

DOI: 10.18832/kp2016032

## Analýza stoletého piva – Chemický, senzorický a genetický profil 100 let starého piva

### *Analysis of Century Old Beer – Chemical, Sensorial and Genetic Profile of 100-Year-Old Beer*

Jana OLŠOVSKÁ<sup>1</sup>, Dagmar MATOULKOVÁ<sup>1</sup>, Jürgen FELSBERG<sup>2</sup>, Markéta JELÍNKOVÁ<sup>2</sup>, Martin DUŠEK<sup>1</sup>, Pavel ČEJKA<sup>1</sup>, Karel ŠTĚRBA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, CZ – 120 44 Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Videňská 1038, 142 20 Praha 4 / Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., CZ – 142 20 Prague, Videňská 1038, Czech Republic

e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Olšovská, J., Matoulková, D., Felsberg, J., Jelínková, M., Dušek, M., Čejka, P., Štěrba, K., 2016: Analýza stoletého piva – Chemický, senzorický a genetický profil 100 let starého piva. Kvasný Prum. 62, č. 11–12, s. 326–334

V roce 2015 byly během rekonstrukce pivovaru firmy Raven Trading, s.r.o. v Záhlinicích nalezeny tři lahve piva. Díky dobrým skladovacím podmínkám bylo možno provést analýzu piva a dozvědět se něco o jeho původním složení. Bylo zjištěno, že všechny tři vzorky jsou s nejvyšší pravděpodobností piva typu ležák. První pivo (světlé, extrakt původní mladiny EPM 10,3 %) mělo výrazné šimé a fekální aroma. Druhé pivo (tmavé, EPM 7,6 %) bylo velmi kyselé a velice připomínalo lambik. Analýza DNA prokázala přítomnost spodních pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* a kontaminanty *Dekkera bruxellensis*. Třetí pivo (světlé, EPM 10,4 %) obsahovalo malé bublinky CO<sub>2</sub> a zbytkovou hořkost. V důsledku zachování podmínek pro přirozené stárnutí byly v tomto pivu nalezeny extrémně vysoké koncentrace 2-furfuralu a transformační produkty iso-alfa hořkých kyselin. Z vysokých koncentrací myristové kyseliny a nízkých koncentrací křemíku lze u všech tří piv usuzovat na poměrně vysoký stupeň surogace. Ve všech pivech byla nalezena DNA kontaminujících mikroorganismů.

Olšovská, J., Matoulková, D., Felsberg, J., Jelínková, M., Dušek, M., Čejka, P., Štěrba, K., 2016: Analysis of Century old Beer – Chemical, sensorial and genetic profile of 100-Year-Old Beer. Kvasný Prum. 62, No. 11–12, pp. 326–334

Three bottles of different beers were found in 2015 during a reconstruction of the brewery of the Raven Trading s.r.o. company in Záhlinice, Czech Republic. Good storage conditions enabled analysis of their original characteristics. All three bottles contained most probably lager type beer. First beer (bright, original extract 10.3%) had sulfuric and fecal off-flavors. The second beer (dark, original extract 7.6 %) was very acidic, resembling Lambic beer. DNA analysis proved the presence of lager yeast *Saccharomyces pastorianus* and contaminant *Dekkera bruxellensis*. The third beer (light brown, original extract 10.4%) contained small CO<sub>2</sub> bubbles and was slightly bitter. As a consequence of natural aging process the extremely high concentration of 2-furfural was found. The relatively high degree of adjuncts addition could be assumed based on high concentration of myristic acid and simultaneously low concentration of silica. DNA of contaminating microorganisms in all samples was proved.

Olšovská, J., Matoulková, D., Felsberg, J., Jelínková, M., Dušek, M., Čejka, P., Štěrba, K., 2016: Analyse des hundertjährigen Bieres – Das chemische, sensorische und genetische Profil des hundertjährigen Bieres. Kvasný Prum. 62, Nr. 11–12, S. 326–334

Im Jahre 2015 wurden während der Rekonstruktion der Firmenbrauerei Raven Trading s. r. o (GmbH) in Záhlinice mit Bier drei gefüllten Flaschen gefunden. Dank der guten Lagerbedingungen war es möglich die Analyse des Bieres durchzuführen und seine ursprüngliche Zusammensetzung festzustellen. Es wurde ermittelt, dass mit der höchsten Wahrscheinlichkeit alle drei gefundenen Muster Typ des Lagerbieres wären. Das erste Bier (helles Bier, EPM = Extrakt der ursprünglichen Würze 10,3%) wies ein ausdrucksvolles und fäkalas Aroma aus. Das zweite Bier (dunkles Bier, EPM 7,6%) war sehr sauer und sehr erinnert an Lambic Bier. Die DNA Analyse hat die Anwesenheit der Untergärungshefe *Saccharomyces pastorianus* und Kontaminanten *Dekkera bruxellensis* nachgewiesen. Das dritte Bier (helles, EPM 10,4%) hat eine kleine CO<sub>2</sub> Blasen und Restbitternis enthält. Durch Beibehalten von Bedingungen für natürliche Alterung des Bieres wurden eine extrem hohe Konzentration an 2-Furfural und Transformationsprodukte von Iso-alpha Bittersäuren gefunden. Aus der hohen Konzentration an Myristinsäure und den niedrigen Silizium Konzentration konnte man bei allen drei Bieren über eine verhältnismäßig hohe Surrogation erwähnen. In allen Mustern wurde die DNA von kontaminierenden Mikroorganismen gefunden.

**Klíčová slova:** sto let staré pivo, stárnutí piva, senzorická analýza, karbonylové sloučeniny, karbohydráty, těkavé sloučeniny, mastné kyseliny, minerální látky, degradace hořkých látek, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pastorianus*

**Keywords:** century-old beer, beer aging, sensory analysis, carbonyl compounds, carbohydrates, volatile compounds, fatty acids, minerals, degradation of bitter compounds, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pastorianus*

## ✉ 1 ÚVOD

V roce 2015 byly během rekonstrukce pivovaru firmy Raven Trading, s.r.o., v Záhlinicích nalezeny tři neporušené lahve piva. Pivo pravděpodobně pochází z doby před či těsně po 1. světové válce a bylo asi omylem zapomenuto v průduchu ležáckého sklepa (obr. 1). Pivo bylo uchováno ve velice dobrých podmínkách, takže bylo možné provést analýzu chemických parametrů a z nich vyvodit původní parametry piva.

## ✉ 1 INTRODUCTION

Three bottles of different beers were found in 2015 during a reconstruction of the brewery of the Raven Trading s.r.o. company in Záhlinice, Czech Republic. The beer probably originated from the period before the World War I and it was, perhaps accidentally, immured in the lager cellar of the brewery (Fig. 1). The beer was preserved in such a way that it was possible to perform analysis of chemical parameters and deduce original characteristics of the beer.





Obr. 1 Fotografie stoletého piva z místa nálezu ve sklepě pivovaru v Záhlincích / Fig. 1 Photo of century-old beers in the place of its finding in cellar of Záhlínice brewery

Nález piva umožnil zkoumat tradiční produkt našich předků a ověřit si a hlouběji prostudovat chemické procesy probíhající během stárnutí piva. Nedávno byly zveřejněny dvě publikace s podobnou tematikou. Londesborough et al. (2016) popsali analýzu piva z potopeného vraku lodi z roku 1840. Na dně oceánu byly kromě vína nalezeny dvě lahve piva staré 170 let. Z analýzy chmelových látek a jejich degradačních produktů autoři usoudili, že se jednalo o dva rozdílné typy piva. Autoři Walther et al. (2015) analyzovali složení ležáků z let 1880, 1890 a 1900, nejvíce se zaměřili na obsah a profil sacharidů. V některých lahvích byly pomocí rDNA sekvence nalezeny pouze dormantní buňky *S. carlsbergensis* a *Sporobolomyces roseus* (pivo kvasící kvasinky). Z výsledků autoři vyvodili postupně zlepšující se trend manipulace při lahvování piva v průběhu sledovaného období 1880 až 1900.

Sekvence DNA je považována za jednu z nejvíce spolehlivých metod identifikace mikroorganismů. Sekvenován není celý genom, ale jen jeho určité geny nebo oblasti. U eukaryot je tou oblastí nejčastěji ITS region (vnitřní prepisovaný mezemík), což je variabilní část DNA mezi konzervovanými sekvencemi kódujícími 18S, 5.8S a 28S rRNA. Porovnávání sekvencí ITS oblastí je hojně využíváno v taxonomii nebo při studiu molekulární fylogeneze, neboť postačuje i malé množství výchozí DNA a metoda umožňuje vzájemně odlišit příbuzné druhy (White et al., 1990). Pro amplifikaci různých oblastí DNA byla navržena řada primerů. V naší studii jsme použili dva páry primerů (ITS1 + ITS4 a NS7 + ITS4), které jsou při identifikaci kvasinek využívány standardně. Produkty polymerasové řetězové reakce (PCR) byly následně sekvenovány a porovnávány se známými sekvencemi DNA, které jsou shromážděny v GenBank Národního centra pro biotechnologické informace (v Národní lékařské knihovně v USA).

Hlavním záměrem této práce bylo provést detailní mikrobiologickou a genetickou analýzu sto let starého piva a srovnat její výsledky se senzorickými a chemickými daty podrobně popsanými v paralelní chemické studii (Olšovská et al., 2016). V rámci studie byl proveden maximálně možný počet analýz, který byl limitován objemem historického vzorku.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Vzorky piva

Pivo bylo nalezeno ve tmavých lahvích s korkovým uzávěrem, který byl na povrchu částečně poškozený, ale uzávěry dobře těsnily. Lahve byly pro další práci označeny jako vzorky A, B a C. Lahve s označením A a B měly vytlačené označení „Pivovar Záhlínice“

Discovery of the three old beers gave us the possibility to explore a traditional product of our ancestors and verify and deepen the current knowledge about the chemical processes during beer aging. Recently, two articles regarding similar topics were published. Londesborough et al. described chemical parameters of beers from a 1840s shipwreck. Besides some wine bottles, two 170-year-old bottles of beer were found on the bottom of the ocean. Analysis of hop components and their degradation products proved that each bottle contained a different type of beer (Londesborough et al., 2016). Walther et al. (2015) analyzed the composition of original lager beer samples from the 1880s, 1890s and 1900s with emphasis on the carbohydrate content and composition. Only dormant cells of *S. carlsbergensis* yeast and *Sporobolomyces roseus* (a beer spoilage yeast) were detected in some bottles using rDNA sequencing. The gradual improvement of bottled beer handling from 1880s to the 1900s was proved.

DNA sequencing is considered as one of the most reliable technique for identification of microorganisms. Not the whole genome is sequenced, but only the special genes or regions. For identification of eukaryotes the ITS region (internal transcribed spacer) is nowadays the most widely used sequenced DNA region. ITS region refers to the variable spacer DNA situated between the conserved sequences encoding for 18S, 5.8S and 28S rRNA. Comparison of sequences of ITS region is widely used in taxonomy and molecular phylogeny because only even a small amount of DNA is needed and has a high level of variation between closely related species (White et al., 1990). Several primers have been designed for amplifying various segments of DNA. In this study two pairs of primers (ITS1 + ITS4 and NS7 + ITS4) were used as a very standard for yeast identification. The resulting products of polymerase chain reaction (PCR) were then sequenced and compared to the known sequences of DNA that are collected in GenBank of National Center for Biotechnology Information (NCBI) in United States National Library of Medicine.

The aim of the article was to provide a detailed microbiological and genetic study of the century-old beers and compare it with sensorial a chemical data published simultaneously in a parallel chemical study (Olšovská et al., 2016). The maximum possible number of analyses was performed with respect to the limited volume of the samples.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Beer samples

The old beers were found in dark glass bottles covered with cork, somewhat dilapidated but well-sealed, and they were marked A, B, and C. The glasses of beers A and B bore the inscription “Záhlínice Brewery”, the bottle of beer C was marked “Holešov Brewery” (the two places are about 10 km apart, see Fig. 2). Based on the place of beer finding, we assume that the bottles were stored in the dark at a quite stable temperature around 10 °C. Based on the history of the Záhlínice brewery, the age of the beer has been estimated at about 100 years. Beer D is standard Czech lager, which was used for the comparison of results of chemical analysis.

### 2.2 Beer analysis

#### Sensory analysis

Because of the small volume of the beer samples, sensory analysis was carried out by only 5 members of our sensory panel. A descriptive analysis of flavor and taste was performed immediately after opening of the bottles.

#### Chemical analysis

Chemical analyses such as determination of **original extract** (EBC 9.4), **alcohol** (EBC 9.2.6), **total acidity** (ASBC Beer 8), **pH** (EBC 9.35), **color** (EBC 9.6), content of **bitter substances** (EBC 9.8), **total nitrogen** (EBC 9.9.1), **FAN** (EBC 9.10), and **volatile compounds** (EBC 9.39) were performed according to EBC methods.

**Metals** were analyzed using AAS using the following EBC methods: Cu (EBC 9.14.3), Fe (EBC 9.13.3), Zn (EBC 9.20), Mn (similar as Zn at 279.5 nm), Si was determined in acetylene–nitrous oxide flame at 309.3, 357.9, 251.6, 235.5 nm, respectively.

The profiles of residual  **$\alpha$ -acids**, **iso- $\alpha$ -acids** and their **cis/trans isomers** were determined using HPLC-UV method (Olšovská et al., 2016). The profiles of **transformation products of alpha acids** were determined using liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HPLC-HR/AM-MS) (Olšovská et al., 2016).





Obr. 2 Současná fotografie Záhlinického pivovaru (vpravo) a sladovny (vlevo) (foto: Milan Starec, 2016) / Fig. 2 Current photo of Záhlinice brewery (right) and malt-house (left) (photo: Milan Starec, 2016)

a láhev C byla originálně označena nápisem „Pivovar Holešov“ (Holešov se nachází 10 km od Záhlinic (obr. 2). Vzhledem k místu nálezu lze předpokládat, že pivo bylo po celou dobu uloženo v temnu a při konstantní teplotě kolem 10 °C po dobu nejméně 100 let. Pro potřeby srovnání parametrů bylo použito referenční pivo D, čerstvé pivo typu český ležák.

## 2.2 Analýzy piva

### Senzorická analýza

Vzhledem k limitnímu objemu historických vzorků (0,5 l) byla bezprostředně po otevření lahví provedena senzorická deskriptivní analýza z minimálního objemu pěti členů senzorického panelu VÚPS.

### Chemická analýza

Chemická analýza vzorků byla provedena podle konvenčních metod: **extrakt původní mladiny** (EBC 9.4), **alkohol** (EBC 9.2.6), **titrační kyselost** (ASBC Beer 8), **pH** (EBC 9.35), **barva** (EBC 9.6), **hořkost** (EBC 9.8), **celkový dusík** (EBC 9.9.1), **FAN** (EBC 9.10) a **těkavé látky** (EBC 9.39).

**Minerály a těžké kovy** byly analyzovány metodou AAS pomocí příslušných EBC metod: Cu (EBC 9.14.3), Fe (EBC 9.13.3), Zn (EBC 9.20), Mn (podobně jako Zn při 279,5 nm), Si byl stanoven v plameni acetylen-oxid dusný při 309,3; 357,9; 251,6 a 235,5 nm.

Profil zbytkových  **$\alpha$ -hořkých kyselin**, **iso- $\alpha$ -hořkých kyselin** a jejich **cis/trans isomerů** byly stanoveny metodou HPLC-UV (Olšovská et al., 2016). Profily **transformačních produktů iso- $\alpha$ -hořkých kyselin** byly stanoveny metodou HPLC s vysokorozlišovací hmotnostní detekcí (HPLC-HR/AM-MS) (Olšovská et al., 2016).

**Sacharidy** byly stanoveny metodou HPLC-RI na chromatografické koloně s iontovou výměnou v Ag<sup>+</sup> cyklu Rezex RSO-Oligosaccharide (200 x 10 mm, Phenomenex, USA) s mobilní fází tvořenou pouze deionizovanou vodou (Jurková et al., 2014).

**Massné kyseliny** byly stanoveny metodou GC-FID; chromatografická separace kyselin s krátkým i dlouhým řetězcem byla provedena na koloně DB-WAX 20 m x 0,18 mm x 0,18  $\mu$ m (Horák et al., 2013).

**Karbonylové sloučeniny** byly stanoveny metodou GS-MS a separovány na polární chromatografické koloně TR-WAX MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m) (Čejka et al., 2013).

### Mikrobiologická/genetická analýza

#### Izolace DNA, PCR a sekvenace

Izolace a purifikace chromosomální DNA, polymerasová řetězová reakce (PCR) a sekvenace je popsána v paralelní práci Olšovské et al. (2016). ITS oblasti DNA kvasinek byly amplifikovány s použitím primerů ITS1 + ITS4 a NS7 + ITS4, pro analýzu bakteriální 16S rDNA byly použity primery 0028F + 1521R (tab. 1).

**Carbohydrates** were determined using HPLC-RI on Rezex RSO-Oligosaccharide ion exchange column in Ag<sup>+</sup> mode, (200 x 10 mm, Phenomenex, U.S.A.) with deionized water as mobile (Jurková et al., 2014).

**Fatty acids** were determined using GC-FID; chromatographic separation of both short- and long-chain fatty acids were carried out on the column DB-WAX 20 m x 0.18 mm x 0.18  $\mu$ m (Horák et al., 2014).

**Carbonyl compounds** were determined using GS-MS analysis on the the polar column TR-WAX MS, (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness according to previously published method (Čejka et al., 2013).

### Microbiology/genetic analysis

#### Isolation of genomic DNA, PCR and sequencing

Isolation and purification of chromosomal DNA, PCR and sequencing was performed according to Olšovská et al. (2016). The ITS regions of yeast were amplified using primer sets ITS1 + ITS4 and NS7 + ITS4. The primer set 0028F + 1521R was used for the amplification of bacterial 16S rDNA. Primer sequences are given in Table 1.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

The opening of the original bottles was immediately followed by the basic sensory analysis. Subsequently, the chemical and genetic analyses were performed. Because of performing DNA isolation directly from the beer sediment, PCR reamplification was needed. As target regions for reamplification, internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2, and 16S rRNA (or 16S rDNA), were used for identification of yeast and bacteria, respectively. The PCR products were controlled by electrophoresis and sequenced. Amplified DNA fragments of adjacent segments of the ITS regions from total DNA isolated from beer samples is shown in Fig. 3. When using the ITS1 + ITS4 primers, more PCR products are often generated because of the high variability of the target region. Products of the PCR reaction with primers NS7 + ITS4 are longer (~ 1000 bp) since the NS7 primer overlaps to the genes encoding for small ribosomal subunit (White et al., 1990).

The sequences of PCR products were then compared with the known sequences in GenBank using the BLAST algorithm (Altschul et al., 1990). The results of DNA analysis are demonstrated in Table 2. The presence of *Saccharomyces* yeast in all three beer samples was expected, since the filtration of beer and thus their separation from the finished product was not perfect at that time. However,



Tab. 1 Sekvence primerů / Table 1 Primer sequences

| Primer set | Primer | Sekvence 5' ⇌ 3' / Sequence 5' ⇌ 3' | Odkaz / Citation     |
|------------|--------|-------------------------------------|----------------------|
| Ia         | ITS1   | TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G           | White et al., 1990   |
|            | ITS4   | TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC          |                      |
| Ib         | NS7    | GAG-GCA-ATA-ACA-GGT-CTG-TGA-TGC     |                      |
|            | ITS4   | TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC          |                      |
| II         | 0028F  | AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG          | Edwards et al., 1989 |
|            | 1521R  | AAG-GAG-GTG-ATC-CA(AG)-CCG-CA       |                      |

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Po otevření lahví bylo provedeno základní senzorické hodnocení pív. Následně byly realizovány chemické a genetické analýzy. Po izolaci DNA, která byla provedena přímo ze sedimentů, následovala PCR reamplifikace – oblastí ITS1 a ITS2 pro identifikaci kvasinek a 16S rDNA (resp. 16SrDNA) pro detekci bakterií. Produkty PCR reakce byly zkontrolovány elektroforeticky (obr. 3) a posléze sekvenovány. Při použití primerů ITS1 + ITS4 často vzniká více PCR produktů, cílová oblast DNA je totiž více variabilní (obr. 3, dráha 2). Produkty PCR reakce s primery NS7 + ITS4 jsou delší (~ 1000 bp), protože primer NS7 přesahuje do genů kódujících malou ribosomální podjednotku (White et al., 1990).

Sekvence produktů PCR byly následně porovnávány se známými sekvencemi v BenBank s použitím algoritmu BLAST (Altschul et al., 1990). Výsledky analýzy DNA jsou uvedeny v tab. 2. Ve všech vzorcích jsme předpokládali přítomnost DNA kvasinek *Saccharomyces*, neboť filtrace piva a tedy i separace kvasnic z hotového výrobku nebyly v době jeho produkce dokonalé. Nicméně, vzhledem k dlouhé době skladování vzorků můžeme předpokládat vysoký stupeň poškození DNA, a tedy i na výsledky je nutné se dívat jako na nekompletní.

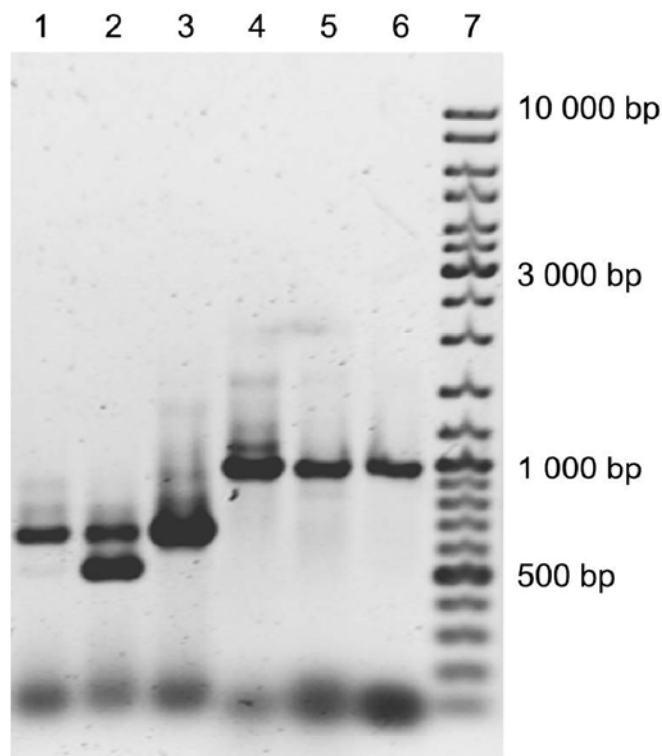
because of the long-time storage of the beer we can assume that the DNA was to a great extent degraded, so the results should be considered as incomplete.

We can assume that pure cultures of yeast were used at the time of production of the three beers. The technique for isolation and maintenance of pure yeast cultures was developed in 1880s by the Danish botanist and microbiologist Emil Christian Hansen (Rainieri et al., 2003). The Záhlinice brewery was founded in 1895 and closed in 1921. Because of the engineering works that were probably performed at the time of “enclosing” the beer bottles in the lager cellar (Starec, 2016), their age was estimated to be about a “century”. From that we can assume that pure cultures of yeast were used for the production of the beers. Basařová and Hlaváček (1998) stated that pure cultures of brewer's yeast were introduced into the Czech breweries at the end of 19th century and the cultures were also maintained in the Yeast Collection of the Research Institute of Brewing and Malting in Prague.

The presence of DNA of bacteria (e.g. *Streptomyces* and *Bacillus* usually occurring in soil) and soil fungi (e.g. *Coniochaeta*, *Lecythophora*, *Hypocreales*) in beers A and C was probably caused by the cork-cup leakage during the storage of beer sample that aided the contamination.

Tab. 2 Výsledky analýzy DNA / Table 2 Results of DNA analysis

| Vzorek / Sample | NCBI Blast*  |
|-----------------|--|
| Pivo A / Beer A | <i>Coniochaeta</i>   |
|                 | <i>Lecythophora</i> sp.  |
|                 | <i>Dikarya</i>   |
|                 | <i>Hypocreales</i> sp.   |
|                 | <i>Staphylococcus hominis</i>  |
|                 | <i>Streptomyces paucisporeus</i>   |
| Pivo B / Beer B | <i>Saccharomyces bayanus</i> / <i>S. pastorianus</i>   |
|                 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces eubayanus</i> x <i>Saccharomyces uvarum</i> |
|                 | <i>Saccharomyces pastorianus</i>   |
|                 | <i>Saccharomyces uvarum</i>  |
|                 | <i>Dekkera bruxellensis</i>  |
|                 | <i>Dikarya</i>   |
| Pivo C / Beer C | <i>Ascomycota</i>  |
|                 | <i>Debaryomyces hansenii</i>   |
|                 | <i>Coniochaeta</i>   |
|                 | <i>Dikarya</i>   |
|                 | <i>Acremonium</i> sp.  |
|                 | <i>Simplicillium</i> sp.   |
|                 | <i>Bacillus simplex</i>  |
|                 | <i>Streptomyces</i> sp.  |



Obr. 3 Amplifikace DNA kódující ITS oblast rDNA; Dráhy 1, 4, pivo A; dráhy 2, 5, pivo B; dráhy 3, 6, pivo C; dráhy 1-3, amplifikace s primery ITS1 + ITS4; dráhy 4-6, amplifikace s primery NS7 + ITS4; 7, velikostní standard (GeneRuler DNA Ladder) / Fig. 3. Amplification of DNA regions encoding the ITS spacer of rDNA. Lanes 1, 4, beer A; lanes 2, 5, beer B; lanes 3, 6, beer C; lanes 1-3, amplification with primers ITS1 + ITS4; lanes 4-6, amplification with primers NS7 + ITS4; 7, size standard (GeneRuler DNA Ladder)

\* NCBI – Národní centrum pro biotechnologické informace, BLAST je algoritmus používaný v bioinformatice za účelem srovnávání primárních sekvenčních informací; sekvence DNA z NCBI jsou uvedeny v publikaci Olšovské et al., 2016 / NCBI - National Center for Biotechnology Information, BLAST - Basic Local Alignment Search Tool; DNA sequences from NCBI are given in more detail including the DNA homology described in the publication by Olšovská et al., 2016.

V době výroby analyzovaných piv byly již pravděpodobně použity čisté kultury pivovarských kvasinek. Technika izolace a udržování čistých kultur byla zavedena v 80. letech 19. století dánským botanikem a mikrobiologem Emilem Christianem Hansenem (Rainieri et al., 2003). Záhlavnický pivovar byl založen v roce 1895 a uzavřen v roce 1921. Vzhledem k tomu, že k „uschování“ lahví v ležáckém sklepě došlo v souvislosti se stavebními pracemi (Starec, 2016), můžeme jejich stáří odhadnout na přibližně 100 let. Z toho usuzujeme, že analyzovaná piva již byla vyrobena s použitím čistých kulturních kvasinek. Podle Basařové a Hlaváčka (1998) byly čisté kultury pivovarských kvasinek zaváděny do českých pivovarů koncem 19. století a zároveň byly deponovány ve Sbírce kvasinek na Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze.

Přítomnost DNA bakterií (např. běžných půdních bakterií *Streptomyces* a *Bacillus*) a půdních hub (např. *Coniochaeta*, *Lecythophora*, *Hypocreales*) v pivech A a C je zřejmě výsledkem netěsnosti korkových uzávěrů, které nezabránilly kontaminaci piva během jeho skladování.

### 3.1 Pivo A

Pivo A mělo nejhorší senzorické hodnocení, bylo světlé, zakalené a obsahovalo silné sírové a fekální aroma.

Nejzajímavější chemické parametry, které velice dobře korespondují se senzorickou analýzou a výsledky mikrobiologické a genetické analýzy, jsou uvedeny v tab. 3 (všechny chemické výsledky jsou uvedeny v paralelní chemické studii, Olšovská et al., 2016). Extrakt původní mladiny ve vzorku A byl 10,30 %. Pravděpodobně z důvodu sekundární fermentace a mikrobiologické kontaminace vzorku obsahoval vzorek A vysoký obsah alkoholu (5,45 % v/v) a velmi malý skutečný extrakt (1,87 %). Ve srovnání s průměrnou hodnotou současného českého ležáku, nízká hodnota pH piva A (3,89) a zvýšená hodnota titrační kyselosti (5,08 ml NaOH/100 ml) je pravděpodobně způsobena mikrobiální kontaminací tohoto piva. Také zvýšené koncentrace DMS (66 µg/l), ethylacetátu (70,4 mg/l), ethyllaktátu (0,64 mg/l) a furfurylalkoholu (0,32 mg/l) indikují sekundární nespecifické kvašení.

DNA kvasinek *Saccharomyces* nebyla detekována, což je s největší pravděpodobností způsobeno poškozením DNA. Identifikována byla DNA bakterií rodů *Staphylococcus* a *Streptomyces*. Mikroskopie ukázala přítomnost mrtvých kvasinkových buněk (obr. 4).

### 3.2 Pivo B

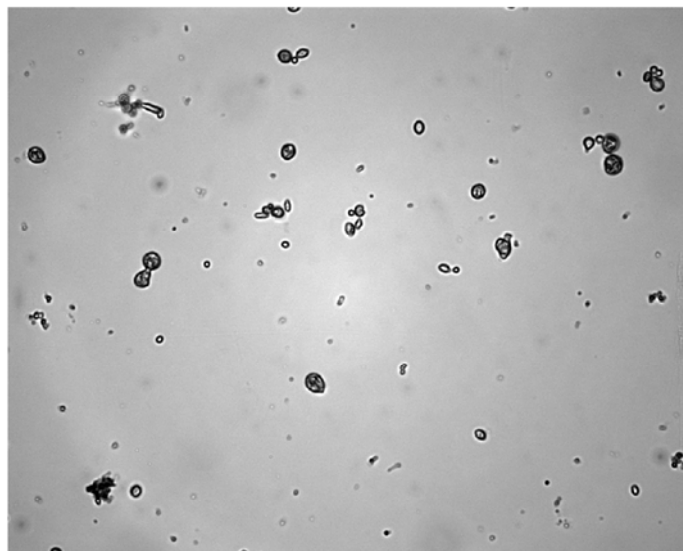
Pivo B svou chutí i vůní velice připomínalo lambik, bylo tmavé, velmi kyselé, s příjemnými tóny madeiry a ovocného aroma.

Také chemický profil piva B blízce koreloval s výsledky senzorické a genetické analýzy. V pivu B byla detekována extrémně nízká koncentrace volných aminokyselin FAN (12,00 mg/l) a extrémně vysoká hodnota titrační kyselosti (12 ml 1M NaOH/100 ml). To odpovídá senzorickému hodnocení silné kyselosti a detekované vysoké koncentraci kyseliny octové (9000 mg/l), která se následně projevila ve vysoké koncentraci jejího esteru, ethylacetátu (624 mg/l). V důsledku sekundární fermentace mikroorganismem *Dekkera bruxellensis* došlo k velice zajímavému efektu, a to obrácenému poměru obsahu esterů a alkoholů (0,15) ve srovnání s čerstvým referenčním pivem (5,72). Za zmínku stojí také dvojnásobná koncentrace celkových nasycených mastných kyselin s krátkým řetězcem (12,6 mg/l) ve srovnání s referenčním pivem D.

Zajímavým výsledkem je minimální koncentrace 2-furfuralu (78 µg/l) v pivu B. Zatímco v pivech A a C byly zjištěny deseti a stonásobné koncentrace této sloučeniny oproti čerstvému pivu, pivo B se během stoletého stárnutí za stejných podmínek chovalo zcela jinak. 2-furfural patří do skupiny heterocyklických sloučenin, které vznikají během stárnutí piva z aminokyselin či peptidů a redukcí cukrů (Vanderhaegen et al., 2006). Tyto látky jsou v odborné literatuře nazývány jako „indikátory stárnutí“ a lze pomocí jejich profilu zpětně zjistit závažové podmínky, při kterých došlo k senzorickému poškození piva během procesu stárnutí (Čejka et al., 2013). Ve vzorku B nebyly pravděpodobně vlivem přítomnosti *Dekkera bruxellensis* vhodné podmínky pro průběh Maillardovy reakce; aminokyseliny a sacharidy byly fermentovány mikroorganismem dříve, než stačilo dojít k tvorbě 2-furfuralu v míře odpovídající stáří piva.

V pivu B byly dále zjištěny asi čtyřikrát vyšší koncentrace kyselin isomáselné, máselné a isovalerové (2,21, 1,15, a 4,36 mg/l), ve srovnání s referenčním pivem D. I tento výsledek je s největší pravděpodobností výsledkem kontaminace *Dekkera bruxellensis*; tento mikroorganismus metabolizuje leucin a valin v pivu na kyseliny isovalerovou a isomáselnou (Oelofse et al., 2008).

V pivech B a C byla zjištěna minimální koncentrace celkových polyfenolů (5,0 a 21,00 mg/l) ve srovnání se stejně starým pi-



Obr. 4 Mikroskopie sedimentu piva A / Fig. 4 Microscopic sediment analysis of beer A

### 3.1 Beer A

Beer A was sensorially the least acceptable. It was light, hazy with very intensive sulphuric and fecal off-flavor.

The most interesting chemical parameters, which very well correspond with sensorial and microbiological quality of the sample, are summarized in Table 3 (the complete results have been presented in a parallel chemical study Olšovská et al., 2016). The original extract of beer A was 10.30%; probably because of a secondary fermentation or contamination, higher content of alcohol (5.45 % v/v) and very low real extract (1.87) were detected. Compared with the results of average current lager beer, the parameters such as pH (3.89) and significantly higher level of the total acidity (5.08 ml NaOH/100 ml) are probably caused by proved infection. Other features that indicate the secondary un-specific fermentation include, a high concentration of DMS (66 µg/l), ethyl acetate (70.4 mg/l), ethyl lactate (0.64 mg/l) and furfuryl alcohol (0.32 mg/l).

No *Saccharomyces* yeast DNA was detected. We can assume that the DNA was to a great extent degraded and the target regions for *Saccharomyces* yeast identification were thus broken. DNA of bacteria *Staphylococcus* and *Streptomyces* was identified. Microscopic analysis proved the presence of dead yeast or yeast-like cells (Fig. 4).

### 3.2 Beer B

Beer B sensorially resembled Lambic. It was dark, very sour with madeira and nicely fruity off-flavors.

The chemical profile of Beer B strongly correlated with sensorial profile and genetic results. Very low concentration of residual FAN (12.00 mg/l), extremely high total acidity (12 ml 1M NaOH/100 ml), and extreme sensorial sourness were caused by high concentration of acetic acid (9000 mg/l) and ethyl acetate (624 mg/l) indicating contamination of beer by wild yeast *Dekkera bruxellensis* (Steensels et al., 2015). Concentrations of ethyl acetate (624 mg/l) and other esters were also very high. Undisputed is the ratio of the sum of esters to the sum of alcohols (0.15) compared to value of reference beer D (5.72). Further, twofold concentration of saturated short chained fatty acids (12.6 mg/l) was determined in beer B in comparison with the reference beer D.

A very interesting phenomenon was the very low concentration of furfural (78 µg/l) in beer B, while in beers A and C it was respectively tenfold and hundredfold higher. Furfural belongs to heterocyclic compounds formed during beer aging from amino acids or peptides and reducing sugars (Vanderhaegen et al., 2006). These compounds are also called “aging indicators” and it is possible to retrospectively assess the storage conditions of the old beer from the profile of these compounds (Čejka et al., 2013). It is very likely that the conditions were not suitable for Maillard reactions due to the presence of *Dekkera bruxellensis*. The amino acids and saccharides were fermented before the formation of 2-furfural concentration level corresponding with the age of the beer.

Also, the concentration of fatty acids such as isobutyric, butyric, and isovaleric acids (2.21, 1.15, and 4.36 mg/l, respectively) in

Tab. 3 Vybrané chemické parametry nalezených piv / Table 3 Selected chemical parameters of founded beers

| Analyt/Analyte                                    | Jednotky/Units    | Pivo A /<br>Beer A | Pivo B /<br>Beer B | Pivo C /<br>Beer C | Pivo D /<br>Beer D |
|---|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Rok výroby / Year of production                   |                   | 1900?*             | 1900?*             | 1900?*             | 2015               |
| Extrakt reálný / Extract real                     | %                 | 1.87               | 1.58               | 2.09               | 4.46               |
| Alkohol / Alcohol (v/v)                           | %                 | 5.45               | 3.85               | 5.38               | 4.89               |
| Alkohol / Alcohol (w/v)                           | %                 | 4.31               | 3.04               | 4.25               | 3.82               |
| Původní extrakt mladiny / Original extract Plato° | %                 | 10.30              | 7.62               | 10.40              | 11.87              |
| Hořkost / Bitterness                              | IBU               | 15.00              | 8.00               | 22.00              | 29.33              |
| Barva / Color                                     | EBCU              | 10.00              | 60.20              | 17.20              | 10.57              |
| pH / pH   | -                 | 3.89               | 3.70               | 3.86               | 4.58               |
| Titrační kyselost / Total acidity                 | ml 1M NaOH/100 ml | 5.08               | 12.00              | 4.34               | 2.73               |
| Celkový dusík / Total nitrogen                    | g/100 ml          | 0.36               | 0.13               | 0.48               | 0.43               |
| Σ volné aminokyseliny / Σ free amino acids        | mg/l              | 149.00             | 12.00              | 180.00             | 211.67             |
| Celkové polyfenoly / Total polyphenols            | mg/l              | 105.00             | 5.00               | 21.00              | 125.00             |
| Cu  | mg/l              | 0.24               | 0.15               | 0.15               | 0.05               |
| Fe  | mg/l              | 0.25               | 0.46               | 0.25               | 0.03               |
| Mn  | mg/l              | 0.28               | 0.1                | 0.17               | 0.09               |
| Si  | mg/l              | 9.7                | 4.7                | 6.4                | 35.40              |
| Zn  | mg/l              | 0.09               | 0.09               | 0.13               | 0.02               |
| Σ iso-α-kyseliny / Σ iso-α-acids                  | mg/l              | 0.1                | 0.02               | 0.05               | 26.27              |
| Σ trans-iso-α-kyseliny / Σ trans-iso-α-acids      | mg/l              | 0.02               | 0.01               | 0.05               | 7.50               |
| Σ cis-iso-α-kyseliny / Σ cis-iso-α-acids          | mg/l              | 0.07               | 0.01               | < 0.01             | 18.77              |
| Σ α-kyseliny / Σ α-acids                          | mg/l              | < 0.01             | < 0.01             | < 0.01             | 1.23               |
| Dimethylsulfid / Dimethylsulfide                  | μg/l              | 66                 | 5                  | < 5                | 20.00              |
| Ethylacetát / Ethyl acetate                       | mg/l              | 70.4               | 624                | 79                 | 10.71              |
| Ethyllaktát / Ethyl lactate                       | mg/l              | 0.64               | 0.55               | 0.92               | 0.12               |
| Ethyllaurát / Ethyl laurate                       | mg/l              | 0.03               | 0.03               | 0.03               | 0.14               |
| Ethylmyristát / Ethyl myristate                   | mg/l              | 0.02               | 0.06               | 0.58               | 0.04               |
| Σ alkoholy / Σ alcohols                           | mg/l              | 70.87              | 97.32              | 69.79              | 73.21              |
| Σ estery / Σ esters                               | mg/l              | 72.5               | 628.18             | 82.62              | 12.70              |
| Poměr alkoholů/estery / Alcohols/esters ratio     |                   | 0.98               | 0.15               | 0.84               | 5.72               |
| Glukosa / Glucose                                 | g/100 ml          | 0.04               | 0.01               | 0.03               | 0.03               |
| Fruktosa / Fructose                               | g/100 ml          | < 0.01             | < 0.01             | < 0.01             | 0.05               |
| Maltosa / Maltose                                 | g/100 ml          | 0.01               | < 0.01             | 0.01               | 0.36               |
| DP 3  | g/100 ml          | 0.04               | < 0.01             | 0.05               | 0.46               |
| DP 4  | g/100 ml          | 0.05               | 0.02               | 0.06               | 0.33               |
| Σ   | g/100 ml          | 0.19               | 0.08               | 0.21               | 1.70               |
| Isomáselná kyselina / Isobutyric acid             | mg/l              | 1.54               | 2.212              | 1.204              | 0.50               |
| Máselná kyselina / Butyric acid                   | mg/l              | 0.781              | 1.145              | 0.703              | 0.35               |
| Isovalerová kyselina / Isovaleric acid            | mg/l              | 2.469              | 4.359              | 2.188              | 1.09               |
| Myristová kyselina / Myristic acid                | mg/l              | 0.937              | 1.12               | 1.405              | 0.41               |
| Aceton / Acetone                                  | μg/l              | 430                | 332                | 812                | 299.67             |
| 2-methylbutanal / 2-methylbutanal                 | μg/l              | 17.51              | 5.63               | 39.96              | 5.32               |
| 3-methyl butanal / 3-methyl butanal               | μg/l              | 25.61              | 5.29               | 118.77             | 13.17              |
| 2-furfura / 2-furfural                            | μg/l              | 626                | 78                 | 6667               | 43.00              |
| Benzaldehyd / Benzaldehyde                        | μg/l              | 6.4                | 6.4                | 49.1               | 1.00               |
| Fenylacetaldehyd / Phenylacetaldehyde             | μg/l              | 85.78              | 51.78              | 893.49             | 31.80              |

vem A (105 mg/l) a referenčním pivem D (125 mg/l). Tento jev si lze vysvětlit oxidačními pochody nebo jinými transformačními pochody polyfenolických látek ve stárnoucích pivech. Reakce, pomocí které jsou stanovovány celkové polyfenoly, je založena na reakci  $\text{FeCl}_3$  s funkčními hydroxylovými skupinami a po jejich chemické přeměně nemůže probíhat.

Genetická analýza prokázala přítomnost DNA kvasinek *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces uvarum*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* a *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* x *S. uvarum* (tab. 2). V současné době je v rámci rodu *Saccharomyces* uznáváno 9 druhů: *S. cerevisiae*, *S. arboricolus*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. eubayanus*, *S. uvarum* a dva hybridní druhy *S. bayanus* a *S. pastorianus* (Boynton a Greig, 2014). Pivovarské kvasinky jsou technologicky i taxonomicky klasifikovány do druhu *S. pastorianus* (tzv. spodní kvasinky) a *S. cerevisiae* (svrchní kvasinky). Předpokládá se, že vzniku spodních kvasinek *S. pastorianus* předcházely dvě nebo více nezávislých hybridizací a na vzniku jejich genomu mají

beer B was about four times higher in comparison with fresh reference beer. This result correlates with the finding of *Dekkera bruxellensis*, which breaks down leucine and valine present in beer into isovaleric and isobutyric acid, respectively (Oelofse et al., 2008).

Very low concentrations of total polyphenols, 5.0 and 21.00 mg/l, respectively, were found in beers B and C. A very interesting fact was the negligible concentration of total polyphenols (5.0 mg/l) in beer B. This phenomenon could be explained by oxidation or other transformation reactions in aging beer. The determination of polyphenols is based on the color reaction between  $\text{FeCl}_3$  and functional hydroxyl groups of polyphenols. When hydroxyl groups are transformed, the reaction does not take place.

DNA of the yeast *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces uvarum*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* and *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* x *S. uvarum* was identified (Table 2). Currently 9 species are recognized within the genus *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. arboricolus*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. eubayanus*, *S. uvarum*



*Saccharomyces bayanus/pastorianus*

Identities: 185/186 (99 %)

```

Query 1  TAAATAAAATGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCGATTGCTCGAAACCCAAAGAAAA 60
Sbjct 308 TAAATAAAATGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCGATTGCTCGAAACCCAAAGAAAA 249

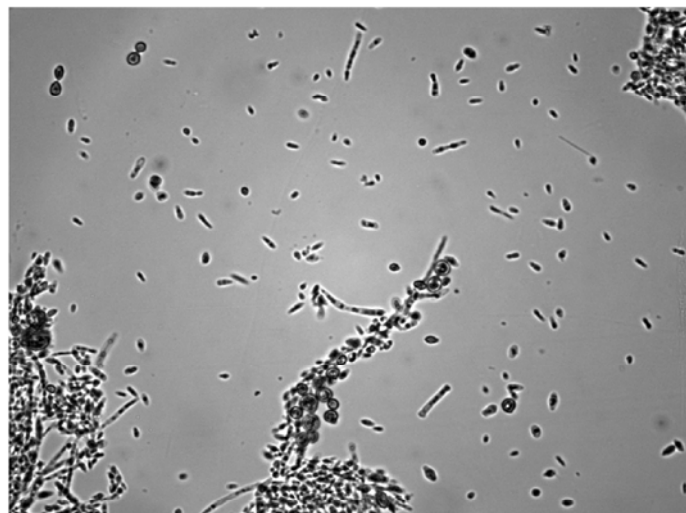
Query 61  GTTGCAAAAGTATAAACTCCACAGTGTGTGTATTGAACCGGTTTAAATTGCTCTATA 120
Sbjct 248 GTTGCAAAAGTATAAACTCCACAGTGTGTGTATTGAACCGGTTTAAATTGCTCTATA 189

Query 121 ACAAAAACAGAGAGTCTCACTGTTTGGAAATAGCAAGAAAGAACTTGCAAGCCCTAGCA 180
Sbjct 188 ACAAAAACAGAGAGTCTCACTGTTTGGAAATAGCAAGAAAGAACTTGCAAGCCCTAGCA 130

Query 181 AGACCG 186
Sbjct 129 AGACCG 124

```

Obr. 5 Porovnání sekvenční části DNA z piva B s databází NCBI; Query – sekvenční DNA z piva, Sbjct – sekvenční z databáze / Fig. 5. Comparison of part of the DNA sequence from Beer B with NCBI database; Query – DNA from beer, Sbjct – sequence from GenBank



Obr. 6 Mikroskopie sedimentu piva B / Fig. 6 Microscopic sediment analysis of beer B

podíl druhů *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* a pravděpodobně i další tzv. non-*S. cerevisiae* druhů (Dunn a Sherlock, 2008; Hebly et al., 2015). Po prvotní hybridizaci a vzniku allotetraploidních kvasinek pak došlo ke značné reorganizaci genomu (Gibson a Liti, 2015). Hybridní původ většiny kmenů spodních pivovarských kvasinek je často příčinou jejich obtížné identifikace nebo odlišení dokonce na úrovni druhu (Kopecká et al., 2016). Na obr. 5 je příklad porovnání části sekvenční DNA z piva B s databází NCBI. Analýza prokázala 100% homologii s DNA *Saccharomyces bayanus/S. pastorianus*. Téměř 100% homologie s oblastí ITS1 *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* x *S. uvarum* kmene CBS1503 může svědčit o hybridním původu kvasinek používaných v záhlinickém pivovaru (Olšovská et al., 2016). Nález DNA kvasinek *S. uvarum* a *S. bayanus* je nejspíše průkazem kontaminace piva v průběhu jeho výroby nebo skladování divokými kvasinkami.

Mikroskopie vzorku B je zdokumentována na obr. 6. Tvar buněk ze sedimentu piva koresponduje s typickou morfologií buněk kvasinek *Dekkera* (obr. 7).



Obr. 7 Buňky kvasinek *D. bruxellensis* / Fig. 7 Cells of yeast *D. bruxellensis* (Kochláňová et al., 2016)

### 3.3 Pivo C

Pivo C mělo světle hnědou barvu a obsahovalo zbytky bublinek  $\text{CO}_2$ . I když byl v pivu zřetelný vysoký stupeň oxidace s typickou sladkou, sirupovou a papírovou chutí, bylo lehce nahořklé a celkově připomínalo pivo jako takové. Vyšší barva oproti pivu A byla patrně způsobena oxidačními reakcemi.

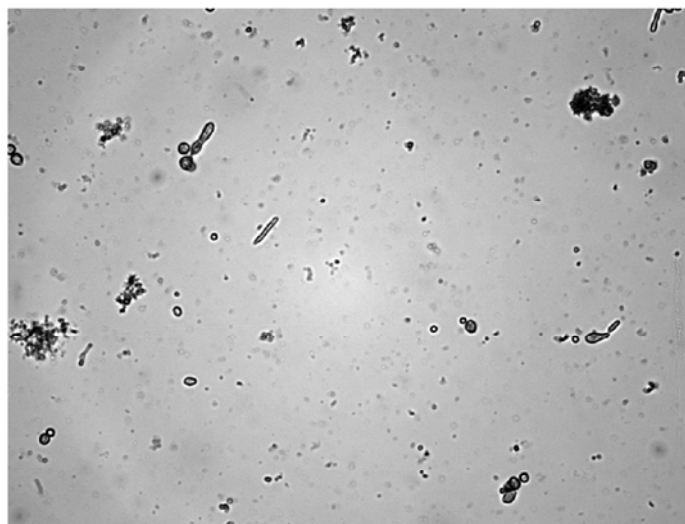
Původní extrakt mladiny piva C byl 10,40%. Podobně jako u piva A, toto pivo obsahovalo zřejmě v důsledku sekundární fermentace vysoké procento alkoholu a nízký skutečný extrakt (viz tabulka 3). Pivo C také obsahovalo velké množství esterů, např. koncentrace ethyllaktátu byla 0,92 mg/l, což je spojeno také s vysokou koncentrací mléčné kyseliny (3500 mg/l).

and two species *S. bayanus* and *S. pastorianus* possessing a hybrid genome (Boynton and Greig, 2014). Brewing yeasts are technologically and taxonomically classified into species *S. pastorianus* (so-called bottom fermenting) and *S. cerevisiae* (top fermenting). It is believed that formation of the bottom fermenting yeast *S. pastorianus* was preceded by two or more independent hybridizations and their genome arose under the participation of the species *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* and probably other non *S. cerevisiae* species (Dunn and Sherlock, 2008; Hebly et al., 2015). After the initial hybridization and formation of allotetraploid yeast the genome was substantially reorganized (Gibson and Liti, 2015). The hybrid nature of most of the lager yeast strains often leads to their problematic identification or unreliable differentiation even on the species level (Kopecká et al., 2016). An example of comparison of DNA from Beer B with GenBank NCBI database is shown in Fig. 5. *Saccharomyces bayanus/S. pastorianus* was determined with 99% identity. The hybrid nature of the yeast strain from Zahlinice brewery may be indicated by the almost 100% DNA homology with *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* x *S. uvarum* strain CBS1503 internal transcribed spacer 1 (Olšovská et al., 2016). The finding of homology between beer B DNA and sequences of *S. uvarum* and *S. bayanus* can also be an indication of contamination of the beer during its production or storage.

Microscopic analysis documented the presence of dead yeast or yeast-like cells (Fig. 6). The appearance of dead cells corresponds to the typical cell morphology of *Dekkera* (Fig. 7).

### 3.3 Beer C

Beer C was light brown and contained traces of carbon dioxide bubbles. While the beer was oxidized, with typical sweetness and



Obr. 8 Mikroskopie sedimentu piva C / Fig. 8 Microscopic sediment analysis of beer C



Pivo C je díky kvalitnímu neporušenému uzávěru a ochranné atmosféře pomocí zbytků  $\text{CO}_2$  typickou ukázkou přirozeně stárnoucího piva. Koncentrace karbonylových látek ze skupiny „indikátorů stárnutí“ narostla během století do extrémních hodnot, zvláště u sloučenin 2-furfural (6667  $\mu\text{g/l}$ ), 2-methylbutanal (40  $\mu\text{g/l}$ ), 3-methylbutanal (119  $\mu\text{g/l}$ ) a fenylacetaldehyd (894  $\mu\text{g/l}$ ) (viz tab. 3). Je velmi zajímavé, že autoři, kteří analyzovali pivo z vraku lodi z roku 1840, našli ve srovnání s námi analyzovaným vzorkem podstatně nižší koncentraci, a to 644  $\mu\text{g/l}$  (Londesborough et al., 2015). Toto zjištění potvrzuje a průkazně demonstruje fakt, že 2-furfural je indikátor teplotní stability, tudíž v podmínkách 4 °C, které jsou na dně oceánu, vzniká v pivu během stárnutí pouze v minimálním množství.

Ve vzorku C byla prokázána DNA kvasinek *Debaryomyces* a bakterií *Bacillus* a *Streptomyces*. Podobně jako u piva A nebyla v tomto vzorku detekována DNA kvasinek rodu *Saccharomyces*, zřejmě z důvodu vysokého stupně poškození DNA. Mikroskopie ukázala přítomnost mrtvých kvasinkovitých buněk (obr. 8).

Jak se dalo předpokládat, piva A, B a C měla vzhledem k identickému původu také řadu shodných chemických parametrů, které nebyly ovlivněny jejich různorodou kontaminací. Všechna tři piva obsahovala poměrně vysokou koncentraci kovů Fe, Cu, Mn a Zn (viz tab. 3); zejména koncentrace železa, která se pohybovala od 0,25 do 0,46 mg/l, byla ve srovnání s dnešním standardem (0,01–0,03 mg/l) vysoká. Vysoká koncentrace železa mohla pocházet z neupravené vody a patrně také z materiálu tehdejšího varného zařízení. Zřejmě je také nízká koncentrace křemíku ve stoletém pivu, která se pohybovala mezi 4,7 až 9,7 mg/l oproti srovnávacímu vzorku piva D 35 mg/l. Významným zdrojem křemíku je ječný slad, neboť křemík je soustředěn v pluchách zrna ječmene (bezpluché obilniny křemík neobsahují) (Cejnar et al., 2013). Nízká koncentrace Si může být způsobena použitou odrudou ječmene, z větší míry však pravděpodobně vyšší mírou surogace. Ta byla v době První světové války a po ní běžná z důvodu nedostatku obilí.

Jednoduché fermentovatelné cukry, jako fruktosa, glukosa a maltosa, byly ve všech třech pivech kompletně spotřebovány kvasinkami a ostatními mikroorganismy. Také celková koncentrace oligosacharidů se stupněm polymerace do 10 glukosových jednotek je minimální (0,08 až 0,21 g/100 ml). Vysoký obsah esterových látek ve stoletých vzorcích piva byl již výše komentován, zajímavý je také jejich neobvyklý poměr k celkovému obsahu alkoholů (od 0,15 do 0,98). V běžných současných ležácích je tento poměr zcela obrácený (zhruba 4,9 až 6,3; výsledky VUPS). Tuto anomálii s největší pravděpodobností způsobila činnost kontaminujících mikroorganismů.

Velmi zajímavým jevem je neshoda mezi výsledkem hořkosti (15, 8, a 22 j. EBC) a výsledky HPLC stanovení iso- $\alpha$ -kyselin, která poskytla v souladu se senzorickým hodnocením téměř nulové hodnoty. Z výsledku je patrné, jak je všeobecně používaná metoda stanovení hořkosti EBC 9.8 nespecifická a může vykazovat falešně pozitivní výsledky. Proto byla provedena analýza degradačních produktů hořkých látek ve vzorku C metodou HPLC-MS a bylo zjištěno, že se jedná o další v řadě „iso“ produkty iso-alfa kyselin. Blížeší popis tohoto experimentu společně s detailními výsledky je popsán v paralelní studii (Olšovská et al., 2016).

Posledním diskutabilním parametrem je koncentrace myristové kyseliny, která je ve stoletých pivech osažena ve čtyřnásobné koncentraci oproti referenčnímu pivu. Tato nasycená kyselina není produktem kontaminujících bakterií ani kvasinek. Zvýšená koncentrace může být způsobena surogací (Briggs et al., 2004), a do jisté míry také odrudou použitého ječmene. Podle našich studií je koncentrace této kyseliny odrudově specifická, a to zejména pro české odrůdy ječmene (poznámka autora, publikace v přípravě).

## ✉ 4 ZÁVĚR

Z chemického a senzorického rozboru sto let starého piva vyplývá, že se s velkou pravděpodobností jednalo o pivo ležáckého typu. Tím, že každé z pív A, B a C bylo kontaminováno jiným způsobem, lze v pivu po tak dlouhé době sledovat řadu zajímavých chemických pochodů. Nejzajímavější je bezpochybně proces kontaminace kvasinkou *Dekkera bruxellensis* v pivu B a procesy stárnutí a isomerizace iso-hořkých kyselin v pivu C. Některé parametry (obsah Si, myristové kyseliny) také shodně ukazují na možnost vyššího stupně surogace, která byla počátkem 19. století nutnou součástí výroby piva z důvodu nedostatku sladovnického ječmene. V pivu B byla prokázána DNA spodních pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus*. V pivech A a C nebyla naopak detekována žádná DNA

papery off-flavors, it was very slightly bitter and it really appeared as beer. The slightly higher color of beer C compared with A is probably caused by oxidation.

The original extract of beer C was 10.40 %. Because of a secondary fermentation or even some kind of contamination, higher content of alcohol and very low real extract were detected. Similarly as beers A and B, also beer C contained a quite high concentration of esters (see Table 3); the concentration of ethyl lactate was high, 0.92 mg/l, which associated with the high amount of lactic acid (3500 mg/l).

Sample C is a typical example of a naturally aging beer due to a well-sealed and undamaged cork cap, which secured a protective atmosphere (rests of carbon dioxide bubbles). The concentration of carbonyl compounds belonging to the group of “aging indicators” increased during the century to extreme values; namely the amounts of 2-furfural, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, and phenylacetaldehyde were 6667, 40, 119, and 894  $\mu\text{g/l}$ , respectively (see Table 3). It is very interesting that the authors who analyzed beer from the 1840s shipwreck found a much lower amount of 2-furfural (644  $\mu\text{g/l}$ ) (Londesborough et al., 2015). This finding confirms and clearly demonstrates that 2-furfural is a “thermal indicator”. In other words, the temperature on the ocean floor is low and stable (about 4 °C).

DNA of yeast belonging to the genus *Debaryomyces* and of *Bacillus* and *Streptomyces* bacteria was identified. As for beer A, no *Saccharomyces* yeast DNA was detected, probably because of the high level of DNA damage. Microscopic analysis proved the presence of dead yeast or yeast-like cells (Fig. 8).

Predictably, beers A, B and C showed a number of similar parameters indicative of their common origin. All beers had a higher content of Fe, Cu, Mn and Zn (see Table 3); especially the concentration of Fe ranging from 0.25 to 0.46 mg/l is very high compared to current beers. This fact could be caused by the usage of insufficiently treated water and by metal composition of the brewhouse equipment 100 years ago. Also the levels of Si determined in the century-old beers were lower (from 4.7 to 9.7 mg/l) than in reference beer D (35 mg/l). Silicon in beer originates from barley, namely from palea (grain without palea does not contain silicon (Cejnar et al., 2013). Barley malt is therefore a rich silicon source. We assume that a lower concentration of Si could be caused by barley variety and by some type of adjuncts, which was common during World War I and also after it.

Further, simple fermentable sugars such as glucose, fructose and maltose were completely fermented by yeasts and other microorganisms (see Table 3) and they are completely missing in A, B, C beers; the sum of carbohydrates with less than 10 glucose units in these samples was 0.19, 0.08, and 0.21 g/100 ml. Moreover, the high content of esters evident in century-old beers A, B, and C was most probably caused by infection; the ratio of the sum of esters to the sum of alcohol ranged from 0.15 to 0.98 whereas in fresh beers the ratio is ranging from 4.9 to 6.3 (data from RIBM database).

A very interesting feature was measured bitterness of 15, 8, and 22 IBU, while the concentration of iso- $\alpha$ -acids determined using HPLC method was near zero. Also sensorially determined bitterness was missing or was negligible. This indicates that the EBC 9.8 routine method is not specific and can provide false positive results. Therefore, the presumed degradation products of bitter acids were further analyzed using HPLC-MS and subsequent “iso” products of iso- $\alpha$ -acids were found. The experiment and results are described in more detail in a parallel study (Olšovská et al., 2016).

Finally, compared with the current beers, four-fold higher concentration of myristic acid was found in century-old beers. This saturated fatty acid is neither a product of contaminating bacteria nor a product of yeasts. The higher concentration of myristic acid may probably be caused by surrogates used, which can increase the concentration of this fatty acid (Briggs et al., 2004), or by the barley varieties used, because the profile of fatty acids is variety dependent and the concentration of myristic acid is a characteristic feature of each Czech barley variety (study in preparation, note of the author).

## ✉ 4 CONCLUSIONS

Based on the results of chemical and sensory analysis of hundred years old beers we can conclude that the beer was the most probably lager type. Due to varying contamination in samples A, B and C it was possible to monitor a number of interesting chemical reactions in the beers after so long a period. The most interesting is undoubtedly the process of contamination by the yeast *Dekkera bruxellensis* in beer B together with an aging process, and isomerization of iso-bitter



kvasinek rodu *Saccharomyces*, zřejmě z důvodu jejího poškození v průběhu skladování.

#### PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla vypracována za podpory MZE-RO1916 – Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin, MŠMT č. LO1312 a projektu RVO61388971. Autoři děkují panu Alešovi Přinosilovi z firmy Raven Trading s.r.o. za laskavé poskytnutí vzorků piva a jeho milou spolupráci.

acids in beer C. Some parameters (for example content of silica and myristic acid) consistently show the possibility of a higher degree of adjunct addition in the early 20th century that was obviously a necessary part of beer production due to lack of malting barley. DNA of lager yeast *Saccharomyces pastorianus* was proved in beer B. No *Saccharomyces* yeast DNA was detected in beers A and C which can be caused by high level of DNA damage during the storage.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the project of Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. RO1915 and Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic No. LO 1312 and the project RVO61388971. The authors thank Mr. Aleš Přinosil from the Raven Trading s.r.o. for providing beer samples and his kind cooperation.

Translated by Karel Sigler

#### LITERATURA / REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990: Basic local Alignment search tool. *J. Molecular Biology*, 215(3): 403–410.
- Basařová, G., Hlaváček, I., 1998: České pivo. NUGA, Pacov, Česká republika, ISBN 80-85903-08-3.
- Boynton, P., Greig, D., 2014: The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*, 31: 449–462.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., Stevens, R., 2004: Brewing. Science and practice. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, United Kingdom: 313–315. ISBN 0849325471.
- Čejka, P., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M., Olšovská, J., 2013: Use of chemical indicators of beer aging for ex-post checking of storage conditions and prediction of the sensory stability of beer. *J. Agric. Food Chem.*, 61: 12670–12675.
- Cejnar, R., Mestek, O., Dostálek, P., 2013: Determination of silicon in Czech beer and its balance during the brewing process. *Czech J. Food Sci.*, 31: 166–171.
- Dunn, B., Sherlock, G., 2008: Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.*, 18: 1610–1623.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E., 1989: Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.*, 17(19): 7843–7853.
- Gibson, B., Liti, G., 2015: *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32: 17–27.
- Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I., Driessen, M.R.M., de Hulster, E.A.F., van de Broek, M., Pronk, J. T., Geertman, J., Daran, J., Daran-Lapujade, P., 2015: *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Res.*, 15: DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fov005>.
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Olšovská, J., 2013: Determination of fatty acids in beer by fast routine analyses. *Kvasny Prum.*, 59: 58–62.
- Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Non-*Saccharomyces* yeasts and their importance in the brewing industry – part I -*Brettanomyces* (Dekkera). *Kvasny Prum.*, 62: 198–205.
- Kopecká, J., Němec, M., Matoulková, D., 2016: Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast. *J. Appl. Microbiol.*, 120: 1561–1573.
- Londesborough, J., Dresel, M., Gibson B., Juvonen, R., Holopainen, U., Mikkelsen, A., Seppänen-Laakso, T., Viljanen, K., Virtanen, H., Wilpola, A., Hofmann, T., Wilhelmson, A., 2015: Analysis of beers from an 1840s' shipwreck. *J. Agric. Food Chem.*, 63: 2525–2536.
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008: Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 29: 128–144.
- Olšovská, J., Matoulková, D., Felsberg, J., Jelínková, M., Dušek, M., Čejka, P., Štěrba, K., 2016: Chemical profile of Czech beer – Analysis of 100-year-old beer, *J. Agric. Food Chem.*, 2016 (under review).
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y., 2003: *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, genetics diversity and evolution. *J. Biosci. Bioeng.*, 96: 1–9.
- Sanger, F., Coulson, A.R., 1975: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94(3): 441–448.
- Starec, M., 2016: Historie pivovaru a sladovny v Záhlinicích. *Kvasny Prum.* 62(11-12): 346–355.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J., 2015: *Brettanomyces* yeasts – From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 206: 24–38.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G., 2006: The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry*, 95: 357–381.
- Walther, A., Ravasio, D., Qin, F., Wendland, J., Meier, S., 2015: Development of brewing science in (and since) the late 19th century: Molecular profiles of 110–130 year old beers. *Food Chem.*, 183: 227–234.
- White, T.J., Bruns, T. D., Lee, S. B., Taylor, J. W., 1990: Chapter 38. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., eds.; Academic Press: New York, NY: 315–322. ISBN 0123721814.

Do redakce došlo / Manuscript received: 01/10/2016  
Přijato k publikování / Accepted for publication: 18/10/2016