

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Bakalářská práce

2012

Lenka Křivská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

Příčiny přepěňování piva

Lenka Křivská

Bakalářská práce

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Křivská**
Osobní číslo: **C09134**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Příčiny přepěňování piva**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na příčiny způsobující přepěňování piva (gushing). Věnujte se vlivům kvality surovin a technologického postupu výroby piva na přepěňování piva (tzn. primární a sekundární gushing).
2. Popište a diskutujte metody stanovení obou typů "gushingu" prezentované v literatuře.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

22. června 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21.6.2012.

Lenka Křivská

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Lence Česlové, Ph.D. za vedení v průběhu jejího vypracování a za její rady a připomínky.

Chtěla bych také poděkovat své rodině, přátelům a spolužákům za podporu během studia na této vysoké škole.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je věnována gushingu nebo-li samovolnému přepěňování piva, které se projevuje jako spontánní přepěnění ihned po otevření pivní láhve. Gushing je i přes intenzivní výzkum problémem v pivovarnictví po celém světě. V první části práce je popsán mechanismus tvorby bublin a teorie mechanismu gushingu. Dále jsou zde shrnuty příčiny primárního a sekundárního gushingu. Další část popisuje vliv technologie výroby piva na gushing možnosti jeho potlačení. Poslední část je věnována analytickým metodám měření gushingu a jeho předvídání.

Klíčová slova: gushing, hydrofobiny, přepěňování, příčiny gushing

TITLE

Causes of beer gushing

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on gushing of beer, which is manifested as a spontaneous overfoaming immediately after opening a bottle of beer. Gushing is still a problem for brewing industry worldwide, despite intensive research of recent decades. The first part of this thesis describes the mechanism of bubble formation and theory of the gushing mechanism. Further the causes of primary and secondary gushing are summarized. Next part describes the impact of technology on the gushing and the possibilities of gushing suppression. The last part is dedicated to the analytical methods and measurements of the gushing and its prediction.

Keyword: gushing, hydrophobins, overfoaming, causes of gushing

OBSAH

1 Úvod	11
2 Pivní pěna	12
2.1 Fyzikálně-chemický popis pěny její tvorby	12
3 Princip gushingu	16
4 Příčiny způsobující přepěňování piva	17
4.1 Primární Gushing	17
4.1.2 Hydrofobiny	18
4.1.3 Mykotoxiny	23
4.2 Sekundární gushing.....	25
4.2.1 Šťavelany	25
4.2.2 Chmelové extrakty	26
4.2.3 Oxid uhličitý.....	28
4.2.4 Kovové ionty	28
4.2.5 Tenzidy.....	28
4.2.6 Vliv pivní láhve.....	29
5 Vliv technologie piva na gushing	29
5.1 Obsah hydrofobinů	30
5.2 Obsah šťavelanů.....	31
6 Vliv kvality vstupních surovin	32
7 Redukce gushingu	33
8 Metody stanovení	35
8.1 Stanovení kyseliny šťavelové	35
8.2 Analýza mykotoxinů.....	35
8.3 Stanovení hydrofobinů.....	35
8.4 Gushingové testy.....	36
8.4.1 Metoda podle VÚPS	37
8.4.2 Carlsberg test.....	37
8.4.3 Modifikovaný Carlsberg test (MCT).....	37
8.4.4 Weihenstephaner test (WT).....	38
8.5 Manometrická metoda	38
8.6 DLS	39

9 Závěr.....	41
10 Literatura	42

SEZNAM POUŽITÝCH ZNAČEK

CDS	Kritický průměr (Critical Diameter Size)
DLS	Dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering)
DON	Deoxynivalenol
ELISA	Enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ES	Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
FBH	Fusariové vadnutí klasů (Fusarium Head Blight)
HMW	Vysoká molekulová hmotnost (High Molecular Weight)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LMW	Nízká molekulová hmotnost (Low Molecular Weight)
MSI	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization)
MCT	Modifikovaný Carlsberg test
MEBAK	Středoevropská pivovarská analytická komise (Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission)
NRW	Jeden z typů pивní láhve o parametrech- 520 ml skutečný objem, hmotnost 380 g, výška 260 mm a průměr 67,5 mm
ns-LTP	Nespecifický protein pro přenos lipidů (non-specific Lipid Transfer Protein)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RIA	Radioimunologická analýza (Radio Immuno Assay)
RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi

SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
TOF	Analyzátor doby letu (Time of Flight)
UV	Ultrafialové záření
VÚPS	Výzkumný ústav pivovarský a sladařský

1 ÚVOD

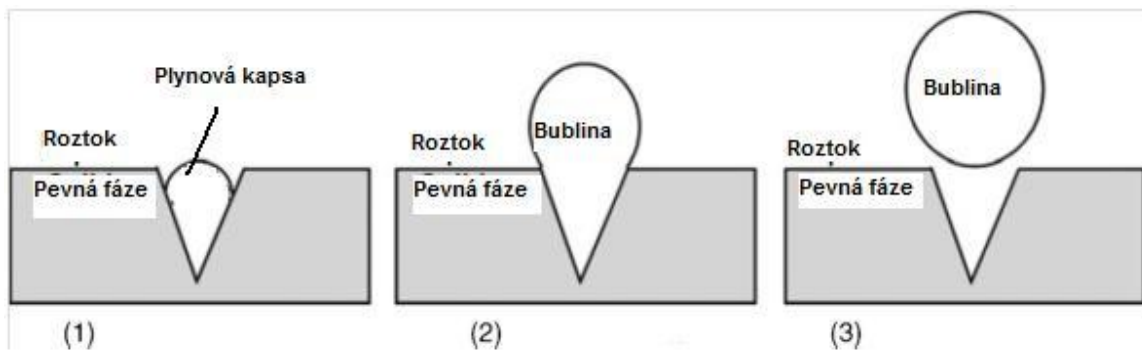
Tato bakalářská práce je věnována celosvětovému problému, kterým je gushing, nebo-li samovolné přepěňování piva. Tento jev byl poprvé pozorován v roce 1909 Kastnerem. Hlavním důvodem proč tomuto jevu byla dále celosvětově věnována pozornost je, že působí ekonomické ztráty pivovarům a má také špatný vliv na spotřebitele. Gushing se popisuje jako samovolné přepěňování piva v podobě spontánně se chrlící pěny, ke kterému dochází ihned po otevření pivní lahve bez předchozího třepání. Toto prudké, samovolné a nadměrné přepěnění zpravidla ustává po několika sekundách. Vyskytuje se sporadicky a nelze jej s jistotou předpovídat. Gushing se objevuje u všech druhů piv, nezávisle a sporadicky. Nejčastěji však po teplých a vlhkých létech, což je úzce spjato s napadením sladovnického ječmene toxinogenními houbami, které mají ideální podmínky pro rozmnožování. Tyto toxinogenní plísňe vylučují specifické látky způsobující přepěnění výsledného piva. Gushing je komplexní jev vyvolaný různými faktory ve výrobním procesu a především vstupními surovinami. Postup, kterým by se zabránilo tomuto nežádoucímu jevu, zatím není znám. Existují však opatření, kterými můžeme zabránit, nebo alespoň minimalizovat přepěňování, např. tím, že se posuzuje kvalita surovin před jejich zpracováním. V současné době se zkoumají prostředky a technologické zásahy, které vedou ke snížení nežadoucího gushingu. Dále se zkoumá mechanismus děje, který by byl následně užitečný pro rozvoj metod pro primární prevenci přepěňování u piva. Dalším výzkumným záměrem je vyvinout metodu, která by mohla předpovědět gushing ve výsledném pivu.

2 PIVNÍ PĚNA

Pivní pěna je nedílnou součástí piva. Pro piva českého typu "spodně kvašená" je charakteristická vysoká, bohatá a stálá pěna, která je jedním z významných kvalitativních spotřebitelských znaků. Působí nejen esteticky, ale má také fyziologický vliv, neboť stimuluje chuť k jídlu, hasí žízeň a udržuje déle pivo svěží a karbonizované [1]. Snaha o dosažení stabilní pěny a zlepšení jejich kvalitativních vlastností se datuje již od středověku. Výsledná podoba je složitým souhrnem řady faktorů. Patří sem např. přítomnost lipidů, bílkovin, kovů, ale také technologické postupy během výroby. Při pozorování pěny se sleduje řada vlastností - stabilita, pěnivost, výška pěny, její tvar, struktura, barva, rychlost rozpadu, ulpívání na stěně sklenice a stabilita pěny od jejího vzniku až do objevení tzv. lysinky. Pěnivostí se rozumí schopnost piva vytvářet pěnu při nalévání, která je ovlivněna obsahem oxidu uhličitého v pivu [2,3].

2.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝ POPIS PĚNY JEJÍ TVORBY

Z fyzikálně - chemického hlediska je pěna charakterizována jako disperse plynu v kapalině, přičemž dispergovanou fází je plyn. Díky nízké povrchové tenzi piva se tvoří menší a jednotné bubliny, což ve finále tvoří krémovitý charakter pěny [3]. Tvorba pěny se rozděluje na 4 základní kroky - tvorbu bublin, odvodňování pěny, její koalescenci a disproportionaci. Tvorba bublin je proces skládající se ze tří kroků: tvorba bubliny, růst bubliny a oddělení bubliny (Obr. 1) [4]. Při odvodňování pěny dochází ke ztrátě kapaliny vlivem gravitace a podtlaku. Dochází ke ztenčování kapalinových filmů mezi bublinami vlivem vzniklého nižšího tlaku v hraničních vrstvách oproti tlaku uvnitř bubliny a v kapalinovém filmu. Při prasknutí filmu dojde ke spojení dvou bublin v jednu tento jev je popisován jako koalescence. Difuze plynu z menších bublin do větších se nazývá disproportionace. K tomuto jevu dochází díky menšímu tlaku, přítomnému ve větších bublinách [3].



Obr. 1: Proces pění na rozhraní pevné fáze a roztoku- 1. tvorba bubliny, 2. růst bubliny, 3. oddělení bubliny

Bublínky CO_2 se tvoří během fermentace heteronukleací na pevných částecháčkách suspence a mikrotrhlinách na zdech fermentoru, ale netvoří se na buněčných stěnách kvasinek, které jsou hydrofobní. V hotovém pivu dochází k tvorbě (nukleaci) bublin za přítomnosti částec, vláken nebo na plynem vyplněných škrábancích na skleněných plochách láhve [4-6]. Mechanismus heterogenní nukleace je tvorba bublin z přesyceného nápoje oxidem uhličitým v tzv. nukleačních (katalytických) polohách – to znamená, že bublinky nevznikají samovolně, ale tvoří se již na existující bublině, nebo se mohou vytvořit v tzv. nukleační poloze, do které patří plynem vyplněné trhliny [4,5]. Existují 4 typy nukleace v roztoku [4,7].

- První tzv. klasická homogenní nukleace (Obr. 2) nastává v homogenním roztoku. Bublínky se produkují ve velkém množství při velkém přesycení 100 ATM a více [4,8].



Obr. 2: Klasická homogenní nukleace

- Druhým typem je klasická heterogenní nukleace (Obr. 3). U tohoto typu je nutná přítomnost cizího materiálu nebo dutin na povrchu nádoby ve velkém množství. Bublínky se vytváří např. při náhlém snížení tlaku, což odpovídá klasické nukleaci.

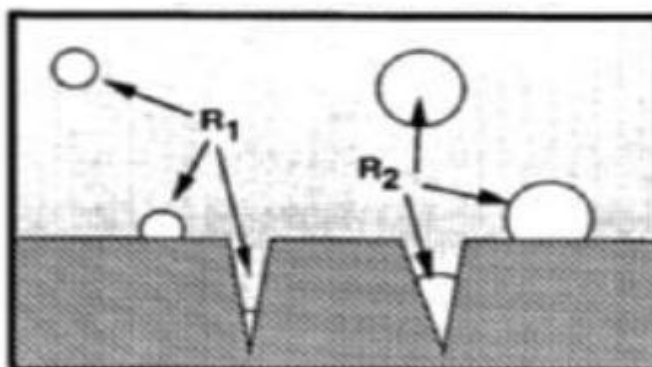
Bublina se může tvořit na povrchu obalů ve škrábancích, na molekulárně hladkém povrchu nebo na větších částicích. Vytvoření první bubliny odpovídá heterogenní nukleaci [4,8].



Obr. 3: Klasická heterogenní nukleace

- Třetím typem je semiklasická nukleace (Obr. 4). Tento typ zahrnuje homogenní a heterogenní nukleaci na již existující bublině v dutině na povrchu nádoby nebo na povrchu suspendované částice. Pro každou dutinu existuje konečná nukleační energetická bariéra, kterou je nutné překonat. Za zahájení nukleace jsou také odpovědné lokální výkyvy v přesyceném prostředí. Hlavním rozdílem oproti heterogenní nukleaci je v tom, že nukleace je dosažitelná i při nízkých úrovních přesycení tzv. bublina se u semiklasické nukleace vytvoří dříve než by se vytvořila při heterogenní nukleaci [4,8].

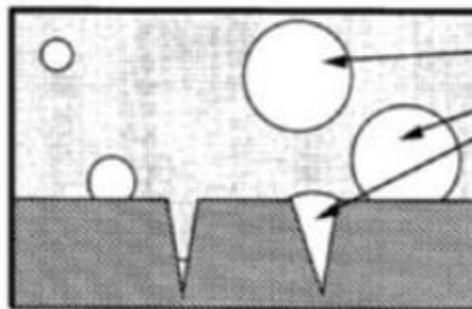
Před přesycením (s předem existujícími vzduchovými prohlubeninami)



Obr. 4: Semiklasická nukleace

- Čtvrtým typem je neklasická nukleace (Obr. 5). Tento typ nukleace není považován za klasický, protože není nutné překonat žádnou energetickou (aktivační) energii. Nukleace obvykle nastane v již existující plynové dutině na povrchu nádoby nebo na jiném místě v roztoku, může následovat po heterogenní nebo semiklasické nukleaci. Dutina s větším poloměrem než je kritická hodnota nukleace je stabilním a stálým místem pro tvorbu bublin. Když klesne přesycením, kritický poloměr nukleace se postupně zvětší na hodnotu rovnající se poloměru dané dutiny, tvorba bubliny z této dutiny se ukončí a vytvoří se protáhlý krk a ten se po chvíli utrhne a tím se bublina uvolní. Poté následuje tvorba další bubliny. Tento typ nukleace je zodpovědný za zachování tvorby bublin v sycených nápojích i dlouho po otevření láhve nebo po nalití do sklenice [4,8].

Po přesycení



Obr. 5: Neklasická nukleace

3 PRINCIP GUSHINGU

Proces gushingu si můžeme představit jako děj, při kterém po otevření láhve nebo jiného obalu dojde k náhlému samovolnému uvolňování a nárůstu bublinek CO_2 (Obr. 6). CO_2 je nepostradatelnou součástí piva (obsah je průměrně 4-5g/l). Hotové pivo je přesyceno z 200 % a tak není žádné překvapení, že po otevření láhve pivo částečně přeteče. Podstatou nežádoucího jevu zvaného gushing je náhlé, masivní a neočekávané uvolnění CO_2 ihned po otevření láhve. Tento jev lze pozorovat i u jiných sycených nápojů nejenom u piva [3,5].



Obr. 6: Ukázka gushingu

Homogenní nukleace nastává pouze v přesycených roztocích a protože vyžaduje vysokou hladinu oxidu uhličitého, je její výskyt v pivu nepravděpodobný [4]. Přepěnění většinou vzniká heterogenní nukleací, která souvisí s již existujícími mikrobublinami v pivu. Bubliny s poloměrem menším než je kritický průměr (CDC) zmizí a větší dále rostou. Když se při růstu těchto bublin otevřena láhev uvolní se tlak a mikrobubliny explodují. K této tvorbě významně přispívají látky s hydrofobní povahou tzv. hydrofobiny [6,8].

4 PŘÍČINY ZPŮSOBUJÍCÍ PŘEPĚŇOVÁNÍ PIVA

Pivo je nápoj obsahující široké spektrum látek pocházejících z použitých surovin, technologického zařízení nebo jsou součástí některých přidaných látek. Řada z nich má na pěnivost piva pozitivní a řada z nich negativní vliv [2,3]. Velký vliv na tvorbu pěny má kvalita vstupních surovin jako je slad, chmel a voda. Dále závisí na technologii zpracování těchto surovin a na vnitřní struktuře a stáří pivních lahví a na používání detergentů při jejich mytí [4,5].

Gushing je rozdělen do dvou skupin, na primární a sekundární [5]. Primární gushing souvisí s plíšňovým napadením sladu a látkami, které tyto plísně produkují. Sekundární gushing nesouvisí s kvalitou sladu, ale je způsoben chybami během výrobního procesu, nesprávným zacházením s pivem a látkami obsaženými v pivu (šřavelany, vysoká koncentrace těžkých kovů nebo izomerované chmelové extrakty) [2,5].

4.1 PRIMÁRNÍ GUSHING

Ječmen nebo slad jako příčina gushingu je známa již řadu let. Důvodem byla epidemie gushingu v Severní Americe, Jižní Americe a Evropě, která byla spojena se specifickými odrůdami a obdobím pěstování. Později se přišlo na to, že příčinou je mikroflóra přítomná na obilí. Periodické opakování těchto procesů přispělo ke zvýšení pozornosti k tomuto jevu [5].

Důvodem primárního gushingu je napadení sladovnického ječmene toxinogenními plísněmi rodu *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Nigrospora* aj. Za nebezpečnou plíseň se považuje hlavně *Fusarium* (Obr. 5) [10]. Plísň se nacházejí jak ve vegetativních tak i v reprodukčních orgánech a způsobují vadnutí a úhyn rostlin, u cereálií poškození klasu a následně i zrna [5,10]. Tyto plísně produkují do svého okolí mykotoxiny, což jsou jejich sekundární metabolity. Množství produkce závisí na druhu a kmenu plísně, stupni kontaminace, používání fungicidů a také na vlivu prostředí, např. na teplotě nebo aktivitě vody [9,11].

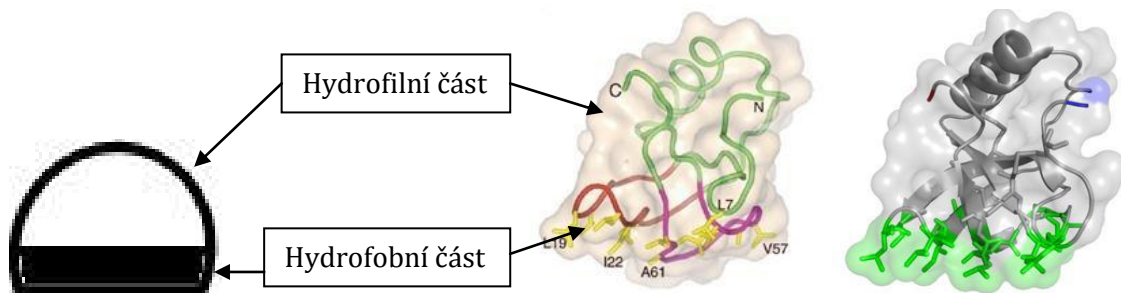


Obr. 5: Plísňové napadení ječmene rodem *Fusarium*

Plísně produkují i další metabolity, které po chemické stránce řadíme mezi polypeptidy nebo proteiny s hydrofobní povahou, tzv. hydrofobiny. Vztah mezi produkcí mykotoxinů a hydrofobinů nebyl nalezen. Proto není možné předpovědět míru gushingu analýzou mykotoxinů, avšak přepěnění piva může být signálem jejich přítomnosti [5].

4.1.2 HYDROFOBINY

Hydrofobiny (Obr. 6) jsou z hlediska gushingu nejaktivnější ze všech známých povrchově aktivních biologických molekul. I velmi malé množství těchto látek v řádech ppm a menších dokáže v pivu vyvolat nežádoucí přepěnění [4,5,12]. Hydrofobiny pocházejí ze sladu napadeného plísněmi. Mezi kmeny produkující hydrofobiny patří především *Fusarium*, ale také *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Produkce hydrofobinů je přímo úměrná s mírou plísňového napadení ječmene [12-14]. Nachází se v buněčných stěnách a zapojují se do vytváření hydrofobních struktur, jako jsou hyfy, spory a fruktifikační orgány [5].

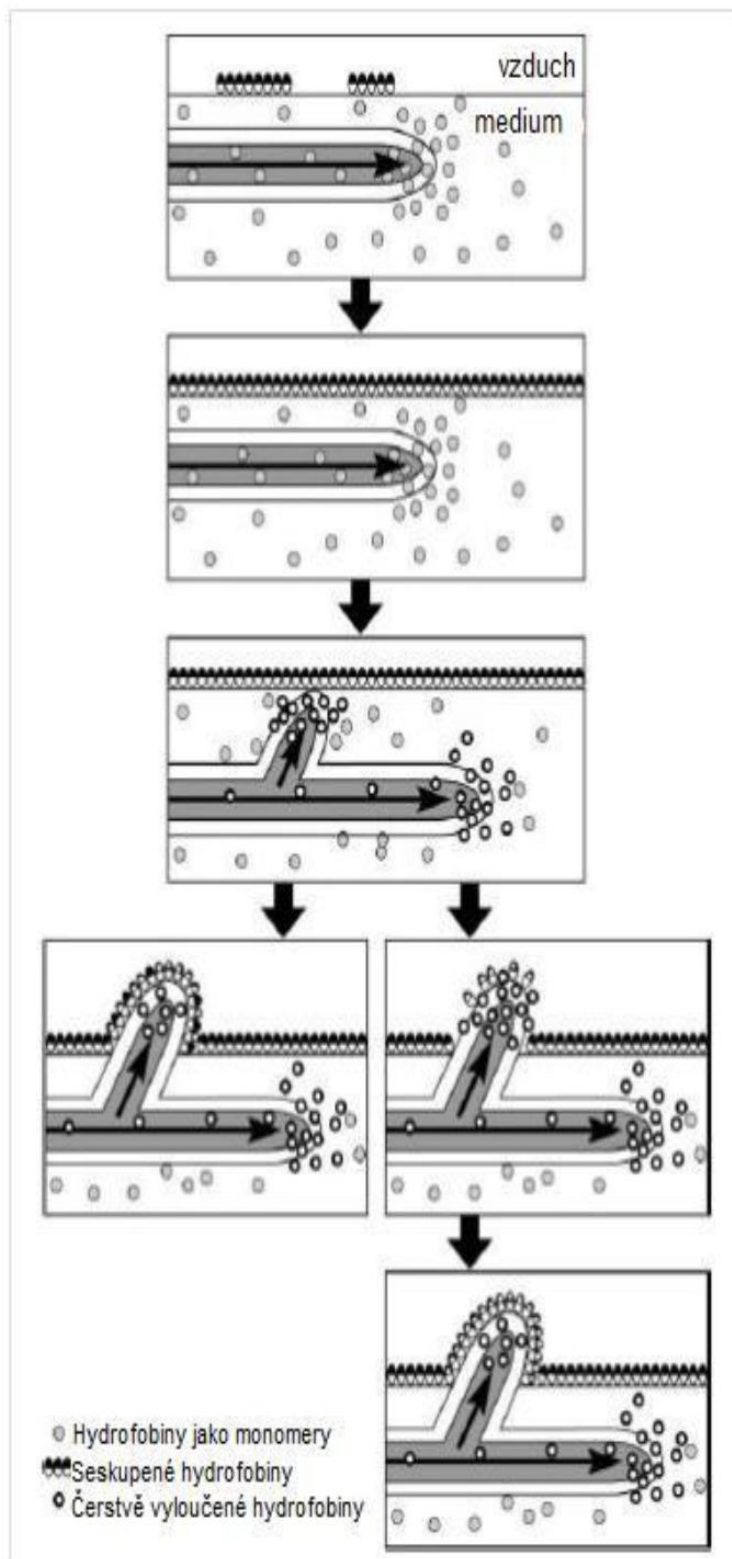


Obr. 6: Struktura hydrofobinů

U plísní plní hydrofobiny řadu důležitých funkcí jako je růst na vzduchu a uchycování na pevné povrchy (Obr. 7) [4,5]. Byl navržen model růstu plísní na vzduchu, který obsahuje následující kroky - po ponoření mycelia do živného roztoku začíná plíseň vylučovat monomerní hydrofobiny do okolního média. Monomery se shromažďují na rozhraní vzduch - médium což mimo jiné vede k poklesu povrchového napětí vody. Při dalším růstu hyf dochází k jevu, kdy se tyto hyfy potáhnou monomery hydrofobinů a ty se poté dostanou z vodného prostředí na vzduch. Díky vrstvě hydrofobinů nepřijdou do přímého styku se vzduchem. Může ale dojít i k protržení membrány tvořené hydrofobiny a plísně se dostanou do kontaktu se vzduchem.

Vrstva hydrofobinů vytváří na povrchu hyf rozhraní tvořené hydrofobní a hydrofilní částí. Hydrofilní strana filmu je v kontaktu s hydrofilní buněčnou stěnou, zatímco hydrofobní strana obaluje vnější část a je v kontaktu se vzduchem. Díky této vnější hydrofobní vrstvě jsou plísně chráněny proti vysychání a navlhnutí. Hydrofobiny také hrají roli ve výživě. Přítomnost této vrstvy dovoluje plísním přijímat jen určité živiny z prostředí a zabraňuje úniku živin z buněk. Principem je, že dovolují malým molekulám (do 10000 Da) přecházet z hydrofobní strany do části hydrofilní a naopak zabraňuje molekulám o velikosti 300-10000 Da unikat z hydrofilní části. Tato skutečnost je významná pro růst plísní. U patogenních druhů plísní mohou tyto povrchově aktivní vlastnosti sloužit k upevnění na svých hostitech [4].

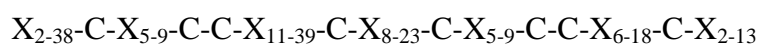
Hydrofobiny mohou být uvolněny do okolního životního prostředí plísně. Přejed z ječmene do piva závisí na jejich rozpustnosti a tepelné stabilitě. Zde se díky své mimořádné povrchové aktivitě hromadí na hydrofobně/hydrofilních rozhraních a shromažďují se do vysoce organizovaných struktur. Látky zvané hydrofobiny mají tu vlastnost, že vytváří povrchové filmy na fázovém rozhraní, které jsou tvořeny molekulami samotných hydrofobinů a roztoku [12,15]. Mění se hydrofobní povrchy na hydrofilní a naopak a ve finále látka funguje jako emulgátor pěny [3,4].



Obr: 7: Role hydrofobinů při růstu plísni na vzduchu

Hydrofobiny (Obr. 6) jsou povrchově aktivní proteiny produkované plísněmi s molekulovou hmotností mezi 7 až 20 kDa a s kulovitým tvarem o průměru 2-3 nm.

Z hlediska chemie jsou složeny z cca 100 (± 25) hydrofilních, hydrofobních a neutrálních aminokyselin a 4 cysteinových zbytků, které tvoří 4 intramolekulární disulfidické můstky. Přítomností této struktury a vazeb se molekula akumuluje do velmi stabilní a kompaktní struktury. Díky této skutečnosti hydrofobiny odolávají změnám pH a teplotním výkyvům. Jsou velmi odolné vůči denaturaci při vysokých teplotách (až 90°C). Aminokyseliny tryptofan a thyrosin hydrofobiny neobsahují. Methionin a histidin chybí jen u některých hydrofobinů. I přes společný hydrofobní charakter nemají všechny hydrofobiny stejnou sekvenci. Obecná sekvence aminokyselin v hydrofobinech je následující [4,5]:



kde C=cystein; X= některý druh aminokyseliny.

Na základě rozpustnosti a jejich struktury se rozdělují do 2 skupin (třídy I a II). Hydrofobiny třídy I jsou rozpustné v silných kyselinách např. trichloroctová kyselina, kyselina mravenčí a po odstranění kyseliny získávají zpět svoji funkci. Strukturně vytváří tyčinky o průměru 5-12 nm. Tyto struktury hrají významnou roli v mnoha morfogeneziích např. tvorba spor nebo vývoji fruktifikačních orgánů. Hydrofobiny třídy II jsou rozpustné v organických rozpouštědlech nebo horkém dodecyl sulfátu sodném (2% SDS). Jsou uspořádány do vysoce uspořádaných pravidelných filmů a krystalických fibrilů. Sekundární struktura je nejčastěji tvořena β -listy a dále se může vyskytovat jako α -helix [5]. Přítomnost obou skupin je nezbytná a podílí se na pění. Pěnicí schopnost je silnější u hydrofobinů třídy II než třídy I. Gushing je způsoben pouze hydrofobiny třídy II [4].

Z pěnivostních bílkovin s ovlivněním gushingu můžeme mezi hydrofobiny zařadit polypeptid - intracelulární přenašeč lipidů LTP1 (Lipid Transfer Protein) [3,4]. Z důvodu své hmotnosti (9660 Da) je řazen do LMW (Low Molecular Weight) skupiny pěnivostních bílkovin. Charakterizována je jako albuminová bílkovina a jedná se o obranný protein v ječmeni vylučovaný při nepříznivých podmínkách především ve vlhkém růstovém prostředí [4]. Uvádí se, že obsah LTP1 koreluje s množstvím vytvořené pěny. Další vlastností izolované LTP1 je vynikající schopnost generovat pěnu, ale slabší schopnost stabilizace pěny [3,5]. Stabilizační schopnost je vyšší ve spojení LTP1 s izolovanou LMW hordein-glutelinovou pěnovou frakcí [3,5] nebo s HMW (High Molecular Weight) frakcí obsahující protein Z [5]. Charakteristické u této bílkoviny je její téměř okamžitá extrakce během rmutování a to činí její nezávislost na použité technologii sladování a rmutování. Během chmelovaru dochází ke změnám ve struktuře a vzniká více forem modifikované LTP1. Vzniklé formy mají stejnou sekvenci aminokyselin a vykazují převážně lepší

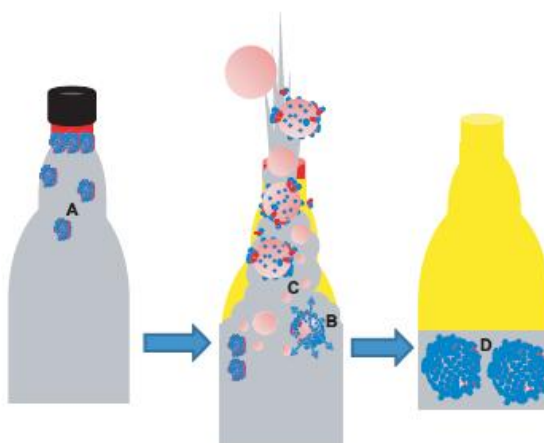
pěnovostí vlastnosti, avšak liší se ve struktuře, isoelektrickém bodě a molekulové hmotnosti (9600 až 9900 Da) [3].

4.1.2.1 Hydrofobiny a gushing

Pro projevení jejich gushingové aktivity je nezbytná přítomnost bublinek oxidu uhličitého se kterými hydrofobiny vytváří tzv. nanobubliny. Tyto nanobubliny usnadňují tvorbu bublinek [6,13]. Bez přítomnosti hydrofobinů se bublinky zcela rozpouští, protože není přítomen žádný prostředek, který by je stabilizoval. Nanobubliny vznikají naadsorbováním hydrofobinů na bublinky oxidu uhličitého a vytvoří se hydrofobně-hydrofilní vrstva kolem bubliny oxidu uhličitého. Vzniklá nanobublina se stává vysoce stabilní. Vrstva hydrofobinů zabraňuje úplnému rozpuštění bubliny oxidu uhličitého a dovoluje jí zvýšit kritický průměr (CDC) [6,12,15]. Nanobubliny mohou být tvořeny sycením, třepáním, plněním nebo mikrokavitací [7].

Vzniklé nanobubliny jsou silnými iniciátory nukleace. Mechanismus gushingu předpokládá, že nanobubliny jsou jednoduše “nanobomby” v uzavřené nádobě určitého kritického průměru, který závisí na tlaku přítomném v lahvi. Po otevření obalu parciální tlak oxidu uhličitého vyvolá natlakování bublin, tento šok vyvolá energii potřebnou k překonání kritického průměru a nápoj přepění (Obr. 8) [7].

Vznik vyžaduje určitou dobu, která je nutná ke zhroucení nanobubliny od doby, kdy je nanobublina pokryta a stabilizována vrstvou hydrofobinů. Doba potřebná k projevení gushingu je 3 týdny od naplnění lahve až po dobu 2 let [6].



Obr. 8: Princip vzniku gushingu

4.1.3 MYKOTOXINY

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované plísněmi. Určitý mykotoxin mohou produkovat různé rody plísní a určitý druh plísně může produkovat i více mykotoxinů [16]. Tyto látky mají negativní biologické účinky (např: mutagenní, karcinogenní, teratogenní apod.) a dále zpomalují růst kvasinek během výroby piva, proto jsou považovány za jednu z možných příčin gushingu [17]. Dosud bylo popsáno více než 300 mykotoxinů, které se dělí do skupin na:

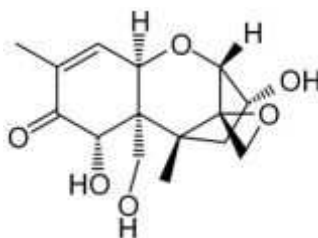
- Aflatoxiny
- Ochratoxiny
- Patulin
- Fusariové toxiny
- Cytochalasin [16]

Mezi nejvýznamnější plísně napadající ječmen patří *Fusarium graminearum*, *F.culmorum*, *F.avenaceum*, *F.poa*e, *F.tricinatum*. Za plísňové onemocnění ječných sladů je považováno fusariové vadnutí klasů (Fusarium head blight-FHB). FBH je příčinou ekonomických ztrát vyplývajících z poklesu výnosu, nutriční a technologické jakosti. Základním faktorem ovlivňujícím napadení fusárií jsou klimatické a povětrnostní podmínky prostředí, které hrají roli ve všech stupních vývoje. Teplotní podmínky mají vliv na sporulaci, která ovlivňuje přežití fusárií na posklizňových zbytcích. Mírné zimy podporují sporulaci, zatímco suché a chladné počasí na podzim a v zimě sporulaci zabraňuje. Jarní klimatické podmínky ovlivňují typ, kvalitu a dobu rozšíření spor. Když se doba šíření shoduje s dobou květení, následky mohou být rozsáhlé. V letním období poté dochází k rozšiřování plísní a produkci mykotoxinů [18,19].

Hlavní skupinou mykotoxinů produkovaných *Fusarium spp.* jsou látky zvané trichocény, zealeron, fumosiny a kyselina fusarová. Nejvýznamnější jsou zastoupeny trichothecenové deriváty - deoxyvalenol (DON), nivalenol (NIV) a T-2 toxin [9]. Další skupinu představuje zealeron a jeho deriváty, u nichž byly prokázány estrogení účinky. Tyto látky jsou velmi tepelně i chemicky stabilní a po napadení sladovnického ječmene přechází až do piva, kde mohou být jednou z možných příčin přepěňování [11,17,20].

4.1.3.1 Deoxyvalenol

Deoxyvalenol (Obr. 9) patří mezi významné zástupce mykotoxinů trichothecenové skupiny se sekviterpenoidní strukturou, který je produkován plísněmi rodu *Fusarium* (např. *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*) a je pravděpodobně nejčastější a nejvýznamnější mykotoxin kontaminující potraviny a krmiva, které jsou vyrobeny z obilovin [9].



Obr. 9: Strukturální vzorec deoxyvalenolu

Mezi negativní toxikologické účinky na lidský organismus patří akutní střevní potíže a zvracení [16,18]. Nejvyšší přípustný hygienický limit platný v EU pro jeho obsah nesmí překročit $1250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ v nezpracovaných cereáliích [21]. Deoxyvalenol (DON) patří mezi inhibitory proteinové syntézy, a tudíž může potenciálně ovlivňovat i proces klíčení sladu. Vyskytuje se často s dalšími mykotoxiny nivalenolem, diacetoxyscirpenolen a toxinem T-2, ale v mnohem vyšší koncentraci [23].

Obsah DONu v ječmeni ovlivňují agrotechnické postupy, odrůda i pěstitelská oblast [11]. Vztah mezi obsahem v ječmeni a sladu je různorodý a závisí na odrůdě ječmene a na technologických podmínkách skladování především na relativní vlhkosti. Během výroby piva přechází z kontaminovaného ječmene do sladu a poté do sladiny [18].

Mezi vlivem koncentrace DONu na gushingový potenciál nebyla nalezena žádná korelace, ale bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací lze očekávat i vyšší gushingový potenciál [5]. Obsah DONu se může zvýšit v průběhu máčení, klíčení a na počátku hvozdění sladu, kdy jsou nastoleny ideální podmínky pro růst plísní a další produkci mykotoxinů. Na druhou stranu i při máčení může dojít k poklesu obsahu DONu a to z důvodu jeho vyloučení do máčecí vody.

V průběhu hvozdění dochází ke zničení mycelia a zastavení produkce DONu, nikoliv však k jeho odstranění či degradaci na netoxické degradační produkty. Během rmutování dochází obvykle k odstranění 80-95 % DONu. Díky vysoké tepelné stabilitě může DON přecházet do dalšího meziprojektu, avšak zde jeho koncentrace klesá osmi až

desetinásobně z důvodu ředění. Ve výsledných komerčně prodávaných pivech nebyl DON detekován a pokud ano, jeho koncentrace se pohybovala v řádech 5-20 ppb [18].

4.2 SEKUNDÁRNÍ GUSHING

Sekundární gushing je méně problematickou příčinou gushingu. Je vyvolán přítomností kovových iontů, látek pocházejících z chmele, krystaly šťavelanu vápenatého, zbytky čisticích prostředků používaných k mytí lahví, strukturou vnitřního povrchu lahví a přebytkem oxidu uhličitého v pivní lahvi [2].

4.2.1 ŠŤAVELANY

Sledováním obsahu šťavelanů v pivovarských surovinách se získávají potřebné informace o jejich případném vlivu na přepěňování. Šťavelany se dělí podle rozpustnosti na ve vodě rozpustné a nerozpustné. Nebezpečí představují především krystalky šťavelanu vápenatého, které mohou tvořit centra pro lavinovité uvolňování oxidu uhličitého [2]. Na povrchu těchto krystalků ulpívají zbytky plynů CO₂ a slouží jako kondenzační jádra, která přispívají k dalšímu nárůstu bublin CO₂ a která při určité koncentraci způsobí přepěnění [2,15].

Šťavelany pochází především ze sladu, jehož jsou přirozenou součástí. Jejich přítomnost v pivu je ovlivněna jejich obsahem ve sladu, ale vliv má také ročník a odrůda ječmene, i když tento vliv není příliš významný [2,24]. Obsah v ječmeni se pohybuje v rozmezí 37-61 mg.kg⁻¹ sušiny. Ječný slad obsahuje 10-20 mg kyseliny šťavelové na 100 g sladu, což odpovídá 25-32 mg.l⁻¹ mladiny. Výsledný obsah v pivu se pohybuje v rozmezí 4-32 mg.l⁻¹. Zde může způsobit zvláště ve formě šťavelanu vápenatého tzv. “oxalátový zákal” a gushing [2,24].

Vápník pochází převážně z varní vody, ale je také obsažen ve sladu. Obsah vápníku ve sladu se pohybuje v rozmezí 15-25 mg na 100 g sladu, v mladině už je více než 25 mg.l⁻¹. Dalším zdrojem vápníku je pivovarská varní voda. V pivu se obsah pohybuje v rozmezí 4-35 mg.l⁻¹. Dále může vápník pocházet z křemeliny, což je práškový filtrační materiál přírodního původu složený především z SiO₂. Obsah vápníku v křemelině bývá 0,5-1,5 % (udávaný jako oxid vápenatý) [2].

Pro zabránění pozdějšímu vzniku gushingu se v praxi používá přídavek chloridu nebo síranu vápenatého do vystírky nebo i částečně do mladiny a vyslazovací vody. To způsobí vysrážení šťavelanu vápenatého do formy krystalů, které jsou poté odstraněny filtrací. Toto srážení by se mělo co nejvíce urychlit před filtrací. Jinou možnost nabízí výběr sladu s nízkým obsahem vápníku nebo náhrada přírodního chmele chmelovým extraktem, který neobsahuje vápník. Z technologických postupů zabraňujících gushingu je použití studeného a dlouhého dokvašování, při němž se šťavelan vápenatý může vysrážet již v ležáckém sklepe. Snížení obsahu vápníku ve filtrovaných pivech je možné tzv. sekundárním kvašením v lahvích [4,25].

4.2.2 CHMELOVÉ EXTRAKTY

Pro pivovarské účely se využívá pouze samičích rostlin chmele otáčivého (*Humulus lupulus*), protože mají žlázy lupulinu, které obsahují pivovarsky cenné látky. Chmel je důležitý ze sensorického hlediska tím, že dává pivu hořkost [2]. V pěně se vyskytují převážně iso- α -hořké kyseliny, isohumulon, isokohumulon a isoadhumulon, které vznikají izomerací α -kyselin při chmelovaru. Dále jsou přítomny oxidované, hydrogenované či hydrolyzované formy iso- α -hořkých kyselin. Oxidované formy vznikají především při chlazení horké mladiny a mají slabší hořkost [3]. Chemické složení chmele závisí na odrůdě, pěstitelské oblasti, způsobu posklizňové úpravy, podmínkách skladování atd. Obecný obsah jednotlivých složek je uveden v Tabulce 1 [2]. Pro pivovarské využití jsou významné tyto 3 skupiny látek: chmelové pryskyřice, chmelové silice a polyfenoly [2,22].

Chmel se používá jen výjimečně, častěji se používají chmelové výrobky. Chmelové výrobky se používají z důvodu nízkého využití cenných pivovarských složek chmele a chemické nestálosti těchto složek. Chmel lze zpracovávat mechanickými, fyzikálními úpravami a chemickými postupy. Mechanicky se připravují granulované (peletované) chmele. Většina produkce chmelových extraktů je založena na extrakci ethanolem nebo oxidem uhličitým. U ethanolového extraktu se vyrábí čistý pryskyřičný extrakt nebo směs pryskyřičného a tříslovinného extraktu jako standardizovaný extrakt o určité koncentraci α – hořkých kyselin. CO₂ extrakt obsahuje velmi malé množství polárních látek z chmele (polyfenoly, dusičnany), protože oxid uhličitý z hlediska charakteru rozpouštědla patří do nepolárních rozpouštědel. Chemickými postupy se vyrábějí speciální izoextrakty a izopelety, u kterých jsou předem uskutečněny chemické změny probíhající jinak při chmelovaru [22].

Tabulka 1: Chemické složení chmele

Složka	Obsah složky (%hmotn.)
Voda	10-11
α -hořké kyseliny	2-12
β -hořké kyseliny	2-10
Chmelové silice	0,5-2
Lipidy a vosky	2-4
Proteiny	12-18
Polyfenoly	2-5
Celulosa	40-50
Pektiny	1-2
Minerální látky	7-9

Chmel obsahuje látky, které podporují nebo redukuje gushing [26-28]. Přítomnost polyfenolů (zejména anthokyanů) má podporující vlastnosti. Se zvyšujícím se obsahem polyfenolů docházelo ke zvýšenému přepěnění při provádění MCT [26].

Další látka, u níž byl zkoumán vliv na gushing je linalool (3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol) (Obr. 10). Linalool patří mezi chmelové silice a je součástí chmelového oleje. Z chemického hlediska patří mezi volné terpenové alkoholy [2]. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací linaloolu se snižuje tendence ke gushingu [26,28]. Po přidání 50 $\mu\text{g/l}$ linaloolu došlo k poklesu přepěněného objemu o 50 % oproti láhvi, kde linalool nebyl. Po následném zvýšení koncentrace na 100 $\mu\text{g/l}$ došlo k poklesu o 60 % [28]. Inhibiční účinky na gushing vykazují také polynenasycené mastné kyseliny [5].



Obr. 10: Chemický vzorec linaloolu

Od roku 1970, kdy se začaly používat izomerované chmelové extrakty (isohumulony) bylo sledováno zvýšené přepěňování piva. V této době byly proto považovány za největšího původce sekundárního gushingu. Později byla za silného promotora označena dehydratovaná kyselina humulonová (DHA). Podpurná schopnost je připisována dále isohumulonům, které vznikají izomerací z humulonů při reakcích ve výrobních procesech. Tetrahydro a hexahydro iso- α -kyseliny vykazovaly slabou podporu gushingového potenciálu [5].

4.2.3 OXID UHLIČITÝ

Průměrný obsah oxidu uhličitého v pivu je 5 g.l^{-1} . Oxid uhličitý vzniká při hlavním kvašení a při dokvašování v ležáckých nádobách [2]. I když oxid uhličitý představuje hnací sílu gushingu není považován za jeho hlavní příčinu [23]. Je potvrzeno, že s jeho stoupající koncentrací se zvyšuje míra gushingu [15], avšak snížení jeho obsahu v pivu není tolerována z pohledu spotřebitele [25].

4.2.4 KOVOVÉ IONTY

Vliv kovových iontů na gushing piva byl uznán již před mnoha lety. Kovové ionty ruší fyzikální vazbu CO_2 na protein a v důsledku toho se rychleji uvolňuje CO_2 a dochází k přepěnění [2]. Fyzikálně-chemická příčina prozatím není známa, ale některé studie předpokládají, že se tvoří kovové uhličitany na fázovém rozhraní mezi kapalinou a CO_2 a tím se stabilizuje bublina. Tento vliv se inhibuje přidávkem EDTA, která tvoří s přítomnými kovy komplexy [5]. Nejvíce způsobují přepěnění ionty Fe^{3+} , dále pak Ni^{2+} a Co^{2+} a to již v koncentracích $\mu\text{g.l}^{-1}$ [2,3].

4.2.5 TENZIDY

Tenzidy (saponáty nebo detergenty) jsou povrchově aktivní látky, které jsou jednou ze složek používaných při čištění a dezinfekci pivních lahví. Jsou zodpovědné za řadu úkolů, které se souhrnně označují jako detergenční účinnost (adsorpce na fázovém rozhraní, snižování povrchového napětí, tvorba micel, smáčivost, emulgační účinnost, dispergační účinnost a stabilizace suspenzí a pěnivost).

Molekula povrchově aktivní látky je složena ze dvou částí. První částí je hydrofobní část (též lipofilní), která vykazuje afinitu k organickým látkám (nečistotám)

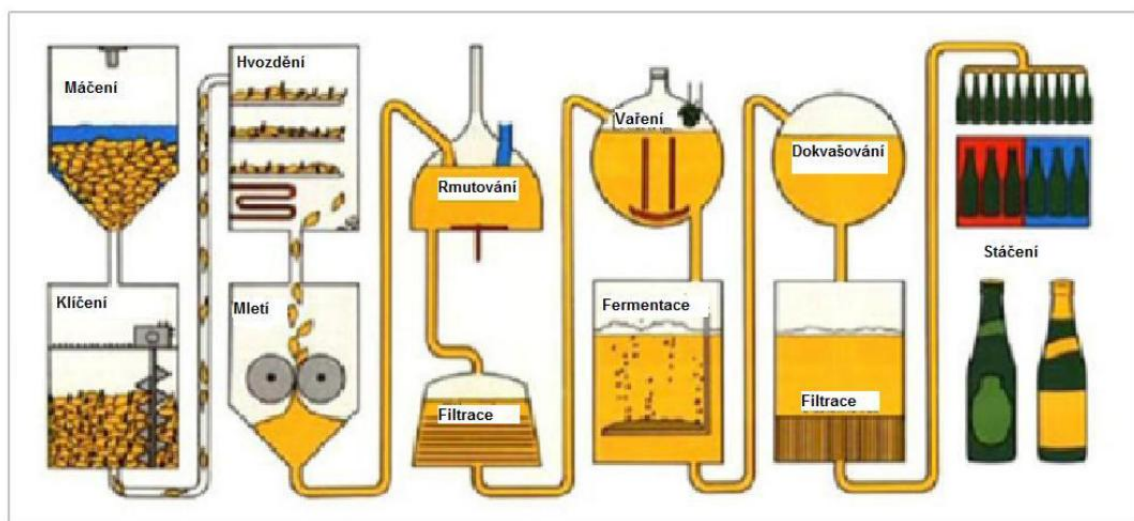
a z chemického hlediska ji může představovat alifatický řetězec. Druhá část je označována jako hydrofilní a ta naopak vykazuje afinitu k vodě a je tvořena například sulfátovou skupinou [2].

4.2.6 VLIV PIVNÍ LÁHVE

Mnoha studii bylo potvrzeno, že gushing podporuje opotřebením skla vlivem čištění lahví mechanicky či chemicky. Hlavní vliv má narušování struktury skla hydroxidem sodným při mytí lahví. Současně se uvolňují a vymývají vápenaté, sodné a další ionty z jeho struktury a tím se snižuje odolnost vůči otěru. Uvolněné ionty tvoří nerozpustné komplexy, které se mohou usazovat na umytých lahvích a tím přispívat k tvorbě bílých povlaků. Proces urychluje narůstající koncentrace mycího louhu, teplota, kontaktní doba a přítomnost některých složek čisticích přípravků [2,5]. Z toho vyplývá, že čím jsou starší láhve a vícrát umyté, tím mají větší tendenci k přepěňování. Pro zabránění resp. zpomalení tohoto procesu je vhodné přidávat do louhových mycích van speciální aditiva, která zabraňují vymývání vápníku [2]. Z obchodní zkušenosti bylo zjištěno, že láhve uložené ve svislé poloze vykazovaly menší gushing než láhve uložené v horizontální poloze. Tato skutečnost naznačuje, že pro vznik gushinu je důležitý plyn v hrdlovém prostoru [22]. Dále bylo zjištěno, že pokud jsou láhve převráceny třikrát před otevřením je znatelný rozdíl mezi “starou“ a “novou” lahví, ale pokud jsou láhve převráceny častěji je rozdíl mezi lahvem nižší. Kvalitní láhev je jednou z možností pro pivovary, jak minimalizovat nežádoucí gushing v pivovarech [1].

5 VLIV TECHNOLOGIE PIVA NA GUSHING

Během výroby piva (Obr. 11) probíhá mnoho chemických a enzymatických změn látek. Prvním technologickým krokem je výroba sladu, která zahrnuje tento postup - příjem, čištění, máčení, klíčení ječmene, sušení a hvozdění zeleného sladu, úprava odsušeného sladu, skladování a expedice [22]. Nejdůležitějším krokem z hlediska gushingu je skladování. Vysoká vlhkost během skladování vede ke zvýšené mikrobiální kontaminaci. Mezi kmeny plísní napadající slad během skladování patří rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Rhizopus*.



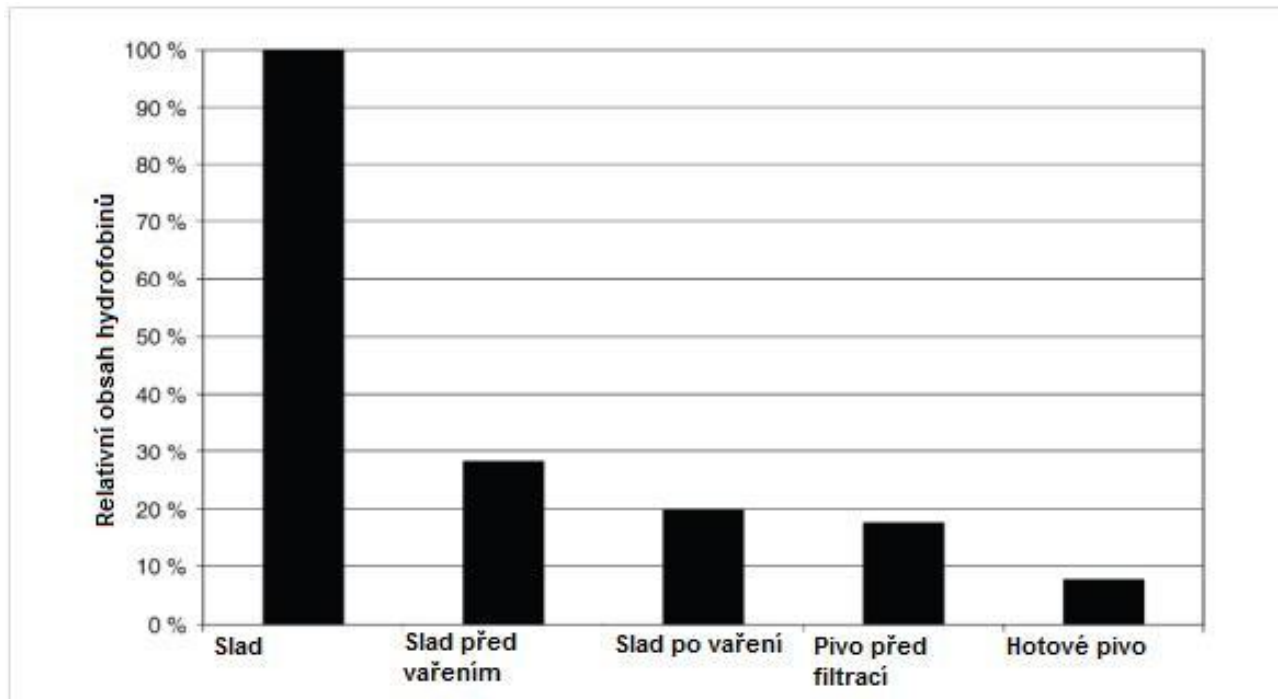
Obr. 11: Schéma výroby piva

5.1 OBSAH HYDROFOBÍNŮ

Hydrofobiny se produkují i během sladovacích procesů jako je skladování a zejména během máčení a klíčení ječmene. Při odkličování ječmene byly zjištěny nižší hladiny. Ve srovnání s množstvím hydrofobinů v ječmeni a v konečném sladu je obsah 10x vyšší.

Hydrofobiny musí být uvolněny ze sladu během rmutování a dále musí přečkat v aktivní formě procesní podmínky a skončit v mladině, aby bylo možné vyvolat gushing. Na (Obr. 12) je zobrazen vliv technologie na vznik gushingu. Ukazuje relativní obsah hydrofobinů během jednotlivých pivovarských procesních fází výroby piva. Filtrace jednoznačně ovlivňuje negativně obsah hydrofobinů. Předpokládá se, že hydrofobiny tvoří agregáty, které se zachytí filtrací. Procentuální ztráta je závislá na koncentraci hydrofobinů. Při koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ se odstraní 60 % v porovnání s koncentrací 5 $\mu\text{g/ml}$ je ztráta jen 15% [14].

Nejvyšší hladiny hydrofobinů byly zjištěny u sladů uměle infikovaných plísněmi *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum*.



Obr.12: Relativní obsah hydrofobinů v jednotlivých fázích výroby piva

5.2 OBSAH ŠŤAVELANŮ

Obsah šťavelanů se během technologie zvyšuje. Během skladování se hladiny šťavelanů zvýší až pětikrát oproti původnímu obsahu v obilce ječmene, oproti tomu obsah nerozpustného šťavelanu vápenatého byl nižší. Celková koncentrace šťavelanů ve sladu je přibližně dvakrát vyšší než v ječmeni. Ve sladině je koncentrace rozpustných šťavelanů více než dvakrát vyšší než koncentrace celkových šťavelanů v ječmeni [24].

6 VLIV KVALITY VSTUPNÍCH SUROVIN

Kvalita vstupních surovin patří mezi nejvýznamější faktory. Příčinou gushingu jsou látky produkované plísněmi napadající ječmen, jednu z hlavních surovin pro výrobu sladu. A proto je důležité dbát na pečlivé sledování kvality vstupních surovin především sladu a jeho mikrobiální kontaminaci [13]. Pivovary nejčastěji používají metodu, kdy se spočítají červená zrna. Přítomná červená zrna indikují fusariovou nákazu. Tato metoda je však diskutabilní z hlediska přepovedení možného výskytu gushingu [29]. Jako alarmující hodnota se uvádí 5 % zrn napadených červenou plísní po zakápnutí obilky 7,5% NaCl a pětidenní inkubaci při 20 °C [24]. Ideální podmínky pro růst plísní na ječmeni jsou horká a vlhká léta (optimální teplota je 24-29 °C) společně s vysokou vlhkostí. Naopak suché a chladné počasí brání jeho růstu [16]. Kontaminaci plísněmi můžeme eliminovat již při pěstování používáním vhodných agrotechnických zásad, dodržováním zásad správné zemědělské praxe a používáním prostředků na ochranu rostlin. K negativně působícím faktorům patří např. minimální orba nebo omezené používání fungicidů [13].

Další příčinou vzniku gushingu jsou šťavelany. Při napadení plísněmi rodu *Fusarium* byl nalezen obsah šťavelanů vyšší, ošetření fungicidy nemá na obsah šťavelanů vliv. Nejnižší hladiny byly naměřeny v ječmeni, který nebyl napaden plísněmi [24].

Existuje několik odrůd ječmene jarního (*Hordeum sativum*). Vliv odrůdy na gushing je prakticky zanedbatelný. Odrůdy Prestige a KM 2629-50 vykazovaly vyšší gushingový potenciál, ale tento výsledek není závazný, protože byly provedeny jen dvě měření a výsledek je málo prokazatelný [30]. Z hlediska odolnosti vůči fusariovému napadení mezi odolné patří odrůda Forum. Mezi méně odolné náleží odrůda Akcent [19].

7 REDUKCE GUSHINGU

Redukce primárního gushingu je možná vhodným vývojem a následným výběrem odolných odrůd a efektivní kontrolou mikroorganismů na polích a ve sladovnách. Dále je možné redukovat gushing následujícími způsoby.

1. Přídavek proteolytických enzymů, jenž degradují strukturu hydrofobinů. Z proteolytických enzymů je nejvýznamnější proteinasa A, která štěpí strukturu při pH 4-5. Zdroje proteolytických enzymů jsou autolyzované kvasinky, ale také jsou vylučovány živými kvasinkami do mladiny během kvašení. Intenzita vylučování se zvyšuje při stresových podmínkách kvašení, rostoucí teplotou a zákvasnou dávkou a je závislá na druhu kvasinky. Nedostatek kyslíku může také vyvolat zvýšené vylučování proteinasy A do mladiny [4]. Proteinasa A je vylučována ve větší míře při kvašení vysokokonzentrovaných mladin než u nízkokonzentrovaných mladin. Část hydrofobních polypeptidů je vůči proteinase A rezistentní, zejména pěnivostní bílkovina LTP [3].

2. Přídavek chmele. Nižší sklon ke gushingu má pivo s vyšším obsahem chmelových přísad. Koncentrace 1 ppm chmelového oleje v pivu vede k významnému snížení gushingu, ale má špatný vliv na sensorické vlastnosti [4,24,28]. Přídavek 4 mg chmelových extraktů snižuje gushing a přídavek 5 mg má neutralizační účinek [31].

3. Pasterizace při 60 °C. Zvýší se vnitřní tlak v pivu a struktura hydrofobinů potahující bubliny se destabilizuje. Opakovaná pasterace vede k rozpuštění mikrobublin a tím se sníží gushingový potenciál [4,25].

4. Podpora vytváření šťavelanu vápenatého v počátečních fázích a redukce obsahu kyseliny šťavelové v mladině použitím chmelových extraktů a sladů s nízkým obsahem kyseliny šťavelové [1,2,20]. Dále udržování plně prokvašeného piva při nízkých teplotách dostatečně dlouhou dobu a čiření prokvašeného piva při co nejnižším možném pH a při co nejnižší teplotě [1,20].

5. Zamezení použití tvrdé vody nebo vody s obsahem uhličitanu vápenatého i při čištění filtrů protiproudem. Zamezení používání křemeliny s vysokým obsahem uhličitanu vápenatého k filtraci piva. Oplach filtru slabou kyselinou z důvodu vymytí vápenatých iontů. Výplach lahví měkkou vodou [1,2].

6. Filtrace při nízké teplotě [4].

7. Použitím membránové filtrace (s póry o průměru 0,1μm) je potlačen gushing. S použitím póru o velikosti od 0,45-0,65 μm se sníží gushing na polovinu.

8. Lipidy zasahují do stability pивní pěny tím, že interagují s proteiny, kationty a chmelovými kyselinami a tím ji destabilizují.
9. Ozařování v rozmezí dávek 6-8 kDy snižuje infekce *Fusarium spp.* u sladovického ječmene s malým dopadem na klíčení.
10. Vystavení horkým vodám o teplotách 45 nebo 50°C po dobu 15 minut se *Fusarium spp.* infekce snížila z 32 % na 1-2 % jen s malým snížením klíčivosti [4].
11. Použití formaldehydu během máčení: Koncentrace 1000 mg/kg potlačuje růst *Fusarium spp.* Jeho používání v komerčních sladovacích procesech, ale není povoleno, protože jde o látku karcinogenní [2,4].
12. Přídavek peroxidu vodíku jako antimikrobiální látky sníží infekci *Fusarium spp.* o 50-98% bez vlivu na klíčení.
13. Použití ozonu: Působení 0,16 mg ozonu na gram ječmene po dobu 5 minut inaktivovalo 96 % plísňových spor. Inaktivace v silech pokračuje, pokud je ozon přítomen v atmosféře. Účinnost se zvyšuje s rostoucí vodní aktivitou a teplotou [4].
14. Použití materiálu s hydrofobním povrchem jako je Nylon, který vede k odstranění hydrofobinů pomocí adsorpce. Nevýhodou je, že je nutné použití velkého množství materiálu při průmyslové aplikaci. Navíc tyto materiály nepříznivě ovlivňují kvalitu piva: snižují stabilitu pěny, hořkost a barvu tím, že selektivně vážou pomocí vodíkových můstků fenolové sloučeniny [4,6].
15. Dlouhodobé skladování ječmene přispívá k nižší produkci hydrofobinů. Při skladování po dobu 12 měsíců se produkce hydrofobinů snížila na polovinu oproti šestiměsíčnímu skladování [14].
16. Z hlediska technologie je dobré zchlazení směsi po chmelovaru na dostatečně nízkou teplotu, kdy vznikne chladový zákal [3].

8 METODY STANOVENÍ

8.1 STANOVENÍ KYSELINY ŠŤAVELOVÉ

Pro stanovení kyseliny šťavelové ve sladu nebo v pivu se používají metody: spektrofotometrie, kapilární izotachoforeza [2], vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) [24].

Ke stanovení oxalátů rozpustných ve vodě může být použita RP-HPLC s UV detekcí, kdy se identifikace provádí na základě porovnání retenčních časů se standardem, kvantita se určuje metodou kalibrační křivky [24].

8.2 ANALÝZA MYKOTOXINŮ

Stanovení mykotoxinů patří k nejrozšířenějším prediktivním testům v současné obchodní praxi. Nejčastěji se používá stanovení DONu. K samotné analýze mykotoxinů se používá řada analytických metod např. HPLC ve spojení s hmotností spektrometrií (HPLC-MS) [18], plynová chromatografie (GC) s detektorem elektronového záchytu nebo GC-MS, superkritická fluidní chromatografie, polymerázová řetězová reakce (PCR) [29]. Z imunologických metod se používá metoda ELISA se spektrofotometrickou detekcí [32]. Stanovení ve vzorcích sladu bez předchozí úpravy je vzhledem ke složitosti matrice velmi obtížné. Proto se pro přípravu vzorku používají různé postupy, které mají vliv matrice minimalizovat. Nejčastěji používanou metodou je extrakce tuhou fází (SPE). Ze sorbentů jsou používány např. aktivní uhlí, alumina, iontově-výměnné pryskyřice, silica gel, Florisil, grafitizované saze, MycoSep kolonky a imunoafinitní kolonky [26].

8.3 STANOVENÍ HYDROFOBINŮ

Z posledních výzkumů se ukazuje, že hydrofobiny jsou zodpovědné za gushing piva. Obsah hydrofobinů se zvyšuje během výroby sladu, proto z analýzy ječmene není možné předpovědět, zda bude docházet ke gushingu. Avšak krátká inkubace namočeného

ječmene za účelem aktivace tvorby hydrofobinů před analýzou by mohla tento problém překonat [28].

Zvýšené riziko gushingu vykazují vzorky sladu s koncentrací hydrofobinů 250 µg/g a vzorky s 500µg/g vyvolávají gushing opakovaně [11].

K analýze hydrofobinů může být dále použita hmotnostní spektrometrie s ionizací laserem za účasti matrice ve spojení s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF). Při použití této metody je nutné zbavit matici nežádoucích interferujících látek. Za nejvíce rušivé molekuly jsou považovány LTP bílkoviny z důvodu stejného rozsahu molekulových hmotností a také to že obsahují 4 disulfidové můstky. Výhoda této metody je její vysoká citlivost a rychlost měření [7].

Koncentrace hydrofobinů lze také stanovit enzymatickou metodou ELISA. Princip je založen na specifické reakci polyklonálních protilátek s hydrofobiny.

Pomocí metody SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) je možné zjistit molekulární hmotnost hydrofobinů.

Obsah jednotlivých aminokyselin v hydrofobinech je možné určit po kyselé hydrolyze a následném stanovení metodou HPLC [5].

8.4 GUSHINGOVÉ TESTY

Gushingové testy využívají množství pěny vzniklé přepěněním sladového extraktu syceného vodou k identifikaci gushingového potenciálu sladu, piva nebo jiných maticí získaných v jednotlivých technologických krocích výroby piva nebo sladu. V průmyslu se například používají k měření gushingového potenciálu sladu, ze kterého pak určují sklon ke gushingu ve vyrobeném pivu. Kvantifikace dvou sladů s gushingovým potenciálem je obtížné, proto se vyvíjí metody, které ve svých postupech mají přesně dané parametry. Samotným gushingovým testům předchází extrakce metabolitů tzv. mykotoxinů z ječmene nebo ze sladu, které se následně přidají do lahví s pivem. Velkou výhodou těchto testů je to, že se mohou aplikovat v různých fázích výroby piva. Toto umožňuje identifikovat ovlivňující faktory především při výrobě mladiny. V současné době existují dvě uznávané metody gushingových testů dle MEBAK- Weihenstephaner test (WT) a Modifikovaný Carlsberg test (MCT) a další upravené varianty těchto testů [29,31].

8.4.1 METODA PODLE VÚPS

Doba provedení této metody jsou 3 dny. U této metody se gushingový potenciál měří z hmotnosti piva, které uniklo po třídenním třepání. Výsledek je udáván v ml/500 ml.

Po rozmixování je ječné zrnko odstředěno a po odpaření na daný objem se vzniklý koagulát odstraní filtrací. Filtrát se vpraví do pivních lahví s vychlazeným pivem. Po vytěsnění vzduchu se láhev uzavře a třepe po dobu 3 dnů. Poté je láhev postavena, zvážena, otevřena a je změřen gushingový potenciál [32].

8.4.2 CALRSBERG TEST

V tomto testu se gushingový potenciál stanovuje v pivní matrici. Přesně definované množství sladu se extrahuje vodou za pomoci mixéru a poté se koncentrát uvede do varu. Část z tohoto sladového extraktu se přidá do láhve komerčního piva. Láhev je pasterizována a poté se třepe dle definovaných podmínek 3 dny. Po 3 dnech je láhev otevřena a množství vyteklého piva se zváží. Nevýhodou je, že tento test má poměrně vysokou standardní odchylku zejména u vzorků s nízkým gushingovým potenciálem [5].

8.4.3 MODIFIKOVANÝ CARLSBERG TEST (MCT)

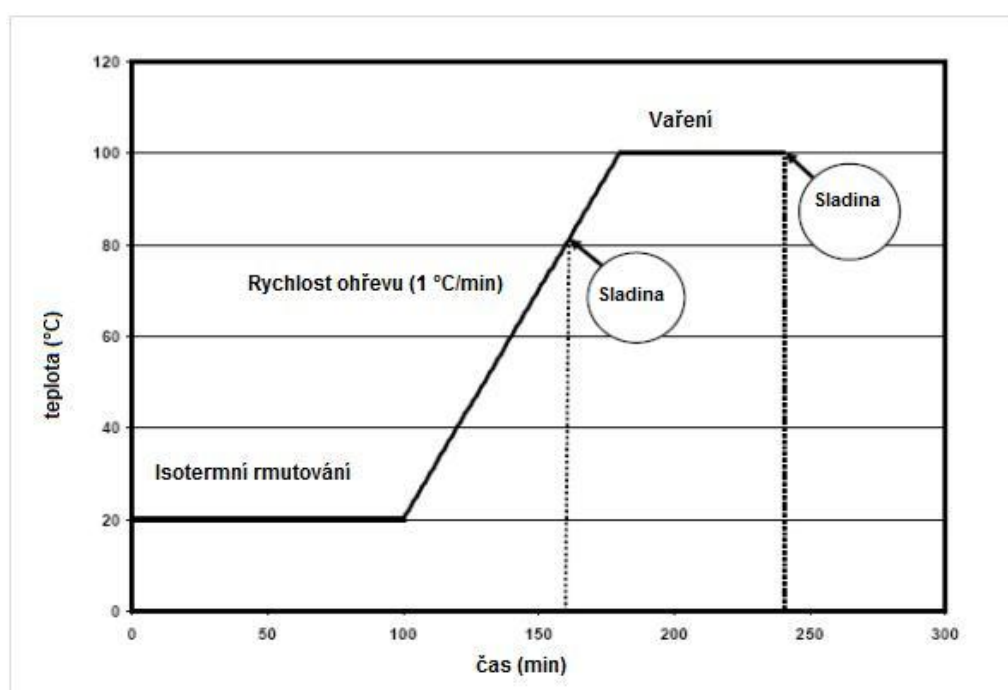
U původního Carlsberg testu byla vysoká variabilita výsledků způsobena tím, že složení piva matrice nebylo stejné u všech vzorků. U MCT se používá místo piva uměle sycená voda Bonaqa®, která obsahuje vyšší množství CO₂ než komerční produkty (7g/l CO₂). Vařený sladový extrakt se přidává do lahví naplněných touto vodou a láhve jsou poté jemně protřepávány 3 dny a otevřeny. Celý postup je prováděn za přesně daných podmínek [5,15] Přepěnění (udává se v g/láhev) odpovídá snížení hmotnosti před a po otevření láhve [15].

Vysoké přepěnění svědčí o vysokém potencionálním gushingu u piva, nízké přepěnění indikuje naopak nízký potenciál gushingu ve výsledném pivu. Pokud se gushing neprojevuje, je ztráta tekutiny 0-5 g, gushing je možný z 50 % u ztráty tekutiny 5-50 g. Pokud je ztráta tekutiny nad 50 g, je potvrzen gushing z (92 %) [5].

8.4.4 WEIHENSTEPHANER TEST (WT)

Oproti předešlým postupům chybí třepání láhve. V porovnání s MCT se tento test vztahuje k produkci mladiny v průmyslu, protože je vařená celá kaše a vyrobená mladina je uzavřena do lahve.

Provedení spočívá ve smíchání jemně namletého šrotu s vodou. Vzniklá směs se vyhřívá a vaří dle diagramu (Obr. 13). Po zfiltrování a zchladnutí se vzniklá směs centrifuguje. Po centrifugaci se směs odstředí a nasatí se oxidem uhličitým za přesně daných podmínek. Nasycený substrát se nalije do standartní láhve NRW a otočí se. Láhev se otevře a určí se přepěnění z rozdílu hmotnosti v gramech láhve před a po otevření [15].

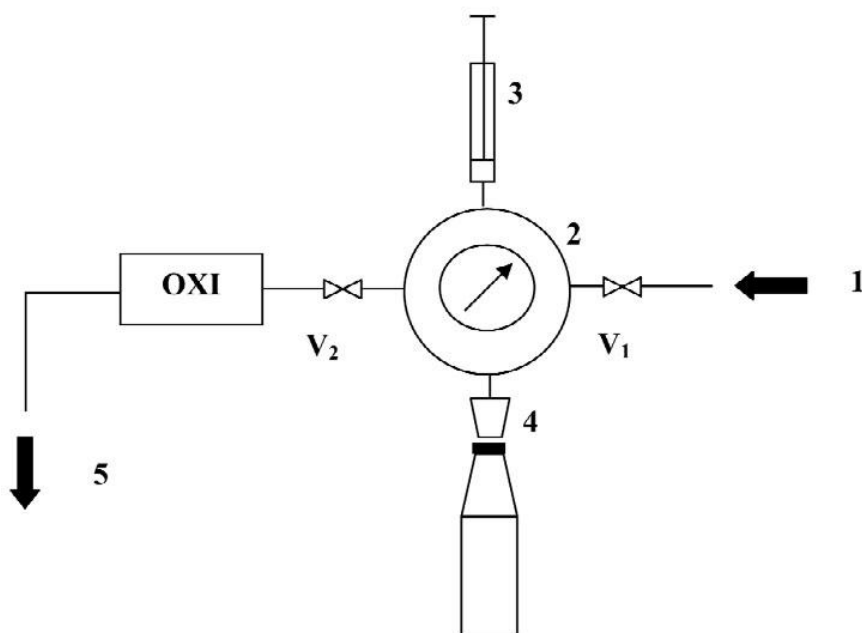


Obr. 13: Diagram provedení Weihenstephaner testu

8.5 MANOMETRICKÁ METODA

Tato metoda slouží primárně k měření množství vzduchu v hrdle obalu s použitím elektrochemického oximetru s krytou elektrodou, připojenou na přístroj (Obr. 14) pro manometrické stanovení obsahu oxidu uhličitého v pivu. Po propíchnutí se plyn z hrdla obalu nechá při průchodu přes oximetr expandovat do atmosféry. Z naměřených hodnot přetlaku v hrdle a údajů z oximetru se vypočte množství vzduchu v hrdle. Tato metoda se

dá aplikovat na měření intenzity gushingu. Měření probíhá následovně: korunka láhve se propíchně po předchozím třepání a následném uklidnění se odpustí přetlak oxidu uhličitého a je změřen opětovný nárůst přetlaku po uzavření komůrky přístroje. Techniku měření je nutno dále propracovat, ale lze předpokládat, že by ji bylo možné využít k měření gushingu [13,33].



Obr. 14: Sestava k měření obsahu vzdušného kyslíku v hrdle obalu: 1 – přívod inertního plynu, 2 – propichovací hlava s manometrem, 3 – vstřikovací pumpička, 4 – pryžová těsnící zátka, 5 – výstup přístroje, V1, V2 – ventily, OXI – oximetr

8.6 DLS

Tato metoda určující gushingový potenciál je založena na rozptylu procházejícího světla suspendovanými částicemi. DLS je metoda, která se používá k měření míry distribuce malých částic v suspenzi nebo polymerů v roztoku. Když světlo zasáhne částice tak se rozptýlí všemi směry. Měří se intenzita rozptylu světla, která je nepřímo úměrná velikosti částic. Zdrojem je laser, jehož světlo je monochromatické a koherentní a tak kolísání intenzity je časově závislé [34].

Pomocí měření velikosti částic je možné určit, zda u vzorků bude či nebude docházet ke gushingu. Využívá se poznatku, že gushing je způsoben hydrofobiny. Pokud je

koncentrace malá (v řádech mikrogramy až miligramy), tak se netvoří krystalky, ale díky afinitě hydrofobinů k přítomné kyselině uhličitě obalí bublinku CO₂. Po odplynění bubliny nezanikají zcela, ale tvoří se tzv nanobubliny o určité velikosti.

Provedení spočívá v odplynění vzorku za atmosférického tlaku a následném měření velikosti částic pomocí rozptylu světla. Zajímavý poznatek, který vyplynul při testování této metody je že látky o průměru přibližně 100 nm byly detekovány u všech vzorků, kde dochází gushingu a nebyly nikdy přítomny u vzorků, u kterých ke gushingu nedocházelo. Předpokládá se, že látky o těchto rozměrech jsou již zmíněné nanobubliny. V současnosti se tato metoda může použít jen jako potvrzení gushingu společně s dalšími testy [6].

9 ZÁVĚR

V této bakalářské práci je popsán jev vyskytující se u piva tzv. gushing, jeho příčiny a možnosti stanovení, pění a tvorba bublin, která úzce souvisí s tímto problémem.

Gushing je jev komplexní a má mnoho příčin, které souvisí s kvalitou vstupních surovin, ale vliv má také i technologie výroby piva a svůj podíl má i např. struktura vnitřní lahve. V současné době je velká část výzkumu věnována studiu principu gushingu a jeho prvotnímu vzniku, který by byl podkladem pro vývoj metody, která by mohla odhalit tendenci ke gushingu již u původní suroviny, v ječmeni. Další značně zkoumanou oblastí jsou látky s hydrofobní povahou tzv. hydrofobiny, které souvisí s plísňovým napadením ječmene. Tyto látky produkované plísněmi jsou považovány za hlavní příčinu vzniku gushingu.

10 LITERATURA

1. Schur, F.: Brauwelt international, **2001**, 2, 302-303.
2. Basařová, G.; Šavel, J.; Basař, P.; Lejsek, T.: Pivovarství- Teorie a praxe výroby piva, Vydavatelství VŠCHT Praha, **2010**, Praha.
3. Čížková, H.; Dostálek, P.; Fiala, J. a Kolouchová, I.: Chem. listy, **2006**, 100, 478–485.
4. Shokribousjein, Z.; Deckers, S. M.; Gebruers, K. a kolektiv: Cerevisia, **2011**, 35, 85-101.
5. Bamforth, Ch. W. a kolektiv: Beer: A quality perspectives, Academic press, **2008**.
6. Deckers, S. M.; Lorgouilloux, Y.; Gebruers, K. a kolektiv : *J. Am. Soc. Brew. Chem*, **2010**, 69, 144-149.
7. Deckers, S. M.; Gebruers, K.; Beggerman, G. a kolektiv: *Brewing Science*, **2010**, 63, 54-61.
8. <<http://www.wzw.tum.de/tmw/index.php?id=102>>-staženo dne 12.2.2012
9. Sýkorová, S.; Nedělník, J. a kol: Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě, Výzkumný ústav rostlinné výroby, **2004**.
10. Mbugua, S. K.; Gathumbi, J. K.: *J. Inst. Brew.*, **2010**, 110, 227-229.
11. Marková J., Lancová, K.; Ehrenbergerová, J.; Vaculová; K. Fusariové mykotoxiny v znu ječmene jarního, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, **2007**.
12. Sarlin, T.; Nakari-Setälä, T.; Linder, M.; Penttilä, M. a Haikara, M.: *J. Inst. Brew.*, **2005**, 111, 105-111.
13. Feigerl, L.: diplomová práce Studium gushingu ve sladovně Rajhrad, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, **2011**
14. Sarlin, T.; Vilpola, A.; Kotaviita, E.; Olkku, J. a Haikara, M.: *J. Inst. Brew.*, **2007**, 113, 2, 147-153.

15. Christian, M. K.: disertační práce Einflussfaktoren, Entstehung und Analytik des Phänomens Gushing, Technische Universität München, **2011**.
16. Šilhánová, L.: Mikrobiologie pro potravináře a mikrobiology, Academia, **2002**, Praha.
17. Machalová, A.; Hajšlová, A.; Ehrenbergerová, J. a kolektiv: Kvasný průmysl, **2010**, 56, 131-137.
18. Ježková, A.; Žďárová, J.; Dohnal, V. a Polišínská, I.: Chem. listy , **2009**, 103, 679-683.
19. Sypecká, Z.; Havlová, P.; Nevrklová, M.: Kvasný průmysl, **2003**, 49, 146-153.
20. <http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/4-Fuzariozy_na_obilninach.pdf>-
staženo dne 20.5.2012
21. EN 1881. Commission Regulation setting maximum levels for certain contaminants in food stuff, 2006-12-19
22. Kadlec, P.; Melzoch, K.; Voldřich, M. a kolektiv: Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin, Key Publishing s.r.o., **2009**, Ostrava.
23. Bekeniová, P.: bakalářská práce Gushing v pivovaru Starobrno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, **2008**
24. Benešová, K.; Macuchová, S.; Běláková, S.; Mikulíková, R. a Svoboda, Z.: Kvasný průmysl, **2010**, 56, 247-250.
25. Ilberg, V.; Titze, J.; Christian, M.; Jacob, F. a Parlar, H.: Brauwelt international, **2009**, 1, 22-25.
26. Müller, M. P.; Schnid, F.; Becker, T. a Gastl, M.: J. Inst. Brew , **2010**, 116, 459-453.
27. Hanke, S.; Kern, M.; Herrmann, M.; Back, W.; Becker, T. a Krottenthaler, M.: Brauwelt international, **2010**, 6, 356-358.
28. Hanke, S.; Kern, M.; Herrmann, M.; Back, W.; Becker, T. a Krottenthaler, M.: Brauwelt international, **2011**, 1, 24-26.

29. Christian, M.; Titze, J.; Ilberg, V. a Jacob, F.: J. Inst. Brew , **2011**, 117, 295-313.
30. Sychra, D.: diplomová práce Kontrola sladu ve sladovně Rajhrad z hlediska gushingu u piva, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, **2009**
31. Christian, M.; Ilberg, V.; Titze, J.; Parlar, H. a Jacob, F.: BrewingScience, **2009**, 62, 164-171.
32. Nesvadba, Z.; Horáčková, S.; Šusta, J.: Obilnářské listy, **2009**, 4, 118-121.
33. Šavel, J.: Kvasný průmysl, **2004**, 50, 66-69.
34. <http://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering>- staženo dne 8.4.2012