



### 1. Secondary contamination of beer by *Pectinatus* and other strict anaerobes

Dagmar Matoulková, Petra Kubizniaková, Karel Kosař, Martina Brožová

Research Institute of Brewing and Malting, PLC

Beer is an environment in which strictly anaerobic bacteria can grow. Strictly anaerobic bacteria capable of spoiling beer or contaminating brewer's yeast belong to the genera *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* and *Propionispira* (formerly „*Zymophilus*“). We have investigated the incidence of strictly anaerobic bacteria in brewery filling areas. Thousands of samples were taken and analysed from bottling lines in 10 brewery plants over a 10 year period. The presentation gives an overview of the frequency and factors influencing the occurrence of strict anaerobes in brewery plants. Microbiological risks and the processes of their elimination, and specific features of the contamination of beer by anaerobes will be presented.

### 2. Brewing microbiology – wild yeasts and cultivation methods of their detection

Petra Kubizniaková, Dagmar Matoulková, Karel Kosař, Martina Brožová

Research Institute of Brewing and Malting, PLC

The term „wild“ yeasts is used for any yeasts other than culture brewer's yeast. Although found in different stages of beer production, they cause the most serious effects by producing undesirable flavors and aromas during the main fermentation of wort. Wild yeasts are generally divided into two groups: 1) yeasts belonging to the genus *Saccharomyces* and 2) yeasts of other genera, so-called non-*Saccharomyces* yeasts. Our poster presentation is focused on the techniques of detection of wild yeasts in brewery laboratory. The growth of a set of 143 strains of culture (brewing and wine) and wild yeasts on selective media was monitored. Culture media under study include WLN agar, wort agar containing monoiodoacetic acid, lysine agar, agar with crystal violet, agar with copper sulphate, MYGP agar with actidione and YPD agar medium used for incubation at temperature 37 °C. The usefulness of the media in the brewery laboratory was evaluated. Photographs of representative yeast colonies on various media are presented.

### 3. Brewing microbiology – bacteria of genus *Kocuria* (*Micrococcus*) and cultivation methods of their detection

Dagmar Matoulková, Petra Kubizniaková, Karel Kosař, Martina Brožová

Research Institute of Brewing and Malting, PLC

Significant brewery species of micrococcus were reclassified to the genus *Kocuria*: *Kocuria kristinae* (previously *Micrococcus kristinae*) and *Kocuria varians* (previously *Micrococcus varians*). Bacteria of genus *Kocuria* belong to less risky microbial contaminants of beer and brewery plant. Species *Kocuria kristinae* may exceptionally cause beer spoilage. Significant is their misplacement for pediococci. Here we present an overview of basic morphological and physiological properties of *Kocuria* (*Micrococcus*) species and describe their harmfulness in the brewing process. The usefulness of selected culture media in the brewery laboratory was evaluated. Photographs of representative bacterial colonies on various media are presented.

### 4. Brewing microbiology – lactic acid bacteria and cultivation methods of their detection

Petra Kubizniaková, Dagmar Matoulková, Karel Kosař, Martina Brožová

Research Institute of Brewing and Malting, PLC

Lactic acid bacteria represent a heterogeneous group of bacteria with one main common feature - the production of lactic acid., some of which may be present as contaminants in beer brewing. The most risky genera are *Lactobacillus* and *Pediococcus*. The poster is focused on the techniques of detection of lactic acid bacteria in brewery laboratory. In first phase of study the growth was monitored in a set of 53 strains of *Lactobacillus* and *Pediococcus* on solidified culture media, e.g. MRS agar and its various modifications, the media Raka-Ray, NBB, UBA, etc. The study also included some liquid media. Selected strains were then used in a consequential set of experiments - incubation of beer-adapted and non-adapted bacteria in beer. In subsequent testing of cultivation media, MRS and its modification were evaluated as the most effective. Raka-Ray was evaluated as the least suitable for the detection of lactic acid bacteria. The real usefulness of the media in brewery plant laboratory was also evaluated.

### 5. Charakterystyka wybranych parametrów fizykochemicznych piw wyprodukowanych z udziałem kultur kveik

Monika Cioch, Aneta Pater, Marek Zdaniewicz, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Piwa specjalne, smakowe i rzemieślnicze zyskują ostatnio coraz większe uznanie wśród konsumentów. Większość z nich otrzymywana jest przy użyciu czystych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, niektóre rodzaje piw regionalnych powstają w wyniku fermentacji spontanicznej. Bardzo ciekawą, a zarazem mało poznaną alternatywą dla komercyjnych, wyselekcjonowanych szczepów drożdży, mogą być kultury kveik. Mimo, że czysta kultura drożdży piwowarskich znacznie ułatwia prowadzenie procesu, doniesienia literaturowe dowodzą słuszności stosowania kultur mieszanych w produkcji piwa. Użycie kombinacji mikroorganizmów warunkuje otrzymanie unikatowych aromatów napoju, które nie zostaną uzyskane w wyniku wykorzystania monokultur.

### 6. Wpływ procesu wymrażania na skład chemiczny piwa typu eisbock

Olga Szczepanik, Aleksander Poreda, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Przeprowadzono wymrażanie komercyjnego piwa w stylu bock, przy zastosowaniu dwóch technologii zagęszczania przez mrożenie, tj. technologii szybkiego oddzielenia lodu od fazy ciekłej oraz technologii sączenia fazy ciekłej z lodu, w dwóch wariantach temperaturowych -15°C oraz -84°C. Z każdej próby wyodrębniono dwie równe objętościowo frakcje: piwa eisbock oraz lodu, które następnie poddano analizom zawartości ekstraktu rzeczywistego, goryczki oraz stężenia alkoholu etylowego. Celem badań była ocena zastosowanych technologii mrożenia oraz określenie zmian w składzie chemicznym i strat ponoszonych w wyniku zagęszczenia przez wymrażanie, podczas produkcji piwa lodowego typu eisbock. Stopień zagęszczenia piwa metodą szybkiego oddzielenia lodu od fazy ciekłej był niewielki, a straty oznaczanych składników piwa wyniosły blisko 50%. Dużą wydajność zagęszczenia składników ekstraktu, związków goryczkowych i alkoholu (bliska 150%) uzyskano przy pomocy wymrażania technologią sączenia fazy ciekłej z lodu.

## 7. Rodzaj surowca niesłodowanego a parametry fizyczne i chemiczne brzeczki

Edyta Kordialik-Bogacka, Adam Sapieżko, Politechnika Łódzka

Słód jęczmienny może być częściowo zastąpiony surowcami niesłodowanymi. Ich użycie stwarza możliwość obniżenia kosztów produkcji piwa, ale też uzyskania odmiennych właściwości smakowo – zapachowych piwa. Dzięki różnorodności fizykochemicznej zbóż, można wyprodukować wiele nowych wariacji stylów piwnych, o ciekawych właściwościach organoleptycznych. Zastosowanie surowców niesłodowanych, szczególnie w większych ilościach, niesie jednak ryzyko wystąpienia poważnych problemów technologicznych. Produkcja w skali laboratoryjnej brzeczki i piw z udziałem konkretnych surowców niesłodowanych i następnie ich ocena pozwala dokonać właściwego wyboru surowca i w konsekwencji uniknąć strat ekonomicznych.

W ramach pracy sprawdzono możliwość wykorzystania do produkcji piwa różnych surowców niesłodowanych, tj. orkiszu, pszenicy, płatków pszennych, owsa, płatków owsianych, żytnich, ryżowych, kukurydzianych, jęczmiennych, gryczanych oraz komosy ryżowej. Zakres pracy obejmował analizę brzeczki uzyskanych w wyniku zacierania mieszanek słodów i różnych surowców niesłodowanych w proporcji słód/surowiec niesłodowany wynoszącej 80/20 i 60/40. Brzeczki analizowano pod kątem: zawartości ekstraktu, pH, barwy, lepkości, czasu filtracji i zawartości wolnego azotu aminowego. Porównano również czas scukrzania skrobi w zacierach otrzymanych z udziałem różnych surowców.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że spośród badanych surowców niesłodowanych największą przydatność do produkcji brzeczki zarówno z 60 jak i 80% udziałem słoju wykazują płatki kukurydziane. Z kolei jakość brzeczki otrzymanych z dodatkiem płatków gryczanych jest najniższa.

## 8. Zastosowanie metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM) w modelowaniu optymalnej zawartości aldehydu octowego w procesie fermentacji piwa

Krzysztof Kucharczyk, Grupa Żywiec S.A.

Tadeusz Tuszyński, Krzysztof Żyła, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Optymalizacja jest bardzo ważnym postępowaniem w projektowaniu procesów technologicznych. Na podstawie modeli matematycznych, które opisują zmienności odpowiedzi układu w funkcji badanych czynników, można dobrać optymalne warunki prowadzonych procesów. Stosunkowo najbardziej rozpowszechnionymi procedurami optymalizacyjnymi są metody obliczeniowe z zakresu analizy matematycznej i statystyki m.in. metoda powierzchni odpowiedzi (ang. response surface methodology, RSM), którą zastosowano w projektowaniu parametrów technologicznych, które mają istotny wpływ na zawartość badanego komponentu piwa (Box-Behnken design). Metoda RSM jest pomocną procedurą w projektowaniu różnych procesów technologicznych.

Przedmiotem badań była optymalizacja zawartości aldehydu octowego w piwie dolnej fermentacji. W modelowaniu procesu badano wpływ różnej dawki drożdży (6 – 10 mln komórek w mL), zmiennego czasu napełniania tankofermentorów (4,5 – 13,5 godzin) i zróżnicowanej temperatury fermentacji (8,5 – 11,5°C) na zawartość aldehydu octowego.

Uzyskane rezultaty sugerują, że metoda RSM może być pomyślnie stosowana do przewidywania i kontrolowania ważnych parametrów fermentacji w celu optymalizacji składu biochemicznego i właściwości sensorycznych piwa

## 9. Determination of staling aldehydes in malt

Weronika Filipowska, Maciej Ditrych, Gert De Rouck, Barbara Jaskała-Goiris, Jessika De Clippeleer, KU Leuven

Beer off-flavours, in particular staling flavours, are associated with the presence of carbonyl compounds, which appear during beer aging. Malt, as a major raw material for beer production, provides aldehydes and their precursors. Both de novo formation of aldehydes and/or release of aldehydes from the so-called bound-state should be taken into account. To improve the quality of malt, it is necessary to determine critical events taking place during the malting process related to beer flavour instability. That creates the need for the development of a tool allowing to quantify flavour staling marker aldehydes in malt.

As a result of intricate (bio)chemical transformations, malt as an organic, non-homogenous and complex, solid structure with a rich aroma profile brings a challenge to the method optimisation. Due to the low concentration of staling aldehydes, a selective methodology needs to be applied in the form of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with on-fibre derivatisation of carbonyls, followed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) with the detection in negative chemical ionisation (NCI) mode.

The work presents HS-SPME-GC-MS method development and optimisation for malt marker aldehydes (2-methylbutanal, 2-methylpropanal, 3-methylbutanal, hexanal, methional, furfural, phenylacetaldehyde and trans-2-nonenal). Evaluated parameters and factors included: extraction (sample size, solvent type, temperature, pH, head-space volume), conditions of sample preparation (aerobic vs. anaerobic) and potential SPME drawbacks (fibre-to-fibre deviation, competitive absorption on fibre and high relative standard deviation). The method was validated and successfully applied on samples from industrial scale maltings. Incorporation of the methodology will allow to evaluate malting protocols and investigate key factors of malt production in relation to beer flavour instability.

## 10. Propagacja bakterii kwasu mlekowego na potrzeby browarnictwa - dobór parametrów procesu

Aneta Ciosek, Olga Szczepanik, Aleksander Poreda, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Bakterie kwasu mlekowego mogą być świadomie stosowane w przemyśle piwowarskim, jako kultury starterowe podczas słodowania, do produkcji piw kwaśnych lub spontanicznej fermentacji. W zależności od oczekiwań browaru do fermentacji stosuje się zarówno bakterie homo, jak i hetero-fermentacyjne. Te pierwsze wytwarzają tylko kwas mlekowy, podczas gdy te ostatnie wytwarzają również kwas octowy, etanol i dwutlenek węgla.

Dynamiczny rozwój polskiego rynku piwa w ostatnich latach zaowocował wieloma nowymi piwami. Podaż kultur bakterii kwasu mlekowego na rynku jest niższa niż popyt (w porównaniu z drożdżami), a głównymi dostawcami są firmy zagraniczne - więc koszty związane z zakupem bakterii są stosunkowo wysokie. Odpowiadając na potrzeby polskiego przemysłu piwowarskiego Krakowska Szkoła Piwowarska oferuje usługę rozmnażania i dostarczania czystych kultur bakteryjnych do zaszczepienia w brzeczce.

Celem pracy było określenie głównych parametrów procesu propagacji bakterii kwasu mlekowego: wybór odpowiedniego stężenia brzeczki i temperatury.

## 11. Kształtowanie zawartości wolnego azotu aminowego (FAN) na poszczególnych etapach produkcji piwa gryczanego

Aneta Pater, Marek Zdaniewicz, Monika Cioch, Robert Duliński, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Wolny azot aminowy (FAN) jest bardzo ważnym wskaźnikiem brzezki słodowej. W przypadku jego niedoboru, następuje znaczne pogorszenie fermentacji, do jej zatrzymania włącznie. Dzieje się tak ponieważ metabolizm drożdży wymaga dostarczania odpowiednich ilości azotu, którego głównym źródłem są aminokwasy oraz niewielkie peptydy wchodzące w skład FAN. Zazwyczaj podczas produkcji piwa z wysokojakościowego słołu jęczmiennego, dobrze rozluźnionego, wymagane minimum zostaje zapewnione. W przeciwnym razie należy rozważyć zastosowanie/przedłużenie przerwy białkowej z jednoczesnym kontrolowaniem późniejszej stabilności piany.

Celem pracy było określenie zawartości wolnego azotu aminowego (FAN) na poszczególnych etapach produkcji piwa gryczanego. Jako najważniejszy surowiec do produkcji brzezki posłużył sład gryczany, pozyskany ze sklepu zaopatrującego entuzjastów złocistego trunku. Ponadto mając na uwadze niewielką aktywność enzymatyczną słołu gryczanego, przeprowadzono ocenę porównawczą zawartości omawianego wyróżnika z uwzględnieniem stosowania preparatów enzymatycznych. Okazały się one niezbędne do zwiększenia zawartości FAN, gdyż brzezki pozbawione ich aktywności miały wartości FAN istotnie niższe. Ponadto monitorując zmiany wartości wskaźnika na poszczególnych etapach warzenia oraz w brzezce nastawnej, zalecanym wydaje się być zastosowanie dodatkowej suplementacji omawianych brzeczek.

## 12. Zawartość wybranych amin biogennych w piwach kwaśnych

Weronika Piechowicz, Paweł Satora, Aneta Ciosek, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Obecnie tendencje monitoringu żywności, oparte są na wykrywaniu substancji, których obecność nawet w śladowych ilościach może wpływać niekorzystnie na zdrowie konsumenta. Przykładem mogą być tu aminy biogenne. Jako składniki naturalne surowców roślinnych i zwierzęcych, występują w niskich stężeniach, nie powodując przy tym zagrożeń dla zdrowia człowieka jednak w przypadku dużej koncentracji w produkcie stają się niebezpieczeństwem. Większe ilości amin biogennych mogą wystąpić w żywności poddanej fermentacji z udziałem bakterii mlekowych. Fakt ten jak i aktualne trendy na rynku piwnym spowodowały zainteresowanie stężeniem amin biogennych w piwach kwaśnych. W procesie ich ważenie stosowane są mikroorganizmy będące potencjalnymi producentami tych substancji.

Celem pracy było sprawdzenie zawartości wybranych amin biogennych w piwach kwaśnych. Jako próby do badań wykorzystano komercyjne piwo kwaśne jak i wyprodukowane w uczelnianym browarze. Poddano analizie różne warianty analizowanych próbek. Zbadano wpływ temperatury fermentacji oraz stopnia chmielenia na końcową zawartość amin biogennych. Wyniki analizy mogą ukazywać potencjalne zagrożenie związane z obecnością szkodliwych substancji w osiagającym co raz większą popularność piwie kwaśnym.

## 13. Evolution of staling aldehydes during the brewing process

Maciej Ditrych, Weronika Filipowska, Gert De Rouck, Barbara Jaskula-Goiris, Luc De Cooman, KU Leuven

Flavour characteristics are of paramount importance for evaluation of beer quality. Many of the off-flavours are related to the presence of the so-called staling aldehydes. However, the formation mechanisms of these compounds are yet not fully understood. With regard to beer, aldehydes may arise from e.g. fatty acid oxidation, Maillard reactions or from Strecker degradation of amino acids. Aldehydes might also be released from non-volatile precursor forms, the so-called "bound-state aldehydes". Therefore, aiming at unravelling the puzzle of chemistry lying behind aldehyde formation and/or release, we have monitored the entire brewing process with regard to these compounds. Wort was produced in our 5 hl pilot brewing plant in oxygen limited conditions. The samples were collected at onset of mashing, end of mashing, mash filtration - first wort collection, mash filtration - sparging, onset of boiling, end of boiling, end of clarification and end of cooling (before wort aeration). The concentrations of 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, hexanal, furfural, phenylacetaldehyde and E-2-nonanal were determined by HS-SPME-GC-MS. The content of all the aldehydes decreased remarkably over the entire brewing process, with the exception of furfural, which increased over the boiling and hot trub separation. Relatively higher extraction of aldehydes was also observed during late sparging. The highest reduction in aldehydes (except for furfural) was observed during the boiling step. This study indicates that a considerable amount of aldehydes originates from the raw material – malt – of which most (excluding furfural) can be reduced strongly over the brewing process.

## 14. Przegroda w kadzi wirowej umożliwiła skrócenie czasu separacji i uzyskanie stożka osadu o mniejszej średnicy

Monika Sterczyńska, Marek Jakubowski, Marta Stachnik, Joanna Piepiórka-Stepuk, Politechnika Koszalińska  
Aleksander Poreda, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

W pracy zaproponowano modyfikację konstrukcji kadzi wirowej polegającą na umieszczeniu w jej wnętrzu przegrody. Celem zmiany było skrócenie czasu utworzenia stożka osadów gorących i zmniejszenie średnicy stożka. Osiągnięcie założonego celu ma dwie zalety: krótszy czas przebywania brzezki w kadzi wirowej, to mniejsze stężenie DMS-u, a bardziej kompaktowy stożek pozwala na zmniejszenie strat brzezki. Zaproponowano wykorzystanie techniki PIV do obserwacji przepływu w kadzi wirowej. Dzięki zastosowanej technice można było zweryfikować, w jaki sposób zmiany w konstrukcji kadzi wpływają na przepływ brzezki i proces tworzenia się stożka. Oceniono wpływ modyfikacji konstrukcyjnej kadzi na prędkość ruchu osadów.

Wyniki PIV pozwoliły nam obserwować zmiany obszarów, w których obecne są wartości maksymalnych prędkości. Obszary o wyższej prędkości zaobserwowano (w pobliżu wlotu zbiornika), oraz za przegrodą zamontowaną w zbiorniku. Na podstawie analizy pól wektorów prędkości wybrano najlepszą opcję przegrody (kształt i położenie względem wlotu brzezki). Zaproponowaną modyfikację konstrukcji kadzi wirowej zweryfikowano podczas warzenia brzezki w skali 1 hl. Modyfikacja konstrukcji kadzi przez wstawienie przegrody pomaga skrócić czas separacji i poprawia wydajność wirów poprzez zmniejszenie średnicy stożka. Wyniki potwierdziły, że stożek osadu gorącego miał mniejszą średnicę niż stożek uzyskany w tej samej kadzi wirowej ale bez zainstalowanej przegrody. Metoda PIV jest przydatnym narzędziem do oceny zmian w projektowaniu wirów, umożliwiając obserwację przepływu cieczy wewnątrz naczynia.