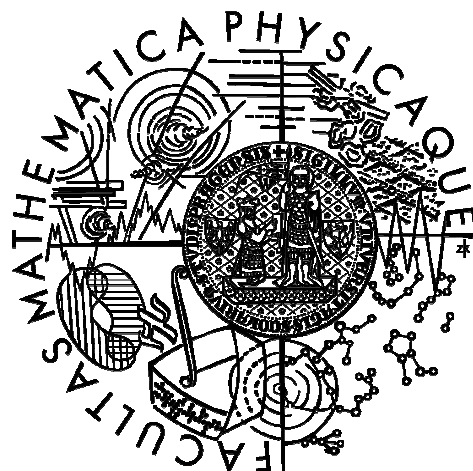


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Matematicko-fyzikální fakulta



Doktorská disertační práce

**OPTICKÉ METODY KONTROLY FERMENTAČNÍCH
PROCESŮ A HODNOCENÍ KVALITY JEJICH PRODUKTŮ**

Mgr. Petr Gabriel

Školitel: Doc.Ing. Petr Sladký, CSc.

Praha 2009

ABSTRAKT

Disertační práce se zabývá vývojem a aplikací bezkontaktních optických metod využívajících principů absorpce a elastického rozptylu světla pro řešení problémů v pivovarské praxi.

Ve spolupráci s Doc. Ing. P. Sladkým a RNDr. M. Dienstbierem byla navržena a realizována měřicí aparatura DATTS 2000 (Dual angle turbidimetric and titrimetric system). Optická měřicí komora aparatury je chráněna patentem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR č.299354 ze dne 21.5.2008. Původní modulární aparatura umožňuje provádění a vyhodnocování širokého spektra metod v různých režimech měření. Program MZN CONTROL speciálně vytvořený pro ovládání DATTS 2000 dovoluje současné připojení a řízení několika typů externích modulů zahrnujících například dávkovací pumpy, elektrochemické detektory atd. Pro vyhodnocení naměřených křivek byl v programu vytvořen modul prokládání dat metodou lineární regrese s minimem kvadratických odchylek doplněnou o iterační výpočet.

Na aparatuře byly optimalizovány a ověřeny nefelometrické titrační metody měření obsahu bílkovinných a polyfenolových prekurzorů koloidních zákalů nápojů, test na obsah tanoidů, test na obsah citlivých proteinů a test koloidní stability srážením síranem amonným. Titrační metody byly doplněny o metody měření přirozeného a teplotně urychleného stárnutí nápojů přímo v komerčních obalech. V práci bylo prokázáno, že DATTS 2000 umožňuje provádět kompletní testy koloidní stability piv, vín a dalších typů nápojů na jedné aparatuře.

Pro řešení problémů kontroly a standardizace fermentačních procesů byly na aparatuře implementovány metody měření sedimentace kvasnic a acidifikační test jejich vitality. Byla navržena a otestována nová optická metoda měření acidifikačního testu vitality kvasnic s použitím barevného pH indikátoru. Ve spolupráci s ÚMCH AV ČR a ÚCHP AV ČR byla vyvinuta a otestována polymerní matrice s imobilizovaným indikátorem pH jako základ senzoru pro optickou bezkontaktní detekci vitality kvasnic.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval Doc.Ing. Petru Sladkému, CSc. za vedení , rady a zkušenosti, které mi pomohly při přípravě disertační práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Miroslavu Dienstbierovi za spolupráci při řešení problémů. Velký dík patří Ing. Karlu Siglerovi za všestrannou pomoc a cenné rady. Děkuji rovněž vedoucímu Katedry chemické fyziky a optiky Prof. RNDr. Hálovi, DrSc za podporu během mého doktorandského studia.

V neposlední řadě chci poděkovat své manželce a dětem za zajištění potřebného zázemí a rodičům za neutuchající podporu během přípravy mé disertační práce.

OBSAH

Abstrakt	1
Obsah	3
1 Úvod	6
2 Cíl disertační práce	7
3 Teoretická část	8
3.1 Elastický rozptylu světla	8
3.1.1 Rayleighova teorie	8
3.1.2 Rayleigh-Debyeova teorie	9
3.1.3 Mieova teorie	10
3.1.4 Jednoduchý a vícenásobný rozptyl	11
3.2 Koloidní trvanlivost piva	12
3.2.1 Zákaly v pivu	12
3.2.2 Polyfenoly	13
3.2.3 Proteiny	14
3.2.4 Sacharidy	14
3.2.5 Mechanismus vzniku protein-polyfenolového zákalu v pivu	15
3.2.6 Stabilizace piva na obsah polyfenolů absorpcí na PVPP	15
3.2.7 Stabilizace piva na obsah proteinů adsorpcí na silikagel	16
3.2.8 Principy a metody předpovědi koloidní stability piva	17
3.2.8.1 Metody zrychleného stárnutí tepelným šokováním	18
3.2.8.2 Nefelometrické titrační testy předpovědi koloidní stability piva ...	19
3.3 Kvasinky	20
3.3.1 Pivovarské kvasinky	21
3.3.2 Metabolismus kvasnic	21
3.3.3 Vitalita kvasinek	22
3.3.4 Acidifikační test vitality kvasnic	22
3.3.5 Optická metoda měření acidifikačního testu vitality kvasnic	24
3.3.5.1 pH indikátory	24
3.3.5.2 Výpočet pH z absorpčních spekter	25
3.3.6 Sedimentace kvasnic	26
4 Přístroje a metody měření	29
4.1 Aparatura DATTS 2000	29
4.1.1 Zákalometr MZN-2002	29
4.1.2 MZN CONTROL software	32
4.2 Analytické metody	33
4.2.1 Nefelometrické titrační testy předpovědi koloidní stability piva	33
4.2.1.1 Příprava vzorků	33
4.2.1.2 Síranový test koloidní stability piva (SASPL)	33
4.2.1.3 Test na obsah tanoidů podle Chapona (PVP test)	34
4.2.1.4 Test na citlivé proteiny (SP test)	35
4.2.2 Metoda tepelného šokování piva	36
4.2.3 Metoda testu acidifikační síly (AP test) pro měření vitality kvasnic	37
4.2.3.1 Kmen kvasinek	37
4.2.3.2 Modifikace aparatury pro měření AP testu (YATA)	37
4.2.3.3 Příprava vzorku a postup měření	37
4.2.3.4 Výpočet AP hodnoty	38
4.2.4 Metoda měření sedimentace kvasnic	38

5 Experimentální část	39
5.1 Možnosti využití dvoúhlového měření rozptylu světla pro rozlišení velikosti a typů zákalotvorných částic	39
5.2 Koncentrační závislost roztoku formazinu – kalibrační křivka	39
5.3 Optimalizace nefelometrických titračních testů koloidní stability piva.....	42
5.3.1 Optimalizace testu na obsah tanoidů podle Chapona	43
5.3.1.1 Vliv rychlosti dávkování PVP	47
5.3.1.2 Vliv teploty	47
5.3.1.3 Vliv míchání vzorku.....	48
5.3.1.4 Vliv Ph	49
5.3.1.5 Vliv iontové síly	49
5.3.1.6 Vliv koncentrace zákalotvorných polyfenolů	51
5.3.1.7 Přesnost a reprodukovatelnost testu	52
5.3.2 Optimalizace testu na citlivé proteiny	53
5.3.2.1 Vliv způsobu dávkování titrantu	54
5.3.2.2 Vliv rychlosti dávkování titrantu	56
5.3.2.3 Vliv teploty	57
5.3.2.4 Vliv velikosti dávky taninu	58
5.3.2.5 Vliv iontové síly	58
5.3.2.6 Vliv ředění	60
5.3.2.7 Vliv pH	60
5.3.2.8 Přesnost a reprodukovatelnost testu	61
5.3.3 Optimalizace síranového testu koloidní stability piv	63
5.3.3.1 Vliv rychlosti dávkování SASS	63
5.3.3.2 Vliv teploty	64
5.3.3.3 Vliv pH	64
5.3.3.4 Přesnost a reprodukovatelnost testu	65
5.3.4 Ověření vztahu titračních testů a koloidní stability piva	65
5.4 Metoda sedimentace částic	70
5.4.1 Vyhodnocení sedimentačních křivek	70
5.4.2 Sedimentace kvasnic	72
5.5 Metoda acidifikačního testu (AP testu) pro měření vitality várečných kvasnic ...	73
5.5.1 Optimalizace metody měření acidifikačního testu vitality kvasnic	73
5.5.1.1 Průběh AP testu	74
5.5.1.2 Kalibrace hodnot absorbance na koncentraci buněk	75
5.5.1.3 Teplotní závislost AP testu	76
5.5.1.4 Dosažení maximální hodnoty AP	77
5.5.1.5 Vliv doby skladování vzorků	77
5.5.1.6 Vliv promývání vzorků	78
5.5.1.7 Vliv podmínek skladování vzorků mezi přípravou a vlastním měřením	79
5.5.1.8 Vliv doby hladovění za aerobních podmínek	80
5.5.1.9 Závislost AP hodnoty na koncentraci kvasnic a glukosy	80
5.5.1.10 Vliv flokulace a sedimentace kvasinek na výsledek AP testu	82
5.5.1.11 Závislost výsledku AP testu na době acidifikace	83
5.5.1.12 Optimalizovaný postup AP testu	83
5.5.1.13 Přesnost a reprodukovatelnost AP testu	84
5.5.2 Ověření AP testu	84
5.5.2.1 Srovnání výsledků AP testu s fermentační schopností kvasinek ...	84
5.5.2.2 Závislost fermentační mohutnosti kvasinek a AP na počtu nasazení v CKT	85

5.5.2.3 Distribuce vitality kvasinek získaných při odstřelu CKT	86
5.5.2.4 Vliv chlazení na vitalitu provozních kvasinek	87
5.5.3 Shrnutí	88
5.6 Titrační AP test (TAP) vitality kvasnic	89
5.7 Optická detekce AP testu	92
5.7.1 pH indikátor bromkresolová zeleň (BCG)	92
5.7.2 Současné měření APT spektroskopicky a s referenční pH elektrodou	93
5.7.3 Závislost spektra BCG na pH	93
5.7.4 Kalibrace rovnice pro výpočet pH z absorpčních spekter	95
5.7.5 Optimalizace koncentrace BCG	95
5.7.6 Absorpční spektrum kvasnic	96
5.7.7 Optimalizace koncentrace kvasnic	97
5.7.8 Vliv BCG na průběh AP test	98
5.7.9 Interakce BCG s kvasnicemi	99
5.7.10 Srovnání výsledků optického a elektrochemického měření AP testu	100
5.7.11 Shrnutí	101
5.8 Senzor pro optickou bezkontaktní detekci vitality kvasnic	102
6 Závěr	105
7 Přínos	106
8 Seznam použitých zkratk a symbolů	107
9 Literatura	108
10 Publikace autora	115

1 ÚVOD

Pivo a další fermentované nápoje jsou složité koloidní systémy, které obsahují často i více než tisíc látek různého chemického složení. Složitost systému je dána použitými surovinami a vlastním procesem výroby, zvláště pak fermentací. Koloidní systém výrobku je nestabilní a během výroby je ovlivněn mnoha faktory. I nepatrné změny mohou způsobit rozdíly mezi jednotlivými šaržemi produktu. Jedním ze základních požadavků, kladených na dnešní pivovarské provozy, je zachování maximální standardizace produkce. Tento požadavek si vynutil vývoj jednoduchých a cenově dostupných metod kontroly na všech stupních výrobního procesu.

Jedním ze základních parametrů, který se sleduje během celého procesu produkce piva, je zákal, který vzniká v důsledku rozptylu světla na částicích ve vzorku. Využívá se k posouzení správného průběhu jednotlivých fází výroby - při scezování sladiny, lomu mladiny, separaci kalů ve vířivce, v průběhu kvašení, čiření, filtraci, atd. Dříve používané vizuální pozorování bylo nahrazeno objektivním měřením zákalu pomocí zákalometrů. Ve spolupráci s Doc. Ing. P. Sladkým a RNDr. M. Dienstbierem byla navržena a realizována měřicí aparatura DATTS 2000 (Dual angle turbidimetric and titrimetric system). Optická měřicí komora aparatury je chráněna patentem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR č.299354 ze dne 21.5.2008. Součástí původní modulární aparatury je zákaloměr MZN 2002, využívající principu měření elastického rozptylu světla pod dvěma úhly k měření charakteristiky rozptylujících částic ve vzorku v širokém rozsahu koncentrací. Zákaloměr umožňuje měření velikosti zákalu kapalných vzorků jak ve speciálních kyvetách, tak přímo v uzavřených komerčních lahvích. Současné měření rozptylu světla pod dvěma úhly dovoluje sledovat změny distribuce rozptylujících částic. Dvouúhlové měření zákalu, velký měřicí rozsah zákaloměru, vysoká citlivost a možnost výběru vzorkovnice jsou základní charakteristiky přístroje, které umožnily zcela pokrýt potřeby měření zákalu meziproductů v celém rozsahu výroby v pivovarnictví, vodárenství a dalších odvětvích průmyslu nápojů.

Jedním z hlavních problémů pivovarského průmyslu je zajištění dostatečné koloidní trvanlivosti piv. Globalizace trhu a doprava na velké vzdálenosti nutí výrobce prodlužovat trvanlivost výrobků na dobu delší než jeden rok. To si vyžádalo změny výrobního procesu a zavedení nových metod kontroly koloidní stability. Zákaloměr MZN 2002 je dlouhodobě využíván ke kontrole přirozené trvanlivosti vzorků piv přímo v komerčních obalech, uložených v depozitářích pivovarů. Stále větší význam získávají i metody rychlé předpovědi koloidní stability piv.

Na tvorbě nebiologického zákalu piv během stárnutí se v rozhodující míře podílejí interakce určité části proteinů a polyfenolů. Jednou z možností rychlé předpovědi koloidní trvanlivosti piv jsou nefelometrické titrační testy, založené na určení obsahu zákalotvorných prekurzorů. Tyto testy, zavedené na základě prací prof. Chapona a dalších výzkumníků, jsou založeny na sledování vzniku protein-polyfenolových komplexů po přidavku reagentu, který reaguje se zákalotvornými prekurzory. Ke sledování vzniku komplexů se využívá metoda detekce změn intenzity elastického rozptylu světla pod úhlem 90° – nefelometrie.

Tato práce se zabývá aplikací nefelometrických titračních testů na aparaturu DATTS 2000. Měření rozptylu pod dvěma úhly umožňuje získání nových poznatků o charakteru precipitačních reakcí probíhajících během testů. Optimalizací podmínek provedení testů je dosaženo maximální reprodukovatelnosti měření. Navržená modifikace testu na obsah tanoidů umožní jeho využití i pro hluboce stabilizovaná piva s nízkým obsahem zákalotvorných polyfenolů. Modulárnost aparatury DATTS 2000 je využita při řešení problémů kontroly a standardizace fermentačních procesů. Za tím účelem byly na aparatuře aplikovány metody měření rychlosti sedimentace kvasnic a acidifikační test vitality kvasnic (AP test).

2 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce je výzkum koloidní stability a trvanlivosti piv a výzkum fermentačních vlastností pivovarských kvasinek optickými metodami. Práce je zaměřena na vývoj metodiky a techniky pro uplatnění levných bezkontaktních optických měření, založených na principu absorpce a elastického rozptylu elektromagnetického záření v pivovarské praxi.

Práce se soustředila na řešení dvou základních problémů:

- na vývoj techniky a metodiky pro sledování koloidní trvanlivosti piv, a
- na vývoj techniky a metodiky pro sledování vitality pivovarských kvasinek,

přičemž hlavní pozornost byla věnována:

- zpracování přehledu teorie a současných poznatků o dané problematice,
- spolupráci na vývoji a realizaci aparatur pro aplikaci vybraných metod,
- implementaci software pro provádění vybraných metod a
- ověření a optimalizaci metod, návrhu úprav pro zajištění maximální přesnosti a reprodukovatelnosti výsledků.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ELASTICKÝ ROZPTYL SVĚTLA

Při šíření elektromagnetického záření hmotným prostředím vyvolává oscilující elektrické pole v molekulách nucené kmity nábojové hustoty. Kmity nábojové hustoty v molekule jsou zdrojem sekundárního elektromagnetického záření o stejné frekvenci. Sekundární záření od jednotlivých molekul navzájem interferuje. V dokonale homogenním prostředí má záření emitované blízkými molekulami definovaný fázový rozdíl, a proto je tato interference sekundárního záření destruktivní ve všech směrech kromě směru šíření budícího záření. Složením rozptýlené a budící vlny vzniká rovinná vlna, jejíž fázová rychlost je

$$v = \frac{c}{n}, \quad (3.1)$$

kde c je rychlost světla ve vakuu a n - index lomu daného prostředí.

V prostředí obsahujícím nehomogenity dochází k narušení destruktivní interference sekundárních vln, které se šíří vzorkem jako rozptýlené záření ve směrech. Tento rozptyl světla nazýváme elastický, neboť při něm nedochází ke změně vnitřní energie rozptylujících molekul vzorku.

Nehomogenity, na kterých dochází k rozptylu světla, se nazývají rozptylová centra. Nehomogenitami mohou být například makromolekuly rozpuštěné v nízkomolekulárním rozpouštědle, buňky ve vodě nebo oblasti v kapalině o odlišné hustotě molekul vzniklé tepelným pohybem. Intenzita a úhlové rozdělení rozptýleného záření jsou závislé na velikosti, tvaru a indexu lomu rozptylujících se částic. Z naměřených charakteristik rozptýleného záření lze usuzovat na vlastnosti rozptylujících částic.

K popisu elastického rozptylu světla na nehomogenitách se využívá několika typů modelů, které se liší podle své složitosti a podle použitelnosti. Jako míra použitelnosti modelů se zavádí bezrozměrná veličina x , která závisí na poměru velikosti rozptylujícího centra a vlnové délky dopadajícího záření:

$$x = \frac{2\pi r}{\lambda} \quad (3.2)$$

kde r je poloměr rozptylového centra a λ - vlnová délka dopadajícího záření v médiu obklopujícím rozptylové centrum.

Podle velikosti veličiny x rozlišujeme tři základní modely:

- Rayleighova teorie
- Rayleigh-Debyeova teorie
- Mieova teorie

3.1.1 Rayleighova teorie

V této teorii se rozptylová centra nahrazují kmitajícími elementárními dipóly. Předpokladem pro možnost použití tohoto modelu je, že velikost rozptylových center je výrazně menší než vlnová délka záření. V literatuře (Kerker [57]) se uvádí mezní hodnota pro velikost rozptylujícího centra d

$$d \leq \frac{\lambda}{20} \quad (3.3)$$

Tomu odpovídá přibližně hodnota

$$x \leq 0.3 \quad (3.4)$$

Velikost vlnového vektoru k dopadajícího záření je dána rovnicí

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (3.5)$$

Intenzitu rozptýleného záření I_r ve vzdálenosti r od rozptylujícího centra je možné vypočítat podle rovnice

$$I_r = I_0 \frac{9k^4 V^2}{32\pi^2 r^2} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta). \quad (3.6)$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího záření, V - objem rozptylujícího centra, θ - úhel, pod kterým se světlo rozptyluje a m - komplexní index lomu rozptylujícího centra.

Z rovnice 3.6 je zřejmé, že intenzita rozptýleného záření klesá s čtvrtou mocninou vlnové délky. Tento průběh je zodpovědný za modrou barvu oblohy, neboť modrá krátkovlnná část spektra slunečního záření je více rozptylována molekulami vzduchu.

Účinný průřez Rayleighova rozptylu C_{sca} , tedy celkovou energii odebranou rozptylem z dopadajícího svazku, dělenou intenzitou dopadajícího záření I_0 , získáme integrací poměru rozptýlené a dopadající intenzity I_r / I_0 přes povrch koule:

$$C_{sca} = \frac{3k^4 V^2}{2\pi} \left| \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right|^2. \quad (3.7)$$

Z rovnic 3.6 a 3.7 vyplývá, že pro malá rozptylová centra roste intenzita rozptýleného záření a zároveň celkový účinný průřez rozptylu s druhou mocninou objemu částic.

3.1.2 Rayleigh-Debyeova teorie

V Rayleigh-Debyeově teorii se vychází z předpokladu, že rozptylové centrum je možné rozdělit na elementy o dostatečně malém objemu tak, aby rozptyl na nich mohl být popsán Rayleighovou teorií. Přitom fáze dílčí vlny emitované libovolným objemovým elementem rozptylového centra je závislá pouze na poloze daného elementu vůči bodu pozorování, nikoliv na vzdálenosti, po kterou se vlna šíří v objemu rozptylového centra. Všechny objemové elementy tedy považujeme za excitované původní dopadající vlnou.

Ke splnění uvedených předpokladů je nutné, aby platila podmínka (Kerker [57]):

$$2kr(m-1) \ll 1, \quad (3.8)$$

která zaručuje, že fázový posun světla je na dráze velikosti rozptylujícího centra malý. Tato podmínka je splněna, pokud velikost rozptylových center je srovnatelná s vlnovou délkou záření a index lomu m rozptylového centra je blízký indexu lomu média.

Úhlová závislost intenzity rozptýleného záření je ovlivněna vzájemnou interferencí vln emitovaných jednotlivými objemovými elementy rozptylového centra a je možné ji vyjádřit jako intenzitu vypočtenou podle Rayleighovy teorie vynásobenou funkcí $R(\theta)$, často nazývanou form factor, závislou na úhlu rozptylu θ :

$$I_r = I_0 \frac{k^4 V^2}{2r^2} \left(\frac{m^2 - 1}{2\pi} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) R(\theta) \quad (3.9)$$

Form faktor je možné vypočítat integrací fázových posunů rozptýleného záření přes objem rozptylového centra podle vzorce

$$R(\theta) = \frac{1}{V^2} \left| \int \exp(i\delta) dV \right|^2 \quad (3.10)$$

kde δ je fáze každé elementární vlny. Form faktory pro různé základní tvary rozptylových center jsou uváděny v literatuře (Kerker [57]). Například pro kouli o poloměru d nabývá form faktor tvaru:

$$R(\theta) = \left[\frac{3(\sin u - u \cos u)}{u^3} \right]^2, \quad (3.11)$$

kde $u = 2kd \sin \frac{\theta}{2}$. Intenzita rozptýleného záření pro kulové částice (rovnice 3.9, 3.10) má oscilující charakter, přičemž poloha extrémů je určena jednoznačně velikostí částice, vlnovou délkou světla a indexem lomu.

3.1.3 Mieova teorie

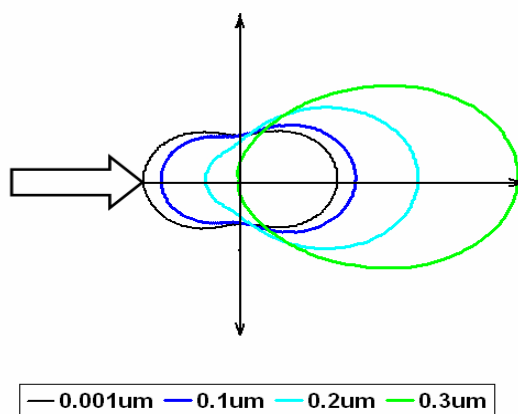
Je obecná teorie rozptylu elektromagnetického záření na sféricky symetrických rozptylových centrech, která vychází z kompletního řešení Maxwellových rovnic. Výsledky této teorie se pro malá rozptylová centra přibližují k výsledkům teorie Rayleighovy. Pro velká rozptylová centra se výsledky Mieova řešení blíží k výsledkům daným lomem, odrazem a difrací záření.

Na rozdíl od Rayleighovy a Rayleigh-Debyeovy teorie je Mieova teorie platná pro rozptylová centra o libovolné velikosti a libovolném poměru k vlnové délce světla. Nevýhodou této teorie je její složitost, neboť k dosažení výsledků je nutné používat speciální funkce a sečítat nekonečné řady. K získání výsledků je ovšem možné použít numerický výpočet. Některé programy pro výpočet rozptylu světla pomocí Mieova rozptylu jsou volně dostupné na internetu (Mie Calculator Prah [86]).

Závislost intenzity rozptýleného záření a účinný průřez rozptylu C_{sca} na vlnové délce je podstatně složitější než v Rayleighově teorii. Obecný tvar závislosti lze vyjádřit rovnicí

$$I_r, C_{sca} \approx \lambda^{-n} \quad (3.12)$$

kde empirický parametr n nabývá hodnoty menší než 4.



Obr.3.1 - Úhlové rozdělení intenzity záření s náhodnou polarizací, elasticky rozptýlené na kulové částici s indexem lomu 1,5 o různé velikosti (prostředí s indexem lomu 1,33, záření o vlnové délce 632,8 nm). Vypočteno programem Mie Calculator (Prah [86]).

S rostoucí velikostí rozptylových center roste i podíl záření rozptýleného do úzkého rozmezí úhlů kolem dopředného směru $\theta = 0$. Vliv velikosti rozptylových center na úhlovou závislost intenzity elastického rozptylu je znázorněn na obr.3.1, kde šipka ukazuje směr dopadajícího paprsku.

3.1.4 Jednoduchý a vícenásobný rozptyl

V předchozích kapitolách byly popsány modely zabývající se rozptylem světla na jednotlivých rozptylujících částicích. Vliv částic na rozptyl závisí nejen na jejich vlastnostech, ale i na jejich vzájemné vzdálenosti a poloze. Pokud jsou částice blízko u sebe, mohou se jejich elektrická pole vzájemně ovlivňovat a dopadající záření s částicemi interaguje jako s celkem. Takovému případu říkáme interaktivní rozptyl; podle Kerker [57] nastává v případě, kdy částice jsou od sebe vzdáleny méně než 3 násobek své velikosti.

Dalším aspektem ovlivňujícím rozptyl na více částicích je jejich vzájemná poloha. Pokud jsou rozptylující částice umístěny v periodicky se opakujících vzdálenostech (např. atomy v krystalu), fáze jednotlivých rozptýlených vln jsou definovány a jedná se o koherentní rozptyl (např. difrakce na Braggově mřížce.)

Rozptýlené záření emitované náhodně orientovanými, dostatečně daleko umístěnými a vzájemně se neovlivňujícími rozptylovými centry je navzájem nekoherentní. Výslednou intenzitu rozptýleného záření získáme jako součet intenzit záření emitovaného jednotlivými rozptylovými centry I_p . Výslednou intenzitu rozptýleného záření I_s vypočteme podle rovnice

$$I_s(\theta) = I_p(\theta)NV \quad (3.13)$$

kde N je objemová koncentrace rozptylových center a V - interakční objem, ze kterého se rozptýlené záření měří.

Lineární závislost mezi intenzitou rozptýleného záření a objemovou koncentrací rozptylových center naměříme pouze v případě, kdy koncentrace rozptylových center je tak nízká, že pravděpodobnost dopadu rozptýleného záření na další částici a jeho opětovné rozptýlení je zanedbatelná. V tomto případě mluvíme o jednoduchém rozptylu.

Při zvětšení koncentrace částic se pravděpodobnost opětovného rozptýlení záření zvyšuje; potom mluvíme o mnohonásobném rozptylu. V prvním přiblížení mnohonásobného rozptylu se vychází z představy jednoduchého rozptylu na částici a započítává se útlum záření na dráze od vysílače k rozptylující částici a po rozptýlení k detektoru. V případě mnohonásobného rozptylu již rovnice 3.13 neplatí.

Podmínku pro určení hranice mezi jednoduchým a mnohonásobným rozptylem je možné definovat pomocí rovnice

$$l = \frac{1}{NC_{sca}} \quad (3.14)$$

Pokud je dráha světla ve vzorku výrazně menší, než střední volná dráha světla ve vzorku l definovaná rovnicí 3.14, jedná se o jednoduchý rozptyl.

Mnohonásobný rozptyl se projevuje nelineární závislostí intenzity rozptýleného záření na koncentraci rozptylových center a změnou úhlového rozložení intenzity rozptýleného záření. Pro malé rozptylové úhly θ může docházet k poklesu intenzity rozptýleného záření s rostoucí koncentrací rozptylových center. Na obr 5.1 v kapitole 5.2 je vynesena závislost intenzity záření rozptýleného pod úhlem 12° na koncentraci formazinové suspenze. Hodnoty byly měřeny na aparatuře MZN 2002 se světlem o vlnové délce 630 nm, v kyvetě s optickou dráhou paprsku 6 cm.

Intenzita záření prošlá vzorkem I_t , měřená pod úhlem $\theta = 0$ a podělená intenzitou dopadajícího záření I_0 , se označuje transmise T

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (3.15)$$

Při průchodu záření vzorkem dochází ke snížení intenzity původního záření o energii, která je ve vzorku absorbována a rozptýlena do všech směrů. Útlum paprsku se řídí Lambert-Beerovým zákonem

$$I_t = I_0 10^{-c\varepsilon(\lambda)l} \quad (3.16)$$

kde $\varepsilon(\lambda)$ je extinkční koeficient, l - dráha paprsku ve vzorku a c - molární koncentrace absorbujících nebo rozptylujících center.

Z definice veličiny absorbance A

$$A = \log \frac{I_t}{I_0} \quad (3.17)$$

vyplývá, že v případě platnosti Lambert-Beerova zákona je absorbance přímo úměrná koncentraci center ve vzorku c , dráze paprsku ve vzorku l a extinkčnímu koeficientu $\varepsilon(\lambda)$:

$$A = c\varepsilon(\lambda)l \quad (3.18)$$

Lambert-Beerův zákon platí jen pro zředěné roztoky, kde se jednotlivá centra navzájem neovlivňují. Ze změřené absorbance vzorku je možné určit koncentraci center ve vzorku.

Na reálných vzorcích dochází jak k útlumu, tak k rozptylu záření. Pokud je koncentrace rozptylujících center malá a nedochází k vícenásobnému rozptylu, je možné celkovou absorbanci vzorku vyjádřit jako součet absorbance dané rozptylem A_s a absorbance dané absorpcí A_a :

$$A = A_s + A_a \quad (3.19)$$

Pokud je koncentrace rozptylujících částic větší, dochází k vícenásobnému rozptylu. K detektoru dorazí i část světla po vícenásobném rozptylu, která prošla dráhu delší než je přímá dráha mezi světelným zdrojem a detektorem, přičemž se prodlužuje i střední dráha paprsku ve vzorku. V takovém případě již obyčejný součet absorbancí neplatí.

3.2 KOLOIDNÍ TRVANLIVOST PIVA

3.2.1 Zákaly v pivu

Pivo je složitý koloidní roztok obsahující více než 800 různých chemických substancí, které jsou v koloidní rovnováze. Během skladování dochází vlivem různých fyzikálně chemických faktorů (teplota, světlo, kyslík – Bamforth [13]) k oxidačně redukčním reakcím, které mění chemické složení produktu a způsobují jeho stárnutí. Stárnutí má vliv na sensorickou i koloidní stabilitu. Koloidní systém přestává být v rovnováze, některé součásti systému agregují a objevuje se koloidní zákal.

Mechanismus vzniku zákalu v pivu se zkoumá již více než půl století, avšak všechny jeho aspekty nejsou stále ještě odhaleny. Existuje mnoho typů nežádoucího zákalu, které mohou vznikat ve finálním produktu. Jednou z nejčastějších příčin je množení kvasinek nebo jiných mikroorganismů. Pokud se soustředíme pouze na nebiologický zákal, byly v poslední době identifikovány zákalu způsobené např. zbytkovým nerozštěpeným škrobem ze sladu, zákalu

způsobené pentosany, β -glukany ze sladu, zákaly způsobené proteiny z lyofilizovaných kvasinek, nebo oxalátové zákaly u mladiny s nedostatkem vápníku (Bamforth [14]).

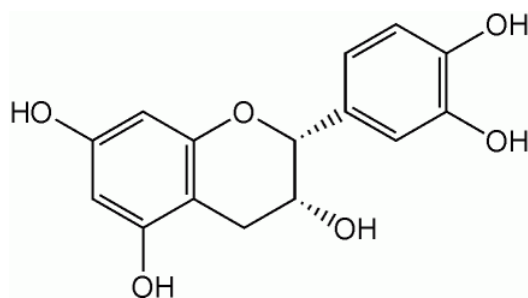
Nejčastější příčinou vzniku nebiologického zákalu v pivu je agregace polyfenolů a proteinů. Polyfenoly se váží na proteiny slabými silami, mezi kterými se uplatňují především vodíkové můstky a hydrofobní vazba. Do piva přecházejí pouze nízkomolekulární polyfenoly, které jsou příliš malé na srážení proteinů. Během postupného stárnutí produktu jsou polyfenoly oxidovány a polymerují do větších celků, které již jsou schopné proteiny agregovat. Zákal se nejdříve objevuje u nižších teplot - vzniká tzv. chladový zákal (měřený na 0°C), který se při pokojové teplotě rozpouští. S postupnou polymerací polyfenolů se zákal objevuje i při pokojové teplotě, vzniká tzv. permanentní zákal (měřený při 20°C). Koloidní částice agregují, zvětšují se, precipitují a vypadávají z roztoku. Polyfenoly v pivu působí jako antioxidanty, vznik chladového a permanentního zákalu je mírou postupující oxidace vzorku.

3.2.2 Polyfenoly

Pivo obsahuje široké spektrum polyfenolových látek, které jsou extrahovány ze sladu a chmele. Jednoduché polyfenoly, které jsou odvozeny od kyseliny hydroxybenzoové (např. kyselina galová) a kyseliny hydroxyskořicové (např. kyselina skořicová, ferulová, kávová), pocházejí většinou ze sladu a vyskytují se často ve formě glykosidů, tzn. navázané na sacharid (Buggey [19], Čepička [22], Kosař [59]).

Flavanoidy jsou nejčastěji zastoupenou skupinou polyfenolových složek piva. Pocházejí převážně z chmele. Je to velice diverzifikovaná skupina látek, jejichž struktura se odvozuje od heterocyklického flavanu. Do piva přecházejí převážně flavan-3-oly, reprezentované např. epicatechinem (obr.3.2) a anthokyanogeny, a to ve formě monomerů, dimerů a trimerů.

Celkový obsah polyfenolů v pivu je dán použitými surovinami a celkovou technologií výroby. Na polyfenoly se v poslední době soustřeďuje velká pozornost poté, co byly potvrzeny jejich antioxidační vlastnosti, které jsou dávány do přímého vztahu s ochranným účinkem proti kardiovaskulárním nemocem a některým druhům rakoviny.



Obr.3.2 - Chemický vzorec Epicatechinu

Polyfenoly mají výraznou afinitu k proteinům. Taniny jsou polyfenoly, které mají tzv. tříslovinnou sílu, to znamená schopnost precipitovat proteiny. Tato vlastnost je klíčová pro lom mladiny a koloidní stabilitu piva. Polyfenoly ve finálním pivu nejsou taniny, neboť mají příliš malou molekulovou váhu na to, aby srážely proteiny. Během stárnutí piva však polyfenoly postupnou oxidací a následnou polymerací zvětšují svoji velikost, získávají tříslovinnou sílu a srážejí proteiny. Srážením taninů s proteiny vzniká zákal, který je u čirých filtrovaných piv nežádoucí. Obsah polyfenolů má přímý vztah ke koloidní stabilitě. Schopnost srážet proteiny nemají všechny polyfenoly. Prof.Chapon [39] zavedl zvláštní název *Tanoidy* pro polyfenolové látky, které je možné vysrážet absorbentem polyvinylpyrrolidonem (PVP), a které další po-

lymerací získávají tříslovinou sílu. Typické pivo plzeňského typu obsahuje 100 až 200 mg/l celkových polyfenolů, ale pouze 30 až 70 mg/l tanoidů (Kosař [59]).

Polyfenoly v pivu mají výrazné organoleptické vlastnosti, přispívají k trpké a částečně hořké chuti a vzhledem ke své antioxidační kapacitě pomáhají udržovat senzoryckou stabilitu během stárnutí.

Z hlediska koloidní stability by bylo výhodné odstranit z piva všechny na proteiny citlivé polyfenoly (tanoidy). K tomu se dnes v pivovarství používá stabilizace piva absorpcí na polyvinylpyrrolidon (PVPP). Vzhledem k antioxidační kapacitě polyfenolů a jejich vlivu na celkovou chuť není vhodné jejich úplné odstranění. Je nutné hledat kompromis a odstranit z hotového produktu tanoidy jen do té míry, která zajistí dostatečnou koloidní stabilitu a neovlivní senzoryckou stabilitu a organoleptické vlastnosti finálního produktu.

K zajištění správné míry odstranění tanoidů je nutné měřit jejich obsah jak v zeleném pivu, tak ve finálním filtrovaném produktu. Jednou z metod měření je titrační nefelometrický test na obsah tanoidů podle Chapona [39].

3.2.3 Proteiny

Jsou dusíkaté látky tvořené aminokyselinami spojenými peptidickou vazbou o velikosti více než cca 100 jednotek. Menší řetězce o délce 10 až 100 aminokyselin se jmenují polypeptidy. Do piva se proteiny dostávají ze sladu při rmutování. Celkový obsah proteinů v pivu bývá v rozmezí 1 až 2 g/l.

Proteiny mají v pivu zásadní význam. Nejdůležitější skupinou jsou enzymy, které katalyzují chemické reakce ve všech fázích výroby. Hydrofobní proteiny (nejčastěji ve formě glykoproteinů) se podílejí spolu s dalšími látkami na vytváření a udržení pивní pěny, která je jedním ze základních atributů piva. Vysokomolekulární proteiny přispívají k plnosti pив.

Proteiny přispívají ke koloidní nestabilitě piva. Během stárnutí produktu jsou proteiny precipitovány polymerovanými polyfenoly a spoluvytvářejí nežádoucí zákal. Proteinům náchylným ke srážení polyfenolů se říká sensitivní nebo zákalotvorné proteiny (anglicky *Sensitive proteins* – SP nebo *Haze Active proteins*).

Vzhledem k významu proteinů v pivu je nelze z finálního produktu kompletně odstranit. V posledních 40ti letech probíhá intenzivní výzkum s cílem odlišit pěnotvorné a zákalotvorné proteiny a následně z piva odstranit výhradně zákalotvorné proteiny bez vlivu na pěnové schopnosti a plnost produktu.

Podle dosavadních znalostí nelze obě skupiny úplně oddělit. Zákalotvorné proteiny jsou bohaté na aminokyselinu prolin a patří většinou k hordeinům (proteiny rozpustné v alkoholu). Chladový zákal jsou však v menší míře schopné vytvářet i albuminy a globuliny (rozpustné ve vodě). K agregaci jsou náchylnější proteiny s vyšší molekulární vahou.

3.2.4 Sacharidy

Pivo obsahuje přibližně 25 až 50 g/l sacharidů, které pocházejí ze sladu (Kosař a kol.[59]) a jsou hlavní součástí zbytkového extraktu. Nejvíce jsou zastoupeny dextriny, štěpné produkty škrobu nezkrasitelné kvasinkami. Velký význam mají β -glukany, které zvyšují viskozitu piva a znesnadňují jeho finální filtraci. Při analýze zákalů vzniklých v pivu během stárnutí byl identifikován i značný podíl sacharidů (Asano [12]). Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že sacharidy nehrají důležitou roli při tvorbě koloidních zákalů a jejich odstranění z finálního produktu nemá na koloidní stabilitu pив výrazný vliv. Do zákalového materiálu se dostávají jako součást proteinů ve formě glykoproteinů, nebo pouhou adsorpcí na již vytvořené koloidní částice.

3.2.5 Mechanismus vzniku protein-polyfenolového zákalu v pivu

Mechanismu vzniku a vlastnostem protein-polyfenolového zákalu v pivu bylo věnováno mnoho publikací (Siebert [95,97], Kawamoto [56], Richard [90]), které se soustředily na chemické složení zákalotvorných částic, jejich fyzikální vlastnosti a na podmínky jejich vzniku. Pozornost se zaměřila na vlastnosti proteinů a polyfenolů, které zákal vytváří a na vliv surovin a technologických postupů na jejich množství a vlastnosti.

Proteiny jsou v pivu ve velkém přebytku nad polyfenoly. Pouze část z nich jsou zákalotvorné. Několik prací prokázalo (Asano [12], Hagermanová [33,34]), že v zákalech se vyskytují převážně proteiny bohaté na aminokyselinu proline. Větší zákalotvorné vlastnosti mají hydrofilní proteiny s větší molekulovou hmotností.

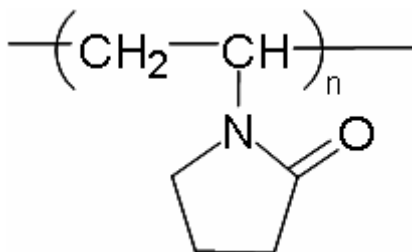
Polyfenoly, které se dostanou do finálního produktu, jsou nízkomolekulární, nemají tříslovinou sílu a nejsou schopné agregovat proteiny. Vysokomolekulární polyfenoly vypadávají z roztoku během procesu výroby piva. Nejvíce na konci chmelovaru, při tzv. lomu mladiny a při následné fermentaci a ležení zeleného piva. Chemický rozbor prokázal (Leemans [61]), že nejčastěji se ve finálních pivech vyskytují monomery a dimery flavanolů. Oxidací a polymerací monomerů a dimerů do delších řetězců získávají polyfenoly schopnost vázat k sobě proteiny.

Z těchto poznatků vycházejí i navržené modely protein-polyfenolové interakce (Siebert [95]). Polyfenoly se vážou na specifická vazebná místa proteinů, nejspíše tam, kde je proline na povrchu proteinu. Zákalotvorný polyfenol musí obsahovat minimálně dvě vazebná místa, aby mohl vázat proteiny k sobě.

3.2.6 Stabilizace piva na obsah polyfenolů absorpcí na PVPP

V dnešní době nutí tlak prodejců výrobce prodlužovat trvanlivost výrobků na co nejdelší dobu, v případě piva až na dobu 1 roku. Cílem stabilizace piva je zajistit koloidní stabilitu systému po celou dobu deklarované životnosti a zabránit vytvoření nežádoucího zákalu. K dosažení tohoto cíle se používá strategie odstranění v pivu existujících prekurzorů zákalu metodami absorpce na různé typy absorbentů.

K absorpci polyfenolů se používá polyvinylpyrrolidon (PVP) nebo Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), zesíťovaný PVP o různé velikosti. K odstranění proteinů se nyní používá více metod. Nejčastějším postupem je absorpce proteinů na silikagely. Již méně se používá precipitace proteinů přidáním taninů do ležáckých tanků, nebo jejich štěpení na menší velikost pomocí různých druhů enzymů, např. papainem. Podrobný výčet stabilizačních postupů a prostředků využívaných při výrobě piva je podán např. v práci Bamforth [14].



Obr.3.3 - Chemický vzorec Polyvinylpyrrolidonu (PVP)

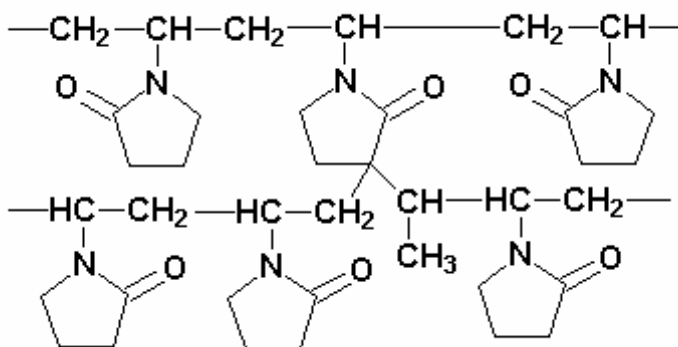
Polyvinylpyrrolidon (PVP) je polymer vytvořený polymerací N-vinyl-2Pyrrolidonových jednotek (obr.3.3). Dusík pyrrolidonových kruhů se váže kovalentní vazbou na polyethylenový řetězec. Jediná funkční skupina je karbonylová skupina, která je účinným elektronovým dono-

rem pro vodíkovou vazbu. Planární pyrrolidonový kruh s velkou polaritou zajišťuje PVP vysokou rozpustnost ve vodě a v polárních rozpouštědlech.

Přestože monomer je toxický, polymer PVP je inertní vůči organismům. Je natolik bezpečný, že může být používán v potravinářství, neboť při konzumaci prochází tělem nezměněn. Dříve byl dokonce používán jako náhrada krevní plazmy. Mezi jeho další významné fyzikální vlastnosti patří velká odolnost vůči extrémním pH a vysokým teplotám. PVP je hygroskopický a je schopný vázat vodu až do 40% své váhy.

Unikátní vlastnosti zajistily PVP široké spektrum použití ve věcech denní spotřeby. Používá se jako plnidlo a rozpouštění podporující látka v pilulkách, stabilizátor a modifikátor viskozity roztoku v šamponech, vlasových gelech, barvách a lepidlech. V potravinách může být PVP použit jako stabilizátor s identifikátorem E1201. Široké uplatnění našel PVP i ve zdravotnictví. Vyrábějí se z něj kontaktní čočky, funguje jako nosič aktivních substancí v některých cílených léčivech atd.

Nejdůležitější vlastností z hlediska pivovarství je schopnost PVP vázat polyfenoly. V interakci polyfenolů s PVP se uplatňuje vodíková vazba, překryv π -vazeb fenolového a pyrrolidonového kruhu a hydrofobní vazba. Význam jednotlivých vazeb na celkové interakci závisí na typu vázaného polyfenolu a dodnes není plně objasněn. Některé práce provedené metodami kompetitivní adsorpce (Hagermanová [33]) potvrdily, že afinita polyfenolů v pivu k PVP je mnohem vyšší než k proteinům.



Obr.3.4 - Chemický vzorec Polyvinylpolypyrrolidonu (PVPP)

Schopnost PVP vázat polyfenoly se využívá v průmyslu nápojů k selektivnímu odstranění části polyfenolů z produktů. K tomuto účelu byl vyvinut Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), zesíťovaný PVP o různé velikosti. Jeho chemický vzorec je znázorněn na obr.3.4.

3.2.7 Stabilizace piva na obsah proteinů adsorpcí na silikagel

Silikagel je granulovitá, pórovitá forma oxidu křemičitého (SiO_2), vyráběná synteticky z křemičitanu sodného (Wikipedia [123]). Má vysokou porositu, kolem $800 \text{ m}^2/\text{g}$, která umožňuje snadno absorbovat vodu. Schopnost silikagelu adsorbovat proteiny je známá již dlouho. Vazba proteinů na silikagel je komplexní, uplatňují se při ní vodíkové vazby, hydrofobní i elektrostatická interakce. Vodíkové vazby vznikají mezi silanolovými SiOH skupinami na povrchu silikagelu a OH, NH a CO skupinami proteinů.

Adsorpční schopnost silikagelu závisí na vlastnostech připraveného materiálu, speciálně na průměrné velikosti částic a velikosti pórů. Výhodou silikagelu proti jiným absorbentům dříve používaným v pivovarnictví (bentonit) je jeho schopnost adsorbovat selektivně zákalotvorné proteiny bez negativního vlivu na stabilitu pěny. Podle publikovaných výsledků (Siebert [96],

Rehmanji [89], Leiper [63,64]) silikagel preferenčně adsorbuje glykosylované proteiny bohaté na aminokyselinu proline, které se nejčastěji podílí na tvorbě koloidních zákalů.

3.2.8 Principy a metody předpovědi koloidní stability piva

Velikost koloidního zákalu se mění během stárnutí produktu a slouží jako kontrolní ukazatel průběhu tohoto procesu. Závisí na výchozím složení produktu a na podmínkách, kterým je vystaven během celého období od expedice po spotřebu. Doposud neexistuje všeobecně přijímané kritérium pro určení koloidní stability pív.

Již z vlastního názvu „koloidní stabilita“ vyplývá, že jde o časový úsek, kdy je produkt stabilní a jeho zákal se nemění. Jako konec koloidní stability lze brát okamžik, kdy zákal začne prudce narůstat. Přesné určení tohoto okamžiku je však často problematické. Proto se definuje hranice akceptovatelného zákalu objektivně měřeného zákaloměry a koloidní trvanlivost jako doba do dosažení tohoto zákalu.

Aby bylo možné objektivně stanovit přirozenou koloidní stabilitu vzorků, udržují pivovary deponáže, kde jsou vzorky vyprodukovaných pív uchovávány za tmy a za stabilizovaných teplotních podmínek (místnosti jsou klimatizovány na 20°C) po celou dobu deklarované koloidní stability, při níž je prováděna pravidelná kontrola zákalu. Z těchto měření se určuje přirozená koloidní stabilita vzorků a tato hodnota se bere jako referenční při posuzování přesnosti jednotlivých metod předpovědi koloidní stability.

Pro předpověď koloidní stability piva bylo v posledních letech vyvinuto velké množství fyzikálních i chemických metod, popsanych v odborné literatuře. Obsáhlejší rozbor metod předpovědi koloidní stability je podán např. v pracích Bamforth [14], Murrough [72]. V této práci se soustředíme na titrační metody určení obsahu zákalotvorných prekurzorů a na metodu založenou na urychlení procesu stárnutí zvýšenou teplotou (tzv. šokovací test). Testy předpovědi koloidní stability piva můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií.

Metody založené na zrychleném procesu stárnutí

Metody založené na zrychleném procesu stárnutí můžeme dále rozdělit na metody fyzikální a chemické. U fyzikálních metod je proces stárnutí urychlen fyzikálními vlivy, nejčastěji zvýšenou teplotou, u chemických metod je proces stárnutí urychlen chemickými postupy, např. působením oxidačních činidel.

Metody založené na určení obsahu zákalotvorných prekurzorů

Zákalotvorné prekurzory jsou látky, které jsou koloidně nestabilní a během stárnutí agregují a vytvářejí zákal. Mezi tyto látky patří hlavně zákalotvorné bílkoviny, polyfenoly a jejich komplexy.

Metody předpovědi koloidní stability mají za úkol určit nejen obsah těchto látek, ale i jejich schopnost vzájemně interagovat a vytvářet zákal během stárnutí. Existuje mnoho metod k detekci celkového obsahu proteinů a polyfenolů založených na různých principech (ASBC [1], Analytica EBC [5], Siebert [102,103]). Tyto metody většinou neumožňují rozlišit schopnost proteinů a polyfenolů agregovat, takže jejich výsledky nekorelují s přirozenou trvanlivostí pív.

S přirozenou trvanlivostí pív nejvíce korelují metody, ve kterých se využívá principu srážení zákalotvorných látek chemickými látkami, které reagují s zákalotvornými prekurzory ve vzorku podobným způsobem, jako zákalotvorné látky navzájem během stárnutí. Srážení se detekuje elastickým rozptylem světla.

Všechny metody předpovědi koloidní stability pív vyžadují verifikaci s přirozenou dobou trvanlivosti během stárnutí, měřenou za standardizovaných podmínek v deponážních místnostech pivovarů.

3.2.8.1 Metody zrychleného stárnutí tepelným šokováním

Metody zrychleného stárnutí tepelným šokováním (šokovací testy) patří mezi metody zrychleného stárnutí vzorků, které jsou způsobeny fyzikálními vlivy. Vzorky finálního výrobku ve spotřebitelských obalech jsou vystaveny po definovanou dobu působení vysoké teploty, poté jsou ochlazeny a měří se vytvořený zákal. Cílem tepelného šokování piva je urychlit vyšší teplotou procesy, které při pokojové teplotě probíhají velmi pomalu. V procesu stárnutí se nejvíce uplatňují oxidativně redukční reakce.

Existují různé varianty aplikace této metody, které se principiálně liší v několika parametrech:

- teplotou a dobou trvání teplé části cyklu, při které dochází k urychlenému stárnutí vzorku,
- teplotou a dobou trvání studené části cyklu, při které dochází k vytvoření zákalových částic,
- počtem opakování cyklů a způsobem vyhodnocení.

Předpokladem správné vypovídací schopnosti testu je, že za vyšší teploty probíhají procesy rychleji, ale obdobně jako při nižších teplotách. Čím vyšší teplota se použije pro urychlení stárnutí, tím více se procesy urychlí a doba trvání testu se zkrátí. Zároveň se však zvýší pravděpodobnost, že chemické reakce během stárnutí proběhnou odlišně od pokojové teploty a výsledky testu se odchýlí od skutečné koloidní stability. Při výběru teploty stárnutí se musí přihlížet i k vlastnostem obalů.

Po přenesení vzorku na nízkou teplotu dochází k agregaci zákalotvorných látek a vytváří se chladový zákal. Čím je teplota nižší, tím větší chladový zákal vzniká. Částice chladového zákalu jsou vázány slabými silami, jeho tvorba je pomalý proces. Čím delší dobu uložení vzorku na nízké teplotě použijeme, tím větší rozlišení testu dostaneme za cenu prodloužení doby jeho trvání.

Mezinárodní expertní pivovarské organizace zavádějí rozdílné metodiky pro provádění a vyhodnocování šokovacích testů (EBC[7], IOB[48], MEBAK[76] a ASBC[2]). Metodiky se v mnoha parametrech liší, a proto jsou jimi získané výsledky mezi sebou neporovnatelné.

Délka trvání a teplota během teplého šoku určuje míru zrychleného stárnutí vzorků. Zvýšení teploty o 10° způsobí zrychlení chemických reakcí přibližně o 2-3násobek. Při teplotě teplého cyklu 60° je stárnutí urychleno přibližně 30krát, tzn. 24 hodin teplého šoku odpovídá 1 měsíci stárnutí na 20° (Mc Murrough [74]).

Zrychlené zkoušky koloidní stability pív tepelným cyklováním patří mezi nejdůležitější metody kontroly koloidní stability a pro vysokou korelaci s přirozenou trvanlivostí jsou v praxi často používány. Vzhledem ke složitosti procesu stárnutí je nutné výsledky korelovat s výsledky přirozeného stárnutí za standardizovaných podmínek pro každý konkrétní druh produktu zvlášť.

Výhodou šokovacích zkoušek je, že je lze provádět s relativně jednoduchým přístrojovým vybavením. Termostat a laboratorní zákalometr dnes již patří k obvyklému vybavení pivovarských laboratoří. Šokovací testy jsou prováděny na vzorcích přímo v komerčních lahvích uzavřených z výrobní linky bez dalších chemických úprav nebo jiných zásahů, a proto mohou postihnout veškeré defekty, k nimž může docházet během produkce.

Nevýhodou šokovacích zkoušek je jejich časová náročnost. I nejkratší test trvá u hluboce stabilizovaných pív minimálně týden. Žádný pivovar si nemůže dovolit skladovat produkci do doby, než budou šokovací testy vyhodnoceny. Potřeba zkrácení doby předpovědi na minimum

vede stále častěji k nutnosti zavedení podstatně rychlejších testů a rozborů, i když jejich korelace s praktickou trvanlivostí je mnohdy menší než u šokovacích zkoušek. Mezi zaváděné testy patří metody zrychleného stárnutí přidávkem oxidačních činidel (Šavel [119]).

Stále častěji se používají i metody založené na určení obsahu zákalotvorných prekurzorů, např. nefelometrické titrační testy, mezi které patří metoda stanovení obsahu citlivých proteinů, metoda srážení síranem amonným, test na obsah tanoidů podle Chapona atd.

3.2.8.2 Nefelometrické titrační testy předpovědi koloidní stability piva

Síranový test koloidní stability piva

Tato analytická metoda poskytuje informaci o koloidní stabilitě piva pomocí sledování koncentrace látek vysolitelných nasyceným roztokem síranu amonného (SASS). Lze ji použít např. k rychlému orientačnímu posouzení stability piva ze strany proteinů. Metoda je přijata jako doporučená analytická metoda v analytice IOB (Institute of Brewing, England [51]). Obdobně je doporučena komisí MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission, www.mebak.org [78]).

V průběhu testu se do vzorku postupně přidává SASS. Až do určité koncentrace nedochází k postřehnutelným změnám zákalu. Nad určitou koncentrací SASS ve vzorku dojde k vysolení proteinů z roztoku a vytvoří se zákal. Práh vysolení - SASPL („Saturated Ammonium Sulphate Precipitation Limit“) je definován jako množství SASS, potřebné ke vzniku registrovatelného zákalu. Platí, že množství SASS, které se musí přidat do vzorku k dosažení postřehnutelného zákalu, souvisí úzce se stavem koloidního systému piva, s obsahem a molekulární vahou vysolitelných proteinů. I když vztah mezi hodnotou SASPL a koloidní stabilitou piva není lineární, neboť koloidní stabilita závisí nejen na obsahu proteinů, ale i na dalších faktorech, jako např. na obsahu kyslíku, železa či tanoidů, lze tohoto testu s úspěchem používat zejména k profilování produkce a jako indikátoru možných problémů a poruch zvláště při stabilizaci piva na straně proteinů.

Test na obsah tanoidů

Prof.Chapon [39] zavedl zvláštní název *tanoidy* pro polyfenolové látky, které je možné vysrážet absorbentem polyvynilpyrrolidonem (PVP), a které další polymerací získávají tříslovinou sílu. Tanoidy ve finálním pivu nejsou taniny; mají totiž příliš malou molekulovou váhu na to, aby srážely proteiny, a nemají tříslovinou sílu. Během stárnutí piva však oxidují, polymerují, získávají tříslovinou sílu a tvoří s bílkovinami komplexy. Mezi tanoidy patří nízko a středně-molekulární polyfenoly a některé polymery katechinů a anthokyanogenů. Metoda nefelometrického stanovení obsahu tanoidů je přijata jako doporučená analytická metoda MEBAK [79].

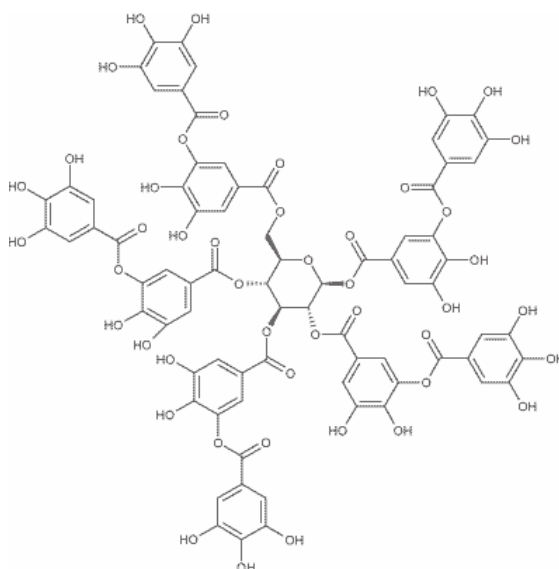
Test na obsah tanoidů (PVP test) spočívá v postupném přidávání roztoku polyvinylpyrrolidonu (dále PVP) do vzorku. Tanoidy se váží na PVP, vzniká zákal, jehož velikost se zvyšuje tak dlouho, než všechny přítomné tanoidy vytvoří s PVP komplexy. Při dalším dávkování PVP hodnota zákalu klesá. Množství PVP, které se musí přidat k dosažení maxima zákalu, je proporcionální obsahu tanoidů. Vývoj zákalu (v jednotkách EBC) v závislosti na množství přidaného PVP do vzorku (v jednotkách mg PVP / litr původního vzorku) se měří nefelometricky.

Test na obsah citlivých proteinů

Během ležení piva tanoidy obsažené v pivu polymerují a přecházejí do taninů. Taniny jsou polyfenoly schopné tvořit s určitými bílkovinami komplexy s nízkou rozpustností. Tento proces, za určitých podmínek pokračující i v silně stabilizovaných pivech, je příčinou vzniku nejdříve chladových a postupně i trvalých zákalů. Citlivými proteiny (SP – Sensitive proteins)

se nazývají v pivu obsažené vysokomolekulární proteiny, které se vyznačují nejsilnější afinitou k taninům a reagují s nimi za vzniku zákalů. Test na obsah citlivých proteinů v pivu (SP test) je metoda přijatá jako doporučená analytická metoda v Analytice EBC [8].

Třísloviny (taniny) jsou rostlinné polyfenoly, které sráží proteiny. Z chemického hlediska se dělí na hydrolizovatelné taniny a kondenzované taniny (Hagerman [35]). Hydrolizovatelné taniny se skládají z cukru, nejčastěji glukózy, na kterou je navázáno esterovou vazbou několik monomerních skupin kyseliny galové. Esterifikované mohou být všechny nebo jen některé skupiny. Na obr.3.5 je zobrazeno schéma gallotaninu jako příkladu hydrolizovatelného taninu s centrální glukózou a navázanými 10 jednotkami kyseliny galové.



Obr.3.5 – Chemický vzorec gallotaninu

Kondenzované taniny jsou polymerní flavanoidy. Je to velice diversifikovaná skupina látek. Nejčastěji zkoumanou skupinou jsou v pivu se vyskytující kondenzované taniny založené na monomerních jednotkách flavan-3-olů, jako jsou např. epicatechin a catechin (viz schéma epicatechinu na obr 3.2).

Taniny jsou extrahovány z rostlin. Ve vodném roztoku rychle oxidují, proto je nutné roztok taninu připravovat každý den čerstvý.

Test nefelometrického stanovení obsahu citlivých proteinů poskytuje informace o zákalotvorných proteinech přítomných v pivu. Vodní roztok taninu (nejčastěji je používán gallotanin) o definované koncentraci je dávkován do vzorku piva. Přítomné citlivé proteiny tvoří s taninem komplexy a zvyšuje se měřený zákal. Hodnota vzniklého zákalu je úměrná obsahu citlivých proteinů ve vzorku (čím větší zákal, tím více citlivých proteinů).

3.3 KVASINKY

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, které patří k nejjednodušším eukaryotním organismům. Existuje u nich analogie s mnoha životními procesy, které probíhají v savcích buňkách; z toho důvodu se často používají jako modelový systém.

Kvasinky patří do říše fungi, třídy Ascomycetes. Rod *Saccharomyces* patří do čeledi Saccharomycetaceae, podčeledi Saccharomycoideae. Kvasinky se rozmnožují převážně vegetativně, a to pučením nebo přehrádečným dělením. Tvar a velikost buněk se liší pro jednotlivé druhy, základním tvarem pro *Saccharomyces cerevisiae* je rotační elipsoid o délce 3 až 10 μm .

Kvasinky jsou od nepaměti využívány k výrobě chleba a fermentovaných nápojů - piva a vína. Dochovaly se doklady o tom, že již staří Babylonané a Egypťané před 6ti až 8mi tisíci lety znali výrobu nápojů z naklíčeného obilí. I dnes se kvasinky hojně využívají v biotechnologiích, ve výrobě těsta, mléčných výrobků, piva, vína a lihu.

3.3.1 Pivovarské kvasinky

Druh *Saccharomyces cerevisiae*, používaný v pivovarnictví, je zástupcem fermentativního typu kvasinek, u kterého i v aerobních podmínkách převládá fermentační metabolismus. Přítomnost kyslíku je nezbytná alespoň ve stopových množstvích pro zajištění množení kvasnic.

Dlouhým šlechtěním byly u pivovarských kvasinek podpořeny některé charakteristické vlastnosti, např. vysoká tolerance k alkoholu (až do 6%) a převaha kvašení v metabolismu sacharidů (až 90%), které je předurčují k výrobě piva.

Při výrobě piva se nyní používají dva základní druhy kvasinek - kvasinky spodního a kvasinky svrchního kvašení, které se liší v některých základních parametrech. Kvasinky spodního kvašení dostaly své jméno podle toho, že na konci kvašení flokulují a sedimentují na dně nádoby. Kvasinky svrchního kvašení jsou na konci kvašení vynášeny bublinkami CO₂ k hladině. Až do vynálezu chlazení v polovině 19. století byly známy pouze svrchně kvasící kvasinky (Kosař [59]). Oba druhy kvasinek se liší geneticky a složením buněčných stěn. Svrchní kvasinky kvasí při vyšších teplotách (18°-20°C) než spodní kvasinky (6°-9°C), což způsobuje i rozdílný průběh metabolismu a rozdílnou tvorbu sensoricky významných látek. Svrchními kvasinkami se produkují piva typu „Ale“, „Porter“ a „Stout“, spodními kvasinkami se produkuje např. u nás i ve světě nejrozšířenější druh piva Pilsener, světlý ležák plzeňského typu.

Správná schopnost flokulace a následné sedimentace kvasinek spodního kvašení je jednou ze základních vlastností zajišťujících optimální průběh dokvašování spodně kvašených piv. Dalšími vlastnostmi kvasinek, významnými pro zajištění správného technologického průběhu výroby piva, jsou vitalita a viabilita.

Pojem vitality není přesně definován; popisuje se jako kvasná kapacita nebo kvasná mohutnost a udává schopnost kvasinek fermentovat substrát. Vitalita buněk závisí na jejich fyziologickém stavu a je ovlivněna jejich stářím a stresovými faktory. Mezi hlavní stresové faktory, kterým jsou pivovarské kvasinky vystaveny, patří vysoká teplota, tlak a vysoký obsah etanolu. Pod pojmem viabilita se míní reprodukční schopnost buněk, to znamená schopnost se množit.

Nejdůležitější schopností kvasinek pro výrobu piva je schopnost kvasit sacharidy na etanol a oxid uhličitý. Kvasinky zkvašují monosacharidy glukosu, fruktosu, galaktosu, manosu, disacharidy sacharosu, maltosu, trisacharidy rafinosu a maltotriosu. Spodní kvasinky zkvašují rafinosu úplně na rozdíl od svrchních, které ji zpracovávají pouze asi z jedné třetiny. Glukosa přechází do buněk částečně prostou difúzí (stejně jako voda a etanol), převážně však usnadněnou difúzí. Glukosový přenašeč přenáší do buněk také fruktosu [58]. Maltosa (disacharid složený ze dvou molekul glukosy, nejvíce zastoupený sacharid v mladině) je stejně jako sacharosa a maltotriosa přenášen do buněk aktivním symportem s H⁺.

3.3.2 Metabolismus kvasinek

Jednoduché sacharidy jsou v buňce přeměněny na fruktosa-6-fosfát, který vstupuje do metabolické dráhy cukrů nazývané *glykolytická dráha* podle *Emden-Meyerhof-Parnasova schématu*. Jedná se o sled reakcí, do kterého vstupuje glukosa a konečným produktem je pyruvát neboli kyselina pyrohroznová.

Pyruvát je významným meziproduktem, od kterého se odvíjejí další metabolické dráhy. Za přítomnosti kyslíku pokračuje metabolismus za přispění enzymu pyruvát-dehydrogenasy k citrátovému cyklu (dýchání). Citrátový cyklus může vést až k úplnému odbourání uhlíkového řetězce na CO₂ při zisku 38 ATP. Často tomu tak není, protože meziprodukty citrátového cyklu jsou využity k syntéze sterolů a lipidů.

V anaerobních podmínkách se spouští za přispění enzymu pyruvát-dekarboxylasy proces kvašení, přeměna pyruvátu na acetaldehyd a dále na etanol. Při procesu kvašení se získají z jedné molekuly pyruvátu pouze dvě molekuly ATP. Proces je výrazně méně energeticky výhodný, avšak asi 100krát rychlejší než proces dýchání.

Dalším efektem glykolýzy je produkce H⁺ iontů, které způsobují okyselení vnitřního prostředí buňky. Zvýšená koncentrace uvnitř buňky aktivuje funkci H⁺ – ATPas, což vede k acidifikaci vnějšího prostředí.

3.3.3 Vitalita kvasinek

Pojem vitality není přesně vymezen; nejčastěji se definuje jako kvasná kapacita nebo kvasná mohutnost a udává schopnost kvasinek fermentovat substrát. V literatuře se však vyskytují i jiné definice vitality, např. jako schopnost kvasinek rychle iniciovat metabolismus po přechodu z prostředí s nedostatkem živin do prostředí na živiny bohatého, schopnost zvládat stres nebo jednoduše dobrý fyziologický stav buněk. Z nepřesnosti definice pojmu vitality vychází i různorodost navržených metod jejího měření.

Metody měření vitality kvasnic založené na měření obsahu významných látek

Předpokladem je, že obsah významné látky je v přímém vztahu k metabolickým schopnostem buněk. Mezi významné látky, které byly použity, patří ATP - základní energetický zdroj buněk, glykogen - zásobní polysacharid a steroly. Přestože ATP i glykogen jsou potřebné pro správné fungování buněk, některé pokusy neprokázaly přímý vztah mezi jejich obsahem a metabolickou kompetencí buněk.

Metody měření vitality kvasnic založené na měření aktivity enzymů

Mezi enzymy, které byly využity k měření metabolické aktivity buněk, patří např. alkohol dehydrogenasa, pyruvát dehydrogenasa a pyruvát dekarboxylasa. Nevýhodou těchto metod je, že odrážejí aktivitu pouze určité části metabolismu.

Metody měření vitality kvasnic založené na měření rychlosti metabolismu

Mezi tyto metody patří klasický Wartburgův test měření nárůstu tlaku CO₂ produkovaného buňkami po přidání substrátu, resp. měření rychlosti spotřeby O₂. Mezi tyto testy patří i test acidifikační schopnosti kvasnic (AP test).

V poslední době se dostává do popředí metoda fluorescenčního měření intracelulárního pH buněk vystavených stresovým podmínkám (Imai [45]). Výhodou této metody by měla být větší citlivost pro vysoce vitální kvasnice než u AP testu.

Kompletní přehled metod měření vitality kvasnic v pivovarském průmyslu byl publikován např. v práci Imai [46].

3.3.4 Acidifikační test vitality kvasnic

Acidifikace vnějšího prostředí patří mezi základní projevy buněk reagujících na změnu vnějších podmínek. V případě kvasinek je pozorovatelná po přidání soli (KCl), okysličení média nebo přidání živného substrátu - glukosy, fruktosy, manosy, nebo sacharosy. Rozsah acidifi-

kace média je závislý na celkovém zdraví kvasinek. Procesu okyselení média se účastní společně vnitřní metabolické procesy a membránové procesy buněk. V rovnováze musí probíhat procesy, které buňce energii poskytují, s pochody, které energii spotřebovávají na udržení životaschopnosti.

Udržování téměř konstantního intracelulárního pH (pH_i) má pro živé buňky zásadní význam. Intracelulární pH ovlivňuje rychlost metabolismu, propustnost membrán pro ionty, autoasociaci ATP a správné spojení podjednotek enzymů do funkčního celku. I malá změna pH může znemožnit průběh některých metabolických procesů. Metabolické procesy jsou někdy spojeny s produkcí H^+ iontů a nárůstem vnitřní acidity. Buňky si musely vyvinout mechanismy, jak tento nárůst kompenzovat. Stabilizace pH je v buňkách zajištěna několika nezávislými mechanismy: pufrovací kapacitou cytosolu, biochemickou neutralizací kyselin a zásad, přenosem kyselých látek do vakuol nebo přenesením přebytečné acidity mimo buňku, které je spojeno s okyselením vnějšího prostředí.

Pasivní přechod H^+ iontů přes membrány je velmi malý. Hlavním prostředkem k přenosu je u kvasinek transmembránový enzym H^+ -ATPasa, který přemísťuje ionty přes plazmatickou membránu. Přenos H^+ iontů do vnějšího prostředí spojený s jeho acidifikací pomáhá buňce zajišťovat homeostázu pH.

Test pro měření acidifikační schopnosti buněk (AP test – Acidification Power test), původně vyvinutý Opekarovou a Siglerem [83], odráží komplexní fyziologický a bioenergetický stav buněk. Informace jím poskytnuté mohou sloužit k předpovědi fermentační schopnosti kvasinek.

Podstatou AP testu je měření změn vnějšího pH po přidání buněk do okysličeného vodného roztoku a po přidání vhodného substrátu, v našem případě glukosy. Acidifikační křivka je charakteristická pro daný typ buněk a odráží jejich historii a stresující vlivy, kterým byly vystaveny.

Acidifikační scénář podle Siglera [104,105,107] pozůstává z těchto kroků:

- 1) Glukosa je přijímána buňkami a rychle fosforylována kinasami na fruktosa-6-fosfát. Při fosforylaci se uvolňuje H^+ , což má za následek vnitrobuněčnou acidifikaci.
- 2) Nízké pH uvnitř buňky (společně se změnami obsahu buněčného cAMP) blokuje K^+ kanály v membráně, K^+ ionty neodcházejí z buňky přes snižující se membránový potenciál.
- 3) Plasmatická H^+ -ATPasa je v důsledku glukosou indukovaných reakcí fosforylována a její aktivita roste. V důsledku fosforylace glukosy a tvorby cAMP klesá obsah ATP. Pokles ATP silně stimuluje buněčný metabolismus (buněčné dýchání).
- 4) Nárůst buněčného metabolismu vede ke zvýšení produkce CO_2 . Funkce H^+ -ATPasy (přenos H^+ vně buňky) a produkce CO_2 vede k acidifikaci vnějšího prostředí a k nárůstu rozdílu vnějšího pH (pH_o) a vnitřního pH (pH_i) – ΔpH .
- 5) Nárůst ΔpH je spojen se zvýšeným přísunem K^+ do buňky. Glukosa aktivuje kromě H^+ -ATPasy i systém spojený s přísunem K^+ do buňky. Přísun je spojen s depolarizací membrány a alkalizací vnitřního prostředí.
- 6) V důsledku vyššího vnitřního pH_i přestanou být kanály K^+ blokovány a dojde k výstupu K^+ iontů z buňky. Tento výstup může být kompenzován výstupem organických aniontů akumulovaných v buňce (pyruvát, sukcinát).

Acidifikace bez substrátu

Acidifikace vnějšího prostředí pivovarskými kvasinkami *Sacharomyces cerevisiae* bez přítomnosti substrátu závisí na koncentraci kyslíku v suspenzi. Okysličení média je možné dosáhnout probubláním kyslíkem nebo přenosem buněk do čerstvého okysličeného média. Přítomnost kyslíku vyvolá nárůst endogenního dýchání, které způsobí acidifikaci vnějšího prostředí (proces nenastává u respiračně deficientních mutantů). Scénář acidifikace je podobný jako po přidání substrátu, energeticky je však proces plně pokryt endogenními zdroji. Hladovění buněk snižuje hladinu buněčného ATP a tím i rozsah spontánní acidifikace.

Spontánní acidifikace média měřená za standardních podmínek odráží schopnost buněk mobilizovat endogenní substráty, acidifikace po přidání substrátu dává informaci o schopnosti buněk využívat exogenní zdroje.

3.3.5 Optická metoda měření acidifikačního testu vitality kvasnic

Testování vitality jednoho vzorku kvasinek AP testem trvá dosud používanou metodou 20 minut i déle. Měření více vzorků za sebou prodlužuje čas potřebný na vlastní měření a zároveň čas na uchovávání vzorků. Prodloužení času úschovy vzorků přináší nebezpečí změny jejich vitality a ovlivnění výsledků. Při měření kvasničných suspenzí skleněnými pH elektrodami může navíc dojít k zanášení elektrod a ovlivnění naměřených hodnot pH.

Proto jsme hledali metodu, která by umožnila urychlení měření, popř. současné měření více vzorků najednou. Optické bezkontaktní měření pH může být vhodnou alternativou měření s elektrochemickými elektrodami. Optická metoda detekce změn pH pomocí barevného pH indikátoru dovoluje současné měření více vzorků, minimalizuje objem vzorku a usnadňuje zacházení se vzorky.

3.3.5.1 pH indikátory

pH je veličina definovaná podle rovnice $\text{pH} = -\log([\text{H}^+])$. Indikátory pH jsou chemické látky, které se přidávají k měřenému vzorku a mění barvu v závislosti na pH. Jde v podstatě o chemické detektory H^+ iontů. Jedná se většinou o slabé kyseliny nebo báze. V roztoku na sebe váží H^+ ionty a mění elektronovou konfiguraci, která způsobí změnu absorpčního spektra.

Indikátor pH, v našem případě bromokresolová zeleň (BCG), v roztoku částečně disociuje podle vzorce

$$C_{BCG} = [HI] + [I^-] \quad (3.20)$$

kde $[HI]$ je koncentrace kyselé formy indikátoru, $[I^-]$ - koncentrace alkalické formy a C_{BCG} - celková koncentrace indikátoru.

Normalizováním koncentrace kyselé a alkalické formy na celkovou koncentraci C_{BCG} získáme hodnoty α_0 a α_1 , což jsou disociační frakce, jinak řečeno poměrné zastoupení obou forem indikátoru, a jejich součet je 1:

$$1 = [HI]/C_{BCG} + [I^-]/C_{BCG} = \alpha_0 + \alpha_1 \quad (3.21)$$

Poměr alkalické a kyselé formy indikátoru se mění podle pH roztoku podle disociační rovnice

$$K_{BCG} = ([\text{H}^+] \times [I^-]) / [HI] \quad (3.22)$$

kde K_{BCG} je disociační konstanta indikátoru a $[\text{H}^+]$ - koncentrace H^+ iontů.

Pokud jsou absorpční spektra alkalické a kyselé formy rozdílná, změna pH způsobí změnu absorpčního spektra vzorku a tudíž i změnu barvy. Změnu pH lze měřit spektroskopicky ze

změn absorpčního spektra. Absorbance roztoku pH indikátoru A_{BCG} je úměrná součtu absorbancí obou forem indikátoru:

$$A_{BCG}(\lambda) = A_{HI}(\lambda)[HI]d + A_{I^-}(\lambda)[I^-]d \quad (3.23)$$

kde A_{HI} je molární absorpční koeficient kyselé formy, A_{I^-} - molární absorpční koeficient alkalické formy indikátoru a d - optická dráha paprsku ve vzorku.

Optickou dráhu budeme dále uvažovat rovnou 1 a nebudeme ji uvádět. Jak molární absorpční koeficient, tak absorbance jsou závislé na vlnové délce světla λ .

3.3.5.2 Výpočet pH z absorpčních spekter

Celková absorbance vzorku je ovlivněna koncentrací rozptylujících částic. Rozptyl světla na těchto částicích snižuje intenzitu světla procházejícího vzorkem a tím zvětšuje naměřenou hodnotu absorbance vzorku:

$$A_{BCG}(\lambda) = A_{HI}(\lambda)[HI] + A_{I^-}(\lambda)[I^-] + A_{YEAST}(\lambda) \quad (3.24)$$

Pro nízké koncentrace rozptylujících částic je naměřená hodnota absorbance $A_{YEAST}(\lambda)$ (bez absorbující látky) úměrná koncentraci částic a celková naměřená absorbance vzorku $A(\lambda)$ je dána součtem absorbance způsobené absorpcí světla na barevném indikátoru $A_{BCG}(\lambda)$ (v našem případě BCG) a absorbance způsobené rozptylem na částicích $A_{YEAST}(\lambda)$ (v našem případě kvasnice):

$$A(\lambda) = A_{BCG}(\lambda) + A_{YEAST}(\lambda) \quad (3.25)$$

Pro vyšší koncentrace rozptylujících částic již tato rovnice neplatí a vliv rozptylu na naměřená spektra je komplexní. Absorpční spektrum není pouze posunuto k vyšším hodnotám, ale je také zploštěné ve srovnání se spektry bez rozptylujících částic (Amesz [4]).

Pokud se budeme při měření pohybovat v rozmezí nízkých koncentrací rozptylujících částic, kde platí rovnice 3.25, je možné naměřené spektrum vzorků kvasnic s přidaným pH indikátorem BCG považovat podle rovnic 3.24 a 3.25 za součet spekter

$$A_{BCG}(\lambda) = A_{HI}(\lambda)[HI] + A_{I^-}(\lambda)[I^-] + A_{YEAST}(\lambda) \quad (3.26)$$

Pokud naměřené spektrum $A(\lambda)$ rozložíme do spekter alkalické a kyselé formy BCG a kvasnic, získáme koeficienty ac, al , které jsou přímo úměrné zastoupení obou forem BCG ve vzorku ($[HI]$, $[I^-]$) a koeficient p je úměrný zastoupení spektra kvasnic bez indikátoru (viz rovnici 3.27):

$$A(\lambda) = al \times A_{HI}(\lambda) + ac \times A_{I^-}(\lambda) + p \times A_{YEAST}(\lambda) \quad (3.27)$$

Zavedeme koeficient R :

$$R = (al - ac)/(al + ac) \quad (3.28)$$

Součet koeficientů $ac + al$ odpovídá celkové koncentraci indikátoru ve vzorku (C_{BCG}). Zavedeme-li do rovnice (3.28) poměrné zastoupení jednotlivých forem BCG ve spektru, dostaneme výsledek, kde koeficient R odpovídá rozdílu disociačních zlomků zavedených v rovnici 3.21:

$$R = \alpha_0 - \alpha_1 \quad (3.29)$$

Použitím rovnice 3.21 dostaneme vzájemný vztah mezi koeficientem R a disociačním zlomkem:

$$R = 1 - 2 \times \alpha_1 \quad (3.30)$$

Vzhledem k tomu, že poměrné zastoupení jednotlivých forem BCG (α_o, α_I) nabývá hodnot 0 až 1, koeficient R nabývá hodnoty od -1 do 1.

Kombinací rovnic pro disociační rovnováhu s definicemi hodnot pH, pK a definicí zavedeného koeficientu R dostaneme teoretický vztah pro výpočet hodnot pH z vypočteného koeficientu R :

$$pH = pK + \log\left(\frac{R+1}{1-R}\right) \quad (3.31)$$

Koeficient R by měl být v oblasti, kde jsou spektra lineárně závislá na koncentraci BCG, nezávislý na koncentraci BCG ve vzorku (C_{BCG}) a měl by být jednoznačnou funkcí pH vzorku. Navrhovaný postup vyhodnocení naměřených spekter a výpočet hodnoty pH_{calc} je následující:

- Rozložení naměřeného spektra metodou PLS do báze tvořené 3 vektory. Vektory báze tvoří spektrum acidické formy BCG, spektrum alkalické formy BCG a spektrum kvasnic.
- Výpočet koeficientu R ze získaných koeficientů zastoupení jednotlivých spekter báze podle vzorce 3.28.
- Výpočet pH_{calc} z koeficientu R podle rovnice 3.31.

(Vzhledem k nepřesnosti pH metru a neznalosti přesné hodnoty pK najdeme přesný tvar kalibrační křivky $pH_{calc} = pH(R)$ z naměřených spekter na vzorcích BCG se známou hodnotou pH).

Tímto postupem získáme z naměřených spekter hodnotu pH_{calc} , která by měla být v určitém rozsahu koncentrace BCG a kvasnic na nich nezávislá.

3.3.6 Sedimentace částic

Na částice v kapalině působí tři síly - gravitační síla G , vztlak kapaliny F_v a odporová síla F_o prostředí. Pokud je gravitační síla v rovnováze se vztlakem, částice se vznáší, pokud je gravitační síla působící na částici větší než vztlak, částice klesá ke dnu nádoby, sedimentuje. Pokud je vztlak větší než gravitace, částice stoupá k hladině. Dále budeme uvažovat sedimentující částice. Odporová síla prostředí na pohybující se částici vzrůstá s rychlostí pohybu, proto během krátké doby dojde k vyrovnání sil působících na částici, a ta dále sedimentuje konstantní rychlostí v .

Gravitační sílu G působící na částici můžeme popsat rovnicí

$$G = mg = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho g \quad (3.32)$$

kde m je hmotnost tělesa a g - gravitační zrychlení.

V dalším odvození budeme částici považovat za kulovou s homogenní hustotou ρ a poloměrem r . Vztlaková síla F_v působící na kulovou částici je dána rovnicí

$$F_v = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho_v g \quad (3.33)$$

kde ρ_v je hustota kapaliny, v které se částice pohybuje. Odporovou sílu F_o působící na pohybující se kulovou částici je možné popsat pomocí rovnice

$$F_o = 6\pi r \eta v \quad (3.34)$$

kde η je viskozita kapaliny a v - rychlost pohybu částice vůči kapalině. Odporová síla se rovná rozdílu gravitační a vztlakové síly.

$$G - F_v = F_o \quad (3.35)$$

Dosažením z rovnic 3.32 až 3.34 do rovnice 3.35 dostaneme rovnici pro určení rychlosti v sedimentující kulové částice v závislosti na hustotě a poloměru částice a hustotě a viskozitě kapaliny:

$$v = \frac{2g(\rho - \rho_v)r^2}{9\eta} \quad (3.36)$$

Tato rovnice se jmenuje Stokesův zákon a platí pro hladké pevné kulové částice pohybující se v kapalině pomalou rychlostí (kapalina obtéká částici laminárně).

Ze Stokesova zákona (3.36) je zřejmé, že rychlost sedimentace je závislá na hustotě a velikosti částic. Sedimentace částic samozřejmě závisí i na dalších parametrech, např. na tvaru (s tvarem se mění odporový koeficient) a pórovitosti. V našem případě tyto vlivy zanedbáme. Pokud mají částice stejnou hustotu, rozdělí se v objemu vzorku sedimentací podle velikosti. Větší částice sedimentují rychleji a vypadnou proto rychleji z objemu vzorku. Metodu sedimentace lze využít pro určení velikostní distribuce částic.

Na začátku experimentu předpokládáme homogenní rozložení částic ve vzorku. Částice budeme detekovat ve vzdálenosti h od hladiny. Od začátku měření sedimentují částice o poloměru r rychlostí v danou Stokesovým zákonem paralelně v celém objemu. Od hladiny se posunuje rozhraní, nad kterým se částice o poloměru r nevyskytují. Toto rozhraní částic projde v čase t místem detekce podle rovnice

$$v = \frac{h}{t} \quad (3.37)$$

V každém čase měření vypadnou z měřicího objemu částice sedimentující různou rychlostí. Pokud dosadíme do rovnice 3.37 hodnotu rychlosti ze Stokesova zákona (3.36), dostaneme vztah mezi poloměrem částice r a časem, kdy vypadne z měřicího objemu vzorku:

$$r = \sqrt{\frac{h9\eta}{t2g(\rho - \rho_v)}} \quad (3.38)$$

Pokud poloměr částice převedeme na plochu průřezu kulové částice S , dostaneme rovnici

$$S = \frac{h9\eta\pi}{t2g(\rho - \rho_v)} \quad (3.39)$$

Rovnice 3.38 a 3.39 udávají jednoznačný vztah mezi časem měření t , poloměrem r a průřezem S kulových částic, jejichž sedimentační rozhraní se v čase t nachází ve výšce h od hladiny.

K detekci změn koncentrace částic ve vzorku je možné využít elastický rozptyl světla. Změna zákalu naměřená v čase t odpovídá úbytku koncentrace částic v měřicím objemu v daném čase. K měření je možné využít kanály měřící intenzitu rozptylu – nefelometrický (N), dopředný (F), i změnu transmisního signálu. Pokud budeme brát do úvahy pouze vzorky s nízkou koncentrací částic, kde nedochází k vícenásobnému rozptylu, můžeme u rozptylových signálů změnu koncentrace částic vypočítat derivací zákalu podle času; u transmisního

signálu platí Lambert-Beerův zákon (rovnice 3.16) a změna koncentrace je dána derivací absorpance podle času.

Derivaci časového průběhu intenzity rozptylu resp. absorpance označíme $dZ(t)$. Převedením časové osy sedimentace podle rovnice 3.38 na poloměr r (nebo podle rovnice 3.39 na plochu průřezu S) získáme křivku $dZ(r)$, která říká, jakou část zákalu způsobují částice různé velikosti. Tato křivka koreluje se zastoupením částic ve vzorku podle velikosti $D(r)$. Částice různých velikostí rozptylují záření s různou intenzitou. Námí naměřená distribuce částic $dZ(r)$ je vynásobena závislostí intenzity rozptylu (nebo účinným průřezem rozptylu pro transmisí) na poloměru částice $I(r)$. Skutečnou distribuci velikostí částic $D(r)$ získáme podělením podle rovnice

$$D(r) = \frac{dZ(r)}{I(r)} \quad (3.40)$$

V reálném případě je závislost intenzity rozptylu $I(r)$ těžko určitelná, při výpočtech se používají pouze přibližné vztahy vycházející z Mieovy teorie rozptylu.

Dalším faktorem, který ovlivňuje výpočet distribuce částic, je konečná nezanedbatelná výška měřicího paprsku. V jednom okamžiku vypadávají z měřicího objemu částice sedimentující v určitém rozmezí rychlostí, odpovídající výšce měřicího objemu. Křivka $dZ(t)$ je dána integrací distribuce $D(r) \cdot I(r)$ přes interval velikostí částic odpovídající výšce měřicího objemu.

Z těchto důvodů je přesný výpočet distribuce velikostí částic velmi složitý a postrádá i praktický význam. V našich aplikacích nás zajímají především změny distribucí velikostí částic, které signalizují změny důležitých vlastností měřeného vzorku.

4 PŘÍSTROJE A METODY MĚŘENÍ

4.1 APARATURA DATTS 2000

Měření byla provedena na aparatuře DATTS 2000 (Dual angle turbidimetric and titrimetric systém) s upravenou konfigurací pro daný typ měření. Optická měřicí komora aparatury je chráněna patentem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR č.299354 ze dne 21.5.2008.

DATTS 2000 je aparatura určená pro široké spektrum aplikací v pivovarském, vinařském a vodárenském průmyslu. Základním a samostatně funkčním přístrojem sestavy je zákaloměr MZN-2002, využívající principu měření elastického rozptylu světla pod dvěma úhly k měření charakteristiky rozptylujících částic ve vzorku v širokém rozsahu koncentrací. Zákaloměr je možné řídit pomocí autorem vyvinutého softwaru MZN CONTROL pro PC pracující pod operačními systémy Windows 9x, XP, 2000 a Vista. Software komunikuje se zákaloměrem po sériové lince RS232 a umožňuje připojení a řízení širokého spektra externích modulů, které rozšiřují možnosti zákaloměru.

K základním modulům ovladatelným pomocí MZN Control patří 3 typy pístových dávkovacích pump a 2 typy peristaltických pump, které se liší cenou, přesností a rozsahem rychlostí dávkování. Pumpy jsou využívány jako dávkovače titrantu ve speciálních titračních aplikacích. Kromě titračních reakcí detekovaných zákaloměrem je po připojení pH metru nebo iontově selektivních sond možné provádět i pH titrace. Software umožňuje i připojení a ovládání externího termostatu pro řízení teploty lázně v zákaloměru a spínání magnetického míchání vzorku. Při připojení pH metru a mikroprocesorem řízené pumpy s proměnnou rychlostí dávkování je možné provádět i titrace na konstantní pH, tzv. pH-statové titrace.

Na obr.4.1 je znázorněna jedna z možných konfigurací aparatury DATTS. Zákaloměr MZN je doplněn o dávkovací pumpu NE500 a modul pro měření vzorků o objemu 5ml v laboratorních zkumavkách s integrovaným magnetickým míchadlem.



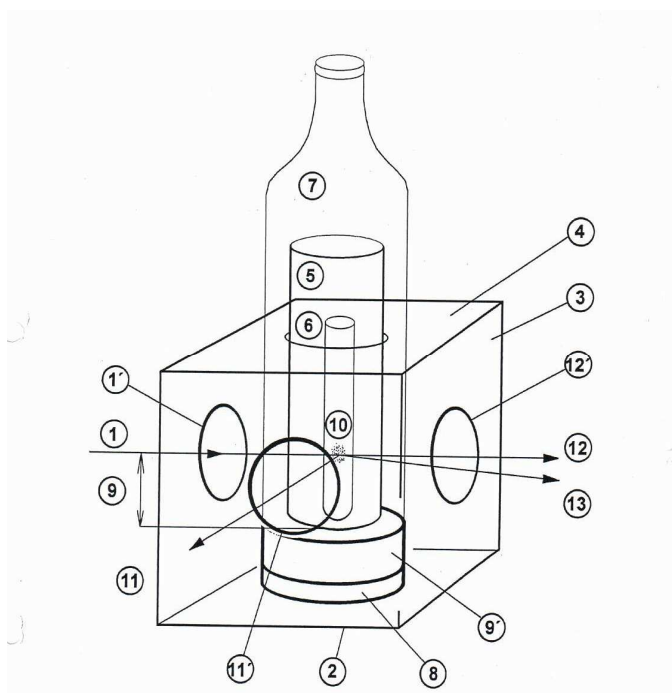
Obr.4.1 - Aparatura DATTS 2000 - jedno z možných uspořádání

4.1.1 Zákalometr MZN-2002

Zákalometr MZN-2002 je plně automatizovaný přístroj, který slouží k měření zákalu kapalin. Je vhodný zvláště pro sledování čírosti nápojů v kontrolních a výzkumných laboratořích potravinářského průmyslu, jakož i pro sledování čistoty vod a některých produktů biotechnologických procesů. Dovoluje měření velikosti zákalu vzorků jak ve speciálních kyvetách, tak přímo v uzavřených lahvích. Přístroj je kalibrován podle mezinárodně používané standardní

suspenze formazinu v nejčastěji používaných zákaloměrných jednotkách EBC [6], NTU a ppm, jejichž použití lze programově navolit.

Obecné schéma měřicí komory zákalometru je znázorněno na obr.4.2.



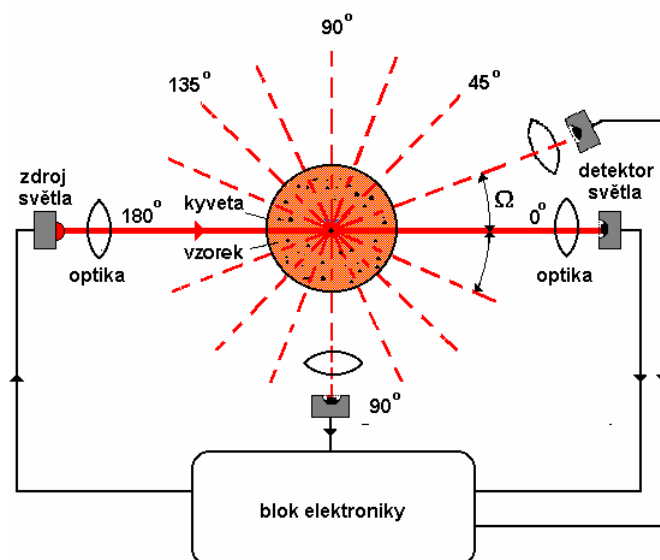
Kolimovaný optický svazek (1) vstupuje přes okénko (1') do měřicí komory (2), která je naplněna čistou imersní termostatující kapalinou (3). Komora je zakryta ochranným krytem (4) se středícím kroužkem pro vybraný typ měřicí nádoby. Jako měřicí nádobu lze použít normovanou kyvetu (5), laboratorní zkumavku o průměru od 15 mm nebo uzavřenou komerční láhev s průměrem do 100 mm. Měřicí nádoba je umístěna na otočné desce (8), která zajišťuje v případě potřeby průběžné otáčení nádoby během měření. Světlo rozptýlené na částicích ve vzorku je detekováno pod úhlem 90° (nefelometrie (11)) a pod úhlem 12° (dopředný směr (13)). Zároveň je detekována i intenzita světla prošlého (12).

Obr.4.2 - Schéma měřicí komory zákaloměru MZN 2002

Měřicí komora zákaloměru pro měření v uzavřených lahvích a současně v komerčních kyvetách je rovněž chráněna patentem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR č.299354 ze dne 21.5.2008.

Zákal kapaliny se v typu MZN-2002 určuje na základě měření intenzity světla rozptýleného ve vzorku pod úhlem 90° (U_n - nefelometrie) a z intenzity světla rozptýleného pod úhlem 12° (U_f – forward), vzhledem ke směru šíření původního světelného svazku. Do jisté koncentrace rozptylujících částic (pro daný úhel rozptylu) platí, že s růstem koncentrace roste i intenzita rozptýleného záření, která přirozeně závisí na intenzitě vstupního excitačního světelného svazku. Proto i každá změna jeho intenzity v důsledku jiných příčin, než je změna rozptylových charakteristik, vyvolá změnu intenzity rozptýleného světla. Tyto příčiny jsou změna výkonu světelného zdroje, zanášení okének a optických prvků a zvláště absorpce světla ve vzorku. Aby bylo možné tyto nežádoucí vlivy odstranit, měří se v přístroji zároveň i intenzita světla v tzv. transmisním kanálu - tj. intenzita světla prošlého vzorkem v přímém směru (U_t - transmise). Konstrukcí přístroje je zajištěno, že optické dráhy pro procházející i rozptýlený paprsek jsou stejné, takže změny intenzity sondujícího svazku nepříslušející rozptylu se projeví stejnou měrou jak v rozptylových (U_n , U_f) kanálech, tak v kanálu transmisním (U_t).

Poměr hodnot U_n/U_t výstupních signálů fotodetektorů z nefelometrického kanálu (kanál dále označován N) a transmisního kanálu (kanál dále označován T) udává tzv. relativní zákal P_n , který je nezávislý na výše uvedených faktorech. Tento relativní zákal je pak pomocí kalibrační křivky uložené v paměti přístroje přepočten na hodnotu zákalu standardní kalibrační zákaloměrné suspenze v nefelometrickém kanálu Z_{90} . V dopředném směru (dále označován F) poměr hodnot výstupních signálů fotodetektorů z dopředného kanálu U_f a transmisního kanálu U_t udává tzv. relativní zákal P_f , který je pomocí kalibrační křivky přepočten na hodnotu zákalu v dopředném směru Z_{12} (viz Obr.4.3).



Obr.4.3 - Blokové schéma optiky zákaloměru

V základním provedení je standardní látkou formazinová suspenze a na displeji přístroje se zákal zobrazuje v mezinárodních jednotkách EBC. V závislosti na užití verzi programu řídícího mikropočítače lze případně volit i mezi jednotkami EBC, NTU a ppm a volit i jazyk komunikace na displeji mezi češtinou, angličtinou a němčinou.

Měření zákalu má velký význam zvláště při výrobě nápojů v potravinářském průmyslu. Zákalometr dává možnost objektivně kvantifikovat čírost nápojů jako jeden z parametrů finálních produktů i meziproduktů.

Sledování časového vývoje zákalu ve vzorcích v uzavřených komerčních obalech přináší navíc informace o jejich stárnutí. Běžná nápojová láhev není přesnou laboratorní kyvetou. Láhev velmi často vykazuje značnou ovalitu, nerovnoměrnou tloušťku stěn, nestejně zabarvení, použité sklo je z hlediska svých optických vlastností silně nehomogenní a navíc v důsledku běžného používání bývá povrch lahví často mechanicky poškozen. Z těchto důvodů není láhev příliš vhodná pro přesná optická měření. Navíc je každá skleněná nádoba se zakřiveným povrchem, naplněná kapalinou (vodou), sama optickým prvkem (čočkou), takže ovlivňuje šíření světelného paprsku.

Pro odstranění „Čočkového“ efektu je prostor okolo láhve v měřicí komoře vyplněn vhodnou imersní kapalinou - tj. kapalinou s indexem lomu blízkým indexu lomu skla, v případě zákalometru MZN čistou destilovanou vodou. Defekty vyskytující se na jednotlivé láhvi lze považovat v převážné míře za náhodně rozložené po jejím obvodu. K potlačení jejich vlivu je proto zapotřebí provést více měření v různých místech po obvodu láhve a jako výslednou hodnotu vzít průměr z těchto měření. V zákalometru MZN je za tímto účelem láhev umístěna na otočném podstavci, který je poháněn motorkem. Během jedné otáčky láhve se provede až několik set měření, které se statisticky zpracovávají (průměrování, odstranění odchylek atd.). Naplnění měřicí komory imersní kapalinou umožňuje její teplotní stabilizaci pomocí externího termostatu.

Jako světelného zdroje se využívá LED SSC R10192 od firmy Seoul Semiconductor s příkonem 1 W a optickým výkonem 30 lm, svítící na vlnové délce 625 nm s pološířkou 30 nm. V případě potřeby je možné použít i halogenovou lampu OSRAM. Pomocí optiky je světlo fokusováno do středu komory. Intenzita transmisního a rozptylových signálů se měří pomocí Si fotodiod Hamamatsu. Fotodiody jsou připojeny na DC předzesilovače vlastní produkce. Signál z předzesilovače je veden do desky zesilovačů rovněž vlastní produkce, která

umožňuje připojení až 4 měřících kanálů. Signály ze zesilovače jsou zpracovávány AD převodníkem na desce mikroprocesoru. Mikroprocesor sbírá data AD převodníku, řídí spínání světelného zdroje, spínání otáčení vzorku a přepínání rozsahů zesilovačů.

4.1.2 MZN CONTROL software

MZN Control software byl vyvinut autorem této práce speciálně pro ovládání aparatury DATTS 2000. Podobně jako celá aparatura DATTS je i software modulární a umožňuje implementovat moduly pro ovládání různých nezávislých měřících přístrojů po sériovém rozhraní RS232.

Program MZN CONTROL má tyto základní funkce:

- externí řízení zákalometru MZN 2002 pro měření zákalů vzorků v různých režimech měření,
- ovládání dalších modulů aparatury DATTS (dávkovací pumpy, termostat, pH metr),
- zobrazování měřených dat na obrazovce PC ve formě grafu,
- ukládání měřených dat,
- matematické zpracování naměřených dat.

Program byl zpracován v programovacím jazyku Delphi a přeložen do *exe* souboru pro operační systémy Windows 9x, NT, 2000 a XP. Do programu byly implementovány tři základní měřící režimy, které pokryjí široké spektrum různých analytických metod.

Kinetický mód měření - měření vzorků v závislosti na čase

V tomto režimu je měření automaticky spouštěno v pravidelných uživatelem navolených časových intervalech. Naměřené hodnoty se ukládají do souboru a vynášejí na obrazovku v závislosti na čase. Kinetický mód se používá např. v těchto aplikacích:

- sedimentace kvasinek (křemelin),
- flokulace kvasinek,
- kinetika vývoje a rozpouštění chladového zákalu piva a meziproductů,
- acidifikační test vitality kvasnic,
- deflokulační test vitality kvasnic.

Titrační mód měření - měření vzorků v závislosti na dávce titrantu

V tomto režimu je měření zákalu spouštěno v pravidelných uživatelem navolených intervalech. V závislosti na rychlosti dávkování titračního činidla se do vzorku automaticky určuje dávka titrantu v okamžiku měření. Na ose x grafu pak nevystupuje čas, ale jednotky spojené s dávkou titrantu ve vzorku. Pokud je v systému zapojena pumpa s proměnnou rychlostí dávkování (NE1000), umožňuje program změnu rychlosti dávkování titrantu během testu v závislosti na metodice testu. Titrační mód se používá např. v těchto aplikacích:

- síranový test koloidní stability piva (SASPL),
- test na obsah tanoidů podle Chapona (PVP test),
- test na obsah citlivých proteinů v pivu (SP test),
- titrační acidifikační test vitality kvasnic (TAP) .

Statistický mód měření – měření souboru vzorků

V tomto režimu je každé měření zákalu jednotlivého vzorku z reprezentativního souboru spouštěno uživatelem z PC jako samostatné s tím, že výsledně se hodnotí soubor vzorků jako celek. Statistický mód se používá např. v těchto aplikacích:

- přirozené stárnutí sady vzorků piv v uzavřených lahvích,

- zrychlené stárnutí sady vzorků piv v uzavřených lahvích,
- alkoholový chladový test [9,50,77],
- chladový zákal sady vzorků piv.

Matematické zpracování naměřených dat

Vyhodnocení naměřených dat závisí na typu prováděného testu. Výsledky měření sady vzorků ve statistickém módu je možné v softwaru vyhodnotit pomocí základních statistických funkcí. Ve statistickém modulu jsou implementovány funkce průměr, směrodatná odchylka, korelace dat.

Výsledkem měření v titračním a kinetickém módu jsou křivky vývoje zákalu, pH a dalších měřených veličin v závislosti na čase nebo na dávce titrantu. Křivky naměřených dat je možné proložit regresními funkcemi odpovídajícími dané aplikaci a navrženému modelu.

K optimálnímu proložení teoretickými křivkami byl naprogramován speciální modul v programovacím jazyce Delphi. Naměřená data (závislá proměnná, zákal, pH atd.) jsou uložena ve formě vektorů. Optimální proložení naměřených dat se provádí metodou lineární regrese s minimem kvadratických odchylek (Wikipedia [123]). V případě, že rovnice teoretické křivky nelze rozložit do součtu nezávislých členů, byla metoda lineární regrese kombinována s iteračním výpočtem.

4.2 ANALYTICKÉ METODY

4.2.1 Nefelometrické titrační testy předpovědi koloidní stability piva

Měření byla prováděna na aparatuře DATTS 2000, řízené programem MZN Control. K dávkování titrantu bylo použito pístové pumpy NE1000. Titrant byl dávkován z 20 ml plastové stříkačky Brand přes hadičky z tygonu R3603, neprostupné pro plyny. Měření byla prováděna ve zkumavce na vzorcích o objemu 5 ml. Adaptér pro zkumavky byl vybaven magnetickým míchadlem s řízeným spínáním a rychlostí otáčení 250 rpm (round per minute). Imersní kapalina byla termostatována na požadovanou teplotu pomocí externího termostatu CTB06C od firmy Labio a.s., Praha. Měření byla provedena v titračním módu.

4.2.1.1 Příprava vzorků

Ke všem měřením byly použity vzorky světlého piva plzeňského typu (12° ležák s 5%-ním obsahem alkoholu). Pivo bylo vyrobeno standardní dvoustupňovou technologií kvašením a ležením v cylindricko-konických tancích (CKT). Vzorky byly získány přímo od výrobce. Byly stabilizovány regenerovatelným PVPP (ISP Global Technologies, DE) a Stabifixem Strong podle potřeby. Aby byly vzorky piv zbaveny oxidu uhličitého, byly před měřením třepány po dobu 30 minut na třepačce a poté ponechány 15 minut stát při pokojové teplotě. Tento postup odpovídá standardnímu postupu zavedenému v pivovarské analytice a prováděnému v pivovarských laboratořích.

4.2.1.2 Síranový test koloidní stability piva (SASPL)

(dle analytiky MEBAK[78] a IOB [51])

Vzorky a činidla:

- vzorek testovaného piva (5 ml) zbavený CO₂ ;
- SASS - nasycený roztok síranu amonného – zásobní roztok se připraví rozpuštěním krystalického síranu amonného (firma Merck, čistota p.a.) při laboratorní teplotě za stálého míchání: 820 g (NH₄)₂SO₄ v 1 litru destilované vody; po rozpuštění se přidá tolik gramů (NH₄)₂SO₄,

aby na dně zůstalo nerozpuštěno několik krystalků. Zásobní roztok je možné uchovávat neomezeně.

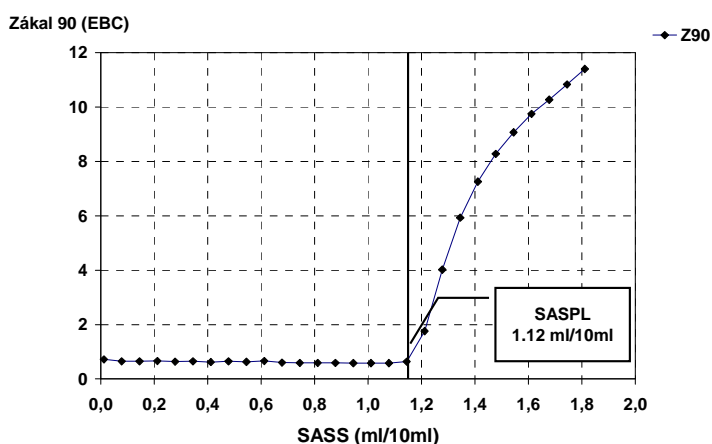
Pracovní postup:

Objem 5 ml odplyněného vzorku se nadávkuje do kyvety s připraveným magnetickým míchadlem a umístí v měřicí komoře DATTS 2000. Titrant je dávkován pístovou pumpou NE1000 konstantní rychlostí 6 ml SASS za hodinu. Vzorek je kontinuálně míchán magnetickým míchadlem rychlostí 200 otáček za minutu.

Až do určité koncentrace SASS se zákal vzorku nemění nebo naopak klesá (proces vsolování). Od určité koncentrace vyvolává přídavek SASS tvorbu zákalu. Práh vysolení (SASPL – Saturated Ammonium Sulphate Precipitation Limit) je definován jako množství SASS potřebné ke vzniku registrovatelného zákalu.

Vyhodnocení:

Typický průběh křivky vývoje zákalu během dávkování SASS do vzorku je znázorněn na obr.4.4. Práh vysolení je označen svislou čarou. V programu MZN Control je implementováno automatické vyhodnocení prahu vysolení jako bod, ve kterém dojde k maximální změně 1.derivace naměřených hodnot. Výsledek se udává v ml SASS na 10 ml původního vzorku. Výsledek SASPL testu na ukázkovém grafu je 1,12 ml SASS/10 ml.



Obr.4.4 - Typický průběh vývoje nefelometrického zákalu v průběhu SASPL testu

4.2.1.3 Test na obsah tanoidů podle Chapona (PVP test)

(dle analytiky MEBAK[79])

Vzorky a činidla:

- vzorek testovaného piva (5 ml) zbavený CO₂ ;
- roztok PVP K90 o koncentraci 0,4 g/litr - zásobní roztok se připraví rozpuštěním odváženého množství 0,4 g PVP K90 (firma ISP Inc.) v 1 litru destilované vody. Zásobní roztok je možné uchovávat po dobu 6 měsíců při pokojové teplotě v temnu.

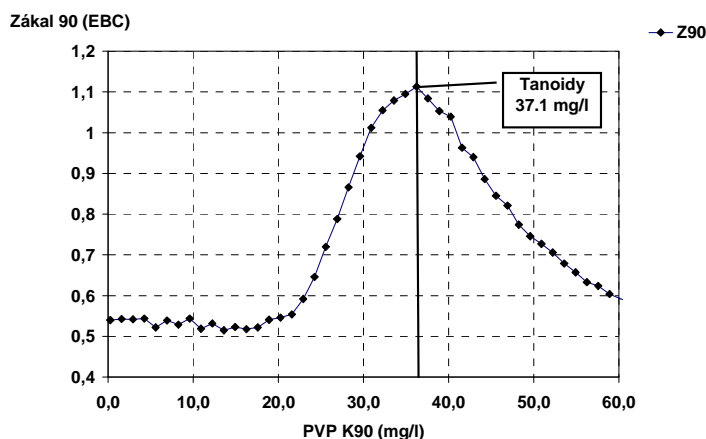
Pracovní postup:

Jako titrační činidlo je zde použit vodní roztok PVP K90 o koncentraci 0,4 g/l. Objem 5 ml odplyněného vzorku se nadávkuje do kyvety s připraveným magnetickým míchadlem a umístí v měřicí komoře DATTS 2000. Titrant je dávkován pístovou pumpou NE1000 konstantní rychlostí (při standardních podmínkách 1,8 ml/hod). Vzorek je kontinuálně míchán magnetickým míchadlem rychlostí 200 otáček za minutu.

Tanoidy se váží na PVP, vzniká zákal, jehož velikost se zvyšuje tak dlouho, až všechny přítomné tanoidy vytvoří s PVP komplexy. Při dalším dávkování PVP hodnota zákalu klesá. Množství PVP, které se musí přidat k dosažení maxima zákalu, je proporcionální obsahu tanoidů. Vývoj zákalu (v jednotkách EBC) v závislosti na množství přidaného PVP do vzorku (v jednotkách mg PVP / litr původního vzorku) se měří nefelometricky.

Vyhodnocení:

Typický průběh křivky vývoje zákalu během dávkování roztoku PVP K90 do vzorku je zobrazen na obr.4.5. Bod dosažení maxima nefelometrického zákalu je označen svislou čarou. Výsledek testu se udává v mg PVP K90 na 1 litr původního vzorku dodaného do vzorku k dosažení maximu zákalu. Výsledek testu na ukázkovém grafu je 37,1 mg PVP K90/1l.



Obr.4.5 - Typická křivka vývoje nefelometrického zákalu v průběhu PVP testu

4.2.1.4 Test na citlivé proteiny (SP test)

(dle Analytiky EBC[8] a IOB [49])

Vzorky a činidla:

- vzorek testovaného piva (5 ml) zbavený CO₂ ;
- roztok taninu (Tanic acid p.a., firma Merck) o koncentraci 0,2 g/litr - zásobní roztok se připraví rozpuštěním odváženého množství 0,02 g taninu v 100 ml destilované vody. Zásobní roztok je nutné připravovat denně.

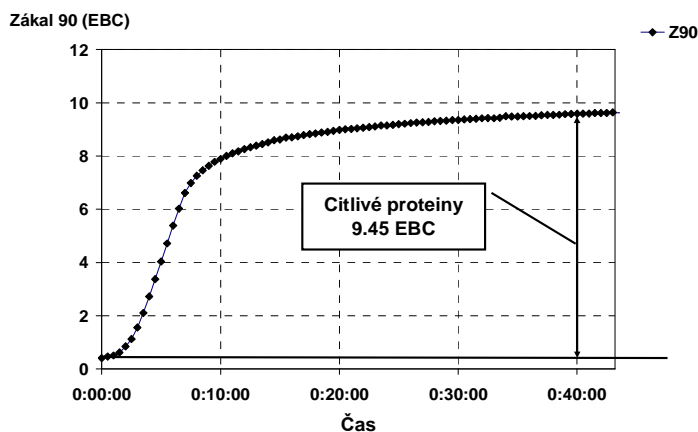
Pracovní postup:

Jako titrační činidlo je zde použit vodní roztok taninu o koncentraci 0,2 g/l. Objem 5 ml odplyněného vzorku se nadávkuje do kyvety s připraveným magnetickým míchadlem a umístí v měřicí komoře DATTS 2000. Titrant je dávkován pístovou pumpou NE1000 konstantní rychlostí (*Analytika EBC* doporučuje dávkování po kapkách - „Drop by drop“). Do vzorku je nadávkováno 0,25 ml roztoku taninu, konečná koncentrace taninu ve vzorku je pak 10 mg/litr vzorku. Vzorek je kontinuálně míchán magnetickým míchadlem rychlostí 200 otáček za minutu.

Citlivé proteiny v pivu jsou látky, které se vyznačují nejsilnější afinitou k taninům a reagují s nimi za vzniku zákalů. Citlivé proteiny v měřeném vzorku tvoří s nadávkováním taninem komplexy, zvyšuje se měřený zákal. Hodnota vzniklého zákalu je úměrná obsahu citlivých proteinů ve vzorku (čím větší zákal, tím více proteinů).

Vyhodnocení:

Typický průběh křivky vývoje zákalu po nadávkování roztoku taninu do vzorku je zobrazen na obr.4.6. Výsledná hodnota zákalu se odečítá ve 40.minutě od začátku měření, kdy již dojde k ustálení hodnoty. Výsledkem testu je rozdíl hodnot nefelometrického zákalu před přidáním taninu a 40 minut po přidání taninu s cílovou koncentrací 10 mg/litr vzorku, udávaný v jednotkách EBC.



Obr.4.6 - Typická křivka nefelometrického zákalu v průběhu SP testu

4.2.2 Metoda tepelného šokování pív

Definice měřených hodnot zákalů

Pro hodnocení vývoje zákalu piva v průběhu stárnutí jsme použili hodnoty celkového $Z90_{all}$, chladového $Z90_{chill}$ a permanentního zákalu $Z90_{room}$, definované podle teploty měření, v souladu se zavedenými metodami pivovarských analýz (EBC [7], IOB [48], ASBC [2]). Všechny hodnoty zákalu byly měřeny v nefelometrickém kanále. Permanentní zákal byl měřen při teplotě 20°C, celkový zákal při teplotě 0°C; chladový zákal byl dán rozdílem hodnoty celkového a permanentního zákalu $Z90_{chill} = Z90_{all} - Z90_{room}$ a odpovídal hodnotě zákalu, který se rozpustil při zahřátí vzorku z 0°C na pokojovou teplotu 20°C.

Přístroje

Tepelné stárnutí vzorků bylo prováděno v kapalinových termostatech MTB40C (Labio s.r.o., Praha) s přesností nastavení teploty $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Stárnutí při teplotě 60°C a inkubace chladových zákalů při 0°C šoků byly prováděny v oddělených kapalinových termostatech. Nefelometrické zákalové Z90 byly měřeny na aparatuře DATTS se zdrojem světla červenou LED diodou (vlnová délka 630nm).

Vzorky

Vzorky pív byly v standardních 0,5 l lahvích NRW.

Volba časových a teplotních režimů stárnutí

Před prvním šokováním byly vzorky umístěny na 24 hodin při teplotě 0°C a byl změřen původní celkový zákal vzorků před začátkem cyklování. Vzorky byly vytemperovány na pokojovou teplotu 20°C a byly změřeny hodnoty původního permanentního zákalu. Po změření původních zákalů byly vzorky vystaveny následujícímu 48 hodinovému cyklu: nejdříve byly umístěny v termostatu a vystaveny působení teploty 60°C po dobu 24 hodin, poté byly přemístěny do studené lázně a udržovány po 24 hodin na teplotě 0°C. Potom byly změřeny hodnoty celkového zákalu, vzorky byly vytemperovány na pokojovou teplotu 20°C a změřeny hodnoty permanentního zákalu. Celý 48tihodinový cyklus se opakoval podle rychlosti stárnutí vzorků.

4.2.3 Metoda testu acidifikační síly (AP test) pro měření vitality kvasnic

4.2.3.1 Kmen kvasinek

Experimenty byly prováděny se spodně kvasícím kmenem 95 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, který se používá v pivovarech SAB-MILLER v České republice. V experimentech byly použity provozní vzorky kvasinek z propagační stanice a další vzorky po jednom, dvou a třech nasazeních v provozních cylindrokoničných tancích (CKT) pivovaru.

4.2.3.2 Modifikace aparatury pro měření AP testu (YATA)

AP test byl prováděn na aparatuře YATA, která je modifikací aparatury DATTS. Aparatura byla zkonstruovaná na Matematicko-fyzikální fakultě v Praze v oddělení optotermální spektroskopie a rozptylu světla. Autor této práce je spoluautorem aparatury.

Měřicí komora aparatury je naplněna imersní kapalinou, která je termostatována externím termostatem Labio, s.r.o, Česká republika. Komora je vybavena magnetickým míchadlem s proměnnou rychlostí otáček. pH ve vzorku je měřeno pH metrem PHI-04 od firmy Labio, s kombinovanou elektrodou Theta 90 HC133. K dávkování titrantu je použita dávkovací pumpa s proměnnou rychlostí dávkování NE1000 od firmy New Era Pump Systems, USA. Všechny součásti aparatury jsou programově řízeny z PC přes sériový port RS232 pomocí speciálního softwaru MZN Control vytvořeného autorem práce. Měřicí komora je vybavena optickým vysílačem LED svítícím na vlnové délce 660 nm a detektory pro měření útlumu svazku v ose svazku a v úhlu 90^0 pro měření elastického rozptylu světla v nefelometrickém uspořádání. Vzorky je možné měřit přímo v centrifugačních zkumavkách s vnitřním průměrem 2 cm (optická dráha paprsku) pro vzorky o objemu 15 ml a v kyvetách s vnitřním průměrem 3 cm a objemu 50 ml.

Pro měření titračního AP testu (TAP) vitality kvasnic je aparatura doplněna o další dávkovací pumpu NE1000, kterou je dávkován neutralizační roztok NaOH.

4.2.3.3 Příprava vzorků a postup měření

Příprava vzorků a postup měření pozůstávaly z těchto kroků:

- a) Vzorky kvasinek přinesené z pivovaru byly skladovány na 2°C pod pivem. Tento způsob skladování nejméně ovlivňuje vitalitu kvasinek (viz vlastní měření).
- b) Vzorky byly před měřením vybrány z lednice, přibližně 5 ml husté suspenze bylo odlito do centrifugační zkumavky a ponecháno 15 minut na vytemperování na pokojovou teplotu. Poté byly vzorky odstředěny na centrifuze Janecki T30 na 1000 rpm otáček za minutu (odpovídá 145 g) po dobu jedné minuty a následně byl supernatant slit.
- c) Usazená vrstva kvasinek (přibližně 3 g) byla zalita 15 ml destilované vody a vzorek byl pečlivě protřepán. Destilovaná voda byla připravena z přístroje Aqual 35 od firmy Aqual Brno s vodivostí menší než $0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$. Tato procedura byla opakována 3x tak, aby byl odstraněn veškerý materiál adsorbovaný na povrchu kvasinek. První dvě odstředění byla provedena při 1000 rpm po dobu 1 minuty, poslední odstředění při 3000 rpm (1300 g) po dobu 10 minut, aby byly kvasinky co nejlépe zbaveny vody. Po trojnásobném promytí a odstředění lze vzorky skladovat po dobu 6 hodin při pokojové teplotě bez snížení vitality (viz měření). Tento krok umožňuje současnou přípravu více vzorků najednou (dáno počtem míst v rotoru centrifugy) a jejich následné postupné proměření.
- d) Definované množství kvasinek bylo odváženo (0,62 – 2,0 g/15 ml) do 20 ml zkumavky, přidáno 15 ml destilované vody a vortexováno tak, aby byla získána homogenní suspenze.

- e) Začátek měření se spustil v okamžiku přidání vody ke kvasinkám. pH hodnota byla kontinuálně měřena a zaznamenávána.
- f) Glukosa byla přidána do vzorku přesně v desáté minutě od začátku měření (na požadovanou koncentraci 0,2 – 5 %) a pH bylo monitorováno dalších 10 až 30 min. Během experimentu byla měřicí komora termostatována na $25,0 \pm 0,1$ °C a vzorek byl míchán magnetickým míchadlem s otáčkami 200 rpm.
- g) Koncentrace buněk v gramech na 15 ml vzorku byla kalibrována na absorbanci A_{660} (viz měření). Koncentrace 1,5 g na 15 ml odpovídá $A_{660} = 3,96$ s přesností ± 1 % pro námi použité vzorky.
- h) Výsledná AP hodnota byla počítána podle předpokladu, že původní pH suspence byla pH = 6,3 (odpovídá pK systému $\text{CO}_2 - \text{HCO}_3^-$ a zároveň přibližnému intracelulárnímu pH).

4.2.3.4 Výpočet AP hodnoty

Hodnota spontánní acidifikace před přidáním glukosy AP_{10} byla vypočtena z hodnoty pH_{10} , naměřené v desáté minutě po začátku měření

$$\text{AP}_{10} = 6,3 - \text{pH}_{10} \quad (4.1)$$

Hodnota glukosou indukované acidifikace AP_{20} byla vypočtena z hodnoty pH_{20} , naměřené ve dvacáté minutě po začátku měření.

$$\text{AP}_{20} = 6,3 - \text{pH}_{20} \quad (4.2)$$

Pokud nebude specifikováno jinak, za AP hodnotu bude označována vždy celková hodnota AP, to znamená AP_{20} .

4.2.4 Metoda měření sedimentace kvasnic

Experimenty byly prováděny se stejnými vzorky kvasnic, s kterými byly prováděny testy acidifikační síly. Sedimentace kvasnic byla měřena na aparatuře DATTS v kinetickém módu. Teplota měřicí komory byla termostatována na $25,0 \pm 0,1$ °C.

Příprava a skladování vzorků kvasnic byla prováděna podle postupu ověřeného v práci Kodedové [58]) s malými modifikacemi. Postup pro přípravu vzorků byl totožný s přípravou pro acidifikační test od bodu a) do bodu e) s následujícími změnami:

- b) Za bod c) bylo přidáno dodatečné promytí 10 mM citrát-fosfátovým pufrem s pH = 4,5 s 5mM přísadkou EDTA, které odstraní z roztoku vápenaté ionty a zabrání flokulaci. Kvasinky jsou poté finálně odstředěny, supernatant slit a odstředěné kvasinky zality a skladovány pod čistým 10 mM pufrem bez EDTA při teplotě 2 °C.
- c) Pro měření bylo odváženo 0,1 g hustých odstředěných kvasnic a rozmícháno ve 100 ml pufru. Na takto vzniklém vzorku s 0,1% koncentrací kvasnic byla naměřena hodnota absorbance $0,80 \pm 0,02$ ve zkumavce na optické dráze 2 cm. Při této koncentraci kvasnic je střední vzdálenost mezi částicemi desetinásobek jejich velikosti a částice se při sedimentaci navzájem neovlivňují. Vzorek byl pečlivě homogenizován, do měřicí zkumavky bylo odměřeno 5 ml vzorku.
- d) Začátek měření se spustil v okamžiku odměření objemu homogenizovaného vzorku a vložení zkumavky do aparatury

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MOŽNOSTI VYUŽITÍ DVOUÚHLOVÉHO MĚŘENÍ ROZPTYLU SVĚTLA PRO ROZLIŠENÍ VELIKOSTI A TYPŮ ZÁKALOTVORNÝCH ČÁSTIC

Zákaloměr MZN 2002 měří intenzitu rozptýleného záření pod 2 úhly; je to N - nefelometrický kanál měřící pod úhlem $90^\circ \pm 5^\circ$ a F - dopředný kanál (Forward) měřící pod úhlem $12^\circ \pm 1^\circ$. Aby bylo možné porovnávat výsledky měření zákaloměry různých typů, byla zavedena kalibrace přístrojů na stupnici danou koncentrací definovaného standardu rozptylujících částic. Jako standard je nyní v mnoha průmyslových odvětvích používán formazinový roztok. Postup přípravy a použití kalibračního zákalového formazinového standardu definuje v pivovarnictví například metoda EBC (European Brewery Convention) 9.29 „Haze in Beer“ [6] nebo metoda MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommision,) 2.15.2.1 [75].

5.2 KONCENTRAČNÍ ZÁVISLOST ROZTOKU FORMAZINU – KALIBRAČNÍ KŘIVKA

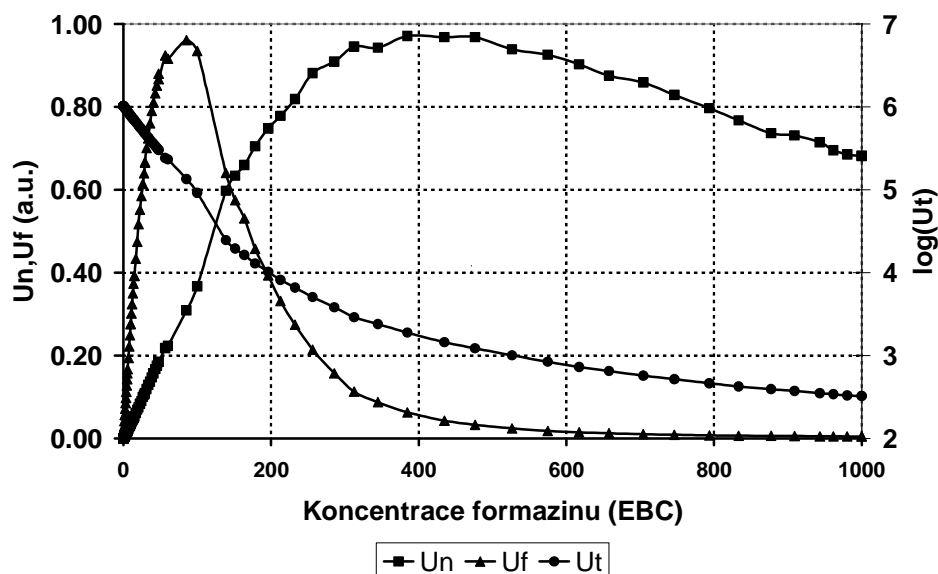
Částice formazinu jako zákalový standard byly zavedeny v 50-tých letech. Jsou používány dodnes pro jednoduchost přípravy a nízkou cenu. Připravují se kondenzační polymerací smícháním vodných roztoků Hexamethylenetetraminu (50 g /500 ml) a hydrazine sulfátu (5 g/500 ml). Reakcí látek vzniká 2,157 g formazinových částic na 1 litr roztoku (0,216%). Tomuto roztoku se přiřazuje hodnota 1000 EBC (jednotky používané v pivovarnictví) nebo 4000 NTU (používané ve vodárenství). Zásobní roztok je možné skladovat až 1 rok v chladu a temnu. Standardní roztoky s nižší hodnotou zákalu se získají definovaným ředěním zásobního roztoku. Ředěné roztoky jsou již nestabilní a nelze je dlouhodobě skladovat.

Částice formazinu mají podle literatury (Sigrist [109], Sadar [93]) střední velikost mezi 2 a 3 μm a nepravidelný tvar (Sadar [93]). Nevýhodou formazinu je, že velikost a tvar částic se mění s koncentrací, teplotou a během skladování. Během úschovy formazin agreguje a sedimentuje, takže před měřením je nutné jej pečlivě rozmíchat. Reprodukovatelnost připravených standardů dosahuje podle dlouhodobých měření firmy Hach produkující komerční zákalové formazinové standardy (Sadar [93]) hodnotu $\pm 2\%$ při dodržení postupu přípravy a použití stejných vstupních surovin. Naše měření prokázala (Sladký [111,112]), že reprodukovatelnost standardů $\pm 2\%$ je možné dosáhnout pouze při měření v nefelometrickém směru rozptylu N. Při měření v dopředném směru rozptylu dosahovala reprodukovatelnost měření pouze hodnoty $\pm 5\%$ (30 připravených vzorků). Signál v kanálu F během skladování zásobních roztoků při teplotě 8°C systematicky roste rychlostí 10% za rok.

Abychom se vyhnuli nejistotě v hodnotě zákalu kalibračních roztoků formazinu v dopředném kanálu F, zavedli jsme dlouhodobou kontrolu standardů pomocí referenčního zákaloměru MZN, kontrolovaného pevným sekundárním zákaloměrným standardem.

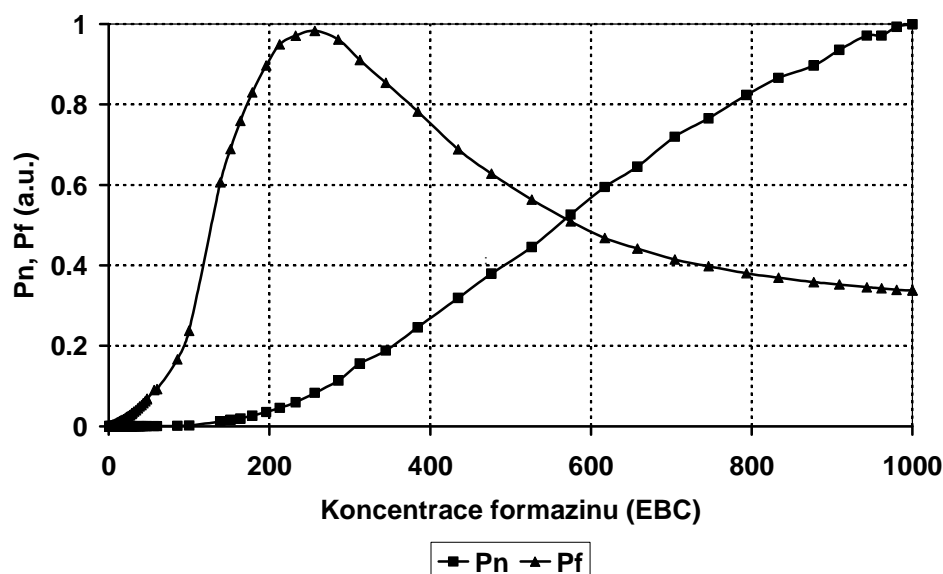
Na obr.5.1 jsou vyneseny závislosti signálů U_n (nefelometrický signál měřený pod úhlem 90°), U_f (dopředný signál měřený pod úhlem 12°) a U_t (transmisní signál) na koncentraci kalibrační formazinové suspenze, měřené na zákaloměru MZN-2000, vybaveném optickým zdrojem LED svítícím na vlnové délce 630 nm. Vzorky byly měřeny ve zkumavce s optickou dráhou paprsku 2 cm. Signály byly normovány na maximální hodnotu. Transmisní signál U_t monotónně klesá v celém rozsahu koncentrace formazinu. Nefelometrický signál U_n roste a dosahuje maxima při koncentraci formazinu 400 EBC, poté klesá. U_f signál dosahuje maxima při koncentraci formazinu 85 EBC. Maximum signálu je dosaženo při koncentraci částic, při které se vyrovná nárůst intenzity rozptýleného světla, daný nárůstem koncentrace rozptylujících částic v měřícím objemu s poklesem intenzity světla, způsobeným rozptylem na dráze mezi zdrojem světla a detektorem. Koncentrace formazinu, při které je dosaženo maximálního

signálu, je závislá na optické dráze paprsku (OPL – optical path length) ve vzorku, přičemž s rostoucí OPL klesá.



Obr.5.1 - Typický průběh vývoje signálů v závislosti na koncentraci kalibračního roztoku. U_n (nefelometrický signál měřený pod úhlem 90°), U_f (dopředný signál měřený pod úhlem 12°), U_t (transmisní signál). Měřeno na zákaloměru MZN 2002 s optickou dráhou paprsku ve vzorku 2cm.

Na obr.5.2 jsou vyneseny závislosti hodnot relativních zákalů P_n (U_n/U_t) a P_f (U_f/U_t) na koncentraci formazinu. Hodnoty relativních zákalů P_n, P_f jsou nezávislé na absorpci paprsku ve vzorku a částečně korigují i útlum paprsku, způsobený rozptylem na dráze od zdroje k detektoru. Křivka P_n je monotónně rostoucí v celém rozsahu koncentrací formazinu 0 až 1000 EBC. Nefelometrický kanál lze použít k měření zákalu v celém tomto rozsahu koncentrací. Relativní zákal P_f roste pouze do hodnoty 235 EBC a poté klesá. Dopředný rozptyl je možné použít pouze v rozmezí koncentrací 0 až 235 EBC. S rostoucí optickou dráhou paprsku ve vzorku se maximum P_f posouvá k nižším koncentracím formazinu.



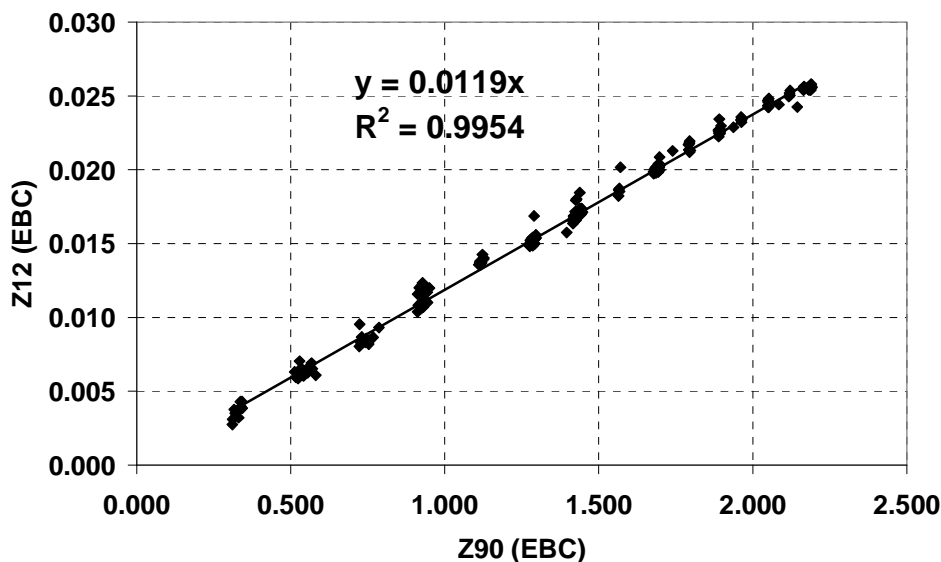
Obr.5.2 - Typický průběh vývoje relativních signálů $P_n = U_n/U_t$, $P_f = U_f/U_t$ v závislosti na koncentraci kalibračního roztoku. Měřeno na zákaloměru MZN 2002 s optickou dráhou paprsku ve vzorku 2 cm

Při měření kalibračního roztoku formazinu o hodnotě 1000 EBC ve zkumavce s optickou dráhou paprsku 2 cm (OPL-optical path length) je útlum transmisního paprsku způsobený rozptylem přibližně 4 řády (2 řády/1cm OPL). Koncentrační rozmezí 0 - 1000 EBC zahrnuje oblast rozptylu světla od jednoduchého přes mnohonásobný až po difusní rozptyl. Bylo by problematické hledat teoretickou křivku, která by proložila naměřené hodnoty s dostatečnou přesností v celém rozsahu koncentrací. Proto byla jako kalibrační křivka implementována soustava navazujících polynomů až 6.stupně. Pomocí takovéto kalibrační křivky bylo dosaženo přesnosti proložení lepší než 1% hodnoty v celém rozsahu koncentrací 0 - 1000 EBC.

Částice formazinu mají podle literatury (Sadar [93], [6,47, 75]) střední velikost mezi 2 a 3 μm , jsou tedy větší než vlnová délka používaného světla 630 nm. Rozptyl světla na částicích formazinu již rozhodně nelze popsat Rayleighovou teorií (Kerker [57]), intenzita rozptýleného záření v dopředném směru je výrazně větší než v nefelometrickém směru (90°).

Abychom tuto skutečnost potvrdili, provedli jsme následující měření. Do vzorku destilované vody přefiltrované přes 0,2 μm PVDF filtr jsme přidávali roztok fluorescenčního barviva Nile Blue. Barvivo absorbuje světlo na vlnové délce 630 nm a emituje v pásu vlnových délek, které jsou detekovatelné křemíkovými fotodiodami. Fluorescenční barvivo emituje záření homogenně ve všech směrech a tím simuluje malé rozptylující částice s velikostí výrazně menší než vlnová délka a rozptylující podle Rayleighovy teorie.

Na obr.5.3 je vynesena vzájemná závislost hodnot zákalů Z90 a Z12, nakalibrovaných v jednotkách formazinového standardu EBC a naměřených na vzorcích s různou koncentrací barviva. Naměřenými hodnotami byla proložena přímka s koeficientem přepočtu mezi hodnotami zákalu $Z12 = 0,0119 \cdot Z90$. Z obrázku je zřejmé, že formazinové částice rozptylují v dopředném směru (Z12) 84krát více než v nefelometrickém (Z90) – měřeno na zákaloměru MZN-2002 s optickým zdrojem svítícím na vlnové délce 630 nm.



Obr.5.3 - Vzájemná závislost hodnot zákalů Z90 a Z12 (v jednotkách formazinového standardu EBC), naměřených na vzorcích s různou koncentrací fluorescenčního barviva Nile Blue ve vodě. Měřeno na zákaloměru MZN 2002 s optickou dráhou paprsku ve vzorku 2 cm

Rozdílná citlivost nefelometrického a dopředného kanálu zákaloměru při měření polystyrenových částic s různou velikostí je demonstrována v tabulce 5.1. Zákalý byly měřeny při nízkých koncentracích částic v oblasti jednoduchého rozptylu. Částice od firmy Spherotech Ltd. byly rozmíchány v destilované vodě s 1% přídatkem detergentu Tween, který zabraňuje

agregaci povrchově hydrofobních částic. Naměřené hodnoty zákalů jsou pro přehlednost normalizovány na hodnotu zákalu v nefelometrickém směru Z90.

Tabulka 5.1 - Hodnoty zákalu naměřené na polystyrenových částicích různé velikosti

d (μm)	42.00	9.20	3.17	1.09	0.51	0.20	Filtr.Pivo	Kvasnice
Z90[EBC]	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Z15[EBC]	6.91	2.91	1.20	0.98	0.48	0.10	0.15	3.50

Polystyrenové částice o střední velikosti 200 a 510 nm jsou v dopředném směru téměř neviditelné. Částice s velikostí 1 μm a 3,17 μm dávají srovnatelné hodnoty zákalu v obou úhlech rozptylu, částice s velikostí 9,2 μm a 42 μm rozptylují více v dopředném směru Z12. Formazinové částice s velikostí 2 až 3 μm jsou ideální k rozlišení nadmikronových a podmikronových částic. Pro srovnání byly do tabulky přidány hodnoty zákalu naměřené na filtrovaném pivu obsahujícím pouze koloidní částice a hodnoty naměřené na vzorku kvasnic ve vodě.

Specifický poměr naměřených zákalů Z12/Z90 byl zaveden v publikaci autorů [28]. Tento poměr umožňuje rozlišit částice na nadmikronové a podmikronové. Velikost rozptylu v obou úhlech je ovlivněna nejen velikostí částic, ale i jejich tvarem a indexem lomu. V měřeném vzorku se navíc téměř nikdy nevyskytují monodisperzní částice s úzkou šířkou distribuce velikostí. V pivu a meziproduktech se kromě koloidních částic vyskytují s různou koncentrací i kvasnice a nadmikronové částice křemeliny. Z toho důvodu je nutné brát poměr Z12/Z90 spíše jako identifikátor stavu disperzní soustavy a jeho změn.

Využití dvouúhlového měření rozptylu světla k rozlišení některých typů zákalotvorných částic v pivovarské praxi bylo rozebráno v autorově publikaci [28]. Zde pouze shrneme některé důležité závěry:

- 1) Kalibrace zákaloměru na formazinový standard rozšiřuje oblast koncentrací částic, v které je naměřený zákal lineárně závislý na koncentraci. Relativní zákal P_n , P_f rostou lineárně s koncentrací částic pouze do zákalu 1 až 5 EBC (podle optické dráhy paprsku ve vzorku). Zákal Z90, Z12 kalibrované na formazín jsou lineární s koncentrací částic, např. kvasnic, až do hodnoty 100 EBC.
- 2) Mikroorganismy vyskytující se v pivu a meziproduktech mají specifický poměr Z12/Z90 výrazně větší než 1 (viz tabulka 5.1). Specifický poměr Z12/Z90 naměřený na vzorcích křemeliny byl v rozsahu 0,8 až 1,2, tzn. přibližně roven 1, koloidní zákal piva dával hodnotu Z12/Z90 v rozsahu 0,3 až 0,5.
- 3) Specifický poměr hodnot Z12/Z90 umožňuje odlišit v pivu čistě koloidní zákal od zákalu způsobeného křemelinou a mikroorganismy.

5.3 OPTIMALIZACE NEFELOMETRICKÝCH TITRAČNÍCH TESTŮ KOLOIDNÍ STABILITY PIVA

Nefelometrické titrační testy byly vyvinuty na základě 30leté výzkumné práce prof. Chapon a jeho kolektivu na Universitě v Nancy (Chapon [40]) ve spolupráci s dalšími evropskými pracovišti za účelem řešení problému koloidní stability piva. Metody jsou založené na sledování vzniku protein-polyfenolových komplexů. Tvorba komplexů je vyvolána přidávkou reagentu, který reaguje se zákalotvornými prekurzory na proteinové (test na citlivé proteiny) nebo polyfenolové (test na obsah tanoidů) straně nebo změnou rozpustnosti prekurzorů zákalu (SASPL test).

Ke sledování vzniku komplexů se využívá metoda detekce změn intenzity elastického rozptylu světla pod úhlem 90° – nefelometrie, která umožňuje dostatečně citlivou detekci i podmikronových částic s koncentrací řádu ppb. Aparatura DATTS umožňuje měřením zákalu pod dvěma úhly kontinuální sledování změn disperzní soustavy během provádění testů a poskytuje nám dodatečné informace o charakteru probíhajících reakcí.

5.3.1 Optimalizace testu na obsah tanoidů podle Chapona

Možnost aplikace rozpustného polyvinylpyrrolidonu (PVP) pro srážení polyfenolů navrhl McFarlane [70]. Prof. Chapon [39] rozpracoval metodu nefelometrického stanovení obsahu tanoidů v pivu (zkráceně „PVP test“). Metoda spočívá v kontinuálním dávkování roztoku PVP K90 do vzorku. Tanoidy ve vzorku se váží na PVP, vzniká zákal, jehož velikost se zvyšuje tak dlouho, až všechny přítomné tanoidy vytvoří s PVP komplexy. Při dalším dávkování PVP hodnota zákalu klesá. Množství PVP, které se musí přidat k dosažení maxima nefelometrického zákalu, se definuje jako obsah tanoidů a udává se v mg PVP K90 na litr vzorku. Koncentraci PVP, při které je dosaženo maxima nefelometrického zákalu Z_{90max} , budeme označovat $PVP_{Z_{90max}}$. Tam, kde nedochází ke konfliktu s obecným pojmem „tanoidy“, budeme výsledek testu odpovídající $PVP_{Z_{90max}}$ označovat tanoidy (mg/l) nebo zkráceně Tan.

Pivo obsahuje množství polyfenolických sloučenin, které patří k velkému počtu chemických skupin. Liší se nejen strukturou, ale výrazně i afinitou k proteinům a schopností vytvářet koloidní zákal. Analytické metody detekce polyfenolů buď vyhodnocují celkový obsah polyfenolů (např. EBC analytika [5]) a tím zahrnují i ty, které se neúčastní koloidního zákalu, nebo naopak měří pouze jednu specifickou skupinu zákalotvorných polyfenolů a opomíjejí ostatní skupiny.

K zavedení definice tanoidů a metody jejich nefelometrické detekce vedla prof. Chapona snaha o vytvoření jednoduché metody vhodné k určení obsahu polyfenolů, které se během stárnutí piva účastní vytváření koloidního zákalu. Cílem bylo vytvořit metodu, jejíž výsledky budou maximálně korelovat s tvorbou koloidního protein-polyfenolového zákalu.

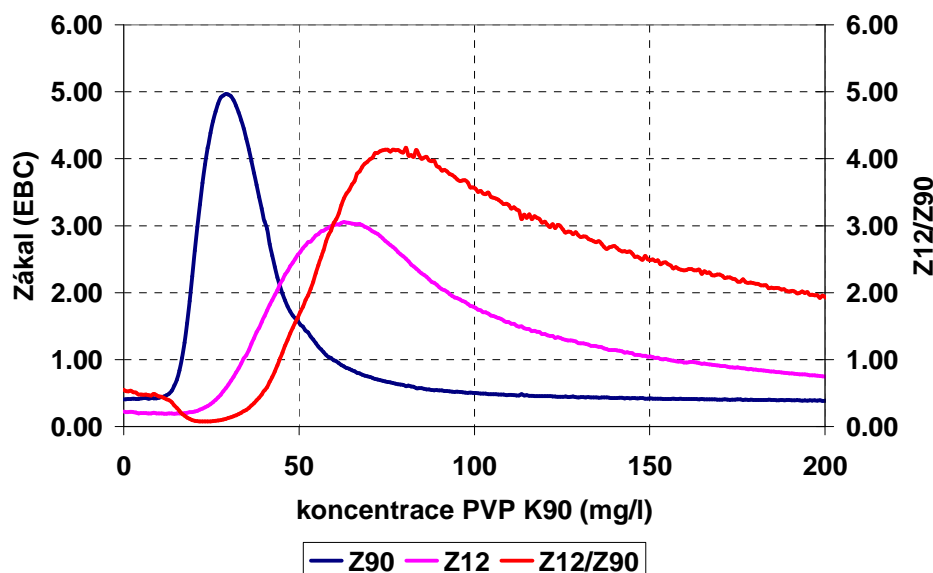
Polyvinylpyrrolidon je účinný absorbent polyfenolů. Vzhledem ke strukturální podobnosti PVP s aminokyselinou proline, která byla identifikována jako místo vazby polyfenolů na proteiny při tvorbě koloidních zákalů (Asano [11], Hagermanová [33]), se předpokládá, že vazba polyfenolů na PVP je podobná s vazbou zákalotvorných polyfenolů na proteiny. Metodou kompetitivní absorpce bylo prokázáno, že afinita polyfenolů k PVP je vyšší než k proteinům (Hagerman [33]). Z těchto důvodů je PVP vhodné k detekci skupiny polyfenolů, které se účastní tvorby zákalů.

Sesíťovaný polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) se ve výrobě nápojů využívá jako stabilizační prostředek adsorbující polyfenoly. Testování koloidní stability produktů ošetřených PVPP prokázalo jeho účinnost a částečnou selektivitu při odstraňování speciálně zákalotvorných polyfenolů.

Velká afinita polyfenolů k PVP je způsobena velkým počtem přístupných karbonylových skupin na molekule PVP a velkou prostorovou volností lineární molekuly nesíťovaného PVP, které má charakter statistického klubka. Po přidání PVP do vzorku se tanoidy dosud slabě vázané na proteiny uvolní a vážou se na PVP. Tanoidy vytvářejí můstky mezi jednotlivými molekulami PVP i mezi částicemi řetězce jedné molekuly PVP. Částice agregují, vydělují se z roztoku a jsou detekovatelné elastickým rozptylem světla. S rostoucí koncentrací PVP ve vzorku tanoidy obsazují vazebná místa na molekulách PVP, způsobují jejich agregaci a růst zákalu. V okamžiku, kdy koncentrace PVP (vazebných míst) přesáhne koncentraci tanoidů, není již další PVP vázáno a růst zákalu se zastaví. Další růst koncentrace PVP zvyšuje počet volných vazebných míst pro tanoidy. Dochází k přerozdělení tanoidů na molekulách

PVP a k rozpouštění zákalu. Prof. Chapon přiřadil koncentraci PVP, při které počet vazebných míst odpovídá koncentraci tanoidů ve vzorku, k okamžiku dosažení maximální hodnoty nefelometrického zákalu.

Na obr.5.4 jsou zobrazeny typické křivky vývoje zákalu Z90 a Z12 v průběhu testu. Nejdříve se soustředíme na křivku nefelometrického zákalu Z90. V první fázi dávkování se zákal vzorku nemění (v našem případě do koncentrace PVP 12 mg/l). To je způsobeno dvěma faktory. Koncentrace PVP ve vzorku je nízká, v roztoku je přebytek tanoidů a koncentrace vznikajících PVP-tanoidových komplexů je pod hranicí detekovatelnosti.



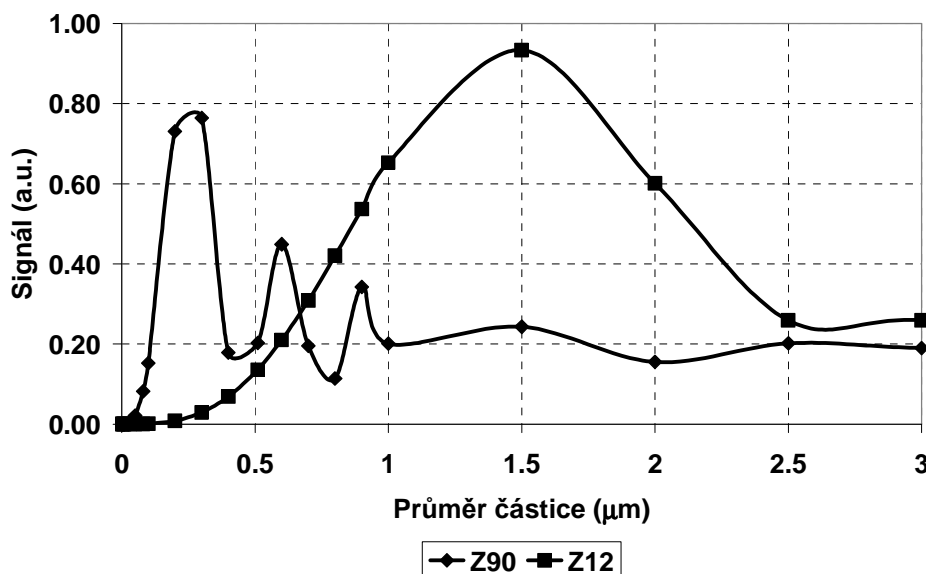
Obr.5.4 - Závislost hodnot zákalů Z90 a Z12 (v jednotkách formazinového standardu EBC) a jejich poměru Z12/Z90 na koncentraci PVP K90.

Dalším faktorem je rychlost reakce vzniku PVP-tanoidových komplexů a rychlost jejich agregace. V další fázi dávkování PVP zákal roste, až dosáhne maximální hodnoty $Z90_{max}$ při koncentraci $PVP_{Z90_{max}}$ rovnou 30 mg/l. Při dalším dávkování PVP do vzorku nefelometrický zákal Z90 klesá. Dopředný zákal Z12 začíná růst až při koncentraci PVP, kdy Z90 dosahuje maxima a roste i v okamžiku, kdy Z90 již klesá. Z12 dosahuje maxima při přibližně dvojnásobné koncentraci PVP než Z90 a poté začne také klesat. Křivky vývoje obou zákalů jsou charakteristické pro průběh testu, liší se pouze dosažené hodnoty zákalů v maximu a vzájemná poloha maxim. Maximum Z12 je plošší a u některých piv je téměř nepozorovatelné.

Specifický poměr zákalu Z12/Z90 má u dobře zfiltrovaných piv, které obsahují pouze podmikronové koloidní částice, hodnotu v rozmezí 0,2 až 0,5. Na začátku testu poměr nejdříve klesá. Při koncentraci PVP odpovídající maximu Z90 klesne poměr Z12/Z90 na minimální hodnotu 0,10. Pro vyšší koncentrace PVP celkový poměr Z12/Z90 roste a dosahuje maxima při koncentraci PVP 75 mg/l.

Změna Z12/Z90 jako indikátoru stavu soustavy dokazuje, že během testu dochází k výrazné změně distribuce rozptylujících částic. Precipitace a agregace komplexů pokračuje i pro koncentraci PVP vyšší než dávka odpovídající nefelometrickému maximu $Z90_{max}$. Koncentraci $PVP_{Z90_{max}}$, při které je dosaženo maxima zákalu $Z90_{max}$, nelze považovat za okamžik, za kterým dochází k rozpouštění PVP-tanoidových komplexů. Jedná se o charakteristický bod, který odráží určitou dynamickou rovnováhu mezi molekulami PVP a tanoidy. K poklesu nefelometrického zákalu při dalším dávkování PVP nedochází v důsledku rozpouštění vzniklých částic, ale spíše změnou jejich distribuce, tvaru a průměrné velikosti.

Vliv agregace částic na intenzitu elastického rozptylu světla lze dokumentovat následujícím modelovým výpočtem. Na obr.5.5 jsou zobrazeny křivky závislosti relativní intenzity elastického rozptylu v úhlu 90° a 12° na průměru částic při konstantním objemu rozptylujících částic. Tento modelový příklad simuluje situaci, kdy je konstantní objem částic ve vzorku a tyto částice agregují do větších celků nebo se naopak rozpadají na menší, a tím se mění jejich počet a rozptylové charakteristiky. Hodnoty byly vypočteny Mieovým kalkulátorem (Prahl [86], index lomu částic 1,5, částice ve vodě, měřící světlo o vlnové délce 630nm) podle Mieovy teorie rozptylu, platí tedy pro částice tvaru koule. Křivka Z90 na obr.5.5 má maximum již při průměru částic 0,2 až 0,3 μm , maximum křivky Z12 je u 1,5 μm a je mnohem plošší.

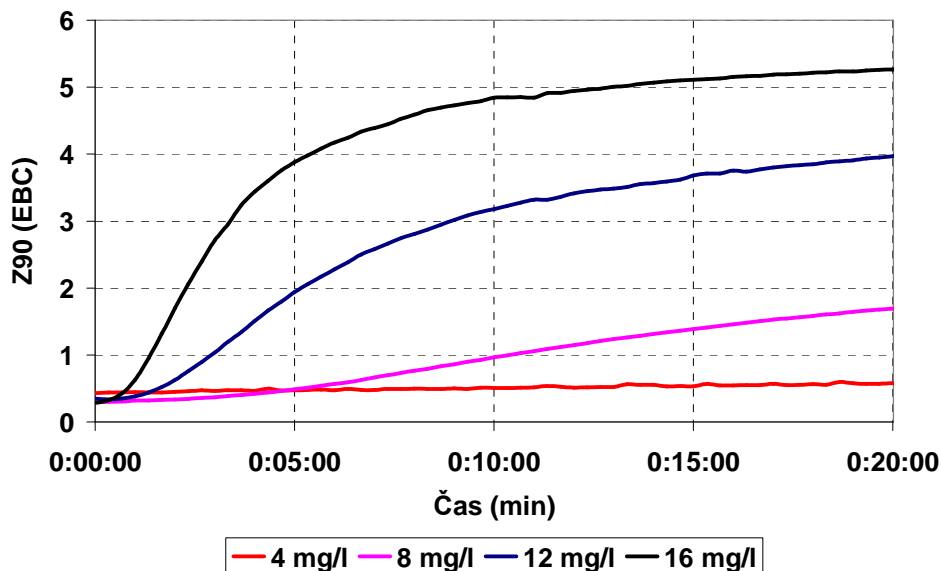


Obr.5.5 - Závislost teoreticky vypočtených hodnot intenzity světla elasticky rozptýleného do úhlů odpovídajících zákalům Z90 a Z12 na velikosti rozptylujících částic při konstantním objemu rozptylujících částic. Hodnoty intenzity záření rozptýleného na jedné částici byly vynásobeny počtem částic odpovídajícím konstantnímu objemu. Hodnoty byly vypočteny Mie Calculátorem (Prahl [86]) pro monodisperzní částice s indexem lomu 1,5 v roztoku s indexem lomu 1,33 a pro záření o vlnové délce 632,8 nm s náhodnou polarizací.

S využitím výsledku z obr.5.5 je možné místo dosažení $Z90_{max}$ u testu na tanoidy interpretovat jako okamžik, kdy zásoba volných tanoidů v objemu vzorku poklesne natolik, že vliv agregace komplexů do větších celků (způsobující pokles Z90) převládne nad tvorbou komplexů volných tanoidů s nově přidaným PVP. Tato interpretace je odlišná od původní interpretace prof. Chapona, přesto ukazuje na přímý vztah mezi koncentrací $PVP_{Z90_{max}}$, při které je dosaženo $Z90_{max}$, a obsahem zákalotvorných polyfenolů ve vzorku.

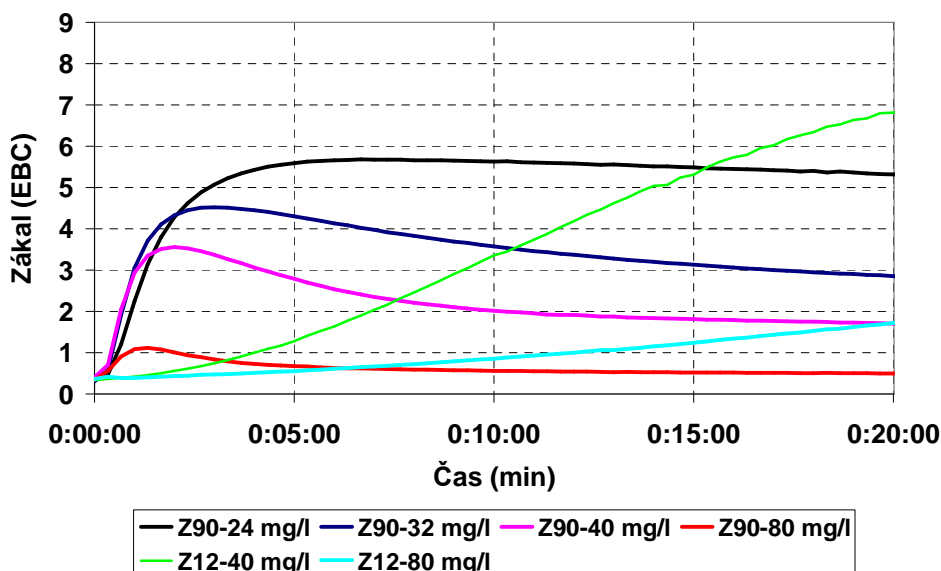
Tuto úvahu je možné podpořit časovým průběhem vývoje zákalu po nadávkování jednorázové dávky PVP. Křivky vývoje zákalu pro různé dávky PVP jsou zobrazeny na obr.5.6, z kterého je zřejmé, že interakce PVP s tanoidy je pomalá a probíhá v řádu desítek minut. Pomalá rychlost reakce prodlužuje dobu lag-fáze při standardním testu. Po jednorázové dávce PVP na koncovou koncentraci 8 mg/l dojde během 20 minut k tvorbě zákalu, přestože při standardním testu prováděném na totožném vzorku začne zákal růst až při koncentraci 12 mg/l. Rozdíl je způsoben rychlostí reakce.

Po aplikaci jednorázové dávky PVP nižší, než odpovídá koncové koncentraci $PVP_{Z90_{max}}$, dojde k monotónnímu růstu Z90 (obr.5.6) - čím větší je dávka PVP, tím větší je zákal. Z12 roste pomalu a nedosahuje hodnot Z90. Při aplikaci jednorázové dávky PVP vyšší než $PVP_{Z90_{max}}$ se charakter křivek změní (obr.5.7). Křivky Z90 mají podobný průběh jako při kontinuálním



Obr.5.6 - Časový vývoj hodnot zákalu Z90 po přidání jednorázové dávky PVP K90. Objem vzorku 5 ml, koncentrace přidávaného roztoku PVP K90 0,4 g/l. Dávka 0,1 ml roztoku PVP K90 odpovídá koncentraci ve vzorku 4 mg/l

dávkování PVP - nejdříve dosáhnou maxima a poté klesají. Čím vyšší je koncentrace PVP, tím nižší je dosažené maximum Z90. Zákal Z12 monotónně roste a rychle přerůstá hodnotu Z90 (viz. křivku Z12 - 40 mg/l). Křivky Z12 pro koncentrace PVP 24 a 32 mg/l nebyly zobrazeny pro větší přehlednost. Maxima křivek Z90 jsou nejspíše způsobena agregací PVP-tanoidových komplexů. Při aplikaci dávky PVP vyšší, než odpovídá maximu zákalu $Z12_{max}$ při standardním testu, vzniká mnohem menší zákal.



Obr.5.7 - Časový vývoj hodnot zákalu Z90 a Z12 po přidání jednorázové dávky PVP K90. Objem vzorku 5 ml, koncentrace přidávaného roztoku PVP K90 0,4 g/l. Dávka 0,1 ml roztoku PVP K90 odpovídá koncentraci ve vzorku 8 mg/l

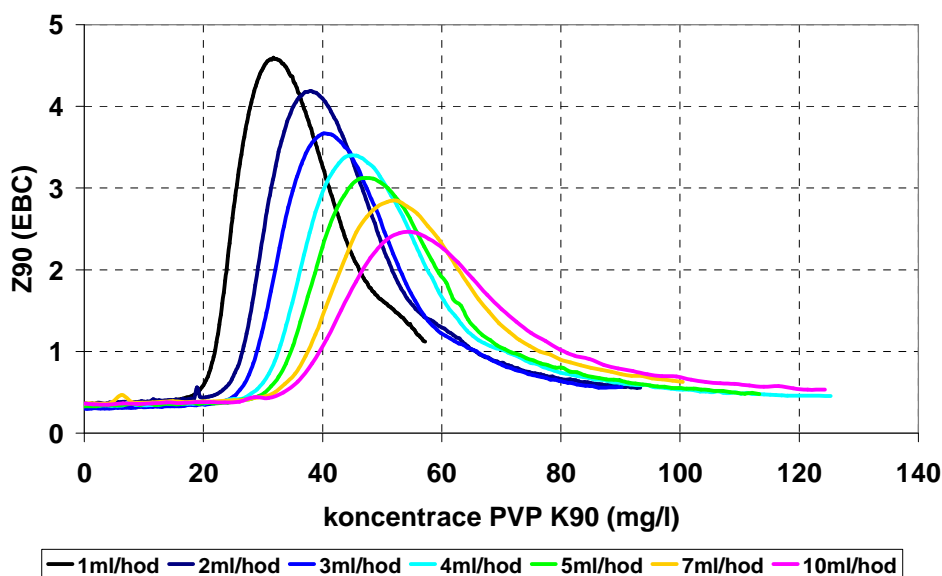
Hodnoty zákalu vzorku po přidání jednorázové dávky PVP se neustálí ani 20 minut od přidání. Rychlost tvorby zákalu je srovnatelná s rychlostí dávkování PVP při standardním testu. Křivka vývoje zákalu při standardním testu neodráží pouze stechiometrii PVP a tanoidů ve vzorku, ale je ovlivněna i rychlostí jejich interakce. Na výsledek testu mají vliv parametry

provedení a měření testu, jako jsou např. rychlost dávkování PVP do vzorku, způsob míchání a teplota měření. V dalším se pokusíme zhodnotit velikost těchto vlivů.

5.3.1.1 Vliv rychlosti dávkování PVP

Na obr.5.8 jsou vyneseny křivky vývoje nefelometrického zákalu během testu prováděného na jednom vzorku piva s různou rychlostí dávkování PVP K90. S rostoucí rychlostí dávkování PVP se bod, kdy dojde k nárůstu zákalu, posouvá k vyšším koncentracím PVP. Stejně se posouvá i poloha maxima nefelometrické křivky PVP_{Z90max} a snižuje se hodnota zákalu v maximu. Takovýto výsledek souhlasí s předchozími měřeními a je způsoben nezanedbatelnou rychlostí interakce PVP s tanoidy ve srovnání s rychlostí dávkování titrantu. Rychlost dávkování titrantu není možné více zpomalit, protože to způsobí neúměrné prodloužení doby testu.

K zajištění dostatečné reprodukovatelnosti testu je nutné stanovit a dodržovat konstantní rychlost dávkování PVP.



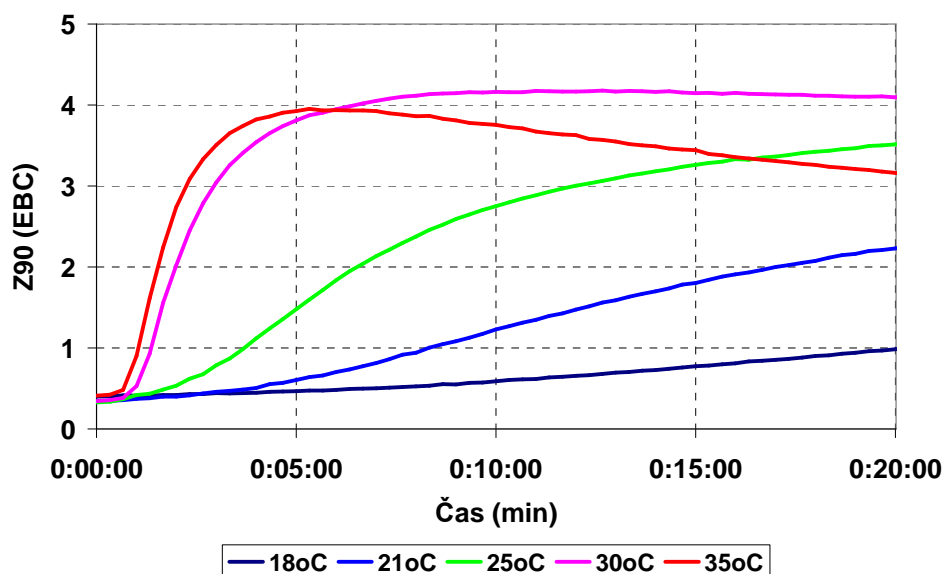
Obr.5.8 - Vývoj hodnot zákalu Z90 při testu na obsah tanoidů pro různé rychlosti dávkování PVP K90 do 5 ml vzorku.

5.3.1.2 Vliv teploty

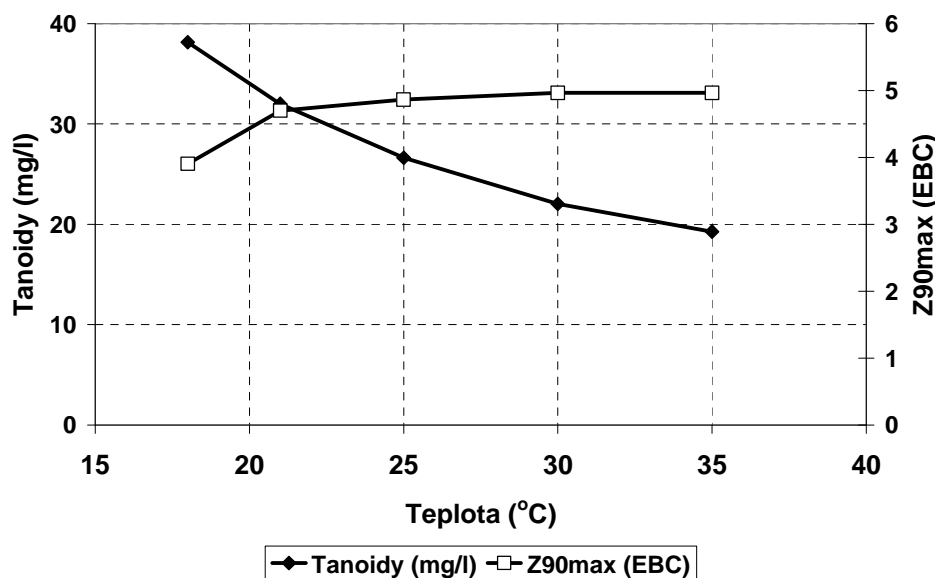
Vliv teploty na výsledek testu dokumentuje obr.5.10. S rostoucí teplotou se poloha maxima PVP_{Z90max} posouvá k nižším množstvím přidaného PVP, přičemž jeho výška $Z90max$ se výrazně nemění. Chapon [39] vysvětluje tento jev vyšší rozpustností PVP-tanoidových komplexů.

Z výsledků teplotní závislosti křivek vývoje zákalu po nadávkování jednorázové dávky PVP K90 na konečnou koncentraci 12 mg/l (obr.5.9) se jeví jako pravděpodobnější vysvětlení vyšší rychlost interakce PVP s tanoidy při vyšší teplotě. Čím vyšší je teplota vzorku, tím rychlejší je tvorba zákalu. Pokles nefelometrického zákalu Z90 po dosažení maxima při teplotě 35°C je způsoben agregací částic do velkých komplexů.

Praktickým výsledkem teplotní závislosti je, že k dosažení maximální reprodukovatelnosti měření je nutné udržovat konstantní teplotu vzorku během měření. Proměřením teplotní závislosti výsledku testu na více druzích piv jsme získali průměrnou chybu měření $\pm 1 \text{ mg/l}$ na 1°C při standardní teplotě měření $25^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$.



Obr.5.9 - Časový vývoj hodnot zákalu Z90 po přidání jednorázové dávky PVP K90 do vzorku piva při různé teplotě měření. Do vzorku o objemu 5 ml bylo po ukončení prvního měření přidáno 0,15 ml roztoku PVP K90 s koncentrací 0,4 g/l. Dávka odpovídá konečné koncentraci PVP ve vzorku 12 mg/l



Obr.5.10 - Standardní průběh závislosti výsledku testu na obsah tanoidů na pivo v závislosti na teplotě. Měřeno na vzorku nestabilizovaného piva.

5.3.1.3 Vliv míchání vzorku

K zajištění vysoké reprodukovatelnosti testu je nutné dodržet kontinuální homogenní zamíchání dávkovaného PVP do vzorku. Při našich měřeních jsme ověřili, že rychlost míchání 200 otáček za minutu je dostatečná.

Kromě parametrů měření mají na výsledek testu velký vliv i parametry vzorku, které mohou ovlivňovat interakci PVP s tanoidy. Mezi tyto parametry patří zvláště pH a iontová síla roztoku.

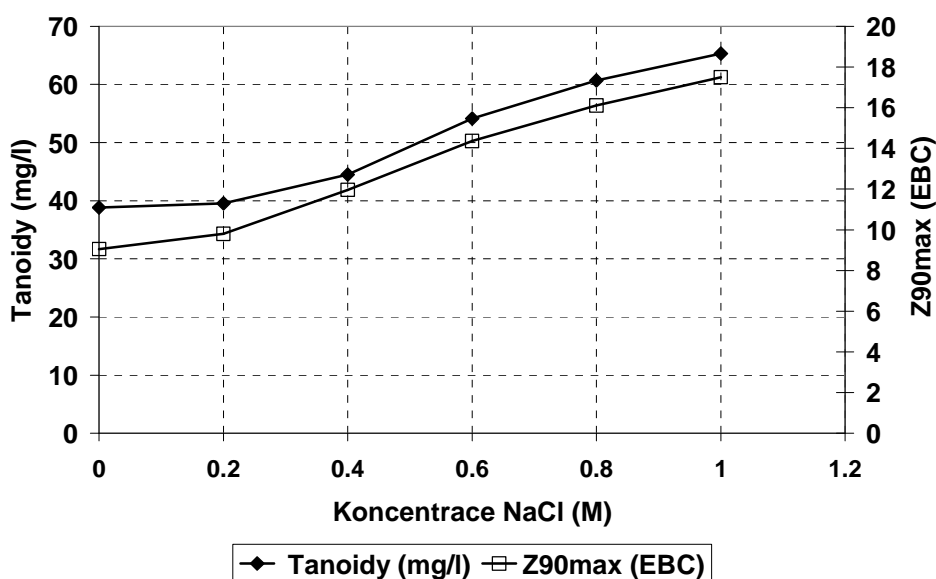
5.3.1.4 Vliv pH

Hodnota pH se u pív pohybuje v rozmezí od 4,1 do 4,8 (Kosař [59]). V tomto rozmezí se nemění celkový náboj polyfenolů ani molekul PVP, lze tedy předpokládat nezávislost výsledků testu na pH. Tuto nezávislost jsme ověřili na 10 druzích českých pív typu Pilsener. V rozmezí hodnot pH od 4,1 do 4,8 jsme pH vzorky upravovali malou dávkou HCL a NaOH a prováděli test na obsah tanoidů. Výsledek testu byl konstantní v rámci chyby měření (± 1 mg/l a $\pm 3\%$ hodnoty).

5.3.1.5 Vliv iontové síly

Abychom ověřili vliv iontové síly na výsledek testu, upravovali jsme vzorek piva přidáním definovaného množství NaCl. Iontová síla piva odpovídá 0,02 molárnímu roztoku NaCl. Jako referenční vzorek jsme použili 4 ml piva s přídávkem 1 ml destilované vody. Vzorky s rostoucí iontovou silou jsme připravili přídávkem NaCl do 4 ml piva a doplněním destilovanou vodou na objem 5 ml.

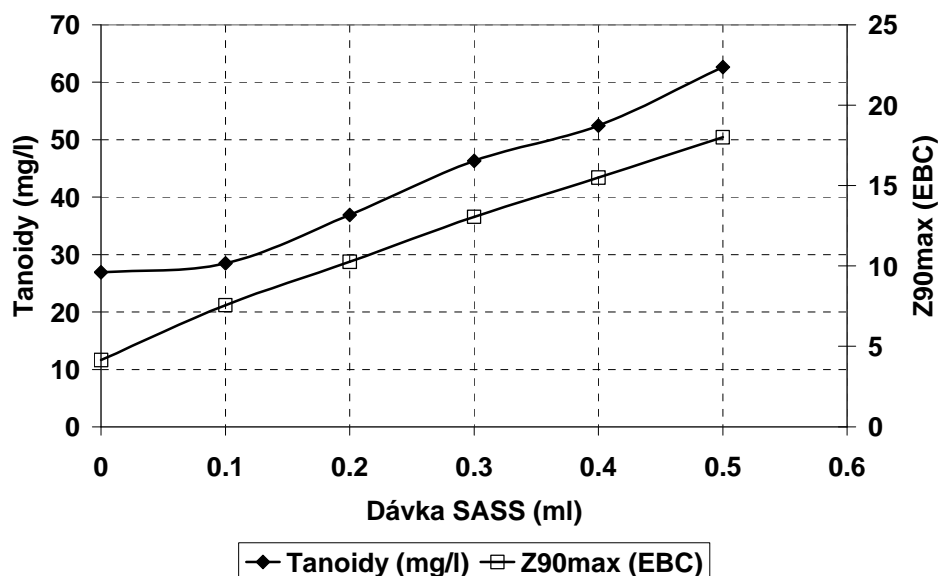
Výsledek měření je vyneseno na obr.5.11. Fluktuace iontové síly piva jsou maximálně v rozmezí 0,01 – 0,03 M roztoku NaCl. Tyto změny nemají vliv na výsledek testu. Pro koncentrace NaCl větší než 0,2 M (řádově vyšší než fluktuace iontové síly ve vzorcích piva) dochází k nárůstu naměřeného obsahu tanoidů (= PVP_{Z90max}) i velikosti maxima zákalu Z90max s koncentrací NaCl. Přidávání neutrální soli do vzorku snižuje rozpustnost PVP- tanoidových komplexů.



Obr.5.11 - Standardní průběh závislosti výsledku testu na obsah tanoidů na iontové síle vzorku. Měřeno na vzorku nestabilizovaného piva. Iontová síla vzorku zvyšována přídávkem 4,8 M roztoku NaCl.

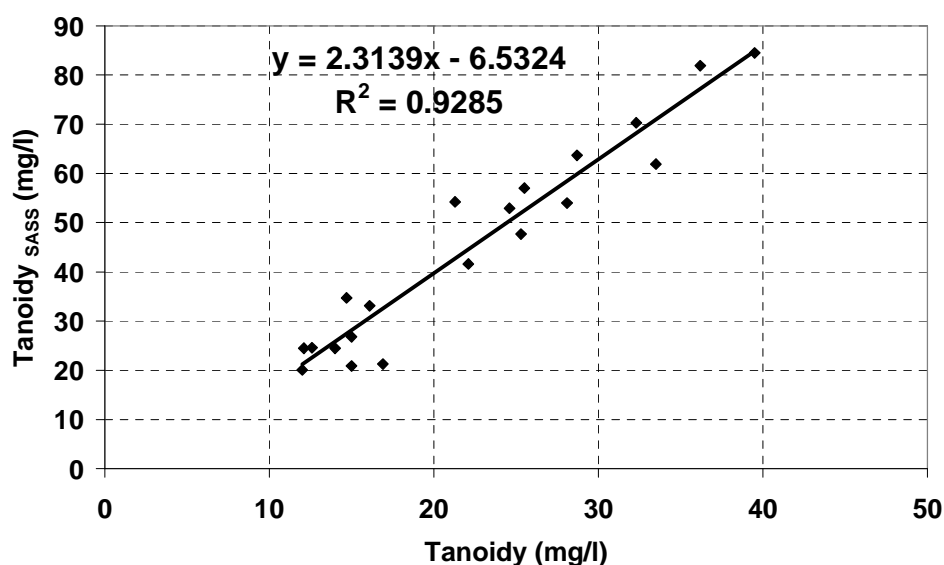
Podobný vliv na výsledek testu má i přidávek saturovaného síranu amonného (SASS – saturated ammonium sulphate - viz obr.5.12). Čím vyšší je přidávek SASS do vzorku před měřením vlastního testu, tím vyšší je naměřená hodnota tanoidů i hodnota zákalu v maximu Z90max. Při dávkování SASS se nesmí překročit koncentrace, při které již dochází k vysrážení proteinů ve vzorku. Tato hranice se u nestabilizovaných pív pohybuje od 1 ml SASS na 10 ml vzorku do 1,5 ml SASS (Basařová [16]), u stabilizovaných pív je výrazně vyšší. U většiny pív je námi použitá maximální dávka 0,5 ml SASS na 5 ml vzorku dostatečně vysoká na zvýraznění zákalového maxima a zároveň dostatečně nízká, aby nevyvolávala srážení proteinů. Přidávání

SASS do vzorku před měřením testu je vhodnou metodou pro zvýšení jeho citlivosti a rozlišovací schopnosti.



Obr.5.12 - Standardní průběh závislosti výsledku testu na obsah tanoidů na přidavku nasyceného roztoku síranu amonného SASS. Měřeno na 5 ml vzorku nestabilizovaného piva.

Abychom ověřili použitelnost naší stanovené dávky síranu 0,5 SASS na 5 ml vzorku, provedli jsme srovnávací měření obsahu tanoidů standardní metodou bez přidavku SASS a s přidavkem 0,5 SASS ($Tanoidy_{SASS}$) na 40 vzorcích českých piv od 15 pivovarů s různou dobou trvanlivosti a s různým stupněm stabilizace. Výsledky jsou zobrazeny na obr.5.13. Přestože jsme měřili vzorky, které se lišily použitými surovinami a technologií výroby, hodnoty naměřené oběma metodami spolu úzce korelovaly. V obr.5.13 jsou zahrnuty pouze vzorky slabě a středně stabilizované na obsah polyfenolů, u kterých vyšla hodnota tanoidů bez přidavku SASS nenulová. Hodnotu $Tanoidy_{SASS}$ s předkápnutím síranu jsme naměřili nenulovou u všech námi měřených vzorků (i hluboce stabilizovaných).



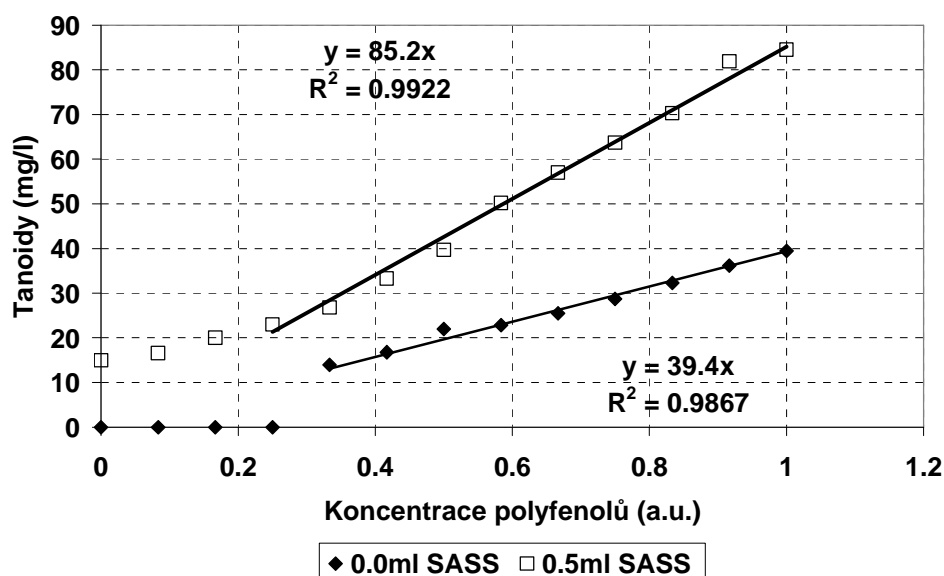
Obr.5.13 - Vzájemná závislost výsledku testu na obsah tanoidů bez a s přidavkem 0,5 ml SASS ($Tanoidy_{SASS}$) do 5 ml vzorku pro 23 druhů českých piv typu Pilsener.

5.3.1.6 Vliv koncentrace zákalotvorných polyfenolů

Vzniká otázka, nakolik poloha maxima PVP_{Z90max} při testu odráží obsah zákalotvorných polyfenolů ve vzorku. Abychom ověřili, jakým způsobem bude výsledek testu ovlivněn změnou koncentrace polyfenolů, provedli jsme následující měření. V provozních podmínkách pivovaru jsme odebrali dva vzorky piva. První vzorek bylo pivo typu Pilsener (světlý ležák), po finální filtraci zbavené kvasinek bez jakékoliv stabilizační úpravy na straně polyfenolů. Druhý vzorek bylo stejné pivo, které bylo zbaveno polyfenolů tak, že bylo vedeno přes stabilizační filtr s regenerovatelným absorbentem PVPP Polyclar Super R. Abychom dosáhli maximálního odstranění polyfenolů, byla kontaktní doba piva s absorbentem prodloužena na maximum. Tyto dva vzorky piva jsme míchali v definovaných poměrech a měřili obsah tanoidů.

Výsledky měření jsou zobrazeny na obr.5.14. Předpokládáme, že vzorek ošetřený dlouhým kontaktem s PVPP byl téměř kompletně zbaven tanoidů a koncentraci polyfenolů v namíchaném vzorku budeme udávat jako podíl nestabilizovaného piva. Výsledek testu koreluje s velkou přesností s obsahem polyfenolů absorbovatelných na PVPP pro vzorky, které mají podíl nestabilizovaného piva větší než 30%. Při větším naředění polyfenolů není hodnota tanoidů detekovatelná, na křivce Z90 se neobjeví žádné maximum.

Pro srovnání jsou na obr.5.14 zobrazeny výsledky testu, který byl proveden na vzorcích s předkápnutím 0,5ml SASS na 5 ml vzorku před vlastním měřením. Výsledek testu znovu koreluje s velkou přesností s mírou ředění nestabilizovaného piva. Na vzorcích s menším než 30% podílem nestabilizovaného piva se tentokrát objevuje nefelometrické maximum a lze určit výsledek testu - odečtené hodnoty se odchyľují od lineární závislosti. Nadhodnocení obsahu tanoidů při nízkých hodnotách je způsobeno nízkou rychlostí tvorby PVP-tanoidových komplexů.



Obr.5.14 - Závislost výsledku testu na obsahu tanoidů bez a s přidavkem 0,5 ml SASS do 5 ml vzorku na koncentraci polyfenolů. Vzorky s různou koncentrací polyfenolů byly získány definovaným mícháním nestabilizovaného piva a stejného piva zbaveného polyfenolů dlouhodobým účinkem PVPP. Koncentrace polyfenolů je udávána v relativním poměru vzhledem k nestabilizovanému vzorku.

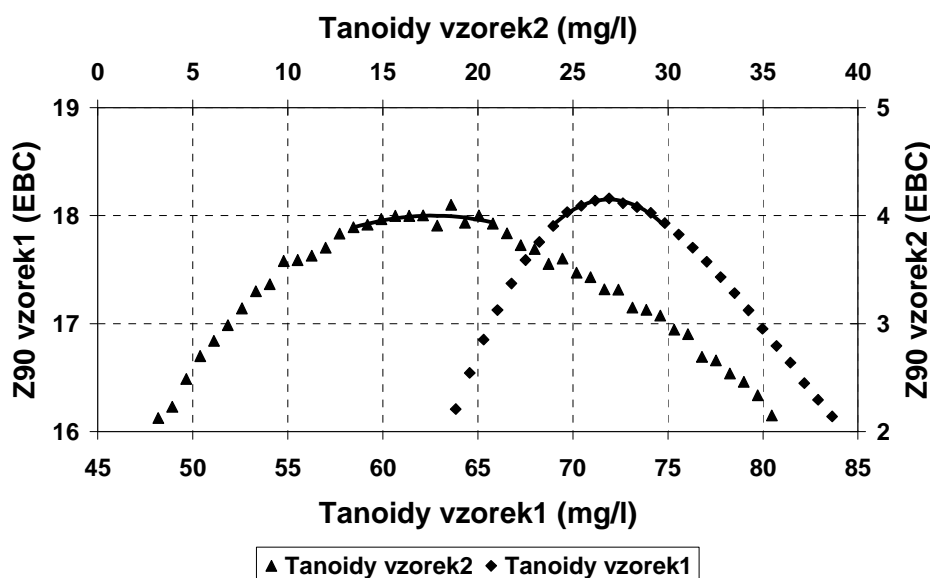
Hodnota okolo 12 mg/l je minimální obsah tanoidů detekovatelný standardním PVP testem. U většiny pív, které jsou stabilizovány na obsah polyfenolů absorpcí na PVPP, je obsah tanoidů natolik nízký, že výsledek standardního PVP testu je nulový. Předkápnutí 0,5ml SASS na 5

ml vzorku umožňuje měření obsahu tanoidů i u piv stabilizovaných pomocí PVPP. Výsledky testu bez přídavku SASS a s definovaným přídavkem SASS spolu korelují v celém rozsahu obsahu tanoidů (viz obr.5.14). Pro jeden typ piva je možné určit koeficient pro vzájemný přepočet hodnot.

Křivka Z90 má v oblasti maxima symetrický tvar. Naměřenými body lze s velkou přesností proložit křivka Gaussova typu podle vzorce 5.1 (viz obr.5.15), kde Z90 je naměřená hodnota zákalu a C_{PVP} je koncentrace PVP K90 (mg/l), při které je naměřen zákal Z90.

$$Z90 = k_0 + k_1 e^{\left(\frac{C_{PVP} - PVP_{Z90max}}{\Delta C} \right)^2} \quad (5.1)$$

Parametry k_0 , k_1 , C_{PVP} , ΔC se získají proložením optimální křivky naměřenými daty. Hodnota



Obr.5.15 - Křivky vývoje zákalu v průběhu testu na obsah tanoidů v oblasti maxima zákalu pro dva vzorky s rozdílným obsahem tanoidů. Naměřenými body je proložena křivka Gaussova typu podle rovnice 5.1

PVP_{Z90max} odpovídá koncentraci PVP, při které je dosaženo maxima nefelometrického zákalu Z90 a která definuje obsah tanoidů ve vzorku. Proložení umožňuje určit polohu maxima i v případech, kdy jsou naměřené hodnoty zatíženy velkou chybou měření, nebo kdy je změna zákalu v maximu povolná. Na obr.5.15 jsou zobrazeny naměřené hodnoty zákalu v oblasti maxima zákalu Z90 pro 2 vzorky s různým obsahem tanoidů. Naměřenými daty jsou proloženy křivky podle rovnice 5.1. Z proložených křivek vycházejí hodnoty tanoidů 62,6 mg/l pro vzorek 1 a 26,9 mg/l pro vzorek 2. Zvláště u vzorku s velkým obsahem tanoidů umožnilo proložení teoretickou křivkou zpřesnit odečet polohy maxima.

5.3.1.7 Přesnost a reprodukovatelnost testu

Při zachování standardních podmínek měření a s použitím matematického vyhodnocení polohy maxima je možné dosáhnout reprodukovatelnosti výsledků testu lepší než ± 1 mg/l v rozsahu měření 0 až 100 mg/l (pokrývá rozsah obsahu tanoidů většiny piv). Základním požadavkem pro dosažení maximální reprodukovatelnosti je dodržení konstantní teploty vzorku při měření s přesností lepší než $\pm 0,5$ °C. V našem případě jsme jako standardní teplotu používali $25^\circ\text{C} \pm 0,5$ °C. Vzhledem k tomu, že poloha maxima nefelometrického zákalu je dána dynamickým vývojem distribuce PVP-tanoidových komplexů, je pro zachování reprodukova-

telnosti testu nezbytné dodržet všechny parametry měření konstantní (tj. rychlost dávkování titrantu, rychlost a způsob míchání vzorku).

Kromě již dříve zmíněných efektů existují další parametry, které mohou výrazně ovlivnit kinetiku tvorby zákalu a polohu nefelometrického maxima. Mezi ně patří např. geometrické uspořádání měřicí komory, místo dávkování titrantu ve vzorku, optické uspořádání měřicí aparatury nebo vlnová délka použitého světla. Právě tyto vlivy mohou způsobit rozdíly ve výsledcích získaných na aparaturách s rozdílnou konstrukcí.

Vzhledem k charakteru testu a vlastnostem interakce PVP s tanoidy mohou být naměřené výsledky ovlivněny použitým PVP K90. Rozpustné PVP prodávané výrobcem je charakterizované hodnotou K, která je odvozena z měření viskozity a odpovídá střední molekulární váze (M_w) polymeru. PVP K90 má střední molekulární váhu (M_w) 1 300 000, na trhu jsou dále k dispozici PVP K15 ($M_w = 8\ 000$), K30 ($M_w = 60\ 000$), K60 ($M_w = 300\ 000$) a K120 ($M_w = 3\ 000\ 000$). Jednotlivé produkty se získávají frakcionací surového vzorku. Každá frakce je směsí různě dlouhých řetězců. Polydisperzita frakcí je velká a i PVP K90 a K120 obsahuje určitou část nízkomolekulárního PVP. Chollot [44] ukázal, že frakce PVP s nízkou molekulární vahou (PVP K15, K30, K60) sráží tanoidy méně účinně než PVP K90, přestože je schopná část tanoidů vázat. Polydisperzita komerčně dostupných PVP není přesně známa a může se měnit od šarže k šarži i pro vzorky od jednoho výrobce, a tím ovlivnit výsledky testu.

Z předkládaných výsledků je možné učinit následující závěry. Test na obsah tanoidů podle Chapona (PVP test) je vhodný nástroj pro určení obsahu tanoidů (zákalotvorných polyfenolů) v pivu s vysokou reprodukovatelností. Nově zavedená verze testu s předkápnutím SASS (0,5 SASS na 5 ml vzorku) umožňuje měřit obsah tanoidů i u hluboce stabilizovaných vzorků. Výsledky testu jsou lineárně závislé na obsahu tanoidů a korelují se stupněm stabilizace piva ze strany polyfenolů.

5.3.2 Optimalizace testu na citlivé proteiny

Test na citlivé proteiny (dále SP test – sensitive proteins) byl zaveden do EBC analytiky na základě prací prof. Chapona [42,43]. Na rozdíl od klasických metod detekce proteinů (ASBC [1], Siebert [102]), které se používají všeobecně k určení celkového obsahu proteinů, detekuje test na citlivé proteiny pouze zákalotvorné proteiny s nejvyšší afinitou k taninům.

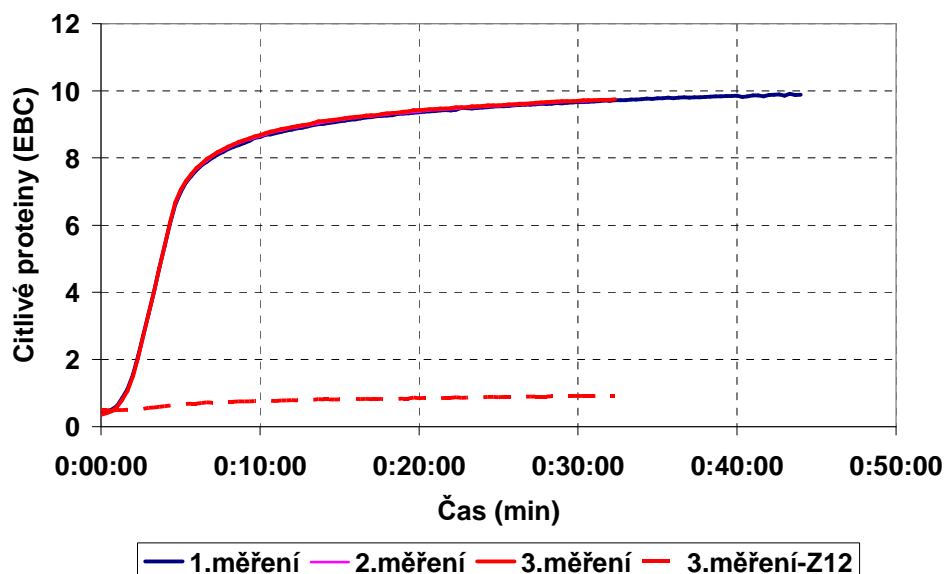
Při SP testu je do vzorku konstantní rychlostí dávkován roztok gallotaninu. Pomalá titrace gallotaninu do vzorku piva za stálého míchání simuluje tvorbu kondenzovaných polyfenolů v pivu během stárnutí. Přestože se gallotanin, který je prototypem hydrolyzovatelné třísloviny, svou strukturou liší od kondenzovaných polyfenolů v pivu, předpokládá se, že interakce taninu s proteiny je nejvíce podobná interakcím, které se uplatňují při vzniku nebiologického polyfenol-proteinového koloidního zákalu piva během stárnutí. Práce provedená prof. Chaponem [43] prokázala, že gallotanin DAB7 od firmy Merck je citlivý na změnu obsahu citlivých proteinů a je schopen rozlišit různě stabilizovaná piva stejného druhu. Přestože některé práce (Hagerman [34]), provedené na modelových roztocích polyfenolů a proteinů, odhalily rozdílnost vazby gallotaninu a v pivu vznikajících kondenzovaných polyfenolů na proteiny, není zatím k dispozici žádná srovnatelně levná, dostupná a reprodukovatelně připravitelná náhrada gallotaninu.

Naším cílem bylo implementovat SP test pro provedení na aparatuře DATTS, zhodnotit vliv faktorů, které ovlivňují výsledek testu, optimalizovat vlastní postup měření tak, aby bylo dosaženo výsledků s maximální reprodukovatelností, a zhodnotit přesnost měření a její vliv na výsledné vyhodnocení koloidní stability piva.

5.3.2.1 Vliv způsobu dávkování titrantu

Podle Analytiky EBC [8] má být titrant dávkován do vzorku „po kapkách“ za stálého míchání. Abychom ověřili vliv dávkování titrantu na výsledek testu, provedli jsme sérii standardních testů (při teplotě 25°C, 5 ml vzorku, dávce 0,25 ml taninu s koncentrací 0,2 g/l, míchání magnetickým míchadlem rychlostí 200 rpm) s ručním dávkováním titrantu a s dávkováním titrantu pomocí pístové pumpy NE500 konstantní rychlostí 3 ml/hod. Měření jsme provedli na sadě 20 vzorků piv, přičemž každý vzorek byl měřen 3x. Při ručním dávkování titrantu jsme dostali standardní odchylku výsledku 8% hodnoty a při dávkování titrantu pístovou pumpou standardní odchylku výsledku 2% hodnoty.

Na obr.5.16 jsou zobrazeny křivky vývoje zákalu při dávkování taninu pumpou rychlostí 3 ml/hodinu. Při trojím měření jednoho vzorku jsou křivky vývoje zákalu téměř totožné. Křivky ukazují standardní vývoj zákalu během SP testu při dávkování taninu pumpou konstantní



Obr.5.16 - Standardní křivky vývoje zákalu během SP testu při dávkování taninu (s koncentrací 0,2 g/l) pumpou konstantní rychlostí 3 ml/hod do 5 ml vzorku. Dávkování roztoku taninu je ukončeno při koncentraci taninu 10 mg/l vzorku, tzn. v páté minutě měření. Křivky tří měření provedených na stejném vzorku jsou reprodukovatelné s velkou přesností. Nárůst zákalu Z12 je výrazně nižší ve srovnání s nárůstem nefelometrického zákalu Z90.

rychlostí. Na začátku dávkování taninu je pomalý náběh křivky daný rychlostí reakce taninu s proteiny. Po něm dochází k lineárnímu nárůstu zákalu s titrovanou dávkou. Po skončení dávkování taninu (na obrázku v 5. minutě měření) zákal dále narůstá, přičemž rychlost tvorby zákalu klesá. V grafu je vynesena i křivka vývoje zákalu v dopředném kanálu Z12. Křivka má podobný průběh jako křivka vývoje nefelometrického zákalu. Dopředný zákal dosahuje výrazně nižších hodnot než nefelometrický zákal, poměr hodnot Z12/Z90 je v rozmezí 0,03 - 0,2. Tato hodnota je stejná jako poměr hodnot Z12/Z90 koloidního zákalu, který vzniká v pivech během první fáze stárnutí. Tanin-proteinové komplexy, které vznikají při kontinuálním dávkování taninu do piva, jsou distribucí velikostí podobné koloidním zákalům piv (viz tabulka 5.1, Sladký [117]).

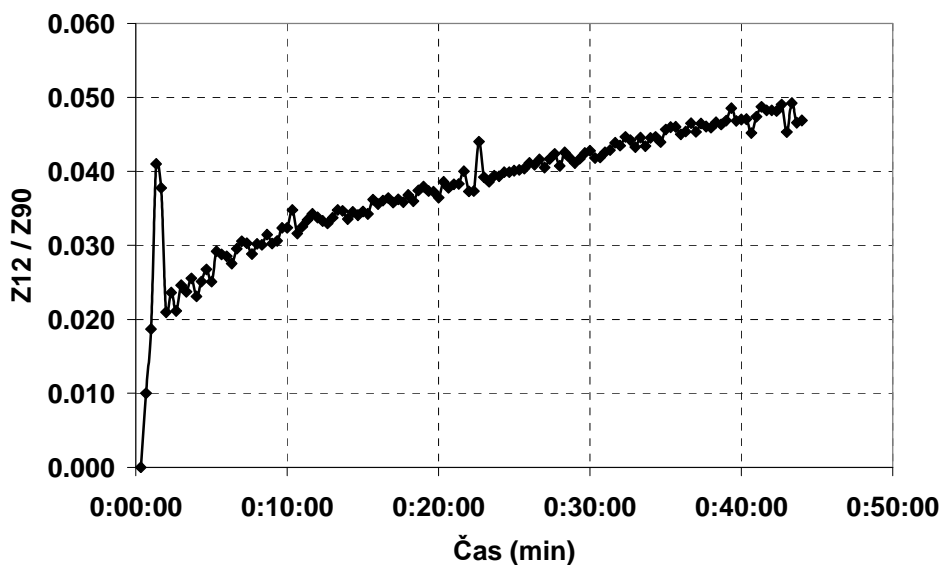
Na obr.5.17 je vynesena typická křivka časového vývoje poměru zákalů Z12/Z90 během SP testu. Hodnoty naměřené během 1. minuty měření jsou zatíženy velkou chybou, protože hodnoty zákalu jsou nízké; přesto je průběh křivky typický a opakuje se u všech měření. Dávkovaný tanin má lokálně vyšší koncentraci v místě konce dávkovací trubičky, vytvářejí se zde velké tanin-proteinové komplexy s vyšším poměrem Z12/Z90. Kontinuálním mícháním se

koncentrace taninu v objemu homogenizuje a tanin-proteinové komplexy vznikají postupně v celém objemu. Nově vznikající malé komplexy ve 2.minutě měření převáží v celkové hodnotě zákalu, poměr Z12/Z90 poklesne. Dále již poměr Z12/Z90 kontinuálně roste i po ukončení dávkování taninu. Tanin-proteinové komplexy s časem agregují, zvětšuje se jejich střední velikost. Tento průběh odpovídá výsledkům naměřeným na modelových roztocích proteinů a taninu a publikovaných Freitasem [27].

Tabulka 5.2 - Srovnání výsledků SP testu

	Dávkování pumpou			Ruční dávkování		
	Z90(EBC)	Z12(EBC)	Z12/Z90	Z90(EBC)	Z12(EBC)	Z12/Z90
Průměr	9.31	0.42	0.0446	8.09	0.92	0.1137
Standardní odchylka	0.04	0.01	0.0013	0.31	0.09	0.0107

V tabulce 5.2 je souhrně zobrazeno porovnání výsledků měření SP testu s ručním dávkováním a kontinuálním dávkováním taninu na jednom vzorku piva. Vzorek byl měřen desetkrát oběma způsoby. Při ručním i pomalém dávkování taninu není dosaženo dostatečné homogenity taninu ve vzorku, a tím i reprodukovatelnosti vytváření tanin-proteinových komplexů. Střední hodnoty Z90 jsou při ručním dávkování taninu menší, poměr Z12/Z90 větší, vznikají komplexy s větší střední velikostí. Standardní odchylky hodnot Z12/Z90 jsou při ručním dávkování výrazně vyšší, reprodukovatelnost distribuce velikostí tanin-proteinových komplexů je menší. Abychom dosáhli maximální reprodukovatelnosti měření, přijali jsme jako standardní postup provedení testu citlivých proteinů s dávkováním taninu píšťovou pumpou.



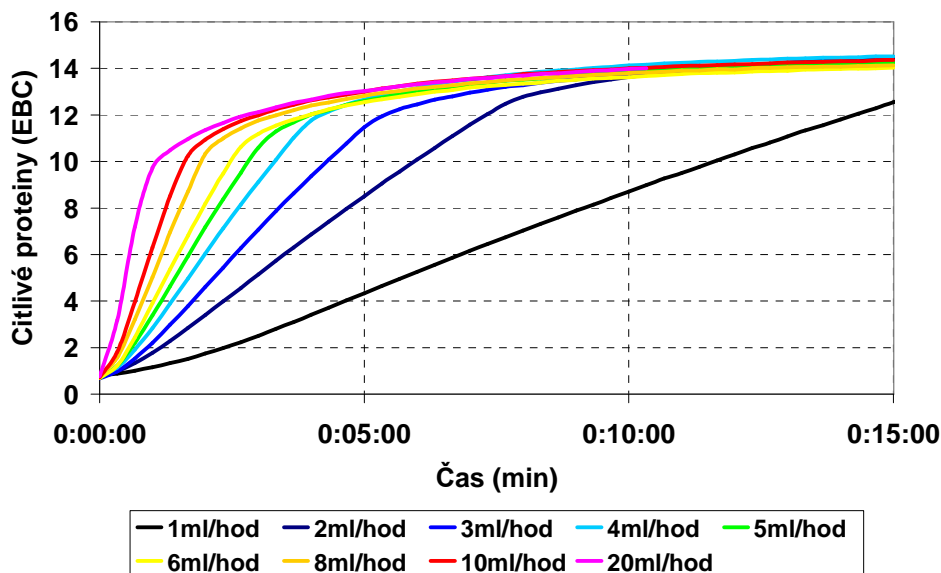
Obr.5.17 - Standardní křivka vývoje poměru dopředného Z12 a nefelometrického Z90 zákalu během SP testu při dávkování taninu (s koncentrací 0,2 g/l) pumpou konstantní rychlostí 3 ml/hod do 5 ml vzorku. Dávkování roztoku taninu je ukončeno při koncentraci taninu 10 mg/l vzorku, tzn. v 5minutě měření

Postupná agregace tanin-proteinových komplexů (nárůst poměru Z12/Z90) vysvětluje fakt, že ani po 40 minutách měření nedochází u některých typů piv k úplnému ustálení hodnot zákalu Z90. Spektrum proteinů v pivu reagujících s taninem je velmi široké, spektrum polyfenolických sloučenin v taninu je rovněž široké, vzájemná interakce je komplexní proces. Rozdílné složení citlivých proteinů v pivu vysvětluje i rozdílný průběh křivek vývoje zákalu po skončení dávkování taninu u různých druhů piv. Agregace tanin-proteinových komplexů probíhá u některých vzorků takovým způsobem, že dochází i k poklesu nefelometrického signálu. Spo-

lečným rysem všech měření je pomalý nárůst dopředného zákalu Z12 a s ním spojený nárůst poměru Z12/Z90.

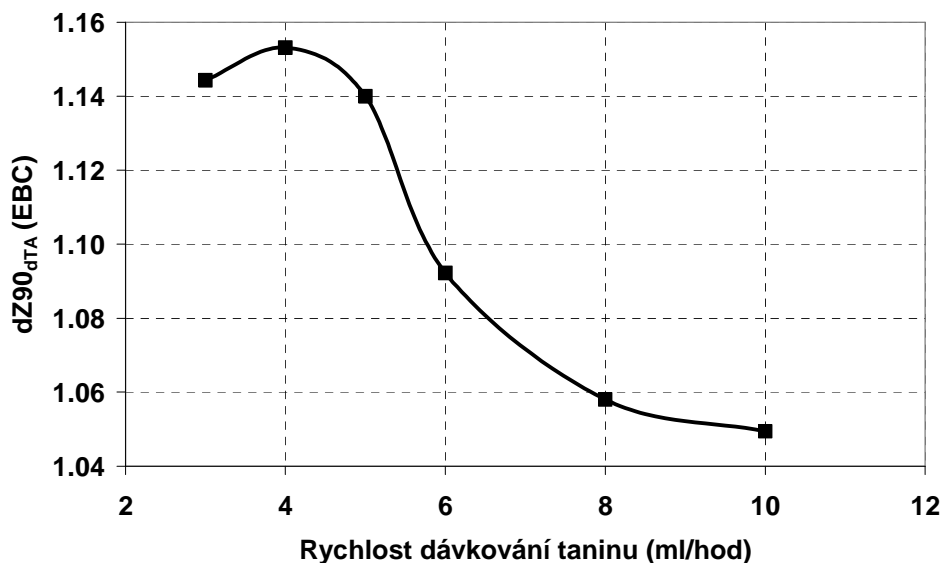
5.3.2.2 Vliv rychlosti dávkování titrantu

Provedli jsme srovnání výsledků SP testu při různých rychlostech dávkování titrantu. Na obr.5.18 jsou vyneseny křivky vývoje zákalu naměřené při SP testu provedeném na stejném vzorku piva s různou rychlostí dávkování taninu. Při rychlostech dávkování od 2 do 10



Obr.5.18 - Standardní křivky vývoje zákalu během SP testu při dávkování taninu (koncentrace 0,2 g/l) pumpou pro různé rychlosti dávkování (5 ml vzorku)

ml/hod se křivky od 10.minuty měření překrývají, výsledky testu jsou totožné v rámci chyby měření 2%. Při rychlosti dávkování titrantu 3 ml/hod je při standardních podmínkách (5 ml vzorku, koncentrace taninu 0,2 g/l, cílová koncentrace taninu 10 mg/l) dávkován objem 0,25 taninu po dobu 300 s. Další zrychlování nemá význam, rychlost dávkování taninu 3 ml/hod jsme přijali za standardní.

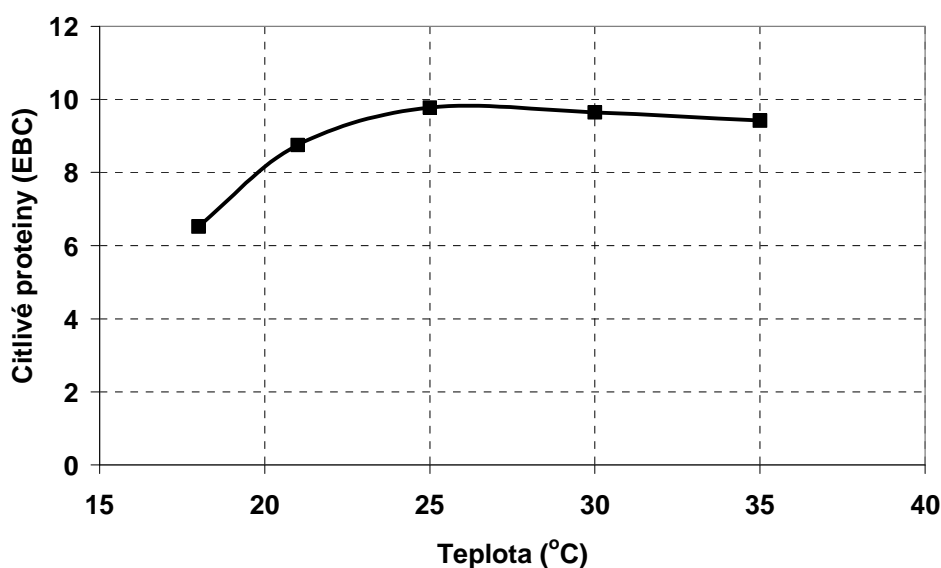


Obr.5.19 - Závislost rychlosti nárůstu nefelometrického zákalu $dZ90_{dTA}$ na rychlosti dávkování taninu při SP testu. Rychlost růstu zákalu je přepočtena na přídatek taninu 1 mg/l.

Při kontinuálním dávkování taninu do vzorku konstantní rychlostí dojde po určité počáteční fázi náběhu, která je daná rychlostí protein-taninové interakce, k lineárnímu nárůstu zákalu s titrovanou dávkou. Označíme $dZ90_{dT_A}$ změnu nefelometrického zákalu odpovídající dávce taninu 1mg na litr vzorku a její hodnotu vypočteme ze směrnice nárůstu zákalu v lineární části křivky. Na obr.5.19 jsou vyneseny hodnoty $dZ90_{dT_A}$, vypočtené z křivek na obr.5.18. Do rychlosti dávkování 5 ml/hod se rychlost tvorby zákalu nemění. Pro vyšší rychlosti dávkování taninu rychlost vývoje zákalu podle očekávání klesá, rychlost dávkování taninu je příliš velká ve srovnání s rychlostí tvorby komplexů.

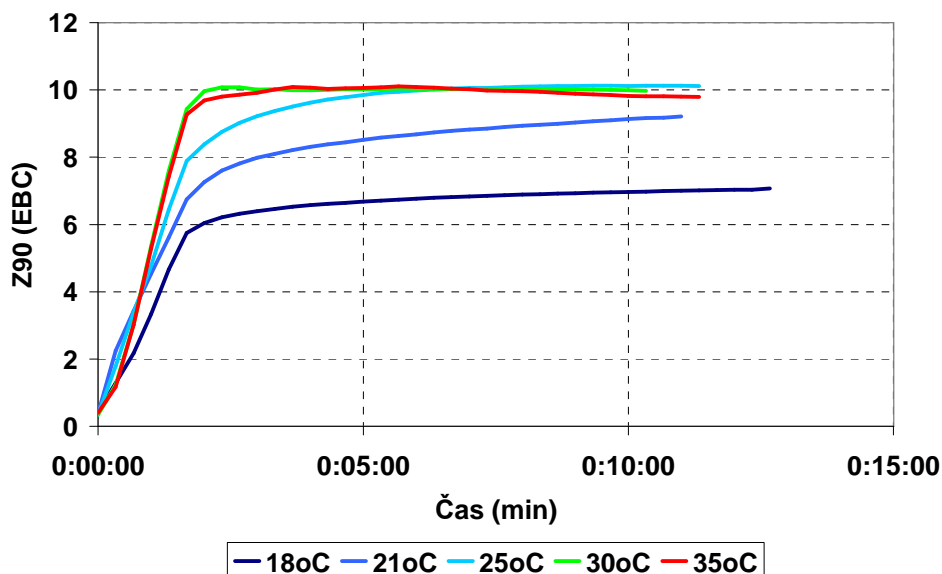
5.3.2.3 Vliv teploty

Na obr.5.20 je vynesena typická závislost výsledku SP testu na teplotě. Při teplotě měření menší než 25 °C je výsledek testu nižší o cca 2% na 1°C. Při teplotě větší než 25 °C je výsledek na teplotě nezávislý. Standardní měření jsme prováděli při teplotě 25°C ± 0.5 °C .



Obr.5.20 - Standardní průběh závislosti výsledku SP testu na teplotě. Měřeno na vzorku nestabilizovaného piva.

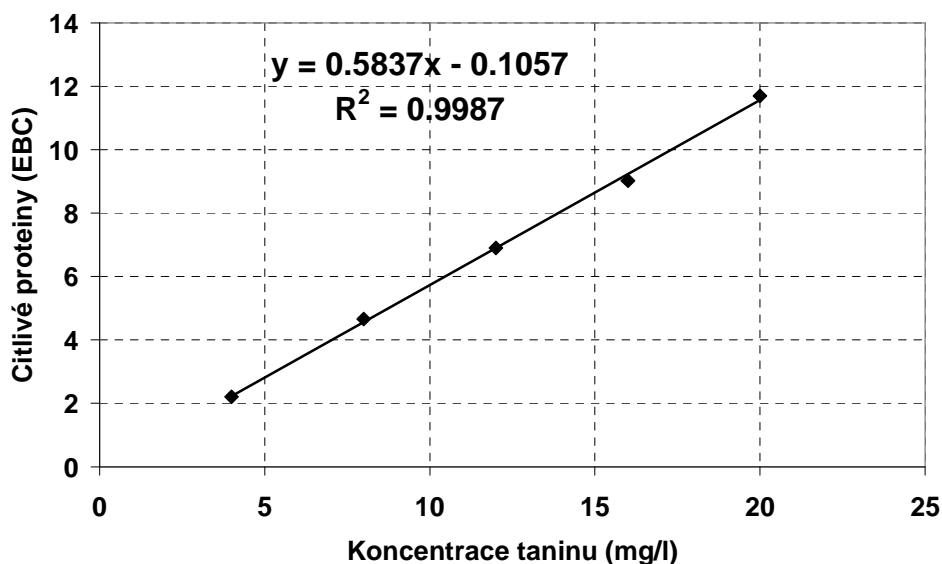
Vysvětlení teplotní závislosti výsledku testu je zřejmé z obr.5.21. Při nižší teplotě je kinetika reakce pomalejší. S rostoucí teplotou rychlost reakce roste, při teplotě 35°C dojde k ustálení hodnoty zákalu Z90 během 1minuty od ukončení dávkování.



Obr.5.21 - Standardní křivky vývoje zákalu během SP testu pro různé teploty měření. Dávkování taninu (koncentrace 0,2 g/l) pumpou rychlostí 3 ml/hod do vzorku o objemu 5 ml.

5.3.2.4 Vliv velikosti dávky taninu

Provedli jsme test s různými dávkami taninu na několika vzorcích piva. Na obr.5.22 je vynesena závislost výsledku SP testu na koncové koncentraci taninu ve vzorku. Závislost je lineární v celém měřeném rozsahu. Lineární nárůst výsledku SP testu s koncentrací taninu odpovídá předpokladu velkého přebytku zákalotvorných proteinů v pivu.

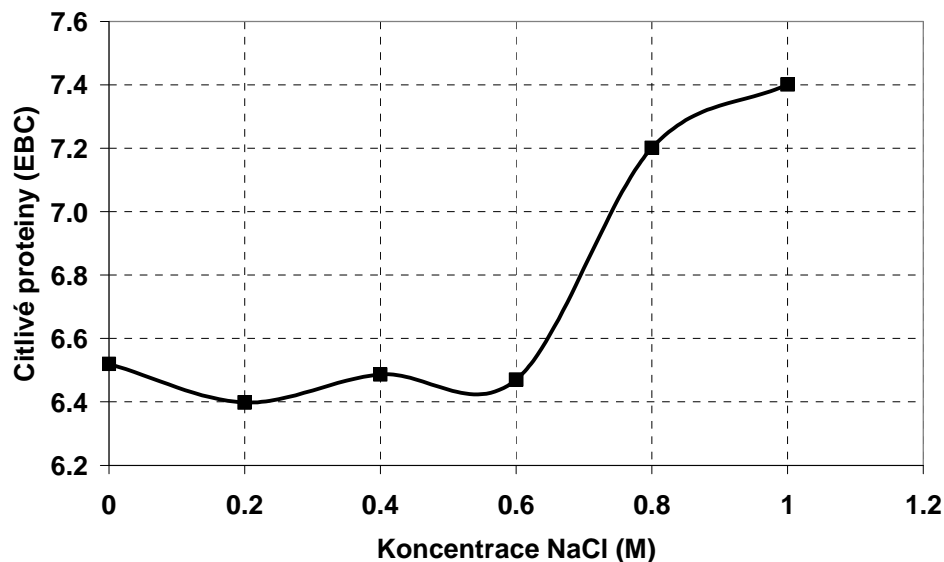


Obr.5.22 - Závislost výsledku SP testu na koncové koncentraci taninu ve vzorku

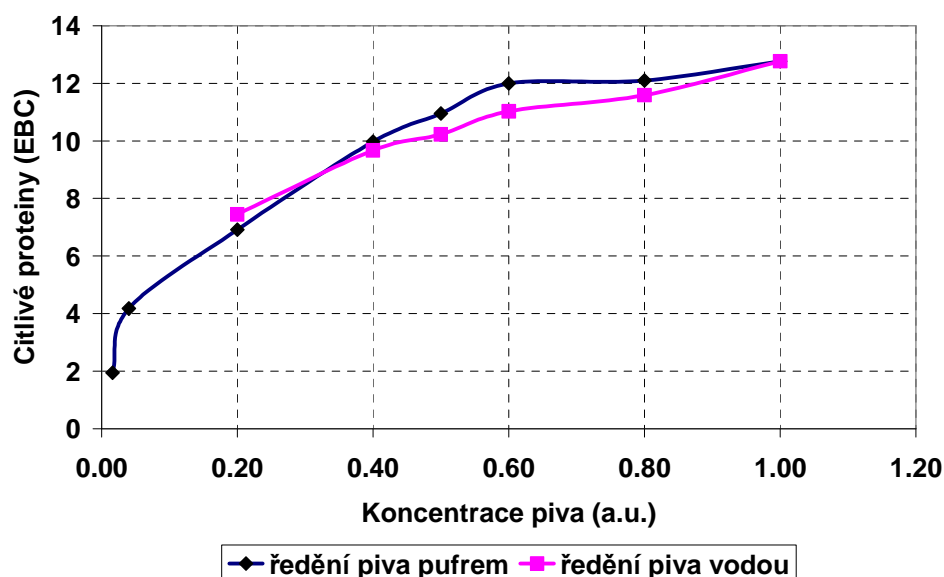
5.3.2.5 Vliv iontové síly

Iontová síla piva odpovídá 0,02 molárnímu roztoku NaCl. Abychom ověřili vliv iontové síly na vazbu citlivých proteinů na tanin, zvyšovali jsme iontovou sílu vzorků piva nasyceným roztokem NaCl. Jako referenční vzorek jsme použili 4 ml piva s přídatkem 1 ml destilované vody. Vzorky s rostoucí iontovou silou jsme připravili přídatkem NaCl do 4 ml piva s doplněním destilovanou vodou na objem 5 ml.

Výsledek měření závislosti výsledku SP testu na iontové síle vzorku je znázorněn na obr.5.23. Až do koncentrace 0,6 Molů nemá NaCl vliv na konečný výsledek testu. Iontová vazba se během SP testu neuplatňuje v tvorbě tanin-proteinového komplexu. Při koncentraci NaCl nad 0,6 M je již elektronegativní vzájemné odpuzování stejných nábojů natolik potlačeno velkou iontovou silou roztoku, že se vytváření komplexů s taninem mohou účastnit i proteiny, které za normálních podmínek v pivo ke koloidním zákalům nepřispívají.



Obr.5.23 - Standardní průběh závislosti výsledku SP testu na iontové síle vzorku. Měřeno na vzorku nestabilizovaného piva. Iontová síla vzorku zvyšována přidávkem 4,8 M roztoku NaCl



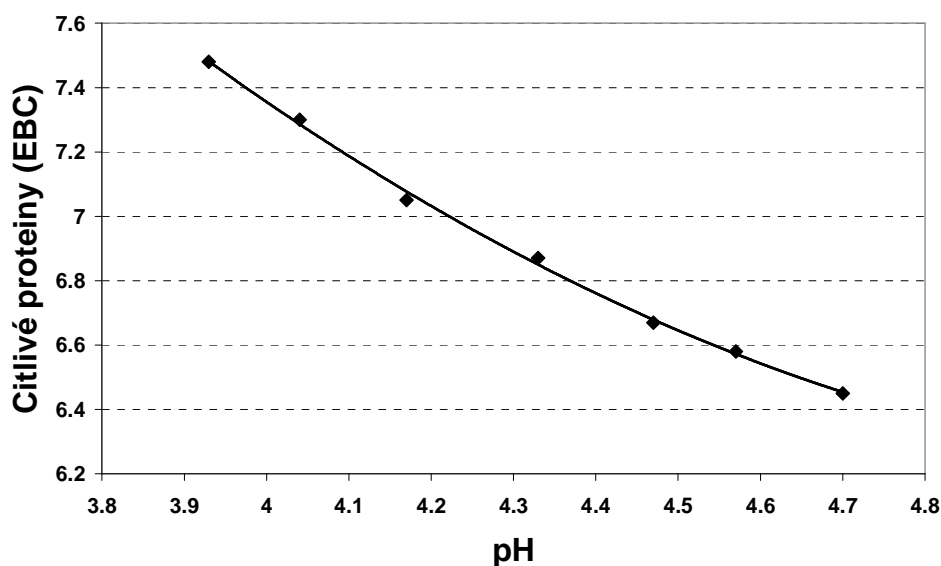
Obr.5.24 - Standardní vývoj výsledku SP testu při definovaném ředění vzorku piva vodou a 0,02 M fosfátovým puřem s 5% obsahem etanolu s pH = 4,40. Koncentrace piva je dána relativním poměrem vzhledem k neředěnému vzorku.

5.3.2.6 Vliv ředění

Vliv ředění piva na výsledek SP testu jsme sledovali dalším pokusem. Vzorek piva jsme definičně ředili destilovanou odplyněnou vodou a 0,02 M fosfátovým pufrům s 5% obsahem etanolu s pH = 4,40. Hodnota pH piva byla 4,42. Na připravených vzorcích jsme provedli standardní SP test, jehož výsledky jsou vyneseny na obr.5.24. Při stejném ředění vodou a pufrům se výsledky testu téměř neliší (odchylka do 5%). Pivo má vlastní vysokou pufrovací schopnost a pH piva ředěného vodou se téměř nemění. Ani změna iontové síly a obsahu alkoholu při naředění vodou nezpůsobila výraznou změnu výsledku. Do hodnoty naředění piva na 1/2 se výsledek SP téměř nemění, je to nejspíše důsledkem velkého přebytku reagujících proteinů.

5.3.2.7 Vliv pH

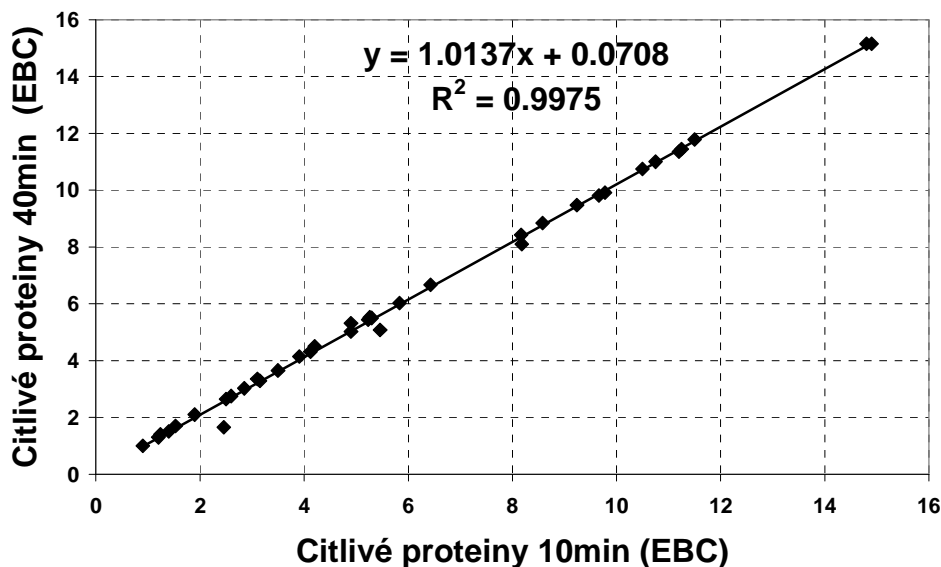
Hodnota pH se u piv pohybuje v rozmezí od 4,1 do 4,8 (Kosař [59]). Abychom ověřili vliv pH na interakci taninu se zákalotvornými proteiny ve vzorku, provedli jsme následující měření. V rozmezí hodnot pH od 4,1 do 4,8 jsme pH vzorků piv upravovali malou dávkou HCL a NaOH (do 200 ul na 5 ml vzorku) a prováděli test na citlivé proteiny. Výsledek měření je zobrazen na obr.5.25. S rostoucí hodnotou pH hodnota citlivých proteinů klesá. V rozsahu pH 4,1 až 4,7 se výsledek testu u zobrazeného vzorku mění v rozsahu 6,4 až 7,0 EBC, tzn. 10% hodnoty.



Obr.5.25 - Standardní vývoj výsledku SP testu v závislosti na pH vzorku. pH bylo upraveno malými dávkami HCl (pH = 1) a NaOH (pH = 11).

Na obr.5.26 je vyneseno srovnání hodnot výsledků SP testů naměřených na 30 vzorcích různých druhů piv. Na každém vzorku byly srovnány výsledky nefelometrického zákalu Z90 dosažené ve 40.minutě od začátku testu (podle EBC normy) a v 10.minutě od začátku testu. SP test byl proveden podle naší standardizované procedury s dávkováním taninu rychlostí 3 ml/hod, přičemž doba dávkování taninu na konečnou koncentraci 10 mg/l byla 5 minut. Hodnoty zákalu získané v 10.minutě korelují s hodnotami odečtenými ve 40.minutě s velkou přesností. Pouze u 3 druhů piv došlo mezi 10. a 40. minutou měření k poklesu zákalu Z90.

Tento pokles byl způsoben agregací tanin-proteinových komplexů do větších celků. U ostatních vzorků došlo k průměrnému nárůstu hodnoty o 0,07 EBC. Praktickým výsledkem srovnání je, že dobu trvání testu (při námi zavedeným standardních podmínkách) je možné zkrátit ze 40 minut na 10 bez snížení citlivosti testu. Výsledky naměřené na jednom typu piva s různým stupněm stabilizace korelují lépe.



Obr.5.26 - Srovnání hodnot výsledků SP testu odečtených v 10. a 40. minutě měření. Měřeno na 30 vzorcích různých druhů českých piv typu Pilsener.

5.3.2.8 Přesnost a reprodukovatelnost testu

Pro dosažení maximální reprodukovatelnosti výsledků SP testu je, stejně jako u testu na obsah tanoidů, nezbytné dodržet všechny parametry měření konstantní. Tvorba tanin-proteinových komplexů a jejich postupná agregace během testu je silně závislá na rychlosti dávkování titrantu, rychlosti a způsobu míchání vzorku a na umístění konce dávkovací trubičky ve vzorku. Geometrické uspořádání měřicí komory má velký vliv na rozmíchávání titrantu ve vzorku a dosažení dostatečné homogenity vzorku. Výsledná hodnota zákalu je ovlivněna optickým uspořádáním měřicí aparatury a vlnovou délkou použitého světla. Podobně jako u testu na obsah tanoidů nelze srovnávat výsledky získané na přístrojích rozdílné konstrukce.

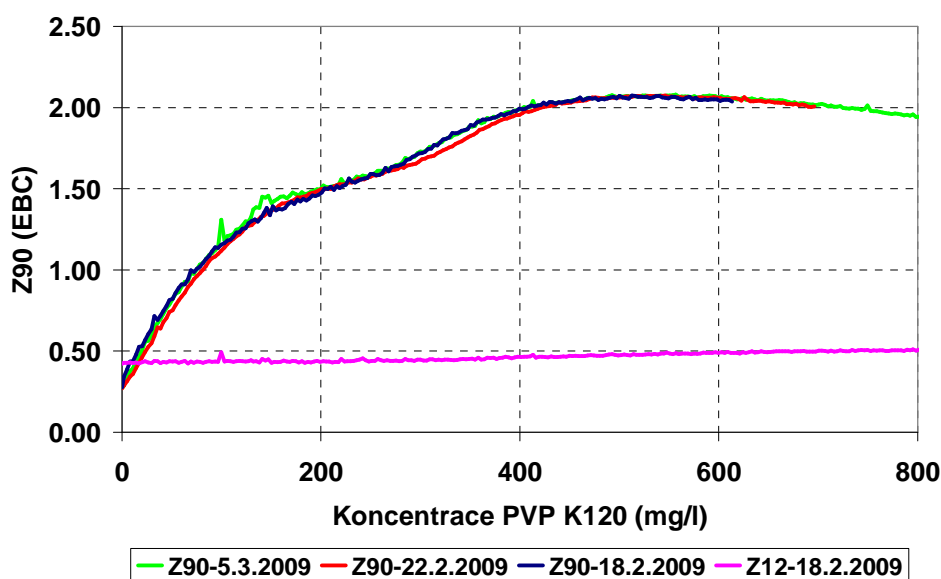
Při opakovaném měření stejného vzorku jsme dosáhli reprodukovatelnosti výsledků lepší než 2% hodnoty a 0,1 EBC. Při opakování měření den po dni s každodenní přípravou roztoku taninu a přípravou (vytřepáním) standardního vzorku piva klesla reprodukovatelnost měření na 6% hodnoty a 0,3 EBC. Pokles reprodukovatelnosti může být způsoben faktory spojenými s vlastnostmi vzorku a s vlastnostmi taninového roztoku.

Výsledek testu může být ovlivněn nestandardností přípravy vzorku. Účinnost odstranění CO_2 ze vzorků piv před vlastním měřením (standardně třepáním po dobu 30 minut) není stoprocentní. Vzhledem k tomu, že výsledek testu je dán velikostí naměřeného zákalu Z90, může i nepatrný výskyt bublin ovlivnit výsledek. Se změnou obsahu zbytkového CO_2 po vytřepání se mění i pH vzorku. Změna pH o hodnotu 0,1 změní výsledek SP o 2% (viz obr 5.25). Velký vliv na vlastnosti tanin-proteinové interakce má obsah etanolu ve vzorku (Poncet-Legrand [85], Zanchi [125]), který se během třepání nepatrně snižuje.

Destilovaná voda použitá k přípravě roztoku taninu obsahuje určité množství rozpuštěného kyslíku. Kyslík způsobuje oxidaci taninu a následné změny precipitačních vlastností roztoku. Ke změnám může dojít i během kratší doby, než je jeden den od přípravy taninového roztoku.

Abychom mohli zhodnotit časový vývoj vlastností taninového roztoku, hledali jsme stálý roztok, který by v SP testu dával definované a dlouhodobě reprodukovatelné výsledky, a který bychom mohli použít jako standard. Bohužel, takovou látku jsme nenašli. Provedli jsme sadu pokusů s PVP K15 až 120 o různých koncentracích, ale nedosáhli jsme reprodukovatelných výsledků s dostatečně vysokou a stabilní hodnotou zákalu. Při dávkování taninu do roztoku PVP s nízkou molekulární vahou (K15, K30, K60) nevznikají měřitelné zákal. Při dávkování taninu do roztoku s přebytkem PVP K90,120 zákal vzniká, ale není stabilní a po chvíli se začíná rozpouštět.

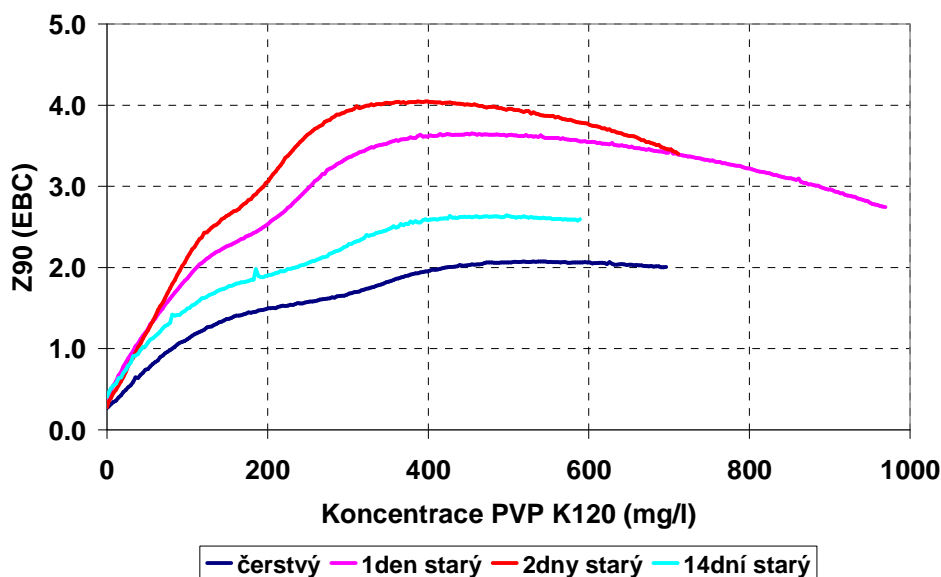
Pro další experimenty jsme zvolili opačnou strategii a jako vzorek jsme použili roztok taninu, do kterého jsme dávkovali roztok PVP K120 jako při klasickém testu na obsah tanoidů. PVP K120 jsme vybrali, protože dává větší hodnoty zákalu. Pro dávkování jsme připravili roztok PVP K120 s koncentrací 1 g/l; maximum zákalu je v tomto případě posunuté k vyšším koncentracím PVP než u piva. Naměřená křivka srážení taninu roztokem PVP K120 je zobrazena na obr.5.27. Maximum zákalu Z90 je ploché a ve srovnání s tanoidy v pivu nastává pro řádově vyšší koncentraci PVP 550 mg/l. Křivka je reprodukovatelná při měření den po dni na nově připravených vzorcích taninu, a to jak z hlediska polohy, tak z hlediska výšky maxima nefelometrického zákalu. Dopředný zákal Z12 se během testu nemění, vznikající PVP-taninové komplexy jsou malé a pro vyšší koncentrace PVP neagregují tak, aby byli měřitelné v dopředném rozptylu.



Obr.5.27 - Vývoj hodnot nefelometrického zákalu při kontinuálním dávkování vodného roztoku PVP K120 (koncentrace 1 g/l) do 5 ml standardního roztoku taninu (koncentrace 0,2 g/l) rychlostí 3 ml/hod. Osa X grafu pře počtena na koncentraci PVP K120 nadávkovanou do vzorku. Pro srovnání přidána křivka vývoje dopředného rozptylu Z12. Křivky naměřeny ve třech různých dnech na čerstvě připravených vzorcích roztoku taninu.

Na obr.5.28 jsou zobrazeny křivky, naměřené stejným způsobem na roztoku taninu (koncentrace 0,2 g/l) po uplynutí určité doby od přípravy. Naměřené křivky se během stárnutí roztoku taninu výrazně mění. Poloha maxima se posouvá k nižší koncentraci PVP a výška maxima zdatelně roste. U dopředného zákalu se objevuje viditelný nárůst hodnoty. Stárnutím a oxidací se vlastnosti taninu mění; tato změna je detekovatelná srážením pomocí PVP K120. Změny taninu se projeví na křivce srážení PVP dříve, než dojde ke změně hodnoty naměřené při SP testu.

Základní nevýhodou SP testu je nutnost každodenní přípravy roztoku taninu a nemožnost přesné kontroly precipitačních vlastností připraveného roztoku na standardním dlouhodobě stabilním vzorku. Tuto nevýhodu testu je možné odstranit přípravou dlouhodobě stabilního roztoku taninu např. přidávkem antioxidantů, který by nepodléhal oxidaci.



Obr.5.28 - Změny titračních křivek PVP K120 (koncentrace 1g/l) při dávkování do roztoku taninu různého stáří. Koncentrace taninu 0,2 g/l, rychlost dávkování PVP K120 3 ml/hod.

Vztahem mezi výsledky SP testu a skutečnou koloidní trvanlivostí piva se zabýváme dále v kap. 5.3.4 „Ověření vztahu titračních testů a koloidní stability piva“.

5.3.3 Optimalizace síranového testu koloidní stability piva

Schopnost neutrálních solí precipitovat při vysokých koncentracích proteiny z roztoku je všeobecně známa. Síran amonný je do dnešních dní hojně používán jako precipitační činidlo při separaci proteinů ze vzorků různého původu. Využití metody SASPL („Saturated Ammonium Sulphate Precipitation limit“) ke kontrole koloidní stability piva vychází ze známé skutečnosti, že rozpustnost proteinů ve vzorku je silně závislá na jejich koncentraci a stabilitě v roztoku. Čím větší dávka SASS je potřebná k vytvoření detekovatelného zákalu, tím koloidně stabilnější roztok je. Přestože mechanismus precipitace proteinů při dávkování saturovaného síranu amonného (SASS) do vzorku je odlišný od mechanismu tvorby koloidního zákalu během stárnutí, předpokládá se, že čím méně stabilní jsou proteiny v roztoku, tím snáze se budou srážet taniny vznikajícími během stárnutí. Z tohoto hlediska metoda SASPL měří stabilitu vzorku ze strany zákalotvorných proteinů a je alternativní metodou k testu na obsah citlivých proteinů.

Naším cílem je - podobně jako u předchozích testů - implementovat metodu SASPL na aparaturu DATTS, zhodnotit vliv faktorů, které ovlivňují výsledek testu, zjistit reprodukovatelnost a přesnost měření a zhodnotit vliv dosažené přesnosti metody na přesnost výsledného vyhodnocení koloidní stability piva.

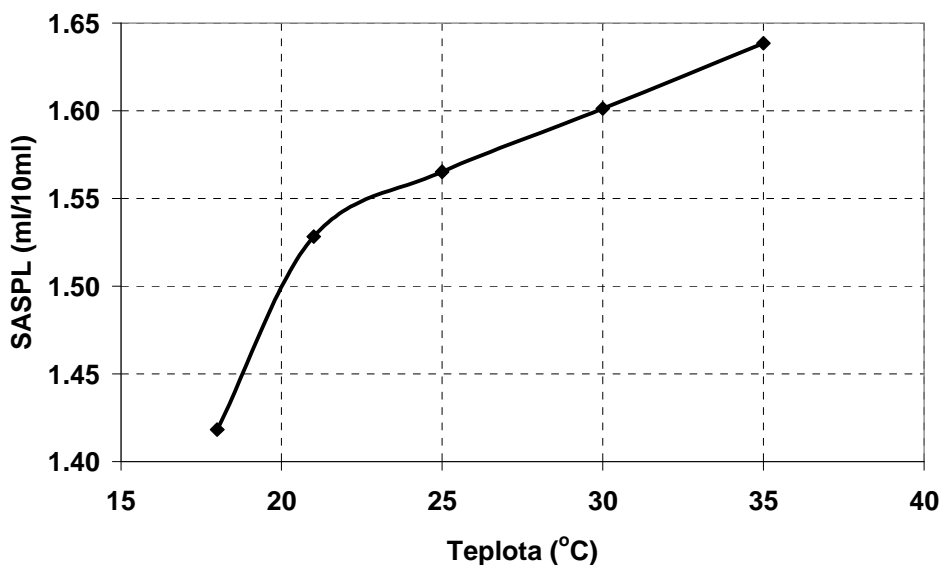
5.3.3.1 Vliv rychlosti dávkování SASS

Rychlost precipitace proteinů ve vzorku piva a vytvoření měřitelného zákalu po přidání jednorázové nadprahové dávky SASS je podle našich předchozích měření v řádech vteřin až desítek vteřin (Sladký [114,115]). Při standardních podmínkách měření SASPL dávkujeme SASS do

vzorku o objemu 5 ml rychlostí 6 ml/hod. Při této rychlosti dávkování je rychlost změny koncentrace SASS ve vzorku 0,1 ml/10 ml za 30 vteřin. Rychlost dávkování SASS je dostatečně malá ve srovnání s rychlostí tvorby proteinových precipitátů, práh SASPL je na rychlosti dávkování nezávislý.

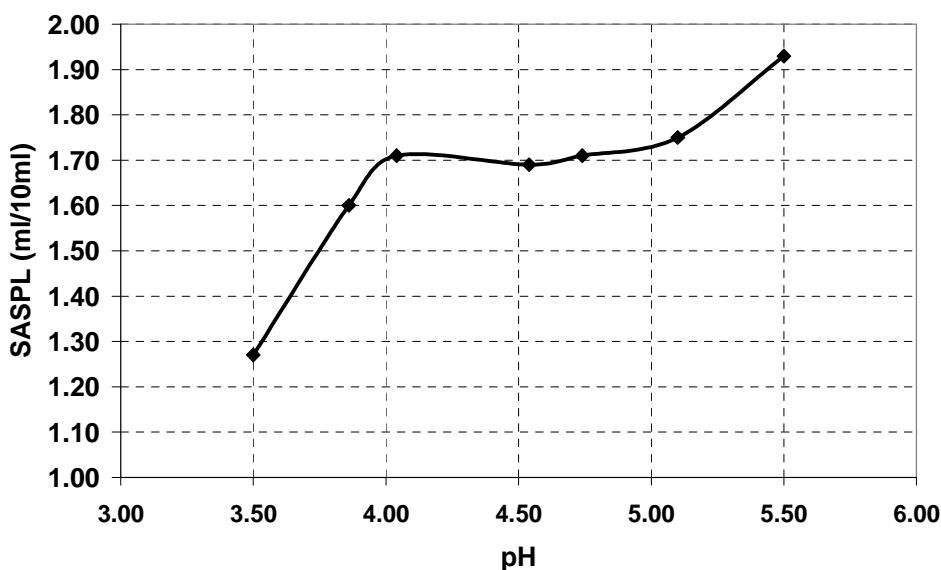
5.3.3.2 Vliv teploty

Rozpustnost látek je závislá na teplotě. Typická ukázka změny výsledku SASPL v závislosti na teplotě, naměřené na vzorku světlého piva, je zobrazena na obr.5.29. S rostoucí teplotou rozpustnost proteinů roste a výsledek SASPL se posouvá k vyšším hodnotám. Teplotní závislost v okolí standardní teploty měření 25°C je 0,01 na 1°C změny teploty. Teplotní závislost SASPL se mění pro různá piva v rozmezí 0,01 až 0,02 ml/10 ml na 1 °C. Při udržení standardní teploty měření v rozsahu 25°C ± 0,5 °C je chyba SASPL způsobená fluktuací teploty v rozmezí ± 0,01 ml/10 ml.



Obr.5.29 - Standardní průběh závislosti výsledku SASPL testu na teplotě. Měřeno na vzorku piva

5.3.3.3 Vliv pH



Obr.5.30 - Standardní průběh závislosti výsledku SASPL testu na pH vzorku piva. pH bylo upraveno malými dávkami HCl (pH = 1) a NaOH (pH = 11).

Vliv pH na výsledek SASPL testu jsme ověřili následujícím pokusem. V rozmezí hodnot pH od 3,5 do 5,5 jsme pH vzorků piv upravovali malou dávkou HCL a NaOH (do 200 μ l na 5 ml vzorku). Výsledek SASPL testu v závislosti na pH je zobrazen na obr.5.30. S rostoucí hodnotou pH roste hodnota SASPL. V rozsahu pH 4,1 až 4,8, který odpovídá rozsahu pH standardních piv, se výsledek testu u měřeného vzorku mění v rozsahu 0,1 ml/10 ml.

5.3.3.4 Přesnost a reprodukovatelnost testu

Výsledek SASPL testu je mnohem méně citlivý na změny parametrů měření, než test na obsah tanoidů a test na citlivé proteiny. Tvorba proteinových precipitátů je rychlá a nezávislá na rychlosti dávkování SASS. Jednou z podmínek k dosažení reprodukovatelných výsledků je zajištění dostatečné homogenizace SASS ve vzorku tak, aby nedocházelo k lokální precipitaci proteinů i pro podprahové koncentrace SASS.

Při opakovaném měření stejného vzorku jsme dosáhli reprodukovatelnosti výsledků lepší než $\pm 0,1$ ml SASS/10 ml vzorku. Výsledek testu může být ovlivněn nestandardností přípravy vzorku, zvláště pak účinností odstranění CO₂ a změnou obsahu etanolu ve vzorku během třepání. V publikaci Sladký [114,115] byl zdokumentován významný vliv doby třepání vzorku na výsledek SASPL testu.

Základní výhodou SASPL testu ve srovnání s testem na citlivé proteiny je možnost dlouhodobého skladování nasyceného roztoku síranu amonného, která usnadňuje a zkracuje přípravu testu před vlastním měřením. Jako kontrolu roztoku SASS a celé aparatury DATTS je možné provést SASPL test na roztoku PVP K90 (s koncentrací 0,4 g/l), který se používá jako titrační činidlo při testu na obsah tanoidů. Roztok PVP K90 je dlouhodobě stabilní a při SASPL testu se na křivce vývoje zákalu objeví výrazný práh precipitace s ostrým nárůstem hodnot zákalu. Poloha prahu je reprodukovatelná s přesností $\pm 0,1$ ml SASS/10 ml vzorku.

5.3.4 Ověření vztahu titračních testů a koloidní stability piva

Jako referenční metodu určení koloidní stability piva jsme vybrali metodu zrychleného stárnutí tepelným šokováním (šokovací test). Mezi přirozenou koloidní stabilitou piva a výsledky šokovacích testů existuje vysoká korelace, která byla potvrzena McMurroughem [72]. Jako standardní metodu nalezení vztahu mezi výsledky šokovacích testů a přirozenou koloidní trvanlivostí piva je možné použít metodu ASBC [2].

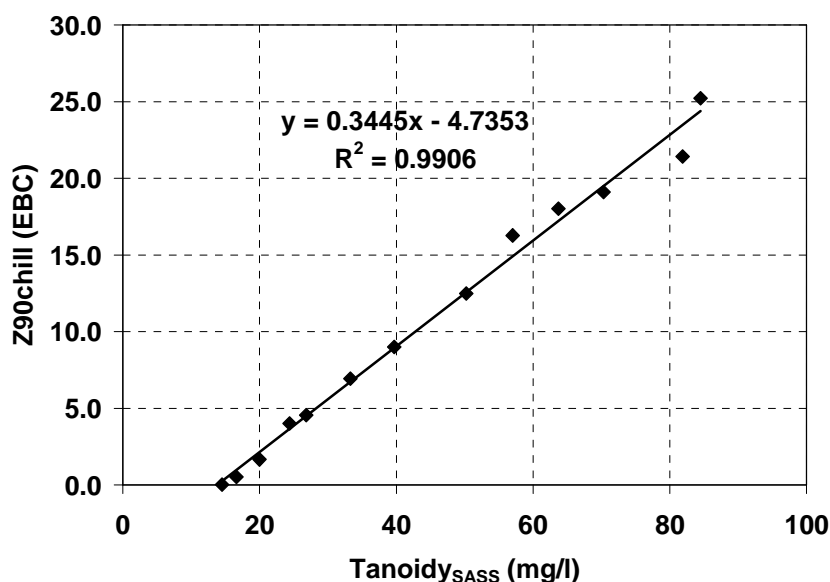
Možnost využití testu na obsah tanoidů s předkápnutím SASS k předpovědi koloidní trvanlivost piva jsme ověřili následujícím pokusem. V provozních podmínkách pivovaru byly připraveny vzorky jednoho druhu piva s rozdílným obsahem tanoidů. Po průchodu filtrem bylo výstupní pivo rozděleno na dvě části. Jedna část piva byla zbavena většiny tanoidů průchodem přes stabilizační filtr s regenerovatelným PVPP, druhá část piva nebyla stabilizována. Mícháním těchto piv v různém poměru bylo získáno 13 vzorků s rozdílným obsahem tanoidů. Tyto vzorky byly stočeny do standardních 0,5 l NRW lahví. Od každého vzorku byla 1 láhev vystavena zrychlenému stárnutí tepelným šokováním (opakováním 48 hodinových cyklů s 24 hodinami na 60°C a 24 hodinami na 0°C) a 1 láhev byla použita k měření titračních testů koloidní stability piva.

Obsah tanoidů naměřený testem bez přídavku SASS se u vzorků pohyboval v rozmezí 0 až 40 mg/l. U čtyř vzorků s nejnižším obsahem tanoidů (menším než 15 mg/l) nebylo naměřeno při dávkování PVP K90 detekovatelné maximum zákalu $Z90_{max}$ a výsledek testu byl 0 mg/l. Při měření testu na obsah tanoidů s předkápnutím 0,5 ml SASS na 5 ml vzorku byla naměřena nenulová hodnota tanoidů u všech vzorků. Rozsah naměřených hodnot se pohyboval

v rozmezí 12 až 82 mg/l. Výsledky testu bez (Tanoidy) a s přidavkem SASS (Tanoidy_{SASS}) spolu korelují s koeficientem přepočtu $\text{Tanoidy}_{\text{SASS}} = \text{Tanoidy} * 2,20 \pm 0,05$. Výsledek testu na citlivé proteiny se pohyboval v rozmezí od 7,38 EBC pro vzorek s nejvyšším obsahem tanoidů až po 6,98 EBC pro vzorek s nejnižším obsahem tanoidů. Podobné výsledky jsme získali i při měření SASPL testu. Výsledek SASPL rostl u vzorků společně s poklesem obsahu tanoidů od hodnoty 1,95 ml/10 ml pro vzorek s nejvyšším obsahem tanoidů až po 2,16 ml/10 ml pro vzorek s nejnižším obsahem tanoidů.

Vzorky byly stabilizovány stejnými dávkami Stabifixu Strong na obsah zákalotvorných proteinů a lišily se pouze mírou stabilizace na obsah tanoidů regenerovatelným PVPP. Pokles citlivých proteinů a nárůst hodnoty SASPL lze vysvětlit částečným odstraněním zákalotvorných proteinů navázaných na tanoidy na PVPP filtru.

V obr.5.31 je vynesena závislost nefelometrického chladového zákalu *Z90chill* na obsahu tanoidů vzorků měřených s předkápnutím 0,5 ml SASS (Tanoidy_{SASS}). Chladový zákal byl naměřen na konci 7.cyklu teplotního šokování. Mezi obsahem tanoidů a chladovým zákalem je lineární závislost.



Obr.5.31 - Závislost chladového zákalu Z90chill na obsahu tanoidů vzorků měřených s předkápnutím 0,5 ml SASS. Chladový zákal byl naměřen na konci 7.cyklu teplotního šokování.

Výsledky navrženého testu na obsah tanoidů s předkápnutím 0,5 ml SASS na 5 ml vzorku jsou lineárně úměrné koloidnímu zákalu vzniklému po definovaném teplem urychleném stárnutí vzorků, a to i pro hluboce stabilizované vzorky, které jsou standardním testem podle EBC normy nerozlišitelné. Koeficient závislosti mezi tanoidy a vzniklým zákalem (při konstantní dávce tepelného zatížení) je závislý na mnoha faktorech a mění se pro piva různého složení, s různým obsahem kyslíku, železa, s různým stupněm prokvašení, obsahem alkoholu, atd. Při zachování standardnosti technologie a vstupních surovin může tento koeficient zůstat pro jeden typ výrobku konstantní.

Při stabilizaci piva absorbentem na bázi silikagelu (tj. absorbentem proteinů) dochází k současnemu poklesu hodnot citlivých proteinů i tanoidů. Pokles obsahu tanoidů (až 30%) není vůči poklesu obsahu citlivých proteinů zanedbatelný a vývoj chladového zákalu takto připravených vzorků během stárnutí je ovlivněn jak obsahem citlivých proteinů, tak i obsahem tanoidů.

Proto jsme při zjištění vlivu obsahu citlivých proteinů na koloidní stabilitu piva zvolili odlišný přístup. K testování jsme vybrali vzorky jednoho druhu piva, které byly v provozních podmínkách pivovaru stabilizovány jak na obsah polyfenolů regenerovatelným PVPP, tak i na obsah zákalotvorných proteinů Stabifixem Strong. Vzorky byly po filtraci a stabilizaci stočeny do 0,5 l NRW lahví. K experimentu byly použity vzorky stočené během jednoho týdne. Od každého vzorku byla 1 láhev vystavena zrychlenému stárnutí tepelným šokováním (opakováním 48 hodinových cyklů s 24 hodinami na 60°C a 24 hodinami na 0°C) a 1 láhev byla použita k měření titračních testů koloidní stability piva. Na testovaných vzorcích byl naměřen obsah citlivých proteinů v rozsahu od 5,5 EBC do 8,3 EBC, hodnoty SASPL od 1,75 ml/10ml do 2,46 ml/10ml a obsah Tanoidů_{SASS} (s předkápnutím 0,5 ml SASS) v rozmezí 17 mg/l až 60 mg/l.

Na naměřených výsledcích jsme hledali maximální míru korelace mezi nefelometrickým chladovým zákalem *Z90chill* měřeným po sedmi cyklech šokování a mezi hodnotami tanoidů a citlivých proteinů (SP). Hodnoty tanoidů a citlivých proteinů jsme kombinovali v různých typech závislostí. Hledali jsme optimální tvar korelační rovnice. Maximální korelace bylo dosaženo při tvaru rovnice

$$Z90_{chill} = k_1 * Tan_{SASS}^{k_2} * SP^{k_3} + k_4 \quad (5.2)$$

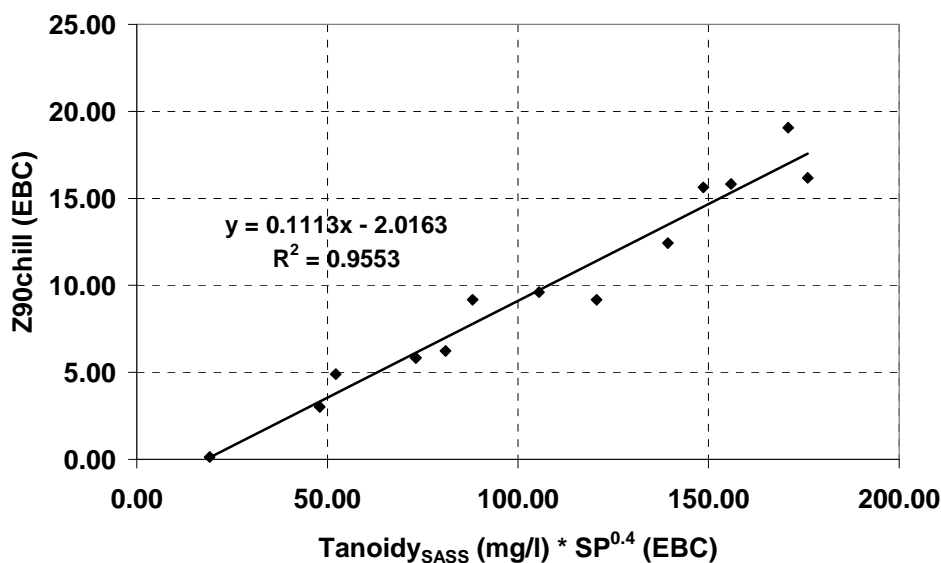
kde k_1, k_2, k_3, k_4 , jsou korelační koeficienty vypočtené metodou nelineární regrese v programu Origin, Tan_{SASS} – obsah tanoidů s předkápnutím 0.5ml SASS a SP – výsledek testu na citlivé proteiny. Rovnice 5.2 odpovídá rovnici chemické rovnováhy mezi prekurzory zákalu a vytvořeným chladovým zákalem. Nejlepší korelace podle rovnice 5.2 je dosaženo pro hodnotu $k_2 = 0,4$ (viz. Tabulka 5.3) Vliv zákalotvorných proteinů (daný výsledkem testu SP nebo SASPL) na velikost chladového zákalu je u námi měřeného druhu piva výrazně nižší než vliv tanoidů. Rozdíl v obsahu citlivých proteinů od 5,5 EBC do 8,3 EBC způsobí změnu chladového zákalu o 0,95 EBC, tedy méně než 10% celkové hodnoty. Díky tomuto faktu bylo možné najít korelaci mezi *Z90chill* a hodnotami tanoidů a citlivých proteinů (nebo SASPL) ve tvaru součtu lineárních členů (Tabulka 5.3 řádek 5,6) bez výrazného snížení hodnoty spolehlivosti R^2 .

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.3. Obsah tanoidů koreluje s vytvořeným chladovým zákalem s korelačním koeficientem $R = 0,913$ i bez započtení vlivu citlivých proteinů. Výsledky SP a SASPL testu s chladovým zákalem významně nekorelují ($R = 0,069$). Při započtení společného vlivu tanoidů a citlivých proteinů stoupne korelační koeficient na $R = 0,955$, směrodatná odchylka výpočtu chladového zákalu klesne pouze z 1,64 EBC na 1,24 EBC. Stejnou míru korelace dostaneme i pokud ve výpočtu hodnoty SP nahradíme naměřenými hodnotami SASPL.

Tabulka 5.3 – Korelace mezi chladovým zákalem a titračními nefelometrickými testy

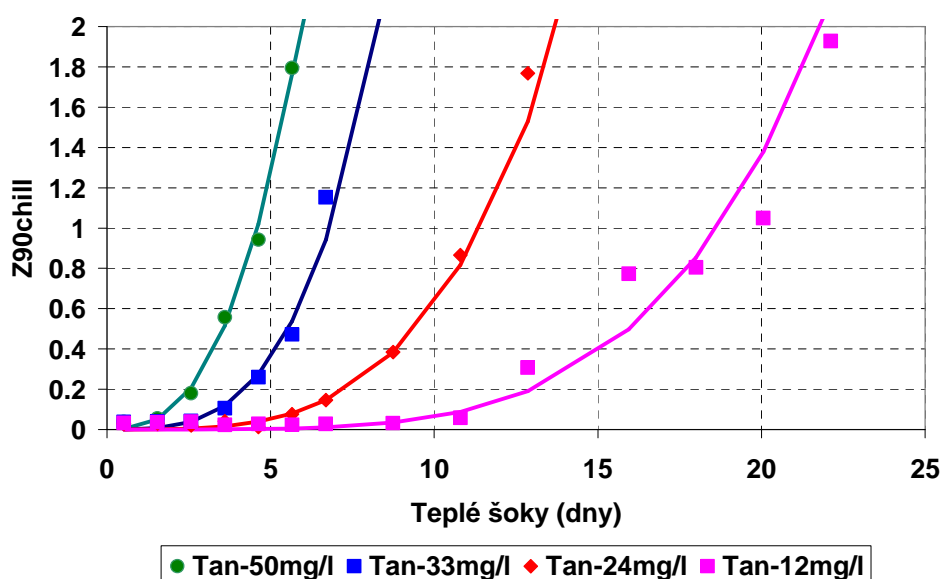
Použité titrační testy	Vypočtená korelační rovnice	Hodnota spolehlivosti R^2	Standardní odch. $\Delta Z90chill$ (EBC)
Tanoidy _{SASS} (Tan)	$Z90chill = 0.2549 * Tan - 1.905$	0.913	1.64
SP	$Z90chill = 0.2853 * SP + 7.4172$	0.005	5.51
SASPL	$Z90chill = -0.0045 * SASPL + 1.985$	0.005	5.58
Tanoidy*SP	$Z90chill = 0.1113 * Tan * SP^{0.4} - 2.06$	0.955	1.23
Tanoidy+SP	$Z90chill = 0.268 * Tan + 0.348 * SP - 5.12$	0.954	1.24
Tanoidy+SASPL	$Z90chill = 0.268 * Tan - 1.310 * SASPL + 0.010$	0.952	1.26

Na obr.5.32 je vynesena závislost chladového zákalu (měřeného na konci 7.cyklu teplotního šokování) na součinu obsahu tanoidů a citlivých proteinů umocněných na 0,4. Obsah tanoidů byl měřen s předkápnutím 0,5 ml SASS.



Obr.5.32 - Závislost chladového zákalu Z90chill na součinu obsahu tanoidů a citlivých proteinů umocněných na 0,4. Obsah tanoidů měřen s předkápnutím 0,5 ml SASS. Chladový zákal byl naměřen na konci 7.cyklu teplotního šokování.

Velikost chladového zákalu neroste během stárnutí lineárně s časem. Typické průběhy křivek znázorňující závislost chladového zákalu na době tepelného šoku, naměřené na vzorcích z předchozího pokusu s rozdílným obsahem tanoidů a citlivých proteinů, ukazuje obr.5.33. Ve tvaru křivek lze rozlišit dvě základní oblasti. Po tzv. lag fázi, při které není chladový zákal měřitelný, následuje růstová fáze, která je charakteristická jeho rychlým nárůstem. S rostoucím obsahem tanoidů a citlivých proteinů klesá doba lag fáze a roste rychlost tvorby zákalu. Doba lag fáze koreluje s následnou rychlostí tvorby zákalu (Leemans [61]). Čím je lag fáze delší, tím pomalejší je i následná tvorba chladového zákalu (křivky se nikde neprotínají). Naměřené body lze proložit mocninnou funkcí.



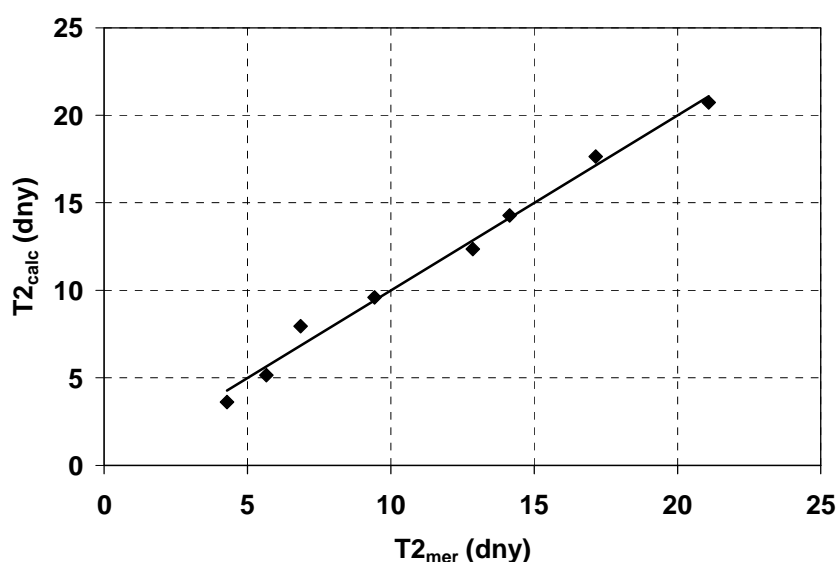
Obr.5.33 - Křivky vývoje chladového zákalu Z90chill v závislosti na době tepelného šoku pro vzorky s různým obsahem tanoidů

Přestože neexistuje všeobecně akceptovaná norma hodnocení koloidní trvanlivosti piv, definuje si většina pivovarů hraniční hodnotu akceptovatelného chladového (nebo permanentního) nefelometrického zákalu, jejíž dosažení signalizuje konec trvanlivosti vzorku. Obvyklou hraniční hodnotou jsou 2 EBC. U vzorků piv z předchozího experimentu jsme určili koloidní trvanlivost jako dobu dosažení chladového zákalu 2 EBC a označili $T2$ (dny). Vzorky byly tepelně šokovány v cyklech (viz. kap.4.2.2), doba $T2$ byla vypočtena z hodnot chladových zákalů naměřených v cyklu před a po překročení hodnoty zákalu 2EBC lineární aproximací.

Hledali jsme optimální tvar korelační rovnice. Maximální korelace bylo dosaženo při tvaru rovnice

$$T2(dny) = k_1 * \frac{1}{Tan_{SASS}^2} + k_2 * SP + k_3 \quad (5.3)$$

kde k_1, k_2, k_3 jsou hledané korelační koeficienty, $T2$ – doba teplého šoku nutného k dosažení hodnoty chladového zákalu 2 EBC, Tan_{SASS} – obsah tanoidů s předkápnutím 0,5ml SASS a SP – výsledek testu na citlivé proteiny.



Obr.5.34 - Porovnání hodnot koloidní stability naměřených metodou tepelného šokování $T2_{mer}$ s hodnotami $T2_{calc}$ vypočtenými z výsledků titračních testů podle rovnice 5.3

Na obr.5.34 je zobrazeno porovnání hodnot koloidní stability naměřených metodou tepelného šokování $T2_{mer}$ s hodnotami $T2_{calc}$ vypočtenými z výsledků titračních testů podle rovnice 5.3 s koeficienty získanými metodou nelineární regrese v programu Origin. Směrodatná odchylka předpovědi $T2$ je 0,51 dne, vliv citlivých proteinů na koloidní trvanlivost je výrazně nižší než vliv tanoidů. Při koeficientu $k_2 = 0,45$ a obsahu citlivých proteinů vzorků od 5,5 EBC do 8,3 EBC je maximální rozdíl v předpovědi koloidní trvanlivosti $T2_{calc}$ způsobený proteiny 1,3 dne. Při použití výsledků naměřených hodnot SASPL místo hodnot SP jsme dostali jiné hodnoty koeficientů k_2, k_3 (k_1 téměř totožné), avšak totožnou hodnotu spolehlivosti proložení.

Nefelometrické titrační testy koloidní stability piva jsou schopné předpovědět koloidní trvanlivost piva. Výsledky modifikovaného testu na obsah tanoidů s předkápnutím SASS korelují s přirozenou trvanlivostí i u vzorků s nízkým obsahem zákalotvorných polyfenolů, na kterých je obsah tanoidů měřený standardní metodou nedetekovatelný. V případě námi měřeného produktu jsme dosáhli přesnosti předpovědi trvanlivosti lepší než 1 den teplého šoku. Tato hodnota odpovídá přibližně jednomu měsíci přirozené trvanlivosti (McMurrough [72]). Korelační koeficienty pro výpočet předpovědi přirozené trvanlivosti se liší pro jednotlivé druhy piv, a to

dokonce i pro piva vyrobená z jednoho druhu pomocí technologie HGB (High Gravity Brewing) (viz. Sladký [117]). Přestože je nutné určovat korelační koeficienty pro každý druh piva zvlášť, není to příliš časově náročné. K získání korelačních koeficientů pro jeden produkt (20 vzorků) je nutné vynaložit přibližně 16 pracovních hodin pro měření titračních testů a 18 hodin (tj. devěkrát dvě hodiny) pro měření chladových a permanentních zákalů vzorků po každém cyklu tepelného šoku.

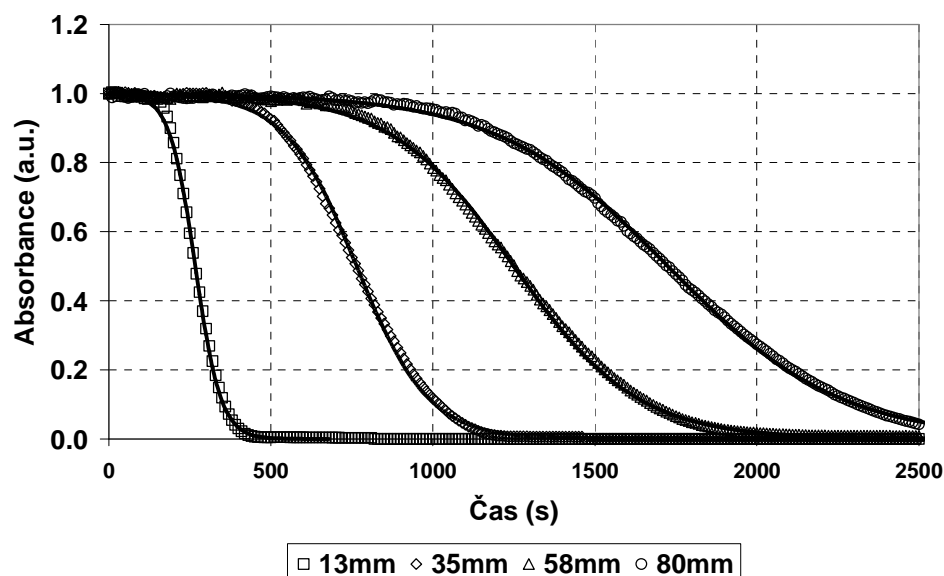
5.4 METODA SEDIMENTACE ČÁSTIC

Částice s hustotou větší než okolní kapalina sedimentují. Rychlost sedimentace je závislá kromě jiných parametrů na hustotě a velikosti částic (rovnice 3.36). Za předpokladu stejné hustoty lze metodu sedimentace využít pro určení distribuce velikostí částic. K detekci změn koncentrace částic ve vzorku je možné využít elastický rozptyl světla. Změna zákalu naměřená v čase t odpovídá úbytku koncentrace částic v měřícím objemu v daném čase.

Aparatura DATTS 2000 umožňuje měření sedimentace částic v kinetickém módu měření. Měření je možné provádět v malých objemech od 5 ml ve zkumavkách o průměru od 18 mm, v kyvetách se 100 ml až 250 ml vzorku, nebo přímo v uzavřených lahvích NRW (500 ml vzorku). Vzorek je umístěn v termostátované měřící komoře aparatury. Teplota lázně je udržována na konstantní teplotě $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Koncentraci sedimentujících částic je nutné nastavit na tak nízkou úroveň, aby nedocházelo k jejich vzájemnému ovlivňování. Při 0,1% objemové koncentraci částic je střední vzdálenost mezi nejbližšími částicemi rovná desetinasobku jejich průměru. Tato vzdálenost je dostatečná k zajištění nezávislosti částic. Koncentrace 0,1% je řádově vyšší než hranice detekovatelnosti aparatury DATTS 2000 pro nadmikronové sedimentující částice. Při našich měřeních jsme používali vzorky s koncentrací částic nižší než 0,1%.

5.4.1 Vyhodnocení sedimentačních křivek

Objem vzorku určuje výšku hladiny nad měřícím svazkem. Na obr.5.35 jsou vyneseny sedimentační křivky kulových částic silikagelu Biospher PSI o střední velikosti $15 \mu\text{m}$ (firma Labio Ltd. Praha), naměřené při různé výšce hladiny nad měřícím svazkem (různý objem vzorku, vodní roztok, 25°C). Větší objem vzorku prodlužuje dobu měření, ale zvyšuje rozlišovací schopnost měření. Částice Biospheru byly naváženy a rozmíchány ve vodném roztoku. Měření bylo prováděno až po dvou dnech od namočení, kdy došlo ke kompletnímu smáčení částic.



Obr.5.35 - Sedimentační křivky Biospheru PSI v závislosti na výšce hladiny nad paprskem.

Sedimentace je detekována poklesem absorpance (logaritmus útlumu T signálu – rovnice 3.17), normalizované na hodnotu 1. Sedimentační křivky v grafu mají klesající sigmoidní průběh ve tvaru „S“ s jedním inflexním bodem. Sigmoidní tvar křivek je typický pro integrál z distribučních funkcí. Pro vyhodnocení sedimentačních křivek bylo do ovládacího programu MZN Control implementováno prokládání naměřených hodnot sigmoidní křivkou podle rovnice 5.4. Z proložených křivek v grafu na obr.5.35 lze získat dva základní parametry:

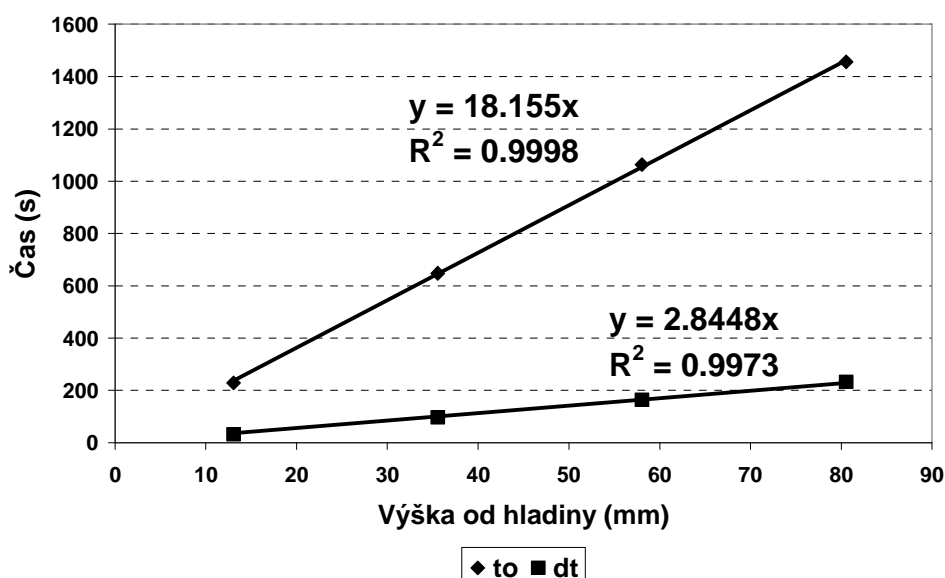
t_0 – inflexní bod sigmoidní křivky určující zároveň čas maximálního poklesu koncentrace částic, který odpovídá maximu distribuce velikosti částic,

dt – pološířku sigmoidní křivky, která odpovídá pološířce distribuce velikosti částic:

$$Z(t) = A_1 \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{\frac{t-t_0}{dt}})} \quad (5.4)$$

Automaticky proložená křivka neumožňuje rozeznat detaily distribuce velikostí sedimentujících částic, ale dává základní charakteristické parametry, kterými můžeme naměřené vzorky porovnávat. Proložení je vhodné pro monomodální distribuce částic.

Proložením sedimentačních křivek v grafu na obr.5.35 sigmoidní křivkou podle rovnice 5.4 jsme dostali hodnoty t_0 a dt pro různé vzdálenosti měřícího paprsku od hladiny vzorku. Vypočtené hodnoty jsou vyneseny v grafu na obr.5.36.



Obr.5.36 - Závislost inflexního bodu t_0 a pološířky dt sedimentační křivky na výšce hladiny nad měřícím paprskem. Měřena sedimentace částic Biospheru PSI, střední průměr částic 15 μm , teplota 25°C, koncentrace 0,6 g/l, hodnoty absorpance byly normovány

Vypočtené hodnoty t_0 a dt jsou lineárně závislé na výšce paprsku od hladiny. Směrnice proložené přímkou hodnotami t_0 udává převrácenou hodnotu rychlosti sedimentace částic. Poměr směrnic dt/t_0 charakterizuje dispersitu vzorku a je nezávislý na objemu vzorku.

V tabulce 5.4 jsou shrnuty výsledky naměřené na částicích Biospheru PSI o středním průměru d deklarovaném výrobcem d (μm) = 7, 10, 15 μm .

Částice Biospheru je možné použít jako kalibrační standard pro ověření závislosti vzdálenosti hladiny od měřícího paprsku na objemu vzorku, např. při použití nového typu zkumavek. Při standardních podmínkách měření (teplota, koncentrace Biospheru) vypočteme neznámou

vzdálenost h pomocí rovnice 3.37 ze známé rychlosti sedimentace v a z naměřené hodnoty inflexního bodu sedimentační křivky t_o .

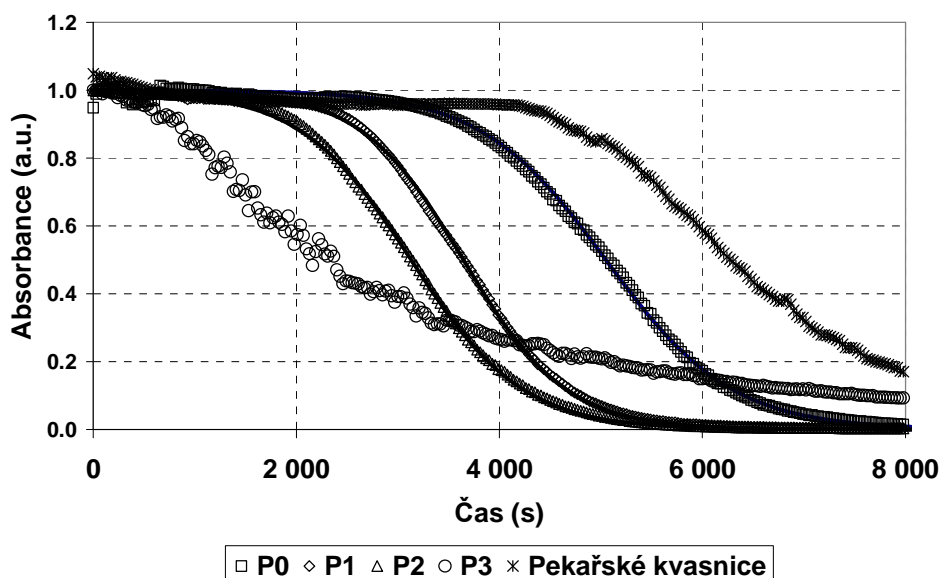
Tabulka 5.4- Parametry částic Biosferu

d (μm)	S (μm^2)	v (mm/s)	dt/t_o
7	38.5	0.0105	0.170
10	78.5	0.0185	0.166
15	176.6	0.0549	0.156

5.4.2 Sedimentace kvasnic

Střední velikost buněk je u pivovarských kvasnic jedním z důležitých parametrů. V literatuře (Egilmez [23], Laun [60]) je dávana do souvislosti se stavem populace buněk. Při každém dělení buněk se zvětšuje objem mateřské buňky. Pro buňky kvasnic byl publikován nárůst objemu mateřské buňky o 20% (Egilmez [23]). Byla potvrzena vzájemná korelace mezi stářím buňky (počtem dělení) a její velikostí. Střední velikost buněk a šířka distribuce jejich velikostí je ukazatelem průměrného stáří populace a zastoupení jednotlivých generací.

V práci Kodedové [58] bylo provedeno srovnání sedimentační křivky s histogramem distribucí velikostí buněk, měřeným pomocí mikroskopu na vzorcích nejčastěji používaných kmenů pivovarských kvasinek. Srovnání prokázalo významnou korelaci mezi velikostí buněk a jejich sedimentační rychlostí.



Obr.5.37 - Sedimentační křivky vzorků kvasnic. P0 - před prvním nasazením v CKT, P1 - po prvním nasazení, P2 - po druhém nasazení, P3 - po třetím nasazení. Objem vzorku 5 ml, výška hladiny 13,5 mm nad měřícím papskem.

Na obr.5.37 jsou vyneseny sedimentační křivky 4 vzorků provozních kvasnic kmene 95, odebraných ze zásobního tanku v pivovarském provozu. Vzorky se liší počtem nasazení v CKT. P0 před prvním nasazením a P1,2,3 po prvním, druhém a třetím nasazení. Naměřenými daty byly proloženy křivky podle rovnice 5.4. V tabulce 5.5 jsou shrnuty parametry proložených křivek. Střední plocha buněk byla vypočtena podle rovnice 3.39 s použitím tabulkových hodnot hustoty vody $r = 0,997 \text{ kg/m}^3$ a viskozity $n = 0,8909 \text{ kg/m/s}$ (Brož [18]) při 25°C . Za hustotu buněk jsme dosadili průměrnou hodnotu $r = 1,08 \text{ kg/m}^3$ z rozmezí hodnot udávaných

v literatuře (1,07 až 1,09 kg/m³). Vzdálenost hladiny od měřícího paprsku $h = 13,5$ mm byla zjištěna kalibračním měřením pomocí částic Bispheru PSI. Za čas t byla dosazena hodnota času inflexního bodu proložené sigmoidní funkce t_o .

Tabulka 5.5 - Srovnání parametrů vzorků kvasnic

Vzorek	t_0 (s)	dt(s)	dt/ t_0	$S_{calc}(\mu\text{m}^2)$	$S_{mikr}(\mu\text{m}^2)$	$dS_{mikr}(\mu\text{m}^2)$	S_{mikr}/dS_{mikr}
P0	5049	620	0,12	41	49	10	0,20
P1	3646	504	0,14	57	67	15	0,22
P2	3132	547	0,17	67	77	21	0,27
Pekařské	6318	854	0,14	33	28	6	0,21

Hodnoty S_{mikr} jsou střední hodnoty plochy průřezu kvasnic, odečtené ze snímků pořízených pod mikroskopem (hodnoty byly naměřeny a poskytnuty Ing. Dagmar Matoulkovou z VUPS). Hodnoty S_{cal} a S_{mikr} jsou v relativní shodě. Odchylky mohou být způsobeny několika vlivy:

- 1) vlivem tvaru částic na sedimentační rychlost - buňky kvasnic nejsou kulové, ale mají tvar elipsoidu, vzájemný poměr velké a malé poloosy elipsoidu se liší pro různě staré buňky, pučící buňky mají větší objem a nepravidelný tvar, kterým se výrazně odlišují od ostatních buněk;
- 2) vlivem hustoty částic na sedimentační rychlost - hustota kvasnic nemusí být stejná pro všechny buňky.

Abychom minimalizovali tyto vlivy, byly vzorky provozních kvasnic odebrány ze zásobního tanku po více než 2 hodinách ležení od odstřelu CKT. Měření pod mikroskopem prokázalo, že ve vzorcích nebyly téměř žádné pučící buňky, kvasinky byly ve stacionární fázi. Trojnásobné promytí vzorků a uložení v citrát-fosfátovém pufru navíc homogenizuje fyziologický stav buněk a zbavuje povrch buněk adsorbovaných kalů.

Naše výsledky prokázaly využitelnost metody měření sedimentační rychlosti při rozlišení vzorků kvasnic s různou střední velikostí a šířkou distribuce. Metodu je možné použít v podmínkách pivovarských provozů, např. k optimalizaci odstřelu CKT tanků a k výběru kvasnic pro další zakvašování.

5.5 METODA ACIDIFIKAČNÍHO TESTU (AP TESTU) PRO MĚŘENÍ VITALITY VÁREČNÍCH KVASNIC

5.5.1 Optimalizace metody měření acidifikačního testu vitality kvasnic

Test pro měření acidifikační schopnosti buněk (AP test – Acidification Power test), původně vyvinutý M. Opekarovou a K. Siglerem [83] byl předmětem zkoumání řady vědeckých pracovníků. Vzhledem ke své jednoduchosti a nenáročnosti na přístrojové vybavení byly některé modifikace testu zavedeny v laboratořích v pivovarském, vinařském, mlékařském a pekařském průmyslu (Gatto [31], Kara [55], Malfeito-Ferreira [69], Riis [91]) na kontrolu fermentační schopnosti kvasinek. V pivovarských provozech byl používán postup podle Kary [55].

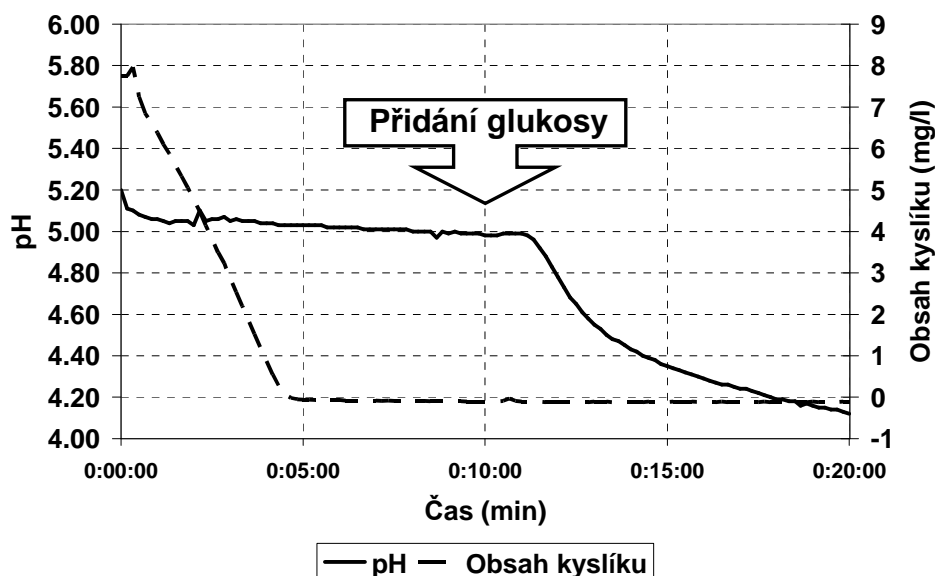
Průběh acidifikační křivky a výsledek testu je ovlivněn mnoha faktory. Kvasinky jsou živé organismy a jako takové jsou citlivé na způsob uchovávání a postup přípravy před měřením. Některé práce týkající se AP testu nevěnovaly dostatečnou pozornost všem faktorům, které ovlivňují jeho výsledek a nerespektovaly specifické požadavky pro měřený kmen kvasinek. Zavedení neúplného nebo nevhodně zevšeobecněného postupu do praxe vedlo občas

k naměření nereprodukovatelných výsledků a k následnému odmítnutí AP testu jako nevhodné metody.

Naším cílem bylo zhodnotit vliv faktorů, které ovlivňují výsledek AP testu, optimalizovat postup skladování a přípravy vzorků před měřením a optimalizovat vlastní postup měření tak, aby bylo dosaženo výsledků s maximální reprodukovatelností.

5.5.1.1 Průběh AP testu

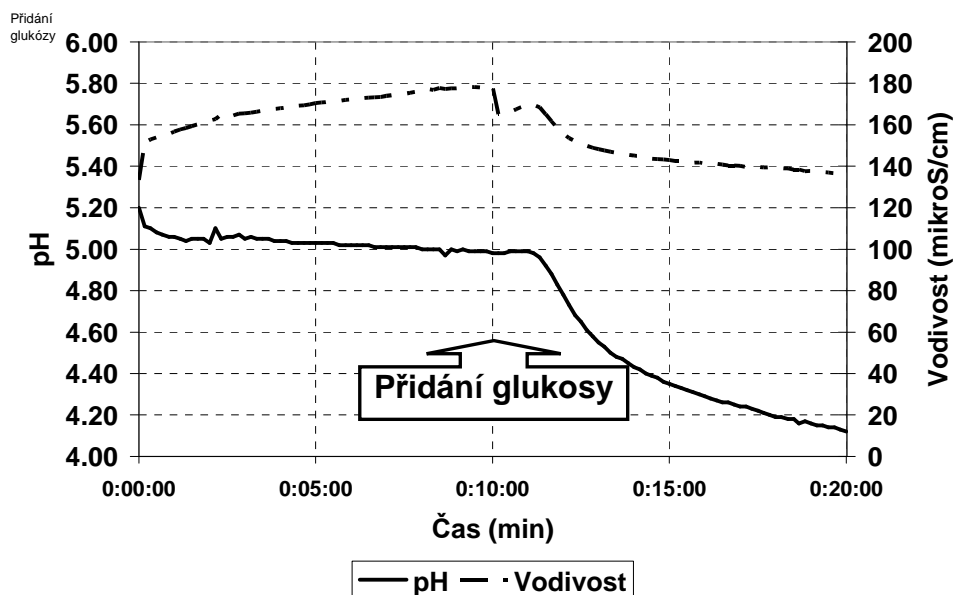
V grafech na obr.5.38 a 5.39 jsou zobrazeny typické průběhy acidifikačních křivek v průběhu AP testu. Jsou zde zobrazeny křivky vývoje pH, obsahu kyslíku a vodivosti během testu. Měření se spouštělo po zalití odvážených kvasnic destilovanou vodou a homogenizaci suspenze vortexem. Prvních 10 minut testu probíhala spontánní acidifikace bez vnějšího substrátu. Kvasnice spotřebovávaly ve vzorku rozpuštěný kyslík a využívaly k respiraci vnitřní energetické zdroje. Po spotřebování kyslíku se pH vzorku ustálilo. Hodnota pH dosažená spontánní acidifikací je mírou vnitřních energetických zdrojů buněk. V 10. minutě byla přidána glukóza, jejíž zpracování buňkami se projevilo další acidifikací vnějšího prostředí.



Obr.5.38 - Typické křivky vývoje hodnot pH a obsahu kyslíku v průběhu AP testu

AP test byl proveden s koncentrací kvasnic 1,5 g/15 ml destilované vody a s 5% finální koncentrací glukózy při teplotě 25°C. Destilovaná voda jeden den po natočení obsahovala na začátku testu téměř saturovanou koncentraci kyslíku 8 mg/l. Veškerý kyslík byl spotřebován během prvních 4 minut testu. Další měření potvrdila, že kvasinky jsou schopny spotřebovat veškerý kyslík ze vzorku během prvních 10 minut spontánní acidifikace i při řádově nižší koncentraci buněk ve vzorku. U některých vzorků s velkými endogenními energetickými zdroji byl kyslík spotřebován i během první minuty měření. Nulové koncentrace kyslíku ve vzorku nebylo dosaženo během deseti minut pouze v případech měření nižších koncentrací kvasnic za nižší teploty pod 20°C.

Během měření AP testu jsme naměřili hodnotu vodivosti u všech vzorků v rozmezí 100 až 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Nárůst vodivosti na začátku testu byl natolik rychlý, že se nám ho nepodařilo zachytit.

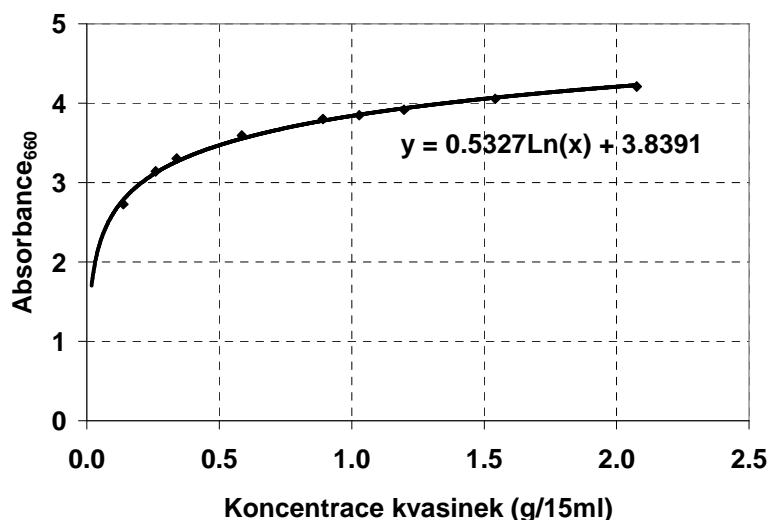


Obr.5.39 - Typické křivky vývoje hodnot pH a vodivosti v průběhu AP testu

5.5.1.2 Kalibrace hodnot absorpance na koncentraci buněk

Jedním ze základních faktorů, které mají vliv na rychlost acidifikace, je koncentrace buněk v roztoku. Pro získání reprodukovatelných výsledků testu je nutné zajistit definovanou koncentraci buněk ve vzorku s co největší přesností.

V proceduře AP testu je definovaná koncentrace buněk zajištěna odstředěním promytého vzorku za definovaných podmínek 3000 rpm po dobu 10 minut, dekantací a odvážením přesné váhy husté kvasničné suspenze. Koncentrace kvasinek se pak vyjadřuje v gramech husté kvasničné suspenze na objem vzorku.



Obr.5.40 - Závislost hodnoty absorpance A_{660} na koncentraci kvasnic. Koncentrace kvasnic je udávána v gramech odvážené husté kvasničné suspenze na 15 ml objemu vzorku. Měřeno v aparatuře YATA v kyvetě s optickou dráhou paprsku 2 cm.

Zákaloměr zabudovaný v přístroji YATA umožňuje nalezení vztahu mezi koncentrací buněk a absorpancí (při vlnové délce 660 nm – Absorbance₆₆₀) a následnou kontrolou odvážené hmotnosti kvasničné suspenze. Vztah mezi odváženou hmotností suspenze kvasnic a naměřenou

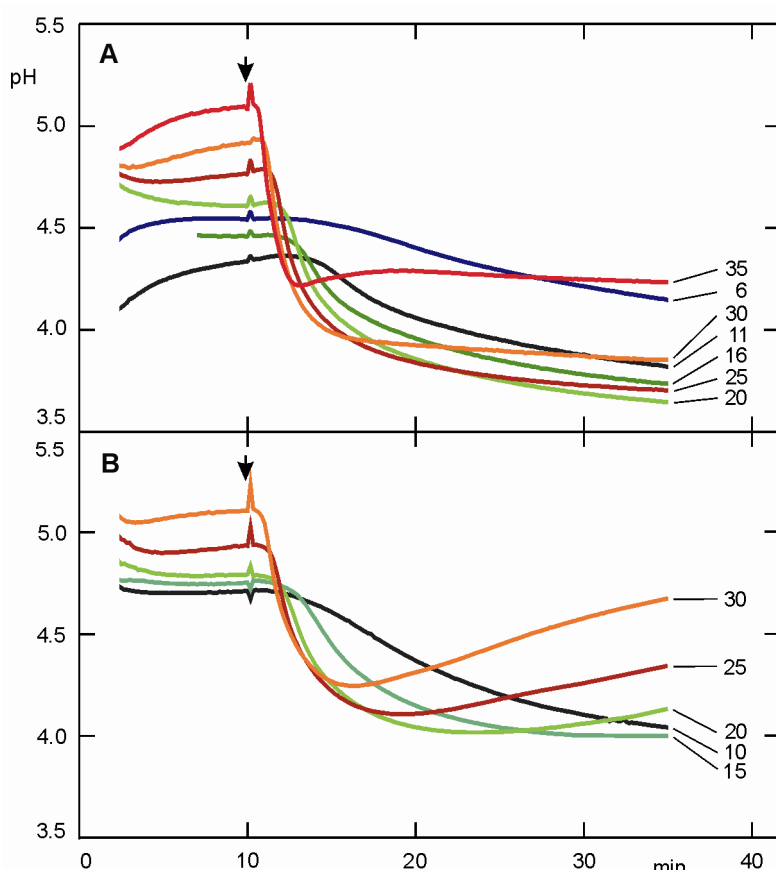
absorbancí je pro daný kmen kvasnic reprodukovatelný s velkou přesností a umožňuje využít naměřenou hodnotu absorbance jako míru koncentrace buněk.

U použitého kmene kvasničných buněk byla měření na 50 provozních vzorcích zjištěna hodnota absorbance $3,96 \pm 0,03$ pro odváženou hmotnost 1,5 g hustých odstředěných kvasnic přidaných do 15 ml destilované vody (9g/100 ml). Ze směrnice kalibrační křivky v grafu na obr.5.40 vychází střední odchylka absorbance úměrná střední odchylce odvážené hmotnosti odstředěné suspenze kvasinek $\pm 0,08$ g/15 ml. Odchytky absorbance jsou způsobeny rozdílnou distribucí velikostí kvasinek v jednotlivých vzorcích.

U tohoto kmene kvasničných buněk byla opakovaným měřením určena sušina $0,16 \pm 0,01$ g sušiny/g odstředěné kvasničné suspenze. Opakovaným měřením byl pro používaný kmen kvasnic určen přepočítávací faktor na počet buněk: 50 milionů/ml buněk odpovídá 1g/100 ml hustých odstředěných kvasnic.

5.5.1.3 Teplotní závislost AP testu

Metabolismus buněk je silně závislý na teplotě prostředí. Se vzrůstající teplotou roste rychlost chemických procesů. Teplota je jeden z parametrů, které mají na výsledek AP testu největší vliv. V grafu na obr.5.41 jsou uvedeny acidifikační křivky naměřené na jednom vzorku kvasinek (z jednoho zásobního roztoku, připraveny současně) při různých teplotách měření. Při všech měřeních bylo odváženo stejné množství husté odstředěné kvasničné suspenze 1,5 g a 15 ml destilované vody..



Obr.5.41 - Vliv teploty na průběh acidifikace v průběhu AP testu

Při vystavení kvasinek teplotě nad $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ mizí jejich aktivita ve spontánní i glukosou indukované fázi. Z grafu je patrné, že se vzrůstající teplotou roste pH v desáté minutě a tím klesá i

hodnota AP₁₀. U glukosou indukované acidifikace AP hodnota pro teploty nad 25⁰C paradoxně klesá.

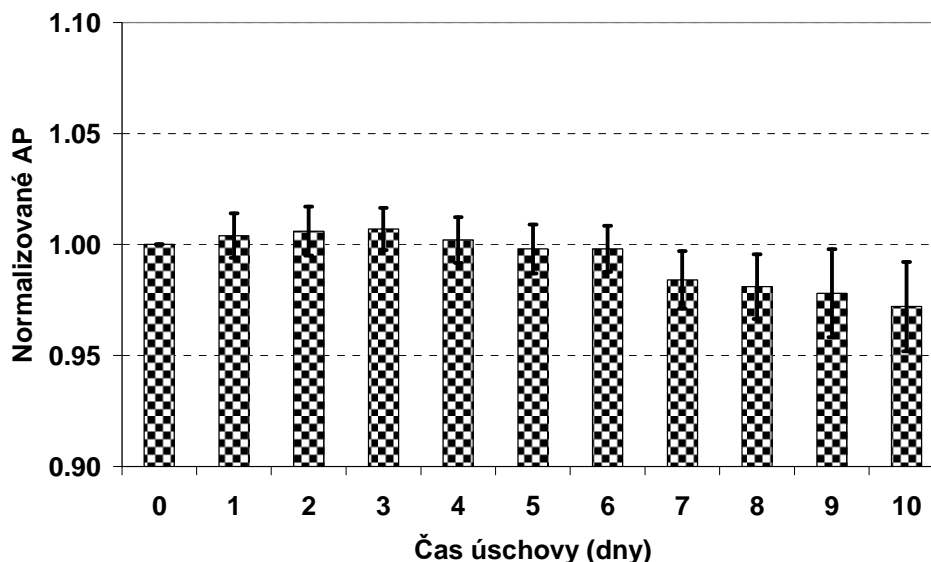
Pro zajištění maximální reprodukovatelnosti AP testu je tedy nutné zajistit konstantní teplotu měření. Při všech našich měřeních byla termostatem udržována teplota 25,0 ± 0,1⁰C. Z teplotní závislosti výsledku AP testu naměřeného na 10 různých vzorcích kvasnic jsme získali střední chybu měření, způsobenou teplotou ± 0,01 jednotek pH/⁰C.

5.5.1.4 Dosažení maximální hodnoty AP

Jako míru fermentační schopnosti vzorku buněk je nutné brát maximální hodnotu AP dosažitelnou na daném vzorku. Dosažení maximální hodnoty AP závisí kromě nastavení parametrů testu také na podmínkách v kterých se buňky nacházejí. Výsledek AP testu závisí nejen na vlastní vitalitě buněk, ale je výrazně ovlivněn i endogenními energetickými zdroji buněk. Kvasinky s velkými endogenními zdroji, např. čerstvě odebrané z propagace, mohou po přidání glukosy pomalu acidifikovat, což se ve výsledku projeví zkresleně nízkou hodnotou AP. Hladovění buněk s vysokými endogenními energetickými zdroji způsobuje zvýšení výsledné hodnoty AP až na určitou maximální hodnotu. Další hladovění pak způsobuje pokles hodnoty AP. Maximální dosaženou hodnotu AP považujeme za správnou. Abychom ověřili vliv hladovění na výslednou hodnotu AP, zavedli jsme do procedury přípravy vzorků krok definovaného hladovění.

5.5.1.5 Vliv doby skladování vzorků

Kvasinky jsou živé organismy a jejich fyziologický stav se mění s dobou a způsobem skladování. Z hlediska praktického využití acidifikačního testu je důležité najít takový způsob skladování odebraných vzorků, který minimálně ovlivní výsledek testu během co nejdelší doby skladování.



Obr.5.42 - Vliv doby skladování na výsledek AP testu. AP hodnoty byly normalizovány na hodnotu naměřenou bezprostředně po odběru. Vzorky byly skladovány na 2⁰C pod pívem. Data jsou průměrem z deseti vzorků.

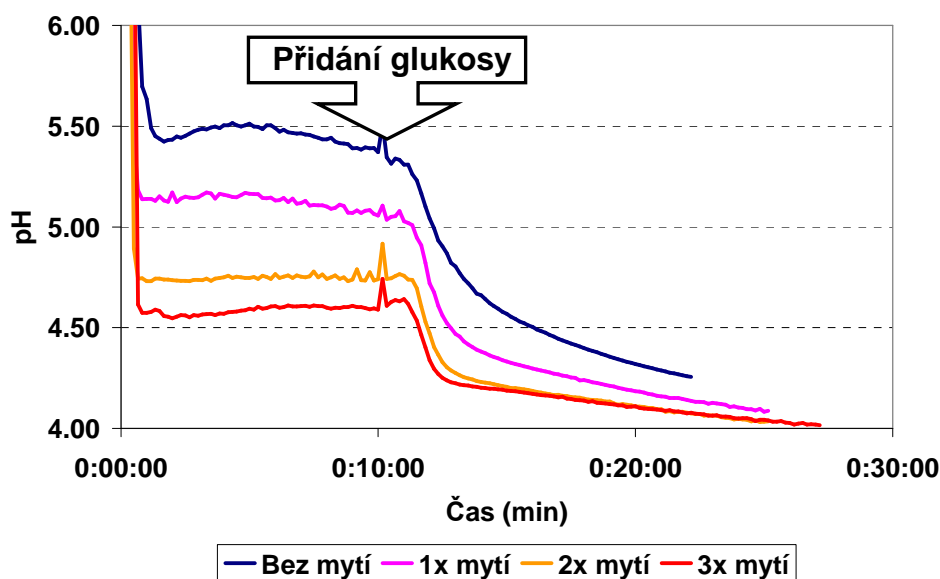
Provedli jsme srovnávací měření vzorků, uschovaných za různých podmínek. Každý odebraný vzorek jsme šetrně odstředili (1000 rpm, 5 minut), rozdělili jej do zvláštních nádob a zalili různými roztoky. Pro srovnávací měření jsme použili odstředěný supernatant (původní pivo), 0,02 M fosfátový pufr pH = 4,5, PBS roztok, fosfát citrátový pufr pH = 4,5 a vodu nasycenou

CO₂. Takto vytvořené zásobní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě 2°C. Každý den byl odebrán z každého zásobního roztoku vzorek a změřen standardní AP test. U vzorků skladovaných pod pufry a vodou nasycenou CO₂ byl od třetího dne skladování naměřen výrazný pokles AP výsledku v řádu desítek procent. Pouze u vzorku skladovaného pod původním pivem nebyl pokles zaznamenán. Opakovaná příprava sady vzorků výsledky potvrdila. Proto jsme se dále soustředili na skladování vzorků pod původním pivem.

Na obr.5.42 je zobrazen časový vývoj výsledku AP testu během skladování pod původním pivem. Hodnoty AP jsou pro každý vzorek normalizovány na hodnotu naměřenou v den odběru. Výsledky jsou průměrem z deseti vzorků. Během prvních 3 dnů po odebrání vzorku hodnota AP testu roste zřejmě v důsledku hladovění buněk. Další tři dny je hodnota AP přibližně konstantní a poté začne pomalu klesat. Ještě 10.den je průměrný výsledek AP testu o 3% menší než maximální dosažená hodnota. Měření prokázala, že vzorky je optimální skladovat pod původním pivem za teploty 2°C a to po dobu 6 dní bez výrazné ztráty vitality.

5.5.1.6 Vliv promývání vzorků

Důležitost přípravy vzorků promytím destilovanou vodou před vlastním měřením je dokumentován na obr.5.43, na němž jsou vyneseny křivky vývoje pH během acidifikačního testu, provedeného na jednom vzorku po několika promytích destilovanou vodou (viz kap.4.2.3.3). Každé následující promytí vzorku zvyšuje hodnotu AP. Mezi výsledky testu po 2. a 3.promytí je již minimální rozdíl, 3-násobné promytí je dostačující k získání maximální AP hodnoty.

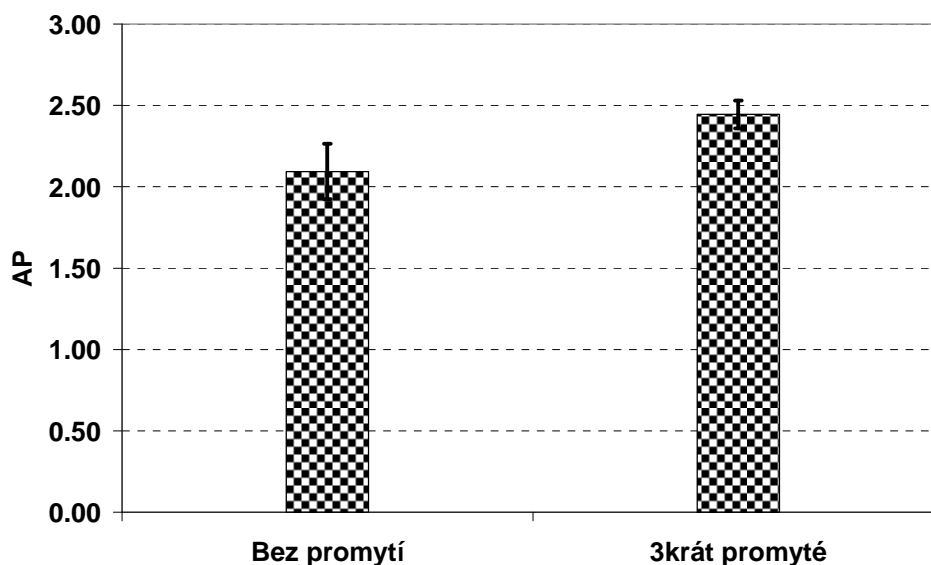


Obr.5.43 - Vliv promývání vzorků na průběh acidifikačních křivek v průběhu AP testu

V grafu na obr.5.44 je vynesena změna AP hodnoty před a po 3-násobném promytí naměřená na 25 vzorcích. Promytí vzorků zvýšilo střední hodnotu AP o 0,35 jednotek a snížilo standardní odchylku (SD – standard deviation) AP hodnot z 0,17 na 0,09. Vyšší SD nepromytých vzorků je zřejmě způsobeno rozdílnou pufrovací kapacitou roztoků.

3-násobné promytí vzorků kvasinek destilovanou vodou odstraní materiál adsorbovaný na povrchu buněk během předchozích kvašení a sníží pufrovací kapacitu roztoku. Zároveň s tím snižuje endogenní zdroje kvasnic a dostává je do uniformního fyziologického stavu ideálního pro dosažení maximální AP hodnoty.

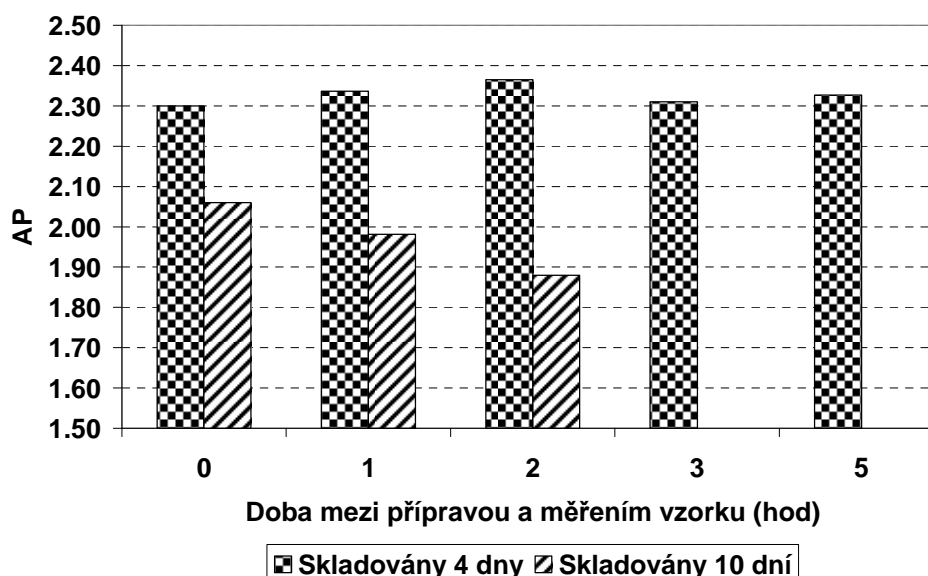
Jako další kontrola dostatečného promytí kvasinek byl měřen zákal supernatantu slitého ze vzorku po odstředění. Po třetím promytí klesl průměrný zákal supernatantu na hodnotu $0,30 \pm 0,05$ EBC, který je již okem nepostřehnutelný.



Obr.5.44 - Vliv trojnásobného promytí na výsledek AP testu. Data jsou průměrem z 25 vzorků

5.5.1.7 Vliv podmínek skladování vzorků mezi přípravou a vlastním měřením

Při přípravě vzorků pro AP test (promýváním a odstředováním na centrifuze) lze připravit současně počet vzorků, který odpovídá počtu míst použité centrifugy. Vlastní AP test trvá minimálně 20 minut a provádí se pouze po jednom vzorku. U některých připravených vzorků může doba mezi přípravou a vlastním měřením dosáhnout i několika hodin. Abychom ověřili vliv této doby na výsledek AP testu, provedli jsme následující kontrolu. Z jednoho vzorku jsme připravili promytím a odstředěním na centrifuze současně několik stejných vzorků, které jsme po posledním odstředění ponechali při pokojové teplotě pod supernatantem. Po hodině jsme odebírali po jednom vzorku, dekantovali, odvážili 1,5 g odstředěné suspenze a provedli AP test.



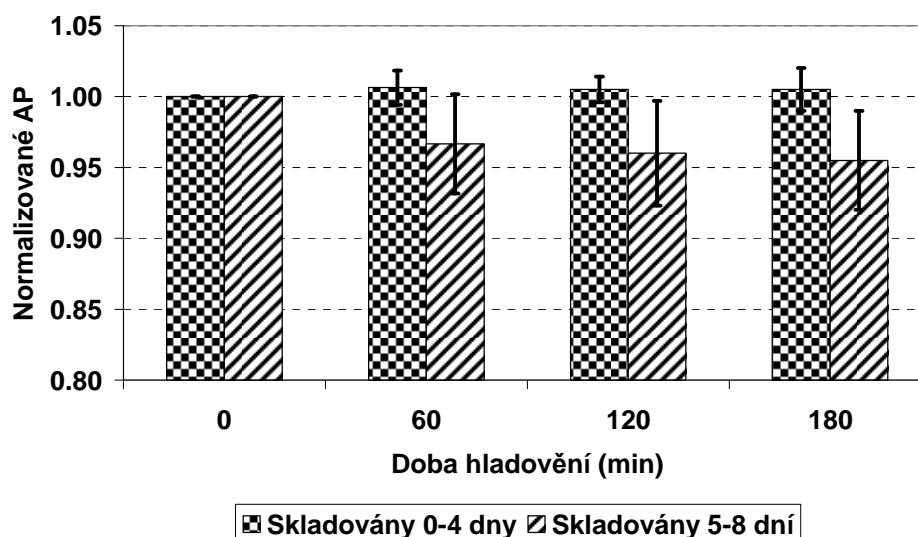
Obr.5.45 - Vliv doby mezi přípravou a měřením na výsledek AP testu u vzorku kvasnic skladovaného 4 a 10 dní na 2 °C pod pivem.

V grafu na obr.5.45 jsou porovnány výsledky AP testu u téhož vzorku, měřeného 4. a 10. den skladování. Čtvrtý den skladování mají buňky ještě dostatečné endogenní energetické zásoby a po promytí neztrácejí svoji vitalitu po dobu minimálně 5 hodin. Po deseti dnech skladování došlo ke snížení vitality buněk a výsledek AP testu klesl o 0,23 jednotek. U tohoto vzorku časová prodleva mezi promytím a měřením způsobila další výrazný pokles AP hodnoty.

Opakování měření na více vzorcích potvrdilo, že u kvasinek skladovaných maximálně 4 dny nemá časová prodleva mezi přípravou vzorku a vlastním měření kratší než 5 hodin negativní vliv na naměřenou hodnotu AP.

5.5.1.8 Vliv doby hladovění za aerobních podmínek

Abychom ověřili, že 3-násobné promytí kvasinek destilovanou vodou je dostatečné k dosažení maximální hodnoty AP, zavedli jsme do procedury přípravy vzorků dodatečný krok hladovění za aerobních podmínek. Promyté vzorky byly po posledním odstředění zality destilovanou vodou, míchány za pokojové teploty po definovanou dobu a teprve poté naposledy odstředěny a změřena AP hodnota podle standardní procedury. Na obr.5.46 je vynesena závislost výsledků AP testu na době hladovění. Aby bylo možné výsledky srovnávat, byla pro každý vzorek provedena normalizace AP hodnot na výsledek bez hladovění. Bylo proměřeno 20 vzorků skladovaných 0 až 4 dny od odběru a 20 vzorků skladovaných 4 až 8 dní od odběru.



Obr.5.46 - Vliv aerobního hladovění na výsledek AP testu pro vzorky s rozdílnou dobou skladování. Data jsou průměrem z 12 vzorků se SD.

U vzorků, které byly skladovány maximálně 4 dny od odběru, AP hodnota během prvních 60 minut hladovění lehce rostla (2%) a poté zůstávala konstantní. U vzorků, které byly skladovány déle než 4 dny, byly již endogenní energetické zdroje částečně vyčerpány a dodatečné hladovění již od začátku způsobovalo pokles AP hodnoty. Po 6ti hodinách hladovění došlo k výraznému poklesu hodnoty AP. Jak je zřejmé z obr.5.46, dodatečné hladovění má na kvasinky podobný vliv jako promývání. Vzhledem k tomu, že hladovění má na kvasinky již jen minimální vliv, byl tento krok z procedury v dalších testech vyřazen.

5.5.1.9 Závislost AP hodnoty na koncentraci kvasnic a glukosy

Zvýšení koncentrace kvasnic a glukosy urychluje průběh acidifikace vzorku a zvyšuje její úroveň. Zrychlení a prohloubení acidifikace zkrátí dobu trvání testu a zvětší rozlišovací schopnost. K ověření vlivu koncentrace kvasnic a glukosy na výsledek AP testu byla prove-

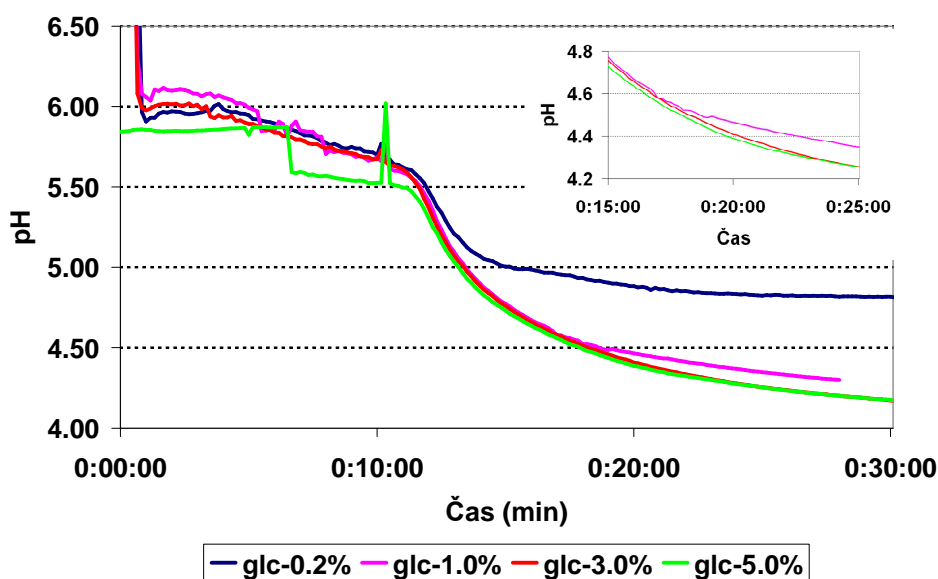
dena sada měření se standardní přípravou vzorků a rozdílnými odváženými koncentracemi kvasnic a přidané glukosy (různé objemy 50% roztoku glukosy).

V tabulce 5.6 jsou vyneseny hodnoty AP testu pro různou koncentraci glukosy a kvasinek. Pro koncentrace buněk větší než 9g/100 ml vzorku a koncentraci glukosy větší než 3% se naměřená hodnota AP nemění, není závislá ani na jedné z koncentrací (čísla v tabulce vyznačená tučně). AP hodnota dosahuje maximální saturační hodnoty. Ani vysoká koncentrace glukosy 5% neovlivňuje negativně výsledek testu, naopak zajišťuje dostatečnou úroveň substrátu v roztoku během celé doby jeho trvání.

Tabulka 5.6 Hodnoty AP pro různé koncentrace buněk a glukosy

Koncentrace kvasinek (g/100 ml)	Koncentrace glukózy (%)				
	0.2	1.0	1.6	3.2	5
	AP				
3.6	1.44	1.70	1.70	1.71	1.71
6.0	1.45	1.78	1.80	1.82	1.82
8.0	1.43	1.82 ^{x)}	1.84	1.88	1.90
9.0	1.42	1.83	1.85	1.88	1.92
12.0	1.42	1.84	1.86	1.89	1.92

^{x)} podmínky podle Kary[55]; tučné písmo – saturační podmínky testu



Obr.5.47 - Závislost průběhu acidifikace během AP testu na koncentraci přidané glukosy. Koncentrace kvasinek 9g/100 ml

V grafu na obr.5.47 jsou vyneseny hodnoty AP testu pro různou koncentraci glukosy při konstantní koncentraci kvasinek 9g/100 ml. Kvasinky použité při tomto měření dosahovaly hodnoty AP = 2,0; jejich vitalita byla výrazně nižší než u některých vzorků, které dosahovaly hodnoty AP větší než 2,5. I přes tuto relativně nízkou vitalitu dochází při nižších koncentracích glukosy k jejímu vyčerpání během testu, AP hodnota nedosáhne maximální hodnoty. Na obr.5.47 jsou acidifikační křivky po přidání glukosy pro koncentrace glukosy 1,0 %, 3,0 %, 5,0 % téměř totožné. Od 18.minuty se křivka pro vzorek s 1% původní koncentrací glukosy

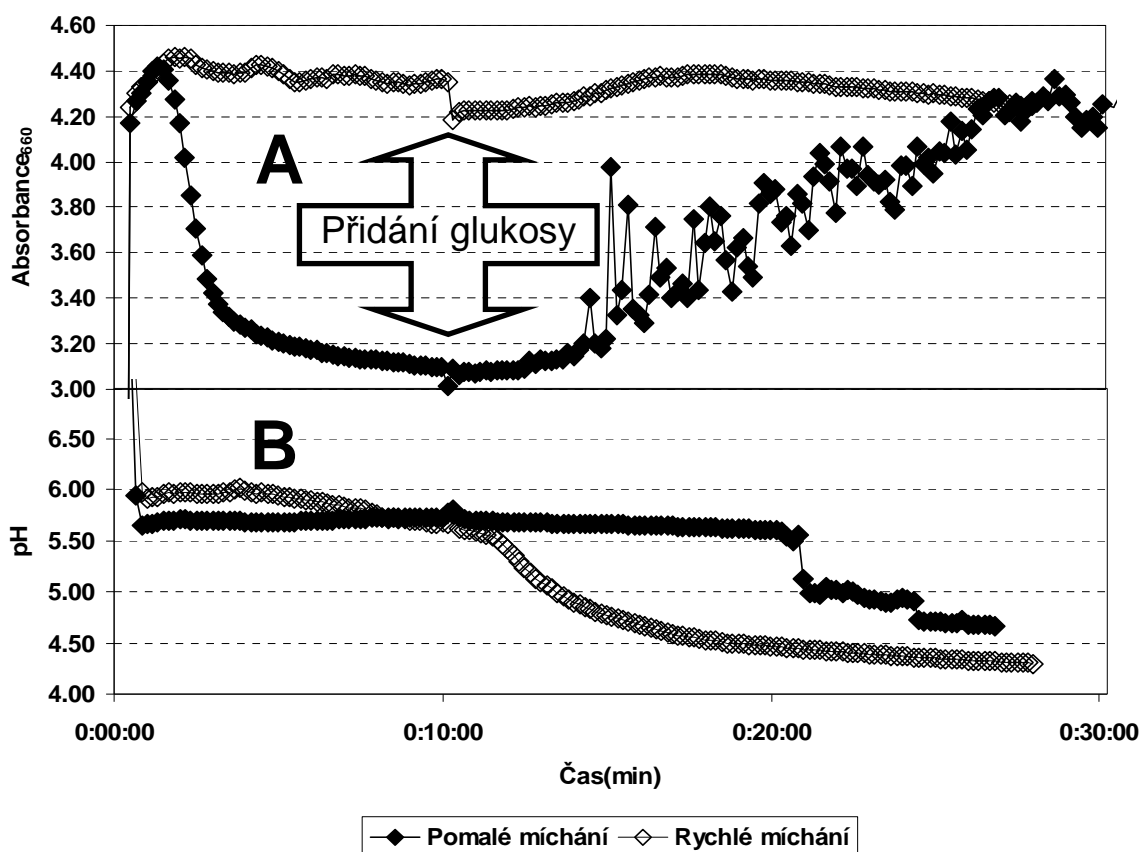
odchyluje od ostatních. Hodnota AP je v 20. minutě o 0,09 nižší než hodnota AP dosažená při vyšších koncentracích glukosy.

Jako standardní parametry budeme v dalších testech používat saturační koncentrace 9g/100 ml (1,5 g/15 ml) odstředěných kvasnic a 5% glukosy. Toto nastavení by mělo zajistit dosažení maximální hodnoty AP a minimalizovat vliv koncentrace kvasnic a glukosy na výsledek testu.

Koncentraci kvasnic je možné samozřejmě používat nižší. V takovém případě je však nutné brát do úvahy závislost výsledku AP testu na použité koncentraci. Chyba výsledku AP testu se zvyšuje o chybu způsobenou nepřesností určení koncentrace kvasnic a doba trvání testu se prodlužuje. Výhodou nižší koncentrace kvasnic může být větší podobnost podmínek testu se skutečnou provozní fermentací, kde se dosahuje maximální hodnoty 1g hustých kvasnic na 100 ml vzorku.

5.5.1.10 Vliv flokulace a sedimentace kvasinek na výsledek AP testu

Rychlost míchání je dalším z důležitých faktorů ovlivňujících výsledek AP testu. Vliv míchání dokumentuje obr.5.48. Při měření 20 ml vzorku spodně kvasících a dobře flokulujících kvasinek kmene 95 a při rychlosti míchání 150 rpm buňky rychle flokulují a sedimentují. Rychlá sedimentace je zřejmá z rychlého poklesu A_{660} již v průběhu spontánní acidifikace před přidáním glukosy.



Obr.5.48 - Vliv rychlosti míchání na průběh acidifikace během AP testu. A_{660} – hodnota absorbance. Měřeno na aparatuře YATA v kyvetě s optickou dráhou světla 2cm.

Přidání glukosy způsobí postupnou deflokulaci a rozptýlení kvasinek v objemu vzorku, pozorovatelnou jako postupný růst absorbance vzorku, spojený s velkými skoky v hodnotě absorbance způsobenými deflokulací buněk ve velkých shlucích. Nízká koncentrace kvasinek v objemu vzorku po přidání glukosy způsobí nízkou acidifikaci, která se projeví v chybně

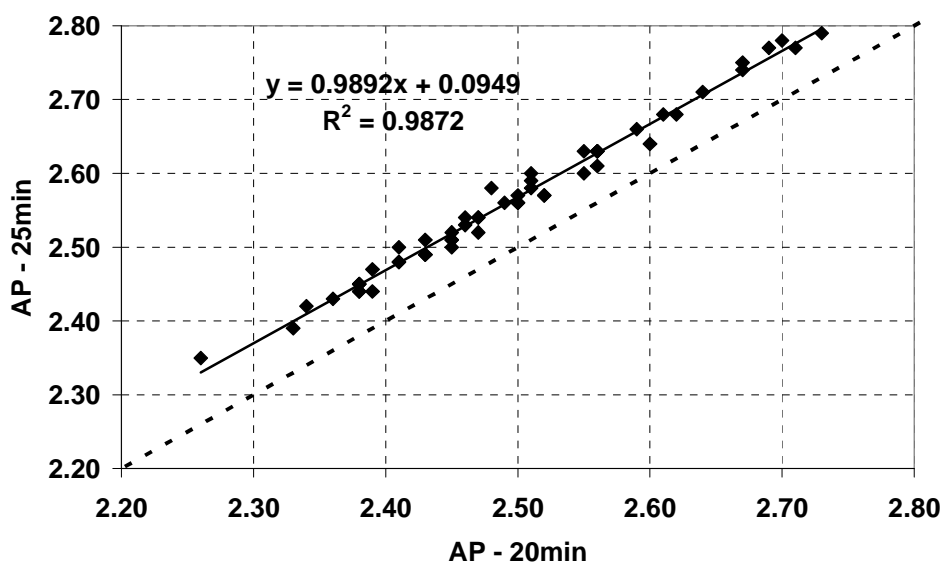
nízké výsledné hodnotě AP testu. Zvýšením otáček míchání nad 200 rpm se zabrání flokulaci a sedimentaci buněk (je zřejmé z průběhu absorbance), které zůstávají rozptýlené v objemu vzorku a acidifikační křivka má standardní průběh.

Monitorování hodnoty absorbance během měření umožňuje kontrolovat, zda nedochází k nežádoucí flokulaci a sedimentaci buněk. Rychlost míchání je nutné udržovat na dostatečně vysoké hodnotě tak, aby k nežádoucí flokulaci a sedimentaci buněk nedocházelo.

5.5.1.11 Závislost výsledku AP testu na době acidifikace

Abychom ověřili, zda není možné dosáhnout větší citlivosti AP testu prodloužením doby měření, provedli jsme srovnání standardních AP hodnot (pH odečteno ve 20. minutě) s hodnotami AP vypočtenými z pH odečteného v 25. minutě od začátku testu u souboru 60 provozních vzorků, měřených podle optimalizované procedury. Výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr.5.49.

Z grafu je zřejmé, že hodnoty AP odečtené ve 20. minutě (standardní AP) a 25. minutě (AP-25min) spolu korelují s vysokou hodnotou koeficientu $R = 0,987$. Směrnice proložené přímkou je téměř 1. Hodnoty AP-25min jsou vyšší o 0,095 než standardní hodnoty AP pro vzorky v celém rozsahu. Prodloužení doby měření testu zvýší výsledné hodnoty AP, ale nezvýší citlivost testu.



Obr.5.49 - Srovnání výsledku AP testu při odečtení hodnoty pH ve 20. minutě (AP-20min) a ve 25. minutě (AP-25min) od začátku měření. Naměřeno na souboru 60 vzorků provozních kvasnic.

5.5.1.12 Optimalizovaný postup AP testu

Na základě předchozích výsledků jsme navrhli optimální nastavení parametrů AP testu:

- vzorky jsou skladovány při 2 °C maximálně 5 dní od odběru;
- kvasinky jsou 3x promyty destilovanou vodou (2 x 1 minuta při 1000 rpm (145 x g), 1x 10 minut při 3000 rpm (1400 x g) ;
- množství kvasinek je odváženo v rozsahu 9 – 12 g na 100 ml vzorku;
- množství glukosy je dávkováno na konečnou koncentraci 5% (1,5 ml 50% glukosy na 15 ml vzorku);

- míchání vzorku je nastaveno na 200 rpm, aby se zabránilo flokulaci kvasinek (správná rychlost míchání závisí na kmenu kvasinek a geometrii měřící komory);
- během měření je udržována konstantní teplota vzorku $25,0 \pm 0,5$ °C.

Tento optimální postup AP testu zajišťuje dosažení maximální hodnoty AP testu s maximální reprodukovatelností a minimální SD.

5.5.1.13 Přesnost a reprodukovatelnost AP testu

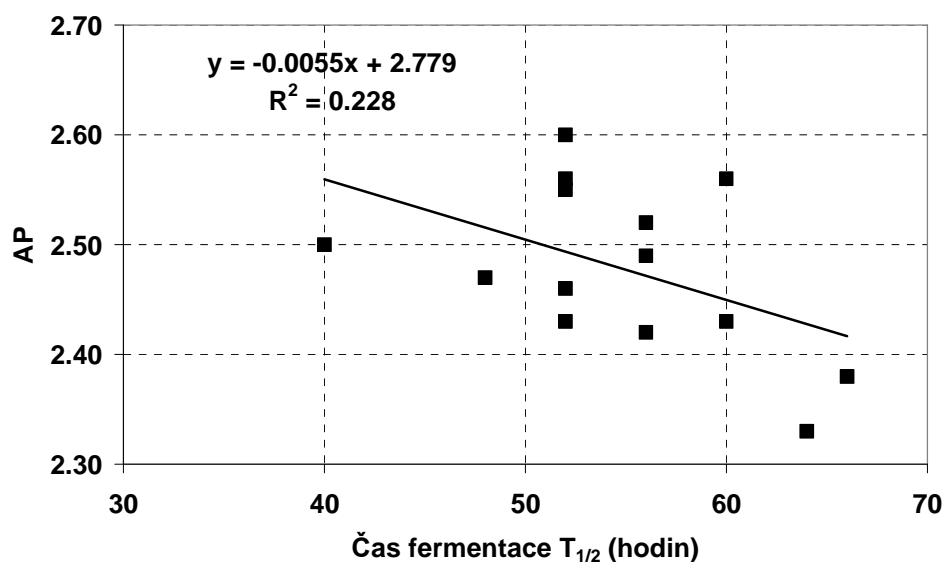
Optimalizovaný AP test se vyznačuje vysokou reprodukovatelností. Pokud jsou dodrženy podmínky přípravy vzorku, výsledek opakovaného testu provedeného na jednom vzorku dává standardní odchylku $\pm 0,7$ %, která je dána chybou pH metru. Chyba měření jednoho vzorku kvasinek včetně kompletní přípravy vzorku je ± 2 % (měřeno na 25 vzorcích kvasinek, každý měřen 3x včetně kompletní přípravy).

5.5.2 Ověření AP testu

Abychom ověřili užitečnost AP testu k určení vitality provozních pivovarských kvasinek, provedli jsme sadu srovnávacích měření na vzorcích odebraných v provozních podmínkách.

5.5.2.1 Srovnání výsledků AP testu s fermentační schopností kvasinek

Pro ověření schopnosti AP testu předpovědět fermentační schopnost kvasinek jsme provedli na sadě vzorků srovnání výsledku AP testu s dobou potřebnou k prokvašení cylindro-konického tanku (CKT) v pivovarském provozu. Vzorky kvasinek byly odebrány ze zásobního tanku před zakvašením CKT. Na odebraných vzorcích byla naměřena AP hodnota a zároveň byla zaznamenána hodnota $T_{1/2}$ – čas v hodinách, za který byla mladina v CKT prokvašena na polovinu původní stupňovitosti. Čas $T_{1/2}$ charakterizuje první část fermentace, kdy je rychlost



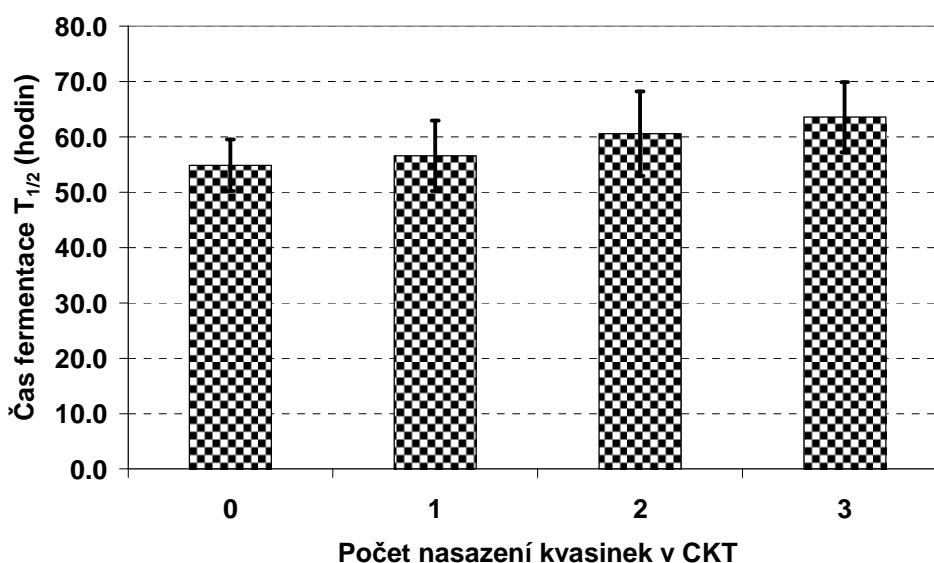
Obr. 5.50 - Korelace výsledku AP testu s fermentační mohutností danou provozní hodnotou $T_{1/2}$ – dobou prokvašení mladiny v CKT tanku na polovinu původní stupňovitosti

více závislá na vitalitě kvasinek a méně na složení mladiny. Mladina v první části kvašení obsahuje dostatek zkvasitelných cukrů. Pro srovnání byly vybrány pouze vzorky kvasinek, kterými byla zakvašena CKT s jedním druhem piva, t.j. mladinou se stejnou stupňovitostí, totožným složením a technologickým postupem přípravy.

Na obr.5.50 je vynesena vzájemná korelace výsledků AP testu a hodnot $T_{1/2}$. Nízká korelace hodnot ukazuje, že průběh fermentace v provozních podmínkách silně závisí na dalších proměnných, jako např. na složení mladiny, zakvašovací koncentraci kvasinek, konstrukci a charakteristice chlazení každého CKT. Tyto proměnné mají srovnatelný vliv na průběh kvašení jako vitalita kvasinek, a proto maskují závislost průběhu fermentace na ní. Všechny testované vzorky kvasinek byly velmi vitální, jejich AP hodnota se pohybovala v malém rozmezí hodnot od 2,4 do 2,6. Během období, kdy byly vzorky odebírány, nebyl nalezen jediný vzorek s významně nižší hodnotou AP.

5.5.2.2 Závislost fermentační mohutnosti kvasinek a AP na počtu nasazení v CKT

Abychom byli schopni rozhodnout, zda je nízká korelace hodnot AP a $T_{1/2}$ způsobena rozptylem $T_{1/2}$ hodnot, rozdělili jsme měřené vzorky do skupin podle počtu nasazení kvasinek v CKT. Pro každou skupinu byly vypočteny střední hodnoty a standardní odchylky AP a $T_{1/2}$ hodnot. Výsledky jsou zobrazeny v grafech na obr.5.51 a 5.52.

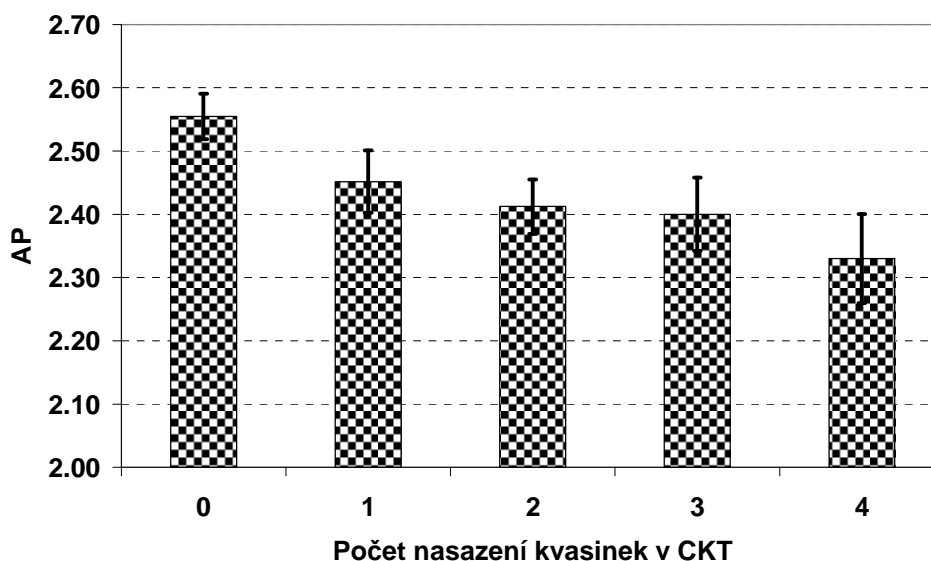


Obr.5.51 – Závislost $T_{1/2}$ (doba prokvašení mladiny v CKT tanku na polovinu původní stupňovitosti) na počtu nasazení kvasnic v CKT. Data jsou průměrem z dvaceti vzorků.

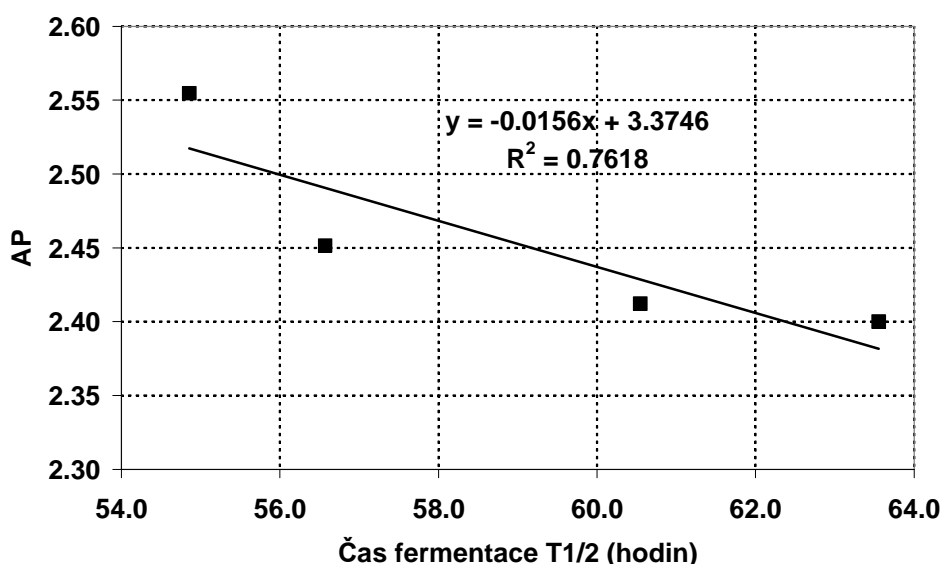
Graf na obr.5.52 znázorňuje vliv opakovaného nasazení kvasinek v CKT na jejich fermentační mohutnost. S počtem nasazení čas fermentace $T_{1/2}$ roste, přičemž fermentační mohutnost kvasinek klesá. Standardní odchylka každé skupiny vzorků dosahuje 20% hodnoty a převyšuje rozdíly mezi skupinami vzorků. Tento výsledek lze vysvětlit minoritním vlivem kvasinek na rychlost kvašení ve srovnání s jinými vlivy. V obr.5.51 jsou vyneseny pouze hodnoty od 0 do 3 nasazení. V provozu, ze kterého byly odebírány vzorky, se k zakvašování CKT používají kvasinky pouze maximálně čtyřikrát.

Hodnota AP naměřená na stejných vzorcích s počtem nasazení kvasinek klesá, standardní odchylka pro každou skupinu vzorků je 2 až 3%. AP hodnota odráží změnu vitality kvasinek při opakovaném nasazení kvasnic v CKT. Standardní odchylka AP hodnot roste s počtem nasazení v CKT, opakovaným nasazením kvasinek se zvětšuje rozdíl mezi vitalitou jednotlivých vzorků ve skupině. Nízká korelace mezi výsledky AP testu a provozním parametrem $T_{1/2}$ je tedy způsobena převážně velkým rozptylem hodnot $T_{1/2}$.

Porovnání středních hodnot AP a $T_{1/2}$ pro kvasnice z jednotlivých generací (tj. po daném počtu nasazení v CKT) z grafů 5.51 a 5.52 je zobrazeno na obr. 5.53.



Obr.5.52 – Závislost AP hodnot na počtu nasazení kvasnic v CKT. 0 – čerstvé kvasnice z propagace, 1, 2, 3, 4 – kvasnice po prvním, druhém, třetím a čtvrtém nasazení v CKT. Data jsou průměrem z dvaceti vzorků.



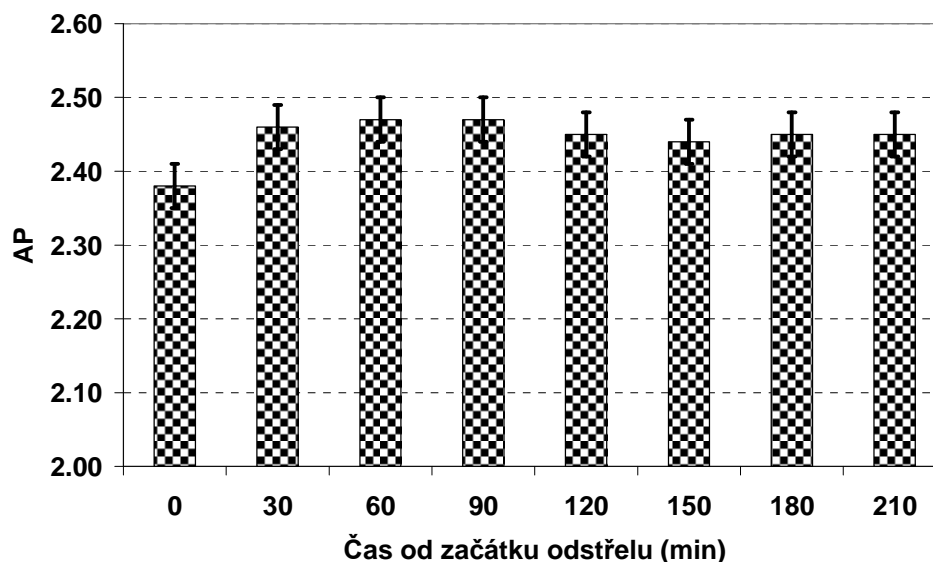
Obr.5.53 – Korelace výsledku AP testu s fermentační mohutností danou provozní hodnotou $T_{1/2}$ pro vzorky kvasnic rozdělené do skupin podle počtu nasazení v CKT

5.5.2.3 Distribuce vitality kvasinek získaných při odstřelu CKT

Abychom demonstrovali možnost praktického využití AP testu ke zkoumání vlivu provozních podmínek na kvasinky, provedli jsme následující měření. Odebrali jsme vzorky během odstřelu CKT v 30-minutových intervalech. Na odebraných vzorcích jsme změřili hodnotu AP (3x každý vzorek). Výsledky měření jsou vyneseny v grafu na obr.5.54. Výsledek AP testu je téměř konstantní pro vzorky odebrané během celého odstřelu, pouze na prvním vzorku odebraném na začátku byla naměřena nižší hodnota AP.

První odebraný vzorek pochází z kvasinek ze dna kónusu CKT nádoby. Tyto kvasinky sedimentovaly první a ležely na dně nádoby nejdéle, přičemž byly vystaveny vysokému hydrostatickému tlaku. Během odstřelu CKT neodtékaly kvasinky vrstvu po vrstvě, ale docházelo k jejich míšení a homogenizaci; tento proces způsobil vyrovnání hodnot AP u dalších vzorků.

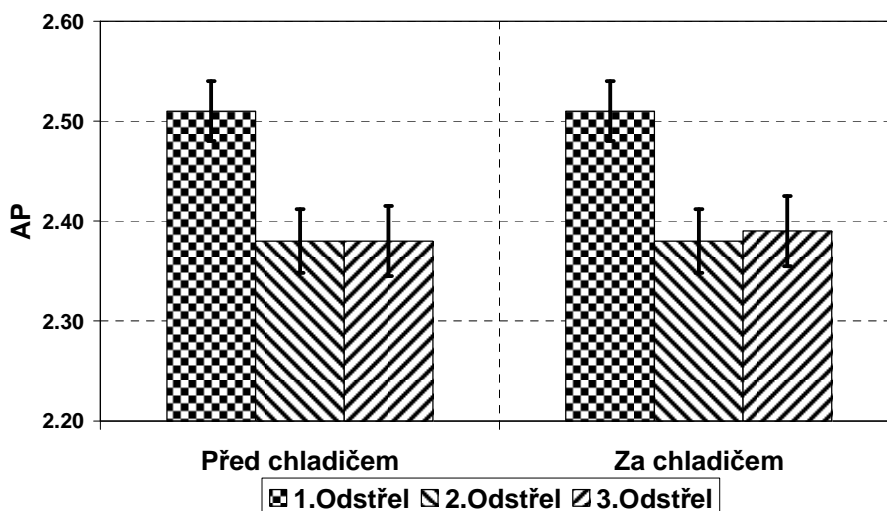
Přestože rozdíly naměřených hodnot AP kromě prvního vzorku byly totožné v rámci chyby, je zde pozorovatelný trend. Nejvyšší AP hodnotu, a tedy i vitalitu, mají vzorky odebrané mezi 30. a 90. minutou odstřelu, dále vitalita vzorku klesá. Naměřená data podporují všeobecně přijímaný fakt, že k opětovnému zakvašování se nejvíce hodí kvasinky ze střední části odstřelu. Výsledek testu se může výrazně lišit pro jednotlivá CKT a lze ho využít při optimalizaci sběru a úschovy kvasinek pro další zakvašování CKT.



Obr.5.54 - AP hodnoty změřeny na vzorcích kvasnic odebraných v 30ti-minutových intervalech při odstřelu z CKT.

5.5.2.4 Vliv chlazení na vitalitu provozních kvasinek

Fermentace v provozních podmínkách pivovaru probíhá v CKT při teplotách nad 10 °C. Na konci fermentace je část kvasinek uschována v záložních tancích pro zakvašení dalších CKT. V záložních tancích jsou kvasinky udržovány při teplotě okolo 4 °C. V některých pivovarech jsou odstřelené kvasinky zchlazeny na průtokových chladičích tak, aby do zásobních tanků přitekly již na skladovací teplotě. Rychlé ochlazení kvasinek může být jeden z technologických kroků, který negativně ovlivní jejich vitalitu. Abychom zjistili vliv chlazení, odebrali jsme po 3 vzorcích kvasinek z 1., 2. a 3. odstřelu před a za chladičem a proměřili na nich AP. Výsledek zobrazený v grafu na obr.5.55 ukazuje, že chlazení nemá žádný vliv na vitalitu vzorků.



Obr.5.55 - Vliv provozního chlazení na vitalitu kvasnic po 1., 2. a 3. nasazení v CKT

5.5.3 Shrnutí

Sledovali jsme vliv různých faktorů tzn. teploty, doby a způsobu skladování, přípravy vzorků, koncentrace buněk a glukosy na výsledek AP testu. Optimalizovali jsme proceduru testu tak, abychom dosáhli maximální hodnoty AP s maximální reprodukovatelností a minimální standardní odchylkou, s přihlédnutím k maximální úspoře času a práce při přípravě vzorků. Optimální parametry testu jsme zjišťovali měřeními na provozních vzorcích kvasinek spodně kvasícího kmene s označením 95 (sbírka kvasnic VÚPS), který je nejrozšířenějším kmenem využívaným pro přípravu pív typu Pilsener v ČR. Optimální podmínky se mohou pro různé kmeny kvasinek lišit, základní faktory, které ovlivňují test a postup optimalizace, však zůstávají stejné.

Abychom ověřili využitelnost AP testu, použili jsme jeho optimalizovanou proceduru k zjištění vlivu některých technologických postupů v pivovarnictví na vitalitu kvasinek.

Snaha o urychlení měření AP testu vedla některé autory (Cunningham [21]) k vynechání fáze spontánní acidifikace bez substrátu a k určení AP hodnoty pouze z poklesu pH v průběhu glukosou indukované acidifikace. Je nutné poznamenat, že fyziologický stav buněk se odráží ve schopnosti metabolizovat jak vnitřní, tak vnější energetické zdroje. Procesy, které se účastní obou fází acidifikace, jsou komplexní (produkce CO₂, činnost H⁺-ATPasy, export organických kyselin, výměna K⁺/H⁺ - Sigler [105]) a jejich vzájemný poměr se mění v jednotlivých subpopulacích buněk. Hlavní charakteristický parametr pro daný vzorek je konečné pH, kterého se dosáhne po provedení kompletního AP testu. Některé vzorky mají atypicky velkou spontánní acidifikaci (zvláště u buněk s velkými endogenními zdroji), která je pak následována relativně menší glukosou indukovanou acidifikací. Podobně vzorky s velkými endogenními energetickými zásobami (např. z propagace) mohou v případě, že nejsou vystaveny dostatečnému hladovění, vykazovat nízkou hodnotu AP.

Výpočet hodnoty AP odečtením naměřené hodnoty pH od referenční hodnoty 6,3 byl zaveden již v práci Siglera [104]. $pH = 6.3$ odpovídá pK systému CO₂ – HCO₃⁻ a zároveň přibližnému intracelulárnímu pH kvasničných buněk. Na začátku měření jsou kvasinky přidávány do destilované vody. Iontová síla roztoku je malá a hodnota pH naměřená pH-metrem je zatížena velkou chybou. Stupnice pH je logaritmická a chyba způsobená zprůměrováním koncentrace H⁺ na začátku měření je zanedbatelná.

Při vynechání spontánní acidifikace z výsledku AP testu je vzhledem k logaritmické definici pH nutné zavést novou definici AP_{GLC} , která odpovídá produkci protonů v glukosou indukované části AP testu:

$$AP_{GLC} = \log(10^{-pH_{20}} - 10^{-pH_{10}}) \quad (5.5)$$

Naše měření prokázala, že AP test je vhodný pro zhodnocení vlivu technologických procesů (např. podmínek vedení propagace, zakvašování, odstřelu a podmínek skladování) na fyziologický stav kvasinek.

Při porovnání výsledků AP testu s fermentační schopností kvasinek měřenou přímo v provozních podmínkách pivovaru (hodnota T_{1/2}) nebyla nalezena výrazná korelace (viz obr 5.50). Rozdělení vzorků do skupin podle počtu nasazení v CKT prokázalo, že nízká hodnota korelace je způsobena převážně faktory ovlivňujícími provozní kvašení v CKT, jako např. distribuce teploty v CKT, složení mladiny, postupy naplnění CKT, zakvašovací koncentrace kvasinek, atd. Vzorky kvasinek, které jsme během 3 měsíců měření odebírali v provozu pivovaru, měly hodnotu AP v rozmezí 2,3 až 2,6, vyznačovaly se tedy vysokou vitalitou (do úvahy jsme brali pouze vzorky kvasnic, které byly použity k zakvašení CKT). Měření viability methylenovou modří prokázalo u všech vzorků hodnotu viability nad 96%. Vysoká hodnota

AP testu naměřená na odebraných vzorcích dokazuje, že kvasinky nejsou během vedení v provozních podmínkách pivovaru, který nám poskytoval vzorky, negativně ovlivněny způsobem uchovávání a nejsou vystaveny výrazným stresům. Rozdíl ve vitalitě provozních vzorků byl příliš malý na to, aby ovlivnil průběh fermentace více než jiné parametry. Publikované výsledky naměřené na vzorcích s větším rozptylem vitality (Kara [55]) prokázaly vzájemnou závislost výsledků AP testu a fermentační schopnosti v laboratorních podmínkách, která koreluje s našimi výsledky.

Aby bylo možné AP test využít v pivovarské praxi, musí splňovat některé základní požadavky. Musí být jednoduchý, levný a nenáročný na čas a práci obsluhy. Naše měření potvrdila možnost skladovat vzorky po delší dobu bez nutnosti okamžitého měření. To umožňuje obsluhu odebírat vzorky průběžně a měřit je současně v dávce jedenkrát za několik dní. Příprava vzorků promýváním v destilované vodě je krok, který nelze vynechat ani u jiných metod měření vitality kvasinek. Počet vzorků, které lze připravovat současně, je dán použitou centrifugou, tzn. počtem míst v jejím rotoru. Podle našich zkušeností trvalo současné promývání 4 až 8 vzorků 20 minut. Časová náročnost metody je nyní způsobena délkou vlastního měření acidifikace pomocí pH metru s elektrochemickou elektrodou, které trvá 20 minut pro každý vzorek a provádí se sériově vzorek za vzorkem.

Výrazného urychlení by bylo možné dosáhnout paralelním měřením více vzorků najednou. K tomu je možné použít aparaturu s více elektrochemickými pH elektrodami. Elektrody jsou ovšem náročné na údržbu a recalibraci. Tyto nevýhody je možné obejít optickou detekcí změn pH pomocí vhodného pH indikátoru.

5.6 TITRAČNÍ AP TEST (TAP) VITALITY KVASNIC

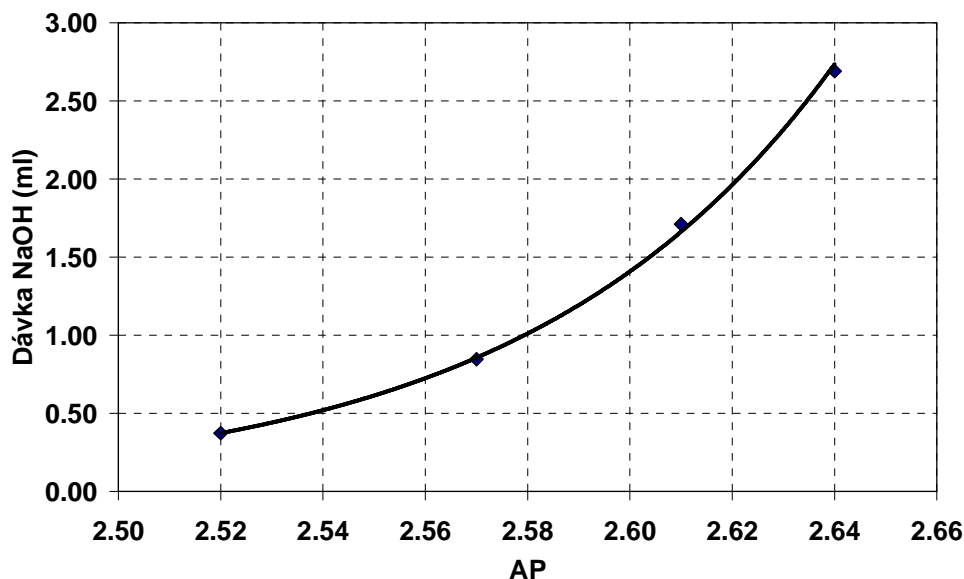
Jedním z argumentů proti AP testu je jeho nízká rozlišovací schopnost pro velmi aktivní kvasnice. V některých případech mohla být nízká rozlišovací schopnost testu způsobena špatným nastavením parametrů testu. V mnoha pracích věnovaných AP testu nebo využívajících AP test k měření vitality kvasnic je standardně používána nízká koncentrace přidávané glukosy (Kara [55]). Glukosa je vitálními kvasnicemi vyčerpána již během testu, což způsobí zpomalení acidifikace a srovnání výsledků AP testu u vzorků kvasnic s rozdílnou vitalitou (Imai [45]).

Námi měřené provozní vzorky kvasnic vykazovaly hodnotu AP v rozmezí 2,3 až 2,6; jednalo se tedy o vzorky, které byly dostatečně vitální a schopné fermentace v provozních podmínkách. Nižší rozlišovací schopnost AP testu pro velmi vitální kvasnice je částečně způsobena logaritmickou podstatou pH stupnice. Stejná produkce protonů u méně vitálních kvasnic při $\text{pH} = 4$ způsobí řádově vyšší změnu pH, než stejná produkce protonů u $\text{pH} = 3.5$.

Jednou z možností úpravy AP testu za účelem zvýšení citlivosti je titrační AP test (TAP). Podstatou TAP je řízené dávkování basického roztoku během AP testu tak, aby se zachovávalo konstantní pH. Velikost dávky zásady, která je potřebná na udržení konstantního pH, je přímo úměrná produkci protonů kvasnicemi. Výsledek TAP se udává v objemu titrantu ve 20. minutě měření. Pro měření titračního AP testu (TAP) vitality kvasnic byl program MZN Control vybaven softwarovým PID regulátorem s nastavitelnými parametry, který optimalizuje dávku zásady.

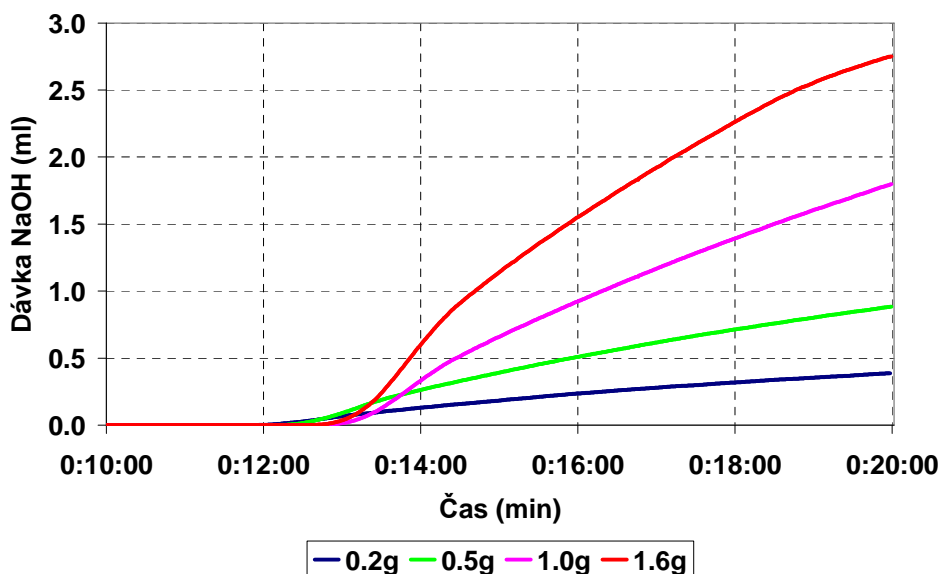
Abychom ověřili možnosti titračního AP testu, provedli jsme srovnávací měření s klasickým AP testem na aparatuře YATA. Byly připraveny 4 vzorky kvasnic z jednoho zásobního roztoku, u kterých byla lehce modifikována vitalita vystavením teplotnímu stresu. Vzorky byly promyty podle standardní procedury pro AP test. Z každého vzorku byly odváženy dva (1,5 g/15 ml) totožné, z nichž na jednom byl změřen standardní AP test, na druhém titrační test TAP. pH roztoku bylo alkalizováno 0,01M roztokem NaOH. Při TAP testu byla udržována

konstantní hodnota $\text{pH} = 4,5$. Výsledné hodnoty AP testu a TAP testu byly odečteny shodně ve 20. minutě od začátku měření. Výsledek TAP je udáván v ml roztoku NaOH nadávkovaného do vzorku během testu.



Obr.5.56 - Srovnání výsledků AP a TAP (Dávka NaOH) testu pro vzorky kvasnic s rozdílnou vitalitou.

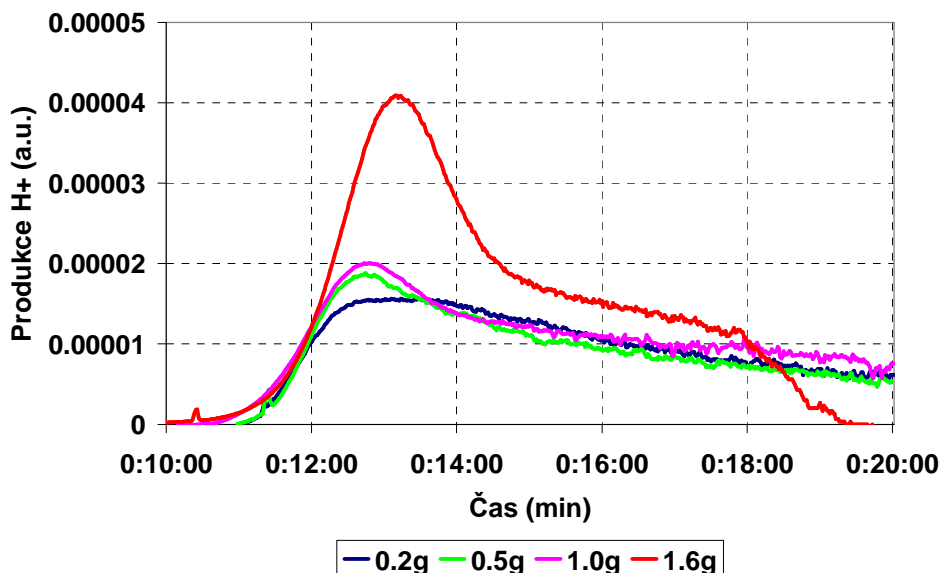
V grafu na obr.5.56 je vynesena vzájemná závislost výsledků AP a TAP testů. Ve výsledcích AP testu jednotlivých vzorků je pouze minimální rozdíl 0,12 jednotek pH . Oproti tomu rozdíl ve výsledcích TAP testu je několikanásobný, od 0,38 ml NaOH pro nejméně vitální vzorek až po 2,69 ml NaOH pro nejvitálnější vzorek. Rozdíl ve výsledcích TAP je výrazně větší, než by odpovídalo převodu výsledku AP z logaritmické stupnice.



Obr.5.57 - Časový vývoj dávky NaOH při TAP testu pro čtyři různé koncentrace kvasnic na 15ml vzorku. Dávkován 0.01M roztok NaOH. pH stabilizováno na hodnotě 4.5.

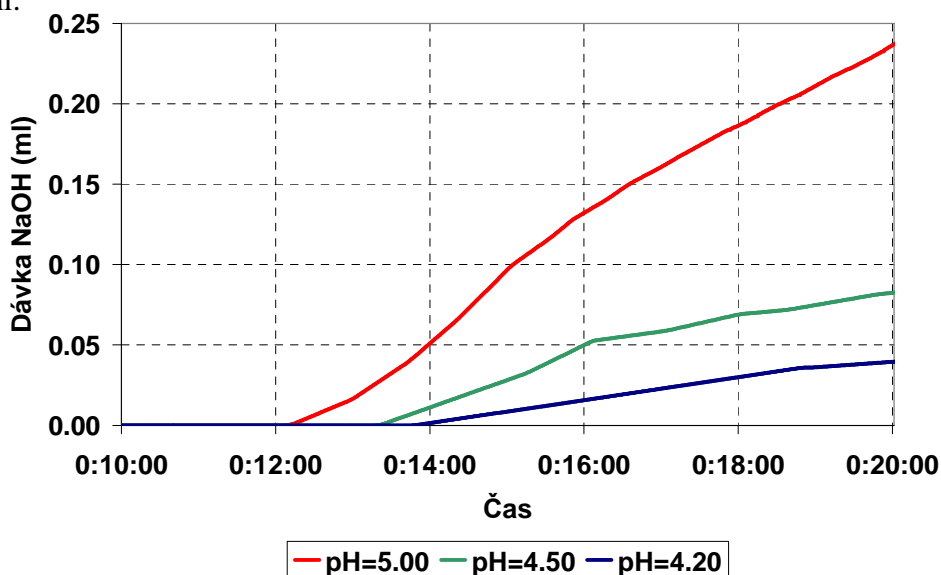
Vysvětlení je zřejmé z grafů na obr.5.57 a 5.58. Na obr.5.57 je zobrazen časový vývoj dávky NaOH při TAP testu, který odpovídá produkci H^+ iontů kvasnicemi. Čas 10 minut odpovídá nadávkování glukosy do vzorku. Až do 20. minuty testu je produkce H^+ iontů monotónně

rostoucí. Prodleva ve startu dávkování NaOH je doba potřebná na dosažení pH (v našem případě 4,5), na kterém je vzorek udržován. V následujícím obr.5.58 je zobrazen časový vývoj produkce H^+ iontů během acidifikace totožných vzorků při AP testu, vypočtený z poklesu pH. Produkce H^+ iontů dosáhne po určitém čase maxima a poté výrazně klesá. Toky H^+ při AP a při TAP se tedy podstatně liší. Rozdíl je daný měnící se pufrací kapacitou suspenze během AP testu a rozdílným pH suspenze.



Obr.5.58 - Časový vývoj produkce H^+ iontů při AP testu pro čtyři různé koncentrace kvasnic na 15ml vzorku. Výpočet za předpokladu nulové pufrovací síly.

Vliv vnějšího pH na produkci H^+ iontů buňkami je zřejmý z obr.5.59. V grafu je zobrazeno srovnání časových vývoje přidávek 0,01M NaOH roztoku při TAP testu provedeném na totožném vzorku kvasnic (standardní příprava, dávkování kvasnic a glukosy) s rozdílnou hodnotou pH, na které byl vzorek stabilizován. S klesající hodnotou pH klesá i produkce H^+ iontů buňkami.



Obr.5.59 - Srovnání časových vývoje dávek 0.01M NaOH roztoku při TAP testu provedeném na totožném vzorku kvasnic (standardní příprava, dávkování kvasnic a glukosy). pH roztoku bylo stabilizováno na různých hodnotách pH.

Titrační test acidifikační síly (TAP) lze využít pro rozlišení kvasnic s malým rozdílem vitality, speciálně pro velmi vitální kvasnice. Výsledky testu nelze přímo srovnávat s výsledky standardního AP testu, protože podmínky, za kterých buňky acidifikují, jsou v obou testech rozdílné.

5.7 OPTICKÁ DETEKCE AP TESTU

Jedním z cílů této práce bylo ověřit možnost optické bezkontaktní detekce acidifikačního testu, která by umožnila cenově nenáročné měření více vzorků současně. K optickému měření změn pH je nutné vybrat vhodný pH indikátor. Jako pH indikátory se používají pH-senzitivní látky, které mění barvu v závislosti na pH okolí. Pokusíme se navrhnout a ověřit metodu měření acidifikačního testu využívající změny barvy po přidání pH indikátoru.

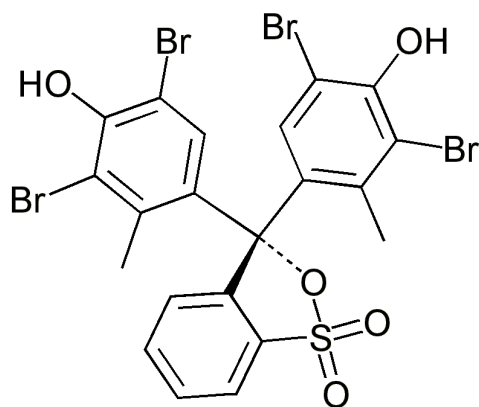
Vitální kvasinky acidifikují okolní prostředí během AP testu až do minimální hodnoty pH = cca 3,5. Hledáme pH indikátor s hodnotou pK okolo 4,5, který bude dostatečně citlivý v celém rozsahu pH změn během AP testu od pH = 3,5 do 5,5. K dalším podmínkám, které musí pH indikátor splňovat, patří minimální ovlivnění výsledku AP testu a minimální interakce s buňkami.

K měření barvy kapalných vzorků se využívá měření absorbance na jedné nebo více vlnových délkách. Navrhli jsme metodu měření acidifikačního testu na základě změny absorbance vzorku. V případě získání uspokojivých výsledků by tato metoda mohla být využita např. při měření na komerčně vyráběných přístrojích, tzv. čtečkách destiček „Plate reader“, které provádějí automatické měření současně na 96 i více vzorcích (podle typu přístroje). Optická detekce změny barvy při AP testu je znesnadněna elastickým rozptylem světla na kvasnicích. Rozptyl světla na kvasnicích snižuje intenzitu prošlého světla a zvyšuje pozorovanou absorbanci vzorku. Zpracování výsledků navíc ztěžuje fakt, že kvasnice jsou při optimalizovaném nastavení testu ve vzorku ve vysoké koncentraci až 10% objemu, rozptyl světla na nich je mnohonásobný a nelze jej popsat Lambert-Beerovým zákonem (viz rovnice 3.16).

Naším cílem bylo nejen navrhnout způsob měření, ale zároveň najít optimální koncentraci pH indikátoru a rozmezí koncentrace kvasnic, při které je metoda použitelná. Vzhledem k vybavenosti laboratoří „Plate readers“ měřícími absorbanci vzorků v transmisním uspořádání a vzhledem k jednoduchosti vyhodnocení výsledků jsme přistoupili nejdříve k měření změn absorbance v transmisním uspořádání. V tomto uspořádání je výhodné volit koncentraci kvasnic dostatečně nízkou tak, aby bylo možné použít jednoduchý součet absorbance způsobené rozptylem a absorbcí ve vzorku podle rovnice 3.25. Tato koncentrace je mnohem nižší, než je koncentrace navržená v optimalizované proceduře standardního AP testu. Při nižší koncentraci kvasnic je acidifikace mnohem pomalejší, ale podmínky jsou více podobné skutečnému průběhu fermentace v provozních podmínkách. Pomalejší průběh testu je kompenzován paralelním měřením více vzorků najednou.

5.7.1 pH indikátor bromkresolová zeleň (BCG)

Jako vhodný pH indikátor pro testování byla na doporučení Ing. K. Siglera vybrána bromkresolová zeleň (Bromocresol green, BCG). Disociační konstanta barviva je okolo 4,7 ([123] – závisí na iontové síle roztoku). Námí používaná sodná sůl BCG od firmy Merck má chemický vzorec $\text{Na C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ a molární váhu 698 g/mol. Na obr.5.60 je uveden strukturní vzorec acidické formy barviva. BCG není aktivně absorbována kvasnicemi a proniká do nich pouze volnou difusí. Mezi další nesporné výhody tohoto barviva patří jeho nízká toxicita, z ní plynoucí snadná manipulace a nízká cena.



Obr. 5.60 - Strukturální vzorec pH indikátoru bromkresolové zeleně (BCG)

5.7.2 Současné měření APT spektroskopicky a s referenční pH elektrodou

Abychom mohli provádět měření AP testu spektroskopicky současně s referenčním měřením na YATA s pH elektrodou, byla provedena následující úprava. 25 ml zkumavka v YATA byla uzavřena víčkem s dvěma přívody. Do spektrofotometru byla instalována průtoková cela s optickou dráhou 1 cm. Vstup a výstup z průtokové cely byly napojeny na přívody zkumavky pro YATA pomocí Tygonových hadiček (s vnitřním průměrem 1 mm) tak, že tvořily uzavřený okruh. Mezi výstup z průtokové cely a vstup do YATA byla vložena peristaltická pumpa s rychlostí průtoku 60 ml/min. Po spuštění peristaltické pumpy vzorek z měřicí termostátované komory v YATA průběžně cirkuluje přes spektrofotometr.

5.7.3 Závislost spektra BCG na pH

Pro měření s BCG byl připraven zásobní 1% roztok rozpuštěním 50 mg BCG v 5 ml destilované vody. Zásobní roztok je 0,0166 M. Požadovanou koncentraci BCG jsme získali dávkováním zásobního roztoku mikropipetou. Pro měření spekter BCG jsme do 50 ml 10 mM fosfátového pufru nadávkovali pipetou 50 μ l 1% BCG. pH roztoku jsme upravovali definovaným přídatkem 1M HCL a NaOH. Při úpravě pH byl roztok naředěn maximálně o 1% objemu. Naměřená spektra byla korigována na změnu koncentrace způsobenou ředěním.

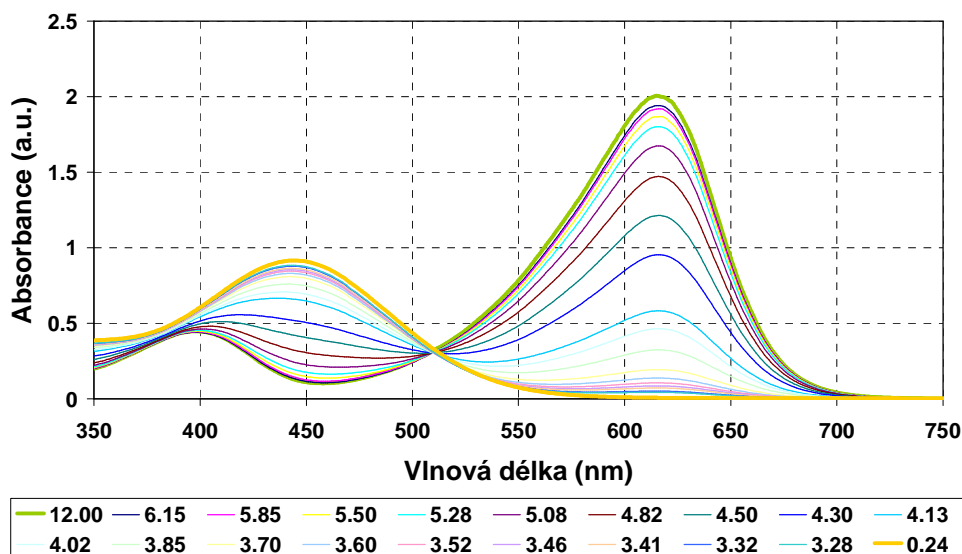
V grafu na obr.5.61 jsou vynesena absorpční spektra 0,001% ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M) vodného roztoku BCG při různém pH, měřená v 1 cm skleněné kyvetě (vůči vodě). S vyšší hodnotou pH se zvětšuje koncentrace bazické formy indikátoru a zvětšuje se absorbance absorpčního píku bazické formy okolo vlnové délky 617 nm. Současně se snižuje koncentrace acidické formy indikátoru a s ní absorpce v absorpčním píku na vlnové délce okolo 450 nm. Spektra se protínají na vlnové délce 511 nm, což je tzv. isobestický bod, tj. vlnová délka světla, pro kterou je absorpční koeficient obou forem pH indikátoru stejný.

Pro detekci změn pH je nejvýhodnější použít světlo o vlnové délce, pro kterou se absorpční koeficient bazické a acidické formy nejvíce liší, tzn. v místě absorpčních maxim. Absorpční spektra mají maxima v červené části spektra v blízkosti vlnových délek okolo 617 nm a v modré části spektra v blízkosti vlnové délky 445 nm.

BCG neabsorbuje světlo o vlnové délce větší než 720 nm a hodnoty absorbance při těchto vlnových délkách jsou v rámci chyby měření nulové. Vlnovou délku 750 nm je možné vybrat jako referenční bod pro určení koncentrace rozptylujících částic ve vzorku.

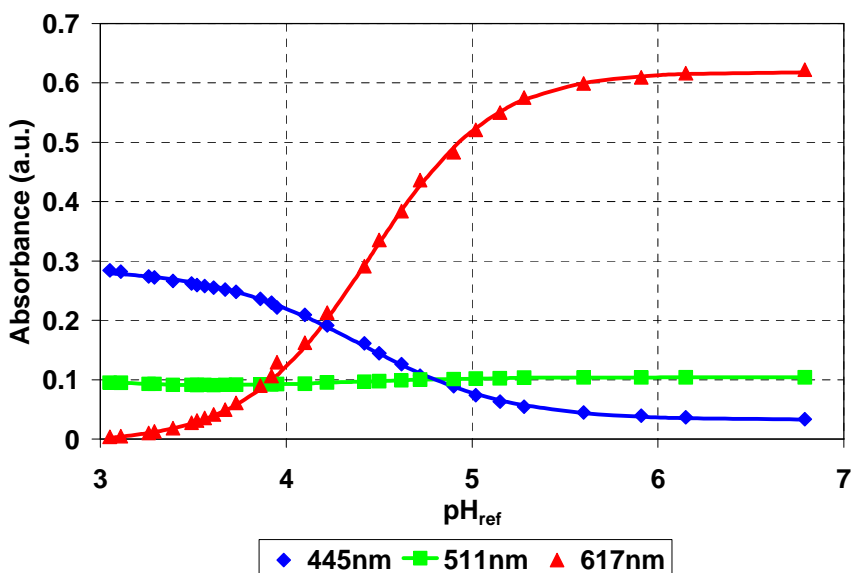
Hodnota pK indikátoru BCG je okolo 4,7 ([123]). Při pH roztoku rovném 0,0 je téměř všechno BCG v alkalické formě a absorpční spektrum reprezentuje výhradně spektrum alkalické

formy. Na druhou stranu BCG roztok s pH = 12,0 obsahuje výhradně acidickou formu indikátoru a absorpční spektrum reprezentuje tuto formu.



Obr.5.61 - Absorpční spektra 0,001% ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M) vodného roztoku BCG při různém pH, měřená v 1 cm skleněné kyvetě (vůči vodě) na spektrofotometru Specord

V grafu na obr.5.62 jsou vyneseny závislosti absorbance 1% roztoku BCG na pH odečtené na třech vlnových délkách, na vlnové délce absorpčního maxima acidické složky BCG – 445 nm, na vlnové délce absorpčního maxima basické složky BCG – 617 nm a v isobestickém bodě – 511 nm.

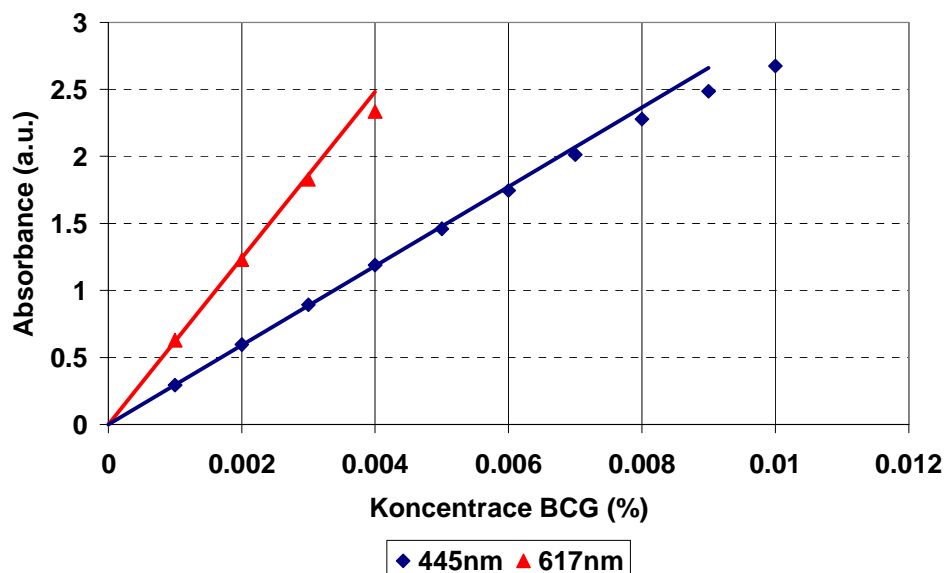


Obr.5.62 - Závislost absorbance na pH_{ref} pro 0,001% roztok BCG v 10 mM fosfátovém pufru. Absorbance odečteny na vlnových délkách 445 nm - modrá, 511 nm - zelená, 617 nm - červená

Naměřenými body byla proložena teoretická křivka

$$Abs = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + 10^{(pH - pK)})} \quad (5.6)$$

spekter a poměrů hodnot absorbancí na různých vlnových délkách, je nutné používat koncentraci BCG v rozmezí, kde je absorbance lineárně závislá na koncentraci a platí Lambert-Beerův zákon. Abychom ověřili linearitu závislosti absorbance na koncentraci BCG, proměřili jsme absorpční spektra v 1 cm skleněné kyvetě na vzorcích 10 mM roztoku fosfátového pufru s pH = 0,0 a pH = 12,0 (nastaveno 1M HCL a NaOH); do 50ml vzorku jsme přidávali po 50 μ l 1% BCG ze zásobního roztoku. Roztok pH se přidávkem BCG měnil v řádu $\pm 0,01$.



Obr.5.64 - Koncentrační závislost absorbance BCG v 10 mM fosfátovém pufru. Červená - absorbance v absorpčním maximu acidické složky na 445 nm při pH = 0,0. Modrá - absorbance v absorpčním maximu basicke složky BCG při pH = 12,0 na 617 nm

V grafu na obr.5.64 je vynesena koncentrační závislost absorbance BCG roztoku měřená v absorpčním maximu acidické složky na 445 nm při pH = 0,0 a v absorpčním maximu basicke složky BCG při pH = 12,0 na 617 nm. Křivky se odchyľují od linearity pro absorbance větší než 2.

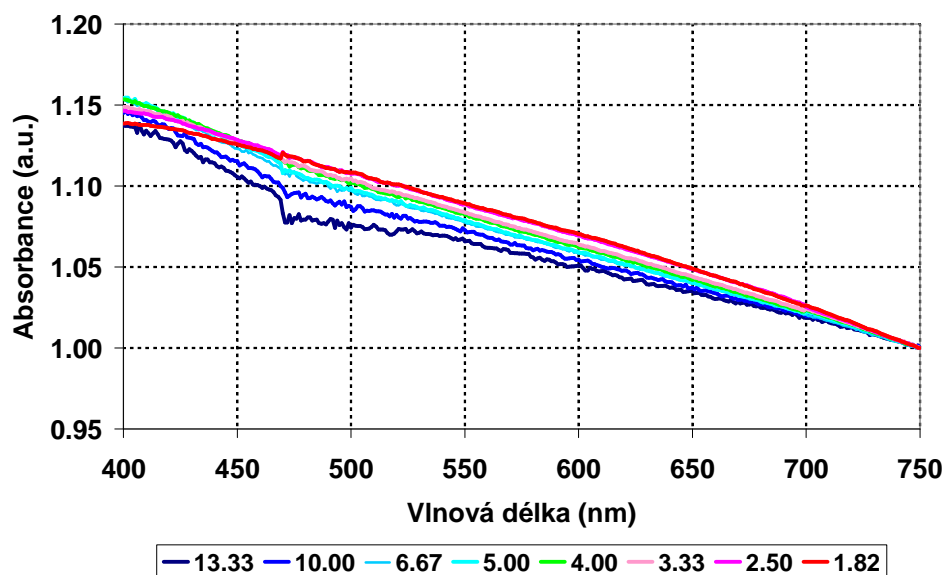
Pokud budeme používat koncentraci BCG do 0,003 %, budou spektra v oblasti linearity. Vzhledem k tomu, že při měření AP testu bude celkovou absorbancí ovlivňovat i rozptyl na kvasnicích, je maximální použitelná koncentrace BCG závislá i na koncentraci kvasnic.

Nezávislost koeficientu R na koncentraci BCG jsme ověřili sadou následujících měření. Byl připraven 10 mM fosfátový pufr s pH 3,50 až pH 5,50, tedy mezi horní a spodní hranici pH měřeného při AP testu. Do pufru byly přidávány definované dávky BCG a na vzorcích byla měřena spektra a hodnota pH. pH roztoku se při přidání BCG měnilo minimálně (v rozsahu $\pm 0,01$). Ze spekter byla vypočtena hodnota pH_{calc} podle kalibrační křivky z obr.5.2. Hodnoty pH_{calc} se v rámci chyby $\pm 0,01$ nemění až do koncentrace BCG, při které hodnota absorbance při vlnové délce odpovídající maximu přesáhla hodnotu 2,5. Odchyľka spekter pro vyšší koncentrace BCG a z ní vyplývající odchyľka vypočtené hodnoty pH_{calc} je způsobena přesností použitého spektrofotometru. Při použití spektrofotometru s větším dynamickým rozsahem měření by bylo možné použít vyšší koncentrace BCG.

5.7.6 Absorpční spektrum kvasnic

V grafu na obr.5.65 jsou vynesena absorpční spektra měřená na vzorcích kvasinek o různé koncentraci od 0,5 g do 2,5 g hustých odstředěných buněk na 100 ml vzorku. Spektra byla měřena v 1 cm kyvetě. Vzorky byly 3x promyty obdobně jako pro AP test. Po třetím odstředění byla odvážena přesná požadovaná hmotnost vzorku a odvážené kvasinky byly zality de-

finovaným objemem destilované vody. Abychom zabránili flokulaci kvasinek, přidali jsme EDTA s finální koncentrací 50 mM.



Obr.5.65 - Absorpční spektra kvasnic o různé koncentraci normalizovaná na hodnotu absorpce na vlnové délce 750 nm. Koncentrace kvasnic je daná hmotností navážky hustých odstředěných kvasnic v gramech na 100 ml roztoku.

Spektra byla normalizována na absorbanci při vlnové délce 750 nm. Spektra nemají žádné lokální maximum, absorbance monotónně klesá s rostoucí vlnovou délkou. Pokles hodnoty absorpce je 15% mezi vlnovými délkami 400 nm a 750 nm.

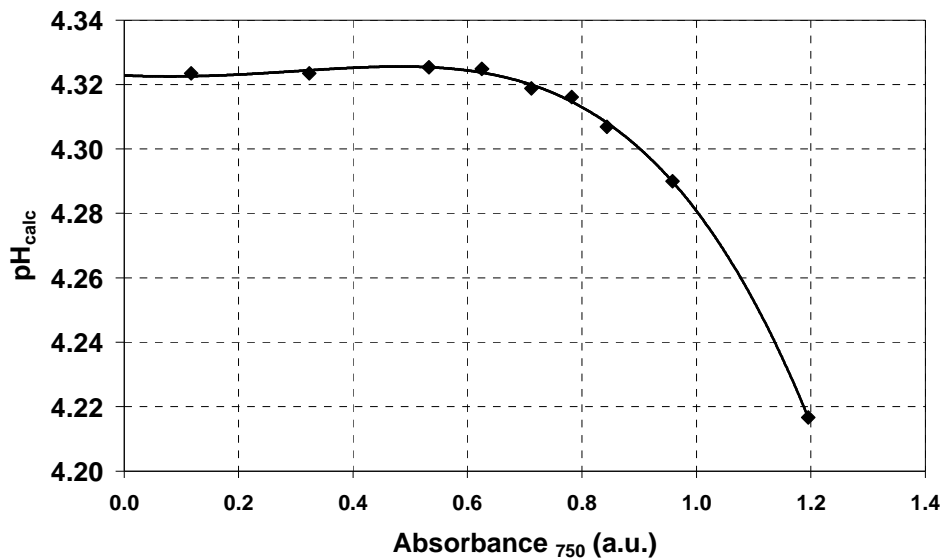
Normalizovaná spektra jsou téměř totožná v celém měřeném rozsahu vlnových délek. V měřeném rozsahu koncentrací kvasnic by odečtení složky spektra, odpovídající rozptylu na kvasnicích, nemělo výrazně změnit tvar absorpčního spektra BCG.

5.7.7 Optimalizace koncentrace kvasnic

Abychom ověřili nezávislost koeficientu R na koncentraci kvasnic, byla provedena následující měření. Byl připraven 10mM fosfátový pufr s pH 4.55 s koncentrací BCG 0.001%. Do něho byl po definovaných dávkách přidáván roztok kvasnic připravených ve stejném pufru, změřeno spektrum v 1cm kyvetě a změřena hodnota pH. Ze spekter byla vypočtena hodnota pH_{calc} podle kalibrační křivky z grafu na obr.5.63. Kontrolní měření pH metrem potvrdilo, že hodnota pH roztoku se při přidávání kvasnic neměnila.

V grafu na obr.5.66 je vynesena závislost pH_{calc} na absorbanci suspenze kvasinek na vlnové délce 750 nm, kde BCG již neabsorbuje - absorbance je způsobena rozptylem na kvasnicích. Z grafu je patrné, že hodnota pH_{calc} se začíná výrazně měnit až pro hodnoty absorpce větší než 1. Tato hodnota pro naše vzorky kvasnic odpovídá koncentraci hustých odstředěných kvasnic 0,4 g na 100 ml vody (odpovídá koncentraci buněk 20 milionů/ml). Koncentrace BCG 0,001% použitá v experimentu je dostatečně nízká, maximální hodnota absorpce nepřesáhla hodnotu 2 v celém rozsahu měřených vlnových délek.

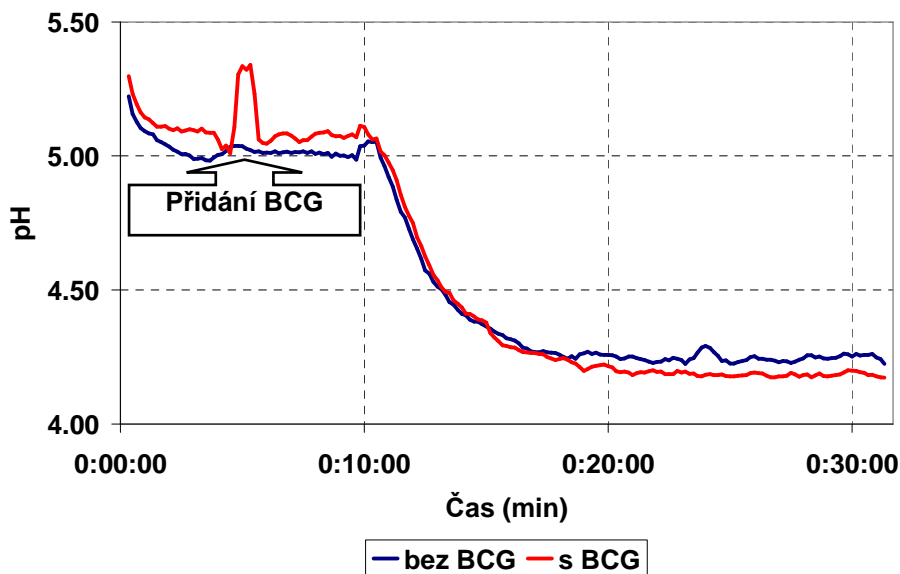
Z provedených měření plyne, že hodnota koeficientu R a zároveň hodnota pH_{calc} je na koncentraci kvasnic nezávislá, pokud absorbance kvasnic měřená v 1cm kyvetě nepřesahuje hodnotu 1. Pro vyšší hodnoty koncentrace kvasnic dochází k deformaci naměřených spekter, způsobené vícenásobným rozptylem, a následně ke snižování naměřené hodnoty pH_{calc} .



Obr.5.66 - Závislost hodnoty pH_{calc} vypočtené z absorpčních spekter v závislosti na absorbanci suspenze kvasinek na vlnové délce 750 nm (Absorbance_{750}), která je úměrná koncentraci kvasnic

5.7.8 Vliv BCG na průběh AP testu

Vliv BCG na průběh AP testu jsme ověřili na sadě 10 různých vzorků (různé vzorky, rozdílná navážka kvasnic). Na každém vzorku jsme provedli 2 identické testy podle standardní procedury s pH měřeným elektrochemickou pH elektrodou. Jeden test byl proveden bez přídavku BCG, u druhého měření jsme v 5. minutě testu uprostřed fáze spontánní acidifikace přidali jednorázově BCG na konečnou koncentraci 0,003%. Srovnání typického průběhu testu je znázorněno v grafu na obr.5.67. Přidání BCG neovlivní průběh AP testu. Průměrná změna výsledku AP testu při přidání BCG je $+0,04 \pm 0,03$ jednotek pH.

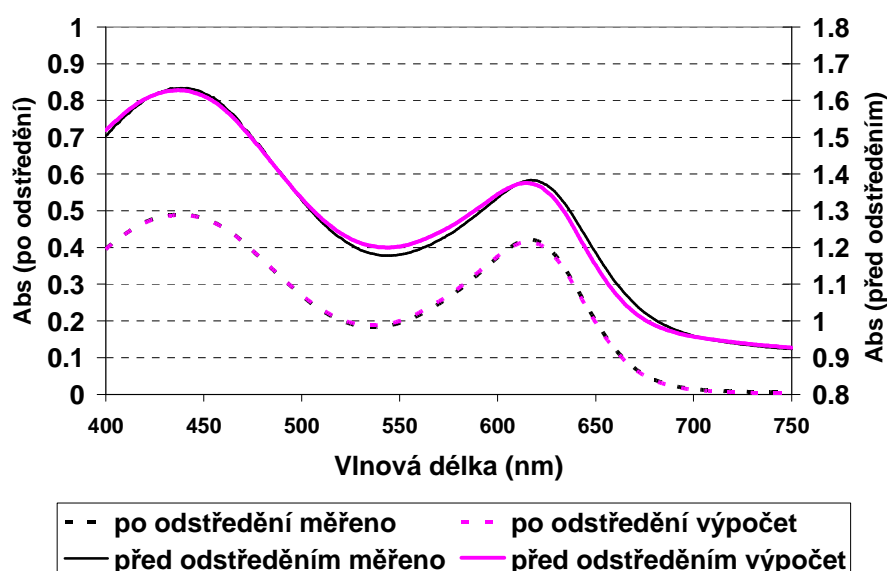


Obr.5.67 - Porovnání průběhu acidifikace v průběhu AP testu, provedeného za standardních podmínek na stejném vzorku s přídavkem a bez přídavku pH indikátoru BCG s cílovou koncentrací 0,003%

5.7.9 Interakce BCG s kvasnicemi

Interakci BCG s kvasnicemi jsme zkoumali následujícím pokusem. Do 100 ml 10 mM fosfátového pufru s pH = 5,00 jsme přidali 300 µl 1% BCG (cílová koncentrace 0,003%). pH roztoku se nezměnilo. Změřili jsme absorpční spektrum BCG roztoku, které jsme dále brali jako referenční. Do roztoku jsme přidali 9 g promytých kvasnic a udržovali kvasnice ve vznosu konstantním mícháním při pokojové teplotě (koncentrace kvasnic odpovídá saturační koncentraci při AP testu). pH roztoku se opět neměnilo. Každou hodinu jsme odebrali 5 ml vzorku, odstředili na centrifuze na 3000 otáčkách po dobu 20 minut a změřili spektrum supernatantu. Kontrola hodnot absorpance na 750 nm (absorbance < 0,01) potvrdila dostatečné odstředění kvasinek z roztoku. Po 12 hodinách průběhu testu byl maximální pokles absorpance odstředěného vzorku vzhledem k referenčnímu spektru menší než 0,015 a menší než 1% hodnoty. Pokud kvasinky neacidifikují, BCG do nich téměř neproniká, ani se neváže na jejich povrch.

Abychom ověřili interakci BCG s kvasinkami během acidifikace, provedli jsme modifikaci předchozího experimentu. Jako referenční roztok bylo použito 100 ml destilované vody s 300 µl 1% BCG s 10 ml 50% glukózy. pH tohoto roztoku bylo 4,65. Do roztoku jsme přidali 9 g promytých kvasnic, spustili míchání (koncentrace kvasnic odpovídá saturační koncentraci při AP testu) a udržovali na teplotě standardního AP $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Po přidání kvasinek nastala rychlá acidifikace substrátu a pH suspenze začalo rychle klesat. Po 20 a 30 minutách acidifikace jsme odebrali 5 ml vzorku, odstředili na centrifuze při 3000 otáčkách po dobu 20 minut a změřili spektrum supernatantu. Kontrola hodnot absorpance na 750 nm (absorbance < 0,01) potvrdila dostatečné odstředění kvasinek z roztoku. Vzhledem k poklesu pH během acidifikace jsme nemohli porovnávat spektrum supernatantů s referenčním spektrem roztoku před přidáním kvasnic přímo, ale rozložili jsme spektrum do báze acidické a bazické formy a porovnávali jsme součet koeficientů zastoupení obou forem ve spektru ($al + ac$ v rovnici 3.27). Zároveň jsme porovnávali hodnotu absorpance v isobestickém bodě na vlnové délce 511 nm, která je u odstředěných vzorků bez buněk úměrná koncentraci BCG.



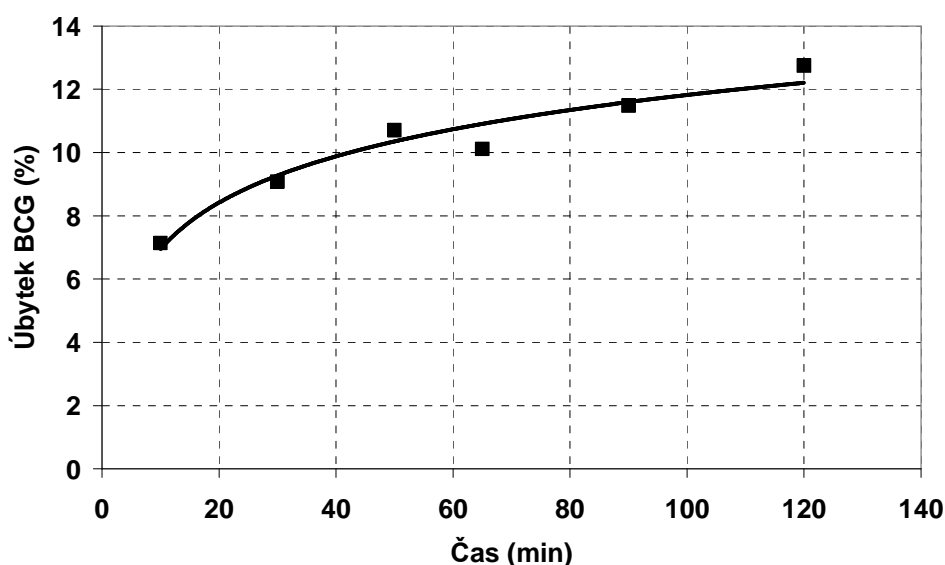
Obr.5.68 - Porovnání absorpčních spekter naměřených na vzorku kvasnic s BCG (0,001%) během AP testu před a po odstředění kvasnic (černá - měřená spektra) se spektry vypočtenými (ružová) jako optimální součet spekter báze tvořené spektrem kvasnic a spektry acidické a bazické formy BCG

Během acidifikace prostředí dochází k interakci BCG s buňkami. Po 20 minutách acidifikace a odstředění kvasnic zůstalo v roztoku pouze 70% původního BCG, po 30 minutách pouze 60% BCG. Na interakci BCG s kvasnicemi je možné usuzovat i ze změn spektra během AP

testu s BCG. V grafu na obr.5.68 je zobrazeno porovnání spektra naměřeného na vzorku během testu se spektrem vypočteným složením spekter obou forem BCG a kvasnic před a po jejich odstředění. U spekter naměřených před odstředěním kvasnic je zřejmý posun maxima bazické složky BCG z 617 nm na 619 nm. Po odstředění kvasnic zůstalo ve vzorku volné BCG, naměřené i vypočtené spektrum má maximum při 617 nm.

Provedli jsme sadu pokusů s různými navážkami kvasnic. Množství BCG, které je odstředěno z roztoku s kvasnicemi, roste s koncentrací buněk a s dobou acidifikace a mění se i vzorek od vzorku v řádu procent.

Typický průběh snižování koncentrace volného BCG v závislosti na průběhu acidifikace je zobrazen na obr.5.69. Připravili jsme vzorek s maximální koncentrací kvasnic, u které nedochází k deformaci spekter (viz kap.5.7.7 - Optimalizace koncentrace kvasnic - 0,4 g kvasnic na 100 ml vzorku) a koncentrací BCG 0,001 %.



Obr. 5.69 - Úbytek volného BCG ve vzorku během AP testu

Po dvou hodinách acidifikace dosáhlo pH hodnoty 3,80. Po odstředění zůstalo ve vzorku 88% původního BCG. Dalším měřením byl potvrzen trend poklesu koncentrace volného BCG rychlostí 2 % za hodinu. Pokles koncentrace BCG během AP testu je natolik velký, že znemožňuje použití metody měření změn absorpance pH indikátoru na jedné vlnové délce. Ke korekci naměřených hodnot na úbytek BCG je nutná kontrola měřením absorpance na vlnové délce isobestického bodu BCG – 511 nm.

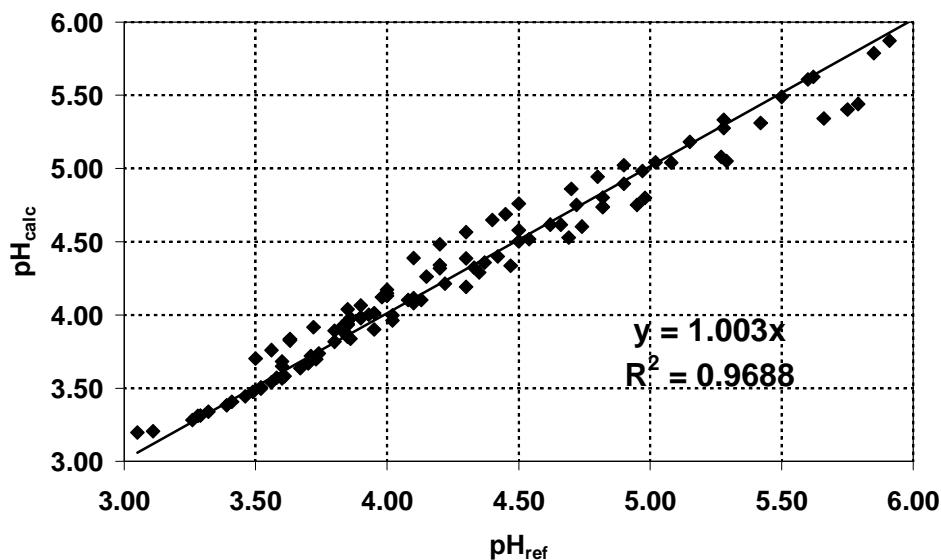
5.7.10 Srovnání výsledků optického a elektrochemického měření AP testu

Byla provedena sada současných měření APT na YATA aparatuře s referenční pH elektrodou a spektroskopicky v průtokové cele s optickou dráhou 1 cm. Naměřená spektra byla zpracována metodou popsanou v teoretické části v kapitole 3.3.5.2. Z koeficientu R byly pomocí rovnice 5.7 vypočteny hodnoty pH označené jako pH_{calc} . Na obr.5.70 je vyneseno srovnání referenčních hodnot pH s hodnotami pH_{calc} určenými spektroskopicky.

Z grafu je patrné, že hodnoty pH_{ref} měřené referenční elektrodou a pH_{calc} vypočtené výrazně korelují s koeficientem 0,98 a se střední odchylkou hodnot pH 0,12. Odchylky naměřených a vypočtených hodnot pH, které jsou vyšší, než jsme předpokládali, jsou způsobeny:

- chybou hodnot naměřených pH sondou při nízké iontové síle roztoku,

- závislostí hodnot naměřených pH sondou na rychlosti a způsobu míchání vzorku,
- závislostí pK hodnoty barevného indikátoru BCG na iontové síle roztoku.



Obr.5.70 - Srovnání referenčních hodnot pH_{ref} měřených pH metrem s hodnotami pH_{calc} vypočtenými z absorpčních spekter během AP testu

5.7.11 Shrnutí

Měření potvrdila možnost optického měření změn pH při AP testu kvasnic po přidavku barevného pH indikátoru BCG. Navržený postup zpracování absorpčních spekter umožňuje měření pH nezávisle na koncentraci BCG v rozsahu do 0,003 % w/v a na koncentraci kvasnic v rozsahu od 0 do 3g/l pro námi použitý kmen kvasnic. Nezávislost vypočtených hodnot pH na koncentraci BCG kompenzuje i námi pozorovaný částečný úbytek volného pH indikátoru ze vzorku během testu.

Výhodou přímého rozpuštění pH indikátoru v měřeném roztoku je vysoká rychlost reakce indikátoru na změny pH, avšak hlavním omezujícím faktorem pro výběr koncentrace kvasnic je při tomto měření deformace naměřených absorpčních spekter v důsledku vícenásobného rozptylu při vyšších koncentracích kvasnic. Tento problém by mohl být odstraněn při měření spekter v difusně rozptylovém uspořádání nebo imobilizací barevného indikátoru např. ve vrstvě polymeru, který se vystaví působení vzorku (Makote [68]).

Při vhodně navrženém uspořádání optického měření s imobilizovaným indikátorem pH je možné odstranit závislost naměřených hodnot na koncentraci rozptylujících částic a provádět AP test s řádově vyššími koncentracemi kvasnic.

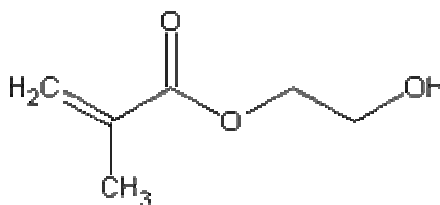
Jedním z cílů předložené práce bylo najít technické parametry pro specializovaný nízkonákladový optický přístroj, který by umožnil ekonomické a rychlé provádění AP testů. Navrhované rozložení absorpčních spekter do spekter báze, tvořené třemi spektry, je možné použít i pro spektra naměřená pouze na 3 vlnových délkách (pásech). Vzhledem k použitému pH indikátoru BCG je ideální použít 1 vlnovou délku okolo 450 nm v modré části spektra, 1 vlnovou délku okolo 515 nm v zelené části spektra a 1 vlnovou délku okolo 620 nm v červené části spektra. V modré a červené části spektra se absorpční spektra obou forem BCG maximálně liší s obráceným znaménkem, v zelené části spektra jsou téměř totožné (isobestický bod). Spektrum kvasnic je na všech 3 vlnových délkách téměř konstantní a liší se výrazně od obou forem BCG. Numerickým výpočtem s výběrem pouze těchto 3 vlnových délek z kompletních naměřených spekter jsme obdrželi výsledky totožné s výpočtem prováděným na celých spekt-

rech. K vybudování aparatury pro měření AP testu podle navrhovaného způsobu by bylo možné použít komerčně dostupný RGB LED světelný zdroj, k detekci RGB pak kameru.

5.8 SENZOR PRO OPTICKOU BEZKONTAKTNÍ DETEKCI VITALITY KVASNIC

Na základě výsledků získaných při optickém měření acidifikačního testu s pH indikátorem BCG volně rozpuštěným ve vzorku jsme přistoupili k vývoji senzoru detekujícího změny pH s pH indikátorem imobilizovaným mimo vzorek. pH indikátor byl imobilizovaný ve vrstvě polymerního materiálu, který byl vystaven působení vzorku. Ve spolupráci s Ing. Michálkem, Ing. Přádným z ÚMCH Akademie věd ČR a s Ing. Rychtárikovou z Ústavu chemických procesů AV ČR byly připraveny vzorky makroporézního síťovaného polymeru vytvořeného z monomeru 2-hydroxyethyl methakrylátu (Hema) s imobilizovaným pH indikátorem BCG (Přádný [87]).

Vzorky Hema polymeru byly připraveny polymerací monomeru 2-hydroxyethyl methakrylátu $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ za přítomnosti pH indikátoru (viz strukturní vzorec na obr.5.71). Jedná se o hydrofilní polymer, který je hojně využíván ve výrobě kontaktních čoček. Byly připraveny vzorky s různou pórovitostí, velikostí pórů a různým obsahem BCG.



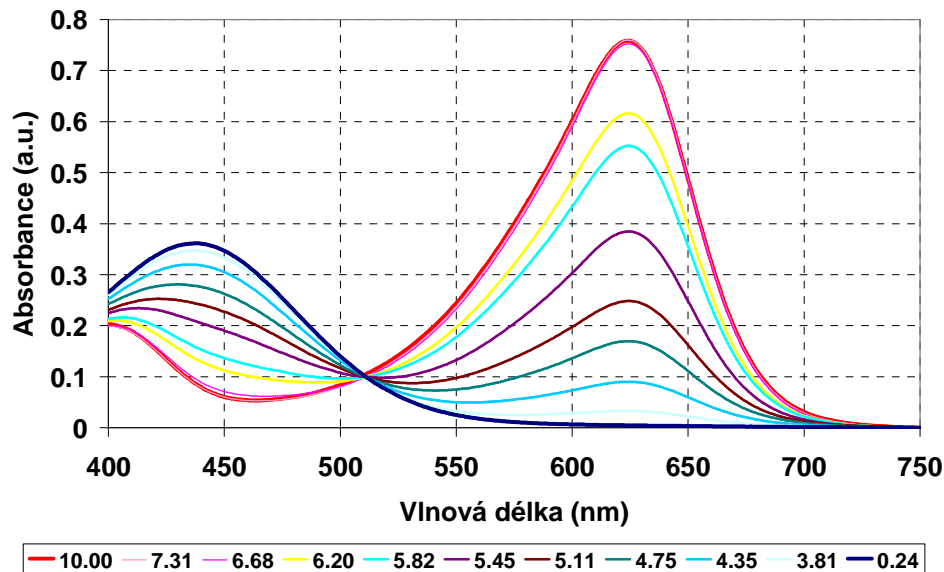
Obr.5.71 - Strukturní schéma monomeru 2-hydroxyethyl methakrylátu

Na připravených vzorcích byla proměřena absorpční spektra v závislosti na pH. Naměřená spektra byla měřena v transmisním módu a jsou zobrazena na obr.5.72. Vzorek polymeru byl připevněn v kyvetě v 10 mM roztoku fosfátového pufru, pH bylo upravováno přidávkem 0,1 M roztoku HCL a NaOH. Po změně pH roztoku jsme ponechali vzorek 30 minut za stálého míchání, aby došlo k ustálení barvy vzorku před měřením. Reference byla měřena na roztoku pufru bez polymeru.

Absorpční spektra mají podobný tvar jako spektra volného BCG (viz obr.5.61). Polohy absorpčních maxim jsou nepatrně posunuty proti spektru volného BCG. Absorpční maximum acidické formy BCG je na vlnové délce 435 nm (absorpční maximum volného BCG je na vlnové délce 445 nm), absorpční spektrum basické formy BCG je na vlnové délce 625 nm (absorpční maximum volného BCG je na vlnové délce 617 nm).

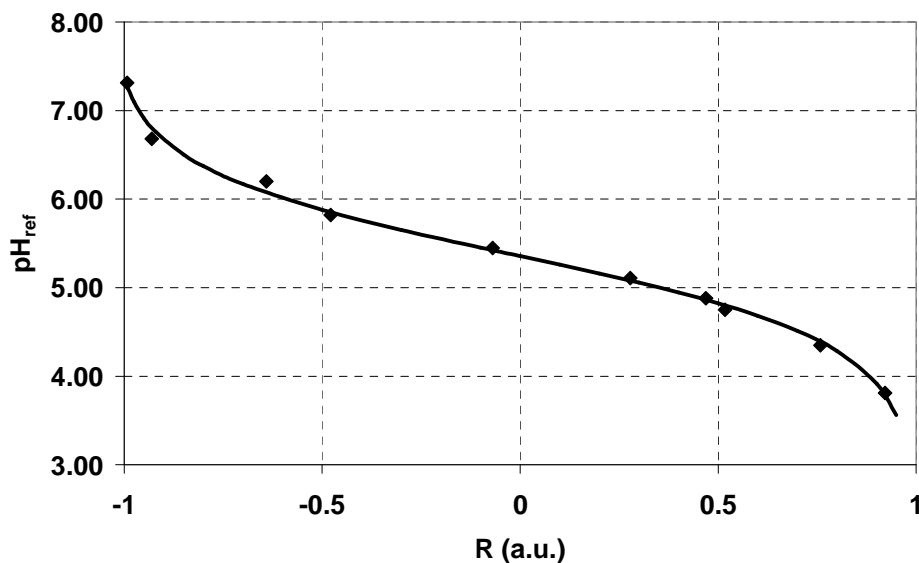
Spektra byla vyhodnocena stejným způsobem, jako absorpční spektra volného BCG. Jako spektra báze byla použita spektra acidické a basické formy BCG (naměřená na vzorku při pH = 0,2 a pH = 12). Jako třetí spektrum báze bylo použito jednotkové spektrum s hodnotou absorpce = 1 pro všechny vlnové délky. Z koeficientů zastoupení složek BCG ve spektru byl vypočten koeficient R podle rovnice 3.28.

Na obr.5.73 je vynesena závislost koeficientu R na pH_{ref} , měřeném referenční pH elektrodou. Naměřenými body byla proložena křivka podle rovnice 5.7. Proložená křivka má parametry $P1 = 5,34 \pm 0,04$, $P2 = 1,13 \pm 0,08$, $P3 = 1,00 \pm 0,03$, $P4 = 1,03 \pm 0,02$. Z proložené křivky dostáváme hodnotu $\text{pK} = 5,34$. Hodnota pK je posunuta o 0,64 ve srovnání s hodnotou $\text{pK} = 4,7$ volného BCG. Posunutí pK posunuje i měřicí rozsah pH indikátoru k vyšším hodnotám pH. Zároveň s posunem hodnoty pK vzrostla i hodnota parametru P2 z 0,85 na hodnotu 1,13.



Obr.5.72 - Absorpční spektra vzorku polymeru HEMA s imobilizovanou BCG. Měřeno v 10 mM fosfátovém pufru při různém pH v 1 cm skleněné kyvetě (reference - roztok pufru bez polymeru) na spektrofotometru Specord.

Nárůst parametru P2 znamená rozšíření měřicí oblasti pH. Pokud budeme uvažovat možnost měření pH s akceptovatelnou chybou v rozsahu koeficientu R od $-0,95$ do $+0,95$, umožňuje imobilizované BCG detekovat změnu pH v rozsahu od 3,56 do 6,91, pro volné BCG vychází rozsah pH od 3,36 do 5,79.



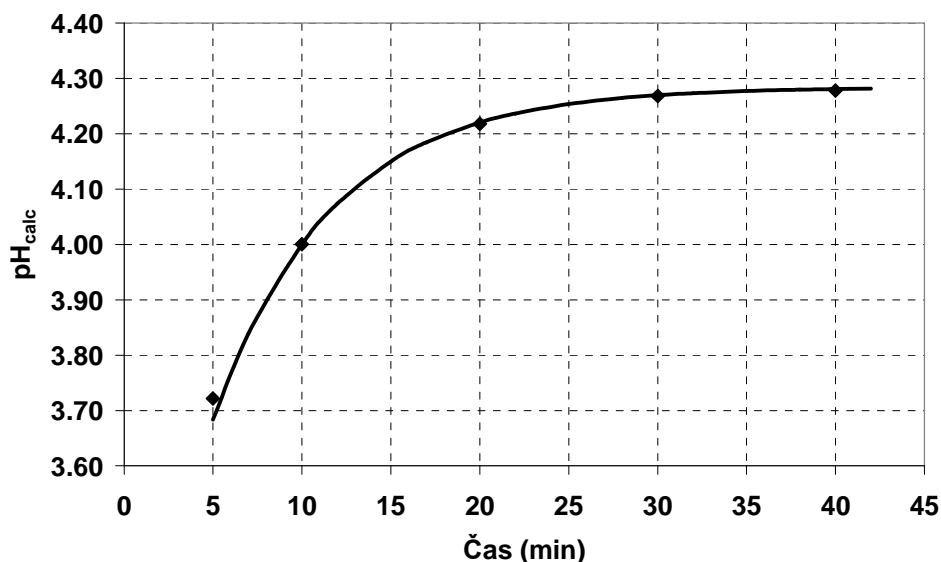
Obr.5.73 - Vzájemná závislost koeficientu R vypočteného z absorpčních spekter a pH_{ref} měřeného referenčním pH metrem. Hodnoty byly naměřeny na vzorku polymeru HEMA s imobilizovanou BCG, měřeno v 10 mM fosfátovém pufru.

Abychom ověřili rychlost odezvy senzoru na změny pH, provedli jsme následující měření. Senzor byl umístěn v roztoku 10 mM fosfátového pufru s $\text{pH} = 0,24$. Ve spektrofotometru byla umístěna kyveta s roztokem 10 mM fosfátového pufru s $\text{pH} = 4,30$. Vzorek byl přenesen do roztoku o $\text{pH} = 4,30$, spuštěno míchání a odstartován odečet času. V pravidelných intervalech bylo změřeno spektrum vzorku. Ze změřených absorpčních spekter byly vypočteny hodnoty pH_{calc} podle rovnice 5.7.

Na obr.5.74 je vynesena časová závislost vypočtené hodnoty pH_{calc} na době od umístění vzorku do kyvety. Naměřenými hodnotami byla proložena křivka. Hodnota pH_{calc} se blíží ke skutečné hodnotě pH roztoku po exponenciální křivce podle rovnice

$$pH_{calc} = 3.01 + 0.28 \times (1 - e^{-0.15t}) \quad (5.8)$$

kde t je čas od začátku měření. K ustálení hodnoty pH_{calc} při skokové změně pH roztoku z 3,0 na 4,30 dochází až za 25 minut.



Obr.5.74 - Časový vývoj odezvy senzoru na skokovou změnu pH

Měření provedená na vzorcích polymeru HEMA s imobilizovaným pH indikátorem BCG prokázala, že připravený senzor je použitelný pro bezkontaktní měření změn pH roztoků během acidifikačního testu. Vzhledem k pomalé rychlosti odezvy senzoru je nutné nastavit parametry testu (nízká koncentrace buněk) tak, aby acidifikace vzorku probíhala v řádu desítek minut až hodin.

6 ZÁVĚR

V předkládané práci je popisován vývoj a optimalizace optických metod pro kontrolu fermentačních procesů a koloidní stability finálního produktu. Ve spolupráci s Doc. Ing. P. Sladkým a RNDr. M. Dienstbierem byla navržena a realizována měřicí aparatura DATTS 2000 (Dual angle turbidimetric and titrimetric system). Optická měřicí komora aparatury je chráněna patentem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR č.299354 ze dne 21.5.2008. Základem modulární aparatury je dvouúhlový zákaloměr MZN 2002, který měří intenzitu elasticky rozptýleného světla pod dvěma úhly. Původní modulární aparatura umožňuje provádění a vyhodnocování širokého spektra metod v různých režimech měření.

Část této práce se zabývá aplikací nefelometrických titračních testů na aparaturu DATTS 2000. Měření rozptylu pod dvěma úhly umožnilo získání nových poznatků o charakteru precipitačních reakcí probíhajících během testů. Optimalizací podmínek provedení testů bylo dosaženo maximální reprodukovatelnosti měření. Byla navržena modifikace testu na obsah tanoidů, která umožnila jeho využití i pro hluboce stabilizovaná piva s nízkým obsahem zákalotvorných polyfenolů. Automatické vyhodnocení testu proložení křivkou Gaussova typu zpřesnilo získané výsledky. Pro test na obsah citlivých proteinů byl navržen způsob dávkování titrantu a vyhodnocení testu, který zvyšuje jeho reprodukovatelnost a přibližuje průběh testu skutečným podmínkám ve vzorku během stárnutí. Využitelnost testu pro předpověď koloidní stability piva byla ověřena na sadě vzorků vybraného typu piva s různým obsahem zákalotvorných proteinů a polyfenolů, získaných rozdílným stupněm stabilizace.

Modulárnost aparatury DATTS 2000 byla využita při řešení problémů kontroly a standardizace fermentačních procesů. Za tím účelem byly na aparatuře aplikovány metody měření sedimentace kvasnic a acidifikační test vitality kvasnic (AP test).

Metodu měření sedimentační rychlosti kvasnic lze využít pro charakterizaci distribuce velikostí kvasničné populace. Distribuce velikostí kvasnic je v přímém vztahu ke stáří populace. Byla navržena metoda kalibrace a automatického vyhodnocení testu proložení naměřené sedimentační křivky teoretickou křivkou sigmoidálního typu. Získané parametry sigmoidální křivky charakterizují střední velikost a pološířku distribuce velikostí kvasnic ve vzorku. Výsledky sedimentačních měření byly ověřeny srovnáním s výsledky získanými měřeními histogramu velikostí kvasnic pod mikroskopem.

V rámci acidifikačního testu vitality kvasnic (AP testu), zavedeného K.Siglerem, byla provedena jeho optimalizace na vzorcích pivovarských kvasnic kmene 95, který je nejčastěji používaným kmenem pro výrobu piva typu Pilsener v českých pivovarech. Použitelnost AP testu pro předpověď průběhu fermentace byla ověřena srovnáním s výsledky průběhu provozního kvašení v CKT. K získání větší citlivosti testu pro velmi vitální kvasnice byl navržen a otestován titrační acidifikační test (TAP).

Byla navržena a otestována metoda optické detekce AP testu s použitím barevného pH indikátoru, citlivého ke změnám pH v celém rozsahu měření AP testu. Tato metoda umožňuje současné měření více vzorků a rozšiřuje tím použitelnost testu v podmínkách provozních laboratoří. Dalším krokem byla příprava polymerní matrice s imobilizovaným pH indikátorem, která by se mohla stát aktivním prvkem optického senzoru, vhodného k měření AP testu. I přes pomalou reakční rychlost byla ověřena použitelnost senzoru při vhodném nastavení parametrů testu.

7 PŘÍNOS

Z předložené studie „Optické metody kontroly fermentačních procesů a hodnocení kvality jejich produkce“ vplynuly tyto hlavní přínosy autora:

- Spoluúčast na vývoji, konstrukci a realizaci měřicí aparatury DATTS 2000 (Dual angle turbidimetric and titrimetric system), která je chráněna patentem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR č.299354 ze dne 21.5.2008. Původní modulární aparatura umožňuje provádění a vyhodnocování širokého spektra metod v různých režimech měření.
- Tvorba původního softwarového programu MZN CONTROL, speciálně vytvořeného pro ovládání DATTS 2000, který dovoluje současné připojení a řízení několika typů externích modulů (např. dávkovací pumpy, elektrochemických detektorů apod.), provádění a vyhodnocování testů metodou lineární regrese s minimem kvadratických odchylek.
- Spoluúčast na zkonstruování aparatury YATA pro měření AP testů, která je modifikací aparatury DATTS.
- Spoluúčast na aplikaci a optimalizaci nefelometrických titračních testů předpovědi koloidní stability piva na aparaturu DATTS 2000.
- Spoluúčast na modifikaci nefelometrického titračního testu na obsah tanoidů, která umožnila jeho využití i pro hluboce stabilizovaná piva s nízkým obsahem zákalotvorných polyfenolů. Automatizace vyhodnocení výsledku testu proložením křivkou Gaussova typu.
- Návrh úpravy způsobu dávkování titrantu a vyhodnocení testu na obsah citlivých proteinů, který zvyšuje reprodukovatelnost testu a přibližuje průběh testu skutečným podmínkám ve vzorku během stárnutí.
- Ověření využitelnosti testů pro předpověď koloidní stability piva na modelové sadě vzorků jednoho typu piva s různým obsahem zákalotvorných proteinů a polyfenolů, získaných rozdílným stupněm stabilizace.
- Aplikace metody měření rychlosti sedimentace kvasnic na aparaturu DATTS 2000. Zavedení kalibrační procedury pomocí kalibračního roztoku kulových částic silikagelu Biospher PSI od firmy Labio Ltd. Praha. Návrh vyhodnocování naměřených hodnot prokládáním křivkou sigmoidálního typu.
- Aplikace acidifikačního testu vitality kvasnic (AP testu) na aparatuře YATA. Optimalizace testu na vzorcích pivovarských kvasnic kmene 95, který je nejčastěji používaným kmenem pro výrobu piva typu Pilsener v českých pivovarech. Ověření testu srovnáním s výsledky průběhu provozního kvašení v CKT.
- Aplikace metody titračního acidifikačního testu (TAP test) na aparatuře YATA, umožňující získání větší citlivosti AP testu pro velmi vitální kvasnice.
- Návrh a ověření metody optické detekce AP testu s použitím barevného pH indikátoru (BCG), citlivého ke změnám pH v celém rozsahu měření AP testu.
- Spoluúčast na přípravě polymerní matrice s imobilizovaným indikátorem pH jako potenciálním aktivním prvkem optického senzoru, vhodného k měření AP testu. Proměření základních parametrů matrice.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ASBC	American Society of Brewing Chemists
BCG	Bromocresolgreen – pH indikátor
CKT	Cylindrokonický tank
DATTS	Dual angle turbidimetric and titrimetric system
EBC	European Brewery Convention – Expertní technická organizace pro kooperaci a spojené aktivity evropských pivovarníků a sladařů – zároveň i jednotky zákalu a barvy zavedené touto organizací
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid – chelační agent
HEMA	2-hydroxyethyl methakrylátu
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision
NRW	typ pivní láhve
PLS	Partial Least Squares – metoda regresní analýzy dat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
SASPL	Práh srážení síranem amonným (Saturated Ammonium Sulphate solution Precipitation Limit) v ml/10ml vzorku
SASS	Nasyčený roztok síranu amonného (Saturated Ammonium Sulphate Solution)
SD	(Standard deviation) Standardní odchylka
SP	výsledek testu na obsah citlivých proteinů (Sensitive Proteins) v jednotkách EBC zákalu
T2	Doba tepelného šokování vzorku potřebná k dosažení hranice nefelometrického chladového zákalu 2 EBC
Z90	Nefelometrický zákal (měřen pod úhlem 90o)
Z12	Dopředný zákal (měřen pod úhlem 12o)
pK	disociační konstanta
R	Bezrozměrný koeficient definovaný rovnicí 3.28, udávající poměrné zastoupení spekter basické a acidické složky pH indikátoru v celkovém spektru

9 LITERATURA

1. American Society of Brewing Chemists (ASBC): Methods of analysis, 9th ed. Beer – 11, Protein, The Society, St.Paul, MN, 1992
2. American Society of Brewing Chemists (ASBC): Methods of analysis, 9th ed. Beer – 27, Physical stability, The Society, St.Paul, MN, 1992
3. American Society of Brewing Chemists (ASBC): Methods of analysis, 9th ed. Beer – 35, Total polyphenols, The Society, St.Paul, MN, 1992
4. Amesz, J., Duysens, N.M., Brandt, D.C.: Methods for measuring and correcting the absorption spectrum of scattering suspensions. *J. Theor. Biol.* 1, 1961, 59-74
5. Analytica EBC (European Brewery Convention) : Brauerei und Getränke - Rundschau, Method 9.11, Total Polyphenols, Verlag Hans Carl, 5th edition, 1997
6. Analytica EBC (European Brewery Convention) : Brauerei und Getränke - Rundschau, Method 9.29, Haze in Beer: Calibration of Haze Meters, Verlag Hans Carl, 5th edition, 1997
7. Analytica EBC (European Brewery Convention): Brauerei und Getränke - Rundschau, Method 9.30, Prediction of Shelf-Life of Beer, Verlag Hans Carl, 5th edition, 1997
8. Analytica EBC (European Brewery Convention): Brauerei und Getränke - Rundschau, Method 9.40, Sensitive proteins in Beer, Verlag Hans Carl, 5th edition, 1997
9. Analytica EBC (European Brewery Convention): Brauerei und Getränke - Rundschau, Method 9.41, Alcohol Chill Haze in Beer, Verlag Hans Carl, 5th edition, 1997
10. Arakawa, T., Timasheff, S. N.: Theory of protein solubility , *Methods Enzymol.* 114, 1985, 49 - 77
11. Asano, K., Hashimoto, N.: Isolation and characterization of foaming proteins of beer, *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.* 23, 1980, 1 – 13
12. Asano, K., Shinagawa, K. and Hasimoto, N., Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 40(4), 1982, 147–154
13. Bamforth, Ch. W.,Muller, R.E., Walker, M.D.: Oxygen and Oxygen Radicals in Malting and Brewing: A Review, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 51, 1993, 79 – 87
14. Bamforth, Ch. W. : Beer haze, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57, 1999, 81 – 90
15. Bamforth, Ch. W. : pH in Brewing: An Overview, *MBAA Technical Quarterly* 38, 2001, 1-9
16. Basařová G., Čepička J.: Sladařství a pivovarství. VŠCHT, Praha 1986
17. Batchvarov, V., Chapon, L.: Vorausbestimmung der Kolloiden Bierhaltbarkeit, *Monatschr. Brauwiss.* 38, 1985, 331 - 342
18. Brož, J., Roskovec, V., Valouch, M. 1980: Fyzikální a matematické tabulky. SNTL,Praha
19. Buggery, L.A.: A review of polyphenolic antioxidants in hops, brewing and beer, *The Brewer International*, april 2001

20. Callemien, D., Collin, S.: Polyphenol and colour stability through beer aging, European Brewery Convention, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, 95, 2007, 853-859
21. Cunningham S. and Stewart G.G., Effects of high-gravity brewing and acid washing on brewer's yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 56(1), 1998, 12-18
22. Čepička, J., Karabín, M.: Polyfenolové látky piva – Přirozené antioxidanty, *Chem. Listy* 96, 2002, 90-95
23. Egilmez, N.K, Chen, J.B. and Jazwinski, S.M.: Preparation and Partial Characterization of Old Yeast Cells, *Journal of Gerontology*, 45(1), 1990, B9-17
24. Evans, D. E., Hejgaard, J.: The impact of malt derived proteins on beer foam quality, Part I: The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1, *J. Inst. Brew.* 105, 1999, 159 - 169
25. Fabelinskij, I. M.: Molecular scattering of light, Plenum Press, New York, 1968
26. Frank I.E., Freidman J.H.: A statistical view of some chemometrics regression tools. *Technometrics* 35(2), 1993, 109-148
27. Freitas, V., Mateus, N.: Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins, *J. Agric. Food Chem.* 49, 2001, 940-945
28. Gabriel, P., Dienstbier, M., Černý, L., Sladký, P.: The use of two angle turbidimeter for the differentiation of some haze-forming particles, *Kvasny Prum.* 40, 1994, 203-207
29. Gabriel, P., Dienstbier, M., Matoulková, D., Kosař, K., Sigler, K.: Optimized Acidification Power Test of Yeast Vitality and its Use in Brewing Practice, *J. Inst. Brew.* 114, 2008, 270-276
30. Gabriel, P., Dienstbier, M., Sladký, P., Sigler, K.: A New Method of Optical Detection of Yeast Acidification Power, *Folia Microbiol.* 53(6), 2008, 527-533
31. Gatto E., Peddie F. and Andrews S., Acidification power: performance evaluation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Australia*, 45(3), 1993, 124-128
32. Green, A. A., Hughes, W. L.: Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic systems, *Methods Enzymol.* 1, 1955, 67 - 90
33. Hagerman, A.E., Butler, G.: The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interaction, *The Journal of Biological Chemistry* 256, 1981, 4494 - 4497
34. Hagerman, A.E., Rice, M.E., Ritchard, N.T.: Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin, Catechin, *J. Agric. Food Chemistry* 46, 1998, 2590-2596
35. Hagerman, A.E.: Tannin Chemistry, <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>
36. Hlaváček, F., Lhotský, A.: Pivovarství, SNTL - Tech. Lit. Publishing, Praha, 1966
37. Hollemans, S. M., Tonies, A. R. J. M.: The role of specific proteins in beer foam, *Proc. Eur. Brew. Conv. 22nd Cong.*, Zurich, 1989, 561 - 568
38. Hough, J. S.: The biotechnology of malting and brewing, Second edition, Cambridge University Press, 1991
39. Chapon, L.: Der Begriff Tannoide, *Monatschr. Brauwiss.* 46, 1993, 263 - 279
40. Chapon, L.: Nephelometry as a method for studying the relation between polyphenols and proteins, *J. Inst. Brew.* 99, 1993, 49 - 56

41. Chapon, L.: Der Begriff Eiweißempfindlichkeit der Biere. Der heutige Stand der Forschung, Teil 1: Fällung der Bierweiß Stoffe durch Tannine, Heft 9/10, Monatschr. Brauwiss. , 1995, 300 - 309
42. Chapon, L.: Der Begriff Eiweißempfindlichkeit der Biere. Der heutige Stand der Forschung, Teil 2: P/T Wechselwirkung – Allgemeinr, Heft 1/2, Monatschr. Brauwiss. , 1996, 12 - 18
43. Chapon, L.: Der Begriff Eiweißempfindlichkeit der Biere. Der heutige Stand der Forschung, Teil 3: Auswertungversuch, Heft 3/4, Monatschr. Brauwiss., 1996, 111 - 114
44. Chollot, B., Chapon, L., Urion, E.:Proceedings EBC Congress. Wien 1961, 334
45. Imai, T., Nakajima, I., Toshihiko, O.: Development of A new Method for Evaluation of Yeast Vitality by measuring Intracellular pH, J. Am. Soc. Brew. Chem. 52(1), 1994, 5-8
46. Imai, T.: The assessment of yeast vitality – the past and the future, Brewer´s Guardian, 128, 1999,
47. IOB Methods of Analyses (The Institute of Brewing): 9.5 – Haze in Beer, The Institute of Brewing, London, Jan. 1997
48. IOB Methods of Analyses (The Institute of Brewing): 9.36 – Accelerated ageing test for beer, The Institute of Brewing, London, Jan. 1997
49. IOB Methods of Analyses (The Institute of Brewing): 9.37 – Sensitive protein in beer, The Institute of Brewing, London, Jan. 1997
50. IOB Methods of Analyses (The Institute of Brewing): 9.38 – Alcohol Chill Haze in beer, The Institute of Brewing, London, Jan. 1997
51. IOB Methods of Analyses (The Institute of Brewing): 9.39 – Saturated ammonium sulphate precipitation limit (SASPL) of beer, The Institute of Brewing, London, Jan. 1997
52. Iserentant, D., Geenens, W., Verachtert, H.: Titrated Acidification Power: A Simple and Sensitive Method to Measure Yeast Vitality and Its Relation to Other Vitality Measurements, J. Am. Soc. Brew. Chem. 54(2), 1996, 110 - 114
53. Jenkins, W. T.: Three solutions of the protein solubility problem, Protein Science 7, 1998, 376 - 382
54. Kano, Y., Kanimura, M.: Simple methods for determinations of the molecular weight distribution of beer proteins and their application to foam and haze studies, J. Am. Soc. Brew. Chem. 51, 1993, 22 - 28
55. Kara, B.V., Simpson, W.M., Hammond, R.M.: Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test, J. Inst. Brew., 94, 1988, 153-158
56. Kawamoto, H., Nakatsubo, F., Murakami, K.: Stoichiometric study of Tannin-Protein co-precipitation, Phytochemistry, 41, 1996, 1427 - 1431
57. Kerker, M.: The scattering of light and other electromagnetic radiation, Academic Press, New York - London, 1969
58. Kodedová, M.: Studium sedimentace a flokulace vybraných kmenů kvasnic metodami komplexní turbidimetrické analýzy, Diplomová práce MFF UK Praha, 2006
59. Kosař, K. a kol.: Technologie výroby sladu a piva, publikace č.11 VÚPS, 2000

60. Laun, P., Pichova, A.: Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis, *Molecular Biology*, 39(5), 2001, 1166-1173
61. Leemans Ch., Pellaud J., Mélotte L., Dupire S., Opportunities for Lag Phase Prediction: a New Tool to Assess Beer Colloidal Stability, *Proc. Europ. Brew. Conv., 29th Congress Dublin*, 2003, 88/1-88/11
62. Leiper, K.A., Duszanskyj, R., Steward, G.G.: Premixing of Isinglass and Silica Gel to Obtain Improved Beer Stability, *J. Inst. Brew.* 108(1), 2002, 28-31
63. Leiper, K.A., Steward, G.G., McKeown, I.P.: Beer Polypeptides and Silica Gel, *J. Inst. Brew.* 109(1), 2003, 57-72
64. Leiper, K.A., Steward, G.G., McKeown, I.P., Nock, T., Thompson, M.: Optimising Beer Stabilisation by selective Removal of Tannoids and Sensitive Proteins, *J. Inst. Brew.* 111(2), 2005, 118-127
65. Leitzement, M., Dodds, J. A., Leclerc, D., Lenoel, M., Moll, M.: Hydrodynamic chromatography. A method for submicron particle sizing applied to beverages, *Proc. Eur. Brew. Conv. 20th Cong., Helsinki*, 1985, 475 - 482
66. Lin, H.CH., Chen, P.Ch., Cheng, T.J., Chen, L.C.: Formation of tannin-albumin nanoparticles at neutral pH as measured by light scattering techniques, *Analytical Biochemistry* 325, 2004, 117-120
67. Lusk, L. T., Goldstein, H., Ryder, D.: Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53, 1995, 93 - 103
68. Makote R., Collinsin M.M.: Organically modified silicate films for stable pH sensors. *Anal. Chim. Acta* 394, 1999, 195-200
69. Malfeito-Ferreira M., Guerra J.P.M. and Loureiro V., Proton extrusion as indicator of the adaptive state of yeast starters for the continuous production of sparkling wines. *Am. J. Enol. Viticult.*, 41(3), 1990, 219-222
70. McFarlane, W.D.: *Proc. Master Brewers Association American Convention*, 1964
71. McFarlane, W.D.: The haze problem - its solution through fundamental research, *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 35, 1998, 108
72. McMurrough, I.: Colloidal Stabilisation of Beer, *Ferment* 8, 1995, 39-45
73. McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R.J.: The Role of Polyphenols in Beer Stability, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 1996, 141-148
74. McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R.J.: Evaluation of Rapid Colloidal Stabilisation with Polyvinylpyrrolidone (PVPP), *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55, 1997, 38 - 43
75. MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission): Brautechnische Analysen Methoden, Band II, 2.15 Trübungsneigung (Eiweißstabilität), 4. Aufgabe, Ed. H. Pfenninger, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freizing-Weihenstephan, 2002, 92
76. MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission): Brautechnische Analysen Methoden, Band II, 2.15.2.1 Forciermethode, 4. Aufgabe, Ed. H. Pfenninger, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freizing-Weihenstephan, 2002, 95
77. MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission): Brautechnische Analysen Methoden, Band II, 2.15.2.3 Alkohol - Kältetest (AKT) nach Chapon, 4. Aufgabe, Ed. H. Pfenninger, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freizing-Weihenstephan, 2002, 98

78. MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission): Brautechnische Analysen Methoden, Band II, 2.15.2.5 Ammoniumsulfatfällungsgrenze, 4. Aufgabe, Ed. H. Pfenninger, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freizing-Weihenstephan, 2002, 102
79. MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission): Brautechnische Analysen Methoden, Band II, 2.17.3 Tannoide, 4. Aufgabe, Ed. H. Pfenninger, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freizing-Weihenstephan, 2002, 111
80. Miedl, M., Garcia, M.A., Bamforth, Ch.W.: Haze formation on Model Beer Systems, *J. Agric. Food Chemistry* 53, 2005, 10161-10165
81. Mills, E. N. S., Kauffman, J. A., Morgan, M. R. A., Field, J. M., Hejgaard J., Prudlove M. O., Onishi A.: Immunological study of hydrophobic polypeptides in beer, *J. Agric. Food Chem.* 46, 1998, 4475 - 4483
82. Moll, M.: Colloidal stability of Beer, *Brewing Science*, 3, 1987, Academic Press, New York
83. Opekarová M, Sigler K.: Acidification power: Indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Folia Microbiol* 27, 1982, 395-403
84. Parker, D.K.: The Study of Haze Formation in Freshly Packaged and Stored Beers, *MBAA TQ* 44, 2007, 23-28
85. Poncet-Legrand, C. et al.: Flavan-3-ol Aggregation in Model Ethanolic Solutions: Incidence of Polyphenol Structure, Concentration, Ethanol Content and Ionic Strength, *Langmuir*, 19, 2003, 10563-10572
86. Prahl S. (2000): Mie Scattering Calculations. Oregon Medical Laser Center, http://omlc.ogi.edu/calc/mie_calc.html
87. Prádný, M. et al.: Macroporous Hydrogels based on 2-HydroxyEthylMethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-HydroxyEthylMethacrylate with Methacrylic Acid, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 68, 2003, 812-822
88. Rehmanji, M., Mola, A., Narayanan, K.S., Ianniello, R.M.: Polyclar (PVPP) for improving Shelf Life in Laboratory Treated Lagers, *MBAA Technical Quarterly* 35, 1998, 95-100
89. Rehmanji, M., Gopal, Ch., Mola, A.: Beer Stabilisation Technology – Clearly a Matter of Choice, *MBAA Technical Quarterly* 42, 2005, 332-338
90. Richard, T., Lefeuvre, D., Descendit, A.: Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006
91. Riis S.B., Pedersen H.M., Sorensen N.K. and Jakobsen M., Flow cytometry and acidification power test as rapid techniques for determination of the activity of starter cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Food Microbiol.*, 12, 1995, 245-250
92. Riou, V.: Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides, *Food Hydrocolloids* 16, 2002, 17 – 23
93. Sadar, M., Foster, A., Gustafson, D., Schlegel, J.: Safety of Formazin and StabCal Stabilized Formazin as Primary Turbidity Standards, *Technical Notes - Hach Company* 1998
94. Seymour, R. B., Carraher Jr., Ch. E.: *Polymer Chemistry - An Introduction*, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1981

95. Siebert, K.J.: Nature of Polyphenol-Protein Interactions, *J. Agric. Food Chem.* 44, 1996, 80 - 85
96. Siebert, K.J., Lynn, P.Y.: Mechanisms of Adsorbent Action in Beverage Stabilisation, *J. Agric. Food Chem.* 45, 1997, 4275 – 4280
97. Siebert, K.J., Lynn, P.Y.: Comparison of Polyphenol Interactions with Polyvinylpyrrolidone and Haze-Active Protein, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56, 1998, 24 – 31
98. Siebert, K.J.: Effects of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze Stabilization, and Analysis, *J. Agric. Food Chem.* 47, 1999, 80 - 85
99. Siebert, K.J.: Chemometrics in Brewing—A Review, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59, 2001, 147 – 156
100. Siebert, K.J., Lynn, P.Y.: Effect of Protein-Polyphenol Ratio on the Size of Haze Particles, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58, 2000, 117 – 123
101. Siebert, K.J., Lynn, P.Y.: Effects of Alcohol and pH on Protein-Polyphenol Haze Intensity and Particle Size, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61, 2003, 88 – 98
102. Siebert, K.J., Lynn, P.Y.: Comparison of Methods for Measuring Protein in Beer, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 63, 2005, 163 – 170
103. Siebert, K.J., Lynn, P.Y.: Comparison of Methods for Measuring Polyphenols in Beer, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64, 2006, 127 – 134
104. Sigler K., Knotková A. and Kotyk A., Factors governing substrate-induced generation and extrusion of protons in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, 643, 1981, 572-582
105. Sigler K., Kotyk A., Knotková A. and Opekarová M., Processes involved in the creation of buffering capacity and in substrate-induced proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* , 643, 1981, 583-592
106. Sigler, K., Pascual, C., Romay, C.: Intracellular control of proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* 28, 1983, 363–370
107. Sigler K. and Höfer M., Mechanisms of acid extrusion in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1071, 1991, 375-391
108. Sigler, K., Mykiška, A., Kosař, K., Gabriel, P., Dienstbier, M.: Factors Affecting the Outcome of the Acidification Power Test of Yeast Quality: Critical Reappraisal, *Folia Microbiol.* 51(6), 2006, 525-534
109. Sigrist Photometer - <http://www.photometer.com>
110. Sladký , P., Císařová, H.: A new method of objective measurement of beer tests with Ammonium Sulphate in usual chemical test tubes, *Kvasny Prum.* 45, 1999, 156 - 159
111. Sladký, P., Dienstbier, M.: Modular turbidimetr for the practical education in brewing and beverage industry, part 1, *Kvasny Prum.* 46 (10), 2000, 280 - 283
112. Sladký, P., Dienstbier, M.: Modular turbidimetr for the practical education in brewing and beverage industry, part 2, *Kvasny Prum.* 46 (11), 2000, 321 – 324
113. Sladký, P., Císařová, H., Dienstbier, M., Gabriel, P.: Development of colloidal hazes in bottled pale lager beer during ageing, *Kvasny Prum.* 47 (11-12), 2001, 322 - 327

114. Sladký, P., Dienstbier, M.: Improved procedures for complex monitoring beer colloidal stability by means of dual angle turbidimetric and titration system DATTS, part 1, *Kvasny Prum.* 47 (5), 2001, 122 - 126
115. Sladký, P., Dienstbier, M.: Improved procedures for complex monitoring beer colloidal stability by means of dual angle turbidimetric and titration system DATTS, part 2, *Kvasny Prum.* 47 (7-8), 2001, 195 - 200
116. Sladký, P., Císařová, H., Dienstbier, M., Gabriel, P.: Direct analyses of beer macromolecular complexes by means of a new differential nephelometric titration method. *Kvasny Prum.* 48(10), 2002, 267-271
117. Sladký, P., Císařová, H., Kellner, V.: Měření koloidního stárnutí a vývoje obsahu tanoidů HGB piv metodou komplexní turbidimetrické analýzy *Kvasny Prum.* 50, 2004, 130-134
118. Stewart, G.G., Russell, I.: Fermentation – the “black box” of the brewing process. *MBAA Technical Quarterly* 30, 1993, 159-168
119. Šavel, J.: The new kind of an antioxidant test, *Monatsschrift fur Brauwissenschaft.* 54, 2001, 206-208
120. Vaag, P., Molskov, B., Cameron-Mils, V., Svendsen, I.: Characterization of a beer foam protein originating from Barley, *Proc. Eur. Brew. Conv. 27th Cong., Cannes, 1999*, 157 – 166
121. Vincent S.F., Bell P.J.L., Bissinger P. and Nevalainen K.M.-H., Comparison of melibiose utilizing baker's yeast strains produced by genetic engineering and classical breeding, *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 1999, 148-152
122. Vold, R. D., Vold, M., J.: *Colloid and Interface Chemistry*, Addison-Wesley, Reading, 1983
123. Wikipedia – www.wikipedia.org
124. Yamazaki, H., Sperline, R.P., Freiser H.: Spectroscopic determination of pH and its application to determination of thermodynamic equilibrium constants. *Anal. Chem.* 54, 1992, 720-725
125. Zanchi, D. et al.: Colloidal Dispersions of Tannins in Water-Etanol Solutions, *Langmuir*, 23, 2007, 9949-9959

10 PUBLIKACE AUTORA

- I. Gabriel, P., Dienstbier, M., Černý, L., Sladký, P.: The use of two angle turbidimeter for the differentiation of some haze-forming particles, *Kvasny Prum.* 40, 1994, 203-207.
- II. Sladký, P., Císařová, H., Dienstbier, M., Gabriel, P.: Development of colloidal hazes in bottled pale lager beer during ageing, *Kvasny Prum.* 47 (11-12), 2001, 322 – 327.
- III. Sladký, P., Císařová, H., Dienstbier, M., Gabriel, P.: Direct analyses of beer macromolecular complexes by means of a new differential nephelometric titration method. *Kvasny Prum.* 48(10), 2002, 267-271.
- IV. Gabriel, P., Dienstbier, M., Císařová, H., Sladký, P.: Haze influence on Beer Color Measurement, Research and Development study for Anton Paar GmbH, 2005.
- V. Sigler, K., Mykiška, A., Kosař, K., Gabriel, P., Dienstbier, M.: Factors Affecting the Outcome of the Acidification Power Test of Yeast Quality: Critical Reappraisal, *Folia Microbiol.* 51(6), 2006, 525-534.
- VI. Gabriel, P., Dienstbier, M., Matoulková, D., Kosař, K., Sigler, K.: Optimized Acidification Power Test of Yeast Vitality and its Use in Brewing Practice, *J. Inst. Brew.* 114, 2008, 270-276.
- VII. Gabriel, P., Dienstbier, M., Sladký, P., Sigler, K.: A New Method of Optical Detection of Yeast Acidification Power, *Folia Microbiol.* 53(6), 2008, 527-533.
- VIII. Gabriel, P., Dienstbier, M., Sladký, P.: Turbidity and Color Measurement in the Brewing Process, Application study for Anton Paar GmbH, 2008.
- IX. Sigler, K., Matoulková, D., Dienstbier, M., Gabriel, P.: Net Effect of Wort Osmotic Pressure on Fermentation Course, Yeast Vitality, Beer Flavor and Haze, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(6), 2009, 1027-1035