

## Předpověď vzniku koloidního zákalu piva

### Prediction of Beer Colloidal Haze Formation

Blanka KOTLÍKOVÁ, Lukáš JELÍNEK, Marcel KARABÍN, Pavel DOSTÁLEK

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, Praha 6, 166 28 / Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Praha 6, 166 28

Email: kotlikob@vscht.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

**Kotlíková, B. – Jelínek, L. – Karabín, M. – Dostálek, P.: Předpověď vzniku koloidního zákalu piva.** Kvasny Prum. 59, 2013, č. 4, s. 101–104.

Pivo má, stejně jako všechny ostatní potraviny, omezenou trvanlivost, se kterou velmi úzce souvisí jeho koloidní stabilita. Protože jsou na ni v současné době kladeny stále vyšší nároky, jsou pivovary nuceny používat k jejímu prodloužení nejrůznější stabilizační prostředky. K zaručení minimální doby trvanlivosti dnes existuje řada metod, kterými se dá trvanlivost předpovědět. Jedná se o tzv. šokovací a precipitační testy. Během šokování dochází k urychlení stárnutí piva a zrychlené tvorbě koloidního zákalu pomocí střídání vysokých a nízkých teplot, zatímco pomocí precipitačních testů se dá zjistit obsah zákalotvorných prekurzorů v pivu a takto předpovědět jeho trvanlivost.

**Kotlíková, B. – Jelínek, L. – Karabín, M. – Dostálek, P.: Prediction of beer colloidal haze formation.** Kvasny Prum. 59, 2013, No. 4, p. 101–104.

Like all of foods, beer suffers from a limited shelf life, which is closely related to the colloidal stability. Due to the increasing demand for rather a lasting products, breweries are forced to use a variety of stability-extending agents. Today, there is a number of methods that can predict a minimum shelf life. These methods are called forcing and precipitation tests. Forcing tests accelerate the ageing of beer through alternation of high and low temperature, resulting in earlier formation of colloidal haze. Precipitation tests can detect the content of haze-active precursors in beer, thus predicting its shelf life.

**Kotlíková, B. – Jelínek, L. – Karabín, M. – Dostálek, P.: Die Vorhersage der Bildung der kolloidalen Trübung im Bier.** Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 4, S. 101–104.

Wie die anderen Lebensmittel wies das Bier auch eine beschränkte Haltbarkeit auf, mit der seine kolloidale Stabilität sehr eng zusammenhängt. Im Hinblick auf die zunehmenden Ansprüche auf die Verlängerung der Haltbarkeit des Bieres, sind die Brauereien gezwungen, zu ihrer Verlängerung verschiedene Stabilisationsmittel anzuwenden. Zurzeit gibt es verschiedene Methoden zur Sicherung der minimalen Haltbarkeit des Bieres, mit deren seine Haltbarkeit prognostiziert werden kann. Es handelt sich um die Schockiert- und Präzipitationstesten. Durch die Änderung der niedrigeren und hohen Temperatur während des Schockierttests wird die Alterung des Bieres beschleunigt, mit der Anwendung von Präzipitationstesten kann der Gehalt an trübungsbildende Prekursoren im Bier und dadurch auch seine Haltbarkeit prognostiziert werden.

**Klíčová slova:** pivo, koloidní stabilita, koloidní zákal, zákalotvorné prekurzory, šokovací testy, precipitační testy

**Keywords:** beer, colloidal stability, colloidal haze, haze-active precursors, forcing tests, precipitation tests

## 1 ÚVOD

Koloidním zákalem piva se rozumí soustava koloidních částic, které jsou tvořeny tzv. prekurzory zákalu (bílkoviny a polyfenoly). Bílkoviny a polyfenoly spolu ochotně reagují a vytvářejí komplexy, jejichž částice se postupně zvětšují. Tím se komplexy stávají nerozpustnými a vzniká viditelný zákal (Parker, 2007). Rozhodujícím faktorem je přítomnost kyslíku, díky němuž dochází k oxidaci polyfenolů a jejich schopnost reagovat s bílkovinami tak vzrůstá (Parker, 2007). Kromě kyslíku ale tvorbu zákalu urychlují i další vlivy, především nevhodné podmínky při skladování (světlo nebo vyšší teploty) (Robinson et al., 2004). Vznik zákalu představuje pro výrobce velký problém, protože zákazníci považují viditelnou sedlinu v pivu za vadu (Robinson et al., 2004; Siebert et al., 1996). Po celou dobu záruky by pivo mělo být čiré, jiskrné, pěnové, řízné a mělo by mít odpovídající chuť a vůni (Rehmanji et al., 2004). Během garantované trvanlivosti musí tedy pivovar zaručit, že se pivo z biologického i nebiologického hlediska nezmění a ke spotřebiteli se dostane pouze s minimálními senzoryckými změnami.

K vyřešení problémů spojených s koloidní stabilitou piva je v pivovarech nezbytné používat nejrůznější stabilizační prostředky (křemičité gely, polyamidové sorbenty). Úkolem stabilizace je minimalizovat riziko vzniku koloidních a senzoryckých změn. Pivovar by proto měl během deklarované doby záruky provádět kontroly kvality daného produktu. Pro každého výrobce je tedy důležité najít vhodnou metodu, která dostatečně přesně a rychle předpoví trvanlivost daného piva.

Míra koloidní stability piva je vždy závislá na řadě konkrétních fyzikálně-chemických vlastností každé šarže výrobku a způsobu skladování. K jejímu stanovení proto doposud neexistuje univerzální metoda použitelná pro všechna piva. Pro obecný odhad trvanlivosti byla v minulosti vyvinuta celá řada fyzikálních i chemických metod (Siebert a Lynn, 2005; Siebert a Lynn, 2006). Mezi nejvíce využívané metody pro stanovení předpovědi trvanlivosti piva patří tzv. šokovací

## 1 INTRODUCTION

Colloidal haze is a system of colloidal particles built by the precursors of colloidal haze – proteins and polyphenols. Proteins and polyphenols react together to build complexes with gradually increasing particle size. The bigger particles become insoluble causing a visible turbidity (Parker, 2007). The critical factor is the presence of oxygen which allows oxidation of the polyphenols and thus increases their ability to react with the proteins (Parker, 2007). Apart from oxygen, the haze formation is also accelerated by further factors, in particular by inappropriate storage conditions such as light or elevated temperature (Robinson et al., 2004). The haze formation creates a big problem for producers since consumers regard visible turbidity in beer as a defect (Robinson et al., 2004; Siebert et al., 1996). Beer should be clear, brilliant, foamy and sharp and it should have the appropriate taste and aroma up to the expiry date (Rehmanji et al., 2004). During the warranted shelf life the brewery must guarantee an unchanged beer both from the biologically and the non-biologically point of view. The consumer should get beer with minimal sensory changes only.

The aim of beer stabilization is the prevention of colloidal haze by using different stabilization means such as silica gels or polyamide adsorbents. The brewery should carry out product quality control up to the expiry date. Therefore, for each producer it is important to find an appropriate method for providing an exact and fast assessment of the beer's shelf life.

The degree of the colloidal beer stability always depends on a number of concrete physio-chemical properties of each batch and on the storage conditions. Therefore, up to now no universal method for its prediction exists. In the past, several physical and chemical methods for a general evaluation of shelf life were developed (Siebert and Lynn, 2005; Siebert and Lynn, 2006). The most used methods for the prediction of beer stability are forcing and precipitation tests. These tests accelerate the haze formation and its intensity is determined by nephelometric measurements. Apart from the tests for the prediction

a precipitační testy, jimiž se docílí zrychleného vzniku zákalu a jeho intenzita se stanoví nefelometricky. Kromě testů pro předpověď koloidní stability piva existují i metody, které podávají informaci přímo o obsahu zákalotvorných prekurzorů v daném pivu. Pomocí výsledků z těchto testů lze usuzovat, jak je dané pivo koloidně stabilní a taktéž jak účinná byla použitá stabilizace (Šavel a Prokopová, 1992).

## 2 TESTY PRO PŘEDPOVĚĎ KOLOIDNÍ STABILITY PIVA

### 2.1 Šokovací testy

Velmi důležitou metodou pro předpověď koloidní stability je tzv. teplotní šokování. Je to destrukční metoda, jejíž princip spočívá ve střídavém umístění piva při teplotách blízkých 0 °C a extrémních teplotách v rozmezí 40 až 60 °C (podle používaného testu, jak udává *tab. 1*) (Dienstbier, 2010), tzn. střídání tzv. teplých a studených dnů až do dosažení zákalu 2 j. EBC. Teplý den znamená 24 hodin v lázni horké 60 °C, studený den je 24 hodin v chladné lázni. Předpověď trvanlivosti se určí podle počtu teplých dní potřebných k dosažení zákalu 2 j. EBC (předpověď trvanlivosti - T2[dny]), přičemž jeden teplý den odpovídá zhruba 1 měsíci trvanlivosti (Gabriel, 2009). Principem těchto testů je urychlit proces stárnutí piva (teplá fáze) a vyvolat tvorbu chladového zákalu (studená fáze). Měření intenzity svazku rozptýleného světla ve vzorku je prováděno pod úhlem 90° (nefelometrie) a 11 až 25° (dopředný rozptyl). Výsledky jsou nejčastěji udávány v jednotkách EBC (Analytica EBC, 1997a).

Výsledky testů může významně ovlivnit přítomnost kyslíku rozpuštěného v pivu a kyslíku obsaženého v hrdlovém prostoru lahve. Celkový obsah kyslíku v jednotlivých lahvích velmi kolísá, a tak je nutné použít k jednomu testu několik souběžně odebraných lahví. Pro zajištění výběru lahví s obsahem kyslíku běžně dosahovaným při stažení je nutné stanovit obsah vzduchu v hrdlovém prostoru i kyslíku rozpuštěném v pivu. Kyslík z hrdlového prostoru časem přechází do piva, kde reaguje s jeho složkami, a tím tvoří zákal. Jedná se o poměrně pomalou reakci, a proto se dříve doporučovalo použít co nejdříve dobu ohřevu, minimálně jeden týden, ale poslední dobou je trend spíše opačný, to znamená urychlit celý proces tak, aby doba ohřevu byla co nejkratší. Vzhledem k tomu, že jsou používány teploty kolem 60 °C, tedy extrémní teploty značně odlišné od běžných teplot, při kterých je pivo skladováno, nesou s sebou šokovací testy riziko, že výsledek nebude příliš spolehlivý. Přesto výsledky šokovacích testů poměrně dobře korelují se skutečnou trvanlivostí. Šokování by však mělo být zahájeno nejpozději jeden týden po stočení, aby se eliminoval vliv přirozeného stárnutí piva (Šavel a Prokopová, 1992).

Pro některé pivovary je ovšem nepřijatelné, že šokování trvá poměrně dlouhou dobu. Proto byly vyvinuty rychlejší metody, které se mohou používat k okamžité provozní kontrole, tzv. precipitační testy, kterými se stanoví obsah zákalotvorných prekurzorů, díky němuž se dá odhadnout doba trvanlivosti. Výsledky těchto testů jsou dostupné během několika minut, ovšem se skutečnou trvanlivostí už většinou nekorelují tak dobře jako šokovací testy. Mezi nejčastěji stanovované veličiny patří celkové a jednotlivé polyfenoly, oxidované a oxidovatelné polyfenoly a anthokyanogeny.

### 2.2 Precipitační testy

Precipitační testy jsou založeny na principu vysrážení zákalotvorných prekurzorů po přidání titračního činidla, se kterým tvoří dané látky komplexy. To umožňuje sledovat vývoj vznikajícího zákalu a výsledky testů jsou udávány buď přímo jako hodnota intenzity zákalu, nebo jako množství titračního činidla potřebného pro vznik registrovatelné intenzity zákalu (Dienstbier, 2010).

#### Síranový test

Tato metoda podává informace o stavu koloidního systému piva pomocí sledování koncentrace látek vysolitelných nasyceným roztokem síranu amonného. Je to metoda doporučená analytikou IOB (IOB, 1997). Spočívá v dávkování nasyceného roztoku síranu amonného do zkoušeného piva až do vzniku registrovatelného zákalu (Basařová et al., 1993). Intenzita zákalu se nejprve nemění (může dokonce mírně klesat), ale po dosažení jisté koncentrace dojde k jeho prudkému nárůstu (k vysolování). Tento bod (práh vysolení – SASPL – Saturated Ammonium Sulphate Precipitation Limit) je definován jako množství roztoku síranu amonného potřebné k vzniku registrovatelného zákalu. Čím více se tedy musí přidat síranu, tím lepší koloidní trvanlivost pivo má.

of beer stability there are methods which measure the content of haze precursors in beer directly. By means of these tests it is possible to predict the colloidal stability of a single beer and also the effectiveness of the stabilizers used (Šavel and Prokopová, 1992).

## 2 TESTS FOR THE PREDICTION OF COLLOIDAL BEER STABILITY

### 2.1 Forcing Tests

A very significant method for the prediction of colloidal stability is the heat forcing test - a forced ageing process accelerated by thermal treatment. The principle of these tests is to accelerate the aging process (warm period) and provoke the formation of chill haze (cold period). It is a destructive method based on alternate placements of the beer at temperatures close 0 °C and temperatures in the range of 40 to 60 °C. These conditions simulate the variation between warm and cold days until a haze of 2 EBC u. (European Brewery Convention turbidity unit) is built. A 24 hour period in a bath with a temperature of 60 °C corresponds to a warm day and a 24 hour period in a cold bath corresponds to a cold day. The used tests are described in *Tab. 1* (Dienstbier, 2010). The prediction of stability - T2 - is determined by the number of warm days before a haze of 2 EBC u. is reached. One warm day corresponds to approximately 1 month of stability (Gabriel, 2009). The measurement of the intensity of a beam of scattered light through the sample is done with angles of 90° (side scattering) and of 11 to 25° (forward scattering). The results are mainly given in EBC u. (Analytica EBC, 1997a).

The results of the tests can be significantly influenced by the presence of oxygen dissolved in the beer and the oxygen inherent in bottle neck. The total content of oxygen in single bottles is very variable, and therefore several bottles must be tested simultaneously to get a valid result. For the assessment of the typical oxygen content during bottling it is necessary to determine both the oxygen content inherent in the bottle neck and the oxygen dissolved in the beer. Over time, the oxygen from the bottle neck area permeates into the beer, reacts with its components and builds a haze. The process is relatively slow therefore in former times it was recommended to extend the duration of the beer warming up period to a minimum of one week. Nevertheless, a recent trend is to keep the period for warming up as short as possible. In view of the fact that the temperatures of 60 °C used for the tests are extreme and completely different from the normal storage temperatures for beer it is possible that the results of the forcing tests will not be very credible. Nevertheless, the results of forcing tests correlate surprisingly well with the real shelf life. To eliminate the influence of natural beer aging the forcing tests have to be carried out latest one week after bottling (Šavel and Prokopová, 1992).

For some breweries however the forcing tests are undesirably time consuming. As a consequence faster tests – the precipitation tests – were developed. These tests are based on a direct determination of haze forming precursors such as total polyphenols, single polyphenols, oxidized and oxidizable polyphenols and anthocyanogens thus allowing a prediction of the beer stability. Results from these tests can be available within several minutes. Accordingly, they can be used for immediate operational controls. Nevertheless, the correlation to the real shelf life is normally worse than with the forcing tests.

### 2.2 Precipitation Tests

Precipitation tests are based on the precipitation of the haze forming precursors by a titration agent. This allows the direct monitoring of the haze formation. The results of the test are given either as a value of the haze intensity or as the amount of titration agent needed for the formation of the first perceptible haze (Dienstbier, 2010).

#### SASPL (Saturated Ammonium Sulphate Precipitation Limit) – Test

This method gives information on the state of the colloidal system in the beer by following the concentration of precipitable substances using saturated ammonium sulphate solution. This method is recommended by the IOB (Institute of Brewing) (IOB, 1997). The method is based on determining the amount of titration agent needed to cause a perceptible haze in the beer sample (Basařová et al., 1993). At the beginning of the test the haze intensity remains stable or even sometimes slightly decreases. The precipitation increases rapidly after the limiting concentration is reached. This point – the SASPL-Limit is defined as the amount in ml of saturated ammonium sulphate solution needed to cause a perceptible precipitation. The more sulphate needed the greater the beer colloidal stability expected.

### Stanovení tanoidů

Tato metoda je založena na reakci tanoidů (nízko- až středněmolekulární polyfenolové látky) s PVP (polyvinylpyrrolidon). Tanoidy jsou adsorbovatelné rozpustným vysokomolekulárním PVP, se kterým se váží vodíkovými můstky (Basařová et al., 1993). PVP se přidává kontinuálně a intenzita zákalu se zvyšuje do té doby, než se naváží všechny tanoidy. Tento okamžik odpovídá maximu křivky. Jakmile začne v roztoku převažovat PVP, začne zákal znovu klesat. Koncentraci tanoidů zjistíme z množství PVP (mg PVP/l vzorku), které bylo potřeba dodat do roztoku k dosažení maximálního zákalu. Intenzita zákalu se zjišťuje nefelometricky a výsledek je vyjádřen v mg/l.

### Stanovení „citlivých“ proteinů

Princípem této metody je reakce citlivých proteinů (proteiny mající silnou afinitu k taninům) s taninem za vzniku nerozpustného komplexu. Reakce probíhá mezi nukleofilní skupinou proteinu (-SH nebo  $\text{NH}_2$ ) a ketonovou skupinou taninu, tvoří se sraženina, a tím se zvyšuje zákal. Intenzita zákalu piva se měří nefelometricky (vyjadřuje se v jednotkách EBC) a je přímo úměrná obsahu zákalotvorných proteinů (Analytica EBC, 1997b).

### Formaldehydový test

Princípem této metody je tvorba zákalu vyvolaná přidávkou formaldehydu do zkoumaného piva. Podle koloidního stavu daného piva se v něm po vytemperování na 0 °C vytvoří zákal. Ten se uvádí v jednotkách EBC a následně je přečten na trvanlivost vyjádřenou počtem tzv. teplých dní. Tento test se používá k rychlé informaci o trvanlivosti piva, ovšem nenahrazuje šokovací testy, protože výsledky jsou velmi závislé na podmínkách analýzy (Basařová et al., 1993).

## 3 METODY PRO STANOVENÍ OBSAHU ZÁKALOTVORNÝCH PREKURZORŮ

### 3.1 Stanovení polyfenolových látek

Ke stanovení polyfenolů byla vypracována řada metod. Nejčastěji je stanovován obsah polyfenolových látek, a to jak celkových, tak i zastoupení jednotlivých polyfenolů. Polyfenoly se nejčastěji stanovují spektrofotometricky, využívá se ovšem i vysoce účinná kapalinná chromatografie (HPLC).

#### Stanovení celkových polyfenolů

Princípem této metody je reakce polyfenolů s trojmocnými ionty železa v alkalickém prostředí, při níž dochází ke vzniku červeného barevného komplexu. Intenzita vzniklého komplexu se měří spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm oproti slepému vzorku. Výsledkem je koncentrace polyfenolů v mg/l (Basařová et al., 1993; Analytica EBC, 1997c).

#### Stanovení anthokyanogenů

Princípem této metody je adsorpce anthokyanogenů obsažených v mladíně (či pivu) na polyamidový prášek. Adsorbované anthokyanogeny se spolu s polyamidem za zvýšené teploty rozpustí ve směsi butanolu a kyseliny chlorovodíkové, přičemž dojde ke vzniku oxoniových solí (červené zbarvení) a intenzita tohoto zbarvení se změní spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm (Basařová et al., 1993).

#### Stanovení oxidovaných a oxidovatelných polyfenolů

Princípem metody stanovení oxidovaných polyfenolů je reakce polyfenolů s cinchoninsíranem. Polyfenoly s ním tvoří nerozpustný komplex a vzniklý zákal se měří nefelometricky. Při stanovení oxidovatelných polyfenolů se ke vzorku mladiny nebo piva nejprve přidá roztok peroxidu vodíku, aby došlo k jejich oxidaci, po dané době se reakce zastaví enzymem peroxidasou a poté se postupuje analogicky jako u stanovení oxidovaných polyfenolů (Basařová et al., 1993).

#### Stanovení jednotlivých polyfenolů

Princípem metody je adsorpce polyfenolů na polyamidový sorbent a jejich následná extrakce acetonem. Tímto dojde ke zkoncentrování polyfenolů v roztoku a získaný extrakt se znovu extrahuje ethylacetátem. Po odpaření rozpouštědla se k izolovaným polyfenolům přidá malé množství methanolu a vzorek se analyzuje pomocí HPLC. Touto metodou je možné zjistit zastoupení i množství jednotlivých polyfenolů ve vzorku piva (Basařová et al., 1993).

### Determination of Tannoids

This method is a nephelometric titration based on the reaction of tannoids (low and medium molecular weight polyphenols) with PVP (polyvinylpyrrolidone). Tannoids can be precipitated by the addition of soluble high molecular weight PVP. The formation of hydrogen bridge bonds allows the adsorption (Basařová et al., 1993). When PVP is titrated into the beer the formation of the haze increases to a maximum as all the tannoids are bonded. As the PVP addition continues the haze intensity decreases from a dilution effect. The peak value in mg PVP/l sample gives a concentration of tannoids which can be correlated with colloidal stability.

### Determination of Sensitive Proteins

This nephelometric titration is based on the reaction of sensitive proteins (proteins which have a strong affinity to tannins) with tannin. Tannic acid easily forms insoluble complexes with proteins. The reaction proceeds via the nucleophilic groups of the proteins (-SH or  $\text{-NH}_2$ ) and the functional group of the ketones. The resulting precipitate increases the haze. The haze intensity given in EBC units correlates directly with the content of haze forming proteins (Analytica EBC, 1997b).

### Formaldehyde Test

This method is based on haze formation induced by the addition of formaldehyde to the beer being tested. After cooling down to a temperature of 0 °C a haze is formed according to the colloidal state of the beer. The haze intensity is given in EBC u. and subsequently converted to a shelf life expressed as a number of warm days. This test is only used for fast information about the beer shelf life. It cannot replace the forcing test because the results depend strongly on the analytical conditions (Basařová et al., 1993).

## 3 METHODS FOR THE DETERMINATION OF HAZE PRECURSORS

### 3.1 Determination of polyphenols

For the determination of both the total polyphenols and the individual compounds a number of methods were developed. The most frequently used approaches are spectrophotometric determination or high performance liquid chromatography (HPLC)

#### Determination of total polyphenols

The method is based on the reaction of polyphenols with trivalent iron ions in an alkaline medium which involves the formation of a red coloured complex. The intensity of the colour is measured with a spectrophotometer at the wavelength of 600 nm against a blind sample. The results are expressed as the concentration of polyphenols in mg/l (Basařová et al., 1993; Analytica EBC, 1997c).

#### Determination of anthocyanogene

The method is based on the adsorption of anthocyanogene inherent in wort or beer on polyamide powder. Both the adsorbed anthocyanogene and the polyamide powder are dissolved in a mixture of butanol and hydrochloric acid at elevated temperature. The intensity of the red colour of the oxonium-salts formed is measured with a spectrophotometer at the wavelength of 550 nm (Basařová et al., 1993).

#### Determination of oxidized and oxidizable polyphenols

The principle of the determination of oxidized polyphenols is the reaction of polyphenols with cinchonine sulphate. The resulting insoluble complex is measured with a nephelometric method. Prior to the determination of oxidizable polyphenols a solution of hydrogen peroxide is added to the sample of beer or wort. The oxidative reaction is stopped after a given period by a peroxidase enzyme. The following procedure is the same as for the determination of oxidized polyphenols (Basařová et al., 1993).

#### Determination of single polyphenols

The method is based on the adsorption of polyphenols on a polyamide adsorbent followed by an acetone extraction. Thereby the polyphenols are concentrated in the solution and then extracted again with ethyl acetate. The solvent is then evaporated. The isolated polyphenols were redissolved in a small amount of methanol and quantitatively and qualitatively analyzed by HPLC (Basařová et al., 1993).

### 3.2 Stanovení zákalotvorných bílkovin

#### ELISA test

Ke stanovení obsahu a zastoupení jednotlivých skupin bílkovin jsou používány imunochemické metody, nejčastěji ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Tou je možné stanovit např. gluten (lepek – bílkovina nejčastěji spojovaná s onemocněním zvaným celiakie) v pivu, popř. ječmeni či sladu (Dostálek et al., 2006). V současné době je však ELISA využívána i pro charakterizaci a kvantifikaci zákalotvorných či pěnotvorných bílkovin.

Před vlastním stanovením zákalotvorných bílkovin v pivu je nutné nejprve je izolovat. Jednou z možností je jejich adsorpce na silikagel (Evans et al., 2003). Dále je možné využít např. membránovou filtrační, při které se z uměle stařeného piva získá kal obsahující zákalotvorné bílkoviny (Ishibashi et al., 1996). Zákalotvorné bílkoviny jsou následně izolovány pomocí SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).

Ke stanovení zákalotvorných bílkovin se nejčastěji používá nekompetitivní ELISA, v tzv. sendvičovém uspořádání (Evans et al., 2003; Ishibashi et al., 1996), při které dochází k navázání protilátky na pevnou fázi, následnému navázání antigenu (stanovovaná bílkovina) na tuto protilátku a dále navázání další, enzymově značené, protilátky na komplex protilátka-antigen (Králová et al., 2007). Protilátky jsou běžně vyvíjeny imunizací králíků či myší, většinou jsou využívány protilátky polyklonální, ovšem v posledních letech se výzkum zaměřil i na vývoj monoklonálních (Evans et al., 2003; Hulín et al., 2007). Enzym, nejčastěji alkalická fosfatasa nebo křenová peroxidasa, zde katalyzuje vznik barevného produktu. Jeho intenzita je přímo úměrná množství stanovované bílkoviny, což umožňuje její detekci a kvantifikaci. Ishibashi et al. (1996) ve své práci použili alkalickou fosfatasa a po její reakci měřili intenzitu žlutého zbarvení p-nitrofenolu při vlnové délce 405 nm. V jiné práci (Evans et al., 2003) byl použit enzym křenová peroxidasa a po jeho reakci byla měřena intenzita modrého zbarvení produktu 4-chloro-1-nafton při vlnové délce 492 nm.

Předpokládá se, že pomocí imunochemických metod bude možno vybírat slady s vhodnými parametry, a tak zlepšit koloidní stabilitu piva a stejně tak i stabilitu pивní pěny.

## 4 ZÁVĚR

Pro předpověď trvanlivosti piva byla v minulosti vypracována řada metod. Některé jsou rychlé, vhodné pro operativní použití přímo v provozu, jiné vyžadují vybavení dostupné jen ve specializovaných laboratořích. Pro deklarování minimální trvanlivosti je však potřeba sledovat i tzv. skutečnou trvanlivost, to znamená, každou šarži kontrolovat okamžitě po výrobě a provádět v určitých časových intervalech kontrolu kvality všech šarží po celou dobu jejich trvanlivosti.

Mezi nejběžnější metody patří tzv. šokovací a precipitační testy. Ve všech metodách je cílem vyloučit zákalotvorné látky z piva a poté v něm změřit množství takto vzniklého zákalu. Šokovací testy jsou destruktivními metodami, při kterých je pivo vystavováno nežádoucím vlivům teploty střídavým uložením při vysokých a nízkých teplotách. Tyto testy hodnotí stabilizační účinek, ovšem v pivovarských laboratořích nejsou pro svou časovou náročnost příliš často využívány. Naopak precipitační testy poskytují informace o množství zákalotvorných prekurzorů téměř okamžitě. U šokovacích i precipitačních testů se měření provádí nefelometricky. V současné době jsou k dispozici zákaloměry, které dokáží změřit zákal a výsledek zobrazit přímo v jednotkách EBC.

Kromě výše uvedených metod jsou k dispozici i takové, kterými se dají stanovit jednotlivé zákalotvorné prekurzory, a to jak polyfenoly, tak bílkoviny. Měření je nejčastěji prováděno spektrofotometricky, možné je však i stanovení pomocí HPLC (polyfenoly) či imunochemickou metodou ELISA (bílkoviny).

### 3.2 Determination of haze-active proteins

#### ELISA

For determinations of particular protein groups immunological methods, most commonly ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) are used. By using ELISA it is possible to detect for example gluten (a protein linked with celiac disease) in beer and prospectively in barley or wort (Dostálek et al., 2006). Recently ELISA has been used for the quantitative and qualitative determinations of haze-active and foam-forming proteins.

The first step is the isolation of the haze-active proteins. This can be achieved for instance by adsorption onto silica gel (Evans et al., 2003) or by using a membrane filtration of force-aged beer. The resulting sediment contains haze-active proteins which can be isolated by means of SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) (Ishibashi et al., 1996).

For the determination of haze-active proteins the non-competitive sandwich ELISA is most often used (Evans et al., 2003; Ishibashi et al., 1996). This assay involves the adsorption of antibodies onto a solid phase followed by the adsorption of antigens (protein tested) on these antibodies. After this comes an adsorption of enzyme marked antibodies to the complex antibody-antigen (Králová et al., 2007). The antibodies are commonly developed by the immunization of rabbits or mice. Polyclonal antibodies are mostly used but recently, research has aimed at the development of monoclonal antibodies (Evans et al., 2003; Hulín et al., 2007). The enzymes such as alkaline phosphatase or horseradish peroxidase catalyze the formation of coloured products. The colour intensity correlates directly with the estimated content of protein. Ishibashi et al. (1996) used alkaline phosphatase. After the reaction the intensity of the yellow colour of the p-nitrophenols at the wavelength of 405 nm was measured. In the research project of Evans et al. (2003) the enzyme horseradish peroxidase was used and after the reaction the blue colour intensity of 4-chloro-1-nafton at the wavelength of 492 nm was measured.

Presumably, by means of immunological reactions it will be possible to choose malts with parameters suitable for improving both the colloidal stability of the beer and the beer foam stability.

## 4 CONCLUSIONS

In the past several methods for the prediction of beer stability were developed. Some of them are fast and therefore suitable for using directly during production. Other methods need instruments only available in specialised laboratories. However, for the postulation of a minimum shelf life it is necessary to keep track of the real shelf life as well. That means controlling each batch immediately after production and at certain intervals, carry on with the quality control of all batches during the whole time of their shelf life.

The most common methods include forcing and precipitation tests. All these methods are based on the precipitation of haze-active precursors in the beer followed by a measurement of the amount of the precipitate. The forcing tests are destructive methods. The beer is exposed to undesirable influences by storing it at alternating high and low temperatures. The tests can estimate the stabilizing effects but they are rather time consuming. Therefore they are not used very often in brewery laboratories. On the contrary, the precipitation tests provide almost immediate information about the content of haze-active precursors. Both with the precipitation test and the forcing test the measurement is carried out using nephelometric methods. Recently, the Haze Meter was developed which measures the haze and subsequently reads the results directly in EBC units.

Furthermore, by means of other methods single haze-active precursors such as polyphenols or proteins can also be determined. The most frequently used approaches are spectrophotometric determination, HPLC for polyphenols or immunochemical technique ELISA for proteins.

Tab 1 Nejběžnější šokovací testy / The most common forcing tests (Dienstbier, 2010)

Test / Test	Způsob provedení / Specification
Původní EBC test / Original EBC test Současný EBC test / Actual EBC test	168 h (40 °C) – 24 h (0 °C) 12 h (0 °C) – 48 h (60 °C) – 12 h (0 °C)
Schildův test / Schild's test	168 h (60 °C) – 24 h (0 °C)
Test dle Basařové a Kahlera / Test acc. Basařová and Kahler	6 h (0 °C) – 16 h (66 °C) – 6 h (0 °C)
Test dle Šavla a Prokopové / Test acc. Šavel and Prokopová Analytika Mebak r.1979 / Analytica Mebak 1979	24 h (0 °C) – 144 h (50 °C) – 24 h (0 °C) 24 h (40 °C, příp. / or 60 °C) – 24 h (0 °C)

Žádná z těchto uvedených metod není schopná předpovědět trvanlivost zcela přesně, proto každý pivovar musí sledovat vývoj zákalu a podle získaných dat si danou metodu upravit.

#### Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.21/2012).

However, none of these methods mentioned is able to predict the shelf life very accurately. Therefore each brewery must follow the process of haze formation and adapt the method used according to the data obtained.

#### Acknowledgements

Financed by the project for support of specific university research (MŠMT č.21/2012).

Translated by Eva Paterson

#### LITERATURA / REFERENCES

- Analytica EBC, 1997a: Analytica EBC, 5th edition, European Brewery Convention: Prediction of Shelf-life of Beer, Carl-Hans Verlag, Nürnberg.
- Analytica EBC, 1997b: Analytica EBC, 5th edition, European Brewery Convention: Sensitive Proteins in Beer, Carl-Hans Verlag, Nürnberg.
- Analytica EBC, 1997c: Analytica EBC, 5th edition, European Brewery Convention: Total Polyphenols, Carl-Hans Verlag, Nürnberg.
- Basařová et al., 1993: Pivovarsko – sladařská analytika. Merkanta, Praha.
- Dienstbier, M., 2010: Metody předpovědi koloidní stability piva. Chem. Listy 104: 86–92.
- Dostálek, P., Hochel, I., Méndez, E., Hernando, A., Gabrovská, D., 2006: Immunochemical determination of gluten in malts and beers. Food Addit. Contam. 23(11): 1074–1078.
- Evans, D. E., Robinson, L. H., Sheehan, M. C., Tolhurst, R. L., Hill, A., Skeritt, J. S., Barr, A. R., 2003: Application of Immunological Methods to Differentiate Between Foam-Positive and Haze-Active Proteins Originating from Malt. J. Am. Soc. Brew. Chem. 61(2): 55–61.
- Gabriel, P., 2009: Optické metody kontroly fermentačních procesů a hodnocení kvality jejich produktů. Disertační práce, MFF UK.
- Hulín, P., Dostálek, P., Hochel, I., 2007: Stanovení prolaminů ječmene v pivu a pivovarských materiálech. Kvasny Prum. 53(9): 273–276.
- IOB Methods of Analyses (The Institute of Brewing), 1997: 9.39 – Saturated ammonium sulphate precipitation limit (SASPL) of beer, The Institute of Brewing, London.
- Ishibashi, Y., Terano, Y., Fukui, N., Honbou, N., Kakui, T., Kawasaki, S., Nakatani, K., 1996: Development of a New Method for Determining Beer Foam and Haze Proteins by Using the Immunochemical Method ELISA. J. Am. Soc. Brew. Chem. 54(3): 177–182.
- Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T., 2007: Bioanalytické metody. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha.
- McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R. J., 1997: Evaluation of Rapid Colloidal Stabilization with Polyvinylpyrrolidone (PVPP). J. Am. Soc. Brew. Chem. 55(2): 38–43.
- Parker, D. K., 2007: Study of haze formation in freshly packaged and stored beers. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 44(1): 23–28.
- Rehmanji, M., Gopal, C., Mola, A., 2005: Beer Stabilization Technology – Clearly a Matter of Choice. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 42(4): 332–338.
- Robinson, L. H., Evans, D. E., Kaukovirta-Norja, A., Vilpola, A., Aldred, P., Home, S., 2004: The interaction between malt protein quality and brewing conditions and their impact on beer colloidal stability. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 41(4): 353–362.
- Siebert, K. J., Lynn, P. Y., 2005: Comparison of Methods for Measuring Protein in Beer. J. Am. Soc. Brew. Chem. 63(4): 163–170.
- Siebert, K. J., Lynn, P. Y., 2006: Comparison of Methods for Measuring Polyphenols in Beer. J. Am. Soc. Brew. Chem. 64(3): 127–134.
- Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., Lynn, P. Y., 1996: Nature of Polyphenol – Protein Interactions. J. Agric. Food Chem. 44(1): 80–85.
- Šavel, J., Prokopová, M., 1992: Jak volit teplotní šokování. Kvasny Prum. 38(11): 289–292.

Do redakce došlo / Manuscript received: 15. 10. 2012  
Přijato k publikování / Accepted for publication: 14. 2. 2013

## Světová premiéra degustace nopálového piva

Ve čtvrtek 15.02.2013 v prostoru kabaretu minipivovaru U medvídků v Praze 1, Perštýn, proběhla za přítomnosti velvyslance Spojených států mexických pana Josého Luise Bernala světová premiéra degustace nopálového piva. Tuto degustaci zorganizovaly firmy Pivo Praha s.r.o. a Partners AR-DANAS, sociální družstvo Prostějov.

Nopálové pivo je obchodní název piva, vyrobeného z klasických pivovarských surovin s přidáním mexického kaktusu nopal, či mexická opuncie (latinsky *Opuntia ficus indica*) Tento kaktus je druh opuncie, kterou používali do různých pokrmů již přibližně před 5000 lety staří Májové, kteří ji považovali za „božskou“ rostlinu. Důsledkem skutečnosti, že tento druh opuncie roste převážně v lávových polích, je neobvykle vysoký obsah vláknin, minerálů, vitamínů, aminokyselin, antioxidantů a tak zvaných fytochemikálií v dužině. Jde o biologicky aktivní látku (je jich známo více než 10 000), které potlačují volné radikály, způsobující vznik rakoviny, dále mohou vést k srdečním chorobám, diabetu a artritidě. Rostlina nopal je dále bohatým zdrojem nerozpustné i rozpustné vlákniny. Rozpustná vláknina zpomaluje vyprazdňování žaludku, tak se zabrání náhlému kolísání hladiny cukru v krvi. Vláknina v trávicím traktu zvýší svůj objem. Nerozpustná vláknina také pomáhá zředit koncentraci potenciálních karcinomů v tlustém střevě. Nopálová mouka dále obsahuje sedmáct z 21 aminokyselin, vitaminy A, C, K, B6, B12 a deset

základních minerálů – vápník, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, draslík, selen, sodík a zinek.

Nopálové pivo je vyrobeno z klasického sortimentu surovin s přidáním rozemleté mouky z nopálu, sklizeného ve výšce 1500 až 3000 metrů nad mořem na úbočí druhé nejvyšší sopky Popocatepetl v Mexiku (nadmořská výška 5426 m). Tato lokalita byla podle sdělení firmy Partners AR-DANAS, s.d. vybrána na základě posouzení kvality sklizené rostliny z různých částí země jako nejlepší.

První zkoušky várky tohoto typu piva proběhly nejdříve ve výzkumném pivovaru Mendelovy univerzity v Brně, který má objem várky přibližně 80 litrů, další várka byla vyrobena v Břevnovském klášterním pivovaru sv. Vojtěcha. V rámci degustace Ing. Jan Šuráň, spolumajitel firmy Pivo Praha s.r.o., seznámil přítomné s průběhem várky a s některými problémy, které nopál ve složení sypaní způsoboval (např. silné pění a další). Degustované pivo mělo trochu odlišnou chuť, ale vzhledem k deklarovaným zdravotním přínosům si konzumenty i přes vyšší cenu jistě najde, podobně jako nopálové pečivo, které vyrábí firma Partners AR-DANAS, sociální družstvo Prostějov a které bylo spolu s nopálovým pivem degustováno. U tohoto druhu pečiva přidávek nopálové mouky podstatně prodlužuje dobu čerstvosti pečiva a zlepšuje jeho chuť.

Ladislav Chládek

