

DOI: 10.18832/kp201729

Alternativní metody pro zvýšení trvanlivosti nefiltrovaných piv v minipivovarech

Alternative Methods for Shelf Life Extension of Unfiltered Beers from Microbreweries

Vojtěch HANKO¹, Aleš POTĚŠIL¹, Václav POTĚŠIL², Jakub NEŠPOR¹, Marcel KARABÍN¹, Lukáš JELÍNEK¹, Pavel DOSTÁLEK¹¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 / Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, Praha 6, 166 28, Czech Republic²PIVO Praha s.r.o., Podskalská 10, Praha 2, 128 46

e-mail: pavel.dostalek@vscht.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Hanko, V., Potěšil, A., Potěšil, V., Nešpor, J., Karabín, M., Jelínek, L., Dostálek, P., 2017: Alternativní metody pro zvýšení trvanlivosti nefiltrovaných piv v minipivovarech. Kvasny Prum. 63(6): 298–306

Pro zajištění zvýšené trvanlivosti nefiltrovaných piv, jejichž široký sortiment je v současnosti zajišťován především minipivovary, dosud v průmyslovém měřítku neexistuje vhodná metoda, která by nefiltrované pivo nezneškodnila po sensorické stránce. Nejrozšířenější metoda, pasteurace, totiž usmrcuje pivovarské kvasinky a navíc tepelně zatěžuje pivo. V přehledném článku jsou popsány předpoklady pro zajištění účinné a efektivní mikrobiální stabilizace, související zejména se správnou výrobní a hygienickou praxí. Pro tento účel jsou z výzkumu známy dvě alternativní metody (vysoký hydrostatický tlak a pulzní elektrické pole), které jsou k pivu relativně šetrné. Tyto metody jsou v článku podrobně popsány a byly již testovány v laboratorních podmínkách a mají potenciál pro uplatnění v průmyslu.

Hanko, V., Potěšil, A., Potěšil, V., Nešpor, J., Karabín, M., Jelínek, L., Dostálek, P., 2017: Alternative methods for shelf life extension of unfiltered beers microbreweries. Kvasny Prum. 63(6): 298–306

At present, a broad range of unfiltered beers is produced mainly by microbreweries. So far, however, no suitable method exists for ensuring extended shelf life at the industrial scale without damaging the taste. The most widespread method – pasteurization also kills brewery yeasts and, has a thermal impact on beer. This review describes the premises for ensuring effective microbial stabilization that depends particularly on proper sanitization practices. Alternative methods – the high hydrostatic in addition, processing and the pulsed electric fields processing have a minimal effect on the beer quality. These techniques were already tested under laboratory conditions and have potential for use at the industrial scale. This article describes these methods in detail.

Hanko, V., Potěšil, A., Potěšil, V., Nešpor, J., Karabín, M., Jelínek, L., Dostálek, P., 2017: Alternative Methoden zur Erhöhung der Beständigkeit der ungefilterten Biere aus den Minibrauereien. Kvasny Prum. 63(6): 298–306

Zur Sicherstellung der erhöhten Beständigkeit der ungefilterten Biere, deren breite Sortiment vor allem durch die Minibrauereien gesichert wird, im industriellen Maßstab zur Zeit keine geeignete Methode gibt, die das ungefilterte Bier sensorisch nicht verletzt. Die am meiste angewandte Methode, Pasteurisation, tötet nämlich die Hefezelle und zusätzlich thermisch belastet das Bier. Im diesen übersichtlichen Artikel werden die Annahmen zur Sicherstellung der wirksamen und effektiven mikrobiologischen Stabilisation beschrieben erhöhten Beständigkeit, die mit richtigen Herstellungs- und Hygienischen Praxis verbunden sind. Für diesen Zweck werden zwar zwei alternative Methoden angewandt (hoher hydrostatische Druck und pulsierendes elektrische Feld), die zum Bier relativ schonende sind. Diese Methode werden im Artikel ausführlich beschrieben, unter Laborbedingungen getestet und wiesen ein Potenzial zur Anwendung in der Industrie auf.

Klíčová slova: nefiltrované pivo, mikrobiologická stabilita, vysoký hydrostatický tlak, pulzní elektrické pole**Keywords:** unfiltered beer, microbial stability, high hydrostatic pressure, pulsed electric fields

1 ÚVOD

Pivo, jako jeden z celosvětově nejpůvodnějších slabě alkoholických nápojů, jehož historie výroby sahá až do starověku, bylo po tisíce let akceptováno jako nápoj více či méně zakalený. Zákal byl způsoben zejména nedokonalým procesem scezování, přítomností živých či mrtvých mikroorganismů nebo jiných částic. S průmyslovou revolucí v 19. století a souvisejícím rozvojem obchodu, centralizací výroby a vyšší potřebou produkce však krátká doba trvanlivosti kalných piv přestávala postačovat, protože omezovala jejich transport na větší vzdálenosti (Basařová et al., 2010). Pro zvýšení stability a zajištění kvality produktu bylo nezbytné zavést do technologie jednotkové operace dříve v pivovarství nepoužívané, vedoucí ke vzniku nových druhů piv bez obsahu mikroorganismů – piv čirých. V druhé polovině 19. století byla do provozu úspěšně zavedena filtrace vedoucí k prodloužení trvanlivosti piva, které tak mohlo najít uplatnění na nových, vzdálenějších trzích.

V posledních letech se však opět začíná zvyšovat poptávka po pivích nefiltrovaných, v současnosti produkovaných převážně minipivovary, které i díky nabídce relativně širokého sortimentu nefiltrovaných piv, zažívají celosvětově obrovský rozmach (Vacl, 2014). V dnešní době je nefiltrované pivo chápáno jako „živý“ nápoj, který oproti filtrovanému pivu obsahuje navíc pivovarské kvasinky. Obsah těchto živých mikroorganismů v pivu sice zajišťuje tomuto nápoji unikátní chuťové vlastnosti, avšak výrazně snižuje trvanlivost produktu, která zpravidla nepřesahuje dva měsíce. Díky tomu bývá odbyt nefiltrovaných piv zajištěn přímo v místě výroby či jeho nejbližším okolí.

1 INTRODUCTION

Beer, as one of the world's most popular and oldest light alcoholic beverage, with a history reaching into antiquity, was for thousands of years accepted as a more or less cloudy drink. Turbidity was specifically caused by insufficient lautering, and by the presence of microorganisms or other particles. With the industrial revolution of the 19th century, and its extensive development of centralized trade and production, higher product demand meant that the short shelf life of hazy beers was no longer sufficient as it restricted transport over longer distances (Basařová et al., 2010). To increase stability and to ensure good beer quality, it was necessary to introduce technological unit operations that were not previously used in breweries. In this way, it was possible to produce new types of beer – clear beers that did not contain microorganisms. Filtration that extended the beer shelf life was successfully introduced in the second half of the 19th century. Such beer could then be sold on new distant markets.

Recently, however, the demand for unfiltered beers has increased. Such beers are currently produced mainly in microbreweries, which, due to their relatively wide product range, have gained worldwide popularity (Vacl, 2014). Unfiltered beer is now considered as a 'live' drink, containing brewery yeasts. The presence of these live microorganisms gives the beer its unique taste but considerably reduces its shelf life, generally to no more than two months; unfiltered beers are therefore marketed directly in the microbreweries or nearby. To satisfy increased demand, beer must be transported to distant markets and therefore it is necessary to treat the unfiltered beer in a way

S rostoucí poptávkou po nefiltrovaných pivech však začíná vyvstávat potřeba dopravy i na vzdálenější odbytí, případně na zahraniční trhy, což vyvolává otázku, jak nefiltrované pivo vhodně ošetřit tak, aby si zachovalo své unikátní vlastnosti ve spojení s výrazně zvýšenou trvanlivostí.

2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TRVANLIVOST NEFILTROVANÝCH PIV

Sloučeniny v čerstvě stočeném pivu, kterých je více než tisíc (Riu-Aumatell et al., 2014), nejsou v průběhu výroby i během skladování v chemické rovnováze. Pivo v obalu (KEG sudy, skleněné či plastové lahve, plechovky) tvoří uzavřený systém, jehož jednotlivé komponenty se účastní různých reakcí vedoucích zpravidla k nežádoucím organoleptickým změnám piva (Vanderhaegen et al., 2005).

Trvanlivost, to jest období, během kterého má mít pivo neměnné organoleptické vlastnosti, závisí na mikrobiální, sensorické a fyzikálně-chemické stabilitě. U nefiltrovaných piv hraje významnou roli zejména biologická a sensorická stabilita, význam koloidní stability je v důsledku přirozeného zákalu výrazně nižší, neboť charakteristickým znakem nefiltrovaných piv je vyšší zákal, který může na spotřebitele působit negativně, pouze pokud je tvořený většími částicemi (většími než zhruba 0,5 mm).

Garantovaná trvanlivost pro nefiltrovaná piva z tuzemských minipivovarů se nejčastěji pohybuje u lahvového piva mezi čtrnácti dny až jedním měsícem, u piva sudového obvykle dva týdny, zatímco u filtrovaného lahvového piva bývá garantována trvanlivost i déle než jeden rok a u piva sudového je to běžně zhruba tři měsíce (tab. 1). Kratší doba trvanlivosti je u nefiltrovaných piv způsobena přítomností živých mikroorganismů, které mohou ovlivnit prakticky všechny analytické i sensorické znaky zbytkovou metabolickou aktivitou, které ve výsledku určují kvalitu piva (Basařová et al., 2003). Pro zajištění přítomnosti pouze žádoucích kulturních pivovarských kvasinek a tedy i zvýšení sensorické stability, je nezbytné dodržet během celého procesu výroby nefiltrovaného piva správnou výrobní a hygienickou praxi.

that secures its unique properties and at the same time extends its shelf life.

2 FACTORS INFLUENCING THE SHELF LIFE OF UNFILTERED BEERS

During production and storage, more than a thousand components in freshly racked beer (Riu-Aumatell et al., 2014) are not in chemical balance. Packaged beers (in kegs, glass or plastic bottles or in tin cans) form closed systems, whose single compounds take part in different reactions, often causing unwanted changes in organoleptic properties of the beer (Vanderhaegen et al., 2005).

Shelf life is the period over which the beer should have stable organoleptic properties. This depends on microbial, sensory and physicochemical stabilities. In unfiltered beers, the most important are biological and sensorial stabilities. Colloidal stability is less important due to the natural turbidity, which is a main characteristic of unfiltered beers and only particles larger than about 0.5 mm would have a negative effect on the consumer perception.

The guaranteed shelf life for unfiltered beers from domestic microbreweries is mostly from two weeks to one month for bottled beer, and two weeks for cask beer, whereas a guaranteed shelf life for filtered bottled beers can be more than one year and for cask beer generally about three months (Table 1). The shorter shelf life for unfiltered beer is the result of presence of live microorganisms, which, due to their remaining metabolic activities, can influence almost all analytical and sensory properties determining the quality of the beer (Basařová et al., 2003). To ensure the presence of only desirable cultured brewery yeast, and so to increase sensorial stability, it is necessary to comply with correct process and sanitization routines over the whole beer production process.

Tab. 1 Garantovaná trvanlivost nefiltrovaných piv z českých minipivovarů
Table 1 Guaranteed shelf life of unfiltered beers from Czech microbreweries

Minipivovar / Microbrewery	Lahvové pivo / Bottled beer (počet dnů) / (number of days)	Sudové pivo / Cask beer (počet dnů) / (number of days)	Poznámka / Note (Typ piva a podmínky skladování) / (Type of beer and storage conditions)
1	30, 60, 90*	30	Silnější piva / Stronger beers
2	14	14	–
3	30	30	6 °C
4	30	30	6 °C
5	60	60	–
6	18	21, 30*	Filtrované pivo / Filtered beer
7	30	30	–
8	21	21	10 °C
9	14, 180*	14	Silnější piva / Stronger beers
10	–	14	–
11	14	14	10 °C
12	30	–	10 °C
13	30	30	Chlad a temno / Cold and dark
14	30, 60*	30, 60*	10 °C
15	14	14	10 °C
16	21	21	10 °C
17	14	14	Výčepní piva a ležáky / Draught beer and lager beer
18	21	14	Ležáky / Lager beer 10 °C
19	14	10	15 °C
20	14	14	10 °C

* trvanlivost různých druhů piv / * shelf life of different type of beers

3 SPRÁVNÁ VÝROBNÍ A HYGIENICKÁ PRAXE NEFILTROVANÝCH PIV

Prvním předpokladem pro zvýšení trvanlivosti finálního produktu je dodržování správné výrobní a hygienické praxe. Je třeba věnovat pozornost zejména kontrole vstupních surovin, které mohou být kontaminovány biologicky (škůdci), mikrobiologicky (plísně, bakterie, kvasinky), chemicky (rezidua pesticidů) či fyzikálně (cizí předměty). Kontrolu biologické a fyzikální kontaminace surovin lze snadno zajistit jejich vizuální kontrolou při nákupu surovin, zatímco mikrobiologickou a chemickou čistotou lze potvrdit pouze laboratorními rozbory (Hollerová, 1998; Tsuchiya et al., 1992).

Důležité je také vést správně samotný technologický postup, neboť jeho nedodržení může vést ke vzniku nebo nedostatečnému odstranění některých negativních látek (například dimethylsulfidu během chmelovaru) či produktů kvašení (například acetaldehydu v pozdějších fázích kvašení a ležení) snižujících senzorickou stabilitu nefiltrovaného piva (Smogrovicova a Domény, 1999; Szlavko a Anderson, 1979). Vzhledem k tomu, že se na vzniku většiny senzoricky negativních látek podílí zejména oxidační reakce (Vanderhaegen et al., 2005), je nezbytné dbát na co nejkratší kontakt surovin i všech meziproductů s kyslíkem, a to v celém procesu výroby piva až po plnění do obalů. Výjimku tvoří pouze vzdušnění mladiny před zakvašením.

V neposlední řadě je třeba věnovat pozornost zajištění mikrobiologické čistoty používaných plynů (vzduchu, oxidu uhličitého či dusíku), pracovních nástrojů a zařízení (Vaughan et al., 2005).

Suroviny a horká fáze výroby nefiltrovaného piva

Většina minipivovarů využívá běžnou vodovodní síť jako zdroj varní vody, která podléhá nárokům na její čistotu dle vyhlášky č. 252/2004 Sb., kterou jsou stanoveny hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody (Vyhláška MZ č. 252/2004 Sb.). Má-li minipivovar svůj vlastní zdroj vody, platí i pro tuto vodu stejné požadavky. Častou příčinou problému s kvalitou vody je však nedostatečná kontrola stavu veškerého potrubí a rozvodů vody přímo v provozu. Zde hrozí značné riziko mikrobiální kontaminace, pro jejíž eliminaci je nezbytné provádět pravidelnou kontrolu a údržbu.

Dalším významným zdrojem biologické kontaminace může být mikroflóra sladu (respektive srogátů), která bývá v závislosti na mnoha faktorech (fyzikálně-chemické vlastnosti zrna, proces sladování) velmi různorodá. Vzhledem k tomu, že míra biologické kontaminace sladu je závislá na podmínkách skladování (Priest a Campbell, 1996), je v rámci udržení kvality sladu a zabránění rozvoje mikrobiální kontaminace nezbytné zajistit jeho uskladnění v suchých prostorech (Vaughan et al., 2005), jako jsou například síla či půdy.

Chmel je oproti sladu, v důsledku obsahu antibakteriálních látek (α -hořkých kyselin), zdrojem užšího spektra mikroorganismů (Matoulková et al., 2010). I přes nízký obsah mikroorganismů je vhodné zabránit jejich rozvoji správným skladováním chmele (teplota do 4 °C, v inertní atmosféře, či vakuu a také bez přístupu světla), které navíc umožňuje zachování pivovarsky cenných látek (Mikyška a Krofta, 2012; Mikyška et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že téměř všechny mikroorganismy jsou během horké fáze výroby piva inaktivovány, představuje mnohem větší riziko mikrobiální kontaminace meziproductů studená fáze výroby piva.

Studená fáze výroby nefiltrovaného piva

Vzduch, používaný v minipivovarech především ke vzdušnění mladiny při zakvašení, je zpravidla filtrován. Je třeba zdůraznit, že sanitace či dezinfekce potrubí a hadiček za tímto filtrem je náročná a v provozech se takřka neprovádí, díky čemuž hrozí riziko rozvoje mikrobiální kontaminace způsobující nežádoucí senzorické změny.

Častým problémem u většiny minipivovarů je kontaminace inokula divokými kvasinkami a bakteriemi. Tyto kontaminanty výrazně zhoršují mikrobiální stabilitu piva a produkují senzoricky nežádoucí látky, jako jsou například diacetyl, octová kyselina, dimethylsulfid či sulfan (Vaughan et al., 2005). Vzhledem k tomu, že minipivovary obvykle nedisponují vlastním kvasničným hospodářstvím, kupují si zákvasnou kulturu, až na výjimky, od velkých pivovarů schopných zajistit dostatečnou kvalitu pivovarských kvasinek. Kritickým krokem, ve kterém hrozí riziko kontaminace, je tedy jejich samotné ošetření a uchovávání v minipivovarech, neboť kvasinky jsou zde obvykle propírány pouze studenou vodou a skladovány převážně v nádobách, u kterých je velmi obtížné zajistit dokonalou čistotu, což může vést k výraznému zhoršení kvality kvasinek a tedy i kvality produktu.

3 CORRECT PROCESS AND SANITIZATION PRACTICES

The first requirement for increasing the shelf life of the final product is compliance with correct procedures and sanitization routines. Particularly, attention should be paid to the control of incoming raw materials. These could be contaminated biologically by pests, microbiologically by moulds, bacteria and yeasts, chemically by residual pesticides or physically by foreign objects. Visual checking when buying a raw material can easily detect biological and physical contaminants but microbial and chemical purity can only be verified by laboratory tests (Hollerová, 1998; Tsuchiya et al., 1992). It is also very important to carry out correct technological procedures. Noncompliance can cause the formation of, or the insufficient removal of undesirable components such as dimethylsulfide during wort boiling, and fermentation products such as acetaldehyde during the later stages of fermentation and storage; these reduce the sensorial stability of unfiltered beer (Smogrovicova and Domény, 1999; Szlavko and Anderson, 1979). Because formation of the most undesirable sensory substances is the result of oxidative reactions (Vanderhaegen et al., 2005), it is necessary to minimize contact of all intermediate products with oxygen over a whole production process until packaging of it is also important to ensure microbial sterility of gases such as air, carbon dioxide and nitrogen, working tools and the machinery (Vaughan et al., 2005).

Raw materials and the hot stage of unfiltered beer production

The majority of microbreweries use mains water supplies as the source of the brewing liquor. This water fulfils the purity requirements according to the legal declaration of the Ministry of Health No. 252/2004 Sb., which sets hygienic standards for drinking and hot water, and also the extent and frequency of testing. The same criteria are valid for microbreweries with their own sources of water. However, the common problem with water quality is insufficient control of the plumbing and distribution directly to the production site, which can impose considerable risks for microbial contamination. To reduce these risks, it is necessary to carry out regular testing and maintenance.

Another important source of biological contamination can be microflora in the malt or malt surrogates, which can be variable and depend on many factors, such as physicochemical properties of the grain or the malting process. The extent of biological contamination of the malt depends on storage conditions (Priest and Campbell, 1996). Therefore, it is essential to keep the malt in a dry place, such as a silo or a loft, in order to maintain its quality and to prevent microbial contamination (Vaughan et al., 2005).

Because of the presence of antibacterial substances such as α -bitter acids, hops, in contrast to malt, harbour only a narrow spectrum of microorganisms (Matoulková et al., 2010). Regardless of this however, it is advisable to prevent microbial reproduction by correct storage at a temperature of up to 4 °C, in an inert atmosphere or vacuum, and in the dark. These conditions also ensure the preservation of important flavour components (Mikyška and Krofta, 2012; Mikyška et al., 2012).

However, a greater risk of microbial contamination of the intermediate product occurs during the cold stage of brewing, since almost all microorganisms will be inactivated during the hot stage.

The cold stage of unfiltered beer production

Air used in microbreweries, mainly for aeration of the wort during pitching, is generally filtered. Nevertheless, sanitization or disinfection of the plumbing and tubing behind this filter is demanding and therefore, seldom carried out. As a result, there is an increased risk of microbial contamination and subsequent unwanted sensory changes.

A frequent problem in most microbreweries is contamination of inocula with wild yeasts and bacteria. These contaminants significantly reduce the microbial stability of the beer by producing undesirable sensory substances such as diacetyl, acetic acid, dimethylsulfide or sulfane (Vaughan et al., 2005). Generally, microbreweries do not possess their own yeasts and buy pitching yeasts, with some exceptions, from large breweries able to provide adequate quality. Therefore, the critical step is treatment and storage in the microbreweries. Normally, yeasts are only rinsed with cold water and stored in containers that are difficult to clean adequately. This can cause significant deterioration in yeast quality and subsequently, product quality.

The use of non-sterilized process gases, such as carbon dioxide or nitrogen, also enhances the risk of microbial contamination. They

Riziko mikrobiální kontaminace zvyšuje také používání nesterilních procesních plynů. Mezi ně patří například oxid uhličitý či dusík, které jsou používány zejména při stáčení (předplnění přetlačných tanků a transportních obalů). V menších minipivovarech jsou pro tyto účely často používány pryžové hadice či plastové hadičky, jejichž dostatečná sanitace je v běžném provozu těžko dosažitelná. Při použití nesterilovaných provozních plynů a nedostatečně sanitovaného potrubí lze tedy předpokládat zhoršení mikrobiální a senzorické stability stočeného piva.

Pravděpodobně největší problém s mikrobiální kontaminací hotového nefiltrovaného piva nastává právě při jeho stáčení do transportních obalů (skleněných či plastových lahví) v menších minipivovarech, zejména tam, kde jsou pro tyto účely využívány ruční stáčečky. Ke kontaminaci v tomto případě může docházet zejména z okolního vzduchu, a v ojedinělých případech i ze samotného materiálu. V tomto ohledu může být také problematická nedostatečná sanitace KEG sudů, neboť většina minipivovarů používá myčku sudů bez závěrečné sterilace párou.

Pro minipivovary je navíc typické používání méně obvyklých technologických postupů vedoucích k rozšíření nabízeného sortimentu či finančním úsporám, během kterých ovšem hrozí zvýšené riziko mikrobiální kontaminace vedoucí ke snížení senzorické stability. Jedná se například o v poslední době velmi populární studené chmelení, během kterých jsou do piva přidávány další suroviny či minimálně používané high gravity brewing (Schönberger a Kostecký, 2011).

Sanitace

V některých minipivovarech byl zaznamenán snížený hygienický stav (Olšovská et al., 2014), způsobený pravděpodobně méně pracováním systémem sanitace, zejména pak nedostatečným čištěním výrobních prostor a vnějších povrchů nádob. Obzvláště problematická jsou místa, která nejsou dostatečně přístupná pro dokonalé mechanické a chemické čištění, jako jsou například některé potrubní armatury či nedostatečně vyhlazené sváry (Topka, 1983). Tato místa vytváří díky dostatečnému přístupu vody a živin (piva) ideální prostředí pro přežití a rozvoj mikroorganismů, který může při opakující se nedokonalé sanitaci vést až ke vzniku biofilmu, mikrobiálního konsorcia, které je již těžko odstranitelné běžnými sanitačními postupy a může se stát trvalým zdrojem kontaminace (Matoulková a Kubizniaková, 2014).

Hotové pivo a jeho skladování

Hotové pivo je nápoj s relativně vysokou mikrobiologickou stabilitou. Obsah hořkých chmelových látek, alkoholu, oxidu uhličitého, nízké pH, a také nízký obsah užitkových živin a kyslíku brání rozvoji celé řady mikroorganismů, včetně patogenních (Jespersen a Jakobsen, 1996; Vaughan et al., 2005; Vriesekoop et al., 2012).

I přesto souvisí jeho mikrobiologická a tedy i senzorická stabilita s podmínkami skladování (Dainty, 1996; Vanderhaegen et al., 2003). Důležitými parametry jsou u nefiltrovaného piva, podobně jako u filtrovaného, zejména teplota, přístup světla a mechanický pohyb (transport). Optimální teplota skladování, která je obecně nejvýznamnějším faktorem, je asi 5–10 °C, přičemž u sudového piva lze tolerovat až 15 °C (Basařová et al., 2010). Prostor pro skladování piva má být navíc větratelný, suchý, bez plísni a zápachů. Největší problém z hlediska teplotních požadavků na správné skladování piva představují pro pivovarskou výrobu zejména letní měsíce, kdy se díky vyšší teplotě mohou nežádoucí mikroorganismy v poměrně krátké době v sudovém i lahvovém pivu rychle pomnožit a senzoricky ho znehodnotit. Metabolická aktivita biologické kontaminace, kterou v Evropě z 90% tvoří pouze čtyři bakteriální druhy – *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* a *Megasphaera* (Suzuki, 2011), a nesprávné skladování hotového piva ohrožuje nejen jeho kvalitu, ale i zdraví spotřebitele. Obzvláště nebezpečné jsou například biogenní aminy, N-nitrosaminy či mykotoxiny, z nichž některé mají karcinogenní aktivitu (Matoulková a Kubizniaková, 2014; Sweeney a Dobson, 1998; Vrzal a Olšovská, 2016).

4 METODY VEDOUcí KE ZVÝŠENí TRVANLIVOSTI NEFILTEROVANÝCH PIV

V praxi nejběžnější a nejspolehlivější metodou vedoucí ke zvýšení mikrobiologické stability piva je kombinace filtrace a pasterace, kterou jsou z piva odstraněny prakticky všechny živé mikroorganismy (Hammond et al., 1999; Vaughan et al., 2005). Pro potřeby zvýšení stability nefiltrovaných pív však není ani jeden z těchto procesů vhodný, neboť filtrací jsou zachycovány kulturní kvasinky, jejichž pří-

are mainly used as counter pressure gases during kegging and as a preload in service tanks and transport containers. In smaller microbreweries, rubber and plastic tubes are often used for these purposes. Sufficient sanitization during standard production is hard to achieve. Therefore, if using non-sterilized process gases and insufficiently maintained plumbing, microbial and sensory stabilities of beer may decline.

The main problems associated with microbial contamination in small microbreweries, particularly if using manual racking machines, arise during the filling of transport containers, such as glass or plastic bottles, with the unfiltered beer. Contamination can be caused by ambient air or exceptionally from the material itself. In particular, insufficient sanitization of kegs can be problematic as most of the microbreweries use cask washers without final vapour sterilization.

In addition, it is typical for microbreweries to use less common technological procedures that may increase the range of produced beer types or save money. Recently, for example, dry hopping became very popular. During this process, further hops are added. High gravity brewing is seldom used in microbreweries (Schönberger and Kostecký, 2011). However, these procedures bring an increased risk of microbial contamination and subsequently a decrease in sensorial stability.

Sanitization

It has been noted that production hygiene in some microbreweries has worsened (Olšovská et al., 2014). This was possibly caused by using less sophisticated sanitization procedures, particularly by insufficient cleaning of the production site and the surfaces of containers. Especially problematic are areas that are difficult to access for perfect mechanical and chemical cleaning, such as plumbing or inadequately polished welds (Topka, 1983). These areas create an ideal environment for the survival and propagation of microorganisms, due to sufficient supplies of water and nutrients from beer. Repeated insufficient sanitization can cause the formation of a biofilm, which is a population of bacterial cells that attach to each other and often to surfaces. They are very difficult to remove by common sanitization procedures and can become a permanent source of contamination (Matoulková and Kubizniaková, 2014).

Storage of the finished beer

Finished beer is a drink with a relatively high microbiological stability. The contents of bitter hop components, alcohol, carbon dioxide, the low pH content of available nutrients and oxygen combined with a low pH inhibit growth of most microorganisms, including pathogens (Jespersen and Jakobsen, 1996; Vaughan et al., 2005; Vriesekoop et al., 2012). Nevertheless, microbiological and consequently sensorial stability of beer also depends on storage conditions (Dainty, 1996; Vanderhaegen et al., 2003). The parameters for storage of unfiltered beer are similar to those for filtered beer. Of greatest importance is temperature, light and mechanical motion during transport. The most important factor is an optimal storage temperature, which should be between 5 to 10 °C. A temperature of up to 15 °C can be tolerated for cask beer (Basařová et al., 2010). The storage room should be ventilated, dry and without mould or bad odour. The most serious problems in complying with the correct storage temperature arise particularly in the summer months. Due to higher temperatures, undesirable microorganisms can proliferate in cask beer as well as in bottled beer and degrade it in a relatively short time. In Europe, 90% of microbial contamination consists of four bacterial species: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* and *Megasphaera* (Suzuki, 2011). The metabolic activities of biological contamination due to incorrect storage of finished beer, threaten not only its quality but also the health of the consumers. Especially dangerous are biogenic amines, N-nitrosamines and mycotoxins, which can be carcinogenic (Matoulková and Kubizniaková, 2014; Sweeney and Dobson, 1998; Vrzal and Olšovská, 2016).

4 METHODS FOR SHELF LIFE EXTENSION OF UNFILTERED BEERS

The most common and reliable method for increasing the microbiological stability of beer is filtration and pasteurization, which remove virtually all living microorganisms (Hammond et al., 1999; Vaughan et al., 2005). Nevertheless, these methods are not appropriate to increase stability of unfiltered beers. Filtration removes the cultured yeast, which is one of the key components in unfiltered beers. Pasteurization changes the sensorial profile of beer because

tomnost je obvykle jedním ze základních požadavků u nefiltrovaných piv. Pasterace pak vede ke změně senzoričského profilu piva, neboť podporuje lýzi buněk a oxidační procesy (Cao et al., 2011). Tyto děje také způsobují změnu barvy, tvorbu karbonylových sloučenin, pokles obsahu aminokyselin, polyfenolů či pokles hořkosti (Cao et al., 2011). Pro výrobu nefiltrovaných piv s prodlouženou trvanlivostí je tedy nezbytné hledat alternativní metody vedoucí k zajištění mikrobiologické stability, které by neměly vliv na pivovarské kvasinky do té míry, aby způsobovaly jejich nežádoucí inaktivaci či destrukci, inaktivovaly by však kontaminující mikroorganismy a zároveň tepelně nezatěžovaly pivo. Jako nejvíce nadějně se jeví použití vysokého hydrostatického tlaku a pulzního elektrického pole, nicméně pro účely zvýšení trvanlivosti nefiltrovaných piv lze použít další, méně výhodné metody či postupy, jako je například pasterace či přidávání různých konzervačních a stabilizačních přípravků.

Vysoký hydrostatický tlak (HHP)

Vysoký hydrostatický tlak umožňuje účinnou netermální inaktivaci mikrobiální populace vedoucí ke zvýšení trvanlivosti a tím i senzoričské stability (Rendueles et al., 2011). V nápojovém průmyslu byla tato metoda poprvé aplikována v Japonsku a dnes jsou jejím prostřednictvím v provozním měřítku stabilizovány ovocné džusy (Buzrul et al., 2005). První testování vlivu vysokého hydrostatického tlaku na pivo bylo provedeno v roce 1998 (Buzrul, 2012), přičemž výzkum v této oblasti stabilizace piva pokračuje dodnes.

Působení vysokého hydrostatického tlaku představuje isostatický adiabatický proces (tlak je přenášen stejnoměrně a okamžitě), jehož výhodou je minimální teplotní namáhání piva, neboť během aplikace této metody bývá zaznamenána pouze malá změna teploty, přibližně o 3 °C na každých 100 MPa (Rendueles et al., 2011).

Za hlavní mechanismus účinku se považuje přerušování nekovalentních hydrofobních interakcí, které se v živých systémech podílí na konformaci biopolymerů (zejména DNA, proteinů či lipidů) a tedy i jejich správné biologické funkci (Tewari et al., 2007). Pravděpodobně největší podíl na inaktivaci mikroorganismů má změna konformace ribozomů vedoucí k rozštěpení jejich podjednotek, díky čemuž dochází k poklesu množství funkčních ribozomů a tedy i omezení translace, které vede až k odumírání buňky (Niven et al., 1999). Vystavení buněk vysokému hydrostatickému tlaku způsobuje také destabilizaci struktury nukleových kyselin (u DNA vede až k disociaci dvoušroubovice) a tedy omezení genové exprese (Macgregor, 2002). Bylo také zjištěno, že při aplikaci této metody na živé buňky dochází ke změně fluidity membrán. S rostoucím tlakem dochází k rychlému poklesu fluidity lipidové dvojvrstvy, která se rychle stává nepropustnou pro vodu a další malé molekuly. Buňka na tuto skutečnost reaguje změnou složení této dvojvrstvy, ve které při působení vysokého tlaku dochází ke zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin, díky kterým membrána získává původní fluiditu (Mota et al., 2013; Valentine a Valentine, 2004). Na membránách navíc dochází ke ztrátě protonmotivní síly prostřednictvím inaktivace ATPázy, což způsobí kritickou změnu acidobazické rovnováhy ve vnitřním prostředí buňky vedoucí až k jejímu zániku (Rendueles et al., 2011). Na buněčné stěně byla pozorována degradace ochranných glykoproteinů buněčné stěny, které ji chrání před rozkladem vlastními enzymy. Odštěpování a denaturace glykoproteinů ve vnějších vrstvách buněčné stěny může vést až k jejímu popraskání a lýzi buňky. Zajímavostí ovšem je, že chitinové jizvy (po pučení) zůstávají i nadále neporušené (Brul et al., 2000). Z morfologického hlediska lze tedy na buňce vystavené vysokému hydrostatickému tlaku pozorovat kromě neporušených chitinových jizev také protažení tvaru buňky, oddělení buněčné membrány od buněčné stěny, kompresi vakuol a kondenzaci nukleových kyselin (Rendueles et al., 2011).

Z těchto poznatků je patrné, že inaktivace buněk působením vysokého hydrostatického tlaku je způsobena kaskádou mnoha dějů a může vést až k destrukci buněk a nežádoucímu vylití jejího vnitřního obsahu (Bendová a Kurzová, 1981; Rendueles et al., 2011). Při aplikaci vysokého hydrostatického tlaku je tedy důležité zajistit takové parametry, při kterých dochází k omezení metabolické aktivity a reprodukčních schopností buněk, avšak nedejde k jejich usmrcení celé buňky a tím i k uvolnění intracelulárního obsahu do piva a tudíž k jeho senzoričkému znehodnocení. Bylo prokázáno, že v pivu ošetřeném tlakem 400 MPa, nebo vyšším (při teplotě 20 až 25 °C), dochází k úspěšné inaktivaci buněk, prokázané pomocí kontrolních kultur, při nichž nebyl zjištěn žádný nárůst buněčné populace (Castellari et al., 2000).

Účinnost stabilizace vysokým tlakem závisí mimo jiné také na velikosti a typu inaktivované buňky, neboť kvasničné buňky jsou díky větším rozměrům obecně méně odolné než buňky bakteriální, u kte-

ř se usnadňuje cell lysis and oxidation processes (Cao et al., 2011). These events also induce colour changes, the formation of carbonyl compounds, the reduction of amino acid and polyphenol contents and decreased bitterness (Cao et al., 2011). For the production of unfiltered beers with a prolonged shelf life, it is therefore essential to find alternative methods. These should guarantee microbial stability, should not inactivate or destroy the brewing yeasts, but should inactivate contaminating microorganisms without imposing a heat load on the beer. The most promising is the use of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields. It is also possible to use other less appropriate methods, such as the addition of preservatives or stabilizers.

High hydrostatic pressure (HHP)

High hydrostatic pressure is a very powerful processing system for the non-thermal inactivation of microbial populations, enabling shelf life extension and sensorial stability (Rendueles et al., 2011). In beverage industry was this technology first applied in Japan and nowadays it is frequently used for the stabilization of fruit juices (Buzrul et al., 2005). The first tests on the impact of high hydrostatic pressure on beer was carried out in 1998 (Buzrul, 2012) but research in this area of beer stabilization continues.

The effect of high hydrostatic pressure is an isostatic adiabatic process where the pressure is transferred uniformly and immediately. The advantage is a minimum heat load on the beer as the temperature change during its application is only about 3 °C per 100 MPa (Rendueles et al., 2011).

The main mechanism of action is the interruption of non-covalent hydrophobic interactions that participate in the conformation of biopolymers, in particular DNA, proteins and lipids in living systems, and therefore in their correct biological functions (Tewari et al., 2007). The predominant effect leading to inactivating of microorganisms probably lies in the changes in ribosome structures leading to cleavage of their subunits and, subsequently, to a decrease in the number of functional ribosomes, a restriction in translation and to cell death (Niven et al., 1999). High hydrostatic pressure also destabilizes nucleic acid structures, including dissociation of the double helix, and therefore reduces gene expression (Macgregor, 2002). It was found that by applying this method to living cells, the membrane fluidity also changes. Fluidity of the lipid bilayer decreases rapidly with increasing pressure and becomes impermeable to water and other small molecules. The cell reacts to this by changing the composition of the bilayer. The content of unsaturated fatty acids, which are important for achieving the original fluidity, increases (Mota et al., 2013; Valentine and Valentine, 2004). In addition, HHP causes a loss of proton motive force at membranes due to inactivation of ATPases. This causes a critical change in the acid-base equilibrium within the cells, which can lead to cell death (Rendueles et al., 2011). Degradation of glycoproteins due to loss of protective cell membrane functions was also observed. The cleavage and denaturation of glycoproteins in the outer layers of the cell membranes can cause their cracking and cell lysis. An interesting finding was that chitin scars derived from germination stay intact (Brul et al., 2000). In cells exposed to HHP, from a morphological point of view, it is possible to observe not only intact chitin scars but also cells with protruding shapes, separation of cell membranes from the cell walls, vacuole compression and condensation of nucleic acids (Rendueles et al., 2011).

From these findings it is evident that cell inactivation by exposure to HHP is the result of many actions that could lead to the destruction of the cell and undesirable release of cellular fluids (Bendová and Kurzová, 1981; Rendueles et al., 2011). Therefore, it is important to set up such parameters that reduce metabolic activity and reproduction of cells, but do not cause total cell destruction, that would change the sensorial properties of the beer. It was demonstrated in control cultures that a pressure of 400 MPa or higher at temperature of 20 °C to 25 °C successfully inactivated cells and prevented any increase in the cell population (Castellari et al., 2000).

The effectiveness of stabilization by high pressure also depends on the type of cell to be inactivated. Larger yeast cells are commonly less resistant than bacterial cells. Their degree of resistance depends mainly on the composition of the cell wall; Gram-positive bacteria are generally more resistant than Gram-negative cells. It was also found that individual species of microorganisms exhibited different levels of resistance to high pressure, depending on the fluidity of their membranes (Mota et al., 2013).

It was also verified that at lower temperatures, a lower pressure was needed to reach the same degree of inactivation. The combina-

rych odolnost závisí hlavně na složení buněčné stěny. Gram-pozitivní bakterie mají obecně vyšší odolnost než gram-negativní buňky. Bylo také zjištěno, že jednotlivé druhy mikroorganismů vykazují odlišnou odolnost vůči tlaku v závislosti na fluiditě membrán (Mota et al., 2013).

Z hlediska účinnosti inaktivace mikroorganismů tlakem bylo ověřeno, že při nižších teplotách postačuje pro dosažení požadovaného efektu nižší tlak. Jako neúčinnější se ukázalo ošetření buněk při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy k usmrcení docházelo již při tlaku 105 MPa. Při teplotách okolo nuly bylo pro dosažení stejného efektu potřeba použít tlak 190 MPa a při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl potřebný tlak 250 MPa, data však pochází ze studie, kde byl tlak aplikován na buněčnou suspenzi o denzitě 3×10^8 buněk na 1 ml, což je v porovnání s reálnou koncentrací buněk v pivu hodnota přibližně o řád vyšší (Fillaudeau a Carrere, 2002; Perrier-Cornet et al., 2005).

Efekt vysokého tlaku a nízké teploty působí na buňky synergicky na dvou úrovních. V první řadě dochází při vystavení mikroorganismů těmto extrémním podmínkám ke změně biochemické rovnováhy zapříčiňující denaturaci buněčných proteinů. Tento efekt je kombinován s poškozeními na mikroskopické úrovni, kdy dochází ke změně velikosti povrchu k objemu díky vnitřní kompresi doprovázené posunem osmotické rovnováhy. Působením vysokého tlaku je rovněž zesílen destruktivní účinek případných vnitrobuněčných ledových krystalů, které buňky namáhají mechanicky (Perrier-Cornet et al., 2005).

Vysoký tlak lze využít také pro inaktivaci spor. V tomto případě je ovšem nezbytné použít ošetření tlakem ve dvou krocích, kdy v první dochází k aktivaci spory (senzitivizace), která ztrácí barotoleranci a při další aplikaci vysokého tlaku odumírá (Rendueles et al., 2011). Přesný mechanismus inaktivace spor pomocí působení vysokého tlaku, který je doprovázen výrazným snížením vnitřního pH, není dosud zcela objasněn. Předpokládá se, že prvním působením tlaku dochází k aktivaci rozkladu kortexu (nejodolnějšího obalu spory) činností hydrolytických enzymů, čímž je zahájeno klíčení spor. Rozkladem kortexu spora ztrácí mechanickou ochranu a dalším působením tlaku dochází k denaturaci jejich kompartmentů i některých látek. Jedná se například o hydrolyzu jádra spory či rozklad dipikolinátu vápenatého a některých nízkomolekulárních proteinů (Ahn a Balasubramaniam, 2007). K senzitivizaci spor dochází už při použití relativně nízkých tlaků, přibližně v rozmezí 50 – 300 MPa (Rendueles et al., 2011), zatímco úspěšná inaktivace spor vyžaduje použití tlaků extrémně vysokých, přesahujících 900 MPa (Castellari et al., 2000).

Pulzní elektrické pole (PEF)

Další netermální metodou vedoucí k inaktivaci mikroorganismů nacházejících se v nápojích je metoda využívající pulzní elektrické pole (Knorr et al., 2001; Knorr et al., 1994; Vega-Mercado et al., 1997), která je založena na generaci velmi krátkých vysokoenergetických elektrických pulzů, jejichž doba trvání nepřesahuje jednotky mikrosekund. V provozních podmínkách je v současnosti pulzní elektrické pole aplikováno hlavně pro zvyšování mikrobiologické stability mléka, díky čemuž je většina poznatků o použití této metody získána z roztoků obsahujících tukové micely (Barsotti et al., 2001; Vega-Mercado et al., 1997). Pulzní elektrické pole však bylo použito i pro ošetření piva, i když zatím pouze v laboratorních podmínkách (Evrendilek et al., 2004).

Bylo prokázáno, že hlavním jevem vedoucím k inaktivaci buněk není zahřívání ani elektrolyza vnitřního obsahu buňky (Knorr et al., 1994), ale destrukce cytoplazmatické membrány mikroorganismů (Barsotti et al., 2001; Bendicho et al., 2002; Soliva-Fortuny et al., 2009). Princip mechanismu je založen na namáhání membrány vysokofrekvenčními elektrickými pulzy vedoucímu ke vzniku takzvané elektroporace, jejíž fyzikální podstata není dosud zcela objasněná (Gudmundsson a Hafsteinsson, 2001; Vega-Mercado et al., 1997). Existuje však teorie, že biologické membrány jsou podobné kondenzátoru s malou dielektrickou konstantou (Zimmermann et al., 1974), na jejichž vnější a vnitřní straně jsou přítomny striktně oddělené malé opačné náboje, které zajišťují vznik transmembránového potenciálu. Pokud je biomembrána vystavena působení vysokoenergetických elektrických pulzů, dochází k akumulaci náboje podél vnitřní a vnější membrány spojené se zvýšením transmembránového potenciálu ve velmi krátkém čase (μs), což vede k prudkému nárůstu energie způsobenému přitažlivými silami mezi opačnými náboji. Tímto jevem dochází k razantnímu zvýšení tlaku na membránu a jejímú mechanickému namáhání v cyklech odpovídajících frekvenci elektrických pulzů. Výsledkem tohoto děje může být lokální poškození biomembrán mikroorganismů, perforace a vylití vnitrobuněčného obsahu (Knorr et al., 2001; Zimmermann et al., 1974).

of a temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a pressure of 105 MPa was most effective. At temperatures around zero, it was necessary to use a pressure of 190 MPa to achieve the same effect and at a temperature of $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pressure of 250 MPa was necessary. Nevertheless, these data were derived from a study in which pressure was applied to a cell suspension of density 3×10^8 cells/ml. That is about ten times higher than the actual cell concentration in beer. (Fillaudeau and Carrere, 2002; Perrier-Cornet et al., 2005).

The combination of high pressure and low temperature affects cells synergistically at two levels. Firstly, the application of these extreme conditions to microorganisms causes a change in biochemical equilibria and subsequently denaturation of cellular proteins. This effect is combined with damage at a microscopic level, which results in surface – area – to volume ratio changes due to inner compression accompanied by a shift in the osmotic equilibrium. The application of high pressure amplifies the destructive effects of prospective intracellular ice crystals, which stress the cells mechanically (Perrier-Cornet et al., 2005).

High pressure could also be used for the inactivation of spores. In this case, pressure must be applied in two steps. The first step results in sensitization of spores that lose their barotolerance and then die from a further application of high pressure (Rendueles et al., 2011). Inactivation of the spores is accompanied by a significant reduction in their internal pH, but the exact mechanism is not fully understood. It is assumed that the first application of pressure activates breakdown processes in the cortex, the most resistant cover of spores, through the activity of hydrolytic enzymes. This starts spore germination. However, along with disintegration of the cortex, the spores lose mechanical protection and further pressure causes denaturation of components within structural compartments. Damage is associated with hydrolysis of the spore kernal, the degradation of calcium dipicolinate and decomposition of low molecular weight proteins (Ahn and Balasubramaniam, 2007). Sensitization of the spores occurs with the application of relatively low pressures within the range of 50 to 300 MPa (Rendueles et al., 2011), whereas successful inactivation of spores needs extremely high pressures exceeding 900 MPa (Castellari et al., 2000).

Pulsed electric fields (PEF)

Another non-thermal technique for the inactivation of microorganisms in drinks is a method using pulsed electric fields (Knorr et al., 2001; Knorr et al., 1994; Vega-Mercado et al., 1997). This is based on the generation of very short high-voltage electric pulses that last no more than a few microseconds. Under production conditions, PEF are used mainly to increase microbiological stability of milk. Consequently, most of the findings about this method were obtained from solutions containing fat micelles (Barsotti et al., 2001; Vega-Mercado et al., 1997). Pulsed electric fields were also applied to beer but only at the laboratory level (Evrendilek et al., 2004).

It has been shown that cell inactivation was not caused by a thermal effect, nor the electrolysis of cell contents (Knorr et al., 1994), but by the destruction of the cytoplasmic membranes of microorganisms (Barsotti et al., 2001; Bendicho et al., 2002; Soliva-Fortuny et al., 2009). The mechanism of action is based on stresses developed from high-voltage electric pulses, leading to electroporation or permeabilization of microbial membranes. The precise physical mechanisms of inactivation are not well understood (Gudmundsson and Hafsteinsson, 2001; Vega-Mercado et al., 1997). However, biologic membranes can theoretically operate like condensers with small dielectric constants (Zimmermann et al., 1974). Small opposite charges at the surface and on the inner side, which are strictly separated, establish and maintain a trans-membrane potential. If the biomembrane is exposed to high-voltage electric pulses for a very short time period (μs), the result is a charge accumulation along the outer and inner membranes and an increase in the trans-membrane potential. This causes a frequency-dependent abrupt increase in energy due to the affinity between opposite charges, and to a sudden increase in pressure on the membrane due to mechanical stress. The result can be local damage to the biomembrane of microorganisms, perforation and then extrusion of the cellular contents (Knorr et al., 2001; Zimmermann et al., 1974).

According to PEF parameters, electroporation can be reversible or permanent (Knorr et al., 2001). The transition between these two cases is determined by the critical voltage, which varies between 12 to 20 kV/cm and depends on the type and size of the microbial cell (Soliva-Fortuny et al., 2009). Exceeding the critical voltage results in permanent cell deformation and even leaking of the cell contents into the beer. Cells exposed to lower intensity PEF only experience

Elektroporace je v závislosti na parametrech elektrického pulzního pole reversibilní nebo ireversibilní (Knorr et al., 2001). Přechod mezi těmito dvěma stavy určuje takzvané kritické napětí, které se pohybuje v rozsahu 12-20 kV/cm v závislosti na typu a velikosti mikrobiální buňky (Soliva-Fortuny et al., 2009). Při překročení kritického napětí dochází k trvalé deformaci a poškození buněk vedoucímu až k úniku vnitřního obsahu do piva, zatímco u buněk vystavených působení elektrického pole s intenzitou nižší dochází ke zdrsnění povrchu buněk spojenému s minimálním poškozením buněčných organel (Knorr et al., 2001).

Efektivita pulzního elektrického pole je ovlivněna celou řadou faktorů, jako je intenzita elektrického pole, doba působení a s ní související počet použitých pulzů a v neposlední řadě teplota ošetřovaného vzorku. Z biologického hlediska je podstatným faktorem ovlivňujícím úspěšnou inaktivaci buněk typ inaktivovaného mikroorganismu (Bendicho et al., 2002), neboť v porovnání s kvasinkami je pro inaktivaci bakterií, jejichž rozměry jsou přibližně desetkrát menší, zapotřebí přibližně dvakrát vyšší intenzity elektrického pole (Evrendilek et al., 2004).

Aplikace vysokého hydrostatického tlaku a pulzního elektrického pole v pivovarství

Metody vysokého hydrostatického tlaku a pulzního elektrického pole dosud v pivovarském průmyslu využívány nejsou, ačkoliv bylo prokázáno, že jejich použití přináší řadu výhod (Buzrul, 2012; Yang et al., 2016). Jednou z hlavních výhod aplikace vysokého hydrostatického tlaku je zachování výsledné kvality produktu. Bylo dokázáno, že tímto ošetřením piva nedochází ke změně jeho vlastností (pH, barvy, hořkosti, extraktu, redoxního potenciálu či stability pěny), ani ke změně obsahu látek (ethanolu, iso- α -hořkých kyselin a polyfenolů), přičemž i spektrum aromatických látek zůstává neměnné (Buzrul, 2012; Castellari et al., 2000). Během stárnutí piva se však výše uvedené vlastnosti a obsahy látek mění, výjimkou je pH, které dosahovalo po sledované době (49 dnů) přibližně stejných hodnot (Buzrul, 2012; Buzrul et al., 2005; Castellari et al., 2000; Franchi et al., 2011). Při ošetření piva vysokým hydrostatickým tlakem dochází zpravidla ke vzniku výrazného zákalu (Buzrul, 2012). Tento jev je pravděpodobně způsoben změnou konformace proteinů (sekundární struktury) vystavených působení vysokému hydrostatickému tlaku, díky čemuž zřejmě dochází ke změně afinity k fenolovým látkám, což může vést až ke zvýšení tvorby trvalého zákalu.

Důležitým faktorem pro další zkoumání vlivu vysokého hydrostatického tlaku na nefiltrované pivo je jeho porovnání s nejpoužívanější metodou mikrobiální stabilizace – pasterací. Piva ošetřená pomocí tlaku 600 MPa po dobu 5 min vykazovala v porovnání s pivy pasterovanými na tunelovém pastéru při 60 °C po dobu 10 min téměř totožné hodnoty barvy (Buzrul et al., 2005; Castellari et al., 2000) a oba vzorky byly taktéž mikrobiologicky inaktivní. U všech vzorků byl analyzován obsah hydroxymethylfurfuralu, který vzniká při tepelném rozkladu sacharidů v kyselém prostředí, jakožto analytického znaku pro posouzení tepelného namáhání (Šavel a Pazourek, 2001). Jeho obsah byl u pív ošetřených vysokým hydrostatickým tlakem v porovnání s pasterovanými pivy řádově nižší, což je prokazatelně pozitivní efekt (Buzrul et al., 2005).

Pro efektivní použití pulzního elektrického pole je nezbytná minimalizace rizika mikrobiologické kontaminace nefiltrovaného piva správnou výrobní a hygienickou praxí, neboť nastavení parametrů metody, způsobující inaktivaci mikrobiální kontaminace, může vyvolat lýzi žádoucích kvasničných buněk a senzoričké znehodnocení piva (Bendicho et al., 2002; Soliva-Fortuny et al., 2009). Vhodným nastavením parametrů pulzního elektrického pole by navíc měla být omezena aktivita kvasinek natolik, aby nedocházelo k nárůstu jejich populace a aby se zároveň podařilo omezit jejich metabolické pochody, zejména pak schopnost kvašení.

Otázkou rovněž zůstává, jak samotné ošetření piva vysokofrekvenčním elektrickým polem ovlivňuje jeho senzoričké vlastnosti, neboť dosud není znám účinek tohoto ošetření na redoxní, degradační či kondenzační reakce samovolně probíhajících v pivu a na denaturaci v něm obsažených proteinů.

Navíc bylo prokázáno, že senzoričkový profil piva je výrazně negativně ovlivněn uvolňováním iontů kovů (zejména chromu, zinku, železa a manganu), z nerezových ocelových elektrod používaných během aplikace elektrického pulzního pole (Evrendilek et al., 2004). Je tedy nezbytné optimalizovat chemické složení a konstrukci elektrod i samotné parametry pulzního elektrického pole tak, aby elektrody zůstaly intaktní a nijak neovlivňovaly stabilizovaný produkt.

V roce 2013 bylo americkým patentovým ústavem registrováno zařízení, primárně navržené pro biologickou stabilizaci mléka, jehož

a roughening of the cell surface and a minimum number of damaged organelles (Knorr et al., 2001).

The efficiency of PEF is influenced by a number of factors, such as the intensity of the electric fields, the duration, the number of pulses used and the temperature. From the biological point of view, the species of microorganisms to be inactivated is a very important factor influencing the success of the process (Bendicho et al., 2002). In addition, when compared with yeasts, bacteria are roughly ten times smaller and therefore require about twice as high an intensity of electric fields for their inactivation (Evrendilek et al., 2004).

Application of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields in breweries

Methods of HHP and PEF are not yet used in breweries despite the fact that their application would bring a number of advantages (Buzrul, 2012; Yang et al., 2016). One of the main advantages of HHP would be the maintenance of a high quality product. It has been shown that this treatment does not cause any changes in essential properties such as pH, colour, bitterness, redox potential and foam stability when applied to beer. The content of aromatic compounds also remains unchanged (Buzrul, 2012; Castellari et al., 2000). During beer aging, however, most properties and compounds change with the exception of pH, which was approximately the same during the entire monitored period of 49 days (Buzrul, 2012; Buzrul et al., 2005; Castellari et al., 2000; Franchi et al., 2011). During the treatment of beer with HHP, a distinct turbidity usually results (Buzrul, 2012). This effect is probably caused by conformation changes in proteins stressed by HHP, particularly interactions with phenolic substances that increase the formation of a permanent turbidity.

An important factor for further research regarding the impact of HHP on unfiltered beer is a comparison with the main method of microbial stabilization – pasteurization. After treatment at a pressure of 600 MPa for 5 minutes versus pasteurization in a tunnel pasteurizer at a temperature of 60 °C for 10 minutes, beer samples showed almost the same colour (Buzrul et al., 2005; Castellari et al., 2000) and both samples were microbiologically inactive. All samples were analysed for the content of hydroxymethylfurfural, formed by thermal decomposition of saccharides in an acidic medium, as marker of thermal load (Šavel and Pazourek, 2001). Content of hydroxymethylfurfural in beers exposed to HHP was about ten times lower than after pasteurization, which is undoubtedly a positive effect (Buzrul et al., 2005).

For the effective application of PEF, it is necessary to minimize the risks of microbial contamination of unfiltered beer by using correct production processes and sanitization practices. With incorrect settings, inactivation of unwanted microbial contamination may be accompanied by lysis of desirable yeast cells and sensory deterioration of the beer (Bendicho et al., 2002; Soliva-Fortuny et al., 2009). In addition, correct parameters should restrict yeast activity in so far that they cease to proliferate and reduce metabolic processes, particularly the fermentation ability.

However, an open question is how the treatment of beer with high frequency electric fields influences its sensorial properties. Up to now, little is known about the impact of this method on redox values, degradation or condensation reactions that spontaneously occur in beer, and on the denaturation of beer proteins.

It was also demonstrated that the sensorial profile of beer is significantly influenced by extraction of metal ions such as chromium, zinc, iron and manganese from the stainless steel electrodes used during the application of PEF (Evrendilek et al., 2004). Therefore, it is essential to optimize the chemical composition and construction of the electrodes as well as the PEF parameters in such a way that the electrodes remain intact and do not influence the stabilized product in any way.

In 2013, the US patent office registered a processing apparatus proposed primarily for the biological stabilisation of milk but it can also be used for the biological stabilisation of beer (Patent No. US20130213898A1). This flow-through system includes an inner cylindrical tube with a porous filter placed at the inner wall, which is designed to hold back large particles, and an outer cylindrical tube where the electrodes and the drainage channels are located. The medium flows into the chamber through the inner tube and through the filter into cladding of the outer tube, where it is exposed to electrical pulses and then flows away through the drainage channels out of the device (Patent No. US20130213898A1). This arrangement is similar to common cross flow filtration. Due to the fact that the inner tube filters can be of different mesh sizes, it is possible to adapt the equipment in such way that yeast cells are not held back. The inten-

provedení lze aplikovat rovněž pro biologickou stabilizaci piva (Patent č. US20130213898A1). Toto průtočné zařízení se skládá z vnitřní trubice s filtrem umístěným na její vnitřní stěně a sloužícím k zachycení velkých částic, a vnější trubice, v jejímž plášti jsou umístěny elektrody a odvodné kanály. Médium proudí do komory prostorem vnitřní trubky a poté protéká filtrem do pláště vnější trubky, kde dochází k působení elektrických pulsů a následně je médium odváděno sběrnými kanály pryč ze zařízení (Patent č. US20130213898A1). Toto uspořádání je obdobné klasické cross flow filtraci. Vzhledem k tomu, že lze ve vnitřní trubce použít filtry různých porozit, je možné přístroj přizpůsobit tak, aby nedocházelo k zachytávání kvasničných buněk uvnitř zařízení a intenzitu elektrických pulsů zvolit takovou, aby nevyvolávala lýzi kvasinek. Z těchto důvodů se toto uspořádání použití PEF jeví velmi vhodné pro zvyšování stability nefiltrovaného piva. Stabilizační celou lze navíc řídit v reálném čase pomocí počítače (Patent č. US20130213898A1).

5 ZÁVĚR

V posledních letech roste poptávka po nefiltrovaných pivech. Vzhledem k jejich krátké trvanlivosti, znemožňující přepravu na delší vzdálenosti a dlouhodobé skladování, je nezbytné zajistit zvýšení jeho mikrobiální a senzorické stability. K tomuto účelu je obecně v pivovarství využívána pasterace, která však není pro ošetření nefiltrovaného piva vhodná, neboť kromě případné kontaminace zabíjí i žádoucí kulturní kvasinky a tepelně zatěžuje pivo. Tyto negativní jevy jsou příčinou hledání vhodných alternativních metod, které by vedly pouze k inaktivaci kvasničných buněk a případné mikrobiální kontaminaci.

Jako perspektivní se jeví použití vysokého hydrostatického tlaku a pulzního elektrického pole. Z dosud dosažených výsledků vyplývá, že vyšší potenciál pro případné budoucí uplatnění v průmyslu má první z uvedených metod, neboť pro účinné zvýšení mikrobiologické stability elektrickým polem je nezbytné zajištění co nejdokonalejší mikrobiologické čistoty správnou výrobní a hygienickou praxí.

Zavedení těchto metod do praxe vyžaduje provedení celé řady dalších testů zahrnujících zejména optimalizaci parametrů metod, vztáženou například na konkrétní druh stabilizovaného nefiltrovaného piva. Dosud také existuje minimum publikací na téma vlivu výše uvedených metod na senzorické vlastnosti nefiltrovaných piv.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie vznikla za podpory Technologické agentury České republiky v rámci projektu TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

LITERATURA / REFERENCES

- Ahn, J., Balasubramaniam, V. M., 2007: Physiological responses of *Bacillus amyloliquefaciens* spores to high pressure. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(3): 524–529.
- Barsotti, L., Dumay, E., Mu, T. H., Fernandez Diaz, M. D., Cheftel, J. C., 2001: Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. *Trends Food Sci. Technol.*, 12(3–4): 136–144.
- Basařová, G., Bláha, M., Veselý, P., 2003: Vliv kmene kvasnic na senzorickou stabilitu piva. *Kvasny Prum.*, 49(1): 3–10.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. VŠCHT v Praze. ISBN 978-80-7080-734-7.

sity of the electrical pulses can also be chosen in such way that they do not cause lysis of the yeast. Therefore, this PEF set-up seems to be suitable for extending the stability of unfiltered beer. Additionally, stabilisation equipment can be continuously controlled by computer (Patent No. US20130213898A1).

5 CONCLUSIONS

The demand for unfiltered beers is increasing. However, the short shelf life limits long distance transport and long-term storage. Therefore, it is necessary to extend microbial and sensorial stability. In breweries, pasteurization is commonly used for this purpose. However, this is not suitable for the treatment of unfiltered beer. Apart from possible contamination, desirable brewing yeasts are also killed, with an additional thermal impact on the beer. These negative effects have motivated the search for suitable alternatives that can bring about the inactivation, but not destruction of both brewing yeasts and microbial contamination.

The applications of HHP and PEF processing seem to be most promising. Results show that the former technique has potential for use at the industrial scale. To effectively increase microbial stability using PEF, it is necessary to ensure maximum microbiological purity using correct production and sanitization procedures.

Introduction of these methods on an industrial scale needs further testing and optimization according to the particular type of unfiltered beer. This paper represents only one of a few published studies on the influence of these two methods on the sensorial properties of unfiltered beers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out within the project TE02000177 – “Centre for Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products” and is supported by the Technology Agency of the Czech Republic.

- Bendicho, S., Barbosa-Canovas, G. V., Martin, O., 2002: Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends Food Sci. Technol.*, 13(6-7): 195–204.
- Bendová, O., Kurzová, V., 1981: Příspěvek k problematice autolyzační schopnosti pivovarských kvasinek. *Kvasny Prum.*, 27(10): 225–227.
- Brul, S., Rommens, A. J. M., Verrips, C. T., 2000: Mechanistic studies on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 1(2): 99–108.
- Buzrul, S., 2012: High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 13(1–12): 1–12.

- Buzrul, S., Alpas, H., Bozoglu, F., 2005: Effects of high hydrostatic pressure on shelf life of lager beer. *Eur. Food Res. Technol.*, 220(5-6): 615–618.
- Cao, L., Zhou, G., Guo, P., Li, Y., 2011: Influence of pasteurising intensity on beer flavour stability. *J. Inst. Brew.*, 117(4): 587–592.
- Castellari, M., Arfelli, G., Riponi, C., Carpi, G., Amati, A., 2000: High hydrostatic pressure treatments for beer stabilization. *J. Food Sci.*, 65(6): 974–977.
- Dainty, R. H., 1996: Chemical/biochemical detection of spoilage. *Int. J. Food Microbiol.*, 33(1): 19–33.
- Evrendilek, G. A., Li, S., Dantzer, W. R., Zhang, Q. H., 2004: Pulsed electric field processing of beer: Microbial, sensory, and quality analyses. *J. Food Sci.*, 69(8): M228–M232.
- Fillaudeau, L., Carrere, H., 2002: Yeast cells, beer composition and mean pore diameter impacts on fouling and retention during cross-flow filtration of beer with ceramic membranes. *J. Membr. Sci.*, 196(1): 39–57.
- Franchi, M. A., Tribst, A. A. L., Cristianini, M., 2011: Effects of high pressure homogenization on beer quality attributes. *J. Inst. Brew.*, 117(2): 195–198.
- Gudmundsson, M., Hafsteinsson, H., 2001: Effect of electric field pulses on microstructure of muscle foods and roes. *Trends Food Sci. Technol.*, 12(3-4): 122–128.
- Hammond, J., Brennan, M., Price, A., 1999: The control of microbial spoilage of beer. *J. Inst. Brew.*, 105(2): 113–120.
- Hollerová, I., 1998: Rychlé metody stanovení kontaminace piva. *Kvasny Prum.*, 44(3): 67–69.
- Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.*, 33(1): 139–155.
- Knorr, D., Angersbach, A., Eshtiaghi, M. N., Heinz, V., Lee, D.-U., 2001: Processing concepts based on high intensity electric field pulses. *Trends Food Sci. Technol.*, 12(3-4): 129–135.
- Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T., Sitzmann, W., 1994: Food application of high electric field pulses. *Trends Food Sci. Technol.*, 5(3): 71–75.
- Macgregor, R. B., 2002: The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1595(1-2): 266–276.
- Matoulková, D., Kubizniaková, P., 2014: Mikrobiologie pivovarské výroby – Striktně anaerobní bakterie *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* a *Zymophilus* a metody jejich detekce. *Kvasny Prum.*, 60(11): 285–294.
- Matoulková, D., Sigler, K., Němec, M., 2010: Vliv tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin na růst bakterií kazících a nekazících pivo. *Kvasny Prum.*, 56(10): 396–403.
- Mikyška, A., Krofta, K., 2012: Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. *J. Inst. Brew.*, 118(3): 269–279.
- Mikyška, A., Krofta, K., Hašková, D., Čulík, J., Čejka, P., 2012: Vliv skladování chmelových pelet na kvalitu piva. *Kvasny Prum.*, 58(5): 148–154.
- Mota, M. J., Lopes, R. P., Delgadillo, I., Saraiva, J. A., 2013: Microorganisms under high pressure – Adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnol. Adv.*, 31(8): 1426–1434.
- Niven, G. W., Miles, C. A., Mackey, B. M., 1999: The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology (Reading, U. K.)*, 145(2): 419–425.
- Olšovská, J., Matoulková, D., Čejka, P., Jurková, M., 2014: Pivo a zdraví. *Kvasny Prum.*, 60(7): 174–181.
- Patent č. US20130213898A1: Liquid processing apparatus and methods for processing liquids, Application 2013-08-22.
- Perrier-Cornet, J.-M., Tapin, S., Gaeta, S., Gervais, P., 2005: High-pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* at subzero temperatures. *J. Biotechnol.*, 115(4): 405–412.
- Priest, F. G., Campbell, I., 1996: *Brewing Microbiology*. Springer US. ISBN 978-1-78242-331-7.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M., 2010: Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT-Food Sci. Technol.*, 44(5): 1251–1260.
- Riu-Aumatell, M., Miro, P., Serra-Cayuela, A., Buxaderas, S., Lopez-Tamames, E., 2014: Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME-GC-MS. *Food Res. Int.*, 57(196-202): 196–202.
- Schönberger, C., Kostecký, T., 2011: 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *J. Inst. Brew.*, 117(3): 259–267.
- Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., Martin-Belloso, O., 2009: Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 20(11-12): 544–556.
- Suzuki, K., 2011: 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *J. Inst. Brew.*, 117(2): 131–155.
- Sweeney, M. J., Dobson, A. D. W., 1998: Review: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 43(3): 141–158.
- Szlvako, C. M., Anderson, R. J., 1979: Influence of wort processing on beer dimethyl sulfide levels. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 37(1): 20–25.
- Šavel, J., Pazourek, K., 2001: Stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) průtokovým analyzátozem. *Kvasny Prum.*, 47(11): 314–316.
- Šmogrovičová, D., Dömény, Z., 1999: Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilized yeasts. *Process Biochem. (Oxford)*, 34(8): 785–794.
- Tewari, G., Juneja, V. K., Editors, 2007: *Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation*. Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-2968-5.
- Tsuchiya, Y., Kaneda, H., Kano, Y., Koshino, S., 1992: Detection of beer spoilage organisms by polymerase chain reaction technology. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 50(2): 64–67.
- Topka, P., 1983: Čištění a dezinfekce v pivovarech z pohledu metody CIP. 1. Vybavení a funkce sanitační stanice. *Kvasny Prum.*, 29(3): 57–61.
- Vacl, J., 2014: Minipivovary jako atraktivní cíl cestovního ruchu v České republice. *Kvasny Prum.*, 60(11): 297–306.
- Valentine, R. C., Valentine, D. L., 2004: Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog. Lipid Res.*, 43(5): 383–402.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., Derdelinckx, G., 2003: Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *J. Agric. Food Chem.*, 51(23): 6782–6790.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G., 2005: The chemistry of beer aging - a critical review. *Food Chem.*, 95(3): 357–381.
- Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D., 2005: Enhancing the microbiological stability of malt and beer - a review. *J. Inst. Brew.*, 111(4): 355–371.
- Vega-Mercado, H., Martin-Belloso, O., Qin, B.-L., Chang, F. J., Gongora-Nieto, M. M., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G., 1997: Non-thermal food preservation: pulsed electric fields. *Trends Food Sci. Technol.*, 8(5): 151–157.
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B., Menz, G., 2012: 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *J. Inst. Brew.*, 118(4): 335–345.
- Vrzal, T., Olšovská, J., 2016: N-nitrosaminy v 21. století. *Kvasny Prum.*, 62(1): 2–8.
- Vyhláška MZ č. 252/2004 Sb. o hygienických požadavcích na pitnou a teplou vodu a četnosti a rozsahu kontroly pitné vody. Sbírka zákonů 2004, částka 82 (2004).
- Yang, N., Huang, K., Lyu, C., Wang, J., 2016: Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review. *Food Control*, 61: 28–38.
- Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F., 1974: Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.*, 14(11): 881–899.