

Faktory ovlivňující pěnivost piva

663.4 663.443.4

Ing. IVO HLAVÁČEK, CSc., Ing. PAVEL PRŮCHA, Ing. JIŘÍ ŠROGL, Západočeské pivovary, k.p., Plzeň

Klíčová slova: pivo, pěna, pěnivost, rozpad, bílkoviny, molekulová hmotnost, isohumulon, mastné kyseliny, fyzikálně chemická změna, gelová chromatografie, trvanlivost, koncentrace, destrukce

Předneseno na XXIII. pivovarsko-sladařském semináři ve dnech 21. a 22. listopadu 1986 v Plzni

Při extrémním zjednodušení je možno pěnivost piva označit jako funkci dvou proměnných, tzn. obsahu CO_2 a složení extraktu. Tato jednoduchá závislost se však podstatně změní, uvědomíme-li si, že pod pojmem pěnivost piva zahrnujeme tvorbu, strukturu, ulpívání i charakter rozpadu pěny. Za uvedené jevy jsou zodpovědné vztahy mezi desítkami, možná několika sty povrchově aktivních látek.

Složitost tohoto problému spočívá mj. již ve skutečnosti, že pivovarský svět dosud nemá vhodnou analytickou metodu, která by s dostatečnou objektivností, přesně a reprodukovatelně postihla všechny uvedené aspekty pěny tak, jak se jeví pohledu konzumenta po nalití do sklenice.

Pro identifikaci pěnově pozitivních látek a měření stability pěny jsme vybrali *Rosse a Clarkovu metodu* [1], publikovanou již v roce 1939, která doznala v různých modifikacích značného rozšíření a uznání, neboť se dostala i do kodexu analytických metod americké společnosti pivovarských chemiků „ASBC“ a figuruje i ve sborníku střeoevropské analytické komise „MEBAK“.

Rosse-Clarkův výraz

$$\Sigma = \frac{150}{2,303 \log \frac{b+c}{c}}$$

popisující rozpad pěny rovnicí I. řádu, analogickou pro monomolekulární reakce, vyhovuje pouze exponenciálnímu průběhu, což nemusí být vždy splněno zejména v okrajových podmínkách. Jak upozornili mnozí kritici Rosse-Clarkovy metody, udává uvedený vztah střední dobu, po kterou je tekutina v pění a nemá význam, který se mu obvykle přikládá, tj. střední dobu životnosti bublinek pěny.

Uvedený vztah se nám stal inspirací v naší další práci poté, co jsme si uvědomili, že hodnota sigma je z uvedeného matematického vztahu nejvíce závislá na velikosti veličiny c ve zlomku

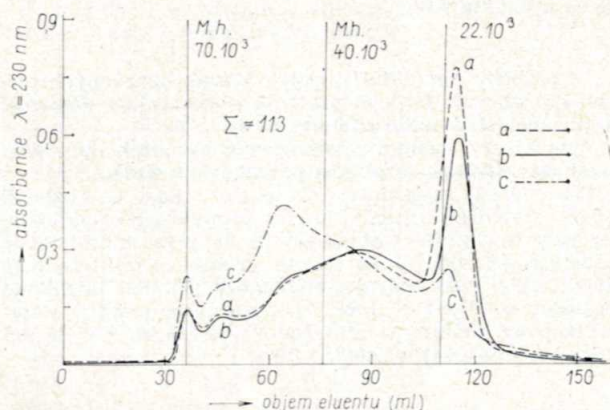
$$\frac{b+c}{c}$$

Princip Rosse-Clarkovy metody spočívá v rozpěnění

100 ml piva vytemperovaného na 20 °C oxidem uhličitým fritou za standardních podmínek po dobu 60 s. Po rozpěnění se prvý vyloučený podíl piva odděluje nadvakrát do 60 s po rozpěnění. Tento podíl označujeme písmenem *a*. Ve středním intervalu rozpadu, trvajícím 150 s s předpokládáním exponenciálního průběhem, se vylučuje a měří velikost podílu *b* a poslední zbytek nejtrvanlivějšího podílu pění je označován jako podíl *c*.

Vzhledem k tomu, že zatím neznáme metody pro měření dynamiky jevů probíhajících na fázovém rozhraní, vycházeli jsme při snaze o identifikaci pěnově pozitivních látek z úvahy, že v podílech *a*, *b*, *c*, budou kvalitativní i kvantitativní změny, které mohou „ex post“ poskytnout informace o úloze a roli jednotlivých skupin pěnových látek pro pěnívost piva. Pro určení zastoupení proteinových frakcí jsme zvolili osvědčenou a dostupnou gelovou chromatografii na Sephadexu G 75, který dělí proteiny v intervalu relativních molekulových hmotností 3 000 až 70 000. Vzorky ze všech podílů se nejprve dialyzovaly 24 hodin proti tekoucí vodě dialyzační membránou s vylučovacím limitem 10 000.

Obrázek 1 zachycuje gelové chromatogramy jednotlivých podílů *a*, *b*, *c*, ze vzorku piva s hodnotou pěnívosti sigma 113 j. Pro vymezení pásem s určenou relativní molekulovou hmotností jsme použili dělení bílkovinných standardů ve směsi: hovězí albumin, ovalbumin a inaktivovaný papain s relativními molekulovými hmotnostmi, 68 000, 40 000 a 22 000.



Obr. 1. Gelový chromatogram *a*, *b*, *c*, frakcí 12% stabilizovaného tuzemského piva

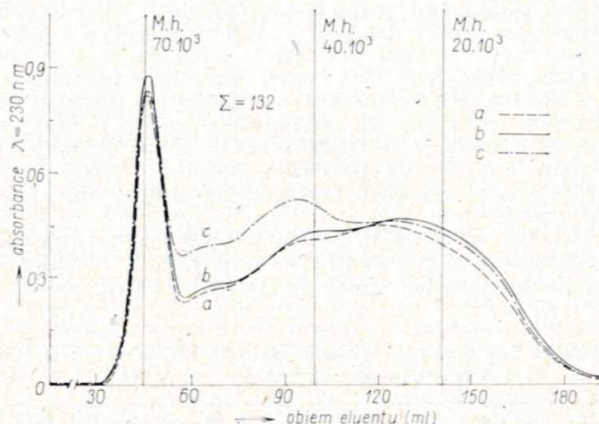
výška sloupce Sephadexu G 75—90 cm, Ø kolony 1,5 cm, eluent NaCl 0,01 mol. l⁻¹, rychlost průtoku 1 ml. min⁻¹

Jak je zřejmé z velikostí ploch vymezených křivkami, je obsah i kvalitativní zastoupení proteinových látek podle jejich relativní molekulové hmotnosti v jednotlivých podílech piva vyloučeného z pěny značně diferencované. V chromatogramu dominují u podílu *c* vrcholy v oblasti relativních molekulových hmotností nad 70 000, dále v pásmu 50 000 a 20 000.

Průběhy křivek z podílu *a*, *b*, jsou v oblastech relativních molekulových hmotností nad 35 000 prakticky shodné. Významné rozdíly jsou v oblasti relativních molekulových hmotností 20 000, kde obsah bílkovinných látek stoupá od podílu *c* k podílu *a*.

Odlišné průběhy křivek z gelové chromatografie byly nalezeny ve vzorku zahraničního piva (obr. 2). Hodnota sigma byla u tohoto piva 132 jednotek a pivo bylo možno i podle subjektivního hodnocení označit jako dobře pěnívé. Od výrobce tohoto piva jsme měli informace, že používá vysoký stupeň surogace ječmenem a že pivo není stabilizováno pro zvýšení koloidní stability. Na prvý pohled je patrný vyšší obsah složek celého spektra bílkovin a menší diferenciací proteinů.

Nepřekvapuje vysoký obsah bílkovinných frakcí s relativní molekulovou hmotností větší než 70 000 s ohledem na použitou technologii. Kvantitativní rozdíl v této oblasti molekulových hmotností se mezi podíly *a*, *b*, *c*, neprojevil



Obr. 2. Gelový chromatogram *a*, *b*, *c*-frakcí zahraničního nestabilizovaného piva s vysokou dávkou surogátu

a proti předcházejícímu vzorku piva se nezvětšila koncentrace v podílu *c*. Stejně jako u předchozího vzorku piva je výrazný růst v podílu *c* u bílkovinných složek s relativní molekulovou hmotností nad 30 000 s částečně patrnou diferenciací a maximem kolem 50 000.

Významně odlišný průběh obou vzorků je i v oblasti kolem 20 000, kde u zahraničního piva mezi podíly *a*, *b*, *c*, není žádný rozdíl a není z předcházejícího vzorku očekávané maximum.

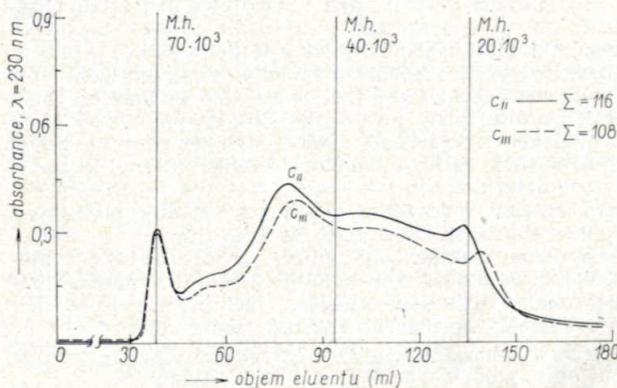
Pro další pokusy jsme vybrali piva, u nichž byla sladina připravena dvourmutovým, resp. třířmutovým způsobem. Hodnoty pěnívosti sigma činily 116 jednotek u dvourmutového vzorku piva proti 108 jednotkám u třířmutového piva.

Jak ukazuje obr. 3, lze ze shodnosti průběhu obou chromatogramů usuzovat na kvalitativně stejné zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí. Porovnání velikostí ploch v oblasti relativních molekulových hmotností pod 70 000 vyznívá mírně ve prospěch vzorku piva připraveného dvourmutovým způsobem.

S ohledem na zatím omezený rozsah experimentů je nutno při formulaci závěrů z provedených šetření postupovat opatrně. Z dosažených výsledků se prokázalo, že v pivu se nachází spojitě spektrum proteinů s různou molekulovou hmotností, které se v posledním *c* podílu pěny zřetelně diferencuje ve prospěch proteinů s relativní molekulovou hmotností větší než 30 000.

Hodnotám sigma byly úměrné velikosti ploch chromatogramů z podílu *c*.

Při porovnání velikostí ploch chromatogramů jednotlivých podílů *a*, *b*, *c*, při kterém vezmeme v úvahu i velikosti jejich objemů, které činí obvykle u *a* 65—75 ml. u *b* 20—25 ml, u *c* 5—10 ml, můžeme



Obr. 3. Gelový chromatogram *c*-frakcí vzorků piva připravených dvourmutovým a třířmutovým postupem

dojít k závěru, že pivo má dostatečný obsah bílkovinných pěnově pozitivních látek a že v mechanismu a v míře jejich rozdělení mezi kapalinu a pěnu, které ovlivňují hodnotu sigma, musí hrát významnou roli i další faktory.

V dalším šetření jsme tedy zaměřili pozornost na isohumulony, které jak ukázali Windisch [2], Kloppe [3], [4], Asano [5] a další, vykazují silnou povrchovou aktivitu, tzn. snižují povrchové napětí, a v komplexu s bílkoviny zvyšují povrchovou viskozitu a tím i stabilitu pěny.

Z tohoto pohledu bylo tedy účelné zjistit rozdělení isohumulonů mezi jednotlivými podíly a, b, c, získané při stanovení stability pěny Rosse-Clarkovou metodou.

Tabulka 1. Koncentrace isohumulonů ve frakcích a, b, c z různých vzorků pív

	Pěnovost [1] (Σ)	Isohumulony (MJH)
Pivo A		
podíl a	139	41
podíl b		33
podíl c		37
		100
Pivo B		
podíl a	105	35
podíl b		30
podíl c		35
		117
Pivo C		
podíl a	132	21
podíl b		19
podíl c		21
		61

V tabulce 1 jsou uvedeny rozborů tří vzorků pív s výrazně odlišnou hodnotou sigma. Obsah isohumulonů je v podílu a nižší oproti původnímu pivu, v podílu b je přibližně shodný a v podílu c se značně zvyšuje. Lze oprávněně předpokládat, že isohumulony, které výrazně snižují povrchové napětí, budou pro tvorbu i stabilitu pěny významné, i když v námi provedených šetřeních neměly obsahy isohumulonů k hodnotě pěnovosti sigma přímý vztah. Ověřili jsme si, že na každé přidané 4 MJH nad hodnotu 40 MJH se snižuje povrchové napětí zhruba o 0,35 m N. m⁻¹.

Pěnový efekt zvýšeného obsahu isohumulonů jsme však měli možnost prokázat u fenomenu ulpívání pěny na stěně sklenice. Bohužel, již přidavek 4 MJH isohumulonů ve formě izomerizovaného extraktu vedl ke změně charakteru hořkosti pokusného vzorku piva.

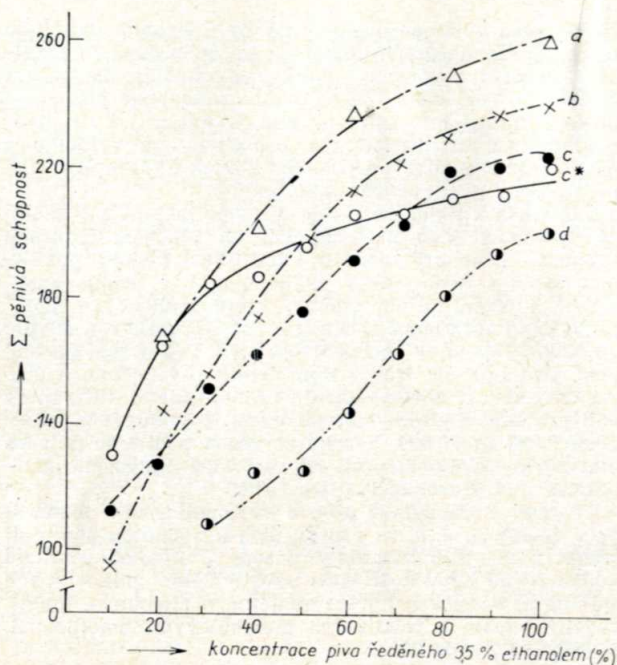
Třetí velkou skupinou povrchově aktivních látek jsou lipidy. Negativní vliv tuků i látek fyzikálněchemicky podobných tukům na pěnovost piva je dostatečně znám. Příčinou této skutečnosti je vysoká povrchová aktivita lipidů, která jim umožňuje vytěsnit pěnotvornou látku, např. bílkoviny z povrchového filmu. Lipidy však tvoří film z hlediska stability zcela nevhodných vlastností, ať již vlivem malé pružnosti a pevnosti či nízké odolnosti proti pronikání plynu.

Pro studium destruktivních vlivů lipoidních látek obsažených v pivu, mezi něž patří vedle vyšších mastných kyselin i nižší mastné kyseliny, jejich estery, neutrální glyceridy, vyšší alkoholy a fosfolipidy, jsme použili test publikovaný Robertsem [6]. Podle této metody lze hodnotit stabilitu pěny piva z charakteristické křivky pěnovosti získané ze závislosti hodnot stability pěny na stupni zředění piva 3,5 % ethanolom. Průběh křivky je podle autorů determinován jak koncentrací, tak fyzikálním stavem molekul v povrchovém filmu a indikuje přítomnost lipidů nebo látek chovajících se jako tuky.

Uvedenou metodu jsme použili pro otestování pív, která vykazovala rozdílnou kvalitu pěny, při hodnocení podle námi používaného způsobu, tzv. pěnové schopnosti [7]. Výsledky uvedených rozborů jsou na obr. 4.

Průběhy charakteristických křivek lze interpretovat ve smyslu hypotéz práce Robertse et al. takto:

— pěnovost pív, kterým odpovídají průběhy křivky a, b, je možno označit jako dobrou, i když se liší absolutně hodnotami pěnové schopnosti;



Obr. 4. Průběhy „charakteristických“ křivek u vybraných druhů piva

— průběhy charakteristických křivek označených písmeny c, d, jsou typické pro piva s narušenou pěnovostí a s hrubou strukturou bublinek pěny.

Tyto křivky indikují relativně vysoký obsah lipoidních látek narušujících strukturu povrchového filmu.

Pro ověření funkčnosti tohoto testu jsme se rozhodli použít stabilizátoru pěny na bázi propylenglykolalginátu. Po přidání 3 g. hl⁻¹ stabilizátoru do piva nedostatečně pěnového (křivka c) se změnil průběh charakteristické křivky, který se vlivem stabilizátoru přiblížil ideálnímu průběhu — křivka c* (obr. 4). Zároveň se zlepšila i stabilita pěny hodnocená metodou Rosse-Clarka, což je dokumentováno údaji v tabulce 2.

Tabulka 2. Hodnoty pěnovosti piva bez a po přidání stabilizátoru pěny

Dávka stabilizátoru pěny (g. hl ⁻¹)	Pěnovost [1] (Σ)
Pivo C: 0	108
1	110
3	117
Pivo B: 0	119
1	120
3	122

Pro ověřování event. negativních vlastností přidávaného stabilizátoru pěny byly vzorky piva podrobeny tepelnému šokování pro předpověď koloidní stability a zároveň byla stanovena i skutečná trvanlivost.

Výsledné šetření prokázalo, že při aplikaci stabilizátoru se významně snižuje koloidní stabilita. Přidávkem propylenglykolalginátu klesla koloidní trvanlivost na třetinu původní hodnoty.

Porovnáním stabilizačního efektu u piva s nízkou pěnovostí a u piva s relativně dobrou stabilitou lze vyvodit závěr, že efekt stabilizace pěny se více uplatní u pív s horší pěnovostí (pivo C). Zlepšení čísla pěnovosti u piva označeného jako B nebylo významné.

Na základě výsledků těchto šetření, která prokázala, že u pív se zhoršenou pěnovostí lze předpokládat zvýšený obsah lipoidních látek mající destruktivní vliv na stabilitu pěny, byly provedeny analýzy dvou vzorků pív s dobrou

a zhoršenou pěnovostí na obsah nižších mastných kyselin. Výsledky rozboru uvádí *tabulka 3*.

Tabulka 3. Obsah nižších mastných kyselin

		Pivo	
		pěňivé	nepěňivé
kyselina hexanová	mg . l ⁻¹	7,7	12,1
kyselina oktanová	mg . l ⁻¹	10,3	22,0
kyselina dekanová	mg . l ⁻¹	3,8	7,8
celkem	mg . l ⁻¹	21,6	41,9

Pro potvrzení negativního vlivu nižších mastných kyselin na pěnovost piva jsme provedli modelové pokusy s přidávkou kyseliny hexanové (kapronové) a dekanové (kaprinové) v množství odvozeném z rozdílu obsahu těchto látek v pěňivém a nepěňivém vzorku piva. Rozbory pěnovosti byly provedeny ve dvou časových obdobích (5. den po stočení a 30. den po stočení). Důvodem bylo ověření hypotézy z již zmíněné práce Robertse, který uvádí, že míra působení lipidních látek je funkcí jak koncentrace, tak fyzikálně chemického stavu v roztoku, tzn. času, který je nutný k eliminaci molekul lipidů z fázového rozhraní plyn-kapalina.

V *tabulce 4* je zachycen vliv přidávky kyseliny hexanové a kyseliny dekanové na pěnovost.

Tabulka 4. Vliv hodnoty pěnovosti piva v závislosti na přidávce nižších mastných kyselin a stáří piva od stočení

	Pěnovost [1] (Σ)		
	srovnávací pivo	kys. hexanová 2,4 mg . l ⁻¹	kys. dekanová 2,4 mg . l ⁻¹
5. den po stočení	104	98	103
30. den po stočení	116	121	106

Výsledky pokusů potvrdily určitý destruktivní efekt obou nižších mastných kyselin na penu piva a současně potvrdily hypotézu o pozitivních změnách ve složení povrchového filmu a tím i pěnovosti v průběhu skladování piva. Zlepšených hodnot pěnovosti se dosáhlo nejen u piva s přidávkou mastných kyselin, ale zároveň i u srovnávacího piva.

Z výsledků našich šetření můžeme tedy potvrdit, že negativní vliv lipidních látek závisí jak na koncentraci, tak na jejich fyzikálním stavu. Pivo s nevyhovující trvanlivostí pěny se může výrazně zlepšit po dosažení fyzikální rovnováhy mezi lipidy a ostatními makromolekulami přítomnými v pivu. Příznivý účinek propylen-glykolalginátu lze uspokojivě vysvětlit jeho interakcí s bázičnými proteiny ve stěně lamely pěny. Podobné vlastnosti byly popsány i u β-glukanu, který byl extrahován ze stěn buněk endospermu ječného zrna a po přidání do piva zvyšoval stabilitu pěny více, než bylo možno vysvětlit z pouhého zvýšení viskozity.

Literatura

- [1] ROSS, S., CLARK, G. L.: Wallerstein Lab. Comm. 2. 6. 1939 s. 46
- [2] WINDISCH, W., KOLBACH, P., BÄNHOLZER, W.: Mschr. Brau. 43, 1926, s. 241
- [3] KLOPPER, W. J.: Brauwelt, 110, 1970, s. 1807
- [4] KLOPPER, W. J.: Proc. EBC, Salzburg, 1973, s. 363
- [5] ASANO, K., HASHIMOTO, N.: Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd., 19, 1976, s. 9
- [6] ROBERTS, R. T., KEENEY, R. J., WAINWRIGHT, T.: J. Inst. Brew. 84, 1978, s. 9
- [7] ŠROGL, J., PRŮCHA, P.: Kvas. prům., 25, 1979, s. 73

Lektoroval Ing. J. Šavel, CSc.

Hlaváček, I. - Průcha, P. - Šrogl, J.: Faktory ovlivňující pěnovost piva. Kvas. prům. 33, 1987, č. 5, s. 134—137.

Určením relativních molekulových hmotností bílkovin pomocí gelové chromatografie se podařilo prokázat, že ve třech frakcích piva získaných z rozpadu pěny piva při stanovení její trvanlivosti metodou Rosse a Clarka, jsou výrazné difference v obsahu bílkovin.

Nejtrvanlivější podíly pěny měly zjevně zvýšenou koncentraci proteinů s relativní molekulovou hmotností od 35 000 do 70 000, s maximem okolo 50 000. Tyto podíly pěny měly rovněž 3krát až 4krát vyšší koncentrace isohumulonů ve srovnání s původním pivem. Modelovými pokusy byl zjištěn destruktivní účinek mastných kyselin na penu piva a experimentálně byl prokázán jev zlepšení pěnovosti vlivem fyzikálně chemických změn, které nastávají při skladování již stočeného piva.

Главачек, И., Пруха, П., Шрогл, И.: Факторы, оказывающие влияние на пенность пива. Квас. прум. 33, 1987, № 5, стр. 134—137.

При помощи определения относительных молекулярных масс белков путем гель-хроматографии удалось доказать, что в трех фракциях пива полученных из распада пены при определении её долговечности методом Россе и Кларка, встречаются важные различия в содержании белков. Наиболее устойчивые части пены отличались выразительным повышенной концентрацией протенинов с относительным молекулярным весом от 35 000 до 70 000, с максимумом около 50 000. Эти части пены также имели в 3 и 4 раза выше концентрацию изогумулонов по сравнению с исходным пивом. Модельными экспериментами был определен деструктивный эффект жирных кислот, оказанный на пену пива, и экспериментально был доказан феномен улучшения пенности под действием физико-химических изменений, которые происходят при хранении уже перелитого пива.

Hlaváček, I. - Průcha, P. - Šrogl, J.: Factors Affecting Beer Foaming. Kvas. prům. 33, 1987, No. 5, pp. 134—137.

The relative molecular weights of proteins were determined by gel chromatography. Three beer fractions obtained from the foam breaking during a determination of the foam stability by Ross and Clark method were analyzed using the above mentioned method. Significant differences in the protein level were obtained from these fractions. The increased protein concentration with the relative molecular weights from 35 000 to 70 000, with the maximum about 50 000, were found in the most stable fraction of the foam. Also isohumulone concentration in these fractions was 3 to 4 times higher in comparison to the original beer. Using model experiments a destructive effect of fatty acids on beer foam was detected. In addition, a phenomenon of the better beer foaming due to physico-chemical changes that occur during the storage of the beer was found, too.

Hlaváček, I. - Průcha, P. — Šrogl, J.: Faktoren, die die Schaumfähigkeit des Bieres beeinflussen. Kvas. prům. 33, 1987, Nr. 5, S. 134—137.

Durch Bestimmung der relativen Molekülmasse der E.weißstoffe mittels Gelchromatographie konnte bewiesen werden, daß bei drei Fraktionen des Bieres, die bei der Bestimmung der Schaumstabilität nach der Methode Ross und Clark aus dem Zerfall des Bierschaumes gewonnen wurde, markante Differenzen in dem Eiweißgehalt bestehen.

Die stabilsten Schaumanteile waren durch eine erhöhte Konzentration der Proteine mit relativer Molekülmasse von 35 000 bis 70 000, mit einem Maximum um 50 000 gekennzeichnet. Diese Schaumanteile wiesen weiter auch eine 3 bis 4mal höhere Konzentration der Isohumulone im Vergleich mit dem Ausgangsbier auf. In Modellversuchen wurde die destruktive Wirkung der Fettsäuren auf den Bierschaum festgestellt. Experimentell wurde das Phänomen der Schaumfähigkeitsverbesserung unter dem Einfluß der physikalisch-chemischen Veränderungen bestätigt, die bei der Lagerung des abgefüllten Bieres verlaufen.