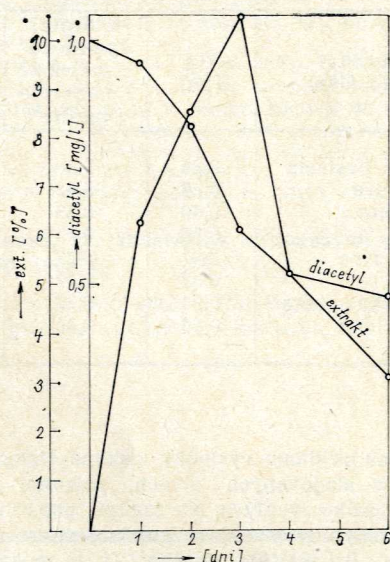


## Diacetyl v slovenských pivách

Ing. MARGITA ONDRIŠEKOVÁ, GRT Pivovary a sladovňe, Bratislava

Senzorický charakter piva je vo veľkej miere ovplyvňovaný prítomnosťou diacetylu. Stúpajúci výstav piva núti pivovary skrátiť dobu kvasenia a dobu ležania, čím dochádza okrem iného i k zvýšeniu obsahu diacetylu. Tento fakt si vynucuje venovať väčšiu pozornosť kontrole obsahu diacetylu a uvažovať o zaradení jeho kvantitatívneho stanovenia k bežným analýzam v pivách. Z tohto dôvodu sme pristúpili na našom pracovisku k tejto problematike. Výskyt diacetylu v pive súvisí jednak s normálnou životnou činnosťou kvasiniek a jednak s metabolismom kontaminujúcich baktérií. Baktérie vytvárajúce diacetyl sú tzv. pseudosarcíny (*Pedicoccus damnosus* a *Pedicoccus pernicius*). Mechanizmus tvorby diacetylu u týchto mliečnych baktérií prebieha od kyseliny pyrohroznovej za vzniku kyseliny  $\alpha$ -acetylmliečnej. Dekarboxyláciou tejto kyseliny vzniká acetoín a ďalej diacetyl.

Diacetyl vzniknutý činnosťou kvasiniek predstavuje vedľajší produkt hlavného kvasenia. Pri činnosti kvasiniek rozlišujeme systém tvoriaci acetoín a  $\alpha$ -acetylmlieč. Acetoín-syntetáza katalyzuje syntézu acetoínu z dvoch molekúl kyseliny pyrohroznovej. Spontánna premena  $\alpha$ -acetylmlieča na diacetyl je ovplyvnená oxidoredukčnými podmienkami, pH, prostredím a dochádza k nej i bez účasti kvasiniek napr. pri analytickom stanovení, najmä pri destilácii.

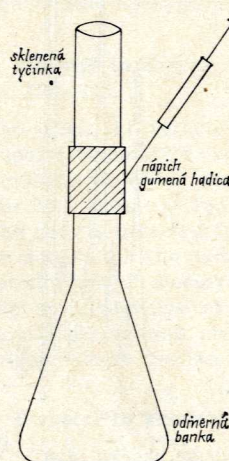


Obr. 1. Produkcia diacetylu pri hlavnom kvasení, max. teplota 8,5 °C

Kvasinky sú schopné nielen tvoriť, ale aj redukovať diacetyl, ktorý vytvorili. Väčšina kvasiniek obsahuje acetoín-dehydrogenázu, ktorá katalyzuje redukciu diacetylu na acetoín až butándiol. Vplyv valínu na tvorbu diacetylu zaujal Chuanga a Collinsa, ktorí zistili, že pri nízkom obsahu valínu v mladine sú kvasinky stimulované syntetizovať valín a v tej súvislosti i diacetyl. Pri vyššom obsahu valínu v mladine nastane tzv. feed-back, výsledkom čoho je inhibícia tvorby diacetylu.

Stimulácia tvorby diacetylu môže nastať akýmkoľvek

zásahom vyvolávajúcím Pasteurov efekt, t. j. zmenu anaerobného metabolismu na aerobný. Jedná sa teda o prívod vzduchu či kyslíka miešaním, alebo prečerpávaním mladiny. Kyslík zasahuje metabolizmus kvasiniek a navodzuje tak zmeny vo využití cukrov a aminokyselín. Vyššiu tvorbu diacetylu ovplyvňuje i spôsob vedenia hlavného kvasenia, a to hlavne teplé vedenie a vyššia zásadná dávka. Za týchto podmienok sa kvasinky pre kratšiu generačnú dobu rýchlejšie rozmnožujú, čo vedie k intenzívnejšej syntéze valínu a teda i diacetylu.



Obr. 2. Upravená nádoba pre plynovochromatografickú head-space metódu stanovenia diacetylu v pive

Maximálny obsah diacetylu počas kvasenia vzniká pri intenzívnom raste a kvasnej činnosti pivovarských kvasiniek, potom postupne pre ich redukčnú činnosť klesá. Pri dokvášaní sa ďalej postupne znižuje jeho obsah. Produkciu diacetylu pri hlavnom kvasení vedenom pri 8,5 °C v závislosti na dobe kvasenia vystihuje grafické znázornenie na obr. 1.

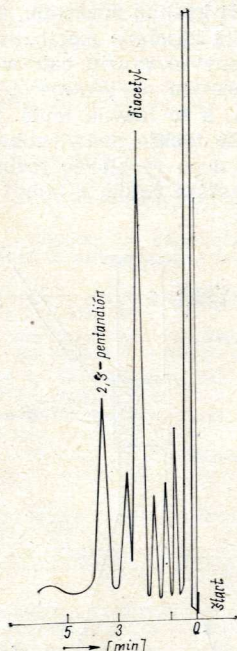
V našej práci sme sa zaoberali dvomi metódami stanovenia diacetylu, a to spektrofotometrickou metódou podľa Giertsena a plynovochromatografickou head-space metódou. Princíp spektrofotometrickej metódy spočíva v meraní 2,3-dimetylchinoxalínu vzniknutého reakciou vydestilovaného diacetylu s orto-fenyléndiamínom v ultrafialovej oblasti svetla pri 335 nm. Okrem diacetylu reagujú s orto-fenyléndiamínom 2,3-pentándion a metylglyoxal. Princíp plynovochromatografickej head-space metódy spočíva v stanovení diacetylu a 2,3-pentándiónu priamo z parného priestoru nad pivom. Analyzované pivo sa vytemperuje na 60 °C v nádobe prispôbenej pre nápič. V našom prípade to bola 25 ml odmerná banka upravená podľa nákresu na obr. 2. Po 10minutovej temperácii sa plynosťou striekačkou vytemperovanou tak tiež na 60 °C odoberie 1 ml pár a prenesie do kolóny plynového chromatografu. Detekcia delených diketónov sa robí detektorom elektrónového záchytu, ktorý je citlivý voči tejto skupine látok.

Podmienky plynovej chromatografie:  
kolóna — sklenená — dĺžka 2 m, Ø 4 mm  
nosič — Diatomit C-AW DMCS, 80—100 mesh  
zakotvená fáza — 10% Carbowax 1500



nosný plyn — dusík, prietok 30 ml/s  
detektor — ECD  
teplota injektora — 120 °C  
teplota kolóny — 70 °C  
teplota detektora — 180 °C

Obsah diacetylu a 2,3 pentándionu bol stanovený odčítaním z kalibračnej krivky zhotovenej na základe závislosti plochy píku od koncentrácie.



Obr. 3. Chromatogram vzorky piva

Desilačné stanovenie obsahu diacetylu, ktoré je východným bodom pri spektrofotometrickom určení, je zaťažené vznikom vhodných podmienok k premene prekursoru  $\alpha$ -acetolaktátu na diacetyl a teda určením celkového vyššieho množstva diacetylu, ako bol pôvodne prítomný v pive. Optimálne podmienky, napomáhajúce premene prekursora, sú destilačná teplota, nízke pH, možná oxidácia. Pri plynovochromatografickej head-space metóde sa tejto chybe vyhneme a stanoví sa priamy obsah diacetylu v pive. Výsledky získané spektrofotometrickým stanovením diacetylu a plynovochromatografickým stanovením head-space metódou sú uvedené v tab. 1.

Obsah diacetylu v analyzovaných pivách sa pohybuje v rozmedzí 0,115 mg/l u vzorky piva vyrobeného v pivovare Rimavská Sobota až 0,733 mg/l u piva vyrobeného v pivovare Košice. Množstvá diacetylu určené plynovochromatografickou metódou sú u všetkých vzoriek nižšie (s výnimkou vzorky piva z pivovaru Košice) ako hodnoty diacetylu určené spektrofotometrickou metódou. U vzorky piva z pivovaru Košice bol pravdepodobne v plnej miere prekursor premenený na diacetyl už v pôvodnom pive, čo vysvetľuje takmer rovnaké množstvá pri oboch metódach.

U analyzovaných pív bolo uskutočnené degustačné hodnotenie vzhľadom na možnosť stanovenia obsahu diacetylu zmyslovými vnemmi v porovnaní s použitými chemickými stanoveniami. Jednotlivé umiestnenie pív vzhľadom na obsah diacetylu určený spektrofotometrickou metódou je uvedený v tabuľke 2.

Výsledné poradie zostavené 10 degustátormi je zhodné so stúpajúcim obsahom diacetylu s výnimkou dvoch vzoriek; pivo z pivovaru Bratislava a pivovaru Michalovce.

Tabuľka 1

Vzorka Pivovar číslo	Diacetyl spektrof. [mg/dm <sup>3</sup> ]	Diacetyl + 2,3 pentándion plyn. chrom. [mg/dm <sup>3</sup> ]
1. Banská Bystrica	0,36	0,302
2. Bratislava	0,42	0,379
3. Hurbanovo	0,23	0,117
4. Košice	0,71	0,733
5. Michalovce	0,27	0,235
6. Nitra	0,47	0,327
7. Rimavská Sobota	0,37	0,115
8. Veľký Šariš	0,46	0,324

Tabuľka 2

Vzorky podľa umiestnenia	Diacetyl — spektro- fotometrické stanovenie [mg/dm <sup>3</sup> ]
Hurbanovo	0,23
Bratislava	0,42
Banská Bystrica	0,36
Michalovce	0,27
Rimavská Sobota	0,37
Veľký Šariš	0,46
Nitra	0,47
Košice	0,71

Tabuľka 3

Vzorka Pivovar číslo	CO <sub>2</sub> [%]	Diacetyl spektrofotometrické stanovenie [mg/dm <sup>3</sup> ]	Degustačné hodnotenie
1. Banská Bystrica	0,36	0,36	3
2. Bratislava	0,43	0,42	2
3. Hurbanovo	0,40	0,23	1
4. Košice	0,35	0,71	8
5. Michalovce	0,27	0,27	4
6. Nitra	0,32	0,47	7
7. Rimavská Sobota	0,34	0,37	6
8. Veľký Šariš	0,44	0,46	5

Ak k tomu pridáme výsledky získané zistením oxidu uhličitého v sledovaných pivách, získame ucelenejší obraz, z ktorého vyplýva, že medza postrehnuteľnosti obsahu diacetylu v pive je v značnej miere závislá na obsahu CO<sub>2</sub>. Pri nižšom obsahu CO<sub>2</sub> je možno organolepticky postrehnúť nižší obsah diacetylu v celkovom buketu piva. Porovnanie obsahu oxidu uhličitého s obsahom diacetylu stanoveného spektrofotometricky a degustáčnym vyjadrením je uvedené v tabuľke 3.

Tento fakt potvrdzuje lepšie umiestnenie piva vyrobeného v pivovare Bratislava, ktoré napriek vyššiemu obsahu diacetylu získalo lepšie umiestnenie pri degustácii ako pivo vyrobené v pivovare Michalovce.

V rámci práce bol ďalej sledovaný obsah diacetylu vzhľadom na základné suroviny (sypanie použité pri výrobe sledovaných pív). Z tohto hľadiska je dôležitý pomer medzi obsahom aminodusíka a skvasiteľných cukrov. Každé zníženie koncentrácie aminokyselín, alebo zvýšenie koncentrácie cukrov môže spôsobiť zvýšenie obsahu diacetylu. Surogácia znižuje obsah dusíkatých



zlúčenín, čím sú kvasinky predom disponované k syntéze valínu a tým aj diacetyl. Tento fakt potvrdili aj naše výsledky napr. u vzorky piva z Hurbanova, kde sypanie zodpovedalo 91 % sladu a 9 % cukru, bol obsah diacetyl 0,117 mg/l, naproti tomu vzorka piva z pivovaru Košice, kde sypanie zodpovedalo 68,3 % sladu, 12 % cukru a 19 % jačmenného šrotu (tedy pivo bolo viac surogované), bol obsah diacetyl 0,733 mg/l. Pokusmy o stanovenie prahovej koncentrácie diacetyl sa zaoberalo viac autorov. V súčasnosti VÚPS v Prahe na základe sérií pokusov so stúpajúcim prídavkom diacetyl priamo do piva stanovil pre naše pivá prahové hodnoty 0,4 až 0,7 mg/l. V zahraničnej literatúre je táto hodnota uvádzaná v rozmedzí 0,1—0,35 mg/l.

Záverom je možné povedať, že spektrofotometrická metóda pre svoju jednoduchosť, nenáročnosť a hlavne dostupnosť pre prevádzkové laboratória poskytuje orientačné výsledky potrebné pre pivovarského pracovníka v prevádzke. Plynovochromatografická metóda je presnejšia, nenáročná na čas, výsledky získané odpovedajú skutočnému obsahu diacetyl v mladine a v pive, avšak je menej dostupná pre bežnú prax.

#### Literatúra

- [1] KAHLER M.: Kvas. prům. **24**, 1978, č. 4, s. 73
- [2] HASHIMOTO N.: J. Inst. Brew. **78**, 1972, s. 43
- [3] NORDSTROM K.: Brew. Digest **40**, 1965, s. 60
- [4] MEILGAARD M.: J. Inst. Brew. **77**, 1971, s. 310
- [5] ENGAN S.: Brew. Digest, **50**, 1975, č. 4, s. 66
- [6] MEILGAARD M.: Techn. Quart. MBAA **12**, 1975, č. 4, s. 66
- [7] WAINWIGHT: J. Inst. Brew. **79**, 1963, s. 451
- [8] DE-ROBICHON-SZULMAJSTER H., MAGEE P. T.: Eur. J. Biochem **3**, 1968, s. 492—506
- [9] CHUANG L. F., COLLINS E. B.: J. Gen. Mikrobiol. **72**, 1972, s. 201—210
- [10] LIEBS, J.: Brauwelt **113**, 1973, s. 260
- [11] INOUE T., YAMOMOTO Y.: Rept. Res. Lab. Kirin Brew. Co. Ltd., **14**, 1971, s. 55
- [12] HAUKELI A. D., LIE S.: J. Inst. Brew. **78**, 1972, s. 229
- [13] TITTEL D., RADLER F.: Mschr. Brauerei **32**, 1979, 5, s. 260
- [14] ZÜRCHER CH., GRUSS R.: Mschr. Brauerei **30**, 1977, 1, s. 13—15
- [15] MAWER J. D. R., MARTIN P. A.: J. Inst. Brew. **84**, 1978, s. 224
- [16] SPAETH G., NIEFIND H. J., MARTINA M.: Schweizer Brauerei Rundschau **82**, 1971, 6, s. 121—123
- [17] STEFFEN P.: Brauwissenschaft **24**, 1971, 7, s. 267

**Ondříšková, M.: Diacetyl v slovenských pivách.** Kvas. prům., **29**, 1983, č. 12, s. 273—275.

V článku je popísaná teória vzniku vicinálnych diketónov v pive počas hlavného kvasenia, ich škodlivý vplyv

na arómu piva. V ďalšej časti sú uvedené metódy stanovenia diacetyl a výsledky získané analýzou slovenských piv. Použitá head-space metóda stanovenia diacetyl je výhodná z dôvodov nenáročnej prípravy vzorky, rýchlosti analýzy ako aj vylúčenia možnosti stanovenia prekursorov.

**Ондрішекова, М.: Діацетил в пивах, произведящихся в Словакии.** Квас. прум. **29**, 1983, № 12, стр. 273—275.

В статье описана теория возникновения vicinальных diketонов в пиве в течение главного брожения, их вредное действие на аромат пива. В следующей части приведены методы установления и результаты, полученные при анализе пив, произведенных в Словакии. Примененный метод head-space установления дицетила выгоден из-за мало требовательного способа получения пробы, скорости анализа и также избежания возможности установления прекурсоров.

**Ondříšková, M.: D'acetyl in Slovak Beers.** Kvas. prům. **29**, 1983, No. 12, p. 273—275.

A theory of the origin of vicinal diketones in beer during the principal fermentation is described in the article. Also their harmful effect on the taste of beer is mentioned. Further, methods for the determination of diacetyl and the results obtained from the analyses of Slovak beers are described. The head-space technique used for the determination of diacetyl has the following advantages: a simple preparation of the sample, a rapidity of the analysis proper and an elimination of the possibility to determine also precursors.

**Ondříšková, M.: Diacetyl in slowakischen Bieren.** Kvas. prům. **29**, 1983, Nr. 12, S. 273—275.

In dem Artikel wird die Theorie der Bildung der vizinalen Diketone im Bier während der Hauptgärung und ihr schädlicher Einfluß auf das Bieraroma behandelt. In dem weiteren Teil der Veröffentlichung werden die Methoden der Diacetyl-Bestimmung und die Analysenergebnisse der slowakischen Bieren angeführt. Die angewendete Head-Space-Methode der Diacetylbestimmung wird wegen der Einfachheit der Probenaufbereitung, der Geschwindigkeit der Analyse und der Elimination der Möglichkeit der Precursorenbestimmung als vorteilhaft empfohlen.