

Průzkum vlivu biologických stabilizátorů na zvýšení trvanlivosti konzumních pív

Ing. JIRÍ CURÍN, Ing. JOSEF ŠTICHAUER, Ing. JANA ŠTORKOVÁ, Pokusné a vývojové středisko, Oborové ředitelství Pivovary a sladovny, Praha — Ing. JAROSLAV HODAN, Západočeské pivovary, n. p., Plzeň

Do redakce došlo 1. 6. 1970

1. Úvod

Mezi nejdůležitější kritéria jakosti piva patří bezesporu trvanlivost. Podle ČSN 56 0186 — Metody zkoušení piva se pod tímto pojmem rozumí doba, která uplyne od stočení do znehodnocení piva, je-li uloženo v lahvích při 20 °C. Za znak znehodnocení piva je považován vznik sedlinky, popřípadě zákalu, vznikne-li zákal dříve než sedlinka. Sedlinka, která nejčastěji indikuje znehodnocení piva, může obecně vzniknout buď vysrážením koloidů piva, nebo je výsledkem činnosti mikroorganismů. V prvním případě je potom trvanlivost piva určována jeho koloidní stabilitou, v druhém případě jeho biologickou stabilitou.

Trvanlivost většiny našich tuzemských lahvových pív je v současné době určována téměř výhradně biologickou stabilitou. Zvýšení biologické stability piva je proto jedním z rozhodujících úkolů pivovarské technologie. Je toho možno dosáhnout v zásadě dvěma způsoby. Nejběžnější a nejosvědčenější je použití tzv. klasických postupů, mezi něž řadíme různé metody vycházející ze zvyšování sanitační úrovně provozů, dále různé způsoby filtrace a konečně i pasteraci, ať již v transportním obalu nebo průtokovou. Kromě těchto tzv. klasických postupů zvyšování biologické stability piva byly však v poslední době vypracovány i postupy další, nazývané často se zřetelem na dobu jejich vzniku, postupy novějšími. Jde hlavně o použití vysokofrekvenční energie, ionizačních a ultrafialových paprsků, ultrafiltrace a konečně i o aplikaci konzervačních čini-

del. Ze všech těchto postupů našla zatím největší praktické uplatnění konzervační činidla, nazývaná někdy rovněž biologickými stabilizátory.

Účinnost a přednosti klasických postupů zvyšování biologické stability piva jsou jistě mimo vší pochybnost. V některých případech je však jejich aplikace spojena s nesnázemi. Jako výhodnější se zdá použití jiných postupů zvyšování biologické stability piva, především však použití biologických stabilizátorů. Aplikace biologických stabilizátorů nese s sebou ovšem rovněž některé problémy. Vzhledem k tomu, že v našich podmínkách jsme doposud v tomto směru neměli k dispozici žádné praktické zkušenosti, provedlo PVS Braník ve spolupráci s n.p. Západočeské pivovary průzkum účinnosti dvou nejběžněji používaných biologických stabilizátorů piva. Průzkum byl zaměřen především na možnosti využití biologických stabilizátorů při zvyšování trvanlivosti konzumních pív.

2. Základní údaje o vlastnostech a použití zkoušených preparátů

Z preparátů, navržených k biologické stabilizaci piva, se podle údajů literatury prakticky nejvíce uplatňuje oktylester kyseliny gallové a heptylester kyseliny p-hydroxybenzoové, které byly proto vybrány k provedení zkoušek. Pro konzervaci nápojů dosti často používaný dietylester kyseliny pyrouhličité je pro všechny nápoje obsahující větší množství bílkovin nevhodný. Podle Mönchové [1] se vlivem reakce dietylesteru kyseliny pyrouhličité s bílkovi-

nami mikrobicidně projevují až vyšší dávky tohoto preparátu, které však již poškozují organoleptický charakter nápoje.

Oktylester kyseliny gallové. Ke zkouškám bylo použito oktylesteru kyseliny gallové, komerčně vyráběného pod označením GA/8 belgickou firmou Sopura. GA/8 může být dodáván ve formě růžového krystalického prášku, nejčastěji je však expedován jako 10 % roztok v propylenglykolu. GA/8 se výborně rozpouští v etylalkoholu, jeho rozpustnost ve vodě je však poměrně malá (25 až 30 ppm). Aplikací koncentrace je výrobcem doporučována v rozmezí 5 až 15 ppm (0,5 až 1,5 g/hl). Preparát je nejlépe dávkovat do piva výhradně až po poslední filtraci tak, aby byla zajištěna maximální homogenita rozptýlení. Tomu nejlépe vyhovuje kontinuální dávkování se zpětnou vazbou na průtok. GA/8 se dávkuje ve formě 1 % hm. etanolového roztoku. Jako rozpouštědla se používá etanol koncentrace asi 96 procent obj. Etanolový roztok GA/8 je stálý.

Preparát GA/8 může však být aplikován i před filtrací a event. i do filtrační hmoty. Dávkování do tanků se nedoporučuje, protože nezaručuje rovnoměrné rozptýlení preparátu v celém obsahu [2]. GA/8 nemá téměř ovlivňovat chuť a pěnivost piva, mírně však zvyšuje jeho sklon k tvorbě koloidních zákalů. Preparát se proto doporučuje aplikovat do koloidně stabilizovaných pív. Toxicita GA/8 je velmi nízká, nižší než je toxicita kyseliny benzoové [2]. Přitom estery kyseliny gallové jsou hojně používány v tukovém průmyslu jako antioxidační prostředky [3]. Cena preparátu GA/8 je 120 belgických franků za 1 litr 10 % roztoku v propylenglykolu.

Heptylester kyseliny p-hydroxybenzoové. Ke zkouškám bylo použito heptylesteru kyseliny p-hydroxybenzoové, komerčně vyráběného pod označením STAYPRO WS-7 (dále pouze WS-7) americkou firmou Wallerstein. Rozpustnost preparátu v etanolu je sice dobrá, avšak zřetelně nižší než u GA/8, dobře se rozpuští v alkáliích. Rozpustnost ve vodě je rovněž nižší než v případě GA/8 (maximálně 15 ppm), takže doporučená aplikační koncentrace v rozmezí 5 až 12 ppm (tj. 0,5 až 1,2 g/hl) se v horním extrému značně blíží rozpustnosti. Preparát je proto nutno dávkovat do piva vždy až po konečné filtraci, nejlépe kontinuálně se zpětnou vazbou na průtok. WS-7 je dávkován ve formě 0,4 % hm. roztoku v 0,1 % NaOH. Stálost preparátu v tomto roztoku je však poněkud nižší, takže je nejlépe denně vždy připravovat čerstvý roztok a omezovat styk tohoto roztoku s CO₂.

Výrobce doporučuje připravovat roztok WS-7 ve dvou stupních. V prvním stupni se má WS-7 rozpustit na koncentrovaný roztok v organickém rozpouštědle, který je při pokojové teplotě stálý. Teprve ve druhém stupni se má získat méně stálá aplikační forma.

Jak uvádí Rinke [4] i další autoři, při aplikaci heptylesteru kyseliny p-hydroxybenzoové dochází ke snížení pěnivosti piva a ke zhoršení jeho koloidní stability. Snížení pěnivosti je podle Portnoa [5] v lineární závislosti na množství přidaného prepa-

rátu. Po chuťové stránce se však nemají projevovat žádné změny. Jak uvádí Courtney [6] je možno pivo stabilizované preparátem WS-7 bez potíží plnit i do pocínovaných plechovek. Náklady na biologickou stabilizaci preparátem WS-7 jsou v USA při výrobě vyšší než 100 000 barelů ročně (tj. asi 158 000 hl za rok) udávány na 3,5—4 centy/barel v porovnání s 12 centy/barel při pasteraci v transportním obalu nebo 9 centy/barel při průtokové pasteraci nebo 8 centy/barel při membránové filtraci [7].

3. Experimentální část

Jak již bylo řečeno v úvodu, průzkum vlivu biologických stabilizátorů na zvýšení biologické stability piva byl prováděn především z hlediska jejich použití u běžných tuzemských lahvočných pív. Hlavní pozornost se proto pochopitelně věnovala vlivu těchto preparátů na prodloužení trvanlivosti piva. Laboratorně byl dále sledován i vliv biologických stabilizátorů na růst vybraných reprezentantů technologicky škodlivých skupin mikroorganismů. Kromě kladných důsledků aplikace biologických stabilizátorů byly sledovány i negativní stránky jejich působení. Hlavní pozornost byla v tomto směru věnována změnám pěnivosti piva a vlivu na organoleptický charakter piva.

Ověřování vlivu biologických stabilizátorů na prodloužení trvanlivosti piva bylo uskutečněno v několika etapách na 3 druhích 10° piva. Šlo jednak o laboratorní zkoušky, při nichž bylo pivo plněno do sterilních 0,33 l lahví s porcelánovým uzávěrem, jednak o zkoušky provozní, při nichž bylo pivo za provozních podmínek plněno do běžných 0,5 l lahví. Biologické stabilizátory byly dávkovány sterilními pipetami v případě laboratorních zkoušek do naplněných lahví, v případě provozních zkoušek do prázdných umytých lahví před stočením. Láhve byly potom v obou případech uloženy jednak při teplotě 8 °C, jednak při teplotě 20 °C, přičemž byl sledován vznik sedlinky a zákalu. Kromě toho byl zjišťován celkový počet zárodků plotnovou metodou (kultivace na mladinové želatině po dobu 6 dní při 20 °C) v pivě srovnávacím (neupraveném) okamžitě po stočení, v pivě srovnávacím i v pivě s dávkou biologických stabilizátorů po 24hodinovém uložení při příslušných teplotách. V rámci těchto pokusů byla ověřována účinnost preparátu GA/8 v koncentracích 5, 10, 15 ppm, preparátu WS-7 v koncentracích 5 a 12 ppm.

Kromě posuzování vlivu biologických stabilizátorů na prodloužení trvanlivosti piva byl laboratorně sledován i jejich účinek na růst vybraných reprezentantů technologicky škodlivých mikroorganismů. Tato část zkoušek byla uskutečněna vzhledem k tomu, že zvýšení biologické stability piva vždy závisí na mikrofloře piva, která je zase dána specifickými podmínkami výrobního závodu. Působení obou zkoušených preparátů bylo sledováno na dvou druhích kvasinek, často se vyskytujících v pivě (*Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces exiguus*), na kvasinkách rodu *Torulopsis*, dále na kmeni *Escherichia coli* vyzolovaném z piva, na kmeni *Lactobacillus*

brevis a *Pediococcus cerevisiae* a konečně byly do zkoušek zahrnuty i kulturní pivovarské kvasinky, reprezentované kvasnicemi *Smíchov*.

Posouzení účinnosti biologických stabilizátorů bylo s výjimkou ověření vlivu těchto preparátů na anaerobní *Pediococcus cerevisiae* prováděno komínkovou metodou. Do komínků o obsahu 0,2 ml byl přímo dávkován aplikační roztok preparátu a po odpovídající kultivaci na vhodné agarové půdě (tab. 1) byl zjišťován průměr vzniklé čisté zóny. Koncentrace aplikačních roztoků byly voleny tak, aby bylo možné všestranné vzájemné porovnání účinnosti. Vzhledem k tomu, že se používalo přímo aplikačních roztoků, byly k eliminaci vlivu rozpouštědel v každém případě uskutečněny i slepé pokusy. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 1. Údaje o kultivaci mikroorganismů

| Druh mikroorganismu | Typ agarové půdy | Teplota kultivace °C | Doba kultivace dní |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|
| Divoké a kulturní kvasinky | Sladinový agar | 25 | 2 |
| <i>Escherichia coli</i> | Masopeptonový agar | 37 | 2 |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | Tomato Juice Agar Special | 25 | 2 |

Tabulka 2. Stanovení účinnosti biologických stabilizátorů komínkovou metodou

| Druh mikroorganismu | Průměr čisté zóny v mm | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|-------------|---|------------|--------------------------|
| | 1 % G A/8 | 0,4 % G A/8 | Slepý pokus (96 % C ₂ H ₅ OH) | 0,4 % WS-7 | Slepý pokus (0,1 % NaOH) |
| <i>Saccharomyces pastorianus</i> | 5 | — | 0 | 0 | 0 |
| <i>Saccharomyces exiguus</i> | 20 | — | 0 | 0 | 0 |
| <i>Torulopsis</i> | 15 | — | 0 | 0 | 0 |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 20 | 15 | 0 | 10 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | — | 0 | 10 | 0 |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | 25 | 15 | 0 | 15 | 0 |

Pro stanovení účinnosti biologických stabilizátorů na kmen *Pediococcus cerevisiae* byla zvolena kultivace v anaerobním obohaceném prostředí pastovaného piva. Posuzované preparáty byly dávkovány ve formě aplikačních roztoků tak, aby se dosáhlo příslušných aplikačních koncentrací. Doba kultivace byla dva dny při 20 °C. Výsledky těchto zkoušek jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Stanovení účinnosti biologických stabilizátorů na kmen *Pediococcus cerevisiae*

| Preparát v koncentraci | Nález po kultivaci |
|------------------------|--------------------|
| G A/8 10 ppm | + + + + + + |
| G A/8 15 ppm | — — + — + — |
| WS-7 12 ppm | + + + + + + |

+ nárůst pediokokků patrný
— nárůst pediokokků nebyl pozorován

Dalším problémem sledovaným v rámci zkoušek bylo posouzení vlivu biologických stabilizátorů na pěnívost piva. Vzhledem k tomu, že běžnými metodami jsme nedošli k jednoznačným výsledkům, byla v PVS Braník pro tento účel vypracována zvláštní metoda pro posouzení pěnívé schopnosti piva. Termínu „pěnívá schopnost piva“ je užito k odlišení od běžně používaného termínu „pěnívost piva“. Pod pojmem pěnívé schopnosti piva rozumí se schopnost piva jako kapalného systému vytvářet pěnu, zatímco pěnívost je schopností piva jako takového vytvářet pěnu a je závislá jednak na pěnívé schopnosti piva a jednak na míře nasycení CO₂. Při použité metodě byla pěnívá schopnost piva charakterizována jednak tvorbou pěny, jednak stabilitou pěny.

Posledním vlivem biologických stabilizátorů, sledovaným v rámci zkoušek, byl vliv na změnu organoleptického charakteru piva. Organoleptické působení biologických stabilizátorů bylo sledováno třetí den po stočení, resp. dávkování stabilizátorů porovnáním piva neupraveného s pivem obsahujícím stabilizátory formou trojúhelníkových zkoušek. Věrohodnost výsledků byla posuzována podle tabulky uváděné *Tilgnerem* [8].

4. Získané výsledky

Sledování změn v celkovém počtu zárodků během prvních 24 hodin uložení vzorků piva ukázalo, že pokles bakterií byl většinou intenzivnější při uložení při 20 °C než při 8 °C, což souhlasí s výsledky získanými *Bendovou* [9] při studiu možností pro přežívání coliformních zárodků v pivě. Jde zde zřejmě o kumulaci vlivu zkoušených preparátů a vlivu teploty. Přitom k celkovému významnějšímu potlačení mikroflory piva došlo až při užití vyšších koncentrací biologických stabilizátorů. Koncentrace 5 ppm se v obou případech ukázala jako málo účinná.

S údaji zjištěnými sledováním změn počtu zárodků v pivě velmi dobře korespondovaly trvanlivosti pív. Nejvyšší prodloužení trvanlivosti 10° piva při 20 °C se projevilo u preparátu GA/8 v koncentraci 15 ppm, kdy se trvanlivost v porovnání s pivem srovnávacím (neupraveným) prodloužila asi o 12 dní. Potom v účinnosti následoval preparát WS-7 v koncentraci 12 ppm s prodloužením asi o 8 dní a nejmenšího efektu (prodloužení trvanlivosti asi o 5 dní) bylo dosaženo při použití preparátu GA/8 v koncentraci 10 ppm.

Při 8 °C byl vzhledem k vyšší přirozené trvanlivosti srovnávacích pív zjištěný efekt biologických stabilizátorů celkově nižší. Nejvyššího efektu se opět dosáhlo při koncentraci GA/8 15 ppm (prodloužení asi o 5 dní), nepatrné zvýšení (asi o 2 dny) bylo zjištěno při koncentraci preparátu GA/8 10 ppm a u preparátu WS-7 v dávce 12 ppm došlo dokonce k mírnému snížení trvanlivosti. Snížení trvanlivosti piva obsahujícího preparát WS-7 však souvisí se značným negativním vlivem tohoto prostředku na koloidní stabilitu piva. Obdobná situace jako při sledování vzniku sedlinky byla zjištěna i při sledování vzniku zákalu.

Mikroskopický nálezný v sedimentech ukázal při vyšších koncentracích preparátů poměrně silné potlačení dlouhých tyčinek a omezení výskytu pediokoků. Barva všech pív obsahujících biologické stabilizátory byla po delším uložení zvýšená asi o 0,1 ml 0,1 N J. Negativní vliv na koloidní stabilitu piva byl výrazně vyšší u preparátu WS-7 než u preparátu GA/8.

Z výsledků získaných při sledování účinku obou posuzovaných biologických stabilizátorů na růst vybraných reprezentantů technologicky škodlivých skupin mikroorganismů vyplynulo toto pořadí účinnosti:

GA/8

Lactobacillus brevis > *Saccharomyces carlsbergensis* = *Saccharomyces exiguus* > *Torulopsis* > *Saccharomyces pastorianus*; *Escherichia coli* = 0

WS-7

Lactobacillus brevis > *Saccharomyces carlsbergensis* = *Escherichia coli*; *Saccharomyces pastorianus* = *Saccharomyces exiguus* = *Torulopsis* = 0

Ze vzájemného porovnání účinku obou preparátů vyplynulo, že GA/8 má širší spektrum působnosti. S výjimkou kmene *Escherichia coli* působil preparát GA/8 na všechny zkoušené mikroorganismy. Růst *Saccharomyces carlsbergensis* byl účinněji potlačován preparátem GA/8, zatímco účinnost obou posuzovaných preparátů na kmen *Lactobacillus brevis* byla stejná. Růst kmene *Pediococcus cerevisiae* byl částečně potlačován pouze preparátem GA/8 v koncentraci 15 ppm. Poněkud odlišné výsledky zjištěné v tomto směru mikroskopickou kontrolou sedimentů jsou zřejmě dány jiným zastoupením kmenů či druhů pediokoků.

Zkoušky mající za úkol prověřit vliv biologických stabilizátorů na pěnivou schopnost piva ukázaly, že tvorba pěny je při koncentraci preparátů WS-7 12 ppm snížena asi o 13 %, stabilita pěny po 2 minutách asi o 15 %, a po 3 minutách dokonce asi o 30 %. Pokles v tvorbě pěny i v stabilitě pěny po přidávce 10 i 15 ppm preparátu GA/8 nebyl naproti tomu prakticky závažný.

Výsledky trojúhelníkových zkoušek ukázaly, že chuťový vliv preparátu GA/8 v dávce 10 ppm je naprosto neprůkazný. V dávce 15 ppm lze vliv preparátu GA/8 prokázat s pravděpodobností, která je nižší než 95 %. U preparátů WS-7 v dávce 12 ppm lze naproti tomu určitý chuťový vliv prokázat s pravděpodobností, která je vyšší než 95 %. Hodnotitelé však shodně konstatovali, že zjišťované chuťové rozdíly byly ve všech případech naprosto nepodstatné.

5. Závěr

Provedené zkoušky s biologickými stabilizátory jednoznačně prokázaly, že touto cestou lze reálně zvýšit biologickou stabilitu piva. Jako nejvýhodnější z hlediska prodloužení biologické stability piva se ukázalo použití preparátu GA/8 belgické firmy Sopura v koncentraci 15 ppm. Při aplikaci GA/8 v uvedené koncentraci se dosáhlo u 10° piva asi 12denního zvýšení trvanlivosti při 20 °C, přičemž negativní důsledky aplikace tohoto preparátu nepřesáhly únosnou hranici. V souhlase s nejvyšším efektem při prodloužování trvanlivosti vykázal tento preparát při speciálních testech i nejširší spektrum působnosti na technologicky škodlivé mikroorganismy. Ve prospěch preparátu GA/8 hovoří i nízká toxicita zjištěná *Loncinem*. Použití preparátu GA/8 se konečně zdá únosné i z ekonomického hlediska. Při dávce 15 ppm by náklady na vlastní preparát dosáhly přibližně 1,25 Kčs/hl piva.

Preparát WS-7 firmy Wallerstein má naproti tomu podle provedených zkoušek nižší efekt v prodloužení biologické stability piva a vykazuje řadu vedlejších negativních vlivů. Jde především o snížení tvorby a stability pěny a o snížení koloidní stability piva. Z těchto důvodů nelze proto podle provedených zkoušek preparát WS-7 považovat za vhodný pro naše podmínky.

Literatura

- [1] MÖNCH, G.: Brauwiss. 14, 1961, s. 257.
- [2] LONCIN, M.: Revue Ferment. Ind. Alim. 21, 1967, s. 229.
- [3] SILBEREISEN, K., WAGNER, B. W.: Monatsschr. f. Brauerei 23, 1970, s. 32.
- [4] RINKE, W.: Brauwelt 107, 1967, s. 444.
- [5] PORTNO, A. D.: J. Inst. of Brew. 74, 1968, s. 291.
- [6] COURTNEY, J. M.: Tech. Quarterli 4, 1967, s. 174, ref. Wall. Lab. Comm. XXXI, 1968, s. 83.
- [7] BRENNER, M. W., IFFLAND, H.: Tech. Quarterli 3, 1966, s. 79, ref. J. Inst. of Brew. 73, 1967, s. 79.
- [8] ČUŘÍN, J.: Kvasný průmysl 13, 1967, s. 51.
- [9] BENDOŤ, O.: Závěrečná zpráva VÚPS Praha, ev. č. ob. 31 z r. 1968.