

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Uzroci, posljedice i prevencija prekomjerna pjenjenja piva

Causes, consequences and prevention of beer gushing

Kristina Mastanjević¹, Natalija Velić^{1*}, Vinko Krstanović¹, Mario Novak², Tihana Marček¹, Božidar Šantek²

¹Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Kuhačeva 20, Osijek, Hrvatska

²Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Prekomjerno pjenjenje piva (engl. beer gushing) definira se kao naglo i nekontrolirano pjenjenje piva odmah po otvaranju ambalaže, bez prethodnog izlaganja ambalaže trešnji ili visokoj temperaturi. Ta je pojava uzrok velikim gubicima u sladarama i pivovarama širom svijeta te se smatra iznimno nepoželjnom. Razlikujemo primarno i sekundarno prekomjerno pjenjenje piva. Fungalne kontaminacije ječma, posebno kontaminacija plijesnima roda *Fusarium*, izravno se povezuju s pojavom primarnog prekomjerna pjenjenja piva. Ove plijesni sintetiziraju male proteine nazvane hidrofobini, koji se navode kao glavni uzročnici prekomjerna pjenjenja piva. Uzročnici sekundarnog prekomjerna pjenjenja piva su brojniji i uključuju različite kemikalije i postupke koji se upotrebljavaju tijekom proizvodnje piva. Sekundarno pjenjenje piva uglavnom se može izbjeći primjenom dobre proizvođačke prakse, dok je problem učinkovitog suzbijanja primarnog prekomjerna pjenjenja piva još uvijek predmet brojnih istraživanja.

Cljučne riječi: *Fusarium*, hidrofobini, proteini, prekomjerno pjenjenje piva

Summary

Gushing is sudden and uncontrolled over foaming of beer right after the bottle has been opened, without previous agitation or exposure to high temperatures. This phenomenon is causing great economic losses for malters and brewers. Beer gushing can be divided into primary and secondary. Fungal contamination of barley, especially that caused by *Fusarium* fungi, has been directly linked to the gushing phenomenon. *Fusarium* fungi produce small proteins called hydrophobins that have been recognized as main inducers of gushing. The casual agents of secondary gushing include number of chemicals and procedures applied during the brewing process. Secondary gushing can be avoided mostly by applying good manufacturing practice, while the efficient suppression of primary gushing still remains the object of many researches.

Keywords: *Fusarium*, hydrophobins, proteins, gushing

1. Uvod

Prekomjerno je pjenjenje piva pojava spontanog izlaženja pjene piva iz boce, neposredno nakon njezina otvaranja. Ova pojava izrazito je nepoželjna jer uzrokuje novčane gubitke pivovarama, ali i proizvođačima drugih gaziranih pića, kao što su gazirani voćni sokovi ili pjenušava vina (Pellaud, 2002; Sarlin i sur., 2005; Lutterschmid i sur., 2010). Osim novčanih gubitaka, pojava prekomjerna pjenjenja piva loše djeluje na percepciju takva piva kod potrošača, pri čemu su potrošači skloni i u potpunosti promijeniti proizvođača piva. Razlikujemo primarno i sekundarno prekomjerno pjenjenje piva. Uzročnici primarnoga prekomjerna pjenjenja piva su fungalni metaboliti - hidrofobini i mikotoksini, prisutni u ječmenom sladu ili drugim žitaricama koje se upotrebljavaju u proizvodnji piva (Shokribousjein i sur., 2015). Hidrofobini su mali, površinski aktivni proteini koje sintetiziraju filamentozne plijesni (Wessels, 1994; Wessels, 1996), pri čemu ih mogu zadržavati u miceliju i pupajućim tijelima ili ih izlučivati u okoliš. Biološke funkcije hidrofobina u stanicama plijesni su raznolike, no najčešće se ističe njihova važnost kao čimbenika koji omogućavaju prijanjanje plijesni na površinu supstrata. Jednako tako, hidrofobinima se pripisuje obrambena uloga, a poznato je da se ponašaju i kao tenzidi (Sarlin i sur., 2007; Linder, 2009).

Uzročnici sekundarnoga prekomjerna pjenjenja piva su brojniji i uključuju proteine podrijetlom iz ječma, povećanu aktivnost proteaza, različite kemikalije koje se dodaju tijekom proizvodnje piva, neke spojeve iz hmelja, itd.

Načini suzbijanja nastajanja primarnoga i sekundarnoga prekomjerna pjenjenja piva predmet su brojnih istraživanja, pri čemu se promatra cijeli proizvodni lanac ječam - pivo, odnosno istražuju se mogućnosti intervencije u različitim fazama proizvodnog lanca.

2. Prekomjerno pjenjenje piva

Fenomen prekomjerna pjenjenja piva (engl. *beer gushing*) ili drugih gaziranih pića iznimno je nepoželjna pojava. Do prekomjerna pjenjenja piva (**Slika 1.**) dolazi odmah nakon otvaranja boce gaziranog pića, i to tako da izađe gotovo sav sadržaj boce, a da boca prethodno nije bila izložena mehaničkom podražaju (trešnji) (Gjertsen, 1967; Sarlin i sur., 2007; Christian i sur., 2011; Shokribousjein i sur., 2011). Prema definiciji, pjena je emulzija plina u tekućini koja sadržava topljive tenzide (Lewis i Bamforth, 2007). Pjena koja nastaje prekomjernim pjenjenjem piva nije stabilna, ali se stvara trenutačno i vrlo je burna (Linder, 2009). Prekomjerno pjenjenje negativno utječe na sliku piva i uzrokuje velike financijske gubitke pivovarama

i sladarama (Sarlin i sur., 2005; Lutterschmid i sur., 2010; Christian i sur., 2011).



Slika 1. Prekomjerno pjenjenje piva (Shokribousjeini i sur., 2011)

Figure 1. Beer gushing (Shokribousjeini et al., 2011)

Primarno je prekomjerno pjenjenje piva uglavnom posljedica loše kvalitete sirovina (prisutnost hidrofobina koje proizvode različite vrste plijesni), dok je sekundarno prekomjerno pjenjenje piva posljedica tehničkih pogrešaka u procesu proizvodnje piva (Amaha i Kitabatake, 1981; Casey, 1996; Shokribousjeini i sur., 2011).

Primarno prekomjerno pjenjenje piva ovisi također o prisutnosti mikromjehurića u piću pri čemu hidrofobini djeluju kao jezgre za stvaranje mjehurića ugljikovog(IV) oksida koji prirodno nastaje tijekom proizvodnje piva. Kada se ugljikov(IV) oksid uvede u već zasićeno piće nakon pada tlaka, mikromjehurići služe kao jezgre kondenzacije te počinju rasti. Mjehurići plina se u zatvorenoj boci gaziranog pića obično smanjuju zbog Laplace-ovog zakona, ali i interakcije na granici voda - zrak te se otope ukoliko nisu stabilizirani. Stabilizacija se može postići uvođenjem površinski aktivnih molekula na granicu voda - zrak. U pivu koje ne pokazuje značajne prekomjerna pjenjenja može se pronaći oko 2 500 mikro-mjehurića/mL (Curtis i Martindale, 1961). Mikromjehurići se moraju stabilizirati površinski aktivnim proteinima iz piva (Draeger, 1996). U pivu koje se prekomjerno pjenu mijenja se broj stabiliziranih mikromjehurića (Lutterschmid i sur., 2010). Mjehurići s polumjerom većim od kritičnog mogu rasti nakon zasićenja otopine plinom, dok u manjih ova pojava nije moguća zbog prevladavajućih sila površinske napetosti i tlaka okolne tekućine (Fischer, 2001). U pivu koje se prekomjerno pjenu broj mjehurića koji mogu rasti veći je nego u onom pivu koje ne pokazuje znakove prekomjerna pjenjenja (Lutterschmid i sur., 2010).

Uzročnici sekundarnog pjenjenja piva mogu biti kristali kalcijevog oksalata, metalni ioni, zaostaci sredstava za čišćenje pogona, tenzidi, neravnomjerno uvođenje CO₂, trešnja, dodir piva sa zrakom tijekom procesa filtracije, produkti razgradnje hmelja ili nečistoće iz boca (Guggenberger i Kleber, 1963; Gardner, 1973; Kieninger, 1976; Dachs i Nitschke, 1977; Schur i sur., 1980; Amaha i Kitabake, 1981; Wershofen, 2004; Bamforth, 2011). Prisutnost uzročnika sekundarnog pjenjenja može se izbjeći primjenom dobre proizvođačke prakse i prikladnim

rukovanjem opremom za proizvodnju piva (Lutterschmid i sur., 2010).

2.1. Uzročnici primarnoga prekomjerna pjenjenja piva

2.1.1. Hidrofobini - struktura

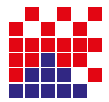
Hidrofobini su izvanstanični, iznimno površinski aktivni i umjereno hidrofobni proteini, bogati cisteinom koje proizvode filamentozne plijesni rodova *Fusarium*, *Nigrospora* i *Trichoderma* (Linder i sur., 2005; Laitila i sur., 2007; Garbe i sur., 2009). Jedno od svojstava tih proteina je da pri određenim uvjetima mogu tvoriti agregate (Lutterschmid i sur., 2010).

Na temelju rasporeda aminokiselinskih baza, hidrofobini se mogu podijeliti u dva razreda: I. i II. (Wessels, 1996). Pripadnici I. razreda imaju sposobnost tvorbe agregata koji su teško topljivi u vodenim otopinama, ali su dobro topljivi u kiselinama (npr. trifluorična i mravlja kiselina) te su nakon uklanjanja kiseline ponovno funkcionalni (Linder i sur., 2005; Szilvay i sur., 2007). Obično se sastoje se od 100 ± 25 aminokiselinskih ostataka i štapičastog su oblika (Hektor i Scholtmeijer, 2005).

Pripadnici II. razreda lakše su topljivi u vodenim otopinama i organskim otapalima (60 % -tni etanol, vrući 2 % -tni natrijev dodecil sulfat). Sastoje se od 50 - 100 aminokiselina te nisu štapičastog oblika. Oba razreda u svom rasporedu imaju osam cisteinskih ostataka koji tvore takav slijed da su drugi i treći te šesti i sedmi cisteinski ostaci susjedi, dok ostali cisteinski ostaci nemaju susjeda (Linder, 2009). Takav redoslijed osigurava iznimnu simetriju i može se lako prepoznati u primarnoj strukturi. Iako su hidrofobini proteini, vrlo su otporni na visoke temperature (čak do 90° C) što im omogućava da sačuvaju svoju funkcionalnu strukturu tijekom procesa proizvodnje piva (Sarlin i sur., 2005; Sunde i sur., 2008; Kisko, 2008; Shokribousjeini i sur., 2011).

Razlike u svojstvima I. i II. razreda hidrofobina posljedica su različite tercijarne strukture tih proteina. Hidrofobini II. razreda posjeduju hidrofobni dio sastavljen od dvije β - nabrane ploče koje se sastoje od alifatskih aminokiselina i hidrofилnog dijela jedne α - uzvojnice (Linder, 2009). Hidrofobini I. razreda slični su hidrofobinima II. razreda, ali nemaju α - uzvojnica, a aminokiselina koje čine raznovrsniji slijed unutar proteina je više (Linder i sur., 2005; Kallio i sur., 2007). Zbog većeg broja β - nabranih ploča hidrofobini I. razreda su stabilniji nego hidrofobini II. razreda (Hektor i Scholtmeijer, 2005).

Hidrofobine je imenovao Wessels (1991) istražujući gene koji su eksprimirani tijekom pupanja gljive vrste *Schizophyllum commune*. Naime, produkti gena SC3 posjeduju sposobnost polimerizacije kada se nalaze na granici zrak - voda. Na granici faza zrak-voda dolazi do promjene konformacije monomernih molekula hidrofobina na način da one polimeriziraju (tvore agregate) u tzv. amfipatske "plahte" (engl. *amphiphatic sheets*) netopljive u natrijevom dodecil sulfatu. Na površini koja dodiruje plin, one su visoko hidrofobne, dok su na površini koja dodiruje vodu iznimno hidrofилne (Wösten i sur., 1993; Wösten, 2001).



Za analizu topljivih oblika hidrofobina I. razreda od velike je koristi bila spoznaja o mogućnosti otapanja polimera u 100 % -tnoj trifluoričnoj kiselini te mogućnosti repolimerizacije pročišćena hidrofobina u obliku štapića (de Vries i sur., 1993; Wösten i sur., 1993).

Hidrofobini, kako je već spomenuto, imaju sposobnost samoslaganja, prilikom čega svojim hidrofilno - hidrofobnim dijelovima tvore amfipatske membrane (Wösten i sur., 1993). Prema Zykwinska i sur. (2014), hidrofobini I. razreda su idealni kandidati za proučavanje mehanizma samoslaganja putem interakcija β - nabranih ploča. Na mehanizam samoslaganja ovih proteina uvelike utječu pH i koncentracija iona u otopini. Svojstvo samoslaganja hidrofobina omogućuje širok spektar funkcija u rastu i razvoju plijesni (Wessels, 1996). Hidrofobini nisu identificirani kod kvasaca te se pretpostavlja da ih oni niti ne sintetiziraju (Sunde i sur., 2008). Plijesni roda *Fusarium* sintetiziraju hidrofobine u polju tijekom rasta ječma (i drugih žitarica), ali se zbog procesnih uvjeta tijekom faza močenja i klijanja koji pogoduju proliferaciji ovih plijesni, sinteza hidrofobina nastavlja i tijekom procesa sladenja ječma (Sarlin i sur., 2007).

2.1.2. Biološka funkcija hidrofobina

Hidrofobini u plijesnima imaju više funkcija. Primarna je uloga hidrofobina rast zračnog micelija i prianjanje plijesni na čvrste površine, što omogućuje patogenim vrstama plijesni adheziju s biljkom - domaćinom (Paananen i sur., 2003; Linder i sur., 2005; Talbot i sur., 1993). Nadalje, hidrofobini stabiliziraju mjehuriće zraka i kapljice ulja u vodi te smanjuju površinsku napetost vode.

Plijesni rastu na organskim supstratima, na mrtvim i živim organizmima te na različitim površinama (npr. zidovi) (Sunde i sur., 2008). Površina hifa koje se nalaze pričvršćene na vlažnim nosačima je hidrofilna, dok je površina zračnih hifa i spora koje se prenose zrakom hidrofobna. Takva je promjena površinskih svojstava stanične stijenke hifa plijesni moguća upravo zbog hidrofobina (Wessels, 1996; Wösten, 2001). Kako je već navedeno, hidrofobini djeluju kao prirodni tenzidi smanjujući površinsku napetost medija u kojem plijesni rastu. Nadalje, hidrofobini omogućuju plijesnima prodiranje granice voda - zrak i stvaranje zračnih hifa (Wösten i sur., 1999). Spore koje se razvijaju na krajevima zračnih hifa također su obložene amfipatskim slojem hidrofobina. Površina spora tako postaje hidrofobnom te ne dolazi do prodiranja vlage u sporu, dok je u isto vrijeme osiguran ulazak plinova (Wang i sur., 2005).

Nakon oblikovanja micelija koji je uronjen u supstrat i koji služi za hranjenje stanice, plijesan počinje lučiti monomere hidrofobina u supstrat. Monomeri se sami slažu na granici supstrat - zrak te, u konačnici, oblikuju amfipatske membrane koje smanjuju površinsku napetost vode. Međutim, nije još utvrđeno što se događa s hifama na kojima je hidrofobni proteinski sloj. Hife mogu rastegnute hidrofobni sloj i omogućiti uglavljanje novog sloja hidrofobnih monomera, bez pucaanja membrane, pri čemu hifa uopće ne mora napuštati vodeno okruženje. U drugom slučaju hifa prodire kroz hidrofobnu membranu i stanična stijenka dolazi u kontakt sa zrakom. Hidrofobini nastali u takvim hifama se združuju na granici stanična stijenka - zrak. Hidrofilna strana hidrofobina okrenuta je prema hidrofilnoj staničnoj stijenci, a hidrofobna je strana izložena

zraku. Hidrofobini štite dijelove plijesni od močenja ili sušenja tako što čine površinu konidija, spora i kapsula hidrofobnima te potpomažu disperziju spora i konidija koje se nalaze u vodi. Na granici ulje - voda dopuštaju jednosmjernan prolaz malih molekula (do 10 000 Da) s hidrofobne na hidrofilnu stranu i sprečavaju prolaz molekula veličine 300 - 10 000 Da s hidrofilne strane (Wösten, 2001; Shokribousjein i sur., 2011; Sunde i sur., 2011). Prekrivajući zračne hife plijesni, hidrofobini štite stanicu plijesni od imunskog odgovora domaćina (Wösten, 2001; Amanianda i sur., 2009).

2.1.3. Hidrofobini kao uzročnici primarnoga prekomjerna pjenjenja piva

Primarno prekomjerno pjenjenje pripisuje se, dakle, kvaliteti sirovina kojima se koristi u industriji slada i piva. Iako hidrofobine proizvode gljive iz različitih rodova, u sladarstvu odnosno pivarstvu od posebnog su značaja plijesni roda *Fusarium*, poglavito vrste *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum* koje su prisutne na slađenim i neslađenim sirovinama (Helm i Richardt, 1938; Sloey i Prentice, 1962; Niessen i sur., 1992; Lowe i Arendt, 2004; Sarlin i sur., 2007; Lutterschmid i sur., 2010). Potencijal ječma i slada za prekomjerno pjenjenje piva trenutačno se može predvidjeti određivanjem ukupnog broja plijesni roda *Fusarium* ili njihovih antigena (Vaag, 1991; Manke i Rath, 1997; EBC, 2001). Nedostatak je ove metode taj što kao takva ne detektira osnovne čimbenike koji pokazuju na prekomjerno pjenjenje piva (Sarlin i sur., 2005) - hidrofobine. Ipak, Rath (1997) je proveo istraživanje u kojemu je dodavao kontaminirana zrna (tzv. relevantna crvena zrna) u referentni materijal koji je imao mali potencijal za prekomjerno pjenjenje te je utvrdio da već 5 relevantnih crvenih zrna na 100 g slada potiče prekomjerno pjenjenje piva.

Sarlin i sur. (2005) dokazali su postojanje jasne povezanosti prekomjerna pjenjenja piva i hidrofobina. Prekomjerno pjenjenje uzrokuje već i vrlo mala količina hidrofobina od 2,5 - 3 $\mu\text{g/g}$ slada. Nadalje, otkrili su kako ječam kontaminiran plijesnima roda *Fusarium* pokazuje veći potencijal za prekomjerno pjenjenje.

Istraživanje koje su proveli Zapf i sur. (2006) pokazalo je kako hidrofobini izolirani iz plijesni *F. culmorum* pripadaju II. razredu, na osnovi čega se može pretpostaviti da hidrofobini II. razreda imaju značajniju ulogu u prekomjernu pjenjenju nego hidrofobini I. razreda. Dodatkom hidrofobina II. razreda u sladinu pojačalo se pjenjenje piva. U navedenom se istraživanju kao modelnom otopinom koristilo gaziranom vodom, koja se nakon dodatka hidrofobina također prekomjerno pjenila.

Količina hidrofobina mijenja se tijekom procesa sladenja. Tijekom ispiranja ječma ne dolazi do smanjenja potencijala prekomjerna pjenjenja, jer se hidrofobini sintetiziraju ispod pljevice ječma. Međutim, potencijal njihove sinteze se smanjuje tijekom procesa močenja (Vaag i Pederson, 1992; Vaag i sur., 1993; Garbe i sur., 2009). Do ponovnog povećanja koncentracije hidrofobina dolazi tijekom procesa klijanja zrna. Tijekom klijanja također može doći i do produkcije mikotoksina.

Unatoč činjenici kako je riječ o proteinima, hidrofobini su izrazito otporni na visoke temperature tijekom procesa ukomljavaanja. Tijekom ukomljavaanja dolazi do ekstrakcije hidrofobina iz zrna slada te dio hidrofobina završava u gotovom proizvodu - pivu. Tako nakon procesa proizvodnje piva (uko-

mljavanje, fermentacija, zrenje) zaostaje do 10 % od ukupne početne koncentracije hidrofobina u sladu, pri čemu se najveći udjeli uklanjaju s tropom, proteinskim talozima i otpadnim kvascem (Müller i sur., 2010; Sarlin i sur., 2007).

2.1.4. Primjena hidrofobina

Moguća primjena hidrofobina je višestruka - mogu se primijeniti u industriji kao biotenzidi (Khalesi i sur., 2012; Mackay i sur., 2001), za stabilizaciju pjene i emulzija u prehrambenim i kozmetičkim proizvodima (Crilly i sur., 2008; Vic, 2003), za imobilizaciju biološki aktivnih molekula i poboljšanje biosenzora (Espino-Rammer i sur., 2013; Zhao i sur., 2009), kao nosači aktivne tvari lijeka ili za povećanje biokompatibilnosti medicinskih implantata (Fang i sur., 2014; Valo i sur., 2013; Khalesi i sur., 2012; Bimbo i sur., 2011), kao mogući antitumorski terapeutici (Haas Jimoh Akanbi i sur., 2013), itd.

Hidrofobini se mogu koristiti u svrhu disperzije hidrofobnih krutina, tekućina i zraka. Dvodimenzionalni kristalinični grafen i višestjenčane ugljikove nanocjevčice stabilizirane su u vodenoj otopini oblaganjem hidrofobinom II. razreda HFBI (Laaksonen i sur., 2010), dok su upotrebom hidrofobina I. razreda dobivenih iz različitih vrsta gljiva (HFGI iz *Grifola frondosa*, te EAS i HYD3 iz *Fusarium verticillioides*) uspješno dispergirani u vodenim otopinama (Yang i sur., 2013; Wang i sur., 2010). Povećanjem stabilnost emulzija i mjehurića zraka u aeriranim prehrambenim proizvodima produljuje se njihov vijek trajanja. S obzirom na to da nisu toksični za ljude (Linder i sur., 2005; Cox i sur., 2009), hidrofobini se mogu koristiti u prehrambenoj industriji za stabilizaciju emulzija ili u proizvodnji aerirane hrane, poput sladoleda gdje u postupku aeracije stabiliziraju dispergirane mjehuriće zraka (Crilly, 2007; Crilly i sur., 2008).

Iako su hidrofobini u proizvodnji piva i drugih gaziranih pića nepoželjni, istražuje se njihova primjena kao sredstva za stabilizaciju pjene u aerobnim bioreaktorima, poput onih za uzgoj filamentoznih plijesni (Khalesi i sur., 2012). Istraživanje koje su proveli Cox i sur. (2009) pokazalo je kako se dodatkom hidrofobina u bioreaktor u koncentraciji od 0,1 % pri velikom rasponu pH vrijednosti, postiže iznimna stabilnost pjene.

Hidrofobini se mogu koristiti za imobilizaciju molekula i cijelih stanica, pri čemu ne dolazi do kovalentnog vezivanja. Tako se hidrofobini adsorbirani na odgovarajućem supstratu mogu koristiti za imobilizaciju proteina, poput enzima kutinaze koji je imobiliziran na poli(etilen -tereftalat) obložen hidrofobinima HFB4 i HFB7 dobivenim iz *Trichoderma* spp. (Espino-Rammer i sur., 2013). Nadalje, hidrofobini se mogu koristiti za imobilizaciju biološkog elementa za prepoznavanje analita u biosenzorima, kojeg čine cijele stanice mikroorganizama, njihovi dijelovi ili pročišćeni enzimi (Zhao i sur., 2009).

U industriji silikonskih mikro-uređaja hidrofobini se mogu primijeniti kao zaštita od kalijevog hidroksida kojim se odgovarajući uzorci urezuju na silikon. Dijelovi silikonske površine pokriveni hidrofobinima otporni su prema toj kemikaliji, dok se urezivanje s kalijevim hidroksidom neometano provodi na nezaštićeni dijelovima (De Stefano i sur., 2007).

Istraživanje koje se bavilo upotrebom hidrofobina za obradu vode onečišćene uljem i naftom, pokazalo je kako se hidrofobini mogu uspješno koristiti i s tom svrhom (Subkowski i sur., 2007).

U farmaceutskoj industriji hidrofobini se mogu koristiti kao nosači aktivne tvari lijekova netopljivih u vodi, kako u formulacijama za oralnu upotrebu, tako i u onima za intravenoznu primjenu lijeka (Fang i sur., 2014; Khalesi i sur., 2012; Valo i sur., 2010). Isto tako, mogu povećati površinsku stabilnost i biokompatibilnost već postojećih nosača aktivne tvari lijeka, poput poroznog silikona i celuloze (Valo i sur., 2013; Bimbo i sur., 2011). Poznata je upotreba hidrofobina u proizvodnji medicinskih implantata s ciljem povećanja njihove biokompatibilnosti (Hektor i Scholtmeijer, 2005). Naime, medicinski implantati moraju imati površine niskog trenja, kako bi se spriječilo oštećenje okolnih tkiva. Površine takvih karakteristika obično se dobivaju primjenom lubrikanata, kao što su primjerice silikonsko ulje ili glicerol. Slabo vezanje lubrikanata na površinu biomaterijala uzrokuje smanjenje njihove učinkovitosti s vremenom. Biomaterijali obloženi hidrofobinima alternativa su primjeni lubrikanata, jer imaju izrazito mali koeficijent trenja (smanjuju koeficijent trenja od 50 - 80 % u usporedbi s neobloženim površinama) (Misra i sur., 2006).

Medicinske gljive stoljećima su korištene u Aziji u terapijske svrhe. Biološki aktivni spojevi izolirani iz takvih gljiva (polisaharidi, proteini, polisaharid-protein kompleksi) stimuliraju ili inhibiraju imunski odgovor te se intenzivno istražuje njihova moguća primjena u liječenju karcinoma, imunodeficijencije i nekih autoimunih bolesti. Hidrofobin SC3 pokazao je snažan antitumorski učinak kod liječenja miševa koji su imali sarkom i melanom, pri čemu je SC3 inducirao imunomodulacijski učinak i nije pokazao znakove toksičnosti za miševce (Haas Jimoh Akanbi i sur., 2013). Daljnja istraživanja hidrofobina mogla bi dovesti do njihove združene uporabe s kemoterapeutima i zračenjem, ali i kao pomoćnih tvari za formulaciju hidrofobnih antitumorskih lijekova.

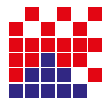
Ovo su samo neke od primjena tih vrlo zanimljivih proteina koji će u budućnosti zasigurno biti bolje istraženi i opisani.

2.1.5. Primarno prekomjerno pjenjenje piva i miktoksini

Plijesni roda *Fusarium* proizvode miktoksine [deoksinivalenol, zearalenon i njihove derivate (npr. zearalenon sulfat)] koji narušavaju zdravstvenu ispravnost slada i piva. Mnogi autori navode kako prisutnost miktoksina u pivu ima utjecaj i na pojavu prekomjerna pjenjenja piva (Schwarz i sur., 1995; Munar i Sebree, 1997) te na prisutnost ergosterola u sladu (Lowe i Arendt, 2004). Suprotno tome, Sarlin i sur. (2005; 2007) tvrde kako ne postoji veza između prisutnosti miktoksina i hidrofobina te kako nije moguće predvidjeti prekomjerno pjenjenje piva na osnovi prisutnosti miktoksina u sladu i pivu. Nadalje, prisutnost hidrofobina ne prejudicira i prisutnost miktoksina u sladu i pivu.

Kako se spojevi koji uzrokuju prekomjerno pjenjenje piva stvaraju prije sinteze deoksinivalenola tijekom klijanja kontaminiranog ječma, pretpostavlja se da se ti spojevi stvaraju nezavisno jedni od drugih. Samo se u slučaju jake kontaminacije ječma vrstom *F. graminearum* može naći poveznica između količine deoksinivalenola, simptoma fuzarijske paleži klasa i potencijala za prekomjerno pjenjenje piva (Sarlin i sur., 2007; Lutterschmid i sur., 2010; Habschied i sur., 2014).

Za istraživanja koja se bave ovom problematikom vrlo je važno rabiti prirodno inficiran ječam, odnosno ječam inficiran



još na polju zbog toga što se hidrofobini i ostali spojevi sintetiziraju već za vrijeme rasta biljke (Lowe i Arendt, 2004; Shokribousjein i sur., 2011). U istraživanju Lowe i Arendt (2004) proizveden je slad od ječma umjetno zaraženog vrstom *F. culmorum* koji je pokazivao smanjenu klijavost, manju razliku ekstrakta i smanjenu aktivnost α - amilaze. Sladovina koja je dobivena od tog slada imala je povećane vrijednosti α - amino dušika, zearalenona i jači potencijal za prekomjerno pjenjenje piva.

2.2. Uzročnici sekundarnoga prekomjerna pjenjenja piva

Kako je već spomenuto, uzročnici sekundarnoga prekomjerna pjenjenja piva mnogobrojni su i najčešće se mogu izbjeći primjenom dobre proizvođačke prakse. Neki su od najznačajnijih opisani u ovom poglavlju.

Proteini podrijetlom iz ječma, odnosno slada obično ne izazivaju pojavu prekomjerna pjenjenja piva. Međutim, ako tijekom procesa proizvodnje piva dođe do razgradnje biljnih proteina za prijenos nespecifičnih lipida [engl. *plant typical non-specific lipid transfer proteins* (ns-LTPs)], to može doprinijeti povećanju potencijala piva za pjenjenje, odnosno snažnijem pjenjenju piva (Sarlin i sur., 2005; Deckers i sur., 2010; Christian i sur., 2010; Deckers i sur., 2011). Laibl i Geiger (2003) su ustanovili kako i neki lipidi koje izlučuju plijesni roda *Fusarium* također mogu povećati potencijal piva za prekomjerno pjenjenje.

Uzrok prekomjerna pjenjenja piva može biti i povećana aktivnost proteaza. Naime, povećane vrijednosti Kolbachovoa indeksa utječu na koloidnu strukturu gotova piva, što nadalje utječe na stabilnost pjene, topljivost plinova i stvaranje mikromjehurića. Sve navedeno u konačnici može izazvati sekundarno prekomjerno pjenjenje piva (Garbe i sur., 2009);

Tijekom procesa proizvodnje piva koristi se raznim dodacima koji mogu sadržavati metalne ione. Prisutnost metalnih iona (npr. Fe^{3+}) iz dijatomejske zemlje može također biti okidač za sekundarno prekomjerno pjenjenje piva (Christian i sur., 2009; Christian i sur., 2010). Oksalna kiselina ili njezine soli (najčešće kalcijev oksalat) prisutne su u relativno velikim koncentracijama u pivu. U sladovini je njezina koncentracija oko 40 mg/L, dok se u pivu smanjuje na 10 - 25 mg/L. Soli oksalne kiseline stvaraju agregate s hidrofobinima, što potpomaže stvaranje mjehurića koji uzrokuju prekomjerno pjenjenje piva (Müller i sur., 2013).

Dodavanje uobičajenih sastojaka tijekom proizvodnje piva, kao što je hmelj, također može izazvati pojavu prekomjerna pjenjenja. Naime, smatra se da su u hmeljnom ulju prisutni spojevi koji potiču prekomjerno pjenjenje piva: polifenoli, zasićeni lipidi, izohumuloni, bezvodna humulinska kiselina, oksidacijski produkti α - i β - kiselina. Prema istraživanju koje su proveli Deckers i sur. (2010; 2011), dodavanje hmelja nakon hlađenja sladovine pridonosi prekomjernu pjenjenju piva.

Temperatura skladištenja piva važan je čimbenik ako se želi izbjeći pojava sekundarnoga pjenjenja piva. Naime, što je temperatura piva u skladištu niža, a temperatura nakon otvaranja boce viša, doći će do izraženijeg pjenjenja nakon otvaranja boce (Deckers i sur., 2011; Garbe i sur., 2009).

3. Sprječavanje pojave prekomjerna pjenjenja piva

Osim istraživanja uzroka tog fenomena, istražuju se i metode kojima bi se moglo spriječiti njegovo nastajanje, pri čemu se istražuju mogućnosti intervencije u različitim fazama proizvodnje piva. Mnoge od predloženih metoda, nažalost, nisu prikladne za primjenu u industrijskom mjerilu, odnosno u realnim sustavima (Shokribousjein i sur., 2011).

Raspršivanjem suspenzije bakterija mliječne kiseline po biljkama (ječam) na polju pokušava se suzbiti kontaminacija plijesnima roda *Fusarium*, kako bi se osigurala zdravstvena ispravnost sirovine te posljedično smanjila mogućnost pojave prekomjerna pjenjenja piva (Garbe i sur., 2009)

Istraživanja koja su proveli Munar i Sebree (1997) te Sarlin i sur. (2007) pokazala su kako produljeno vrijeme skladištenja ječma smanjuje sposobnost plijesni da stvaraju hidrofobine, čime se smanjuje i potencijal piva za prekomjerno pjenjenje. Nadalje, primjena ozona za inaktivaciju plijesni u silosima, također je metoda koja se može primijeniti kao prevencija prekomjerna pjenjenja piva već na razini polazne sirovine (Allen i sur., 2003; Kottapalli i sur., 2005).

Sterilizacija ječma radijacijom (6 - 8 kGy) znatno smanjuje ukupan broj plijesni roda *Fusarium* koji su odgovorni za sintezu hidrofobina (Kottapalli i sur., 2003). S obzirom na to da sterilizacija ječma radijacijom ne utječe na klijavost ječma tijekom slađenja, ta se metoda može smatrati prihvatljivom za upotrebu. Tretman ječma vodikovim peroksidom također djeluje na smanjenje kontaminacije plijesnima iz roda *Fusarium*. Istraživanje koje su proveli Kottapalli i sur. (2005) pokazalo je kako se tijekom 5 min tretmana kontaminacija ječma smanjila za 50 - 98 %. Primjena vodikovog peroksida također nije imala utjecaja na klijavost ječma tijekom slađenja.

Miješanje različitih šarži slada jednako se tako pokazalo korisnim u svrhu smanjenja prekomjerna pjenjenja piva. Međutim, čest problem kod primjene te metode je nedostatak skladišnog prostora u pivovarama, što poskupljuje proces proizvodnje piva. Nadalje, u godinama kada je urod manji ili više kontaminiran plijesnima, nema dovoljno "zdrave" sirovine koja bi se uporabila za miješanje (Müller i sur., 2013).

Tijekom procesa proizvodnje slada, poglavito tijekom močenja, rast plijesni može se spriječiti i biološkim metodama, primjerice dodatkom bakterija mliječne kiseline ili kvasca *Geotrichum candidum* u vodu za močenje. Ti mikroorganizmi znatno smanjuju probleme uzrokovane prisutnošću *Fusarium* vrsta na ječmu i mikotoksina deoksinivalenola (Boivin i Malanda, 1997).

Prema Haikara i sur. (1980), dodatak formaldehida (1 g/kg ječma) tijekom močenja ječma sprječava rast plijesni roda *Fusarium*. Međutim, glavni je nedostatak tog postupka taj što primjena formaldehida nije dopuštena zbog njegova štetnog utjecaja na zdravlje. Tijekom močenja ječma se može tretirati i vrućom vodom (45 ili 50° C kroz 15 min), pri čemu se znatno smanjuje stupanj kontaminacije plijesnima roda *Fusarium*. Prema istraživanju koje su proveli Kottapalli i sur. (2003), primjenom te metode smanjio se stupanj kontaminacije tijekom močenja s 32 % na 1 - 2 %. (Shokribousjein i suradnici, 2013)

Uobičajena metoda za sprječavanje pojave prekomjerna pjenjenja piva je dodatak kalcijevih soli (kalcijev klorid ili kalcijev sulfat) u vodu za proizvodnju piva (Müller i sur., 2013).

Ti spojevi reagiraju s kalcijevim oksalatom i tako tijekom taloženja sprječavaju oslobađanje CO₂. Iako je ta metoda učinkovita, pokazalo se kako kalcijev sulfat u prisutnosti Mg²⁺ iona uzrokuje netipično gorak okus te znatno mijenja aromu piva. Kalcijev klorid uzrokuje slani priokus tijekom konzumacije piva, ali i žgaravicu kod potrošača, a ako koncentracija klorida prelazi 70 mg/L može doći i do korozije opreme od nehrđajućeg čelika.

Dodatak različitih kalcijem obogaćenih silikata tijekom ukomljavanja također može djelovati na smanjenje pojave prekomjerna pjenjenja piva (Müller i sur., 2013). Hidrofobini se vežu za produkt silikatne soli i oksalne kiseline te se tijekom filtracije izdvajaju s tropom. Budući da se silikatne soli dodaju u vodu za proizvodnju piva, pH vrijednost te vode se podiže do 5,8 što pridonosi agregaciji hidrofobina i smanjenju pojave prekomjerna pjenjenja piva (Müller i sur., 2013). Primjenom te metode u pivu ne dolazi do promjene mineralnog sastava, što znači da se njegova senzorska svojstva uopće ne mijenjaju, dapače, još su prihvatljivija potrošačima. Jednako se tako ne narušavaju stabilnost pjene i fizikalno-kemijska svojstva piva (Müller i sur., 2013).

Dodatkom proteolitičkih enzima u sladovinu dolazi do razgradnje hidrofobina i biljnih proteina podrijetlom iz ječma, čime se znatno smanjuje pojava prekomjerna pjenjenja piva (Aastrup i sur., 1996; Sarlin i sur., 2005; Garbe i sur., 2009).

Iako neki spojevi iz hmelja mogu izazvati sekundarno pjenjenje piva, dodatak hmeljnog ulja pivu u vrlo malim koncentracijama (1 mg/L) može znatno smanjiti potencijal prekomjerna pjenjenja piva (Christian i sur., 2010). Glavni je problem te metode činjenica da takvo pivo okusom nije privlačno potrošačima te nije u skladu s njemačkim zakonom o čistoći piva (Hanke i sur., 2009; Müller i sur., 2013).

Shokribousjejin i suradnici (2013) istraživali su utjecaj dodatka lipofilnog ekstrakta hmelja u različitim fazama proizvodnje piva na primarno prekomjerno pjenjenje piva. Rezultati istraživanja pokazali su kako dodatak lipofilnog ekstrakta hmelja dovodi do znatnog smanjenja intenziteta prekomjerna pjenjenja piva kada je ekstrakt dodan nakon procesa ukomljavanja (filtriranoj i ohlađenoj sladovini). To smanjenje bilo je znatno manje kada je ekstrakt dodan prije ukomljavanja. Kako bi se istražio potencijal za prekomjerno pjenjenje samog ekstrakta hmelja, kao modelna otopina korištena je gazirana voda. Dodatkom hmeljnog ekstrakta modelnoj otopini nakon ukomljavanja nije došlo do prekomjerna pjenjenja. Kada je hmeljni ekstrakt dodan u modelnu otopinu prije ukomljavanja došlo je do prekomjerna pjenjenja vode. Proces ukomljavanja dovodi do promjene svojstava samog hmeljnog ekstrakta, posebice zasićenih i nezasićenih masnih kiselina te voskova. Uslijed znatnog povećanja temperature tijekom ukomljavanja dolazi do taljenja navedenih spojeva te oni ulaze u interakcije s hidrofobinima i CO₂, što za posljedicu ima prekomjerno pjenjenje otopine u kojoj se nalaze. Stoga hmeljni ekstrakt koji se koristi u svrhu smanjenja potencijala prekomjerna pjenjenja piva treba dodati u sladovinu nakon filtracije i hlađenja.

Daljnja aktivnost ove istraživačke skupine (Shokribousjejin i sur., 2015) uključuje istraživanje tijekom kojeg su u sladovinu koja je sadržavala hidrofobin HFBI dodavali protupjenjivče u obliku hmeljnog ekstrakta te su zatim tako pripremljenu sladovinu izložili utjecaju magnetskog polja. Taj je postupak doveo do smanjenja intenziteta prekomjerna pjenjenja piva, što

se objašnjava činjenicom kako magnetsko polje utječe na bolju disperziju i smanjenje čestica hmeljnog ekstrakta, što dovodi do povećanja površine čestica i interakcije protupjenjivča s velikim brojem molekula hidrofobina. Još veće smanjenje intenziteta pjenjenja postignuto je kada se hmeljni ekstrakt, prije nego što se dodao sladovini, izložio utjecaju magnetnog polja. Bolja disperzija čestica hmeljnog ekstrakta moguća je zbog hidrodinamičkih sila koje se javljaju tijekom turbulentnog strujanja te pojave Lorentzove sile koja se javlja zbog prisutnosti polarnih molekula u hmeljnom ekstraktu (masne kiseline). Ta sila pojačava smicanje među česticama, što utječe na njihovu segregaciju. Ovo je istraživanje značajno za industriju piva jer omogućava prethodnu obradu protupjenjivča, bez potrebe obrade sladovine na opisan način, pri čemu se postiže jednak učinak.

Osim istraživanja hmeljnog ekstrakta Shokribousjejin i suradnici (2015) istražili su i mehanizam inhibicije primarnoga prekomjerna pjenjenja piva uporabom različitih nepolarnih modelnih molekula. U radu je korišten dobro istražen hidrofobin HFBI i proučavane su njegove interakcije s nepolarnim molekulama te utjecaj tih interakcija na fenomen prekomjerna pjenjenja piva. Nepolarne molekule bile su različite kemijske prirode, duljine, stupnja zasićenja (alkani, alkeni, masne kiseline). Kada su te molekule pomiješane s hidrofobinom HFBI, došlo je do stvaranja kompleksa nepolarna molekula-hidrofobin, koji su pokazali manji ili nikakav potencijal za prekomjerno pjenjenje. Ovaj učinak autori su objasnili natjecanjem između nepolarnih molekula i molekula CO₂ za vezanje s hidrofobnim dijelom hidrofobina. Priroda interakcija nepolarna molekula-hidrofobin nije kovalentne prirode, niti uključuje stvaranje vodikovih veza.

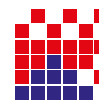
Membranska filtracija piva (pore veličine 0,45 i 0,65 μm) smanjuje pojavu prekomjerna pjenjenja piva i do 50 % (Christian i sur., 2009).

Tijekom pasterizacije piva (60 °C) struktura hidrofobinskog omotača oko nanomjehurića slabi i destabilizira se (Deckers i sur., 2011), a posljedica ponavljanja tog postupka je povećanje tlaka u sustavu i solubilizacija mjehurića, što u konačnici smanjuje prekomjerno pjenjenje piva (Garbe i sur., 2009).

Iako se metode suzbijanja pojave prekomjerna pjenjenja piva i dalje intenzivno istražuju, još uvijek ne postoji dovoljno učinkovita i općeprihvaćena metoda koja bi u potpunosti spriječila navedenu pojavu.

4. Zaključak

Iako je istraživačka aktivnost vezana uz pojavu prekomjerna pjenjenja piva vrlo intenzivna, još uvijek ne postoje općeprihvaćene metode za učinkovito suzbijanje te pojave. S obzirom na to da su mali fungalni proteini hidrofobini koje sintetiziraju plijesni roda *Fusarium* identificirani kao najznačajniji uzročnici primarnoga prekomjerna pjenjenja piva, može se pretpostaviti kako će daljnja istraživanja ovog fenomena biti usmjerena na pronalaženje učinkovitih strategija za smanjenje kontaminacije polazne sirovine ovim plijesnima. Na taj bi se način ujedno osigurala i mikotoksikološka odnosno zdravstvena ispravnost polazne sirovine, što je iznimno važno kod prijema ječma u sladaru. Boljim poznavanjem čimbenika koji induciraju pojavu prekomjerna pjenjenja piva i pronalaženje učinkovitih metoda koje ju suzbijaju, omogućilo bi smanjenje



gubitaka koji nastaju u sladarama i pivovarama kao posljedica navedene pojave.

5. Literatura

Astrup S., Legind-Hansen P., Nielsen H. (1996) Enzymatic reduction of gushing tendencies in beer. *Brauwelt International* II, 136-138.

Aimanianda V., Bayry J., Bozza S., Knemeyer O., Perruccio K., Elluru S.R., Clavaud C., Paris S., Brakhage A.A., Kaveri S.V., Srinu V.K., Romani L., Latge J.P. (2009) Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460, 1117-1121.

Allen B., Wu J., Doan H. (2003) Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. *Journal of Environmental Science and Health* 38, 617-630.

Amaha M., Kitabatake K. (1981) Gushing in beer. U: *Brewing science*, Vol. 2, J. R. A. Pollock, Ed., Academic Press: London, pp. 457-489.

Bamforth C. W. (2011) 125th anniversary review: the non-biological instability of beer. *Journal of the Institute of Brewing* 117, 488-497.

Bimbo L. M., Mäkilä E., Raula J., Laaksonen T., Laaksonen P., Strommera K., Kauppinen E. I., Salonen J., Linder M. B., Hirvonen J., Santos H. A. (2011) Functional hydrophobin-coating of thermallyhydrocarbonized porous silicon microparticles. *Biomaterials* 32, 9089-9099

Boivin P., Malanda M. (1997) Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *MBAA Technical Quarterly* 34, 96-101.

Casey G. P. (1996) Primary versus secondary gushing assay procedures used to assess malt/beer gushing potential. *MBAA Technical Quarterly* 33, 229-235.

Christian M., Ilberg V., Aydin A. A., Titze J., Friess A., Jacob F., Parlar H. (2009) New gushing mechanism proposed by applying particle size analysis and several surfactants. *Brewing Science* 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. *Brewing Science* 63, 72-79.

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

Cox A.R., Aldred D.L., Russell A.B. (2009) Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBI. *Food Hydrocolloids* 23, 366-376.

Crilly J. F. (2007) ISP: a breakthrough for better ice-cream. *New Food* 7, 40-45.

Crilly J. F., Russell A. B., Cox A. R., Cebula D. J. (2008) Designing multiscale structures for desired properties of ice-cream. *Industrial and Engineering Chemical Research* 47, 6362-6367.

Curtis N. S., Martindale L. (1961) Studies on gushing I. Introduction. *Journal of the Institute of Brewing* 67, 417-421.

Dachs M., Nitschke R. (1977) Fallstudie zum Problem "Gushing". *Brauwelt* 117, 129-131.

De Stefano I., Rea I., Armenante A., Giardina P., Giocondo M., Rendina I. (2007) Self-assembled biofilm of hydropho-

bins protect the silicon surface in the KOH wet etch process. *Langmuir* 23, 7920-2.

De Vries O. M. H., Fekkes M. P., Wösten H. A. B., Wessels J. G. H. (1993) Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Archives of Microbiology* 159.

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 nanobombs in beer. *Brewing Science* 63, 54-61.

Deckers S. M., Lorgouilloux Y., Gebruers K., Baggerman G., Michiels C., Neven H., Derdelinckx G., Delcour J. A., Martens J. (2011) Dynamic light scattering (DLS) as a tool to detect CO₂-hydrophobin structures and study the primary gushing potential of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 69, 144-149.

Draeger M. (1996) Physikalische Überlegungen zum Thema Gushing. *Brauwelt* 7, 259-264.

EBC *Analytica Microbiologica II*, CD-ROM, 2001.

Espino-Rammer L., Ribitsch D., Przylucka A., Marold A., Greimel K. J., Herrero Acero E., Guebitz G. M., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2013) Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. Stimulate enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4230-4238

Fang G, Tang B., Liu Z., Gou J., Zhang Y., Xu H., Tang X. (2014) Novel hydrophobin-coated docetaxel nanoparticles for intravenous delivery: in vitro characteristics and in vivo performance. *European Journal of Pharmaceutical Science* 60, 1-9.

Fischer S. (2001) Blasenbildung von in Flüssigkeiten gelösten Gasen. Doctoral Thesis, TU-München, Munich, Germany.

Garbe L. A., Schwarz P., Ehmer A. (2009) Beer gushing. U Bamforth C. W., Russell I., Stewart G. (ed), *Handbook of Alcoholic Beverages Series, Beer A Quality Perspective*. Elsevier Ltd., pp. 185-212.

Gardner R. J. (1973) The mechanism of gushing. A review. *Journal of the Institute of Brewing* 79, 275-283.

Guggenberger J., Kleber W. (1963) Über den Mechanismus des Wildwerdens von Bier. Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels, Elsevier Scientific: Amsterdam, pp. 299-319.

Habschied K., Krstanović V., Velić N., Šantek B., Novak M., Slačanac V. (2014) Gushing potential of wheat malt infected with *Fusarium culmorum*. *Journal of Hygienic Engineering and Design* 6, 166-170.

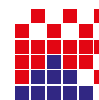
Haikara A. (1980) Gushing induced by fungi. *European Brewery Convention Monograph VI*, Relationship between Malt and Beer, pp. 251-258.

Hanke S., Kern M., Herrmann M., Back W., Becker Th., Krottenthaler M. (2009) Suppression of gushing by hop constituents. *Brewing Science* 62, 181-186.

Haas Jimoh Akanbi M., Post E., van Putten S. M., de Vries L., Smisterova J., Meter-Arkema A. H., Wösten H. A. B., Rink R., Scholtmeijer K. (2013) The antitumor activity of hydrophobin SC3, a fungal protein. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 4385-4392.



- Hektor H. J., Scholtmeijer K. (2005) Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 434-439.
- Helm E., Richardt O. C. (1932) Das Übersäumen (Wildwerden) des Bieres. *Wochenschrift für Brauerei* 55, 89-94.
- Hippeli, S., Hecht, D. (2009) The role of ns-LTP1 and proteases in causing primary gushing. *BRAUWELT Int.* 27, 30-34.
- Kallio J. M., Linder M. B., Rouvinen J. (2007) Crystal structures of hydrophobin hfbii in the presence of detergent implicate the formation of fibrils and monolayer films. *Journal of Biological Chemistry* 282, 28733-28739.
- Khalesi M., Deckers S. M., Gebruers K., Vissers L., Verachtert H., Derdelinckx G. (2012) Hydrophobins: Exceptional proteins for many applications in brewery environment and other bio-industries. *Cerevisia* 37, 3-9.
- Kieninger H. (1976) Gushing des Flaschenbieres-derzeitiger Forschungsstand. *Brauwelt* 116, 1633-1636.
- Kottapalli B., Wolf-Hall C. E., Schwarz P., Schwarz J., Gillespie J. (2003) Evaluation of hot water and electron beam irradiation for reducing *Fusarium* infection in malting barley. *Journal of Food Protection* 66, 1241-1246.
- Kottapalli B., Wolf-Hall C. E., Schwarz P. (2005) Evaluation of gaseous ozone and hydrogen peroxide treatments for reducing *Fusarium* survival in malting barley. *Journal of Food Protection* 68, 1236-1240.
- Laibl B., Geiger E., Primary gushing and polar lipids - an important addition to gushing research. Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Dublin, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, str. 915-922 (2003)
- Laaksonen P., Kainlahti M., Laaksonen T., Shchepetov A., Jiang H., Ahopelto J., Linder M. B. (2010) Interfacial engineering by proteins: exfoliation and functionalization of graphene by hydrophobins. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 4946-4949.
- Linder M. B. (2009) Hydrophobins: proteins that self-assemble at interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14, 356-363.
- Linder M. B., Szilvay G. R., Nakari-Setälä T., Penttilä M. E. (2005) Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 877-896.
- Lowe P. D., Arendt E. K. (2004) The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationship to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *Journal of the Institute of Brewing* 110, 163-180.
- Lutterschmid G., Stübner M., Vogel R. F., Niessen L. (2010) Induction of gushing with recombinant class II hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* and the impact of hop compounds on its gushing potential. *Journal of the Institute of Brewing* 116, 339-347.
- Mackay J. P., Jacqueline K., Matthews M., Winefield R. D., Mackay L. G., Haverkamp R. G., Templeton M. D. (2001) The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Structure* 9, 83-91.
- Misra R., Li J., Cannon G. C., Morgan S. E. (2006) Nanoscale reduction in surface friction of polymer surfaces modified with Sc3 hydrophobin from *Schizophyllum commune*. *Biomacromolecules* 7, 1463-1470.
- Kisko K., Characterization of hydrophobin proteins at interfaces and in solutions using X-rays. Disertacija. University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Physics, 2008.
- Manke W., Rath F. (1997) Rapid test for *Fusarium* as a practical tool for HACCP in malting. *European Brewery Convention Monograph* 26, Stockholm, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, pp. 27-33.
- Müller M. P., Schmid F., Becker T., Gastl M. (2010) Impact of different hop compounds on the overfoaming volume of beer caused by primary gushing. *Journal of the Institute of Brewing* 116, 459-463.
- Müller V., Besier A., Pätz R., Fröhlich J. (2013) Method for the treatment of the phenomenon gushing in beer and malt beverages. *Erbslöh Geisenheim AG -AnGus1516® Brauindustrie*, 1-9.
- Munar M. J., Sabree B. (1997) Gushing - A malster's view. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55, 119-122.
- Niessen L., Donhauser S., Weideneder A., Geiger E., Vogel H. (1992) Mykologische Untersuchungen an Cerealien und Malzen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) des Bieres. *Brauwelt* 132, 702-714.
- Paananen A., Vuorimaa E., Torkkeli M., Penttilä M., Kauranen M., Ikkala O., Lemmetyinen H., Serimaa R., Linder M. B. (2003) Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry* 42, 5253-5258.
- Pellaud, J. (2002) Gushing: state of the art. *Cerevisia* 27, 189-205.
- Rath F. (2009) Gushing in 2008 - trialling the "Modified Carlsberg test". *BRAUWELT International* 27, 26-29.
- Rilling M. C. (2005) A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency? *Pedobiologia* 49, 395-399
- M.J. Lewis, C.W. Bamforth, *Essays in Brewing Science*. Springer, US, str. 28-42, 2007.
- Sarlin T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Haikara A. (2005) Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing* 111, 105-111.
- Sarlin T., Vilpola A., Kotaviita E., Olkku J., Haikara A. (2007) Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain. *Journal of the Institute of Brewing* 113, 147-153.
- Schur F., Anderegg P., Senften H., Pfenniger H. (1980) Brautechnologische Bedeutung von Oxalat. *Brauerei Rundschau* 91, 201-207.
- Schwarz P. B., Casper H. H., Beattie S. (1995) Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53, 121-127.
- Shokribousjein Z., Deckers S. M., Gebruers K., Lorgouilloux Y., Baggerman G., Verachtert H., Delcour J. A., Ettienne P., Rock J.-M., Michiels C., Derdelinckx G. (2011) Review: Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia* 35, 85-101.
- Shokribousjein Z., Philippaerts A., Riveros D. G., Deckers S. M., Khalesi M., Michiel C., Delcour J. A., Gebruers K., Verachtert H., Derdelinckx G., Sels B. (2013) Effect of the mashing process on the performance of a lipophilic hop extract to reduce the primary gushing of beer. *Cerevisia* 38, 71-76.
- Shokribousjein Z., Riveros Galan D., Michiels C., Gebruers K., Verachtert H., Martens J., Peeters C., Derdelinckx G.



(2015) Effect of a magnetic field on dispersion of a hop extract and the influence on gushing of beer. *Journal of Food Engineering* 145, 10-18.

Shokribousjein Z., Riveros D. G., Losada-Pérez L., Wagner P. H., Lammertyn J., Arghir I., Golreihan A., Verachtart H., Aydin A. A., De Maeyer M., Titze J., Ilberg V., Derdelinckx G. S. (2015) Mechanism of Nonpolar Model Substances to Inhibit Primary Gushing Induced by Hydrophobin HFBI. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), in press.

Sloey W. i Prentice N. (1962) Effects of *Fusarium* isolates applied during malting on properties of malt. *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists* 24-29.

Subkowski T., Karos M. (2007) Industrial performance proteins: hydrophobin-learning from nature. *Journal of Biotechnology* 131, S212-S213.

Sunde M., Kwan A. H. Y., Templeton M. D., Beever, R. E., Mackay, J. P. (2008) Review: Structural analysis of hydrophobins. *Micron* 39, 773-784.

Szilvay G. R., Paananen A., Laurikainen K., Vuorimaa E., Lemmetyinen H., Peltonen J., Linder M.B. (2007) Self-assembled hydrophobin protein films at the air-water interface: structural analysis and molecular engineering. *Biochemistry* 46, 2345-2354.

Talbot N. J., Ebbole D. J., Hammer J. E. (1993) Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5, 1575-1590.

Vaag P. (1991) Immunological detection of *Fusarium* in barley and malt. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Lisbon, IRL press: Oxford, pp. 553-560.

Vaag P., Pederson S. (1992) Practical experiences with immunological techniques for the detection of *Fusarium* in barley and malt. *European Brewery Convention Biochemistry and Microbiology Groups Bulletin*, EBC, Zoeterwoude, Netherlands.

Vaag P., Preben R., Knudson A.-D., Pederson S., Meiling E. A. (1993) A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress* 24, 155-162.

Valo H., Arola S., Laaksonen P., Torkkeli M., Peltonen L., Linder M. B., Serimaa R., Kuga S., Hirvonen J., Laaksonen T. (2013) Drug release from nanoparticles embedded in four different nanofibrillar cellulose aerogels. *European Journal of Pharmaceutical Science* 50, 69-77.

Valo H.K., Laaksonen P.H., Peltonen L.J., Linder M.B., Hirvonen J.T., Laaksonen T.J., (2010) Multifunctional hydrophobin: toward functional coatings for drug nanoparticles. *ACS Nano* 4, 1750-1758.

Vic G. (2003) Cosmetic use of at least one hydrophobin for treating keratin materials, and compositions used. US Patent Application 20030217419.

Wang Z., Wang Y., Huang Y., Li S., Feng S., Xu H., Qiao M. (2010) Characterization and application of hydrophobin-dispersed multiwalled carbon nanotubes. *Carbon* 48, 2890-2898.

Wang Z.-Y., He G.-Q., Liu Z.-S., Ruan H., Chen Q.-H., Xiong H.-P. (2005) Purification of yeast proteinase A from fresh beer and its specificity for foam proteins. *International Journal of Food Science and Technology* 40, 1-6.

Wershofen T. (2004) Gushing - Ein überschäumend spritziges Erlebnis. *Brauwelt*, 35, 1061-1063.

Wessels J.G.H. (1994) Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Reviews in Phytopathology* 32, 413-437.

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

Wessels J.G.H., de Vries O.M.H., Asgeirsdottir, S.A., Springer J. (1991) The *thin* mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene. *Journal of Genetic Microbiology* 137, 2439-2445.

Wösten H. A. B. (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Reviews of Microbiology* 55, 625-646.

Wösten H. A. B., de Vries O. M. H., Wessels J. G. H. (1993) Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell* 5, 1567-1574.

Wösten H. A. B., vanWetter M. A., Lugones L. G., van der Mei H. C., Busscher H. J., Wessels J. G. H. (1999) How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology* 9, 85-88.

Yang W., Ren Q., Wu Y.-N., Morris V. K., Rey A. A., Braet F., Kwan A. H., Sunde M. (2013) Surface functionalization of carbon nanomaterials by self-assembling hydrophobin proteins. *Biopolymers* 99, 84-94.

Zapf M. W. (2006) Charakterisierung oberflächenaktiver Proteine aus *Fusarium* spp. und deren Einfluss auf die Blasenstabilisierung in Bier. Disertacija, TU: München.

Zapf M. W., Theisen S., Vogel R. F., Niessen L. (2006) Cloning of wheat LTP1500 and two *Fusarium culmorum* hydrophobins in *Saccharomyces cerevisiae* and assesment of their gushing indicting potential in experimental worth fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 112, 237-245.

Zhao Z. X., Wang H. C., Qin X., Wang X. S., Qiao M. Q., Anzai J., Chen Q. (2009) Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71,102-106.

Zykwinska A., Guillemette T., Bouchara J.-P., Cuenot S. (2014) Spontaneous self-assembly of SC3 hydrophobins into nanorods in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844, 1231-1237.