

Těkavé látky při kontinuálním kvašení

MIROSLAV KAHLE, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

663.45 - 932
663.423

Těkavé látky jsou velmi důležitou součástí piva, neboť určují jeho charakter a vytvářejí celkový vjem chuti a vůně. Tvorba těchto sloučenin úzce souvisí s biochemickými změnami při kvašení. V podstatě jde o metabolismus hlavních složek substrátů, které potřebují kvasnice ke své činnosti. Znalost mechanismů, kterými se regulují biochemické změny, přispívá k získání základní kvality piva, to je stejnoměrné a vyrovnané chuti.

Dnes nejlépe propracovaným úsekem je tvorba vyšších alkoholů a diacetylu. Bylo by chybou považovat pouze tuto skupinu látek za rozhodující při posuzování chuti a vůně, neboť se uplatňuje vliv i ostatních těkavých složek. Podle dosažených výsledků je konečná jakost piva dána harmonickým sladěním kvalitativního i kvantitativního zastoupení všech těkavých látek.

Při pokusech, které se konaly v rámci výzkumného úkolu, byla zaměřena pozornost na změny těkavých látek při kontinuálním kvašení. K ověření přímého vlivu způsobu kvašení se dodržovaly při klasickém kvašení stejné podmínky jako při kontinuálním. V podstatě šlo o tepelný režim a způsob větrání. Větralo se v období lag-fáze a délka doby větrání odpovídala době zdržení v nádobě. Rozhodující význam pro tvorbu těkavých sloučenin mají použité kvasnice a proto byly vybrány k pokusům dva rozdílné kmeny.

Nejdůležitější základní biochemický problém je mechanismus kvašení, protože se týká syntézy živé hmoty. V mladině jsou přítomny vždy tři skupiny sacharidů, mono-, di- a trisacharidy, z nichž hlavní zástupci jsou glukóza, maltóza a maltotrióza. Podle zkvašování jednotlivých skupin můžeme kvašení rozdělit na tři etapy.

První etapa se vyznačuje zkvašováním glukózy a její doba trvání závisí na obsahu tohoto cukru. Při surogaci sacharózou se tato etapa prodlužuje, protože kvasnice velmi rychle hydrolyzují sacharózu a uvolňuje se glukóza. V této části kvašení se kvasnice desadaptují k maltóze a stupeň desadaptace je funkcí koncentrace glukózy a použitého kmene. Hodnoty metabolického kvocientu na maltóze jsou značně nízké a pohybují se okolo 80 až 90 $\mu\text{l CO}_2$.

V druhé etapě nastává adaptace k maltóze, v níž je zahrnuta biosyntéza permeázy a maltázy. První enzym umožňuje aktivní přenos substrátu do buňky, druhý tento substrát štěpí. Důležitým předpokladem je přítomnost potřebných aminokyselin nebo jejich intracelulárních rezerv, aby mohly vzniknout nové bílkoviny. V normální mladině nepřesahuje obsah glukózy 15 % celkových cukrů, takže adaptace nastává v poměrně krátké době po zakvašení a probíhá dostatečně rychle.

Druhá adaptace k maltotrióze není již tak snadná, protože syntéza specifické permeázy, pro tento substrát nastává až v období, kdy množství amino-

kyselin je již značně nízké. Proto biosyntéza musí proběhnout převážně z intracelulárních rezerv aminokyselin, které se snižují s počtem opakovaného nasazení kvasnic.

Je to klasický případ určité degenerace kvasnic spojené se schopností sedimentační. Technologicky se projevuje pomalým dokvašováním, nízkým stupněm prokvašení a špatným nasycením CO_2 . Štěpení maltotriózy po přenesení do buňky je způsobeno pravděpodobně stejným enzymem jako štěpení maltózy. Sedimentace se jeví jako cyklický jev jdoucí po sobě při každém nasazení. Doba trvání tohoto cyklu závisí na rychlosti syntézy ve vztahu mannan — protein v buněčné stěně kvasnic. V praxi se tyto změny vyznačují rozdílnou schopností sedimentace kvasnic při prvním nasazení a např. po pátém nasazení.

Všechny tyto znaky jsou spojeny s fázovitostí stacionárního kvašení, kdy každá fáze se pravidelně opakuje za současné adaptace nebo desadaptace kvasnic k maltóze. Sledováním těchto pochodů podle schopnosti kvasit maltózu za anaerobních podmínek jsme zjistili zásadní rozdíl mezi klasickým a kontinuálním způsobem. Průběh hodnot $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}}$ je patrný z tabulky 1.

Tabulka 1

Stacionární kvašení	$\mu\text{l CO}_2/\text{h}$ mg suš.	Kontinuální kvašení	$\mu\text{l CO}_2/\text{h}$ mg suš.
Násadní kvasnice	143,5	násadní kvasnice	143,5
24 h po zakvašení	84,8	I. tank	254,8
Maxim. hodnota	238,3	II. tank	275,9
Mladé pivo	105,6	mladé pivo	275,9

Tyto výsledky ukazují, že mechanismus kvašení při kontinuálním způsobu je odlišný a proto lze očekávat i odlišnou tvorbu těkavých látek. Vyplývá to již z požadavků aminokyselin při první adaptaci, které podle hodnot $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}}$ nebudou stejné. Na základě těchto zjištění jsme zaměřili nejdříve pozornost na ty složky těkavých látek, které se dnes běžně stanovují v pivě. Jsou to vyšší alkoholy a diacetyl.

Tvorba vyšších alkoholů a diacetylu probíhá v těsné souvislosti s prokvašením mladiny a s metabolismem aminokyselin. Bylo zjištěno, že tyto sloučeniny se nevytvářejí v období vylučování dusíkatých látek zpět do prostředí, ani v období autolýzy, nýbrž v období kvašení. To znamená, že při dokvašování se již podstatně nezvyšuje obsah vyšších alkoholů a diacetylu. Získané hodnoty oběma způsoby kvašení za podmínek pokusů jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

Různé podmínky při kvašení a různé kmeny kvasnic se značnou měrou podílejí na biochemických

Tabulka 2

Práškovité kvasnice

	Stacionární kvašení				Kontinuální kvašení
	studené vedení		teplé vedení		
	srovnávací	větráno	srovnávací	větráno	
Vyšší alkoh. mg/l	74,0	96,0	115,0	159,0	59,0
β fenyletanol mg/l	8,6	17,8	10,2	19,2	6,0
Diacetyl mg/l	0,39	0,42	0,46	0,51	0,58

Tabulka 3

Krupičkovité kvasnice

Vyšší alkoh. mg/l	55,0	59,0	55,0	65,0	72,0
β fenyletanol mg/l	11,2	13,0	11,5	13,5	10,9
Diacetyl mg/l	0,45	0,49	0,59	0,64	0,54

změnách. U vyšších alkoholů při stacionárním kvašení a za použití práškovitého kmene je markantní vzestupná tendence jejich obsahu vlivem teploty a větrání. Při teplém vedení byla maximální teplota 12 °C, aby se za současného větrání v lag-fázi dosáhly přibližně stejné podmínky jako při kontinuálním kvašení. Při zakvašení krupičkovitým kmenem zvyšování teploty a větrání mělo jen nepatrný vliv. U pív z kontinuálního kvašení jsou hodnoty pro práškovitý kmen příznivější než pro krupičkovitý. Oba výsledky jsou v rozmezí, které bývá běžné v pivech z klasické výroby. Toto zjištění je sice zářející, může však být způsobeno vlivem uzavřených kvasných nádob.

Do skupiny vyšších alkoholů se zařazují alifatické alkoholy, které mají v molekule 3 až 6 uhlíků. Běžně bývají v pivech propanol, izopropanol, butanol, izobutanol, pentanol, tri-metylbutanol a 2-metylbutanol. Způsob tvorby vyšších alkoholů při kvašení byl prvně popsán *Ehrlichem*. Důsledkem tohoto mechanismu byla deaminace aminokyselin za vzniku příslušného alkoholu a amoniaku, který představoval zdroj výživy pro kvasnice. Znamenalo by to, že žádná aminokyselina by nebyla lepší živinou než amoniak a obsah vyšších alkoholů by byl funkcí obsahu aminokyselin. Pozdější studium původního *Ehrlichova* mechanismu ukázalo, že vznik α -ketokyselin z aminokyselin je způsoben transaminací, a tím byla vysvětlena nepřítomnost velkých množství čpavku v médiu. Tímto mechanismem nelze však vysvětlit tvorbu všech alkoholů, protože by byla nutná přítomnost takových aminokyselin, které se nevyskytují v přírodě. Tato okolnost vedla k názoru, že aminokyseliny nejsou jediným zdrojem vyšších alkoholů. Na základě nejnovějších prací mají při vzniku některých alkoholů ústřední význam kyselina pyrohroznová a aktivní kyselina octová.

Vzhledem k asimilaci volných aminokyselin byl jejich úbytek při hlavním kvašení u kontinuálního způsobu intenzivnější. Naopak u hotových pív ze

stacionárního kvašení byl počet kyselin i koncentrace nižší. Jaký význam mají tyto rozdíly, lze zatím těžko posoudit, protože vyžaduje tato otázka ještě podrobné sledování. Všeobecně platí názor, že při nedostatečném množství dusíku pro aminaci a transaminaci se hromadí ketokyseliny, z kterých vznikají příslušné alkoholy. V případě nadbytečného obsahu některých aminokyselin působí *Ehrlichův* mechanismus ve smyslu kontroly konečnými produkty, které inhibují enzymy, syntetizující přechodné sloučeniny. Z tohoto hlediska lze některé rozdíly obsahu aminokyselin vysvětlit.

Vedle alifatických alkoholů byly zjištěny v pivech alkoholy aromatické. Kvantitativně nejdůležitější je β -fenyletanol, protože se významně podílí nejen na organoleptických vlastnostech, nýbrž také na fyziologických účincích svojí vysokou omamností. Zbývající dva alkoholy tyrosol a tryptofol udílejí pivu kvasničnou příchut.

β -fenyletanol vzniká pravděpodobně jako alifatické alkoholy podle *Ehrlichova* mechanismu z příslušné aminokyseliny. Byly však podány důkazy o jeho tvorbě bez přítomnosti fenylalaninu. Rychlost tvorby závisí na poměru asimilovaného dusíku k množství zkvasitelných cukrů. Při vyšších koncentracích fenylalaninu se zvyšuje obsah fenyletanolu, avšak využití aminokyseliny je nejvýše 30%. Fenylalanin má inhibiční účinek na tvorbu alifatických alkoholů. Naopak tyrosin inhibuje syntézu fenylalaninu, nepůsobí však na tvorbu fenyletanolu.

Hladina fenyletanolu kolísá v dosti širokém rozmezí a při obsahu nad 20 mg/l jsou piva znatelně aromatická. Vliv nadměrného množství vzduchu při pokusech se projevil intenzivněji než zvyšování teploty. Největší produkce byla opět u práškovitých kvasnic ze stacionárního kvašení při teplém vedení za současného větrání. U kontinuálních pív bylo množství nižší než u pív srovnávacích. Je zajímavé, že podle získaných výsledků produkují práškovité kvasnice v kontinuálním systému méně vyšších alkoholů a β -fenyletanolu než kvasnice krupičkovité. Nezdá se být pravděpodobné, že je to způsobeno buď inhibiční funkcí některých konečných produktů, nebo odlišným vztahem při metabolismu cukru a dusíkatých látek, nýbrž použitými kvasnicemi.

Názory na množství diacetylu, které vyvolává nežádoucí organoleptické změny, se dosti liší. Při našich pokusech jsme uměle zvyšovali dávky diacetylu až na koncentraci 0,7 mg/l bez prokazatelné změny chuti a vůně. Příčinu možno hledat především ve vyšší hořkosti našich pív. Piva s normální chutí podle zahraničních pramenů by neměla obsahovat více diacetylu než 0,45 mg/l.

Dnes je bezpečně dokázáno, že diacetyl je běžným metabolitem kvasnic. Při kvašení se tvoří kondenzací buď dvou molekul acetaldehydu, jedna je v aktivním stavu, nebo kondenzací aktivního acetaldehydu s pyrohroznovou kyselinou. Meziproduktem je kyselina acetylmléčná, která se tvoří i při syntéze valinu a leucinu. Proto se jeho vznik spojuje se schopností využívat valinu ze substrátu, která nepřímo může způsobit zvýšení diacetylu. Zvláště je to patrné u respiračně deficientních mutantů. Z tohoto hlediska se doporučuje výběr kvas-

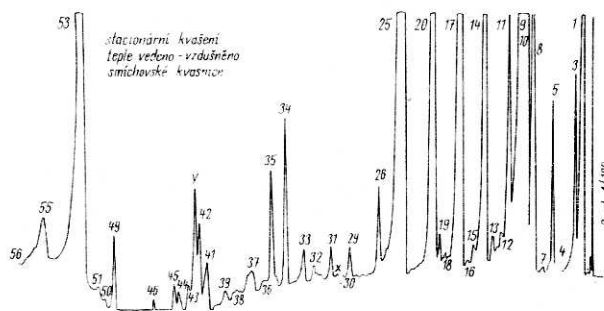
nic podle jejich schopností využívat valinu z mladiny.

U stacionárního kvašení zvyšováním teploty a množství rozpustného kyslíku stoupal obsah diacetylu. Sníženou tvorbu diacetylu při kontinuálním kvašení vykazovaly krupičkovité kvasnice. Podle některých autorů se obsah diacetylu při dokvašování bere za ukazatel zralosti piva a jeho vhodnosti pro stáčení. V průběhu této výrobní fáze obsah diacetylu klesá. Maximálních hodnot se dosahuje při hlavním kvašení na konci logaritmické fáze. Z uvedených výsledků vyplývá, že po kvantitativní stránce není velkých rozdílů mezi pivem vedenými klasickým a kontinuálním způsobem. Přesto nelze tento problém jednoznačně uzavřít a spokojit se s dosaženými výsledky, protože podrobnosti o vlivu ostatních těkavých látek nejsou v tomto rozboru zahrnuty. Pro zjištění správného stupně zralosti rozhodně nestačí určit pouze vyšší alkoholy a diacetyl. Je proto velmi problematické hovořit o zachování charakteru piva při změnách technologie pouze na základě chemického zjištění a organoleptických zkoušek, jestliže není možno porovnat celkové kvalitativní i kvantitativní složení těkavých látek.

K doplnění získaných výsledků, které jistě byly překvapující, jsme použili plynové chromatografie. Vysoký počet nalezených složek průměrně přes 50 chromatografických vln nedával bohužel reálný předpoklad k jejich úplné identifikaci. Podařilo se nám získat necelou polovinu čistých sloučenin jako standardu.

Porovnáme-li výsledky získané běžnými analytickými metodami s výsledky chromatografickými, vyniknou rozdíly mezi pokusnými a srovnávacími pivem. Za srovnávací pivo jsme zvolili pivo studeně vedené, zakvašené krupičkovitými kvasnicemi. U tohoto vzorku (obr. 1) byly zjištěny tyto hlavní složky: etylacetát (9), 3-metylbutanol (25), kyselina octová (33), furfurool (35), 42 neidentifikováno, betafenylalkohol (53), kyselina kaprylová (55). Při dodržení přibližně stejných podmínek v otevřené nádobě jako jsou u kontinuálního způsobu, změnilo se kvalitativní složení těkavých látek (obr. 2). V pivě se zvýšil značně obsah látek s nižším bodem varu. Hlavními složkami byl izopropanol (8), etylacetát (9), 10 neidentifikováno, 11 neidentifikováno, propanol (14), butylacetát (17), butanol (20), 3-metylbutanol (25), pentanol (26), 34 neidentifikováno, furfurool (35), betafenyletanol (53).

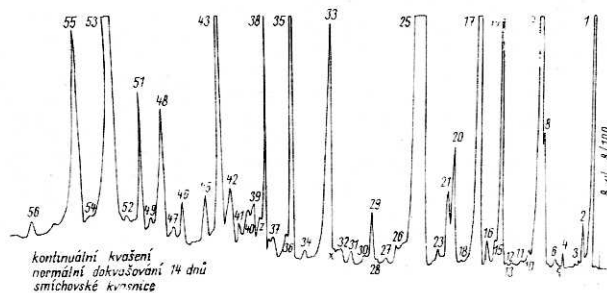
Z těchto dvou případů jasně vyplývá, že kolorimetrická metoda nemůže poskytnout správný názor



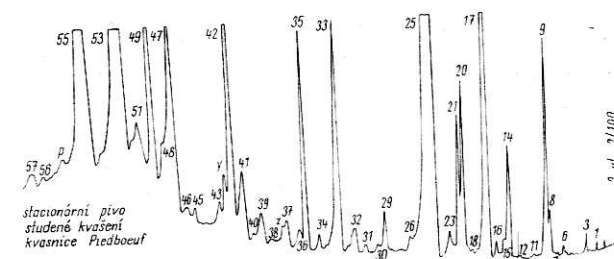
Obr. 2

o obsahu vyšších alkoholů. Rozdíl ve výsledcích pro oba krajní případy byl pouze 10 mg/l, kdežto na chromatogramu je vidět, že se zvyšovaly právě ty alkoholy, které dávají za podmínek kolorimetrické metody jen nepatrné zbarvení. Jestliže nyní ohodnotíme chromatografický záznam piva z kontinuálního kvašení, je zastoupení těkavých látek asi mezi oběma uvedenými pivem ze stacionárního kvašení (obr. 3). Hlavními složkami byly etylacetát (9), propanol (14), butylacetát (17), 3-metylbutanol (25), kyselina octová (33), furfurool (35), 38, 43, 48, 51, neidentifikováno, betafenyletanol (53), kyselina kaprylová (55). Ve všech vzorcích byly vždy dvě převládající složky, a to 3-metylbutanol (25) a betafenyletanol (53). Podle některých pracovníků zvýšený obsah furfuroolu je znakem rychlého stárnutí piva. Tato sloučenina vzniká po stočení piva ve všech případech, i když jsou stabilizovaná a zdá se, že jde o určitou chemickou reakci. Z našich zkušeností můžeme říci, že piva z kontinuálního kvašení vyžadují podstatně kratší doby dokvašování, neboť při delším ležení po stočení velmi rychle stárnou. Doba dokvašování se pohybuje mezi 8 až 11 dny.

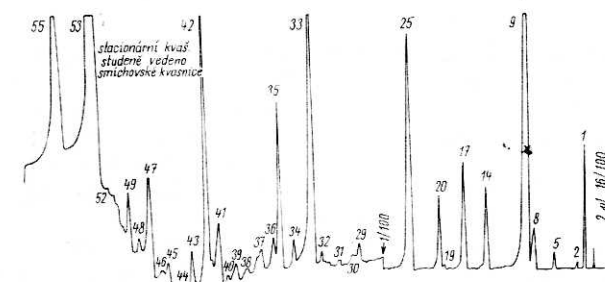
Práškovité kvasnice při klasických podmínkách vytvářejí zcela odlišné spektrum těkavých látek



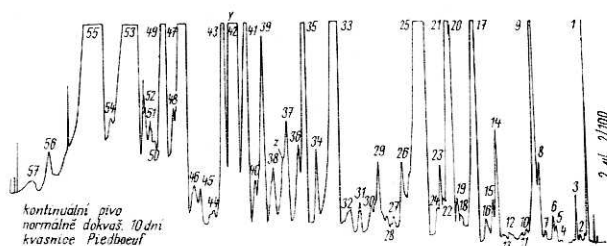
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 1



Obr. 5

než kvasnice krupičkovité. Je to patrné v obsahu některých dominujících složek (obr. 4). Zvýšilo se především množství propanolu (14), butylacetátu (17), butanolu (20), amylacetátu (21), furfurolu (35), etylkaprylátu (47), a neznámá složka označená číslem 49. U piva z kontinuálního kvašení, které podle obsahu vyšších alkoholů a diacetylů by bylo možno označit za jedno z nejlepších, byly zjištěny složky, které mají negativní vliv na chuť a vůni (obr. 5). Je to amylacetát, kyselina máselná a izovalerová. Dále přistupuje i složka vlny č. 43, která také nebyla identifikována. Celkově se zvýšila koncentrace i ostatních složek. Všeobecně můžeme říci, že zvyšováním teploty a nadměrným vzdušněním se zvyšují při stacionárním kvašení především složky s nižším bodem varu. Jsou to většinou vyšší alkoholy a estery. Naopak u kontinuálního kvašení za přibližně stejných teplot a obsahu kyslíku v substrátu se zvyšují látky s vyšším bodem

varu. Jsou to látky za kyselinou octovou, které z nich můžeme zařadit do skupiny mastných kyselin.

Z tohoto krátkého sdělení vyplývá, proč je nutné věnovat zvýšenou pozornost těkavým látkám v souvislosti s novými technologickými postupy. Bez znalosti biochemických změn a konečných produktů bude každý způsob, směřující ke zkrácení výrobního postupu zatížen hlavním nedostatkem, tj. určením vhodných optimálních podmínek.

Literatura

- [1] Drews, B. - Specht, H. - Bärwald, G.: Über die höheren aliphatischen Alkohole im Bier und einige Faktoren zu ihrer mengenmäßigen Beeinflussung. = „Monatschr. Brauerei“, 17, 1934: 101.
- [2] Drews, B. - Specht, H. - Schwartz, E.: Die aromatische Alkohole im Bier. = „Monatschr. Brauerei“, 18, 1935: 240.
- [3] Drews, B. - Specht, H. - Trinel, G.: Über Acetoin und seine Umwandlungsprodukte im Bier. = „Monatschr. Brauerei“, 18, 1935: 259.
- [4] McFarlane, W. D. - Thompson, K. D.: Colorimetric Methods for Determination of Aromatic Alcohols in Beer. = „J. Inst. Brew“, 70, 1964: 497.
- [5] Harris, G.: Protein Formation as a Fundamental Factor in Malt and Brewing. = „Brew. Digest“, 38, 1933: 53.
- [6] Harrison, G. A. F. Investigations on Beer Flavour and Aroma by Gas-chromatography. = EBC - Proc. 1963: 247.
- [7] Pfenninger, H. B.: „Zur Fuselölanalyse in Bieren. = EBC - Proc. 1963: 257.
- [8] Bavisotto, V. S. - Roch, L. A.: Gas Chromatography of Volatiles in Beer during its Brewing Fermentation and Storage. = „ASBC - Proc.“ 1960: 101.
- [9] Senthe Shanmuganathan, S. - Elsdon, S. R.: The Mechanism of the Formation of Tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. = „Biochem. J.“, 69, 1958: 210.
- [10] Strating, J. - Kenema, A.: Gas-chromatographic Study of an Aroma Concentrate. I. Qualitative features. = „J. Inst. Brew.“, 67, 1961: 525.

ОБРАЗОВАНИЕ ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ БРОЖЕНИИ

В рамках изучения образования летучих веществ при стационарном и непрерывном брожении было установлено, что специфика непрерывного брожения влияет на образование летучих веществ. При сходных прочих условиях непрерывное брожение дает повышенное содержание летучих веществ, элюция которых требует больше времени чем элюция уксусной кислоты, в то время как при стационарном брожении повышается, наоборот, содержание составляющих с более коротким временем элюции. Сюда относятся главным образом высшие спирты и некоторые сложные эфиры. Значительное влияние на образование летучих веществ оказывает вид применяемых дрожжей.

DIE FUSELÖLE BEI KONTINUIERLICHER GÄRUNG

Es wurden die Unterschiede in der Bildung der Fuselöle bei stationärer und kontinuierlicher Gärung verfolgt. Aus der Analyse des Gärungsmechanismus beider Prozesse ergab sich, dass man aus gewissen Abweichungen, die den kontinuierlichen Gärprozess kennzeichnen, auch auf die unterschiedliche Bildung der Fuselöle schließen kann. Man kann jedoch konstatieren, dass unter identischen Bedingungen sich bei der kontinuierlichen Gärung der Gehalt an Fuselölen mit höherer Elutionszeit als bei Essigsäure erhöht, wogegen bei der stationären Gärung mehr Produkte mit einer niedrigeren Elutionszeit entstehen. Es handelt sich hauptsächlich um höhere Alkohole und einige Estere. Auch die benutzte Hefe hat einen bedeutenden Einfluss auf die Fuselölbildung.

FORMATION OF VOLATILE SUBSTANCES DURING CONTINUOUS FERMENTATION

Specific features of continuous fermentation affect also the formation of volatile substances. The article deals with the differences between the two methods. Providing all other conditions are equal continuous fermentation results in higher content of volatile substances with elution time longer than acetic acid, whereas stationary fermentation contributes to the formation of components with shorter elution time. This group includes in the first line higher alcohols and some esters. The sort of yeast employed in fermentation process is very important, too.

