

Porovnání stanovení zákalu piv a vín různého stáří standardní nefelometrií a počítáním rozdělení kalových částic

Comparison of haze determination in beer and wines of various age by standard nephelometry and haze particles distribution counting

Petr Sladký

Katedra chemické fyziky a optiky, Matematicko-fyzikální fakulta, Universita Karlova v Praze, Ke Karlovu 3, 121 16 Praha 2

Charles University in Prague, Faculty of Mathematics and Physics, Department of Chemical Physics and Optics, Ke Karlovu 3, 121 16 Praha 2, Czech Republic

ABSTRAKT

Za účelem hlubšího kvantitativního poznání vlivů stárnutí na celkovou smyslovou kvalitu filtrovaných kvasných nápojů rostlinného původu byla porovnávána tvorba zákalů lahvového piva a vín během jejich stárnutí současně uzanční nefelometrickou metodou i stanovením distribuce kalových částic. Ve všech studovaných vzorcích piva i vín byl pozorován během stárnutí růst nefelometrického zákalu. Měření distribuce kalových částic podle velikosti metodou počítání ukázala, že je způsoben agregací a koagulací makromolekulárních a koloidních částic zfiltrovaných vzorků piva a vína výchozích submikronových rozměrů. Nejméně se růstem kalových částic během stárnutí zakalovala bílá vína. Srovnatelnými a podstatně většími zákalami se vyznačovaly vzorky zestárlého piva a červeného vína, které obsahovaly i větší množství zkoagulovaných kalových částic větších než 2 mikrometry. Poměrně malý růst zákalů bílých vín během stárnutí byl s největší pravděpodobností způsoben podstatně menší koncentrací zákalotvorných proteinů a polyfenolů a z nich zvláště antokyanogenů ve srovnání s červeným vínem i pivem. Ve srovnání s uzanční nefelometrickou metodou umožnilo stanovení a porovnání distribucí kalových částic nezestárlých a zestárlých vzorků piv a vín podstatně účinněji rozlišit tvorbu zákalů, způsobenou nedokonalou filtrací a nebo stabilizací a nebo dobou a podmínkami stárnutí. Stanovení rozdělení kalových částic optickým počítáním během stárnutí v nenákladném transmisním uspořádání lze s výhodou použít nejen k hodnocení účinnosti filtrace a stabilizace piva a vína, ale zvláště pro výběr vín k řízenému stárnutí a archivaci.

SUMMARY

Nephelometric haze and haze particles size distribution in beer and wines of different aged were compared to obtain more detailed knowledge of the effect of ageing on beer and wines complex sensorial properties. With the age of the samples the growth of nephelometric haze has been observed due to aggregation and coagulation of initially submicron macromolecular and colloidal to the size of coarse haze particles as it was revealed by particle counting and size distribution. While the nephelometric haze in fresh filtrated beer and in both young white and red wines was approximately the same, the aged white wine samples were less hazy than aged beer and red wines too because of greater amount of coarse haze particles bigger than 2 micrometers. Relatively greater haze growth in beer and red wines during ageing as compared to white wines was due to lesser content of anthocyanogens and particularly of their haze active condensed and polymerized forms. In contrast to formazin standardized nephelometry the method of haze particles size distribution counting enabled more effective differentiation of the effect of filtration, stabilization and ageing on beer and wine hazes and visual properties. This can be used not only for the optimization and improvement of beer and wine filtration, stabilization and bottling technologies but particularly in the case of wines for more effective selection and optimization of archive storage conditions.

Úvod

Pivo i víno patří mezi nejrozšířenější kvasné nápoje přírodního původu¹⁻³. Podle historického a geografického původu existuje celá řada druhů a značek piv a vín⁴⁻⁷. Převážná většina z nich se pro konzumaci uchovává, dopravuje i konzumuje v transparentních skleněných lahvích a pohárech. Za účelem odstranění nežádoucích mikrobiální kontaminace a zachování resp. optimalizaci jejich celkových sensorických vlastností tj. nejen chuťových⁸, ale i čichových a vizuálních⁹, se před stočením do lahví většina druhů piv a vín fyzikálně-chemicky případně i biochemicky stabilizuje a submikronově filtruje¹⁰⁻¹². Takto upravená čerstvá piva a vína viditelně nerozptylují světlo¹³⁻¹⁶. Stočená do transparentních lahví nebo nalitá do konzumačních sklenic se jeví jako jiskrně čirá, tj. nevykazují zákal. Ze zkušenosti a z celé řady odborných studií je známo, že během uchovávání piva i vína stárnou¹⁷⁻¹⁹. V případě vín částečně žádoucími, ale jinak převážně nežádoucími^{20,21} a dosud ne úplně poznanými fyzikálně-chemickými a částečně i biochemickými procesy^{22,23}. Tyto procesy se projevují velmi složitými změnami charakteristických sensorických vlastností piv a vín včetně těch vizuálních^{14,18,24,25}. Původně jiskrně číře stočená piva a vína se v lahvích během stárnutí postupně až viditelně zakalují tak, že lze pozorovat na dně lahví i úsadu kalových částic^{9,10,25}. Viditelné zákaly a úsady v lahvoých pivech a vínech obvykle snižují v očích konzumenta jejich nejen vizuální, ale i chuťovou přitažlivost a jsou považována laickým spotřebitelem obecně za nekvalitní²⁵⁻²⁷.

Přestože v současné době je k dispozici řada přístrojů vhodných pro objektivní tj. fotometrické stanovení zákalu piv i vín na základě statického (elastického) či dokonce dynamického (kvazieleastického) rozptylu světla^{13,28-32}, z výše uvedených praktických důvodů je vizuální hodnocení zákalů piv a vín za účelem posouzení jejich kvality během stárnutí stále široce používáno i ve výrobní analytické praxi právě za účelem porovnávání s poznatky spotřebitelů^{24,33-35}.

Nevýhodou vizuálního stanovení a hodnocení zákalů piv a vín je, jak známo, značná nejistota získaných dat, způsobená přirozeně širokou a plovoucí amplitudovou i spektrální citlivostí očí hodnotitelských subjektů^{15,24}. I když objektivní fotometrické stanovení zákalů piv a vín na základě rozptylu světla odstraňuje uvedené nedostatky subjektivních stanovení, jeho nedostatkem je, že poměrně složitě závisí nejen na optických vlastnostech piv a vín, ale i parametrech vysílače a přijímače zkušebního světla a jejich vzájemném prostorovém uspořádání^{13,27,29,36}. Proto se v praxi pro stanovení zákalu piv i vín, ale i vod a jiných kapalin resp. kapalných disperzí, používají zákalové fotometry se zjednodušeným tzv. nefelometrickým vzájemným uspořádáním vysílače svazku zkušebního světla a přijímače rozptýleného světla pod pravým úhlem^{33-35,37}. Stanovení zákalu piv a vín, ale i jiných kapalin, měřením rozptýleného svazku světla pod úhlem 90° se nazývá nefelometrií a příslušné přístroje jsou v literatuře bohužel označovány nejen jako nefelometry, ale i turbidimetry^{28,30,38}. V nefelometrech moderní konstrukce se pro částečné omezení vlivu barvy kapaliny na její zákal intenzita svazku rozptýleného světla normalizuje, nebo-li dává do poměru k intenzitě prošlého světla^{33-35,37}.

Výhodou zjednodušeného stanovení zákalu na základě měření rozptylu světla v jednom (nefelometrickém) směru je poměrně velká analytická účinnost při zachování nízkých pořizovacích nákladů^{15,27}. Proto je nefelometrická metoda kodifikována jako standardní referenční metoda pro stanovení zákalu nejen piv^{33,34} a vín³⁵, ale i jiných nápojů, a zvláště pak pitných i odpadních vod³⁷. Velikost zákalů se podle uvedených standardních referenčních metod stanovuje na základě porovnávání se zákalem standardní formazinové suspenze (SFS)^{38,49} v témže (linearizovaném) uspořádání a týmž přístrojem. Liší se pouze koeficientem. Zatímco ve vodohospodářství i vinařství se nefelometrický zákal stanovuje v tzv. nefelometric turbidity units NTU^{35,37}, v evropském pivovarství v jednotkách EBC (European Brewery Convention) dle evropské pivovarské konvence³³ a v americkém pivovarství v jednotkách

NTU ASBC (American Society of Brewing Chemists)³⁴. Poznamenejme, že zákalý piv i vín, zvláště v případě jejich světlých druhů (tj. světlých piv a bílých vín), jsou viditelné přibližně počínaje úrovní 1 NTU resp. 0,25 EBC resp. 15,25 ASBC NTU²⁴. Odtud je patrný i vzájemný poměr uvedených jednotek na stupnici koncentrace standardní formazinové suspenze.

Nevýhodou nefelometrické tj. v principu jednoúhlové rozptylové metody je, že neumožňuje rozlišit, jsou-li změny zákalů piv a vín způsobeny jen růstem počtu stejně velikých kalových částic nebo i velikostí stejného počtu kalových částic^{13,16,31,41}, neboť obecně se během stárnutí zákalý piv i vín mohou měnit jak změnou počtu částic rozptylujících světlo, tak i jejich velikostí^{14,16}. Pro hlubší poznání procesů tvorby zákalů piv a vín během stárnutí byly v poslední době použity moderní metody víceúhlového rozptylu světla samostatně^{31,39}, nebo ve spojení s velikostními dělicími metodami³¹, a nebo metodami dynamického rozptylu světla³². Rovněž byla ověřena možnost použití moderních cytometrů⁴⁰. Vzhledem k mimořádně vysoké investiční i operační nákladnosti byly uvedené studie provedeny většinou na modelových soustavách piv a vín v rámci základního výzkumu⁴¹.

Přímé porovnávání tvorby zákalů vzorků reálných piv a vín v důsledku změn velikosti i počtu kalových částic stárnutím nebylo dosud v dostupné odborné literatuře popsáno.

Význam takovýchto porovnávání spočívá v tom, že piva i vína se, do značné míry, vzhledem ke svému výchozímu rostlinnému původu, navzdory procesně odlišné extrakci a kvašení, vyznačují podobným kvalitativním, avšak kvantitativně rozdílným složením, zvláště co se týká obsahu jejich bílkovin (polypeptidů)^{42,43} a tříslovin (taninů resp. obecně polyfenolů)⁴⁴⁻⁴⁶, o kterých je známo, že jsou jednou z příčin tvorby jejich zákalů během stárnutí. Tvorba těchto, ale i jiných zákalů v závislosti na širších fyzikálně-chemických podmínkách stárnutí, není dosud uspokojivě objasněna. To platí zvláště o vlivu vzájemného působení katalytických kovů¹⁷, reaktivních forem kyslíku^{18,19,52}, přirozených antioxidantů^{6,44,51} a oxidu siřičitého^{23,50}, či i o polymerační úloze polysacharidů a aldehydů²⁰ během stárnutí piv i vín při různých

teplotách resp. dávkách tepla⁹. Rovněž vliv pH¹⁴, alkoholu^{39,41}, polysacharidů⁹ a podíl enzymatických procesů^{21,22} na tvorbu zákalů během stárnutí piv a vín není vzhledem k jejich značné kvalitativní i kvantitativní složitosti uspokojivě popsán.

Proto bylo zajímavé, alespoň na vyhledávací úrovni, v této experimentální studii provést přímé porovnání a důležitější kvalitativní hodnocení tvorby zákalů piv a vín během stárnutí jak uzančnickou nefelometrickou metodou, tak i metodou počítání částic v jednoduchém transmisním uspořádání s možností stanovení jejich rozdělení do několika tříd podle velikosti.

Experimentální část

M a t e r i á l y

Voda a modelové suspenze

Čistá voda (dále jen ROV) pro nastavení a kontrolu nulové úrovně zákalu a přítomnosti kalových částic a jejich distribuce byla připravena reverzní osmózou, demineralizací a nanofiltrací (měrná vodivost do 0,2 mS/cm, kalové částice menší než 200 nm) ve 2. stupni kvality dle⁴⁸ pomocí aparatury AQUAL 35 (Šuster, Brno, CZ). Pro přípravu standardní formazinové suspenze (C₂H₄N₂) dle³⁷ (dále jen SFS) byla použita ROV, hexamethylenetetramine H₆C₁₂N₄ (H-5020 Lot 13H0920, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) a hydrazinium sulfat N₂H₄*H₂SO₄ (ACS Reagent, Sigma Chemie, D8024 Desenhofen, D), chemicky čisté odměrné sklo třídy A (Kavalier, CZ), rtuťový teploměr s přesností 0,2°C/100°C (Julius Brückner Co. Ilmenau, D), vodní termostat o objemu 6 l (Medingen, Dresden, D) a o objemu 40 l (Labio, Praha, CZ), oba s přesností nastavení a homogenitou teploty lázně 0,2°C, váhy 0-160 g s rozlišením 0,1 mg typ WAA 220/C/2, (Radwag, P).

SFS 4000 NTU resp. 1000 EBC pro kalibraci zákaloměrů dle^{33,35,37} se připravila následovně:

ve vodě se v jedné uzavřené odměrné baňce při teplotě $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ rozpustilo 100 ml 10g \pm 1mg hexamethylentetraminu a zředilo na 100 ml (roztok A), ve druhé stejného provedení 1g \pm 1mg síranu hydrazinu a ten se zředil rovněž na 100 ml (roztok B). S hydrazinem se pracovalo podle předpisu na práci s jedovatými látkami, neboť je jedovatý a karcinogenní. Po rozpuštění a stání obou roztoků bez odparu v uzavřených odměrných baňkách po dobu 12 hodin se 5 ml roztoku A a 5 ml roztoku B smísilo v uzavřené vialce z hnědého skla o objemu 15 ml. Směs obou roztoků se vířivým pohybem promíchala a ponechala stát a zrát v termostatu na teplotě $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Tím vznikla zásobní SFS o ab definitio hodnotě zákalu 4000 NTU (Nephelometric Turbidity Units³⁷), nebo dle českého názvosloví (ČSN EN 27027) 4000 Zft – (transmisní) turbidimetrická formazinová jednotka, nebo Zfn - nefelometrická formazinová jednotka.

Zásobní SFS 4000 NTU resp. 1000 EBC se uložila v lednici pro úschovu analytických roztoků při teplotě 10°C pro následnou úpravu koncentrací kalibračních formazinových suspenzí ředěním ROV na jmenovitě cejchované resp. kontrolované hodnoty stupnice ověřovaného zákaloměru. Příprava stupnice kalibračních suspenzí se ze zásobního standardu prováděla vždy několik hodin před cejchováním. Dle normativních doporučení se zásobní formazinový standard používal pro přípravu zředěných kalibračních suspenzí maximálně po dobu 3 měsíců.

ROV byla použita i pro přípravu kalibračních suspenzí z monodisperzních polystyrenových částic SPHERO™ (Spherotech Inc. USA). Byly připraveny tři suspenze částic o nominálním průměru (dle údajů výrobce) $0,5\ \mu\text{m}$ (Lot X01), $3,17\ \mu\text{m}$ (Lot Y01) a $9,2\ \mu\text{m}$ (Lot Y01). Pro porovnávání a interpretaci měření byly suspenze připraveny o (rozdílném) počtu částic dávajícím přibližně stejnou hodnotu nefelometrického zákalu 1 NTU.

Rovněž v ROV byly pro srovnání připraveny modelové suspenze várečných pivovarských, resp. vinařských a pekařských kmenů kvasnic *Saccharomyces cerevisiae*. Množství kvasnic v obou suspenzích bylo také přibližně nastaveno na hodnotu nefelometrického zákalu 1 NTU. Vzorky kvasnic byly získány nákupem u malovýrobců a pro potřeby této studie nebyly jejich vlastnosti blíže určovány. Všechny připravené vodní suspenze byly studovány „as is“ tj. bez pufrování či jiné úpravy pH nebo iontové síly.

Pivo a víno

Pro účely studie bylo zvoleno lahvové pivo jednoho druhu, značky a šarže. Jmenovitě to bylo světlé výčepní pivo plzeňského typu⁴ o koncentraci extraktu 10 % s dobou trvanlivosti 90 dní dle údajů na etiketě. Vzorky označené jako psA (pivo světlé čerstvé, Tab. II) byly vzaty k měření den po zakoupení a zklidnění, tedy 11 dní po stočení dle údajů na etiketě. Vzorky téhož piva označené psB (pivo světlé staré - Tab. II) byly proměřeny 70 dní od data stočení. Do té doby stály během laboratorního skladování při průměrné teplotě 25°C v temnu. Bylo proměřeno po pěti lahvích čerstvých i starých vzorků piva.

Rovněž studované vzorky vín byly zakoupeny v maloobchodě. Za účelem porovnání vlivu stárnutí na tvorbu zákalů piva a vína byly zvoleny tři lahvové vzorky bílého vína o obsahu 0,75 l druhu Chardonnay různých výrobců, značek i ročníků (2006 a 2008 – dle údajů na etiketě, vzorky bB, bC, bE).

Pro porovnání zákalů červených vín byly studovány tři lahvové vzorky druhu Cabernet Sauvignon rovněž různých značek a výrobců, avšak stejného ročníku podle údajů na etiketě (Tab. II, vzorky erA, erC, a erG). Všechny vzorky lahvových vín byly proměřeny duplicitně. Složení studovaných vzorků piva a vín nebylo pro účely této studie stanovováno. Informace o typických úrovních poměru celkových proteinů a polyfenolů a jejich poměru v klasických světlých pivech^{2,4,9,30,43} a bílých a červených vínech byly převzaty z literatury^{5,7,12,42,46,47,50-52}.

Poznamenejme, že složení piv i vín se mění ve velmi širokých mezích nejen v závislosti na použitých surovinách, technologiích a stárnutích, ale i použitých analytických metodách^{6,30,53,54}.

Z obecného fyzikálně-chemického hlediska platí okřídlená věta, že každé pivo i víno je jiné.

Metody a přístroje

Stanovení nefelometrického zákalu

Nefelometrické zákalu byly stanovovány měřením svazku světla rozptýleného ve směru 90° a normalizovány intenzitou prošlého svazku 0° ^{15,16}. Schéma uspořádání měřících svazků a vzorků piv buď v kyvetách, a nebo lahvích v měřící komoře podle⁵⁵ aparatury DATTS 2000 je ukázáno a popsáno na obr. 1.

Kolimovaný světelný svazek (1) vstupuje skrz okénko (1') do měřící komory (2), která je naplněna opticky čistou imersní a tepelně stabilizační kapalinou (3). Komora je případně zakryta ochranným krytem se středícím kroužkem (4) pro vzorek v normované kyvetě (5), nebo běžné chemické zkumavce (6) či komerční lahvi (7). Měřící nádoby (5) až (7) mohou být otáčeny na otočné desce (8) a/nebo zdviženy vůči ose světelného paprsku (9) pomocí bloku (9'). Vstupní světlo (1), rozptýlené částicemi ve vzorku (10), je detekováno v úhlu 90° (11) (nefelometrický směr skrz okénko (11')) a srovnáváno se světlem prošlým vzorkem (12) (transmisní směr skrz okénko (12')); stejně tak je detekováno světlo rozptýlené do úhlu 12° (13) (dopředný směr skrz okénko (12')) – ve dvouúhlové verzi přístroje.

Aparatura byla kalibrována resp. kontrolována standardní formazinovou suspenzí podle³⁵.

Pro hodnocení nefelometrických zákalů byly použity střední hodnoty. Koeficient variance byl menší než $\pm 5\%$.

Stanovení distribuce kalových částic optickým počítáním

Bylo měřeno přístrojem CHEMTRAC PC 2400D. Přístroj pracuje na obecném principu (elektronického) rozdělování podle velikosti a počítání elektromagnetických impulsů vyvolaných částicemi při průchodu elektromagnetickým polem. Změny intenzity pole způsobené částicemi se obvykle přeměňují pomocí detektorů na proudový nebo napěťový signál. Pro zjednodušení detekce jednotlivých částic se jejich pohyb obvykle vymezuje do prostoru pole srovnatelné velikosti. Typickým příkladem je buzení elektrických impulsů při průchodu částic elektrickým polem vymezeným otvorem v přepážce. Na rozdíl od elektrického, při optickém rozdělování a počítání (obr. 2) přerušují jednotlivé částice ve vymezeném prostoru průtokového kanálku optický svazek obvykle buzený laserem (obr. 2.a). Změny intenzity svazku způsobené průchodem částic vyvolávají na výstupu fotodetektoru proudové impulsy, které se rozdělují podle velikosti amplitudy do tříd, ve kterých se počítají (obr. 2. b). Snahou při konstrukci optických počítačů částic je, aby velikost impulsů byla co nejvíce úměrná velikosti částic (obr. 2.c). CHEMTRAC PC 2400D pracuje na jednoduchém a nenákladném principu zastiňování svazku částicemi ve Fresnelově oblasti difrakce světla¹³ (obr. 3). Z tohoto důvodu umožňuje detekci částic až od 1 či spíše 2 μm při zachování podmínky jejich minimálního zákrytu, omezující maximální koncentraci počítaných částic přibližně na 20000/ml s chybou pod 10%. Částice počítá a rozděluje do osmi tříd v celkovém intervalu 2 až 400 μm (viz. Tab I a II). Naměřené počty částic v jednotlivých třídách jsou ukazovány postupně po 7,5 s v cyklech po 1 min na dvacetiznakovém dvouřádkovém ukazateli. Data se odečítají ručně nebo lépe automaticky pomocí připojeného PC (RS 232 nebo RS 485) pro další početní a nebo grafické zpracování pomocí SW dodávaného v příslušenství přístroje. Poznamenejme, že nákladnější přístroje, jako např. moderní cytometry⁴⁰, detekují jednotlivé částice přibližně již od velikosti 0,3 μm

v nefelometrickém směru 90° a nebo dopředném směru rozptylu světla ve Fraunhoferově oblasti²⁹.

Čerpání vzorků

Vzorky vín byly z lahví čerpány do měřicí komůrky počítače částic CHEMTRAC PC 2400D samospádem z výšky cca 1m, která zajistila v průměru požadovanou velikost průtoku na úrovni 100 ml/min nebo peristaltickým čerpadlem (Meredos GmbH, Bovenden, D) s uvedeným průtokem. Vzorky piva byly čerpány oxidem uhličitým o přetlaku cca 0,2 MPa se zaškrcením na výstupu z komůrky. Tím bylo, při požadovaném průtoku 100 ml/min, zamezeno vlivu pění piva v měřicí komůrce na výsledky počítání kalových částic. Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Teplota vzorků byla kontrolována digitálním teploměrem (ORBIT Merret, CH) osazeného odporovým čidlem Pt-100 (ZPA Turnov, CZ).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Kalibrační a modelové suspenze

Pro zvýšení účinnosti porovnávání byly kalibrační a modelové suspenze připraveny s celkovou koncentrací částic, odpovídající přibližně nefelometrickému zákalu $1 \pm 0,2$ NTU stanovenému přístrojem DATTS. Pro porovnání v Tab. I byly jejich distribuce normalizovány na úroveň nefelometrického zákalu 1 NTU.

Za nulovou úroveň zákalu byla vzata hodnota zákalu vody připravené reverzní osmózou (RO voda, Tab. I) stanovená s přesností $0,04 \pm 0,02$ NTU. Celkový počet částic v rozsahu 2 a 400 μm v 1 ml RO vody se opakovaně pohyboval v intervalu 30 až 100/ml podle momentálního

zákalu síťové vody (100 až 10000 / ml), prašnosti v laboratoři a stupni vymytí transportních PET lahví. Převážné množství částic bylo ve třídě 2-5 μm , přičemž počet částic větších než 15 μm byl průměrně menší než 1%, avšak podstatně závisel na čistotě nádob a prašnosti okolí (není ukázáno).

Úroveň 1 NTU zákalu kalibrační formazinové suspenze byla opakovaně připravována a kontrolována s přesností +/- 0,04 NTU. Částice SFS nejsou monodisperzní^{25,28}, přičemž se jejich distribuce podle literárních údajů pohybuje v širokém intervalu od 0,2 do 10 μm , zvláště v závislosti na teplotě přípravy a stárnutí^{38,49}. Maximum objemové distribuce částic SFS, připravené při standardní teplotě 25°C je okolo 2,5 μm , avšak převážná část populace podle počtu je menší než 2 μm , což je v souladu s daty uvedenými v Tab I, která udává početní distribuci částic SFS v intervalu 2 až 400 μm . V tomto rozmezí se největší počet částic SFS nachází přirozeně ve třídě 2-5 těsně pod maximem početní distribuce. Jinak je tomu v zestárlé SFS o normalizované hodnotě zákalu 1 NTU. Počet částic 2-5 μm se více než zdvojnásobil. To nasvědčuje tomu, že během stárnutí došlo ve SFS k významnému přerozdělení velikosti částic v důsledku jejich agregace a koagulace.

Ještě více je vliv velikosti částic na hodnoty nefelometrického zákalu podle stupnice SFS, tj. stanovované nefelometry, kalibrovanými pomocí SFS, patrný z početních distribucí nominálně monodisperzních polystyrenových částic, normalizovaných na jednotnou úroveň nefelometrického zákalu (1 NTU). Jak je vidět ze sloupců 4 až 6 v Tab. I, je množství částic o velikosti 0,5 μm vyvolávajících zákal 1 NTU početně nejméně zastoupeno ve třídách 2 až 400 μm . Logicky největší je počet monodisperzních částic o velikosti 3 μm ve třídě 2 až 5 μm a částic 9,2 μm ve třídě 5-10 μm . Na základě toho a za předpokladu stálosti monodisperzity polystyrenových suspenzí lze optické čítače rozdělení velikosti částic kalibrovat, resp. kontrolovat stabilitu jejich stupnic.

Vzhledem k tomu, že pivo i víno se připravují kvašením, byly proměřeny orientačně i distribuce modelových vodných suspenzí várečných a pekařských kvasnic o koncentraci odpovídající normalizované hodnotě nefelometrického zákalu 1 NTU (sloupce 7,8, TAB. I). Podle počtu buněk v jednotlivých třídách lze usuzovat, že obojí kvasnice mají průměr v intervalu 2 až 10 μm , přičemž várečné kvasnice jsou větší než pekařské, neboť část jejich populace se nacházelo i ve třídě 10 až 15 μm , což může rovněž svědčit o jejich větší schopnosti agregovat a flokulovat oproti pekařským kvasnicím^{2,3}.

Pivo, bílá a červená vína

Porovnání distribucí kalových částic a nefelometrických zákalů piva, bílého a červeného vína je ukázáno v Tab. II.

Nízké počty kalových částic větších než 2 μm v čerstvém pivu značí, že bylo dobře zfiltrováno bez většího průniku kvasnic, případně i jiných hrubších kalových částic do filtrátu. Během stárnutí se však podíl hrubších částic na zákalu piva zvětšuje, jak je patrné z porovnání distribucí čerstvého a 90 dní starého výčepního piva, uvedených ve sloupcích 1 a 2 Tab II. To svědčí o tom, že během stárnutí studovaného piva došlo k významnému procesu agregace a koagulace kalových částic výchozích makromolekulárních a koloidních rozměrů^{30,32,36} menších než cca 0,5 μm .

Mimořádně malým počtem kalových částic i hodnotou jejich nefelometrického zákalu byl charakteristický vzorek bC bílého vína Chardonnay i přesto, že se nejednalo o mladé, čerstvě zfiltrované víno. Tento vzorek byl pravděpodobně nejen excelentně zfiltrován asi tangenciální membránovou filtrací, ale i zbaven zákalových prekurzorů v podobě zákalotvorných proteinů a případně i polyfenolů hloubkovou stabilizací. Sníženou tendenci ke tvorbě hrubších zákalů lze přisoudit i vyššímu obsahu polysacharidů⁴¹ subjektivně odhadutých degustací vína. Ty

mohly do určité míry zastínit očekávanou chuťovou prázdnotu uvedeného vzorku, které by nasvědčovala nízká úroveň nefelometrického zákalu. Stejný ročník téhož vína, ale jiného výrobce, se naopak vyznačoval poměrně velkým počtem kalových částic ve třídě 2-5 μm , svědčícím o proběhlé agregaci a koagulaci zákalových koloidů v důsledku jejich menší stabilizace před stočením¹¹, jakož i, s největší pravděpodobností, o působení oxidace během stárnutí v důsledku nedostatečného uzavření¹⁹, případně i skladování za vyšších teplot²⁰. Stejnou hodnotou nefelometrického zákalu a přibližně stejně velkým obsahem hrubých částic 2–5 μm byl charakteristický i nejmladší studovaný vzorek Chardonnay 2008. Větší podíl částic ve třídách 10-80 μm nasvědčoval jeho špatné filtraci oproti vzorkům bB a bC (Tab. II). Na rozdíl od bílých vín byly naměřeny větší nefelometrické zákalové i distribuce kalových částic ve vzorcích červených vín nejen u odrůdy Cabernet Sauvignon ročníku 2007 (vzorky erA erC a erG, Tab. II), ale v průměru i u jiných proměřených odrůd, značek a ročníků (není ukázáno). To lze vysvětlit kvalitativně tím, že červená vína oproti bílým obsahují větší množství taninů, resp. zákalotvorných polyfenolů jako např. anthokyanogenů^{7,12,47,51}, které zvláště během stárnutí v důsledku oxidačních¹⁹ a jiných procesů²⁰ kondenzují a polymerují¹ a stávají se více afinními k polypeptidům a glykoproteinům^{1,45}, zůstávajícím po kvašení ve zfiltrovaných vínech z moštu^{5,46} i kvasničných kalů^{22,50}. Porovnání nefelometrických zákalů a distribucí částic vzorku zestárlého piva psB a červeného vína erG ukazuje, že jsou srovnatelné. Z toho je pravděpodobné, že v obou případech se zákal vytvořil z jistého, vazebně úměrného množství zákalotvorných proteinů^{14,16,45} a polyfenolů i přesto, že červená vína obsahují přibližně desetkrát více celkových polyfenolů^{1,47} a naopak desetkrát méně celkových bílkovin^{14,42} než světlá piva klasického složení a technologie^{26,27}.

ZÁVĚR

Velká část produkce piv a vín se číře filtruje a plní do průhledných lahví, ve kterých během skladování stárne a zakaluje se. Zakalené pivo i víno je většinou spotřebitelem hodnoceno jako méně kvalitní. Za účelem hlubšího kvantitativního poznání vlivů stárnutí na celkovou smyslovou kvalitu filtrovaných kvasných nápojů rostlinného původu byla porovnávána tvorba zákalů lahvového piva a vín během jejich stárnutí současně uzanční nefelometrickou metodou i stanovením distribuce kalových částic. Obě metody byly nejprve ověřeny pomocí čisté vody, uzančně používané standardní formazinové suspenze (SFS), monodisperzních suspenzí polystyrenových částic ve třech rozměrových třídách a modelových suspenzí várečných a pekařských kvasnic. V souladu s teorií rozptylu světla, byly normalizované hodnoty nefelometrického zákalu, stanoveného nefelometrem cejchovaným pomocí SFS, největší v suspenzi polystyrenových částic o průměru 0,5 μm , přičemž ve třídách 2 – 400 μm počítače částic CHEMTRAC PC 2400D již nebyly prakticky zaznamenány na rozdíl od částic o průměru 3 a 9 μm . Použitý počítač rozdělení částic velmi účinně zaznamenal proces agregace a koagulace částic v zestárlé SFS o nominální kalibrační hodnotě 1 NTU, jakož i dílčí flokulaci várečných kvasnic, které jednoduše rozlišil podle velikosti od pekařských. Zvláště užitečně indikoval znečištění nominálně čisté vody připravené reverzní osmózou a nanofiltrací laboratorním prachem v použitých zásobních lahvích. Na rozdíl od uzanční nefelometrické metody optické počítání částic s podstatně větší citlivostí indikovalo fluktuace zákalu síťové vody, které pronikaly i filtry reverzně-osmózní aparatury AQUAL v poměru cca 1/1000. V našich laboratorních podmínkách se aparaturou AQUAL nepodařilo připravit čistou vodu s počtem částic menším než 20 / ml.

Ve všech studovaných vzorcích piva i vín byl pozorován během stárnutí růst hodnot nefelometrického zákalu. Měření distribuce kalových částic podle velikosti metodou počítání ukázala, že byl způsoben agregací a koagulací makromolekulárních a koloidních částic zfiltrovaných vzorků piva a vína výchozích submikronových rozměrů.

Nejméně se růstem kalových částic během stárnutí zakalovala bílá vína. Srovnatelnými a podstatně většími zákalů se vyznačovaly vzorky zestárlého piva a červeného vína, které obsahovaly i větší množství zkoagulovaných kalových částic větších než 2 μm . Poměrně malý růst zákalů bílých vín během stárnutí byl s největší pravděpodobností způsoben podstatně menší koncentrací zákalotvorných proteinů a polyfenolů a z nich zvláště antokyanogenů ve srovnání s červeným vínem a pivem. Ve srovnání s uzanční nefelometrickou metodou umožnilo stanovení a porovnání distribucí kalových částic nezestárlých i zestárlých vzorků piv a vín podstatně účinněji rozlišit tvorbu zákalů, způsobenou nedokonalou filtrací a nebo stabilizací a nebo dobou a podmínkami stárnutí.

Stanovení rozdělení kalových částic optickým počítáním během stárnutí v nenákladném transmisním uspořádání lze s výhodou použít nejen k hodnocení účinnosti filtrace a stabilizace piva a vína, ale zvláště pro výběr vín k řízenému stárnutí a archivaci.

LITERATURA:

1.	Haslam E.: <i>Practical Polyphenolics</i> . Cambridge University Press: Cambridge U.K. 1998.	
2.	Hlaváček F., Lhotský A.: <i>Pivovarství (The Brewing)</i> , SNTL Publ. House, Praha 1966.	
3.	Hough J.S.: <i>The biotechnology of malting and brewing</i> . Second Edition, Cambridge Univ. Press. 1991.	
4.	Čejka P., Kellner V., Čulík J., Horák T., Jurková M.: <i>Kvasný Prům.</i> 50, 3 (2004).	
5.	Balík J., Kyseláková M., Tříška J., Vrchotová N., Veverka J., Híc P., Totušek J., Lefnerová D.: <i>Czech J. Food Sci.</i> 26, Special Issue: S3 (2008).	
6.	Aron P.M., Kenedy J.A.: <i>Nutr. Food Res.</i> 52, 79 (2008).	
7.	Dadáková E., Vrchotová N., Tříška J., Kyseláková M.: <i>Chem. Listy</i> 97, 558 (2003).	
8.	Gawel R., Francis L., Waters E.J.: <i>J. Agric. Food Chem.</i> 55, 2683 (2007).	
9.	Bamforth Ch.W.: <i>J. Am. Soc. Brew. Chem.</i> 57, 81 (1999).	
10.	Moll M., v knize: <i>Brewing Science</i> (Pollock, J.R.A., ed.), Academic Press, New York. 3, 1 (1987).	
11.	De Bruijn J., Loyolola C., Flores A., Hevia F., Melín P., Serra I.: <i>Int. J. Food Sci. and Technology</i> 44, 330 (2009).	
12.	Cosme F., Ricardo-da-Silva J. M., Laureano O.: <i>Am. J. Enol. Vitic.</i> 60, 74 (2009).	
13.	Berry G.C.: <i>Encyclopedia of Analytical Chemistry. Instrumentation and Applications</i> , (Meyers, R.A., ed.), Wiley et Sons Ltd., Sussex, 2000.	
14.	Siebert K.J.: <i>LWT-Food Sci. & tech.</i> 39, 987 (2006).	
15.	Sladký P.: <i>Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv.</i> 30, 860 (2005),	
16.	Sladký P., Císařová H., Dienstbier M., Gabriel P.: <i>Kvas. Prům.</i> 47, 322 (2001).	
17.	Kaneda H., Kobayashi N., Takashio M., Tamaki T., Shinotsuka K.: <i>Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.</i> 36, 41 (1999).	
18.	Šavel J.: <i>Kvasný Prům.</i> 49, 114 (2003).	
19.	Hart A., Kleinig A.: <i>Australian And New Zealand Wine Industry Journal</i> 20, 46 (2005).	
20.	Es-Safi N., Cheynier V., Moutounet M.: <i>J. Agric. Food Chem.</i> 50, 5571 (2002).	
21.	Sajdok J., Kozak A., Zídková P., Kotrba P., Pilin A., Káš J.: <i>Chem. Listy</i> 95, 98 (2001).	
22.	Dupin I.V.S., McKinnon B.M., Corey R., Boulay M., Markides A.J., Jones G.P., Williams P.J., Walker E.J.: <i>J. Agric. Food Chem.</i> 48, 3098 (2000).	
23.	Pococok K.F., Alexander G.M., Hayasaka Y., Jones P.R., Waters E.J.: <i>J. Agric. Food Chem.</i> 55, 1799 (2007).	
24.	Gales P.W.: <i>J. Am. Soc. Brew. Chem.</i> 58, 101 (2000).	
25.	Morris T.M.: <i>J. Inst. Brew.</i> 93,13 (1987).	
26.	Koukol R.: <i>Doktorská dizertační práce</i> , Univerzita Karlova, Praha 2009.	
27.	Gabriel P.: <i>Doktorská dizertační práce</i> , Univerzita Karlova, Praha 2009.	

28.	Buckee G.K., Morris T.M., Bailey T.P.: J. Inst. Brew. 92, 475 (1986).	
29.	Kratochvíl P.: <i>Classical light scattering from polymer solutions</i> , Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1987.	
30.	Chapon L.: J. Inst. Brew. 99, 49 (1993).	
31.	Wyatt P.J.: <i>Analytica Chimica Acta</i> 272, 1 (1993).	
32.	Claesson S., Sandegren E.: Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv. 14, 343 (1973).	
33.	<i>Analytica EBC</i> , European Brewery Convention, 5th update, Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag, Nürnberg 2005.	
34.	<i>Methods of Analyses ASBC</i> American Society of Brewing Chemists, 8th ed., St. Paul, MN 1992.	
35.	<i>Compendium of international methods of wine and must analysis O.I.V.</i> International Organization of Vine and Wine, Resolution oeno 4/2000 Edition 2009, Volume I, 84-90.	
36.	Pouchlý J.: <i>Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav</i> . VŠCHT, Praha 1998.	
37.	<i>International Standard ISO 7027</i> , (1990): Water quality. Determination of turbidity	
38.	Ebie K., Yamaguchi D., Hoshikava H., Shirozu T.: <i>Water Research</i> 40, 683 (2006).	
39.	Poncet-Legrand C., Cartalade D., Putaux J.-L. Cheynier V., Vernhet A.: <i>Langmuir</i> 19, 10563 (2003).	
40.	Novák J., Basařová G., Fiala J., Dostálek P.: <i>Chem. Listy</i> 102, 183 (2008).	
41.	De Freitas V., Carvalho E., Mateus N.: <i>Food Chemistry</i> 81, 503 (2003).	
42.	Moreno-Arribas M.V., Pueyo E., Polo M.C.: <i>Analytica Chimica Acta</i> 458, 63 (2002).	
43.	Sladký P., Císařová H., Kellner V.: <i>Kvasný Prům.</i> 50, 130 (2004).	
44.	De Lange D.W.: <i>Thrombosis Research</i> 119, 403 (2007).	
45.	Charlton A., Baxter N.J., Khan M.L., Moir A.J.G., Haslam E., Davis A.P., Williamson M.P.: <i>J. Agric. Food Chem.</i> 50, 1593 (2002).	
46.	Balík J.: <i>Hort. Sci.</i> 33, 103 (2006).	
47.	Harbertson J.F., Hodgins R.E., Thurston L.N., Schaffer L.J., Reid M.S., Landon J.L., Ross C.F., Adams D.O.: <i>Am. J. Enol. Vitic.</i> 59, 210 (2008).	
48.	<i>International Standard ISO 3696</i> , (1987): Water for analytical laboratory use. Specification and test methods	
49.	Rice E.W.: <i>Analytica Chimica Acta</i> 87, 251 (1976).	
50.	Furdíková K., Malík F.: <i>Chem. Listy</i> 103, 154 (2009).	
51.	Šmidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlíková I., Buckiová D., Křísa B.: <i>Chem. listy</i> 95, 602 (2001).	
52.	Waterhouse A. L., Felipe .V.: <i>Am. J. Enol. Vitic.</i> 57, 306 (2006).	
53.	Koukol R.: Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv. 30, 1010 (2005).	
54.	Koukol R, Koukol H.: 2004, EP 1 439 438 A1 (CENTEC GmbH).	
55.	Sladký P., Dienstbier M., Gabriel P., CZ patent 299354 B6, <i>G01N 21/1</i> , <i>G01N 21/49</i> (Universita Karlova, Praha)	

Tabulka I Voda, kalibrační a modelové suspenze

Vzorek Třída ($\mu\text{m/ml}$)	RO voda	Forma- zin čerstvý	Forma- zin 90 dní	Částice polystyr 0,5 μm	Částice polystyr 3 μm	Částice polystyr 9,2 μm	Kvas- nice var.	Kvas- nice pek.
2 - 5	23,1	665	2010	25,4	13638	230	13213	18476
5 - 10	2,75	25,9	34,5	3,9	416	4337	9484	6285
10 - 15	1,32	5,29	11,2	1,48	10,1	1756	2434	1906
15 - 25	0,61	2,93	6,39	1,39	3,97	439	678	1128
25 - 50	0,15	0,40	0,98	0,94	0,06	4,12	23,1	108
50 - 80	0	0,06	0,05	0,11	0,0	0,0	0,0	0,54
80 - 100	0	0,0	0,0	0,10	0,0	0,0	0,0	0,0
větší 100	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zákal Zn (NTU)	0,04+/- 0,02	1,0+/- 0,04	1,0 (norm.)	1 (norm.)	1 (norm.)	1 (norm.)	1 (norm.)	1 (norm.)

Tabulka II Porovnání tvorby zákalů piv a vín během stárnutí

Vzorek Třída ($\mu\text{m/ml}$)	psA Pivo světlé čerstvé	psB Pivo světlé staré	bC Chardo- nnay 2006	bB Chardo- nnay 2006	bE Chardo- nnay 2008	erA Cab. Sauvig. 2007	erC Cab. Sauvig. 2007	erG Cab.- Sauvig. 2007
2 - 5	237	1721	61,3	2253	865	6458	4035	1254
5 - 10	44,6	1368	2,05	99	90,5	323	2799	93,4
10 - 15	13,5	125	0,84	12,4	28,3	42,7	900	23,1
15 - 25	4,84	64	0,74	5,16	18,1	19,7	228	13,0
25 - 50	1,92	27	0,64	2,35	18,4	5,46	14,7	2,71
50 - 80	0,25	13	0,0	0,35	0,40	0,33	0,48	0,04
80 - 100	0,0	3	0,01	0,09	0,12	0,10	0,24	0,02
větší 100	0,0	0	0,0	0,14	0,72	0,11	0,0	0,0
Zákal Zn (NTU)	1 (norm.)	1 (norm.)	0,32	0,28	0,28	2,85	2,73	1,17

Legenda k obrázkům

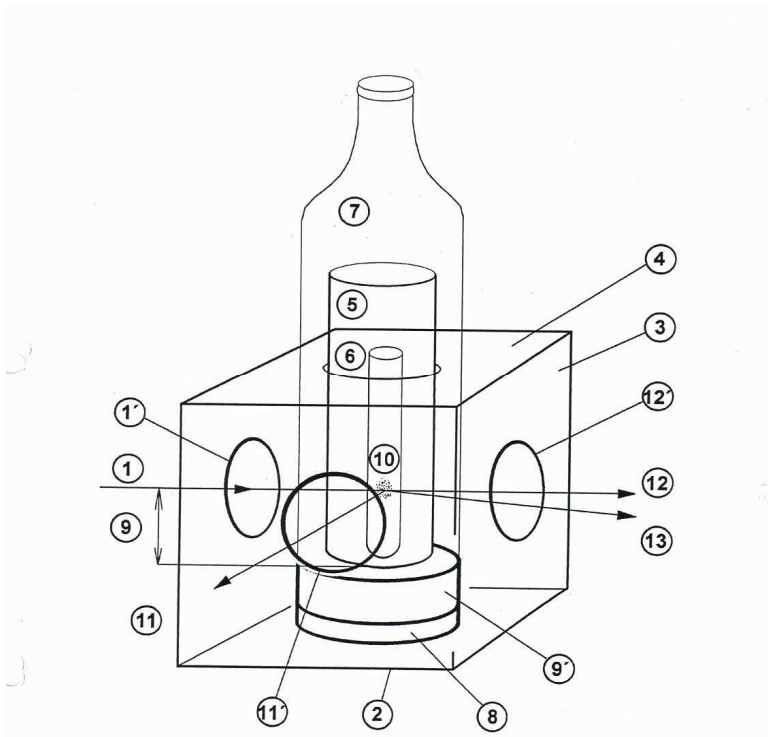
Obr. 1. Schéma uspořádání měřících svazků a vzorků pív a vín v kyvetách a nebo lahvích v měřící komoře⁵⁵ aparatury DATTS 2000.

1-kolimovaný světelný svazek budícího světla, 1'-vstupní okénko, 2-měřící komora která je naplněna 3-opticky čistou imersní a tepelně stabilizační kapalinou, 4-středící kroužek, 5,6,7-vzorek v normované kyvetě, nebo běžné chemické zkumavce či komerční lahvi, 8-deska pro otáčení vzorkovnic, 9-osa světelného paprsku, 9'-výškový polohovací blok 10-vzorek se světlo rozptylujícími částicemi, 11-rozptýlený svazek detekovaný v úhlu 90°, 11'-nefelometrické okénko 12-srovnávací svazek světla prošlého vzorkem, 12'-dopředné okénko, 13- svazek světla rozptýleného v dopředném směru, detekovaný pod úhlem 12° (ve dvouúhlové verzi uspořádání přístroje).

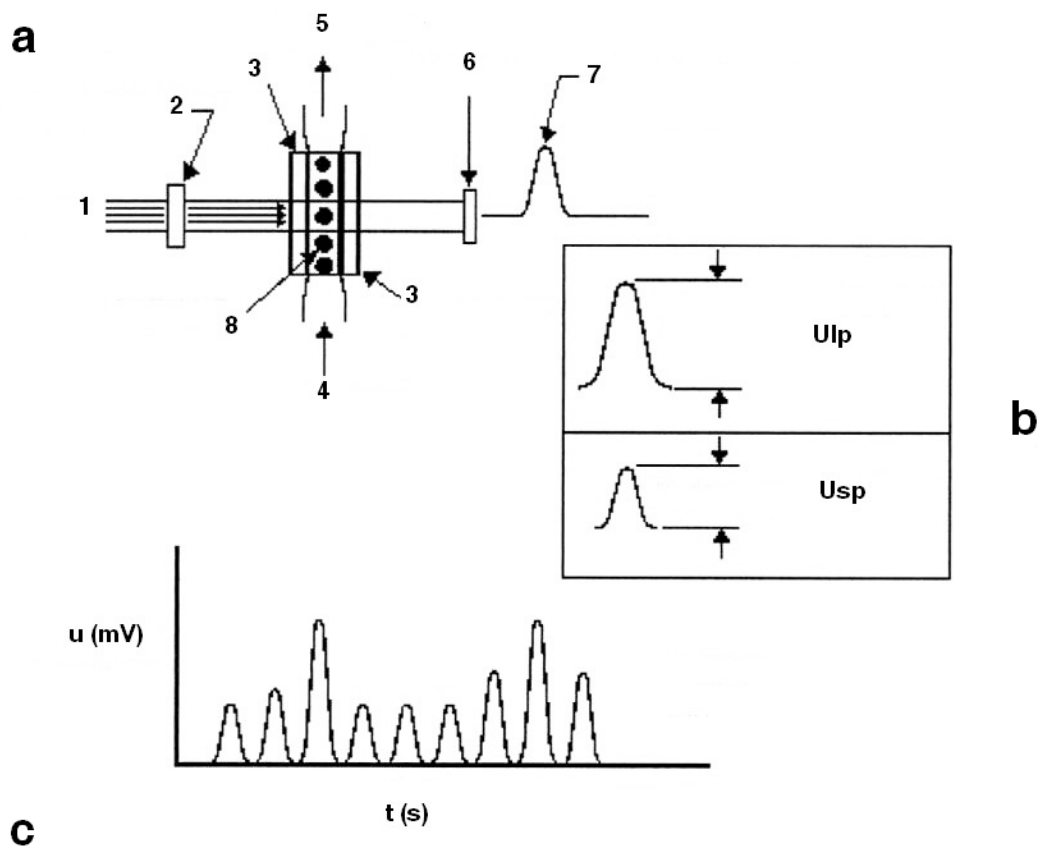
Obr. 2. Princip optického rozdělování a počítání částic v transmisním uspořádání.

(a) Schéma vymezení toku částic vůči svazku světla laseru: 1-budící svazek světla laseru, 2-kolimátor, 3-vstupní a výstupní okénka průtokové měřící komůrky, 4-přítok částic, 5-odtok částic, 6-fotodetektor, 7- výstupní napěťový signál, 8-kolimovaný tok částic. (b) Rozdělování částic podle amplitudy vzbuzeného signálu na základě úměrnosti: U_{lp}, U_{sp} - napěťový impuls vzbuzený větší nebo menší částicí. (c) Schématický časový průběh diskriminovaných a čítaných pulsů, vzbuzených protékajícími částicemi.

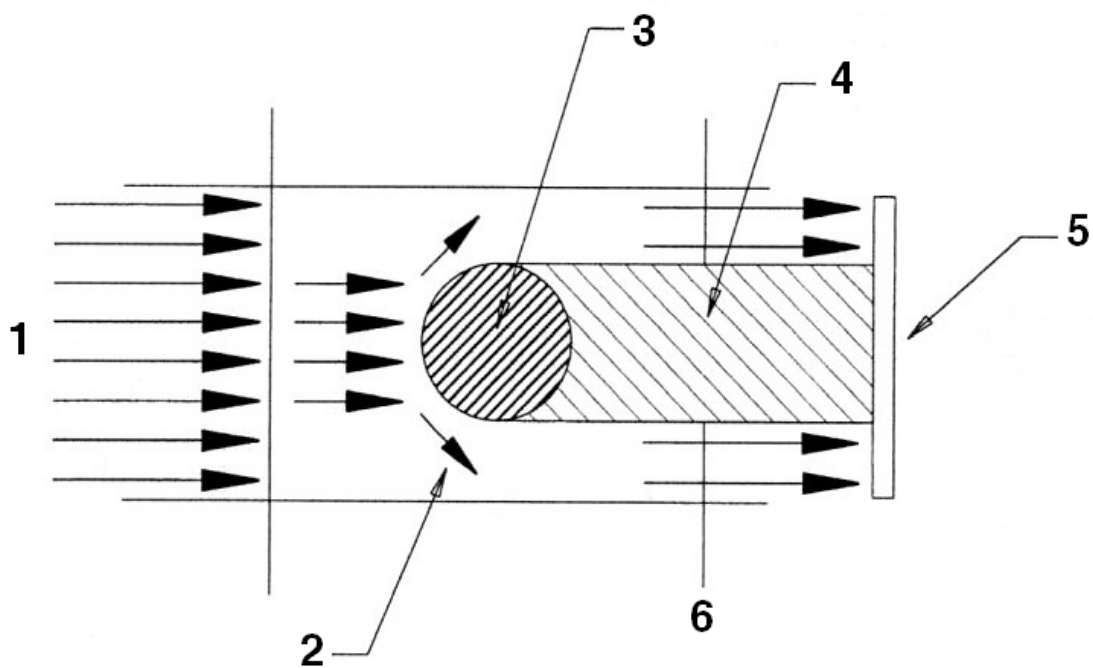
Obr. 3. Schéma buzení a detekce optických pulsů v transmisním uspořádání, vyvolaných zastíněním kolimovaného svazku světla částicí. 1-budící svazek, 2-část svazku odstíněná a rozptýlená částicí, 3-částice, 4-stín vyvolaný částicí, 5-fotodetektor, 6-výstupní okénko měřící komůrky.



Obr. 1.



Obr. 2.



Obr. 3.