

# Stabilizační prostředky pro zvýšení koloidní stability piva

## Stabilizers for Increased Colloidal Stability of Beer

PAVEL DOSTÁLEK<sup>1</sup>, BLANKA KOTLÍKOVÁ<sup>1</sup>, JAROMÍR FIALA<sup>1</sup>, LUKÁŠ JELÍNEK<sup>1</sup>, ZBYNĚK ČERNÝ<sup>2</sup>, BOHUSLAV ČÁSENSKÝ<sup>2</sup>, JIŘÍ MIKULKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 / Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic

<sup>2</sup> Katchem spol. s r.o., E. Krásnohorské 6, 110 00 Praha 1 / Katchem Ltd., E. Krásnohorské 6, 110 00 Praha, Czech Republic

<sup>3</sup> ATYPO s r.o., V Olšinách 2300/75, 100 00 Praha 10 / ATYPO Ltd., V Olšinách 2300/75, 100 00 Praha 10, Czech Republic  
e-mail: pavel.dostalek@vscht.cz

**Dostálek, P. – Kotlíková, B. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Černý, Z. – Čázenský, B. – Mikulka, J.: Stabilizační prostředky pro zvýšení koloidní stability piva.** Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 290–295.

Cílem práce bylo shrnout poznatky o nejznámějších prostředcích pro stabilizaci piva, popsat, na jakém principu fungují a v jakém úseku výroby piva se aplikují. Pozornost byla věnována i novému polyamidovému sorbentu BEERPAP®, který byl vyvinut před několika lety a odkoušen v provozních podmínkách několika pivovarů. Při stabilizaci piva bylo zjištěno, že sorbent má stejnou sorpční kapacitu pro zákalotvorné polyfenoly piva (přepočteno na stejné váhové množství polymeru) jako stejná dávka PVPP. Sorbent má také sorpční aktivitu pro sorpci dusíkatých látek, má výborné průtočné vlastnosti a nízký filtrační odpor, je absolutně nerozpustný v pivu a je bez nabobtnání okamžitě použitelný v provozu.

**Dostálek, P. – Kotlíková, B. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Černý, Z. – Čázenský, B. – Mikulka, J.: Stabilizers for increased colloidal stability of beer.** Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 290–295.

The aim of this study was to summarize the findings about the best known beer stabilizers. Their operational principals and processing sections of their application are described.

The attention was given also to the new polyamide sorbent BEERPAP®. It was developed some years ago and tested in several breweries in full scale conditions. This sorbent has the same sorbent capacity for polyphenols which cause beer turbidity (haze) as the same amount of polyvinylpyrrolidone (PVPP) when recalculated to the same polymer weight. This sorbent also has a sorption activity for nitrogen compounds, excellent flow characteristics, low filtration resistance, is completely insoluble in beer and is instantly useable in the production without previous soaking.

**Dostálek, P. – Kotlíková, B. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Černý, Z. – Čázenský, B. – Mikulka, J.: Stabilisationsmittel für die Erhöhung der kolloidal Stabilität des Bieres.** Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 290–295.

Der Artikel befaßt sich mit der Zusammenfassung der neuesten Kenntnisse über die Mittel für die Erhöhung der Stabilität des Bieres und mit der Beschreibung der Funktion der angewandten Prinzipie und in welcher Etappe werden angewandt. Die Aufmerksamkeit wurde auch dem neuen vor einigen Jahren entwickeltes und in einigen Brauereien unter Betriebsbedingungen erprobtes Polyamidsorbent BEERPAP® Stabilisationsmittel gewidmet. Während der Bierstabilisierung wurde ermittelt, dass das Sorbent für die trübungsbildenden Polyphenole des Bieres die gleiche Sorptionskapazität wie die gleiche Menge PVPP (überrechnet auf die gleiche Polymergewichtsmenge) hat. Sorbent wies auch die Sorptionskapazität für die Stickstoffsorption, hervorragende Durchflusseigenschaften und einen niedrigen Filtrationswiderstand auf. Im Bier ist Sorbent absolut unlöslich und ist sofort ohne aufzuquellen bereit zur Stabilisierung.

**Klíčová slova:** koloidní stabilita piva, stabilizační prostředky, PVPP, BEERPAP®, silikagel, tanin, prolin specifická proteasa

**Keywords:** colloidal stability of beer, PVPP, BEERPAP®, silica gel, tannin, proline-specific protease

## 1 ÚVOD

Pivo je ve světě velmi oblíbený nápoj. Protože spotřebitelé vyžadují kvalitní čiré pivo s čerstvou chutí a vůní, správnou barvou a pěnivostí, jsou kladeny stále větší nároky na jeho stabilitu. To je dáno také tím, že v současnosti, kdy je mnoho druhů piv určeno na export, uplyne poměrně dlouhá doba, než se hotový nápoj dostane do rukou konzumenta. I z tohoto důvodu jsou pivovary nuceny používat nejrůznější prostředky pro zajištění dlouhodobé trvanlivosti piva [1].

Na koloidní stabilitu mají negativní vliv především polypeptidy a polyfenoly, které spolu vytvářejí komplexy, ale nemalou roli zde hraje i obsah kyslíku, teplo či světlo. Vzniku zákalu se dá nejlépe předejít zejména výběrem správných surovin, případně odstraněním jednoho nebo obou prekurozorů. To se dá zajistit použitím různých stabilizačních prostředků, kterých je dnes na trhu k dispozici celá řada. Jsou to proteolytické enzymy, taniny, antioxidační prostředky a adsorbenty dusíkatých a polyfenolových látek [1,2].

Proteolytické enzymy štěpí vysokomolekulární látky. Taniny fungují na principu srážení. Reagují s nukleofilními skupinami bílkovin (SH-, NH<sub>2</sub>-) za tvorby tanin-proteinového komplexu, který se poté z piva odstraní. Antioxidační prostředky zmírňují vliv kyslíku obsaženého v pivu. V současné době jsou ale nejoblíbenější adsorpční prostředky. Bílkoviny nejlépe adsorbují křemičité gely, které jsou k dostání ve formě suchých gelů, tzv. xerogely a v hydratované formě, tzv. hydro-

## 1 INTRODUCTION

Beer is one of world's most popular drinks. As the customers call for clear beer of a good quality with a fresh taste and odour, the right colour and foaming power, higher demands are always put on its stability. Another reason is that many types of beer are exported. It can take a relatively long time for the drinks to reach the consumers. Due to these reasons, the breweries are forced to use different treatments to extend long term beer stability [1].

The colloidal stability is negatively influenced especially by polypeptides and polyphenols which combine to produce a colloidal complex known as a haze. Oxygen content, temperature and light also have a not negligible influence. The haze can be prevented in particular by selecting the proper raw materials or by reducing the levels of one or both precursors by means of different stabilizers. Among the number of stabilizers available on the market are proteolytic enzymes, tannins, antioxidants and adsorbents of nitrogen compounds (proteins) and polyphenols [1,2].

The proteolytic enzymes cleave high molecular substances. Tannins work on the principal of precipitation. They react with nucleophiles of proteins (-SH-, -NH<sub>2</sub>) to form a tannin-protein complex, which can be removed from the beer. Antioxidants abate the influence of oxygen contained in beer. Recently, the adsorbent materials have become the most popular. Proteins are best adsorbed by silica gels available in the form

gely. Adsorbent polyfenolů je zesíťovaný polyvinylpyrrolidon (PVP), tzv. PVPP (polyvinylpyrrolidon) a látky založené na tomto materiálu. Alternativou k PVPP při použití na filtru spolu s křemelinou je prostředek BEERPAP®, který je nově vyvinutým polyamidovým sorbentem polyfenolů a vykazuje řadu výhod oproti PVPP [2].

## 2 KOLOIDNÍ STABILITA PIVA

Výrobci běžně pokládají za trvanlivost dobu, která uplyne do vzniku pozorovatelné sedliny nebo zákalu při skladování při 20 °C. I když biologická a senzorycká stabilita je z hlediska trvanlivosti velmi důležitá, posuzuje se trvanlivost hlavně podle stability koloidní [1,2]. Ta je v první řadě ovlivňována koncentrací bílkovin, polyfenolů, kyslíku, polysacharidů a některými kovy [3]. Důležitou roli ale hraje i nedostatečné ošetření piva nebo jeho špatné skladování (vyšší teplota, světlo, pohyby piva) [4].

Koloidní zákaly se dělí na dvě základní skupiny, chladové a trvalé [5], ovšem v pivu se mohou vyskytovat i zákaly kovové, vznikající při vyšší koncentraci kovových iontů v pivu, nebo polysacharidové, vznikající neúplnou hydrolyzou škrobu [6,7]. Bílkoviny a polyfenoly spolu reagují a tvoří tak rozpustné komplexy, které se postupně zvětšují, a tím vzniká viditelný zákal [8]. To představuje velký problém z hlediska trvanlivosti piva, protože zákazníci považují pivo s viditelnou sedlinou za zkažené [9,10]. Schopnost polyfenolů reagovat se zákalotvornými bílkovinami vzrůstá s jejich oxidací [8].

## 3 STABILIZACE PIVA

Dodržování správného technologického postupu při výrobě trvanlivého piva od výběru surovin až po stáčení a skladování může vznik sedlin a zákalů omezit, nikoli však vyloučit. Proto se piva s dlouhou trvanlivostí stabilizují [5]. V České republice se nejčastěji stabilizuje pivo během filtrace, případně na stabilizačním filtru po filtraci. Nejčastěji se v ČR používají křemičité gely. Nejprve je potřeba vědět, jakou koloidní stabilitu pivovar požaduje. Pak je nutné prověřit filtraci piva, protože křemičitý gel má podobné filtrační vlastnosti jako křemelina a jeho přidáváním se nesmí negativně ovlivnit čírost zfiltrovaného piva. Dále se musí počítat s tím, jakou kapacitu filtračního zařízení má pivovar k dispozici, protože dávkování příliš jemného gelu než u pív ze sladů vyrobených z klasických sladovnických jarních ječmenů. Doporučuje se dávkovat gel už ve fázi dokvašování, tzn. do ležáckých tanků. Pro toto použití jsou nejvhodnější křemičité gely s přidáváním bentonitu [12].

Ke stabilizaci se dnes nejčastěji používají dva základní postupy: stabilizace pomocí křemičitých gelů a stabilizace pomocí PVPP. Oba postupy lze kombinovat, případně se dají použít i antioxidanty. Ty se používají v případě, že je zjištěn zvýšený obsah kyslíku ve stočeném pivu [5]. Protože i např. 1 ml vzduchu v hrdlovém prostoru 0,33 lahve při stáčení znamená nárůst obsahu kyslíku na hodnotu 0,8 mg/l a to může zkazit veškeré předchozí snažení o stabilizaci [11]. Nejvíce se používá kyselina askorbová nebo oxid siřičitý ve formě siřičitanů. Chemicky na sebe vážou volný kyslík v pivu a prodlužují chuťovou stabilitu piva. Tento způsob stabilizace je však v některých státech zakázán [5]. V mnohých případech se osvědčilo dávkování stabilizačního prostředku už do ležáckého tanku nebo použití křemičitý gel v kombinaci s bentonitem. Tímto postupem se pivo vyčistí a ušetří se tak jednak křemelina při filtraci a jednak polyvinylpyrrolidon při stabilizaci [11].

## 4 STABILIZAČNÍ PROSTŘEDKY

Ke zvýšení koloidní stability je dnes na trhu velké množství stabilizačních prostředků. Podle působení se rozdělují na srážecí (tanin), enzymové (proteolytické enzymy), adsorpční (adsorbenty dusíkatých látek – křemičité gely, adsorbenty polyfenolových látek – látky na bázi polyamidů) a antioxidační (kyselina askorbová, oxid siřičitý). Všechny tyto prostředky slouží ke snížení obsahu hlavních zákalotvorných sloučenin, tj. bílkovin nebo polyfenolů. Dále je v některých pivovarech používán systém firmy Handtmann, fungující na principu iontoměniče (matrice sorbentu je ze zesíťované agarosy). V současné době jsou nej-

of dry gels (xerogels) and in the form of hydrates (hydrogels). Polyphenols adsorbents are cross-linked polyvinylpyrrolidone (PVP) – polyvinylpyrrolidone (PVPP) and PVPP-based substances. An alternative to PVPP when used on the filter together with kiselguhr is a newly developed polyamide sorbent of polyphenols called BEERPAP®. It has a number of advantages when compared to the PVPP [2].

## 2 COLLOIDAL STABILITY OF BEER

The time until a visible haze or sediment in beer appears when being stored at 20 °C, is indicated by producers as the shelf life. In spite of the fact that both a biological and a sensory stability are very important, the shelf life of beer is determined mainly by its colloidal stability [1,2]. Haze formation is mostly influenced by the concentrations of proteins, polyphenols, oxygen, polysaccharides and the presence of heavy metals [3]. Insufficient beer treatment and poor storage (such as elevated temperature, light or movement) are also very important factors [4].

There are two basic sorts of a colloidal turbidity: the chill haze and the permanent haze [5]. Indeed, metal turbidity formed from an increased concentration of metal ions can also occur in beer as well as polysaccharide turbidity which appears through incomplete hydrolyses of starch [6, 7]. Proteins and polyphenols react to produce soluble complexes which gradually increase and become visible [8]. This phenomenon represents a serious problem with respect to shelf life because the customers consider beer with visible sediment as a spoiled beer [9, 10]. The ability of polyphenols to react with proteins responsible for haze formation is accelerated by beer oxidation [8].

## 3 BEER STABILIZATION

Strict control of the technological procedure for the production of lager beers going from the selection of the proper raw materials to canning, bottling and storage can reduce but not eliminate the formation of haze. Therefore, all beers with a long shelf life must be stabilized [5]. In the Czech Republic beers are stabilized mainly during the filtration procedure or on the stabilization filter just after filtration, mainly by means of silica gels. When choosing the procedure, firstly, it is necessary to know which kind of colloidal stability is required. Secondly, the beer filtration must be checked because the silica gel has similar filtration characteristics as kiselguhr and its addition must not negatively influence the clarity of the filtered beer. Thirdly, it is important to know the filter capacity of the brewery. The use of a large quantity of too fine a gel will clog the sludge area of the filter. As a result, the pressure will quickly rise and the filter capacity will decrease [11]. When using malt produced from barley with high content of proteins for a beer production, it is necessary to add more silica gel than when using malt made from spring malting barley. In this case it is recommended to add the silica gel with a bentonite supplement already at the stage of secondary fermentation directly in the storage tank [12].

Nowadays, two basic approaches are mainly used for the beer stabilization. The stabilization with silica gels and the stabilization with PVPP. Both methods can be combined. In addition antioxidants can be used when increased oxygen content in bottled beer is detected [5]. For example already 1 ml air in the headspace of a 0.33 l bottle results in an increased oxygen content of up to 0.8 mg/l. This value can ruin all previous efforts to stabilize the beer [11]. Ascorbic acid and sulphur dioxide in the form of sulphites are mainly used as antioxidants. They bind the free oxygen due to chemical reactions and extend the flavour stability of the beer. However, this stabilization procedure is forbidden in some countries [5]. Often, the addition of a stabilizer in the storage tanks or the use of silica gel in combination with bentonite has proved to be the right tactic. By using this approach the beer will already be clarified and both the kiselguhr at the filtration and PVPP at the stabilization will be saved [11].

## 4 STABILIZERS

They are a number of agents on the market which can be used for increasing colloidal beer stability. According to the operating methods, they can be divided into precipitation methods (tannin), enzyme methods (proteolytic enzymes), adsorbent methods (adsorbents of nitrogen compounds are silica gels, adsorbents of polyphenols are agents based on polyamides) and antioxidant methods (using ascorbic acid and sulphur dioxide). All these agents reduce the content of the main

používanějšími stabilizačními prostředky adsorpční stabilizátory, protože nejúčinněji odstraňují prekurzory zákalu a navíc jsou v pivu nerozpustné a kompletně odstranitelné. Taniny jsou v pivu po hydrolýze částečně rozpustné a při předávkování se zvyšuje hladina polyfenolů, enzymy po aplikaci zůstávají v pivu [13, 1].

#### 4.1 Křemičité gely

Dr. Raible se pokoušel najít metodu pro stanovení koloidní stability piva. Po řadě různých pokusů zkusil izolovat zákalotvorné frakce bílkovin z piva a z jejich množství usuzoval na koloidní stabilitu zkoumaného piva. Jako prostředek pro izolaci zákalotvorných frakcí bílkovin použil mimo jiné i křemičitý gel. Výsledek byl úspěšný, a tak se rozhodl využít ho pro zvýšení koloidní stability piva [11, 14]. Analýzou bílkovinné frakce adsorbované na křemičitém gelu bylo zjištěno, že nejvíce obsaženými aminokyselinami jsou prolin a glutamin [15].

Křemičité gely se pro adsorpci zákalotvorných frakcí bílkovin, které způsobují zákal v pivu, začaly používat počátkem roku 1961. Tehdy byl křemičitý gel poprvé představen Dr. Karlem Raiblem na Kongresu EBC ve Vídni, v téže roce byl udělen německý patent firmě Stabifix Brauerei Technik, bezprostředně následovalo přihlášení patentu v zahraničí (tím se stal tento pro pivovarství významný objev patentově chráněný po celém světě) a od této doby se datuje aplikace křemičitého gelu v pivovarství [11]. Firma Brauerei Technik uvedla na trh gel pod názvem Stabifix a způsob stabilizace pomocí tohoto prostředku se začal prosazovat v sedmdesátých letech [5]. Odhad celosvětové roční spotřeby gelu je 20 000 až 25 000 t za předpokladu průměrné spotřeby 50 g/hl [3].

Vzhledem k tomu, že křemičité gely nemají vždy stejné vlastnosti (např. obsah vody, průtočnost atd.), není možno je libovolně zaměňovat. Podle obsahu vody je rozdělujeme na xerogely, hydratované xerogely a hydrogely. Je důležité rozlišovat mezi obsahem pevné a aktivní fáze. Obsah pevné fáze znamená absolutní hodnota obsahu oxidu křemičitého. Částice oxidu křemičitého v gelu nejsou všechny stejně aktivní a nemají stejnou adsorpční sílu. Tudiž nedochází k případu, kdy celý povrch současně adsorbuje. Z toho vyplývá, že xerogel (tzv. suchý gel) s nejvyšším obsahem pevných částic nemusí být zároveň výrobkem s nejvyšším podílem aktivních látek, tedy nejúčinnějším stabilizačním prostředkem [13].

Kvalitativní vlastnosti mohou být u křemičitých gelů různých dodavatelů rozdílné podle použitého výrobního postupu. Důležitými parametry jsou objem pórů, jejich průměr a specifický povrch. Těmito parametry je dána porozita. Pro dobrý stabilizační účinek gelu je potřeba, aby struktura jeho pórů byla speciálně přizpůsobena adsorpci specifických zákalotvorných frakcí bílkovin. Z toho plyne, že porozita gelu se musí přizpůsobit tak, aby byl zajištěn dostatečný adsorpční potenciál, Van der Waalsovy síly a přístupnost molekuly bílkoviny do póru. To znamená, že obsah oxidu křemičitého není pro stabilizační účinek rozhodující sám o sobě, ale musí se hodnotit v souvislosti s výše uvedenými parametry [14].

#### 4.2 Polyamidy

Poznání vysoké reaktivity polyfenolů v tvorbě koloidních zákalů vedlo k hledání a vývoji stabilizátorů snižujících jejich koncentraci v pivu. Praktické používání adsorbentů polyfenolových sloučenin v kombinaci s adsorbenty dusíkatých látek umožnilo zajistit podmínky pro dlouhodobé garance koloidní stability lahvového piva až na hranici jednoho roku. Mezi prakticky dominantní polymerní materiály, které se pro sorpci používají, jsou polyamidy, které vážou vodíkovými můstky selektivně fenolové sloučeniny [13]. Nerozpustné polyamidy byly poprvé použity Harrissem a Rickettsem koncem padesátých let pro stabilizaci piva [16]. V jejich pracích bylo ukázáno, že Nylon 66 efektivně odstraňuje anthokyanidiny z piva (stabilizace na polyfenoly tedy byla objevena stejně, jako v případě křemičitých gelů během výzkumu analytických metod). Nicméně praktická aplikace nylonů jako adsorbentů prostředků pro zvýšení koloidní stability piva byla prakticky úplně eliminována kvůli jejich vysoké ceně. V šedesátých letech byl nylon nahrazen levnějším PVPP [17].

##### 4.2.1 Polyvinylpyrrolidon – PVPP

Polyvinylpyrrolidon je makromolekulární, ve vodě nerozpustný polyamid, který je schopen selektivně na sebe vázat všechny polyfenoly [5], které mají odpovídající velikost a molekulové uspořádání vhodné pro spojení s proteiny [2]. Obsahuje totiž stejné –NH funkční skupiny jako zákalotvorné bílkoviny [18]. Je kompletně inertní a tím pádem bezpečný pro používání. Má trojrozměrnou strukturu zpevněnou molekulovými řetězci [2]. Do pivovarů se dodává ve formě mikronizovaného suchého bílého prášku (obsah vlhkosti je max. 6%) s ex-

haze-forming substances such as proteins or polyphenols. In some breweries the system from the company Handtmann is in the use which works on the principal of ion exchange with cross-linked agarose used as a sorbent matrix. Recently the most popular stabilizers have become adsorbent agents, because they reduce the haze precursors most effectively. Additionally, they are insoluble in beer and completely removable. Tannins are partly soluble in beer after hydrolysis and they raise the level of polyphenols through an overdose. Enzymes after application remain in beer [13, 1].

#### 4.1 Silica Gels

Dr. Raible had tried to find a method for the determination of the colloidal stability of beer. After a number of tests he segregated haze-forming fractions of beer proteins. From their amount he judged the colloidal stability of the beer tested. Besides other agents he used a silica gel for the segregation of the haze-forming protein fraction. The result was so excellent that he decided to utilize the silica gel for increasing the colloidal beer stability [11, 14]. The analyses of the protein fraction adsorbed on the silica gel proved that the most inherent amino acids are proline and glutamine [15]. The reduction of the haze-forming protein fraction by silica gels has been used since the beginning of the year 1961. By then Dr. Karle Raible introduced silica gel for the first time at the Congress of the European Brewery Convention (EBC) in Vienna. In the same year the German patent was granted to the company Stabifix Brauerei Technik and soon afterwards the patents abroad followed. Since then this important discovery patent is protected throughout the world and since that time dates the application of silica gel in the beverage industry [11]. The company Stabifix Brauerei Technik marketed the gel under the name of Stabifix. The usage of this stabilizer began to assert itself in the seventies [5]. Assuming an average demand of 50 g/hl beer, the estimated yearly worldwide demand for the silica gel is about 20,000–25,000 tonnes [3].

In view of the fact that silica gels do not always have the same properties (for instance the water content or the flow rate) it is impossible to replace them arbitrarily. They are classified according to water content into xerogels, hydrated xerogels and hydrogels. It is important to consider the difference between the content of solid and active phases. The content of the solid phase presents an absolute value of silicon dioxide. The particles of silicon dioxide in the gel do not have the same activity and adsorbent power. Due to this fact, the whole surface never adsorbs simultaneously. As a result the xerogel (dry gel) with the highest content of solid particles is not necessarily the product with the highest portion of active particles and therefore not the most effective stabilizer [13].

The qualitative properties of silica gels from different producers also vary due to the diverse manufacturing processes. Important parameters are the volume of the voids, their diameter and the specifics of the surface. These parameters determine the porosity. The void structure of a good stabilizer must be adjusted for the adsorption of specific haze-forming protein fractions. The gel porosity must be modified in such a way that sufficient adsorbent potential, sufficient van der Waals interaction and protein molecule accessibility into the voids are ensured. It follows that the content of silicon dioxide by itself does not determine the quality of the stabilizer. Moreover, the parameters mentioned above must be considered as well [14].

#### 4.2 Polyamides

After the significant participation of polyphenols in the haze formation was discovered, the development of stabilizers reducing their concentration in beer began. The standard usage of polyphenol adsorbents in combination with adsorbents of nitrogen compounds guarantees the long-term colloidal stability of bottled beer for up to one year. The most used polymeric materials are polyamides which bind selectively phenol compounds by means of hydrogen bonds [13]. The polyamides insoluble in beer were first applied as beer stabilizers by Harris and Ricketts at the end of the fifties [16]. In the published study they show the effectiveness of Nylon 66 for reducing anthocyanins in beer. The stabilization due to the removal of polyphenols was discovered in the course of a study of analytical methods, as in the case of silica gels. Nevertheless, the application of nylons as adsorbent agents for increasing the colloidal stability of beer was almost entirely blocked due to their high price. In the sixties the nylon was replaced by the cheaper PVPP [17].

##### 4.2.1 Polyvinylpyrrolidone – PVPP

The PVPP is a macromolecular, water insoluble polyamide which is able to bind selectively all polyphenols [5] with the appropriate size and molecular arrangement for binding proteins [2]. It contains the



trémně vysokým poměrem povrchu ke hmotnosti (1,2 m<sup>2</sup>/g). Zvýšení specifického povrchu totiž umožňuje použití přípravku v menších dávkách než stabilizační prostředek s větší velikostí a hrubostí částic [2]. Reakce probíhá jenom v určité oblasti pH – v alkalickém prostředí se vazba uvolňuje a adsorbované látky přecházejí zpět do roztoku. Na tomto principu je založena regenerace PVPP. V současné době se používají hlavně dva způsoby stabilizace piva PVPP: přidání PVPP při filtraci ke křemelině při dávkování (ztracená filtrace) a stabilizace PVPP s následnou regenerací a recyklací [2]. Při normálním dávkování PVPP (20–60 g/hl) odstraňuje přibližně 40 % anthokyanogenů obsažených v pivu. Struktura PVPP nedovoluje vytvářet žádné vnitřní vodíkové vazby, veškeré vodíkové vazby jsou k dispozici pro adsorpci polyfenolů, což je důvodem dobré účinnosti této adsorpcce [2].

V současnosti je na trhu několik stabilizačních prostředků na bázi PVPP. Pravděpodobně nejpožívanější je Polyclar 10 od firmy ISP a jeho obdoba Divergan F od firmy BASF. Tento bílý, jemný, ve vodě, v kyselinách, zásadách a organických rozpouštědlech nerozpustný prášek je vhodný ke kombinovanému použití s křemičitými gely. Svůj stabilizační účinek plně rozvine, je-li před použitím rozmíchán s vodou teplou zhruba 40 °C jeden den před filtrací. Po nabobtnání se přípravek může dávkovat buď přímo s křemelinou do piva, nebo samostatně ze speciálního dávkovače, přičemž optimální doba kontaktu je 5 až 10 minut. Tento přípravek je kompletně odstranitelný během filtrace. Optimální dávkování je v rozmezí 10 až 40 g/hl a kontaktní doba by měla být nejméně 3 minuty [1]. Další variantou je PVPP určené pro opětovné použití (regeneraci). Proto vyžaduje speciální filtrační a regenerační zařízení, skládající se z filtrační jednotky instalované za křemelinovým filtrem. Suspenze produktu se přidává do přefiltrovaného piva a po 4 až 5 minutách je dosaženo plné účinnosti. Na trhu je Divergan RS (BASF) a Polyclar Super R (ISP). Prostředek je hrubozrnný prášek s průměrnou velikostí částic 80 až 100 µm a je tedy i mechanicky pevnější než prostředek používaný pro jedno použití. Regenerace pak probíhá ve filtrační jednotce. Stabilizátor se regeneruje pomocí roztoku hydroxidu sodného. Takto regenerovaný prostředek se znovu propłachuje, neutralizuje, pasterizuje a je připraven pro další použití. Ztráty PVPP jsou minimální (max. 1 % při každé regeneraci), přesto se doporučuje pravidelně kontrolovat obsah pevného PVPP a ztráty doplnit [2].

#### 4.2.2 Polyamidový sorbent na bázi křemeliny – BEERPAP®

V 80. letech byl proveden velmi intenzivní výzkum na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze a byla vyvinuta celá řada polyamidových sorbentů s excelentními sorpčními účinky na polyfenoly. Pokusně byly testovány i chemicky modifikované polyamidy na bázi polykaprolaktamu a polyethylenoxidu [13,19]. Tyto prostředky se ale nikdy ve velkém nevyráběly.

V současné době je snaha vytvořit nové stabilizační prostředky na bázi polyamidu-6 nebo polyamidu 66 kombinovaného s křemelinou a prosadit je v nápojovém průmyslu jako náhradu za dosud používané sorbenty na bázi síťovaných polyvinylpyrrolidonů. Jedním z představitelů takovýchto nových sorbentů je BEERPAP® vyrobený ve spolupráci firm KATCHEM, VŠCHT a firmou ATYPO [20, 21, 22].

BEERPAP® je nový původní český výrobek určený ke stabilizaci nápojů, především piva a vína. Je založen na sorpci polyfenolů, takže by mohl nahradit používání celkem drahého PVPP. Provozní zkoušky ukázaly, že sorbent BEERPAP® má při stejném váhovém množství stejnou sorpční kapacitu pro zákalotvorné polyfenoly piva jako stejná dávka PVPP. Sorbent má navíc vysokou aktivitu i pro sorpci bílkovin, takže dobře redukuje oba hlavní prekursorů zákalu piva. Dále má výborné průtočné vlastnosti, nízký filtrační odpor a protože je to pravý polymer, je naprosto nerozpustný v pivu. Další výhodou oproti PVPP je, že se nemusí nechat nabobtnat. Doporučené dávkování je 40 až 50 g/hl, ale samozřejmě záleží na dalších okolnostech, jako např. na používaných surovinách a technologii nebo na požadované trvanlivosti. Tento prostředek byl úspěšně provozně odzkoušen v několika českých pivovarech [21,22] a používá se při křemelinové filtraci, kde se dá kombinovat i s křemičitými gely.

#### 4.3 Agarosový sorbent (iontoměnič)

Systém CSS firmy Handtmann je kompaktně konstruované stabilizační zařízení, které pracuje automaticky a lze jej integrovat do běžné filtrační linky [4, 2]. Skládá se z jednoho nebo více modulů, ve kterých je jako náplň použita upravená agarosa. Přefiltrované pivo protéká modulem systému CSS, který je naplněn adsorpčním materiálem a je založen na adsorpci bílkovin a polyfenolů v jednom kroku a následné regeneraci. Ke specifickému odstranění látek tvořících zákal stačí kontaktní doba několik sekund. Je to tedy alternativa ke kombinované stabilizaci piva s použitím křemičitých gelů a PVPP.

same –NH<sub>2</sub> functional group as haze-forming proteins [18] and is completely inert and therefore safe for the use. The PVPP has a three-dimensional structure reinforced by the molecular chains [2]. It is delivered to the breweries in the form of micronized dry powder of max. 6 % water content and an extremely high surface to weight ratio of 1.2 m<sup>2</sup>/g. Enhancement of the specific surface makes it possible to use the agent in smaller doses than a stabilizer with a higher coarseness and particle size [2]. The reaction occurs only in a certain pH range. In an alkaline environment the bonds release and the adsorbed particles go back into solution. PVPP recovery is based on this principle. Recently two main stabilization procedures using PVPP are employed: a PVPP addition to silica gel during filtration and a stabilization followed by PVPP recovery and recycling. With a normal PVPP dosage of 20–60 g/hl about 40 % of anthocyanins contained in the beer are removed. The structure of the PVPP does not allow the formation of any internal hydrogen bonds. All hydrogen bonds are available for the adsorption of polyphenols which is the reason for its high effectiveness [2]. They are a number of stabilizers based on PVPP on the market. Probably the most frequently used is Polyclar from the International Speciality Products Inc. (ISP) and its analogue Divergan F from BASF. This white, fine powder, insoluble in water, acidic and alkaline liquids and in organic solvents is suitable for combination with silica gels. Its full effectiveness is reached after being soaked in circa 40 °C warm water for 24 hours. The soaked agent can be added to the beer either directly with the silica gel or separately from a special dispenser. The agent can be completely removed in the course of filtration. The optimal dosage ranges from 10 to 40 g /hl beer and the contact time should be at least 3 minutes with an optimum time of 5 to 10 minutes [1].

Other types of stabilizer based on PVPP are agents intended for repeated applications. A special filtration unit installed after the kieselguhr filter must be available. The stabilizer in the form of a suspension is added to the filtered beer. After 4 to 5 minutes the full effectiveness is developed. Available on the market are Divergan RS from BASF and Polycar Super R from ISP. The agent is a coarse grained powder with an average particle size of 80 to 100 µm. Therefore, it is also mechanically stronger than the stabilizer for single use. The recovery is carried out in the filtration unit which is rinsed with carbon dioxide under pressure. The substances adsorbed in the filter cake are removed by rinsing with water followed by rinsing with sodium hydroxide. The recovered agent must be rinsed again, neutralized, pasteurized and then is prepared for next stabilization. In spite of the fact that the losses are minimal (max. 1 % per recovery) it is advisable to control the content of solid PVPP regularly and compensate for any losses [2].

#### 4.2.2 Polyamide Sorbent Based on Kieselguhr – BEERPAP®

In the eighties intensive research at the Institute of Chemical Technology Prague (VŠCHT) was carried out and a number of polyamide sorbents with excellent sorbent properties for polyphenols was developed. Some chemically modified polyamides based on polycaprolactam and polyethylene oxide were tested [13, 19]. However, these agents were never produced in a large scale.

Currently, there is an effort to develop new stabilizers based either on polyamide 6 or on polyamide 66 combined with kieselguhr and promote them in the beverage industry as a replacement for the hitherto used sorbents based on cross-linked polyvinylpyrrolidone. One of these newly developed agents is BEERPAP® produced in the co-operation between the companies Katchem and ATYPO and the VŠCHT [20, 21, 22].

BEERPAP® is an original Czech product designed for the stabilization of beverages, especially of beer and wine. Due to the adsorption of polyphenols it is predestined to replace the rather expensive PVPP. A full scale trial proved the same sorbent capacity for haze-forming polyphenols as the same amount of PVPP when recalculated to the same polymer weight. Additionally, this stabilizer has a high sorption activity for proteins so that it successfully reduces both the two most important precursors of the beer haze. Furthermore it has excellent flow characteristics, low filtration resistance and as a real polymer it is completely insoluble in beer. Another advantage when compared to PVPP is its instant use without previous soaking. It can be used for a kieselguhr filtration but a combination with silica gels is also possible. The recommended dosage is from 40 to 50 g/hl and that varies according to other circumstances such as the raw materials and technology used or the desired shelf life. This sorbent was successfully tested in full scale trials in several Czech breweries [21, 22].

#### 4.3 Agarose Sorbent (Ion Exchanger)

The Combined Stabilization System (CSS) from the company

Adsorbér systému CSS obsahuje příčně zesíťovanou nerozpustnou agarozu, což poskytuje stabilní a nerozpustnou porézní matici s velikostí částic 100 až 300  $\mu\text{m}$ , na které se zachycují bílkoviny a polyfenoly a při regeneraci se z ní opět uvolňují. Splňuje tak potravinářské předpisy a německý „zákon o čistotě piva“ (Reinheitsgebot), protože ani vlastní materiál systému, ani jakékoli rozpustné látky nepřecházejí do piva. Adsorpce je selektivní a z piva jsou odstraňovány jen sloučeniny tvořící zákaly. Díky této selektivitě je odstraňováno méně bílkovin i polyfenolů, než je tomu u tradičních stabilizačních metod a zároveň se dosahuje minimálně stejné stability piva [4,2].

#### 4.4 Taniny

Přírodní taniny jsou velkou skupinou rostlinných polyfenolických sloučenin. Dělí se na tzv. kondenzované a hydrolyzovatelné taniny, které mohou být dále děleny na gallotaniny a ellagitanniny. Hydrolyzovatelné obsahují několik monomerních skupin kyseliny gallové navázaných na cukr, kondenzované taniny jsou polymery flavonových jednotek. Tyto skupiny tvoří s bílkovinami vodíkové můstky, zatímco karbonylové skupiny taninu reagují s nukleofilními skupinami jako např. SH- nebo NH<sub>2</sub>-, a tím vzniká tanin – bílkovinný komplex [13].

Vysoce čisté taniny mají obvykle nepatrně natrpklou chuť a reagují hlavně s bílkovinami piva o molekulové hmotnosti mezi 10 a 30 kDa [13]. Dají se využít jako čistič a čířicí prostředky k odstranění přebytečných bílkovin, jako antioxidanty a stabilizátory barvy. Taniny se mohou aplikovat v různých fázích výroby, např. během rmutování, chmelovaru, sudování nebo před filtrací. Podle toho jsou tyto stabilizační prostředky také odstraněny, a to buď na varné spole s mlátem, ve vířivé kádi, sedimentací během ležení piva nebo při filtraci. Podle druhu přípravku je běžné dávkování v rozmezí 0,5 až 8 g/hl [23]. Protože v pivu jejich hydrolyzované produkty částečně zůstávají, nesplňují tak tzv. zákon o čistotě piva (Reinheitsgebot). Na trhu jsou pod označením Brewtan od firmy Ajinomoto OmniChem.

#### 4.5 Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy (např. papain z papáji, bromelain z ananasu, ficin z fíků) se dlouhou dobu používaly ke snižování obsahu proteinů, které tak nemohou snadno vytvářet protein-polyfenolové komplexy [17]. Bohužel tyto proteasy nejsou příliš specifické. Stejně tak, jak hydrolyzují zákalotvorné bílkoviny, totiž hydrolyzují i hydrofobní polypeptidy, odpovědné za vznik pěny. Jejich používání má několik dalších nevýhod: zůstávají v pivu a negativně mohou ovlivnit pěnivost piva, jejich použití je v rozporu s tzv. zákonem o čistotě piva (Reinheitsgebot). Naopak jejich výhodou je poměrně nízká cena.

Pokud už dojde k rozhodnutí používat ke stabilizaci piva enzymy, je vhodnější dávkovat prolin-specifickou proteasu, která nenarušuje pěnótvorné bílkoviny (ty mají velmi nízký obsah prolinu). Jejím působením dochází k redukci řetězce bílkovin bohatých na prolin a tyto bílkoviny poté nejsou schopny tvořit bílkovinnopolyfenolové komplexy [24]. Doporučuje se přidávat enzymy ihned po chmelovaru, ale možná je i varianta, dávkovat je do piva během ležení [19]. K jejich odstranění je potřeba pasterizace, ale některé mohou zůstat aktivní i po ní [25]. Na trhu je dostupná prolin-specifická proteasa Brewers Clarex od firmy DSM, která se dává od 2 do 4 gramů na hl piva.

#### 4.6 Antioxidanty

Tyto látky se používají v případech, že je v pivu obsaženo větší množství kyslíku. Fungují tak, že na sebe volný kyslík chemicky váží. Nejčastěji používaným antioxidantem je kyselina askorbová a oxid siřičitý ve formě siřičitanů. Tyto látky zároveň prodlužují chuťovou stabilitu piva, ale v některých státech je jejich používání zakázáno, protože v pivu zůstávají a nesplňují tak tzv. zákon o čistotě piva (Reinheitsgebot) [5]. Běžné dávkování kyseliny askorbové je v rozmezí od 0,2 do 0,5 g/hl a dávkovat se může buď do přetlačných tanků, nebo při filtraci do piva. Oxid siřičitý v pivu vzniká během kvašení a je to tedy přirozený antioxidant, ovšem jeho následné dávkování do piva není příliš rozšířené [13].

## 5 ZÁVĚR

Koloidní trvanlivost piva závisí především na obsahu bílkovin a polyfenolů. Aby se netvořil koloidní zákal, je potřeba tyto sloučeniny z piva buď vyloučit, nebo eliminovat faktory, které vznik zákalů urychlují.

Z velké části záleží na použitých surovinách a celé technologii výroby piva, ovšem bez použití stabilizačních prostředků se vysoké trvanlivosti nedosáhne. Většinou stačí použít jeden stabilizační prostředek.

Handtmann is based on the adsorption of proteins and polyphenols in one step and a following recovery. It is a compactly constructed and fully automatic stabilizing device and it can be integrated into a common filtration unit [4, 2]. It is composed of one or more units filled with treated agarose. The filtered beer flows through the CSS unit filled with adsorbent material. The removal of specific haze-forming substances is accomplished in few seconds. Therefore, is a good alternative to the combined beer stabilization using silica gels and the PVPP.

The adsorbent of the CSS is a highly cross-linked insoluble agarose which forms a stable porous matrix with a particle size of 100–300  $\mu\text{m}$ . The adsorbed proteins and polyphenols are released by the recovery process. Since neither the adsorbent material nor any soluble substances pass into beer, the CSS fulfils the food laws and the German Beer Purity Law (Reinheitsgebot). As the CSS removes selectively only haze-forming substances, generally less proteins and polyphenols are removed from beer when compared to traditional stabilization methods and at the same time at least an equal beer stability is reached [2, 4].

#### 4.4 Tannins

The natural tannins are part of a large group of vegetable polyphenolic compounds. They are divided into condensed and hydrolysable tannins. The hydrolysable tannins can be further divided into gallotannins and ellagitannins which contain monomeric groups of gallic acid bonded to glucose. Condensed tannins are polymers of flavonoid units. These groups create hydrogen bonds with proteins whereas the carboxylic groups of tannins react with nucleophilic groups as -SH or -NH<sub>2</sub> to form a tannin-protein complex [13].

The highly pure tannins usually have a slightly astringent taste. They react preferably with beer proteins of a molecular weight between 10 and 30 kDa [13]. They can be used as clarifying and fining agents for the elimination of excessive proteins, as antioxidants and as colour stabilizers. Tannins can be applied in different production steps for instance during the mashing, the wort boiling and the racking or before the filtration. Depending on the application step, the stabilizers are removed either in the brewhouse together with spent grains, or in the whirlpool-tank by sedimentation during the beer storage or during the filtration. Since some their hydrolysed products of tannins remain in the beer they do not conform to the German Beer Purity Law (Reinheitsgebot).

Depending on the specific product the usual doses range from 0.5 to 8 g/hl [23]. A product available on the market is for example Brewtan from the company Ajinomoto OmniChem.

#### 4.5 Proteolytic enzymes

The proteolytic enzymes, for example papain from papaya, bromelain from pineapple or ficin from figs, have been used for a long time to prevent the building of protein-polyphenol complexes by reducing the protein content [17]. Nevertheless, these proteolytic enzymes are rather non-selective. They hydrolyse both, the haze-forming proteins and the hydrophobic polypeptides responsible for the foaming power. Their use also has further disadvantages. They remain in the beer and have negatively impact to foam of beer and since they remain in the beer they do not conform to the German Beer Purity Law (Reinheitsgebot). Their advantage is a relatively low price.

If choosing proteolytic enzymes as the beer stabilizer it is advisable to use a proline-specific protease which does not destroy the low in proline foam-forming proteins. They degrade the chains of proteins rich in proline and thereby prevent the formation of complexes with polyphenols [24]. It is recommended to add the enzymes directly after wort boiling but an addition during beer storage is also possible [19]. A pasteurisation is necessary for the deactivation of proteolytic enzymes; nevertheless, some enzymes can stay active even after the pasteurisation [25]. Available on the market is the proline-specific protease Brewers Clarex from the DSM Company Chemie GmbH. The recommended dosage is 2–4 g/hl beer.

#### 4.6 Antioxidants

These agents are used in cases of increased oxygen content in the beer. They chemically bind free oxygen. The most used antioxidants are ascorbic acid and sulphur dioxide in the form of sulphites. These compounds also ensure the taste stability. Since they remain in the beer they do not conform to the German Beer Purity Law (Reinheitsgebot) and are forbidden in some countries [5]. The dosage of ascorbic acid usually ranges from 0.2 to 0.5 g/hl beer. The addition is done to the bright beer tank or in the course of the filtration. The sulphur dioxide in beer is formed during the fermentation and therefore it is a natural antioxidant. Nevertheless, its use is not common [13].

dek a z piva tak vyloučit buď zákalotvorné bílkoviny, nebo polyfenoly. Pokud jsou piva určená na export a je tedy nutné, aby trvanlivost byla vyšší, je lepší, použít kombinovanou stabilizaci a snížit tak množství jak bílkovin, tak polyfenolů. Proto je nutné, aby si každý pivovar určil, jak dlouhou trvanlivost požaduje, podle toho se rozhodl, jaké prostředky bude používat a pak si vyzkoušel vlastní dávkování, protože i když výrobce doporučí určité rozmezí dávek, každý pivovar si ho nakonec musí upravit podle vlastních podmínek a vlastností piva.

#### Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/ 2011), z prostředků Výzkumného centra 1M0570 (MŠMT) a Výzkumného záměru MSM6046137305 (MŠMT).

*Recenzovaný článek / Reviewed paper*

*Do redakce došlo / Manuscript received: 13. 5. 2011*

*Přijato k publikování / Accepted for publication: 22. 6. 2011*

## 5 CONCLUSIONS

The colloidal stability of beer depends mainly on the content of proteins and polyphenols. To prevent the formation of beer haze it is necessary to remove these compounds from the beer or eliminate all factors accelerating this process. Highly important are the raw materials and the technology used but it is not possible to reach a long shelf life without the use of stabilizers. Mostly it is sufficient to employ a single stabilizer which removes either polyphenols or proteins. In cases where a long shelf life is required as with beers assigned for export, the combined stabilization procedure involving the reduction of both the proteins and the polyphenols is recommended. Therefore, an assessment of the required shelf life is critical for each brewery. Based on this requirement the most suitable stabilizer and the size of dosage can be decided. The dosage should be assessed by individual testing with respect to the conditions and the beer characteristics, since the producers only recommend the dosage range needed.

#### Acknowledgements

This study was supported by the grant for Specific Academic Research MŠMT (Adjudication No. 21/2011), Research Centrum 1M0570 and Research project MŠMT 6046137305.

*Translated by Ing. Eva Paterson*

## LITERATURA / REFERENCES

1. Kotlíková, B.: Optimalizace postupů stabilizace piva, Diplomová práce, VŠCHT, Praha, 2011.
2. Kotlíková, B.: Stabilizační prostředky a jejich využití v pivovarském průmyslu, Bakalářská práce, VŠCHT, Praha, 2009.
3. Niemsch, K., Raible, K.: 30 let zkušeností se zvyšováním kvality stabilizací piva křemičitým gelem, firemní materiály, Stabifix Brauerei Technik KG, Mnichov, Německo, 1991.
4. CSS Combined Stabilization System beer stabilization, Albert Handtmann Armaturenfabrik GmbH & Co.KG, firemní materiály <http://www.handtmann.de/plant-engineering/filtration-and-separation/css-beer-stabilization.html?L=1> staženo 18. 4. 2011.
5. Kosař, K., Procházka, S.: Technologie výroby sladu a piva, VÚPS, Praha, 2000. ISBN: 80-902658-6-3.
6. Janková, L.: Srovnání metod pro odhad koloidní stability piva, Diplomová práce, VŠCHT, Praha, 2007.
7. Dienstbier, M., Janková, L., Sladký, P., Dostálek, P.: Metody předpovědi koloidní stability piva. Chem. Listy **104**, 2010, 86–92.
8. Parker, D. K.: Study of haze formation in freshly packaged and stored beers. Tech. Q. MBAA Commun. **44**, 2007, 23–28.
9. Robinson, L. H., Evans, D. E., Kaukovirta-Norja, A., Vilpolo, A., Aldred, P., Home, S.: The interaction between malt protein quality and brewing conditions and their impact on beer colloidal stability. Tech. Q. MBAA Commun. **41**, 2004, 353–362.
10. Siebert, K. J., Carrasco, A., Lynn, P. Y.: Formation of protein – polyphenol haze in beverages. J. Agric. Food Chem. **44**, 1996, 1997–2005.
11. Niemsch, K.: Kvalitativní aspekty křemičitých solí a gelů. Kvasny Prum. **50**, 2004, 218–220.
12. Niemsch, K.: Quo vadis, stabilito piva? Kvasny Prum. **53**, 2007, 139–141.
13. Basařová, G.: Pivovarství: teorie a praxe výroby piva, Vydavatelství VŠCHT Praha 2010, ISBN: 978-80-7080-734-7.
14. Niemsch, K.: Beer stabilization renaissance with silica gel. Brauwelt **140**, 2000, 580–583, 585.
15. Robinson, L. H., Healy, P., Stewart, D. C., Eglinton, J. K., Ford, C. M., Evans, D. E.: The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability: The genetic basis of a barley malt haze active protein. J. Cereal Sci. **45**, 2007, 335–342.
16. Harris, G., Ricketts, R. W.: Nonbiological hazes of beers. IX. Effect on Nylon 66 in delaying formation of haze. J. Inst. Brew. **65**, 1959, 418–422.
17. Priest, F. G., Stewart, G. G.: Handbook of Brewing, CRC Boca Raton 2006, ISBN: 0-8247-2657-X.
18. Bamforth, C. W.: Brewing: New Technologies, Woodhead Publishing, 2006, ISBN: 0-8493-9159-8.
19. Basařová, G.: The structure-function relationship of polymeric sorbents for colloid stabilization of beer. Food Structure **9**, 1990, 175–194.
20. Černý, Z., Čáskenský, B., Fusek, J., Neumann, J., Dostálek, P.: Polyamidový sorbent pro stabilizaci nápojů a způsob jeho výroby, PV 479, 2007.
21. Dostálek, P., Černý, Z., Čáskenský, B.: Stabilizace piva pomocí polyamidových sorbentů. 22. Pivovarsko-sladařské dny, Praha 1.–2. 11. 2007, Kvasny Prum. **53**, 2007, 307.
22. Dostálek, P., Šiříšková, L., Černý, Z., Čáskenský, B., Mikulka, J.: Aplikace polyamidových sorbentů v pivovarství – praktické zkušenosti, 23. Pivovarsko-sladařské dny, České Budějovice, 15.–16. 10. 2009, Kvasny Prum. **55**, 2009, 232.
23. Brewery - Brewtan "Bright Ideas for Brilliant Beers", <http://www.natural-specialities.com/natural-specialities/en/8443-brewery.html>, Ajinomoto OmniChem, firemní materiály, staženo 18. 4. 2011.
24. Lopez, M., Edens, L.: Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from Aspergillus niger. J. Agric. Food Chem. **53**, 2005, 7944–7949.
25. Briggs, D. E.: Brewing: Science and Practice, Woodhead Publishing Limited and CRC Press, England, 2004, ISBN: 0-8493-2547-1.

# PIVOVARSKÝ KALENDÁŘ

starší ročníky pivovarského kalendáře  
v omezeném množství k dispozici

sleva: 70 Kč (vč. DPH)

objednávky: [boudova@beerresearch.cz](mailto:boudova@beerresearch.cz)