

POLYFENOLOVÉ LÁTKY PIVA – PŘIROZENÉ ANTIOXIDANTY

JAROSLAV ČEPIČKA a MARCEL KARABÍN

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Jaroslav.Cepicka@vscht.cz

Došlo dne 10.VIII.2001

Klíčová slova: polyfenoly, flavonoidy, antioxidanty

Obsah

1. Úvod
2. Chemická struktura přírodních polyfenolů piva
3. Reakce polyfenolů piva a jejich změny v technologii
4. Zdravotní a hygienické účinky polyfenolových složek piva
5. Závěr

1. Úvod

Pivo je oblíbený slabě alkoholický nápoj, který je pro svůj osvěžující charakter, příjemnou hořkou chuť a dietetické účinky velmi rozšířen u nás i v zahraničí. Jeho obliba se projevuje v celosvětovém růstu výroby.

Jedním z hlavních problémů pivovarského průmyslu je zajištění dostatečně vysoké trvanlivosti piva. Současný trend směřuje k prodeji piva v lahvích a plechovkách, což je důsledek změny životního stylu a extenzivnějšího exportu. Všeobecně se dnes požaduje až roční garantovaná trvanlivost. Vysoká trvanlivost piva neznamená pouze zachování čisti, která je dnes samozřejmým požadavkem, ale také udržení všech ostatních kvalitativních vlastností, jako je chuť, vůně, barva a pěnivost, a to během transportu i při následném skladování. Bohužel ani sebelepší systém výroby a kontroly nedokáže jednoznačně zaručit, že finální výrobek bude mít dobrou senzoryckou stabilitu.

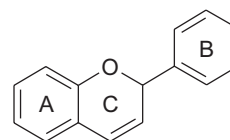
Jedny ze složek, které mají těsný vztah k popsaným kvalitativním znakům a stabilitě piva, jsou polyfenolové látky. Do piva se dostávají z ječmene, resp. sladu, chmele a chmelových výrobků jako přírodní složky, které dalekosáhle ovlivňují jeho senzorycké vlastnosti i celkovou trvanlivost.

Rostlinné polyfenoly jsou amorfni látky fenolické povahy, které jsou rozšířeny v nejrůznějších částech rostlin – v kůře, dřevě, listech, plodech, kořenech i v patologických útvarech. Jsou charakteristické řadou zevních společných vlastností. Vyčiňují kůži, srážejí roztoky želatiny i alkaloidů, se železitými solemi dávají tmavé sraženiny, oxidují se v alkalickém prostředí atd. Jsou v rostlinné říši všudypřítomné, dodávají rostlinám charakteristické zbarvení, někdy příznačnou chuť plodům, ale nejčastěji jsou smyslově nevýrazné.

Jejich hlavními představiteli jsou flavonoidy, zahrnují se však mezi ně i kumarinové deriváty, chinony, ubichinony, štěpné produkty testinových kyselin, deriváty kyseliny chlorogenové a volné fenolové kyseliny.

2. Chemická struktura přírodních polyfenolů piva

Nejvíce zastoupenou skupinu polyfenolových složek piva představují flavonoidy, které patří do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů obsahujících v molekule dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání C₆-C₃-C₆ a jejichž struktura se odvozuje od skeletu heterocyklického flavanu (I).



I flavan

Uvedené polyfenoly se obvykle rozdělují do čtyř podskupin na chalkony, flavonoidy, flavonoly a anthokyanidiny¹. Chalkony jsou prvními intermediáty v biosyntéze flavonoidů vznikajícími reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkonsynthasou (schéma 1). Další adice prenylu nebo geranylu mohou vést k prenylovaným chalkonům. Flavanonová struktura vzniká isomerací chalkonu enzymem chalkonisomerasou a její následná oxidace vede k flavanolům, kdežto redukce k flavanolům. Flavanolová polymerace může dále vést k dobře známým proanthokyanogenům. V tomto případě se vytváří vazba mezi C-8 kruhu A a C-4 prostředního můstku. Krátké polymery s méně než 10 jednotkami jsou obvykle označovány za oligomery, kdežto dlouhé řetězce polymerů jsou známy jako taniny².

Ze chmele se dostávají do piva navíc prenylované flavonoidy s prenylovým substituentem na kruhu A. Více než 80 % z nich tvoří xanthohumol, který přechází do piva v isomerované formě jako isoxanthohumol³.

Skupina flavanoidů je extrémně diverzifikovaná. Ve flavonech a iso flavonech je 2,3-dvojná vazba konjugovaná s 4-oxo funkcí, ve flavan-3,4-diolech jsou hydroxyskupiny na uhlících C-3 a C-4, ve flavan-3-olech je jen jedna hydroxyskupina v pozici C-3 a ve flavanonech je v pozici C-4 oxoskupina. B kruh se může také posunout do polohy C-3 nebo C-4, jak je tomu v případě isoflavonů a neoflavonů.

Do piva přecházející flavanoly ze chmele jsou reprezentovány hlavně flavan-3-oly katechinem (II) a anthokyanogeny (III) (cit.⁴). Autoři izolovali ze chmele odrůdy Bullion šest flavanoidních subfrakcí: monomery, dimery, trimery a tři polymerní frakce se zdánlivým polymeračním stupněm 3,76 až 11,7.

Z výsledků prezentovaných autory vyplynulo, že jednodu-

ché flavanoly (monomery, dimery a trimery) představují pouze menší díl chmelových flavanoidů. Nalezli dva monomery, katechin a epikatechin. Proanthokyanidin B1 (obsahující molekulu katechinu vázanou na epikatechin) a proanthokyanidin

B3 (dvě molekuly katechinu) tvořily většinu dimerové frakce, zatímco hlavním trimerem byl proanthokyanidin C2 (tři katechinové jednotky). Oligomerní frakce byla přítomna v největším množství a tvořila až 80 % flavanoidního extraktu chmele.

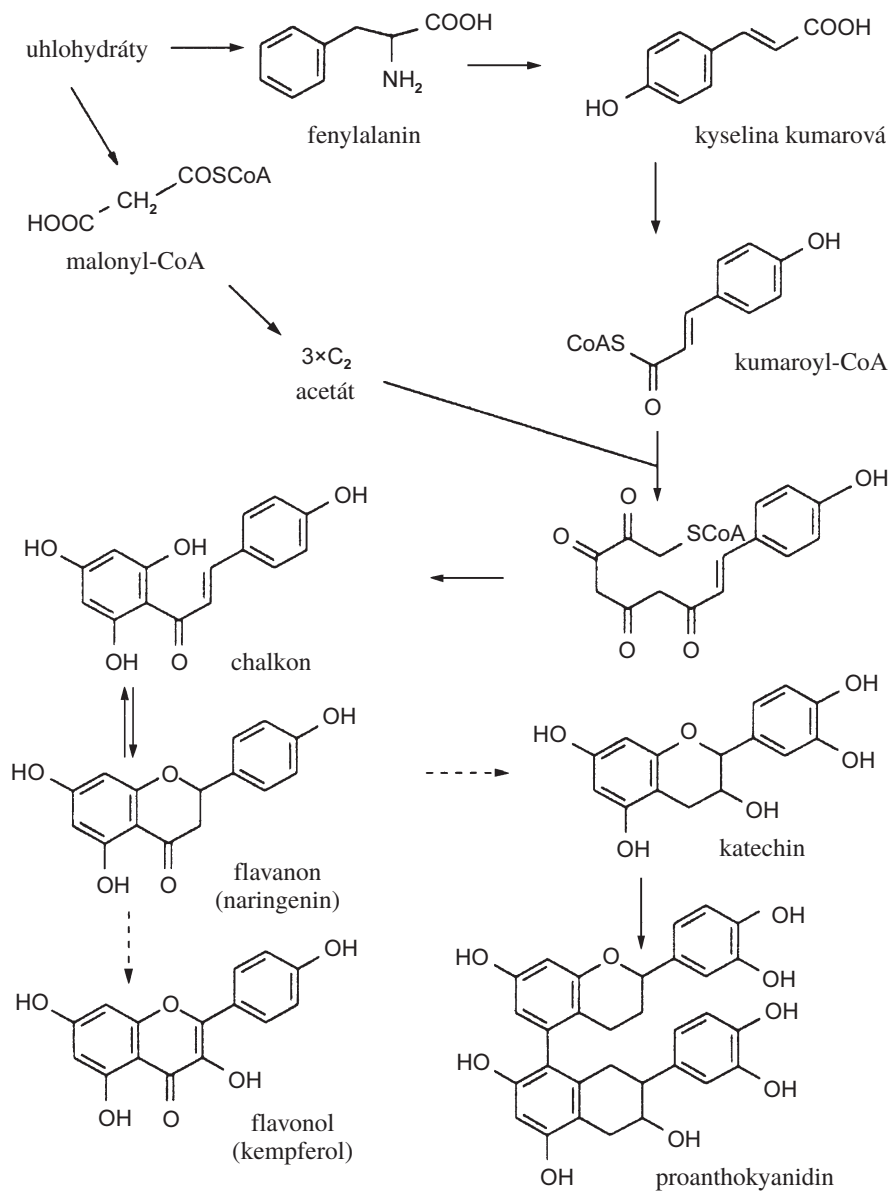
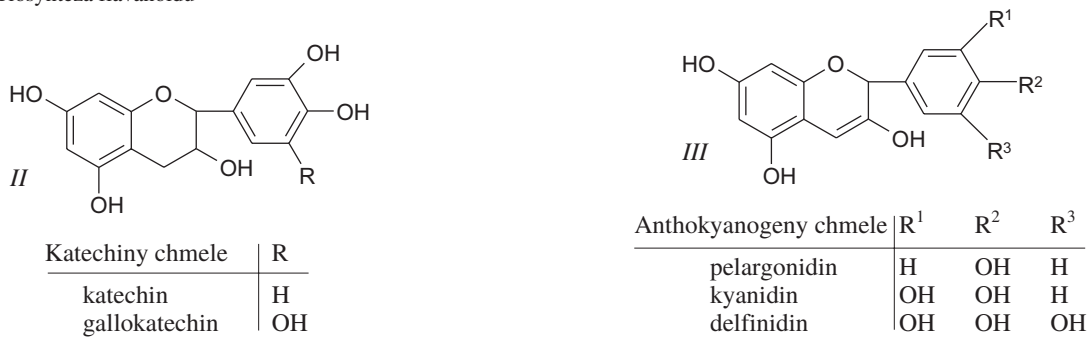


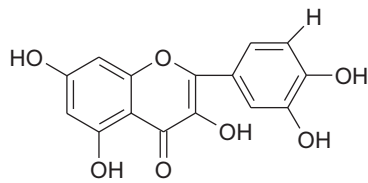
Schéma 1. Biosyntéza flavanoidů^{2,3}



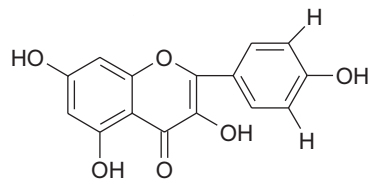
Flavanoly přicházejí do pivovarského procesu ze surovin převážně ve formě flavonolových glykosidů. Většina z nich byla identifikována jako mono-, di- a tri-glykosidy kvercetin (IV) a kempferolu (V) a bylo přítomno jen malé množství myricetinu. Čtyři hlavní zastoupené glykosidy byly kvercetin a kempferol- β -3-glukosidy a β -3-rutinosidy⁵.

Přestože chmelovar umožňuje extrakci 90 % flavonolových glykosidů, jsou nalézány ve velmi nízkých koncentracích jak v mladině, tak i v pivu. Přes jejich vysoké antioxidační účinky se předpokládá, že flavanoly jen málo přispívají k redukční síle chmele a mladiny. Čtyři hlavní glykosidy byly kvercetin, kempferol, β -3-glukosidy a β -3-rutinosidy^{6,7}. Podle VanSumere a spol.⁸ existuje velká variabilita v poměrech glykosidů u jednotlivých odrůd, což umožňuje identifikaci kultivarů.

Kumarinové deriváty jsou přímo ve chmelu, v ječmeni i ve sladu. Vyskytují se buď jako volné aglykony nebo jako glyko-



IV kvercetin



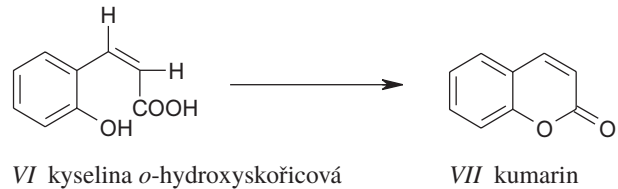
V kempferol

sidy, obvykle β -D-glukosidy^{9,10}. Jejich struktura je odvozena od laktónů *o*-hydroxykyselin, zejména kyseliny *o*-hydroxyskořicové (VI), resp. kumarinu (VII) (schéma 2).

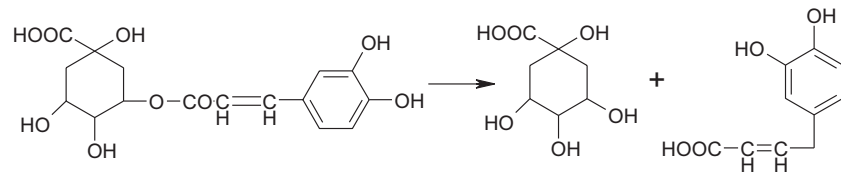
Chinony a ubichinony přecházejí do piva z ječmene a sladu pouze jako minoritní složky a jejich role je spojena s oxidoredukčními přeměnami¹¹. Deriváty kyseliny chlorogenové tvoří bohatou skupinu aromatických hydroxy- a methoxykyselin odvozených převážně od kyseliny chlorogenové (VIII), kyseliny kávové (X) (schéma 3) a kyseliny *p*-hydroxybenzoové (XI). Mohou snadno podléhat kondenzačním reakcím a oxidačním přeměnám na chinony, které se napojují na chemismus hnědnutí mladiny¹².

Aromatické kyseliny a stejné produkty testinových kyselin jsou představovány zejména kyselinou vanilinovou (XIV), ferulovou (XIX), syringovou (XV) a sinapovou (XX), které se vyskytují v klíčcích sladovaného ječmene i ve chmelu¹³. Do této skupiny polyfenolových látek patří i cukerné estery kyseliny gallové, častěji *m*-digallové a deriváty kyseliny ellagové (XXI), která je oxidačním produktem kyseliny gallové.

Z uvedeného přehledu je patrná široká diverzifikace polyfenolových složek přecházejících v průběhu pivovarského procesu do piva buď v nepozměněné, ale ještě častěji v pozměněné formě. Situace se stává navíc složitější tím, že důležitý zdroj polyfenolů piva, chmel, se v současné době stále více zpracovává ve formě chmelových výrobků (extraktů, pelet,

VI kyselina *o*-hydroxyskořicová

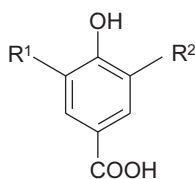
VII kumarin

Schéma 2. Tvorba kumarinu z kyseliny *o*-hydroxyskořicové

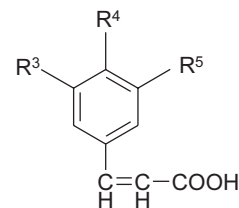
VIII kyselina chlorogenová

IX kyselina chinová X kyselina kávová

Schéma 3. Štěpení kyseliny chlorogenové



Deriváty kyseliny <i>p</i> -hydroxybenzoové	R ¹	R ²
XI kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H
XII kyselina protocatechová	OH	H
XIII kyselina gallová	OH	OH
XIV kyselina vanilinová	H	OCH ₃
XV kyselina syringová	OCH ₃	OCH ₃



Deriváty kyseliny skořicové	R ³	R ⁴	R ⁵
XVI kyselina skořicová	H	H	H
XVII kyselina <i>p</i> -kumarová	H	OH	H
XVIII kyselina kávová	H	OH	OH
XIX kyselina ferulová	H	OH	OCH ₃
XX kyselina sinapová	OCH ₃	OH	OCH ₃

hydrogenovaných a isomerovaných preparátů), při jejichž výrobě dochází ke změnám složení polyfenolových látek.

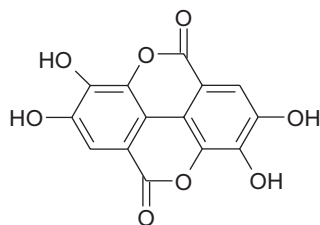
3. Reakce přírodních polyfenolů a jejich změny v technologii

V pivu je přítomna široká škála polyfenolových látek. Složky o nižší molekulové hmotnosti, představované zejména volnými aromatickými kyselinami, jsou přítomny v menší míře a méně se uplatňují v pivovarském procesu než složitější flavonoidy, zejména flavanoly a jim strukturálně podobné flavonoly.

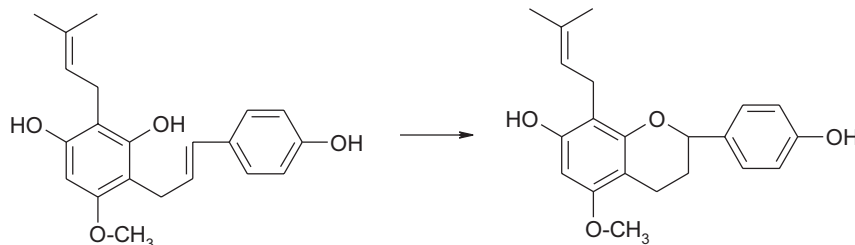
Toto jednoduché rozdělení potvrdil a upřesnil Ros^{14,15} v jedné z nejnovějších klasifikací polyfenolů vyskytujících se v pivovarském procesu. Polyfenolové látky rozdělil do dvou velkých skupin. První jsou fenolické kyseliny zahrnující deriváty kyseliny benzoové (ortho- i para-) a deriváty kyseliny skořicové (XVI). Do druhé podskupiny patří kyselina salicylová, kyselina gentisová, kyselina *p*-hydroxybenzoová (XI), kyselina protokatechová (XII), kyselina gallová (XIII), kyselina vanilinová (XIV) a kyselina syringová (XV). Do druhé podskupiny patří kyselina *p*-kumarová (XVII), kyselina kávová (XVIII), kyselina ferulová (XIX) a kyselina sinapová XX. Druhou velkou skupinou jsou flavonoidy. Ty jsou dále rozděleny na flavany (flavanoly a prokyanidiny), anthokyany a flavonoly.

V průběhu pivovarské technologie dochází k řadě chemických přeměn polyfenolových složek pocházejících z původních surovin, především v průběhu chmelovaru, kvašení, filtrace, a stabilizace koloidních vlastností piva. Neméně významnými změnami jsou procesy stárnutí piva, které se projevují snížením sensorické kvality dlouhodobě skladovaného piva. Jedná se o reakce hydrolytické, isomerační, kondenzační až polymerační a oxidoredukční.

Hydrolytické reakce vedou obvykle ke štěpení glykosidů



XXI kyselina ellagová



XXII xanthohumol

XXIII isoxanthohumol

Schéma 4. Isomerace xanthohumolu při chmelovaru¹⁶

na aglykony a odpovídající sacharidické složky a výrazně se v kvalitě hotového piva neuplatňují. Z isomeračních reakcí je nutno uvést především přeměnu xanthohumolu (XXII) na isoxanthohumol (XXIII) během chmelovaru¹⁶ (schéma 4).

Kondenzační až polymerační reakce se uplatňují především ve smyslu tvorby výšmolekulárních celků s vysokou srážecí aktivitou vůči bílkovinám extraktu piva. Tím dochází k tvorbě polyfenol-bílkovinných komplexů, které za určitých podmínek mohou vypadávat z roztoku, a tím vytvářet koloidní zákaly. Teorii vazeb polyfenolových látek na bílkoviny vypracoval Siebert a spol.^{17–20} Na základě studií modelových systémů v různých nápojích prokázali, že zákalotvorné polyfenolové složky mají dvě a více vazebných míst, kterými se váží na specifická místa zákalotvorných bílkovin, jejichž počet souvisí s obsahem aminokyseliny prolinu. Vazby polyfenolových složek na bílkoviny se uskutečňují na principu nekovaletních interakcí a tvorbou můstků mezi molekulami. Hydrofobní interakce se uplatňují ve větší míře než vodíkové můstky. Vazebná schopnost, specifita a dostupnost vazebných míst závisí na chemické a fyzikálně-chemické povaze polyfenolů. Důležitou roli v těchto procesech hraje i pH prostředí. Vhodnými stabilizačními postupy, dnes založenými především na adsorpci zákalotvorných prekurzorů na inertní filtrační materiály, lze tvorbu koloidních zákalů výrazně potlačit. Koloidní stabilizace piv se uplatňuje především při výrobě exportních piv s požadovanou dlouhodobou trvanlivostí a považuje se dnes za technicky vyřešenou.

Dosud nevyřešeným problémem pivovarské technologie však zůstává otázka sensorické stability piva, která přímo souvisí s oxidačně-redukčními procesy probíhajícími v pivu po naplnění do konzumního obalu. Uvedené procesy jsou souhrnně nazývány stárnutím piva a polyfenolové složky v něm hrají důležitou roli. Působením světla, tepla, kovových iontů, mechanického pohybu a dalších faktorů jsou iniciovány reakce, vedoucí ke tvorbě volných radikálů způsobujících autooxidaci polynenasycených lipidických složek extraktu piva. To má za následek tvorbu těkavých karbonylových sloučenin odpovědných za nepříznivé chuťové změny vyvolané širokou škálou karbonylových látek.

Tvorba karbonylových sloučenin probíhá několika různými mechanismy. Antioxidanty pak mohou působit jako „lapače“ volných radikálů a kyslíku a rovněž tak jako maskovací činidla v důsledku tvorby chelátů s kovovými ionty. Polyfenoly a zejména flavanoidy jsou přitom považovány za nejúčinnější přirozené antioxidanty piva.

Irwin²¹ se spolupracovníky dospěli k závěru, že všeobecné ovlivnění chuťové stability polyfenolovými látkami závisí na

absolutní i relativní koncentraci trihydroxy- i dihydroxy- flavanoidů v pivu. Bylo zjištěno, že trihydroxyflavany, např. prodelfinidin, mohou působit jako prooxidanty v mechanismu senzorkého stárnutí piva, zatímco dihydroxyflavany, např. katechin a prokyanidin B3 mohou chránit citlivé látky před oxidací a nejsou schopny vystupovat jako prooxidanty.

Biovin²² se spolupracovníky rovněž referuje o zcela jasné závislosti antioxidačních vlastností sladu, resp. sladiny na obsahu a skladbě polyfenolových látek. I podle těchto autorů tvoří polyfenoly hlavní přirozené antioxidanty piva a působí dvěma mechanismy, jako lapače volných radikálů a jako inhibitory aktivity lipoxygenas. Dále zjistili, že antioxidační účinnost sladu je závislá na odrůdě ječmene a technologii sladování.

Stárnutí piva se tak stává jedním z klíčových problémů pivovarského výzkumu a technologie. V současnosti se všeobecně uznává platnost radikálové teorie, podle níž se při stárnutí uplatňují zejména radikály organických i anorganických sloučenin, které podporují průběh radikálových procesů. Zvláštní význam při tom mají sloučeniny kyslíku, popř. jeho excitované stavy.

Polyfenolové složky piva mají silné antioxidační vlastnosti²³. Jsou např. schopny likvidovat hydroxylové radikály generované při fotolýze peroxidu vodíku, reagují s O_2^- a 1O_2 a s peroxyradikály, včetně terminace řetězové reakce během autooxidace mastných kyselin. Autoři zjistili, že aktivita flavonoidů klesá v pořadí myricetin > kvercetin > rhamnetin > naringenin > katechin > 5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon > kempferol > flavon. Aktivita vzrůstá s počtem hydroxylových skupin substituovaných na aromatickém kruhu B a přítomnost hydroxyly na C-3 a jeho glykosylace dále nezvyšuje „pohlčovací“ účinnost. Řada z přírodních polyfenolových složek je silnějšími antioxidanty, než jsou prokázány antioxidačně účinné vitaminy C, E a provitamin β -karoten.

4. Zdravotní a hygienické účinky polyfenolových složek piva

Přesný vliv polyfenolových složek piva na lidské zdraví se přisuzuje především jejich antioxidačním účinkům, které jsou schopny eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Souhrnně mají polyfenoly široké spektrum příznivých účinků na lidské zdraví, zahrnující účinky antioxidační, antikancerogenní, antimikrobiální, imunomodulační a protizánětlivé. Dále se účastní procesů regulace tlaku krve a hladiny glukózy v krvi²⁴.

Jestliže jsou antioxidační fenolické komponenty stále přijímány pravidelnou spotřebou nápojů obsahujících právě tyto látky, snižují kolektivně trombotické jevy, a tím přispívají ke zlepšení aterosklerózy a snížení výskytu onemocnění a úmrtnosti na nemoci cévní soustavy. Bylo zjištěno, že fenolické látky piva a červeného vína inhibují mědi katalyzovanou oxidaci LDL (nízkodenzitní lipoprotein), a tudíž mají vůči ní silné antioxidační účinky²⁴.

Ve chmelu a v pivu přítomné prenylované flavonoidy jsou schopny inhibovat oxidaci LDL, hrající klíčovou roli při vzniku aterosklerózy^{25,26}. Hlavní prenylchalon xanthohumol vykazuje vysokou antioxidační aktivitu při inhibici oxidace LDL, vyšší než α -tokoferol, ale nižší než flavonol kvercetin. V pivu se navíc nachází i jeho isomer isoxanthohumol s prokázaným

antikancerogenním potenciálem. Při blokování škodlivě působících enzymů je dokonce účinnější než xanthohumol¹⁷. Polyfenoly obsažené v pivu jsou schopny vázat LDL a VLDL (nízko- a velmi nízkodenzitní lipoprotein) v plazmě, a chránit je tak proti oxidaci *ex vivo*. Obdobné účinky vykazuje i ubichinon-10. Navíc se předpokládá, že xanthohumol je původcem oestrogenní aktivity²⁷.

Z uvedeného přehledu jsou zřejmé příznivé účinky polyfenolových složek piva na lidské zdraví. Na druhé straně nelze opominout v pivu obsažený alkohol, který naopak může být při přílišné konzumaci původcem řady zdravotních poškození. Zdraví prospěšná konzumace, tzv. řízené neboli moderované pití by nemělo přesáhnout podle různých zdrojů 0,5 až 1 litr denně, posuzováno však vždy s ohledem na celkový zdravotní stav konzumenta. Při konzumaci piva je doporučováno pít pivo během jídla, aby jeho vstřebávání bylo pomalejší a ochranný účinek delší.

5. Závěr

Přírodní polyfenolové složky piva pocházející z ječmene, sladu a chmele vykazují výrazné antioxidační účinky, které se projevují především v inhibici oxidačních přeměn lipidických složek, a tím blokováním procesů stárnutí chuti piva. Přiměřená konzumace piva je jedním z možných zdrojů přírodních antioxidantů a látek s prokazatelnými antisklerotickými, antikancerogenními, antimikrobiálními, antioxidačními, oestrogenními, imunomodulačními a protizánětlivými účinky.

LITERATURA

1. Rice-Evans C., Miller N. J., Paganga G.: Free Radical Biol. Med. 20, 933 (1996).
2. Stevens J. F., Miranda C. L., Buhler D. R.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 56, 136 (1998).
3. Stevens J. F., Ivancic M., Hsu V. L., Deinzer M. L.: Phytochemistry 44, 1575 (1997).
4. McMurrugh I., Henningan G. P.: J. Inst. Brew. 90, 24 (1984).
5. McMurrugh I.: J. Chromatogr. 218, 683 (1981).
6. McMurrugh I., Henningan G. P., Malcolm J. L.: J. Agric. Food. Chem. 30, 1102 (1982).
7. Sägeser M., Deinzer M. L.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 54, 129 (1996).
8. VanSumere C. F., Vande Castele K., Hutsebaut W., Everaert E., De Cooman L., Meulemans W.: EBC Monograph XIII, 146 (1987).
9. Moll M.: Brauwelt 124, 17 (1984).
10. Kretschmer K. F.: Brauwelt 135, 1372 (1995).
11. Vinson J. A., Jinhee J., Jihong Y., Dabbagh Y., Xiquan L., Mamdouh S., Proch J., Songhuai C.: J. Agric. Food. Chem. 47, 2502 (1999).
12. Marinova E. M., Yanishieva N. V.: J. Am. Oil Chem. Soc. 71, 427 (1994).
13. McMurrugh I., Roche G. P., Cleary K. G.: J. Inst. Brew. 90, 181 (1984).
14. Ros I.: Cerveza Malta 35(1), 38 (1998).
15. Ros I.: Cerveza Malta 35(2), 22 (1998).
16. Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L.: J. Chromatogr., A 832, 97 (1999).

17. Siebert K. J., Troukhanova N. V., Lynn P. Y.: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 80 (1996).
18. Siebert K. J., Carrasco A., Troukhanova N. V., Lynn P. Y.: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1997 (1996).
19. Siebert K. J., Lynn P. Y.: *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4275 (1997).
20. Siebert K. J., Lynn P. Y.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **56**, 24 (1998).
21. Irwin A. J., Barker R. L., Pipats P.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **49**, 140 (1991).
22. Boivin P., Malanda M., Maillard M. N., Berset C., Richard H., Hugues M., Richard-Forget F., Nicolas J.: *Proc. EBC Congr., Brussels 1995*, str. 159.
23. Husain S. R., Gillard J., Gillard P.: *Phytochemistry* **26**, 2489 (1987).
24. Piendl A., Biendl M.: *Brauwelt Int.* **IV**, 310 (2000).
25. Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., MaCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R.: *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3876 (2000).
26. Mosinger B.: *Cor Vasa* **36**, 171 (1994).
27. Keukeleire D., De Cooman L., Rong H., Heyerick A., Kalita J., Milligan S. R., v knize: *Plant Polyphenols*, 2. díl, str. 739. Kluwer Academic, New York 1999.

J. Čepička and M. Karabín (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Polyphenolic Compounds of Beer – Natural Antioxidants**

The review summarizes the current knowledge of beer polyphenols, their chemical structure and classification. Biosynthesis pathways of some polyphenolic compounds are also included. Great attention is devoted to chemical reactions, which take place during brewing technology, in relation to colloidal and sensory stability of beer. Further, the health prevention properties of beer polyphenolics are discussed.