

Z výzkumu a praxe

UV-SPEKTROFOTOMETRIE MODELOVÝCH ROZTOKŮ PRO STUDIUM TVORBY MELANOIDINŮ

Doc. Ing. Jan ŠAVAL, CSc., Ing. Dana ZDVIHALOVÁ, Budějovický Budvar, n.p., České Budějovice

Klíčová slova: pivo, stárnutí, UV-spektrofotometrie, elektronová spinová rezonance, melanoidiny

1. ÚVOD

Stárnutí piva je jedním z klíčových problémů pivovarského výzkumu a technologie. V poslední době se s použitím elektronové spinové rezonanční spektroskopie (ESR) a chemiluminiscenčních metod prokázala účast radikálových dějů při těchto procesech [1–3].

Stárnutí piva obvykle zahrnuje několik mechanismů:

- Fentonova reakce při oxidaci vyšších alkoholů
- Maillardova reakce aminokyselin
- melanoidinová oxidace vyšších alkoholů
- oxidace nenasycených mastných kyselin
- Streckerovo odbourávání aminokyselin
- fotooxidační reakce
- aldolová kondenzace a sekundární reakce alkoholů
- oxidace isohumulonů

Je zřejmé, že u většiny těchto mechanismů se mohou uplatnit radikálové reakce. Ačkoliv se dříve předpokládala převaha mechanismů, založených na oxidaci vyšších alkoholů, v poslední době se pozornost opět zaměřuje na oxidaci aminokyselin v pivu. Během stárnutí piva výrazně klesal obsah glutaminu [4].

Experimentálně se prokázala možnost přímé oxidace vyšších alkoholů a aminokyselin anorganickými činidly za tvorby aldehydů, typických pro stárnutí piva [5,6]. Přítomnost benzaldehydu při oxidaci fenylalaninu svědčí o radikálovém mechanismu oxidace, podobně jako zesílení přirozené chemiluminiscence piva po jeho oxidaci peroxidisíranem draselným. Při oxidacích se uplatňují melanoidní látky [7].

Poslední studie se zaměřují na komplikovaný průběh Maillardovy reakce [8]. Výsledkem těchto reakcí je složitá směs reakčních produktů, včetně vysoce reaktivních nízkomolekulárních látek, např. formaldehydu, glyoxalu, methylglyoxalu, furfuralu apod. Vznikající hydroxykarbonylové sloučeniny mohou přitom generovat kyslíkové radikály [9].

Jako markerů procesu stárnutí se používá obsah jednotlivých karbonylových sloučenin, nebo jejich skupin [10]. Tvorbu indikátorů tepelných změn při vaření mladiny sledoval Hug [11]. Za typická kritéria byly považovány změny barvy a koncentrace S-methylmethioninu (SMM), dimethylsulfidu (DMS), furfuralu, furfurylalkoholu, 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) a thiobarbiturového čísla.

Za význačný indikátor stárnutí piva byl vždy pokládán furfural, jeho přítomnost

v pivu se však obvykle spojovala s hydrolytickým štěpením pentos. K stanovení furfuralu v pivu se použily barevné reakce s anilinem, p-aminodimethylanilinem, fluorescenční metoda s o-aminothiofenolem a přímá spektrometrie v UV oblasti při 277 nm po oddělení furfuralu přeháněním s vodní párou [12–15].

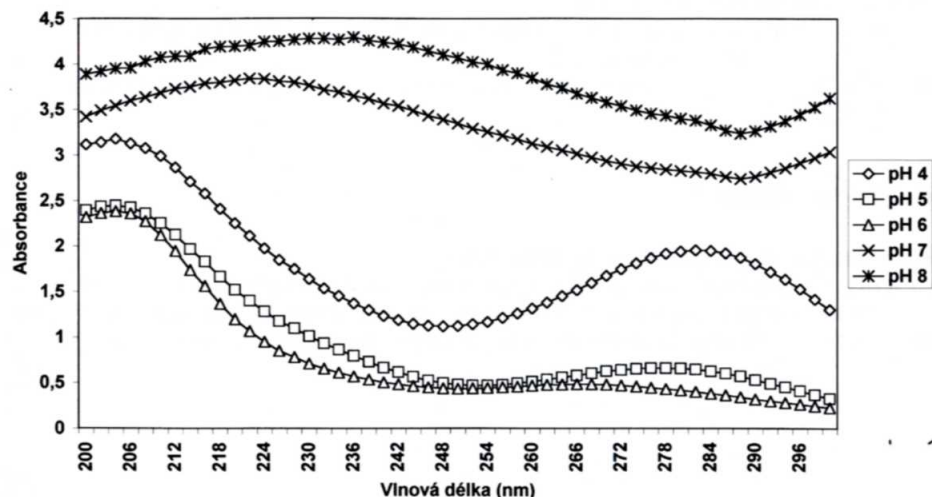
S reakcí furfuralu s anilinem také souvisí stanovení tzv. anilinového čísla v pivu a meziproduktů [16]. Hodnota tzv. absorpčního integrálu mezi 240 až 310 nm také zahrnuje absorpční furfuralu v analytické metodě pro posouzení průběhu stárnutí piva podle Kleina [17]. Hydroxymethylfurfural se obvykle stanovuje přímo kapalinovou chromatografií

nebo spektrofotometricky Winklerovou metodou reakcí s thiobarbiturovou kyselinou a p-toluidinem [18].

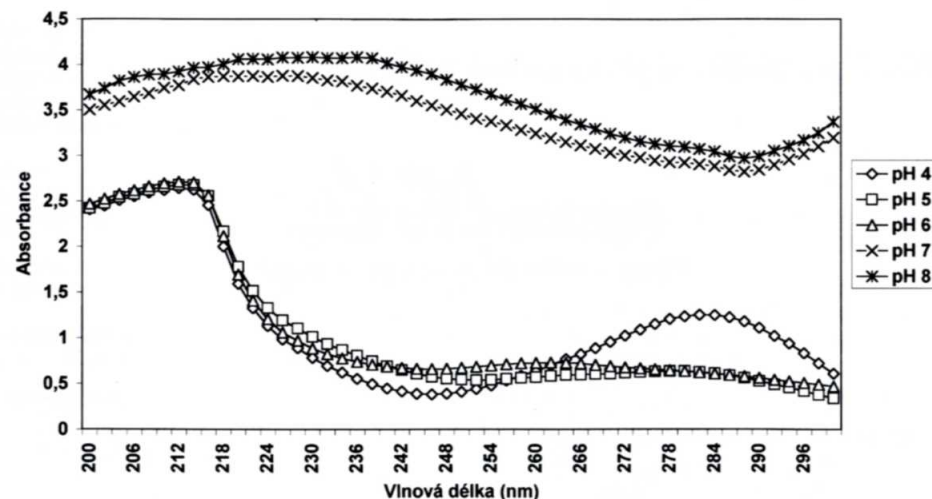
2. MATERIÁL, METODY A PŘÍSTROJE

2.1 Chemikálie

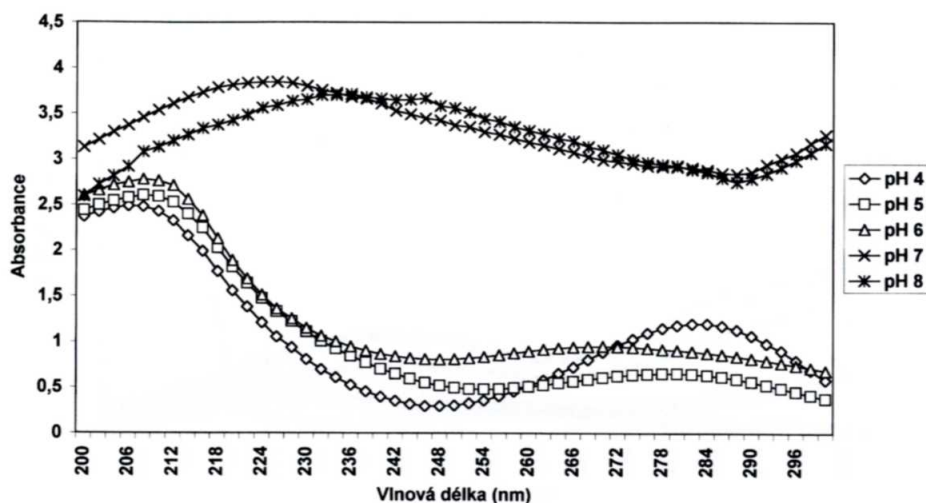
D(+)-monohydrát glukosy, D(+)-monohydrát maltosy, dihydrogenfosforečnan draselný, monohydrát kyseliny citronové, 2-fenylethanol (FLUKA, Švýcarsko), DL-fenylalanin, DL-methionin (SIGMA, USA). Všechny roztoky se připravovaly rozpuštěním těchto látek v redestilované vodě s vodivostí < 0,2 μ S.



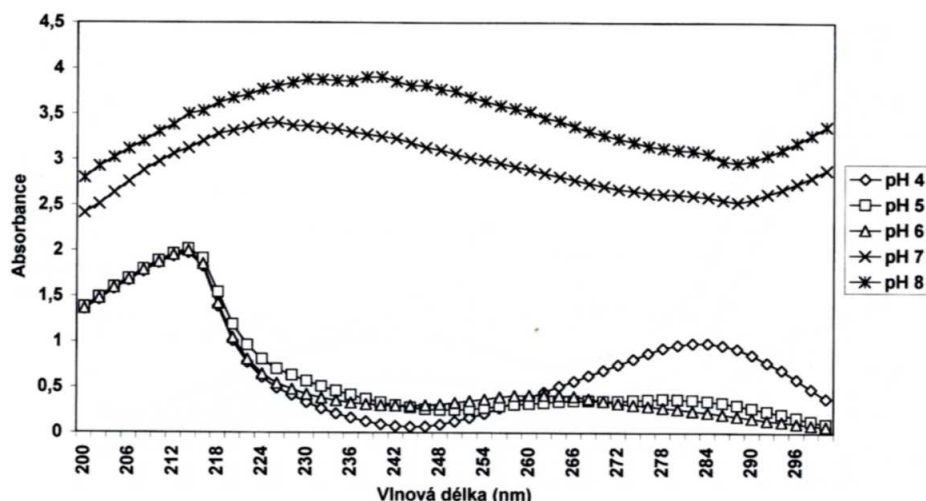
Obr. 1 Absorpční spektra roztoků glukosy po zahřívání



Obr. 2 Absorpční spektra roztoků glukosy s fenylalaninem po zahřívání



Obr. 3 Absorpční spektra roztoků glukosy s methioninem



Obr. 4 Absorpční spektra roztoků glukosy s 2-fenylethanolem

2.2 Citrátový tlumivý roztok

Tlumivé roztoky se připravovaly smísením roztoků kyseliny citronové ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) a dihydrogenfosforečnanu draselného ($c = 0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) podle [19]. K přípravě modelových roztoků se tlumivé roztoky předem zředily redestilovanou vodou v poměru 1 díl tlumivého roztoku + 9 dílů redestilované vody.

2.3 Vodovodní voda

Vodovodní voda s tvrdostí 7 mmol.l^{-1} a vodivostí $170 \mu\text{S}$, $\text{pH} = 6,9$.

2.4 Redestilovaná voda

Redestilovaná voda s vodivostí $< 0,2 \mu\text{S}$, $\text{pH} = 6,4$.

2.5 Přístroj pro přehánění vodní párou

Přístroj pro přehánění vodní párou s elektrolitickým vyvíječem vodní páry (I-CUBE, Havlíčkův Brod). Z 50 ml vzorku se přehnal vodní párou 50 ml destilátu za 2 min.

2.6 Horkovzdušná sušárna

Horkovzdušná sušárna s nuceným oběhem (WTB Binder, SRN).

2.7 Spektrofotometr

Spektrofotometr CADAS 200 (Dr. Lange, SRN). Spektra se proměřovala v 1 cm kře-

menných kyvetách proti redestilované vodě.

2.8 Přístroj pro přípravu destilované a redestilované vody

Laboratorní přístroj pro přípravu destilované a redestilované vody reversní osmosou (PREMIER, USA).

2.9 pH metr

Mettler Toledo 345 pH meter.

3. POSTUPY

3.1 Stárnutí roztoků glukosy, fenylalaninu, methioninu a 2-fenylethanolu při různém pH

Roztoky glukosy ($c = 5 \%$), popř. spolu s fenylalaninem, methioninem nebo 2-fenylethanolem ($c = 0,1 \text{ g.l}^{-1}$) se připravily rozpustěním čistých látek v desetkrát zředěných tlumivých roztocích s hodnotami pH 4 až 8.

Připravené roztoky (150 ml) se zahřívaly 3 dny při 80°C v horkovzdušné sušárně v 200 ml lahvičkách s kloboučkovým uzávěrem se silikonovou těsnicí vložkou. Po samovolném ochlazení na laboratorní teplotu se proměřila absorpční spektra těchto roztoků (obr. 1–4) a jejich destilátů po přehánění vodní párou (obr. 5–8).

3.2 Vůně a barva modelových roztoků po stárnutí

Roztoky připravené podle odstavce 3.1 byly bezbarvé a bez vůně, s výjimkou roztoku 2-fenylethanolu s velmi slabou vůní po růžích. Po stárnutí (3 dny při 80°C) a ochlazení roztoků se posoudila jejich vůně a barva (tab. 1).

V tabulce byly použity zkratky: GLU – glukosa, PHE – fenylalanin, MET – methionin, POH – 2-fenylethanol. Intenzita vůně se hodnotila podle stupnice: 0 – žádná, 1 – slabá, 2 – střední, 3 – silná, 4 – velmi silná.

3.3 Indukovaná chemiluminiscence roztoků maltosy po ohřevu

Roztoky maltosy ($c = 5\%$) v redestilované a vodovodní vodě se pasterovaly 1 h při 80°C , nebo autoklávovaly 15 min při 120°C . Po týdenním skladování při 20°C se k roztokům přidal roztok peroxidisiranu draselného ($c = 5\%$) v poměru 1:9, výsledná koncentrace peroxidisiranu draselného ve vzorku byla 0,5 %. Ihned po přidavku peroxidisiranu draselného se měřila intenzita chemiluminiscence při 45°C v luminometru BioOrbit 1251 (obr. 3).

Tabulka 1. Změny vůně a barvy modelových roztoků po ohřevu

Modelový roztok	pH	Vůně		Barva	
		popis	intenzita	popis	intenzita
GLU	4	–	0	–	0
GLU	5	–	0	žlutá	1
GLU	6	–	0	žlutá	2
GLU	7	cukerná	2	žlutá	3
GLU	8	melasová	3	oranžová	4
GLU+PHE	4	–	0	–	0
GLU+PHE	5	květinová	1	žlutá	1
GLU+PHE	6	květinová	2	žlutá	2
GLU+PHE	7	květinová+cukerná	3	žlutá	3
GLU+PHE	8	květinová+melasová	4	oranžová	4
GLU+MET	4	po zkaženém zeli	1	–	0
GLU+MET	5	po zkaženém zeli	2	žlutá	1
GLU+MET	6	po zkaženém zeli	3	žlutá	2
GLU+MET	7	po zkaž. zeli+cukerná	4	žlutá	3
GLU+MET	8	po zkaž. zeli+cukerná	4	oranžová	4
GLU+POH	4	po růžích	2	–	0
GLU+POH	5	po růžích	2	žlutá	1
GLU+POH	6	po růžích	2	žlutá	2
GLU+POH	7	po růžích+cukerná	2	žlutá	3
GLU+POH	8	po růžích+melasová	3	oranžová	4

Měření zajišťovalo pracoviště Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně (Dr. Číž, Dr. Lojek).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Roztoky glukosy, popř. ještě s aminokyselinami nebo 2-fenylethanolem, vykazovaly po jejich zahřívání při 80 °C silnou absorbanci v UV oblasti (obr. 1–4). Nižší hodnoty absorbance byly zřetelné i u destilátů těchto roztoků po přehánění vodní párou (obr. 5–8).

Pro sledování změn zahříváním roztoků sacharidů s aminokyselinami se obvykle používá spektrofotometrie ve viditelné oblasti, ačkoliv viditelné změny lze pozorovat i v UV oblasti [20]. Reakcí sacharidů s aminokyselinami vznikají melanoidní látky, které se zúčastňují tvorby těkavých látek při stárnutí piva. Tyto látky silně absorbují v UV oblasti, na čemž se zakládá stanovení tzv. absorpčního integrálu podle Kleina [17].

Opticky aktivní jsou i další těkavé látky, které mohou vznikat při kvašení i při stárnutí piva. Původ většiny z nich se odvozuje od aminokyselin, vykazujících absorpci v UV oblasti [7]. Těkavé látky absorbující v UV světle, např. furfural, také vznikají při zahřívání roztoků sacharidů.

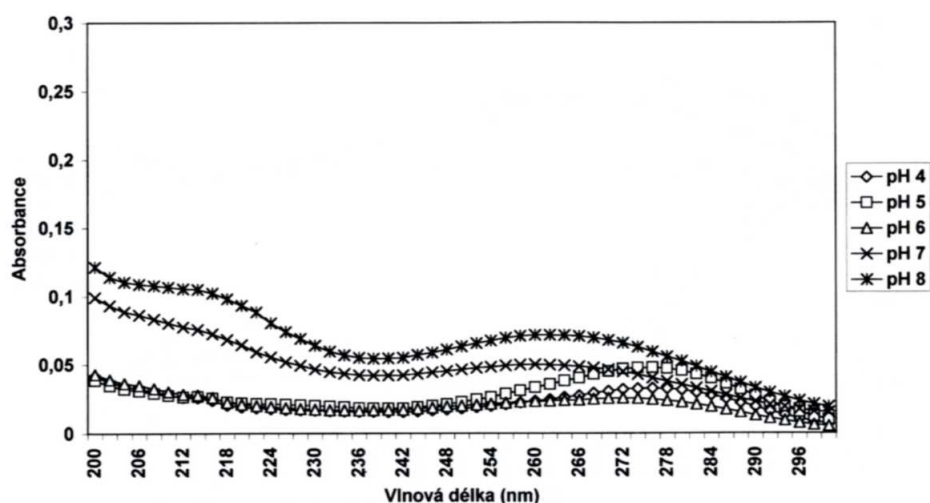
Také některé netěkavé látky, vznikající při vaření mladiny i rozkladu sacharidů (např. 5-hydroxymethylfurfural), absorbují v UV oblasti. Jejich přímé stanovení v pivu však znemožňuje silná absorbance polyfenolů i hořkých látek v UV oblasti. Proto jsme pro studium těchto procesů připravili čiré modelové roztoky glukosy, dvou aminokyselin a 2-fenylethanolu, jejichž spektra jsou známa [7].

Roztoky glukosy vykazovaly po zahřívání nárůst absorbance mezi 200–240 nm, s dalším typickým maximem v okolí 280 nm. Podle literárních údajů je absorpční maximum v okolí 280 nm charakteristické pro furfural i 5-hydroxymethylfurfural, čehož se využívá při jejich spektrofotometrickém stanovení [15,18].

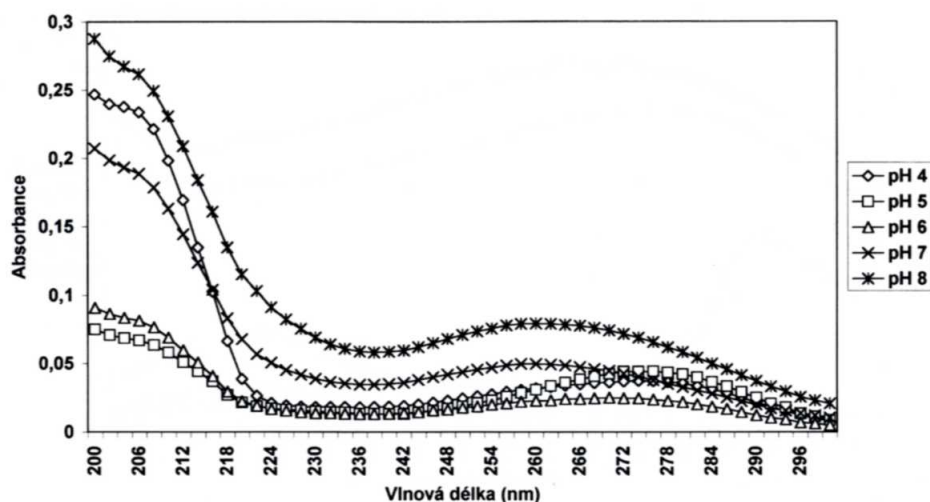
S rostoucím pH klesalo absorpční maximum v okolí 280 nm za vzniku nového maxima mezi 200 až 240 nm (obr. 1). Podobný trend při vzniku melanoidních látek při pH = 8 pozoroval Mac Dougal et al. [20]. Současně se poněkud snížilo absorpční maximum v okolí 200 nm u vzorku s přidavkem aminokyselin nebo 2-fenylethanolu.

Podobné tvary absorpčních křivek vykazovaly i roztoky glukosy s aminokyselinami i 2-fenylethanolem, přičemž se přidavkem těchto látek snižovalo absorpční maximum mezi 200 až 240 nm, ačkoliv fenylalanin i 2-fenylethanol vykazují v této oblasti vlastní maxima (obr. 2–4).

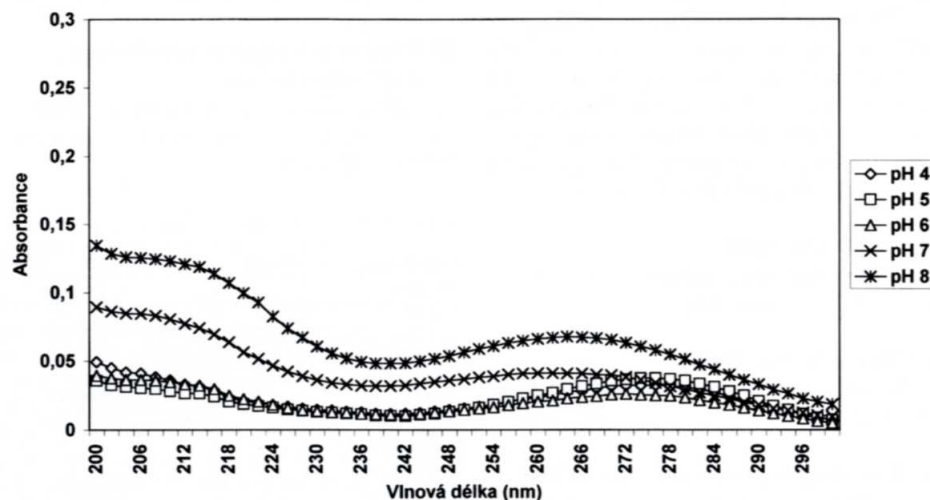
Absorpční spektra těkavých látek vzniklých zahříváním roztoků glukosy vykazovaly relativně nízké absorpční maximum v okolí 280 nm s mírným nárůstem absorbance při 200 nm. Výška absorpčního maxima při 280 nm opět klesala s rostoucím pH. Podstatným znakem těchto změn je posun absorpčního maxima v okolí 280 nm k nižším vlnovým délkám v okolí 260 nm s rostoucím pH. Lze předpokládat výskyt dosud neidentifikovaného meziproductu



Obr. 5 Absorpční spektra destilátů roztoků glukosy po zahřívání



Obr. 6 Absorpční spektra destilátů roztoků glukosy s fenylalaninem po zahřívání



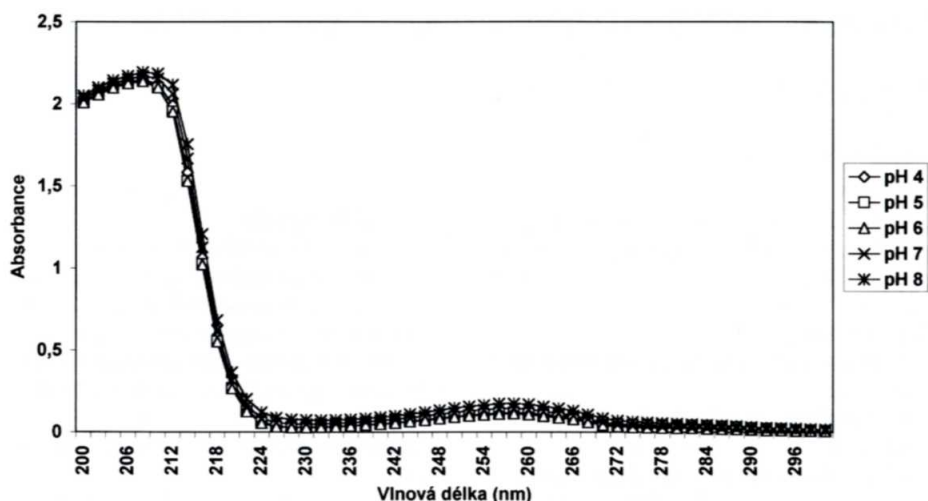
Obr. 7 Absorpční spektra destilátů roztoků glukosy s methioninem po zahřívání

těchto reakcí, s absorpčním maximem v okolí 260 nm (obr. 5).

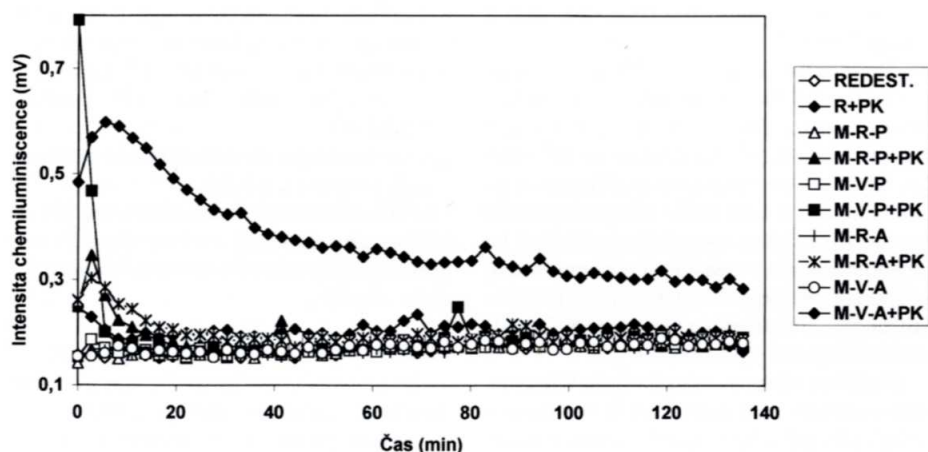
Podobný obraz absorpčních křivek poskytoval i roztok s methioninem, neboť oxidační produkty methioninu neabsorbují v UV světle (obr. 7).

Podle obr. 6 se naproti tomu v destilátech s přidavkem fenylalaninu prokázalo charakteristické zvýšení absorbance v okolí 200 nm,

což patrně souvisí s tvorbou fenylacetaldehydu [6]. Absorpční maximum v okolí 280 nm ovlivňoval přidavek obou aminokyselin jen málo, absorpční spektrum 2-fenylethanolu se téměř nezměnilo (obr. 8). Přesto by mohly tyto malé změny spolu se snížením absorpčního pásu mezi 200 až 240 nm svědčit o částečné reakci 2-fenylethanolu. Tuto hypotézu však bude nutné ještě ověřit.



Obr. 8 Absorpční spektra destilátů roztoků glukosy s 2-fenylethanolem po zahřívání



Obr. 9 Chemiluminiscence roztoku maltosy (M) v redestilované (R) a vodovodní (V) vodě po pasteraci (P) nebo autoklávování (A) s přidavkem peroxodisíranu draselného (PK)

S těmito závěry souhlasí i vzhled a vůně vzorků (tab. I). Shodně u všech vzorků se s rostoucím pH zvyšovala barva roztoku i intenzita vůně. S přidavkem methioninu souvisí výskyt vůně po zkaženém zelí, s přidavkem fenylalaninu květinová vůně. Vůně stejného charakteru jsme získali také při oxidaci těchto aminokyselin roztokem peroxodisíranu [6, 8]. U 2-fenylethanolu se změna vůně výrazně neprojevila. Je velmi zajímavé, že přidavek aminokyselin přitom výrazně nezvyšoval intenzitu zbarvení roztoků (tab. I).

Pro ověření těchto závěrů jsme zahřívali roztoky maltosy jako typického sacharidu, vyskytujícího se v pivovarské výrobě a testovali indukovanou chemiluminiscenci přidavkem roztoku peroxodisíranu draselného. Užitečnost této techniky potvrdily předchozí práce [7].

Nejsilnější indukovanou chemiluminiscenci vykazoval roztok maltosy ve vodovodní vodě po intenzivním ohřevu autoklávováním. Vliv vodovodní vody zřejmě zahrnoval jak vyšší hodnotu pH, tak možný výskyt kovů, zejména železa a mědi. Podrobnému průzkumu těchto vlivů se budeme věnovat v další studii.

Podle získaných výsledků lze předpokládat, že při stárnutí piva se nejdříve rozkládají sacharidy, samostatně, nebo za současného vzniku melanoidních látek reakcí s aminokyselinami. Rozkladem sacharidů patrně vznikají

látky indukující radikálové reakce, což potvrdilo i měření chemiluminiscence. Přidavek peroxodisíranu může průběh těchto reakcí urychlit.

Na počátku těchto procesů vzniká jak těkavý furfural, tak netěkavý 5-hydroxyfurfural. Jeho přítomnost v modelových roztocích i v dlouhodobě zahříváném pivu jsme prokázali klasickou Winklerovou reakcí [18]. Kapalínovou reakcí prokázal tvorbu 5-hydroxymethylfurfuralu v pivu při stárnutí Klein [17].

Tzv. „absorpční integrál“ těkavých látek může zahrnovat více složek, např. furfural, benzaldehyd, další těkavé látky vznikající rozkladem sacharidů, aminokyselin a vyšších alkoholů, nebo zbytky absorbance aromatických vyšších alkoholů, vzniklých kvašením. Pravděpodobně je výskyt těkavého produktu s absorpčním maximem okolo 260 nm, který jsme zjistili po tepelném rozkladu glukosy.

Výsledky ukazují, že produkty tepelného rozkladu sacharidů, v tomto případě glukosy, by mohly být startující reakcí v procesech stárnutí piva i potravin. Tyto reakce mohou probíhat i při teplotách pod 100 °C, ačkoliv vyšší teplota je zřejmě urychluje. Průběh reakcí je silně závislý na pH a ovlivňuje ho přidavek dalších látek, jako jsou aminokyseliny a vyšší alkoholy. Na základě rozkladu aminokyselin lze předpokládat, že produkty tepelného rozkladu sacharidů se mohou zúčastnit tvorby kyslíkových radikálů, které

jsou vlastním oxidačním činidlem, schopným napadat další biochemické cíle.

Těkavé produkty rovněž vykazovaly výrazný absorpční pás v okolí 280 nm, což svědčí o přítomnosti furfuralu. Je zřejmé, že mechanismus vzniku furfuralu musí zahrnovat také tvorbu této látky z hexos. Jedním z možných vysvětlení je oxidace hexosy za účasti kyslíkových radikálů, přičemž se předpokládá tvorba glyoxalu a pentos [21]. Jiným možným mechanismem je tvorba furfuralu při Maillardově reakci v přítomnosti aminokyselin [8].

Podle předběžných testů se na rozkladné produkty glukosy může vázat vzdušný kyslík. Také toto pozorování bude předmětem dalšího studia.

LITERATURA

- [1] KANEDA, H., KANO, Y., KAMIMURA, M.: J. Inst. Brew. **97**, 1991, s. 105
- [2] UCHIDA, M., SUGA, S., ONO, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, 1996, s. 205
- [3] PUNCHARD, N.A., KELLY, J.F.: Free radicals – a practical approach. Oxford University Press, New York 1996
- [4] HILL, P., LUSTIG, S., SAWATZKI, V.: Monatsschr. Brauwiss. **51**, 1998, s. 36
- [5] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D., PROKOPOVÁ, M.: Kvasný Prum. **44**, 1998, s. 40
- [6] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D.: Kvasný Prum. **44**, 1998, s. 171
- [7] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, D.: Kvasný Prum. **45**, 1999, s. 67
- [8] The Maillard reaction in foods and medicine. Proc. 6th Int. Symp. on Maillard reaction, London 1996. The Royal Soc. Chem., Cambridge 1998.
- [9] HUYGHUES-DESPOINTES, A., YAYLAYAN, V.A.: J. Agric. Food Chem. **44**, 1996, s. 672
- [10] MIEDANER, H., NARZISS, L., EICHORN, P.: Proc. Eur. Brew. Conv., Lisbon 1991, s. 401
- [11] HUG, H.: Brau. Getr. Rundsch. **103**, 1992, s. 1
- [12] BENARD, M., SCRIBAN, R.: Rev. Embout. Et Ind. Condit. **1975**, č. 154, s. 27
- [13] DAVÍDEK, J. et al.: Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL, Praha 1977
- [14] BRENNER, H.W., KHAN, A.A.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **33**, 1975, s. 14
- [15] Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists. 10 ed. George Bauta Comp., Inc. Menasha, Wisconsin 1965 (cit. podle [13])
- [16] THALACKER, R., BÖSENDÖRFER, G., BIRKENSTOCK, B.: Brauwelt **138**, 1998, s. 421
- [17] KLEIN, H., KRAMMER, R., NATTER, M.: Proc. Eur. Brew. Conv., Maastricht, 1997, s. 553
- [18] WINKLER, O.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **102**, 1955, s. 161
- [19] ŠYKORA, V., ZÁTKA, V.: Příruční tabulky pro chemiky. SNTL, Praha 1956
- [20] MacDOUGAL, B.D., GRANOV, M.: Proc. 6th Int. Symp. on Maillard reaction, London 1996. The Royal Soc. Chem., Cambridge 1998, s. 160
- [21] PEGENHARDT, T.P., et al.: Proc. 6th Int. Symp. on Maillard reaction, London 1996. The Royal Soc. Chem., Cambridge 1998, s. 3

Lektoroval: Ing. Vladimír Kellner, CSc.
Do redakce došlo 10. 2. 1999