



Protein-thioler og stabilitet af øl

Det færdige øls mikrobielle holdbarhed var tidligere en af de største udfordringer i forbindelse med ølbrygning. I dag er de mikrobielle udfordringer imidlertid under kontrol, og opmærksomheden er rettet mod fremstilling af øl, der har en stabil høj kvalitet i længere tid efter tapning.

Af Signe Hoff, Birthe M. Jespersen, Marianne N. Lund og Mogens L. Andersen, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet

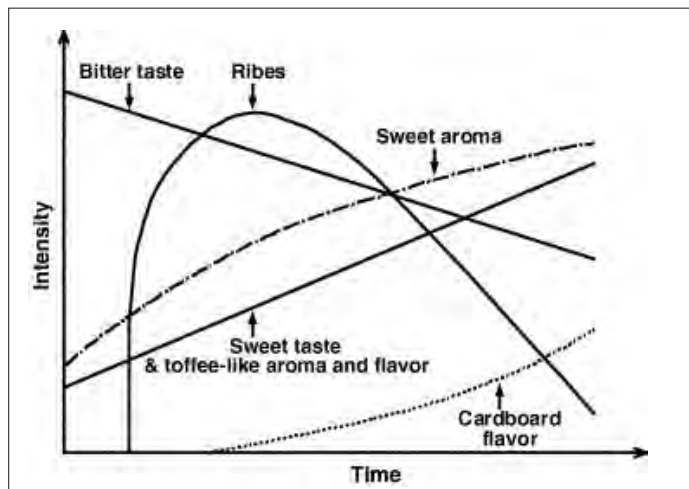
Tilstedeværelsen af naturlige thiolholdige proteiner i den færdige øl kan gøre øllet mere smagsstabilt pga. den mulige antioxidative effekt af redox-aktive thiolgrupper.

Varme, lys og ilt er alle vigtige faktorer, der fremmer oxidation og begrænser smagsstabiliteten og dermed øllets holdbarhed. Smagen af gammelt øl er kompleks, og mange forskellige typer oxidative reaktioner kan resultere i dannelse af afsmag (figur 1). Især lipidoxidation og dannelsen af trans-2-nonenal er blevet gjort ansvarlig for smagen af gammelt pilsnerøl med dens papagtige smag og lugt.

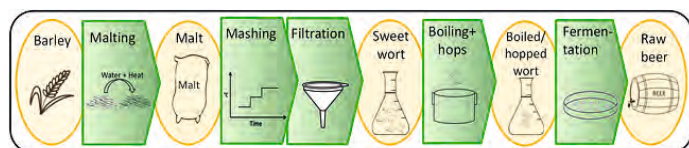
Forholdet mellem prooxidanter og antioxidanter er afgørende for øllets smagsstabilitet.



Prooxidanterne fremmer oxidation, mens antioxidanterne modvirker oxidation. Når antioxidanterne er brugt op, får prooxidanterne frit spil til at starte de oxidative kædereaktioner, der ender med dannelse af uønskede kemiske smagsforbindelser. En øget mængde af antioxidant vil kunne modvirke disse oxidative processer og bevare den høje kvalitet i længere tid.

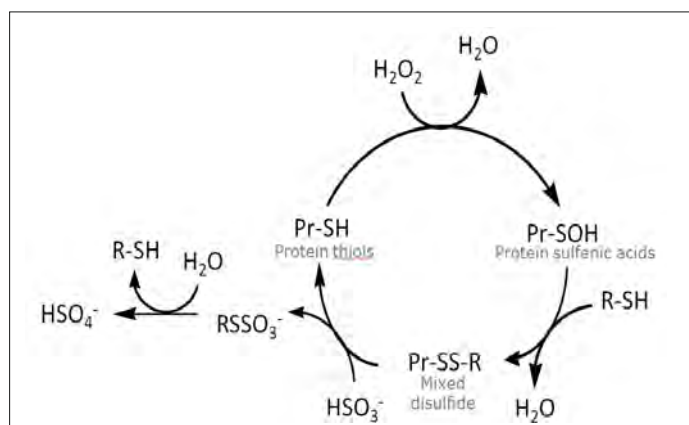


Figur 1. Skitse over udviklingen af afsmag dannet under lagring i lyse øl [9].



Figur 2. Brygprocessen.

Ved Institut for Fødevarevidenskab har vi i længere tid arbejdet med hypotesen om, at de naturligt forekommende thioier virker som antioxidanter i øl. Denne forskning er sket i samarbejde med mikromalter og mikrobrygger Per Kølster (KØLSTER malt og øl), brygmester William Frank, Grauballe Bryghus samt Novozymes A/S. For rationelt at kunne udnytte thioierne



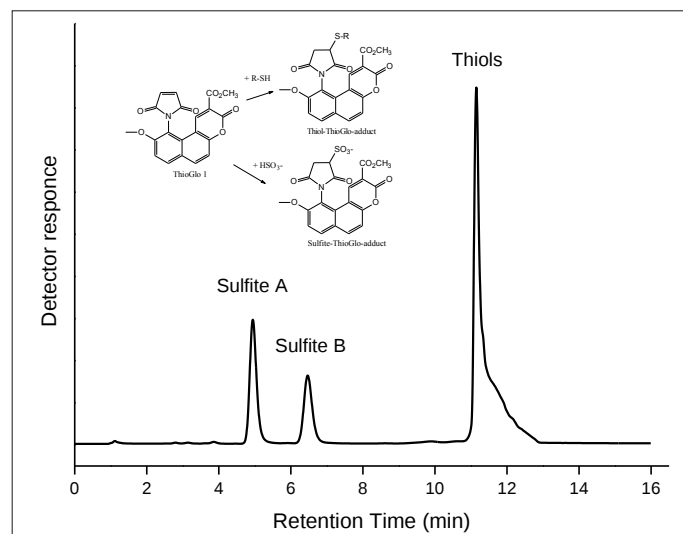
Figur 3. Hypotesen hvorved thiol er indgår i den antioxidative kædereaktion med sulfid

til at øge øllets kvalitet kræves en grundlæggende forståelse af de mange oxidative mekanismer, der finder sted under bryggeprocessen (figur 2).

Sulfit, der bliver udskilt af gæren under fermenteringen, er den vigtigste antioxidant i øl. Sulfit reagerer med hydrogenperoxid (reaktion 1), der er en af de vigtigste precursorer for dannelsen af radikaler.



Thioler antages at kunne katalysere reaktionen mellem sulfit og hydrogenperoxid (figur 3). I stedet for sulfit er det en thiol, der reagerer med hydrogenperoxid, hvorved der dannes en sulfensyre under frigivelse af vand. Derefter dannes et blandet disulfid mellem den meget reaktive sulfensyre og en anden thiol. Til sidst reagerer sulfit med disulfidet og gendanner den oprindelige thiol.



Figur 4. Separation af sulfit og thiol på HPLC-kolonne. ThioGlo 1 binder sulfit stereoisometrisk, hvilket resulterer i to sulfittoppe. Alle thioleler eluerer i samme top.

Ampliqon ||||
Bioreagents & PCR Enzymes

Danske enzymer til dansk bio-teknologi

Ampliqon A/S er dansk producent af DNA polymeraser og reagenser.

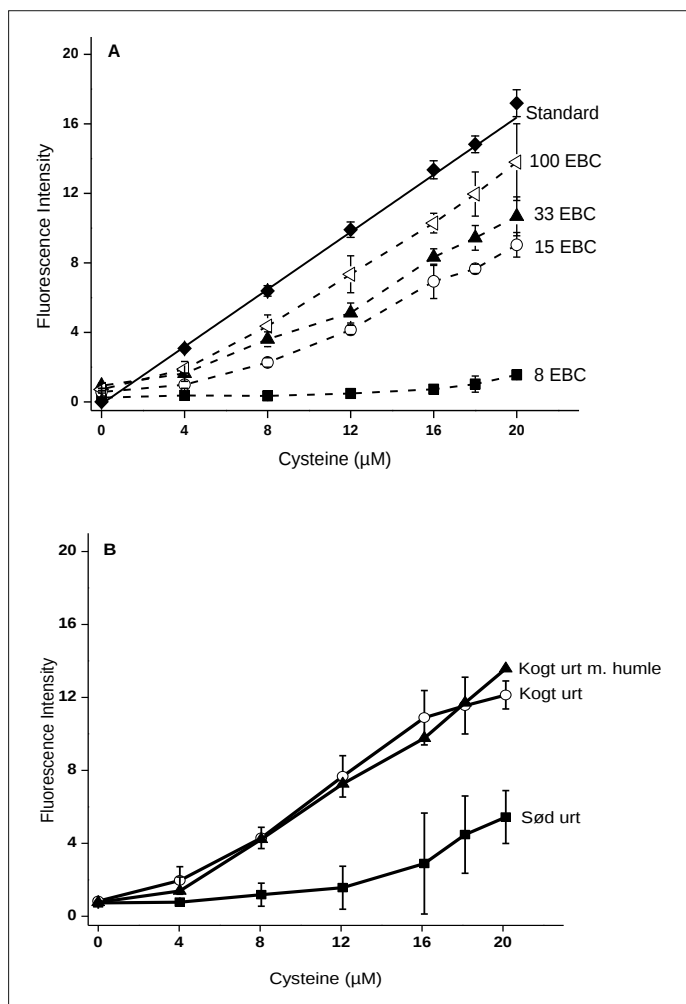
Ampliqon tilbyder kvalitets enzymer og bufferløsninger til bl.a. PCR, qPCR og high fidelity PCR.

Kvalificerede og engagerede medarbejdere står klar til at yde hjælp med problemløsning og udarbejdelse af brugertilpassede enzym-mix.

Som dansk producent kan Ampliqon tilbyde danske kunder høj kvalitet og kort leveringstid til attraktive priser.



Ampliqon A/S • Stenhuggervej 22 • DK-5230 Odense M • Denmark
www.ampliqon.com • Mail: sra@ampliqon.com
Phone: +45 70201169 • Mobile: +45 61276075



Figur 5.
 A: Standard-additionskurver med cystein (0-20 µM thiol) tilsat sød urt fremstillet af malt med stigende ristningsgrad (EBC er et farvemål, der udtrykker ristningsgraden).
 B: Standard-additionskurver med cystein (0-20 µM thiol) tilsat sød, kogt og humlet urt. Mængden af cystein, der ikke er oxideret af den thioloxidative effekt måles som fluorescensintensitet af cystein-ThioGlo 1 addukter. Øget maltristning fører til nedsat thioloxidation, og urtkogning eliminerer thioloxidationskapaciteten.

Metoder

Den mest anvendte metode til thiolbestemmelse er baseret på Ellmans reagens, DTNB¹⁾ og spektrofotometrisk detektion. Den store udfordring ved kvantificering af thiol i øl er tilstedeværelsen af sulfid. Sulfid reagerer nemlig også med DTNB og danner den samme kromofor som thiol. Ved brug af DTNB i øl vil man derfor få et samlet bidrag fra thiol og sulfid.

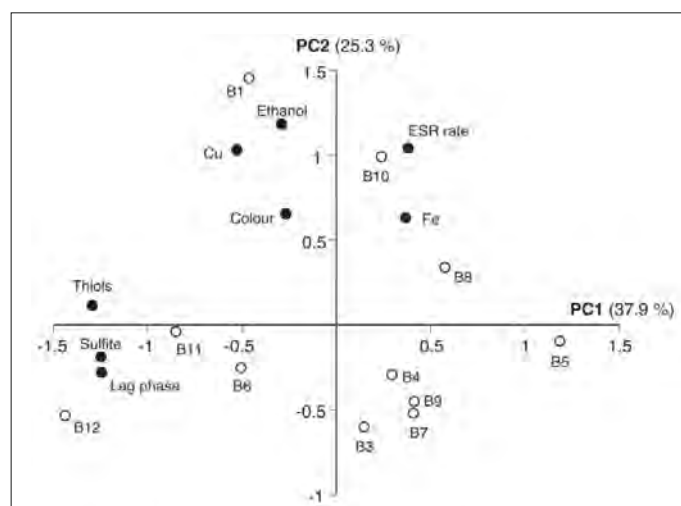
For at kunne lave en sikker kvantificering af thiol i øl har vi udviklet en metode baseret på det fluorescerende thiolreagens ThioGlo 1 [1,2]. ThioGlo 1 danner addukter med både thiol og sulfid, der fluorescerer ved samme bølgelængde, men som kan adskilles vha. HPLC-separation (figur 4). ThioGlo 1-metoden er ca. 100 gange mere følsom end DTNB-metoden. Ved at anvende standard-additionsprincippet er det muligt at bruge metoden til bestemmelse af thiol og sulfid i øltyper, der spænder fra meget lyse pilsnere til meget mørke portere og stouts.

Thiol igennem brygprocessen

Thiolindholdet varierer indenfor bygsorter og derfor også indenfor malttyper. Derudover påvirker udførelsen af selve mæskeprocessen også indholdet af de oxidationsfølsomme thiol. Thioloxidation og dannelse af disulfidbindinger mellem

proteiner under mæskningen medfører nedsat filtreringshastighed af urten. Nedsat filtreringshastighed er problematisk i industriel produktion af øl, og det er derfor allerede i den tidlige brygfase vigtigt at holde thiolerne på deres reducerede form - både for at bevare deres antioxidative effekt og for at undgå længere filtreringshastighed. Thiolindholdet i urten er særlig følsomt overfor tilgængeligheden af oxygen under mæskningen, og udføres mæskningen under atmosfæriske forhold oxideres alle thiol. Større bryggerier mæsker i lukkede systemer, mens mæskning med adgang til atmosfærisk oxygen finder sted på mange mikrobryggerier.

Sød urt viste sig at have en thioloxiderende effekt, som har oprindelse i malten. Øget maltristning resulterede i et fald i den thioloxiderende effekt i sød urt (figur 5, A), mens effekten forsvinder under urtkogningen (figur 5, B). Det virker derfor sandsynligt, at thioloxidationen i sød urt er forårsaget af et



Figur 6. Principal Component Analysis (PCA) af 11 lagrede øl (B1, B3-B12), som viser, at thiolindhold, sulfidindhold og ølets holdbarhed (lag phase), målt med electron spin resonance (ESR) spektroskopi, er korrelerede.

enzym, der kan inaktiveres ved høj varme. På trods af denne thioloxiderende effekt kan der stadig detekteres reducerede thiol i sød urt. Det skyldes, at den thioloxiderende effekt primært påvirker lavmolekylære thiol [3,4].



¹⁾ 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

De thiol, der findes i det færdige øl, kan være overført fra urten, være dannet ved reduktion af disulfider under fermenteringen eller være frigivet fra gæren. Både selektion af råvare samt minimering af ilt under brygprocessen kan være afgørende for thiolernes tilstedeværelse i øllet. Ved en screening af 12 kommercielle danske øl blev der ikke kun fundet en relativ stor variation mellem thiolindholdene i forskellige øltyper, men også en variation mellem forskellige batches af samme øl [5]. Samme screening viste, at thiolindholdet i øllene korrelerede med sulfidindholdet og øllenes holdbarhed, der blev vurderet vha. accelererede ældningsforsøg (figur 6).

Forskellig gær udskiller varierende mængde af thiol, og positiv selektion kan potentielt være gavnligt for stabiliteten. Under lagring falder sulfidindholdet lineært over tid i takt med, at den forbruges som antioxidant i forebyggelse af oxidative reaktioner [6]. Thiolindholdet derimod ser ud til kun at falde lineært i den første del af lagringsperioden, hvorefter tabet af thiol stagnerer [7]. Det tyder derfor på, at kun en del af thiolerne i øl er vigtige ift. øllets holdbarhed.

Den formodede antioxidative effekt af thiol er også aktuell i andre fødevarer som f.eks. mælkeprodukter, hvor der også forskes i thiolernes betydning. I kød har man fundet, at thiol-oxidation og dannelse af disulfidbindinger resulterer i at kødet bliver sejt [8].

E-mail: Signe Hoff: hoff@life.ku.dk

Referencer

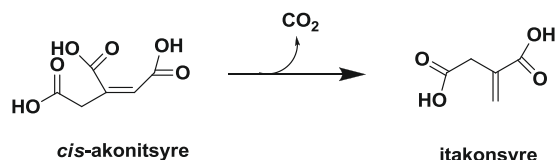
- Hoff, S.; Larsen, F. H.; Andersen, M. L.; Lund, M. N. (2013) Quantification of protein thiols using ThioGlo 1 fluorescent derivatives and HPLC separation. *Analyst* 138, 2096-2103.
- Abrahamsson, V.; Hoff, S.; Nielsen, N. J.; Lund, M. N.; Andersen, M. L. (2012) Determination of sulfite in beer based on fluorescent derivatives and liquid chromatographic separation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70 (4), 296-302.
- Hoff, S.; Lund, M. N.; Petersen, M. A.; Jespersen, B. M.; Andersen, M. L. (2012) Influence of malt roasting on the oxidative stability of sweet wort. *J. Agric. Food Chem.* 60 (22), 5652-5659.
- Hoff, S.; Damgaard, J.; Petersen, M. A.; Jespersen, B. M.; Andersen, M. L.; Lund, M. N. (2013) Influence of barley varieties on wort quality and performance. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1968-1976.
- Lund, M. N.; Andersen, M. L. (2011) Detection of thiol groups in beer and their correlation with oxidative stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 69 (3), 163-169.
- Lund, M. N.; Hoff, S.; Berner, T. S.; Lametsch, R.; Andersen, M. L. (2012) Effect of pasteurization on the protein composition and oxidative stability of beer during storage. *J. Agric. Food Chem.* 60, 12362-12370.
- Hoff, S.; Lund, M. N.; Petersen, M. A.; Frank, W.; Andersen, M. L. (2013) Storage stability of pasteurized non-filtered beer. *J. Inst. Brew.* (in press)
- Lund, M. N.; Lametsch, R.; Hviid, M. S.; Jensen, O. N.; Skibsted, L. H. (2007) High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Sci.* 77 (3), 295-303.
- Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. (2006) The chemistry of beer aging - a critical review. *Food Chem.* 95 (3), 357-381.

Nyt om ...

... Itakonsyre beskytter hjernen



Itakonsyre (methylenbutandisyre), hvis navn er et anagram af akonitsyre, er et industrikemikalie, der hovedsageligt anvendes i plastindustrien. Det produceres af mikrosvampe som



Aspergillus terreus ved decarboxylering af cis-akonitsyre. Nye undersøgelser viser helt uventet, at itakonsyre også produceres af mikroglia-celler i pattedyrs hjerner. Syren virker antibakteriel ved at blokere enzymer, der er livsvigtige for bakterier. Både væksten af *Salmonella enterica* og *Mycobacterium tuberculosis* hæmmes kraftigt af den substituerede ravsyre.

Carsten Christophersen

Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. A. Michelucci *et al.* *PNAS* 2013, <http://www.pnas.org/content/early/2013/04/18/1218599110.full.pdf+html>

Intelligent Chemistry

Now JASCO available from Biolab A/S:

SFC/SFE & HPLC/X-LC, UV/VIS/NIR Spectrometers, Circular Dichroism, Raman, Polarimeters, FT-IR / FT-Raman.



Also available from Biolab A/S:



Gilson Automated SPE & HPLC
Gilson Robotic Solutions
Gilson Pipettes
CAMAG HPLC
Radleys Reaction Systems
Genevac Evaporators
Virtis Freeze Dryers
Andrew Pipetting Robot

Biolab A/S
Sindalsvej 29
DK-8240 Risskov
Telefon 8621 2866
Telefax 8621 2301
E-mail: sales@biolab.dk