



Pienpanimon mikrobiologiset uhkatekijät

Jarkko Halonen

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2019

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan koulutusohjelma

HALONEN, JARKKO:
Pienpanimon mikrobiologiset uhkatekijät

Opinnäytetyö 24 sivua.
Toukokuu 2019

Tämän opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Pyynikin Käsityöläispanimo Oy. Työn tavoite oli selvittää, onko panimon tuotantotilojen viemärijärjestelmä mahdollinen oluen pilaajamikrobien lähde. Työn tarkoitus oli laatia työskentelymenetelmä, jolla mahdollinen kontaminaation uhka saadaan minimoitua.

Työn teoreettisessa osiossa esitellään oluen mikrobiologiaa ja yleisimpiä tunnettuja oluen villihiivoja ja anaerobisia pilaajabakteereita, niiden ominaisuuksia ja vaikutuksia lopputuotteen ominaisuuksiin. Työn käytännön osuudessa tutkittiin panimon tuotantotiloissa sijaitsevia lattiakaivoja kuuden viikon ajan semikvantitatiivisin anaerobisin maljaviljelyin, löydettyjä mikrobeja mikroskopoititiin ja niitä pyrittiin tunnistamaan vertaamalla kirjallisuudesta löytyviin tietoihin.

Hiivat ovat välttämätön osa oluen valmistusta, mutta villihiivat voivat myös pilata tuotteen. Villihiivat jaetaan *Saccharomyces*- ja ei-*Saccharomyces*-sukuisiin, joista ensin mainitut voivat olla läheistä sukua panimolla käytettyihin hiivoihin. Panimolla käytössä olevat panimohiivat voivat myös aiheuttaa ristikontaminaation väärään tuotteeseen joutuessaan.

Anaerobiset oluen pilaajabakteerit jaetaan ominaisuuksiensa perusteella Gram-positiivisiin ja Gram-negatiivisiin bakteereihin. Tärkeimpiä anaerobisia pilaajabakteereita ovat *Lactobacillus*-, *Megasphaera*- ja *Pectinatus*-sukujen bakteerit, jotka vaikuttavat rajusti oluen ominaisuuksiin.

Saatujen tulosten perusteella voidaan arvioida tutkittujen viemäreiden muodostavan merkittävän villihiiva- ja bakteerikontaminaation riskin panimon lopputuotteiden laadulle. Tulosten perusteella voidaan myös arvioida, ettei viemäreiden säännöllinen peseminen kuitenkaan pienennä mikrobiologista riskiä niin paljon, että säännöllisten pesujen jatkaminen olisi suositeltavaa. Tarkempien tulosten saaminen vaatisi kuitenkin jatkotutkimuksia ja jo mahdollisten hajuhaittojen poistamiseksi viemäreiden satunnainen pesu on kannattavaa.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

HALONEN, JARKKO:
Microbial Threats of a Craft Brewery

Bachelor's thesis 24 pages.
May 2019

This thesis was commissioned by Pyynikin Brewing Company. The goal of this work was to find out if the sewer system in the production areas of the brewery is a microbial threat to the finished products. The aim of this work was to find a procedure to minimize the risk of microbial contamination.

In the theoretical part of this work the most important microbial beer contaminants are discussed, focusing on their morphology and biochemical properties which may help in their identification. In the practical part of the work the sewers were investigated during a six-week period and the results were reported.

Microbes are an important part of the brewing process. While purpose-suited microbes are crucial for the fermentation process itself, a foreign yeast or unwanted bacteria can contaminate the product during bottling or canning and ruin the whole batch. This can cause severe quality effects on the beer, causing financial losses and affect the reputation of the brewery.

Most important beer spoiling microbes are wild yeasts and anaerobic bacteria. Wild yeasts, which are also called foreign yeasts in some occasions, are divided into two subcategories, *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeasts. *Saccharomyces* species of wild yeasts can be closely related to the yeasts used at the brewery and a cross-contamination between brewing yeasts is also considered as a wild yeast contamination.

Anaerobic bacteria are divided into two subcategories regarding their Gram staining properties as Gram-negative and Gram-positive bacteria. The most important anaerobic beer spoilage bacteria include species *Lactobacillus*, *Megasphaera* and *Pectinatus*.

The conclusion of this work is that the sewers in the brewery introduce a major microbial risk to the quality of the finished product. Washing procedures of the sewer system do not seem to have major effects on the amounts of microbes found, but further investigation is needed. For these reasons, a regular washing protocol is not recommended.

Key words: beer, anaerobic, bacteria, contamination, brewery, yeast, pectinatus

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	HIIVAT	6
	2.1 <i>Saccharomyces</i> -suvun villihiivat	7
	2.2 Ei- <i>Saccharomyces</i> -suvun villihiivat.....	7
3	BAKTEERIT	8
	3.1 Gram-positiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit	9
	3.1.1 <i>Lactobacillus</i>	9
	3.1.2 <i>Pediococcus</i>	10
	3.1.3 Muut Gram-positiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit...	10
	3.2 Gram-negatiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit	11
	3.2.1 <i>Megasphaera</i>	11
	3.2.2 <i>Pectinatus</i>	11
	3.2.3 Muut Gram-negatiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit .	12
4	KOKEELLISEN OSAN SUORITUS	13
	4.1 Näytteenotto, näytteiden rikastus ja maljaviljelyt	13
	4.2 Työssä käytetyt kasvatusalustat	13
	4.3 Mikrobin tunnistaminen	14
5	TULOKSET	15
	5.1 Viikko 1	15
	5.2 Viikko 2	16
	5.3 Viikko 3	18
	5.4 Viikko 4	19
	5.5 Viikko 5	20
	5.6 Viikko 6	20
	5.7 Tulosten arviointi.....	21
6	POHDINTA	23
	LÄHTEET	24

1 JOHDANTO

Työn toimeksiantajana toimi Pyynikin Käsityöläispanimo Oy. Työn tavoitteena oli selvittää, onko panimon tuotantotilojen viemärijärjestelmä mahdollinen oluen pilaajamikrobien lähde. Työn tarkoitus oli laatia työskentelymenetelmä, jolla mahdollinen kontaminaation uhka saadaan minimoitua.

Pilaajamikrobit voivat vaikuttaa rajusti tuotteen laatuun ja ne aiheuttavat maailman panimoteollisuudelle vuosittain miljoonien eurojen taloudelliset tappiot, joten mikrobikontaminaatioiden estäminen on tärkeää myös taloudellisesti. Olut on kuitenkin tiettyjen ominaisuuksiensa vuoksi mikrobeille vaikea kasvualusta, jossa vain harvat bakteerit kykenevät selviämään. Oluessa ei tavata patogeenejä, eli taudinaiheuttajia, minkä vuoksi se onkin ollut suosittu juoma jo muinaisina aikoina, jolloin puhdasta juomavettä ei ole ollut saatavilla.

Työn teoreettisessa osiossa käydään läpi oluen mikrobiologiaa yleisesti, esitellään yleisimpiä tunnettuja anaerobisia oluen pilaajamikrobeja, niiden ominaisuuksia ja vaikutuksia lopputuotteen ominaisuuksiin. Aerobiset pilaajabakteerit jätettiin työstä pois, koska työn pääpaino oli lopputuotteen laadussa ja astioidun lopputuotteen happipitoisuus on modernilla panimolla hyvin alhainen tuotantoprosessin ollessa kunnossa, jolloin aerobiset bakteerit eivät kykene menestymään ja pilaamaan olutta.

Työn käytännön osuudessa tutkittiin panimon tuotantotiloissa sijaitsevia lattiakaivoja kuuden viikon ajan semikvantitatiivisin anaerobisin villihiivoille ja bakteereille selektiivisin maljaviljelyin. Näytteenoton ajankohdissa otettiin huomioon lattiakaivoihin kohdistuvat pesuprosessit ja verrattiin löydettyjen kontaminanttien määrää suhteessa pesuihin. Havaitut mikrobit pyrittiin tunnistamaan kasvatusmaljojen selektiivisiä ominaisuuksia ja mikroskooppia käyttäen, tulokset taulukoitiin ja löydöksiä verrattiin potentiaalisiin pilaajamikrobeihin.

2 HIIVAT

Hiivat ovat oluenvalmistuksen tärkeimpiä raaka-aineita, mutta ne voivat myös muodostaa merkittävän laadullisen ongelman. Lopputuotteeseen päätyvien villihiivojen lisäksi ristikontaminaatio eri oluttyypeissä käytettävien hiivojen osalta on mahdollinen ja mahdollisesti yhtä haitallinen lopputuotteen laadulle, kuin varsinainen villihiivakontaminaatio.

Oluthiivat ovat yleisimmin pitkälle jalostettuja *Saccharomyces cerevisiae* tai *S. pastorianus* -lajien hiivoja (Willey, Sherwood, Woolverton 2008, 1044.). Pintahiivat, eli ale-hiivat, on luokiteltu *S. cerevisiae* -lajin hiivoiksi, kun taas pohjahiivat, eli lager-hiivat, tunnetaan monilla nimillä, kuten *S. carlsbergensis*, *S. uvarum* ja *S. cerevisiae*. Läheisestä sukulaisuudesta huolimatta pinta- ja pohjahiivat ovat kuitenkin geneettisesti hyvin erilaisia. Ale-hiivat luokitellaan edelleen *S. cerevisiae* -lajin hiivoiksi, mutta lager-hiivojen osalta tilanne on sekavampi. Nykyisellään käytössä oleva lager-hiiva on mahdollisesti *S. cerevisiae* ja toisen *Saccharomyces*-suvun hiivan, mahdollisesti *S. monacensis* tai *S. bayanus*, risteymä. Lisäksi *S. monacensis* on käytössä synonyyminä *S. pastorianus* -lajille, joka on taksonomisesti oikea nimitys lager-hiivalle. Panimoalalla *S. pastorianus* kuitenkin tunnetaan villihiivana ja hiivan fermentointiominaisuudet ovat panimolla taksonomiaa tärkeämpiä, joten panimoympäristössä on suositeltavaa käyttää lagerhiivasta nimitystä *S. carlsbergensis*. (Tenge 2009, 121.)

Myös *Brettanomyces*-suvun hiivoja käytetään joissain perinteisissä keskieuropalaisissa oluttyypeissä. (Back 2009, 481) Tavanomaiselle suomalaiselle panimolle *Brettanomyces*-sukuiset hiivat ovat kuitenkin lähinnä kontaminantteja.

Hiivasolut ovat Gram-positiivisia ja ne ovat kooltaan tyypillisesti huomattavasti bakteereita suurempia. Koko vaihtelee kuitenkin erittäin paljon. Muodoltaan hiivasolut ovat sylinterimäisiä tai munanmuotoisia. (Willey ym. 2008, 631.) Hiivalajien suora tunnistaminen mikroskopoimalla on näistä ominaisuuksista johtuen vaikeaa, mutta villihiivojen erotteluun panimohiivoista voi käyttää esimerkiksi villihiivoille selektiivistä kasvatusalustaa.

2.1 *Saccharomyces* -suvun villihiivat

Saccharomyces-suvun villihiivat voivat aiheuttaa merkittäviä virheitä oluen makuun ja tuoksuun. Yleensä nämä hiivat ovat *S. cerevisiae* -lajin eri kantoja, mutta muitakin *Saccharomyces*-suvun hiivoja on tavattu. Villihiivat eroavat morfologialtaan yleisesti panimohiivoista, hyvin viheliäinen *S. cerevisiae* var. *diastaticus* muodostaa pääasiallisesti pieniä ovaalin, ellipsin tai sylinterin muotoisia soluja, jotka voivat myös olla pidentyneitä. Muodostuneet klusterit ovat panimohiivan muodostamia säännöllisemmän muotoisia ja koostuvat vain muutamasta solusta. (Back 2008, 480.)

Saccharomyces-sukuisten villihiivojen käymisprofiili, eli hiivan käyttämät ravinteet, käymisaste ja käymisnopeus, on samankaltainen kuin ei-villihiivoilla, mutta tuottamiensa amylaasi- ja amyloglukosidaasientsyymien avulla *S. diastaticus* kykenee pilkkomaan myös dekstriinejä ja tärkkelystä ja käyttämään näitä ravintonaan. Kontaminaatio astioidussa lopputuotteessa aiheuttaa jälkikäymistä, joka aiheuttaa sameuden, sakan ja hiilidioksidin muodostuksen lisäksi maku- ja hajuvirheitä, kuten happamuutta ja katkeruutta. (Back 2008, 480.)

Muita merkittäviä suvun villihiivoja ovat *S. cerevisiae* var. *bayanus* ja sille läheistä sukua oleva *S. cerevisiae* var. *pastorianus*. Solut ovat useimmiten muodoltaan sylinterimäisiä, epäsäännöllisen mailamaisia tai makkaran muotoisia eivätkä ne tyypillisesti muodosta klustereita, vaan solut ovat pareittain. Yleisesti nämä villihiivat ovat ominaisuuksiltaan lähempänä pohjahiivoja, mutta joiltain fermentaatio-ominaisuuksiltaan ne ovat enemmän pintahiivojen kaltaisia. (Back 2009, 480-481.)

2.2 Ei-*Saccharomyces* -suvun villihiivat

Ei-*Saccharomyces* -sukuiset villihiivat ovat harvinaisia, ja yleisimpinä näistä voidaan mainita *Brettanomyces*-suvun hiivat. Näiden hiivojen fermentaatio on hidasta ja vaikutukset lopputuotteen laatuun suuria hiivan tuottaessa suuria määriä etikkahappoa ja erilaisia estereitä. Hiivasolut ovat muodoltaan ovaaleja, elliptisiä, sylinterimäisiä ja myös pidentyneitä muotoja tavataan. (Back 2009, 481.)

3 BAKTEERIT

Olut on suurimmalle osalle mikrobeja varsin epäoptimaalinen kasvualusta. Näitä ominaisuuksia ovat matala pH (<4,7), anaerobiset olosuhteet sekä korkea etanolipitoisuus. Etanoli aiheuttaa proteiinien denaturoitumisen lisäksi vaurioita bakteerien soluseinän rakenteeseen, sekoittaa aineenvaihduntaa ja hajottaa solujen rakennetta. (Ashtavinayak, Hill 2016, 195.) Lisäksi Gram-positiivisten bakteerien kasvua inhiboi olueen lisättävistä humalista johtuva katkeroaine-, eli iso- α -happopitoisuus (Sakamoto, Konings 2003, 105-124.). Tyypillisesti näiden katkeroaineiden pitoisuus on välillä 17-55 ppm (Ashtavinayak, Hill 2016, 195.), mutta joillekin oluttyypeille tätä matalammat ja korkeammat arvot ovat tyypillisiä. Iso- α -happoyhdisteet voivat läpäistä bakteerisolun soluseinän ja solun sisäiseen protonitasapainoon vaikuttamalla muuttaa solun sisäistä pH-gradienttia, joka sekoittaa solun ravinnonsaannin ja inhiboi iso- α -happoyhdisteille sensitiivisten bakteerien kasvun (Sakamoto, Konings 2003, 105-124.). Näiden lisäksi mikrobikasvua inhiboi oluen tuotantoprosessin matalat lämpötilat. (Back 2009, 477.)

Bakteerit ovat tyypillisessä pienpanimoympäristössä yleisesti kontaminantteja, mutta tietyissä perinteisissä oluttyyleissä käytetään maitohappobakteereita vierteen hapattamiseen ja myös pääkäymisen fermentoijina. (Burberg, Zamkow 2009, 235.) Yleisimpiä oluenpilaajabakteereja on tutkittu kattavasti ja niiden ominaisuudet sekä vaikutukset lopputuotteen laatuun on hyvin tiedossa.

Aerobiset bakteerit muodostavat uhan lähinnä käymisen aikana ja tynnyrikypsyttäviin oluisiin, mutta anaerobiset bakteerit voivat pilata myös pulloihin, tölkkeihin ja oluthanoihin liitettäviin kegeihin astioidun tuotteen. Monet anaerobiset absoluuttiset oluenpilaajabakteerit ovat hyvin sensitiivisiä hapelle ja jo vähäinenkin tuotteeseen liennut happi inhiboi niiden kasvun. Nämä obligatoriset anaerobit ovat siksi hyvin hankalia määrittää perinteisin viljelymenetelmin.

3.1 Gram-positiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit

Gram-positiivisiä bakteereita, erityisesti laktobasilleja, pidetään yleisesti panimoiden suurimman kontaminaatiouhan aiheuttavina mikrobeina. Nämä oluenpilaajabakteerit voivat aiheuttaa pH:n laskua tuottaessaan aineenvaihduntatuotteinaan orgaanisia happoja. Lisäksi ne voivat aiheuttaa sameutta, sakan muodostusta sekä lankamaisia proteiinikimppuja, engl. ”ropiness”. Tuotettuina virhemakuina esiintyy voimaista makua aiheuttavaa diasetyyliä, hunajaisuutta sekä hedelmäisyyttä. (Esmaeili, Mogharrabi, Safi, Sohrabvandi, Mortazavian, Bagheripoor-Fallah 2015, 66.)

3.1.1 *Lactobacillus*

Yleisimpiä *Lactobacillus*-suvun pilaajabakteereita ovat *L. brevis* ja *L. lindneri*. Harvemmin tavattavia *L. rossiae*, *L. buchneri*, *L. coryniformis*, *L. casei* ja *L. backii*. (Back 2009, 483.)

L. brevis on suvun tyypillisin kontaminantti ja yleisin astioidun tuotteen pilaaja. Bakteerit esiintyvät yleensä yksittäin tai pareittain, suorat tai käyrät sauvat ovat kooltaan n. 0,7x4 µm, mutta jopa 50 µm pitkiä soluja on tavattu. (Back 2009, 483.) *L. brevis* on tolerantti korkeille iso- α -happopitoisuuksille ja optimaalisinta kasvu on 30 °C lämpötilassa pH-alueella 4-6. (Esmaeli ym. 2015, 67.) Se kykenee fermentoimaan glukoosin ja maltoosin lisäksi pitkäketjuisia sokereita ja pilkkomaan arginiinia. *L. brevis* aiheuttaa lopputuotteelle kaasunmuodostusta, sameutta ja sakan muodostusta sekä pH:n laskua, josta seuraa myös maun happamoituminen. *L. buchneri* on ominaisuuksiltaan hyvin samankaltainen kuin *L. brevis*, mutta se kykenee fermentoimaan myös tiettyjä trisakkarideja. (Back 2009, 483)

L. lindneri esiintyy yleensä lyhyinä, hieman epäsäännöllisen muotoisina soluina järjestäytyneenä pitkiin ketjuihin. Se kykenee fermentoimaan glukoosia ja maltoosia, mutta ei kykene pilkkomaan arginiinia tai muita aminohappoketjuja. (Back 2009, 483.) Tyypillisiä vaikutuksia lopputuotteeseen ovat sameus ja sakan muodostuminen, mutta yleensä virhemakuja ei esiinny. *L. rossiae* on ominaisuuksiltaan samankaltainen ja muodostaa limaa. (Back 2009, 483.)

L. casei, *L. coryniformis* ja *L. plantarum* ovat lyhyitä sauvoja ja muodostavat ketjuja. Näitä esiintyy yleisemmin lievemmin katkerohumaloiduissa oluttyypeissä, kuten vehnäoluissa, ja ne muodostavat selkeän virhemaun aikaansaavaa diasetyyliä. *L. backii* eroaa muista laktobasilleista erityisesti kykenemättömyydellään fermentoida maltoosia ja glukonaattia. (Back 2009, 483.)

3.1.2 *Pediococcus*

Pediococcus damnosus on oluenpilaajabakteereista yleisimpiä (Esmaeili ym. 2015, 67) ja se muodostaa tyypillisesti tetrodeja, pienehköjä kokeille tyypillisiä klustereita. (Back 2009, 483.) *P. damnosus* on tolerantti korkeille katkeroainepeitoisuuksille (Esmaeili ym. 2015, 67) ja hyvin tyypillinen hiivakierron kontaminantti (Back 2009, 483). Vaikutuksina lopputuotteeseen sameus sekä runsas sedimentti ja lisäksi voimakas virhemakua aiheuttavan diasetyylin tuotto ja pH:n lasku. (Back 2009, 483.)

Muita tunnettuja *Pediococcus*-suvun oluenpilaajabakteereja ovat *P. inopinatus* ja limaa muodostava *P. clausenii*, jotka ovat ominaisuuksiltaan hyvin samankaltaisia kuin *P. damnosus*. Molemmat ovat huomattavasti vähemmän yleisesti tavattuja kontaminantteja. (Back 2009, 483.)

3.1.3 Muut Gram-positiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit

Muitakin oluessa esiintyviä Gram-positiivisia bakteereja on tavattu, joilla voi olla merkittäviä vaikutuksia lopputuotteen ominaisuuksiin. *Kocuria kristinae* (ent. *Micrococcus kristinae*) on fakultatiivinen anaerobi, jota voi esiintyä matalan alkoholi- ja iso- α -happopitoisuuden oluissa. Sen kasvu inhiboituu pH:n laskiessa alle arvon 4,5. Vaikutuksina lopputuotteeseen epätyypillinen hedelmäinen virhemaku. (Esmaeili ym. 2015, 67.)

3.2 Gram-negatiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit

Panimoteollisuuden prosessien ja hygienian parantuessa lopputuotteeseen liuenneen hapen määrä jää hyvin vähäiseksi ja aiemmin merkittävän riskin muodostaneiden *Acetobacteria* ja *Glucanobacteria*-sukujen etikkahappobakteerien aiheuttama oluen pilaantuminen on hyvin vähäistä. (Ashtavinayak, Hill 2016, 204.) Hapelle sensitiiviset obligatoriset anaerobit muodostavat kuitenkin aiempaa suuremman riskin. (Ashtavinayak, Hill 2016, 204.)

3.2.1 *Megasphaera*

Megasphaera cerevisiae on halkaisijaltaan 1,2-1,6 µm ovaali tai pyöreä kokki, joka esiintyy pareina tai lyhyissä ketjuissa. Obligatorisena anaerobina se on hyvin hankala määrittää. Laji on sensitiivinen alkoholille ja kasvu inhiboituu alle 5 til.-% etanolipitoisuuksilla (Back 2009, 483.), mutta se on melko tolerantti korkeille iso- α -happopitoisuuksille. (Esmaeili ym. 2015, 67.) Se kykenee fermentoimaan fruktoosia, pyruviinihappoa sekä maitohappoa. Aineenvaihduntatuotteina esiintyy voi-happoa, etikkahappoa, 5- ja 6-hiiliketjuisia aminohappoja sekä hiilidioksidia, vetyä ja divetyysulfidia, joka aiheuttaa hyvin epämiellyttävän tuoksun ja maun. (Esmaeili ym. 2015, 67.) Vaikutukset oluen ulkonäköön ovat vähäisiä ja sameutta voi esiintyä. (Back 2009, 483.)

3.2.2 *Pectinatus*

Pectinatus cerevisiophilus ja *P. frisingensis* ovat obligatorisia anaerobeja ja niillä on samankaltaisia vaikutuksia lopputuotteeseen kuin *Megasphaera*-suvun bakteereilla. Motiilit solut ovat tyypillisesti ohuita, n. 0,8x4 µm, käyriä, käärmemäisiä tai korkkiruuvimaisia ja ne käyttävät liikkumiseen flagelloja. Kasvu on mahdollista välillä 15-40 °C optimaalisen kasvun alueen osuessa alueelle 28-32 °C. Kasvu inhiboituu oluen pH-arvon alittaessa 4,3 ja alkoholipitoisuuden ylittäessä 5,0 til.-% etanolia. Suvun bakteerit kykenevät fermentoimaan monia erilaisia sokereita, sokerialkoholeja ja orgaanisia happoja. Pääasiallisina aineenvaihduntatuotteina

tuotetaan propionihappoa, etikkahappoa ja asetoimia sekä hiilidioksidia ja rikkiyhdisteitä. Vaikutuksina lopputuotteeseen voimakasta sameutta ja sakkaa sekä hyvin epämiellyttävä viemärimäinen tuoksu ja maku. (Back 2015, 484.) Bakteeria on panimoympäristössä tavattu viemärijärjestelmien lisäksi lattian halkeamista (Juvonen 2015, 199.), joten esiintyminen panimon viemäreissä on hyvin odotettavaa.

3.2.3 Muut Gram-negatiiviset anaerobiset oluenpilaajabakteerit

Zymomonas mobilis on fakultatiivinen anaerobi, jota tavataan pääasiassa sekundääristä pullokäymistä hyödyntävissä ale-tyyppisissä oluissa. Morfologialtaan ne ovat lyhyitä paksuja sauvoja ja esiintyvät yksittäin, pareissa ja joskus ketjuissa tai roseteissa. (Ashtavinayak, Hill 2016, 197.) *Z. mobilis* on etanolitolerantti 10 til.-%:in asti, optimaalisen kasvun alue on pH-arvon ollessa yli 3,4 ja lämpötilan ollessa alueella 25-30 °C. Ne kykenevät fermentoimaan glukoosia, fruktoosia ja muita monomeerisokereita, mutta eivät maltoosia ja maltotriooseja. (Ashtavinayak, Hill 2016, 197.) Vaikutuksina lopputuotteeseen asetaldehydin tuotannosta johtuva mätää omenaa muistuttava hedelmäinen tuoksu sekä mädän kananmunan ja viemäriaromeita rikkiyhdisteistä johtuen. (Ashtavinayak, Hill 2016, 198.)

Enterobacteriaceae-suvun bakteerit ovat fakultatiivisia anaerobeja, jotka toimivat lähinnä indikaattorimikrobeina puutteellisesta hygieniasta valmistusprosessissa eivätkä aiheuta suurta riskiä lopputuotteen laadulle. Ne voivat kuitenkin kasvaa vierteessä ja aiheuttaa tätä kautta ei-toivottuja virhemakua lopputuotteeseen. (Ashtavinayak, Hill 2016, 199.)

4 KOKEELLISEN OSAN SUORITUS

4.1 Näytteenotto, näytteiden rikastus ja maljaviljelyt

Tutkimuskohteiksi valittiin neljä lattiakaivoa, jotka muodostavat sijainnillaan merkittävän riskin lopputuotteiden laadulle sijaiten lähellä tankkien letkuliitäntöjä ja astiointilaitteistoa. Viemäreistä otettiin 2 ml näytettä tarkoitukseen rakennetulla näytteenottimella ja näyte siirrettiin rikastusliuoksena käytettyyn olueen.

Rikastukseen käytettiin olutta selektiivisyytensä vuoksi. Suoraan kasvatusalustalle suspensoituna jätevedestä olisi alustalle kasvanut myös muita, kuin olutta pilaamaan kykeneviä mikrobeja ja myös mahdollisia patogeenejä. Rikastukseen käytetty olut valittiin tarkoin panimon tuotteista, makea ja 4,2 til.-% etanolia sisältävä stout-tyyppinen olut sisältää runsaasti sokereita mikrobien ravinnoksi ja sen matala etanoli- ja katkeroainepitoisuus ei inhiboi oluenpilaajamikrobien kasvua.

Jätevedellä terästettyä olutta inkuboitiin steriileissä astioissa 33° C lämpötilassa inkubaattorissa 4 vrk, jonka jälkeen näytteitä siirrostettiin maljoille. Kasvatusmaljojen elatusaineina oli käytössä Universal Beer Agar (UBA) ja Yeast & Mold agar (YM) kuparisulfaatilla. Maljoja inkuboitiin anaerobisissa oloissa 33° C lämpötilassa inkubaattorissa 3 vrk, jonka jälkeen maljoja tarkasteltiin aistinvaraisesti ja analysoitiin mikroskopoimalla.

4.2 Työssä käytetyt kasvatusalustat

Universal Beer agar on semi-selektiivinen olutta sisältävä kasvatusalusta, jossa kykenevät kasvamaan yleisimmät oluenpilaajabakteerit sekä villihiivat. Kasvatusalustaan lisätty antibiootti sykloheksimidi inhiboi hiivojen ja homeiden kasvun. (Dalynn Biologicals 2014.) Bakteerien aineenvaihduntatuotteinaan tuottamat orgaaniset hapot muuttavat vihreän kasvatusalustan keltaiseksi kasvatusalustaan lisätyn pH-indikaattorin vaikutuksesta.

Yeast & Mold agar (YM) kuparisulfaatilla on kasvatusalusta villihiivojen ja homeiden detektointiin. Kasvatusalustaan pieninä pitoisuuksina lisätty CuSO_4 inhiboi

Saccharomyces-sukuisten panimohiivojen kasvun, mutta sallii useimpien *Saccharomyces* ja ei-*Saccharomyces*-sukuisten villihiivojen kasvun. (Taylor, Marsh 1984, 134-145.)

4.3 Mikrobin tunnistaminen

Löydetyt mikrobit pyrittiin tunnistamaan havainnoimalla niiden ominaisuuksia. Bakteeripesäkkeistä valmistettiin mikroskoitavat Gram-värijätyt näytteet ja niiden morfologiaa tarkasteltiin kameralla varustetulla valomikroskoopilla. Lisäksi tutkittiin mahdollista hapontuottoa maljalla. Mikrobin tunnistamisen apuna voisi käyttää myös mikrobin aineenvaihdunnasta kertovia biokemiallisia katalaasi- ja oksidaasitestejä, mutta tässä työssä näin ei toimittu.

5 TULOKSET

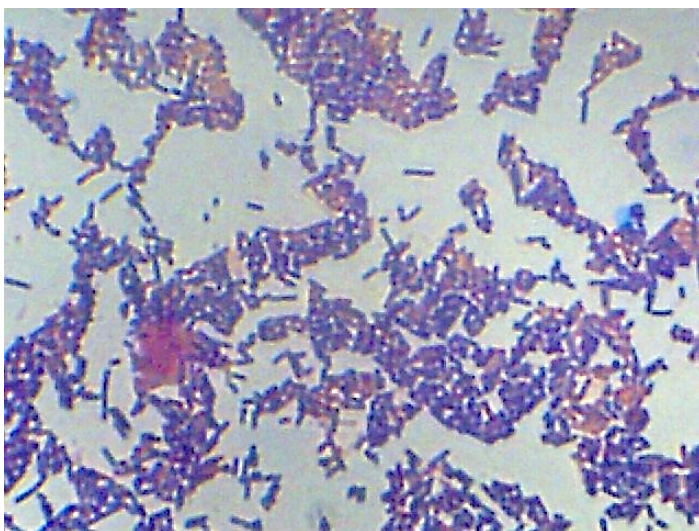
5.1 Viikko 1

Ensimmäiset 2 ml näytteet viemäreistä lisättiin rikastusliuokseen neljän vuorokauden ajaksi. Liuoksesta tehtiin maljaviljelyt, joita inkuboitiin 33 °C lämpötilassa 2 vuorokautta anaerobisissa oloissa. Ennen maljaviljelyiden tekoa viemäri 2:n rikastusliuoksessa havaittiin etikkahappobakteerille tyypillinen liuoksen pintaan kasvanut kalvo, eli biofilmi, ja etikan tuoksua. Maljaviljelyn anaerobiset olosuhteet olivat kuitenkin odotetusti onnistuneet, sillä Gram-negatiivisia aerobisia etikkahappobakteereita ei mikroskopoimalla löytynyt. Tuloksia esitellään taulukossa 1. Mikrobikasvuston määrää kuvaa yksikkö cfu/ml (colony forming units / ml) ja viiva merkitsee, ettei maljalla havaittu mikrobikasvustoa.

TAULUKKO 1. Viikon 1 viljelytulokset

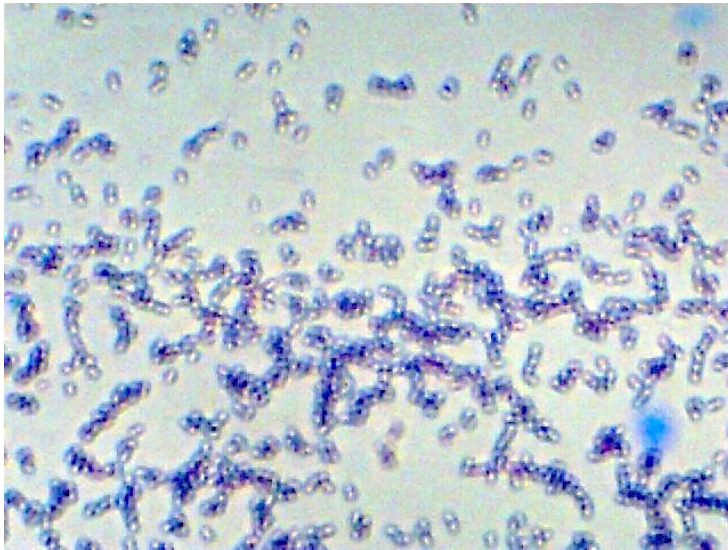
	VIEMÄRI 1	VIEMÄRI 2	VIEMÄRI 3	VIEMÄRI 4
UBA	-	800 cfu/ml	-	10k cfu/ml
YM	-	-	-	-

Viemäri 2 viljelyissä ilmeni maljalla kahta erilaista pesäkettä, molemmat Gram-positiivisia. Maljalla havaittiin hapontuottoa.



KUVA 1. Viemäri 2 valomikroskooppikuva, 1000x

Mikroskoopilla tarkasteltuna havaittiin pitkä sauvabakteeri, mahdollisesti *Lactobacillus*-suvun edustaja sekä jonoissa ja pienissä klustereissa kasvava kokki, joka on mahdollisesti *P. damnosus*, Näitä esitellään kuvassa 1.



KUVA 2. Viemäri 4 valomikroskooppikuva, 1000x

Viemäri 4:n UBA-maljalla havaittiin runsaasti kasvua ja hapontuottoa. Näytteestä havaittiin mikroskopoimalla Gram-positiivinen jonoja ja pieniä klustereita muodostava kokki, mahdollinen *P. damnosus* (KUVA 2.).

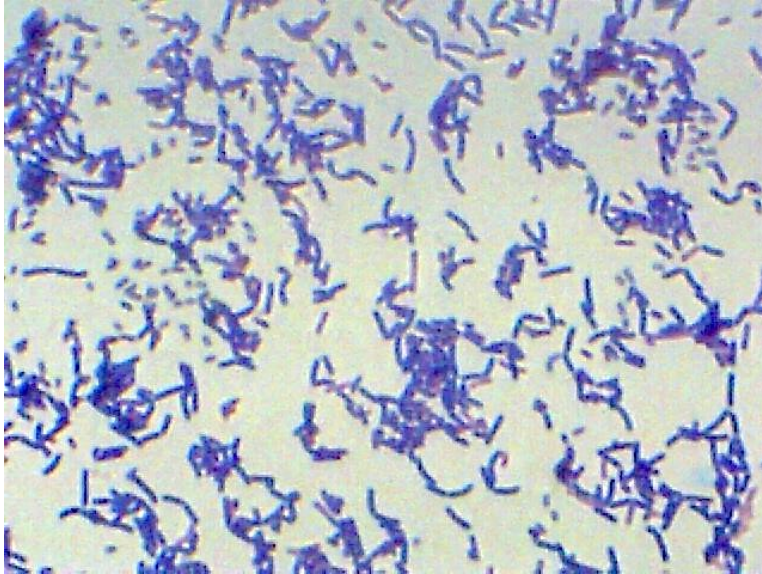
5.2 Viikko 2

Näytteenottohetkellä viemäriin 4 vieressä oli käynnissä astiointilaitteiston pesu ja pesuliuosta valui myös tutkittavaan viemäriin. Tuloksia esitellään taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Viikon 2 viljelytulokset

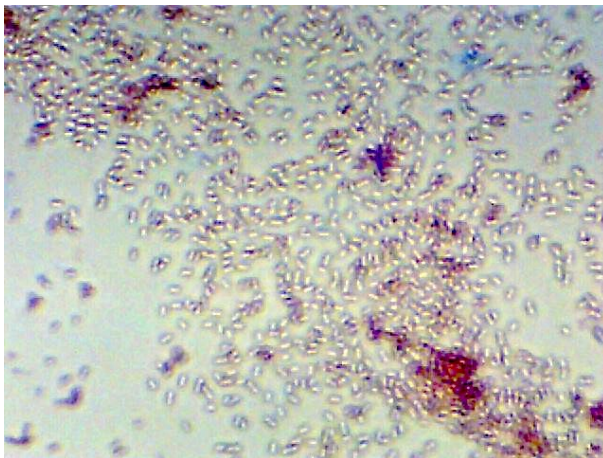
	VIEMÄRI 1	VIEMÄRI 2	VIEMÄRI 3	VIEMÄRI 4
UBA	>10k cfu/ml	>10k + 6 cfu/ml	>10k + 4 cfu/ml	>10k cfu/ml
YM	-	-	-	-

Viemäriin 1 viljelymaljalla oli runsasta kasvua ja hapontuottoa, pesäkkeitä mikroskopoitaessa havaittiin Gram-negatiivinen kokki, mahdollinen *M. cerevisiae*. Viemäriin 2 viljelymaljalla havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja kaksia eri näköisiä pesäkkeitä.



KUVA 3. Viemäri 2 valomikroskooppikuva, 1000x

Näytettä mikroskopoitaessa havaittiin Gram-negatiivinen kokki, mahdollinen *M. cerevisiae*, sekä Gram-positiivinen basilli, mahdollinen *Lactobacillus*, ja Gram-positiivinen kokki, mahdollinen *P. damnosus* (KUVA 3.).



KUVA 4. V4 valomikroskooppikuva, 1000x

Viemäriin 3 maljalla havaittiin runsaan kasvun lisäksi hapontuottoa. Pesäkkeistä tehtyjä näytteitä mikroskopoitaessa havaittiin Gram-positiivinen lyhyt basilli, mahdollinen *Lactobacillus*, Gram-positiivinen kaareva basilli, mahdollinen *Lactobacillus* ja Gram-negatiivinen kokki, mahdollinen *M. cerevisiae*. Viemäriin 4 maljalla

havaittiin runsasta kasvua ja hapontuottoa, pesäkkeitä mikroskopoitaessa havaittiin Gram-negatiivinen lyhyt basilli tai pareittain esiintyvä kokki, mahdollinen *M. cerevisiae* (KUVA 4.).

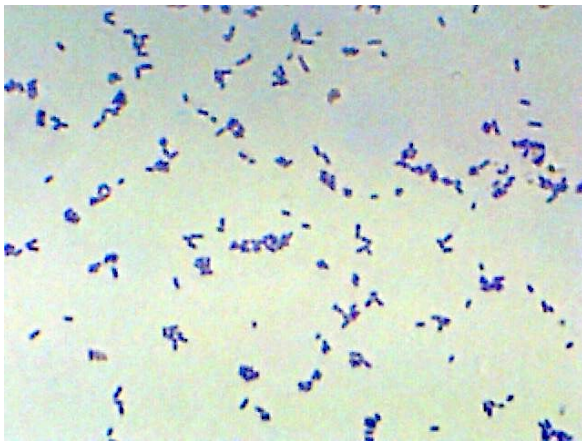
5.3 Viikko 3

Kaikkiin viemäreihin lisättiin n. 2 dl Orapi Enzym Clean -entsyymipesuainetta ja sen annettiin vaikuttaa 3 vrk, jonka jälkeen viemäreistä otettiin näytteet. Näytteitä rikastettiin 4 vrk ajan ja niistä tehtiin maljaviljelyt, tuloksia taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Viikon 3 viljelytulokset

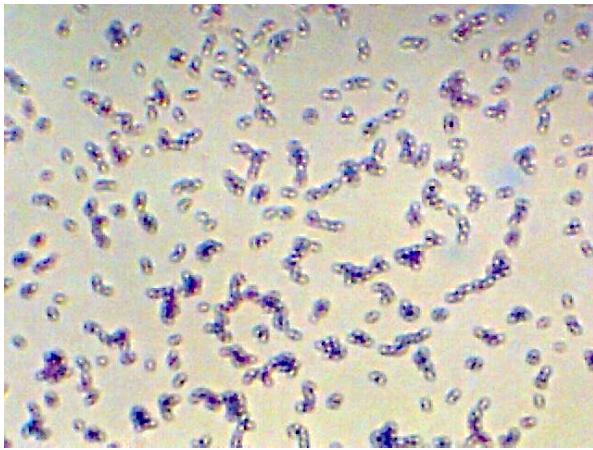
	VIEMÄRI 1	VIEMÄRI 2	VIEMÄRI 3	VIEMÄRI 4
UBA	-	-	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml
YM	-	-	120 cfu/ml	320 cfu/ml

Viemärien 1 ja 2 maljaviljelyissä ei havaittu kasvua. Viemäri 3:n UBA-maljalla havaittiin runsasta bakteerikasvua ja hapontuottoa.



KUVA 5. V3 valomikroskooppikuva, 1000x

Näytteitä mikroskopoimalla havaittiin Gram-positiivinen kokki, mahdollinen *P. damnosus* (KUVA 5.). YM-maljalta havaittiin villihiivapesäkkeitä.



KUVA 6. V4 valomikroskooppikuva, 1000x

Viemäriin 4 UBA-maljalta havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja näytettä mikroskopoimalla havaittiin Gram-positiivinen kokki, mahdollinen *P. damnosus* (KUVA 6.). YM-maljaa tarkastelemalla havaittiin villihiivapesäkkeitä.

5.4 Viikko 4

Kaikkiin viemäriin lisättiin n. 2 dl Orapi Enzym Clean -entsyymipesuainetta ja sen annettiin vaikuttaa 3 vrk, jonka jälkeen viemäreistä otettiin näytteet. Näytteitä rikastettiin 4 vrk ajan ja niistä tehtiin maljaviljelyt, tuloksia taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Viikon 4 viljelytulokset

	VIEMÄRI 1	VIEMÄRI 2	VIEMÄRI 3	VIEMÄRI 4
UBA	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml
YM	-	-	-	-

Viemäriin 1 näytteen maljaviljelyistä havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja näytettä mikroskopoimalla pareittain esiintyvä Gram-positiivinen kokki, mahdollinen *P. damnosus*. Viemäriin 2 näytteen maljaviljelyistä havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja näytettä mikroskopoimalla Gram-positiivinen kokki, mahdollisesti *P. damnosus*. Viemäriin 3 näytteen maljaviljelyistä havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja näytettä mikroskopoimalla pareittain esiintyvä Gram-negatiivinen kokki, mahdollisesti *M. cerevisiae*. Viemäriin 4 näytteen maljaviljelyistä havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja näytettä mikroskopoimalla pareittain esiintyvä Gram-positiivinen kokki, mahdollisesti *P. damnosus*.

5.5 Viikko 5

2 ml näytteet viemäreistä lisättiin rikastusliuokseen viiden vuorokauden ajaksi. Liuoksesta tehtiin maljaviljelyt, joita inkuboitiin 33 °C lämpötilassa 2 vuorokautta anaerobisissa oloissa. Tuloksia esitellään taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Viikon 5 viljelytulokset

	VIEMÄRI 1	VIEMÄRI 2	VIEMÄRI 3	VIEMÄRI 4
UBA	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml
YM	-	-	-	-

Viemäriin 1 UBA-maljalla havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja pesäkkeitä mikroskopoimalla Gram-negatiivinen kokki, mahdollisesti *M. cerevisiae*. Viemäriin 2 UBA-maljalla havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja pesäkkeitä mikroskopoimalla Gram-positiivinen kokki, mahdollisesti *P. damnosus*. Viemäriin 3 UBA-maljalla havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja pesäkkeitä mikroskopoimalla havaittiin Gram-negatiivinen lyhyt ja paksu basilli, mahdollisesti *P. cerevisiophilus* tai *Z. mobilis*. Viemäriin 4 UBA-maljalla havaittiin runsasta kasvua, hapontuottoa ja pesäkkeitä mikroskopoimalla havaittiin Gram-negatiivinen kokki, mahdollinen *M. cerevisiae* ja basilli, mahdollinen *P. cerevisiophilus* tai *Z. mobilis*.

5.6 Viikko 6

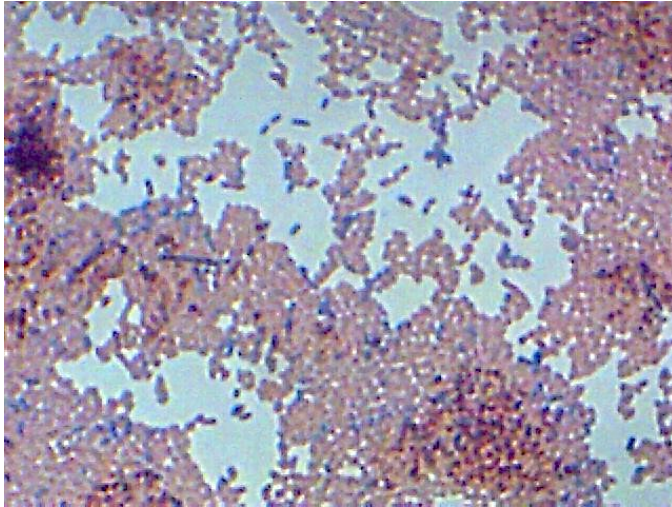
Kaikkiin viemäriin lisättiin n. 2 dl Orapi Enzym Clean -entsyymipesuainetta ja sen annettiin vaikuttaa 3 vrk, jonka jälkeen viemäreistä otettiin näytteet. Näytteitä rikastettiin 4 vrk ajan ja niistä tehtiin maljaviljelyt, tuloksia taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Viikon 6 viljelytulokset

	VIEMÄRI 1	VIEMÄRI 2	VIEMÄRI 3	VIEMÄRI 4
UBA	-	-	>10k cfu/ml	>10k cfu/ml
YM	-	-	6 cfu/ml	1000 cfu/ml

Viemärien 1 ja 2 maljaviljelyissä ei havaittu kasvua. Viemäriin 3 UBA-maljalla havaittiin runsasta bakteerikasvustoa ja hapontuottoa. Pesäkkeitä mikroskopoimalla havaittiin Gram-negatiivinen sauva, mahdollinen *P. cerevisiophilus*, ja

Gram-positiivinen pitkä sauva, todennäköinen *Lactobacillus*. YM-maljalla havaittiin pieniä määriä villihiivapesäkkeitä.



KUVA 7. V4 valomikroskooppikuva, 1000x

Viemäriin 4 UBA-maljalla havaittiin runsasta kasvustoa kaksina erilaisina pesäkkeinä sekä runsasta hapontuottoa. Pesäkkeitä mikroskopoimalla havaittiin Gram-negatiivinen kokki, mahdollisesti *M. cerevisiae*, ja Gram-positiivinen sauva jonoissa, todennäköisesti *Lactobacillus* (KUVA 7.). Viemäriin 4 YM-maljalla havaittiin erittäin runsasta villihiivan kasvua.

5.7 Tulosten arviointi

Pesujen tehokkuutta arvioitiin vertaamalla mikrobikasvustojen kokonaismäärää pesuja ennen ja niiden jälkeisenä aikana. Tuloksista muodostettiin pylväsdiagrammit, kuviot 1 ja 2.



KUVIO 1. Viljelyiden bakteeripesäkkeiden kokonaismäärä (cfu/ml)

Saatujen tulosten perusteella voidaan arvioida, ettei säännöllisillä pesuilla ole suurta merkitystä bakteerikasvustojen määrään. Vaikuttaisi kuitenkin siltä, että tauon jälkeen aloitettujen viemäripesujen jälkeen bakteerien määrä hieman putoaisi.



KUVIO 2. Viljelyiden villihiivapesäkkeiden kokonaismäärä (cfu/ml)

Villihiivapesäkkeiden määrää bakteeripesäkkeisiin eri ajankohtina verrattaessa voidaan havaita, että bakteerien määrän vähentyessä vapautunut ekolokero antaa tilaa villihiivojen kasvulle. Luotettavampien tulosten saaminen vaatisi kuitenkin lisätutkimuksia pidemmällä aikavälillä. Mikroskoopilla mahdollisesti useammasta näytteestä tunnistetun *P. cerevisiophiluksen* havaitsemiseen pitää suhtautua varauksella, se on erittäin hankala määrittää perinteisin menetelmin ja herkkä pienillekin happipitoisuuksille. (Back 2015, 484.)

6 POHDINTA

Saatujen tulosten perusteella voidaan arvioida tutkittujen viemäreiden muodostavan merkittävän mikrobikontaminaation riskin panimon lopputuotteiden laadulle. Tulosten perusteella voidaan myös arvioida, ettei viemäreiden säännöllinen peseminen kuitenkaan pienennä mikrobiologista riskiä niin paljon, että säännöllisten pesujen jatkaminen olisi suositeltavaa. Tarkempien tulosten saaminen vaatisi kuitenkin jatkotutkimuksia ja jo mahdollisten hajuhaittojen poistamiseksi viemäreiden satunnainen pesu on kannattavaa.

Panimon viemäriin valuu usein ja säännöllisesti ravintopitoista nestettä mikrobeille ja ne muodostavat oivallisen ympäristön bakteerien ja villihiivojen kasvulle. Kontaminaation uhka on siis merkittävä, mutta letkuliitäntöjen huolellisella suojaamisella ja roiskeiden, eli biosprayn, minimoimisella saavutetaan riittävä suoja viemäreiden muodostamaa uhkaa vastaan.

Mikrobien tarkka tunnistaminen on perinteisillä menetelmillä hankalaa. Moderneja DNA-seulontaan perustuvia PCR-laitteistoja on tarjolla myös panimoteollisuuden tarpeisiin räätälöitynä. Laitteistojen korkea hinta muodostaa kuitenkin esteen pienille ja keskisuurille panimoille, mutta analyysipalveluita voi myös ostaa. Näissä analyyseissä näytteiden rikastus vie aikaa useita päiviä, mutta pesäkeistä tehdystä analyysistä saa tulokset parissa tunnissa. (Pall Corporation, Genedisc tuotesivu, 2019.)

Bakteeri- ja villihiivakontaminaatiot muodostavat panimoteollisuudelle merkittävän uhan ja pahimmillaan kontaminaatio johtaa koko erän hävittämiseen. Suuria taloudellisia menetyksiä tulee myös karanteenissa olevan kontaminoituneen erän varastoinnista ja pahimmassa tapauksessa jakeluun ehtineen pilaantuneen tuotteen myötä panimon maine voi kärsiä. Astioitujen oluiden pastörinti, eli kuumentaminen korkeisiin lämpötiloihin, pienentää riskiä hyvin vähäiselle tasolle (Juvenen 2015, 195.), mutta pastöroinnilla voi olla vaikutuksia myös oluen makuun.

LÄHTEET

Ashtavinayak, P., Hill, A. E. 2016. Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*.

Dalynn Biologicals. 2013. Tuoteseloste. Universal Beer Agar (UBA). Luettu 24.4.2019. https://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/PU65.pdf

Esmaeili, S., Mogharrabi, M., Safi, F., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., Bagheripoor-Fallah, N. 2015. The Common Spoilage Microorganisms of Beer: Occurrence, Defects, and Determination - a Review.

Juvonen, R. Koonnut Hill, A. E. 2015. Brewing Microbiology. Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781782423317010029>

Pall Corporation. GeneDisc PCR -tuotesivut. Luettu 26.4.2019. <https://food-beverage.pall.com/en/landing/beer-spoilage.htm>

Sakamoto, S., Konings, W. N. 2003. Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89 (2-3), 105-124. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001533>

Taylor, G. T., Marsh, A. S. 1984. *Journal of the Institute of Brewing*.

Tenge, C., Burberg, F., Zamkow, M., Back, W. Koonnut Eßlinger H. M. 2009. *Handbook of Brewing*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolwerton, C. J. 2008. Prescott, Harley, and Klein's *Microbiology*. Seventh Edition. New York: McGraw-Hill