

Historie a nové trendy v oblasti výzkumu přepěňování piva

History and New Trends of Research Into Over-foaming of Beer

Michaela POŠTULKOVÁ^{1,2}, Klára VITOUŠOVÁ¹, Pavel NOVÁK^{1,2}, Jaromír FIALA¹, Marek RŮŽIČKA², Tomáš BRÁNYIK¹

¹ Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6-Dejvice / Department of biotechnology, ICT Prague, Technická 5, CZ-166 28 Praha 6-Dejvice

² Ústav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje / Institute of Chemical processes AS CR, Rozvojová 135, Praha 6-Lysolaje

e-mail: postulkm@vscht.cz, postulkova@icpf.cas.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Poštulková, M. – Vitoušová, K. – Novák, P. – Fiala, J. – Růžička, M. – Brányik, T.: Historie a nové trendy v oblasti výzkumu přepěňování piva. Kvasny Prum. 59, 2013, č. 10–11, s. 317–320

Přestože se přepěňování piva (tzv. gushing) projevuje až ve výsledném produktu, jeho vznik a vývoj je realizován mnohem dříve. Kvalita surovin a následně i vedení celého sladovacího procesu jeho vznik výrazně ovlivňují, dále pak samotná výroba mladiny a piva mohou nadměrné pění podpořit, nebo potlačit. Především plísňová kontaminace ječmene, jenž je použit pro výrobu sladu, je nejčastější příčinou vzniku přepěňování. Plísně produkují malé, hydrofobní, silně povrchově aktivní proteiny zvané hydrofobiny, které se podílejí na stabilizaci malých bublin CO₂ v lahvovém a plechovkovém pivu. Vzhledem k tomu, že přepěňování je spotřebiteli vnímáno velice negativně, mnoho pivovarů jej považuje za vážný problém. Tento přehled ukazuje, jak byl v průběhu let gushing zkoumán a jaké jsou nejnovější poznatky v této oblasti. Přesto, že se za hlavního původce považuje právě mikrobiologická kontaminace, stále více autorů se zaměřuje na výzkum fyzikálně-chemické podstaty přepěňování – od analýzy velikosti částic až po výzkum tvorby gushingové pěny.

Poštulková, M. – Vitoušová, K. – Novák, P. – Fiala, J. – Růžička, M. – Brányik, T.: History and new trends of research into over-foaming of beer. Kvasny Prum. 59, 2013, No. 10–11, p. 317–320

Although over-foaming of beer (so-called gushing) is manifested only in the final product, its origin and development is realized much earlier. Quality of raw materials and subsequently the whole malting process markedly affect its origin, further, production of hopped wort and beer itself can either support or suppress excessive foaming. First of all, fungal contamination of barley used for malt production is the most frequent cause of over-foaming. Fungi produce small, powerful, surface-active hydrophobic proteins called hydrophobins which participate in stabilization of small CO₂ bubbles in bottled or canned beer. Regarding the fact that over-foaming is perceived by customers negatively, it is considered a serious problem by many breweries. This survey shows history of gushing research and new knowledge in this area. Despite the fact that microbiological contamination is considered a main cause of gushing, more and more authors have been focusing on research into physical and chemical basis of over-foaming – from the size particle analysis to research into gushing foam.

Poštulková, M. – Vitoušová, K. – Novák, P. – Fiala, J. – Růžička, M. – Brányik, T.: Die Geschichte und neue Trend im Forschungsbereich Überschaumbildung des Bieres (Gushing). Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 10–11, S. 317–320

Trotzdem das Phänomen der Überschaumbildung der Bieres (sog. Gushing) wird erst im Endprodukt sichtbar, sein Entstehen und Entwicklung schon viel früher realisiert worden war.

Die Rohstoffqualität und nachfolgend Prozess der Malzbereitung die Überschaumbildung bedeutend beeinflussen, weiterhin die Würze- und Bierherstellung können das Phänomen der Überschaumbildung entweder fördern oder unterdrücken. Vor allem die Schimmelfkontamination der für Malz angewandten Gerste ist die Hauptursache der Überschaumbildung. Der Schimmel produziert kleine hydrophoben oberflächlich stark aktiven Proteine, genannte Hydrophobine, die einen Anteil an Stabilisation von kleinen CO₂ Blasen in Flaschen – oder Dosenbier hat. Mit Rücksicht darauf, dass die Verbraucher das Phänomen der Überschaumbildung der Bieres sehr negativ akzeptieren, viele Brauereien halten es als ein ernstes Problem. Der Artikel bringt eine Übersicht, wie im Zeitraum von letzten Jahren dieses Problem geforscht wurde mit den neuesten Ergebnissen. Trotzdem, dass als Hauptursache der Überschaumbildung die mikrobiologische Kontamination betrachtet wurde, nimmt die Zahl von Verfassern zu, die sich auf Forschung der physikalisch-chemische Beschaffenheit der Überschaumbildung – von Analyse der Partikelgröße bis zur Gushing konzentrieren.

Klíčová slova: gushing, pěna, hydrofobiny

Keywords: gushing, foam, hydrophobins

1 ÚVOD

Pivní pěna má v pivovarsko-sladařském výzkumu zásadní postavení. Je to právě ona, která má podstatný vliv na vnímání spotřebitele, který se tak rozhoduje o kvalitě výrobku. Proto se také jejímu studiu věnuje značná pozornost. Přepěňování piva (gushing) je negativní jev, který se zapisuje do povědomí konzumentů a poškozuje tak dobré obchodní jméno pivovaru.

2 HLEDÁNÍ PREKURZORŮ PŘEPĚŇOVÁNÍ

O přepěňování se mluví pravděpodobně již od vynálezu stáčení do lahví Priestleym v roce 1772 (Pellaud, 2002). Gushing tedy není v podmínkách pivovarství žádnou novinkou, první publikace jej zmiňují již v 50. letech 20. století, kdy se autoři domnívají, že těžké kovy, jako je cín, bismut, molybden, nikl a železo již v koncentracích několika ppm, mohou vyvolávat gushing (Gray a Stone, 1956).

První skupinou, která se zabývala příčinami přepěňování, byla skupina Carlsberg (z názvu skupiny později vznikl i název pro gushingový rychlostest) (Gjertsen et al., 1963; Gjertsen, 1967). Ta navrhla rozdělit přepěňování na dva typy: primární přepěňování, kte-

1 INTRODUCTION

Beer foam has a principle position in brewing-malting research. It substantially affects consumers' perception, his decision about the product quality. Therefore, a considerable attention has been paid to this study. Over-foaming of beer (gushing) is a negative phenomenon getting into the awareness of consumers and damaging a good reputation of a brewery.

2 SEARCH FOR PRECURSORS OF OVER-FOAMING

Very probably, over-foaming has been discussed since filling into bottles was invented by Priestley in 1772 (Pellaud, 2002). Therefore, gushing is not a new phenomenon in brewing, the first studies mentioned it as early as in the 1950s when the authors supposed that heavy metals such as tin, bismuth, molybdenum, nickel and iron can already cause gushing at concentrations of several ppm (Gray and Stone, 1956).

The Carlsberg group was the first to examine the causes of over-foaming (later, the name of the group gave the name to a rapid gushing test) (Gjertsen et al., 1963; Gjertsen, 1967). The group proposed

ré se vyskytuje častěji a pravděpodobně souvisí s kvalitou sladu, a sekundární přepěňování, které vzniká kvůli chybám ve výrobě piva (například tvorba krystalů šťavelanů vápenatého, nepravidelnosti stěn obalu, nečistoty a detergenty v lahvích, obsah vzduchu v hrdlovém prostoru atp.). V důsledku pokračujícího úsilí o vyjasnění příčin gushingu se objevilo, že přepěňování úzce souvisí s napadením ječmene plísními a jejich modifikacemi během skladování a sladování (Gjertsen et al., 1965; Amaha et al., 1973; Gyllang a Martinson, 1976; Haikara, 1980; Weideneder, 1992; Niessen, 1993; Zepf, 1998).

Mezi lety 1960–1962 skupina okolo Prentice a Sloey jasně ukázala, že zejména plíseň rodu *Fusarium* způsobují změny v analytických hodnotách sladu – například zvýšení hodnot α -amylázy a rozpuštěného dusíku v extraktu – které by také mohly mít vliv na přepěňování piva (Prentice a Sloey, 1960).

Gjertsen et al. pak v roce 1965 provedli experimentální testy, které tyto domněnky víceméně potvrdily. Ukázalo se, že kontaminace ječmene různými druhy fusárií během kroků sladování by mohlo gushing podporovat. Avšak přidání houbového mycelia nebo filtrátu z fusárií pak nakonec gushing v pivu neprokázalo. Autoři tak dospěli k závěru, že přepěňování není způsobeno pouze samotnými plísněmi, ale jako výsledek vzájemného působení mezi houbou a interakcemi probíhajícími v obilí během klíčení (popř. během růstu na poli). Několik výzkumných skupin se pak pokoušelo izolovat tyto látky z filtrátu různých plísní, ale také ze sladu, rmutu, mladiny a nakonec i z gushingového piva (Hippeli a Elstner, 2002).

Během 70. let minulého století vědci Amaha, Kitabake a jejich spolupracovníci uspěli v izolaci a charakterizaci gushing-aktivní látky produkované plísní *Nigrospora* č. 207 v tekutém kultivačním médiu (Amaha et al., 1973; Kitabake a Amaha, 1974; Kitabake a Amaha, 1977). Autoři poukazují na to, že NGF (*nigrospora gushing factor*) je hydrofóbní polypeptid o hmotnosti 16,5 kDa a izoelektrickém bodu 4,0. NGF je rozpustný ve vodě, tepelně stabilní, povrchově aktivní a odolný vůči degradaci některých proteáz. Analýza aminokyselin pak ukázala, že NGF neobsahuje čtyři základní aminokyseliny, a to methionin, histidin, tyrosin a tryptofan. Zato však obsahuje 16 cysteinových zbytků, které tvoří 8 intramolekulárních disulfidových vazeb (Wessels, 1996; Wösten a Wessels, 1997; Hippeli a Elstner, 2002).

V roce 1991 pak Wessels et al. objevili amfifilní proteiny produkované plísní a nazvali je hydrofobiny (Wessels et al., 1991). Ve vodě rozpustné hydrofobinové monomery obsahují osm cysteinových zbytků, které tvoří disulfidové můstky, a to vždy specifickým způsobem v rámci určité aminokyselinové sekvence. Aromatické aminokyseliny jako je tyrosin a tryptofan chybí vždy, methionin a histidin se v hydrofobinech občas vyskytovat mohou. Právě na základě zjištění o aminokyselinové a strukturální podobnosti se prokázalo, že NGF jsou totožné s dimerními hydrofobiny. Obě látky jsou navíc vylučovány v submerzních tekutých kulturách bez toho, aniž by ječmenná či pšeničná zrna byla infikována (Hippeli a Elstner, 2002).

3 KLASICKÉ METODY PŘEDPOVĚDI PŘEPĚŇOVÁNÍ

Mezi již „klasické“ metody stanovení přepěňovací aktivity sladu nebo piva by se daly řadit metody založené na principu výroby sladiny a následného třepání v uzavřené lahvi.

Jako první byl zformován tzv. Donhauserův nebo také Weiherstephanův test (Donhauser et al., 1990). Ten se svými podmínkami snažil co nejvíce přiblížit skutečné výrobě piva, a přesto, že výsledky naznačují jeho vyšší citlivost (Rath et al., 2009), je jeho provádění zdlouhavé a pro podmínky laboratoře v pivovaru nevyhovující (také vzhledem k nutnosti sycení vyrobené sladiny). V návaznosti pak byla vytvořena další metoda, tzv. Carlsberg test (Vaag et al., 1993). Ten poté prošel několika modifikacemi s cílem sjednotit a co nejvíce se přiblížit metodám analytickým. První modifikace (MCT – Modified Carlsberg test) již nepoužívala standardní nepřepěňující pivo, ale uměle syčenou vodu. Problémy s přepěňováním piva během roku 2005 v Německu vedly k tomu, že metoda MCT měla být znovu prošetřena. Vzniklý M²CT (Doubly modified Carlsberg test) pak využívá jemného mletí sladu a postup pro výrobu kongresní sladiny. Obě modifikace měly vést ke zvýšení citlivosti testu. MCT pak byl přijat německou organizací MEBAK (Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission), nikoli však komisí EBC – European Brewery Convention (Radau et al., 1995; Garbe et al., 2007).

V pivovarské praxi se stále nejvíce využívá právě Carlsbergtestu – většinou upraveného dle potřeb pivovarské či sladařské laborato-

ty to divide over-foaming into two types: primary over-foaming which occurs more frequently and presumably relates to malt quality, and secondary over-foaming which occurs due to errors in the beer production (such as formation of calcium oxalate crystals, irregular walls of the package, dirt and detergents in bottles, air content in the bottle neck area, etc.). An ongoing effort to clarify the causes of gushing revealed that over-foaming is closely connected with infection of barley with fungi and their modification during storage and malting (Gjertsen et al., 1965; Amaha et al., 1973; Gyllang and Martinson, 1976; Haikara, 1980; Weideneder, 1992; Niessen, 1993; Zepf, 1998).

In the period of 1960–1962, a group around Prentice and Sloey clearly showed that mostly fungi of *Fusarium* spp cause changes in analytical values of malt – e.g. an increase in the values of α -amylase and dissolved nitrogen in extract – which could also affect over-foaming of beer (Prentice and Sloey, 1960).

Further, in 1965, Gjertsen et al. conducted experimental tests, more or less confirming these assumptions. Contamination of barley with various *Fusarium* spp during malting could support gushing. However, the addition of fungal mycelium or filtrate of fusaria did not confirm gushing in beer. The authors then concluded that over-foaming was not caused by fungi alone but as a result of interaction between the fungi and interactions occurring in grain during germination (or during growth of the stand in field). Several research groups then attempted to isolate these substances from the filtrate of various fungi, but also from malt, mash, wort and finally from gushing beer (Hippeli and Elstner, 2002).

During the 1970s, the scientists Amaha, Kitabake and their colleagues succeeded in the isolation and characterization of gushing-active substances produced by *Nigrospora* species no. 207 in liquid culture medium (Amaha et al., 1973; Kitabake and Amaha, 1974; Kitabake and Amaha, 1977). The authors referred that NGF (*nigrospora gushing factor*) is a hydrophobic polypeptide with a molecular weight of 16.5 kDa and an isoelectric point of 4.0. NGF is water soluble, heat stable, surface-active, and resistant to degradation by some proteases. Amino acid analysis then revealed that NGF does not contain four basic amino acids, methionine, histidine, tyrosine and tryptophan, but containing 16 cysteine residues forming 8 intramolecular disulfide bonds (Wessels, 1996; Wösten and Wessels, 1997; Hippeli and Elstner, 2002).

In 1991, Wessels et al. discovered amphiphilic proteins produced by fungi and called them hydrophobins (Wessels et al., 1991). The water soluble hydrophobin monomers contain 8 cysteine residues forming disulfide bonds in a particular manner within a certain amino acid sequence. The aromatic amino acids such as tyrosine and tryptophan are always absent, methionine and histidine can sometimes occur in hydrophobins. Based on the above mentioned data on amino acid and structural similarities, it has been inferred that NGF are identical to dimer hydrophobins. Furthermore, both substances are secreted in submerged liquid cultures without an infection of barley or wheat grains (Hippeli and Elstner, 2002).

3 CLASSICAL METHODS FOR THE PREDICTION OF OVER-FOAMING

Methods based on hopped wort production and subsequent shaking in a closed bottle belong to the classical methods for the determination of the over-foaming activity of beer or malt.

The first assay was a so called Donhauser's or Weihersteph's test (Donhauser et al., 1990). He, in his test tried to simulate real conditions of the brewing process and although his results showed higher sensitivity (Rath et al., 2009), this test is lengthy and unsuitable for laboratories in breweries (also due to the necessity to saturate the produced sweet wort). Consequently, another method, a so-called Carlsberg test was designed (Vaag et al., 1993). This test went through several modifications with the aim to develop a universal method getting close to the analytical methods. The first modification (MCT – Modified Carlsberg Test) did not use standard not over-foaming beer any more but artificially saturated water. In 2005, the problems with over-foaming of beer in Germany led to revision of the MCT method. A new M²CT (Doubly modified Carlsberg test) then uses fine grinding of malt and the procedure for congress wort production. Both modifications should have led to the enhancement of test sensitivity. The MCT was then accepted by the German organization MEBAK (Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission), but not by the EBC (European Brewery Convention) – (Radau et al., 1995; Garbe et al., 2007).

Breweries frequently use the Carlsberg test modified usually according to the needs of brewing and malting laboratories. Despite

ře. Přes všechny modifikace přesto vykazuje stále vysoké procento falešně pozitivních výsledků (Radau et al., 1995; Garbe et al., 2007).

Tyto gushingové testy tedy nejsou dostatečně citlivé ani reprodukovatelné. Ukáží pouze, má-li nebo nemá-li slad sklon k přepěňování. Kvantifikaci gushingového potenciálu pak navrhla skupina okolo Christian et al., kdy titrací gushingového supresantu (nejčastěji CO₂ extrakt chmele) do tzv. neutrálního bodu, lze přímo určit, kolikrát vyšší či nižší je potenciál sladiny k přepěňování. Množství použitého supresantu je pak přímo úměrné gushingovému potenciálu. Podobně lze nepřímo titrovat sladinu do vody. Kolikrát menší je pak objem titrované sladiny pro vznik přepěňování, tolikrát vyšší je její gushingová aktivita (Christian et al., 2011).

4 MODERNÍ METODY STANOVENÍ PŘEPĚŇOVÁNÍ

Klasické metody pro stanovení přepěňování mají výhodu ve své jednoduchosti, protože prakticky každá pivovarská laboratoř je schopna zařídit si vybavení pro tento typ měření. Nicméně problém s nedostatečnou spolehlivostí a reprodukovatelností začal být v minulosti a současnosti řešen právě hledáním metod nových.

4.1 ELISA

Velice spolehlivou metodou je imunologický test ELISA, navržený právě pro stanovení gushingových prekurzorů – hydrofobinů. Pracuje na principu reakce hydrofobinového antigenu s protilátkou, většinou proti plísni rodu *Fusarium*. To zajišťuje metodě úzkou specifitu, nicméně pokud budou hydrofobiny vytvořeny jinou plísní (např. NGF), pak ji ELISA neodhalí (Kleemola et al., 2001; Astrup et al., 2003; Haikara et al., 2006). Během procesu sladování se navíc množství hydrofobinů mění, nelze tedy jednoznačně říci, zda bude vytvořený slad náchylný k přepěňování. Gushingově aktivní slad také nutně nemusí způsobit přepěňování piva (Astrup et al., 2003). Je tedy evidentní, že gushing nakonec tvoří celý soubor interakcí látek obsažených v surovinách během celého procesu výroby piva.

Od objevu hydrofobinů se většina výzkumných skupin zabývala právě jejich studiem. Nicméně po téměř dvaceti letech bádání se trend výzkumu gushingu obrátil od molekulárně-biologické podstaty k fyzikálně-chemické, což vědce přivádí k molekule CO₂, která, ač není přímým spouštěčem přepěňování, je nutnou podmínkou pro jeho průběh. Teorie vychází z předpokladu, že bublina CO₂, která by se za běžných podmínek rozpustila, je obalena hydrofobinovou monovrstvou, jež ji vysoce stabilizuje, a tím pádem vytváří jádro pro vznik a růst další bubliny na principu heterogenní nukleace (Deckers et al., 2010). Dle nové teorie vytvářejí hydrofobiny nejprve micely, které poté rostou difúzí CO₂ z okolní kapaliny do jejich hydrofobního jádra (Christian et al., 2009).

4.2 Kombinovaná analýza velikosti částic

Dalším nástrojem pro predikci a stanovení přepěňovací aktivity je tzv. kombinovaná analýza částic. Ta byla původně nástrojem pro kontrolu koloidní stability piva, následně pak byla využita i pro měření potence k přepěňování.

Původní myšlenka vycházela z jednoduchého předpokladu, že pivo je kapalina, v níž jsou dispergované částice, jejichž velikost nebo hmotnost je možné měřit. Ve filtrovaných nápojích se nejvíce vyskytují částice bílkovinné povahy, kde velikost většiny z nich se pohybuje mezi 1–20 nm (Titze et al., 2010). Neopomenutelnou charakteristikou takových částic je rovněž povrchové napětí – na svém povrchu si částice nesou buď kladný, nebo záporný náboj. Ten může být změřen pomocí tzv. „nábojového“ částicového analyzátoru (CAS – charge analyzing system). Vzorek nápoje je titrován polyelektrolytem a náboj částice se určí právě titrací do neutrálního bodu. Pro zjištění velikosti a distribuce částic je následně použit přístroj Nanotrak, jenž pracuje na principu závislosti velikosti částic na intenzitě rozptýleného světla. Kombinací těchto dvou měření autoři získali nástroj pro měření přepěňování a úspěšně jej použili pro predikci gushingu v ovocných nápojích a šumivých vínech (Bach et al., 2001; Christian et al., 2011). Pomocí přístroje Nanotrak bylo zjištěno, že v gushing-pozitivních vzorcích syčených ovocných nápojů je větší množství částic o velikosti 1–2 nm. Tyto vzorky pak byly podrobeny titraci polyelektrolytem hexadecyltrimethylamoniem (CTAC).

Předpokládalo se, že u vyššího počtu 1–2 nm velkých částic bude i velký specifický povrch a tím bude přímo úměrně vyšší i spotřeba titračního činidla spotřebovaného na neutralizaci náboje. Laboratorní testy pak tuto domněnku potvrdily (Christian et al., 2011).

all the modifications, this test still exhibits a high percentage of false positive results (Radau et al., 1995; Garbe et al., 2007).

It means that these gushing tests are not sufficiently sensitive or reproducible. They only show whether the malt is or is not prone to over-foaming. The quantification of gushing potential was then proposed by a group around Christian et al. They found that titration of the gushing suppressant (mostly CO₂ hop extract) to the neutral point enables to determine directly how many times higher or lower the potential of the sweet wort to overfoam is. The amount of the suppressant used is then directly proportional to the gushing potential. Similarly, it is possible to titrate sweet wort indirectly to water. How many times smaller the volume of titrated wort for the formation of over-foaming is, so many times higher its gushing activity is (Christian et al., 2011).

4 MODERN METHODS FOR THE DETERMINATION OF OVER-FOAMING

The advantage of the classical methods for the determination of over-foaming is their simple use and practically each brewing laboratory is able to arrange their own equipment for this type of measurement. The problem connected with the insufficient reliability and reproducibility has been solved by searching for new methods.

4.1 ELISA

ELISA is a very reliable immunological test designed for the determination of gushing precursors – hydrophobins. It is based on a reaction between a hydrophobin antigen and an antibody, usually against *Fusarium* spp. This ensures a narrow specificity of the method nevertheless if hydrophobins are produced by other fungi (e.g. NGF), then the ELISA will not detect it. (Kleemola et al., 2001; Astrup et al., 2003; Haikara et al., 2006). Furthermore, the amount of hydrophobins during the malting process varies, thus it cannot be explicitly stated whether the malt will be prone to over-foaming. Gushing-active malt also does not have to cause over-foaming of beer (Astrup et al., 2003). Therefore, it is evident that gushing is induced by a whole set of interactions between substances contained in raw materials during the entire brewing process.

Since their discovery, hydrophobins have been studied by many research groups. However, after nearly twenty years of research into gushing, the research trend turns from the molecular and biological to physical and chemical bases, this brings the scientists to CO₂ molecule. Although the CO₂ molecule does not directly trigger over-foaming, it is considered to be its prerequisite.

The theory is based on the assumption that CO₂ bubbles which would dissolve under common conditions, are coated with a hydrophobin highly stable monolayer forming a core for the origin and growth of other bubbles on the principle of heterogeneous nucleation (Deckers et al., 2010). A new theory infers that hydrophobins produce mycelia growing by CO₂ diffusion from the surrounding liquid to their hydrophobic cores (Christian et al., 2009).

4.2 Combined particle size analysis

A so-called combined particle size analysis is another tool for the prediction and determination of the over-foaming activity. Originally it was used for checking beer colloid stability; subsequently it was also used for the measurement of potential to over-foam.

The initial idea was based on a simple prerequisite that beer is a liquid with dispersed particles, the size or weight of which can be measured. Filtered beverages mostly contain protein based particles of the size ranging from 1–20 nm (Titze et al., 2010).

Surface tension is another important character of these particles; on their surface, the particles carry either a positive or negative charge. The charge can be measured using the particle analyzer (CAS – charge analyzing system). The method of polyelectrolyte titration is used, charge of the particle is determined by titration to the neutral point. Particle size distribution was measured using the instrument Nanotrak working on the principle of the dependence of size particles on scattered light intensity. By combining these two measurements, the authors obtained a device for the measurement of over-foaming and they used it successfully for the prediction of gushing in fruit beverages and sparkling wines (Bach et al., 2001; Christian et al., 2011). By using the Nanotrak, it was detected that gushing-positive samples of saturated fruit drink contained a higher amount of particles with size 1–2 nm. These samples were subject to titration with polyelectrolyte hexadecyltrimethylammonium (CTAC).

It was assumed that a higher amount of 1–2 nm particles would have a large specific surface and also consumption of titrate agent

Kombinovaná analýza částic pro měření gushingového potenciálu ovocných nápojů potvrdila, že částice o velikosti 1–2 nm jsou iniciátory gushingu v nealkoholických nápojích. Tato informace by mohla být zajímavá především pro pivovary, jež se zabývají výrobou míchaných nápojů na bázi piva (Christian et al., 2010).

Při provádění této analýzy rovněž autoři zjistili zajímavou skutečnost, že přidávek samotného polyelektrolytu hexadecyltrimethylamoni-um chlorid (CTAC) do perlivé vody (7g CO₂/l) vyvolal přepěňování, ale jen v případě, kdy byla jeho koncentrace vyšší než kritická micelární koncentrace (Christian et al., 2011). Na základě tohoto poznatku bude nutné ověřit micelární teorii také v souvislosti s gushingovými prekursory v pivu.

5 ZÁVĚR

Během posledních desetiletí byl problém přepěňování piva zkoumán především v souvislosti s plísňovou kontaminací a hledáním prekursorů přepěňování. Prokázané gushingové faktory – hydrofobiny – gushing vyvolávají a současný výzkum naznačuje, že molekuly amfifilní povahy mohou způsobit přepěňování pomocí tvorby micelárních struktur. Nicméně, v případě tak složité matrice, jako je pivo, je studium přepěňování značně obtížné. Pro lepší pochopení chování látek způsobujících přepěňování by mohl posloužit výzkum chování modelových roztoků piva v závislosti na rychlém poklesu tlaku a následně doplněn výzkumem s reálnými vzorky piva.

LITERATURA / REFERENCES

- Aastrup, S., 2003: Gushing factors are already present in barley allowing early detection of gushing risk. Proc. EBC Congr., Dublin, 90: 923–929.
- Amaha, M., Kitabatake, K., Nakagawa, A., Yoshida, J., Harada, T., 1973: Gushing inducers produced some mould strains. Proc. EBC Congr., Salzburg, 14: 381–388.
- Bach, H.P., Görtges, S., Burger, K., Schneider, R., 2001: Das Wildwerden oder Übersäumen (Gushing) des Sektes, Der Deutsche Weinbau: 36–41.
- Deckers, S.M., Gebruers, K., Baggerman, G., Lorgouilloux, Y., Delcour, J.A., Michiels, C., Derdelinckx, G., Martens, J., Neven, H., 2010: CO₂-hydrophobin structures acting as nano-bombs in beer, Part 1: A critical review of hypotheses and mechanism. Brew. Sci. 63: 54–61.
- Donhauser, S., Weideneder, A., Winnewisser, W., Geiger, E., 1990: Test zur Ermittlung der Gushingneigung von Rohfrucht, Malz, Würze und Bier. Brauwelt 130: 1317–1320.
- Garbe, L.A., Nagel, R., Rauschmann, M., Lamers, M., Khmer, A., Tresek, R., 2007: Correlation of DON, hydrophobins and gushing. Proc. EBC Congr., Venice, 31: 6–10.
- Gjertsen, P., 1967: Gushing in beer; its nature, cause prevention. Brew. Dig. 42(5): 80–84.
- Gjertsen, P., Trolle, B., Andersen K., 1963: Weathered barley as a contributory of gushing in beer. Proc. EBC Congr., Brussels: 320–341.
- Gjertsen, P., Trolle, B., Andersen K., 1965: Studies on gushing caused by microorganisms, specially *Fusarium* spec.. Proc. EBC Congr., Stockholm: 428–438.
- Gray, P., Stone, Z., 1956: Proc. Am. Soc. Brew. Chem.: 83.
- Gyllang, H., Martinson, E., 1976: Studies on the mycoflora of malt. J. Inst. Brew. 82: 350–352.
- Haikara, A., 2006: Method for determining a gushing factor for a beverage. US Patent 7041464, May 5, 2006.
- Haikara, A., 1980: Gushing induced by fungi, Monograph VI – Relationships between Malt and Beer. Proc. EBC Congr., Helsinki: 251–258.
- Hippeli, S., Elstner, E.F., 2002: Are hydrophobins and/or non-specific lipid transfer proteins responsible for gushing in beer? New hypotheses on the chemical nature of gushing inducing factors. Z. Naturforsch. [online]. 57c [25.6.2013]. Dostupné z: <http://www.znaturforsch.com/ac/v57c/s57c0001.pdf>
- Christian, M., Ilberg, V., Aydin, A., Titze, A., Friess, F., Jacob, F., Parlar, H., 2009: New gushing mechanism proposed applying particle size analysis and several surfactants. Monatsschr. Brauwiss. 62: 100–107.
- Christian, M., Titze, J., Ilberg, V., Jacob, F., 2010: Combined particle analysis as a new tool to predict gushing shown with alcohol-free beverage products. Brew. Sci. 63: 72–79.

for neutralization of the charge would be proportionally higher. Laboratory tests then confirmed this assumption (Christian et al., 2011).

The combined particle analysis for the measurement of gushing potential of fruit drinks confirmed that particles with sizes of 1–2 nm are the initiators of gushing in non-alcoholic beverages. This information could be interesting particularly for breweries producing beer mixed drinks (Christian et al., 2010).

When performing this analysis, the authors also found an interesting fact that the addition of the polyelectrolyte hexadecyltrimethylamoni-um (CTAC) into sparkling water (7g CO₂/l) induced over-foaming but only in case that concentration was higher than the critical micelle limit (Christian et al., 2011). Based on this knowledge, it will also be necessary to verify the micellar theory in relation to gushing precursors in beer.

5 CONCLUSION

During the last decade the problem of beer over-foaming has been studied mainly in connection with fungal contamination and looking for precursors of over-foaming. The proven gushing factors – hydrophobins – induce gushing and current research has suggested that the amphiphilic nature of these molecules can cause over-foaming by forming micellar structures. Nevertheless, in case of such a complicated matrix as beer, study of over-foaming is considerably complicated. Research into the behavior of model beer solutions depending on a fast decline in pressure could improve understanding of behavior of substances inducing over-foaming, subsequently research with real beer samples should follow.

Translated by Vladimíra Nováková

- Christian, M., Titze, J., Ilberg, V., Jacob, F., 2011: Novel perspectives in gushing analysis: A review. J. Inst. Brew. 117(3): 295–313.
- Christian, M., Titze, J., Jacob, F., Parlar, H., Ilberg, V., 2012: Latest development in research on gushing analysis – Part 2. Brauwelt Int. 4: 216–219.
- Kitabatake, K., Amaha, M., 1974: Production of gushing factor by a *Nigrospora* sp. in liquid culture media. Bull. Brew. Sci. 20: 1–8.
- Kitabatake, K., Amaha, M., 1977: Effect of chemical modifications on the gushing inducing activity of a hydrophobic protein produced by a *Nigrospora* sp. Agric. Biol. Chem. 41(6): 1011–1019.
- Kleemola, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Kotaviita, E., Olkku, J., Haikara, A., 2001: Characterisation and detection of the gushing factors produced by fungi. Proc. EBC Congr., Budapest, 12: 129–138.
- Niessen, M. L., 1993: Entwicklung und Anwendung Immunchemischer Verfahren zum Nachweis wichtiger *Fusarium* – toxine bei der Bierbereitung sowie mykologische Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) von Bieren. Ph.D. thesis, Technische Universität München.
- Pellaud, J., 2002: Gushing: state of the art. Cerevisia 27: 189–205.
- Prentice, N., Sloey, W., 1960: Studies on barley microflora of possible importance to malting and brewing quality during malting with selected microorganisms. Proc. Am. Soc. Brew. Chem.: 28–32.
- Radau, B., Linemann, A., Krüger, E., 1995: Modifizierter Carlsberg-Test (MCT). Brauerei-Forum 10: 377–378.
- Rath, F., 2009: Gushing in 2008 – trialling the “Modified Carlsberg test”. Brauwelt Int. 27: 26–29.
- Titze, J., Christian, M., Ilberg, V., Jacob, F., 2010: Particle analysis – A combined method to analyze the colloidal characteristics of particles. Brew. Sci. 63: 62–70.
- Vaag, P., Riis, P., Knudsen, A.D., Pedersen, S., Meiling, E., 1993: A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials. Proc. EBC Congr., Oslo, 24: 155–162.
- Weideneder, A., 1992: Untersuchungen zum malzverur sachten Wildwerden (Gushing) des Bieres. Ph.D. thesis, Technische Universität München.
- Wessels, J.G.H., 1996: Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. Trends in Plants Science 1(2): 9–15.
- Wessels, J.G.H., de Vries, O.M.H., Asgeirsdottir, S.A., Schuren, F.H.J., 199: Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. Plant Cell 3(8): 793–799.
- Wösten, H.A.B., Wessels, J.G.H., 1997: Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. Mycoscience 38(3): 363–374.
- Zepf, M., 1998: Gushing-Ursachenfindung anhand von Modellversuchen. Ph.D. thesis, Technische Universität München.