

Z výzkumu a praxe

Nové příspěvky k radikálové teorii stárnutí piva

Doc. Ing. JAN ŠAVAL, CSc., Ing. DANA ZDVIHALOVÁ, Ing. MARIE PROKOPOVÁ, B. Budvar, n. p., Č. Budějovice

Klíčová slova: stárnutí piva, radikál, aktivní kyslík, aminokyseliny, řízená oxidace piva

1. ÚVOD

Stárnutím piva se zabývá stále více výzkumných pracovníků i technologů. Zachování původních vlastností piva je zatím nedostupným cílem, po němž touží všichni výrobci piva. Jeho dosažení by znamenalo značný náskok v konkurenčním boji.

Tento problém má další zajímavé aspekty. Stárnutí piva, potravin a dokonce i živých organismů může souviset s poškozením lipidických frakcí buněk a nalezení vhodné inhibice těchto procesů má proto obecný význam. Kromě toho je známo, že přirozené antioxidanty, přítomné v červeném vínu a pivu, mohou alespoň částečně eliminovat nepříznivé dopady z nadměrného požívání živočišných tuků.

V uplynulých dvou letech jsme se zabývali studiem oxidačních vlivů na pivo a jeho meziprodukty. Tento článek se pokouší shrnout dosažené poznatky v jednotnou teorii a reaguje také na současný stav poznání, obsažený v nejnovějších publikacích.

2. SOUČASNÉ TEORIE

Stárnutí piva je složitý komplexní problém, zahrnující několik různých mechanismů. Jednotlivé mechanismy se nevylučují a mohou působit současně:

- Streckerovo odbourávání aminokyselin
- Oxidace vyšších alkoholů
- Aldolové kondensace a sekundární reakce nižších aldehydů
- Oxidace nenasyčených mastných kyselin a jejich derivátů
- Enzymové reakce nenasyčených kyselin a jejich derivátů
- Oxidační odbourávání isohumulonů
- Fotooxidační reakce piva

Za typické, analyticky prokazatelné projevy stárnutí piva se považuje výskyt nižších alifatických a aromatických aldehydů. S tzv. lepenkovou příchutí souvisí přítomnost *trans*-2-nonenalu a jemu příbuzných sloučenin.

O velkém zájmu o tuto problematiku svědčí poslední kongres EBC v Maastrichtu. Bohužel ani přednesená nebo uveřejněná sdělení jednoznačně nerozhodla o mechanismu vzniku *trans*-2-nonenalu. V klíčové přednášce se zpochybňuje vznik *trans*-2-nonenalu přímou oxidací lipidických frakcí vzdušným kyslíkem při skladování piva [1].

Silnou podporu získává radikálová teorie, podle níž aktivní formy kyslíku napadají sloučeniny přítomné v pivu a přeměňují je na senzoričky aktivní sloučeniny [2].

Radikálová teorie se opírá především

o přímý průkaz hydroxylového radikálu v pivu elektronovou spinovou spektrofotometrií a chemiluminiscenčními metodami. Současně se předpokládá existence redukčních látek mladiny a piva, schopných alespoň zpočátku eliminovat vznikající radikály [3].

Radikálovou teorii rozpracovali především Japonci, kteří se však bohužel orientovali pouze na fyzikální aspekty metody, bez ohledu na chemismus reakcí [2]. Chemickými pochody se naopak zabývali Američané, kteří oxidovali vyšší alkoholy plyným kyslíkem za přítomnosti kovových iontů, přičemž předpokládali průběh podle známé Fentonovy reakce. Do této reakce zahrnují i reakce polyfenolů, podporujících i inhibujících oxidační reakce [4].

3. NOVÁ MODIFIKACE RADIKÁLOVÉ TEORIE

Ačkoliv se četné studie zabývají různými mechanismy vzniku senzoričky aktivních aldehydů, jen málo z nich využívá uměle generovaných zdrojů aktivního kyslíku. Přímou se prokázal vznik *trans*-2-nonenalu při současném působení k pivu přidaného peroxidu vodíku [5].

Jiným zdrojem aktivních forem kyslíku je působení denního i umělého světla za přítomnosti fotosenzitizérů, např. riboflavínu. Tento typ reakce byl popsán např. u fotochemické oxidace ethanolu a methioninu [6].

Podle literárních údajů uvolňují peroxodisírany ve vodných roztocích kyslík, obsa-

hující ozon [7]. Ozon dále reaguje s vodou za tvorby aktivních forem kyslíku, které napadají sloučeniny piva za vzniku organických radikálů a následně těkavých aldehydů.

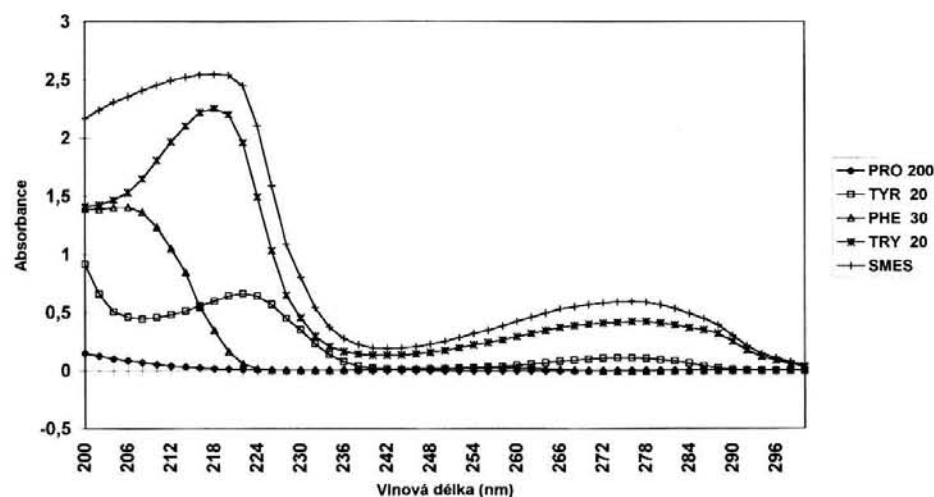
Při sledování oxidačních reakcí piva a meziproduktů jeho výroby jsme jako oxidační činidlo používali peroxodisíran draselný nebo amonný. Zahřívání piva s těmito činidly vyvolávalo intenzivní vznik zákalů, změny barvy a tvorbu cizích vůní, typických pro velmi staré pivo [8].

V našich experimentech jsme sledovali působení aktivních forem kyslíku na aminokyseliny, vyšší alkoholy a ethanol, u nichž lze očekávat vznik senzoričky aktivních sloučenin. Zjistili jsme, že přidávky peroxodisíranů k pivu vytvářejí stejné změny absorpčního spektra piva ve viditelné oblasti jako ozařování denním i umělým světlem za přítomnosti kyslíku. Pokles absorbance při 380 nm považujeme za důkaz přítomnosti aktivních forem kyslíku, pro něž je typické odbarvování v pivu přítomných barevných složek extraktu [9].

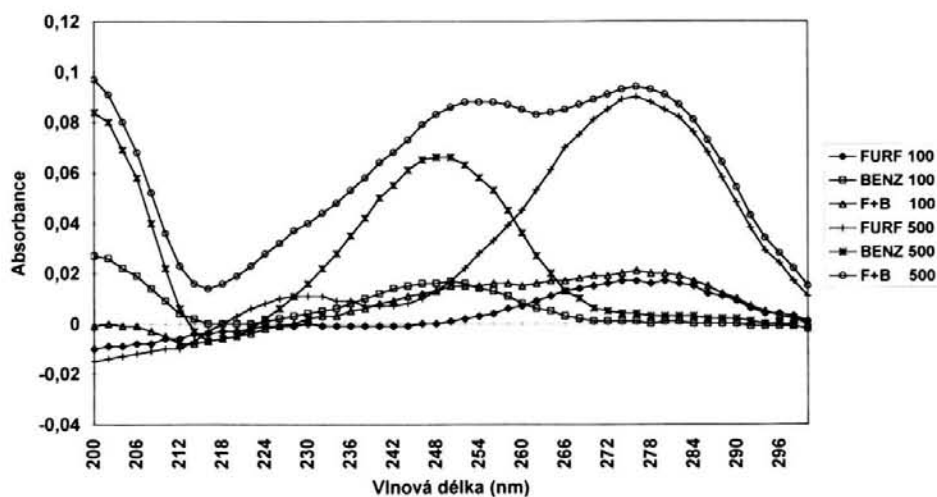
Kromě toho se opatrnou oxidací aminokyselin i vyšších alkoholů podařilo připravit senzoričky účinné sloučeniny, většinou aldehydicke povahy. Tyto sloučeniny vykazovaly rozdílné vůně a jejich tvorba se mohla eliminovat látkami, přítomnými ve sladidě. Současně se oxidací sladiny i piva mohly získat typické oxidační vůně, připomínající staré pivo [10].

Domníváme se, že těkavé aldehydy mohou vznikat nejen v literatuře zmíněným Streckerovým odbouráváním za účasti di-

Obrázek 1. Absorpční spektra aminokyselin a jejich směsi ve vodných roztocích. Čísla udávají koncentrace v mg.l⁻¹



Obrázek 2. Absorpční spektra furfuralu (FURF), benzaldehydu (BENZ) a jejich směsí (F + B). Čísla udávají koncentrace v $\mu\text{g.l}^{-1}$

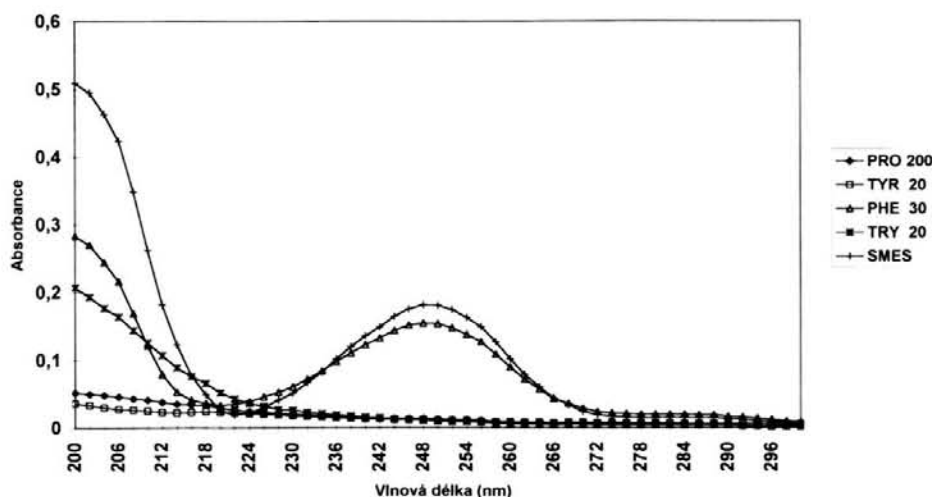


karbonylových sloučenin, ale také přímou reakcí aminokyselin s aktivními formami kyslíku [10].

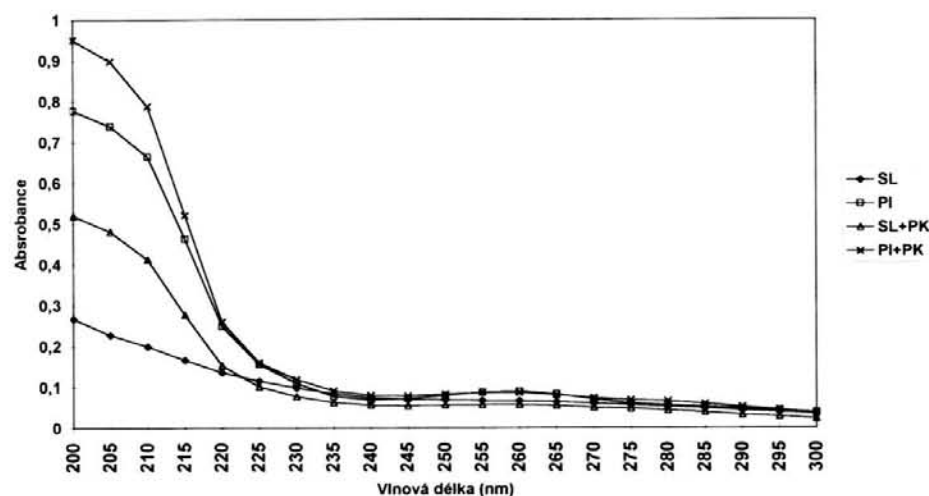
Mezi oběma druhy forem aktivního kyslíku je při působení na pivo podstatný rozdíl. Ozáření piva poskytuje vůni po thiolech,

sirovodíku, nebo jiných těkavých sirných sloučeninách. Oxidace peroxidisíranem poskytuje štiplavou, připálenou vůni s částečným náznakem vůně po lepence. Tato vůně není ovšem zcela totožná s vůní *trans*-2-nonenalu [9].

Obrázek 3. Absorpční spektra oxidačních produktů aminokyselin, oxidovaných peroxidisíranem draselným ($c = 0,1 \%$) při přehánění vodní párou



Obrázek 4. Absorpční spektra těkavých látek sladiny (SL) a piva (PI) po přehánění vodní párou s přidavkem peroxidisíranu draselného (PK) a bez něj (podle [11])



Mezi aminokyselinami přítomnými v pivo mají zvláštní význam aminokyseliny s benzenovými nebo heterocyklickými jádry, tj. fenylalanin, tyrosin, tryptofan a prolin. Současně tyto aminokyseliny silně absorbují ve vodném roztoku ultrafialové (UV) světlo, na čemž se zakládá stanovení prvních tří aminokyselin v bílkovinách. Při stanovení se využívá absorpčního maxima při 280 nm v alkalických roztocích. Absorpční spektra vodných roztoků aminokyselin proti destilované vodě v 1 cm křemenné kyvetě uvádí obr. 1. Podobná absorpční maxima vykazují i destiláty piva při přehánění s vodní párou [11].

Na posledním kongresu EBC uveřejnili Klein et al. metodu, hodnotící stárnutí piva po přehánění vodní párou podle sekundárního maxima mezi 240 až 310 nm [12]. Absorbanci v této oblasti UV světla přičítají autoři metody přítomnosti 2-furfuralu nebo derivátů furanu, ačkoliv nechali bez povšimnutí silný nárůst absorbance mezi 200 až 240 nm. Absorbance furfuralu totiž v této oblasti UV stoupá jen mírně.

Porovnání absorpčních spekter furfuralu a benzaldehydu ukazuje dvě sekundární absorpční maxima okolo 250 nm pro benzaldehyd a 280 nm pro furfural. Tato maxima se mohou skládat ve výslednou křivku, odpovídající absorbančnímu pásu mezi 240 až 310 nm (obr. 2).

Furfural se obvykle považuje za indikátor časového působení teploty na pivo, zatímco benzaldehyd za indikátor oxidačního poškození piva [13].

Obsahy furfuralu v lahvovém pivo s vysokým obsahem vzduchu v hrdle láhvi dosahovaly po 4 týdnech skladování při 25 °C až 45 mg.l^{-1} , u benzaldehydu až 13 mg.l^{-1} . Za přítomnosti čistého kyslíku obsah benzaldehydu dále vzrůstal. I při nízkém obsahu vzduchu lze po několikaměsíčním skladování dosáhnout koncentrací furfuralu stovek až tisíců $\mu\text{g.l}^{-1}$ a u benzaldehydu stovek $\mu\text{g.l}^{-1}$ [13].

Závislost tvorby furfuralu na teplotě skladování jsme v roce 1977 použili k návrhu tzv. furfuralové jednotky. Obsah furfuralu ve skladovaném pivo umožňoval odhadnout jeho tepelnou historii a jeho „furfuralové“ datování [14]. Hodnoty rychlostních konstant tvorby furfuralu později potvrdili pracovníci Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze [15].

Podle našeho názoru je nález silné absorbance v první části absorpční křivky důkazem tvorby těkavých produktů, vzniklých reakcí aromatických nebo heterocyklických aminokyselin při oxidaci sladiny, mladiny a piva. Vzorke těkavých oxidačních produktů aminokyselin, sladiny a piva se opět měřily v 1 cm křemenné kyvetě proti destilované vodě (obr. 3, 4). Pouze v pivo lze předpokládat účast souvisejících vyšších alkoholů, vzniklých kvašením, popř. jejich dalších oxidačních produktů po reakci s aktivními formami kyslíku.

Některé alifatické aminokyseliny mohou rovněž v menším rozsahu absorbovat světlo

v oblasti okolo 200 nm. Tyto příspěvky se sčítají, takže absorpance komplexních roztoků, jako jsou sladina a pivo, mohou po přehánění vodní párou dosáhnout relativně vysokých hodnot.

Za vysoce senzoričky aktivní, oxidaci poskytující cizí vůně i v koncentracích, obvyklých v pivu, lze podle našeho zjištění pokládat prolin, isoleucin, methionin a fenylalanin. Produkty oxidace prolinu připomínají spálenou rohovinu a fenylalanin poskytuje po oxidaci produkt s těžkou květinovou vůní, někdy s náznakem vůně po hořkých mandlích. Oxidovaný isoleucin voněl po másle, zatímco methionin zapáchal po sirných sloučeninách.

Aminokyseliny se působením peroxodisíranu oxidovaly v různých stupních. Fenylalanin např. v závislosti na reakčních podmínkách přecházel nejdříve na typickou květinovou vůni s nádechem po hořkých mandlích (pravděpodobně fenylacetaldehyd a benzaldehyd), později na nerozpustný, senzoričky inaktivní produkt, který se nakonec rozkládal za tvorby oxidu uhličitého. Charakter cizí vůně může rovněž ovlivnit současná přítomnost melanoidinů i ethanolu, které potlačují tvorbu cizích vůní [9].

Pro ověření získaných závěrů jsme připravili modelové roztoky aminokyselin i vyšších alkoholů s různou koncentrací složek (tab. 1, 2). Tyto roztoky poskytovaly po oxidaci peroxodisíranem draselným příchutě po starém pivu, přičemž vůně oxidovaných vyšších alkoholů byla spíše zatuchlá, vůně oxidovaných aminokyselin připálená, štiplavá s náznakem vůně po lepence.

Kombinovaný roztok, obsahující aminokyseliny, vyšší alkoholy, 5 % obj. ethanolu a 10 % maltosu vykazoval po oxidaci peroxodisíranem draselným ($c =$

0,1%) po 2 h při 60 °C typickou vůni starého piva, zatímco po ozařování denním světlem vznikala vůně po sirných sloučeninách.

Oxidační procesy ovlivňuje dále přítomnost ostatních látek sladiny, mladiny i piva, které eliminují škodlivé působení radikálů. Z tohoto důvodu jsou sladina a mladina mnohem odolnější k senzoričkému poškození než pivo [9]. Proto je také množství látek absorbujících při 200 nm v pivě vyšší než ve sladince (obr. 4). Možnosti průkazu aktivních forem kyslíku v pivu a meziproduktů jsme diskutovali v práci [11].

Navržený model vzniku cizích vůní představuje další možnosti ovlivnění senzoričkových vlastností piva podle řízeného zastoupení aminokyselin. Současně tento model nabízí další možnosti studia antioxidačních vlastností látek přítomných v pivu i návrh nových testů pro hodnocení senzoričkové stability piva [11].

4. ZÁVĚR

Modifikovaná radikálová teorie vychází z předpokladů a experimentálních důkazů, získaných řízenou oxidací piva:

- Senzoričky aktivní sloučeniny piva při stárnutí vznikají přímou reakcí aktivních forem kyslíku s aminokyselinami a vyššími alkoholy
- Senzoričky aktivní látky se tvoří především oxidací prolinu, isoleucinu, methioninu a fenylalaninu
- Senzoričky aktivní sloučeniny mohou vznikat fotochemickými i chemickými reakcemi za tmy
- Různé aktivní formy kyslíku poskytují produkty s různou senzoričkou aktivitou
- Průběh těchto reakcí mohou potlačovat látky sladiny a mladiny s antioxidačními účinky

- Inhibici oxidačních reakcí lze sledovat podle odbourávání organických barviv v přítomnosti roztoků peroxodisíranu
- Senzoričky aktivní sloučeniny se dále mohou odbourávat aktivními formami kyslíku za ztráty senzoričkové aktivity
- Aminokyseliny s aromatickými nebo heterocyklickými jádry poskytují po oxidaci těkavé produkty se silnou absorpancí mezi 200 až 240 nm
- Absorbance těkavých složek piva mezi 240 až 310 nm souvisí s přítomností furfuralu i oxidačních produktů aminokyselin i vyšších alkoholů
- Chemickou oxidací modelové směsi aminokyselin, ethanolu a maltosu lze připravit produkty, připomínající staré pivo oxidačními příchutěmi a vůněmi, zatímco u fotochemické oxidace vůněmi a příchutěmi po těkavých sirných sloučeninách.

LITERATURA

- [1] COLLIN, S., et al.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr. 1997, s. 535.
- [2] UCHIDA, M., SUGA, S., ONO, M.: J. Am. Brew. Soc. Chem. **54**, 1996, s. 205.
- [3] DEVREUX, A.: J. Inst. Brew. **103**, 1997, s. 142.
- [4] IRWIN, A. J., BARKER, R. L., PIPASTS, P.: J. Am. Brew. Soc. Chem. **49**, 1991, s. 140.
- [5] WAESBERGHE VAN, I. J.: Techn. Q. Master. Brew. Assoc. Am. **33**, 1996, s. 96.
- [6] BLOCKMANS, CH., et al.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr. 1981, s. 347.
- [7] The Merck Index, An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12 vyd., Merck Res. Lab., New York 1996, s. 92.
- [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. 233.
- [11] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasny Prum. **43**, 1997, s. 268.
- [12] KLEIN, H., KRAMMER, R., NATTER, M.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr. 1997, s. 553.
- [13] MIEDANER, H., NARZI, L., EICHORN, R.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr. 1991, s. 401.
- [14] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D.: Kvasny Prum., **24**, 1978, s. 30.
- [15] ŠKACH, J., et al.: Senzoričká stabilita piva. Výzkumná zpráva VÚPS, Praha 1994.

Tab. 1 Koncentrace složek v modelovém vodném roztoku aminokyselin

Název	Zkratka	Koncentrace [mg.l ⁻¹]	Název	Zkratka	Koncentrace [mg.l ⁻¹]
Kys. asparaginová	ASP	20	Isoleucin	ILEU	20
Threonin	THRE	10	Leucin	LEU	40
Serin	SER	10	Tyrosin	TYR	20
Kys. glutamová	GLU	20	Fenylalanin	PHE	30
Prolin	PRO	200	Histidin	HIS	40
Glycin	GLY	20	Lysin	LYS	20
Alanin	ALA	40	Arginin	ARG	50
Valin	VAL	30	Tryptofan	TRY	20
Methionin	MET	10	CELKEM	-	1000

Tab. 2 Koncentrace složek v modelovém vodném roztoku vyšších alkoholů

Název	Koncentrace [mg.l ⁻¹]	Název	Koncentrace [mg.l ⁻¹]
1-propanol	15	2-methyl-1-butanol	50
2-propanol	5	3-methyl-1-butanol	30
2-methyl-1-propanol	10	2-fenylethanol	5
1-butanol	5	CELKEM	120