

Praktické zkušenosti se zavedením stabilizace piva v provozu

Practical Experience with Installation of Beer Stabilization in Operation

Blanka KOTLÍKOVÁ¹, Petr GABRIEL², Jaromír FIALA¹, Lukáš JELÍNEK¹, Marcel KARABÍN¹, Petr SLADKÝ², Pavel DOSTÁLEK¹

¹ Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, Praha 6, 166 28 / Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, CZ-166 28 Praha 6

² Katedra chemické fyziky a optiky, Univerzita Karlova v Praze, Ke Karlovu 3, Praha 2, 121 16 / Department of Chemical Physics and Optics, Charles University in Prague, Ke Karlovu 3, CZ-121 16 Praha 2
e-mail: kotlikob@vscht.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Kotlíková, B. – Gabriel, P. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Karabín, M. – Sladký, P. – Dostálek, P.: Praktické zkušenosti se zavedením stabilizace piva v provozu. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 3, s. 46–51

Stabilizace piva znamená použití různých stabilizačních prostředků k dosažení požadované trvanlivosti, na kterou jsou v současnosti kladený stále vyšší nároky. Cílem příspěvku je doporučit vhodný způsob zavedení stabilizace v provozu na základě výsledků získaných porovnáním adsorpčních účinků několika stabilizačních přípravků v laboratorním měřítku. Po vyhodnocení výsledků laboratorních zkoušek byly vybrány dva stabilizační prostředky, které svými vlastnostmi nejlépe výhovovaly požadavkům pivovaru. Adsorbenty byly následně aplikovány v provozu a jimi ošetřené vzorky piv byly testovány titračními a šokovacími testy. Výsledky byly použity pro předpověď koloidní stability. Aplikací nového stabilizačního postupu byla výrazně prodloužena trvanlivost piv v porovnání se vzorky stabilizovanými původním postupem.

Kotlíková, B. – Gabriel, P. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Karabín, M. – Sladký, P. – Dostálek, P.: Practical Experience with Installation of Beer Stabilization in Operation. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 3, pp. 46–51

Stabilization of beer means using various stabilization agents to attain the required shelf life. Currently increasing demands are placed on the shelf life of beer. The aim of this paper is to recommend a suitable way how introduce stability to the operation on the basis of the results obtained by comparing the adsorption effects of several stabilization agents in laboratory scale. After evaluation the results two stabilizing agents with properties that best suit the requirements of the brewery were selected. They were applied to the operation and samples of beer treated with these adsorbents were tested by titration and forcing tests. The results were used to predict the colloidal stability. Application of the new stabilization process extended greatly shelf life of beer in comparison with samples of beer stabilized with the original procedure.

Kotlíková, B. – Gabriel, P. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Karabín, M. – Sladký, P. – Dostálek, P.: Die praktische Erfahrungen mit der Einführung der Bierstabilisation im Brauereibetrieb. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 3, S. 46–51

Die Bierstabilisierung heißt eine Anwendung von verschiedenen Stabilisationsmitteln zur Erreichung der gewünschten Lebensdauer, auf die im Gegenwart immer höhere Ansprüche angelegt sind. Der Artikel befasst sich mit einer Empfehlung einer Stabilisationsmethode in Brauereibetrieb, die auf Basis vom Vergleich der Adsorptionsauswirkungen einiger Stabilisationsmittel im Labormaßstab ermittelt wurde. Nach der Auswertung von Laborergebnissen wurden zwei Stabilisationsmittel ausgewählt, die mit ihren Eigenschaften den Anforderungen der Brauerei am besten genügten. Im Brauereibetrieb weiter wurden die Adsorbente angewandt, und die Muster des stabilisierten Bieres durch Titrations- und Forciereste geprüft. Die Ergebnisse wurden für die Vorhersage der kolloiden Bierstabilität angewandt. Durch Anwendung eines neuen Stabilisationsverfahrens wurde im Vergleich mit den anderen durch ursprüngliche Stabilisationsweise vorbereiteten Biermustern die Lebensdauer des Bieres wesentlich verlängert.

Klíčová slova: pivo, koloidní stabilita, stabilizační prostředky, šokovací testy, precipitační testy

Keywords: beer, colloidal stability, stability-extending agents, forcing tests, precipitation tests

1 ÚVOD

Pivo je celosvětově oblíbený nápoj, a proto jsou na jeho kvalitu přirozeně kladený vysoké nároky. Stejně jako všechny ostatní potraviny, má však i pivo omezenou trvanlivost, se kterou velmi úzce souvisí jeho koloidní stabilita (Bamforth, 1999). Dnes je zcela běžné deklarovat trvanlivost až 1 rok a pivovar musí garantovat, že se pivo dostane ke spotřebiteli bez senzorických změn, tzn. po celou dobu záruky zůstane čiré, jiskrné, pěnivé, řízné a bude mít odpovídající chuť a vůni (Rehmanji et al., 2004).

Pojem koloidní stabilita piva je v pivovarském průmyslu velmi rozšířený a znamená rovnováhu mezi zákalotvornými bílkovinami a polyfenoly, které mají schopnost spolu reagovat a vytvářet komplexy, jež se z piva vylučují ve formě zákalu (Parker, 2007). Pro dosažení dobré koloidní stability je nutné používat kvalitní vstupní suroviny, ověřený technologický postup a po stočení pivo skladovat ve vhodných podmínkách (Robinson et al., 2004). Kromě dodržování těchto základních zásad se v pivovarech běžně používá tzv. stabilizace. Tou se rozumí ošetření piva určitými stabilizačními prostředky, které z piva odstraňují jeden nebo oba hlavní zákalotvorné prekurzory (bílkoviny a polyfenoly) (Siebert et al., 1996). Nejčastěji probíhá stabilizace během konečných úprav piva (při filtraci), k čemuž se dnes používají dva základní postupy: stabilizace pomocí silikagelu a pomocí polyvinylpolypyrrrolidonu (PVPP). U silikagelu je předmětem stabilizace reakce s proteiny obsaženými v pivu, zatímco PVPP reaguje se zákalotvornými polyfenoly. Oba tyto prostředky fungují na principu

1 ÚVOD

All over the world, beer is a favorable beverage, thus demands for its quality are naturally high. But similarly as all other foods, beer has a limited shelf life and with it closely associated colloidal stability (Bamforth, 1999). Today even one-year durability is commonly expected and breweries must guarantee that beer reaches the consumer without sensory changes, i.e. throughout the whole warranty period it will remain clear, foamy, sharp, brilliant, and will taste and smell appropriately (Rehmanji et al., 2004).

The term colloidal stability of beer is widely used in the brewing industry and it means a balance between haze-forming proteins and polyphenols, which have the ability to react together and form complexes which are secreted from the beer in the form of haze (Parker, 2007). To achieve good colloidal stability, good quality raw materials, verified technological procedure must be used and after racking beer must be stored under suitable conditions (Robinson et al., 2004). Besides keeping these principal rules, so-called stabilization is commonly used in breweries. This means treatment of beer with certain stabilizers that remove from beer one or both main haze producing precursors (proteins and polyphenols) (Siebert et al., 1996). Stabilization is usually a part of beer final treatment (during filtration) and currently two basic procedures are used: stabilization with silica gels and polyvinylpolypyrrrolidon (PVPP). While the stabilization with silica gel is based on the reaction with proteins contained in beer, PVPP reacts with haze-forming polyphenols. Both methods are based on

adsorpce a jejich kombinované použití je ideální pro dosažení vysoké trvanlivosti piva (Niemisch, 2007; Niemisch a Heinrich, 2006).

Učinnost stabilizačních prostředků se dá posoudit tzv. šokovacími metodami či precipitačními testy (Šavel a Prokopová, 1992; Sladký a Dienstbier, 2001). Šokovací testy jsou destrukční metody, které vystavují pivo nežádoucím vlivům teploty střídavým uložením při extrémně vysokých a extrémně nízkých teplotách. Tyto testy hodnotí poměrně spolehlivě stabilizační účinek z hlediska dosažené koloidní stability, jsou však vysoko časově náročné (Dienstbier et al., 2010). U hluboce stabilizovaných piv je doba trvání testu až 14 dní. Precipitační testy poskytují informace o obsahu zákalotvorných prekurzorů, jsou časově nenáročné (1 test trvá 10–30 minut) a umožňují sledovat účinnost odstranění zákalotvorných prekurzorů stabilizačním procesem (Siebert a Lynn, 2005; Siebert a Lynn, 2006).

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Laboratorní testy stabilizačních prostředků

K zavedení nových stabilizačních prostředků vyhovujících požadavkům daného pivovaru bylo nejprve nutné provést laboratorní zkoušky vybraných stabilizátorů na nefiltrovaném a nestabilizovaném pivu. Byla použita piva typu ležák, která byla odebrána přímo z ležáckého tanku. K testování byly vybrány tři prostředky na odstranění polyfenolů na bázi PVPP a tři přípravky na odstranění proteinů na bázi křemičitých gelů. Během testů stabilizátorů byla současně používána jemná křemelina od firmy SECA Clarcel CBL3. Po vyhodnocení výsledků byly vybrány dva prostředky nejlépe vyhovující nárokům pivovaru a ty byly následně použity v provozním měřítku.

Zásobní roztoky stabilizačních prostředků byly připraveny tak, aby výsledná koncentrace stabilizátoru v pivu odpovídala koncentraci doporučované dodavatelem, tedy 10 g/l v případě prostředků na bázi PVPP, 50 g/l v případě křemičitých gelů. Dané množství bylo rozmícháno v destilované vodě a poté automatickou pipetou dávkováno do piva. Prostředky na bázi PVPP byly ještě před dávkováním ponechány podle doporučení nabobtnat.

Jeden vzorek byl ponechán nestabilizovaný, byl pouze dvakrát přefiltrován přes filtrační papír s vrstvou křemeliny. Ke stabilizaci bylo připraveno vždy 300 ml vzorku, do něj bylo přidáno 0,5 g křemeliny a dané množství stabilizačního prostředku. Vzorky byly převedeny pod atmosféru CO₂ do uzavíratelných lahví a byly ponechány za stálého míchání v lednici při 8 °C po dobu 30 minut. Následovala dvojitá filtrace přes filtrační papír. Nakonec byly ponechány 30 minut na třepačce, aby se odstranil CO₂ a ještě nejméně 15 minut stály v klidu při pokojové teplotě, kvůli odstranění mikrobublin, které by mohly rušit samotné měření zákalu. Doba působení stabilizačních prostředků byla v laboratorních testech vyšší než minimální kontaktní doba deklarovaná výrobcem, aby se minimalizoval její vliv na provedení testu.

Pro předpověď koloidní stability piv bylo používáno několik analytických metod. Během técto testů byly používány chemikálie uvedené v tab. 1. S naměřenými hodnotami nestabilizovaného vzorku byly srovnávány hodnoty vzorků stabilizovaných jednotlivými prostředky.

2.2 Šokovací testy

Tyto testy jsou jednou z nejpoužívanějších metod pro předpověď koloidní stability, pomocí nichž je možné hodnotit stabilizační účinek. Jedná se o destrukční metody vystavující pivo velkým rozdílům teplot, čímž dochází k urychlění nežádoucích změn vlastností piva. Princip spočívá ve střídavém uložení piva při extrémních teplotách 40 až 60 °C a následném ochlazení na 0 °C. Působením chladu je vytvárána chladový zákal, zatímco v teplé části teplotního šokování se urychluje stárnutí piva (Šavel a Prokopová, 1992).

V našem případě probíhalo střídání teplot 0 °C a 60 °C po 24 hodinách, střídaly se tedy tzv. teplé a studené dny. Podle počtu teplých dní potřebných k dosažení zákalu 2 j. EBC (předpověď trvanlivosti – T2 [dny]) je možno předpovědět trvanlivost piva, přičemž jeden teplý den odpovídá přibližně 1 měsíci trvanlivosti (Gabriel, 2009). Intenzita svazku rozptýleného světla je ve vzorku měřena nefelometricky, tedy pod úhlem 90° a výsledky jsou udávány v jednotkách EBC (Analytica EBC (a)).

2.3 Precipitační testy

Precipitační testy slouží k určení obsahu zákalotvorných složek (Sladký a Dienstbier, 2001). Jsou založeny na principu vysrážení zákalotvorných prekurzorů po přidání titračního činidla, se kterým tvoří dané látky komplexy. Přidané činidlo reaguje s jednotlivými typy zá-

the principle of adsorption and their combined use is ideal to achieve long shelf-life of beer (Niemisch, 2007; Niemisch and Heinrich, 2006).

The efficiency of stabilizers can be assessed with forcing tests or precipitation methods (Šavel and Prokopová, 1992; Sladký and Dienstbier, 2001). Forcing tests are destruction methods during which beer is subject to undesirable effects of alternating extremely high/extremely low temperatures. These tests relatively reliably assess the stabilization effect in terms of the achieved colloidal stability; however, they are highly time demanding (Dienstbier et al., 2010). In deeply stabilized beers, the testing time is even 14 days. The precipitation tests render information on haze precursors, they are not time demanding (1 test takes 10–30 minutes) and allow to monitor the efficiency of haze precursors elimination by the stabilization process (Siebert and Lynn, 2005; Siebert and Lynn, 2006).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Laboratory tests of stabilizers

Prior to the introduction of new, stability-extending agents that meet the requirements of the given brewery, firstly laboratory tests of the selected stabilizers were conducted in non-filtered and non-stabilized beer. For testing lager beer collected directly from a storage tank was used. Three products for removing polyphenols on the PVPP basis and three for the elimination of proteins with silica gels were applied. In addition during tests of stabilizers fine kieselguhr from the company SECA Clarcel CBL3 was applied. After result evaluation two agents best meeting requirements of the brewery were selected and subsequently used in large-scale operation.

Stock solutions of the stabilizers were prepared so that the final stabilizer concentration in beer corresponded to the concentration recommended by the supplier, i.e. 10 g/l and 50 g/l for PVPP and silica gel stabilizers, respectively. The given amount was mixed in distilled water and then added to beer with an automatic pipette. The PVPP-based products had been firstly allowed to swell.

One sample was left non-stabilized, it was only filtered through a filtration paper with the kieselguhr layer twice. Always 0.5 g of kieselguhr and the given amount of a stabilizer were added to a sample (300 ml). The samples were transferred under CO₂ atmosphere to closeable bottles and left while constantly stirring in a refrigerator at 8 °C for 30 minutes. Subsequently, the samples were double filtered through the filtration paper. Finally, they were left for 30 minutes on a shaker, to remove CO₂, and then for at least 15 minutes left still at room temperature to remove microbubbles that could interfere in the haze measurement. The efficiency time of the stabilizers in laboratory tests was higher than the minimum contact time declared by the manufacturer, thus minimizing their effect on the test performance.

Several analytical methods were used to predict colloidal stability of beer. Chemicals listed in Table 1 were used during these tests. The measured values of the samples stabilized by individual agents were compared to the values of the non-stabilized sample.

2.2 Forcing tests

These tests belong to the most frequently method for the prediction of colloidal stability, with their use the stabilization effect can be assessed. These destruction methods subject beer to big differences in temperatures accelerating thus undesirable changes in beer characters. The principle is based on alternating depositing beer at extreme temperatures 40 to 60 °C and following cooling to 0 °C. Chill haze arises during the cooling, while high temperatures of thermal shocking procedure accelerate beer ageing (Šavel and Prokopová, 1992).

In our case, temperatures of 0 °C and 60 °C altered after 24 hours, so-called hot and cold days rotated. According to the number of warm days needed to achieve the haze of 2 EBC units (shelf-life prediction – T2 [days]), beer shelf-life can be predicted, one warm day corresponds approximately to 1 month of the shelf-life (Gabriel, 2009). The intensity of the scattered light beam is measured by nephelometry in the sample, i.e. at an angle of 90° and the results are reported in units EBC (Analytica EBC (a)).

2.3 Precipitation tests

The precipitation tests are used for the determination of haze-forming components (Sladký and Dienstbier, 2001). The tests are based on the precipitation of haze precursors after the addition of the titration agent with which the given substances form complexes. The added agent reacts with the individual types of haze-forming components and the haze formed is detected by a turbidimeter.

kalotvorných složek a vytváří zákal, který se detekuje zákaloměrem.

Síranový test (SASPL test)

Tato metoda dává informace o stavu koloidního systému piva pomocí sledování koncentrace látek vysolitelných nasyceným roztokem síranu amonného. Roztokem síranu amonného se titruje zkoušené pivo až do vzniku viditelného zákalu. (Basařová et al., 1993). Ten 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 (Gabriel, 2009).

Stanovení tanoidů (TAN test)

Tanoidy jsou nízko- až střednémolekulární polyfenolové látky, které specificky reagují s bílkovinami obsaženými v pivu a vytvářejí tak zákal. Jsou adsorbovatelné rozpustným PVP, se kterým tvoří nerozpustné komplexy pomocí vodíkových můstků. PVP se kontinuálně přidává a intenzita zákalu se zvyšuje do té doby, než se navází všechny tanoidy. V této době je dosaženo maxima křivky a jakmile začne v měřeném roztoku převažovat PVP, začne zákal znovu klesat (Chapon, 1993). Koncentraci tanoidů zjistíme z množství PVP (mg PVP/l vzorku), které bylo nutné dodat do roztoku k dosažení maximálního zákalu. Intenzita zákalu se měří nefelometricky a výsledek je vyjádřen v mg/l (Basařová et al., 1993).

Modifikovaná verze TAN testu – s přídavkem nasyceného roztoku síranu amonného (SASS)

Tato metoda zvyšuje citlivost a rozlišovací schopnost testu a umožňuje měřit i vysoko stabilizované vzorky. Přídavek soli do vzorku totiž snižuje rozpustnost PVP-tanoidových komplexů. SASS se do vzorku přidává ještě před zahájením vlastního testu a čím více se ho do vzorku přidá, tím vyšší je naměřená hodnota tanoidů a zákalu. Ne-smí se ovšem překročit hranice koncentrace, při které už dochází k vysrážení proteinů. Do 5 ml se běžně přidává 0,5 ml SASS. Tím dojde ke zvýraznění maxima zákalu, ale zároveň ještě není vyvoláno srážení proteinů (Gabriel, 2009, Dienstbier et al., 2011).

Stanovení citlivých proteinů (SP test)

Citlivé proteiny v pivu jsou takové, které mají silnou afinitu k taninu a za vzniku trvalého zákalu s nimi rychle reagují (Basařová et al., 1993). Reakce probíhá mezi nukleofilní skupinou proteinu (-SH nebo -NH₂) a ketonovou skupinou taninu, tvoří se srazenina, a tím se zvyšuje zákal.

Do 5 ml vzorku je jednorázově nadávkováno 0,25 ml roztoku taninu, je sledován vývoj zákalu a po 10 minutách je test ukončen. Intenzita zákalu piva se měří nefelometricky (vyjadřuje se v jednotkách EBC) a je přímo úměrná obsahu zákalotvorných proteinů (Analytica EBC (b)).

Během výše zmíněných testů byly použity chemikálie o daných koncentracích uvedené v tab. 1.

Intenzita zákalu v pivu byla měřena zákaloměrem MZN-2002, což je plně automatizovaný přístroj schopný měřit zákal přímo v komerčních láhvích. Určení hodnoty zákalu probíhá na základě měření intenzity světla rozptýleného ve vzorku pod úhlem 90° a 12° vzhledem ke směru šíření původního světelného svazku a výsledky jsou uváděny v jednotkách EBC.

Titrační testy byly prováděny na standardní, komerčně dostupné aparaturě DATTS 2000 (obr. 1), která se skládá ze zákaloměru MZN-2002, softwaru MZN CONTROL, oběhového termostatu od firmy 1-Cube a pístové dávkovací pumpy. Ta slouží jako dávkovač titračního činidla. Pro vyhodnocení korelačních koeficientů a regresních závislostí byl použit program Microsoft Excel.

Tab. 1 Použité chemikálie / Table 1 Chemicals used

Chemikálie / Chemicals	Výrobce / Manufacturer	Koncentrace / Concentration
Síran amonný / Ammonium sulphate	MERCK	Nasycený roztok / Saturated solution (>820 g/l)
PVP K90	ISP	0.4 g/l
Tanin / Tannin	MERCK	0.2 g/l

Tab. 2 Hodnoty testů vzorku A stabilizovaného různými stabilizačními prostředky / Table 2 Values of tests of the sample A stabilized with different stabilizers

Prostředek / test Preparation / test	TAN (mg/l)	TAN _{SAS} (mg/l)	Tanoidy odstr./ Tannoids removed (%)	SP (j. EBC/EBC un.)	SP odstr./ SP removed (%)	SASPL (ml/10ml)
Bez stabilizace / Without stabilization	54.9	103.5		11.4		0.98
Polyfenoly-1 / Polyphenols-1	28.2	57.6	44.6	10.3		1.24
Polyfenoly-2 / Polyphenols-2	ND	28.7	72.3	10.3		1.35
Polyfenoly-3 / Polyphenols-3	28.7	59.4	42.6	11.6		1.23
Bílkoviny-1 / Proteins-1	52.3	-		6.9	39.5	1.57
Bílkoviny-2/ Proteins-2	53.3	-		8.4	26.3	1.24
Bílkoviny-3 / Proteins-3	55.5	-		6.8	40.4	1.35

ND – pod mezí detekce / not detected

Sulphate test (SASPL test)

This method provides information on the state of the beer colloidal system by monitoring the concentration of substances precipitated by a saturated solution of ammonium sulfate. The ammonium sulfate solution is titrated to the tested beer until a visible haze is formed. (Basařová et al., 1993) At first the haze does not change (it may even slightly decline), but after reaching a certain concentration a sharp increase (precipitation) occurs. This limit (SASPL – ("Saturated Ammonium Sulphate Precipitation Limit") is defined as the amount of ammonium sulphate needed for the origin of recordable haze (Gabriel, 2009).

Tannoid determination (TAN test)

Tannoids are low to medium molecular polyphenolic substances which specifically react with the proteins contained in beer creating haze. They are adsorbable with soluble PVP, with which they form insoluble complexes through hydrogen bridges. On continuous injection of a solution of PVP into the sample a haze develops until all the tannoids are bound. PVP is continuously added and haze intensity increases until all tannoids are bound. At this point the curve maximum is achieved and as soon as PVP exceeds in the measured solution, haze again starts to decline (Chapon, 1993). Tannoid concentration is determined from the amount of PVP (mg PVP/l of the sample) which had to be added to the solution to achieve the maximum haze. The haze intensity is measured by nephelometry and the result is expressed in mg/l (Basařová et al., 1993).

Modified version of the TAN test – with the addition of saturated ammonium sulphate (SASS)

This method increases sensitivity of the test and allows for measuring of highly stabilized samples. Addition of sulphate to the sample reduces solubility of the PVP-tannoid complexes. SASS is added to the sample prior testing, and the more amount is added to the sample, the higher the measured value of tannoid and turbidity is. However, the limit of concentration at which protein already starts to precipitate must not be exceeded. Commonly, 0.5 ml of SASS is added to 5 ml. This highlights the maximum of haze turbidity, but protein precipitation is not initiated (Gabriel, 2009 Dienstbier et al., 2011).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Výběr stabilizačních prostředků

Stabilizační prostředky byly vybírány na základě výsledků laboratorních zkoušek. Účinnost stabilizace byla posuzována třemi titračními testy – testem na stanovení tanoidů (TAN test), citlivých proteinů (SP test) a síranovým testem (SASPL test). V tab. 2 jsou uvedeny výsledky laboratorních zkoušek účinnosti stabilizačních prostředků provedené na vzorku piva plzeňského typu. Tytéž zkoušky byly provedeny na dalších 6 vzorcích piva plzeňského typu různých druhů a stupňovitosti produkovaných pivovarem a u všech vzorků byly výsledky testů obdobné. Prostředky na odstranění tanoidů, označené jako Polyphenoly-1,2,3, jsou na bázi PVPP, prostředky na odstranění bílkovin, označené jako Bílkoviny-1,2,3, jsou na bázi křemičitých gelů. Nejlepšího stabilizačního účinku na odstranění tanoidů bylo podle TAN testu dosaženo při použití přípravku Polyphenoly-2. Klasickým testem nebyla hodnota tanoidů detekovatelná, proto musel být použit test s přídavkem síranu amonného (TANSAS), pak byla naměřena hodnota 28,7 mg/l. Míra odstranění tanoidů při použití tohoto přípravku se u všech vzorků pohybovala v rozmezí 40–75 %. Podle SP testu dosáhly nejlepších výsledků při odstranění zákalotvorných proteinů shodně prostředky Bílkoviny-1 (6,9 j. EBC) a Bílkoviny-3 (6,8 j. EBC). Míra odstranění zákalotvorných proteinů téměř prostředky se u všech vzorků pohybovala v rozmezí 25–45 % (rozdíly mezi oběma stabilizačními prostředky byly v řádu procent). Nejlepšího výsledku při SASPL testu dosáhl prostředek Bílkoviny-1 (1,57 ml/10 ml nasyceného roztoku síranu amonného).

Podle získaných výsledků byl pro provozní zkoušky vybrán prostředek Polyclar 10 a Stabiquick Strong, tedy dva prostředky, které prokázaly nejlepší stabilizační účinky a nejlépe vyhovovaly požadavkům pivovaru (zohledněno bylo i ekonomické hledisko).

3.2 Srovnání původní a nové stabilizace

Po výběru stabilizačních prostředků bylo provedeno srovnání nově zavedené a původní stabilizace v provozu, přičemž bylo očekáváno zlepšení odstranění zákalotvorných prekurzorů. Podle nově zavedené stabilizace byly vzorky ošetřeny 40 g/hl v případě Stabiquicku Strong a 15 g/hl v případě Polyclaru 10. Vzorky ošetřené původně používanou stabilizací byly ošetřeny přípravkem na odstranění zákalotvorných proteinů i přípravkem na odstranění polyfenolů.

Výsledky srovnání jsou zobrazeny v tab. 3. Z naměřených hodnot je zřejmé, že všechna piva, která byla stabilizována novým způsobem, dosáhla lepších výsledků oproti pivům stabilizovaným původně používanou stabilizací. Bylo prokázáno, že nově zavedený postup stabilizace snížil obsah zákalotvorných prekurzorů u všech zkoumaných vzorků. Míra zlepšení je závislá na druhu piva. Především došlo k významnému poklesu tanoidů, zhruba o 30 %. K tak vysokému úbytku došlo pravděpodobně díky použití nově zavedeného stabilizačního prostředku pro adsorpci polyfenolů. Pokles citlivých proteinů se pohyboval v jednotkách % a zlepšení odstranění zákalotvorných sloučenin podle testu SASPL bylo v rozmezí 0,04 až 0,25 %, což jsou poměrně nevýznamné hodnoty. Míra odstranění bílkovin je též shodná u původního i nově použitého křemičitého gelu, v obou případech se jednalo o Stabiquick (pouze jiný typ), ovšem u Stabiquicku Strong bylo možné snížit dávkování.

3.3 Předpověď koloidní stability

Po vyhodnocení testů bylo přistoupeno k použití vybraných stabilizačních prostředků v provozu. Byla odebrána piva jednotlivých šárží ošetřených nově navrženou stabilizací, u kterých byl měřen obsah kyslíku, aby se mohl posoudit jeho vliv na koloidní stabilitu. Následně byly provedeny titrační i šokovací testy, pomocí nichž byla u jednotlivých šárží předpovězena trvanlivost v teplých dnech (T2) (tab. 4).



Obr. 1 Aparatura DATTS 2000 / Fig. 1 DATTS 2000 equipment

Determination of sensitive proteins (SP test)

Sensitive proteins in beer are the proteins with a strong affinity to tannins, during a quick reaction permanent haze is formed (Basařová et al., 1993). The reaction proceeds between the nucleophilic group of the protein (-SH or -NH₂) and tannin ketone group, precipitate is formed and haze is thus increased.

Solution of 0.25 ml of tannin is once added to a 5 ml of the sample, the development of haze is observed and after 10 minutes the test is terminated. The intensity of beer haze is measured by nephelometry (expressed in units EBC) and is directly proportional to the content of haze-forming proteins (Analytica EBC (b)).

Chemicals of given concentrations used during the above-mentioned tests are given in Table 1.

The intensity of haze in beer was measured by a turbidity meter MZN-2002, which is a fully automated instrument capable of measuring haze directly in commercial bottles. Determination of the haze value is based on measuring the intensity of light scattered in the sample at angles of 90° and 12° relative to the direction of propagation of the original light beam and the results are reported in the EBC units.

Titration tests were performed on standard, commercially available DATTS 2000 equipment (Fig. 1) consisting of a turbidity meter MZN-2002, software MZN CONTROL circulating thermostat from the company 1-Cube and piston dosing pumps. It serves as a dispenser of titration agent. Program Microsoft ExcelATTs 2000 was used for the evaluation of the correlation coefficients and regression dependence (Fig. 1).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Selection of stabilizing agents

Stabilizing agents were selected based on results of the laboratory tests. The efficiency of stabilization was assessed by three titration tests – the test for the determination of tannoids (TAN test), sensitive proteins (SP test) and sulphate test (SASPL test). Results of the laboratory tests of the stabilizing agent efficiency carried out in Pilsen-type beer samples are given in Table 2. The same tests were performed in further six Pilsen-type beer samples of different brands and gravity produced by the brewery, with similar results in all samples. Preparations for removing tannoids marked as Polyphenols-1,2,3 are on the basis of PVPP, preparations for removing proteins marked as Proteins-1,2,3 are on the basis of silica gels. According to the TAN test, the best stabilizing effect for removing tannoids was achieved with the preparation Polyphenols-2. The classical test did not detect the tannoid value, therefore the test with the addition of ammonium sulphate was used (TANSAS), the value of 28.7 mg/l was then detected. The rate of removal of tannoid using this preparation ranged from 40–75% in all samples. According to the SP test, the best results in the removal of haze-forming proteins was achieved with the preparations Protein-1 (6.9 EBC) and Protein-3 (6.8 EBC). The rate of removal of haze-forming proteins with these preparations varied from 25–45% in all samples (the difference between the two stabilizing agents was in the order of percents). The best result was achieved in the SASPL test with the preparation Protein-1 (1.57 ml/10 ml of saturated ammonium sulphate solution).

Based on the results achieved, the preparations Polyclar 10 and Stabiquick Strong were selected for operational tests, i.e. two preparations that exhibited the best stabilizing efficiency and met the requirements of the brewery best (economic aspect was also taken into account).

3.2 Comparison of original and new stabilization

After the selection of stabilizing agents, the newly introduced stabilization was compared with the original one; the improved removal of haze-forming precursors was expected. According to the newly introduced stabilization, the samples were treated with 40 g/hl of Stabiquick Strong or 15 g/hl of Polyclar 10. The samples treated by the originally used stabilization were treated with preparations for removal of haze-forming proteins and polyphenols. The results obtained from the comparison are given in Table 3. The measured values suggest that all the beers stabilized using the new method achieved better results compared to the beers stabilized with the originally used stabilization process. It was proven that the newly introduced technique reduced the content of haze-forming precursors in all investigated samples. The extent of improvement depends on the beer type. Namely tannoids declined significantly, roughly by 30 %. This high decline was probably due to the use of the newly introduced

Tab. 3 Srovnání vzorků piv ošetřených původní (P) a novou (N) stabilizací / Table 3 Comparison of beer samples treated with original (P) and new (N) stabilization

Vzorek / test Sample / test	TAN (mg/l)		TAN _{SAS} (mg/l)		SP (j. EBC /EBC un.)		SASP (ml/10 ml)	
	P	N	P	N	P	N	P	N
1	32.4	ND	40.4	28.1	11.0	10.4	1.24	1.28
2	ND	ND	38.9	27.5	11.9	11.7	1.13	1.20
3	29.0	ND	60.3	42.6	12.0	11.9	1.24	1.35
4	33.8	30.0	62.0	49.9	11.6	10.5	1.23	1.38
5	21.2	19.9	50.3	34.7	11.9	11.6	0.83	1.02
6	18.6	ND	47.3	28.4	11.5	10.6	1.02	1.27

ND – pod mezí detekce / not detected

Tab. 4 Hodnoty testů u deseti šarž téhož piva / Table 4 Values of tests in ten batches of the same beer

Vzorek / naměřené hodnoty / Sample / measured values	Obsah kyslíku / Oxygen content (ppm)	TAN (mg/l)	TAN _{SAS} (mg/l)	SP (j. EBC / EBC un.)	SASP (ml/10ml)	T2 (dny/ days)
1	0.03	21.6	41.7	10.0	0.98	3.0
2	0.10	19.6	27.6	11.2	1.02	5.8
3	0.07	ND	29.7	10.8	1.09	5.3
4	0.03	18.7	32.2	11.7	0.98	3.3
5	0.05	19.3	31.1	11.8	1.05	3.3
6	0.05	ND	27.9	11.2	0.83	4.3
7	0.06	21.2	37.5	12.3	0.83	2.0
8	0.07	23.2	38.3	11.4	0.87	2.9
9	0.04	26.5	47.6	10.6	0.9	1.8
10	0.07	21.0	37.6	11.4	0.9	3.6

Tab. 5 Korelační rovnice, hodnoty spolehlivosti a směrodatné odchylinky trvanlivosti u jednotlivých kombinací prediktčních testů / Table 5 The correlation equation, values of reliability and standard deviation of shelf-lifetime for each combination of predictive tests

Kombinace prediktčních testů / Combination of prediction tests	Korelační rovnice / Correlation equation	Hodnota spolehlivosti / Reliability value
TAN _{SAS} +SP	y = 7.5 - 0.7059*SP + 1728.1* (TAN) ^{-1.73}	R ² = 0.842
TAN _{SAS} +SASP	y = 3.2 + 3.74*SASP + 1398.7* (TAN) ^{-1.73}	R ² = 0.738

Jednotlivé šarže se od sebe příliš nelišily ve stupňovitosti, obsahu alkoholu a obsahu kyslíku, jenž byl poměrně nízký a u každé šarže se pohyboval do 0,1 ppm.

Přestože u všech piv byla použita stejná stabilizace, obsah tannoidů se pohyboval v rozmezí 27,6 až 47,6 mg/l (podle testu TANSAS) a trvanlivost naměřené šokovacími testy kolísala mezi 1,8 až 5,8 teplými dny (T2). Obsah zákalotvorných proteinů byl v rozmezí 10,0 až 11,8 j. EBC, výsledky SASPL testu se pohybovaly mezi od 0,90 až 1,09 ml/10ml nasyceného roztoku síranu amonného.

U vzorků byla nalezena dobrá korelace mezi obsahem tannoidů a naměřenou trvanlivostí ($R^2 = 0,714$). Pro proložení závislosti byla použita mocninná funkce podle Dienstbiera (2011). Pro porovnání byl použit test s přídavkem síranu amonného, protože prostý TAN test nebyl schopen u některých vzorků tannoidy detektovat. Pomocí rovnice získané z proložení naměřených bodů lze z obsahu tannoidů předpovědět trvanlivost s přesností na 0,64 teplého dne. Mezi obsahem citlivých proteinů a naměřenou trvanlivostí byla nalezena korelace téměř nulová ($R^2 = 0,023$), velmi podobně na tom byl i výsledek testu SASPL ($R^2 = 0,3$).

Pro zpřesnění předpovědi byla použita kombinace výsledku testu TANSAS+SP a TANSAS+SASP (tab. 5). U obou těchto kombinací

stabilizer for the polyphenol adsorption. The decline in sensitive proteins varied in the % units and the improvement of the removal of haze-forming compounds according to the SASPL test was in the range of 0.04 to 0.25 %, which are quite insignificant values. The extent of the removal of proteins is nearly similar both in the original and newly used silica gel, in both cases Stabiquick was used (only another type), however, with Stabiquick Strong, the dose could be reduced.

3.3 Prediction of colloidal stability

After evaluation of the tests, the selected stabilization agents were used in practice. Beer samples of the individual batches treated with newly developed stabilization, in which the oxygen content was measured in order to assess its effect on the colloidal stability, were taken. Subsequently, titration and force tests for prediction of shelf-life in hot days (T2) (Table 4). The individual batches did not differ significantly in terms of gravity, alcohol content and oxygen content, which was relatively low, moving in each batch to 0.1 ppm. Although the same stabilizer was used in all beers, tannoid content moved in the range of 27.6 to 47.6 mg/l (based on the TANSAS test) and durability measured by the force tests varied between 1.8 to 5.8 hot days (T2). Content of haze-forming proteins was in the range of 10.0 to 11.8 EBC units, the results of the SASPL test moved from 0.90 to 1.09 ml/10ml of the saturated solution of ammonium sulphate.

Samples exhibited a good correlation between tannoid content and measured shelf-life ($R^2 = 0.714$). For fitting the dependence, power function after Dienstbier was applied (2011). For comparison, the test with the addition of ammonium sulphate was employed as the simple TAN test did not detect tannoids in some samples. Using the equation obtained from fitting the measured points the shelf-life can be predicted from tannoid content with an accuracy of 0.64 of a warm day. The correlation detected between the contents of sensitive proteins and measured shelf-life was nearly zero ($R^2 = 0.023$), the SASPL test ($R^2 = 0.3$) gave very similar results ($R^2 = 0.3$).

For more accurate predictions a combination of results of tests TANSAS + SP + and TANSAS SASPL was used (Table 5). For each of these combinations correlation with shelf-life increased. The best results were

obtained using a combination TANSAS + SP, where the value of reliability equals to 0.842. Fig. 2 shows the correlation between the time calculated from the results of titration assays (TANSAS + SP) using the equations in Table 5 and the measured shelf life (hot days T2 in Table 4).

4 CONCLUSIONS

Colloidal beer stability depends first of all on the content of haze-forming precursors (polyphenols, proteins), which together can form undesirable haze. This can be prevented by selection of suitable raw materials or elimination of one or both the precursors of haze formation. Nowadays, for this purpose adsorption stabilizers are usually used. The aim of this study was to develop and implement into standard brewing operation a new stabilization procedure.

Titration tests were used for the determination of the colloidal state of the beer samples (test for the determination of tannoids after Chapon – TAN test, test for the determination of sensitive proteins – SP test, precipitation test with ammonium sulphate – SASPL test), in addition forcing test for the prediction of col-

se zvýšila korelace s trvanlivostí. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při kombinaci TAN-SAS+SP, kdy se hodnota spolehlivosti rovná 0,842. Obr. 2 ukazuje korelací mezi dobou vypočtenou z výsledků titračních testů (TAN-SAS+SP) pomocí rovnice v tab. 6 a naměřenou dobou trvanlivosti (teplé dny T2 v tab. 4).

4 ZÁVĚR

Koloidní stabilita piva je závislá především na obsahu zákalotvorných prekurzorů (polyfenoly, bílkoviny), které spolu mohou tvořit nežádoucí zákal. Tomu se dá předejít výběrem vhodných surovin nebo eliminací jednoho či obou hlavních prekurzorů vzniku zákalu. K tomuto účelu se dnes používají převážně adsorpční stabilizační prostředky. Cílem této práce bylo navrhnout a zavést do běžného pivovarského provozu nový stabilizační postup.

Pro zjištění koloidního stavu vzorků piva byly používány titrační testy (test na stanovení tanoidů podle Chapon - TAN test, test na stanovení citlivých proteinů - SP test, test srážení síranem amonným - SASPL test), dále byly prováděny šokovací testy pro předpověď koloidní stability. Prvním úkolem bylo vybrat dva stabilizační prostředky, které budou nejlépe vyhovovat požadavkům pivovaru z technologického i ekonomického hlediska. Bylo testováno 6 prostředků, přičemž z polyfenolových adsorbentů dosahoval nejlepších výsledků jednoznačně Polyclar 10, z křemičitých gelů byl zejména z ekonomických důvodů (nižší cena a dávkování) vybrán Stabiquick Strong. Po zavedení těchto stabilizačních prostředků v provozním měřítku se přistoupilo u vybraných vzorků k provádění titračních a šokovacích testů pro předpověď trvanlivosti. Bylo testováno vždy deset šárží téhož typu piva; u piv s nízkým obsahem kyslíku byla nalezena dobrá korelace mezi obsahem tanoidů a naměřenou trvanlivostí. Pomocí nalezeného korelačního vztahu je možné u těchto piv předpovědět trvanlivost s přesností na 1 teplý den. Při započetí společného vlivu obsahu tanoidů a citlivých proteinů se podařilo přesnost předpovědi zlepšit na 0,64 teplého dne. Bylo ověřeno, že tanoidy mají u daného druhu piva až několikanásobně větší vliv na předpověď trvanlivosti než citlivé proteiny.

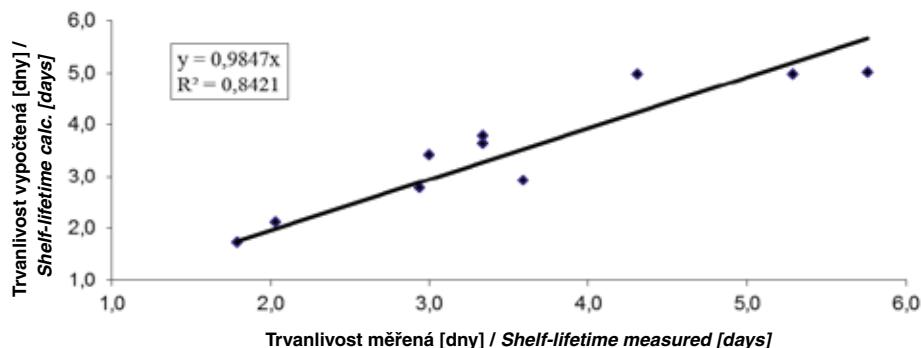
Při použití konstantního dávkování stabilizačních prostředků se trvanlivost jednotlivých šárží piva od sebe může výrazně lišit (viz. tab. 4) zejména v důsledku rozdílného obsahu zákalotvorných prekurzorů piv před filtrací. Pro dosažení standardní úrovni koloidní stability u všech šárží je nutné měřit obsah zákalotvorných prekurzorů nefiltrovaných piv a upravovat dávkování stabilizačních prostředků.

Poděkování

Autori děkují Technologické agentuře ČR (TAČR), projekt TE02000177, za finanční podporu.

LITERATURA / REFERENCES

- Analytica EBC, 1997(a): Analytica EBC, 5th edition, European Brewery Convention: (a) Prediction of Shelf-life of Beer. Carl-Hans Verlag, Nürnberg.
- Analytica EBC, 1997(b): Analytica EBC, 5th edition, European Brewery Convention: (b) Sensitive Proteins in Beer. Carl-Hans Verlag, Nürnberg.
- Bamforth, Ch. W., 1999: Beer haze. J. Am. Soc. Brew. Chem. 57: 81–90.
- Basařová, et al., 1993: Pivovarsko – sladařská analytika. Merkanta, Praha.
- Dienstbier, M., Janková, L., Sladký P., Dostálka P., 2010: Metody předpovědi koloidní stability piva. Chem. Listy, 104: 86–92.
- Dienstbier, M., Gabriel, P., Sladký, P., Sigler, K., 2011: Prediction of colloidal stability of highly stabilised beers by modified Chapon's tannoid content test. J. Inst. Brew. 117(3): 329–334.
- Gabriel, P., 2009: Optické metody kontroly fermentačních procesů a hodnocení kvality jejich produktů. Disertační práce, MFF UK.
- Chapon, L., 1993: Der Begriff Tannoide, Prinzip der Bestimmung und Auswertung der Ergebnisse. Monatsschr. Brauwiss. 46: 7–8.
- Niemisch, K., 2007: Quo vadis, stabilito piva? Kvásny Prum. 53: 139–141.
- Niemisch, K., Heinrich, T., 2006: Aktuální problematika koloidního zákalu piva. Kvásny Prum. 52: 7–8.
- Parker, D. K., 2007: Study of haze formation in freshly packaged and stored beers. Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am. 44: 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.
- Sladký, P., Dienstbier, M., 2001: Zlepšené postupy měření zákalů pro komplexní sledování koloidní stability piva pomocí dvouúhlové turbidimetrického a titračního systému DATTS. Kvásny Prum. 47(7–8): 122–126.
- Šavel, J., Prokopová, M., 1992: Jak volit teplotní šokování. Kvásny Prum.: 38(11): 289–292.



Obr. 2 Korelace mezi naměřenou a vypočtenou dobou trvanlivosti / Fig. 2 Correlation between the measured and calculated shelf-lifetime

Ioidal stability was conducted. The first task was to select two stabilizing preparations that would meet the requirements of the brewery best both from the technological and economic points of view. Six preparations were tested, of polyphenol adsorbents, Polyclar 10 clearly achieved the best results, of silica gels, Stabiquick Strong was chosen namely for economic reasons (lower value and dosing). After introduction of these stabilization preparations in operation, in selected samples titration and forcing tests for shelf-lifetime prediction were conducted. Always ten batches of the same type of beer were tested; in beers with low oxygen content was found good correlation between tannoid content and measured shelf-life was found. Based on the determined correlation, shelf-life can be predicted in these beers with accuracy to one hot day. Considering the joint effect of the tannoid content and sensitive proteins the prediction accuracy was improved to 0.64 hot day. It was verified that tannoids have in the given type of beer even several times higher effect on the shelf-life prediction than sensitive proteins.

With the use of the constant dose of stabilization agents the shelf-lifetime of the individual beer batches can differ significantly (see Table 4) mainly as a result of different content of haze-forming precursors of beer before filtration. To achieve the standard level of colloidal stability in all batches, it is necessary to measure content of haze-forming precursors of non-filtered beers and to adjust dosage of the stabilization preparations.

Acknowledgements

This study was supported by the Technological Agency CR (TAČR), project no. TE02000177.

Translated by Vladimíra Nováková