

KRZYSZTOF KUCHARCZYK, TADEUSZ TUSZYŃSKI

OBECNOŚĆ DIACETYLU I 2,3-PENTANODIONU W PIWIE

Streszczenie

Podczas fermentacji alkoholowej drożdże piwowarskie syntetyzują oprócz etanolu i dwutlenku węgla szerokie spektrum różnych ubocznych produktów przemiany materii, z których większość wydzielana jest do środowiska. W różnych gatunkach piwa można stwierdzić ponad 1000 komponentów, w tym ok. 200 związków karbonylowych. Ilość i jakość produktów i metabolitów pośrednich wydzielanych z komórek ma wpływ na cechy sensoryczne gotowego piwa. Obok składników chmielu związki te nadają mu specyficzny i charakterystyczny smak oraz aromat. Jedną z grup takich związków są diketony wicynalne (VDK – *vicinal diketons*). To ważne składniki bukietu smakowo-zapachowego młodego piwa. W piwie wyróżnia się dwa podstawowe składniki z grupy tych diketonów: diacetyl i 2,3-pentanodion. Ich wpływ na smak i aromat piwa jest na ogół negatywny, ale uważane są za „wyznaczniki dojrzałości piwa”. W wyższych stężeniach nadają piwu słodkawy, nieczysty, czasem niewłaściwy smak, a aromat przypomina zapach masła. Powstają z prekursorów produkowanych przez drożdże w czasie fermentacji. W kolejnym etapie fermentacji piwo podlega procesowi dojrzewania, którego głównym celem jest zmniejszenie zawartości diketonów wicynalnych bądź ich eliminacja. W tej fazie procesu diacetyl dyfunduje z powrotem do cytoplazmy komórki drożdżowej, a następnie podlega redukcji do acetoiny w wyniku aktywności enzymu reduktazy diacetylowej. Etap konwersji regulowany jest temperaturą i długością procesu dojrzewania w celu otrzymania piwa o właściwym bukiecie smakowo-zapachowym.

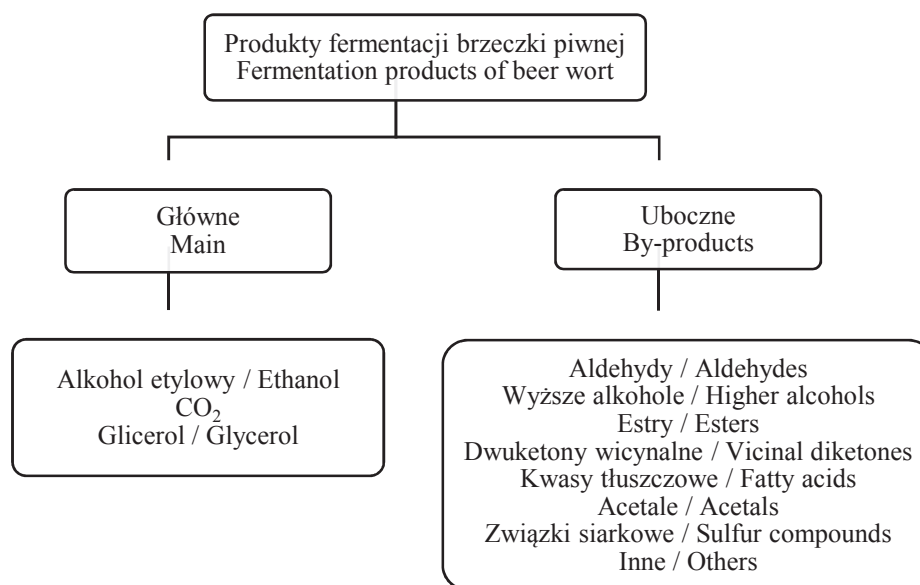
Celem pracy było przybliżenie mechanizmów powstawania wicynalnych diketonów podczas fermentacji brzezki piwnej. Opisano znaczenie diketonów w procesie dojrzewania piwa, których odpowiednia ilość jest uważana za wyznacznik zakończenia tej fazy procesu produkcji piwa. Przedstawiono również wybrane parametry technologiczne, których optymalizacja zapewnia uzyskanie odpowiednio niskiej zawartości diacetylu i 2,3-pentanodionu w gotowym produkcie.

Słowa kluczowe: piwo, fermentacja, dojrzewanie, diacetyl, 2,3-pentanodion

Wprowadzenie

Jednym z głównych celów fermentacji, a zwłaszcza dojrzewania piwa jest odpowiednie ustabilizowanie składu chemicznego (rys. 1), aby otrzymany produkt charakte-

ryzował się pożądanym smakiem i zapachem. Podczas wymienionych procesów drożdże mogą uczestniczyć również w usuwaniu niektórych niepożądanych związków [24]. Diketony wicynalne (VDK – *vicinal diketons*) to istotne składniki bukietu smakowo-zapachowego piwa. Należą do nich: diacetyl i 2,3-pentanodion. Diacetyl w ilościach przekraczających próg wyczuwalności nadaje piwu nieczysty smak i zapach niedojrzałego piwa, przypominający zapach masła [8, 12, 19].



Rys. 1. Składniki piwa powstające podczas fermentacji i dojrzewania

Fig. 1. Ingredients of beer produced during fermentation and maturation

Źródło / Source: Modyfikacja własna na podstawie [1] / The authors' own modification on the basis of [1].

Bezpośrednim prekursorem diacetylu jest α -acetomleczan, który powstaje z pirogronianu. Jako metabolit zewnątrzkomórkowy zamienia się w diacetyl w nieenzymatycznym procesie dekarboksylacji. W następnej kolejności komponent ten ulega redukcji do acetoiny za pomocą diacetyloreduktazy. Acetoina jest w dalszym etapie przekształcana przy udziale wewnątrzkomórkowych enzymów drożdży do 2,3-butanodiolu, który nie ma już istotnego wpływu na cechy sensoryczne piwa. W konsekwencji prawidłowo fermentowane i dojrzewane piwo dolnej fermentacji (np. Lager – najbardziej rozpowszechniony gatunek piwa w Polsce) powinno zawierać śladowe ilości diacetylu ($< 25 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$), który przyjęto jako wyróżnik jego dojrzałości. W małych ilościach diacetyl jest akceptowany, a w niektórych stylach piwnych nawet pożądan, m.in. w piwach Scotch Ales, Dry Stouts, English Bitters, Czech Pils (w tym Pil-

sener Urquell), Oktoberfest. W przypadku piw z pożądaną podwyższoną zawartością diacetylu poziom ten może osiągnąć nawet $600 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Z kolei w piwach jasnych niskoalkoholowych o słabym aromacie (np. Lager) diacetyl jest wyczuwalny w zakresie $10 \div 40 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [17].

Próg wyczuwalności 2,3-pentanodionu wynosi ok. $900 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, co oznacza, że jest on praktycznie niewyczuwalny w piwie ze względu na zdecydowanie mniejszą ilość powstającą podczas procesu produkcji [8].

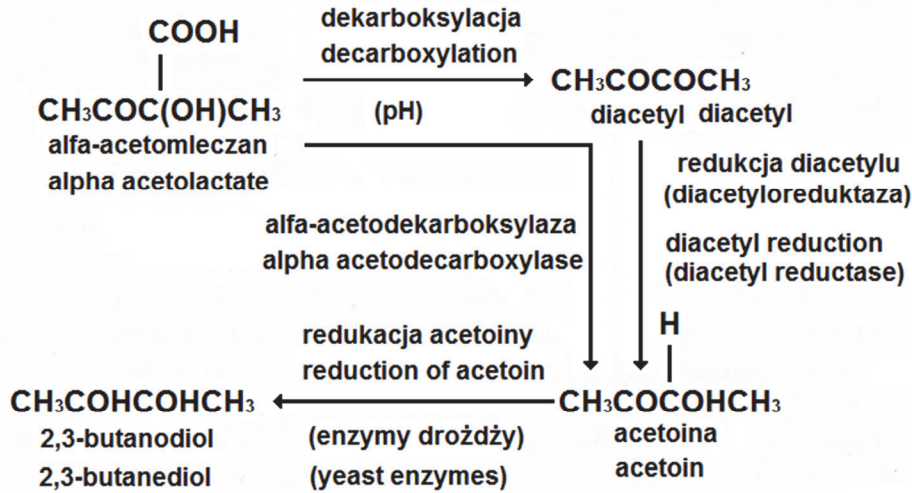
Powstawanie wicynalnych diketonów

Diacetyl (butan-2,3-dion) i 2,3-pentanodion, będące produktami ubocznymi fermentacji alkoholowej brzezki, powstają pośrednio w procesie biosyntezy izoleucyny i waliny. Produkty tego szlaku przemian, w tym m.in. α -acetomleczan (rys. 2), są bezpośrednimi prekursorami diketonów wicynalnych [1, 3]. Pod koniec fermentacji i podczas procesu dojrzewania piwa ulegają one ponownej reasymilacji przez drożdże, a następnie redukowane są do acetoiny i 2,3-butanodiolu.

Zawartość wolnych aminokwasów (FAN) w brzezce wpływa na tworzenie aceto hydroksykwasów. Nakatani i wsp. [20] dowiedli zależności pomiędzy stężeniem diacetylu a minimalną zawartością FAN osiąganą podczas fermentacji.

Redukcja diacetylu pojawia się w późniejszej fazie fermentacji oraz w procesie dojrzewania i wymaga obecności oraz aktywności reduktaz komórek drożdży. Tworzenie i degradacja diketonów pokrewnych przebiega w trzech etapach. W pierwszym etapie drożdże w procesie przemiany materii wytwarzają wyłącznie pośrednie prekursor diketonów pokrewnych. Nie mają one smaku ani zapachu i trudno wykryć je w piwie. Prekursory te powstają w procesie syntezy aminokwasów przy udziale drożdży [1].

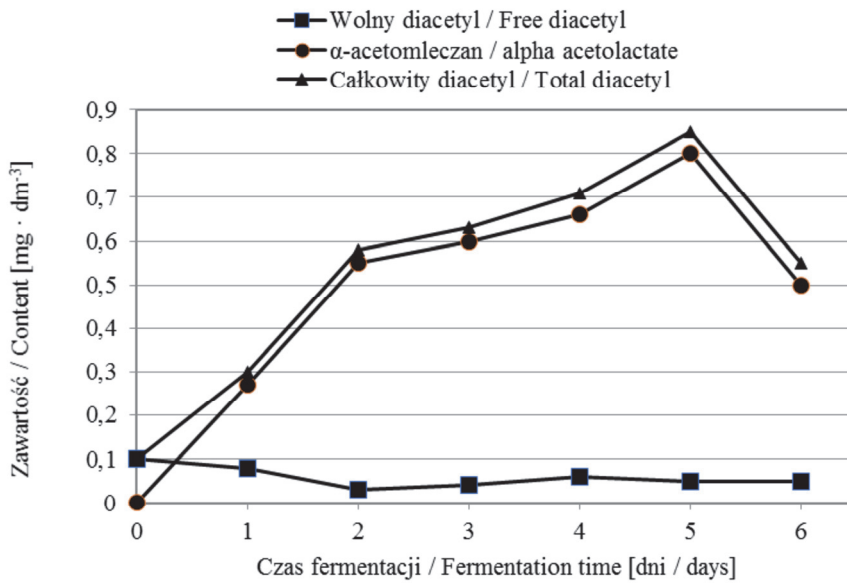
Początkowym związkiem procesu jest kwas pirogronowy powstający w jednym z etapów cyklu glikolizy. Wytwarzane w kolejnym stadium acetomleczany będące bezpośrednimi prekursorami diketonów wydzielane są do otoczenia przez komórki drożdżowe (metabolity zewnątrzkomórkowe). W wyniku spontanicznej, tlenowej dekarboksylacji odpowiednich α -aceto hydroksykwasów powstają diketony wicynalne, których ilość w piwie zależy m.in. od zawartości prekursorów pozakomórkowych [12]. W pierwszym etapie fermentacji jednym z metabolitów drożdży wydzielanym w największej ilości do brzezki jest α -acetomleczan, który po utlenieniu przekształca się w diacetyl. Konwersja α -acetomleczanu jest reakcją enzymatyczną, której przebieg zależy od pH, temperatury i potencjału oksydoredukcyjnego [2]. Podczas fermentacji zawartość wolnego diacetylu w fermentującej brzezce jest zazwyczaj mała, natomiast α -acetomleczan stanowi zdecydowaną większość ogólnej zawartości całkowitego diacetylu (rys. 3).



Rys. 2. Tworzenie diacetylu i jego konwersja za pomocą drożdży do butano-2,3-diolu

Fig. 2. Formation of diacetyl and its conversion by yeast to butane-2,3-diol

Źródło / Source: Modyfikacja własna na podstawie [18] / The authors' own modification on the basis of [18].



Rys. 3. Zawartość diacetylu i α-acetomleczanu podczas fermentacji piw dolnej fermentacji

Fig. 3. Content of diacetyl and α-acetolactate during fermentation of bottom-fermented beers

Źródło / Source: Modyfikacja własna na podstawie [13] / The authors' own modification on the basis of [13].

Zawartość wycylnych diketonów jest zależna od wielu czynników, m.in. temperatury fermentacji i dojrzewania piwa, wskaźnika tworzenia prekursora α -aceto-mleczanu przez drożdże, spontanicznej dekarboksylacji α -aceto-hydroksykwasów do diacetylu, a następnie jego redukcji przez enzymy drożdży [13].

Uzyskiwanie niższych stężeń diacetylu i 2,3-pentanodionu w młodym piwie jest rezultatem warunków procesu, składu brzezki, zastosowanej technologii oraz szczepu drożdży. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w warunkach przemysłowych wykazano, że dawka drożdży nastawnych, stopień napowietrzania brzezki oraz sposób napełniania tankofermentorów nie mają istotnego wpływu na końcową zawartość diacetylu i 2,3-pentanodionu [14, 15]. Dowiedziono natomiast dużego wpływu stężenia komórek drożdży [jtk/cm^3] oraz temperatury fermentacji. Wraz ze wzrostem temperatury zawartość omawianych związków zmniejszała się głównie na skutek większej aktywności diacetyloreduktazy, która jest odpowiedzialna za konwersję diacetylu do acetoiny. Jej wzrost powoduje, że α -aceto-mleczan tworzy się szybciej i skuteczniej rozkłada do diacetylu, który może wówczas zostać wcześniej zredukowany. W przeciwnym razie przedwczesne usunięcie drożdży skutkuje rozkładem α -aceto-mleczanu do diacetylu, który nie w pełni zostanie zredukowany, co sprawia, że jego poziom w piwie może być wyższy [1]. Proces redukcji diacetylu przez drożdże nie jest tak dobrze poznany jak mechanizmy jego tworzenia, ale na pewno zależy od kondycji fizjologicznej i składu ściany komórkowej drożdży oraz temperatury i pH procesu dojrzewania piwa. Ogólnie można stwierdzić, że proces przemiany wycylnych diketonów jest ograniczony przez szybkość reakcji spontanicznej dekarboksylacji α -aceto-mleczanu do diacetylu [13].

Wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się szybkość przemiany α -aceto-mleczanu oraz redukcji diacetylu do acetoiny i butanodiolu. Do istotnych czynników wpływających na tworzenie prekursorów wycylnych diketonów można zaliczyć [12]:

- szczep drożdży użyty do fermentacji brzezki – cecha uwarunkowana genetycznie,
- dawkę drożdży – jej zwiększenie powoduje bardziej intensywne wytwarzanie aceto-mleczanów, ale jednocześnie większa dawka aktywnych drożdży powoduje szybszy i intensywniejszy ich rozkład,
- natlenienie brzezki – obecność tlenu zwiększa wytwarzanie prekursorów przez drożdże.

Wpływ powyższych czynników nie jest jednak tak duży, aby przez odpowiednie zabiegi technologiczne nie można było skutecznie ograniczyć wytwarzania tych związków podczas fermentacji brzezki [4, 16].

W drugim etapie poza komórką drożdżową i niezależnie od niej, w procesie oksydatywnej dekarboksylacji, z aceto-mleczanów powstają diketony pokrewne – diacetyl

i 2,3-pentanodion. Ta przemiana przebiega stosunkowo łatwo i korzystne są dla niej następujące czynniki [9]:

- obniżenie pH – przy pH 4,2 ÷ 4,4 przemiana zachodzi najszybciej. Wzrost wartości pH wpływa hamująco na proces dekarboksylacji,
- podwyższenie temperatury,
- napowietrzanie – kontakt piwa z powietrzem prowadzi do przyspieszenia przemiany prekursorów.

Stwierdzono, że powolna przemiana prekursorów w ich pokrewne diketony ogranicza szybkość dojrzewania piwa [22].

W trzecim etapie diacetyl i pentanodion, które powstają głównie podczas fermentacji głównej, są w większości zredukowane przez enzymy drożdży do substancji niewpływających negatywnie na smak piwa.



Proces tych przemian można przyspieszyć różnymi zabiegami technologicznymi, a szczególnie dodatkami preparatów enzymatycznych z aktywnością odpowiednich enzymów z grupy reduktaz. Redukcja diacetylu do acetoiny przebiega przy udziale diacetyloreduktazy produkowanej przez komórki drożdżowe. Acetoina zostaje następnie przekształcona w 2,3-butanodiol, który z kolei redukowany jest początkowo do acetyloetylokarbinolu, a następnie 2,3-pentanodionu [11, 23]. Zarówno 2,3-butanodiol, jak i 2,3-pentanodiol są związkami obojętnymi sensorycznie. Charakteryzują się stosunkowo wysokimi progami wyczuwalności sensorycznej. Wyczuwalność smakowa butanodiolu wynosi ok. 150 mg·dm⁻³ (jest 10-krotnie mniejsza niż diacetylu) i w piwie jest on z reguły sensorycznie niewyczuwalny [28].

Redukcję diacetylu ułatwiają czynniki [1, 16]:

- właściwy szczep drożdży odznaczający się odpowiednią zdolnością redukcji diacetylu,
- obecność dużej liczby aktywnych komórek drożdży w fazie dofermentowania i dojrzewania piwa; aktywność reduktazy diacetylu świeżo dodanych, energicznie fermentujących drożdży może być kilkakrotnie większa (zaleta tzw. krążkowania dojrzewającego piwa),
- utrzymanie możliwie dużej koncentracji komórek drożdżowych w dojrzewającym piwie,
- zapobieganie nadmiernemu osadzaniu się biomasy na dnie tanku, a więc wymuszona cyrkulacja zwłaszcza w części stożkowej tankofermentora (celowe włączenie pompki do pobierania prób), przepompowanie od dołu stożka strumienia CO₂ (kondycjonowanie piwa), zmniejszanie ciśnienia w tanku itp.,
- okresowe podwyższenie temperatury.

Usuwanie diacetylu zależy głównie od aktywności metabolicznej drożdży. Komórki martwe, zdegenerowane, źle odżywione nie redukują diacetylu, a długo przechowywane, zwłaszcza w podwyższonej temperaturze (powyżej 5 °C), rozkładają go mniej skutecznie niż komórki o dużej aktywności metabolicznej. Z kolei aktywność diacetyloreduktazy drożdży w brzeczce jest uwarunkowana nie tylko temperaturą procesu, ale także ilością biomasy drożdży, szczególnie młodych komórek, których przyrost w wyższej temperaturze jest istotnie większy. Te dwa czynniki mają decydujący wpływ na szybkość konwersji diketonów.

Doświadczenia przeprowadzone ze zwiększoną dawką drożdży, większym napowietrzaniem brzeczki i zastosowaniem przerwy w dopełnianiu nie zawsze wykazują istotne zmiany w zakresie zawartości diketonów, mimo że obserwuje się większy przyrost biomasy [15]. W badaniach przeprowadzonych przez Ertena i wsp. [7] zauważono, że istotnie zmniejsza się zawartość diacetylu w zależności od początkowej koncentracji drożdży nastawnych. Natomiast Dekoninck i wsp. [4] wskazali na trudności z uzyskaniem akceptowanego poziomu diacetylu w piwie wyprodukowanym ze stężonych brzeczek, ale przy zastosowaniu dużych dawek drożdży. Podobne wyniki uzyskali Nguyen i Viet Man [22], którzy wykazali wzrost stężenia diacetylu w wyniku wprowadzenia większych dawek inokulum. Autorzy zwrócili również uwagę na istotną kwestię, jaką jest czas przebywania drożdży w fermentorze. W wyniku zwiększania dawki drożdży nastąpiło wyraźne skrócenie procesu fermentacji, a przez to i okresu obecności drożdży w tankofermentorze. Krótszy proces w przypadku większych dawek drożdży jest prawdopodobnie niewystarczający do pełnej konwersji α -acetomleczanu do diacetylu, a następnie do acetoiny i 2,3-butanodiolu. Nieznacznie odmienne wyniki badań laboratoryjnych i przemysłowych mogą wskazywać na wrażliwość komórek drożdży i ich macierzystych enzymów na ciśnienie hydrostatyczne, które panuje w tankofermentorach (wysokość fermentującej brzeczki wynosi ok. 15 m). Większa koncentracja inokulum powoduje proporcjonalnie mniejszy przyrost nowych komórek drożdżowych, co zostało potwierdzone w przemysłowej skali doświadczeń. Sytuacja taka przyczynia się do szybszego „starzenia” populacji drożdży, które charakteryzują się zarazem mniejszą aktywnością enzymów i spowolnionym tempem przemian biochemicznych. Ważne jest więc stosowanie świeżych, odpowiednich szczepów i pasażu drożdży szlachetnych, które skutecznie redukują ten związek pod koniec fermentacji [6, 10, 15].

Istotny wpływ mają także liczba komórek oraz temperatura fermentacji. Wzrost liczby komórek powoduje, że α -acetomleczan tworzy się szybciej i skuteczniej rozkłada do diacetylu, który może wówczas zostać wcześniej wyeliminowany. Przedwczesne usunięcie drożdży skutkuje rozkładem α -acetomleczanu do diacetylu, który nie w pełni zostanie zredukowany, co sprawia, że jego poziom w piwie może być wyższy [1]. Ze wzrostem temperatury fermentacji następuje zmniejszenie zawartości diacetylu

i 2,3-pentanodionu [19, 21]. Saerens i wsp. [25] wykazali, że wzrost temperatury z 12 do 15 °C spowodował zmniejszenie zawartości diacetylu o ok. 20 %. Sepelova i wsp. [26] prowadzili fermentację brzeczki w temp. 10 i 14 °C. W wyniku zwiększenia temperatury procesu uzyskali znaczne skrócenie czasu dojrzewania piwa.

Sposobem na uniknięcie nadmiaru diketonów jest zapobieganie akumulacji α -acetomleczanu w brzeczce podczas procesu fermentacji. Efekt ten można uzyskać przez dodanie bakteryjnej dekarboksylazy α -acetomleczanu do fermentującej brzeczki. Dekarboksylaza nie występuje u drożdży, ale jest wytwarzana m.in. przez niektóre bakterie z rodzaju *Enterobacter*, *Acetobacter* i *Streptococcus* [29]. Bakteryjna dekarboksylaza przeprowadza bezpośrednią konwersję α -acetomleczanu do acetoiny [3].

Preparatem zawierającym enzym α -acetodekarboksylazę jest Maturex L, który przyspiesza redukcję diacetylu. Preparat dodaje się zazwyczaj już po inokulacji drożdży. W wyniku jego działania zawartość diacetylu można utrzymać na niskim poziomie ($< 35 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$). W konsekwencji wyprodukowanie gotowego, dojrzałego piwa możliwe jest nawet w ciągu 10 dni [27]. Po zastosowaniu preparatu Maturex z *Lactobacillus casei* proces leżakowania można ograniczyć do 22 h, a w otrzymanym piwie zawartość diacetylu powinna być poniżej wyczuwalności sensorycznej [6].

Inną metodą zmniejszania zawartości diacetylu w gotowym produkcie jest stosowanie drożdży genetycznie zmodyfikowanych. Wprowadzenie do konwencjonalnych drożdży piwowarskich genu *Sc-ILV6* skutkuje redukcją zawartości diacetylu o ok. 65 % [5].

Podsumowanie

Po stwierdzeniu, że diacetyl i 2,3-pentanodion stały się produktami niepożądanymi w piwie, ich usuwanie jest jednym z głównych celów procesu dojrzewania piwa. Wytwarzanie diacetylu silnie łączy się z zapotrzebowaniem komórek drożdży na przyswajanie aminokwasu waliny. Przemiana wicynalnego diketonu w piwie jest skutkiem dekarboksylacji α -acetomleczanu do diacetylu, którego redukcja do 2,3-butanodiolu, składnika obojętnego dla zapachu piwa, jest przeprowadzana przez drożdże.

Proces redukcji diacetylu i 2,3-pentanodionu przez drożdże nie jest do końca poznany, ale w największym stopniu zależy od kondycji fizjologicznej drożdży, składu brzeczki piwnej, jak również temperatury procesu dojrzewania i pH piwa. Jednoznacznie można stwierdzić, że wzrost temperatury fermentacji przyczynia się do efektywnej redukcji wicynalnych diketonów, nawet w przypadku krótszego procesu, bez konieczności dodatkowego wydłużania okresu dojrzewania piwa celem maksymalnej przemiany diketonów. Zwiększona konwersja prekursorów do diacetylu przebiega z dużą wydajnością już od pierwszych dni fermentacji. Wtedy też występuje największe namnożenie nowych komórek drożdżowych z dużą aktywnością enzymatyczną.

Literatura

- [1] Annemuller G., Manger H.J.: *Gärung und Reifung des Bieres*. VLB, Berlin, Germany, 2009.
- [2] Bednarski W.: Aspekty bioenergetyczne fermentacji piwa w unitankach. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2000, 7, 32-34.
- [3] Bonciu C.A., Stoicescu A.: Research concerning the use of encapsulated Maturex for beer fermentation. *Annals Univ. Dunarea de Jos Galati*, 2007, 82-86.
- [4] Dekoninck T., Verbelen P., Delvaux F., van Mulders S., Delvaux F.: The importance of wort composition for yeast metabolism during accelerated brewery fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 2012, 3, 195-204.
- [5] Duong C., Strack L., Futschik M., Katou Y., Nakao Y., Fujimura T., Shirahige K., Kodama Y., Nevoigt E.: Identification of *Sc-type ILV6* as a target to reduce diacetyl formation in lager brewers' yeast. *Metabolic Engineering*, 2011, 10, 1016.
- [6] Dziuba E.: Rola drożdży w kształtowaniu cech sensorycznych piwa. *Mat. VI Szkoły Technologii Fermentacji nt. „Dokształcanie cech sensorycznych piwa”*, Szczyrk 2001, ss. 50-74.
- [7] Erten H., Tanguler H., Cakiroz H.: The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing. *J. Inst. Brew.*, 2007, 113, 75-79.
- [8] Eslinger H.: *Handbook of Brewing – Processes, Technology, Markets*. Wiley-VCH, Verlag, Germany, 2009, pp. 132, 717.
- [9] Gupta K., Jain A., Dhawan S.: Removal of diacetyl from beer by adsorbents and diacetyl reductase. *Biotechnol. Bioeng.*, 1979, 21, 649-657.
- [10] Hannemann W.: Reducing beer maturation time while retaining quality. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 2002, 39, 149-155.
- [11] Inoue T., Masuyama K., Yamamoto Y., Okada K.: Mechanism of diacetyl formation in beer. Part III. Mechanism of diacetyl formation. *Laboratorium Kirin Brewery*, 1968, 11, 17-23.
- [12] Kobayashi K., Kusaka K., Takahaszi T., Sato K.: Method for the simultaneous assai of diacetyl and acetoin in the presence of α -acetolactate: Application in determining the kinetic parameters for the decomposition of α -acetolactate. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 5, 502-507.
- [13] Kristoffer K., Gibson B.: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *J. Inst. Brew.*, 2013, 119, 86-97.
- [14] Kucharczyk K., Tuszyński T.: Effect of wort filling time on fermentation, maturation and acetaldehyde content in beer. *Czech J. Food Sci.*, 2015, 34, 1-6.
- [15] Kucharczyk K., Tuszyński T.: The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavor compounds of beer produced on an industrial scale. *J. Inst. Brew.*, 2015, 121, 349-355.
- [16] Kunze W.: *Technology Brewing and Malting*. VLB, Berlin, Germany, 1999, pp. 309-311.
- [17] Leszczyński P.: *Opis cech sensorycznych piwa, wersja 3.0*. Polskie Stowarzyszenie Piwowarów Domowych, Warszawa 2015, s. 20.
- [18] Lewis J., Young T.: *Piwowarstwo*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001.
- [19] Masschelein C.: The biochemistry of maturation. *J. Inst. Brew.*, 1986, 92, 213-219.
- [20] Nakatani K., Fukui N., Nagami K., Nishigaki M.: Kinetic analysis of ester formation during beer fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 1991, 4, 152-157.
- [21] Narzis L.: Fermentation and maturation – state of the art. *Brauwelt*, 1987, 127, 745-749.
- [22] Nguyen T., Viet Man L.: Using high pitching rate for improvement of yeast fermentation performance in high gravity brewing. *Int. Food Res. J.*, 2012, 16, 547-554.
- [23] Omura F.: Targeting of mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* Ilv5P to the cytosol and its effect on vicinal diketone formation in brewing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 78, 503-513.
- [24] Pires E., Teixeira J., Branyik T., Brandao T., Vicente A.: Continuous beer fermentation – diacetyl as a villain. *J. Inst. Brew.*, 2015, 121, 55-61.
- [25] Saerens S., Verbelen P., Vanbeneden N.: Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl. Genet. Molecular Biotechnol.*, 2008, 80, 1039-1051.
- [26] Sepelova G., Cvangroschova M., Smogrovicova D.: Temperature influence on fermentation speed and organoleptic beer properties. *Kvasny Prumysl*, 2004, 2, 41-42.

- [27] Solarek L., Cissowski J.: Mikrobiologiczne preparaty enzymatyczne „Novozymes A/S” w technologii piwowarstwa. *Mat. XI Szkoły Technologii Fermentacji nt. „Technologia i marketing piwa”*, Łódź 2006, ss. 77-96.
- [28] Wieczorek E.: Dwuacetyl w piwie i metody jego oznaczania. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1995, 11, 7-8.
- [29] Yamauchi Y., Okamoto T., Murayama H., Kejino K., Nagara A., Noguchi K.: Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreaktor. Balance of total diacetyl reduction and regeneration. *J. Biotechnol.*, 1995, 38, 109-116.

THE PRESENCE OF DIACETYL AND 2,3-PENTANODIONE IN BEER

S u m m a r y

During the process of alcoholic fermentation, the brewer's yeast synthesizes, except for ethanol and carbon dioxide, a broad spectrum of various by-products of metabolism and most of them are emitted to the environment. In different types of beer, more than 1000 components can be found including ca. 200 carbonyl compounds. The quantity and quality of products and indirect metabolites emitted from cells impact the organoleptic qualities of finished beer. Besides the components of hop, those compounds give it a specific and characteristic taste and aroma. Vicinal diketons are one of the groups of those compounds. They are important components of the taste and aroma of the young beer. In beer, two basic components from the group of diketons are present: diacetyl and 2,3-pentanodion. Their impact on the taste and aroma is generally negative; however, they are considered to be „determinants of beer maturity”. In higher concentrations, they give the beer a sweetish, impure and, sometimes, improper taste, and the aroma reminds that of butter. They are formed from the precursors produced by yeast during fermentation. At the next stage of fermentation, the beer is subject to a process of maturation the main purpose of which is to decrease the amount of vicinal diketons or to eliminate them. At this stage of the process, the diacetyl diffuses back to the cytoplasm of yeast cell and, next, is subject to reduction to acetoin as a result of the activity of diacetyl reductase enzyme. The process of conversion is regulated by the temperature and length of the maturation process with the purpose of producing beer of a proper taste and aroma.

The objective of the research study was to give an outline of formation mechanisms of vicinal diketons during fermentation of beer wort. Described is the meaning of diketons in the process of beer maturation since their appropriate quantity is considered as a determinant of completing this stage of the beer production process. Moreover, some selected technological parameters are depicted the optimization of which ensures that a low content of diacetyl and 2,3-pentanodion in a finished product can be achieved.

Key words: beer, fermentation, maturation, diacetyl, 2,3-pentanodion 