

Tvorba a redukce diacetylu v průběhu kvašení a zrání piva

663.45
663.13

Ing. PETR VOLF, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Klíčová slova: diacetyl, 2,3-pentandion, vicinální diketony, cylindrokónické tanky, kvasinky, genové inženýrství

ÚVOD

Jako jeden z hlavních údajů pro popis procesu v cylindrokónických tancích (CKT) se uvádí množství diacetylu, respektive vicinálních diketonů (VDK), které ovlivňují organoleptické vlastnosti piva, a to zejména v souvislosti se zaváděním inovačních a intenzifikačních postupů. V současnosti jsou velkoobjemové CKT v zahraničí nejrozšířenějším zařízením fermentační části výroby.

Literárně byla publikována řada postupů, kterými lze částečně hladiny těchto látek ovlivnit. Především se jedná o úpravu fermentačních podmínek, optimální složení mladiny a řadu dalších technologických zásahů. V poslední době nastupují konstrukce nových kmenů kvasinek pomocí genových manipulací s cílem úpravy enzymového aparátu, zodpovědného za tvorbu a redukci VDK. Tyto úpravy poskytují nové možnosti při snižování hladiny diacetylu.

1. VÝZNAM VDK V ORGANOLEPTICKÉ KVALITĚ PIVA

Diacetyl a 2,3-pentandion jsou přirozenými produkty metabolismu kvasinek ovlivňujícími chuť a aróma piva. Dosud byla publikována rozsáhlá řada zpráv s často zásadně odlišnými závěry s rozdílným dopadem na sledovanou problematiku [1]. Diacetyl byl objeven jako produkt látkové přeměny poprvé v roce 1928 u smíšené kultury *Streptococ-*

cus cremoris a *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* [2]. V pivu byl poprvé objeven a stanoven *Schimwellem* [3]. V řadě potravinářských oblastí na rozdíl od pivovarství je diacetyl a jeho zvýšená koncentrace požadována a intenzivně se zkoumají možnosti a podmínky stimulace jeho tvorby.

Pivu naopak ve vyšších koncentracích propůjčuje nepříjemnou chuť, označovanou jako diacetylová, máselná, medová aj. [1, 4, 5]. Obecně se považuje koncentrace diacetylu mezi $0,1\text{--}0,2\text{ mg.l}^{-1}$ a v pivech typu „Ale“ $0,1\text{--}0,4\text{ mg.l}^{-1}$ za nejvyšší přípustnou hranici. Prahová hodnota pentandionu je přibližně desetinasobná, v rozmezí $1,0\text{--}1,5\text{ mg.l}^{-1}$. Běžná koncentrace v řadě našich i zahraničních piv je nižší než $0,2\text{ mg.l}^{-1}$ diacetylu a $0,01\text{--}0,08\text{ mg.l}^{-1}$ pentandionu.

2. ZÁKLADNÍ SCHÉMA TVORBY VICINÁLNÍCH DIKETONŮ, PŘEDEVŠÍM DIACETYLŮ

Dlouhou dobu se předpokládalo, že diacetyl se tvoří oxidací z acetoinu. Tato cesta byla navrhována pro kvasinky i bakterie. Dnes je již jednoznačně prokázáno, že pivovarské kvasinky nejsou schopny takto diacetyl produkovat [6, 7]. Diacetyl se tvoří z α -acetolaktátu, který je meziproduktem isoleucin-valinové dráhy v kvasničné buňce. Většina α -acetolaktátu je metabolizována uvnitř buňky na valin a leucin, zatímco malé množství zůstává v mladině a je konvertováno na diacetyl oxidativní dekarboxylací bez enzymové účasti [8].

Redukce diacetylů je značně závislá na fermentačních podmínkách a kombinaci následujících reakcí:

- 1 — tvorba acetohydroxykyselin,
- 2 — tvorba diketonů z acetohydroxykyselin,
- 3 — redukce vicinálních diketonů.

2.1 Biosyntéza valinu, isoleucinu a leucinu

Diacetyl a pentandion jsou tvořeny z acetolaktátu a acetohydroxybutyrátu — prvních intermediátů v biosyntetické dráze pro isoleucin a valin. Biosyntetická dráha vedoucí od threoninu a pyruvátu k isoleucinu a valinu je katalyzována pěti enzymy. Geneticky byly identifikovány pro všechny enzymové reakce s výjimkou poslední (transaminace). U *Saccharomyces cerevisiae* každý z enzymů katalyzujících první čtyři reakce v biosyntetické dráze isoleucinu a valinu je kódován prostřednictvím separátního genu. Jedná se o geny značené ILV1, ILV2, ILV5 a ILV3 [9] — tab. 1.

Tabulka 1. Umístění genů a jejich informace

Gen	Lokalizace na chromosomu	Kóduje
ILV 1	V	threonin deaminasa TD
ILV 2	XIII	acetohydroxykyselina synthasa AHAS
ILV 5	XII	acetohydroxykyselina reduktoisomerasa RI
ILV 3	X	dihydroxykyselina dehydrasa DHA

Jednou z cest vedoucích k získání kmenů, které neprodukují vicinální diketony, je izolace kmenů deficitních v ILV2 a ILV1 genu, což eliminuje tvorbu prekursorů diketonů. Jinou možností redukce diacetylů je zvýšení hladin a aktivity RI a DHA. Hladiny těchto enzymů mohou být zvýšeny inzercí dodatečných kopií genů kódujících tyto enzymy, což vede ke vzrůstu toku intermediátů acetohydroxykyselin ve směru tvorby valinu a isoleucinu, nebo kvasinky se zvýšeným obsahem DR. Další možnosti je přímá konverze acetolaktátu na acetoin prostřednictvím acetolaktát dekarboxylasy ALDC vnesením genu pro tento enzym do kvasinkové buňky [8].

AHAS podléhá v regulaci oběma kyselinám — valinu a isoleucinu. Jsou-li v médiu přítomny v přebytku, dochází k represí a syntéza je inhibována. Jestliže valin a isoleucin brzdí syntézu acetohydroxykyselin, snižuje se tvorba diacetylů a pentandionu. To je důvod, proč u mladých kmenů na tyto aminokyseliny může vznikat zvýšené množství vicinálních diketonů.

Valin má specifický účinek na inhibici tvorby acetolaktátu [10]. Současné názory na inhibici AHAS nejsou jednotné. Shodně se uvádí, že jeho přídavek v průběhu fermentace působí preventivně proti tvorbě acetolaktátu [11]. *Narziss et al.* [12] uvádějí, že absorpce aminokyselin v průběhu utilizace substrátu probíhá rozdílně a nemusí se krýt s potřebou kvasničné buňky, proto k syntéze valinu a isoleucinu dochází i v průběhu kvašení. Přídavek valinu částečně potlačuje utilizaci aminokyselin skupiny C [37] (klasifikace podle *Jonese a Pierce* [36]). Byla vyslovena domněnka, že vzrůst obsahu kyslíku v médiu stimuluje tvorbu diacetylů v důsledku rychlejšího vyčerpávání valinu z média [38]. Snížení konečného obsahu diacetylů přídavkem valinu do média se opírá o zdržení začátku jeho tvorby v průběhu fermentace. Přídavek jiných aminokyselin včetně isoleucinu nemusí mít vliv na jeho obsah.

2.2 Odbourávání acetohydroxykyselin a přeměna acetolaktátu na diacetyl

Neenzymová přeměna acetolaktátu na diacetyl v mladé, oxidativní dekarboxylace, se děje podle kinetiky prvního řádu a je nezávislá na přítomných kvasinkách. Diacetyl je inkorporován do buňky a redukován na acetoin, popř. 2,3-butandiol [8, 20, 22]. Tato změna závisí na typu a enzymovém vybavení kvasničného kmene.

2.2.1 Význam a působení enzymů AHAS a TD

Jeunehome et al. [13] studovali auxotrofní mutanty (valin — leucin — isoleucin) snižující hladinu TD (ILV1) a AHAS (ILV2). ILV2 mutanty nebyly schopny produkovat vicinální diketony, jejich fermentační schopnost však byla ovlivněna nižší utilizací maltosy a maltotriosy za teplot pod 20 °C. Aktivita AHAS při kvašení je inhibována valinem a syntéza současně reprimována valinem, leucinem a isoleucinem [14]. Uvedení autoři dospěli k závěru, že AHAS byla inhibována pouze L-valinem, žádný z ostatních produktů cesty větvených aminokyselin neměl vliv na její aktivitu (inhibice valinem byla nekompetitivní vzhledem k pyruvátu). AHAS je též specificky inhibována herbicidem Sulfometuron Methyl (SM). Následně u kmene *Saccharomyces cerevisiae* byly změny v oblasti ILV2 genu dominantní [39]. V našich podmínkách byly připraveny rezistentní mutanty kvasinek k herbicidu Chlorsulfuron (du Pont de Nemours & Co, U.S.A), období SM. Pracuje se na konstrukci plasmidu pro produkci anti-ILV2 RNA [40].

Pivovarské kvasinky využívají při fermentaci threonin rychleji, zatímco spotřeba mastných ky-

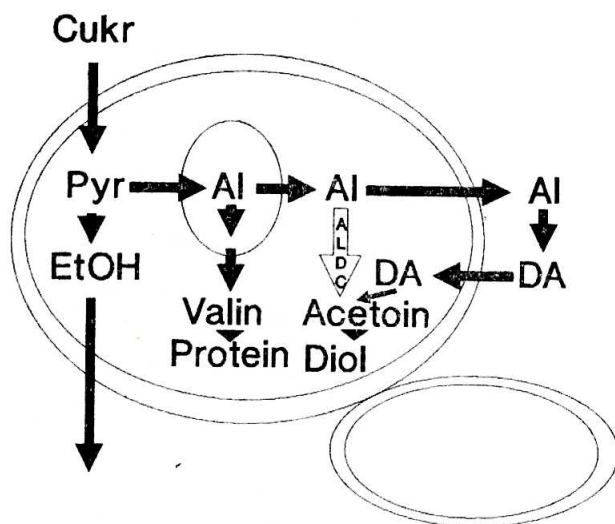
selin je mnohem pomalejší a až po určité časové prodlevě [15]. Postup při syntéze bílkovin se musí přizpůsobit potřebě nebo spotřebě aminokyselin, přičemž důležitým enzymem této syntézy je právě TD. Její působení na začátku syntézy je brzděno isoleucinem, v podstatě se jedná o allostericou regulaci vzniku konečného produktu [13]. TD vykazuje u *Saccharomyces cerevisiae* řadu shodných vlastností s analogickým bakteriálním enzymem (pH optimum, sigmoidní charakter v závislosti na substrátu-threoninu).

2.2.2 Význam a působení enzymů DHA a RI

Zvýšení aktivity těchto enzymů vede ke snížení hladiny acetolaktátu, prekursoru diacetylu, a tím i následnému snížení hladin VDK. Analýza ILV enzymů prokázala, že RI a DHA jsou rychlostně limitujícím krokem biosyntetické dráhy mastných kyselin a mohou přispívat k nadprodukcí VDK. Pětinašobný až desetinašobný vzrůst aktivity RI způsobil snížení produkce VDK o více než dvě třetiny. Při přidavku mastných kyselin v koncentraci $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ k minimálnímu médiu se snížila hladina DHA o 50 % [15].

2.2.3 Význam a působení enzymu ALDC

Přímá konverze acetolaktátu na acetoín je katalyzována enzymem acetolaktát dekarboxylasou-ALDC. V současné době se jedná o nejpoužívanější typ mutace. Přídavek ALDC k zakvašované mladině nebo mladému pivo může výrazně změnit a redukovat tvorbu diacetylu a tím umožnit i kratší dobu ležení. Tento enzym nebyl dosud v kvasinkách a eukaryontech nalezen. Alternativní metodou kvašení je aplikace pivovarských kvasinek s geneticky kódovanou nadprodukcí enzymu ALDC [17]. Goehling a Stahl [18] provedli expresi ALDC ze *Streptococcus lactis subs. diacetylactis* do *Escherichia coli*. Z acetolaktátu vznikl jen acetoín, nikoliv diacetyl.



Obr. 1. Tvorba a odbourání diacetylu kvasinkovou buňkou [42]
DA — diacetyl, ALDC — acetolaktát dekarboxylasa,
Al — acetolaktát, Pyr — pyruvát

Sone et al. [19, 20] transformovali plasmid DNA obsahující ALDC z *Enterobacter aerogenes* do *Saccharomyces cerevisiae*. Pivovarské kvasinky degradovaly acetolaktát, snížilo se množství diacetylu na jednu čtvrtinu oproti původní hodnotě. Aktivita ALDC poklesla pětikrát při třetím nasazení a udržela se až do desátého nasazení. Godtfredsen et al. [21] izolovali ALDC z *Bacillus licheniformis*. Přídavek enzymu vedl k redukci celkového diacetylu přibližně na polovinu.

V pivovaru Carlsberg izolovali ALDC z *Enterobacter aerogenes*. Enzym nechali působit 24 hodin ve spilce při 10°C . Po dvou dnech se pivo filtrovalo a stáčelo. Došlo k redukci diacetylu asi o jednu desetinu oproti kontrolní sadě [1, 22].

2.3 DEGRADACE DIACETYLU

Metabolismus rozpadu diacetylu jeho enzymovou redukcí podrobně studovali Galzy et al. [23]. Studium haploidního kmene *Saccharomyces cerevisiae* α potvrdilo, že diacetyl i acetoín byly redukovány akcí jednoho a téhož enzymu, který uvedení autoři nazvali „diacetyl-acetoín reduktasou“. U kmene *Saccharomyces uvarum* a DR redukovala diacetyl na acetoín a AR acetoín na butandiol. Aktivita těchto enzymů byla studována za aerobních i anaerobních podmínek. Diference mezi těmito dvěma kmeny byla překvapující, protože oba byly získány ze stejného asku i ze stejné meiose. Rozdíly pozorované mezi kmeny „ α “ a „a“ jsou důležité z průmyslového hlediska. Jeden z kmenů transformoval diacetyl ve dvou krocích na 2,3-butandiol, zatímco druhý pouze na acetoín, což představuje možnou diferenciaci arómatu a změn při skladování piva. K obdobným výsledkům rozdělení aktivit mezi DR/AR dospěli i Legeay et al. [41].

2.4 VZNIK A REDUKCE ACETOINU

Tvorbu a odbourávání acetoínu v průběhu fermentace sledovali Haukeli a Lie [25, 26, 27, 28]. Hlavní dobu fermentace klasifikovali dvěma separátními fázemi a maximum tvorby acetoínu nazvali „bodem metabolické změny“. Vzestup a redukce byly ovlivněny složením mladiny, množstvím inokula, typem kvasničného kmene i přítomností kyslíku. V první fázi fermentace je acetoín exkretován do média, ve druhé fázi pak absorbován buňkou a redukován na 2,3-butandiol. Redukce je vyšší než exkrece. Krátce po „bodu metabolické změny“ se dosáhlo i maxima acetolaktátu.

3. VLIV TECHNOLOGICKÝCH FAKTORŮ NA OBSAH VICINÁLNÍCH DIKETONŮ

Rychlost redukce diacetylu je přímo úměrná jeho následnému metabolismu v kvasinkách, proto i jeho vyšší hladina může být v průběhu fermentace odstraněna [29]. Bylo zjištěno, že potenciální rychlost odstranění diacetylu v průběhu fermentace je nejméně desetkrát vyšší než potenciální rychlost tvorby acetolaktátu [30]. Kvasničné kmeny skladované po dlouhou dobu nebo při vysoké teplotě, resp. při

nedostatku nutričních faktorů nejsou schopny provést redukci VDK dostatečně. Diacetyl přidaný před koncem fermentace je mnohem méně redukován než na jejím počátku, neboť rychlost metabolismu je snížena. Rychlost redukce se zvyšuje, jestliže jsou kvasinky rovnoměrně suspendovány v médiu, slabě dispergované kvasinky provádějí redukci méně intenzívně [31]. Inoue [32] uvádí, že změny v koncentraci kvasinek jsou tak zřetelné za tradičních podmínek ležení, že hladina vicinálních diketonů často více závisí na flokulačním charakteru použitého kmeny než na teplotě v průběhu ležení a zrání piva. Vyšší zákvasná dávka a teplota mohou v řadě případů snížit obsah diacetylů v pivu a používají se též ke zrychlení fermentace. Byl patentován způsob kvašení s vysokou zákvasnou dávkou za relativně nízké teploty, která vzrostla až po využití většiny sacharidických složek. Tím se snížila tvorba aceto-hydroxykyselin a zrychlil se jejich rozpad a redukce [1]. Řada prací se zabývá vhodným složením mladiny z hlediska tvorby a redukce diacetylů. Shodně doporučují dostatečný obsah valinu v mladině, naopak vysoká surogace a nízký obsah dusíkatých látek nebo použití nevhodného sladů s nízkým obsahem aminokyselin často vede k vysokým hodnotám diacetylů [30]. Vliv koncentrace aminokyselin v mladině na tvorbu těkavých látek je výraznější v případě aerobní fermentace oproti anaerobní.

Aerace zakvašené mladiny běžně neovlivní vzrůst hladiny diacetylů, avšak podporuje zvýšení aktivity kvasinek a tedy i produkci acetolaktátu v počátečních fázích kvašení. Zvýšená aerace při současném poklesu redox-potenciálu může způsobit nárůst diacetylů. Tato situace nastává více u ležáků než u svrchně kvašených pív v důsledku vyšší rozpustnosti kyslíku za nižších teplot [7]. Hladina kyslíku v ležáckém tanku je často kolem 0,8 mg . l⁻¹, což postačí k produkci až 4 mg . l⁻¹ diacetylů. Nebezpečí aerace se zvyšuje také při filtraci. Nízký obsah kyslíku při zakvašování není kritický, pokud nevede ke zpomalení fermentace. Důsledky přístupu vzduchu na začátku fermentace lze potlačit aktivním růstem kvasinek a zrychlením metabolismu, dokud nejsou ještě zcela vyčerpány zásoby zkvasitelných sacharidů. Provzdušnění na konci fermentace prakticky vždy způsobí vzestup diacetylů.

Jestliže primární fermentace probíhá za vyšší teploty, pak ležení může být značně zkráceno a obecně udržení relativně vysoké teploty na konci hlavního kvašení zaručuje nízký obsah vicinálních diketonů. Jsou-li rozloženy všechny aceto-hydroxykyseliny před pasterací a skladováním, hladina diacetylů je minimální za předpokladu, že pivo nebylo kontaminováno. Pasterace urychluje rozklad acetolaktátu, navíc je často přítomen vzduch v hrdlovém prostoru láhve, což může způsobit vzestup diacetylů.

Hoffman [33] sledoval změny vicinálních diketonů v CKT. Stanovil celkový diacetyl jako volný diacetyl a přeměněný acetolaktát. Obsah α -aminodusíku by neměl být v zakvašované mladině menší než 200 mg . l⁻¹, obsah kyslíku 6–8 mg . l⁻¹. Pokles nasycení mladiny kyslíkem z 8,0 na 0,8 mg . l⁻¹ na

začátku fermentace vedl ke čtyřnásobnému zvýšení hladiny diacetylů na jejím konci. Obsah zinku by neměl klesnout pod 0,15 mg . l⁻¹. Jako běžnou dávku kvasnic uvádí 20–22 . 10⁶ buněk na mililitr. S počtem vedení se množství diacetylů zvyšovalo a maximální tvorba se časově posouvala. U piva s nadměrným obsahem diacetylů doporučuje Hoffman ohřev na 20 °C a „řezání“ várky při současném kroužkování kolem 10 %.

Při kvašení v CKT tlak oxidu uhličitého redukuje tvorbu vyšších alkoholů a má vliv i na profil VDK. Oxid uhličitý redukuje kvasničný růst, avšak nemá vliv na glykolýzu [34, 35]. Nejvýrazněji se tato tendence projevila při tlaku 0,1 MPa. Při 0,05 MPa byl vliv tlaku již prakticky nevýznamný. Pravděpodobně oxid uhličitý v tomto tlakovém rozmezí ovlivňuje fermentaci nepřímo prostřednictvím inhibičního efektu na kvasničný růst než přímým působením na metabolismus glykolytické cesty. Zatímco rychlost fermentace při tlaku 0,05–0,1 MPa je ovlivněna jen mírně, absorpce aminokyselin a produkce mnoha senzoricky významných látek je stimulována. Utilizace aminokyselin asparagové, glutamové, threoninu nebo lysinu není v tomto tlakovém rozmezí prakticky ovlivněna, zato absorpce valinu, isoleucinu a leucinu je progresivně redukována. Tlak oxidu uhličitého nemá vliv na absorpci aminokyselin skupiny „A“ [36] a počáteční utilizace volného aminodusíku zůstává prakticky neovlivněna. Utilizace aminokyselin skupiny „B“ je brzděna.

4. ANALYTIKA VICINÁLNÍCH DIKETONŮ

Metodika EBC uvádí spektrofotometrické stanovení diacetylů reakcí s 1,2-fenylendianinem po předchozí destilaci vzorku s vodní párou nebo stanovení metodou plynové chromatografie.

Diacetyl je možno dále stanovit spektrofotometricky po reakci s α -naftolkreatinem při 530 nm nebo s α -naftolem a alkalickým kreatinem podle Owadese [43], resp. upravenou metodou Drewsovou [44].

Gjertsen *et al.* [45] upravili pro analytiku piva Hetzelovu metodu [46] pro stanovení diacetylů v másle. Delgado *et al.* [47, 48] uvádějí modifikaci oficiální EBC metody a diskutují vliv oxidu siřičitého při stanovení diacetylů. Diacetyl lze stanovit i fluorometricky. Metoda je založena na derivatizaci diacetylů s 2,3-dimethylbenzochinozalinem a měřením absorpance při 365, resp. 435 nm [49].

Stanovení diacetylů plynovou chromatografií /GLC/ ukázalo, že postupy vyžadující zahřátí vzorku mohou poskytnout částečně zkreslené výsledky. Inoue [50] uvádí za hlavní zdroj nárůstu nekonvertované aceto-hydroxykyseliny. Příprava vzorku se provádí head space technologií za použití detektoru elektronového zachytu ECD [4, 51, 52] nebo plameno-ionizačního detektoru FID [53].

Některí autoři doporučují úpravu pH vzorku na hodnotu 7,0 před vlastním stanovením z důvodu inhibice přeměny prekurzorů na diacetyl. Jiní naopak uvádějí, že při přidávku hydroxidu sodného ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bylo jen 50 % diacetylů v doka-

zatelném množství. Jako možnou příčinu uvádějí vznik dimeru diacetylu [53].

Kolorimetrické metody dávají hodnoty pro celkové diketony v hotových pivech přibližně rovné sumě individuálních diketonů získaných metodou GLC.

Analytika diacetylu byla vyvinuta řadou autorů, jako nejspecifičtější se jeví metoda GLC, která však vyžaduje náročné přístrojové vybavení. Spektrofotometrické metody nejsou zcela specifické, avšak obraz tzv. celkového diacetylu, tj. diacetylu a pentandionu, popř. prekurzorů je z pívovarského hlediska vhodným ukazatelem [12]. Velkou výhodou je jejich jednoduchost, menší náročnost na přístroje a pracnost.

Použité zkratky

AHAS	— synthasa acetoxyhydroxy kyselin [E. C. 4.1.3.18]
ALDC	— acetolaktát dekarboxylasa [E. C. 4.1.1.5]
AR	— acetoin reduktasa [E. C. 1.1.1.4]
BAT	— aminotransferasa větvených aminokyselin [E. C. 2.6.1.42]
DHA	— dehydrasa dihydroxykyselin [E. C. 4.2.1.9]
DR	— diacetyl reduktasa [E. C. 1.1.1.5]
RI	— reduktoisomerasa acetoxyhydroxykyselin [E. C. 5.4.99.3]
TD	— threonin deaminasa [E. C. 4.2.1.16]
VDK	— vicinální diketony

LITERATURA

- [1] WAINWRIGHT, T.: J. Inst. Brew., **79**, 1973, s. 451.
- [2] JENSEN, B. R., SVENDSEN, I., OTTESEN, M.: Proc. EBC Congr., 1987, s. 393.
- [3] SHIMWELL, J. L., KIRKPATRICK, W. F.: J. Inst. Brew., **45**, 1939, s. 137.
- [4] NIEFIND, H. J., REIWERDE, E. H.: Lebensmittel. Gerichth. Chem., **40**, 1986, s. 50.
- [5] SUOMALAINEN, H., RONKAINEN, P.: Nature, **220**, 1968, s. 792.
- [6] GEIGER, E.: BRAUWELT, **120**, 1980, s. 1680.
- [7] CHUANG, L. F., COLLINS, E. B.: J. Appl. Bacteriol., **95**, 1968, s. 2083.
- [8] SCHULZ, R., BEUBLER, A.: Lebensmittelind., **36**, 1989, s. 62.
- [9] GJERMANSSEN, C., NILSON-TILGREN, T., PETERSEN, J. G. L., KIELLAND-BRANDT, M. C., SIGSAARD, P., HOLMBERG, S.: J. Basic. Microbiol., **28**, 1988, s. 175.
- [10] UMBARGER, H. E., BROWN, B., EYSING, E. J.: J. Am. Chem. Soc., **79**, 1957, s. 2980.
- [11] BRENNER, M. W.: MBAA Tech. Quarterly, **7**, 1970, s. 43.
- [12] NARZISS, L., MIEDANER, H., GRESSER, A.: Brauwelt, **124**, 1984, s. 495.
- [13] RAMOS-JEUNEHOMME, C., DEWERCHIN, M., MAS-CHELEIN, C. A.: Proc. EBC Congr., 1985, s. 283.
- [14] MAGEE, P. T., DE-ROBICHON-SZULMAJSTER, H.: Eur. J. Biochem., **3**, 1968, s. 507.
- [15] GOOSENS, E., et al.: Proc. EBC Congr., 1987, s. 573.
- [16] SMITH, J. K., SCHLOSS, J. V., MAZUR, B. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 1989, s. 4179.
- [17] FUJII, T., et al.: Appl. Environ. Microbiol., **56**, 1990, s. 997.
- [18] GOELING, D., STAHL, U.: Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1988, s. 1989.
- [19] SONE, H., et al.: Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1988, s. 38.
- [20] SONE, H., et al.: Proc. EBC Congr., 1987, s. 553.
- [21] GODTFREDSEN, S. F., et al.: Proc. EBC Congr., 1987, s. 563.
- [22] DELLWEG, H.: Mschr. Brauwiss., **38**, 1985, s. 262.
- [23] GALZY, P., RATOMAHENIA, P., LOUIS-EUGENE, S.: Proc. EBC Congr., 1983, s. 505.
- [24] LOUIS-EUGENE, S., RATOMAHENIA, R., GALZY, P.: Folia Microbiol., **33**, 1988, s. 38.
- [25] HAUKELI, A. D., LIE, S.: J. Inst. Brew., **77**, 1971, s. 538.
- [26] HAUKELI, A. D., LIE, S.: J. Inst. Brew., **78**, 1971, s. 229.
- [27] HAUKELI, A. D., LIE, S.: J. Inst. Brew., **81**, 1975, s. 58.
- [28] HAUKELI, A. D., LIE, S.: J. Inst. Brew., **84**, 1978, s. 85.
- [29] KAHLER, M., LEJSEK, T.: Kvas. prům., **23**, 1977, s. 248.
- [30] MORRISON, N. M., BENDIAK, D. S.: MBAA Tech. Quarterly, **24**, 1987, s. 14.
- [31] BURGER, M., GLENISTER, P. R., LAUTENBACH, A. F.: Proc. ASBC, 1958, s. 80.
- [32] WREAU, D.: Brew. Guardian, **110**, 1981, s. 35.
- [33] HOFFMAN, S.: Brauwelt, **124**, 1984, s. 1398.
- [34] KNACHTBULL, F. B.: J. Inst. Brew., **93**, 1987, s. 420.
- [35] DREWS, B., SPECHT, H., TRÉNEL, G.: Mschr. Brau., **20**, 1967, s. 149.
- [36] JONES, M., PIERCE, J. S.: J. Inst. Brew., **70**, 1964, s. 307.
- [37] STRASSMAN, M., THOMAS, A. J., WEINHOUSE, S.: J. Am. Chem. Soc., **75**, 1955, s. 1261.
- [38] PORTNO, A. D.: J. Inst. Brew., **72**, 1966, s. 458.
- [39] GALVAN, L., et al.: Proc. EBC Congr., 1987, s. 385.
- [40] BENDOŤ, O., JANDEROVÁ, B., CVRČKOVÁ, F.: Zpráva o práci podle H. S. č. 1049/90, 1990, Univerzita Karlova, Praha.
- [41] LEGEAY, O., et al.: Agric. Biol. Chem., **53**, 1989, s. 531.
- [42] DONHAUSER, S., SPRINGER, R.: Brauwelt, **130**, 1990, s. 2307.
- [43] OWADES, J. L., JAKOVAC, J. A.: Proc. ASBC, 1952, s. 81.
- [44] DREWS, B., et al.: Mschr. Brau., **19**, 1966, s. 34.
- [45] GJERTSEN, P., UNSTRUP, S., TROLLE, B.: Mschr. Brau., **17**, 1964, s. 232.
- [46] HETZEL, H. F.: Milchwiss., **14**, 1959, s. 424.
- [47] DELGADO, M. A., HAYA, E. F., ALVAREZ, R.: J. Inst. Brew., **95**, 1989, s. 25.
- [48] ALVAREZ, R., et al.: J. Inst. Brew., **95**, 1989, s. 21.
- [49] DAMIANI, P., BUSINI, G.: Ind. Alimentari, **64**, 1987, s. 1143.
- [50] INOUE, T., YAMAMOTO, M.: Proc. ASBC, 1970, s. 198.
- [51] WESTERFELD, W. W.: J. Biol. Chem., 1945, s. 495.
- [52] DUMONT, J. P., LAND, D. G.: J. Agric. Food. Chem., **34**, 1986, s. 1043.
- [53] MONTVILLE, J., et al.: J. Microbiol. Methods, **7**, 1987, s. 1.

Lektoroval Ing. J. Šavel, CSc.

Volř, P.: Tvorba a redukce diacetylu v průběhu kvašení a zrání piva. Kvas. prům., 37, 1991, č. 5, s. 129–134.

Při fermentaci piva v CKT je diacetyl jedním z ukazatelů průběhu kvašení a zrání piva. S tím souvisí i snahy o snižování jeho hladiny v pivu. V odborné literatuře je publikována řada způsobů ovlivňujících jeho koncentraci — od klasické regulace fermentačních podmínek až po změnu enzymových hladin kvasinek metodami genového inženýrství. Nové selektivní kmeny s vnesením genu acetolaktát dekarboxylasy — E. C. 4.1.1.5 nebo se stimulací diacetyl reduktasy — E. C. 1.1.1.5 poskytují možnost prudkého snížení hladiny diacetylu. Dosud problémem u transformantů zůstává stabilita kmene.

Proto tradiční mechanismy ovlivňující jeho tvorbu — teplota, tlak, složení mladiny a rozhodující měrou kvasničný kmen — jsou stálým zájmem výzkumných pracovníků.

Вольф, П.: Образование и понижение содержания диацетила в течение сбраживания и выдержания пива. Квас. прум. 37, 1991, № 5, стр. 129—134.

При ферментации пива в ЦКТ диацетил является одним из показателей хода брожения и созревания пива. С тем связано и стремление к понижению его количества в пиве. В литературе опубликован ряд способов, оказывающих влияние на его концентрацию — от классического регулирования условий ферментации по изменению энзимных уровней дрожжей методами генной инженерии. Новые селективные штаммы с внесением гена ацетолактат декарбоксилазы — Е.Ц. 4.1.1.5 или с стимулированием диацетил редуктазы — Е.Ц. 1.1.1.5 предоставляют возможность резкого понижения уровня диацетила. Проблемой до сих пор остается стабильность штамма трансформантов.

Всвязи с тем традиционные механизмы, оказывающие влияние на образование диацетила — давление, температура, состав охмеленного сусла и в решающей степени штамм дрожжей находятся в области постоянного внимания исследовательских институтов.

Volf, P.: Formation and Reduction of Diacetyl During Fermentation and Maturation of Beer. Kvas. prům., 37, 1991, No. 5, pp. 129—134.

Diacetyl is one of the important parameters of the fermentation and maturation processes of beer in the cylindro-conical fermentation vessels. The different procedures of the keeping of low diacetyl concentrations in beer are described in a literature. New selected yeast strains with the incorporated gene of acetolactate decar-

boxylase — E.C. 4.1.1.5 or with the stimulated diacetyl reductase — E.C. 1.1.1.5 permit a possibility of a strongly lowered diacetyl level. However, the problem remaining with these strains is their stability. Therefore, the parameters affecting the diacetyl formation, i. e. temperature, pressure, wort composition and the yeast strains still have been investigated.

Volf, P.: Bildung und Reduktion des Diazetyls im Verlauf der Gärung und Reifung des Bieres. Kvas. prům. 37, 1991, Nr. 5, S. 129—134.

Bei der Fermentation des Bieres in ZK-Tanks ist das Diazetyl eines der Kennzeichen des Verlaufs der Gärung und Reifung des Bieres. Damit hängen auch die Bemühungen um die Senkung des Diazetyl-Niveaus im Bier zusammen. In der Fachliteratur wurde eine Reihe von Verfahren veröffentlicht, welche die Konzentration des Diazetyls beeinflussen — von der klassischen Regulation der Fermentationsbedingungen bis zur Änderung des Enzymniveaus bei Hefen durch genetische Methoden. Die neuen Selektivstämmе mit Inkorporierung des Gens der Azetolaktat-Deкарбоксилазе — E.C. 4.1.1.5 oder mit Stimulierung der Diazetyl-Reduktase — E.C. 1.1.1.5 bieten die Möglichkeit eines plötzlichen Senkens des Diazetylniveaus. Als ein bisher ungelöstes Problem bleibt bei den Transformanten die Stabilität des Stammes.

Deshalb wird von Seiten der Forschung den traditionellen Mechanismen, die die Diazetylbildung beeinflussen — Temperatur, Druck, Würzezusammensetzung und in entscheidendem Ausmaß der Hefestamm — eine ständige Aufmerksamkeit gewidmet.