

DOI: 10.18832/kp201811

## Low-Molecular Weight Proteins in Malt and Gushing Nízkomolekulární proteiny ve sladu a gushing

Zdeněk SVOBODA<sup>1</sup>, Renata MIKULÍKOVÁ<sup>1</sup>, Pavla MYSLIVCOVÁ<sup>2</sup>, Sylvie BĚLÁKOVÁ<sup>1</sup>, Karolína BENEŠOVÁ<sup>1</sup><sup>1</sup> Research Institute of Brewing and Malting, Malting Institute, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno

<sup>2</sup> University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

e-mail: svoboda@beerresearch.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

**Svoboda, Z., Mikulíková, R., Myslivcová, P., Běláková, S., Benešová, K., 2018: Low-Molecular weight proteins in malt and gushing.**

Kvasny Prum. 64(2): 46–49

Gushing – overfoaming of beer – can be affected by hydrophobic polypeptides and high surface activity. The study focused on lipid transfer proteins (LTP) and hydrophobins – products of microscopic filamentous fungi. For the experiment, barley samples, intermediaries of malting and malt were used. Proteins extracted from the samples were subsequently separated with the SDS-PAGE method with the TRIS-tricine buffer system. Character of the change in the content of the low-molecular weight proteins during malting was studied. The studied relationships between the low-molecular weight proteins, gushing potential and microbiological contamination of samples were not proven.

**Svoboda, Z., Mikulíková, R., Myslivcová, P., Běláková, S., Benešová, K., 2018: Nízkomolekulární proteiny ve sladu a gushing.**

Kvasny Prum. 64(2): 46–49

Gushing – přepěňování piva – může být ovlivněn hydrofobními polypeptidy s vysokou povrchovou aktivitou. V práci byla pozornost zaměřena na proteiny ječmene přenášející lipidy - lipid transfer proteins – LTP a hydrofobiny – produkty mikroskopických vláknitých hub. Pro experiment byly použity vzorky ječmene, meziproductů sladování a sladu. Ze vzorků byly extrahovány proteiny, které byly následně separovány metodou SDS-PAGE za použití TRIS-tricinového pufového systému. Byl sledován charakter změny obsahu zmíněných nízkomolekulárních proteinů během sladování. Dále byly hledány souvislosti mezi obsahem nízkomolekulárních proteinů, gushingovým potenciálem a mikrobiologickou kontaminací vzorků, které však nebyly prokázány.

**Keywords:** gushing, hydrophobins, LTP proteins, SDS-PAGE**Klíčová slova:** gushing, hydrofobiny, LTP proteiny, SDS-PAGE

### 1 INTRODUCTION

Gushing is one of many aspects of beer quality. This spontaneous overfoaming of beer is caused by non-controlled release of carbon dioxide (Čepička et al., 1993). The gushing potential of barley or malt in brewing is determined with the Carlsberg or its modified version (Nesvadba et al., 2009; Christian et al., 2011). Based on its causes, two types of gushing are distinguished: primary and secondary. Primary gushing is associated with infection of pathogenic fungi which occur in malt. Secondary gushing is connected with the production parameters such as rough surface of the bottle, carbon dioxide oversaturation or high concentrations of heavy metal and oxalates (Basařová, 2015; Běláková et al., 2012; Hégrová et al., 2009).

The cause of the primary gushing is connected with malt attacked with microscopic filamentous fungi, most commonly *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, and *Nigrospora* spp. During malting, the above mentioned fungi can proliferate and produce mycotoxins and hydrophobic polypeptides – hydrophobins with high surface activity hydrophobes characterized by a high affinity to carbon dioxide. Hydrophobins are present in the cell walls of microscopic filamentous fungi where they are involved in mycelium and spore production. Secreted proteins are able to decrease the surface tension of water or change the hydrophilic nature of the surface to hydrophobic (Sarlin et al., 2005).

Based on the amino acid composition, hydrophobes can be divided into two classes: hydrophobins I and hydrophobins II. In general, hydrophobins are in the range of 7–20 kDa and play an important role in the growth of pathogenic fungi. The molecular weight of hydrophobins produced by *Fusarium* filamentous fungi is 8.5 kDa (Sarlin et al., 2005; Bamforth, 2009).

The principle of overfoaming of beer is carbon dioxide, which is not its main initiator but a necessary component. The carbon dioxide microbubble that would dissolve under normal conditions in beer is stabilized by the surrounding hydrophobic layer. Thus it represents the core for the emergence and growth of other bubbles. Their strong surface activity along with the fact that the hydrophobin layers can form condensation centers for releasing carbon dioxide bubbles contribute to gushing formation (Bamforth, 2009; Poštulková et al., 2013).

### 1 ÚVOD

Jedním z mnoha aspektů kvality piva je i jev zvaný gushing – samovolné přepěňování piva, které je způsobené nekontrolovaným uvolněním oxidu uhličitého (Čepička et al., 1993). Ke stanovení gushingového potenciálu ječmene nebo sladu se v pivovarské praxi využívá test Carlsberg nebo jeho modifikovaná verze (Nesvadba et al., 2009; Christian et al., 2011). Z hlediska příčin lze rozlišit dva typy gushingu: primární a sekundární. Primární gushing je spojován s infekcí patogenních hub, které se vyskytují ve sladu. Sekundární gushing je spojen spíše s výrobními parametry, jako je drsný povrch láhve, přesycení oxidem uhličitým nebo vysoká koncentrace těžkých kovů a štavelanů (Basařová, 2015; Běláková et al., 2012; Hégrová et al., 2009).

Příčina primárního gushingu souvisí se sladem napadeným mikroskopickými vláknitými houbami, nejčastěji rody *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* a *Nigrospora*. Během sladování se mohou zmíněné houby množit a produkovat mykotoxiny a hydrofobní polypeptidy – hydrofobiny s vysokou povrchovou aktivitou vyznačující se velkou afinitou k oxidu uhličitému. Hydrofobiny se nachází v buněčných stěnách mikroskopických vláknitých hub, kde se podílejí na tvorbě mycelií a spor. Vylučované proteiny jsou schopny snížit povrchové pnutí vody nebo změnit hydrofilní povahu povrchu na hydrofobní (Sarlin et al., 2005).

Na základě aminokyselinového složení lze hydrofobiny rozdělit do dvou tříd: hydrofobiny I a hydrofobiny II. Obecně lze říci, že hydrofobiny mají velikost v rozmezí 7–20 kDa a hrají důležitou roli v růstu patogenních hub. Hydrofobiny produkované vláknitými houbami *Fusarium* mají velikost 8,5 kDa (Sarlin et al., 2005; Bamforth, 2009).

Podstatou přepěňování piva je oxid uhličitý, který není hlavním iniciátorem, ale je nutnou součástí. Mikrobublina oxidu uhličitého, která by se za běžných podmínek v pivu rozpustila, je stabilizována hydrofobinovou vrstvou, která ji obklopuje. Představuje tak jádro pro vznik a růst další bubliny. K možnosti způsobit gushing přispívá jejich silná povrchová aktivita spolu s faktem, že vrstvy hydrofobinů mohou tvořit kondenzační centra pro uvolnění bublin oxidu uhličitého (Bamforth, 2009; Poštulková et al., 2013).

Na gushingu se mohou podílet ale i antimikrobiální peptidy (PR proteiny), které produkuje napadená rostlina ječmene jako odpověď na mikrobiální kontaminaci. Jsou to obecně povrchově aktivní mole-

Gushing can be also induced by antimicrobial peptides (PR proteins) produced by an infected plant in response to microbial contamination. These surface active molecules stabilize carbon dioxide bubbles in beer by forming a layer around the carbon dioxide microbubbles preventing thus their dissolution (Hégrová et al., 2009; Sarlin et al., 2005).

PR proteins are an important group of barley proteins. These proteins represent about one third of the total protein content and play an important role when a plant is attacked by pathogens (Gorjanovic, 2010; Benešová et al., 2011). Non-specific lipid transfer proteins (ns-LTP) represent an important group of PR proteins. These extracellular proteins are able to mediate transport of lipids and hydrophobic molecules. They are involved in plant adaptation to biotic and abiotic stress, recognition and inhibition of pathogens of bacteria and fungi and collecting defense extracellular polymeric substances. Their expression is regulated by pathogens, signaling molecules associated with plant defense and abiotic and environmental stress (Gorjanovic, 2005).

LTP proteins occur in two 2 forms: ns-LTP1 and ns-LTP2 of the molecular weight 9 kDa and value of pI 9 and 7 kDa and pI 8, respectively (Perrocheau, 2006).

During the malting process, the amount of surface-active low-molecular weight proteins changes, making prediction of the propensity of malt to overfoaming more difficult (Evans and Hejgaard, 1999). Beer is a complex mixture in which gushing initiators and inhibitors are in a certain balance. Additionally, the content of these substances can be affected by yeast during fermentation. It is clear that the issue of gushing is highly complex. Gushing is caused by a whole set of substances contained in raw materials for beer production and their interactions (Bamforth, 2009; Poštulková et al., 2013).

## 2 MATERIAL AND METHODS

Low-molecular proteins in samples of barley, malting intermediaries and malt were analyzed by the optimized SDS-PAGE method (sodium dodecyl sulfate-polyac lam electrophoresis in polyacrylamide gel).

### 2.1 Instrumentation

Vertical electrophoresis equipment: PowerPac Universal voltage sources, electrophoretic cell Protean II xi Cell (BIO-RAD), cooling water bath (Julabo), densitometer GS-800 (BIO-RAD).

### 2.2 Samples

Five different collections of barley samples were used for the experiment (Table 1). Each of the collections included totally 10 samples which were collected during malting to cover all the malting process (Table 2).

Table 1 Barley varieties used for analyses

Tab. 1 Odrůdy ječmene použité pro analýzy

Collection Odběr	Barley variety Odrůda ječmen
collection 1 / odběr 1	Sebastian
collection 2 / odběr 2	Bojos
collection 3 / odběr 3	Bojos : Malz : Laudis 550 / (2:1:1)
collection 4 / odběr 4	Bojos : Malz / (1:1)
collection 5 / odběr 5	Bojos : Malz : Laudis 550 / (1:1:1)

### 2.3 Protein extraction

Proteins were extracted from the analyzed samples with extraction solution containing sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-mercaptoethanol, N, N-dimethylformamide, glycerol and TRIS-HCl buffer (Schägger and von Jagow, 1987).

### 2.4 Electrophoresis

Protein analysis was performed by gel electrophoresis. Focusing and separating SDS-polyacrylamide gel and TRIS-tricine buffer solution were used for electrophoresis.

Electrophoresis was performed by an optimized method for 2 hours with a constant current of 10 mA and then 11 hours at 15 mA (maximum voltage 300 V). Electrophoresis was cooled during the electrophoresis cooling water bath with circulation to 0 °C.

kuly, které v pivu tvoří vrstvu kolem mikrobublinek oxidu uhličitého, a tím je stabilizují a zabraňují jejich rozpuštění (Hégrová et al., 2009; Sarlin et al., 2005).

PR proteiny jsou významnou skupinou proteinů ječmene. Tyto proteiny reprezentují asi třetinu z celkového obsahu proteinů a hrají důležitou obrannou roli v případě napadení rostliny patogenem (Gorjanovic, 2010; Benešová et al., 2011). Významnou skupinou PR proteinů jsou nespecifické proteiny přenášející lipidy (ns-LTP). Jedná se o extracelulární proteiny schopné zprostředkovat transport lipidů a hydrofobních molekul. Jsou zapojeny při adaptaci rostliny na biotický i abiotický stres, rozpoznávání a inhibici patogenů bakterií i hub a shromažďování obraných extracelulárních polymerických látek. Jejich exprese je regulována patogeny, signálními molekulami spojenými s obranou rostliny a abiotickým i environmentálním stresem (Gorjanovic, 2005).

LTP proteiny se vyskytují ve 2 formách: ns-LTP1 a ns-LTP2 o velikosti 9 kDa a hodnotě pI 9, resp. 7 kDa a pI 8 (Perrocheau, 2006).

Během procesu sladování se mění množství povrchově aktivních nízkomolekulárních proteinů, což znesnadňuje predikci sklonu sladu k přepěňování (Evans a Hejgaard, 1999). Pivo je komplexní směs, ve které jsou iniciátory a inhibitory gushingu v určité rovnováze. Navíc obsah těchto látek může být ovlivněn kvasinkami během fermentace. Z toho je zřejmé, že problematika gushingu je vysoce komplexní. Gushing je způsoben celým souborem látek obsažených v surovinách pro výrobu piva a jejich vzájemnými interakcemi (Bamforth, 2009; Poštulková et al., 2013).

## 2 MATERIÁL A METODY

K analýze nízkomolekulárních proteinů ve vzorcích ječmene, meziproduktů sladování a sladu byla použita optimalizovaná metoda SDS-PAGE (gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným).

### 2.1 Použité přístroje

Zařízení pro vertikální elektroforézu: napěťový zdroj PowerPac Universal, elektroforetická cela Protean II xi Cell (BIO-RAD), chladič vodní lázeň (Julabo), densitometr GS-800 (BIO-RAD).

### 2.2 Vzorky

Pro experiment bylo použito celkem 5 různých odběrů vzorků ječmene (tab. 1). Každý z odběrů zahrnoval celkem 10 vzorků, které byly odebrány během sladování pro zachycení celého sladovacího procesu (tab. 2).

### 2.3 Extrakce proteinů

Proteiny byly z analyzovaných vzorků extrahovány extrakčním roztokem s obsahem dodecylsírany sodného (SDS), 2-merkaptotethanolu, N,N-dimethylformamid, glycerolu a TRIS-HCl pufru (Schägger a von Jagow, 1987).

Table 2 Description of the analyzed samples

Tab. 2 Popis analyzovaných vzorků

Sample Vzorek	Sample description Popis vzorku
1	barley / ječmen
2	1 <sup>st</sup> steeping / 1. máčení
3	2 <sup>nd</sup> steeping / 2. máčení
4	3 <sup>rd</sup> steeping (1 <sup>st</sup> day of germination) / 3. máčení (1. den klíčení)
5	2 <sup>nd</sup> day of germination / 2. den klíčení
6	3 <sup>rd</sup> day of germination / 3. den klíčení
7	4 <sup>th</sup> day of germination (green malt) / 4. den klíčení (zelený slad mokrý)
8	green malt pre-dried / zelený slad předsušený
9	green malt bottom floor / zelený slad spodní líska
10	malt / slad

### 2.4 Elektroforéza

Analýza proteinů byla provedena metodou gelové elektroforézy. K elektroforéze byl použit zaostřovací a dělicí polyakrylamidový gel s obsahem SDS a TRIS-tricinový pufrový roztok.

### 2.4.1 Dying and evaluation

After electrophoresis, the gel was dyed for 5 hours with Brilliant Blue R methanol solution. After staining, the gel was rinsed with water and evaluated.

For evaluation and archiving, the gel was scanned into the PC. The electrophoretic spectrum of each sample was compared with the molecular weight standard (1.060-26.600 kDa) which was analyzed together with the samples. Based on the comparison of the samples with the weight standard, only 9 kDa low-molecular protein fractions were identified and evaluated, the other fractions were not identified.

Using a densitometer (BIO-RAD GS-800), the relative optical density of the selected low-molecular proteins was detected and changes of its intensity were observed during the malting process. Software Statistica was used for testing a possible correlation between the content of the selected low-molecular proteins, microbiological contamination and gushing potential.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

Totally, five sets of samples were used for the experiment. Each of the sets contained 10 samples which were collected during malting for covering the whole malting process (Table 1). Content of low-molecular proteins in the analyzed samples based on the relative optical density is shown in Fig. 1. The general trend of the change of the content of these proteins in the individual samples was followed; for all collections, a similar character of the dependency of protein content on the phase of malting can be observed. The detected character of the malting effect on the LTP content can be compared with the study by Evans and Hejgaard (1999), who determined the content of LTP proteins in samples of barley, green malt and malt in 7 barley varieties using the ELISA method.

In all the analyzed samples, microbiological contamination with filamentous *Fusarium* fungi (Fig. 2) and gushing potential (Fig. 3) with the Carlsberg test (Vaag et al., 1993) was determined. The acquired data was used for the statistical evaluation together with information obtained by the SDS-PAGE method using the program Statistica. The relationship between the content of low-molecular proteins and the gushing potential or microbiological contamination was not confirmed. The effect of microbiological contamination on the gushing potential was not proven either.

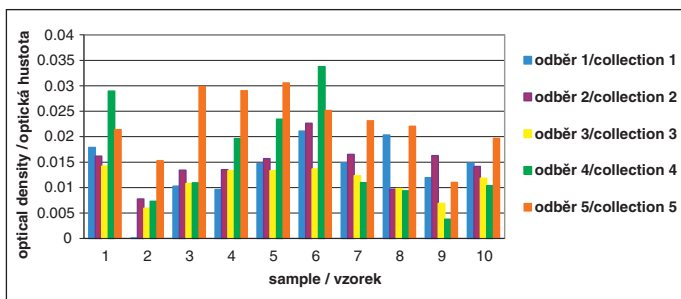


Fig. 1 Content of low-molecular proteins in the analyzed samples based on relative optical density  
Obr. 1 Obsah nízkomolekulárních proteinů v analyzovaných vzorcích na základě relativní optické hustoty

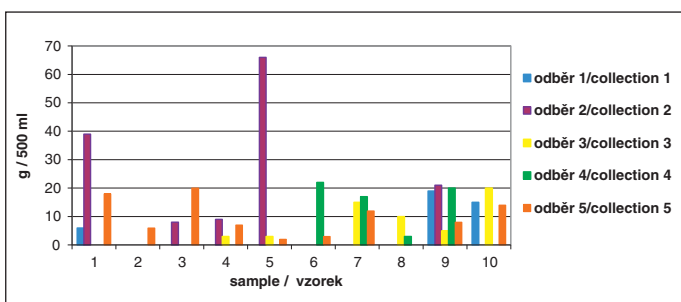


Fig. 2 Gushing potential in the analyzed samples  
Obr. 2 Gushingový potenciál v analyzovaných vzorcích

Elektroforéza probíhala optimalizovanou metodou 2 hodiny za konstantního proudu 10 mA, a poté 11 hodin při 15 mA (maximální napětí 300 V). Elektroforéza byla v průběhu chlazená chladicí vodní lázní s cirkulací na 0 °C.

### 2.4.1 Barvení a vyhodnocení

Po elektroforéze byl gel barven 5 hodin methanolvým roztokem Brilliant Blue R. Po barvení byl gel propláchnut vodou a připraven k vyhodnocení.

Pro vyhodnocení a archivaci byl gel naskenován do PC. Elektroforérické spektrum každého vzorku bylo porovnáno s molekulovým hmotnostním standardem (1,060-26,600 kDa), který byl analyzován společně se vzorky. Na základě porovnání vzorků s hmotnostním standardem byla identifikována a vyhodnocena pouze frakce nízkomolekulárních proteinů o velikosti 9 kDa, ostatní frakce nebyly identifikovány.

Pomocí densitometru (BIO-RAD GS-800) byla zjištěna relativní optická hustota vybraných nízkomolekulárních proteinů a byla sledována změna její intenzity během procesu sladování. Pomocí softwaru Statistika byla testována možná korelace obsahu vybraných nízkomolekulárních proteinů, mikrobiologické kontaminace a gushingového potenciálu.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro experiment bylo použito celkem 5 souborů vzorků. Každý ze souborů zahrnoval celkem 10 vzorků, které byly odebírány během sladování pro zachycení celého sladovacího procesu (tab. 1). Obsah nízkomolekulárních proteinů v analyzovaných vzorcích na základě relativní optické hustoty je znázorněn na obr. 1. Byl sledován obecný trend změny obsahu těchto proteinů v jednotlivých odběrech, u všech odběrů lze pozorovat podobný charakter závislosti obsahu proteinů na stupni sladování. Zjištěný charakter vlivu sladování na obsah LTP proteinů lze srovnat s prací Evanse a Hejgaard (1999), kteří pomocí metody ELISA stanovovali obsah LTP proteinů ve vzorcích ječmene, zeleného sladu a sladu v 7 odrůdách ječmene.

Ve všech analyzovaných vzorcích byla také stanovena mikrobiologická kontaminace vláknitými houbami *Fusarium* (obr. 2) a gushingový potenciál (obr. 3) testem Carlsberg (Vaag et al., 1993). Získaná data byla použita při statistickém zpracování spolu s informacemi získanými metodou SDS-PAGE pomocí programu Statistika. Souvislost mezi obsahem nízkomolekulárních proteinů a gushingovým potenciálem ani mikrobiologickou kontaminací nebyla potvrzena. Nebyl potvrzen ani vliv mikrobiologické kontaminace na gushingový potenciál.

## 4 ZÁVĚR

Souvislost mezi obsahem nízkomolekulárních proteinů na základě relativní optické hustoty a gushingovým potenciálem nebo mikrobiologickou kontaminací nebyla potvrzena. Problematika gushingu je vysoce komplexní a gushing je způsoben mnoha faktory, které se vzájemně ovlivňují. Pro nalezení příčin tohoto nežádoucímu jevu a porozumění celému problému je potřeba ještě dalšího výzkumu.

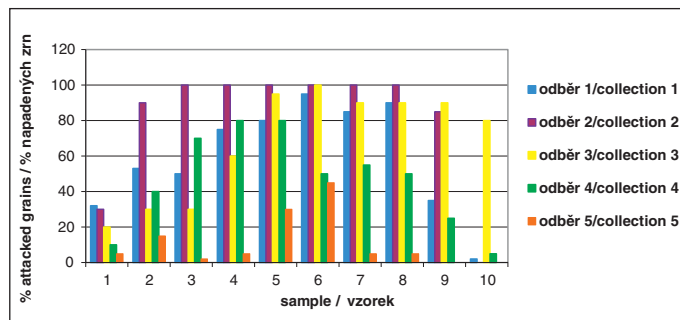


Fig. 3 Relative representation of grains attacked by microscopic filamentous fungi of *Fusarium* sp.  
Obr. 3 Relativní zastoupení zrn napadených mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium*

## 4 CONCLUSIONS

The relationship between the content of low-molecular proteins based on the relative optical density and gushing potential or microbiological contamination was not confirmed. Gushing is a very complex issue, it is caused by many interacting factors. Further research is needed for finding causes of this undesirable phenomenon and understanding the whole issue.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was elaborated within the project TAČR TE02000177 "Center for Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products".

## REFERENCES / LITERATURA

- Bamforth, C., 2009: Beer: a quality perspective. Burlington, MA: Academic. ISBN 978-0126692013.
- Basařová, G., 2015: Sladařství: Teorie a praxe výroby sladu. 1. vydání. Praha: Havlíček Brain Team. ISBN 978-80-87109-47-2.
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2012: Faktory ovlivňující gushing. Kvasny prum., 58(3): 62–65.
- Benešová, K., Psota, V., Mikulíková, R., Běláková, S., Svoboda, Z., 2011: Patogenní metabolity v obilkách ječmene a jejich vliv na kvalitu sladovnického ječmene a sladu. Kvasny prum., 2011, 57(7): 215–218.
- Čepička, J., Šrogl, J., Škach, J., 1993: Samovolné přepěňování piva – gushing. Kvasny prum., 39(4): 98–102.
- Evans, D. E., Hejgaard, J., 1999: The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. J. Inst. Brew. 105(3): 159–170.
- Gorjanovic, S., 2005: Malting barley grain non-specific lipid-transfer protein (ns-LTP): Importance for grain protection. J. Inst. Brew. 111(2): 99–104.
- Gorjanovic, S., 2010: A Review: The role of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs) in beer production. J. Inst. Brew. 116(2): 111–124.
- Hégrová, B., Farková, M., Macuchová, S., Havel, J., Preisler, J., 2009: Investigation of relationships between barley stress peptides and beer gushing using SDS-PAGE and MS screening. J. Sep. Science. 32(23–24): 4247–4253.

## PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována v rámci projektu TAČR TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

- Christian, M., Titze, J., Ilberg, V., Jacob, F., 2011: Novel perspectives in gushing analysis: A review. J. Inst. Brew. 117(3): 295–313.
- Nesvadba, Z., Horáčková, S., Šusta, J., 2009: Hodnocení gushingu piva u vybraných odrůd jarního sladovnického ječmene po očkování houbou *Fusarium culmorum*. Obilnářské listy. 17(4): 118–121.
- Perrocheau, L., 2006: Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: Relationships with the Brewing Process. J. Agric. Food Chem. 54(8): 3108–3113.
- Poštulková, M., Vitoušová, K., Novák, P., Fiala, J., Růžička, M., Bráňnyk, T., 2013: Historie a nové trendy v oblasti výzkumu přepěňování piva. Kvasny prum., 59(10): 317–320.
- Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Haikara, A., 2005: Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. J. Inst. Brew. 111(2): 105–111.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry. 166(2): 368–379.
- Vaag, P., Prebend, R., Knudson, A.D., Pederson, S., Meiling, E. A.: 1993: A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials. Eur. Brew. Conv. Proc. 24 Congress, Oslo 1993, Oxford: IRL Press, 155–162. ISBN 0-19-963466-1.

Translated by Vladimíra Nováková

Manuscript received / Do redakce došlo: 15/01/2018

Accepted for publication / Přijato k publikování: 19/02/2018