

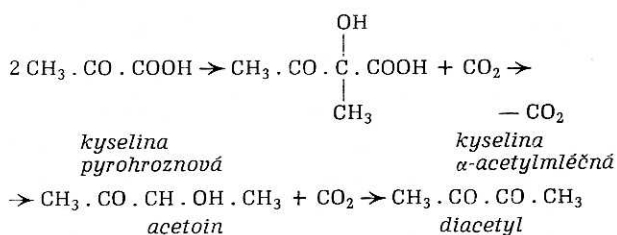
Diacetyl při kvašení a dokvašování piva

OLGA BENDOŤ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

663.45
547.44

Výskyt diacetylů v pivě souvisí jednak s metabolismem kontaminujících bakterií a jednak s normální životností kvasničných buněk.

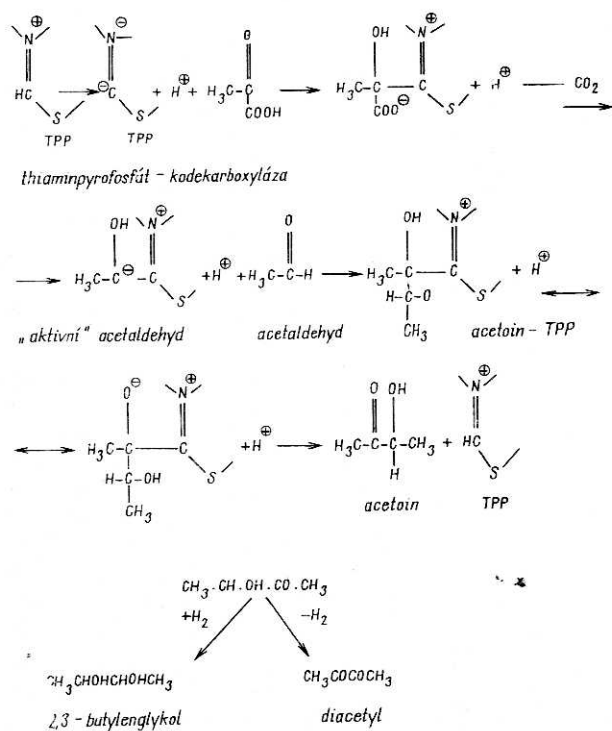
V prvním případě vzniká diacetyl především činností tzv. pseudosarcin, což jsou známé, pivo škodlivé pediocoky (*Pediococcus damnosus* a *Pediococcus pernicius*, Claussen). Jde o mléčné bakterie, které tvoří diacetyl jako vedlejší produkt svého metabolismu. Mechanismus tvorby diacetylů u bakterií probíhá od kyseliny pyrohroznové, jejíž dvě molekuly kondenzují za vzniku kyseliny α -acetylmléčné. Dekarboxylací této kyseliny vzniká acetoin a dále pak diacetyl podle tohoto schématu [2]:



Ve druhém případě je přítomnost diacetylů v biologicky čistém pivě podmíněna činností kvasinek, kdy diacetyl představuje vedlejší produkt kvasného procesu.

Jedna cesta vede od kyselin pyrohroznové přes acetyldehyd k acetoinu a odtud dále k diacetylům [3]. Volný acetaldehyd kondenzuje s „aktivním“ acetaldehydem, který vzniká jako meziprodukt při dekarboxylaci kyseliny pyrohroznové. Acetoin, vzniká

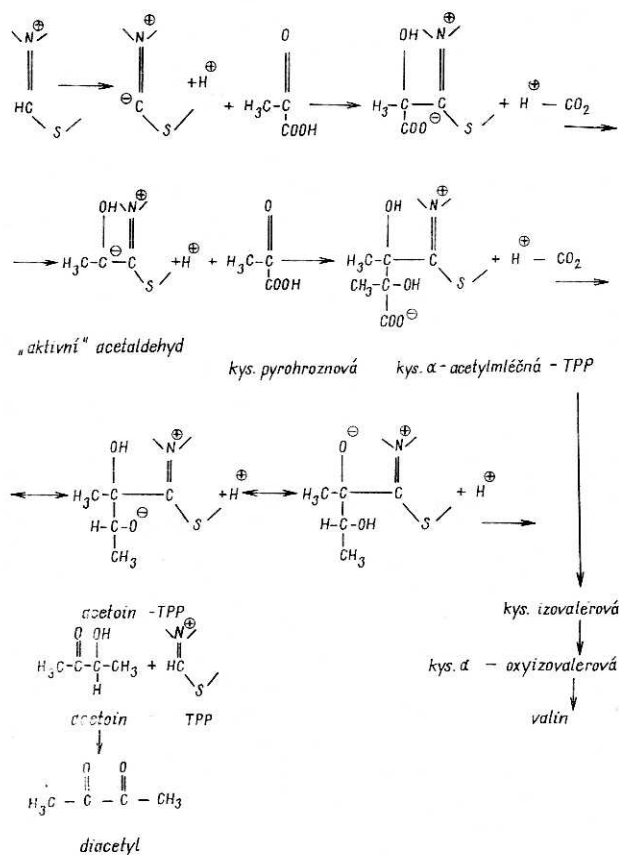
Reakční schéma 1:



kající za součinnosti thiaminpyrofosfátu je oxidován na diacetyl. Redukcí acetoinu pak vzniká 2,3-butylenglykol. Tyto tři složky tvoří systém, který může významně ovlivňovat chuť a aroma piva. (Viz reakční schéma 1).

Druhý mechanismus souvisí s metabolismem dusíku, a to se syntézou valinu. Bylo zjištěno, že acetolaktát je současně meziproduktem jak syntézy valinu tak i acetoinu [4]. V tomto případě kondenzuje kyselina pyrohroznová s „aktivním“ acetaldehydem za současné tvorby kyseliny α -acetylmléčné. Reakce pokračují dále přes kyselinu izovalerovou, α -oxyizovalerovou až k valinu. Při vedlejší reakci je kyselina α -acetylmléčná dekarboxylována na acetoin [5, 6].

Reakční schéma 2:



Zvýší-li se v mladině obsah valinu, nebo přidá-li se k ní α -acetolaktát, nastane tzv. feed-back, jehož výsledkem je inhibice tvorby diacetylů [5]. V tomto případě potlačuje produkt, popř. reakční meziprodukt, svou vlastní syntézu inhibicí pro ni nezbytného enzymu.

Naopak, obsahuje-li mladina málo valinu, nebo je-li jeho podíl snížen asimilací bakteriálními kontaminanty, jsou kvasnice tímto stimulovány syntetizovat valin a v této souvislosti i diacetyl. Velký význam zde tedy má jednak biologická činnost

kvasnic a jednak schopnost jejich různých kmenů asimilovat valin z mladiny. Uvádí se, že největší produkce diacetylů je u kmenů, které valin nejméně asimilují. Podobný mechanismus jako při syntéze valinu se uplatňuje i při syntéze izoleucinu. Vedlejším produktem je zde homolog diacetylů 2,3-pentadien, jemuž se připisuje vznik určitých rozdílů mezi aromatem piva a skutečným obsahem diacetylů v pivě [5].

Kvasnice se vyznačují schopností redukovat diacetyl, který vytvořily během logaritmické fáze růstové křivky. Po dosažení maxima, které je závislé na podmínkách vedení kvasného procesu, je redukční schopnost kvasnic rovněž ovlivněna kmenovými vlastnostmi. Variabilní je i doba, po kterou tato redukce probíhá. Obecně platí, že čím intenzivněji kvasnice kvasí, tím více diacetylů se tvoří, a tím rychleji jej kvasnice redukuje. Pro tuto schopnost se naopak kvasnic používá jako prostředku k snižování obsahu diacetylů v pivě. Doporučuje se přidávat k pivu buď samotné kvasnice, a to v množství asi 120 až 300 g/hl nebo kroužky, nebo z poloviny mísit pivo obsahující vyšší koncentraci diacetylů s čerstvou mladinou a zakvasit normální dávkou kvasnic [7]. Tuto vlastnost si však podržují jen živé buňky, které redukuje diacetyl na 2,3-butylen glykol.

Do značné míry zde záleží i na tom, zda jde o typ práškovitý či krupičkovitý. Práškovité kvasnice mají větší kontakt s mladinou a proto mohou efektivněji redukčně působit [8]. Brenner [9] upozornil, že kvasinky, které mají sklon ke sporulaci, produkují zvýšená množství diacetylů a acetoinu koncem hlavního kvašení. Je tedy zřejmé, že velkou důležitost má zde výběr a použití vhodných kvasničních kmenů. Proto se někteří autoři zabývali otázkou detekce kvasničních variant v souvislosti s redukčními vlastnostmi buněk a tvorbou diacetylů [1]. Princip testů spočíval ve vyhodnocování redukčních schopností kvasničních izolátů na pevných půdách, obsahujících jako indikátor buď bromkrezolovou zeleň, nebo 2,3,5-trifenylnitrazolium chlorid. Zjištěná míra redukční schopnosti byla v korelaci s tvorbou diacetylů. V této souvislosti je však nutno se zmínit o respiračně deficientních mutantech pivovarských kvasinek, u nichž se lze setkat se snížením růstu rychlosti a naopak, se zvýšenou tvorbou diacetylů. Tyto mutanty se detekují obdobnými testy, jaké již byly uvedeny [1, 10]. Nejsou bez praktického významu i pokusy o zvýšení redukční aktivity v pivě aplikací enzymu připraveného z kultur *Aerobacter aerogenes*. Jde o specifickou reduktázu, která převádí diacetyl na acetoin [11].

Protože diacetyl vzniká především během anaerobické fáze kvasničního metabolismu, může u kvasnic nastat stimulace produkce diacetylů jakýmkoli zásahem, který působí Pasteurův efekt, tzn., že změny anaerobního metabolismu v aerobní a tedy také přívod vzduchu či kyslíku do prostředí, ať již přímo nebo např. pouhým mícháním nebo přečerpáváním mladiny během kvašení, mohou podporovat tvorbu diacetylů [12]. Počáteční koncentrace kyslíku v mladině nemá vliv na obsah diace-

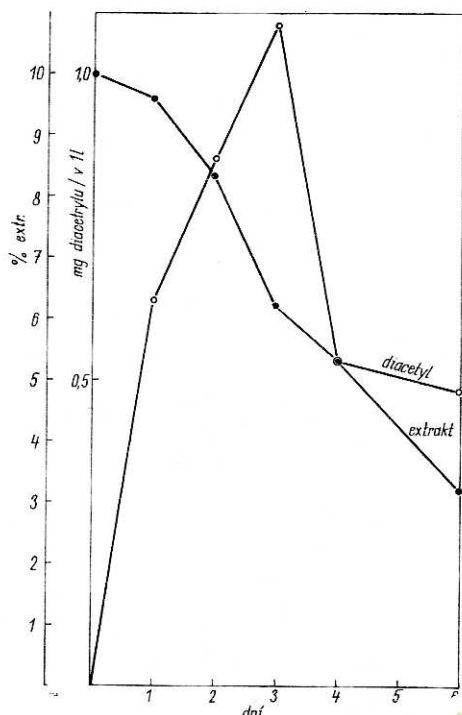
tylu, vytvořeného při kvašení. Bylo však zjištěno, že aerací kvasícího média vzniklo v souvislosti se zvýšeným růstem kvasnic 5 až 6krát více diacetylů [13]. Kyslík je tudíž sekundárním faktorem, který ovlivňuje tvorbu diacetylů při kvašení, přitom tento vliv není uskutečňován přímou oxidací acetoinu, nýbrž zasahuje metabolismus kvasinek a navozuje tak změny ve využití cukrů a aminokyselin.

Poměr mezi obsahem aminodusíku a zkvasitelných cukrů v mladině je dalším důležitým faktorem. Každé snížení koncentrace aminokyselin nebo zvýšení koncentrace cukrů může způsobit zvýšení obsahu diacetylů v pivě. Týká se to především vysokých dávek surogace, která snižuje obsah dusíkatých sloučenin. Tim jsou kvasnice předem disponovány k syntéze valinu, který je brzy spotřebován, a proto je stimulována tvorba diacetylů. Je pochozí, že zde mohou mít určitý význam i změny ve složení aminodusíku sladu v závislosti na jeho ročníku. Je však nutno se zmínit ještě i o pozitivním vlivu chmelovaru na zvýšení obsahu valinu v mladině [14]. Vyšší tvorbu diacetylů ovlivňuje i způsob vedení hlavního kvašení, a to zejména teplé vedení a vyšší zákvasná dávka. Za těchto podmínek se kvasinky pro kratší generační dobu rychleji rozmnožují, a to vede opět k větší syntéze valinu a proto i diacetylů. Záleží tudíž na tempu, v jakém je dosaženo v daném případě maximálního přírůstku biomasy [12]. Kromě toho se uvádí, že vzhledem k obsahu diacetylů v mladém pivě není vhodné opožděné sudování mladého piva, jehož deka se propadla a pivo, nechráněné delší dobu dekou, bylo vystaveno oxidačnímu účinku vzduchu [7].

Pohled na otázku oxidace acetoinu na diacetyl je však u různých autorů odlišný. Proti názoru, že jde o přímou oxidaci [15, 6] stojí negativní zjištění [13, 16]. Právě tak se lze setkat s názory, že v kvasícím médiu neexistuje přímý vztah mezi acetoinem a diacylem [9, 16, 17].

Dalším faktorem, ovlivňujícím tvorbu diacetylů a acetoinu během kvašení, je způsob propagace várečných kvasnic. V tomto směru se jednotlivé kmeny mohou projevovat odlišně. Kringstad [17] zjistil, že vyšší produkce diacetylů byla zaznamenána vždy v kulturách zakvašených kvasnicemi, které byly pomnoženy za stálého míchání kvasícího média, nežli v kulturách s inokulem, připraveným za stacionárních podmínek.

Uvádí se, že diacetyl vzniká během logaritmické fáze metabolismu kvasnic. Tato závislost byla ověřena šetřením obsahu diacetylů při hlavním kvašení za běžných provozních podmínek. Diacetyl se stanovil metodou podle Brennera [9]. Je známo, že angličtí výzkumní pracovníci Maule a Portno [13, 19] dávají při sledování diacetylů v kvasící mladině přednost plynové chromatografii před běžnými destilačními metodami jako je Brennerova, s poukazem na to, že tyto dávají v odebraných vzorcích vyšší hodnoty než plynová chromatografie. Koncem hlavního kvašení v mladých a hotových pivech nezjistili však oba autoři při použití obou typů metod žádné rozdíly. Přesto však se lze domnívat, že aplikací běžné destilační metody lze spolehlivě určit tendenci průběhu tvorby této slož-



Obr. 1. Produkce diacetylu při hlavním kvašení (max. teplota 8,5 °C)

ky. Výsledky několika šetření potvrdily skutečnost, že maximum diacetylu vzniká při intenzivním růstu a kvasné činnosti pivovarských kvasinek a potom postupně pro jejich redukční činnost klesá (obr. 1). Při dokvašování se pak ze stejných důvodů dále postupně snižuje obsah diacetylu v pívě.

Jak již bylo uvedeno, do jisté míry ovlivňují tvorbu diacetylu podmínky vedení kvasného procesu. Jsou to zejména vyšší teploty, které jsou příznivé pro vznik vyšších koncentrací diacetylu v prostředí. Během čtvrtprovozních a provozních zkoušek, v nichž je sledován vliv vyšších teplot kvašení na biochemickou činnost kvasnic, byla ve všech případech zjištěna u mladých pív z teplého vedení vyšší koncentrace diacetylu ve srovnání s pivy, vyrobenými za běžných podmínek. V hotových pivech byl diacetyl v obou případech vždy zredukován do té míry, že ve většině případů nebyly mezi pivy ze studeného a teplého vedení zjištěny rozdíly anebo byly zanedbatelné (tabulka 1).

Tabulka 1

Vliv teploty na produkci diacetylu

Zkouška	Max. teplota při kvašení °C	Obsah diacetylu v mg/l	
		mladé pivo	hotové pivo 10°
Čtvrtprovozní	9,0	0,60	0,20
	12,0	0,79	0,24
Čtvrtprovozní	8,7	0,51	0,31
	15,0	0,73	0,31
Provozní	8,4	0,55	0,35
	12,9	0,70	0,38
Provozní	8,5	0,46	0
	11,1	1,01	0

Tabulka 2

Vliv kmenů na produkci diacetylu

Kmen	Max. teplota při kvašení °C	Obsah diacetylu v mg/l	
		mladé pivo	hotové pivo 10°
A	13	0,72	0,50
F		0,68	0,35
H		1,16	0,83
U	14	1,45	0,50
B		1,83	0,64
C		2,10	0,72

Pokud jde o kmenové difference v produkci diacetylu během teplého vedení, byly tyto sledovány u šesti kvasničných kmenů. V první sérii čtvrtprovozních zkoušek byly porovnány kmeny označené jako A, F a H. Kmen H produkoval nejvíce diacetyl, a to bylo potvrzeno i laboratorním porovnáním uvedených kmenů. Rovněž hotové pivo obsahovalo relativně nejvyšší koncentraci diacetylu (tabulka 2). Ve druhé sérii bylo provedeno srovnání kmenů B, U a C. Nejvíce diacetylu vytvořily kvasnice C, po nich následoval kmen B a poměrně nejnižší produkce byla zaznamenána u kmene U. V hotových pivech byl obsah diacetylu v případě kvasnic C poněkud vyšší proti dvěma dalším porovnávaným pivům (tabulka 2). Z uvedeného je tedy zřejmé, že existují prokazatelné rozdíly v tvorbě diacetylu u jednotlivých kmenů pivovarských kvasinek, avšak je zapotřebí vždy přihlížet i k ostatním podmínkám vedení kvasného procesu.

Není zajisté bez zajímavosti i porovnání určitého počtu vzorků pív různé stupňovitosti a provenience, pokud jde o obsah diacetylu (tabulka 3). Provedené analýzy prokázaly, že zhruba v polovině počtu vyšetřovaných vzorků byla stanovena nízká koncentrace diacetylu, popř. nebyla jeho přítomnost vůbec dokázána. U ostatních vzorků byly

Tabulka 3

Obsah diacetylu v různých vzorcích pív

Vzorek	mg diacetylu/l
Závod č. 1	
7°	0,58
10°	0,14
Závod č. 2	
7°	0
10°	0,10
12°	0,14
10° tmavé	0,97
Závod č. 3	
7°	0
10°	0
12°	0
Závod č. 4	
10°	0,99
12°	0,97
Závod č. 5	
10°	0,65

zjištěny hodnoty vyšší, než jaké připouští zahraniční literatura. Němečtí autoři udávají jako mezní hodnotu 0,20 až 0,25 mg diacetylů v litru piva, američtí 0,35 mg/l [3].

Je nutno uvést i naše zkušenosti z organoleptických zkoušek piva s vyšším obsahem diacetylů. U 10° piva s 0,35 mg diacetylů v litru, právě tak jako u piva téže stupňovitosti s 0,99 mg diacetylů v litru, nebyly zjištěny chuťové závady. Naproti tomu u téhož piva, avšak s 1,5 mg/l a dále pak s 2,0 mg/l a více byla zaznamenána zhoršená chuť a vůně, v míře závislé na koncentraci diacetylů.

Z uvedeného vyplývá, že mezní hodnoty diacetylů v pivě, udávané zahraničními autory, by nebylo správné aplikovat při hodnocení našich piv, kde zejména vyšší obsah hořkých chmelových látek může být příčinou překrytí chuťové a aromaticky nepříznivých účinků přítomného diacetylů. Jistě by bylo třeba věnovat pozornost i obsahu acetonu, o němž se uvádí, že v přítomnosti i nízké koncentrace di-

acetylů může jeho zvýšené množství působit chuťové závady piva.

Otázku obsahu diacetylů v pivě je tedy třeba posuzovat v souvislosti s obsahem ostatních těkavých látek.

Literatura

- [1] Kato, S. - Nishikawa, N.: „Bull. Brew. Sci.“, 6, 1931: 12.
- [2] Silvermann, M. - Werkmann, C. H.: „J. biol. Chem.“, 138, 1941: 35.
- [3] Singer, T. P. - Pensby, I.: „J. biol. Chem.“, 196, 1952: 375.
- [4] Firscherl, D. - Hoffmann, H.: „Biochem. Z.“, 23, 1954.
- [5] Owades, J. L. - Maresca, L.: „Proc. A. S. B. C.“, 14, 1959: 22.
- [6] Drews, B. - Specht, H.: „Monatschr. f. Br.“, 15, 1952: 109; 18, 1955: 259.
- [7] Burger, M. - Glenister, P. R.: „Proc. A. S. B. C.“, 1957: 110; 1958: 80.
- [8] Tran Hieu Anh.: „Brasserie“, 20, 1965: 338.
- [9] Brenner, M. W.: „Proc. E. B. C.“, 1963: 233.
- [10] Czarnecki, H. T.: „Brew. Digest“, 34 1959: 52—56.
- [11] Sandine, W. E.: „Techn. Quart. M. B. A. A.“, 2, 1965: 155.
- [12] Voerkelius, G. A.: „Brauwiss.“, 14, 1965: 389.
- [13] Portno, A. D.: „J. Inst. Brew.“, 72, 1966: 458.
- [14] Sandegren: „Proc. A. S. B. C.“, 1954: 63.
- [15] Schlutze - Antelmann: „Brew. J.“, 17, 1965: 106.
- [16] Kitazawa, Y. - Shigematsu, N.: „Bull. Brew. Sci.“, 10, 1964: 45.
- [17] Kringstad, H. J.: „Inst. Brew.“, 72, 1966: 56.
- [18] Kocková - Kratochvílová, A.: „Brauwiss.“, 9, 1956: 73, 98.
- [19] Maule, D. R. - Pinnegar, A. R.: „Inst. Brew.“, 72, 1966: 488.

ОБРАЗОВАНИЕ ДИАЦЕТИЛА ПРИ БРОЖЕНИИ И ДОБРАЖИВАНИИ ПИВА

Приводится обзор новейших взглядов на образование диациетила в пиве, дополненный результатами экспериментально-исследовательских работ автора, изучавшего влияние разных температурных режимов ферментации, разных штаммов, состава пива, его происхождения и крепости. Изучаемые сорта пива сравнивались также по органолептическим показателям.

DIACETYL BEI DER HAUPT- UND NACHGÄRUNG DES BIERES

Es wird eine Übersicht der gegenwärtigen Erkenntnisse auf dem Gebiet der Diacetylbildung im Bier gegeben. Die Autorin berichtet weiter über eigene experimentale Erfahrungen aufgrund von Analysen kalt und warm geführter Biere, die mit verschiedenen Hefestämmen vergärt wurden, über die analytischen Werte bei Bieren verschiedener Grädigkeit und Provenienz, sowie auch über Ergebnisse der Verkostungsproben.

FORMATION OF DIACETYL DURING FERMENTATION AND AFTERFERMENTATION OF BEER

After a brief summarization of results published in literature the authoress presents her own conclusions on the formation of diacetyl based upon a series of experiments covering the effect of cool and warm fermentation, application of various yeast strains, composition of beer, its origin and strength. Organoleptic tests were also included in the research.