ZLEPŠENÉ POSTUPY MĚŘENÍ ZÁKALŮ PRO KOMPLEXNÍ SLEDOVÁNÍ KOLOIDNÍ STABILITY PIVA POMOCÍ DVOUÚHLOVÉHO TURBIDIMETRICKÉHO A TITRAČNÍHO SYSTÉMU DATTS

Doc. Ing. PETR SLADKÝ, CSc., RNDr. MIROSLAV DIENSTBIER,
Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Katedra chemické fyziky a optiky

I. část

1 ÚVOD

Pozorování zákalů meziproduktů a piva používají sládkové od nepaměti k posuzování správného vaření, kvašení, čiření atp. a v neposlední řadě i k hodnocení jakosti finálního produktu [1]. V současnosti bývá většinou vizuální pozorování nahrazováno objektivním měřením zákalů pomocí zákalometrů (turbidimetrů) [2,59,60]. Moderní turbidimetry umožňují automatizaci řady dílčích pivovarských technologií, jako např. scezování, filtraci atp. [3]. V laboratoři jsou zákalometry využívány ke kontrole jakosti, a zvláště k posouzení, resp. předpovědi koloidní (fyzikální) trvanlivosti finálního produktu, neboť pivo, po odstranění biologických zákalů, vykazuje převážně zákal způsobený koloidními částicemi v závislosti na době stárnutí, výchozím složení a okolních vlivech (teplotě, transportu aj.) [1].

Práce mnoha pivovarských výzkumníků poslední doby [9–30] přispěly k poznatku, že se na tvorbě nebiologických zákalů piva podílejí v rozhodující míře interakce proteinů (P) a polyfenolů (tříslovin resp. tanninů – T) surovinového původu. Tyto interakce, zapisující se obvykle v podobě symbolické reakční rovnice $P + T = k PT$, vedou k tvorbě zakalujících sraženin, nejprve při teplotách nižších než cca 5 °C (tzv. chladový zákal), které později přecházejí v trvalý zákal i při teplotách nad 5 °C.

Přes poměrně dobrou obecnou znalost příčin tvorby koloidních zákalů piva a možností jejich omezení různými stabilizačními způsoby a materiály je i v současné době věnována studiu koloidní nestability piva v pivovarském výzkumu značná pozornost, zvláště z hlediska optimalizace výrobních postupů a zlepšování jakosti finálního produktu v souladu s náročnými požadavky moderního trhu. Jsou sledovány jak konkrétní otázky výrobní praxe jednotlivých značek pív celosvětového charakteru [25, 29], tak i otázky modelového základního výzkumu [30], inovace stabilizačních prostředků a postupů [45–50], a v neposlední řadě i výzkumu a vývoje nových metod a zařízení ke sledování, resp. stanovení koloidní nestability piva a meziproduktů [31–39].

Současná práce je věnována zlepšení metod sledování koloidní stability piva a meziproduktů na základě podstatného zpřesnění a zvýšení rychlosti měření zákalů a využití nových poznatků

o změnách rozměrů částic v průběhu přirozeného i vynuceného stárnutí a precipitačních interakcí P-T koloidů. Protože praktické zajištění optimální koloidní stability piva vyžaduje holistický přístup sládků [29], jsou uvedené metody rozšířeny i o analýzu pomocných stabilizačních a filtračních prostředků a operativní diagnostiku a kontrolu technologie ovlivňující komplexně koloidní stabilitu finálního produktu.

2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KOLOIDNÍ STÁRNUTÍ PIVA

Koloidní stárnutí piva je obecně složitý nevratný termodynamický proces. Závisí jak na chemickém složení a stavu výchozího produktu, tak i na fyzikálně-chemických podmínkách, ve kterých probíhá, jak je schematicky ukázáno na obr. 1.

Během procesu stárnutí piva dochází vesměs k růstu koloidních zákalů převážně tříslovinno-bílkovinného původu v důsledku P-T interakcí. Na obr. 2 je vynešena časová závislost celkového zákalu, který je definován součtem hodnot tzv. chladového zákalu při teplotě 0 °C a trvalého zákalu při teplotě 20 °C (obr. 3). Měření uvedených zákalů se dle pivovarských analytik [40–44] provádí uznaně v nefelometrickém uspořádání. Rovněž teploty měření chladových a trvalých zákalů jsou věcí analytické dohody.

V čerstvě stočených pivech, např. do

lahví pomocí moderních technologií, by celkový nefelometrický měřený zákal (ve viditelném oboru světla) neměl přesáhnout hodnoty cca 0,5 j.EBC. Těsně po stočení jsou polyfenolové prekurzory zákalu piva přítomny jako jednoduché molekuly. Postupem času jednoduché flavanoly, katalyzované kyslíkem, polymerují do podoby oligomerů o třech až čtyřech jednotkách, vytvářejících se zákalotvornými proteiny částicové komplexy chladového zákalu. Plně oxidované flavanoly vytvářejí tzv. tannoidy, které jsou ještě více reaktivní. Tannoidy svými násobnými vodíkovými vazebnými místy pak tvoří nevratný trvalý zákal [50].

3 METODY SLEDOVÁNÍ KOLOIDNÍ STABILITY PIV ZALOŽENÉ NA MĚŘENÍ ZÁKALU

Ke sledování koloidní stability piv měřením zákalů bylo vyvinuto v posledních padesáti letech více než sto různých variant fyzikálních i chemických metod popsaných podrobně v odborné literatuře [32, 34, 28, 29, 30]. Řada z nich byla kodifikována i v pivovarských analytikách [40–44].

Mezi nejdůležitější kodifikované fyzikální metody patří zrychlené zkoušky koloidní stability piv tepelným cyklováním – tzv. šokovací či forsírovací testy. Vzhledem ke složitosti procesu stárnutí se doporučuje tyto modelové testy u kon-

Obr. 1 Ilustrační schéma základních faktorů ovlivňujících vývoj procesu koloidního stárnutí piva

Obr. 2 Vývoj nefelometrických zákalů (Z90) během skladování piva s rostoucí koloidní stabilitou. Body označené šipkami definují prahy koloidní nestability.

Obr. 3 Schematický průběh teplotní závislosti nefelometrického zákalu (Z90) piva, ilustrující definici měřených hodnot zákalu (celkový zákal = chladový zákal + trvalý zákal).

krétních značek piva a výrobních postupů korelovat s výsledky dlouhodobých testů koloidního stárnutí za přirozenějších podmínek, odpovídajících blíže skladování a distribuci. Je vhodné je kombinovat i s mechanickými a optickými vlivy.

K velmi rychlým a účinným fyzikálním zkouškám, které vysoce korelují s výsledky forsírovacích testů i testů přirozeného koloidního stárnutí, patří i zkoušky stability srážením koloidů piva přidávkou několika procent alkoholu a chlazením k bodu tuhnutí (cca -8°C i méně v závislosti na celkovém množství alkoholu v pivu). Tyto testy jsou známy pod názvem alkoholový chladový test (ACT) a jsou stále více používány k rychlé předpovědi koloidní stability [10,32,28].

Z chemických metod jsou používány zvláště testy založené na nefelometrických či turbidimetrických titracích piva různými specifickými činidly, reagujícími s jednotlivými typy zákalotvorných složek jak na straně proteinů, tak i polyfenolů. Vedle sledování vývoje koloidní nestability umožňují posoudit i aktivní množství zákalových prekurzorů a kinetiku tvorby sraženin. Přehled nejpoužívanějších turbidimetrických titrací piva a meziproduktů podávají např. práce [32,34,42,43], ve kterých jsou zahrnuty i osvědčené fotometrické titrace DPFe_3 (železitý dipyridyle komplex) nebo DIP (2,6-dichlorfenolindofenol) ke stanovení redukční schopnosti piva.

4 ZLEPŠENÉ POSTUPY MĚŘENÍ ZÁKALŮ KE STANOVENÍ KOLOIDNÍ STABILITY PIVA

Metody sledování stability piva, uvedené v předchozí kapitole, jsou založeny vesměs na nefelometrických měřeních zákalu ve směru rozptylu světla pod úhlem 90° vůči budicímu svazku. V průběhu přirozeného či vynuceného fyzikálně-chemického stárnutí a titračních zkoušek se mění nejen koncentrace, ale i velikost zákalotvorných částic piva [30,31,32]. Znalost těchto změn je důležitá zvláště pro posouzení kinetiky tvorby zákalů a tedy přesnější a rychlejší odhalení pří-

čin nestabilit zkoušené koloidní soustavy. Současné měření zákalů ve dvou směrech rozptylu světla – nefelometrickém a dopředném, umožňuje rozlišit částice tvořící se v rozměrových pásmech pod a nad hranicí cca jednoho mikrometru [3, 4, 5, 6, 33, 55, 57].

Výše uvedené zlepšení je účelné spojit s řádově větším rozlišením změn měřených zákalů oproti stávajícím metodám a využitím automatického zápisu měřených hodnot pomocí PC [54, 55, 56]. To umožňuje podstatné zvýšení

rychlosti měření a hodnocení velkých souborů vzorků v krátkých analytických časech. Rychlý automatický zápis měřených změn zákalů až se subsekundovou opakovací frekvencí je zvláště důležitý pro stanovení kinetiky srážecích reakcí jednotlivých zákalotvorných složek piva a pro identifikaci příčin fluktuací stability produkce.

Zásadním technicko-ekonomickým omezením používání komplexních zákalových testů koloidní stability piva a vlastností meziproduktů je, že je dosud bylo

Obr. 4 Schéma termostatování a modulárního uspořádání měření zákalu vzorků ve dvou směrech rozptylu světla v různých typech vzorkovnic v měřicí komoře turbidimetru s imerzní a termostatující kapalinou (DATTS mod 2000).

1 – interakční objem vzorku rozptylující svazek světla, 2 – měření v kruhových komerčních lahvích, 2' – měření v přístrojových kvjetkách $\varnothing 60\text{ mm}$, 2'' – měření v běžných chemických zkumavkách a vialkách $\varnothing 15 \div 30\text{ mm}$, 3 – středící adaptéry s pohonem magnetického míchadla, 4 – točna automatického otáčení lahve, 5 – měřicí komora turbidimetru, 6 – imerzní a termostatující kapalina, 6' – přepad, 7 – cirkulační čerpadlo, 8 – kapalinový termostat, 8' – trubkový výměník, 8'' – termoelektrický výměník Peltierova typu, 9 – řízení termoelektrického výměníku, 10 – zpětné potrubí, 11 – kontrolní teploměr, 12 – filtr termostatující kapaliny, 13 – budicí svazek, 14 – svazek prošlý vzorkem, 14' – svazek rozptýlený do nefelometrického směru, 14'' – svazek rozptýlený v dopředném směru.

Obr. 5.1.a Příklad automatického zápisu naměřených hodnot zákalu série dvaceti vzorků piva v uzavřených lahvích rychlostí 1 vzorek za 30 s. Pro metodickou ilustraci byl mezi každými dvěma vzorky piva změřen kontrolní vzorek (čistá voda), v praxi stačí kontrolovat „nulový“ zákal méně často, podle toho, jak rychle dochází ke znečištění imerze (např. po dvaceti lahvích s pivem).

Obr. 5.1.b Distribuce celkových a trvalých zákalů Z15 a Z90 24 vzorků lahvového piva EXP12 po třech měsících skladování po stočení o deklarované trvanlivosti 12 měsíců dle etikety (měřeno přístrojem DATTS 2000) 1) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 26. 1. 2000; 2) $T = -5\text{ }^{\circ}\text{C}$; 27. 1. 2000.

možno provádět pouze pomocí dvou specializovaných a nákladných přístrojů. Jmenovitě jednoho přístroje pro provádění šokovacích testů v lahvích a druhého pro provádění turbidimetrických titrací. Posledně uvedené nedostatky odstraňuje jediný přístroj modulární koncepce [54], jmenovitě duálně angulární turbidimetrický a titrační systém (DATTS), který umožňuje automatická měření malých změn koloidních zákalů s velmi vysokým rozlišením ($\sim 0,001$ j. EBC) ve dvou úhlech rozptylu světla jak v běžných komerčních lahvích, tak i ve zkumavkách či vialkách malého průměru o objemu reaktantů několik mililitrů [55,56]. Navíc, díky své modulární konstrukci umožňuje DATTS současně pro-

vádět jak turbidimetrické, tak i pH, resp. vodivostní titrace jednoho vzorku při jednotně dávkovaném titrantu [54]. To vede ke stanovení elektrokinetických vlastností koloidní soustavy zkoušeného piva, jež jsou principiálně důležité pro předpověď jeho stability, jakož i srážení koloidů meziproduktů ve varně i ve sklepě.

Součástí DATTS je i průtoková cela odolná vůči provozním tlakům a teplotám, umožňující operativní kontrolní měření provozních zákalů meziproduktů v jednotlivých technologických uzlech ve varně i ve sklepě a případnou in-line provozní kontrolu stabilizačních zásahů, kontrolu cejchování provozních turbidimetrů aj. rovněž ve dvou úhlech rozptylu budicího světla v dohodnutých spektrál-

ních pásmech dle pivovarských analytik citovaných výše.

Rostoucí částice koloidních zákalů (ale i jiné „filtrovatelné“ částice) rozměrů větších než jeden mikrometr sedimentují. DATTS umožňuje tyto sedimentace analyzovat pomocí Stokesova zákona v jednoduchém uspořádání dle obr. 4, což je nesmírně cenné pro další posouzení nejen rozměrů nadmikronových částic koloidních sraženin piva i meziproduktů, ale např. i částic křemeliny a jiných pomocných filtračních a stabilizačních prostředků (degradace nerozpuštěného PVPP recyklováním atp.).

5 PRAKTICKÉ PŘÍKLADY PROVEDENÍ ZLEPŠENÝCH METOD MĚŘENÍ ZÁKALŮ KE KOMPLEXNÍMU SLEDOVÁNÍ KOLOIDNÍCH VLASTNOSTÍ PIVA A MEZIPRODUKTŮ

5.1 Zrychlení a zpřesnění analýz koloidní stability zvýšením opakovací frekvence měření a statistickým hodnocením

Moderní pivovarské zákalometry umožňují až na výjimku [4-8] sledovat změny zákalů piva (koloidního i nekolooidního původu) přímo v uzavřených komerčních lahvích (bez etiket). Zkušenost ukazuje, že i ve velkých pivovarských laboratořích se dosud odečítají a zapisují výsledky měření zákalů piva ručně se vzorkovací rychlostí často mnohem menší než jeden vzorek za minutu. Rozlišení změn měřených zákalů je rovněž poměrně malé, nepřesahující 0,1 j. EBC, neboť se měření dějí absolutně.

Na obr. 5.1.a je ukázán grafický příklad automatického zápisu naměřených hodnot zákalu série vzorků piva přímo v uzavřených lahvích pomocí osobního počítače rychlostí jeden vzorek za 30 s, přičemž počítač snímá a ukládá již seřazenou a korigovanou hodnotu zákalu během otočení lahve se vzorkem, naměřenou turbidimetrem [54] v průběhu jedné měřicí periody. Případný vliv

Obr. 5.2 Vývoj celkového nefelometrického zákalu během skladování dvou piv s rostoucí koloidní stabilitou. Body označené plnými šipkami definují prahy koloidní stability. Zvýšené rozlišení měření zákalu zmenšuje interval nejistoty předpovědi koloidní stability;

a) nestabilizované pivo,

b) střednědobě stabilizované pivo (– doba trvanlivosti cca 6 měsíců).

Obr. 5.3.a Příklad provedení inverzního ACT tří vzorků piva; vzorek A – čerstvě stabilizované pivo, vzorek B – stabilizované pivo po 60 °C / 24 hod teplém šoku, vzorek C – nestabilizované pivo cca týden po stočení (20 °C). „Zalomení“ na klesajících křivkách zákalu je způsobeno pseudokritickou opalescencí vzorků piva s lihem při průchodu částí vzorku s rozdílnou teplotou (a tedy i zákal) měřicím svazkem světla během prvních cca 40 s ohřevu 5 ml vzorků ve zkumavkách z teploty –8 °C.

Obr. 5.3.b Rozpouštění chladového nefelometrického zákalu piva v lahvi; chladový zákal byl inkubován 24 hodin při teplotě –4 °C. Fluktuace zákalu pod teplotou 0 °C jsou způsobeny pseudokritickou opalescencí v důsledku fluktuací teplot částí vzorku a jeho zakalení v oblasti měřicího svazku světla při přechodu piva z vychlazeného stavu do stavu stacionárního ohřevu po cca prvních dvou až třech minutách v závislosti na velikosti tzv. tepelné časové konstanty, jak je patrné z grafu časového průběhu teploty vzorku v blízkosti měřicího svazku světla. Viz též analogický jev na křivkách rozpouštění chladových zákalů na obr. 5.4.a, b, c.

postupného znečištění imerzní a termo-statující kapaliny v měřicí komoře turbidimetru lahvemi se jednoduše koriguje kontrolním vzorkem např. v podobě lahve s čistou vodou (obr. 5.1.a).

Vysoká opakovací frekvence měření umožňuje stanovit zákaly velkého souboru vzorků v lahvích a sledovat účinně jakostní profil a fluktuace produkce, jak je ukázáno na příkladu na obr. 5.1.b.

5.2 Zkrácení forsírovacích testů měřením zákalů s velmi vysokým rozlišením (~ 0,001 j.EBC)

Větší rozlišení měřených změn koloidních zákalů během stárnutí piva umožňuje úměrně zmenšit časový interval předpovědní nejistoty tvorby nadprahových hodnot, jak je názorně patrné z grafického schématu na obr. 5.2.

Praktický příklad z obr. 5.1.b ukazuje nefelometrické hodnoty (Z90) celkového a trvalého zákalu souboru 24 vzorků hluboce stabilizovaného lahvového piva (deklarovaná trvanlivost na etiketě t = 12 měsíců) uchovávaného v laboratorii při teplotě 22 °C tři měsíce od doby stočení. Odpovídající průměrná hodnota chladového zákalu celého souboru (24 lahví z jednoho kartonu), měřeného při teplotě podchlazení –5 °C, činila 0,09 j.EBC. Při vysoké rozlišovací schopnosti použitého turbidimetru rovné 0,001 j.EBC z toho plyne možnost pozorovat změny zákalů způsobené stárnutím koloidů již při laboratorních teplotách po prvních 24 hodinách teplotně „prohloubeného“ studeného šoku. Totéž přirozeně platí i pro pozorování zákalů po tepelném šoku způsobeném pasterací či jinými fyzikálními šoky.

Získané výsledky měření zákalů s velmi vysokým rozlišením přinášejí závažný poznatek, že chladový zákal přirozeného koloidního systému piva (např. v uzavřené, tj. intaktní, pивní lahvi) indikuje tepelné aktivované reakce volných radikálů vedoucí

ke koloidnímu stárnutí stejně citlivě jako příměsové lapače radikálů používající k detekci nákladnou metodu elektron-spinové rezonance (ESR) [51,52].

5.3 Zrychlení alkoholového chladového testu (Alcohol Chill Test – ACT) piva měřením v režimu rozpouštění v běžných chemických zkumavkách i komerčních lahvích

Přirozený obsah alkoholu v pivu relaxuje jeho koloidní stabilitu a vede k většímu chladovým zákalům. Zvýšení intenzity chladových zákalů přidávkou několika dalších objemových procent alkoholu a inkubací v okolí kryoskopické teploty se účinně využívá k analýze koloidní stability piva v podobě tzv. Chaponova alkoholového chladového testu piva (ACT) [32].

ACT se vyznačuje velmi vysokou výpovědní schopností o stabilitě koloidního systému piva [28]. K dispozici jsou i specializované aparatury [32], které umožňují měřit ACT automaticky v režimu chlazení, což však trvá i v případě vzorku o objemu několika ml několik desítek minut, a analýza je zdlouhavá.

Podstatného zrychlení ACT lze dosáhnout měřením rozpouštění chladových zákalů během ohřevu vzorků z teploty chladového šoku na zvolenou teplotu, jak je ilustrováno pomocí praktického příkladu na obr. 5.3.a. Z něho je patrné zkrácení doby stanovení ACT jednoho vzorku o objemu 5 ml ve zkumavce inverzním postupem na několik minut.

Sledování teplotních změn koloidních zákalů piva lze provádět i přímo v uzavřených komerčních lahvích, což bohužel v režimu chlazení, vzhledem k velkému objemu a související tepelné kapacitě vzorků a kinetice jevu, trvá i desítky hodin. V režimu definovaného ohřevu lahvového vzorku přímo v předtmostatované měřicí komoře turbidi-

metru s automatickým zápisem dat lze získat velmi cenné informace o stabilitě koloidního systému piva během deseti až patnácti minut po předchozí (např. 24-hodinové) inkubaci chladového zákalu při kodifikované teplotě 0 °C nebo teplotách nižších (úměrně obsahu alkoholu jako v případě ACT) (obr. 5.3.b).

Výhodou zkoušek piva měřením rozpouštění chladových zákalů dle vzoru na obr. 5.3.b je, že na konci testu dosáhne vzorek v měřicí komoře turbidimetru teploty zvolené pro tepelný šok (např. až 60 °C). Navíc lze na počátku ohřevu vzorku sledovat pomocí automatického zápisu vliv teplotních nerovnoměrností v oblasti průchodu svazku světla vzorkem na měřené hodnoty zákalů zhruba po dobu odpovídající tepelné časové konstantě, která činí pro lahvové vzorky dvě až tři minuty a pro zkumavky se vzorky 5 ÷ 10 ml několik desítek sekund (obr. 5.3.b resp. a).

5.4 Zpřesnění stanovení kinetiky koloidního stárnutí piva sledováním změn rozměrů částic ve dvou úhlech rozptylu světla

Moderní pivovarské technologie umožňují připravit koloidně stabilní piva s trvanlivostí přesahující 12 i více měsíců. Koloidní zákal takovýchto hluboce stabilizovaných piv vzrůstá za běžných skladovacích teplot okolo 20 °C velmi pomalu, jak je schematicky znázorněno na obr. 5.2.

Na obr. 5.4.a pozorovaný zbytkový nefelometrický zákal Z90 indikuje, že rozměry koloidních částic hluboce stabilizovaných piv nepřesahují vesměs jeden mikrometr. Tento poznatek přímo potvrzují i současná měření chladových zákalů hluboce stabilizovaného piva v nefelometrickém (Z90) a dopředném (Z15) směru rozptylu světla při konstantní teplotě (obr. 5.1.b) nebo účinněji v režimu rozpouštění (obr. 5.4.a). Jak je z obr. 5.4.a

Obr. 5.4.a Rozpouštění chladového zákalu vzorku hluboce stabilizovaného piva z teploty -5°C na teplotu $+50^{\circ}\text{C}$. Zákal v dopředném směru (Z15) je během celé doby rozpouštění konstantní, zatímco nefelometrický zákal (Z90) (citlivý na submikronový koloidní zákal) viditelně klesá.

Obr. 5.4.b Rozpouštění chladového zákalu vzorku piva z teploty -5°C na teplotu $+50^{\circ}\text{C}$. Hodnoty zákalu v dopředném směru (Z15) přesáhly hodnoty nefelometrického zákalu (Z90), což indikuje dosažení prahu koloidní nestability.

patrné, zůstává hodnota dopředného zákalu Z15 koloidně stabilních piv téměř stejná během celé doby rozpouštění zákalu piva z teploty -5°C na teplotu $+50^{\circ}\text{C}$, což dokazuje, že ve sledovaném vzorku se netvoří částice chladového zákalu větší než jeden mikrometr, způsobující viditelný zákal, citlivěji právě indikovaný ve směru dopředného rozptylu světla (hodnoty Z15) než ve směru nefelometrickém Z90, který reaguje citlivěji na neviditelný submikronový koloidní zákal.

Při sledování vývoje nefelometrických hodnot celkového zákalu v závislosti na době stárnutí piva nedochází ve skutečnosti v prahovém bodě (obr. 5.2) ke skokovému, nýbrž ke spojitému růstu rychlosti tvorby zákalu, přičemž doba prahu koloidní nestability se stanovuje resp. definuje matematicky jako průsečík časové souřadnice asymptot křivky vývoje zákalu v momentě stočení ($t=0$) a v momentě, kdy celkový zákal Z90 vzroste o více než 2 j.EBC. Výše popsany, analyticky exaktní postup stanovení doby prahu koloidní nestability nefelometrickým měřením vývoje zákalů je i při použití zkrácených forsírovacích testů

značně zdlouhavý a pracný, přestože je v pivovarských analytikách kodifikován (po nacejchování) jako údaj definující dobu koloidní trvanlivosti piva.

Výše uvedenou zdlouhavost a pracnost hodnocení koloidní trvanlivosti piva pouze na základě nefelometrických měření celkových zákalů odstraňuje analytické využití našeho objevu „skokového“ vzrůstu celkového dopředného zákalu Z15 nad hodnoty zákalu nefelometrického Z90 v poměrně úzkém časovém intervalu okolo prahu koloidní nestability.

Popsaný objev „přeskočení“ hodnot zákalů Z90 hodnotami zákalů Z15 (neboli tzv. „cold break“) v době, kdy pivo dosáhne „stáří“ prahu koloidní stability, lze analyticky stanovit pouze na základě současných měření nefelometrických a dopředných zákalů, buď v režimu tvorby nebo, jednodušeji, rozpouštění chladových zákalů, jak ilustrují názorné grafy na obr. 5.4.b.

Na sérii obr. 5.4.c 1 až 6 je potom ukázán příklad časového vývoje stárnutí P-T koloidního systému stabilizovaného piva v průběhu cyklického forsírovacího testu současným měřením zákalů Z15 a Z90 v průběhu režimu rozpouštění vždy na

Obr. 5.4.c Příklad sledování časového vývoje stárnutí P-T koloidního systému stabilizovaného piva v průběhu cyklického forsírovacího testu současným měřením zákalů Z15 a Z90 v průběhu režimu rozpouštění vždy na konci 24hodinového studeného šoku

konci 24hodinového studeného šoku. Uvedená série vývojových grafů je na obr. 5.4.c 1 až 6 ilustrativní ukázkou průběhu přerozdělení rozměrů P-T koloidních částic při přechodu z oblasti reverzibilních chladových zákalů do oblasti irreverzibilních permanentních zákalů. Získané výsledky [61, 62], první svého druhu, jsou přímým experimentálním důkazem posledních poznatků [50] o tvorbě P-T zákalů v procesu stárnutí piva postupnou oxidací polyfenolových složek do reaktivní zákalotvorné podoby, budící „zlom“ chladového zákalu („cold break“).