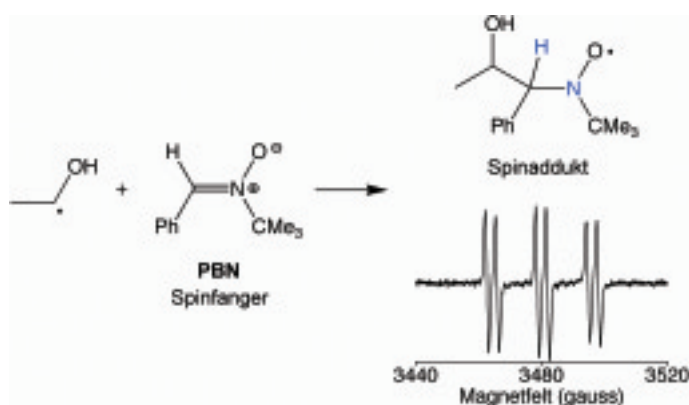


Øl og ESR-spektroskopi

Mange vil sikkert mene, at øl og elektron spin resonans (ESR)-spektroskopi hører hjemme i vidt forskellige kemiske universer. Men ESR-spektroskopi har bidraget med vigtig viden om mekanismerne bag ældning af øl og er blevet en rutinemetode til at måle øls holdbarhed

Af Mogens L. Andersen & Leif H. Skibsted, Fødevarekemi, Institut for Fødevarevidenskab, KVL

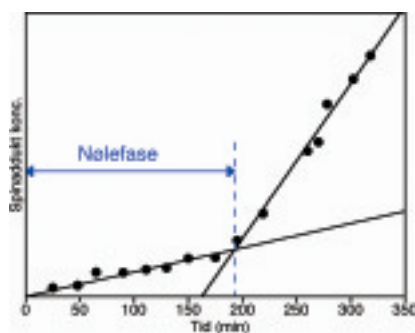


Figur 1. Kortlivede radikaler kan detekteres indirekte som spinaddukter. 1-hydroxyethylradikalet danner sammen med spinfangeren α -phenyl-t-butylnitron (PBN) et stabilt nitroxylradikal. Koblingsmønstret for ESR-spektre af PBN-spinaddukter består typisk af en triplet af dubletter på grund af hyperfin kobling mellem den uparrede elektron og et N-atom samt en proton (angivet med blått).

Holdbarheden af øl i flasker - og pilsnerøl især - påvirkes negativt af varme, lys og ilt under opbevaring. Det skyldes især oxidative reaktioner, der ændrer smag og danner uklarheder. ESR-spektroskopi har i de seneste år været et vigtigt værktøj til at studere radikaler, der er kortlivede intermediater i disse processer. ESR-detektion af radikaler har både bidraget med vigtig viden om mekanismerne bag ølældning og er desuden blevet en rutinemetode til at måle holdbarheden af øl.

Detektion af radikaler i øl

Under gunstige omstændigheder kan man med ESR-spektroskopi detektere radikaler i koncentrationer ned til nogle få nM. Alligevel er



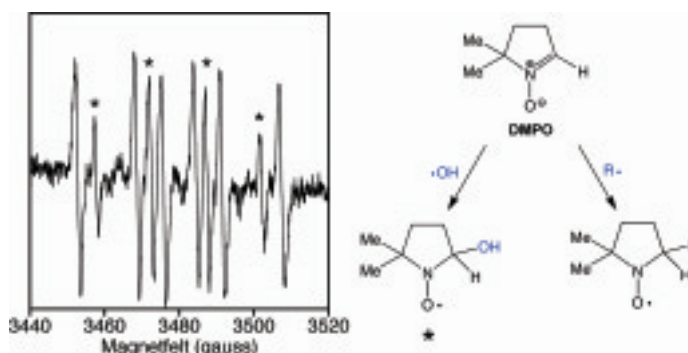
Figur 2. Mængden af spinaddukter detekteret med ESR i pilsnerøl ved opvarmning til 55°C og under adgang til atmosfærisk luft. Der er tilsat spinfanger (30 mM PBN).

steady-state koncentrationer af radikaler, der dannes i øl i forbindelse med ældningsreaktioner, alt for lave til at kunne detekteres direkte med ESR. Dette problem kan delvist løses ved at bruge spinfangningsteknikken, hvor de reaktive radikaler sammen med en spinfanger danner stabile radikaler kaldet spinaddukter (figur 1).

Spinaddukterne kan ofte akkumuleres i koncentrationer, der kan detekteres med ESR. Derved fås indirekte information om de fangede radikaler. Praktisk taget alle ESR-studier af øl har været baseret på spinfangningsteknikken.

Forudsigelse af øls holdbarhed

Uchida *et al.* fra Suntory Bryggeriet i Japan har vist, at spinfangningsteknikken sammen med ESR-detektion kan bruges til hurtigt at forudsige pilsnerøls smagsstabilitet [1]. I praksis følger man mængden af spinaddukter, der dannes ved at opvarme øl, som er tilsat en spinfanger, under adgang til atmosfærisk luft (figur 2). I forsøgets begyndelse er dannelsen af

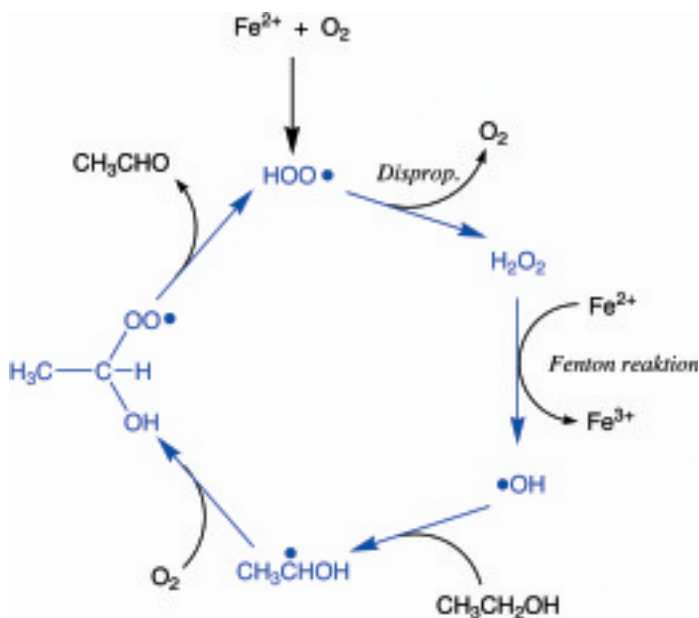


Figur 3. ESR-spektrum af spinaddukter, der dannes ved tilsætning af DMPO til pilsner, hvor antioxidant er fjernet [5].

spinaddukter begrænset, og fasen kaldes derfor nølefasen. Efter et stykke tid begynder mængden af spinaddukter at vokse hastigt og lineært med tiden. Længden af nølefasen afhænger af, hvor hurtigt øllets indhold af antioxidant, der forhindrer dannelsen af radikaler, forbruges. Uchida *et al.* viste som de første, at længden af nølefasen målt i friskfremstillet pilsnerøl korrelerer med smagsstabiliteten under normale opbevaringsbetingelser. Dvs. metoden kan bruges til hurtigt at forudsige holdbarheden af øl og som et værktøj til at justere produktions-trinene mhp. at opnå optimal holdbarhed [2-4].

Hvilke radikaler dannes i øl?

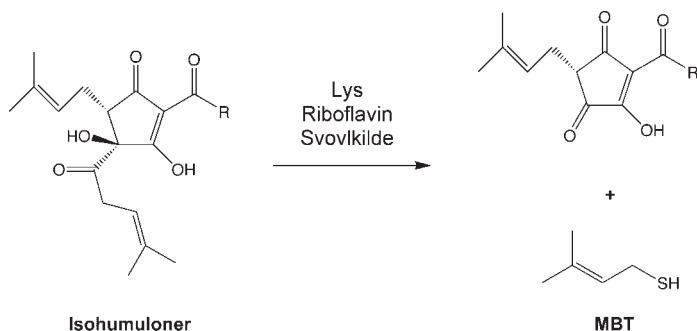
Ved Fødevarekemi på Institut for Fødevarevidenskab, KVL, har vi som en del af et samarbejdsprojekt med Carlsberg Forsøgslaboratorium under FØTEK 2-programmet brugt spinfangningsteknikken til at identificere radikalerne, der dannes ved de oxidative processer i øl [5]. Tilsætning af spinfangeren 5,5-dimethyl-1-pyrrolidin-N-oxid (DMPO) til øl gav ESR-spektre, der stammede fra en blanding af to spinaddukter. Det ene var dannet ved spinfangning af hydroxylradikaler, og det andet blev tilskrevet et spinaddukt



Figur 4. Oxidative kædereaktioner i øl, der involverer radikaler.

med et alkylradikal (figur 3). Ved at bruge spinfangeren 2-methyl-2-nitrosopropan (MNP) blev alkylradikalet identificeret som 1-hydroxyethylradikalet. Koblingskonstanterne for adduktet, der observeres ved nølefasemålingerne med PBN som spinfanger, er i øvrigt også i overensstemmelse med et addukt dannet ud fra 1-hydroxyethylradikalet.

På baggrund af de identificerede radikaler og resultaterne fra andre spinfangningsforsøg er det vist, at spormængder af kobber- og jernioner har afgørende betydning for dannelsen af radikaler i øl [6]. Det blev derfor foreslået, at dannelsen af radikaler sker via en række reaktioner som vist i figur 4 [7]. Ved tilstedeværelse af oxygen kan der dannes hydrogenperoxid, der via Fenton-reaktionen danner hydroxylradikaler. Disse er ekstremt reaktive og reagerer med diffusionskontrollerede hastigheder med langt de fleste organiske forbindelser. Hydroxylradikaler udviser derfor meget lidt selektivitet og reagerer hovedsageligt med de forbindelser, der er til stede i den højeste koncentration. I en almindelig pilsner er det ethanol, som er til stede i en koncentration på ca. 1 M. 1-hydroxyethylradikalet dannes ved abstraktion af et hydrogenatom fra ethanol, og dette radikal vil ved tilstedeværelse af oxygen omdannes til et α -hydroxyperoxyradikal, der henfalder til acetaldehyd og superoxid eller hydroperoxyradikaler afhængigt af pH. Denne mekanisme tillægger ethanol en vigtigere rolle i de oxidative processer i øl, end man tidligere har været klar over. Radikalerne (figur 4) er alle meget reaktive og kan derfor reagere med andre ølkomponenter i forskellige



Figur 5. Lysinduceret nedbrydning af isohumuloner i øl.

sidereaktioner. Det er med til at forkorte øls holdbarhed, idet smagskomponenter ødelægges, og der dannes oxiderede forbindelser, som enten giver bismag eller danner uklarhed og bundfald.

Antioxidanter i øl

Detektion af dannelse af radikaler med ESR og spinfangningsteknikken er et godt værktøj til at screene potentielle antioxidanters effekt på holdbarheden af øl. Metoden har været med til at fastlægge, at polyphenoler, der ellers er gode antioxidant i mange biologiske systemer, ikke har indflydelse på øls oxidative stabilitet [7,8]. Til gengæld var det tydeligt, at sulfid, der findes naturligt i øl i koncentrationer på nogle få ppm, er den dominerende antioxidant. Øl, der ikke indeholder sulfid, har således ingen nølefase for dannelsen af radikaler i øl, selv om indholdet af polyphenoler var højt. Det kan skyldes, at sulfid effektivt fjerner peroxider, der ellers reagerer med Fe(II) og Cu(I) , som normalt findes i spormængder i øl. Dermed starter nye radikalreaktioner (figur 1). Peroxider er forholdsvis langlivede ift. de andre reaktive oxygenforbindelser, der indgår i de oxidative reaktioner (figur 4), og selv små mængder af sulfid kan derfor effektivt fjerne peroxider. Derimod er koncentrationen af polyphenoler i øl for lav til effektivt at kunne fjerne reaktive radikaler i konkurrence med andre komponenter, der er til stede i langt højere koncentrationer.

Lysinduceret nedbrydning af humlestoffer

Øls bitre smag skyldes hovedsageligt tilstedeværelsen af isohumuloner, der dannes ved omlejring af humuloner fra humlen under brygningen af øl. Øl, der udsættes for sollys, ►

VWR 
INTERNATIONAL

**BIOTECH
FORUM+
SCANLAB**

Bella Center København

5 – 7 oktober 2004

... og VWR finder du på stand nr. C3 – 009

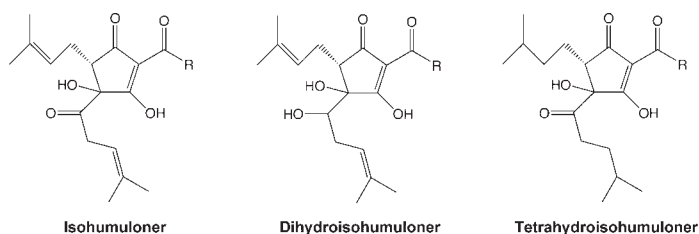
Ring 43 86 87 88, så sender vi en billet!

udvikler hurtigt en bismag, der stammer fra dannelsen af 3-methylbut-2-en-1-thiol (MBT), hvis smag beskrives som »skunky«, og som kan smages i koncentrationer ned til 1 ng/l. Det har været kendt siden begyndelsen af tresserne, at MBT kan dannes ved belysning af blandinger af riboflavin, cystein og isohumuloner med synligt lys (350–500 nm) (figur 5), men den

præcise mekanisme for dannelsen af MBT er stadig ukendt. Man kan forhindre dannelsen af MBT og dermed gøre smagen af øl mindre lysfølsom ved at bruge delvist hydrogenerede isohumuloner ved fremstillingen af øl (figur 6).

I de seneste år har ESR været anvendt til at fastlægge de indledende reaktioner ved lysinduceret nedbrydning af humlestoffer. Radikaler, der dannes ved direkte fotolyse af isohumuloner, er identificeret ved tidsopløst ESR (TREPR) [9], mens riboflavins evne til at danne hydroxyl- og 1-hydroxyethylradikaler i øl-modellsystemer ved belysning er studeret vha. ESR-spinfangningsteknikken [10].

I et samarbejde med kemikere fra universitetet i Gent støttet af Levnedsmiddelcentret under Major Research Infrastructure-programmet har vi forsøgt at klarlægge de indledende trin af oxidationen af isohumuloner. På grundlag af resultater opnået ved elektrokemisk oxidation af salte af isohumuloner og

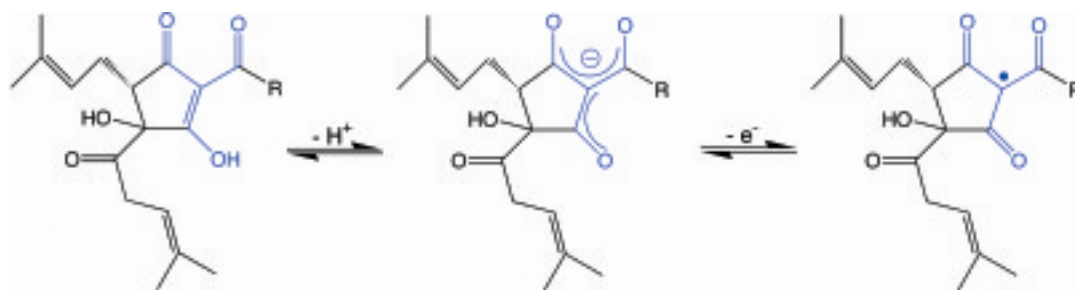


Figur 6. Isohumuloner og hydrogenerede isohumuloner.

detektion af de dannede radikaler ved spinfangning og ESR er det foreslået, at det er anioner af isohumuloner, der hovedsageligt oxideres. Reaktiviteten af isohumulonerne påvirkes desuden ikke af hydrogenering, til trods for at spinfangningsforsøgene påviste dannelsen af radikaler, der var forskellige fra isohumulonerne selv [11]. Hastighederne for elektronoverførsel fra triplet-exciteret riboflavin til salte af forskellige isohumuloner er desuden blevet bestemt ved laser flash fotolyse [12]. Isohumuloner med forskellige grader af hydrogenering gav næsten ens hastighedskonstanter ($\approx 2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), hvilket er i overensstemmelse med oxidation af β -tricarboxymethylgruppen, der er fælles for de forskellige typer af isohumulonanioner.

Øls indflydelse på ESR

Det er ikke kun ESR, der har påvirket bryggeriindustrien. Fabrikkerne af ESR-instrumenter er også blevet påvirket af det nye marked, der har åbnet sig. Det har stimuleret udviklingen af små X-bånd (10 Ghz) ESR-instrumenter, der er beregnet til rutineanalyser, og som bl.a. automatisk kan køre nølefasen-analyser af ølprøver. Denne nye generation af små ESR-instrumenter er yderst velegnet til studier af oxidative processer i andre typer levnedsmidler og i det hele taget alle typer af biologiske materialer. ESR-spektroskopi er derfor ikke længere



Figur 7. Isohumuloner har pK_a -værdier omkring 3 og er derfor hovedsageligt deprotoniserede i øl, hvor pH er 4–5. β -tricarboxymethylanionen i deprotoniseret isohumulon kan oxideres til et radikal ved én-elektronoverførsel.

begrænset til specialiserede forskningslaboratorier, men er nu blevet både økonomisk og praktisk tilgængelig for alle, der er interesserede i radikaler.

E-mail-adresser

Mogens L. Andersen: mola@kvl.dk
Leif H. Skibsted: ls@kvl.dk

Referencer:

1. Uchida, M., Suga, S. og Ono, M. Improvement for oxidative flavor stability of beer – Rapid prediction method for beer flavor stability by electron spin resonance spectroscopy. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54** (1996) 205–211.
2. Takaoka, S., Kondo, H., Uchida, M. og Kawasaki, Y. Improvement of beer flavor stability by applying ESR method to industrial plant. *MBAA Technical Quarterly* **35** (1998) 157–161.
3. Uchida, M. og Ono, M. Technological approach to improve beer flavor stability: Analysis of the effect of brewing processes on beer flavor stability by the electron spin resonance method. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **58** (2000) 8–13.
4. Franz, O. og Back, W. Experiences in measuring free radicals using electro spin resonance spectrometry in the brewery. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **55** (2002) 156–162.
5. Andersen, M. L. og Skibsted, L. H. Electron spin resonance spin trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer. *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 1272–1275.
6. Uchida, M. og Ono, M. Improvement for oxidative flavor stability of beer – Role of OH-radical in beer oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54** (1996) 198–204.
7. Andersen, M. L., Outtrup, H. og Skibsted, L. H. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 3106–3111.
8. Andersen, M. L. og Skibsted, L. H. Modification of the levels of polyphenols in wort and beer by addition of hexamethylenetetramine or sulfite during mashing. *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 5232–5237.
9. Burns, C. S., Heyerick, A., de Keukeleire, D. og Forbes, M. D. E. Mechanism for formation of the lightstruck flavor in beer revealed by time-resolved electron paramagnetic resonance. *Chem. Eur. J.* **7** (2001) 4554–4561.
10. Laane, C., de Roo, G., van den Ban, E., Sjaauw-En-Wa, M.-W., Duyvis, M. G., Hagen, W. A., van Berkel, W. J. H., Hilhorst, R., Schmedding, D. J. M. og Evans, D. J. The role of riboflavin in beer flavor instability: EPR studies and the application of flavin binding proteins. *J. Inst. Brew.* **105** (1999) 392–397.
11. Huvaere, K., Andersen, M. L., Olsen, K., Skibsted, L. H., Heyerick, A. og de Keukeleire, D. Radicaloid-type oxidative decomposition of beer bittering agents revealed. *Chem. Eur. J.* **9** (2003) 4693–4699.
12. Huvaere, K., Olsen, K., Andersen, M. L., Skibsted, L. H., Heyerick, A. og de Keukeleire, D. Riboflavin-sensitized photooxidation of isohumulones and derivatives. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3** (2004) 337–340.