

# VÝVOJ KOLOIDNÍCH ZÁKALŮ SVĚTLÉHO LEŽÁKU BĚHEM STÁRNUTÍ

PETR SLADKÝ, HANA CÍSAŘOVÁ, MIROSLAV DIENSTBIER, PETR GABRIEL, Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Katedra chemické fyziky a optiky

## 1 ÚVOD

Světlé ležáky plzeňského typu jsou vesměs stáčený do lahví jiskrně filtrovány a stabilizovány tak, že vykazují pouze koloidní (makromolekulární) zákal, převážně bílkovino-tříslovinového (P-T) původu. Vývoj P-T koloidních zákalů piva v intaktní lahvi v závislosti na čase a teplotě je potom významnou analytickou mírou probíhajícího procesu jeho stárnutí [1, 2]. Normativně je dle pivovarských analytických konvencí [3–6] doporučeno měřit vývoj zákalu piva pomocí (elastického) rozptylu světla v nefelometrickém uspořádání pod úhlem 90° v definovaném teplotním a časovém režimu.

Obecně se však v průběhu stárnutí piva mění jak počet, tak i velikost koloidních zákalových částic [7–10]. Tyto změny jsou částečně zvrátelné, zvláště v případě tzv. chladového zákalu, který se tvoří ve stárnoucím pivu při ochlazení k teplotám okolo 0 °C [11].

Doporučené nefelometrické metody stanovení zákalu piva [3–6] bohužel neumožňují získat současně informaci o změně počtu a rozměru částic koloidních zákalů jako funkci teploty a času, což je principiálně důležité pro bližší poznání procesu koloidního stárnutí piva, a je jednou z příčin malé analytické účinnosti většiny stávajících předpovědních testů, jak je patrné z existence velkého počtu jejich empirických variant [12–17].

K získání informace jak o změně počtu částic, tak i jejich rozměrů v čase, je na základě obecné teorie rozptylu světla v makromolekulárních roztocích [18, 19], tak i dřívějších praktických poznatků o rozptylu světla v pivu [20–22] a nedávných měření zákalů v průběhu provozní křemelinové filtrace [23, 24], nutno použít současných měření zákalů alespoň ve dvou úhlech rozptylu světla, tj. vedle nefelometrického směru 90° ještě i měření ve směru dopředného rozptylu, např. v intervalu úhlů 10° až 25°.

V souladu s teorií i praxí lepší rozlišení hrubých částic rozměrů nad 1 μm (kvasnic, křemeliny, silikagelů, PVPP atp.) od submikronových částic koloidů ve filtrovaném pivu poskytují současná nefelometrická měření 90° spolu s měřeními zákalu při menších úhlech 10°–15°, než měření pod úhlem 25°. U typu zákaloměrů měřících pod úhly 90° a 25° je použití úhlu 25° zvoleno z konstrukční nouze umístit detektor dopředného rozptylu blíže k ose primárního svazku svazku 0° než na úhel 25°.

Laboratorní měření zákalu piva ve dvou úhlech rozptylu světla přímo v lahvi byla nejdříve prováděna pomocí jednoho

přístroje v rozdílné době, tj. přístroj umožňoval podle nastavení programu buď změřit zákal v nefelometrickém směru, nebo ve směru dopředného rozptylu, nikoliv však současně [25].

Současná měření vývoje zákalů piva ve dvou úhlech rozptylu světla přímo v lahvích s automatickou korekcí na rotační anizotropii a barvu lahví byla poprvé provedena nedávno [29] autory současné práce, s cílem zlepšit stávající metody předpovědi koloidní stability piva tepelným šokováním [26–28, 15].

Cílem této práce je uvést výsledky našich měření vývoje zákalů zvláště v mírně stabilizovaných ležácích během stárnutí přímo v lahvích a diskutovat je ve světle nedávno proponovaných modelů mechanismu interakcí proteinů a polyfenolů v různých typech nápojů [30–32, 35–38, 40].

Uvedené grafy současného vývoje hodnot nefelometrického a dopředného zákalu jsou svého druhu prvním přímým důkazem přechodných změn rozměrů P-T koloidních částic chladového zákalu při přeměně na trvalý zákal v procesu stárnutí při různých teplotách, což má zásadní význam pro zpřesnění předpovědi trvanlivosti piva v lahvích bez nutnosti jejich otevření, jakož i pro komplexní optimalizaci předcházejících technologických postupů zpracování výchozích surovin a meziproduktů, vedoucích k zajištění požadované koloidní stability finálního produktu.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Vzorky piva

Vzorky světlého lahvového piva plzeňského typu (12% ležák, 5% obj. al. alkoholu, obchodní šarže pro tuzemsko) byly získány v maloobchodě. Pivo bylo mírně stabilizováno regenerovatelným

PVPP a pasterováno na trvanlivost 6 měsíců (dle etikety). 40 lahví vzorků z jedné šarže bylo získáno 7 dní po stočení, rovněž dle údajů z etikety. Předtím byly pravděpodobně transportovány a uloženy při teplotě přibližně 20 °C. Pro potřebu této studie nebyla provedena podrobnější analýza složení měřených vzorků.

### 2.2 Definice měřených hodnot zákalů

Pro hodnocení vývoje nefelometrického zákalu piva v průběhu stárnutí jsme použili hodnoty tzv. celkového, chladového a trvalého zákalu, definované podle teploty měření, v souladu se zavedenými metodami pivovarských analýz [3–6]. Dle uvedené definice je chladový zákal dán rozdílem hodnoty celkového a trvalého zákalu.

Pro výzkumné účely této práce jsme nedodržovali uzanční teploty měření celkového resp. trvalého zákalu 0 °C resp. 20 °C, ale pro zesílení efektu jsme chladové zákalové inkubovali po dobu 24 hodin při teplotě -4 °C a rozpouštěli je až na teplotu 40 °C.

V souladu s uvedenou definicí jsme měřili současně i hodnoty dopředného zákalu. V dalším textu a grafech budeme měřené hodnoty zákalů označovat symbolem Z a rozlišovat indexem úhlu měření.

### 2.3 Volba časových a teplotních režimů stárnutí

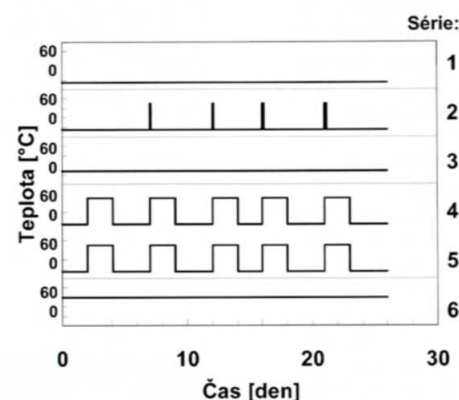
V této studii jsme zvolili šest reprezentativních režimů tepelného stárnutí pro celkem 36 lahvoých vzorků dané šarže, rozdělených po šesti do jednotlivých tepelných režimů, charakterizovaných časovými průběhy teplot stárnutí, ukázanými schematicky na obr. 1. Na konci chladové fáze tepelných impulsů režimů 4, 5 a 2 charakteru tepelného šokování bylo rovněž na postupně odebíraných vzorcích z odpovídající série provedeno měření změn zákalů.

V případě tepelných režimů stárnutí vzorků při různé stálé teplotě byly den před hodnotícím měřením vývoje zákalů příslušné vzorky podrobeny po dobu 24 hodin vybuzení chladového zákalu skokem na rovnovážnou teplotu -4 °C.

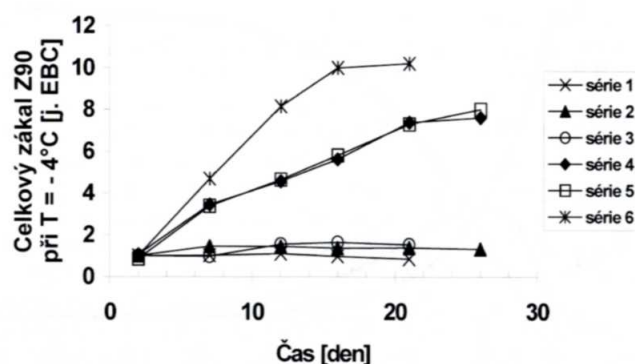
### 2.4 Přístroje a pomůcky

Tepelné stárnutí vzorku v různých teplotních režimech dle obr. 1 a inkubace měřících chladových šoků byly prováděny v oddělených kapalinových termostatech (LAUDA MS 20 a RMS 20).

Pro současná měření zákalů ve dvou úhlech rozptylu světla přímo v lahvích jsme použili osvědčený dvouúhlový la-



Obr. 1 Časové diagramy šesti zvolených tepelně-tepelných režimů stárnutí 6 sérií po 6 vzorcích studovaného piva



Obr. 2 Vývoj hodnot celkového zákalu v konvenčním nefelometrickém směru (Z90) ve zvolených režimech stárnutí resp. odpovídajících sériích vzorků 1 až 6 studovaného piva

boratorní zákaloměr vlastní konstrukce Mod. MZN 93-MC2 [27, 28].

Teplota byla vesměs měřena Pt odporovými teplotními čidly vlastní konstrukce, vestavěnými v systému použitých zákaloměrů [27, 28].

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Hodnocení stárnutí piva na základě vývoje nefelometrického zákalu

Koloidní stárnutí piva se tradičně hodnotí pouze na základě vývoje hodnot nefelometrických zákalů s časem. Vývoj celkového nefelometrického zákalu (Z90) našich vzorků, stárnoucích při různých teplotách resp. tepelných dávkách dle algoritmů na obr. 1, je ukázán pomocí souhrnných grafů na obr. 2.

S klesající teplotou, jak ukazuje obr. 2, ale i s klesající dávkou tepla vynucujícího stárnutí, klesá i rychlost růstu nefelometrického zákalu a při ochlazení pod 0 °C dosahuje nejmenších hodnot, které jsou pomocí starších typů zákaloměrů, používaných dosud ve většině pivovarských laboratoří, s malou citlivostí a rozlišením pod 0,01 j.EBC prakticky neměřitelné.

V závislosti na teplotním režimu lze, zvláště na grafech 1, 2 a 3 nefelometrických zákalů stárnutí vzorků piva ze sérií nízkoteplotních režimů, pozorovat určitou lag-fázi, která se ve vysokoteplotního tepelného stárnutí velmi zkracuje, a při měření méně stabilizovaných piv, podobně jako v případě našich vzorků, se pozoruje téměř ihned již růstová fáze nefelometrických zákalů (obr. 2, série grafů 4–6).

#### 3.2 Porovnání současného vývoje nefelometrických a dopředných zákalů různě intenzivně stárnoucího piva

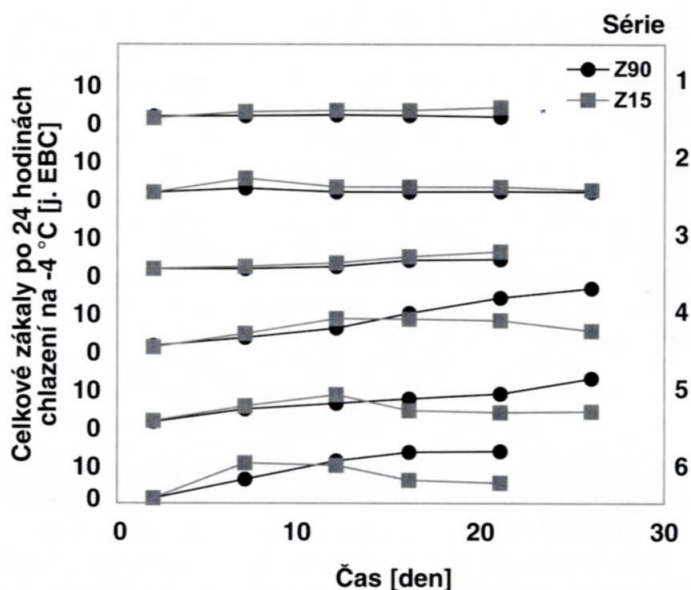
Na rozdíl od nefelometrického zákalu dosahuje vývoj hodnot dopředného zákalu maxima v určité době stárnutí, která se zkracuje s rostoucí teplotou tepelné dávky, jak je patrné ze srovnání vývoje

vých grafů obou zákalů Z90 a Z15 v různých režimech stárnutí 1–6, ukázaných na obr. 3. Z grafů vývoje zákalů vzorků série 6, stárnoucích při nejvyšší zvolené teplotě (40 °C), nastupují maximální hodnoty dopředného zákalu v nejkratší době, zatímco nefelometrický zákal pokračuje v monotónním růstu. I přes malou hustotu naměřených bodů lze usuzovat, že pravděpodobně v oblasti maxima vývoje celkového dopředného zákalu dochází i k ukončení určité lag-fáze vývoje nefelometrických zákalů, projevující se zvýšením rychlosti jejich růstu, jak lze v náznamech pozorovat v režimech intenzivního stárnutí našich vzorků na obr. 3.

#### 3.3 Viditelný zlom chladového zakalení stárnoucího jiskrně zfiltrovaného piva

Jak ukazují výsledky našich měření, uvedené na obr. 3, k vzrůstu dopředných hodnot chladového resp. celkového zákalu piva dochází pravděpodobně na konci lag-fáze rychleji než u odpovídajících nefelometrických hodnot. V případě nestabilizovaných či mírně stabilizovaných piv se to děje prakticky skokem, a to již i při laboratorních teplotách stárnutí.

Z teorie rozptylu světla i z pivovarské zkušenosti je známo, že zákal piva, tvořený nadmikronovými částicemi, jsou již dobře viditelné i v průhledu, což odpovídá měření zákalů v dopředném směru rozptylu světla i v transmisní turbidimetrii, zatímco submikronové koloidní a makromolekulární částice ostře filtrovaného piva tvoří v průhledu tzv. neviditelný zákal, který lze pozorovat zrakem jako Tyndallův jev teprve při osvětlení intenzivním svazkem světla z boku, nejlépe pod pravým úhlem, tj. v nefelometrickém uspořádání, podobně jako v případě objektivních nefelometrických měření pomocí zákaloměru.

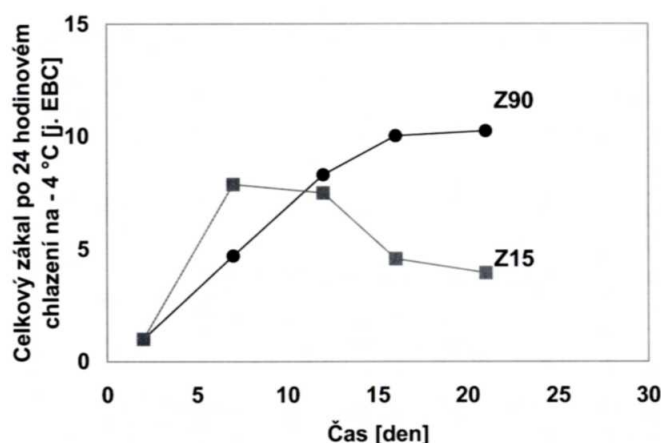


Obr. 3 Porovnání současného vývoje obou hodnot nefelometrických i dopředných zákalů v jednotlivých režimech stárnutí vzorků studovaného piva sérií 1 až 6

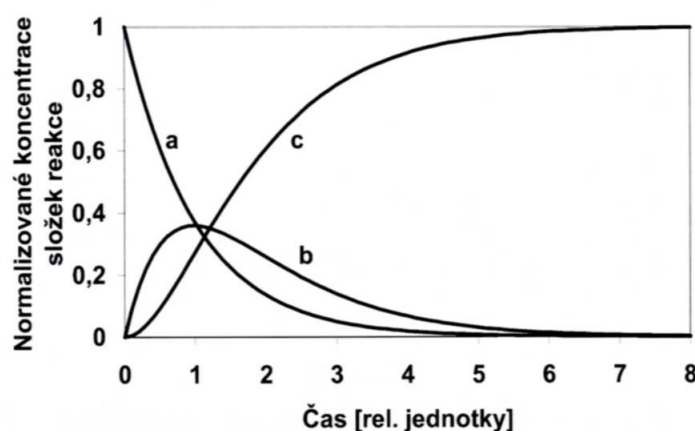
Výsledky našich současných dvouúhlových měření tedy objektivně objasňují z pivovarské zkušenosti známý jev chladového „zalomení“, či tzv. „cold break“ zoxidované mladiny resp. mladého piva a zcela přirozeně, podstatně však méně intenzivně, pozorovatelný i u stárnoucího resp. zoxidovaného filtrovaného piva (viz např. [42–44]) a naopak tzv. neviditelný zákal vyvolaný v ostře zfiltrovaném pivu pouze přítomností makromolekul a submikronových koloidů. Jejich maximální výchozí rozměry jsou přirozeně určeny tzv. hranou použité filtrace, která by měla být u moderní křemelinové filtrace menší než jeden mikrometr. Naopak, částice chladového zákalu mohou podle plnosti málo stabilizovaného stárnoucího piva snadno dosáhnout již sedimentujících rozměrů od několika jednotek až po desítky mikrometrů.

#### 3.4 Objevení přechodného maxima dopředného chladového zákalu v průběhu stárnutí piva

Jak je patrné zvláště z průběhu grafů 4, 5 a 6 na obr. 3, objevila naše současná dvouúhlová měření zákalů v průběhu stárnutí piva vznik přechodného maxima dopředného chladového resp. celkového zákalu při současně rostoucích nefelometrických hodnotách. Uvedené výsledky jsou přímým důkazem přechodných změn rozměrů zákalotvorných částic protein-polyfenolových komplexů piva, poprvé ukazujícími na skutečnost, že vzniku trvalých koloidních zákalů předchází dočasný vzrůst velikosti částic P-T komplexů chladového zákalu do nadmikronových rozměrů a jejich opětovné rozpuštění v procesu pokračujícího stárnutí piva. Uvedené poznatky jsou o to významnější, že jsou v plném



Obr. 4 Současný vývoj obou hodnot nefelometrických i dopředných zákalů studovaného piva během intenzivního stárnutí při teplotě 40 °C (série 6)



Obr. 5 Schematické znázornění kvalitativního průběhu koncentrací u následné reakce  $A \rightarrow B \rightarrow C$ , popisující v prvním přiblížení vývoj chladových zákalů piva v průběhu stárnutí: a – koncentrace jednoduchých flavanoidů, b – koncentrace částic dopředného chladového zákalu, c – koncentrace částic nefelometrického chladového zákalu

souhlasu s často opomíjenými výsledky prací Claessona a Sandegrena [7, 8], kteří jako první zviditelnili koloidní částice P-T zákalů elektronovým mikroskopem a upozornili na možnost změn jejich rozměrů a morfologie v procesu stárnutí piva, jakož i naznačili jednoduchý model prahové kinetiky.

Z dřívějších prací prof. Chapona a kol. [10, 11, 30–32] a později dalších autorů [33–46] o interakcích proteinů a polyfenolů piva je známo, že především pouze některé z nich, jako např. proteiny a polypeptidy bohaté na prolin [34–41] a jednoduché kondenzující flavanoidy [1, 2, 14, 45, 46] vytvářejí s rostoucí afinitou částicové komplexy, které se s přibývajícím koncentrací na straně jedné nebo druhé složky mohou opět rozpouštět [30–32, 38–40]. Uvedené jevy názorně demonstruje např. známý Chaponův titrační test srážení tzv. citlivých proteinů gallotanninem nebo, ještě názorněji, test srážení rozpustného PVP z roztoku kondenzovanými polyfenoly – tzv. tannoidy piva. Podle množství tannoidů v pivu dojde na křivce nefelometrické titrace při určité ekvivalentní dávce dodaného titrantu v podobě roztoku PVP k vytvoření maxima nefelometrického zákalu. Po jejím překročení se precipitované komplexy tannoidů piva a PVP opět rozpouštějí [30–32].

V analogii s uvedenými jevy můžeme kvalitativně vysvětlit i námi pozorované maximum chladového resp. celkového zákalu v dopředném směru rozptylu světla. V průběhu stárnutí piva roste v důsledku oxidační kondenzace koncentrace a zákalotvorná afinita jednoduchých flavanoidů [45], které se vážou k molekulám zákalotvorných proteinů prostřednictvím vodíkových můstků v místech prolinu, přičemž dochází s největší pravděpodobností i k tvorbě hydrofobních kapes [34–38, 45] a podle našeho současného názoru i uzavřených P-T koloidních micel.

Dosáhne-li v procesu stárnutí piva koncentrace vznikajících zákalotvorných polyfenolů určité vazební ekvivalence s přítomnými zákalotvornými proteiny resp. polypeptidy piva, dojde k maximu precipitace a pravděpodobně i nízkou teplotou umocněné koagulaci původně makromolekulárních a submikronových částic do nadmikronových rozměrů chladového resp. celkového zákalu, indikovaných převážujícím dopředným rozptylem světla. Další zvýšení koncentrace zákalotvorných polyfenolů v procesu stárnutí piva nad „ekvivalentní“ hodnoty zákalotvorných bílkovin vede k postupnému „rozpuštění“ nadmikronových koagulátů chladového zákalu zpět na postupně rostoucí částice trvalého zákalu až nadmikronových sedimentujících rozměrů z původně submikronových a makromolekulárních rozměrů částic čerstvě zfiltrovaného piva.

Uvedený kvalitativní model lze ukázat pomocí postupů tepelného stárnutí pro piva konkrétní výrobní technologie a výchozích fyzikálně-chemických vlastností (druh, složení, pH atp.) pomocí současných dvouúhlových měření zákalů kvantifikovat resp. „nacejchovat“ a využít k podstatně přesnější předpovědi fyzikální resp. koloidní stability, než na základě dosud používaných měření zákalů pouze v nefelometrickém směru.

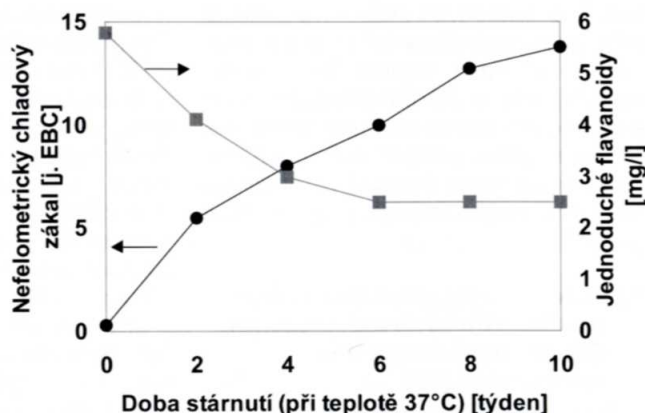
Kvantifikaci zákalových interakcí vybraných soustav proteinů a polyfenolů, modelujících tvorbu koloidních zákalů piva resp. i dalších nápojů na bázi přírodních extraktů (ví-

no, mošt) se nedávno zevrubně zabývali Siebert a kol. [38–41]. Jejich modelové představy jsou v dobrém kvalitativním souhlasu s námi učiněnými poznatky o přechodném růstu rozměrů zákalových částic protein-polyfenolových komplexů s přibývajícím koncentrací zákalotvorných polyfenolů v procesu stárnutí piva. Modelové studie Sieberta a kol. se bohužel omezují pouze na rovnovážný vztah mezi finálními rozměry zákalových částic a velikostí již vytvořeného trvalého zákalu, a to pouze v nefelometrickém směru.

Pro hlubší teoretické poznání mechanismu tvorby koloidních zákalů piva a zvláště pro praktické využití těchto poznatků k zpřesnění předpovědi fyzikální stability má velký význam i analýza kinetiky procesu, kterou naznačíme v následujícím textu.

### 3.5 Popis kinetiky tvorby zákalů stárnoucího piva následnými nezvratnými reakcemi

Vývoje hodnot celkového nefelometrického (Z90) a dopředného (Z15) zá-



Obr. 6 Úbytek obsahu jednoduchých flavanoidů (●) a růst celkového nefelometrického zákalu (■) během zrychleného stárnutí světlého piva typu ležák při teplotě 37 °C podobného našim vzorkům. Převzato z práce McMurrough a kol. [46]

kalu intenzivně stárnoucího piva, vynešené v závislosti na čase na obr. 4, jsou v prvním přiblížení nápadně podobné časovému průběhu koncentrací koncového produktu a meziprojektu dvou následných nezvratných reakcí 1. řádu ukázaných pro kvalitativní srovnání na obr. 5. Jestliže naše výsledky formálně doplníme o výsledky měření poklesu výchozí koncentrace jednoduchých flavanoidů získané McMurroughem a kol. [46] spolu se změnami koncentrace tannoidů a hodnotami růstu nefelometrického chladového zákalu v stárnoucím pivu podobnému našim vzorkům (obr. 6), stává se naše premisa o tvorbě trvalého zákalu stárnoucího piva v prvním přiblížení následnými nezvratnými reakcemi velmi pravděpodobnou, přičemž první reakcí je tepelně aktivovaná kondenzace jednoduchých flavanolů do oxidované zákalotvorné podoby [45].

Přirozeně lze průběh vývoje koncentrace reakčního meziprojektu v podobě nadmikronových částic chladového zákalu pozorovat dopředným rozptylem světla jen za nízkých teplot, přičemž lze snížení jejich rozpustnosti a zvýšení precipitace podpořit jak známo přidávkou dalších několika procent alkoholu [11].

### 3.6 Mechanismus tvorby částic protein-polyfenolových permanentních zákalů piva

Molekulární interpretace druhé fáze resp. následné nezvratné reakce vedoucí k postupnému vzniku trvalých, tj. při laboratorních teplotách nerozpustných koloidních zákalů je podstatně složitější, neboť vedle teploty záleží jak na pH piva [12], tak i na konkrétních koncentracích a molekulární podobě interagujících P-T zákalotvorných složek, jak naznačují nedávné modelové studie vlivu koncentrace a pH na rovnovážné rozměry částic gliadin-tanninových permanentních zákalů Sieberta a kol. [41].

V případě reálných piv zůstává otevřenou otázkou vliv rozpuštěných polysacharidových složek zbytkového extraktu na tvorbu a zvláště morfologii zákalových částic P-T komplexů v průběhu stárnutí. S určitou pravděpodobností mohou plnit úlohu smáčedla na povrchu částic P-T koloidů, jako je tomu u pивní pěny (viz např. [48]). Vůbec poznatky o vztahu mezi P-T zákalotvornými a pěnотvornými koloidy jsou dosud neucelené a často rozporuplné [1], jak co se týče složení, tak i podstaty interakcí a spektra molekulárních hmotností zúčastněných makromolekulárních složek [47–49].

Unikátní pionýrské snímky, pořízené elektronovým mikroskopem před více než třiceti lety Sandegrenem a Claessonem [7, 8], nasvědčují tomu, že P-T koloidní částice chladových zákalů piva jsou micelární povahy s převažující kulovou symetrií a možností jak intramicelár-

ního růstu, tak i růstu shlukováním, resp. flokulací jednotlivých micel ve větší celky.

Naše současná měření chladových zákalů piva v dopředném a nefelometrickém směru rozptylu světla pak naznačují i možnost existence jevu zpětného rozpadu, resp. deflokulace nadmikronových shluků výchozích submikronových P-T micel chladového zákalu s rostoucí koncentrací zákalotvorných polyfenolů, tj. oxidovaných flavanolů, doprovázenou poklesem hodnot dopředného chladového zákalu a jejich postupné (intramicelární) zvětšování nad hranici jednoho mikrometru s přibývajícím podílem kovalentní vazby. O tom svědčí trvale rostoucí hodnoty nefelometrických zákalů stárnoucího piva. V další fázi procesu stárnutí dorůstají P-T částice permanentního zákalu „sedimentálních“ rozměrů několika jednotek až desítek mikrometrů a postupně vytvářejí na dně lahve úsadu, obvykle spolu s dalšími „zestárlymi“ koloidy piva, zvláště polysacharidového původu.

Je třeba zdůraznit, že díky velmi různorodému surovinnému i technologickému původu reálných piv, jsou kinetika a mechanismus druhé fáze tvorby P-T koloidních zákalů piva a souvisejících finálních rovnovážných hodnot měřených zákalů mimořádně složité, což vysvětluje stále velkou nejistotu předpovědi doby fyzikálně-chemické trvanlivosti a podněcuje další zkoumání s nezbytnou účastí základního výzkumu pomocí fyzikálních i chemických modelových soustav.

### 4 ZÁVĚR

Poprvé přímo v uzavřených lahvích byl systematicky studován vývoj P-T koloidních zákalů typického, střednědobě stabilizovaného 12% světlého ležáku v průběhu různých teplotně-tepelných režimů stárnutí s možností přímého sledování změn rozměrů zákalových částic pomocí současných měření ve dvou úhlech rozptylu světla – konvenčním nefelometrickém (90°) a dopředném (10–15°).

Bylo objeveno a prokázáno, že v průběhu stárnutí piva dochází k přechodnému růstu P-T koloidních částic chladového zákalu z výchozích submikronových do nadmikronových rozměrů, indikovaných maximem hodnot chladového zákalu, měřených v dopředném směru rozptylu světla v průběhu stárnutí piva.

Pozorovaný jev lze kvalitativně vysvětlit růstem poměru koncentrace resp. afinity zákalotvorných polyfenolů, vznikajících kyslíkem katalyzovanou kondenzací z jednoduchých flavanoidů, vůči koncentraci zákalotvorných bílkovin, v soulase s nedávnými poznatky o mechanismu protein-polyfenolových interakcí v roztoku piva a v modelových soustavách [1, 2].

Získané výsledky rovněž naznačují, že tvorbu trvalých P-T koloidních zákalů lze v prvním přiblížení pravděpodobně popsat dvěma následnými nezvratnými reakcemi, přičemž rychlost první z nich je určena konverzí jednoduchých flavanolů do zákalotvorné afinní podoby indikované křivkou kinetiky vývoje dopředného chladového zákalu a druhá je dána rychlostí růstu hodnot chladového resp. trvalého nefelometrického zákalu za lag-fází.

I když dosud neplně objasněný molekulární mechanismus tvorby trvalých koloidních zákalů piva je podstatně složitější, lze navržený model kinetiky jejich tvorby na základě dvou následných nezvratných reakcí fitovat resp. „nacejchovat“ pro konkrétní výrobní druhy piv ukázanými postupy a použít k zpřesnění předpovědi procesu koloidního stárnutí a pro komplexní optimalizaci technologií vedoucích k dosažení požadované fyzikálně-chemické, případně i chuťové stability finálního produktu.

V neposlední řadě lze získané výsledky využít k dalšímu základnímu výzkumu poznatků o tvorbě koloidních zákalů jak modelových soustav, tak i komerčních piv a meziprojektů.

### Literatura:

- [1] BAMFORTH, Ch.W.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **57** (3), 1999, s. 81
- [2] SIEBERT, K.J.: J. Agric. Food Chem. **47**, 1999, s. 353
- [3] Analytica EBC, Brauerei und Getränke – Rundschau, Method 9.29, Haze in Beer: Calibration of Haze Meters, Method 9.30, Prediction of Shelf-Life of Beer, Verlag Hans Carl, 5th edition, 1997
- [4] Brautechnische Analysen Methoden, Band II, 2.19 Trübungsneigung, 3. Auflage, ed. H. Pfenninger, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freizing-Weihenstephan, 1993, s. 155
- [5] Institute of Brewing Methods of Analyses – The Institute of Brewing, London, Jan., 1997
- [6] American Society of Brewing Chemists: Methods of Analysis, 9th ed. Beer – 27, Physical Stability, The Society, St. Paul, MN, 1992
- [7] CLAESSION, S., SANDEGREN, E.: Proc. Eur. Brew. Con. Cong., Bruxelles, 1963, Elsevier, Amsterdam, 1964, s. 221
- [8] CLAESSION, S., SANDEGREN, E.: Proc. Eur. Brew. Con. 12th Cong., Interlaken, 1969, Elsevier, Amsterdam, 1969, s. 339
- [9] CLAESSION, S., SANDEGREN, E.: Proc. Eur. Brew. Con. 14th Cong., Salzburg, 1973, s. 343
- [10] CHAPON, L.: J. Inst. Brew. **99**, 1993, s. 49
- [11] CHAPON, L., CHEMARDIN, M.: Proc. Eur. Brew. Con., Madrid, 1967, s. 389
- [12] KOLBACH, P., KREMKOW, C.: Monatschrift für Brauerei **22**, 1969, s. 89
- [13] BATCHVAROV, V., CHAPON, L.: Monatschrift für Brauwissenschaft **38**, 1985, s. 331
- [14] McMURROUGH, I., et al.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **50**, 1992, s. 67
- [15] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M.: Kvasný Prům. **38**, 1992, s. 289

- [16] O'NEILL, M.: *Brew. Guard.* **125** (2), 1996, s. 54
- [17] HEGARTY, P.K., HARTLAND, T.: *Proc. Eur. Brew. Noc. Cong.*, Cannes, 1999, s. 209
- [18] FABELINSKI, I.M.: *Plenum Press*, New York, 1968
- [19] THORNE, R.S.W., SVEDENSEN, K.: *J. Inst. Brew.* **68**, 1962, s. 257
- [20] WEBSTER, R.D.J.: *Proc. Eur. Brew. Con. Cong.*, London, 1983
- [21] BUCKEE, G.K., MORRIS, T.M., BAILEY, T.P.: *J. Inst. Brew.* **92**, 1986, s. 475
- [22] MORRIS, T.M.: *J. Inst. Brew.* **93**, 1987, s. 13
- [23] WACKERBAUER, K., EVERS, H., KAUFMANN, B.: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **29**, 1992, s. 73
- [24] KLIMOWITZ, R.J., BYRNES, J.: *Brauwelt* **134**, 1994, s. 2052
- [25] HUBER, E.: *Brewing and Distilling International Sept.*, 1989, s. 32
- [26] GABRIEL, P., et al.: *Kvasny Prum.* **40** (7), 1994, s. 203
- [27] SLADKÝ, P., DIENSTBIER, M.: *Kvasny Prum.* **46** (10, 11), 2000, s. 280 a 321
- [28] SLADKÝ, P., DIENSTBIER, M.: *Kvasny Prum.* **47** (5, 7-8), 2001, s. 122 a 195
- [29] SLADKÝ, P., DIENSTBIER, M.: *Dual angle rotating bottle laboratory hazemeter MZN 92 – MC2*, users manual, published by The Dept. of Chemical Physics and Optics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Prague, 1992
- [30] CHAPON, L.: *Monatschrift für Brauwissenschaft* **46**, 1993, s. 263
- [31] CHAPON, L.: *Monatschrift für Brauwissenschaft*, Teil 1 **48**, 1995, s. 300, Teil 2 **49**, 1996, s. 12, Teil 3 **49**, 1996, s. 111
- [32] CHAPON, L.: *Brewers' Guardian*, Dec., 1994, s. 46
- [33] ASANO, K., HASHIMOTO, N.: *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co.* **23**, 1980, s. 1
- [34] ASANO, K., SHINIGAWA, K., HASHIMOTO, N.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **40**, 1982, s. 147
- [35] OUTTRUP, H., FOGH, R., SCHAUMBURG, K.: *Proc. Eur. Brew. Con. 21st Cong.*, Madrid, 1987, s. 583
- [36] OUTTRUP, H.: *Proc. Eur. Brew. Con. 22nd Cong.*, Zurich, 1989, s. 609
- [37] MONTGOMERY, G.W.G., MORRIS, K.B.: *Ferment*, 1993, s. 49
- [38] SIEBERT, K.J., TROUKHANOVA, N.V., LYNN, P.Y.: *Jour. of Agriculture and Food Chemistry* **44**, 1996, s. 80
- [39] SIEBERT, K.J., LYNN, P.Y.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **56**, 1998, s. 24
- [40] SIEBERT, K.J.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **58**, 2000, s. 117
- [41] SIEBERT, K.J., LYNN, P.Y.: *Proc. Eur. Brew. Con. Cong.*, Budapest, 2001
- [42] MORRIS, T.M.: *J. Inst. Brew.* **90**, 1984, s. 162
- [43] MORRIS, T.M.: *J. Inst. Brew.* **92**, 1986, s. 93
- [44] CROMPTON, I.E., HEGERTY, P.K.: *Proc. Eur. Brew. Con. 23rd Cong.*, Lisbon, 1991, s. 625
- [45] REHMANJI, M., et al.: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **35**, 1998, s. 95
- [46] McMURROUGH, I., MADIGAN, D., KELLY, R.J.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55** (2), 1997, s. 38
- [47] KANO, Y., KANIMURA, M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51** (1), 1993, s. 22
- [48] LUSK, L.T., GOLDSTEIN, H., RYDER, D.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53** (3), 1995, s. 93
- [49] ISHIBASHI, Y., et al.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54** (3), 1996, s. 177
- [50] GALES, P.W.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **58** (3), 2000, s. 101

*Lektoroval: Doc. Ing. J. Šavel, CSc.  
Do redakce došlo 18. 10. 2001*

**Sladký, P. – Císařová, H. – Dienstbier, M. – Gabriel, P.: Vývoj koloidních zákalů světlého ležáku během stárnutí.** *Kvasny Prum.* **47**, 2001, č. 11-12, s. 322–327.

Poprvé byl přímo v lahvích systematicky studován vývoj P-T koloidních zákalů typického, střednědobě stabilizovaného 12% světlého ležáku v průběhu různých teplotně-tepelných režimů stárnutí s možností přímého sledování změn rozměrů zákalových částic současným měřením ve dvou úhlech rozptylu světla – konvenčním nefelometrickém (90°) a dopředném (10–15°).

Bylo objeveno a prokázáno, že v průběhu stárnutí piva dochází k přechodnému růstu P-T koloidních částic chladového zákalu z výchozích submikronových do nadmikronových rozměrů, indikovaných maximem hodnot chladového zákalu, měřených v dopředném směru rozptylu světla v průběhu stárnutí piva.

Pozorovaný jev lze kvalitativně vysvětlit růstem poměru koncentrace, resp. afinity zákalotvorných polyfenolů, vznikajících jednosledným katalyzovanou kondenzací z jednoduchých flavanoidů, vůči koncentraci zákalotvorných bílkovin v souhlase s nedávnými poznatky o mechanismu protein-polyfenolových interakcí v roztoku piva i modelových soustavách.

Získané výsledky rovněž naznačují, že tvorbu trvalých P-T koloidních zákalů lze v prvním přiblížení pravděpodobně popsat dvěma následnými nezvratnými reakcemi, přičemž rychlost první z nich je určena konverzí jednoduchých flavanoidů do zákalotvorné afinní podoby indikované křivkou kinetiky vývoje dopředného chladového zákalu a druhá je dána rychlostí růstu hodnot chladového resp. trvalého nefelometrického zákalu za lag-fázi.

I když dosud ne plně objasněný molekulární mechanismus tvorby trvalých koloidních zákalů piva je podstatně složitější, lze navržený model kinetiky jejich tvorby na základě dvou následných nezvratných reakcí „nacejchovat“ pro konkrétní výrobní druhy pív uká-

zanými postupy a použít k zpřesnění předpovědi procesu koloidního stárnutí a pro komplexní optimalizaci technologií vedoucích k dosažení požadované fyzikálně-chemické, případně i chuťové stability finálního produktu. V neposlední řadě lze získané výsledky využít k získání dalších nových poznatků o tvorbě koloidních zákalů jak modelových soustav, tak i komerčních piv a meziproduktů.

**Sladký, P. – Císařová, H. – Dienstbier, M. – Gabriel, P.: Development of Colloidal Hazes in Bottled Pale Lager Beer during Ageing.** *Kvasny Prum.* **47**, 2001, No. 11-12, p. 322–327.

The haze development patterns of protein – polyphenol beer colloids has been simultaneously studied at nephelometric 90° angle and forward 15° angle of scattered light, directly on intact commercially bottled 12 grade pale lager beer samples at various thermal ageing conditions.

It has been discovered and proved that during the beer ageing process the size of protein – polyphenol chill haze particles is temporary growing over the one micrometer dimension and dissolves again with increasing ageing time as indicated by the appearance of temporary forward scattering haze maximum on the haze development pattern curve.

The observed effect can be explained qualitatively by the concentration growth of haze-active polyphenols, i.e. condensed flavanols in relation to the concentration of haze-active proteins. When the concentration of haze-active polyphenols reaches the equivalent concentration of haze-active proteins, the biggest haze particles are formed, thus scattering more light in forward direction. With increasing haze-active polyphenol concentration large chill haze particles are dissolved back to submicrometer size as indicated by the value of 90° nephelometric haze. The precipitation effect is supported by the

presence of ethanol and low temperatures.

Obtained results are suggesting that the process can be described in the first approximation by two simple irreversible subsequent kinetics. The time constant of the first one is governed by the rate of the conversion of simple flavanoids into haze-active form, indicated by the forward scattering chill haze curve and the second one is expressed by the rate of the conventional 90° nephelometric chill haze growth after the lag phase.

Although the molecular mechanisms of the beer permanent haze can not yet be elucidated by the results of the present work the suggested kinetic model can be used to fit or „calibrate“ the first stage of the colloidal ageing process of the particular beer brand and to improve the forecast of beer colloidal stability.

At least but not last, the obtained results will be useful for further studies of the colloidal and flavour ageing processes in commercial beer brands as well as in model systems.

**Sladký, P. – Císařová, H. – Dienstbier, M. – Gabriel, P.: Entwicklung kolloider Trübungen bei hellen Lagerbieren während der Alterung.** *Kvasny Prum.* **47**, 2001, Nr. 11-12, S. 322–327.

Erstmals, direkt in Flaschen, wurde systematisch die Entwicklung der P-T kolloider Trübungen bei einem typischen, mittelfristig stabilisierten hellen 12° Lagerbier im Verlauf verschiedener thermisch-thermalen Regime der Alterung studiert, und zwar mit der Möglichkeit der direkten Verfolgung der Änderungen der Dimensionen der Trübungspartikel mit gleichzeitiger Messung in zwei Lichtstreuungswinkeln – dem konventionellen nefelometrischen (90°) und dem Vorwärtstreuungswinkel (10–15°).

Es wurde entdeckt und bewiesen, dass im Verlauf der Bieralterung ein vorübergehendes Wachstum der P-T kolloiden Partikel der Kältefällung von der Ausgangs-Submikron-

mension in die Supramikrondimension zu-  
stande kommt, wobei diese Erscheinung  
durch das Maximum der Kältetrübungswerte,  
in Vorwärtsstreuung während der Bier-  
alterung gemessen, indiziert ist.

Zur qualitativen Erklärung der beobachte-  
ten Erscheinung wird das Wachstum der Pro-  
portion der Konzervation bzw. Affinität der trü-  
bungsbildenden Polyphenole, die aus  
einfachen Flavanoiden in einer durch Sauer-  
stoff katalysierten Kondensation entstehen,  
gegenüber den trübungsbildenden Eiwei-  
stoffen und ihrer Konzentration erwähnt, und  
zwar im Einklang mit den letzten Erkenntnis-  
sen über den Mechanismus der Protein-Po-  
lyphenolreaktionen in Bierlösungen sowie  
auch in Modellsystemen.

Die erzielten Ergebnisse deuten auch an,  
dass die Bildung P-T kolloider Dauertrü-  
bungen in der ersten Annäherung wahrschein-  
lich durch zwei nacheinanderfolgende irre-  
versible Reaktionen beschrieben werden  
können, wobei die Geschwindigkeit der er-  
sten von ihnen durch die Konversion der ein-  
fachen Flavanole in die trübungsbildende  
Afinform (indiziert durch die Kurve der Ent-  
wicklungskinetik der vorwärtsgerichteten  
Kältetrübung) bestimmt wird und die zweite  
durch die Geschwindigkeit des Wachstums  
der Werte der Kältetrübung bzw. der dauer-  
haften nephelometrischen Trübung nach der  
Lag-Phase gegeben ist.

Wennoch der bisher nicht vollkommen  
aufgeklärte molekulare Mechanismus der Bil-  
dung dauerhafter kolloider Biertrübungen we-  
sentlich komplizierter ist, kann das vorge-  
schlagene kinetische Modell ihrer Bildung  
aufgrund von zwei nachfolgenden irreversi-  
blen Reaktionen mittels der beschriebenen  
Verfahren für die einzelnen Biersorten indi-  
vidualisiert resp. „eingeeicht“ werden, und zwar

zur Applikation für die Präzisierung der Vor-  
aussage der kolloiden Alterung und für die  
komplexe Optimalisierung der Technologien  
zur Erreichung der geforderten physikalisch-  
chemischen, bzw. auch Geschmacksstabilität  
des Endprodukts. Nicht in letzter Reihe kön-  
nen die erzielten Ergebnisse auch zur Ge-  
winnung neuer Erkenntnisse über die Bildung  
kolloider Trübungen nicht nur in Modellsyste-  
mem sondern auch in kommerziellen Bieren  
und Zwischenprodukten appliziert werden.

**Сладкы, П.–Цисаржова, Г.–Диенст-  
биер, М.–Габриел, П.: Образование  
коллоидной мути светлого пива  
лагерного типа в течение старения.**  
Kvasny Prum. 47, 2001, No. 11–12, стр.  
322–327.

Впервые был прямо в бутылках  
исследован процесс P-T коллоидного  
попутнения типичного светлого пива  
лагерного типа средне стабилизирован-  
ного (12°) при разных режимах теплового  
и температурного старения с возмож-  
ностью прямого исследования изменений  
размеров частиц мути с одновременным  
измерением в двух углах рассеяния света  
– 90° и (10–15°).

Было обнаружено и доказано, что в те-  
чение старения пива происходит вре-  
менное нарастание P-T коллоидных  
частиц холодной мути с исходящих  
частиц размером в порядке субмикрон  
на размеры сверхмикрон, опреде-  
ленных максимальными величинами  
холодной мути, измеряемыми углом 15° в  
течение старения пива.

Наблюдаемое явление можно кван-  
титативно объяснить нарастанием отно-  
шения концентрации (или сродства)  
мутнодействующих полифенолов, возни-

кающих кислородом катализированной  
конденсацией из простых флаваноидов и  
конденсации мутнообразующих белков  
в соответствии с недавними сведениями о  
механизме протеин-полифеноловых ин-  
теракций в растворе пива и модельных  
системах.

Полученные результаты намекают,  
что образование постоянных P-T  
коллоидных мутей можно правдепо-  
добно описать двумя последующими  
необратимыми реакциями, скоростью  
первой из которых определена преобра-  
зованием простых флаванолов на му-  
тнообразующую аффинную форму опре-  
деленную кривой кинетики развития  
холодной мути измеряемой углом 15°.  
Скорость второй реакции определена  
скоростью роста величин холодной, или  
постоянной нефелометрической мути в  
течение lag-фазы.

Хотя до сих пор не вполне объяс-  
ненный молекулярный механизм образо-  
вания постоянных коллоидных мутей  
пива существенно сложнее, можно  
предлагаемую кинетическую модель их  
образования на основе двух последу-  
ющих необратимых реакций “градуи-  
ровать” для конкретного производства  
пива указанным путем и использовать  
для уточнения прогноза процесса  
коллоидного старения и для ком-  
плексной оптимизации технологий, веду-  
щих к достижению требуемой физико-  
химической, или вкусовой стабильности  
финального продукта. Полученные  
результаты можно также использовать  
для получения новых знаний о обра-  
зовании коллоидной мути как модельных  
систем, так и изготавливаемого пива и  
промежуточных продуктов.