–	lihová	0,06	0,062	0,002	0,000	0,042
destilovaná voda	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	ovocná	0,14	0,129	0,003	0,000	2,646



Obr. 1 Absorpční spektra leucinu (LEU), isoleucinu (ILEU), a fenylalaninu (PHE) po oxidaci peroxodisíranem draselným (PK) ve vodném prostředí



Obr. 2 Absorpční spektra 3-methyl-1-butanolu (3M), 2-methyl-1-butanolu (2M) a 2-fenyletanolu (FE) po oxidaci peroxodisíranem draselným (PK) ve vodném prostředí



Tabulka 3. Oxidace aminokyselin a alkoholů ve vodném a ethanolovém prostředí s přeháněním vodní párou

Sloučenina	Oxidační činidlo	Cizí vůně	Zákal jEBC	Absorbance			
				200 nm	800 nm	340 nm	430 nm
leucin	dest. voda	zatuchlá	0,15	0,700	0,001	0,001	0,023
leucin	ethanol	lihová	0,10	0,167	0,001	0,005	2,295
isoleucin	dest. voda	spálená	0,08	0,072	0,001	0,005	0,009
isoleucin	ethanol	lihová	0,12	0,113	0,002	0,001	2,295
fenylalanin	dest. voda	květinová	0,13	0,988	-0,001	0,004	0,007
fenylalanin	ethanol	lihová	0,10	0,621	0,002	-0,013	2,701
3-methyl-1-butanol	dest. voda	zatuchlá	0,15	0,100	-0,002	-0,015	0,019
3-methyl-1-butanol	ethanol	lihová	0,12	0,120	0,000	0,011	2,822
2-methyl-1-butanol	dest. voda	spálená	0,18	0,079	0,002	-0,012	0,020
2-methyl-1-butanol	ethanol	lihová	0,16	0,120	0,001	0,011	3,018
2-fenyl-ethanol	dest. voda	květinová	0,18	1,779	-0,002	-0,028	0,009
2-fenyl-ethanol	ethanol	citrusová	0,14	1,949	0,005	-0,008	3,029

## 2. MATERIÁL, METODY, PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

### 2.1 Chemikálie a činidla

Peroxodisíran draselný p.a.  $K_2S_2O_8$ , Nesslerovo činidlo, kyselina chlorovodíková 37 % (MERCK, SRN), L-leucin (LA-CHEMA Brno, ČR), DL-isoleucin, DL-fenylalanin 3-methyl-1-butanol, (S)-(-)-2-methyl-1-butanol (SIGMA), 2-fenylethanol, kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová TNBS, vodný roztok ( $c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$ ), (FLUKA, Švýcarsko), ethanol 96,5 % rafinovaný, jemný (Lihovar Chrudim, ČR).

Fosfátový tlumivý roztok:

vodný roztok hydrogenfosforečnanu sodného  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  ( $c = 5 \%$ ) se smísil s 5 % vodným roztokem dihydrogenfosforečnanu sodného  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  ( $c = 5 \%$ ) v přibližném poměru 100: 1,5 tak, aby výsledná hodnota pH byla 8,2.

Barevné činidlo pro stanovení aminodusíku: 0,274 ml TNBS ( $c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) se rozpustilo v 100 ml destilované vody.

### 2.2 Metody

#### 2.2.1 Stanovení aminodusíku (upraveno podle [10])

Po smíchání 1 ml vzorku modelových roztoků před a po oxidaci peroxodisíranem draselným s 5 ml fosfátového tlumivého roztoku se přidaly 2 ml barevného činidla, roz-

tok se promíchal a zahříván v temnu po 2 h při 40 °C a po ochlazení doplnil do 10 ml kyseliny chlorovodíkovou ( $c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Absorbance se měřila v křemenné kyteti při 340 nm proti slepému pokusu s destilovanou vodou místo vzorku.

#### 2.2.2 Reakce s Nesslerovým činidlem

Vzorek modelových roztoků před a po oxidaci peroxodisíranem draselným se zředil desetkrát, 4 ml zředěného roztoku se smísily s 1 ml činidla a po 15 min se změřila absorbance při 430 nm.

#### 2.2.3 Oxidace aminokyselin a alkoholů peroxodisíranem draselným

Roztoky vyšších alkoholů a aminokyselin ( $c = 50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v destilované vodě a ethanolu ( $c = 5 \%$  obj.) se zahřívaly 18 h při 60 °C v přítomnosti peroxodisíranu draselného ( $c = 0,1 \%$ ). Po ochlazení na 20 °C se změřil zákal, absorbance při 200 a 800 nm, reakce s Nesslerovým činidlem, TNBS a zaznamenala se absorpční spektra roztoků proti destilované vodě (obr. 1, 2, 3, tab. 1, 2).

#### 2.2.4 Charakterizace těkavých produktů oxidace aminokyselin a alkoholů

Roztoky alkoholů a aminokyselin ( $c = 50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v destilované vodě a vodném ethanolu ( $c = 5 \%$  obj.) se přeháněly vodní pá-

rou v přítomnosti peroxodisíranu draselného ( $c = 0,1 \%$ ). Z původních 100 ml roztoku se vodní párou přehnálo 50 ml destilátu a po doplnění na 100 ml destilovanou vodou se změřily absorbance při 200 a 800 nm, reakce s Nesslerovým činidlem, TNBS a zaznamenala se absorpční spektra roztoků proti destilované vodě (obr. 4, 5, tab. 3).

#### 2.2.5 Charakterizace těkavých produktů oxidace sladiny a piva

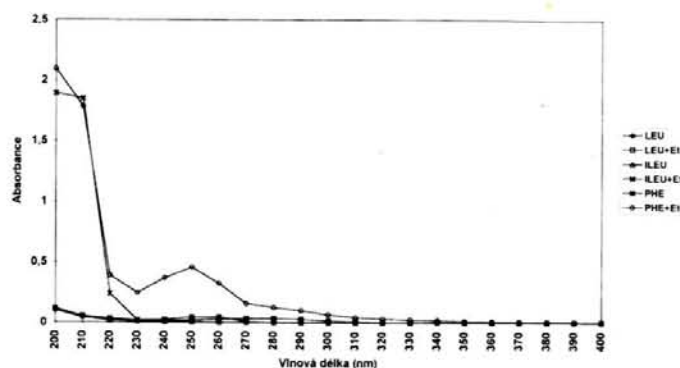
Sladina a pivo (původní koncentrace 12%) s přídavkem peroxodisíranu draselného ( $c = 0,1 \%$ ) a bez něj se přeháněly vodní párou. Z původních 100 ml vzorku se vodní párou přehnálo 50 ml destilátu a po doplnění na 100 ml destilovanou vodou se proměřila absorpční spektra proti destilované vodě (obr. 6).

### 2.3 Přístroje a zařízení

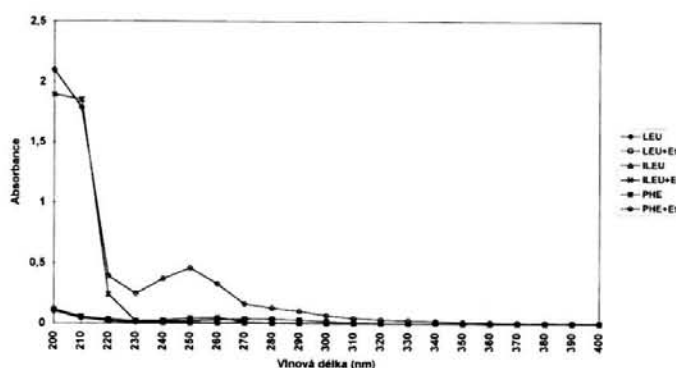
Hodnoty absorbcí a absorpční spektra se měřila spektrofotometrem CADAS 100 (Dr. B.Lange, SRN) v skleněné 1 cm kyteti, s využitím softwarových programů TEST, t-SCAN a PCSCAN s intervalem měření 10 nm. Zákal se měřil zákalometrem LTP 6B (Dr. B.Lange, SRN).

## 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

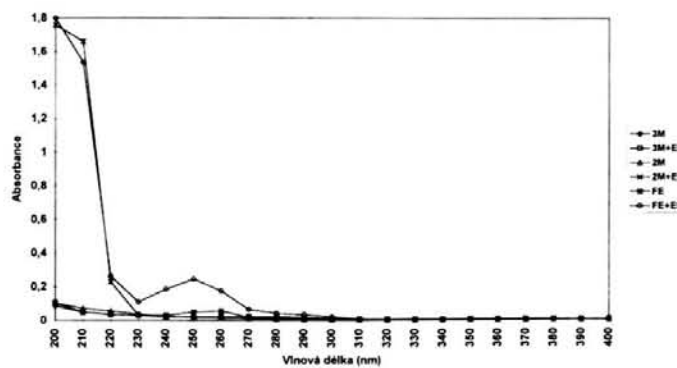
V poslední době přibývají důkazy o de-



Obr. 4 Absorpční spektra oxidačních produktů leucinu (LEU), isoleucinu (ILEU) a fenylalaninu (PHE) po oxidaci peroxodisíranem draselným (PK) s přeháněním vodní párou z vodného a ethanolového prostředí

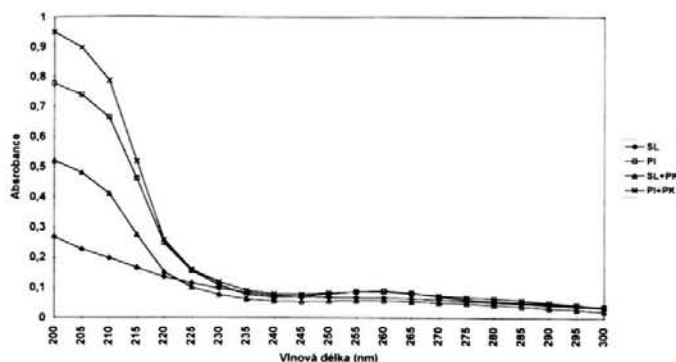


Obr. 3 Absorpční spektra leucinu (LEU), isoleucinu (ILEU) a fenylalaninu (PHE) po oxidaci peroxodisíranem draselným (PK) v ethanolovém prostředí



Obr. 5 Absorpční spektra oxidačních produktů 3-methyl-1-butanolu (3M), 2-methyl-1-butanolu (2M) a 2-fenyletanolu (FE) po oxidaci peroxodisíranem draselným ve vodném a ethanolovém (Et) prostředí





Obr. 6 Absorpční spektra těkavých látek sladiny (SL) a piva (PI) po přehánění vodní párou s přídavkem peroxidisíranu draselného (PK) a bez něj

struktivním působení aktivních forem kyslíku při stárnutí piva. Ačkoliv se největší pozornost soustřeďuje na reakce aktivních forem kyslíku s nenasyčenými mastnými kyselinami, prokázalo se, že aktivní formy kyslíku ochotně reagují s různými sloučeninami, přítomnými v pivu, např. s aminokyselinami a alkoholy. Tyto reakce by teoreticky mohly sloužit ke studiu a průkazu aktivních forem kyslíku.

Z literatury je známo, že karbonylové sloučeniny, obsahující konjugované dvojné vazby, silně absorbují v ultrafialové oblasti světla [11]. V této oblasti silně absorbují i aromatické sloučeniny, nacházející se v pivu a mladíně, např. fenylalanin, tyrosin a tryptofan, na čemž se zakládá spektrofotometrické stanovení bílkovin. V ultrafialové oblasti absorbují i *trans*-2-nonenal a furfural.

Experimentálně jsme zjistili, že absorbance těkavých produktů sladiny a mladiny po přehánění vodní párou silně absorbují v UV oblasti. Absorbance dále vzrůstala při současné oxidaci s peroxidisíranem draselným, jehož působení spojujeme se vznikem aktivních forem kyslíku (obr. 6). Oxidaci pravděpodobně vznikají těkavé látky podobné nebo shodné s oxidačními produkty aminokyselin a alkoholů, jejich totožnost však bude nutné teprve prokázat.

Podle předchozího zjištění poskytuje reakce peroxidisíranu amonného nebo draselného s pivem změny barvy, senzorické i koloidní stability typické pro stárnutí piva. Podle literárních údajů je aktivní složkou při reakci peroxidisíranu ozon [12]. Lze předpokládat, že sekundárními reakcemi vznikají další aktivní formy kyslíku.

Jako modelové sloučeniny pro oxidaci se použily aminokyseliny i vyšší alkoholy, obvykle přítomné v pivu. Při studiu jejich optických vlastností ve vodných roztocích vykazovaly některé z nich silnou absorbanci v UV oblasti, zejména sloučeniny s benzenovým jádrem, tj. fenylalanin a 2-fenylethanol (obr. 1, 2).

Z obr. 1, 2, 3 i tab. 1, 2 je patrná silná absorbance v ultrafialové oblasti ve vodném roztoku fenylalaninu. Po jeho oxidaci roztok absorboval v ultrafialové i ve viditelné oblasti, což souvisí s vyloučením viditelného zákalu. Ostatní aminokyseliny absorbovaly

teprve po oxidaci peroxidisíranem, podobně jako vyšší alkoholy (obr. 1, 2).

Stanovení aminodusíku prokázalo částečné odbourávání aminokyselin, což se projevilo i nárůstem intenzity reakce s Nesslerovým činidlem (tab. 1).

V ethanolovém roztoku se aminokyseliny degradovaly v menším rozsahu. Silná reakce s Ness-

lerovým činidlem souvisí s oxidací ethanolu (tab. 3). Z absorpčních spekter aminokyselin je patrné potlačení tvorby zákalů i částečné potlačení degradace aminokyselin (obr. 3).

Po zahřívání s peroxidisíranem draselným se vodné roztoky fenylalaninu a 2-fenylethanolu silně zakalily, jak prokázaly změny absorbancí i zákalu (tab. 1, obr. 1, 2). Možným vysvětlením je nižší rozpustnost vznikajících těkavých aldehydů, popř. dalších reakčních produktů. Alifatické alkoholy poskytovaly po oxidaci pouze málo výrazný nárůst absorbance, přihlídneme-li se ke zbytkové absorbanci roztoku peroxidisíranu draselného (tab. 1). Zvýšení absorbance roztoku peroxidisíranu draselného může souviset s přítomností absorbujících nečistot, popř. s absorbancí v roztoku vznikajícího ozonu [12].

Při oxidaci aromatických aminokyselin a alkoholů v přítomnosti vodného roztoku ethanolu typické zákal nevznikaly, což pravděpodobně souvisí se zvýšenou rozpustností těchto látek v ethanolu nebo s potlačením oxidace souběžně probíhající reakcí s ethanolem.

Přes podobnost zákalů vzniklých oxidací obou sloučenin se prokázaly drobné rozdíly ve vzhledu vyloučených látek. Zákal po oxidaci fenylalaninu tvořil větší částice s odstínem do žluta, které snáze sedimentovaly. Zákal vzniklý z fenylethanolu byl mléčně zbarvený a velmi stálý.

Pro ověření předchozích závěrů se aminokyseliny i vyšší alkoholy oxidovaly za současného odstraňování vznikajících těkavých sloučenin vodní párou v přítomnosti ethanolu a bez něj. Opět se prokázala silná absorbance v UV oblasti u aromatických sloučenin, zde je však nutné uvážit i možnou přítomnost těkavého 2-fenylethanolu.

Podle získaných výsledků se prokázal odlišný způsob degradace aminokyselin ve vodném ethanolovém prostředí a současně silná tvorba acetaldehydu z ethanolu. Reakce s TNBS byla podle očekávání negativní (tab. 3).

V obou případech ethanol potlačoval absorpční minimum při 250 nm, což opět svědčí pro interakci ethanolu při oxidační reakci. Podle očekávání poskytovaly oxidační produkty vodných roztoků aminokyselin i alkoholů senzoricky podobné sloučeniny,

přičemž ethanol ovlivňoval jejich charakter. Tyto závěry jsou ve shodě s předchozím porovnáním [9].

Pro posouzení chemických změn aminokyselin, alkoholů a jejich reakčních produktů se použily další chemické reakce. Reakce s kyselinou trinitrobenzensulfonovou by mohla prokázat pokles aminodusíku při reakci aminokyselin, zatímco Nesslerovo činidlo může reagovat jak s očekávanou tvorbou amonných iontů, tak se vznikajícími aldehydy. Podle literárních údajů reaguje Nesslerovo činidlo s aldehydy za vzniku žlutě nebo hnědě zbarvených produktů, popř. až za vyloučení kovové rtuti [11].

Podle údajů v tab. 1 se prokázalo snížení intenzity reakce s TNBS po oxidaci aminokyselin, a pouze slabá reakce s Nesslerovým činidlem po oxidaci vyšších alkoholů ve vodném prostředí. V ethanolovém prostředí byla zejména patrná silná reakce Nesslerova činidla s acetaldehydem, vznikajícím oxidací ethanolu (tab. 3).

Ze získaných výsledků lze odvodit možné reakce, využitelné pro studium působení aktivních forem kyslíku na různé sloučeniny, přítomné v pivu. Základní model představuje substrát reagující s aktivním kyslíkem, oxidující se za tvorby lehce měřitelného produktu, nebo úbytku substrátu. Tento systém může sloužit k posouzení reaktivity sloučenin s aktivními formami kyslíku, nebo naopak pro studium antioxidačních vlastností různých látek.

## Literatura

- [1] BAMFORTH, C.W., MULLER, R.E., WALKER, M. D.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **51**, 1993, s. 79.
- [2] NARZI, L., et al.: Techn. Q. Master Brew. Assoc. Am. **30**, 1993, s. 48.
- [3] BONTE, S., DUPIRE, S.: EBC Biochem. Microbiol. Group Bull., 1994, s. 39.
- [4] UCHIDA, M., ONO, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **54**, 1996, s. 198.
- [5] KANEDA, H., et al.: Techn. Q. Master Brew. Assoc. Am. **32**, 1995, s. 90.
- [6] KRALJIC, I., EL MOHSNI, S.: Photochem. Photobiol., **28**, 1978, s. 577.
- [7] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasný prům. **43**, 1997, s. 233.
- [8] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasný prům. **43**, 1997, s. 67.
- [9] KANEDA, H., et al.: Techn. Q. Master Brew. Assoc. Am. **32**, 1995, s. 76.
- [10] ANALYTICA-EBC. 4. vyd., Zurich 1987.
- [11] VEČERA, M., GASPARIČ, J.: Důkaz a identifikace organických látek. 2. vyd., Praha 1973.
- [12] MERCK INDEX: 12. vyd., Merck Res. Lab., 1996.