

S rychle se rozšiřujícím expeditivnějším lahvo-  
vým balením piva nabývá stále více na důležitosti  
úkol podstatně zvýšit jeho koloidní stabilitu. Tento  
problém je zvláště akutní u exportních druhů lahvo-  
vých piv, u nichž je zahraničními zákazníky často  
vyžadována koloidní stabilita až jeden rok. Avšak  
i domácí konzument žádá čím dál, tím více piva  
lahvová s vysokou stabilitou. Z těchto důvodů je  
nutno technologii lahvového piva věnovat mno-  
hem větší péči než běžným výčepním druhům piv,  
neboť piva lahvová jsou vystavena více nepřízní-  
vým vlivům než piva sudová.

Z organoleptického a fyzikálně chemického hle-  
diska se u lahvového piva požaduje zejména jiskr-  
nost, biologická stálost, fyzikálně chemická stálost,  
neměnná vůně a chuť a dostatečná pěnivost [1].

## A. Dělení zákalů piva

Za předpokladu, že většina vícestupňových piv,  
mimo ta, která jsou určena brzkému konzumu, se  
pasteruje, můžeme problém biologické stálosti za-  
nedbat a blíže si povšimnout problému uchování  
zbývajících žádaných vlastností lahvového piva.  
Všechny zbývající faktory stability jsou již závislé  
na dokonalosti filtrace, vnitřní extraktové stavbě  
piva a podmínkách uchovávání. Celý problém fyzi-  
kálně chemické stability piva se dnes shrnuje pod  
pojmem „nebiologické zákalý“ piva.

Klasifikace a terminologie této skupiny zákalů je  
velmi rozdílná, neboť vesměs vznikala na základě

\*) Stručný výtah z obsáhlejší studie, která bude uveřejněna ve  
Sborníku VŠCHT v Praze, Oddíl fakulty potravinářské technologie.

zkoumání jednotlivých, pro ten který pivovar spe-  
cifických zákalů. Stručně je uvedeno jen dvoje  
rozdělení, které podle našeho soudu dobře posti-  
huje charakter, původnost a metodickou přístup-  
nost ke zkoumání těchto zákalů.

De Clerck [2] dělí veškeré zákalý piva na tři  
skupiny:

I. *Biologické zákalý* — vzniklé rozvojem zbylých  
či kontaminujících kvasinkovitých a bakteriálních  
mikroorganismů v pivě.

II. *Koloidní zákalý* — vzniklé vyvločkováním  
koloidů jejich přirozeným stárnutím.

III. *Chemické zákalý* — vzniklé koagulací ko-  
loidů chemickými kontaminanty piva.

Máme-li na mysli dlouhodobou stabilitu pastero-  
vaných piv, nepřichází prakticky v úvahu první  
skupina zákalů, tj. zákalý biologické. Při dodržení  
dostatečné provozní hygieny a sanitace nepřichází  
běžně v úvahu ani třetí skupina zákalů, tj. zákalý  
chemické. Proto podle této klasifikace, které se  
bude dále používat, zůstává ve většině případů  
k řešení toliko druhá skupina zákalů, tj. zákalý  
koloidní, a to v plném rozsahu provozních, trans-  
portních a skladovacích podmínek.

Které speciální druhy zákalů mohou v podstatě  
v této skupině vznikat, ukazuje Lüers [3], který  
dělí nebiologické zákalý piva na:

1. Bílkovinné zákalý,
2. Kovové zákalý,
3. Škrobové nebo dextrinové zákalý,
4. Oxalátové zákalý,



5. Zákalý způsobené chmelovými pryskyřicemi,
6. Zákalý způsobené pryskyřičnými oleji a smolou.

Bílkovinné zákalý samotné dělí Helm [4] dále na chladové a oxydační zákalý, zatímco Lüers [5] a Enders [6] je dělí na:

- a) čistě bílkovinné zákalý,
- b) tříslóbílkovinné zákalý (chladové a oxydační zákalý),
- c) kovo-bílkovinné zákalý.

Za výstižné a běžné praxi velmi blízké autoři pokládají bližší dělení bílkovinných zákalů piva podle Pawlowského a Doemense [7], kteří je dělí na:

1. Chladové zákalý rozpustné teplem,
2. Teplem nerozpustné bílkovinné zákalý, jež možno podle příčiny vzniku dále dělit na:
  - a) bílkovinný zákal,
  - b) pasterační zákal,
  - c) kovo-bílkovinný zákal.

Toto poslední dělení velmi dobře postihuje v praxi nejčastěji se vyskytující druhy nebiologických zákalů piva. Dnes, kdy příčiny vzniku bílkovinných, resp. tříslóbílkovinných zákalů piva jsou již dostatečně prozkoumány, obvykle nedělíme teplem irreverzibilní zákalý na bílkovinné, pasterační, kovo-bílkovinné, oxydační, zákalý vzniklé slunečním zářením, pohybem atd., protože tyto faktory nepůsobí zpravidla jednotlivě, izolovaně, nýbrž společně a podmíněně. Postupným poznáváním příčin a charakteru běžných koloidních zákalů piva se stále více zužuje jejich terminologický rozsah na dva druhy zákalů, resp. na dvě stadia tvorby tříslóbílkovinného zákalu. Prvním stadiem je reverzibilní chladový zákal, druhým stadiem je postupný přechod reverzibilního chladového zákalu přirozeným koloidním stárnutím, jehož rychlost je závislá na dříve uvedených podmínkách, v irreverzibilní trvalý tříslóbílkovinný zákal.

Z dosud uvedeného lze již dostatečně usoudit, že za běžných technologických podmínek převládají typy bílkovinných, resp. tříslóbílkovinných zákalů. Abychom lépe porozuměli charakteru a příčinám vzniku těchto zákalů, všimněme si blíže chemických a fyzikálně chemických vlastností jejich převládajících složek, tj. bílkovin, tříslovin, sacharidů a minerálních látek, běžně obsažených v pivovarských surovinách, a vlivu některých fyzikálních či fyzikálně chemických faktorů na koloidní stabilitu piva.

### B. Bílkoviny

Bílkoviny ječmene, resp. sladu, jsou po škrobu jeho druhou hlavní extraktivní složkou. Ječmeny podle odrůdy, ročníku, klimatu a půdních podmínek obsahují 7 až 17 %, event. až 30 % [8] bílkovin. Sladovnické ječmeny obsahují obvykle 9 až 12 % bílkovin.

Osborn [9] v roce 1895 rozdělil ječné bílkoviny frakcionací ve vodných, solných a lihových rozpouštědlech do čtyř skupin:

1. albumin (leukosin) rozpustný ve vodě,
2. globulin (edestin) rozpustný ve zředěných solných roztocích,
3. prolamin (hordein) rozpustný v 70% etylalkoholu,
4. glutelin rozpustný v silně alkalickém prostředí.

O těchto bílkovinných frakcích se dlouho soudilo, že jsou více méně homogenními látkami ve

smyslu fyzikálně chemickém. Teprve kombinováním použitím moderních analytických metod, jako elektroforézy, papírové chromatografie a ultracentrifugace se dosáhlo postupně dalšího dělení každé ze čtyř uvedených skupin. Je to především zásluhou Bishopa [10, 11], Biserta a Scribana [12, 13], Rondeleta a Lontieho [14], Quensela [15, l. c. 17], Ayrapäa a Nihlena [16], Waldschmidt-Leitze [17, 18] a jiných.

O některých směrech pohybu bílkovin v průběhu technologického pivovarského procesu (z hlediska koloidní stability piva) bylo v tomto časopise nedávno pojednáno M. Kotrlou [19]. Proto budou o bílkovinách dále uvedena jen nutná a autorkou nepostížená nebo méně postižená fakta, potřebná k souvislosti tohoto článku.

Na základě poznatků výše uvedených autorů bylo možno sestavit přehlednou tabulku o fyzikálně chemických vlastnostech jednotlivých bílkovinných složek ječmene.

Jednotlivé bílkovinné frakce, uvedené v tabulce 1, byly podrobeny totální hydrolýze [26, 17] a byl v nich stanoven kvalitativní a kvantitativní obsah základních stavebních složek bílkovin, tj. aminokyselin (tabulka 2).

Z porovnání obsahů jednotlivých aminokyselin v uvedených frakcích je zřejmé, že albumin a globulin jsou proti hordeinu mnohem bohatší na kyselinu asparagovou, globulin proti právě uvedeným vyšším obsahem cystinu, jehož relativní obsah se ještě zvyšuje u podfrakce  $\beta$ -globulinu. Pro hordein je významný zejména vysoký obsah kyseliny glutamové a prolinu.

Tato charakteristická zjištění umožňují sledovat technologický význam jednotlivých bílkovinných frakcí a jejich fragmentů, vzniklých proteolýzou při sladování, rmutování, event. umělým zásahem stabilizačními proteolytickými preparáty ve stadiu dokvašování. Podobnou dedukcí usuzuje Waldschmidt-Leitz [17], že proteinová část chladového zákalu je tvořena hordeinovými fragmenty.

U jednotlivých bílkovinných frakcí byly stanoveny také koncové aminokyseliny. Působením aminopolypeptidázy [17] se např. zjistilo, že pro albuminovou frakci je charakteristická N-koncová aminokyselina serin, pro frakci globulinu glykokol a pro frakci hordeinovou isoleucin. Toto zjištění je dosti překvapující, neboť říká, že buď všechny jednotlivé složky daných frakcí vykazují tytéž koncové stavební aminokyseliny, tedy všech pět složek hordeinu začíná isoleucinem, všechny čtyři složky globulinu glykokolem a albuminy serinem, nebo že dané aminokyseliny jsou v takovém přebytku, že jsou přednostně odštěpovány.

Impulsem k zintenzivnění výzkumu chemických a fyzikálně chemických vlastností v pivovarství významných bílkovinných frakcí byla Sandegrenova hypotéza v první formulaci z roku 1947 [24, 27], která říká, že podstatou nebiologických zákalů piva, zejména chladových, je ječný  $\beta$ -globulin, resp. jeho štěpné fragmenty s molekulární vahou asi 30 000. Jedním z podnětů této hypotézy [23, 28] byl korespondující obsah síry  $\beta$ -globulinu a zkoumaných chladových zákalů piva.

Významným přínosem v řešení bílkovinné problematiky chladového zákalu piva je práce Waldschmidt-Leitze, přednesená na kongresu EBC v Kodani 1957 [18]. Autor frakcionoval chladové zákalý etylalkoholem, v němž se rozpustilo 60 až 85 % původních zákalů. Kvalitativním a kvantitativním



Tabulka 1

Přehled fyzikálně chemických vlastností bílkovinných frakcí ječmene [20]

Frakce	Molekulární váha	% obsah síry	Isoel. bod pH	% z celkového dusíku sušiny ječného zrna			Rozpustnost
				Švédsko *)	Anglie [10]	Francie [21]	
Nebílkoviny (proteózy, peptidy, aminokyseliny, atd.)				8—10	6—7	12	ve vodě
Albuminy (A, B) lit. [12]	54 000	1,4	5,75	6—8,7	8—10	11	ve vodě
Globulin: $\alpha$	26 000	cca 1,6	5,00	cca 3,5	•	•	v solných roztocích
Globulin: $\beta$	cca 100 000	2,0	4,90	3,6—5,0	•	•	v solných roztocích
Globulin: $\gamma$	cca 186 000	cca 1,6	5,70	cca 2,5	•	•	v solných roztocích
Globulin: $\delta$	cca 300 000 lit. [13]	•	•	stopy 9,6—11	•	•	v solných roztocích
Globuliny celkově	•	•	•	•	18—30	11	v solných roztocích
Hordeiny a, b, c, d, e lit. [22]	27 500	celk. $\phi$ 0,83 lit. [23]	•	•	22—35	•	v alkoholu
Glutelin	•	•	•	•	30—33	•	

Nejnovější poznatky v albuminech ječmene byly předneseny na Kongresu EBC ve Vídni [82, 83] v r. 1961.

Ve sladu jsou isoel. body některých proteinů posunuty až k pH = 4,5. Sladováním se zvyšuje polarografická aktivita albuminu [25].

\*) [24 i. c. 34]

stanovením základních stavebních složek této alkoholové frakce, určením její molekulové váhy, jež se pohybovala okolo 10 000, jejím enzymovým štěpením a elektroforetickou studií *Waldschmidt-Leitz* zjistil, že hlavní část v alkoholu rozpustné bílkoviny chladového zákalu odpovídá podle základních stavebních složek a fyzikálně chemického charakteru určitému fragmentu ječné hordeinové frakce, s velkou pravděpodobností  $\delta$ -hordeinu, resp.  $\delta + \epsilon$ -hordeinu.

Nakonec je třeba se ještě zmínit o bílkovinných frakcích v terminologii *Johnstonové* [29] a jejich významu v koloidní stabilitě piva. *Johnston* dělí srážení  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bílkoviny piva do čtyř frakcí:

a) protein *T* — k chladu citlivý tanin-globulinový komplex se 48 až 68 % bílkovin,

b) protein *C* — koagulovatelný albumin, oxyduje se na protein *O*,

c) protein *O* — oxyprotein nebo nukleoproteid,

Tabulka 2

Základní stavební složky bílkovinných frakcí ječmene

Aminokyselina	Celkový albumin lit. [17]	Celkový globulin lit. [17]	$\beta$ -globulin lit. [28]	Celkový hordein lit. [17]	$\delta + \epsilon$ hordein lit. [18]
Glycin	5,6	4,9	4,2	1,1	1,5
Alanin	—	—	6,5	—	1,3
Valin	9,3	8,3	9,5	3,7	1,0
Leucin	9,4	9,4	11,0	7,6	3,0
Isoleucin	7,8	4,5	3,2	4,7	2,0
Serin	7,3	6,1	4,3	1,8	1,2
Threonin	4,0	4,7	5,9	2,3	1,2
Cystin ( $\frac{1}{2}$ )	1,8	4,8	9,4	1,7	1,6
Methionin	2,1	1,6	3,2	1,4	1,3
Fenylalanin	6,2	6,0	4,7	7,6	4,0
Tyrosin	7,9	3,3	8,5	4,2	1,7
Tryptofan	—	—	3,8	—	—
Prolin	3,7	5,6	13,3	24,1	18,6
Kys. asparagová	14,6	10,3	8,8	4,6	1,3
Kys. glutamová	22,3*)	29,3*)	17,8	46,9*)	30,4
Lysin	5,5	3,5	2,1	2,6	0,9
Arginin	6,3	11,9	2,7	1,1	2,2
Histidin	2,1	2,3	1,7	0,9	2,3
Amoniak	2,1	1,5	2,5	4,7	17,5

Hodnoty prvních čtyř sloupců jsou vyjádřeny v gramech aminokyselin na 100 gramů bílkoviny, v pátém sloupci pak v % z celkového dusíku.

\*) Kyselina glutamová a alanin stanoveny a vyjádřeny společně.

d) frakce *D* — rozpustná frakce, obsahuje málo dusíku a mnoho polysacharidů.

Chladový zákal je podle *Johnstona* složen z proteinu *T* a *O*. Oxydační zákal obsahuje, stejně jako chladový zákal, protein *T* a *O*, a to i ve stejných poměrech a tvoří se oxydací proteinu *C* na protein *O*. Přestože chladový zákal je vázán na přítomnost proteinu *T*, eliminací proteinu *O* se mají získat piva stabilnější.

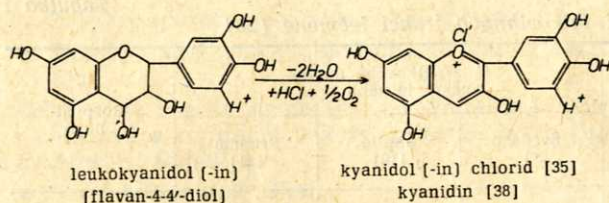
### C. Trísloviny

Chemické vědomosti o struktuře tríslovin jsou dosud velmi neúplné. V podstatě lze říci, že jejich stavební složky jsou převážně aromatické fenoly a hydroxykyseliny, se kterými jsou někdy glykosidicky vázány různé cukry. Novější literatura proto obvykle nahrazuje termín trísloviny názvem polyfenolové látky.

Koncem 19. století rozdělil *Procter* [30] rostlinné trísloviny na dvě hlavní skupiny podle rozpadových produktů, vznikajících při suché destilaci, a to na trísloviny pyrokatechinové a pyrogallolové. Od té doby klasifikace tríslovin prošla složitým vývojem [31, 32, 33], avšak ne vždy se podstatně liší od rozdělení *Procterova*. Také v pivovarství se až donedávna dělily, a namnoze ještě dělí, trísloviny jen na dvě základní skupiny, a to řady pyrogallolové a řady pyrokatechinové [34, 35]. Přehled o novějších názorech na trísloviny, resp. polyfenolové látky pivovarských surovin a produktů, vyplývajících zejména z prací *Bengougha*, *Harrise* a *Rickettse* [36, 37, 38], podal před nedávnem v tomto časopise *V. Karel* [39].

Z hlediska koloidní stability piva je z polyfenolových látek podle literárních údajů zvláště významná v pivě bohatě zastoupená skupina anthokyanogenů, která po zahřátí s minerálními kyselinami poskytuje ze svých leukoforem hnědočerveně zbarvené zplodiny, z nichž nejznámější jsou kyandin a delfinidin.





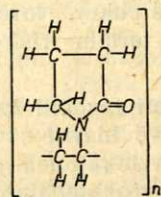
Je-li  $+H = OH$ , jde před reakcí o leukodelfinidin, po reakci o delfinidin.

Stojí za zmínku, že u divokých chmelů bylo nalezeno obdobné poměrné zastoupení leukokyanidinu k leukodelfinidinu [35] jako u šlechtěných chmelů.

Obsahem a kvalitou tříslovin, resp. polyfenolových látek v nebiologických zákalech piva se zabývala již velká řada výzkumníků [3, 34, 35, 38, 40, 41, 42]. Jejich nálezy a závěry nebyly však vždy shodné, což vyplývá z použití různých surovin, odlišné technologie, z různé experimentální metodiky a v neposlední řadě i z komplexního složení zákalů z látek ne zcela obecně známých.

Na koloidní stabilitu piva má velmi nepříznivý vliv zvýšený obsah jemného kalu v mladině. Z praktických zkušeností vyplývá nepřímý vztah mezi obsahem jemného kalu a koloidní stabilitou piva. Některé práce [42a] naznačují, že jemný kal mladiny tvoří spolu s kvasničnými metabolity hlavní potenciální zákalotvornou substanci piva. V praxi se proto vyskytla řada technologických opatření ke snížení obsahu jemného kalu v mladině (filtrace, odstředování, srážení, atd.). Jedním z novějších opatření je použití PVP (polyvinylpyrolidon) za horka (při čerpání mladiny), jež skýtá dokonalejší a rychlejší koagulaci jemného kalu mladiny.

Množství hořkých kalů se tím značně zvyšuje na úkor jemného kalu a ve prospěch snížení obsahu potenciálních zákalotvorných látek mladiny. PVP sráží jak kondenzované, tak i hydrolyzovatelné typy tříslovin či taninů [42] a má tuto formuli [43]:



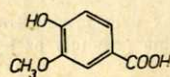
polyvinylpyrolidon (PVP)

V jemném kalu várek normálních i upravovaných PVP byly kromě již uvedeného kvanidinu a delfinidinu nalezeny ještě kyselina kávová, ferulová, p-kumarová, chlorogenová a různé flavonoly. Zjistilo se, že chmel přivádí do mladiny v průměru 10krát více kvanidinu než delfinidinu.

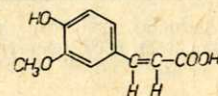
Použitím PVP u horké vyražené mladiny se na jedné straně značně snížila tvorba jemného (chladového) kalu, vytvářejícího se po filtraci horké mladiny, avšak na druhé straně byl zjištěn zvýšený obsah pravých bílkovin v zelených pivech u takto upravených várek [42 l. c. 1]. Lze se proto na základě Hartongovy [44] koacervátové teorie tvorby chladového zákalu domnívat, že zvýšená tvorba chladového zákalu během kvašení je alespoň zčásti způsobována potenciálním přebytkem pravých bílkovin, které nelze vysrážet ani zvýšenou dávkou PVP, a nově se vytvářejícími anthokyaniny.

Ne všichni výzkumníci však připouštějí přítomnost polyfenolových látek v jemném kalu mladiny či v chladových zákalech piva. De Clerck [45] např. uvádí, že nemohl získat žádný kladný důkaz přítomnosti tříslovin v chladových zákalech. Jinde byl jejich obsah v chladových zákalech jen předpokládán [46]. Řada dalších výzkumníků [47, 48, 49] usuzuje na obsah tříslovin, resp. polyfenolových látek v chladových zákalech jen z nepřímých důkazů.

Pozornost byla věnována i výskytu ligninových derivátů a sloučenin typu kyselin testinových z pluch sladu v zákalech piva [50]. V Harrisové a Rickettsové [38] analytické studii polyfenolových látek sladových pluch se usuzuje, že kyselina vanilínová a ferulová pochází z ligninových derivátů, které se nacházejí v ječných a sladových pluchách. Protože tyto dvě fenolové kyseliny byly nalezeny jako hlavní alkalické degradační zplodiny nebiologických zákalů piva, vnučuje se domněnka souvislosti ligninových derivátů sladových pluch s tvorbou zákalů.



kyselina vanilínová



kyselina ferulová

K řešení problému výskytu sladových a chmelových anthokyaninů v zákalech piva však neobyčejně přispěla další práce Harrisové a Rickettsové [40], ve které bylo dokázáno, že podobnost těchto látek ze sladu a chmele je velmi blízká s možným přechodem v identitu. Zjistilo se, že oba druhy anthokyaninů se kromě toho vyskytují v pivních zákalech v polymerní formě. Tyto polymery jsou proti monomerům již chromatograficky v organických soustavách nepohyblivé, avšak zahříváním s minerálními kyselinami poskytují ještě stejný barevný test jako monomery. Toto byla hlavní překážka při řešení genese anthokyaninů nebiologických zákalů piva.

Obdobné rozuzlení nastalo i v otázce původu a charakteru dříve nazývaných „na vzduchu hnědnoucích pigmentů“, o nichž bylo zjištěno, že jde o katechinové polymery. Dále se zjistilo, že i chmel obsahuje d(+) katechin a epikatechin. Tím byly exaktně indikovány prameny anthokyaninů a katechinů, společná účast jejich polymerních forem na tvorbě zákalů piva a určen tak spolehlivý směr dalšího výzkumu.

Vývoj světového výzkumu zvýšení fyzikálně chemické stability piva z hlediska vlivu polyfenolových látek, zejména typu anthokyanogenů, je po získání prvních dostatečných znalostí o jejich charakteru a vlivu na tvorbu zákalů zaměřen na hledání cest a prostředků ke snížení jejich obsahu ve vystavovaném pivě.

Z prací Salače a spoluprac. [51, 52, 53] vyplývají však o vlivu polyfenolových látek na koloidní stabilitu piva českého typu pro chmelovou tříslovinu příznivější závěry, než bylo právě diskutováno. Podle Salače se úloha samotné chmelové třísloviny jeví v silně čerivém účinku na středněmolekulární bílkovinnou Lundinovu B frakci, na niž se váže a s níž se během kvašení a dokvašování asi z jedné třetiny vylučuje. Vysokomolekulární bílkoviny udržuje při chmelovaru v roztoku. Chmelová tříslovina v množství kolem 5 % má zvláště příznivý vliv na chuťovou výraznost a říznost piva, charakterizující



český, resp. plzeňský typ. Jmenovaným pracovníkům se podařilo dokázat, že na snižování fyzikálně chemické stability piva se nepodílí chmelová tříslovina, nýbrž tříslovina sladová, která se při varném procesu těžko vylučuje a která nepříznivě působí zejména při dálkové dopravě piva.

Na koloidní stabilitu mohou nepříznivě působit také v některých chmelech více zastoupené látky furanogenního charakteru, zejména pektiny a pentosany, které nepříznivě ovlivňují vylučování B frakce bílkovin při chmelovaru [54].

### D. Sacharidy

Podle relativního kvantitativního zastoupení hlavních složek nebiologických zákalů piva tvoří sacharidy třetí, po bílkovinách a polyfenolech, nejvíce zastoupenou složku. Obsah sacharidů v těchto zákalech piva se pohybuje od stopových množství až do 13 % [18, 24].

Výskyt sacharidů v nebiologických zákalech piva je možný v podstatě ve dvou formách:

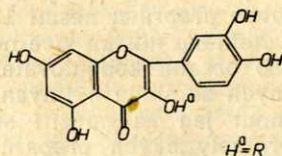
1. jako součást glykosidů s aglykony polyfenolových látek sladu a chmele;
2. jako polyméry a kondenzáty koloidních vlastností.

Která z těchto forem v zákalech převládá, záleží na složení extraktu piva, podmínkách tvorby zákalů a technice jejich izolace.

Nejprve k obsahu glykosidicky vázaných sacharidů v nebiologických zákalech piva. Z dříve již zmíněných polyfenolových látek, které mohou glykosidicky vázat sacharidy, je to především skupina anthokyanogenů. Od aglykonů (anthokyanidinů) se odvozuji všechny jejich glykosidy (anthokyaniny) různou vazbou cukerné části. Sacharidy zúčastněné na tvorbě glykosidické vazby jsou nejčastěji D-glukóza a D-galaktóza, méně L-rhamnóza a ojediněle D-xylóza. Z identifikovaných disacharidů lze uvést pouze genciobiózu; disacharid složený z D-glukózy a L-rhamnózy je pravděpodobně rutinóza. Z trisacharidů byla nalezena toliko rhamnióza.

Na základě polohy glykosidické vazby, která je nejčastěji v poloze 3, a dalších cukerných složek se anthokyaniny řadí do pěti skupin [55, 56]. Tak přispívají sacharidy způsobem své vazby ke klasifikaci anthokyaninů.

V pivovarství přicházejí z flavonolových glykosidů v úvahu především kvercitrin, isokvercitrin a rutin; dále sem patří kaempferithrin se sacharidickou složkou rhamnozidorhamnozylem, myricitrin se sacharidickou složkou rhamnozylem a řada jiných, dosud ještě přesně neidentifikovaných tri- a polyglykosidů.



kvercetin

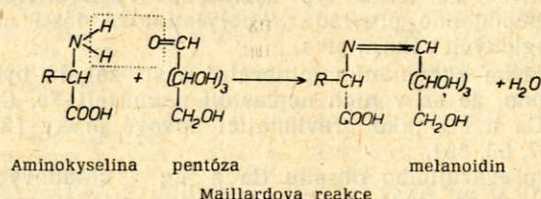
- Je-li R = rhamnozyl, jde o kvercitrin,  
R = glukozyl, jde o isokvercitrin,  
R = β-L-rhamnozido-6-D-glukozyl, jde o rutin.

Sacharidy glykosidů jsou však ve srovnání s vlivem svých reaktivních polyfenolových aglykonů při tvorbě zákalů piva funkčně prakticky bezvýznamné.

Na hydroxylové skupiny cukerné části glykosidů

nebo jejich aglykonů bývá někdy esterově vázána organická kyselina, jako kyselina p-hydroxybenzoová, p-hydroxyskořicová nebo malonová [57].

Druhou možnou formou účasti sacharidů na nebiologických zákalech piva jsou jejich polymery a kondenzáty koloidních vlastností. Může zde v podstatě jít o vyšší dextriny, výšemolekulární pentosany, látky melanoidinového typu nebo o sloučeniny těchto forem polysacharidů a kondenzátů s metabolickými a autolytickými produkty kvasinek za tvorby tzv. gumovitých látek. Všechny čtyři typy uvedených látek podléhají jakožto koloidy přirozenému stárnutí, další polymeraci, úbytku lyofilních vlastností, slučování s jinými koloidy nebo alespoň adsorpci na jejich molekuly atd. To vše vede k hrubnutí molekul, které postupně přecházejí od reverzibilního vyloučení při chladových zákalech k trvalému vyloučení z roztoku v dalším stadiu vývoje tvorby zákalů.



Maillardova reakce

Maillardovou reakcí mezi aminokyselinami a sacharidy se tvoří melanoidiny podle uvedeného všeobecného schématu. Lea a Hannan [58] dokázali, že tohoto typu reakcí se zúčastňují i bílkoviny.

Při dostatečném rozluštění sladů, citlivém rmotování, dobré virulenci kvasinek při hlavním kvašení a bez extrémně dlouhého ležení piva nejsou však obvykle ani tyto formy sacharidů potenciální zákalotvornou složkou.

### E. Kovy

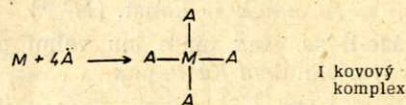
Poslední z významnějších známých složek zákalů piva je jejich minerální část a z ní zejména kovy žiravých zemin a těžké kovy. Minerální část piva je tvořena především mineráliemi varní vody a zpracovávaných surovin.

Kovy se na snížení fyzikálně chemické stability podílejí v zásadě dvěma způsoby:

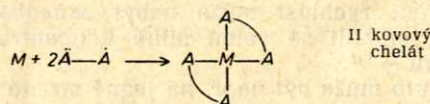
- a) přímým chemickým spojením s dusíkatými, polyfenolovými a jinými koloidními složkami pivního extraktu [59, 60, 61],
- b) katalytickou oxydaci sub a) uvedených koloidů [62, 63].

Slučuje-li se kovový ion s elektronovým donorem, nazývá se vznikající látka komplexem nebo koordinační sloučeninou. Jestliže látka slučující se s kovem obsahuje dvě nebo více donorových skupin, takže vzniká jeden nebo více kruhů, nazývá se vznikající struktura chelátem, popř. kovovým chelátem, přičemž molekule donoru se říká chelátotvorné činidlo [64].

Jednoduché příklady vzniku komplexu a chelátu lze schematicky znázornit takto:



I kovový komplex



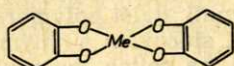
II kovový chelát



kde  $M$  představuje kovový ion;  $\bar{A}$  je komplexotvorné činidlo a  $\bar{A}-\bar{A}$  činidlo chelátotvorné.

Přestože je počet známých chelátotvorných a komplexotvorných činidel velký, omezují se donorové atomy reagující s kovem na silně nekovové prvky V. a VI. skupiny; z nich jsou jedinými běžnými příklady dusík, kyslík a síra.

Jako typ kyslíkokovových chelátů uvádí Kelley a Watts [65] cheláty polyfenolových sloučenin, které mají hydroxyskupiny v  $\alpha$ ,  $\beta$ -poloze, za tvorby nových pětičlenných kruhů tohoto schématu:

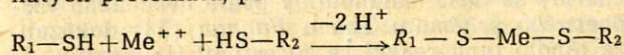


Kyslíkový typ chelátu

Protože sladové i chmelové polyfenoly obsahují řadu látek hydroxylovaných v  $\alpha$ ,  $\beta$ -poloze, lze se domnívat, že tento typ kyslíkokovových chelátů pravděpodobně převládá v polyfenolové části nebiologických zákalů piva.

Bližším zkoumáním minerální části zákalů bylo zjištěno, že se v nich nejčastěji nacházejí Fe, Cu, Sn, Ca a Mg jako převládající kovové prvky [27, 66, 67, 68, 69].

Z převažujícího obsahu Ca a Mg v chladových zákalech se soudí [70, 71], že převládajícím typem reakce je zde tvorba reverzibilních kovových-vápenatých proteinátů, podle schématu:



Dříve se připisoval také velký vliv hydratovaným formám  $SiO_2$  na tvorbu chladových zákalů. V novější době však Piratzky [72] nedokázal žádnou spoluúčast na tvorbě zákalů.

Obsah kovů v popelu pivních zákalů se velmi liší od obsahu kovů popela matečných piv v tom, že popel trvalých nebiologických zákalů obsahuje o několik řádů větší množství Cu, Fe a Al oproti koncentracím v popelu piva.

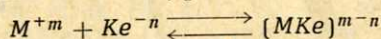
Není znám přesně faktor, který způsobuje tak překvapující zvýšení koncentrací těžkých kovů v koloidních zákalech piva. Jeví se jen určitý vztah mezi koncentrováním kovů v zákalech a jejich chelátotvornou schopností. Je totiž známo [73], že Cu, Fe a Al mají největší chelátotvornou schopnost s fenolovými, aminovými a karboxylovými skupinami, tedy s funkčními skupinami bílkovin a polyfenolů.

Konkrétní údaje [74] o obsahu Fe, Al a Cu v trvalých zákalech piv a ve zbytkových pivech (po separaci zákalu) jsou v tab. 3.

V této souvislosti je třeba se ještě zmínit o „negativní“ katalýze chelátotvorných činidel [64]. Tato katalýza je druhotným jevem, při němž chelátotvorné činidlo brání chemické reakci nebo snižuje její rychlost tím, že se slučuje s kovovými ionty, které jsou skutečnými katalyzátory určité reakce. Uvažujeme reakci o rychlostní konstantě  $k$ , která je katalyzována kovovým iontem  $M^{+m}$ :

$$k = \text{konst. } (M^{+m})$$

Váže-li se však tento ion velmi pevně chelátotvorným činidlem  $Ke^{-n}$ , pak



Reakční rychlost může nabýt zanedbatelné hodnoty, snížila-li se velmi silně koncentrace katalyzátoru  $M^{+m}$ .

Takto může být např. na jedné straně inhibována rychlost oxydace extraktivních substancí piva kys-

Kov	Zbytkové pivo	Odseparovaný zákal
	$1.10^{-6}$ g v pivu	$1.10^{-6}$ g v sušině zákalu
Fe	0,09	3990
Al	0,06	3150
Cu	0,10	3150

líkem, katalyzovaná přítomnými ionty Cu a Fe, na druhé straně pak neúměrné koncentrování těchto kovů v chelátotvorných substancích extraktu piva.

Tyto cheláty pak, máme-li na mysli extraktivní substance piva jako jsou bílkoviny a polyfenolové látky, mohou se koloidním stárnutím a ztrátou lyofilních vlastností vyloučit z roztoku v první fázi jako chladový zákal a ve druhé fázi jako trvalý nebiologický zákal piva se zvýšeným obsahem uvedených kovů.

#### F. Fyzikálně chemické faktory s vlivem na koloidní stabilitu piva

K těmto faktorům se obvykle počítají skladovací doba, teplota, pohyb, světlo a stupeň oxydace piva.

K prvním dvěma faktorům lze říci, že technicky nelze připravit koloidně neomezeně stálé frakce bílkovin a celý komplex polyfenolových látek tvořící extrakt piva a jeho organoleptickou výraznost. Bílkovinám je organicky vlastní schopnost polymerace. Polyfenolové látky tvoří rovněž ve větší nebo menší míře postupně irreverzibilní oxydované nebo kondenzované formy. Na daný fyzikálně chemický stav těchto látek má velký vliv stáří a stupeň jejich přeměny, nazývaný koloidní stárnutí, který je značně závislý na teplotě při skladování a na stupni oxydace. O skladovací teplotě lze jednoznačně říci, že při běžné technologii piva se s vyšší skladovací teplotou zvyšuje tvorba zákalů.

O vlivu pohybu na koloidní stálost piva lze konstatovat, a to bez nadsázky, že umocňuje faktor vlivu skladovací doby, teploty a oxydace. Pohyb má značný vliv zejména při dálkové dopravě, kde na malý objem lahví působí vždy relativně větší objem vzduchu než u sudového piva. Pohybem se neustále přivádí veškerý obsah piva v láhvi opětovně do styku se vzduchem. U železniční dopravy se kromě pohybu vůbec musí ještě přičíst faktor tvrdých, rytmických otřesů na spojích kolejnicových částí, který neobyčejně přispívá k agregaci koloidních částic. U dálkové dopravy musíme zvláště dbát na obsah koagulovatelného dusíku, neboť látky schopné koagulace tvoří materiálový základ pro tvorbu zákalů, vzniklých z otřesů a pohybu vůbec [75]. Kleber [76] a Franke [77] uvádějí, že pro úspěšnou dálkovou přepravu nesmí  $12^\circ$  pivo obsahovat koagulovatelného dusíku více než 0,5 mg/100 ml. Tak nízkého obsahu koagulovatelného dusíku lze u piv vařených ze sladu a jiných škrobnatých surovin dosáhnout jen za použití srážecích, adsorpčních a proteolytických preparátů, aplikovaných při dokvašování dostatečným podchlazením ke konci ležení nebo alespoň před filtrací a účinnou násobnou filtrací s adsorpčním efektem. Bez těchto opatření se při běžné technologii obvykle nepodaří snížit obsah koagulovatelného dusíku na výše uvedenou hranici.

Světlo a zvláště přímé sluneční záření má mimořádný vliv na koloidní stabilitu piva. Tento silně rušivý vliv koloidní rovnováhy je ještě zesilován přítomností kyslíku. Cenný experimentální materiál o tomto problému podává Sandegren [28]. Světlo,



resp. sluneční záření katalyzuje jak oxydační, tak i redukční proces. Pokud je však v pivě přítomen vzduch, nelze přírůstek redukujících látek analyticky prokázat, neboť jsou bezprostředně po svém vzniku oxydovány.

Sluneční záření má značný vliv i na organoleptické vlastnosti piva. Zhoršení chuti a vůně je vyvoláváno redukčním procesem indukovaným zářením, při kterém z funkčních SH-skupin aminokyselin a bílkovin vzniká  $H_2S$  a merkaptany, jež jsou součástí tzv. sluneční příchuti [78]. Podle japonských pracovníků *Obata* a *Yamanishi* [28 l. c.] je sluneční příchut' tvořena hlavně etylesterem kyseliny thioglykolové. Tento ester nebyl však ze sluněného piva izolován, nýbrž zjištěna toliko shoda vůně a chuti piva sluněného a čerstvého, do něhož byl uvedený ester přidáván v odstupňovaných dávkách. Je zřejmé, že tato domněnka vyžaduje ještě exaktního experimentálního podkladu. Fotochemickou redukcí se převádí také část organických disulfidů v hydrosulfidy, které, kromě výše zmíněné reakce, vystavují své funkční skupiny tvorbě nových komplexů s polyfenoly a kovy. Tato tvorba nových agregátů se pak projevuje ve zvýšené chladové a trvalé zákalovosti.

Kyslík ve vztahu slunečního záření a organoleptických vlastností sluněného piva má zvláštní význam. Zatímco ve všech diskutovaných problémech koloidní stability piva vůbec měl kyslík negativní vliv, má při slunění piva kladný účinek ve smyslu zmenšování tzv. sluneční příchuti. Svou přítomností paralyzuje zářením indukované foto-redukční procesy, jejichž zplodiny jsou podstatou sluneční příchuti sluněného piva.

Závěrem diskutovaných problémů je nutno připomenout spojitost a současné působení řady faktorů, ovlivňujících koloidní stabilitu piva. Tak jako úplným vyloučením styku vzduchu s pivem od technologického stadia dokvašování nelze dosáhnout neomezené koloidní stability piva [79, 80], tak jako právě uvedeným vyloučením vzduchu a uložením piva ve tmě nelze zamezit jeho organoleptickým změnám [28], nemůže také jakýkoli nadbytek vzduchu zamezit vzniku sluneční příchuti u sluněného piva [78].

### Závěr

Zákaly, které běžně vznikají v déle skladovaných pasterovaných pivech, mají obvykle třísló-bílkovinný charakter. Omezit tvorbu nebiologických zákalů piva, vyrobeného za normálních technologických podmínek, lze především snížením rychlosti, obsahu a rozsahu objektu stárnutí velmi složitěho koloidního systému piva. Tyto tři hlavní faktory koloidní stability piva jsou za normálních technologických podmínek závislé hlavně na absolutním množství celkového a vysokomolekulárního dusíku, polyfenolových látek, polysacharidů a jiných vysokomolekulárních látek, a na jejich vzájemné reakční kinetické rovnováze. U dobře odleženého piva je tato rovnováha závislá především na fyzikálně chemických podmínkách filtrace, stáčení, transportu, distribučního skladování, ale také na fyzikálně chemických vlastnostech koloidního systému piva schopného odolávat těmto vlivům.

### Literatura

- [1] Antelmann H.: Die Brauerei, 10, 32 (1956).
- [2] de Clerck J.: Lehrbuch der Brauerei, Band I, Berlin, 1950.
- [3] Lüers H.: Die wissenschaftlichen Grundlagen vom Mälzerei und Brauerei, Nürnberg, 1950.
- [4] Helm E.: Wochenschrift f. Brau., 393, 1936; 241, 1937.
- [5] Lüers H.: V. Congr. inter. Techn. Chim. Ind. Agricol. Scheveningen, 1937.

- [6] Enders C.: Wochenschrift f. Brau., 405, 1937.
- [7] Pawlowski-Doemens: Die brautechnischen Untersuchungsmethoden, München und Berlin, 1938.
- [8] Konečný V.: Pivovarsko-sladařská příručka, Praha, 1949.
- [9] Osborne T. B.: J. Am. Chem. Soc., 17, 539 (1895).
- [10] Bishop L. R.: J. Inst. Brewing, 34, 101 (1928).
- [11] Bishop L. R., Lontie R., Rondelet J., Dulcino J.: Kongres EBC, Nice, 1953; Sborník, 37.
- [12] Biserte G., Scriban R.: Bull. Soc. Chim. Biol. 32, 959 (1950).
- [13] Biserte G., Scriban R.: Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 8, 699 (1954).
- [14] Rondelet J., Lontie R.: Kongres EBC, Nice, 1953; Sborník, 22.
- [15] Saverborn S., Danielson C. E., Svedberg T.: Svensk. Kem. Tidsk., 56, 75 (1944).
- [16] Äyräpää K., Nihlen H.: Acta Chem. Scand., 8, 88 (1954).
- [17] Waldschmidt-Leitz E., Brutscheck H.: Brauwissenschaft, 8, 273 (1955).
- [18] Waldschmidt-Leitz E.: Kongres EBC, Kodaň, 1957; Sborník, 141.
- [19] Kotrlá-Hapalová M.: Kvas. prům., 6, 3 (1960); 6, 25 (1960).
- [20] Hopkins R. H.: Wallerstein Lab. Comm., 21, 91 (1958).
- [21] Urion E., Raux J.: Brass. Français, 3, 393 (1939).
- [22] Scriban R., Biserte G.: Bull. Soc. Botanique du Nord, 3, 95 (1950).
- [23] Sandegren E.: Brauwissenschaft, 4, 197 (1951).
- [24] Sandegren E.: ref. Wallerstein Lab. Comm., 10, 249 (1947).
- [25] Hultin E.: Arkiv Kemi, 2, 135 a 143 (1950).
- [26] Jensen R.: Acta Chim. Scand., 6, 771 (1952).
- [27] Sandegren E.: Kongres EBC, Schwenningen, 1947; Sborník, 28.
- [28] Sandegren E.: Die Brauerei, Wiss. Beil., 9, 139 (1958).
- [29] Johnston St. J. H.: Kongres EBC, Lucerne, 1949; Sborník I, 82.
- [30] Procter H. R.: Leather Industries Laboratory Book, II., London, 1908.
- [31] Freudenberg K.: Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe, Berlin, 1920.
- [32] Freudenberg K.: Tannin, Cellulose, Lignin; Berlin, 1933.
- [33] Flinn E. S.: Nature of the Chemical Components of Wood, New York, 1948.
- [34] Deuyx Y.: Petit J. Brass., Nr. 2444-6, 1953.
- [35] Lebreton P.: Petit J. Brass., 253, 1958.
- [36] Bengough W. L., Harris G.: J. Inst. Brewing, 61, 134 (1955).
- [37] Harris G.: J. Inst. Brewing, 62, 390 (1956).
- [38] Harris G., Ricketts R. W.: J. Inst. Brewing, 64, 22 (1958).
- [39] Karel V.: Kvas. prům., 6, 193 (1960).
- [40] Harris G., Ricketts R. W., Chem. & Ind., 686, 1958.
- [41] Hartong B. D.: Brauwelt, 97, 698 (1957).
- [42] Wye E., MacFarlane W. D.: Kongres EBC, Kodaň, 1957; Sborník, 299.
- [42a] Hopkins R. H.: The Brewers Guardian, 86, Nr. 12 (1957); ref. Kvas. prům., 4, 279 (1958).
- [43] Mendlik F.: J. Inst. Brewing, 62, 144 (1956).
- [44] Hartong B. D.: Kongres EBC, Lucerne, 1949; Sborník, 58.
- [45] de Clerck J.: Kongres EBC, Nice, 1953; Sborník, 161.
- [46] Brown H. T.: J. Inst. Brewing, 19, 84 (1913).
- [47] Enders C.: Woch. f. Brauerei, 54, 161 (1937).
- [48] Helm E.: J. Inst. Brewing, 42, 379 (1936).
- [49] le Corvaisier H.: Brauwissenschaft, 5, 25 (1952).
- [50] Harris G., Ricketts R. W.: J. Inst. Brewing, 65, 252 (1959).
- [51] Salač V., Kotrlá-Hapalová M., Vančura M.: Brauwissenschaft, 7, 258 (1954).
- [52] Salač V., Kotrlá M., Vančura M.: Kvas. prům., 1, 160 (1955).
- [53] Salač V., Kotrlá M., Vančura M.: Kvas. prům., 1, 258 (1955).
- [54] Salač V., Kotrlá-Hapalová M., Vančura M.: Kvas. prům., 2, 146 (1956).
- [55] Robinson G. M., Robinson R.: Biochem. J., 25, 1687 (1931).
- [56] Robinson G. M., Robinson R.: Biochem. J., 25, 240 (1955).
- [57] Vystrčil A.: Rostlinné glykosidy, Praha, NČSAV, 1955.
- [58] Lea C. H., Hannan R. S.: Proc. Biochemical Congress, Cambridge, 134, 1949.
- [59] de Witt K. W.: Chem. & Ind., 1551, 1955.
- [60] Dobbie H., Kermack W. O., Lees H.: Biochem. J., 25, 240 (1955).
- [61] Clifton C. E.: Introduction to Bacterial Physiology, London, 1957.
- [62] Baruak P., Swain T.: Biochem. J., 55, 392 (1953).
- [63] Timmerlake C. F.: J. Sci. Food Agric., 8, 159 (1957).
- [64] Martell A. E., Calvin M.: Chemie kovových chelátů, NČSAV, Praha, 1959.
- [65] Kelly G. G., Watts D. M.: Food Research, 22, 308 (1957).
- [66] Lhoest W., Lontie R., de Clerck J.: ref. Wallerstein Lab. Comm., 17, 75 (1954).
- [67] Hartong B. D.: Woch. f. Brauerei, 54, 33 (1937).
- [68] Helm E.: J. Inst. Brewing, 45, 80 (1939).
- [69] Hopkins R. H. & Krause B.: Biochemistry Applied to Malting and Brewing, London, 1947, str. 59.
- [70] Hudson J. R.: J. Inst. Brewing, 64, 157 (1958).
- [71] Knorr F.: Echo Brass., 31, 1958.
- [72] Piratzky W.: Die Brauerei, 33, 1948.
- [73] Klotz J. M.: The Mechanism of Enzyme Action, Baltimore, 1954, str. 257.
- [74] Hudson J. R.: J. Inst. Brewing, 61, 127 (1955).
- [75] Weinfurter F., Narziss L.: Brauwissenschaft, 10, 139 (1957).
- [76] Kleber W.: Echo Brass., 1085, 1958.
- [77] Franke G.: Brauwelt, 99, 1637 (1959).
- [78] Knorr F.: Brauwelt, 97, 711 (1957).
- [79] Sandegren E.: Die Brauerei, 10, 555 (1956).
- [80] de Clerck J., Cauwenberge H.: Wallerstein Lab. Comm., 20, 255 (1957).
- [81] Hummel J.: Kvas. prům., 7, 145 (1961).
- [82] Waldschmidt-Leitz E.: Kongres EBC, Viedeň, 1961; ref. Kvas. prům., 7, 173 (1961).
- [83] Enari T. M., Mikola J.: Kongres EBC, Viedeň, 1961; ref. Kvas. prům., 7, 173 (1961).

Došlo do redakce 14. 9. 1961.