

Zur Entstehung und Analytik von Diacetyl, Pentandion-(2,3), Acetoin und Butandiol-(2,3) in Würze und Bier

ABHANDLUNG

zur Erlangung

der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

ANTON SCHERRER

dipl. Ing.-Agr. ETH

geboren am 8. September 1942

von Zell (Kanton Luzern)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. L. Ettliger, Referent

Dr. H. Pfenninger, Korreferent



ETH N. 4585 B

Meinen Eltern



Inhaltsübersicht

1	Problemstellung und Literaturübersicht	3	Ermittlung der Einflüsse von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin auf den Geruch und Geschmack des Bieres
11	Problemstellung	4	Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in Würze und Bier
12	Literaturübersicht	41	Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in ungehopfter und gehopfter Bierwürze
121	Vorkommen von Diacetyl, Acetoin, Pentandion-(2,3) und Butandiol-(2,3)	42	Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in Bier
122	Frage der Stoffwechselwege zur Bildung von Diacetyl, Acetoin, Pentandion-(2,3) und Butandiol-(2,3)	43	Die Bildung und Verminderung von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in Abhängigkeit von Gärführungen verschiedener Temperatur
1221	Diacetyl- und Acetoinbildung durch Bakterien	431	Laborgärung mit <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> bei 25°
1222	Die Diacetyl-, Acetoin-, Butandiol-(2,3)- und Pentandion-(2,3)-bildung durch Hefen	432	Haupt- und Nachgärung mit <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> in einer halbtechnischen Anlage
123	Übersicht über die herkömmlichen Diacetyl- und Acetoinbestimmungsmethoden	44	Einflüsse verschiedener Aminosäuren auf die Bildung von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin bei Hefen
2	Methoden	45	Die Abnahme von Diacetyl und Acetoin im Verlaufe der Gärung
21	Die gaschromatographische Analyse von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin	46	Die Bildung von Diacetyl und Acetoin durch Bakterien in Bier
211	Allgemeines	461	Das Wachstum von Laktobazillen und Pediokokken in Bier
212	Apparatives	462	Diacetyl- und Acetoinbildung durch Stämme der Gattungen <i>Lactobacillus</i> und <i>Pediococcus</i>
213	Trennsäule	5	Diskussion
214	Vorbereitung der Proben zur gaschromatographischen Analyse	6	Zusammenfassung
215	Operationsparameter	7	Literatur
216	Die qualitative Analyse		
217	Die quantitative Analyse		
22	Die Bestimmung von Butandiol-(2,3)		

1 Problemstellung und Literaturübersicht

11 Problemstellung

Der charakteristische Geruch und Geschmack ist für jedes alkoholische Getränk qualitätsbestimmend. Obwohl heute bereits über hundert Aromastoffe im Bier bekannt sind, lässt sich oft der Einfluss einzelner Bestandteile auf den Geruch und Geschmack, den «Flavor», kaum abschätzen. Gewisse Verbindungen wie Diacetyl (Butandion-(2,3)), Pentandion-(2,3) und Acetoin (3-Hydroxy-2-butanon, Acetylmethylcarbinol) verursachen in Konzentrationen über ihren Schwellenwerten einen durchdringenden Geruch und verleihen damit dem Bier einen starken «Off-Flavor» (*Palmand* 1969). Butandiol-(2,3) vermag erst über 500 mg/l das Bieraroma zu beeinflussen (*Drews* und Mitarbeiter 1967). Seit *Pasteur* (1876) wurden Biere mit butterartigem, süsslichem Charakter als «sarcinakrank» bezeichnet, bis *Shimwell* und *Kirkpatrick* (1939) zeigen konnten, dass Diacetyl, gebildet durch *Pediococcus cerevisiae*, die Bieraroma verderbende Komponente sei.

Wie man heute weiss, bilden nicht nur *Pediococcus cerevisiae*, sondern auch Hefen diese Substanzen als normale Stoffwechselnebenprodukte (*Gross* und *Werkmann* 1947, *Owades* und Mitarbeiter 1959, *Harrison* 1965).

In neuerer Zeit haben einige Autoren (*Christensen* und *Pederson* 1958, *Harris* und *Watson* 1960, *Eschenbecher* 1968) auch verschiedenen *Lactobacillus*-Arten, die sich in Bier vermehren können, die Fähigkeit zur Diacetyl- und Acetoinbildung zugesprochen.

Vorversuche haben ergeben, dass herkömmliche Methoden zur Bestimmung von Diacetyl in Bier der nötigen Spezifität ermangeln, indem auch Pentandion-(2,3) miterfasst wird. So war eine gaschromatographische Methode unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors auszuarbeiten, die auch quantitative Bestimmungen des in Würze und Bier auftretenden Diacetyls, Pentandions-(2,3) sowie des Acetoins gestattet. Die ausgearbeitete Methodik soll es auch erlauben, einen Einblick in die verschiedenen Stoffwechselwege zur Bildung von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin zu gewinnen.

12 Literaturübersicht

121 Vorkommen von Diacetyl, Acetoin, Pentandion-(2,3) und Butandiol-(2,3)

Diacetyl und Acetoin sind als recht bemerkenswerte Aromafaktoren in verschiedenen Lebensmitteln von Bedeutung. So werden sowohl Diacetyl als auch Acetoin u. a. in Kaffee, Kakao, Honig und Käse (*Schmalfuss* und *Barthmeyer* 1929) sowie Wein- und Obstessig (*Toth* 1941) angetroffen. Als Aromasubstanz in Butter ist Diacetyl schon seit den zwanziger Jahren bekannt, und man ist bis heute der Ansicht, dass es ihr wichtigster Aromabildner sei (*Schmalfuss* und *Barthmeyer* 1929, 1932, *Pette* 1949, *Krishnaswamy* und *Babel* 1951). Nach *Riberau-Gayon* und *Peynaud* (1958) ist Diacetyl auch von Bedeutung für das Aroma des Weines. *Peynaud* und *Lafon* (1951) haben

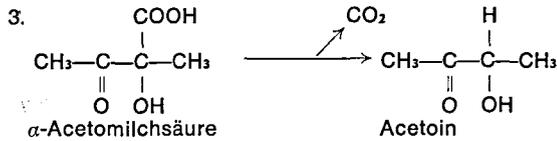
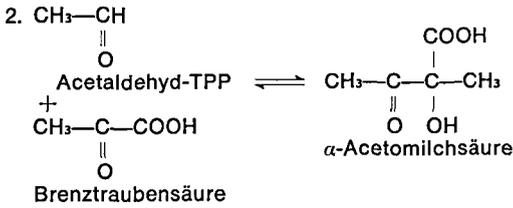
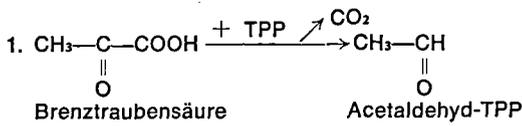
das Auftreten von Diacetyl und Acetoin in französischen Weinbränden verschiedenen Alters wie auch in verschiedenen Branntweinen untersucht. Obwohl die genannten Verbindungen ihrer Menge nach starken Schwankungen unterworfen sind, vertreten die Verfasser die Ansicht, dass der Gehalt an Diacetyl, Acetoin und Butandiol-(2,3) die zwischen den Getränken vorhandenen Typenunterschiede widerspiegelt. Im Vergleich zu Cognac enthält Armagnac in vermehrtem Masse Acetoin und Butandiol-(2,3), was auf die unterschiedliche Destillationsart zurückzuführen ist. Auch aromareicher Originalrum enthält diese Verbindungen in reichlicher Menge. In Whisky fanden die genannten Autoren überhaupt kein Diacetyl und auch das Acetoin war nur in geringstem Masse vertreten. *Salo* und *Suomalainen* (1957) verfolgten das Auftreten von Diacetyl in verschiedenen Spritsorten und -qualitäten und konnten feststellen, dass roher Sulfitspirit, Kartoffelsprit oder Gerstensprit recht bedeutende Mengen an Diacetyl (10–15 ppm) enthalten. Durch die Rektifikation kann das Diacetyl fast restlos entfernt werden. Daneben fanden *Ronkainen* und *Suomalainen* (1966) in Getreide- und Sulfitspiriten auch Pentandion-(2,3).

Auf den nachteiligen Einfluss des Diacetyls bezüglich des Bieraromas wurde bereits eingangs hingewiesen.

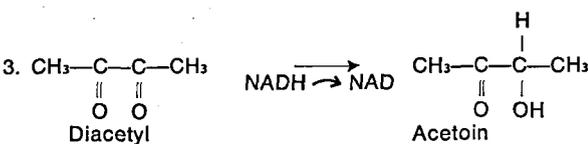
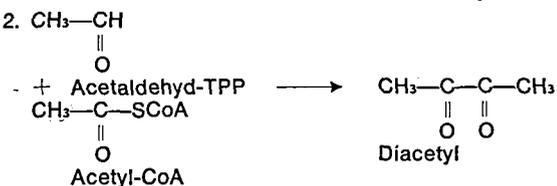
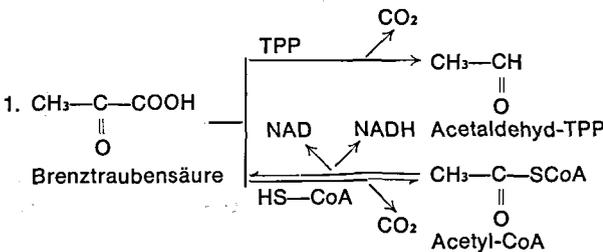
122 Frage der Stoffwechselwege zur Bildung von Diacetyl, Acetoin, Pentandion-(2,3) und Butandiol-(2,3)

1221 Diacetyl- und Acetoinbildung durch Bakterien
Nach *Silverman* und *Werkman* (1941) sowie *Lemoigne* und Mitarbeitern (1949) synthetisieren Bakterien Acetoin aus Brenztraubensäure. Durch Kondensation eines aus Brenztraubensäure entstandenen Acetaldehyd-Thiaminpyrophosphat-Komplexes mit einem Molekül Brenztraubensäure erklären *Juni* (1951) und *Mizuno* und *Jezeski* (1959) die Entstehung der α -Acetomilchsäure, die bereits 1947 durch *Watt* und *Krampitz* als Zwischenprodukt der Acetoin synthese gefunden wurde. *Krampitz* (1948) und *Juni* (1951) konnten auch zeigen, dass Bakterien, die Acetoin zu bilden vermögen, α -Acetomilchsäure dekarboxylieren.

Verschiedene Autoren stellten fest (*Juni* 1951, *Kreennan* und Mitarbeiter 1966, *Speckman* und *Collins* 1968), dass freier Acetaldehyd nicht zur Bildung von Acetoin durch Bakterien verwendet werden kann. Eine Oxydation des Acetoins zu Diacetyl, wie dies in Arbeiten von *Schmalfuss* und *Barthmeyer* (1928) und *van Niel* und Mitarbeiter (1929) sowie *Sebek* und *Randles* (1952) beschrieben wurde, liess sich durch andere Arbeiten nicht bestätigen. So konnte bei Milchsäurekulturen (*Michaëlian* und *Hammer* 1936, *Cox* 1945, *Pette* 1949), bei *Aerobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* (*Strecker* und *Harary* 1954), *Streptococcus diacetylactis* und *Leuconostoc citrovorum* (*Speckman* und *Collins* 1968) keine Fähigkeit zur Oxydation von Acetoin nachgewiesen werden. Somit lässt sich die Bildung von Acetoin durch Bakterien in den folgenden Reaktionsgleichungen zusammenfassen:



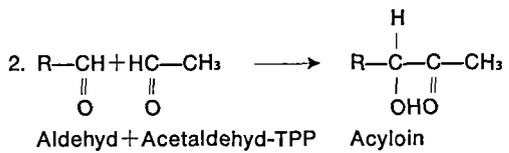
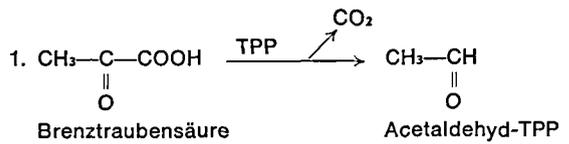
Nach *Speckman* und *Collins* (1968) sowie *Chuang* und *Collins* (1968) wird Diacetyl direkt durch Kondensation von Acetaldehyd-TPP mit Acetyl-CoA gebildet. Diese Autoren fanden auch bei zellfreien Extrakten eine Oxydation von NADH₂, was auf das Vorhandensein einer Diacetylreduktase hinweist. *Strecker* und *Harary* (1954) isolierten eine Diacetylreduktase aus *Staphylococcus aureus*, *Bavisotto* und Mitarbeiter (1954) aus *Aerobacter aerogenes*. Der durch *Speckman* und *Collins* (1968) sowie *Chuang* und *Collins* (1968) neu gefundene Stoffwechselweg zur Bildung von Diacetyl und Acetoin lässt sich wie folgt darstellen:



1222 Die Diacetyl-, Acetoin-, Butandiol-(2,3)- und Pentandion-(2,3)-bildung durch Hefen

Die Diacetyl- und Acetoinbildung durch Hefen: *Neuberg* und Mitarbeiter (1922, 1925) zeigten zum erstenmal, wie unter dem Einfluss von Hefe und auch zellfreiem Mazerationsaft zugesetzte Aldehyde mit dem bei der alkoholischen Gärung intermediär erzeugten Acetaldehyd-TPP zu optisch aktiven Körpern, den sogenannten Acyloinen, zusammentreten. Die von *Neuberg* und Mitarbeitern (1922) vorgeschlagene Acyloinkondensation wurde spä-

ter wiederholt bestätigt (*Gross* und *Werkman* 1947, *Neish* 1950, *Juni* 1952, *Holzer* und Mitarbeiter 1962, *Chuang* und *Collins* 1968). Sie lässt sich durch die folgenden Reaktionsgleichungen darstellen:



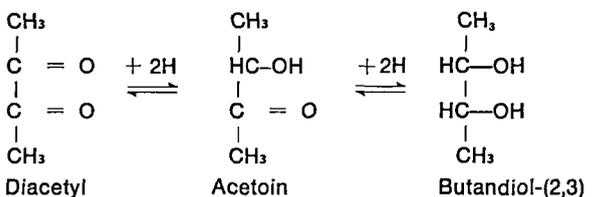
Einen zweiten Stoffwechselweg zur Bildung von Acetoin durch Hefen geben *Discherl* und *Höfermann* (1951) mit *Saccharomyces carlsbergensis* sowie *Owades* und Mitarbeiter (1959) an, indem nach ihren Befunden α -Acetolactat nicht nur ein Zwischenprodukt der Valinsynthese ist, sondern auch bei der Bildung von Acetoin auftritt: *Owades* und Mitarbeiter (1959) konnten eine Abhängigkeit der Diacetylbildung vom Valinangebot zeigen, da vorhandenes Valin seine Synthese und die von Acetoin und Diacetyl unterdrückt. Sie stellten fest, dass die Bildung von α -Acetolactat unter «feed-back-Kontrolle» des Endproduktes Valin steht. Nach *Inoue* und Mitarbeitern (1968) wird Diacetyl durch spontane oxydative Decarboxylierung aus α -Acetolactat, das durch die Hefezelle in das Gärmedium ausgeschieden wird, gebildet, sofern ein rH-Wert über 10 vorhanden ist. Acetoin wird nach diesen Autoren nicht zu Diacetyl oxydiert. Wie *Portno* (1966) feststellte, entsteht Diacetyl nicht unter dem Einfluss des Sauerstoffs aus Acetoin. Die durch den Luftsauerstoff hervorgerufene vermehrte Diacetylbildung resultiert aus der Umsteuerung vom Gärungs- zum Atmungsstoffwechsel.

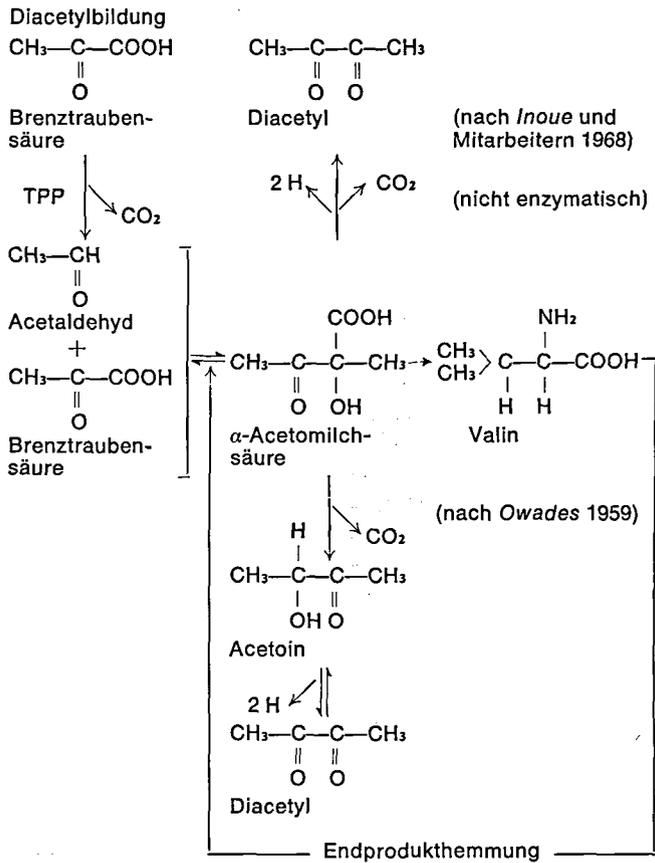
Nach *Discherl* und *Höfermann* (1951) und *Owades* und Mitarbeitern (1959) sowie *Inoue* und Mitarbeitern (1968), lässt sich somit die Bildung von Acetoin und Diacetyl in Abhängigkeit der Valinsynthese darstellen.

Formelmässige Darstellung siehe folgende Seite.

Chuang und *Collins* (1968) konnten jedoch keine Decarboxylierung von α -Acetolactat durch Hefen feststellen. Zur Bildung von Diacetyl fanden sie für Hefen den gleichen Stoffwechselweg wie für Bakterien, wobei Acetaldehyd-TPP mit Acetyl-CoA kondensiert.

Die Bildung von Butandiol-(2,3) durch Hefen: Gärende Hefe kann nach *Neuberg* und *Kobel* (1925) sowie *Suomalainen* und *Jännes* (1946) Diacetyl über Acetoin zu Butandiol-(2,3) reduzieren.





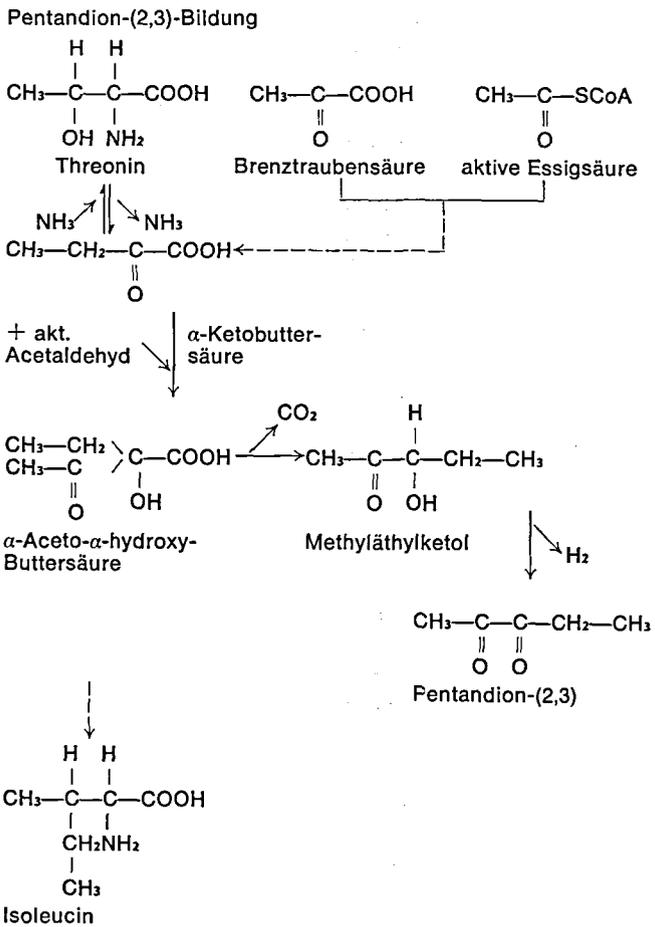
Die Bildung von Pentandion-(2,3) durch Hefen: *Harrison* und Mitarbeiter konnten 1965 erstmals zeigen, dass die Hefen Pentandion-(2,3) bilden. Ein möglicher Stoffwechselweg wurde von *Drews* und Mitarbeitern (1967) vorgeschlagen, nach dem Pentandion-(2,3) als Stoffwechselnebenprodukt bei der Synthese von Isoleucin anfallen würde. Ausgangsprodukte wären die Brenztraubensäure und die aktive Essigsäure, die über verschiedene Zwischenstufen α -Ketobuttersäure ergeben. Andererseits kann die α -Ketobuttersäure durch Desaminierung aus Threonin entstehen. α -Ketobuttersäure ergibt dann zusammen mit aktivem Acetaldehyd α -Aceto- α -hydroxy-Buttersäure, aus der durch Dekarboxylierung der Methyläthylketol entsteht. Methyläthylketol wurde 1966 durch *Suomalainen* und *Linnahalm*e bei Brauerei- und Bäckerhefe gefunden. Durch Oxydation des Methyläthylketols wurde Pentandion-(2,3) anfallen. Die Bildung von Pentandion-(2,3) ist nebenstehend (unten) dargestellt.

123 Übersicht über die herkömmlichen Diacetyl- und Acetoinbestimmungsmethoden

Die Bildung von Acetylmethylcarbinol (Acetoin) stellt ein wichtiges Merkmal für die systematische Zuordnung von Bakterien dar. Die bekannteste Bestimmungsmethode beruht auf der Voges-Proskauer-Reaktion, wobei gebildetes Acetoin nach Zugabe von Kalilauge anhand der nach einigen Stunden auftretenden Rosafluoreszenz erkannt werden kann (*Harden* und *Walpole* 1905). *O'Meara* (1931) modifizierte diese Methode, indem er einer zweitägigen Kultur eine Messerspitze Kreatin und 5 ml 40%ige Natronlauge zugab. Nach 2- bis 5minütigem Schütteln stellt sich bei vorhandenem Acetoin, das zu Diacetyl oxydiert wird, eine Rosafärbung ein. *Owades* und Mitarbeiter (1960) haben dann mittels der Voges-Proskauer-Reaktion eine quantitative Bestimmungsmethode für Diacetyl ausgearbeitet, indem sie die Reaktion mit α -Naphthol und alkalischem Kreatin ausführten. Die anschließende Bestimmung erfolgte kolorimetrisch.

Andere analytische Verfahren von *West* und Mitarbeitern (1952), *Kielhöfer* und *Wüdig* (1960), *Canales* und *Martinez* (1962), *Brenner* und Mitarbeitern (1963) angewandt, beruhen auf der Umwandlung des Diacetyls in das Nickel- oder Eisensalz des Dimethylglyoxims. Zur Bestimmung von Acetoin muss dieses erst mit Ferrichlorid zu Diacetyl oxydiert werden. Die spektralphotometrische Messung des Eisen- bzw. Nickeldimethylglyoxims erlaubt die quantitative Bestimmung. *Owades* und *Jacovac* entwickelten 1963 eine für Bieranalysen geeignete Mikromethode, bei der das Diacetyl mit CO_2 ausgetrieben und mit Hydroxylammoniumchlorid nach der Tschugaeff-Reaktion in Dimethylglyoxim umgewandelt wird. Mit Eisen-II-Sulfat ergibt sich der photometrisch günstig erfassbare rote Farbkomplex des Eisendimethylglyoxims. Diese Methode wurde 1966 durch *Drews* und Mitarbeiter apparativ vereinfacht und für Serienbestimmungen angewandt.

Gjertsen und Mitarbeiter (1964) modifizierten eine von *Hetzel* (1959) für Butter ausgearbeitete Diacetylbestim-



mungsmethode und benützten sie zur Analyse von Bier. Sie beruht auf der Reaktion zwischen Diacetyl und o-Phenylendiamin unter Bildung von 2,3-Dimethylchinoxalin, welches ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Bereich aufweist. *Kockova-Kratochvilova* und Mitarbeiterinnen (1956) stellten Diacetyl mit einer polarographischen Methode nach *Pleticha* (1951) fest, indem sie dem Bierdestillat eine zehnfach konzentrierte Kolthoff'sche Pufferlösung zugaben, um anschliessend bei einer Spannung von 4 Volt die Bestimmung vorzunehmen. Eigene Versuche haben ergeben, dass Diacetyl und Pentandion-(2,3) das gleiche Halbstufenpotential aufweisen und somit polarographisch nur gemeinsam erfasst werden können.

Ausser der Mikromethode von *Owades* und *Jacovacs* (1963), bedürfen alle angeführten quantitativen Analyseverfahren für die Anwendung auf Bier einer Destillation, bei der vorhandenes Diacetyl übergetrieben wird. In Zusammenarbeit mit andern Laboratorien konnten in letzter Zeit Ringanalysen durchgeführt und die verschiedenen Diacetylbestimmungsmethoden verglichen werden. Aus den Ergebnissen war ersichtlich, dass sämtliche Methoden, die einer Destillation bedürfen, zu hohe Werte für

das vorhandene Diacetyl ergeben. Ein Nachteil beruht auch in der mangelhaften Spezifität der herkömmlichen Methoden. Eigene Versuche haben ergeben, dass Pentandion-(2,3), das stets neben Diacetyl in Bier zu finden ist, bei der spektralphotometrischen Messung des roten Eisendimethylglyoximkomplexes miterfasst wird. *Harrison* und Mitarbeiter (1965) konnten zeigen, dass Elektroneneinfangdetektoren die Verbindungen organischer Art spezifisch und hochempfindlich anzeigen, die konjugierte Carbonylgruppen oder Disulfide enthalten. Andere Inhaltsstoffe wie Alkohole, Ester und Ketone werden auch in vergleichsweise ansehnlichen Mengen kaum erfasst. *Drews* und Mitarbeiter (1967, 1968) sowie *Latimer* und Mitarbeiter (1969) wiesen diese Diketone ebenfalls mit Hilfe von Elektroneneinfangdetektoren nach. Nach der Ausarbeitung der unter 21 beschriebenen gaschromatographischen Methode konnten im Rahmen von kollektiven Untersuchungen des Analytikomitees der «European Brewery Convention» (EBC) mit drei Laboratorien aus England zusammen Versuche zur Bestimmung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) durchgeführt werden. Diese Ergebnisse stimmten sehr gut überein.

2 Methoden

21 Die gaschromatographische Analyse von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin

211 Allgemeines

Diacetyl und Pentandion-(2,3) treten in normalen Bieren in Mengen um 0,01–0,2 ppm auf. Im Vergleich dazu fallen Fuselöle in 100- bis 500facher und der Äthanol gar in 30 000- bis 60 000facher Menge an. Das Erfassen dieser beiden Diketone ist deshalb mit Hilfe der Gasverteilungschromatographie, z. B. unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors, problematisch ohne ihre vorhergehende Anreicherung und Abtrennung. Im besten Falle würden Diacetyl und Pentandion-(2,3) im Chromatogramm als «Reiter» auf den Alkohol-Peaks erscheinen. Eine exakte quantitative Auswertung wäre dabei ausgeschlossen. Elektroneneinfangdetektoren erfassen im Gegensatz dazu elektronenabsorbierende Substanzen bis in den Picogrammbereich. Selbst relativ grosse Alkoholmengen, wie dies bei Bieren der Fall ist, werden nur sehr schwach angezeigt. Durch das selektive Erfassen von Halogenverbindungen, Mehrfachhalogenverbindungen (Pestizide) und Diketonen der Form $R-CO-CO-R'$ oder Disulfidgruppen der Form $R-CS-SC-R'$ eignen sich Elektroneneinfangdetektoren besonders für bestimmte Analysen der Lebensmitteluntersuchung und -forschung.

Im Hinblick auf Serienuntersuchungen und die Anwendung in der Praxis war eine schnelle Methode zur getrennten quantitativen Erfassung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) anzustreben.

212 Apparatives

Für die gaschromatographischen Untersuchungen wurde das Forschungsgerät Beckman-GC 4 benutzt.

Prinzip: Die Einheit basiert auf einem Ionisationsdetektor, der über einen Helium-Entladebrenner verfügt. Bei Detektoren dieser Art ergibt sich ein grosser Prozentsatz an Einfangempfindlichen, niederenergetischen Elektronen.

Bau und Funktionsweise: Wie Abb. 1 zeigt, ist der Elektroneneinfangdetektor aus zwei zylindrischen Kammern (1, 2), die achsial nebeneinander angeordnet und durch einen engen Durchgang miteinander verbunden sind, zusammengesetzt. In der Entladekammer, welche aus rostfreiem Stahl besteht, wird durch einen Heliumstrom eine Entladung verursacht. Dadurch entstehen positive Ionen, angeregte Atome, Photonen und niederenergetische Elektronen. Einige Elektronen entweichen in die keramische Detektionskammer (2) und erreichen den Kollektor (10). Sie verursachen einen bleibenden Strom, der über einen äusseren Kreislauf gemessen wird (11). Eintretende Komponenten der Proben mit elektronenabsorbierenden Eigenschaften reduzieren die Elektronenverteilung und damit auch die Grundstromstufe. Die Stromverminderung ist eine nicht-lineare Funktion der Konzentration der interessierenden Komponenten. Die Entladekammer ist mit einem Einlass (3) versehen, die Detektionskammer mit einem Einlass (4) und einem Auslass (6). Ein kontinuierlicher Heliumstrom tritt in die Einlasspforte (3) der Entladekammer (1) hinein und fliesst an den Entladeelektroden vorbei durch die enge Verbindungsöffnung in die Detektionskammer (2). Elektronen und Photonen, welche von der Entladung herrühren, folgen diesem gleichen Weg. Die Detektionskammer-Einlasspforte ist mit dem Kolonnenausfluss (4) verbunden. Unmittelbar vor der Einlasspforte wird CO_2 zum Kolon-

nenausfluss zugegeben (5). Der allgemeine Effekt des CO_2 besteht in einem unelastischen Zusammenstoß mit den Elektronen, so dass ihre Eigenbewegung herabgesetzt wird, wodurch sie besser einfangbar werden. Hält man alle andern Operationsparameter konstant, erhöht ein geeigneter CO_2 -Durchfluss den Grundstrom. Ferner wird durch CO_2 die Selektivität verstärkt. Das CO_2 in der Detektionskammer (2) absorbiert auch zurückbleibende, entfernt ultraviolette Photonen, die Moleküle der Probe ionisieren könnten. Beim Eintritt in die Detektionskammer (2) passiert der Kolonnenausfluss den Kollektor (10), eine Drahtgitter-Platinelektrode. Zwischen der Entladekammer und dem Kollektor (10) befindet sich das Polarisationsgitter (9). Es ist einer Platinelektrode ähnlich. Die Ausgangspforte am oberen Ende der Detektionskammer (6) führt alle Abgase aus beiden Kammern ab.

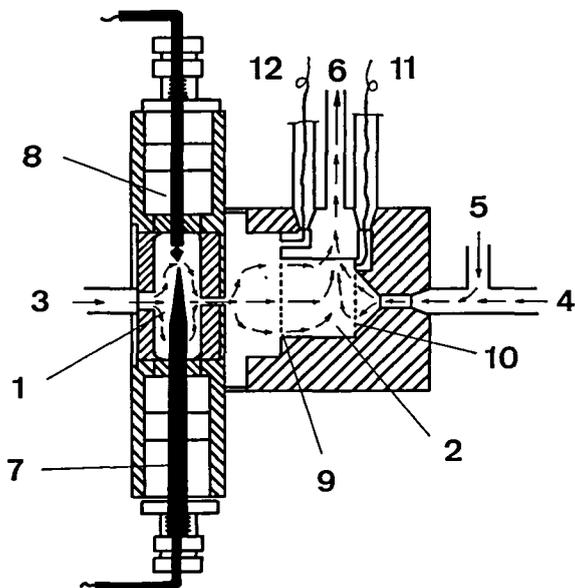


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Elektroneneinfangdetektors. 1 Entladekammer; 2 Detektionskammer; 3 Entladehelium-Einlass; 4 Kolonnenausfluss (Heliumträgergas, Probenkomponenten); 5 Kohlensäureeinlass; 6 Auspuff; 7 Anode-Entladeelektrode; 8 Kathode-Entladeelektrode; 9 Polarisationsgitter; 10 Kollektor; 11 Grundstrom; 12 Polarisationsspannung.

213 Trennsäule

Für alle analytischen Untersuchungen kam eine aus V_2A -Stahl bestehende Säule mit 3 mm Innendurchmesser und 3,2 Metern Länge zum Einsatz. Vor dem Einfüllen des Trennmateri­als wurde die Kolonne mit folgendem Verfahren gereinigt: Spülen mit Seifenwasser, destilliertem Wasser, Aceton, Methanol, Toluol, Benzol. Anschliessend wurde die Säule an einen Stickstoffstrom angeschlossen und ausgeheizt.

Als flüssige Phase wurde Igepal (Nonylphenoxypolyäthylenoxyäthanol) verwendet. Das Trägermaterial für die flüssige Phase war nicht-sauer gewaschene, getrocknete, kalzinierte, ausgesiebte Diatomeenerde (Chromosorb W-NAW, 80–100 mesh). 2,5 g Igepal wurden in 100 ml Pentan aufgenommen und mit 50 g Chromosorb (80–100 mesh) durch sorgfältiges Rühren vermischt. Anschliessend liess man das Lösungsmittel bei Zimmertem-

peratur von der nun imprägnierten stationären Phase verdampfen. Das Einbringen der stationären Phase in die Kolonne erfolgte unter Vakuum, wobei vorerst der Kolonnenausfluss mit Glaswatte versehen wurde. Ein mechanischer Vibrator gewährleistete dabei ein homogenes Einfüllen des feinkörnigen Materials. Vor der Verwendung musste die gepackte Säule während zwei Tagen unter Heliumdurchfluss bei 90°C konditioniert werden. Die Untersuchungsmuster liessen sich mit einer Mikroinjektionsspritze in die mit einer Silikonmembrane gasdicht verschlossene Injektionsstelle einführen. Um ein sofortiges Verdampfen des Analysengutes zu gewährleisten, wurde die Temperatur des Injektionsblockes um 70°C über der Temperatur der Trennsäule gehalten. Mit Mikroinjektionsspritzen normaler Ausführung war jeweils bei aufeinanderfolgenden Einspritzungen ein Mitschleppen von Spuren vorhergehender Proben nicht zu vermeiden, selbst wenn der Spritzeninhalt hundertmal mit einem reinsten Lösungsmittel erneuert wurde. Deshalb kam für alle Untersuchungen eine «Precision-Sampling»-Mikroinjektionsspritze ($0,05\text{--}2\ \mu\text{l}$) mit Durchlaufspülmöglichkeit zur Anwendung.

214 Vorbereitung der Proben zur gaschromatographischen Analyse

Vorversuche zeigten, dass durch das direkte Einspritzen von wässrigen Lösungen oder deren Dampfphasen die Empfindlichkeit des Detektors stark beeinträchtigt wird. Dies machte folgende Vorbehandlung des Probematerials erforderlich:

Prinzip: Diacetyl und Pentandion-(2,3) werden mittels eines Kohlendioxidstromes in eine durch einen Kryomaten gekühlte Vorlage getrieben, die Methylalkohol enthält. Die beiden Diketone werden dabei quantitativ zurückgehalten.

Apparate und Geräte: Apparatur nach Owades und Jacovac (1963) – Wasserbad, auf 100°C beheizbar – Kryomat, bis minus 35°C einstellbar – Reagenzgläser, graduiert bis 10 ml, mit Schliffstopfen als Vorlage.

Durchführung: 20 ml von Kohlensäure nicht befreites Bier in das Austreib-Glas pipettieren – Vorlage mit 3 ml gereinigten Methylalkohols beschicken und an das Austreib-Glas anschliessen – Gaseinleitungsrohr mit der Kohlensäuredruckflasche verbinden – Gasstrom auf 150 ml CO_2/min einstellen – Austreib-Glas in ein Wasserbad von 70°C , die Vorlage in den Kryomaten von minus 35°C eintauchen – Kohlendioxid während 100 min durchströmen lassen – Vorlage abnehmen – Das in die Vorlage tauchende Gaseinleitungsrohr mit Methylalkohol in die Vorlage hinein abspülen – Flüssigkeitsvolumen der Vorlage mit Methylalkohol genau auf 4 ml einstellen.

Oxydation des Acetoin

Prinzip: Das Acetoin wird mit Eisen(III)-Chlorid in Anwesenheit von Eisen(II)-Sulfat zu Diacetyl oxydiert und letzteres gemäss dem oben angegebenen Verfahren zur gaschromatographischen Bestimmung vorbereitet.

Reagenzien zur Oxydation des Acetoin: 5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\ \text{H}_2\text{O}$ in 15 ml einer 50%igen Lösung von $\text{FeCl}_3 \cdot 6\ \text{H}_2\text{O}$ auflösen – Einstellen einer 27prozentigen Lösung.

Durchführung der Oxydation: 20 ml von Kohlensäure nicht befreites Bier mit Wasser auf 200 ml verdünnen – davon 20 ml in das Austreib-Glas pipettieren – 2,8 ml 27%ige Schwefelsäure und 5,6 ml Oxydierlösung zusetzen – wie bei der Vorbereitung zur Diacetylbestimmung 3 ml Methylalkohol in die Vorlage pipettieren – Austreib-Glas und Vorlage verbinden – Zwecks Oxydation des Acetoin zu Diacetyl Austreib-Glas in ein kochendes Wasserbad stellen. Die Vorlage wird dabei durch den Kryomaten auf minus 30 °C gekühlt – das System unter CO₂-Gegendruck setzen, damit die Probeflüssigkeit nicht zurücksteigen kann – 60 Minuten reagieren lassen – nach beendeter Oxydation auf 70 °C abkühlen und nach dem oben angegebenen Verfahren während 100 min Kohlensäure durchströmen lassen.

215 Operationsparameter

Die zur Bestimmung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) ermittelten Operationsparameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

216 Die qualitative Analyse

Wie Abbildung 2 zeigt, gelingt mit den unter 215 angegebenen Operationsparametern die Trennung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) einwandfrei. Das Lösungsmittel Methylalkohol stört dabei nicht.

Abbildung 3 gibt eine Bieranalyse wieder. Aus dem Chromatogramm geht hervor, dass Äthylalkohol nur schwach angezeigt wird. Er wirkt sich unter den gegebenen Analysenbedingungen nicht störend auf die Trennung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) aus.

217 Die quantitative Analyse

Um Stoffwechsel- und Serienuntersuchungen durchführen zu können, war eine reproduzierbare quantitative Analyse auszuarbeiten. Die Detektoranzeige ist eine nicht lineare Funktion der Verminderung des Elektro-

nenstromes, verursacht durch eintretende elektronenabsorbierende Substanzen. Vorversuche zeigten denn auch, dass die Flächenanzeige für zunehmende Mengen an Diacetyl bzw. Pentandion-(2,3) über grössere Bereiche nicht proportional ist. Auch erwies sich die Anzeigeempfindlichkeit des Detektors als stark abhängig von der zur Optimierung des Gerätes einzustellenden Polarisationsspannung. Deshalb wäre, um reproduzierbare Resultate

Tab. 1 Operationsparameter bei der gaschromatographischen Trennung von Äthanol, Diacetyl und Pentandion-(2,3) auf einer analytischen Säule mit Igepal als Trennflüssigkeit.

Trennsäule (V ₂ A)		
Länge	cm	320
Durchmesser	mm	3
Trennstufenzahl		936
Trennfüllung		
Trägermaterial (Chromosorb W-NAW)	mesh	80–100
Trennflüssigkeit (Igepal)	%	5
Trägergas (Helium)		
Durchfluss	ml/min	30
Gasdruck	atü	2,7
Trenntemperatur		
Kolonne	°C	50
Kolonneneinlass	°C	120
Kolonnenauslass	°C	150
Detektor		
(Elektroneneinfangdetektor mit Entladebrenner)		
Detektortemperatur	°C	180
Grundstrom	m A	4
Polarisationsspannung	0–1000 Einh. (2,7 bis –47,3 V)	580–640
Helium (Entladestrom)	ml/min	60
CO ₂	ml/min	1–3
Elektrometer-Schreiber-Kombination		
Empfindlichkeit		
Elektrometer	A	5 · 10 ⁻¹⁰ –0,5 · 10 ⁻⁸
Einstellung		1 · 10 ⁻⁴ –1 · 10 ³
Registrierung (Philips-Schreiber)	mV	1
Papiervorschub	mm/min	5,33
Probenmenge	µl	1

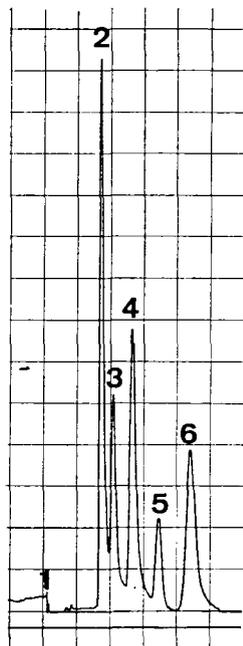
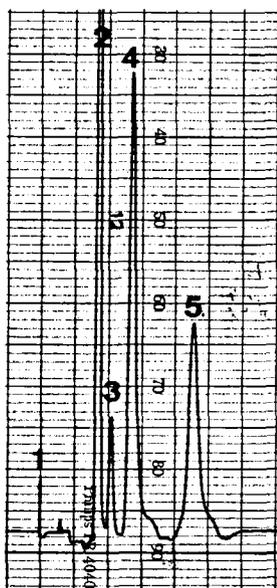
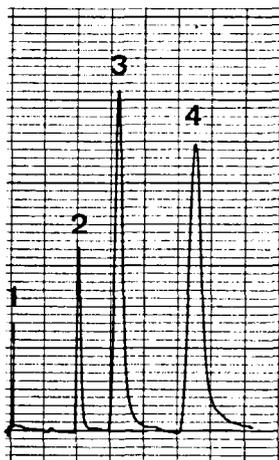


Abb. 2 (Bild links) Gaschromatographische Trennung von Diacetyl und Pentandion-(2,3). 1 Start; 2 Methylalkohol; 3 Diacetyl; 4 Pentandion-(2,3).

Abb. 3 (Bild Mitte) Diacetyl und Pentandion-(2,3) in Bier. 1 Start; 2 Methylalkohol (Lösungsmittel); 3 Äthylalkohol; 4 Diacetyl; 5 Pentandion-(2,3).

Abb. 4 (Bild rechts) Analyse einer gärenden Würze, wobei als Standard Chloroform verwendet wurde. 1 Start; 2 Methylalkohol (Lösungsmittel); 3 Äthylalkohol; 4 Diacetyl; 5 Chloroform; 6 Pentandion-(2,3).

zu erhalten, nach jeder Analyse unmittelbar eine Vergleichsprobe mit abgemessenen Eichlösungen durchzuführen. Auch ist die Reproduzierbarkeit der Spritzmenge im Mikroliterbereich problematisch. Diese Schwierigkeiten lassen sich durch die Verwendung eines geeigneten Standards beseitigen. Dabei bestand das Problem darin, eine Substanz zu finden, die elektronenabsorbierende Eigenschaften besitzt, einen nicht zu hohen Siedepunkt aufweist und deren Peak sich im Chromatogramm nicht mit denjenigen der zu untersuchenden Verbindungen überlappt. Abbildung 4 zeigt, dass Chloroform als Standard die letztgenannte Anforderung erfüllt.

Erstellen der Eichkurven

Injiziert man Lösungen mit gleichen Konzentrationen an Chloroform, Diacetyl und Pentandion-(2,3), wird durch den Schreiber ersteres den beiden letzteren gegenüber etwas schwächer registriert. Theoretische Überlegungen ergaben, dass ein festes Verhältnis der Peakflächen für beliebige Konzentrationen an Diacetyl bzw. Pentandion-(2,3) und für eine konstant gehaltene Menge an Chloroform bestehen muss. Dabei dürften geringe Abweichungen in der Probedosierung oder Apparateschwankungen nur unwesentlich ins Gewicht fallen.

In Abbildung 5 sind die chromatographisch erhaltenen Werte aus Tabelle 2 in den Eichkurven für Diacetyl und Pentandion-(2,3) graphisch dargestellt. Diese Eichkurven dürfen nur verwendet werden, sofern das Probenmaterial nach 214 vorbereitet und die unter 215 angeführten Operationsparameter eingehalten werden. Der Standard (Chloroform, 0,02 mg/ml) muss sehr genau in einer Menge von 1 ml zu den 4 ml der Vorlage zugegeben werden.

Wird Acetoin nach der Oxydation als Diacetyl bestimmt (vgl. 214), kann der Acetoingehalt des Bieres nach der folgenden Formel berechnet werden:

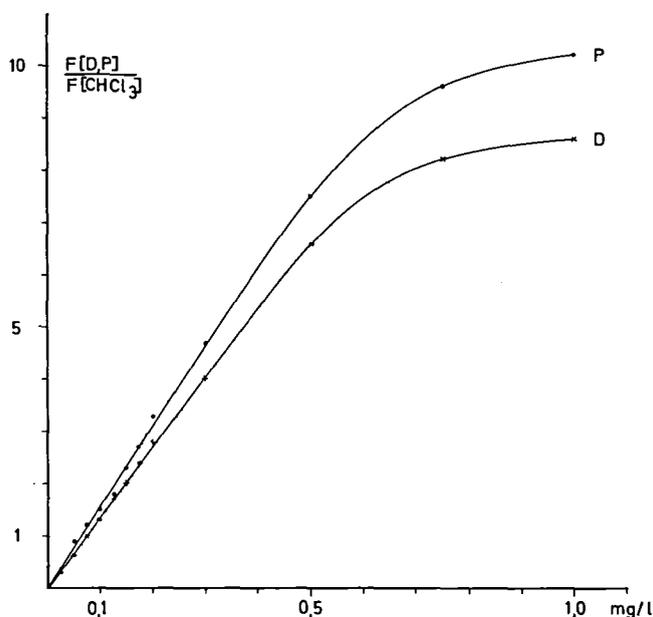


Abb. 5 Diacetyl und Pentandion-(2,3) in Relation der Peakflächen zu einem konstant gehaltenen Standard.

$$\text{Acetoin (mg/l)} = 1,023 \cdot 10 (a-b/10)$$

a = Gesamtgehalt an Diacetyl nach der Oxydation des Acetoin (aus 2 ml Bier)

b = effektiv vorhandenes Diacetyl (aus 20 ml Bier)

Molekulargewicht des Acetoin = 88, des Diacetyls = 86, woraus sich der Faktor von 1,0234 ergibt.

Tab. 2 Diacetyl und Pentandion-(2,3) in zunehmenden Konzentrationen als Verhältnis der Peakflächen zu der eines gegebenen Standards (Chloroform 0,02 mg/ml)

D, P mg/l	Peakhöhe (cm)			Peakfläche (cm ²)					Fläche (D, P) Fläche (S)	
	D	P	S	D	P	S	effektiv D*	P*	D	P
Bier	0,6	0,1	1,7	0,11	0,03	0,37	—	—	—	—
0,025	1,1	0,5	1,6	0,22	0,14	0,35	0,11	0,11	0,3	0,3
0,050	1,8	1,2	1,7	0,34	0,36	0,37	0,23	0,33	0,6	0,9
0,075	2,5	1,6	1,7	0,48	0,47	0,37	0,37	0,44	1,0	1,2
0,10	2,9	1,9	1,6	0,56	0,55	0,35	0,45	0,52	1,3	1,5
0,125	4,3	2,7	1,9	0,81	0,77	0,41	0,70	0,74	1,7	1,8
0,15	4,5	3,0	1,7	0,85	0,88	0,37	0,74	0,85	2,0	2,3
0,175	5,0	3,3	1,6	0,95	0,97	0,35	0,84	0,94	2,4	2,7
0,20	4,8	3,5	1,3	0,92	0,99	0,29	0,81	0,96	2,8	3,3
0,30	7,4	5,3	1,5	1,41	1,53	0,32	1,30	1,50	4,0	4,7
0,50	9,0	8,4	1,5	1,71	2,43	0,32	1,60	2,40	6,6	7,5
0,75	15,0	11,1	1,5	2,81	3,23	0,33	2,70	3,20	8,2	9,6
1,0	17,4	11,3	1,7	3,31	3,83	0,37	3,20	3,80	8,6	10,2

D Diacetyl

P Pentandion-(2,3)

S Standard (Chloroform)

Peakfläche = Peakhöhe · Peakbreite auf halber Höhe

Peakbreite auf halber Höhe: D = 0,19 cm

P = 0,29 cm

S = 0,22 cm

* abzüglich Flächenanteil von Diacetyl und Pentandion-(2,3) aus Bier

22 Die Bestimmung von Butandiol-(2,3)

Zur Bestimmung von Butandiol-(2,3) wurde die Methode nach Drews und Mitarbeitern (1967) modifiziert.

Prinzip: Butandiol-(2,3) wird mit Perjodsäure zu zwei Molekülen Acetaldehyd aufgespalten.

Reagenzien: 0,05 ml Perjodsäure (10,696 g NaJO₄ + 50 ml n H₂SO₄ in 1 Liter gelöst und filtriert); 27 %ige Natriumacetatlösung (270 g wasserfreies Natriumacetat in 1 Liter gelöst und filtriert); 10 %ige Piperidinlösung (10 ml Piperidin auf 100 ml aufgefüllt); 2 %ige Nitroprussidnatriumlösung (2 g Nitroprussidnatrium auf 100 ml aufgefüllt). Diese Lösung ist nicht länger als 2 Tage haltbar.

Durchführung: 20 ml entkohlensäurtes Bier werden in einen 100-ml-Kurzhalskolben pipettiert. Der Kolben wird mit einer Widmer-Kolonne mit Liebigkühler verbunden. Nach vorsichtigem Erhitzen werden 6 ml überdestilliert. Nach kurzem Abkühlen kann der Rundkolben mit den restlichen 14 ml an eine Wasserdampfdestillationsapparatur angeschlossen werden (500 ml Dampftrichter, 200 ml Vorlagekolben). Der durchgetriebene überhitzte Wasserdampf reisst das Butandiol-(2,3) innerhalb einer Stunde vollständig mit in den Vorlage-Messkolben, wo sich fast 200 ml Butandiol-(2,3)-Wassergemisch ansammeln. Der Rundkolben muss zusätzlich erhitzt werden, um ein vorzeitiges Kondensieren des Wasserdampfes zu vermeiden. Das Destillat wird bis auf die Marke aufgefüllt und gut umgeschüttelt. Anschliessend werden 5 ml davon zum Farbansatz entnommen.

Farbentwicklung und Messung: In einem 25-ml-Messzylinder mit Glasstopfen gibt man 5 ml des Butandiol-(2,3)-Wasser-Gemisches, 5 ml der Natriumacetatlösung und 5 ml der Perjodsäure. (Nach jedem Zusatz umschütteln!) Man lässt genau 2 Minuten reagieren und gibt nun in schneller Folge 2,5 ml Nitroprussidnatrium und 2,5 ml Piperidinlösung zu, schüttelt kurz und entnimmt zur Messung in einer 1-cm-Küvette die notwendige Menge. Die Nulllösung muss vor der Messung mit destilliertem Wasser abgeglichen werden. Das Farbmaximum ist bereits nach 45 Sekunden erreicht. Gemessen wird die Extinktion mit dem höchsten Ausschlag bei 560 nm. Die Reagenzien werden schnell zupipettiert.

Erstellen der Eichkurve: Wegen der Eigenfärbung der alkalischen Nitroprussidnatriumlösung beginnt die Eichkurve nicht im Nullpunkt, sondern bei einer Extinktion von 0,062. Zum Erstellen der Eichkurve wurden Verdünnungen von reinstem Butandiol-(2,3) der Firma Fluka Buchs verwendet. Die Verdünnungen wurden entspre-

chend der beschriebenen Methode gewählt, so dass sich der Butandiol-(2,3)-Gehalt der Bierproben direkt durch die erhaltene Extinktion in mg/l an der Eichkurve ablesen lässt (Abb. 6).

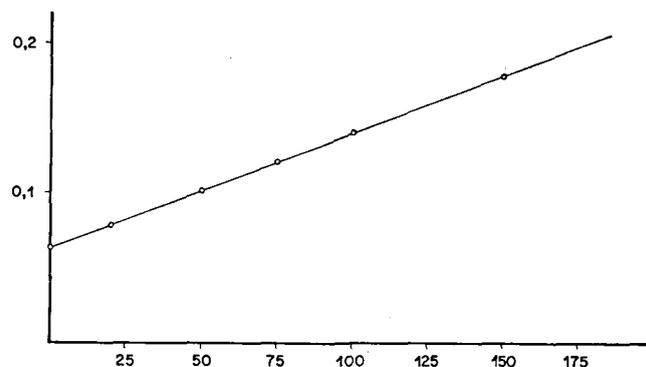


Abb. 6 Eichkurve zur Ermittlung des Gehaltes an Butandiol-(2,3) aus Bier (Wellenlänge 560 nm, Abzisse mg/l, Ordinate Extinktion).

3 Ermittlung der Einflüsse von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin auf den Geruch und Geschmack des Bieres

Zur Ermittlung der Einflüsse von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin auf den Geruch und Geschmack des Bieres war eine Methode der Sinnenprüfung anzuwenden. Die Methode musste sich zur Beantwortung der Frage eignen, ob zwischen den vorgelegten Proben ein signifikanter qualitätsbestimmender Unterschied bestehe.

Vorgehen: Nach der Dreiecksmethode (Triangle-Test) (Daepf 1967) setzte man den Kostern jeweils drei Proben helles Lagerbier vor, von denen zwei identisch waren. Als Nullprobe kam bei der Dreiecksmethode ein helles Lagerbier mit sehr niedrigen Gehalten an Diacetyl (0,01 mg/l), Pentandion-(2,3) (0,005 mg/l) und Acetoin (1,1 mg/l) zum Einsatz. Als Testmuster wurden dem gleichen Bier bestimmte Konzentrationen von Diacetyl, Pentandion-(2,3) oder Acetoin zudosiert.

Die Degustatoren hatten drei Fragen zu beantworten:

- Welches sind die identischen Proben?
- Welches ist die qualitativ bessere?
- Wie äussern sich die Unterschiede geruchlich und geschmacklich?

Die Auswertung der Degustationsbefunde erfolgte nach dem χ^2 -Test. Die Angaben *, **, *** bedeuten statistisch gesicherte Befunde, wobei * höchstens 5, ** 1 und *** 0,1 Zufallsergebnisse auf 100 Einzelurteile angeben.

In Tabelle 3 sind die Degustationsbefunde zusammengefasst.

Tabelle 3 zeigt, dass Diacetyl schon in Konzentrationen um 0,07 mg/l mit 95 %iger Sicherheit von der Bier-Nullprobe, die 0,01 mg/l Diacetyl enthielt, unterschieden werden kann. Ab 0,1 mg/l ergibt sich eine mit 99,9 % gesicherte Aussage, wobei das zudosierte Diacetyl unangenehm durch seinen butterartigen Geruch und süßlichen Geschmack hervortrat. Bei einem Diacetylgehalt von 0,2 mg/l ist helles Lagerbier bereits als verdorben zu be-

urteilen. Weit weniger stark wirken sich Pentandion-(2,3) oder gar Acetoin auf den Geruch und Geschmack des Bieres aus. Eine signifikante Veränderung des Flavors wird durch Pentandion-(2,3) erst bei einer Konzentration von 1,5 mg/l erreicht, wobei ebenfalls ein leicht butterartiger Geschmack festgestellt wurde. Acetoin ergibt ab 30 mg/l leichte geruchliche und geschmackliche Veränderungen. Eine signifikante negative Beeinflussung des Aromas durch Acetoin ist jedoch erst ab 100 mg/l durch einen fruchtigen, esterartigen Geruch feststellbar, chlorid extrahiert.

Tab. 3 Einfluss von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin auf den Geruch und Geschmack des Bieres (Dreiecksmethode).

Bier-Probe	Degustatoren	richtige Reihenfolge der Proben herausgefunden	Probe mit Zusatz als solche erkannt und als schlechter beurteilt	Beurteilung des Einflusses auf den Geruch und Geschmack
Diacetyl mg/l				
0,04	8	4	2	
0,07	6	5*	5*	schwach verändert
0,10	14	13***	11***	butterartig
0,13	14	11***	11***	butterartig
0,20	8	8***	8***	süßlich stark butterartig süßlich
Pentandion-(2,3) mg/l				
0,50	8	5	4	
1,00	11	7*	6	
1,50	6	5*	5*	leicht fruchtig
2,00	7	5*	5*	butterartig
Acetoin mg/l				
5	6	3	3	
10	7	3	3	
15	11	4	4	
30	11	7*	6	
50	11	7*	6	
100	11	9**	8**	fruchtig, Ester

*, **, *** = Signifikanz nach dem χ^2 -Test

4 Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in Würze und Bier

41 Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in ungehopfter und gehopfter Bierwürze

Ungehopfte und gehopfte Bierwürze, sowie Hallertauer Doldenhopfen und dessen methylenchloridlöslicher Extrakt wurden vergleichend auf ihre Gehalte an Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin untersucht.

Proben: 1 Liter ungehopfte Bierwürze (12prozentig) – 1 Liter ungehopfte Bierwürze (12prozentig) + 2 g Hallertauer Doldenhopfen – 1 Liter Wasser + 2 g Hallertauer Doldenhopfen – 1 Liter Wasser + methylenchloridlöslicher Extrakt aus 2 g Hallertauer Doldenhopfen. – Kochzeit: 70 Minuten für alle Proben. – Gewinnung des Hopfenextrakts: 2 g Hallertauer Doldenhopfen wurden während 10 Stunden in einer Soxhlet-Apparatur mit Methylenchlorid extrahiert.

Tab. 4 Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in ungehopfter und gehopfter Würze, dem eingesetzten Hopfen und dessen methylenchloridlöslichen Extrakt.

Probe	Diacetyl mg/l	Pentandion-(2,3) mg/l	Acetoin mg/l
un-gehopfte Würze	0,014	0,000	0,40
gehopfte Würze (2 g/l)	0,035	0,005	0,50
Hopfen (2 g/l) in Wasser	0,025	0,005	0,06
Hopfenextrakt (2 g/l) in Wasser	0,005	<0,001	0,07

Die aus den gaschromatographischen Analysen ermittelten Gehalte an Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin sind in der Tab. 4 zusammengefasst. Aus ihr ist ersichtlich, dass der Hauptteil des Diacetyls und sämtliches Pentandion-(2,3) aus dem Doldenhopfen stammt. Pentandion-(2,3) ist in ungehopfter Würze nicht nachweisbar. Der Hauptanteil des Acetoin stammt aus ungehopfter Würze. Im methylenchloridlöslichen Extrakt sind nur kleinste Gehalte an Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin nachweisbar. Gehopfte Bierwürzen enthalten bis 0,15 mg/l Diacetyl und bis 1,5 mg/l Acetoin. Pentandion-

(2,3) konnte jeweils nur in Spuren bis 0,01 mg/l festgestellt werden.

Die Abb. 7 veranschaulicht das Analyseergebnis einer Diacetylbestimmung von gehopfter Würze. Die Acetoinbestimmung wurde bei geringerer Empfindlichkeit vorgenommen (Abb. 8). Die Unterschiede sind aus dem mitgeführten Standard, der in gleichen Konzentrationen zudosiert wurde, erkenntlich.

42 Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in Bier

Zur Klärung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- bzw. Acetoingehalt und dem Biertyp bestehe, wurden sämtliche Biere aus vier Schweizer Brauereien und zwei Biere aus einer fünften in dieser Hinsicht untersucht. Auch gelangten aus speziell enzymreichem Malz hergestellte Diätbier und ein mit *Saccharomyces diastaticus* hochvergorenes Bier zur Untersuchung. Ferner konnten Biere analysiert werden, die mit einem grossen Anteil an Rohfrucht (Gerste und Mais) unter Zusatz von proteolyti-

Tab. 5 Die Gehalte einiger Schweizer Biere an Diacetyl, Acetoin, Pentandion-(2,3) und dem Reduktionsprodukt von Pentandion-(2,3).

Brauerei	Biertyp	Diacetyl mg/l	Acetoin mg/l	Pentandion-(2,3) mg/l	Redukt. Prod. von Pentandion-(2,3) mg/l
1	Lager Hell	0,030	3,0	0,01	0,11
	Spezial Hell	0,015	2,5	0,01	0,19
	Lager Dunkel	0,025	2,7	0,02	0,22
	Spezial Dunkel	0,020	1,8	0,02	0,14
	Stark Hell	0,020	1,1	0,02	0,10
2	Lager Hell	0,010	1,1	0,00	0,12
	Spezial Hell	0,015	0,9	0,01	0,08
	Lager Dunkel	0,015	1,4	0,01	0,09
	Spezial Dunkel	0,015	1,2	0,02	0,08
	Stark Hell	0,015	1,4	0,02	0,21
3	Lager Hell	0,025	1,4	0,02	0,11
	Alkoholfrei	0,025	0,6	0,01	0,05
	Lager Hell	0,04	4,1	0,03	
	Spezial Hell	0,06	4,0	0,04	
	Spezial Dunkel	0,04	4,1	0,03	
4	Lager Hell	0,008	0,8	0,01	
	Spezial Hell	0,010	0,8	0,01	
	Lager Dunkel	0,015	0,8	0,01	
	Spezial Dunkel	0,010	0,8	0,01	
5	Lager Hell	0,012	0,7	0,01	
	Stark Hell	0,06	4,0	0,03	
	Spezial Hell	0,36*	8,4	0,25	

Versuchsbrauerei	Biertyp	Diacetyl mg/l	Pentandion-(2,3) mg/l
Halbtechnisch	Diätbier	0,06	0,04
	Bier mit <i>Saccharomyces diastaticus</i> vergoren	0,05	0,04
	Biere gebraut mit hohen Rohfruchtanteilen an Gerste und Mais	0,04	0,04
		0,08	0,06
		0,03	0,02
Grosstechnisch	Biere «kaltgehopft»	0,03	0,02
	(Zusatz der vorisomierten Bitterstoffe nach der Gärung)	0,03	0,01
		0,04	0,02
		0,02	0,02

* Diacetylkonzentration verursacht einen starken «Off-Flavor».

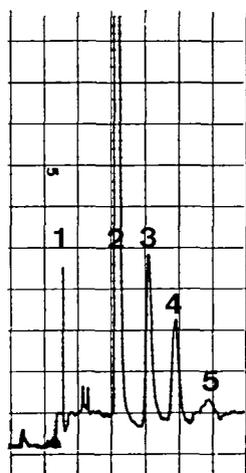


Abb. 7

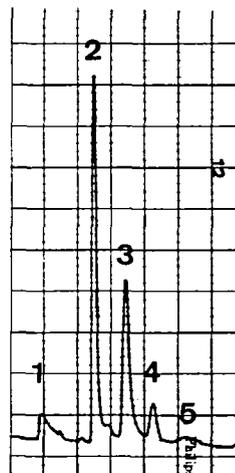


Abb. 8

Gaschromatische Bestimmung von: Abb. 7 Diacetyl und Pentandion-(2,3) in Bierwürze. Abb. 8 Acetoin (als Diacetyl) in Bierwürze; 1 Start; 2 Methylalkohol; 3 Diacetyl; 4 Standard (Chloroform); 5 Pentandion-(2,3).

schen und amylolytischen Enzymen in halbtechnischem Masstab gebraut wurden. Auch wurde der Diacetyl- und Pentandion-(2,3)-gehalt in grosstechnischem Masstab hergestellter Biere, die man erst nach der Gärung mit vorisomerisiertem Bitterstoff «kalthopfte», geprüft.

Wie aus Tab. 5 ersichtlich ist, besteht kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Biertypen und den entsprechenden Gehalten an Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin. Vielmehr scheint sich ein Unterschied zwischen den Betrieben abzuzeichnen, indem alle Biere der Brauerei 3 höhere Gehalte an Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin aufweisen als die der Brauereien 1, 2 und 4. Möglicherweise hängt dies mit einer ungenügenden Nachgärung zusammen. Es ist allerdings zu sagen, dass Diacetyl auch bei Brauerei 3 bei allen Proben in Mengen, die noch beträchtlich unterhalb der eindeutig wahrnehmbaren Konzentration liegen, vorhanden ist. Die Abbildungen 9 und 10 stellen typische Chromatogramme von Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoinbestimmungen einer Bierprobe dar. In Abbildung 9 wurden Diacetylgehalte um 0,04 mg/l und Pentandion-(2,3)gehalte um 0,01 mg/l aus einem hellen Lagerbier festgestellt. Abbildung 10 veranschaulicht das Ergebnis der mit der gleichen Probe durchgeführten Acetoinbestimmung.

Das helle Spezialbier der Brauerei 5 wies einen weit über der tolerierbaren Grenze von 0,1 mg/l liegenden Diacetylgehalt auf (vgl. Abb. 11). Acetoin und Pentandion-(2,3) scheinen in Bier überhaupt nicht in Konzentrationen aufzutreten, die zu einem «Off-Flavor» führen könnten (vgl. auch 3). Die im halbtechnischen Masstab hergestellten Diätbiere oder mit grossen Rohfruchtanteilen unter Enzymzusatz eingebrauten wie auch «kaltgehopften» Biere ergaben keine abnormal hohen Diacetylgehalte. Selbst ein versuchsweise mit *Saccharomyces diastaticus* hochvergorenes Bier wies normale Diacetyl- und Pentandion-(2,3)gehalte auf.

Bestimmte man Acetoin nach der Oxydation mit Eisen-III-Chlorid gaschromatographisch als Diacetyl (vgl. Abb. 10), konnte auch Pentandion-(2,3) in höheren Konzentrationen ermittelt werden. Es ist anzunehmen, dass Eisen-III-Chlorid Methyläthylketol zu Pentandion-(2,3) oxydiert. Das Reduktionsprodukt von Pentandion-(2,3) trat in den untersuchten Bierproben in Konzentrationen zwischen 0,08 und 0,22 mg/l auf.

43 Die Bildung und Verminderung von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in Abhängigkeit von Gärführungen verschiedener Temperatur

Die Temperatur ist bei der Gärführung ein äusserst wichtiger Faktor. So werden durch Warmgärungen Bedingungen geschaffen, die zu unerwünscht hohen Gehalten an Aromakomponenten wie an höheren Alkoholen führen (Drews und Riemann 1967, Äyräpää 1970). Auch findet man in der neueren Literatur (Lewis 1968) die weitverbreitete Ansicht bestätigt, dass durch warme Gärführungen Biere mit erhöhten Gehalten an Diacetyl entstehen.

Zur Abklärung der Frage, wieweit die Gärtemperatur einen Einfluss auf die Höhe des Diacetylgehaltes des Bieres ausübt, wurde mit der gleichen Würze je eine Gärung im Labormasstab bei 25 °C und eine halbtechnische Gärung bei 8,5 °C durchgeführt.

431 Laborgärung mit *Saccharomyces carlsbergensis* bei 25 °C

Vorzucht. Hefestamm: *Saccharomyces carlsbergensis* Stamm G 77 – Substrat: Gehopfte Würze 11,7prozentig – Zeit: 3 Tage – Temperatur: 25 °C – Gefäss: 500-ml-Erlenmeyerkolben mit Gärverschluss.

Anzucht. Impfmenge: je 5,08 · 10⁶ Zellen / 100 ml. – Substrat: für jede Probe 100 ml gehopfte Würze. – Gefäss: 150-ml-Erlenmeyerkolben mit Gärverschluss. – Temperatur: 25 °C.

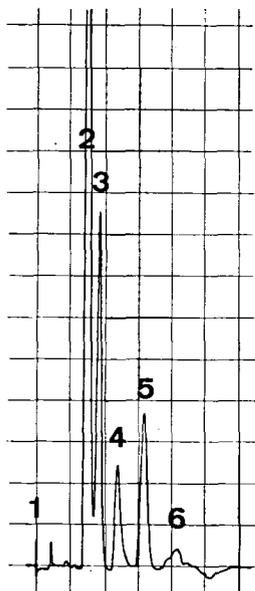


Abb. 9

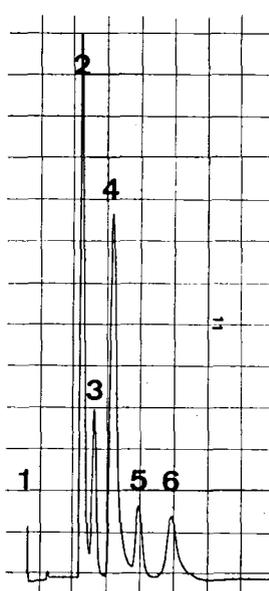


Abb. 10

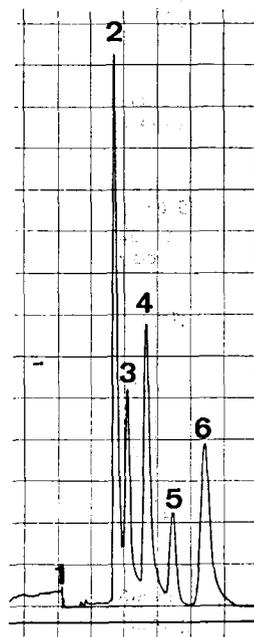


Abb. 11

Gaschromatographische Bestimmungen von:

Abb. 9 Diacetyl und Pentandion-(2,3) in hellem Lagerbier.

Abb. 10 Acetoin (als Diacetyl) in hellem Lagerbier.

Abb. 11 Diacetyl und Pentandion-(2,3) in verdorbenem hellem Spezialbier. Man beachte die im Vergleich zu hellem Lagerbier (Abb. 9) deutlich höheren Gehalte an beiden Diketonen. – 1. Start; 2. Methylalkohol; 3. Aethylalkohol; 4. Diacetyl; 5. Standard (Chloroform); 6. Pentandion-(2,3).

Analysen: Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoinbestimmungen nach 214 bis 217. — Extraktbestimmung: refraktometrisch. (Der wirkliche Extrakt lässt sich aus einer Korrekturtabelle herauslesen.) — Alkoholbestimmung: Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Destillates.

Die Analysenergebnisse für den Extrakt-, den Diacetyl-, Pentandion-(2,3)-, Acetoin- und Alkoholgehalt nach verschiedenen Gärzeiten sind in der Tab. 6 zusammengefasst und in Abb. 12 graphisch dargestellt. Die einzelnen Werte stellen jeweils das Mittel aus Doppelbestimmungen dar.

Aus Tabelle 6 und Abbildung 12 ist ersichtlich, daß bei einer Gärtemperatur von 25 °C die höchsten Gehalte an Diacetyl (0,46 mg/l), Pentandion-(2,3) (0,28 mg/l) und Acetoin (6,4 mg/l) nach 24 Stunden erreicht waren. Im Verlaufe der weiteren Gärung war eine Verminderung der drei Substanzen feststellbar. Eine erneute Zunahme des Acetoin nach 86 Stunden konnte in späteren Versuchen (s. 44) nicht festgestellt werden. Auch Diacetyl war am Ende der Gärung in einer Konzentration von 0,01 mg/l nur noch weit unterhalb der geruchlich und geschmacklich wahrnehmbaren Grenze vorhanden. Diacetyl-, Pentandion-(2,3) und Acetoin stellen somit transitorische Gärungsprodukte dar, die bis zum Schlusse der Gärung praktisch verschwinden.

Tab. 6 Extraktabnahme, Diacetyl-, Pentandion-(2,3)-, Acetoin- und Alkoholbildung im Verlaufe einer Laborgärung bei 25 °C.

Gärzeit in Stunden	Extrakt %	Diacetyl mg/l	Pentandion mg/l	Acetoin mg/l	Alkohol %	pH
0	11,76	0,06	0,02	0,65		5,0
6	11,51	0,07	0,04	0,97		5,0
12	11,05	0,08	0,08	3,12		
15	10,74	0,26	0,16	5,75		4,9
24	9,42	0,46	0,28	6,40		4,8
32,5	8,37	0,35	0,22	4,05		4,6
39	7,17	0,26	0,16	2,94		4,5
47,5	6,70					4,5
56	6,48	0,17	0,13	2,70	2,20	4,4
63	5,60	0,07	0,11	1,63		4,4
71,5	4,95	0,06	0,06			
81,5	4,00					
86	3,60	0,05	0,02	2,90		4,4
94,5	2,99	0,02	0,03	2,90		
104	2,60	0,02	0,03	1,60		4,4
113	2,35	0,02	0,03	1,00		4,4
132,5	2,18	0,01	0,02	0,90	3,90	4,4
168	2,07	0,01	0,01	0,75	4,04	4,4

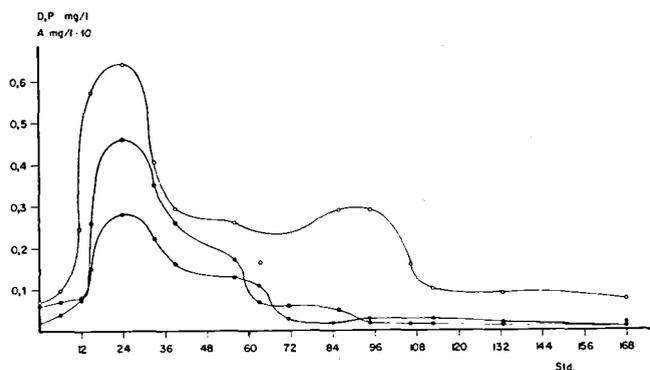


Abb. 12 Acetoin- (oberste Kurve), Diacetyl- (mittlere Kurve) und Pentandion-(2,3)-bildung (unterste Kurve) in Funktion der Extraktabnahme bei einer Gärtemperatur von 25 °C. Die angegebene Würze enthielt $5,08 \cdot 10^5$ Zellen/ml.

432 Haupt- und Nachgärung mit *Saccharomyces carlsbergensis* in einer halbtechnischen Anlage

Substrat: Anstellwürze (11,5prozentig). — Impfmenge: 1 Liter dickbreiige Hefe pro 100 Liter Würze. — Anlage: Pilot-Brauerei der Versuchsstation Schweizerischer Brauereien (Pfenninger und Mitarbeiter 1970).

Hauptgärung:	Zeit	Temperatur (°C)
	0 – 48 Std.	6 – 8,5
	48 – 168 Std.	8,5
	168 – 200 Std.	8,5 – 6,5

Transfer des Bieres vom Gär- in den Lagertank (Schlauchen) nach 200 Stunden

Nachgärung:	3 Wochen	6,5 – 4
	3 – 6 Wochen	4 – 2

Tab. 7 und Abb. 13 veranschaulichen eine der Praxis entsprechende, normal geführte Gärung im halbtechnischen Massstab, wobei die Extraktabnahme sowie die Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoingehalte in Funktion der Zeit dargestellt sind. Die grössten Gehalte an Diacetyl (0,32 mg/l) und Pentandion-(2,3) (0,12 mg/l) traten erst nach 47 Stunden auf. Die Acetoinbildung setzte schneller ein. Die höchsten Konzentrationen an Acetoin (7,2 mg/l) wurden jedoch erst nach 56 Stunden erreicht. Die Verminderung erfolgte etwas langsamer als bei Diacetyl und Pentandion-(2,3). Während das Diacetyl beim Gärversuch von 25 °C (vgl. 431) bereits nach 132 1/2 Stunden auf sehr geringe Konzentrationen (0,01 mg/l) ver-

Tab. 7 Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoingehalte während der Haupt- und Nachgärung in einer halbtechnischen Anlage.

Stunden	Extrakt %	Diacetyl mg/l	Pentandion-(2,3) mg/l	Acetoin mg/l
0	11,51	0,04	—	0,8
5		0,05	0,017	2,2
10		0,05	0,02	3,2
24	11,20	0,06	0,03	5,0
32		0,11	0,03	5,8
47	10,61	0,32	0,12	7,0
56		0,21	—	7,2
72	9,5	0,20	0,12	6,5
119	7,5	0,18	0,14	3,8
165	7,0	0,16	0,16	2,4
217	6,6	0,19	0,17	2,5
338	5,9	0,18	0,15	2,7
500	5,43	0,14	0,11	1,7
792	4,59	0,05	0,03	1,1

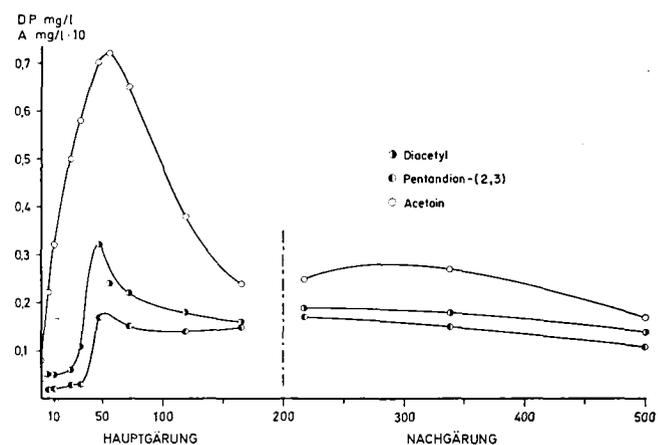


Abb. 13 Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoingehalte in Funktion der Zeit. (Die Gärung wurde im halbtechnischen Massstab bei 8,5 °C durchgeführt.)

mindert wurde, waren bei dem im halbertechnischen Massstab durchgeführten Gärversuch Diacetylgehalte unterhalb den organoleptisch feststellbaren Konzentrationen (s. 3) erst nach 792 Stunden erreicht.

Aus den beiden unter 43 angeführten Versuchen geht hervor, dass zur Verminderung von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin auf die erwünscht kleinen Gehalte bei tieferen Temperaturen längere Gärzeiten erforderlich sind als bei höheren.

44 Einflüsse verschiedener Aminosäuren auf die Bildung von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin bei Hefen

Wie schon in der Literaturübersicht unter 122 erwähnt, ist nach *Owades* und Mitarbeitern (1959) die Diacetylbildung bei Hefen vom Valinangebot abhängig, indem vorhandenes Valin durch Endprodukthemmung auf die α -Acetolactatsynthetase wirkt und damit die Bildung von α -Acetolactat, Acetoin und Diacetyl unterdrückt. Inzwischen konnte durch *Inoue* und Mitarbeiter (1968) sowie *Chuang* und *Collins* (1968) gezeigt werden, dass Acetoin bei Hefen nicht durch Dekarboxylierung von α -Acetolactat anfällt. Dieser Befund konnte auch durch den im folgenden beschriebenen Versuch bestätigt werden. Der Bildungsmechanismus von Isoleucin aus Threonin ist bekannt. Der folgende Versuch sollte auch zeigen, ob diese beiden Aminosäuren einen direkten Einfluss auf die Bildung von Pentandion-(2,3) ausüben.

Substrat: Gehopfte Würze (11,8 %) – Impfmenge: $5,04 \cdot 10^5$ Zellen (in 100 ml gehopfter Bierwürze) – Hefestamm: *Saccharomyces carlsbergensis* G 77 – Gärtemperatur: 25 °C – Zudosierte Aminosäuren: je 250 mg/l oder 400 mg/l L-Valin, L-Threonin oder L-Isoleucin – Gärgefäße: 150-ml-Erlenmeyerkolben mit Gärverschluss.

Analysen. Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoinbestimmungen nach 21. – Extraktbestimmungen: refraktometrisch. (Der wirkliche Extrakt lässt sich aus einer Korrekturtabelle herauslesen.) Alkoholbestimmung: Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Destillates.

In den Tab. 8 und 9 sowie Abb. 14, 15 und 16 sind die Gehalte an Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in Funktion der Zeit dargestellt.

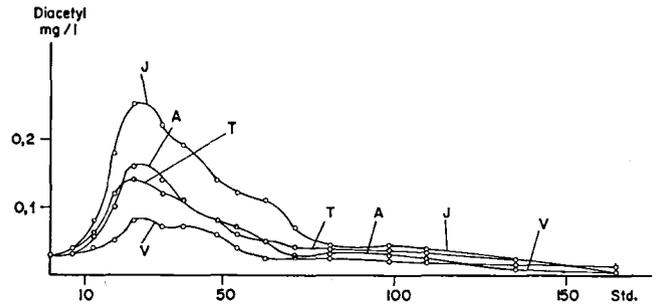


Abb. 14 Diacetylgehalte im Verlaufe einer Gärung bei 25 °C unter Zusatz verschiedener Aminosäuren (je 250 ppm). A Vergleich; J Isoleucin; V Valin; T Threonin.

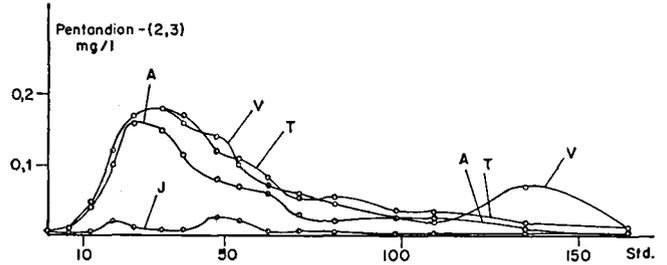


Abb. 15 Pentandion-(2,3)-Gehalte im Verlaufe einer Gärung bei 25 °C unter Zusatz verschiedener Aminosäuren (je 250 ppm). A Vergleich; J Isoleucin; V Valin; T Threonin.

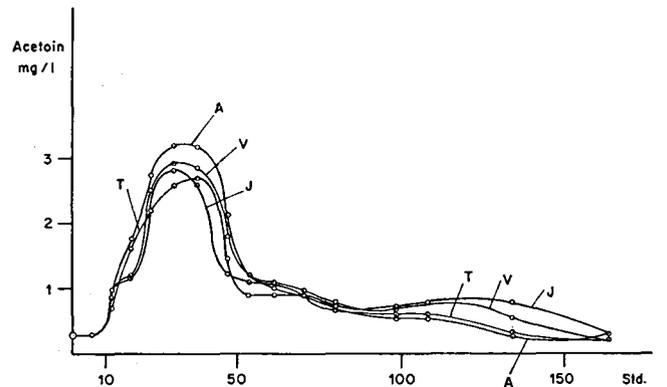


Abb. 16 Acetoingehalte im Verlaufe einer Gärung bei 25 °C unter Zusatz verschiedener Aminosäuren (je 250 ppm). A Vergleich; J Isoleucin; V Valin; T Threonin.

Tab. 8 Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoinbildung im Verlaufe einer Gärung bei 25 °C unter Zusatz von je 250 mg/l Isoleucin, Valin und Threonin zu einer 11,8%igen gehopften Bierwürze.

Stunden	Diacetyl mg/l			Pentandion-(2,3) mg/l			Acetoin mg/l			Extrakt* %	pH*			
	Vergleich	Isoleucin	Valin	Threonin	Vergleich	Isoleucin	Valin	Threonin	Vergleich			Isoleucin	Valin	Threonin
0	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,28	0,28	0,28	0,28	11,7	5
6	0,03	0,04	0,03	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,27	0,28	0,29	0,27	11,7	5
12	0,06	0,08	0,04	0,06	0,04	0,01	0,04	0,05	0,98	0,70	0,94	0,84	11,4	4,9
18	0,10	0,18	0,05	0,12	0,10	0,02	0,12	0,13	1,75	1,52	1,19	1,14	10,6	4,8
24	0,16	0,25	0,08	0,14	0,16	0,01	0,17	0,17	2,74	2,20	2,52	2,38	9,5	4,6
32	0,14	0,22	0,07	0,12	0,15	0,01	0,18	0,18	3,20	2,58	2,93	2,82	7,9	4,6
38	0,11	0,19	0,07	0,11	0,12	0,01	0,16	0,17	3,13	2,61	2,85	2,60	7,8	4,5
47 1/2	0,08	0,14	0,06	0,08	0,08	0,03	0,14	0,12	2,10	1,46	1,80	1,20	6,45	4,5
54	0,07	0,12	0,04	0,06	0,07	0,02	0,10	0,11	1,20	0,90	1,20	1,10	5,7	4,4
62	0,05	0,11	0,025	0,05	0,06	0,01	0,06	0,08	1,00	0,90	1,10	1,10	5,25	4,4
71	0,03	0,07	0,025	0,04	0,03	0,01	0,06	0,06	—	0,90	0,97	0,90	4,85	4,4
81	0,03	0,04	0,025	0,04	0,02	0,01	0,04	0,06	0,68	0,70	0,75	0,66	4,30	4,4
98	0,03	0,04	0,020	0,03	0,03	0,01	0,03	0,04	0,56	0,67	0,60	0,55	3,50	4,4
109	0,025	0,035	0,020	0,03	0,03	0,01	0,02	0,03	0,53	0,77	0,54	0,60	3,2	4,4
135	0,01	0,025	0,015	0,02	0,01	0,01	0,07	0,01	0,27	0,53	0,40	0,31	3,0	4,4
164	0,005	0,008	0,014	0,016	0,01	0,01	0,03	0,02	0,31	0,31	0,22	0,30	2,85	4,4

* alle Proben

Tab. 9 Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoinbildung nach 24stündiger Anzucht bei 25 °C unter Zusatz von 400 mg/l verschiedener Aminosäuren zu 11,8 % gehopfter Bierwürze als Substrat.

Substrat	Std.	Diacetyl- gehalt mg/l	Pentandion- (2,3)-gehalt mg/l	Acetoin- gehalt mg/l
Würze	0	0,13	0,01	1,05
Würze	24	0,35	0,30	8,75
Würze und Valin	24	0,13	0,47	11,00
Würze und Isoleucin	24	0,82	0,00	12,00
Würze und Threonin	24	0,29	0,45	8,00

Ergebnisse. Diacetylbildung bei Zusatz verschiedener Aminosäuren (s. Tab. 8, Tab. 9, Abb. 14): Bei Zugabe von 250 mg/l Valin zum Substrat wird die Diacetylbildung teilweise, von 400 mg/l vollständig unterdrückt. — Ein Zusatz von 400 mg/l Isoleucin förderte die Diacetylbildung stärker als ein Zusatz von 250 mg/l. — Threonin übt keinen feststellbaren Einfluss auf die Diacetylbildung aus.

Pentandion-(2,3)-bildung bei Zusatz verschiedener Aminosäuren (Tab. 8, Tab. 9, Abb. 15): Valin- bzw. Threoninzusätze ergeben eine schwache Zunahme der Pentandion-(2,3)-bildung — durch Isoleucin wird die Pentandion-(2,3)-bildung mit 250 mg/l fast vollständig, mit 400 mg/l vollständig unterdrückt.

Acetoinbildung bei Zusatz verschiedener Aminosäuren (Tab. 8, Tab. 9, Abb. 16): Die Acetoinbildung scheint im Gegensatz zur Diacetyl- und Pentandion-(2,3)-bildung von den zudosierten Aminosäuren nicht beeinflusst zu werden.

45 Die Abnahme von Diacetyl und Acetoin im Verlaufe der Gärung

Die verschiedenen Gärversuche (s. 43 und 44) zeigten eine starke Abnahme des gebildeten Diacetyls, Pentandions-(2,3) und Acetoin in der zweiten Hälfte der Gärung. Um abzuklären, ob auch grössere Mengen an Diacetyl und Acetoin abgebaut werden und ob, entgegen den Befunden, die aus den Abb. 12 und 13 hervorgehen, eine Reduktion des Diacetyls und Acetoin erfolgen kann, wurde gehopfter Bierwürze vor der Beimpfung mit *Saccharomyces carlsbergensis*, nach 24 Stunden, dem Zeitpunkt mit den höchsten Gehalten an Diacetyl und Acetoin bei einer Gärtemperatur von 25 °C (Abbildung 12) sowie nach 57 Stunden, einer Zeit, in der bereits eine starke Verminderung des Diacetyls und Acetoin eingesetzt hat, 4 bzw. 40 mg/l an Diacetyl oder Acetoin zudosiert. Diese Ansätze wurden mit den unter den

gleichen Bedingungen gehaltenen Anzuchten ohne Diacetyl- und Acetoinzusätze verglichen.

Substrat: Gehopfte Bierwürze (11,8prozentig). — Impfmengung: $5,1 \cdot 10^5$ Zellen (in 100 ml gehopfter Bierwürze). — Hefestamm: *Saccharomyces carlsbergensis* G 77 — Gärtemperatur: 25 °C. — Zudosierte Mengen: 4 mg/l oder 40 mg/l Diacetyl oder Acetoin. — Gärgefässe: 150-ml-Erlenmeyerkolben mit Gärverschluss. — Analysen: Diacetyl- und Acetoinbestimmungen nach 21 Butandiol-(2,3)-bestimmung nach 22.

Zur Kontrolle allfälliger Verluste an Diacetyl wurden die während der Gärung gebildeten Gase durch eine bei - 30 °C gehaltene Methanolvorlage geleitet. In dieser Vorlage konnten nur Spuren an Diacetyl (bis 0,005 mg/l) gefunden werden.

Aus Tab. 10 ist ersichtlich, dass Diacetyl sehr schnell über Acetoin zu Butandiol-(2,3) reduziert wird, indem nach 24 Stunden, dem Zeitpunkt mit dem höchsten Diacetylgehalte bei einer Gärung von 25 °C, vor der Beimpfung zugegebenes Diacetyl (4 mg/l) beinahe restlos über Acetoin zu Butandiol-(2,3) reduziert wurde. Dosierte man Diacetyl (4 mg/l) erst nach 24 oder gar 57 Stunden zu, war nach 160 Stunden eine beinahe restlose Reduktion durch die Hefe festzustellen. Selbst bei 40 mg/l Diacetyl wurden innerhalb von 160 Stunden zu 99,5 % reduziert.

Acetoin wird ebenfalls gleichzeitig gebildet und reduziert. So konnten von 40 mg/l Acetoin nach 24 Stunden Gärzeit gegenüber der Anzucht ohne Zusätze noch 14 % festgestellt werden. Der Rest wurde zu Butandiol-(2,3) reduziert. Ein Zusatz von 40 mg/l Acetoin vor der Anzucht hatte keinen Einfluss auf die Diacetyl- und Acetoingehalte der vergorenen Bierwürze nach 160 Stunden. Es wurde restlos zu Butandiol-(2,3) reduziert. Eine Oxydation von Acetoin zu Diacetyl konnte nicht festgestellt werden.

46 Die Bildung von Diacetyl und Acetoin durch Bakterien in Bier

Wie schon einleitend erwähnt, können sich verschiedene Organismen der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* in Bier vermehren (*Eschenbecher* 1968). Einige davon sind auch fähig, Diacetyl und Acetoin zu bilden (*Christensen* und *Pederson* 1958, *Harris* und *Watson* 1960, *Eschenbecher* 1968).

In den folgenden Versuchen wurde das Wachstum von Laktobazillen der Arten *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* sowie einiger Stämme der Art *Pediococcus cerevisiae* in Bier geprüft. Stämme, die

Tab. 10 Untersuchung eines Gäransatzes von 25 °C auf Diacetyl (D), Acetoin (A) und Butandiol-(2,3) (B) in mg/l nach 0, 24, 57 und 160 Stunden

Inkubationszeit (Std.) Probe	0			24			57			160		
	D	A	B	D	A	B	D	A	B	D	A	B
Ohne Zusatz	0,05	0,72	—	0,26	5,6	35	0,05	4,2	85	0,02	1,74	110
mit 4 mg/l D nach 0 Std.	4,05	0,72	—	0,30	6,0	42	0,16	4,0	91	0,03	1,76	119
mit 4 mg/l D nach 24 Std.				4,26	5,6	35	0,15	6,72		0,02	1,74	
mit 4 mg/l D nach 57 Std.							4,05	4,2		0,07	1,6	
mit 40 mg/l D nach 0 Std.	40,05	0,72	—							0,24	2,4	153
mit 40 mg/l A nach 0 Std.	0,05	40,72	—	0,28	12,0	65	0,08	6,0	118	0,03	2,56	160
mit 40 mg/l A nach 24 Std.				0,26	45,6	35	0,06	7,6		0,03	2,5	
mit 40 mg/l A nach 57 Std.							0,05	44,2		0,036	2,56	

sich in Bier vermehrten, wurden auch auf die Fähigkeit, Diacetyl und Acetoin zu bilden, untersucht. Der Einfluss von L-Valin auf die Bildung von Diacetyl und Acetoin konnte parallel ermittelt werden.

461 Das Wachstum von Laktobazillen und Pediokokken in Bier

Aus verschiedenen Instituten bezogene Laktobazillen- und Pediokokkenstämme bekannter Artzugehörigkeit wurden auf ihre Fähigkeit, sich in Bier zu vermehren, untersucht. Zur Kontrolle prüfte man auch deren Morphologie, Gramfärbung (Conn und Darron 1960) und Besitz von Katalase (Prüfungsreagens: Wasserstoffperoxyd dreiprozentig).

Durchführung: Helles Lagerbier wurde in Patentverschlussflaschen abgefüllt und zweimal während 10 Minuten bei 70 °C gehalten. Die in gehopfter Würze während drei Tagen vorgezüchteten Stämme wurden in Suspension (je 0,5 ml) zur Beimpfung des Bieres verwendet. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte visuell gemäss der Stärke der Trübung nach Inkubationszeiten von 3, 15 und 30 Tagen. In Tabelle 11 sind die entsprechenden Ergebnisse zusammengefasst.

Obwohl alle angeführten Stämme durch mehrmaliges Überimpfen in gehopfte Würze oder auf gehopften Würzeagar vor der Anzucht in Bier an die Hopfenbitterstoffe «gewöhnnt» wurden, stellte sich nur ein sehr langsames Wachstum in Bier ein. Mit einer Ausnahme fand man die ersten Bodensatzbildungen und Trübungen in Bier erst nach 15 Tagen Inkubationszeit. Nach 30 Tagen zeigten alle angezüchteten Stämme ein schwächeres bis stärkeres Wachstum. Alle untersuchten Stämme der in Tabelle 11 angeführten Arten verhielten sich grampositiv. Das Enzym Katalase war nicht nachweisbar.

462 Diacetyl- und Acetoinbildung durch Stämme der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus*.

Sämtliche in Tab. 11 angeführten Stämme wurden auf die Fähigkeit, Diacetyl und Acetoin zu bilden, geprüft. Der Stamm jeder Art mit der stärksten Bildung von Diacetyl kam für den folgenden Versuch zum Einsatz. *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus buchneri* bildeten kein Diacetyl.

Vorbereitung des Probematerials: Um ein schnelles Wachstum der Bakterien zu erreichen, gab man Bier, das in 250-ml-Patentverschlussflaschen abgefüllt wurde, 1 % Maltose zu. Einer Probeserie setzte man vor der Pasteurisation (2×10 Min. 70 °C) 250 mg/l L-Valin zu. — Anzucht: Die verschiedenen Stämme wurden aus einer dreitägigen Vorzucht in gehopfter Bierwürze abzentrifugiert und mit einer sterilen Kochsalzlösung auf eine Verdünnung von 0,8 · 10⁶ Zellen/ml gebracht. Die Bierproben wurden mit je einem ml der entsprechenden Bakteriensuspension beimpft.

Aus Tab. 12 ist ersichtlich, dass die untersuchten Stämme der Arten *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus casei* mehr Diacetyl und Acetoin bildeten als *Pediococcus cerevisiae*. Dies hing mit einem kräftigeren Wachstum der Laktobazillen zusammen. Nach langer Inkubationszeit wurden das gebildete Diacetyl und Acetoin wieder vermindert. Die Diacetylkonzentrationen lagen jedoch nach 672 Stunden noch über der organoleptisch stark wahrnehmbaren Grenze von 0,1 mg/l. Zudosiertes Valin in Konzentrationen von 250 mg/l unterdrückte die Bildung von Diacetyl nicht wie bei *Saccharomyces carlsbergensis* (vgl. 44). Sämtliche untersuchten Laktobazillenstämme bildeten kein, *Pediococcus cerevisiae* nur Spuren von Pentandion-(2,3).

Tab. 11 Eigenschaften [Morphologie; Gramfärbung; Katalase] verschiedener Stämme der Gattungen *Lactobacillus* (L.) und *Pediococcus* (P.) und ihr Wachstum in Bier (Wachstum).

Nr.	Art	Stamm	Morphologie	Gramfärbung	Katalase	5	Wachstum	
							15	30 Tage
3	<i>L. plantarum</i>	LBG-ETH	transparente, feine Kolonien,	+	—	+	++	++
59	<i>L. plantarum</i>	L-B	mittlere bis lange Stäbe in kurzen	+	—	—	(+)	+
60	<i>L. plantarum</i>	L-B	Ketten	+	—	—	++	+
61	<i>L. plantarum</i>	L-B		+	—	—	(+)	+
14	<i>L. casei</i>	MTI-ETH	weisse Kolonien, etwas plumpe	+	—	—	+	+
15	<i>L. casei</i>	MTI-ETH	Stäbe mit rundlichen Enden, teil-	+	—	—	(+)	+
44	<i>L. casei</i>	ITM-M	weise abgewinkelt	+	—	—	(+)	+
62	<i>L. casei</i>	L-B		+	—	—	+	+
46	<i>L. brevis</i>	ITM-M	feine weisse Kolonien, mittlere	+	—	—	(+)	+
49	<i>L. brevis</i>	ITM-M	bis längere Stäbe	+	—	—	—	(+)
51	<i>L. brevis</i>	IG-B		+	—	—	—	+
53	<i>L. brevis</i>	IG-B		+	—	—	+	+
54	<i>L. buchneri</i>	IG-B	feine weisse Kolonien, mittlere bis	+	—	—	(+)	
			lange Stäbe, teilweise in Paaren					
			oder kurzen Ketten					
22	<i>P. cerevisiae</i>	LBG-ETH	feine weissliche Kolonien,	+	—	—	—	+
24	<i>P. cerevisiae</i>	LBG-ETH	Tetraden	+	—	—	(+)	+
28	<i>P. cerevisiae</i>	LBG-ETH		+	—	—	—	(+)
58	<i>P. cerevisiae</i>	L-B		+	—	—	—	+

Legende zu Tabelle 11

LBG-ETH: Mikrobiologisches Institut ETH, Zürich
L-B: Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, Bern
MTI-ETH: Milchtechnisches Institut ETH, Zürich
ITM-M: Institut für Technische Mikrobiologie, TH München

IG-B: Institut für Gärungsgewerbe, Berlin
Wachstum: ++ sehr stark
+ stark
(+) schwach
— klein

Tab. 12 Diacetyl- und Acetoinbildung durch Organismen der Gattungen *Lactobacillus* (L.) und *Pediococcus* (P.) nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 25 °C in hellem Lagerbier (LH) unter Zusatz von 1% Maltose (+ 1% M).

Art	Inkubationszeit (Std.) Substrat	0		68		88		186		672	
		D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
L. plantarum	LH + 1% M	0,06	0,11	0,13	0,5	0,7	1,2	3,2	14,0	0,51	2,1
L. casei	LH + 1% M	0,06	0,11	0,11	0,5	0,5	1,1	1,0	42,0	0,4	3,5
P. cerevisiae	LH + 1% M	0,06	0,11	0,07	0,15	0,18	0,3	0,19	3,0	0,11	1,0
L. plantarum	LH + 1% M 250 mg/l Valin	0,06	0,11	0,14	0,55	0,8	1,5	4,0	15,0	0,62	2,5
L. casei	LH + 1% M 250 mg/l Valin	0,06	0,11	0,09	0,80	0,7	1,5	1,5	45,0	0,5	6,0
P. cerevisiae	LH + 1% M 250 mg/l Valin	0,06	0,11	0,08	0,20	0,30	0,6	0,4	4,0	0,15	1,5

D = Diacetyl mg/l A = Acetoin mg/l

Die Abbildung 17 veranschaulicht das Chromatogramm einer Probe, die aus einem ungenügend nachvergorenen Bier stammte. Die Fläche des Peaks 4 gibt das noch nicht reduzierte Diacetyl, die des Peaks 6 das noch vorhandene Pentandion-(2,3) an. Abbildung 18 stellt das Chromatogramm einer Bierprobe dar, der man 1% Maltose zugesetzt hatte. Sie enthielt anfänglich nur Spuren (< 0,01 mg/l) an Diacetyl und Pentandion-(2,3). Nach einer Inkubationszeit von 186 Stunden bei 25 °C mit *Lactobacillus casei* ergab sich jedoch ein grosser Peak für gebildetes Diacetyl. In Abbildung 18 fehlt ferner der Peak 6 für Pentandion-(2,3). *Lactobacillus casei* bildet also kein Pentandion-(2,3) in Bier. Somit könnte eine Infektion durch Diacetyl bildende Laktobazillen direkt und schnell mittels des gaschromatographischen Analysenverfahrens ermittelt werden.

Nach erfolgter Filtration und Pasteurisation mag ein vorgehend mit Laktobazillen infiziertes Bier wohl blank und als biologisch einwandfrei erscheinen. Gebildete Stoffwechselprodukte, wie Diacetyl, die einen ungünstigen Einfluss auf den Geruch und Geschmack des Bieres ausüben, bleiben erhalten. Soll nun vom Produkt her auf den Ursprung eines bestimmten Fehlers zurückgeschlossen werden, kann im erwähnten Beispiel die Methode der Gaschromatographie wertvolle Dienste leisten, indem die Ursachen für gebildetes Diacetyl direkt auf diese Art nachgewiesen werden können. Zur Sicherung dieser Annahme sind jedoch Untersuchungen eines hinreichend grossen Probenmaterials erforderlich.

5 Diskussion

Aus den Vorversuchen (s. 123) geht hervor, dass die herkömmlichen Analysenverfahren zur Bestimmung von Diacetyl, einschliesslich der Polarographie, der notwendigen Spezifität ermangeln, indem bei der spektralphotometrischen Messung Diacetyl und Pentandion-(2,3), gemessen als Nickel- oder Eisensalz des Dimethylglyoxims, ein gleiches Absorptionsmaximum aufweisen. Bei der polarographischen Bestimmung fand man für beide Substanzen dasselbe Halbstufenpotential. Die herkömmlichen Bestimmungsmethoden für Diacetyl messen also stets die Summe der beiden Diketone. Ringanalysen zeigten, dass bei Methoden, in denen zum Übertreiben des Diacetyls ein Destillationsschritt eingeschaltet wird, stets zu hohe Werte für Diacetyl resultieren (s. 123). Der

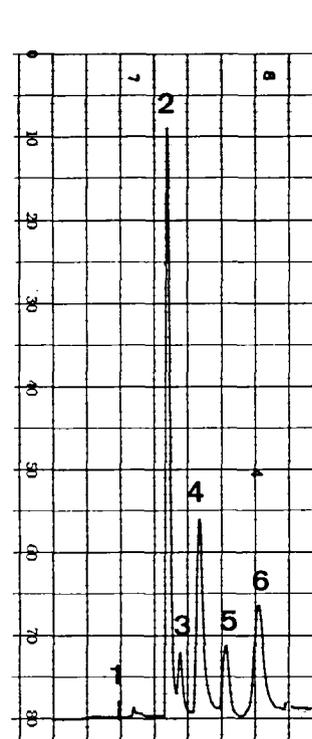


Abb. 17

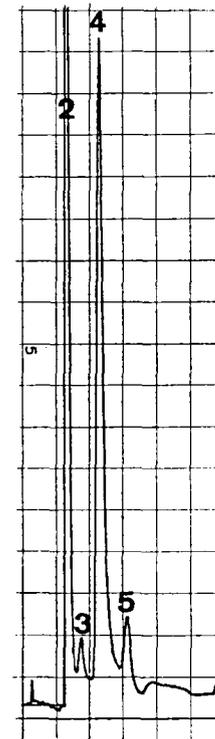


Abb. 18

Abb. 17 Chromatographische Bestimmung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) eines ungenügend vergorenen Bieres.

Abb. 18 Diacetylbildung in Bier (1% Maltosezusatz) durch *Lactobacillus casei* nach einer Inkubationszeit von 186 Stunden bei 25 °C.

1 Start; 2 Methylalkohol; 3 Aethylalkohol; 4 Diacetyl; 5 Standard; 6 Pentandion-(2,3).

Grund könnte in oxydativen Umwandlungen des Acetoin oder in einer spontanen oxydativen Dekarboxylierung der α -Acetomilchsäure während des Destillationsvorganges zu suchen sein. Immerhin ist zu sagen, dass auch die herkömmlichen Methoden ihre Bedeutung als Routineuntersuchungen im Brauereilaboratorium beibehalten dürften, da gaschromatographische Befunde (s. 4 und 43) ergaben, dass abnormal hohe Summenwerte für Diacetyl und Pentandion-(2,3) stets auf einen abnormalen Gehalt beider Diketone zurückzuführen sind, sofern sie durch Hefe und nicht durch eine bakterielle Infektion verursacht wurden.

Mit Hilfe der Gaschromatographie unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors lassen sich Diacetyl

und Pentandion-(2,3) einwandfrei trennen und quantitativ bestimmen (s. 21). Ein getrenntes analytisches Erfassen von Diacetyl und Pentandion-(2,3) ist von Bedeutung, da man anhand von Kostproben sah, dass die deutlich wahrnehmbare Konzentration für Diacetyl mit 0,1 mg/l in hellem Lagerbier ungefähr 15mal tiefer liegt als für Pentandion-(2,3). Aus den unter 3 angeführten Degustationsversuchen und den gefundenen Konzentrationen von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin in den verschiedensten Biertypen (s. 42) geht hervor, dass Pentandion-(2,3) und Acetoin in Bier nicht in Konzentrationen auftreten, die zu einer negativen Beeinflussung des Geruchs und Geschmacks führen können. Selbst die höchsten Gehalte für Pentandion-(2,3) und Acetoin in der ersten Gärphase erreichen nicht die organoleptisch wahrnehmbare Grenze von 1,5 mg/l für Pentandion-(2,3) und 30 mg/l für Acetoin.

Bei der Analyse von Würzen (s. 41) liess sich Diacetyl in Beträgen bis zu 0,15 mg/l und Acetoin bis zu 1,5 mg/l feststellen. Pentandion-(2,3) tritt normalerweise an der Grenze der Nachweisbarkeit um 0,005 mg/l, nie aber über 0,05 mg/l auf. Überraschend war die Feststellung, dass der Hauptanteil des Diacetyls und sämtliches Pentandion-(2,3) in gehopfter Bierwürze aus dem Doldenhopfen stammt, während der grösste Teil des Acetoin bereits in der ungehopften Würze vorhanden ist. Im methylenchloridlöslichen Extrakt aus Doldenhopfen konnten nur kleinste Konzentrationen von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin ermittelt werden, so dass nach der Hopfung mit dem methylenchloridlöslichen Extrakt geringere Diacetyl- und Pentandion-(2,3)-gehalte in der Würze zu erwarten sind.

Die Untersuchung verschiedener Biere ergab keine Abhängigkeit des Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoingehalts vom Biertyp. Es war aber ein Unterschied in den Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoingehalten zwischen den verschiedenen Brauereien festzustellen. Auch dürften, wie die Resultate unter 42 zeigen, verschiedene Verfahren der Bierherstellung nicht von allzu grosser Bedeutung auf die Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoingehalte im ausstossreifen Bier sein. Selbst ein mit *Saccharomyces diastaticus*, einem gefürchteten Bierschädling, hergestelltes, hochvergorenes «Bier», enthielt nach einer genügenden Nachgärzeit normale Konzentrationen an Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin. Zu hohe Gehalte an Diacetyl im fertigen Bier dürften meistens, eine einwandfreie Gärung vorausgesetzt, auf eine zu kurze Nachgärzeit zurückzuführen sein (s. 43). Auch die Möglichkeit einer Infektion durch Hefen oder Bakterien, die sich in ausstossreifem Bier vermehren und dabei Diacetyl bilden können, ist natürlich nie auszuschliessen. Für einwandfreie Biere stellen 0,06 mg/l Diacetyl die obere Grenze dar.

Bestimmt man Acetoin nach der Oxydation mit Eisen-III-Chlorid gaschromatographisch als Diacetyl (s. 42), so kann auch Pentandion-(2,3) in höheren Konzentrationen ermittelt werden. Es ist anzunehmen, dass dieses vor der Oxydation als Analogon des Acetoin, dem Methyläthylketol (3-Hydroxy-2-pentanone) vorlag. Dies stimmt

mit den Befunden von *Suomalainen* und *Linnahalm* (1966) überein, welche Methyläthylketolbildung bei Bäcker- und Brauereihefen nachgewiesen haben.

Zur Abklärung der Frage, wie weit die Bildung von Diacetyl, Acetoin und Pentandion-(2,3) temperaturabhängig sei, wurden Gärungen bei 25 °C und bei 8,5 °C angesetzt. Wie zu erwarten war, erfolgte bei der wärmeren Gärung die Bildung der drei Substanzen viel schneller. Es stellte sich aber auch eine raschere Abnahme ein. Es ist bekannt, dass bei Warmgärungen mit kurzer Lagerzeit erhöhte Gehalte an Aromakomponenten auftreten. Wird ein Ansatz endvergoren, wäre, wenigstens bezüglich der Diacetylgehalte, gegenüber einer Warmgärung nichts einzuwenden, da bei 25 °C bereits nach 130 Stunden Diacetyl auf Konzentrationen um 0,01 mg/l vermindert wurde, während die im halbtechnischen Massstab geführte Gärung bei 8,5 °C erst nach einer Gär- und Lagerzeit von 792 Stunden den erwünscht kleinen Gehalt an Diacetyl (0,05 mg/l) unterhalb der organoleptisch wahrnehmbaren Grenze aufwies. Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin stellen somit transitorische Gärungsprodukte dar, die in der zweiten Gärphase praktisch verschwinden.

Nach den unter 44 erhaltenen Befunden besteht eine starke Abhängigkeit der Diacetylbildung vom Valinangebot, indem zugegebenes Valin die Diacetylbildung unterdrückt. Im Gegensatz zu den Befunden von *Owades* und Mitarbeitern (1959), aber in Übereinstimmung zu *Chuang* und *Collins* (1968) war keine Beeinflussung der Acetoin synthese durch zudosiertes Valin festzustellen. Die durch *Neuberg* und Mitarbeiter (1922, 1925) festgestellte Acyloinkondensation dürfte nach wie vor als Hauptstoffwechselweg zur Bildung von Acetoin bei Hefen zu betrachten sein. Gibt man dem Substrat Isoleucin zu, wird die Pentandion-(2,3)-bildung unterdrückt. Isoleucin kann durch Desaminierung von Threonin über α -Ketobuttersäure, die mit aktivem Acetaldehyd kondensiert, über verschiedene weitere Zwischenprodukte gebildet werden. Ist genügend Isoleucin vorhanden, was im Falle eines Zusatzes von 250 oder 400 mg/l zutrifft, wird die Threonindesaminase gehemmt, so dass keine α -Ketobuttersäure mehr anfällt. Damit wird auch keine α -Aceto- α -hydroxybuttersäure mehr gebildet. Methyläthylketol könnte nach *Drews* und Mitarbeitern (1967) durch Decarboxylierung aus α -Aceto- α -hydroxybuttersäure entstehen. Durch Oxydation des Methyläthylketols würde Pentandion-(2,3) anfallen. Auch könnte der gefundene Methyläthylketol aus aktivem Acetaldehyd und Propionaldehyd durch Acyloinkondensation analog der Bildung von Acetoin entstehen. Zugegebenes Threonin erhöhte die Pentandion-(2,3)-bildung leicht. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Threonindesaminase erst gehemmt wird, wenn genügend Isoleucin aus Threonin synthetisiert ist. Als Nebenprodukt dieser Synthese könnte Pentandion-(2,3) anfallen. Ein Zusatz von Isoleucin förderte die Diacetyl-, ein Zusatz von Valin die Pentandion-(2)-synthese. Diese Ergebnisse berechtigen zur Annahme, dass gewisse Zusammenhänge zwischen den Synthesen von Valin und Isoleucin bestehen.

Die festgestellte Verminderung des Diacetyls und Acetoin (s. 43) war Gegenstand von weiteren Untersuchungen (s. 45). Es konnte festgestellt werden, dass Diacetyl sehr schnell über Acetoin zu Butandiol-(2,3) reduziert wird. Innerhalb von 160 Stunden Gärzeit reduzierte die Hefe 99,5 % des in überaus hoher Konzentration von 40 mg/l zudosierten Diacetyls zu Butandiol-(2,3). Ein Zusatz von 40 mg/l Acetoin war nach 160 Stunden restlos zu Butandiol-(2,3) reduziert.

Interessant ist auch die Feststellung, dass Diacetyl und Acetoin nicht in einer ersten Gärphase gebildet und anschliessend reduziert werden. Gab man vor der Beimpfung 4 mg/l Diacetyl zum Substrat, war dieses nach 24 Stunden bei 25 °C, dem Zeitpunkt mit der höchsten Diacetylbildung bei einer Probe ohne Zusätze, beinahe restlos zu Butandiol-(2,3) reduziert. Selbst 40 mg/l zudosiertes Acetoin wurden innerhalb von 25 Stunden zu 86 % reduziert. Es konnte in keinem Fall eine Oxydation des Acetoin zu Diacetyl festgestellt werden, da 40 mg/l an zudosiertem Acetoin keinen Einfluss auf die Diacetylgehalte hatten.

Der Brauprozess bietet den meisten Bakterien wenig Gelegenheit, sich in Würze oder Bier zu vermehren. Ein zweieinhalbstündiges Würzekochen, niedrige Gärttemperaturen, anaerobe Verhältnisse kurz nach dem Anstellen der Würze bis zum fertigen Bier, ein tiefes pH, durch Brauereihefe gebildeter Alkohol und vorhandene Hopfenantiseptika in der Würze sowie im Bier verunmöglichen den meisten Bakterien ein starkes Wachstum. So stellen bei der Produktion untergäriger Biere aerobe Bakterien keine grosse Gefahr dar, es sei denn, eine starke Infektion trete bereits beim Kühlen der Würze auf. Hier können sich vor allem gramnegative Organismen der Gattungen *Acetobacter*, *Flavobacterium* und *Aerobacter*, die gegen Säure und Hopfenantiseptika widerstandsfähig sind, schnell vermehren und die Würze durch ihre Stoffwechselprodukte

6 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Gaschromatographie unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors konnte eine Methode zur getrennten quantitativen Erfassung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) ausgearbeitet werden. Acetoin wurde jeweils mit Ferrichlorid oxydiert und als Diacetyl bestimmt.

Eine Sinnenprüfung nach der Dreiecksmethode gestattete, die Einflüsse von Diacetyl, Pentandion-(2,3) und Acetoin auf das Bieraroma zu bestimmen. Diacetyl verursacht bereits ab 0,1 mg/l in hellem Lagerbier einen «Off-Flavor», indem es durch butterähnlichen Geruch und einen süsslichen Geschmack wahrnehmbar ist. Pentandion-(2,3) und Acetoin treten in Bier nicht in Konzentrationen auf, die zu negativen Beeinflussungen des Bieraromas führen könnten. Die organoleptisch noch feststellbaren Konzentrationen liegen für Pentandion-(2,3) bei 1,5 mg/l, für Acetoin bei 30 mg/l.

Es konnte ein Reduktionsprodukt von Pentandion-(2,3) in Bier gefunden werden. Dabei dürfte es sich um das Analogon des Acetoin, den Methyläthylketol, handeln.

gefährden. Sofern die anschliessende Gärung normal verläuft, ist ein möglicherweise erhöhter Diacetylgehalt ohne Bedeutung. Eigene Untersuchungen haben nämlich gezeigt (s. 431 und 44), dass Biere aus einwandfreien Gärungen geringere Diacetylgehalte aufweisen können als die zur Herstellung verwendete Würze. Infektionen durch Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* stellen auch während und nach der Gärung eine besondere Gefahr für die Qualität des Bieres dar. Durch Pasteurisation können diese Organismen zwar abgetötet werden, doch bleiben ihre Stoffwechselprodukte im Bier erhalten.

Alle geprüften Stämme der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* konnten sich nach längerer Inkubationszeit, nachdem man sie in gehopfter Würze an die Hopfenbitterstoffe angewöhnt hatte, mehr oder weniger stark in Bier vermehren. So wurde nach 30tägiger Bebrütung bei 25 °C ein schwacher bis starker Bodensatz oder eine vollständige Trübung des Bieres festgestellt.

Weitere Versuche ergaben, dass vor allem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* und auch in geringerem Masse *Pediococcus cerevisiae* zur Diacetyl- und Acetoinbildung befähigt sind. Nach 672 Stunden war eine Verminderung des gebildeten Diacetyls und Acetoin festgestellt. Zugegebenes Valin unterdrückte die Bildung von Diacetyl bei Laktobazillen und Pediokokken nicht. Nach *Eschenbruch* (1970) ist *Lactobacillus plantarum* Valin-bedürftig. Somit ist anzunehmen, dass bei diesem Organismus der Stoffwechselweg über α -Acetolactat zur Bildung von Valin nicht existiert. Die Diacetyl- und Acetoinbildung könnte deshalb auch für die geprüften Laktobazillen und Pediokokken nach dem kürzlich durch *Chuang* und *Collins* (1968) vorgeschlagenen Weg durch Kondensation von aktivem Acetaldehyd mit Acetyl-CoA verlaufen.

Im Verlaufe der Gärung wird gebildetes Diacetyl, Acetoin und Pentandion-(2,3) stark vermindert. Es konnte festgestellt werden, dass Diacetyl und Acetoin dabei quantitativ zu Butandiol-(2,3) reduziert werden. Die Bildung von Diacetyl und Acetoin verläuft bei der Gärung gleichzeitig mit der Reduktion beider Substanzen.

Es konnte keine Oxydation von Acetoin zu Diacetyl festgestellt werden.

Zugegebenes Valin hemmt die Bildung von Diacetyl bei Hefen, nicht aber bei Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus*. Eine Beeinflussung der Acetoinbildung durch zugegebenes Valin konnte weder bei Hefen noch den untersuchten Bakterien festgestellt werden.

Isoleucin unterdrückte bei Hefen die Pentandion-(2,3)-bildung gänzlich.

Die Diacetyl-, Pentandion-(2,3)- und Acetoingehalte hängen nicht mit dem Biertyp zusammen. Entscheidend für möglichst niedrige Gehalte an Diacetyl ist eine genügende Nachgärung.

Einige Stämme der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* vermögen sich in Bier zu vermehren und dieses zu trüben. Ein Zusatz an Maltose bewirkte dabei ein wesentlich beschleunigteres Wachstum und damit verbunden die Bildung von Diacetyl und Acetoin. Beide Substanzen wurden nach längerer Inkubationszeit wieder vermindert.

Die untersuchten Laktobazillen bildeten kein, *Pediococcus* nur Spuren von Pentandion-(2,3). Hefen dagegen synthetisieren stets grössere, mit dem Diacetyl vergleichbare Mengen Pentandion-(2,3). Damit ergäbe sich die Möglichkeit, anhand eines Gaschromatogrammes zu unterscheiden, ob die Bildung des Diacetyls durch Bakterien oder Hefen verursacht wurde.

7 Literatur

- Äyrapää T.: Der Einfluss der Temperatur auf die Bildung höherer Alkohole durch Kulturhefen, *Brauwissenschaft* 23, 48-55, 1970.
- Bavisotto V. S., Shovers J. und Sandine W. E.: Enzymatic removal of diacetyl from beer, *J. Inst. Brew.* 72, 220, 1966.
- Brenner M. W., Blick S. R., Frenkel G. und Siebenberg J.: New light on diacetyl and acetoin, *EBC-Proc. Brüssel* 233, 1963.
- Canales A. M. und Martinez N.: Simplified and sensitive method for the determination of diacetyl in beer, *American Brewer* 95, 10, 1962.
- Christensen M. D. und Pederson C. S.: Factors affecting diacetyl production by lactic acid bacteria, *Appl. Microbiol.* 6, 319, 1958.
- Chuang L. F. und Collins E. B.: Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast, *J. Bact.* 95, 2083, 1968.
- Conn J. H. und Darrow M. A.: Staining procedures, *The Williams and Wilkins Comp., Baltimore* 226, 1960.
- Cox G. A.: The effect of acidity on the production of diacetyl by bacilli in milk, *J. Dairy Res.* 14, 28, 1945.
- Daepf H. U.: Probleme und Möglichkeiten der Sinnenprüfung von Fruchtsäften und anderen Getränken, *Flüssiges Obst* 34, 333, 1967.
- Discherl W. und Höfermann H.: Über die mögliche Rolle der α -Oxy- α -methyl-acetessigsäure bei der fermentativen Acetoinbildung, *Biochem. Zeitschr.* 322, 237, 1951.
- Drews B., Specht H., Bärwald G. und Trenel G.: Diacetyl- und Acetoinbestimmung im Bier, *Msch. für Brauerei* 19, 34, 1966.
- Drews B., Specht H. und Trenel G.: Der Einfluss der Gärbedingungen und Lagerzeit auf den Gehalt des Bieres an Acetoin, Diacetyl, Pentandion und Butandiol, *Msch. für Brauerei* 20, 1949, 1967.
- Drews B. und Gübel H.-J.: Neues über die praktische Qualitätskontrolle des Bieres mit Hilfe der Gaschromatographie, *Msch. für Brauerei* 20, 360, 1967.
- Drews B., Bärwald G. und Niefind H. J.: Gaschromatographische Bestimmung von Diacetyl und Pentandion-(2,3) in Bier, *Msch. für Brauerei* 21, 96, 1968.
- Drews B. und Riemann J.: Der Einfluss einiger gärungstechnologischer Faktoren auf den Gehalt des Bieres an höheren aliphatischen Alkoholen und Isoamylacetat, *Msch. für Brauerei* 20, 254, 1967.
- Eschenbecher F.: Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen, *Diss. Technische Hochschule München*, 1968.
- Eschenbruch R. und Dittrich H. H.: Die Acetoinbildung von *Lactobacillus plantarum* in Abhängigkeit von Thiamin, Liponsäure, L-Valin und L-Isoleucin, *Arch. Mikrobiol.* 70, 303, 1970.
- Gjertsen P., Undstrup S. und Trolle B.: Diacetyl im Bier, *Msch. für Brauerei* 17, 232, 1964.
- Gross N. H. und Werkmann C. H.: Isotopic composition of acetylmethylcarbinol formed by yeast juice, *Arch. Biochem.* 15, 125, 1947.
- Harden A. und Walpole G. S.: Production of 2,3-butylene glycol and acetyl-methylcarbinol, *Proc. roy. Soc.* 424, 1377, 1905.
- Harris J. O. und Watson W.: Observations on some beer spoilage bacteria, *J. Inst. Brew.* 66, 151, 1960.
- Harrison G. A. F., Byrne W. J. und Collins E.: Application of electron capture chromatography to brewery problems, *J. Inst. Brew.* 71, 336, 1965.
- Hetzel H. F.: Eine einfache photometrische Diacetylbestimmung mittels o-Phenylendiamin, *Milchwiss.* 14, 424, 1959.
- Holzer H., Da Fonseca-Wollheim F., Kohlhaw G. und Woenckhaus Ch. W.: Active forms of acetaldehyde, pyruvate and glycolic aldehyde, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 98, 453, 1962.
- Inoue T., Masuyama K., Yamamoto Y., Okada K. und Kuroiwa Y.: Mechanisms of diacetyl formation in beer, *J. of Ferm. Techn.* 46, 341, 1968.
- Juni E.: Mechanisms of formation of acetoin by bacteria, *J. Biol. Chem.* 194, 715, 1951.
- Juni E.: Mechanisms of the formation of acetoin by yeast and mammalian tissue, *J. Biol. Chem.* 195, 727, 1952.
- Keenan T. W., Lindsay R. C., Morgan M. E. und Day E. A.: Acetaldehyde production by single-strain lactic streptococci, *J. Dairy Sci.* 49, 10, 1966.
- Kielhöfer E. und Würdig G.: Die Bestimmung von Acetoin und Diacetyl in Wein und der Gehalt deutscher Weine an diesen Substanzen, *Weinwiss.* 15, 135, 1960.
- Kockova-Kratochvilova A., Vavruchova A. und Vopatkova-Novakova D.: Der mikrobielle Ursprung von Diacetyl und Acetoin in Bier, *Brauwiss.* 9, 73, 98, 1956.
- Krampitz L. O.: Synthesis of α -Acetolactic Acid, *Arch. Biochim.* 17, 81, 1948.
- Krishnaswamy M. A. und Babel F. J.: Diacetyl production by cultures of lactic acid-producing Streptococci, *J. Dairy Sci.* 34, 374, 1951.
- Latimer R. A., Glenister P. R., Kopple K. G. und Balles F. C.: A review of the diacetyl problem, *Techn. quarterly* 6, 24, 1969.
- Lemoigne M., Hooreman M. und Croson M.: Recherches sur la formation d'acétoine aux dépens de l'acide pyruvique et l'ethanal par *Bacillus subtilis*, *Ann. Inst. Pasteur* 76, 303, 1949.
- Lewis M. J.: Recent research on diacetyl, *Brewers Digest*, 43, 80, 1968.
- Michaelian M. B. und Hammer B. W.: The Oxydation of acetyl-methylcarbinol to diacetyl in butter cultures, *Iowa Agr. Expt. Sta. Res. Bull.* 205, 1936.
- Mizuno W. G. und Jezeski J. J.: Studies on starter metabolism, *J. Dairy Sci.* 42, 251, 1959.
- Neish A. C.: Note on the stereoisomers of butanediol-(2,3) produced by yeast, *Canadian J. of Res.* 28 B, 660, 1950.
- Neuberg C. und Ohle H.: Zur Kenntnis der Carboligase, *Biochem. Z.* 127, 327, 1922 und 128, 610, 1922.
- Neuberg C. und Kobel M.: Über das physiologische Verhalten des Acetoin, *Biochem. Zeitschr.* 160, 250, 1925.
- Neuberg C. und Simon E.: Zur Kenntnis der biochemischen Acyloinsynthese, *Biochem. Z.*, 1956, 374, 1925.
- Niel C. B., van Kluyver A. J. und Derr H. G.: Über das Butteraroma, *Biochem. Z.* 210, 234, 1929.
- O'Meara J.: A simplified delicate and rapid method of detecting the formations of acetylmethylcarbinol, *J. Path. Bact.* 34, 401, 1931.
- Owades J. L., Maresca L. und Rubin G.: Nitrogen metabolism during fermentation in the brewing process, II, *Proc. A.S.B.C.* 22, 1959.
- Owades J. L., Jacovac J. A. und Vigilante C.: Analyses simplified, Diacetyl, *Proc. A.S.B.C.* 63, 1960.
- Owades J. L. und Jacovac J. A.: Microdetermination of diacetyl in beer, *Proc. A.S.B.C.* 22, 1963.
- Palmand S. R.: Studies on the relative flavor importance of some beer constituents, *Techn. Quart. MBAA* 6, 117, 1969.
- Pasteur L.: Etudes sur la bière, Vol. V., *Masson, Paris*, 1876.

- Pette J. W.*: Some aspects of the butteraroma problem, XII Int. Dairy Congr., Proc. 2, 572, 1949.
- Peynaud E. und Lafon M.*: Présence et signification du diacétyl, de l'acétoïne et du 2,3-butandiol dans les eaux-de-vie, Ann. Falsif. Fraudes 44, 263, 1951.
- Pfenninger H., Schlienger E., Ullmann F. und Schur F.*: Die neue halotechnische Brauerei der Versuchsstation Schweizerischer Brauereien, Schweiz. Brauerei-Rdsch. 81, 69, 1970.
- Pleticha R.*: Prednaska na polarigrafickém sjezdu, 1951.
- Portno A. D.*: The influence of oxygen on the production of diacetyl during fermenting and conditioning, J. Inst. Brew. 72, 458, 1966.
- Riberau-Gayon J. und Peynaud E.*: Analyse et contrôle des vins, Paris-Liège: Librairie Polytechnique Ch. Béranger, 2. Aufl. 280, 1958.
- Ronkainen P. und Suomalainen H.*: Dicarbonyl compounds of whisky and cognac, Suomen Kemistilehti 39 B, 280, 1966.
- Salo T. und Suomalainen H.*: Die Bestimmung des Diacetyls im Sprit, Z. f. Lebensmittelunters. und -forsch. 106, 367, 1957.
- Schmalfuss H. und Barthmeyer H.*: Diacetyl ein Stoffwechselprodukt? Z. Physiol. Chemie 176, 282, 1928.
- Schmalfuss H. und Barthmeyer H.*: Diacetyl als Aromabestandteil von Lebens- und Genussmitteln, Biochem. Z. 216, 330, 1929.
- Schmalfuss H. und Barthmeyer H.*: Nachweis von Diacetyl und Acetylmethylcarbinol in Lebensmitteln, Z. Untersuch. Lebensm. 63, 283, 1932.
- Sebek O. K. und Randles C. I.*: The Oxydation of the stereoisomeric 2,3-Butanediols by Pseudomonas, Arch. Biochem. Biophys. 40, 373, 1952.
- Shimwell J. L. und Kirkpatrick W. C.*: New light on the Sarcina question, J. Inst. Brew. 45, 137, 1939.
- Silverman M. und Werkman C. H.*: The formation of acetylmethylcarbinol from pyruvic acid by a bacterial enzyme preparation, J. Biol. Chem. 138, 35, 1941.
- Speckman R. A. und Collins E. B.*: Diacetyl biosynthesis in Streptococcus diacetylactis and Leuconostoc citrovorum, J. Bact. 95, 174, 1968.
- Strecker H. J. und Harary I.*: Bacterial butyleneglycol dehydrogenase and diacetylreductase, J. Biol. Chem. 211, 263, 1954.
- Suomalainen H. und Jännes L.*: Fermentative formation of diacetyl, Nature 157, 336, 1946.
- Suomalainen H. und Ronkainen P.*: Der Mechanismus der Diacetylbildung bei der Hefegärung, Nature 220, 792, 1968.
- Suomalainen H. und Linnahälme T.*: Über den Bildungsmechanismus von Diacetyl im Gärprozess durch Hefekulturen, Arch. Biochem. 114, 502, 1966.
- Toth E.*: Die Unterscheidung von Weinessig und Spritessig, Z. Unters. Lebensmittel 82, 439, 1941.
- Watt D. und Krampitz L. O.*: α -Acetolactic acid, an intermediate in acetylmethylcarbinol formation, Federation Proc. 6, 301, 1947.
- West D. B., Lautenbach A. L. und Becker K.*: Untersuchungen über Diacetyl im Bier, Proc. A.S.B.C. 81, 1952.

Dank

Dem Vorstand des Mikrobiologischen Institutes der ETH, Herrn Professor Dr. L. Ettlinger, möchte ich für die Zuweisung des Themas, die umsichtige Leitung sowie die zahlreichen Anregungen meinen vorzüglichen Dank aussprechen. Zu grossem Dank bin ich auch dem Stiftungsrat des Schweizerischen Bierbrauervereins verpflichtet, der zur Durchführung dieser Arbeit an der Versuchsstation Schweizerischer Brauereien einen Kredit aus dem Fonds für wissenschaftliche Forschung bewilligte. Ein spezieller Dank gebührt dem Direktor der Versuchsstation Schweizerischer Brauereien, Herrn Dr. H. Pfenninger, für den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz mit modernsten Einrichtungen, die persönliche Förderung und die wertvollen Ratschläge. Mein Dank richtet sich auch an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Versuchsstation Schweizerischer Brauereien, die mir bei der Ausführung und der Niederschrift der Arbeit behilflich waren. Meiner Schwester, Frau H. Huber-Scherrer, danke ich an dieser Stelle für die sorgfältige Schreibarbeit.

Lebenslauf

Geboren am 8. September 1942 in Zell LU

1949–1955: Primarschule in Zell

1955–1959: Mittelschule in Willisau

1959–1962: Kantonsschule Luzern, Maturität Typus C

1962–1963: Praktikum, Militärdienst

1963–1967: Studium an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Abteilung für Landwirtschaft, agrotechnologische Richtung
Diplom als Ing.-Agr. mit spezieller Ausbildung in agrotechnologischer Richtung,
Herbst 1967

1967–1970: Wissenschaftlicher Mitarbeiter, mit externem Arbeitsplatz an der Versuchsstation Schweizerischer Brauereien in Zürich
Ausführung der Promotionsarbeit