



národní
úložiště
šedé
literatury

Vliv vybraných fyzikálně-chemických faktorů na mechanismus přepěňování piva

Poštulková, Michaela
2013

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-161384>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 30.09.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://www.nusl.cz) .

Vliv vybraných fyzikálně-chemických faktorů na mechanismus přepěňování piva

^{1,2}M. Poštulková, ^{1,2}P. Novák, ¹K. Vitoušová, ²M. Růžička, ¹T. Brányik

1 VŠCHT Praha, Ústav biotechnologie, Technická 5, Praha 6, email: postulkm@vscht.cz,
tel.: 220 444 271

2 Ústav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, Praha 6, email: postulkova@icpf.cas.cz

Úvod do problematiky

Gushing neboli přepěňování piva je negativní jev, kdy samovolně dochází prudkému úniku kapaliny z lahve či plechovky (Hippeli a Elstner, 2002). Za normálních podmínek, pokud jsou balená piva otevřena a nadměrný tlak uvolněn, CO₂ pomalu putuje z roztoku pryč a formuje pro pivo typickou pěnu. V případě gushingu se CO₂ uvolní velice rychle po otevření a nakonec skončí ztrátou piva, které přeteče z lahve (Garbe a kol., 2009).

Výskyt tohoto jevu se zdaleka nevztahuje pouze na pivo – může se objevit i u jiných nápojů, například v šumivých vínech, v jablečném moštu a dalších sycených nealkoholických nápojích. Pivo se však zdá být nejcitlivějším nápojem, jelikož obsahuje vysoký obsah bílkovin na rozdíl od ostatních nápojů (Pellaud, 2002).

Problém přepěňování se řeší už téměř sto let a přes veškeré úsilí vědců nebyl ještě plně pochopen. Byla snaha především nalézt a prozkoumat prekurzory způsobující přepěňování. Vycházelo se z předpokladu, že tyto faktory jsou rozpustné ve vodě, stále aktivní i po povaření a za podmínek, které převažují v pivu (Vaag a kol., 1993). V 60. letech 20. století si výzkumné skupiny všimli zajímavého spojení kontaminace ječmene vláknitými houbami a vznikem gushingu (Gjertsen a kol., 1965). Od té doby se pozornost zaměřila především na plísňe a látky, jež v rámci svého metabolismu produkují.

V roce 1991 pak Wessels a kol. objevili amfifilní proteiny produkované plísní a nazvali je hydrofobiny (Wessels a kol., 1991). Jedná se o malé, středně hydrofobní, vysoce povrchově aktivní proteiny vylučované houbami. Charakteristickým rysem těchto proteinů je osm zachovaných cysteinových zbytků, tvořících S-S můstky. Molekula se skládá přibližně ze 100 ± 25 aminokyselin. Na základě pořadí aminokyselin se pak hydrofobiny dělí do různých tříd. Velice zajímavou schopností hydrofobinů je to, že jsou sami na sebe schopné vázat hydrofilní i hydrofobní látky a tvořit tak amfipatickou membránu. Tato vlastnost jim umožňuje plnit široké spektrum funkcí v růstu a vývoji plísní (Wessels, 1996; Wösten a Wessels, 1997). Kontaminace ječmene, tvorba hydrofobinů a vedení sladařského procesu se většinou řadí mezi tzv. primární přepěňování (Pellaud, 2002).

Objev hydrofobinů sice posunul problém gushingu do nového světla, nicméně kontaminovaný ječmen ne vždy způsobí přepěňování a naopak i použití nekontaminovaného ječmene a sladu může v konečném důsledku přepěňování vyvolat. Každá z hlavních surovin pro výrobu piva může mechanismus na molekulární úrovni ovlivnit. Navíc i výrobní technologie, jež je pro každý pivovar specifická, může do jisté míry přepěňování podpořit či potlačit. Tím v podstatě i termín primární přepěňování, jež je užíván především ve významu kvality surovin, vytrácí, protože přepěňování souvisí jak se surovinami, tak se všemi kroky sladařského a pivovarského procesu (Astrup a kol., 2003; Poštulková, 2012).

V otázce prekurzorů přepěňování je na místě zmínit i vlivy tzv. sekundárního gushingu, který je dáván do souvislosti s výrobními postupy a tímto rozebrat i jeho hlavní příčinu – šťavelany. Oproti primárnímu gushingu, způsobovaného plísníovou infekcí, se však sekundární gushing a prekurzory s ním spojené vyskytují sporadicky a bylo by ho teoreticky možné ovlivnit změnou výrobních podmínek (například vysrážení šťavelanu přidávkem CaCl₂ nebo CaSO₄ do vystírky) (Pellaud, 2002; Čejka a Kellner 2003).

Současné metody pro stanovení přepěňovací aktivity

Klasické metody

Gushing rovněž souvisí s problémem predikce. Klasické metody, jako je Weihenstephan (Donhauser) test nebo Carlsberg test, se především snaží přiblížit skutečné výrobě piva. U Weihenstephan testu je podezřelý slad jemně šrotován, smíchán s vodou a následně rmutován. Rmut je dále povařen (teplota se zvyšuje od 20°C do 100°C), mláto je odstraněno filtrací přes skládaný filtr a vyprodukovaná sladina je nasycena a stočena do lahve (Donhauser, 1990; Christian a kol., 2009). Při vaření není použit žádný chmelový preparát. Indukce gushingu při tomto testu je závislá na teplotě rmutování a množství sladového šrotu (Christian a kol., 2009).

U Carlsberg testu je rovněž vyrobena sladina, která je následně přidána do lahve se syčenou vodou nebo do standardního nepřepěňujícího piva. Lahev s extraktem sladiny je uzavřena a následuje třídenní třepání na horizontální třepače po definovanou dobu. Po těchto 3 dnech je lahev otevřena a gushing je pozorován jako rozdíl v hmotnosti před a po otevření (Vaag a kol., 1993). Carlsberg test pak následně ještě prošel několika úpravami – MCT a MCT² (Modified Carlsberg test, Double Modified Carlsberg test) (Radau a kol., 1995; Garbe a kol., 2007).

V pivovarské praxi se stále nejvíce využívá právě Carlsberg testu - většinou upraveného dle potřeb pivovarské či sladařské laboratoře. Přes všechny modifikace přesto vykazuje stále vysoké procento falešně pozitivních výsledků - tyto testy nejsou dostatečně citlivé ani reprodukovatelné (Radau a kol., 1995; Garbe a kol., 2007).

Moderní metody

Oproti klasickým metodám se jako velice spolehlivý jeví imunologický test ELISA, navržený 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, pak ji ELISA neodhalí (Kleemola a kol., 2001; Astrup a kol., 2003; Haikara a kol., 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 a kol., 2003). Je tedy evidentní, že gushing nakonec tvoří celý soubor interakcí látek obsažených v surovinách během celého procesu výroby piva.

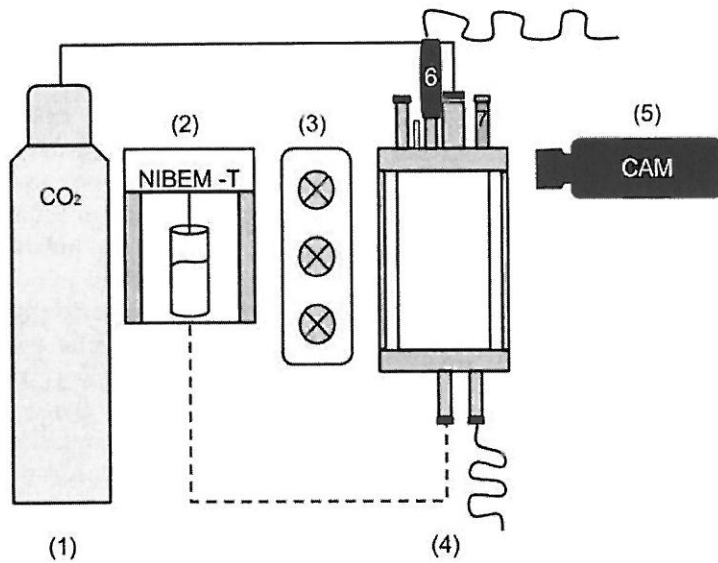
Další nově se rozvíjející metodou je tzv. kombinovaná analýza částic. Ta byla původně nástrojem pro kontrolu koloidní stability piva, následně pak byla využita i pro měření potence k přepěňování. Využívá kombinace dvou měřících přístrojů – Nanotracu a nábojového částicového analyzátoru (CAS - charge 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 Nanotracc, jež pracuje na principu závislosti velikosti částic na intenzitě rozptýleného světla. Metoda byla úspěšně použita pro predikci gushingu v ovocných nápojích a šumivých vínech (Bach a kol., 2001; Christian a kol., 2011).

Moderní metody jsou již přesnější a jejich výsledky reprodukovatelnější, nicméně jsou to metody velice nákladné a v případě ELISy i příliš úzce specifické. Navíc dosud nejsou v České republice zavedeny.

Výsledky

Všechna měření byla prováděna na novém experimentálním zařízení – tlakové koloně – která byla přímo navržena pro pozorování gushingu. Zařízení se skládá z tlustostěnného skleněného válce umístěného do nerezové konstrukce, ve které je v horní a dolní části několik vstupních a výstupních otvorů. Na tyto otvory lze připojit ventily a hadice pro přívod/odvod plynné nebo kapalné fáze, případně pro zavedení pojistného ventilu, tlakové sondy či citlivého teplotního čidla.

Celá aparatura pak zahrnuje výše popsanou kolonu připojenou k tlakové lahvi (náplň může být různá), digitální kameru (full HD, min. 30 fps), zdroj světla a distributor světla (Obr.1). K aparatuře rovněž může být připojena část přístroje NIBEM-T určeného pro tvorbu pěny průchodem tryskou, pomocí kterého se do kolony isobaricky přečerpá pivo přímo z lahve do kolony (nedojde ke ztrátě CO₂ rozpuštěného v pivo). Zařízení je vhodné pro predikci, stanovení i kvantifikaci přepěňovací aktivity.



Obr. 1 Náčrt zařízení pro pozorování gushingu: (1) Tlaková lahev s plynem, (2) Část přístroje NIBEM-T, (3) Zdroj a distributor světla, (4) Tlaková kolona, (5) Digitální kamera, 6 – Tlakové čidlo, 7 – Pojistný ventil

Vyhodnocení probíhá jako ruční odečet výšky pěny na kamerou pořízených fotografiích ve chvíli prvotní nukleace až po ustálení pěny (nebo po naplnění celé kolony). Intenzita přepěňování je pak vyhodnocena jako „faktor růstu pěny“ a je vypočtena z grafu závislosti výšky pěny na čase. Čím vyšší „faktor růstu pěny“ tím intenzivnější přepěňování.

$$f = \frac{h}{t} \left(\frac{\text{cm}}{\text{s}} \right),$$

kde h je výška pěny, t značí čas.

Na základě výsledků měření byla vypracována tabulka I., ve které je pozorovaná intenzita přepěňování přiřazena intervalu faktoru růstu pěny. Pomocí ní lze prakticky odhadnout intenzitu přepěňování.

Tab. I. Intenzita přepěňování dle faktoru růstu pěny

f (cm/s)	Intenzita přepěňování
< 3	slabé přepěňování
3,5-6,5	střední přepěňování
7,0-12,0	silné přepěňování
> 12,5	velmi silné přepěňování

Závislost přepěňování na pH

Pro určení závislosti přepěňování na pH byl jako modelový roztok použit sérový hovězí albumin (BSA) o koncentraci 0,5 g/l (což je jeho kritická micelární koncentrace) rozpuštěný v destilované vodě. pH tohoto roztoku bez úpravy se pohybuje okolo hodnoty 6,3. Bylo následně upraveno na hodnoty dle tabulky II. přidávkem HCl. Hodnoty byly voleny blízké pH piva.

Tab. II. Použité hodnoty pH

pH	3,5	4	4,5	5	6,3
----	-----	---	-----	---	-----

První tři hodnoty pH se pohybují pod pH izoelektrického bodu a proto by v roztocích o těchto pH měl být protein nabit kladně. Čtvrtá hodnota pH je již nad izoelektrický bodem a náboj proteinu je tedy očekáván záporný. Poslední hodnota je pH neupraveného roztoku proteinu. Protein BSA je v neupraveném roztoku nabit záporně.

Tab. III. Výsledky vlivu intenzity přepěňování na pH roztoku BSA

pH	f (cm/s)	Intenzita přepěňování
3,5	-	bez přepěňování
4	1,55	slabé přepěňování
4,5	2,71	slabé přepěňování
5	3,61	střední přepěňování
6,3	6,36	střední přepěňování

Z výsledků tohoto měření uvedených výše lze vyhodnotit, že s rostoucím pH roste intenzita přepěňování roztoku BSA. Úprava pH na hodnotu pod izoelektrickým bodem proteinu snižuje intenzitu přepěňování nejúčinněji. Jakmile dojde ke zvýšení pH k hodnotě blízké se izoelektrickému bodu, kladný náboj začíná slábnout a intenzita přepěňování lehce roste. Záporné nabití proteinu pravděpodobně podporuje tvorbu micel, což je zřejmé z prudce rostoucí intenzity přepěňování roztoků o pH vyšším než izoelektrický bod proteinu.

Vliv zvýšení tlaku nad pivem po nasycení na přepěňování

Roztok BSA o koncentraci 0,5 g/l byl v koloně běžným způsobem nasycen. Před uvolněním tlaku byl tlak v koloně nejprve zvýšen na určitou hodnotu pomocí proudu CO₂ ze zásobní lahve a byl udržován definovanou dobu. Poté byl proud CO₂ zastaven a tlak v koloně byl rychle uvolněn za současného záznamu tlakových údajů a fotografií. Pro každou kombinaci aplikovaného tlaku a doby bylo měření provedeno celkem dvakrát. Výsledky vlivu zvýšení tlaku na přepěňování jsou uvedeny v tabulce IV.

Tab. IV. Vliv zvýšení tlaku na intenzitu přepěňování

Hodnota tlaku (bar)	Doba působení (min)	Intenzita přepěňování
3,5	10	úplné potlačení
3,5	5	úplné potlačení
3	10	úplné potlačení
3	5	úplné potlačení

Nejprve byl aplikován maximální tlak, který bylo možno vytvořit proudem CO₂ ze zásobní lahve a to 3,5 bar. Ten byl udržován nejprve po dobu 10 min. Z výsledků v tabulce IV. je patrné, že gushing

byl dokonale potlačen. Stejně chování bylo pozorováno při aplikaci nižšího tlaku po kratší dobu. Tyto výsledky jsou v souladu s Christianem a kol., kteří tvrdí, že prostým zvýšením tlaku v prostoru nad pivem těsně před otevřením lze zaručit úplné potlačení gushingu (Christian a kol., 2011).

Závěr

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že s rostoucím pH roztoku BSA o koncentraci 0,5 g/l roste intenzita jeho přepěňování. Rovněž bylo zjištěno, že zvýšení tlaku nad gushingovou maticí vedlo k úplnému potlačení přepěňování.

Zařízení pro pozorování přepěňování se z praktického hlediska jeví jako vhodný nástroj pro predikci, stanovení a kvantifikaci přepěňovací aktivity a bude v budoucnu využíván pro další studium tohoto jevu.

Literatura

Aastrup S. (2003) Gushing factors are already present in barley allowing early detection of gushing risk, Proceedings European Brewery Convention Congress, Dublin, 90, str. 923 – 929.

Bach, H.-P., Görtges, S., Burger, K. and Schneider, R. (2001) Das Wildwerden oder Überschäumen (Gushing) des Sektes, Der Deutsche Weinbau, str. 36-41.

Čejka P., Kellner V. (2003) Gushing (přepěňování piva), Pivovarský kalendář, str. 140-143.

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, str. 100-107.

Christian M., Titze J., Ilberg V., Jacob F. (2011) Novel perspectives in gushing analysis: A review, Journal of the Institute of Brewing, 117, str. 295-313.

Donhauser S., Weideneder A., Winnewisser W., Geiger E. (1990) Test zur Ermittlung der Gushingneigung von Rohfrucht, Malz, Würze und Bier, Brauwelt, 130, str. 1317–1320.

Garbe L.A., Nagel R., Rauschmann M., Lamers M., Khmer A., Tresek R., (2007) Correlation of DON, Hydrophobins and gushing , International Eur. Brew. Conv. Congr. Proc., Venice, 31, str. 6-10.

Garbe L.A., Schwarz P., Ehmer A. (2009) Beer gushing, (Beer: A Quality Perspective, Russel I., Bamforth Ch., W., Stewart G.G.), Elsevier, London, Burlington, San Diego, str. 185-212.

Gjertsen P., Trolle B., Andersen K. (1965) Studies on gushing caused by microorganisms, specially *Fusarium spec.*, Proceedings European Brewery Convention Congress, Stockholm, str. 428-438.

Haikara (2006) Patent č. US7041464B2: Method for determining a gushing factor for a beverage, 2006-05-09.

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 [25.7.2013].

Dostupné z: <http://www.znaturforsch.com/ac/v57c/s57c0001.pdf>

Kleemola T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Kotaviita E., Olkku J., Haikira A., (2001) Characterisation and detection of the gushing factors produced by fungi, Proceedings European Brewery Convention Congress, Budapest, 12, str. 129 – 138.

Pellaud J. (2002) Gushing: state of the art, *Cerevisia*, 27, str. 189-205.

Poštulková, M. (2012) Vliv surovin a technologie na prekurzory přepěňování piva, diplomová práce, VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, 71 stran.

Radau B., Linemann A., Krüger E. (1995) Modifizierter Carlsberg-Test (MCT), *Brauerei-Forum*, 10, str. 377-378.

Vaag P., Riis P., Knudsen A.D., Pedersen S., Meiling E. (1993) A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials, Proceedings European Brewery Convention Congress, Oslo, 24, str. 155-162.

Wessels J.G.H. (1996) Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface, *Trends in Plant Science*, 1 (2), str. 9-15.

Wessels J.G.H., de Vries O.M.H, Asgeirsdottir S.A., Schuren F.H.J (1991) Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*, *Plant Cell*, 3 (8), str. 793-799.

Wösten H.A.B, Wessels J.G.H. (1997) Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development, *Mycoscience*, 38 (3), str. 363-374.