

# Z výzkumu a praxe

## STABILITA PIVA CHARAKTERIZOVANÁ POMOCOU LAPAČOV RADIKÁLOV

<sup>a</sup>Prof. Ing. ANDREJ STAŠKO, DrSc., <sup>b</sup>Ing. MÁRIA LIPTÁKOVÁ,  
<sup>b</sup>Prof. Ing. FEDOR MALÍK, DrSc., <sup>c</sup>RNDr. VLADIMÍR MIŠÍK, CSc.,

<sup>a</sup>Katedra fyzikálnej chémie, <sup>b</sup>Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Bratislava, <sup>c</sup>Ústav experimentálnej farmakológie Slovenskej akadémie vied, Bratislava

**Kľúčové slová:** pivo, stabilita, EPR, lapače radikálov

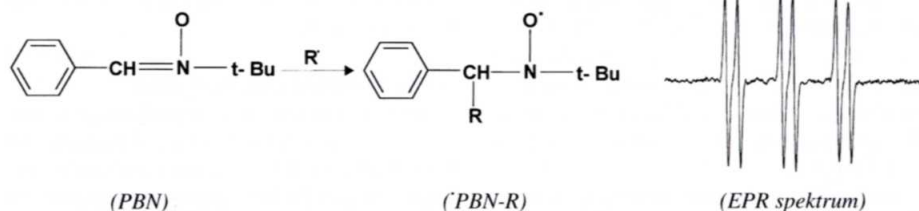
### 1. ÚVOD

So stále sa zvyšujúcimi nárokmi na kvalitu a trvanlivosť potravín, pozornosť výskumu sa v rastúcej miere orientuje na popis procesov ich starnutia. Skladovateľnosť ovplyvňuje predovšetkým teplota, svetlo a prístup vzduchu. V literatúre je veľa údajov dokumentujúcich, že procesy starnutia prebiehajú často radikálovým mechanizmom. Na takomto mechanizme a vplyve hore spomínaných parametrov sa zakladá jedna z najnovších metód charakterizácie senzorickej stability piva [1–5].

Stacionárne koncentrácie radikálov pri starnutí piva sú za normálnych podmienok (bez prístupu vzduchu – kyslíka, izbová teplota) veľmi nízke a experimentálne sotva detegovateľné. Pre potreby merania sa čas starnutia skráti zvýšením teploty (napr. na 60 °C). Najvhodnejšou technikou pre popis radikálových procesov je elektrónová paramagnetická rezonancia (EPR). Aj napriek jej vysokej citlivosti (oblasti koncentrácií 10<sup>-6</sup> až 10<sup>-8</sup> M roztokov), sú stacionárne koncentrácie radikálov v procese starnutia ešte nižšie. Preto sa tu využíva technika spinových lapačov (spin-trapping). V rozsahu predkladaných výsledkov sa obmedzíme na jeden lapač: N-tert-butyl-alfa-fenylnitron (PBN). Samotný lapač nie je radikál a tým nemá EPR spektrum. Zachytením reaktívneho radikálu R sa lapač premení na radikálový adukt PBN-R a v EPR spektre sa prejaví charakteristickým sextetom podľa ďalej uvedenej schémy.

Časová závislosť zmeny intenzity spektra PBN-R aduktu pri vynútenom starnutí (60 °C) charakterizuje stabilitu piva. Vychádzajme z predpokladu, že v podstate iniciátorom starnutia je kyslík, ktorý sa postupne premieňa na reaktívne radikály R [5], (v [2–4] sa predpokladá vznik OH). Tieto reaktívne radikály R, iniciujú oxidačné reakcie vyúsťujúce do tvorby nežiadúcich produktov starnutia. Samotné pivo, podľa jeho kvality, má vlastnú antioxidačnú kapacitu, ktorá je schopná terminovať reaktívne radikály R. Po vyčerpaní tejto kapacity dochádza k dramatickému nárastu neterminovaných radikálov R. Tieto sa zachytávajú na lapači PBN a tak dochádza aj k dramatickému nárastu aduktov PBN-R (resp. PBN-OH) radikálov, ako bude neskôr demonštrované.

Čas trvania tejto antioxidačnej odolnosti (tj. nízkej hladiny koncentrácie PBN-R radikálov v priebehu termicky vynúteného star-



nutia) je mierou senzorickej stability piva [1–5].

### 2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

**Štandardný pokus.** Za účelom odstránenia nadbytočného CO<sub>2</sub>, 5 ml vzorky čerstvo otvoreného piva sa 5 min centrifuguje pri zrýchlení 1000 g. K 1 ml cetrifugovanej vzorky sa pridá 50 µl 1 M roztoku PBN v alkohole a vzorka sa prenesie do plochej kyvety. Tá sa bezprostredne umiestni do dutiny EPR spektrometra, kde je temperovaná pri 60 °C, a spektrá sú snímané v pravidelných časových intervaloch (spravidla 15 min). V prípade, ak sa merania uskutočnili pod CO<sub>2</sub> (vzorka piva s jej pôvodnou atmosférou), ďalej pod argónom, vzduchom, alebo kyslíkom, potom bola vzorka 1 minútu pred meraním intenzívne sýtená príslušným plynom.

**Prístrojová technika.** EPR spektrometer SRC-200 D firmy Bruker vybavený tepelnou jednotkou a počítačom Aspect 2000.

**Materiál.** Lapač PBN (N-tert-butyl-alfa-fenylnitron) od Sigma Chemicals, USA.

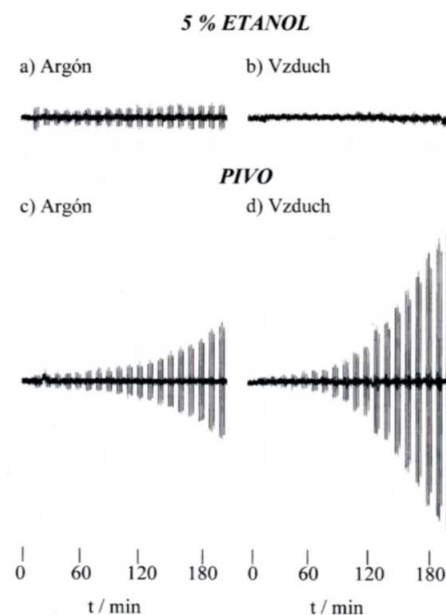
Vzorky slovenského a českého piva: Zlatý Bažant 9 %, Topvar 12 %, Staropramen 12 %, Pilsner Urquell 12 %, Stein 12 %, Corgoň 12 %, Smädny mnich 12 %, Budějovický Budvar 12 %, Velkopopovický Kozel 12 % a Krušovice 12 %. Niektoré značky boli opakovane použité, avšak s rôznym dátumom výroby a dobou skladovania.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

#### 3.1 Porovnanie vzorky piva s 5%-ným vodným roztokom etanolu

V úvodnej časti sme uvažovali, že starnutie piva prebieha cez radikálové procesy, ktoré môžeme sledovať pomocou lapačov radikálov. Skôr než prejdeme detailnejšie k samotným výsledkom, zastavme sa pri princípe tejto techniky. Bude vhodné si všimnúť obr. 1. Tu sme za referenčnú vzorku zvolili 5%-ný obj. vodný roztok etanolu, ktorý reprezentuje základnú masu pívneho zloženia a môžeme ho

pokladať za referenčný systém. Tento roztok etanolu je v pokuse pri termickom starnutí (obr. 1 a,b) porovnávaný s priemerne sa javiacou vzorkou piva (obr. 1 c,d). Toto meranie sa uskutočnilo jednak pod argónovou atmosférou (obr. 1 a,c) a tiež so vzorkami nasýtenými vzduchom (obr. 1 b,d). Obrázok znázorňuje časový priebeh vývoja spektier pri 60 °C. Bez detailnejšej analýzy je zrejmé, že vzorka piva (obr. 1 c,d) sa vyznačuje vyššou aktivitou radikálových reakcií, čo sa prejavilo vyššou koncentráciou radikálov zachytených PBN la-



Obr. 1 Časová závislosť zmeny EPR spektra PBN-aduktu vzorky 5%-ného etanolu (a,b) a vzorky piva (c,d) pri 60 °C pod argónovou (a,c) a vzdušnou (b,d) atmosférou

pačom, a to už aj v atmosfére argónu (obr. 1 c) a ešte výraznejšie za prítomnosti vzduchu (obr. 1 d). Analogické procesy vo vodnom roztoku 5%-ného etanolu (obr. 1 a,b) sú na zreteľ-



ne nižšej koncentračnej úrovni. Toto je nesporným osvedčením, že uvedená metodika charakterizuje radikálové procesy prebiehajúce pri starnutí piva.

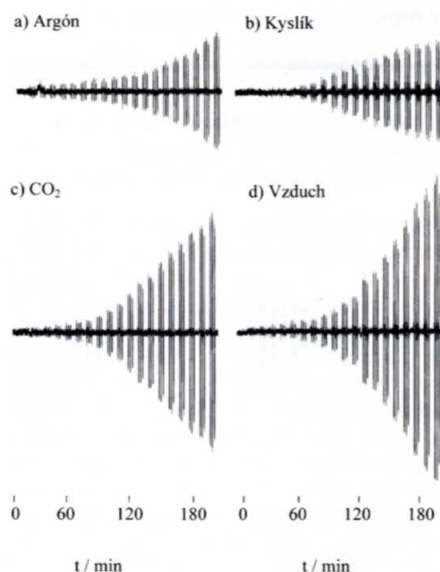
### 3.2 Vplyv atmosféry argónu, CO<sub>2</sub>, vzduchu a O<sub>2</sub> na radikálové procesy

Z obr. 1 sme mohli usúdiť, že atmosféra, pod ktorou sa vzorka nachádza, ovplyvňuje množstvo generovaných radikálov.

V nasledujúcich pokusoch sme preto urobili testy stability jednej priemerne sa javiacej vzorky piva pod rôznymi atmosférami. Bol použitý: a) argón, b) kyslík, c) CO<sub>2</sub> a d) vzduch.

Časový priebeh generácie radikálov počas temperovania vzoriek pri 60 °C je znázornený na obr. 2. Z neho je vidieť, že atmosféra, pod ktorou sa vzorka nachádza, modifikuje vznik radikálových aduktov. Markantné rozdiely sú v kvantite generovaných radikálov.

Všimnime si, že úroveň koncentrácie generovaných radikálov sa postupne zvyšuje od argónovej atmosféry (obr. 2 a), k atmosfére CO<sub>2</sub> (obr. 2 c) a vzduchu (obr. 2 d). Toto je v zhode s predpokladom, že kyslík sa podieľa na tvorbe radikálových produktov. Táto reakcia sa dá očakávať aj u vzorky na obr. 2 c, kde sa u prirodzenej vzorky piva síce predpokladá atmosféra CO<sub>2</sub>, avšak určitá kontaminácia kyslíkom je tu veľmi pravdepodobná. Nápadný je však pokles koncentrácie aduktov v prípade čistej atmosféry kyslíka, kde, ak je kyslík zodpovedný za generáciu reaktívnych radikálov, by sa očakával ešte ďalší výraznejší nárast koncentrácie aduktov. Tu ale zrejme v rastúcej miere začína domi-



Obr. 2 Časová závislosť zmeny EPR spektra PBN-aduktu piva pri 60°C pod atmosférou: a) argónu, b) kyslíka c) CO<sub>2</sub> a d) vzduchu

novat ďalší efekt kyslíka, ktorým je jeho interakcia s aduktom, resp. terminácia radikálového charakteru PBN-aduktu. Evidenciu pre uvedenú hypotézu sme našli v pokusoch, o ktorých sa tu nebudeme zmieňovať.

### 3.3 Aplikácia techniky PBN lapača na rôzne vzorky piva

Ďalší obr. 3 demonštruje možnosť využitia uvedenej metódy pri vyhodnotení stability na štyroch rôznych vzorkách piva zo série našich meraní. Prakticky okamžitý lineárny nárast koncentrácie aduktu v prípade vzorky na obr. 3 a, bez indukčnej periódy, indikuje, že vzorka nevykazuje skoro žiadnu antioxidačnú kapacitu. Ďalšie vzorky (obr. 3 b, c) majú strednú a vzorka obr. 3 d má mimoriadne vysokú antioxidačnú kapacitu a tým aj predpokladanú dlhú dobu skladovateľnosti resp. zachovania dobrých senzorických vlastností. Predkladané výsledky dokumentujú, že predstavená technika umožňuje charakterizovať vzorky piva s rôznou stabilitou.

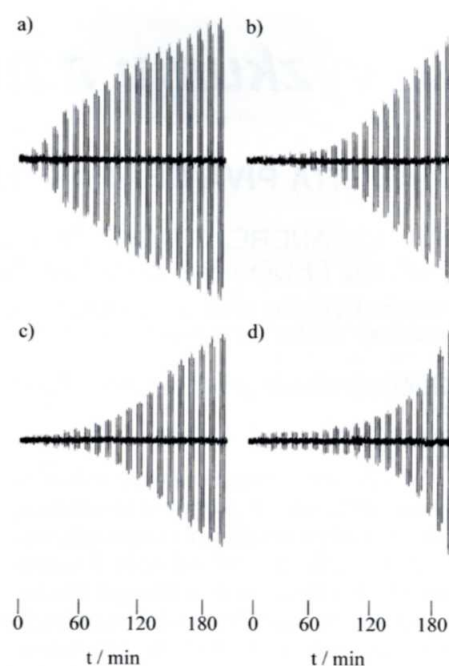
### 3.4 Vyhodnocovanie výsledkov

Obr. 4 ilustruje, akým spôsobom je možné z takto získaných výsledkov nájsť čas zlomu v stabilite piva. Určí sa priesečník medzi stúpaním počiatočného narastania koncentrácie aduktu a stúpaním po zrýchlení, tj. po zlome antioxidačnej kapacity. Tento priesečník môže nájsť manuálne, alebo matematickým vyhodnotením. Obe procedúry vo väčšine prípadov vedú k identickým alebo veľmi podobným výsledkom. Takéto postupy sme potom využili pri vyhodnotení meraní.

### 3.5 Porovnanie stability viacerých vzoriek

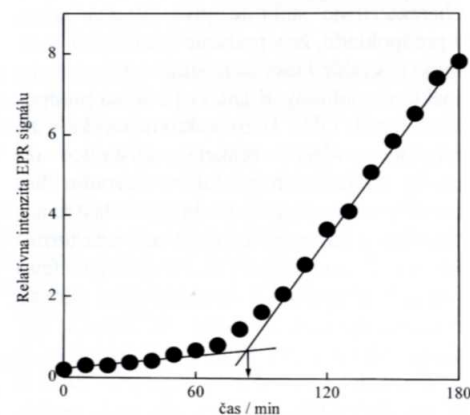
Na obr. 5 je porovnaný väčší počet vzoriek pív, ktorých pôvod je uvedený v časti 2. Otvorenou otázkou tu bolo, ako nájsť objektívne kritérium pre porovnanie stability jednotlivých vzoriek, vzhľadom na ich výrobcom deklarovanú trvanlivosť, dobu ich skladovania od výroby až po dátum merania a tiež ako porovnať tieto údaje s nameranými časmi stability v našich pokusoch. Aby sme mohli porovnať stabilitu piva (skladovateľnosť v dňoch) s nami nameranými dobami stability pív pri 60 °C v minútach, určili sme jednoduchý prevodový koeficient, ktorý umožnil priradiť meranej stabilite pri 60 °C v minútach očakávanú stabilitu v dňoch. Tento koeficient sme získali nasledujúcim postupom: z dátumu minimálnej deklarovanej skladovateľnosti a dátumu merania sme zistili, koľko dní ostáva pivo do uplynutia skladovateľnosti (predpokladaná stabilita). Túto predpokladanú stabilitu sme sčítali pre všetky merané vzorky pív a dostali tak sumárnu stabilitu  $S$  všetkých vzoriek v dňoch. Podobným spôsobom sme sčítaním dôb stability určených pri termickom starnutí (dĺžka indukčnej periódy radikálových oxidácií pri inkubácii pri 60 °C) určili sumárnu stabilitu  $T$  všetkých vzoriek v minútach. Z týchto údajov sme vypočítali koeficient  $k = S/T$ , ktorý nám vyjadruje, koľkým dňom priemernej predpokladanej doby stability zodpovedá jedna minúta priemernej stability charakterizovanej indukčnou periódou.

Násobením experimentálne určenej dĺžky indukčnej periódy v minútach týmto koeficientom sme získali údaj nameranej stability v dňoch. Tento je vynesenej na obr. 5 v závislosti oproti predpokladanej stabilite piva podľa údajov výrobcu. V ideálnom prípade, ak

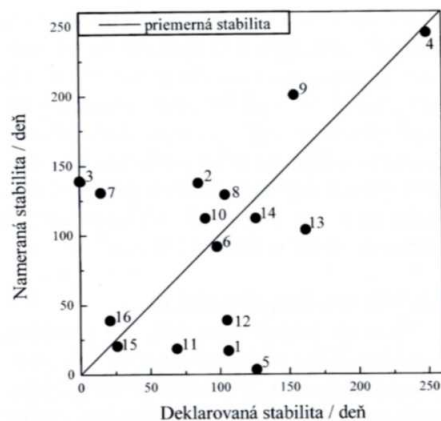


Obr. 3. Časová závislosť zmeny EPR spektr PBN-aduktu štyroch rôznych vzoriek piva a)-d) pri 60 °C

by výrobcom udaná stabilita a nami meraná stabilita presne korelovali, ležali by v obr. 5 vynesené údaje na priamke priemernej stability, ktorá je tam znázornená. V skutočnosti však vzorky piva, ktoré prekračujú priemernú stabilitu, ležia nad priamkou priemernej stability a vzorky, ktoré nedosahujú priemernú stabilitu, ležia pod priamkou priemernej stability. Ich odklonenie od tejto priamky (kladné či záporné) je mierou ich priaznivého či nepriaznivého odklonenia sa od predpokladanej stability normovanej na skúmaný súbor vzoriek. Výrazný odklon od tejto priamky v zmysle vyššej nameranej stability ako deklarovanej výrobcom vykazujú vzorky 3 a 7, ktoré sme merali až po prekročení doby deklarovanej stability (3) resp. tesne pred jej skončením (7). Aj napriek tomu vykazovali ešte výraznú termickú stabilitu. Odklon v zmysle zhoršenia od priemernej stability vykazujú predovšetkým vzorky so stabilizátorom (ako dole opísané v 3.6) a tiež iné. Uve-



Obr. 4. Grafické znázornenie časovej závislosti intenzity EPR spektr PBN-aduktu vzorky piva počas temperovania pri 60 °C, s načrtom extrapolácie zlomu



Obr. 5. Porovnanie stability vzoriek rôznych pív vyhodnotením nameranej stability oproti predpokladaným dobám stability. Vynesená priamka reprezentuje priemernú stabilitu všetkých vzoriek po zohľadnení deklarovanej trvanlivosti, dátumu výroby, doby skladovania a záručnej doby.

dený postup navrhujeme využívať na porovnanie a predpoveď stability jednotlivých vzoriek piva.

### 3.6 Vzorky s prídavkom stabilizátora

V súčasnosti skúmame niektoré otázky, ktoré sa vynorili v priebehu meraní. Jednou z nich sú vzorky, ktoré majú deklarovaný prídavok stabilizátora. V našich testoch takéto vzorky vykazovali netypický časový priebeh

testu v tom zmysle, že už od počiatočného štádia prejavili prudký kontinuálny nárast radikálu spinového aduktu. Navyše, v ďalšom priebehu temperovania vzorky, koncentrácia aduktu začala klesať rôznou rýchlosťou, pre vzorky rôzneho pôvodu. Výsledky meraní pre dve takéto vzorky dopované stabilizátorom E-300 (kyselina L-askorbová) sú znázornené na obr. 6 c,d.

Ich porovnanie s dvoma vzorkami reprezentujúcimi štandardný – očakávaný priebeh je uvedené v rovnakom obrázku závislosťami obr. 6 a,b. Toto rozdielne chovanie je možné vysvetliť rôznymi hypotézami, ktoré sú v súčasnosti predmetom skúmania v našom laboratóriu.

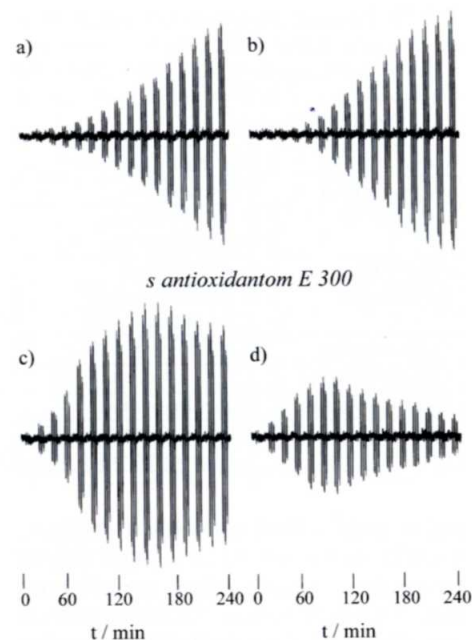
### 4. ZÁVER

Využitie techniky spinového lapača pri termicky urýchlennom starnutí reprezentuje veľmi vhodnú metódu na charakterizáciu stability piva.

**Uznanie** Slovenskej Grantovej Agentúry Project VEGA1-4206/97 za podporu.

### LITERATÚRA

- [1] KANEDA, H.: J. Food Sci. **55**, 1988, s. 885
- [2] UCHIDA, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, 1996, s. 198
- [3] UCHIDA, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, 1996, s. 205
- [4] TAKAOKA, By. S.: Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **35**, 1998, s. 157



Obr. 6. Časová závislosť zmeny EPR spektrier PBN aduktu vzoriek piva bez antioxidantu pri 60 °C (a,b) a s deklarovaným prídavkom kyseliny L-askorbovej (c,d)

- [5] BARR, D.: Bruker EPR Application Note, 1998

Lektoroval: Ing. Pavel Čejka, CSc.  
Do redakcie došlo 2. 7. 1999