

---

**OLUEN KÄYMISEN PILAAJAMIKROBIT:  
DIAGNOSTIIKKA qPCR-TEKNIKALLA**



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö  
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Hämeenlinna, kevät 2015

*Sari-Johanna Järvinen*

Sari-Johanna Järvinen



## VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma  
Elintarviketeknologia

---

|                  |  |                   |
|------------------|--|-------------------|
| <b>Tekijä</b>    | Sari-Johanna Järvinen  | <b>Vuosi</b> 2015 |
| <b>Työn nimi</b> | Oluen käymisen pilaajamikrobit: diagnostiikka qPCR-tekniikalla |                   |

---

## TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyön aiheena ovat pilaajamikrobit oluen käymisen eri vaiheissa ja mikrobien diagnostiikka PCR-tekniikkaa hyväksi käyttäen. Kirjallisuusosiossa keskitytään potentiaalsiin oluen pilaajamikrobeihin, maitohappobakteereihin ja gram-negatiivisiin anaerobeihin.

Opinnäytetyön tavoitteena oli paikantaa kontaminaatiolähde oluen valmistusprosessissa Oy Hartwall Ab:n Lahden tehtaalla. Aihe rajattiin oluen käymiseen, jotta päästiin mahdollisimman suureen näytemäärään tutkitun prosessivaiheen osalta. Toimeksiannon tavoitteena oli löytää ja tunnistaa prosessissa mahdollisesti hyvin pieninä määrinä esiintyvät oluenpilaajabakteerit, löytää bakteerien alkuperä sekä kohdistaa korjaavat toimenpiteet oikeisiin kohteisiin, esimerkiksi tehostetut pesu- ja hygieniatoimenpiteet.

Mikrobiologisessa laadunvalvonnassa maljakasvatuksen rinnalle on kehitetty uusia sovelluksia, kuten PCR (*Polymerase Chain Reaction*), joka nopeuttaa ja yksinkertaistaa mikrobien tunnistamista. Opinnäytetyöhön sisältyi näytteenotto prosessista, näytteiden rikastusviljely sekä analysointi qPCR-laitteistolla (*Quantitative PCR*). Opinnäytetyössä kerättiin yhteensä 71 näytettä, joista 15 oli vierrenäytteitä, 32 suodatusnäytteitä ja 24 CO<sub>2</sub>-näytteitä.

Panimokontaminantteja löytyi seuraavasti: yksi vierteestä (*L.buchneri*), yksi suodatusvaiheesta (*L.casei*) ja 12 käymistankkien CO<sub>2</sub>-linjoilta (*L.casei*, *L.brevis*). Osoitetuista kontaminanteista kaikki ovat mahdollisia oluenpilaajia, *L.brevis* merkittävin. Herkemmillä osoitusmenetelmillä ei prosessista löydetty vakavia kontaminaatioita. Johtopäätös oli, että tehtaan omavalvonta toimii hyvin. Laadunvalvontaa voidaan kehittää parantamalla CO<sub>2</sub>-linjojen ja näytteenoton hygieniakäytäntöjä.

**Avainsanat** panimokontaminantit, olut, qPCR

**Sivut** 38 s. + liitteet 1 s.

Visamäki  
Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering  
Food Technology

---

|                                     |   |                  |
|-------------------------------------|---|------------------|
| <b>Author</b>                       | Sari-Johanna Järvinen   | <b>Year</b> 2015 |
| <b>Subject of Bachelor's thesis</b> | Spoiling microorganisms in beer fermentation:<br>detection and identification with qPCR |                  |

---

## ABSTRACT

The purpose of this Bachelor's thesis was to study beer-spoiling microbes at different stages of beer fermentation and microbial diagnostics with PCR technology. The literature section focuses on the potential spoiling organisms, lactic acid bacteria and gram-negative anaerobic bacteria.

The aim of the study was to locate the source of contamination in the manufacturing process in Hartwall Ltd brewery. The subject was limited to beer fermentation to get the greatest possible quantity of samples at the stage of the process. The aim was to detect and identify beer spoiling bacteria, to find the origin of the contamination, and also to target remedial measures to correct locations, for example enhanced cleaning and hygiene measures.

New applications, such as PCR (*Polymerase Chain Reaction*), have been developed for the microbiological quality control in order to speed up and to simplify the identification of the spoiling organisms. The thesis included sampling in the process, the enrichment culture of the samples as well as the analysis with qPCR instrument (*Quantitative PCR*). The total of 71 samples was collected: 15 samples from the wort, 32 from the filtering step and 24 samples from the CO<sub>2</sub> lines of the fermentation tanks.

As a result of the study brewery contaminants were found as follows: one from the wort (*L.buchneri*), one from the filtering step (*L.casei*) and 12 from the CO<sub>2</sub> lines (*L.casei*, *L.brevis*). The detected contaminants are all potential beer spoilers, *L.brevis* the most significant. No serious contamination in the process was found by the more sensitive detection methods. It was concluded that the self-monitoring is working well. The quality control can be developed by improving the CO<sub>2</sub> sampling lines and hygiene practices.

**Keywords** beer-spoiling organisms, beer, qPCR

**Pages** 38 p. + appendices 1 p.

# SISÄLLYS

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | JOHDANTO.....  | 1  |
| 2       | TYÖN TAVOITTEET .....  | 2  |
| 3       | PANIMOKONTAMINANTIT.....   | 2  |
| 3.1     | Panimokontaminanttien luokittelu pilaamiskyvyn mukaan .....              | 3  |
| 3.1.1   | Absoluuttiset pilaajaorganismit .....                                    | 3  |
| 3.1.2   | Potentiaaliset pilaajaorganismit.....                                    | 4  |
| 3.1.3   | Välilliset pilaajaorganismit.....  | 4  |
| 3.1.4   | Indikaattoriorganismit ja latentit organismit .....                      | 4  |
| 3.2     | Jaottelu gram-positiivisiin ja gram-negatiivisiin kontaminantteihin..... | 4  |
| 3.2.1   | Gram-positiiviset bakteerit .....  | 5  |
| 3.2.1.1 | <i>Lactobacillus</i> .....   | 5  |
| 3.2.1.2 | <i>Pediococcus</i> .....   | 6  |
| 3.2.1.3 | Muut gram-positiiviset bakteerit .....                                   | 6  |
| 3.2.2   | Gram-negatiiviset bakteerit .....  | 7  |
| 3.2.2.1 | <i>Pectinatus</i> .....  | 7  |
| 3.2.2.2 | <i>Megasphaera</i> .....   | 8  |
| 3.2.2.3 | Etikkahappobakteerit ja muut gram-negatiiviset bakteerilajit.....        | 9  |
| 3.3     | Kontaminaatiolähteet .....   | 9  |
| 4       | OLUEN LAADUNVALVONTA JA -MENETELMÄT .....                                | 9  |
| 4.1     | Elatusaineet .....   | 10 |
| 4.2     | Lajin tunnistus .....  | 11 |
| 5       | PCR-TEKNIikka .....  | 12 |
| 5.1     | PCR-tutkimuksen periaate.....  | 12 |
| 5.2     | Quantitative PCR.....  | 13 |
| 5.3     | LightCycler-analysointilaitteen periaate .....                           | 13 |
| 6       | PCR:N SOVELTAMINEN OLUEN KONTAMINANTTIEN OSOITTAMISEEN 14                |    |
| 6.1     | Gram-negatiivisten panimokontaminanttien osoittaminen .....              | 14 |
| 6.1.1   | BREWPROC-hanke: PCR-geeli, PCR-ELISA ja qPCR vertailussa.....            | 16 |
| 6.1.1.1 | Panimokontaminanttien tunnistaminen BREWPROC-menetelmin .....            | 17 |
| 6.1.1.2 | Ryhmäspesifiset seulontatestit BREWPROC-projektissa.....                 | 17 |
| 6.1.1.3 | Laji- ja sukuspesifiset menetelmät BREWPROC-projektissa.....             | 18 |
| 6.1.1.4 | DNA:n valmistus suodattuvista ja ei-suodattuvista panimonäytteistä ..    | 19 |
| 6.1.1.5 | BREWPROC-hankkeen päätelmät ja PCR-menetelmien tulevaisuus ..            | 20 |
| 6.2     | Gram-positiivisten panimokontaminanttien osoittaminen .....              | 21 |
| 6.3     | Multiplex-PCR .....  | 22 |
| 7       | TYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS.....   | 23 |
| 7.1     | Näytteenottosuunnitelma.....   | 23 |
| 7.2     | Näytteenotto ja esikäsittely .....                                       | 24 |
| 7.3     | Työssä käytetty PCR-menetelmä ja PCR-kitti .....                         | 26 |
| 7.4     | Näytteiden valmistus ja ajo qPCR-analysointilaitteella.....              | 27 |

---

|   |    |
|---|----|
| 8 TULOKSET .....                            | 31 |
| 9 JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTOIMENPITEET ..... | 34 |
| 10 POHDINTA.....                            | 34 |
| LÄHTEET .....                               | 36 |

Liite 1      PROSESSIKAAVIO: VIERRE-KÄYMISTANKKI-PUSKURITANKKI

## 1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön aiheina ovat pilaajamikrobit oluen käymisen eri vaiheissa ja mikrobien diagnostiikka PCR-tekniikkaa hyväksikäyttäen. Työssä keskitytään potentiaalsiin oluen pilaajamikrobeihin, maitohappobakteereihin ja gram-negatiivisiin anaerobeihin. Villihiivoja ei tässä opinnäytetyössä tutkita. Työn toimeksiantajana on Hartwallin panimo Lahdessa.

Oy Hartwall Ab oli osa Heineken-konsernia ennen siirtymistään tanskalaisen Royal Unibrew'n omistukseen vuonna 2013. Hartwallin pääkonttori sijaitsee Helsingissä ja tehdas Lahdessa (kuva 1). Hartwallin tuotevalikoimaan kuuluu oluita, siidereitä ja long drink -juomia, pullotettuja vesiä, virvoitusjuomia, mehuja ja erikoisjuomia sekä tytäryhtiö Hartwa-Traden kautta viinejä ja muita alkoholijuomia. Hartwallin liikevaihto vuoden 2011 lopussa oli 280 M€ ja henkilöstöä n. 870 (Hartwall n.d., Taloussanomat n.d.).



Kuva 1. Lahden tehdas valmistui vuonna 2003 (HighTech Finland n.d.).

Olutta pilaavat mikrobit ovat olleet panimoteollisuuden ongelmana vuosikymmeniä. Pilaajamikrobeihin kuuluu sekä gram-positiivisia (esim. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* ja *Pediococcus damnosus*) että gram-negatiivisia bakteereita (*Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis* ja *Megasphaera cerevisiae*). Ne pilaavat olutta aiheuttamalla siihen sameutta, happamuutta ja epätoivottuja aromeja kuten diasetyyliä ja rikkivetyä. Koliformit *Megasphaera* ja *Pectinatus* ovat obligatorisia eli ehdottomia anaerobeja ja siksi hankalasti osoitettavia. Mikrobiologisessa laadunvalvonnassa perinteisen maljakasvatuksen rinnalle on kehitetty uusia bioteknisiä sovelluksia, kuten ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (entsyymivälitteinen määrittely) ja PCR, *Polymerase Chain Reaction*. Kontaminantin osoittamisen lisäksi on selvitettävä, kuuluuko löydetty mikrobi potentiaalsiin pilaajaorganismeihin ja voiko bakteeri lisääntyä oluessa. (Sakamoto & Konings 2003.)

Oluen säilyvyyteen vaikuttavat monet tekijät, kuten humalan yhdisteet, alkoholi- ja hiilidioksidipitoisuus, hapen puute ja matala pH. Grampositiiviset maitohappobakteerit, *Lactobacillukset* kestävät humalan yhdisteitä, iso- $\alpha$ -happoja ja kykenevät niiden läsnäollessakin kasvamaan ja lisääntymään oluessa. *L. brevis* ja *L. lindneri* ovat voimakkaita pilaajaorganismeja, *L. casei* ja *L. buchneri* heikompia. *Pectinatus*- ja *Megasphaera*-sukujen kaikki tutkitut kannat, lukuun ottamatta *M. elsdeniä* kuuluvat potentiaalisiiin pilaajaorganismeihin, joten niiden tunnistaminen sukutasolla riittää. Nykyisin vallitseva oluttrendi, matala alkoholiprosentti, happipitoisuus ja katkeruus, muodostaa merkittävän riskin oluen laadulle. Erityisesti gram-negatiivisten bakteerien tutkimus voi olla tämän riskin pienentämiseksi varsin hyödyllistä. (Sakamoto & Konings 2003.)

## 2 TYÖN TAVOITTEET

Opinnäytetyön tavoitteena oli paikantaa kontaminaatiolähde oluen valmistusprosessissa Oy Hartwall Ab:n Lahden tehtaalla. Kontaminaatioepäilyt olivat siellä kohdistuneet käymisvaiheen lisäksi tölkitykseen. Aihe rajattiin oluen käymiseen, jotta päästiin mahdollisimman suureen näytemäärään ko. prosessivaiheen osalta. Ongelmana oli ollut kontaminaation ajoittainen ilmeneminen prosessissa.

Toimeksiannon tavoitteena oli löytää ja tunnistaa oluen valmistusprosessissa mahdollisesti hyvin pieninä määrinä esiintyvät oluenpilaajabakteerit, löytää bakteerien alkuperä sekä kohdistaa korjaavat toimenpiteet oikeisiin kohteisiin, esimerkiksi tehostetut pesu- ja hygieniatoimenpiteet. Työssä hyödynnettiin PCR-tekniikkaa, aiempaa suurempaa näytemäärää sekä samanaikaista analysointia tuotantoketjussa. Näytepisteet valittiin aiempien tutkimustulosten perusteella ja siksi, että kyseisissä kohteissa oli aiemmin esiintynyt harvakseltaan mikrobeja. Prosessin alkupään mikrobit kulkeutuvat loppupäähän ja voivat lisääntyä matkalla. Varmistamalla prosessin alkupään puhtaus voidaan ehkäistä mikrobien leviämistä prosessissa.

Prosessin alkupäästä vierteen valmistuksesta ei ollut aiempia PCR-tuloksia. Pidemmällä kasvatusajalla pyrittiin löytämään mahdolliset hitaasti kasvavat bakteerit. Työn riski oli, että mikrobeja ei saada kasvamaan viljelyssä/rikastuksessa tai niitä ei löydetä.

## 3 PANIMOKONTAMINANTIT

Panimoprosessi itsessään on altis erilaisten mikro-organismien kasvulle, sillä vierre ja panimohiiva tarjoavat ravinteikkaan kasvualustan erilaisille bakteereille ja villihiivoille. Lisäksi suhteellisen pitkäkestoinen valmistusprosessi vierteen keitosta eri käymisvaiheiden kautta pullotukseen tarjoaa ei-toivotuille mikrobeille runsaasti aikaa kehittyä, mikäli ne saavat tilaisuuden. (Storgårds 2000, 13.) Vierteen keitto steriloi vierteen. Priestin ym. (2003) mukaan vain jotkin itiöitä muodostavat *Bacillus*- ja *Clostridium*-sukujen bakteerit selviytyvät keitosta, mutta niiden kasvu inhiboituu pääkäymisen alussa. Vierteen mikrobiologista puhtautta uhkaavat ongelmat alkavat vasta keiton jälkeen, kun vierre jäähdytetään selkeyttämisen jäl-

keen. Kriittisin piste on jäädytyn, jäädyttimen ulostulo ja putkisto. (Lehtonen 2012, 46.) Astioiden, laitteistojen ja muiden pintojen puhtaus vaikuttaa ratkaisevasti lopputuotteen laatuun. Oluen valmistus ja astiointi tapahtuu pääasiassa suljetuissa systeemeissä, joissa käytetään CIP-pesuja (cleaning-in-place). Pitkät ajot pesujen välillä mahdollistavat bakteerikasvustojen kertymisen pinnoille. Flemmingin ym. (1992) mukaan biofilmit muodostuvat, kun kiinnittyneet mikro-organismit erittävät solunulkoisia polymeerejä kuten polysakkarideja ja glykoproteiineja. LeChevallier ym. (1988) ovat esittäneet, että polymeerialustaan juurtuneet mikrobit ovat useiden tutkimusten mukaan vastustuskykyisiä pesulle ja desinfioinnille. Biofilmejä esiintyy pääasiallisesti niillä tuotantoalueilla, jotka ovat kaikkein vaikeimpia pestä ja desinfioida, ja joista on yleensä myös vaikea saada otetuksi näytteitä. (Storgårds 2000, 13–14.)

Valmis olut on epäsuotuisa kasvualusta monille mikro-organismeille, johdun alkoholipitoisuudesta (0,5...10 til%), katkeruudesta eli iso- $\alpha$ -happopitoisuudesta (17...55 ppm), korkeasta hiilidioksidipitoisuudesta (n. 0,5 til%), matalasta pH:sta (3,8...4,7) ja alhaisesta happikonsentraatiosta (<0,1 ppm). Bunkerin (1955) mukaan oluessa on käymisen päätyttyä jäljellä vain hyvin vähän ravinteita, hiilihydraatteja ja aminohappoja, mistä syystä patogeenit, kuten *Salmonellae typhimurium* ja *Staphylococcus aureus*, eivät kykene kasvamaan oluessa. (Sakamoto & Konings 2003.) Myös suodatus, mahdollinen pastörointi ja varastointi alhaisessa lämpötilassa vähentävät kontaminaatoriskiä (Storgårds 2000, 15).

Oluessa vallitsevista olosuhteista huolimatta eräät mikro-organismit pystyvät lisääntymään oluessa aiheuttaen sameutta ja epämiellyttäviä muutoksia oluen flavoriin. Tämä heikentää lopputuotteen laatua ja sillä on merkittävä vaikutus panimoiden taloudelliseen tuottavuuteen. (Sakamoto & Konings 2003.)

### 3.1 Panimokontaminanttien luokittelu pilaamiskyvyn mukaan

Werner Back (1994) on jaotellut panimokontaminantit viiteen tyyppiin: absoluuttiset, potentiaaliset ja välilliset pilaajaorganismit, indikaattororganismit ja latentit organismit (Storgårds 2000, 15).

#### 3.1.1 Absoluuttiset pilaajaorganismit

Absoluuttiset pilaajaorganismit sietävät oluen selektiivisiä ominaisuuksia. Nämä organismit aiheuttavat olueen virhemakujen lisäksi sameutta tai saostumia. Backin (1994) mukaan tähän ryhmään kuuluvat muun muassa *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri*, *L. brevisimilis*, *L. frigidus*, *L. coryniformis*, *L. casei*, *Pediococcus damnosus*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *P. frisingensis*, *Megasphaera cerevisiae*, *Selenomonas lactificex* ja *Saccharomyces cerevisiae*. Maitohappobakteerien kasvu riippuu oluen pH:sta ja sen sisältämistä humalan yhdisteistä. Back (1994) esittää myös, että *Lactobacillus*-lajien joukossa voimakkaimpia pilaajia ovat obligaatit heterofermentatiiviset lajit kuten *L. brevis* ja *L. lindneri*, fakultatiiviset heterofermentatiiviset lajit sen sijaan ovat heikompia pilaajia. (Storgårds 2000, 16.)



### 3.1.2 Potentiaaliset pilaajaorganismit

Potentiaaliset pilaajaorganismit eivät normaalisti kasva oluessa. Kuitenkin oluet, joissa on korkea pH, matala humalapitoisuus, matala käymisaste, alhainen alkoholipitoisuus tai korkea happipitoisuus voivat olla näille organismeille herkkiä. Backin (1994) mukaan tähän kategoriaan kuuluvat esimerkiksi *L. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *L. raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus kristinae*, *Pediococcus inopinatus*, *Zymomonas mobilis*, *Z. raffinovorans* ja *Saccharomyces pastorianus*. (Storgårds 2000, 16.)

### 3.1.3 Välilliset pilaajaorganismit

Välilliset pilaajorganismit eivät kasva valmiissa oluessa, mutta ne voivat lisääntyä tietyissä prosessin vaiheissa ja aiheuttaa virhemakuja lopputuoteseen. Tyypillisesti niitä esiintyy hiivauksessa tai pääkäymisen alussa. Backin (1994) mukaan tähän ryhmään kuuluu enterobakteereita ja aerobisia villihiivoja sekä joitakin *Saccharomyces*-suvun villihiivoja. Hawthorne ym. (1991) ovat esittäneet, että välillisiin pilaajaorganismeihin voidaan lukea myös voihippoa muodostavat *Clostridium*-lajit, joita on eristetty vierteen valmistuksesta ja panimolisäaineista. (Storgårds 2000, 17.)

### 3.1.4 Indikaattoriorganismit ja latentit organismit

Backin (1994) mukaan indikaattoriorganismeja ovat muun muassa eräät etikkahappobakteerit ja aerobiset hiivat. Ne eivät pilaa lopputuotetta, mutta ilmentävät yleisesti pilaajaorganismien esiintymistä prosessissa ja kertovat huonosta prosessihygieniasta. Latenteilla organismeilla tarkoitetaan satunnaisesti esiintyviä mikrobeja, jotka voivat joissakin tapauksissa selviytyä prosessin läpi aina lopputuotteen asti. Myös ne kertovat huonosta prosessihygieniasta, sillä niiden alkuperä on kontaminoituneessa prosessivedessä. Tähän ryhmään kuuluu itiöitä muodostavia koliformeja sekä biofilmejä muodostavia bakteereja ja hiivoja. (Lehtonen 2012, 42.)

## 3.2 Jaottelu gram-positiivisiin ja gram-negatiivisiin kontaminantteihin

Panimoteollisuudelle haitallisimpia pilaajamikrobeita ovat gram-positiiviset fakultatiiviset aerobit, *Lactobacillus*- ja *Pediococcus*-sukuihin kuuluvat maitohappobakteerit. Ne aiheuttavat 70 % kaikista panimoteollisuudelle aiheutuneista mikrobiologisista vahingoista. Moderni panimoteknologia tavoittelee mahdollisimman matalaa oluen happikonsentraatiota, joka muodostaa lähes anaerobiset kasvuolosuhteet happiherkille bakteereille. Siksi aerobiset mikrobit eivät enää olekaan panimoiden vakavin uhka, vaan gram-negatiiviset obligaatit anaerobit, *Pectinatus* ja *Megasphaera*. Myös gram-negatiiviset aerobiset etikkahappobakteerit ovat olleet tutkituimpia oluen pilaajabakteereita. (Sakamoto & Konings 2003.)

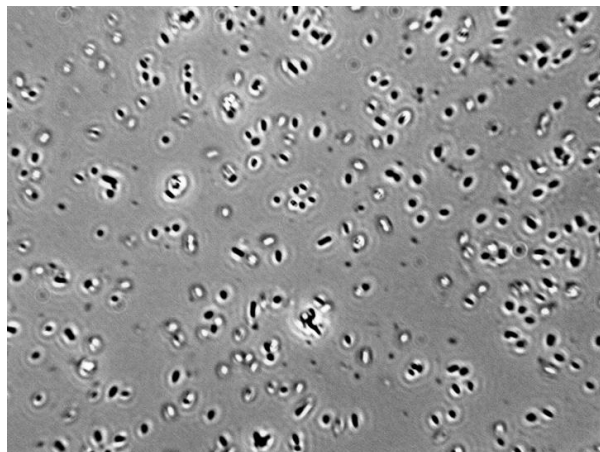
### 3.2.1 Gram-positiiviset bakteerit

Maitohappobakteerilajeja on paljon, mutta vain harvat niistä pilaavat oluen. Lähes kaikki gram-positiiviset oluenpilaajamikrobit kuuluvat maitohappobakteereihin. *Lactobacillus*- ja *Pediococcus*-bakteerit aiheuttavat olueen sameutta, rihmoja sekä epämiellyttäviä tai epätyypillisiä muutoksia oluen flavoriin. (Sakamoto & Konings 2003.)

#### 3.2.1.1 *Lactobacillus*

Laktobasillit ovat maitohappobakteereiden suurin ryhmä. Ne ovat fakultaatiivisesti anaerobisia sauvabakteereja, joita käytetään hyödyksi erilaisissa käymisprosesseissa, oluen ja viinin sekä jogurtin ja muiden hapatettujen tuotteiden valmistuksessa. (Sakamoto & Konings 2003.) Boultonin ym. (2006) mukaan *Lactobacillus*ten aiheuttamia virhevaikutuksia oluessa ovat sameus, diasetyylin tuotto, happamuus ja ketjumaisten biofilmien muodostus (Lehtonen 2012, 47). Back (1981) on esittänyt, että *Lactobacillus*-sukuun kuuluvien bakteerien haitallisuus johtuu niiden kyvystä vastustaa humalan yhdisteitä, lämpökäsittelyä ja joitakin desinfiointiaineita. Lisäksi ne muodostavat biofilmejä ja kontaminoivat immobilisoitua hiivaa käyttäviä reaktoreja. (Storgårds 2000, 76.)

*Lactobacillus brevis* (kuva 2) on merkittävin kontaminantti ja sitä esiintyy laajalti oluessa ja panimoissa. Back ym. (1988, 1994), Hollerová & Kubizniaková (2001) ovat esittäneet, että *L. brevis* aiheuttaa yli puolet panimokontaminaatioista. *L. brevis* on obligaatisti heterofermentatiivinen bakteeri ja yksi tutkituimpia panimobakteereita. Sen optimikasvuolosuhteet ovat +30 °C, pH 4...6, ja se on yleensä vastustuskykyinen humalan yhdisteille. Lawrencen (1988) mukaan se on fysiologisesti muuntautumiskykyinen ja voi aiheuttaa vaimentumista eli käymisliuoksen ominaispainon vähenemistä fermentoimalla dekstriinejä ja tärkkelystä. (Sakamoto & Konings 2003.)



Kuva 2. *Lactobacillus brevis*  
(University of California, Davis n.d.)

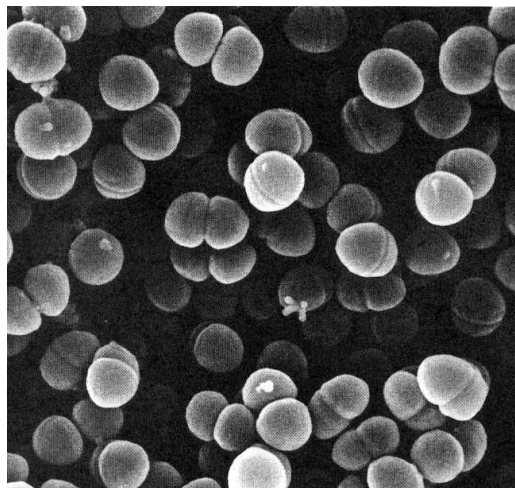
Toiseksi merkittävin pilaajaorganismi on *Lactobacillus lindneri*. Se on erittäin vastustuskykyinen humalan yhdisteille, kasvaa optimaalisesti

+19...23 °C:ssa, mutta kestää Backin (1981, 1992) ja Priestin (1987) mukaan korkeampia lämpökäsittelyjä kuin muut maitohappobakteerit. Rinck & Warkerbauer (1987) sekä Storgårds ym. (1998) ovat esittäneet, että kaikki toistaiseksi tutkitut *L. lindneri* -kannat pilaavat olutta. (Sakamoto & Konings 2003.)

Priestin (1996) mukaan *Lactobacillus buchneri*, *L. casei*, *L. coryneformis*, *L. curvatus* ja *L. plantarum* eivät ole yhtä yleisiä kontaminanteja kuin edellä mainitut lajit. *L. buchneri* tuottaa diasetyyliä, mikä antaa oluelle voimaisen flavorin. (Sakamoto & Konings 2003.)

### 3.2.1.2 *Pediococcus*

Pediokokit (kuva 3) ovat fakultatiivisesti anaerobisia, homofermentatiivisia maitohappobakteereita, jotka kasvavat pareittain tai neljän ryhminä, tetradeina (Sakamoto & Konings 2003). Lehtonen (2012, 47) esittää Boultonin ym. (2006) mukaan, että myös *Pediococcus*-lajit tuottavat olueen sameutta, diasetyyliä ja happamuutta. Tunnettuja lajeja ovat esimerkiksi *Pediococcus damnosus*, *P. claussenii*, *P. parvulus* ja *P. inopinatus*. Niitä esiintyy panimoprosessissa, vierteestä valmiiseen olueen asti. *P. damnosus* on lajeista merkittävin oluen pilaajaorganismi, sillä se on yleensä vastustuskykyinen humalan yhdisteille. *P. damnosusta* esiintyy yleensä valmiissa oluessa ja loppukäymisessä, mutta harvemmin panimohiivassa. McCaig & Weaver (1983) sekä Priest (1987) ovat esittäneet, että *P. inopinatus* sen sijaan kasvaa useimmiten hiivassa, mutta harvemmin muissa käymisen vaiheissa. Lawrence (1988) mukaan *P. inopinatus* kasvaa matalassa alkoholi- ja humalapitoisuudessa, pH:n ylittäessä 4,2. (Sakamoto & Konings 2003.)



Kuva 3. *Pediococcus* (LookForDiagnosis n.d.)

### 3.2.1.3 Muut gram-positiiviset bakteerit

*Micrococcus*-suvun lajien on toisinaan raportoitu aiheuttaneen oluen pilaantumista. Back (1981) sekä Lawrence & Priest (1981) ovat esittäneet,

että esimerkiksi *M. kristinae* voi kasvaa sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa ja se aiheuttaa oluen hedelmäisen virhemaun. (Sakamoto & Konings 2003.)

### 3.2.2 Gram-negatiiviset bakteerit

Panimoissa gram-negatiiviset bakteerit ovat yleensä epätoivottuja mikroorganismieja, koska ne pilaavat oluen joko suoraan ja epäsuorasti. Tärkeimmät gram-negatiiviset panimokontaminantit ovat entero- ja etikka-happobakteereja sekä ehdottoman anaerobisia bakteereja. Nämä muodostavat ominaisuuksiltaan, esiintymiseltään ja vaikutuksiltaan heterogeenisen ryhmän. Lisäksi ne kaikki sietävät humalanyhdisteitä. (Juvonen, Koivula & Haikara 2003.)

Enterobakteerit ovat epäsuoria pilaajabakteereita, jotka kasvavat sekä happellisissa että hapettomissa olosuhteissa, mutta ovat yleensä herkkiä etanolille ja matalalle pH:lle. Siten ne voivat lisääntyä pääasiassa panimoprosessin alkuvaiheissa tai oluen annostelujärjestelmissä, missä ne tuottavat erilaisia metaboliatuotteita, kuten N-nitrosamiinien esiasteita. Ne voivat vaikuttaa myös käymisnopeuteen. Useimmiten vaaditaan melko korkeita kontaminaatiopitoisuuksia ( $>10^3$  solua/ml), jotta niiden vaikutukset ovat havaittavissa. Yleisimmät enterobakteerikontaminantit ovat *Rahnella aquatilis* (aiemmin *Enterobacter agglomerans*) ja *Obesumbacterium Proteus*, joka on tällä hetkellä jaettu kahteen biotyypin: Biotyyppi II kontaminoi panimohiivaa ja biotyyppi I on *Hafnia alvein* kaltainen ja esiintyy pääasiassa oluessa. (Juvonen ym. 2003.)

Koliformit ovat enterobakteereita, jotka sietävät sappihappoja tai niiden kaltaisia yhdisteitä ja fermentoivat laktoosia tuottamalla kaasua ja happoja +37 °C:ssa. Niitä käytetään panimoissa sekä muussa elintarviketeollisuudessa esimerkiksi osoittamaan veden mikrobiologista laatua. (Juvonen ym. 2003.) Koliformeista *Pectinatus* ja *Megasphaera* ovat erityisen harmillisia panimokontaminantteja. Ne ovat mikrobiologisesti hankalia määrittää, koska obligaatteina anaerobeina ne ovat hyvin herkkiä pienillekin happipitoisuuksille.

#### 3.2.2.1 *Pectinatus*

*Pectinatus*-lajit aiheuttavat jopa 20–30 % mikrobikontaminaatioista. Backin (1994) mukaan niitä esiintyy enemmän pastörimattomassa kuin pastöroidussa oluessa (Sakamoto & Konings 2003). *Pectinatus*-lajeja ovat *P. cerevisiophilus* (kuva 4, s. 8), *P. frisingensis* (Sakamoto & Konings 2003) ja uusi *P. haikarae* (genotyypitys: Juvonen 2009). *Pectinatus*-lajit ovat flagellojen avulla aktiivisesti liikkuvia itiöttömiä sauvabakteereita. Haikaran ym. (1981) mukaan ne ovat eräänlaisia gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteereiden välimuotoja, sillä niillä on myös eräitä gram-positiivisille bakteereille ominaisia piirteitä. Chelak & Ingledew (1987) sekä Watier ym. (1993) ovat esittäneet, että *Pectinatus* kasvaa +15...40 °C:ssa optimin ollessa +32 °C, pH alue 3,5...6 (optimi 4,5) ja alkoholipitoisuus alle 4,5 til-%. Bakteerien lisääntyessä muodostuu huomatt-

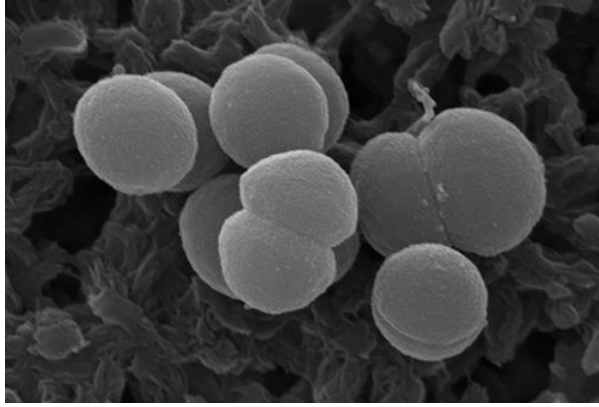
tavia määriä propioni-, etikka-, meripihka- ja maitohappoja, asetaldehydiä sekä asetoimia (voin aromiaine). *Pectinatus* kykenee lisäksi fermentoimaan maitohappoja. Tunnusomaista tämän bakteerin pilaamalle oluelle on voimakas samentuminen ja rikkiyhdisteistä johtuva mädän kananmunan haju. *Pectinatus*-kontaminaatit voivat siten aiheuttaa vakavia vahinkoja panimoteollisuudelle. (Sakamoto & Konings 2003.)



Kuva 4. *Pectinatus cerevisiophilus* (Lee, Mabee & Jangaard 1978)

#### 3.2.2.2 *Megasphaera*

Backin ym. (1988) mukaan *Megasphaera* aiheuttaa 3–7 % bakteerikontaminaatioista. Ne ovat itiöttömiä mesofiilisiä (keskilämpötiloissa kasvavia) kokkeja, jotka esiintyvät yksittäin, pareittain tai lyhyinä ketjuina. (Sakamoto & Konings 2003.) Tähän sukuun kuuluvat lajit *M. elsdenii* (kuva 5, s. 9) ja *M. cerevisiae* (Sakamoto & Konings 2003) sekä *Megasphaera paucivorans* ja *Megasphaera sueciensis* (Juvonen 2009), jotka *M. elsdenii*-tä lukuun ottamatta ovat pilaajaorganismeja. *M. cerevisiae* kasvaa +15...37 °C:ssa (optimi +28 °C), pH:n ollessa yli 4,1. Haikara & Lounatmaa (1987) sekä Lawrence (1988) ovat esittäneet, että *M. cerevisiae* kasvu inhiboituu etanolipitoisuuden noustessa yli 2,8 til-%:n, mutta kasvu on kuitenkin mahdollista aina 5,5 til-%:iin asti. Seidelin ym. (1979) mukaan *Megasphaera* aiheuttaa olueen voimakasta samentumista ja tuottaa huomattavia määriä voihappoa sekä pienempiä määriä etikka-, kaproni-, iso-valeriaana- ja valeriaanahappoja sekä asetoimia. Rikkivedyn muodostuminen tuottaa olueen ulostemaisen hajun, minkä takia bakteeri on yksi pelätyimpiä panimokontaminantteja. (Sakamoto & Konings 2003.)



Kuva 5. *Megasphaera elsdenii* (MS Biotec n.d.)

### 3.2.2.3 Etikkahappobakteerit ja muut gram-negatiiviset bakteerilajit

Etikkahappobakteerit ovat aerobisia bakteereja. Niitä esiintyy yleisesti ha-naoluessa, mutta myös panimoprosessin alkuvaiheissa. Ne pilaavat oluen muodostamalla etikkahappoa, sivumakuja ja sameutta. Rihmoja voi myös kehittyä. Panimoissa esiintyvät etikkahappobakteerit kuuluvat sukuihin *Acetobacter*, *Gluconobacter* ja *Gluconacetobacter*. (Juvonen ym. 2003.)

*Megasphaeran* ja *Pectinatuksen* lisäksi anaerobisia bakteereja ovat *Zymomonas*, *Selenomonas* ja *Zymophilus*. Happiherkkyyden takia ne ovat pääasiassa pastöroimattoman pakatun oluen pilaajia. Panimoissa esiintyviä lajeja ovat muun muassa *S. lacticifex*, *Z. mobilis*, *Z. paucivorans* ja *Z. raffinosivorans*. Pilaantuminen ilmenee epämiellyttävänä sivumakuina ja sameutena. *Z. mobilis* -bakteerin esiintyminen rajoittuu olueen, johon lisätään ylimääräisiä sokereita ennen pullotusta, koska tällä bakteerilla on rajallinen kyky hyödyntää hiilihydraatteja. Toistaiseksi *Selenomonas*- ja *Zymophilus*-sukuihin kuuluvia potentiaalisia pilaajaorganismeja on todettu vain panimohiivasta. (Juvonen ym. 2003.)

### 3.3 Kontaminaatiolähteet

Panimokontaminaatiot voidaan jaotella primäärikontaminaatioihin ja sekundäärikontaminaatioihin. Ensin mainittuihin kuuluvat hiiva ja vierre, käymis- ja painetankit, jälkimmäisiin pullotus, tölkitys ja ravintola-astioihin ja -säiliöihin pakkaaminen. Backin (1997) mukaan noin 50 % mikrobiologisista kontaminaatioista on peräisin pullotuksesta, mutta primäärikontaminaatioiden seuraukset voivat olla vakavampia. Absoluuttisia pilaajaorganismeja voi esiintyä missä prosessin vaiheessa tahansa, kun taas välilliset pilaajaorganismit ovat pääosin primäärikontaminantteja. (Storgårds 2000, 20.)

## 4 OLUEN LAADUNVALVONTA JA -MENETELMÄT

Oluen laadun varmistamiseksi on oleellista luotettavasti ja nopeasti tunnistaa haitalliset mikro-organismit, jotta kontaminaation lähde prosessissa voidaan jäljittää. Mikrobiologisen laadunvalvonnan perinteinen ja edelleen

käytetyin menetelmä on kontaminanttien inkubointi selektiivisillä elatusalustoilla. Menetelmä on hidas, pesäkkeiden kasvu maljalle kestää päiviä ja samentuman muodostuminen nestemäiseen alustaan jopa viikkoja. Tästä syystä tuote on yleensä jo kaupan hyllyllä, ennen kuin mikrobiologiset laboratoriotulokset ovat valmiit. Mikäli testit osoittavat tuotteen kontaminoituneeksi potentiaalisilla pilaajamikrobeilla, on tuote-erä vedettävä pois markkinoilta, mistä aiheutuu panimolle taloudellista tappiota. Tästä syystä mikrobiologisen tutkimuksen fokuksessa on ollut spesifisempien ja nopeampien osoitusmenetelmien kehittäminen. Bakteerilajin tunnistamisen lisäksi menetelmällä tulee voida selvittää bakteerin kyky lisääntyä oluessa. (Sakamoto & Konings 2003.)

### 4.1 Elatusaineet

Koska panimokontaminanteista pääasiassa vain muutama laji on oluenpilaajia, oluen laadun varmistamiseksi riittää käytännössä potentiaalisten kontaminanttien, *L. brevis*, *L. lindneri*, *P. damnosus* ja *Pectinatus spp.* kontrollointi. Tunnistamisen avuksi on panimoteollisuudessa kehitetty erilaisia selektiivisiä elatusaineita. The European Brewing Convention (EBC) suosittelee laktobasillien ja pediokokkien määrittämiseen kolmea elatusainetta: MRS-agar (de Man, Rogosa and Sharpe) täydennettynä sykloheksimidillä (aerobisten hiivojen ja homeiden kasvun inhiboimiseksi), Raka-Ray täydennettynä sykloheksimidillä ja VLB S7-S (Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin). Vaihtoehtoisia elatusaineita ovat UBA (Universal Beer Agar) täydennettynä sykloheksimidillä, HLP (Hsu's *Lactobacillus* and *Pediococcus* medium), NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakterien), WLD (Wallerstein Laboratory Differential Medium), Nagakawa medium, SDA (Schwarz Differential Agar) ja MRS täydennettynä maltoosi-hiivauutteella pH 4,7. (Sakamoto & Konings 2003.) UBA on panimoteollisuudessa paljon käytetty yleiselatusalusta. Antibiooteilla muokkaamalla voidaan lisätä alustan selektiivisyyttä. Sykloheksimidi on kaupallinen tuote, joka inhiboi eukaryoottien proteiinisynteesiä. (Lehtonen 2012, 50.)

Mikään edellä mainituista elatusaineista ei yksinään sovellu kaikkien laktobasilli- ja pediokokkilajien määrittämiseen, mutta näiden erilaisilla yhdistelmillä voidaan saavuttaa parhaat tulokset. *Pectinatus*- ja *Megasphaera*-lajien määrittämiseen panimoiden rutiinianalyyseissä suositellaan seuraavia: konsentroitua MRS broth (liemi), PYF (Peptone, Yeast Extract and Fructose), tioglykolaatti rikastamiseen, LL-Agar (lactate-lead acetate), UBA, NBB ja Raka-Ray. Maljaviljelyn ongelmana on, että elatusaineet eivät ole selektiivisiä bakteerilajin suhteen. Maitohappobakteereiden määrittämiseen tarkoitettulla elatusaineella kasvaa potentiaalisten pilaajaorganismien lisäksi myös harmittomia maitohappobakteereita, kuten esimerkiksi *L. delbrückii* ja *P. acidilactici*. Selektiivisyyden parantaminen lisäämällä elatusaineeseen jotakin kemikaalia saattaa jopa entisestään pidentää kasvatusaikaa. (Sakamoto & Konings 2003.)

## 4.2 Lajin tunnistus

Ennen 1990-luvun alkua, ainoa menetelmä pilaaja/ei pilaaja- organismien erottelemiseen oli ns. ”pakotetesti” (forcing test). Testissä bakteeri siirrettiin olueen tai elatusaineella rikastettuun olueen. Tulosten saaminen saattoi kestää jopa kuukausia, mistä syystä menetelmä oli hyvin epäkäytännöllinen. (Sakamoto & Konings 2003.)

Jotkin oluessa viihtyvät maitohappobakteerit ovat haluttomia ja hitaita kasvamaan elatusalustoilla. *L. lindneri* aiheuttaman kontaminaation osoittaminen rutiinilaadunvalvontamenetelmillä voi olla hyvin vaikeaa sen heikon elatusalustalla kasvun takia. (Storgårds 2000, 76.)

Suomessa ja Japanissa tehtyjen tutkimusten mukaan *L. lindneri* -kantojen kasvatusta epäonnistui panimoissa yleisesti käytetyillä UBA- ja SDA-agarilla. Lisäksi jotkut kannat eivät kasvaneet ollenkaan tai vain heikosti MRS-agarilla. Paras tapa kasvun kiihdyttämiseen oli rikastaa olutnäytteet NBB-C-agarin (Nachweismedium für bierschädliche Bakterien, concentrate). Myös MRS-liemen ja oluen seos suhteessa 4:1 tuki kuuden testatun *L. lindneri* -kannan nopeaa kasvua. Membraanisudatusmenetelmässä NBB-A-agar tuotti testissä parhaan kasvun. (Storgårds 2000, 76.)

Vaikka tutkijat ovat kehittäneet erilaisia vaihtoehtoisia menetelmiä pilaajaorganismien nopeampaan osoittamiseen, niitä ei panimoissa laajalti käytetä riittämättömän nopeuden, herkkyyden tai spesifisyyden takia tai siksi, että niiden käyttö vaatii kehittyneitä ja kalliita laitteita ja reagensseja. Siksi selektiivisten elatusaineiden ja inkuboinnin käyttö on yhä suosiossa, vaikka pilaajaorganismien tunnistus ei näillä menetelmillä aina tarjoakaan vaadittua nopeutta, herkkyyttä ja spesifisyyttä. (Storgårds 2000, 76–77.) Perusmenetelmien pesäke- ja solumorfologian, gram-värijäyksen ja katalaasimenetelmän lisäksi voidaan käyttää biokemiallisia menetelmiä: orgaanisten happojen kromatografiaa, sokerifermentaatioon perustuvaa mallia sekä poly- tai monoklonaalisten vasta-aineiden käyttöön perustuvia menetelmiä (immunoassay). Molekyylibiologisia menetelmiä ovat DNA-hybridisaatio, DNA-sekvensointi ja polymeerasiketjureaktio eli PCR. (Sakamoto & Konings 2003.) Nopeuden lisäksi PCR:n etuna on lajispesifisyys, mikä ei viljelymenetelmillä ole mahdollista (Storgårds 2000, 77).

Teollisissa laboratorioissa lajikohtainen tunnistaminen pidetään normaalisti minimissä. Kun tunnistaminen on tarpeen, sen tulee olla käytännöllistä ja osoittaa potentiaalisten pilaajaorganismien läsnäolo taksonomisten yksityiskohtien sijaan. Pilaajaorganismien tunnistaminen on tärkeä työkalu kontaminaatiolähteiden jäljittämiseksi. Gutteridgen & Priestin (1996) mukaan tunnistaminen perustuu geneettisen informaation ilmentymisen neljään tasoon: genomiin, proteiineihin, solukomponentteihin sekä morfologiaan ja käyttäytymiseen. Ribotyypitys on menetelmä, joka perustuu genomin analyysiin, SDS-Page solun proteiinien analyysiin ja biokemialliset testit, esim. API-menetelmä, *Analytical Profile Index* morfologiaan ja käyttäytymiseen. (Storgårds 2000, 77.) Ribotyypitys hyödyntää ribosomaalista RNA:ta koodaavaa genomin osaa (*Southern hybridization*) bakteerikantojen tunnistamisessa. Ribotyypitys on täysin automatisoitua ja kestää vain joitakin tunteja. (Sakamoto & Konings 2003.)



Tunnistuksen jälkeen on eräiden lajien kohdalla tarpeen määrittää, onko kyseessä potentiaalinen oluenpilaajorganismi tai -kanta. Kuten edellä on todettu, maitohappobakteerilajit käsittävät sekä haitallisia että harmittomia kantoja: *L. brevis* - ja *P. damnosus* -kannoista suurin osa on oluenpilaajia, *L. casei* -, *L. coryneformis* - ja *L. plantarum* -kannoista vain jokunen, mutta *L. lindneri* -kannoista kaikki. Tunnistettujen pilaajabakteerikantojen genotyypit rekisteröidään tietokantoihin, joihin tutkijat voivat verrata uusia löydöksiä. (Sakamoto & Konings 2003.)

## 5 PCR-TEKNIikka

PCR-tekniikassa (*Polymerase Chain Reaction*) monistetaan polymeeraasientsyymien avulla näyte-DNA:n osaa, esimerkiksi yhtä geeniä, useita kertoja. Tuloksena saadaan miljoonia geenikopioita tarvittaessa mitättömän pienestäkin näytemäärästä. PCR-menetelmät ovat yleistyneet vähitellen elintarvikelaboratorioissa. PCR-tekniikalla on mahdollista tunnistaa erilaisia organismeja: bakteeri-, virus-, kasvi- sekä eläinlajeja. Tällä hetkellä PCR-tekniikkaa hyödynnetään elintarvikelaboratorioissa paitsi laaduntarkkailussa myös esimerkiksi geenimuuntelun toteamiseen ja GMO-pitoisuuden määrittämiseen, allergiaa aiheuttavien organismien toteamiseen sekä tautia aiheuttavien bakteerien ja virusten tunnistamiseen. (Heilimo 2006.)

PCR on hinnaltaan kallis tekniikka. Laitteiden hankintahinta on suuri, myös reagenssit ovat kalliita, joten mikrobiologisessa laadunvalvonnassa hinta ei ole ollut kilpailukykyinen viljelymenetelmien kanssa. PCR-menetelmän etuina ovat nopeus ja spesifisyys. Elintarviketeollisuudessa PCR:n käyttösovellukset ovat lähinnä tutkimus- ja tuotekehityspuolella. PCR on vaativa ja häiriöaltis menetelmä. Konsentraatioilla ja lämpötiloilla on suuri merkitys. Myös näytteestä jääneet orgaaniset tai epäorgaaniset yhdisteet voivat inhiboida käytetyn entsyymin toimintaa. PCR:llä pystytään optimaalisissa olosuhteissa havaitsemaan jopa kaksi DNA-kopiota. (Heilimo 2006.)

### 5.1 PCR-tutkimuksen periaate

PCR-tutkimus alkaa tutkittavan DNA:n eristämällä muusta näytemassasta. DNA:n eristämiseen on tarjolla erilaisia kaupallisia kittejä. Eristyksessä käytetään apuna entsyymejä, RNAaseja ja proteinaaseja. PCR-reaktion ensimmäisessä vaiheessa (denaturoituminen, *denaturation*) kaksijuosteinen DNA-rihma avautuu lämmön vaikutuksesta n. +95 °C:ssa. Toisessa vaiheessa (*annealing*) reaktioseokseen lisätyt alukkeet eli kemiallisesti syntetisoidut DNA-pätkät kiinnittyvät näyte-DNA:n tutkittavaan geeniin tai sen osaan +40–65 °C:ssa. Kolmannessa vaiheessa (pidennys, *extension*) polymeeraasientsyymi rakentaa kummallekin yksinkertaiselle juosteelle vastinjuosteen liittämällä reaktioseokseen lisättyjä DNA-rakennuspalikoita eli nukleotidejä alukkeisiin alkaen templaatin 3'-päästä ja päättyen sen 5'-päähän. Kolmannen vaiheen lämpötila riippuu käytetystä entsyymistä. Tuloksena saadaan kaksi uutta kaksoisjuosteista DNA-rihmaa. Muodostuneet

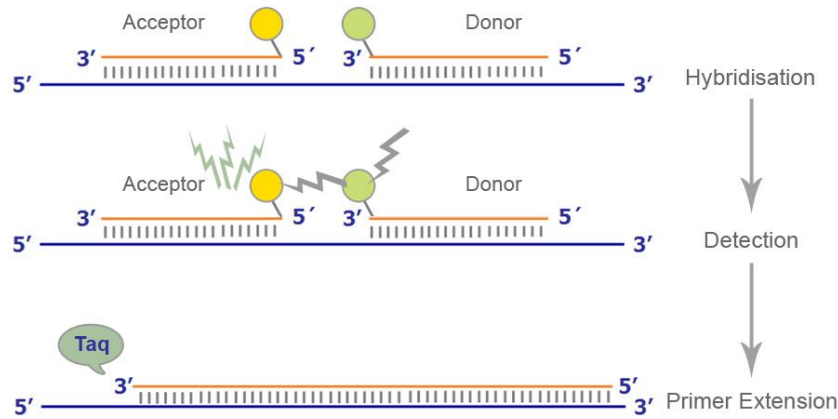
DNA-juosteet avataan uudelleen ja sykli alkaa alusta. Reaktion vaiheita ohjataan muuttamalla reaktioseoksen lämpötilaa. Yhden lämpötilasyklin jälkeen DNA:n määrä on kaksinkertaistunut eli DNA monistuu eksponentiaalisesti. Syklejä toistetaan esimerkiksi 15...45 kertaa reaktiosta riippuen. Jos näyte-DNA sisältää etsityn geenin, DNA monistuu ja geenikopiot voidaan havaita visuaalisesti värjäyksen jälkeen. Mikäli näyte-DNA ei sisällä etsittyä geeniä, alukkeet eivät sitoudu DNA:han eikä monistumista silloin tapahdu. Tällöin näyte ei sisällä etsittyä organismia. Näin tutkitaan, sisältääkö näyte jotakin tiettyä organismia, esimerkiksi bakteeria. (Heilimo 2006.)

## 5.2 Quantitative PCR

Tässä opinnäytetyössä hyödynnetty reaaliaikainen PCR on yleistynyt viime vuosina. Real time-PCR:ssä reaktioseokseen lisätään reagenssia, joka aiheuttaa fluoresenssin lisääntymisen DNA-pitoisuuden noustessa. Tällöin DNA:n monistuminen nähdään reaaliaikaisena tietokoneruudulta lisääntyvänä fluoresenssina. (Heilimo 2006.) Tuotteen määrä voidaan selvittää standardisuoran tai referenssinäytteiden avulla. Real time-PCR tunnetaan myös nimellä qPCR, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*.

## 5.3 LightCycler-analysaattorin periaate

Tässä työssä käytetty laite, LightCycler™ 2.0 (Roche), mahdollistaa kahden vaihtoehdoisen fluoresenssiin perustuvan menetelmän käytön: DNA:han sitoutuvan fluoresoivan väriaineen (SYBR GREEN I) ja fluoresoivaa koetinta (*hybridization probe*) käyttävän tekniikan. Jälkimmäisessä menetelmässä on kaksi sekvenssispesifistä oligonukleotidiä, jotka on leimattu fluoresoivilla väriaineilla. Toinen oligonukleotidi on leimattu merkkiaineella ketjun 3'-päästä ja toinen oligonukleotidi eri merkkiaineella sen 5'-päästä. Oligonukleotidien kemiallinen rakenne estää niiden pariutumisen keskenään: toinen on leimattu 3'-päästä, kun taas 5'-päästä leimatun oligonukleotidiketjun vapaassa 3'-päässä on fosfaattiryhmä. Utta vastinjuostetta rakennetaan templaatti-DNA:n 3'-päästä alkaen 5'-suuntaan, jolloin leimat sijoittuvat lähelle toisiaan. Luovuttaja-leima (donor) virittyy laitteen lähettämästä valosta ja siirtää osan viritysenergiastaan vierekkäiselle vastaanottaja-leimalle (acceptor) dipoli-dipoli-vuorovaikutuksen avulla, jolloin vastaanottajaleima emittoi valoa (kuvio 1, s.14). Fluoresenssin määrä on verrannollinen syntetisoituvan DNA:n määrään ja mitattavissa LightCycler-analysaattorilla. (Roche Life Science n.d.)



Kuvio 1. LightCycler periaate, fluoresoiva koetin (Eurofins Genomics n.d.). *Thermus aquaticus*-bakteerista eristetty *Taq*-polymeraasientsyymi rakentaa uuden DNA-juosteen. *Taq* on yleinen PCR:ssä käytetty entsyymi.

## 6 PCR:N SOVELTAMINEN OLUEN KONTAMINANTTIEN OSOITTAMISEEN

PCR-menetelmien soveltamista ja vertailua koskevia tutkimuksia on julkaistu runsaasti 1990-luvulta 2010-luvulle saakka. Eniten on tutkittu gram-negatiivisia anaerobisia bakteereja niiden aiheuttamien vakavien haittavaikutusten vuoksi. Alan arvostettuja tutkijoita ovat olleet suomalaiset dosentti Auli Haikara (VTT) ja Riikka Juvonen (VTT).

### 6.1 Gram-negatiivisten panimokontaminanttien osoittaminen

Satokari, Juvonen, von Wright ja Haikara (1997) käsitelivät *Pectinatus*-pilaajabakteerin osoittamista PCR-tekniikan avulla. Pastöroimattomassa oluessa pienikin määrä kontaminoivaa materiaalia voi saastuttaa oluen ja saada aikaan viallisen tuotteen. *Pectinatus*-bakteerin tunnistaminen perinteisillä mikrobiologisilla menetelmillä on paitsi hidas myös epäkäytännöllinen ehkäisevänä laaduntarkkailumenetelmänä. Tutkimuksessa käytettiin spesifisiä alukkeita, joilla pystyttiin erottamaan *Pectinatus* muista pilaajabakteereista. Menetelmä sisälsi DNA:n eristämisen, PCR-reaktion, reaktiotuotteiden tunnistamisen elektroforeesilla ja se kesti noin 10 tuntia. Menetelmän herkkyys oli noin 20 solua näytemillilitraa kohden. Tutkimuksessa todettiin tekniikan olevan varsin potentiaalinen rutiinikontrollimenetelmä panimoiden käyttöön.

Satokari, Juvonen, Mallison, von Wright ja Haikara (1998) tunnistivat *Megasphaera*- ja *Pectinatus*-lajeja PCR:llä ja kolorimetrisellä mikrolevyhybridisaatiolla. Koska obliigaattien anaerobien osoittaminen on haasteellista ja aikaavievää, on tutkijoilla ollut tarve kehittää nopeampia analyysimenetelmiä. Biotiinileimattua alukeparia käyttämällä monistettiin tutkittujen bakteerien 16S rRNA -geeniä, jotka sitten analysoitiin mikrolevyllä. Biotiinileimattu PCR-tuote havaittiin streptavidiinillä ja hybridisoi- tiin digoksigeniini-leimatulla koettimella. Tutkitulla menetelmällä onnis-

tuttiin havaitsemaan oluen bakteeripitoisuuksia seuraavasti: *M. cerevisiae*  $\geq 5 \times 10^3$  pmy/100 ml ja *P. frisingensis*  $\geq 5 \times 10^5$  pmy/100 ml. Pienempien bakteerimäärien havaitsemiseksi menetelmän herkkyyttä oli tutkimuksen mukaan edelleen parannettava.

*Clostridia*-suvun anaerobiset bakteerit *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* ja *Zymophilus* ovat merkittäviä pastöroimattoman, pakatun oluen pilaajia. Juvosen, Koivulan ja Haikaran tutkimuksen (2008) tavoitteena oli kehittää ja arvioida lajispesifisiä PCR-menetelmiä näiden bakteerien osoittamiseksi ja erottamiseksi oluessa. Työssä kehitettiin lajispesifinen alukepari 16S rRNA -kohdegeenin 342 emäsparin jaksolle, määritettiin päätepiste-PCR-elektroforeesilla ja real-time PCR:llä SYBR Green I -värjäystä käyttämällä. PCR-tuotteet eroteltiin lajin tai suvun mukaan ja niiden pilaajapotentiaali määritettiin RFLP-tekniikalla (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ja sulamiskäyräanalyysillä. RFLP hyödyntää homologisten DNA-sekvenssien variaatioita. Menetelmän avulla havaittiin  $10^{1-3}$  pmy/25 ml olutta riippuen bakteerikannasta ja käytetystä PCR-järjestelmästä. Päätepiesteanalyysi kesti 6–7 tuntia ja real-time PCR 2–3 tuntia. Oluenäytteiden esirikastus ennen PCR-ajoa mahdollisti jopa yksittäisen bakteerisolun havaitsemisen näytteessä. PCR-tulokset ja vastaavat viljelytulokset olivat pääosin yhteneviä, mutta PCR-menetelmät olivat ajoittain herkempiä. Käytetyt PCR-menetelmät mahdollistivat kaikkien yhdeksän tutkitun pilaajabakteerin tunnistamisen yhdessä reaktiossa lajitasolle asti. Samanaikaisesti analyysiaika lyheni 1–2 päivällä. Tutkittujen menetelmien todettiin soveltuvan sekä panimoiden rutiinilaadunvalvontaan että obliigaattien anaerobien pilaajabakteerien esiintymisen, monimuotoisuuden ja määrän tutkimiseen panimoprosesseissa.

Juvonen (2009) tutki bakteerisukupuuun *Sporomusa*-alahaaraan klostridien luokkaan kuuluvia kuutta anaerobista oluenpilaajalajia: *Megasphaera cerevisiae*, *Pectinatus cerevisiophilus*, *Pectinatus frisingensis*, *Selenomonas lactificifex*, *Zymophilus paucivorans* ja *Zymophilus raffinosivorans*. Kyseisiä lajeja on toistaiseksi löydetty vain oluen tuotantoketjusta. Tutkimuksen tavoitteena oli parantaa *Sporomusa*-alahaaran oluenpilaajien osoittamista ja tunnistamista sekä tuottaa uutta tietoa näiden bakteerien monimuotoisuudesta, sukulaisuussuhteista ja lähteistä DNA-tekniikoita käyttämällä.

*M. cerevisiae* -lajille ja *Pectinatus*-suvulle kehitettiin PCR-pohjainen kuoppalevytesti, joka perustui DNA-hybridisaatioon ja entsyymaattiseen värireaktioon. Lisäksi tutkimuksessa kehitettiin reaaliaikaiseen PCR:ään sekä lopputuoteosoitukseen perustuvat ryhmäspesifiset testit *Sporomusa*-alahaaran oluenpilaajabakteerien osoittamiseksi. Reaaliaikainen PCR lyhensi analyysiaikaa ja ryhmäspesifiset PCR-testit tarjosivat kustannustehokkaan työkalun anaerobisten oluenpilaajabakteerien osoittamiseksi. Ryhmäspesifisten PCR-tuotteiden restriktiofragmenttianalyysi (RFLP) ja sulamislämpötilan määrittäminen mahdollistavat lisäksi kontaminantin sukuta-son tunnistuksen ja haitallisuusasteen arvioinnin. PCR-inhibiittorit sekä äärimmäinen herkkyys vaikeuttavat PCR:n soveltamista panimonäytteille. (Juvonen 2009; 5, 71–78, 109–110.)

PCR-testeihin liitettiin olutnäytteen rikastuskasvatus, jolloin pieni määrä eläviä soluja ( $\leq 10$  pmy/100 ml näytettä) voitiin havaita 1–3 vuorokaudessa. PCR-tulos saatiin 2–8 tunnissa näytetyypistä ja PCR-sovelluksesta riippuen. Kehitetyt PCR-menetelmät mahdollistivat bakteerien osoittamisen spesifisemmin ja useita päiviä nopeammin kuin perinteiset viljelymenetelmät. Kontaminaation tapahtuessa korjaaviin toimenpiteisiin on mahdollista ryhtyä entistä varhaisemmassa vaiheessa ja toimenpiteet voidaan myös kohdentaa entistä tarkemmin. Tämä auttaa vähentämään kontaminaatioiden aiheuttamia panimoteollisuuden tappioita. (Juvonen 2009; 6, 84, 96.)

Juvosen tutkimuksessa kuvattiin myös geno- ja fenotyypiseen karakterisointiin perustuen oluen tuotantoketjusta kolme uutta ehdottoman anaerobista oluenpilaajalajia: *Megasphaera paucivorans*, *Megasphaera sueciensis* ja *Pectinatus haikarae*. Perinteisten viljelymenetelmien havaittiin soveltuvan myös uusien lajien osoittamiseen ja eristämiseen panimonäytteistä. Tutkimuksessa osoitettiin, että nämä bakteerit voidaan tunnistaa myös ribotyypityksen ja 16S rRNA -geenisekvenssivertailun avulla. 16S rRNA -geenisekvenssien vertailuun perustuvassa sukupuussa panimoista tavatut *Megasphaera*-lajit muodostivat muista elinympäristöistä löydettyjen bakteerien sekvensseistä erillisen alaryhmän. Tämä viittaa siihen, että *M. cerevisiae*, *M. paucivorans* ja *M. sueciensis* ovat mukautuneet elämään yksinomaan panimoympäristössä. Lisäksi osoitettiin, että *M. cerevisiae* voi säilyä erilaisissa panimoprosessia jäljittelevissä stressiolosuhteissa pitkään elinkykyisenä, mikä piirre voi osittain selittää lajin vakiintumisen panimoympäristöihin. (Juvonen 2009; 6, 98–102, 111.)

Muista tutkimuskohteista *Selenomonas*-suku todettiin polyfyleettiseksi eli useista eri esi-isistä polveutuvaksi ja vaativan siksi uudelleenluokittelua. Lisäksi *Zymophilus*-lajien osoitettiin kuuluvan *Propionispira*-sukuun, jonka ainoa laji on tavattu vettyneestä sydänpuusta. Siksi on mahdollista, että myös *Zymophilus*-lajit ovat peräisin kasvimateriaalista, jonka mukana ne ovat kulkeutuneet panimoihin. (Juvonen 2009; 6, 107–108, 111.)

### 6.1.1 BREWPROC-hanke: PCR-geeli, PCR-ELISA ja qPCR vertailussa

Gram-negatiiviset panimokontaminantit, joihin kuuluu tiettyjä *Pectinatus*-, *Megasphaera*-, *Zymophilus*- ja *Zymomonas*-lajeja, etikkahappobakteereita ja enterobakteereita, muodostavat monipuolisen joukon oluen pilaajorganismeja. Rutiinimenetelmät niiden kontrollointiin eivät useinkaan ole tarpeeksi nopeita ja spesifisiä. Juvosen, Koivulan ja Haikaran selvitys ”PCR detection of Gram-negative brewery contaminants - present state” vuodelta 2003 esittelee ja vertailee vaihtoehtoisia PCR-tekniikkaan perustuvia menetelmiä. Artikkelissa arvioidaan PCR-tekniikoita laajasti ja perusteellisesti ja siksi se ansaitsee oman luvun opinnäytetyöni kirjallisuusosiossa.

Artikkeli keskittyy PCR-menetelmiin, jotka on kuvattu kirjallisuudessa tai jotka on kehitetty silloisessa EU-projektissa ”Development and demonstration of PCR based methods for process control in the brewing industry” (BREWPROC). Standardi-PCR (geeli), reaaliaikainen PCR ja PCR-

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, entsyymivälitteinen immunologinen menetelmä) ovat tekniikoita, joita projektissa käytettiin gram-negatiivisten bakteerilajien, -ryhmien ja -sukujen osoittamiseksi olut- ja prosessinäytteistä. Menetelmät ovat nopeampia ja spesifisempiä kuin viljelymenetelmät, ja niiden käytöllä omat etunsa, mutta myös haittansa. (Juvonen ym. 2003.)

#### 6.1.1.1 Panimokontaminanttien tunnistaminen BREWPROC-menetelmin

Rutiinilaadunvalvonnassa enterobakteerien, koliformien ja etikkahappobakteerien tunnistaminen selektiivisillä ja ei-selektiivisillä alustoilla viljelemällä vie aikaa 1–5 päivää. Pelkkä viljely kestää siis kauemmin kuin virhemakujen syntyminen olueen. Ennen kuin havaitut kontaminantit voidaan luotettavasti identifioida, ne täytyy viljelyn jälkeen tunnistaa esimerkiksi gram-värjäyksellä tai biokemiallisilla testeillä. Anaeroobeille organismeille voidaan käyttää pakote- ja rikastustestejä, joissa oluen tai olut-elatuskonsentraattiseoksen samentumista seurataan 2–6 viikon ajan. Positiiviset löydökset pitää vielä myöhemmin vahvistaa aistinvaraisella arvioinnilla ja mikroskopioimalla. Lajin tunnistus, mikä sisältää isolaattien puhdistamisen ja tarvittavien tunnistustestien suorittamisen voi sekin kestää kaksi viikkoa tai yli. Edellä mainituista syistä johtuen on ilmeistä, ettei gram-negatiivisten bakteerien tunnistus perinteisillä menetelmillä mahdollista ennakoivaa laadunohjausta tai nopeaa reagointia kontaminaatio-ongelmiin. Lisäksi jotkin pilaajabakteerit voivat olla elinkelpoisia mutta eivät viljelykelpoisia eikä niitä siten ole edes mahdollista havaita viljelymenetelmillä. (Juvonen ym. 2003.)

PCR-tekniikka, joka perustuu spesifisten DNA-sekvenssien monistamiseen, voi parantaa ja nopeuttaa gram-negatiivisten bakteerien osoittamista panimoiden laaduntarkkailussa. Erilaisia PCR-sovelluksia on kehitetty löydetyille gram-negatiivisille panimokontaminanteille. Ensimmäiset menetelmät perustuivat DNA-monistukseen, minkä jälkeen syntyneet PCR-tuotteet tunnistettiin geielektroforeesilla. Tulokset saatiin 5–8 tunnissa. PCR-ELISA perustuu monistettujen PCR-tuotteiden kolorimetrisen tunnistukseen kuoppalevyllä ja se kestää 5–7 tuntia. Real time-PCR edustaa uusinta PCR-tekniikkaa. PCR-analyysin kesto on sillä vähentynyt 1–2 tuntiin, sillä PCR-tuotteet tunnistetaan reaaliaikaisesti samalla, kun ne monistetaan. (Juvonen ym. 2003.)

#### 6.1.1.2 Ryhmäspesifiset seulontatestit BREWPROC-projektissa

Ensimmäiset PCR-testit kehitettiin osoittamaan yksittäisiä lajeja tai sukua. Vasta myöhemmin on otettu käyttöön ryhmäspesifisiä menetelmiä. Ryhmäspesifisiä PCR-tekniikoita voidaan käyttää osoittamaan toisiinsa läheisesti liittyviä bakteereja, joilla on saman fenotyypin ominaisuuksia, kuten entsyymiaktiivisuus, tai ne ovat fylogeneettisesti lähellä toisiaan, esimerkiksi niillä on samanlaista ribosomaalista DNA:ta (rDNA). Projektissa käytettyjen ryhmäspesifisten PCR-tekniikoiden kohteena olivat yksittäiset alueet bakteerien ribosomaalisessa DNA:ssa. (Juvonen ym. 2003.)

BREWPROC-projektissa spesifisiä PCR-menetelmiä kehitettiin osoittamaan etikkahappobakteereita, *Megasphaera*- ja *Pectinatus*-lajeja, anaerobeja oluenpilaajia sekä enterobakteeriryhmää yhdessä testissä (taulukko 1). Osoitukseen käytettiin PCR:ää ja geelielektroforeesia tai real time-PCR:ää joko hybridisaatiokoettimilla tai SYBR Green I -värjäyksellä. Myöhemmin PCR-ELISA-menetelmiä on kehitetty myös etikkahappobakteereille ja enterobakteereille. Koliformeille on julkaistu kaksi geelipohjaista menetelmää. (Juvonen ym. 2003.)

Real time-PCR-tekniikoissa bakteerilajien tunnistus tapahtuu sulamiskäyräanalyyseillä. PCR-tuotteen sulamispiste määritetään analysaattorilla PCR-monistuksen jälkeen. Anaeroobeille kehitetyssä geelipohjaisessa menetelmässä *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Zymophilus* ja *Selenomonas* erotellaan käyttämällä spesifisiä DNA-sekvenssejä tunnistavia restriktioentsyymejä. Ryhmäspesifisiä PCR-tekniikoita voidaan soveltaa myös indikaattoribakteerien (esim. koliformien) osoittamiseksi panimonäytteistä. Toisinaan seulontatestit mahdollistavat myös uusien pilaajalajien osoittamisen. Esimerkiksi ehdottomille anaeroobeille kehitetyllä ryhmäspesifisellä PCR:llä voitaisiin osoittaa myös uusia *Megasphaera*-lajeja. (Juvonen ym. 2003.)

Taulukko 1. Ryhmäspesifiset PCR-menetelmät gram-negatiivisille panimokontaminanteille (BREWPROC).

| Ryhmä   | PCR   |       |           |        |     |
|---|-------|-------|-----------|--------|-----|
|   | Geeli | ELISA | Real time |        |     |
|   |       |       | SGreen    | 5'-NUC | HYB |
| Etikkahappobakteerit  | X     | X     | X         | X      |     |
| Enterobakteerit   | X     | X     |           | X      |     |
| <i>Megasphaera</i> ja <i>Pectinatus</i> spp.  | X     |       |           | X      | X   |
| Anaerobit:<br><i>Pectinatus</i> , <i>Megasphaera</i> ,<br><i>Selenomonas</i> , <i>Zymophilus</i> spp. | X     |       | X         |        |     |
| Koliformit  | X     |       |           |        |     |

SGreen = SYBR Green I; 5'-NUC = eksonukleaasi assay eli hydrolyysiiprobe; HYB = hybridisaatioprobe

### 6.1.1.3 Laji- ja sukuspesifiset menetelmät BREWPROC-projektissa

PCR-menetelmiä, joilla on mahdollista osoittaa tiettyjä lajeja tai sukuja, voidaan käyttää paitsi kontaminaatioiden jäljittämiseen ja tunnistamiseen myös rutiinilaadunvalvontaan. Projektissa käytetyt gram-negatiivisten oluenpilaajabakteerien tunnistusmenetelmät perustuvat 16S rDNA:n tai 16S ja 23S rDNA:n välisen spacer-alueen monistamiseen. Haitallisimmat gram-negatiiviset oluenpilaajabakteerit, *M. cerevisiae* ja *Pectinatus* spp. voidaan osoittaa laji- tai sukutasolla millä tahansa taulukon 2 (s.19) PCR-formaatilla. Kaupallisia PCR-kittejä on saatavilla sekä standardi-PCR:lle että real time-PCR:lle. Enterobakteerilajeista vain *O. proteus* biotyypille I ja II sekä *E. colille* on kuvattu spesifisiä menetelmiä. (Juvonen ym. 2003.)

Taulukko 2. Laji- ja sukuspesifiset PCR-menetelmät gram-negatiivisille panimokontaminanteille (BREWPROC).

| Suku/laji   | Kohde-sekvenssi | PCR-testien määrä |       |           |       |     |
|---|-----------------|-------------------|-------|-----------|-------|-----|
|   |                 | Geeli             | ELISA | Real-time |       |     |
|   |                 |                   |       | SGreen    | 5'NUC | HYB |
| <i>Pectinatus</i> spp.                            | 16S rDNA        | 2                 | 1     |           | 1     | 1   |
| <i>P. frisingensis</i>                            | 16-23S rDNA     | 1                 |       |           |       |     |
|   | 16S rDNA        | 2                 |       |           | 1     | 1   |
| <i>P. cerevisiophilus</i>                         | 16-23S rDNA     | 1                 |       |           |       |     |
|   | 16S rDNA        | 2                 |       |           | 1     | 1   |
| Identifioimaton <i>Pectinatus</i> sp. (DSM 20764) | 16S rDNA        | 1                 |       |           |       |     |
| <i>M. cerevisiae</i>                              | 16S rDNA        | 3                 | 1     |           | 1     | 1   |
| <i>O. proteus</i> I                               | 16S rDNA        | 1                 |       | 1         |       |     |
| <i>O. proteus</i> II                              | 16S rDNA        | 1                 |       |           |       |     |
| <i>E. coli</i>                                    | 16S rDNA        | 5                 |       |           |       |     |

SGreen = SYBR Green I; 5'-NUC = eksonukleasi assay eli hydrolyysiiprobe; HYB = hybridisaatioprobe

#### 6.1.1.4 DNA:n valmistus suodattuvista ja ei-suodattuvista panimonäytteistä

Panimokontaminanttien osoittaminen olutnäytteistä PCR-tekniikalla on monimutkaista PCR:ää inhiboivien yhdisteiden ja äärimmäisen herkkyyden takia. Gram-negatiivisten bakteerien PCR-monistuskelpoista DNA:ta valmistetaan sekä suodattuvista että ei-suodattuvista panimonäytteistä seuraavien protokollien mukaan. (Juvonen ym. 2003.)

Suodattuviin näytemuotoihin kuuluvat vesi ja kirkas olut. Suodattuvien näytteiden esikäsittelyyn kuuluu yleensä kolme vaihetta. Ensin solut kerätään näytteistä suodattamalla ne polykarbonaattikalvon läpi matalampien kontaminaatiotasojen havaitsemiseksi. Seuraavaksi oluen sisältämät inhibiittorit inaktivoidaan tai poistetaan huuhtelemalla membraanikalvoa vedellä, pesuaineilla ja/tai alkaalilla. Tarvittavat kemikaalit riippuvat käytetystä PCR-menetelmästä, oluttyypistä ja näytetilavuudesta. Lopuksi DNA eristetään soluista: Käytettävissä on kaupallisia protokollia tai eristys voidaan tehdä kuumentamalla, fysikaaliseen käsittelyllä tai jäädyttämällä. Solujen hajottamisen (lysis) jälkeen membraania voidaan vielä liottaa kloroformissa. Kokonaiskäsittelyaika riippuu näytteiden määrästä, esimerkiksi kymmenen olutnäytettä voidaan prosessoida 30–70 minuutissa. (Juvonen ym. 2003.)

Standardi-PCR-menetelmien detektorajat vaihtelivat  $2 \dots 10^6$  pmy/suodatettu olutnäyte. Spesifiset PCR-menetelmät osoittivat  $5 \times 10^5 \dots 1 \times 10^6$  pmy/*Pectinatus* spp. ja  $5 \times 10^{3-4}$  pmy/*M. cerevisiae* 100 ml:ssa olutta. Spesifisten PCR-menetelmien detektorajat *O. proteus* biotyypille I olivat  $10^{2-4}$  pmy/100 ml ja ehdottomille anaeroobeille  $10^{0-3}$  pmy/100 ml. (Juvonen ym. 2003.) PCR-ELISAa ja PCR-geelielektroforeesia vertaillaessa *Pectinatus*- ja *M. cerevisiae* -lajien osoittamiseksi saavutettiin yhtäläiset detektorajat molemmilla analyyseillä. Kokonaisanalyysiaika real time -



tekniikoissa on 2,5–3,5 tuntia ja standardi-PCR-menetelmissä 6–8,5 tuntia. (Juvonen ym. 2003.)

Panimoissa tärkeimmät ei-suodattuvat näytteet ovat panimohiivaa sisältävät näytteet ja suodattamaton olut ( $10^{5-9}$  hiivasolua/ml). Lisäksi vierre ja esirikastetut olutnäytteet voidaan lukea tähän kategoriaan. Korkea hiivasolujen määrä inhiboi PCR:ää ja vähentää sen herkkyyttä. Kapillaari-qPCR-analysaattorit (esim. LightCycler) näyttävät olevan erityisen herkkiä hiivasolujen liiallisen määrän aiheuttamille häiriöille. Ei-suodattaville näytteille suositellaan sentrifugointia ennen PCR-ajoa, myös kemiallisilla lisäaineilla voidaan parantaa erottumista. Hiivasolut ovat suurempia kuin bakteerisolut ja jäävät sedimenttiin, kun taas useimmat bakteerit erottuvat supernatanttiin. (Juvonen ym. 2003.)

Haitalliset määrät entero- ja etikkahappobakteereita ovat osoitettavissa suoraan prosessinäytteistä PCR:llä. Esikokeissa  $10^{3-4}$  *E. coli* -soluja oli osoitettavissa  $3 \times 10^7$  hiivasolun joukosta käyttämällä yksinkertaista esikäsittelymenetelmää ja enterobakteerispesifistä PCR:ää ja geelielektroforeesia. PCR-ELISA alensi detektorirajaa kymmenellä yksiköllä. Standardi-PCR-menetelmä *O. proteus* biotyypille II osoitti  $10^4$  pmy/ml vierrettä. Etikkahappobakteereille saavutettiin  $10^{2-3}$  detektoriraja ja anaerobiset hiivakontaminantit pystyttiin osoittamaan tasolla  $10^{1-3}$  pmy/ $10^8$  hiivasolua. *Nested PCR* -menetelmää on käytetty maitohappobakteerien havaitsemisen helpottamiseksi hiivalietteisissä, mutta niitä ei vielä ole sovellettu gram-negatiivisten pilaajabakteerien määrittämiseen. (Juvonen ym. 2003.) *Nested PCR*-menetelmässä käytetään kahta alukeparia, jotka toimivat kahdessa peräkkäisessä PCR-reaktiossa siten, että jälkimmäisessä reaktiossa toinen alukepari monistaa ensimmäisessä reaktiossa ensimmäisen alukeparin avulla syntynyttä PCR-tuotetta.

Edellä kerrotun perusteella voidaan päätellä, että tähän asti kuvattujen PCR-menetelmien detektorirajat eivät ole riittäviä valmiin oluen rutiinilaudunvalvonnassa, missä vaaditaan jopa alle 10 pilaajabakteerin osoittamista/pullo. Lisäksi menetelmät eivät pysty erottelemaan toisistaan eläviä ja kuolleita soluja. Nämä ongelmat ovat ratkaistavissa esirikastuksen avulla. Menetelmän herkkyyden maksimoimisen sijaan solumäärää kasvatetaan havaittavalle tasolle sopivassa elatusaineessa. Erilaisia konsentroituja elatusaineita voidaan lisätä suoraan olueen kiihdyttämään näiden bakteerien kasvua. Sopivia elatusaineita ovat konsentroidut MRS- ja Micro Inoculum (Difco) -liemet sekä NBB-C (Döhler). Elatusaineet eroavat toisistaan selektiivisyyden, käytön helppouden ja kaupallisen saatavuuden perusteella. Artikkelin mukaan konsentroidut MIB- ja MRS-liemet edistävät *Megasphaera* ja *Pectinatuksen* nopeaa kasvua. Kannasta, alkuperäisen kontaminaation tasosta ja oluen alkoholipitoisuudesta riippuen vaaditaan 1–4 päivän esirikastusvaihe ennen PCR-analyysiä. (Juvonen ym. 2003.)

#### 6.1.1.5 BREWPROC-hankkeen päätelmät ja PCR-menetelmien tulevaisuus

PCR voi nopeuttaa gram-negatiivisten pilaajabakteerien ja indikaattoribakteerien osoittamista ja tunnistamista panimoiden laadunvalvontalaboratorioissa. Haitalliset enterobakteeri- ja etikkahappobakteeritasot ( $10^{2-4}$ ) pro-

sessinäytteistä voidaan osoittaa yhdessä työpäivässä. Anaerobiset bakteerit ovat osoitettavissa huomattavasti nopeammin kuin rutiinimenetelmillä. Myös lajintunnistus on mahdollista tehdä yhden työpäivän aikana. Tulosten nopea saatavuus mahdollistaa kontaminaatio-ongelmien ehkäisemisen, nopean tunnistamisen ja ratkaisemisen. Tämän ansiosta oluen pilaantuminen ja tuotehävikki voidaan minimoida. PCR myös yksinkertaistaa gram-negatiivisten bakteerien tunnistamista, koska isolaattien puhdistaminen ja fenotyypitys ei ole tarpeen. Tekniikan spesifisyydestä johtuen pilaajabakteerit ovat erotettavissa ei-pilaajabakteereista. (Juvonen ym. 2003.)

Gram-negatiivisille bakteereille käytettävien PCR-sovellusten eduista huolimatta tuotekehitystä tarvitaan edelleen. Vaikka tavallisimmat panimokontaminantit voidaan spesifisesti tunnistaa PCR:n avulla, ei testipaketti ole täydellinen. Tietämyksen mukaan PCR-testit eivät tunnista muun muassa seuraavia: uudet *Megasphaera* spp., *Z. mobilis*, *S. lacticifex* tai *Zymophilus* spp. Sekvenssidatan puute ja informaatio tiettyjen gram-negatiivisten bakteerien esiintymisestä ja roolista panimoissa hidastaa tois- taiseksi menetelmien suunnittelua. Analyysin yksinkertaistamiseksi voitaisiin kehittää preanalyyttisten vaiheiden automaatiota ja multiplex-PCR-menetelmiä. Tulevaisuudessa joukko pilaajalajeja voisi olla mahdollista tunnistaa kaikki tarvittavat koettimet sisältävällä DNA-sirulla. (Juvonen ym. 2003.)

Nykyiset PCR-testit gram-negatiivisille panimokontaminanteille ovat parhaimmillaankin vain semikvantitatiivisia. Kvantitatiivinen menetelmä olisi kuitenkin parempi prosessikontaminanteille ja indikaattoriorganismeille (koliformeille). Luotettavia rikastusmenetelmiä tarvittaisiin osoittamaan pienet entero- ja etikkahappobakteerikontaminaatiot. Haasteena on myös elävien ja kuolleiden solujen erottaminen toisistaan esirikastamattomista näytteistä ja näytteistä, joiden oletetaan sisältävän suuria määriä kuolleita gram-negatiivisia bakteereita (esim. keitetty vierre). BREWPROC-projektissa kehitetyt PCR-menetelmät gram-negatiivisille bakteereille ovat olleet sittemmin arvioitavina panimoissa ja riippumattomissa tutkimuslaboratorioissa. Artikkelin mukaan objektiivista dataa niiden käytännön sovelluksista oli odotettavissa vuoden 2003 loppuun mennessä. (Juvonen ym. 2003.)

## 6.2 Gram-positiivisten panimokontaminanttien osoittaminen

Partanen selvitti vuonna 2004 julkaistussa tutkimuksessa RT-PCR-tekniikan (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*; käänteiskopiointi-PCR) soveltuvuutta elävien oluenpilaajabakteerien osoittamiseen. RT-PCR:ssä monistetaan DNA:n sijasta RNA:ta. Elävät pilaajamikrobit, jotka pystyvät lisääntymään panimoissa ja/tai valmiissa oluessa, aiheuttavat suurimman riskin panimoteollisuudelle. Perinteisen PCR:n, jossa osoitetaan DNA:ta, huonona puolena on, että sen avulla ei pystytä erottamaan eläviä ja kuolleita pilaajabakteereita toisistaan, koska DNA säilyy kuolleissa soluissa stabiilina pitkiä aikoja. RNA on DNA:ta epästabiilimpi molekyyli, joka hajoaa kuolleessa solussa DNA:ta nopeammin. RT-PCR on nopea, herkkä ja spesifinen menetelmä RNA-molekyylien monistamiseen. Partasen työssä tutkittiin reaaliaikaisen RT-PCR:n soveltuvuutta elä-

vien *L. brevis* -, *L. lindneri* - ja *P. damnosus* -bakteerien osoittamiseen. Lisäksi vertailtiin erilaisia RNA:n eristysmenetelmiä. Työssä käytetyt kohdegeenit olivat 16S rRNA ja transkription elongaatiotekniikan (Ef-TU) mRNA. RT-PCR suoritettiin reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR-menetelmällä (LightCycler, Roche). Työssä vertailtiin myös erilaisten tappokäsittelyjen, kuumennuksen ja desinfiointiaineen vaikutusta kohde-RNA:n hajoamiseen kuolleessa solussa. Eri menetelmillä tapettuja soluja inkuboitiin huoneenlämpötilassa kolme viikkoa, jona aikana kohde-RNA:n hajoamista seurattiin RT-PCR:n avulla. Vaikka RNA:n määrän todettiin hitaasti vähenevän inkubointiajan funktiona sekä kuumentamalla että desinfiointiaineella tapetuista soluista, RNA kohdemolekyylit (16S rRNA ja Ef-TU mRNA) monistuivat RT-PCR:ssä vielä kolme viikkoa tappokäsittelyjen jälkeen. Tutkitun menetelmän ei siksi todettu soveltuvan sellaisenaan elävien oluenpilaajabakteerien osoittamiseen.

### 6.3 Multiplex-PCR

Multiplex-PCR tarkoittaa PCR-tekniikkaa, jossa monistetaan samanaikaisesti useita kohdegeenejä useita alukepareja käyttämällä. Alukeparit on suunniteltu siten, että ne toimivat PCR-reaktiossa samassa lämpötilassa. Menetelmä on kustannustehokas, se säästää sekä aikaa että kalliita reagensseja. Multiplex-PCR:ää on hyödynnetty muun muassa patogeenien tunnistuksessa, SNP-genotyypityksessä (*Single Nucleotide Polymorphism*) ja rikosoikeudellisissa tutkimuksissa.

Japanilainen tutkijaryhmä, Iijima, Asano, Suzuki, Kuriyama, Ogata ja Kitagawa, julkaisi vuonna 2008 modifioitua multiplex-PCR-menetelmää *Pectinatus*- ja kokkibakteeri-kontaminanttien osoittamiseksi. Tutkimuksessa jatkettiin aikaisempien multiplex-menetelmien, P. multiplex *Pectinatus*-kokeille ja C. multiplex kokeille, kehittämistä luomalla spesifiset alukkeet uusien pilaajaorganismien *P. haikarae*, *M. sueciensis* ja *M. paucivorans* osoittamiseksi. Uudet alukkeet perustuivat 16S rRNA -geenin nukleotidisekvensseihin, yksi alukepari *P. haikarae* -bakteerilajille ja yleisalukepari yhteisesti *M. sueciensis* - ja *M. paucivorans* -lajeille, joiden 16S rRNA:sta on 99 % samaa. Modifioitujen primer-mixien spesifisyys, reaktiivisuus ja herkkyys arvioitiin multiplex-PCR:llä. Menetelmällä pystyttiin tunnistamaan kolme *Pectinatus*-lajia (*P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis* ja *P. haikarae*) ja kuusi kokkilajia (*P. damnosus*, *P. inopinatus* ja *P. clausenii* sekä *M. cerevisiae*, *M. sueciensis* ja *M. paucivorans*). Kuvatut menetelmät ovat tutkijoiden mukaan hyödynnettävissä panimoiden laadunvalvonnassa yksinkertaisena ja tarkkana menetelmänä mikrobiologisten haittojen vähentämiseksi ja oluen korkean laadun varmistamiseksi.

Pittet, Haakensen ja Ziola käsitelivät vuonna 2010 julkaistussa tutkimuksessa gram-negatiivisten ja gram-positiivisten oluenpilaajafirmikuuttien osoittamista real time multiplex-PCR:n avulla. Firmikuuttien pääjakso jaotellaan kolmeen bakteeriluokkaan, jotka ovat fakultatiivisesti aerobiset baccillit (*Bacillales*, *Lactobacillales*), anaerobiset klostridit (*Clostridia*) ja *Mollicutes*-luokka (soluseinättömät bakteerit). Tutkijoiden aiempi selvitys käsiteli firmikuuttien osoittamista real time-PCR-tekniikan avulla, uudessa tutkimuksessa haluttiin luoda edelliseen tutkimukseen perustuva mene-

telmä, jolla voidaan osoittaa ja erotella gram-positiiviset (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) ja gram-negatiiviset (*Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* ja *Zymophilus*) firmikuutit. Aiempaa tutkimusta varten oli kehitetty kaksi real time-PCR hydrolyysikoetinta bakteerien ja firmikuuttien osoittamiseen: universaali koetin R375 eubakteereille ja firmikuuttispesifinen koetin. Näitä koettimia käytettiin nyt yhdessä uuden GmNeg-koettimen kanssa, joka osoittaa vain gram-negatiiviset oluenpilaajafirmikuutit. GmNeg-koettimen spesifisyys testattiin geelielektroforeesilla ja real time-PCR:llä, mitkä testit osoittivat GmNeg-koettimen osoittavan gram-negatiiviset firmikuutit, mutta ei gram-positiivisia firmikuutteja eikä firmikuuttien jaksoon kuulumattomia bakteereita. Tutkimuksessa esitellyllä real time multiplex-PCR:llä on mahdollista tarkasti ja nopeasti osoittaa gram-negatiiviset oluenpilaajafirmikuutit ja samanaikaisesti erotella toisistaan gram-positiiviset ja -negatiiviset firmikuutit. Tutkijoiden mukaan menetelmä on suhteellisen halpa real time -tekniikkaa jo hyödyntäville laboratorioille, lisäksi se tarjoaa mahdollisuuden samanaikaisesti paitsi osoittaa pilaajaorganismi myös tunnistaa organismin pilaajapotentiaali pos/neg-erottelulla.

## 7 TYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön haasteellisuus todettiin heti alussa, sillä näytteitä ei aina saa niistä prosessin vaiheista, mistä olisi tarve eikä näytteenottoa voi muutenkaan suunnitella kovin tarkkaan etukäteen. Lisäksi on mahdollista, ettei tutkittavista näytteistä löydy viitteitä minkäänlaisesta kontaminaatiosta eli toisin sanoen prosessivaihe on puhdas. Prosessinäytteiden analysointia qPCR:llä oli teetetty parin vuoden ajan opiskelijatyönä Helsingin Yliopiston ympäristöekologian laitoksella Lahdessa. Tutkimusten perusteella mahdollinen kontaminaatiolähde oli paikannettu käymiseen tai tölkityseen. Kuten luvussa 2 esitettiin, tämän opinnäytetyön aiheeksi rajattiin oluen käyminen.

### 7.1 Näytteenottosuunnitelma

Suunnitelman mukaan opinnäytetyöhön sisällytettiin näytteenotto prosessista, vierteen jäädytyksestä puskuritankkiin ennen suodatusta; näytteiden rikastusviljely sekä analysointi qPCR-laitteistolla. Prosessikaavio ja näytteenottopisteet on esitetty liitteessä 1. Hartwallin panimolla suoritettiin näytteiden otto ja rikastus. Helsingin Yliopiston ympäristöekologian laitoksella Lahden yksikössä eristettiin DNA ja ajettiin qPCR Rothen Light Cycler<sup>TM</sup> 2.0 -analysaattorilla.

Näytteenottosuunnitelman mukaiset näytteenottokohdat prosessissa olivat

#### 1. Vierteen jäädytys:

- jäädytyksen alusta (vesi-vierreseos)
- 5 min. alusta
- 30 min. alusta
- jäädytyksen lopusta (vesi-vierreseos)
- käymistankki

2. Suodatus:

- käymistankki
- näyte ennen jäädytintä
- näyte jäädyttimen jälkeen
- puskuritankki
- (par-tankki)

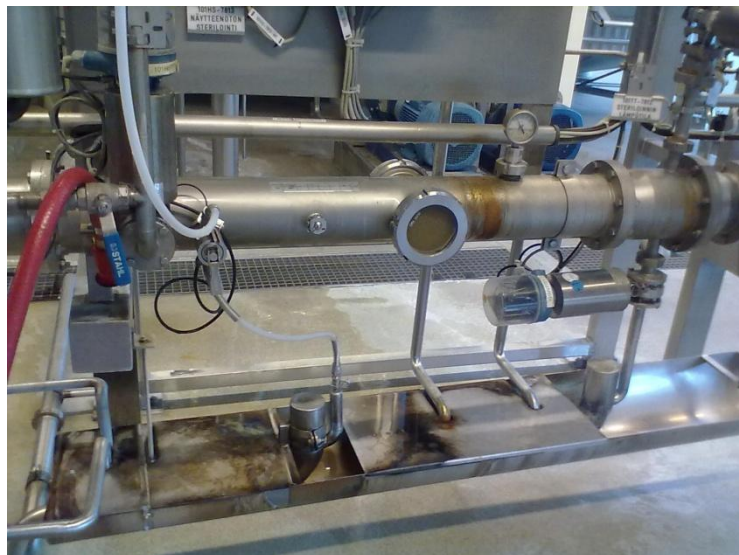
3. Käymistankkien CO<sub>2</sub>-näytteenottolinja

Näytteiden viljely ja rikastus suunniteltiin tehtäväksi seuraavilla menetelmillä:

- maljaviljely: aerobit WLN- ja WLD-agar (hiivaiset näytteet), inkubointi +27 °C:ssa 3 vrk ja anaerobit NBB-A-maljoilla anaerobipöntöissä +27 °C:ssa 6 vrk,
- liemiviljely: anaerobien rikastus NBB-C pulloissa +30 °C:ssa 3–21 vrk, minä aikana PCR-ajo tarvittaessa useampaan kertaan.

7.2 Näytteenotto ja esikäsittely

Näytteitä otettiin aluksi 500 ml:n pulloihin vierteen jäädytyksestä (kuva 6) sekä suodatuksen näytteenottopisteistä (kuvat 7–8, s. 25). WLN-, WLD- ja NBB-A-maljoille viljeltiin 5 ml ja NBB-C-pulloihin 74 ml vierrenäytettä tai 29 ml suodatettavaa olutnäytettä (NBB-C-lientä pulloissa oli 18 ml). CO<sub>2</sub>-näytteitä kerättiin näytteenottolinjan hanasta (kuva 9, s. 26) 15 minuutin ajan NBB-C-pulloon. Käymistankeista otettavaa näytetilavuutta nostettiin myöhemmin 1 000 ml:aan näytteen edustavuuden parantamiseksi.



Kuva 6. Näytteenottopiste: vierteen jäädytys.



Kuva 7. Näytteenotto-paneeli: käymistankit.



Kuva 8. Olutsuodatin.



Kuva 9. CO<sub>2</sub>-näytteenottolinja käymistankin päällä.

Viljelyssä ja esirikastuksessa käytettiin seuraavia elatusaineita:

- WL Nutrient Agar, WLN (monitoiminen mikrobiologinen elatusaine aerobisten panimo-organismien osoittamiseksi; *Bacillus*-bakteerit, myös maitohappobakteerit kuten *Pediococcus* ja *Lactobacillus* voi kasvaa,
- WL Differential Agar, WLD (aerobit, hiivaisille näytteille),
- NBB-A (Nachweismedium für bierschädliche Bakterien, agar; kiinteä alusta anaerobeille),
- NBB-C (Nachweismedium für bierschädliche Bakterien, concentrate; nestemäinen alusta anaerobeille).

### 7.3 Työssä käytetty PCR-menetelmä ja PCR-kitti

Työssä käytetty laboratoriostandardi kuvaa menetelmän, jonka avulla voidaan löytää ja tunnistaa 22 eri oluen pilaajaorganismia Roche LightCycler™ 2.0 -analysointilaitteella ja Foodproof Beer Screening -kitillä (Biotecon Diagnostics). Kanavalla MP705 voidaan tunnistaa *Megasphaera* sp, *Pediococcus inopinatus*, *P. damnosus*, *Lactobacillus brevis* ja *L. lindneri* sekä kanavalla MP640 ryhmät *L.brevis*, *L.casei*, *L.buchneri*, *P.damnosus*,

*P.parvulus* ja *Pectinatus* sekä lajit *P.claussenii*, *Megasphaera cerevisiae*, *M. paucivorans*, *M. sueciensis*, *L. rossiae* ja *L. perolens*. Testin herkkyys pilaajaorganismeille on  $\geq 10^2$  pmy/ml, *Megasphaera* ja *L. brevis* voidaan valmistajan mukaan havaita pitoisuudesta 10 pmy/ml.

Menetelmä soveltuu sameille olutnäytteille, esirikastetuille nestemäisille näytteille ja agarilla kasvatetuille pesäkkeille. Menetelmässä mikro-organismit esikasvatetaan rikastamalla niitä esimerkiksi olut-NBB-C-liemessä tai kiinteällä agar-alustalla. Mikro-organismien DNA eristetään puskuriin (lysis buffer) suspensioimalla, minkä jälkeen suoritetaan PCR-ajo ja sulamiskäyräanalyysi.

#### 7.4 Näytteiden valmistus ja ajo qPCR-analysaattorilla

Koska PCR:llä voidaan todeta hyvin pieniä DNA-määriä, se on myös herkkä kontaminaatioille. PCR-työskentelyssä noudatetaan erityistä huolellisuutta ja tiettyjä varotoimia kontaminaatioiden aiheuttamien väärien tulosten ehkäisemiseksi. Työskentely tapahtuu aseptisesti ja suojakäsineitä käyttäen. Puhdastilan laminaarikaappi ja kaikki työvälineet puhdistetaan etanolilla ja UV-käsittelyllä. DNA:n eristys ja mastermixin käsittely pidetään erillään toisistaan, DNA käsitellään laboratoriossa ja mastermix puhdastilassa laminaarikaapissa. Työssä käytetään eri pipettejä ja filtterikärkiä.

Näytteet esikäsiteltiin rikastamalla tutkittavaa olut- tai CO<sub>2</sub>-näytettä NBBC-agarissa +30 °C:ssa inkuboimalla (ks. luku 7.2). Liitteessä 2 on esitetty näytteiden inkubointiajat ennen PCR-ajoa. Näytteitä pipetoitiin 1 ml steriileihin eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin. Supernatantti poistettiin pipetillä ja pelletin päälle pipetoitiin 50 µl puskuriliuosta. Vortexilla sekoituksen jälkeen putkia inkuboitiin lämpöhauteessa +95 °C:ssa 10 minuuttia, minkä jälkeen putket vortexoitiin ja sentrifugoitiin uudelleen. PCR-mix valmistettiin puhdastilassa laminaarikaapissa.

Lasikapillaareihin pipetoitiin 15 µl mastermixiä ja 5 µl näytettä (=supernatanttia)/kontrollia. Mastermix-liuos sisälsi Beerscreening Master Mix -liuosta, entsyymiliuoksen (FastStart Taq DNA Polymerase + Uracil-DNA Glycosylase), probet eli koettimet ja alukkeet.

Kontrolleina käytettiin seuraavia:

- positiivinen kontrolli = PCR-kitin positiivinen kontrolli-DNA (kontrolloi reagenssien toimivuuden),
- negatiivinen kontrolli, ”eristyskontrolli” = autoklavoitu Millipore-vesi + puskuri (menetelmän toimivuus, eristyksen onnistuminen),
- vesi (PCR-kitin toimivuus).

Kapillaarit korkitettiin (kuva 10, s. 28), sentrifugoitiin, asetettiin näytekaruselliin (kuva 11, s. 28) ja suoritettiin PCR-ajo (kuva 12, s. 29).





Kuva 10. Näytekapillaarien korkitus laminaarikaapissa.

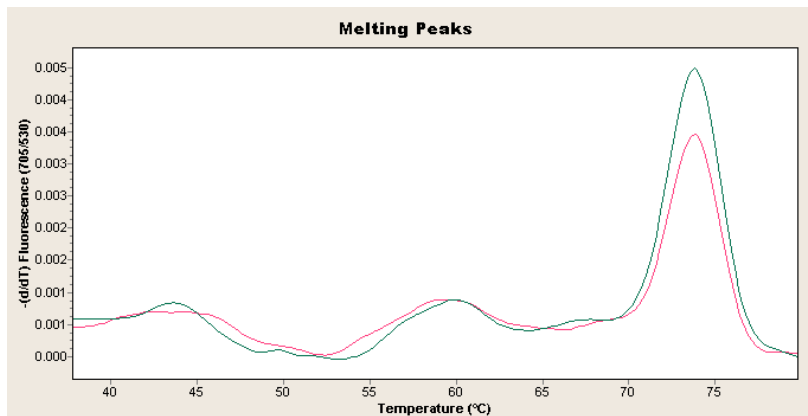


Kuva 11. Näytteet valmiina 40-paikkaisessa näyttekarusellissa.

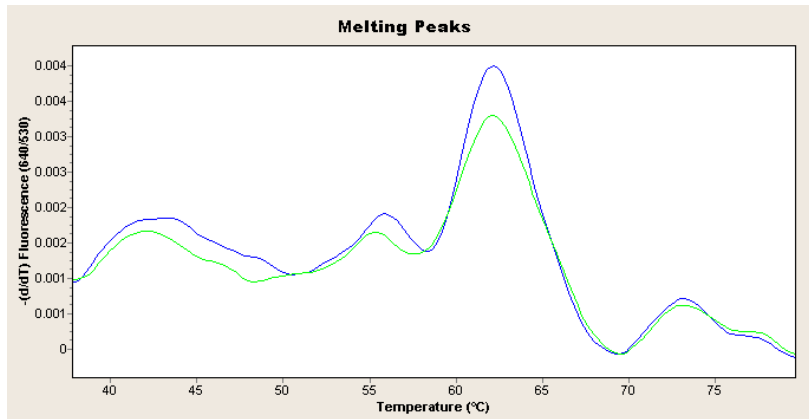


Kuva 12. PCR-ajo käynnissä.

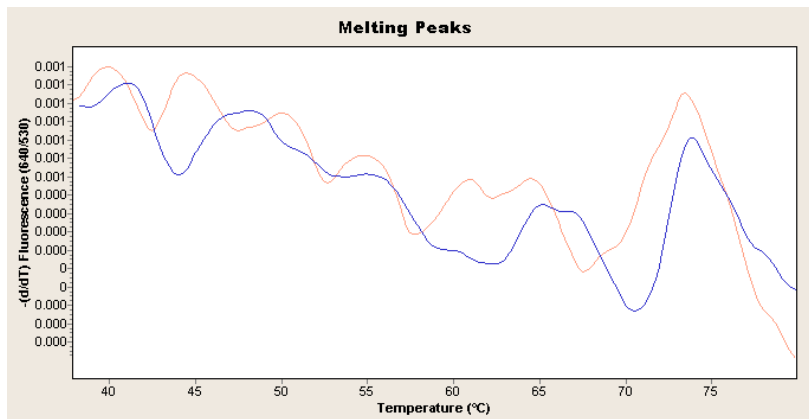
Ajon valmistuttua reaktiokuvaajista luettiin tulokset: näytteiden sulamispisteitä (kanavat MP705 ja MP640) verrattiin käytetyn laboratoriostandardin taulukkoon. PCR-analyysin tulos oli joko positiivinen (kuviot 2–3, s. 30) tai negatiivinen (kuvio 4, s. 30). Näytteiden valmistus ja ajo kesti yhteensä n. 2 tuntia.



Kuvio 2. Esimerkki positiivisesta näytteen sulamispistekäyrästä. *Lactobacillus brevis* (MP705). Näyte ja rinnakkaisnäyte. Huippu +59,5 °C ja kontrolli +72 °C.



Kuvio 3. Esimerkki positiivisesta näytteen sulamispistekäyrästä. *Lactobacillus casei* (MP640). Näyte ja rinnakkaisnäyte. Huiput +56 °C ja +61 °C.



Kuvio 4. Esimerkki negatiivisesta näytteen sulamispistekäyrästä. Näyte ja rinnakkaisnäyte (MP640). Useita huippuja, ei vastaavuutta taulukossa.

Näytteenottojakson lähestyessä päätöstään todettiin, että kerätyistä näytteistä ainoastaan yksi vierrenäyte oli osoitettu positiiviseksi, kaikki muut tutkitut näytteet olivat olleet negatiivisia. Johtopäätöksenä voitiin todeta, että opinnäytetyön johdosta lisääntynyt näytteenotto ei ollut kasvattanut positiivisten näytteiden suhteellista osuutta rutiininäytteenottoon verrattuna. Tehtaan omavalvonta toimii siis tutkimusten perusteella hyvin. Näytteiden edustavuuden parantamiseksi käymistankeista päätettiin ottaa suuremmat näytemäärät eli näytemäärä kasvatettiin 500 ml:sta 1 000 ml:aan. Näytteenottoa vierteestä jatkettiin ja varsinkin CO<sub>2</sub>-linjoilta tarvittiin lisää näytteitä.

## 8 TULOKSET

Opinnäytetyössä kerättiin yhteensä 71 näytettä, joista 15 oli vierrenäytteitä, 32 suodatusnäytteitä ja 24 CO<sub>2</sub>-näytteitä.

Positiivisia näytteitä löytyi seuraavasti:

- vierre: 1 positiivinen (*L.buchneri*)
- suodatus: 1 positiivinen (*L.casei*)
- CO<sub>2</sub>-linjat: 12 positiivista (*L.casei*, *L.brevis*)

PCR-ajojen tulokset on esitetty taulukoissa 3–5. Kasvu agarmaljoilla (WLN, WLD, NBB-A) on merkitty joko – (ei kasvua) tai + (kasvua). Esi-rikastusaika NBB-C-pulloissa on merkitty vuorokausina. PCR-ajon tulos on joko negatiivinen tai osoitettu bakteerilaji/-ryhmä.

Taulukko 3. Viljely- ja PCR-tulokset vierteen jäädytyksestä.

| 1. Vierteen jäädytys |  |              |                |        |                             |
|----------------------|--|--------------|----------------|--------|-----------------------------|
| Näyte                |  | WLN<br>3 vrk | NBB-A<br>6 vrk | NBB-C  | PCR                         |
| 1.1.                 | vierre jäädytyksen alusta (vesi-vierreseos)            | -            | -              | 10 vrk | neg                         |
| 1.2.                 | 5 min jäädytyksen alusta                               | -            | -              |        | neg                         |
| 1.3.                 | 30 min jäädytyksen alusta                              | -            | -              |        | neg                         |
| 1.4.                 | vierre 30 min jäädytyksen alusta                       | -            | -              | 14 vrk | neg                         |
| 1.5.                 | vierre jäädytyksen lopusta (vesi-vierreseos)           | -            | -              |        | <i>L. buchneri</i><br>group |
| 1.6.                 | vierre 30 min. jäädytyksen alusta (1.keitto)           | -            | -              | 13 vrk | neg                         |
| 1.7.                 | vierre 45 min. jäädytyksen alusta (2.keitto)           | -            | -              |        | neg                         |
| 1.8.                 | vierre jäädytyksen lopusta (vesi-vierreseos, 2.keitto) | -            | -              |        | neg                         |
| 1.9.                 | vierre jäädytyksen lopusta (vesi-vierreseos)           | -            | -              | 14 vrk | neg                         |
| 1.10.                | vierre 15 min. jäädytyksen alusta                      | -            | -              | 15 vrk | neg                         |
| 1.11.                | vierre 30 min. jäädytyksen alusta                      | -            | -              |        | neg                         |
| 1.12.                | vierre jäädytyksen lopusta (vesi-vierreseos)           | -            | -              |        | neg                         |
| 1.13.                | vierre 15 min. jäädytyksen alusta                      | -            | -              | 9 vrk  | neg                         |
| 1.14.                | vierre 30 min. jäädytyksen alusta                      | -            | -              |        | neg                         |
| 1.15.                | vierre jäädytyksen lopusta (vesi-vierreseos)           | -            | -              |        | neg                         |

Taulukko 4. Viljely- ja PCR-tulokset suodatusvaiheesta.

| 2. Suodatusvaihe |                                 |             |               |        |                 |
|------------------|---------------------------------|-------------|---------------|--------|-----------------|
| Näyte            |                                 | WLD<br>3vrk | NBB-A<br>6vrk | NBB-C  | PCR             |
| 2.1.             | kt 158 suodatuksen keskeltä     | -           | -             | 3 vrk  | neg             |
| 2.2.             | np 50 suodatuksen keskeltä      | -           | -             |        | neg             |
| 2.3.             | np 78 suodatuksen keskeltä      | -           | -             |        | neg             |
| 2.4.             | pt 2 (454) suodatuksen keskeltä | -           | -             |        | neg             |
| 2.5.             | kt 145 suodatuksen alusta       | -           | -             | 14 vrk | neg             |
| 2.6.             | np 50 suodatuksen alusta        | -           | -             |        | neg             |
| 2.7.             | np 78 suodatuksen alusta        | -           | -             |        | neg             |
| 2.8.             | pt 1 (453) suodatuksen alusta   | -           | -             |        | neg             |
| 2.9.             | kt 145 suodatuksen keskeltä     | -           | -             |        | neg             |
| 2.10.            | np 50 suodatuksen keskeltä      | -           | -             |        | neg             |
| 2.11.            | np 78 suodatuksen keskeltä      | -           | -             |        | neg             |
| 2.12.            | pt 1 (453) suodatuksen keskeltä | -           | -             |        | neg             |
| 2.13.            | kt 137                          | -           | -             | 13 vrk | neg             |
| 2.14.            | kt 111 suodatuksen keskeltä     | -           | -             | 15 vrk | neg             |
| 2.15.            | np 50 suodatuksen keskeltä      | -           | -             |        | neg             |
| 2.16.            | np 78 suodatuksen keskeltä      | +(1 hp)     | -             |        | neg             |
| 2.17.            | pt 1 (453) suodatuksen keskeltä | +(3 hp)     | -             |        | neg             |
| 2.18.            | np 50 suodatuksen lopusta       | +(1 dk)     | -             |        | <i>L. casei</i> |
| 2.19.            | np 78 suodatuksen lopusta       | +(1 hp)     | -             |        | neg             |
| 2.20.            | pt 1 (453) suodatuksen lopusta  | +(4 hp)     | -             |        | neg             |
| 2.21.            | par-tankki (455)                | -           | -             | 16 vrk | neg             |
| 2.22.            | kt 138 suodatuksen keskeltä     | -           | -             | 9 vrk  | neg             |
| 2.23.            | np 50 suodatuksen keskeltä      | -           | -             |        | neg             |
| 2.24.            | np 78 suodatuksen keskeltä      | -           | -             |        | neg             |
| 2.25.            | pt 1 (453) suodatuksen keskeltä | -           | -             |        | neg             |

jatkuu

## Oluen käymisen pilaajamikrobit: diagnostiikka qPCR-tekniikalla

jatkuu

|       |                                 |         |   |        |     |
|-------|---------------------------------|---------|---|--------|-----|
| 2.26. | kt 139 suodatuksen keskeltä     | -       | - | 9 vrk  | neg |
| 2.27. | np 50 suodatuksen keskeltä      | -       | - |        | neg |
| 2.28. | np 78 suodatuksen keskeltä      | -       | - |        | neg |
| 2.29. | pt 1 (453) suodatuksen keskeltä | -       | - |        | neg |
| 2.30. | kt 163*                         | -       | - | 15 vrk | neg |
| 2.31. | pt 1 (453) suodatuksen lopusta  | +(1 hp) | - | 5 vrk  | neg |
| 2.32. | kt 156*                         | -       | - | 9 vrk  | neg |

\* näytemäärä 1 000ml

kt = käymistankki, np = näytepiste, pt = puskuritankki  
hp = homepesäke, dk = diplokokkipesäke (mikroskopoitu)

Taulukko 5. Viljely- ja PCR-tulokset CO<sub>2</sub>-linjoilta.

| 3. CO <sub>2</sub> -näytteet |        |        |                            |
|------------------------------|--------|--------|----------------------------|
| Näyte                        |        | NBB-C  | PCR                        |
| 3.1.                         | kt 148 | 15 vrk | <i>L. casei, L. brevis</i> |
| 3.2.                         | kt 150 |        | <i>L. casei, L. brevis</i> |
| 3.3.                         | kt 107 |        | <i>L. casei</i>            |
| 3.4.                         | kt 153 |        | <i>L. casei</i>            |
| 3.5.                         | kt 108 | 18 vrk | <i>L. casei</i>            |
| 3.6.                         | kt 109 |        | neg                        |
| 3.7.                         | kt 140 |        | <i>L. casei</i>            |
| 3.8.                         | kt 151 |        | <i>L. casei</i>            |
| 3.9.                         | kt 135 | 15 vrk | neg                        |
| 3.10.                        | kt 154 |        | neg                        |
| 3.11.                        | kt 156 |        | neg                        |
| 3.12.                        | kt 157 | 8 vrk  | <i>L. casei</i>            |
| 3.13.                        | kt 153 |        | <i>L. casei</i>            |
| 3.14.                        | kt 145 |        | <i>L. casei</i>            |

jatkuu

|        |       |        |       |                 |
|--------|-------|--------|-------|-----------------|
| jatkuu | 3.15. | kt 149 | 8 vrk | <i>L. casei</i> |
|        | 3.16. | kt 135 |       | <i>L. casei</i> |
|        | 3.17. | kt 155 |       | neg             |
|        | 3.18. | kt 156 |       | neg             |
|        | 3.19. | kt 158 |       | neg             |
|        | 3.20. | kt 155 | 6 vrk | neg             |
|        | 3.21. | kt 147 |       | neg             |
|        | 3.22. | kt 145 |       | neg             |
|        | 3.23. | kt 149 |       | neg             |
|        | 3.24. | kt 150 |       | neg             |

kt = käymistankki

## 9 JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTOIMENPITEET

Tutkimuksen perusteella voidaan sanoa, että opinnäytetyössä tutkittu prosessivaihe, oluen valmistus, on puhdas vierteen jäähtymisen ja suodatusvaiheen osalta. Kontaminaatioita löytyi käymistankkien CO<sub>2</sub>-linjoilta. Osoitetuista panimokontaminanteista *L.brevis* on merkittävä pilaajaorganismi, kun taas *L.buchneri* ja *L.casei* ovat harvinaisempia ja heikompia pilaajia eikä niitä pidetä suurina uhkina oluen laadulle. PCR on spesifisempi menetelmä kuin käytössä olevat rutiinimenetelmät, aerobi/anaerobiviljely, mistä syystä yksittäiset lajilöydöt eivät rutiinivalvonnassa ole edes mahdollisia.

CO<sub>2</sub>-linjojen puhtaus ja oikea näytteenottotapa on tarkistettava. Käytössä oleva näytteenottohana ei ole varsinainen mikrobiologinen hana (kuva 9, s. 26), näytettä otettaessa hanan sterilointi tapahtuu etanolilla ja liekillä, ja on mahdollista, että näytteet kontaminoituvat näytteenoton yhteydessä ulkopuolelta, mikä voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Ongelma voidaan ratkaista korvaamalla näytteenottohanat mikrobiologisesti puhtaalla ratkaisulla. CO<sub>2</sub>-linjojen pesutiheys tarkistetaan.

## 10 POHDINTA

Opinnäytetyön riskinä oli, että mikrobeja ei saada kasvamaan viljelyssä tai niitä ei löydetä. Kuten edellä on todettu, obligaatit anaerobit ovat hankalia osoitettavia eikä saatujen tulosten perusteella voida olla varmoja, johtuuko näytteiden negatiivisuus pelkästään prosessin hyvästä puhtaustasosta. Saattaa olla, että mikrobit jäivät löytymättä siitä syystä, ettei näytteitä saatu otettua juuri oikeista kohteista tai mikrobeita ei saatu kasvamaan viljelyssä/esirikastuksessa. Korkea hiivasolujen määrä saattoi myös inhiboida

PCR:ää ja vähentää sen herkkyyttä. Kirjallisuuden mukaan juuri LightCycler-analysaattori voi olla erityisen herkkiä hiivasolujen aiheuttamille häiriöille.

Aikataulun takia näytteiden saanti sopivista prosessikohteista ei aina ollut mahdollista. Esimerkiksi yhtenäistä näytesarjaa käymistankista puskuritankkiin ei aina saatu. Aikataulu rajoitti myös kerättyjen näytteiden kokonaisuutta. Isomman näyteaineiston analysoiminen antaisi mielestäni luottavamman kuvan prosessin puhtaudesta.

PCR-työskentely, näytteiden valmistus ja PCR-ajo yliopiston laboratoriossa onnistui hyvin. Tilat ja laitteet olivat erinomaiset. Sain työskennellä haluamini ajankohtina ja sain asiantuntevaa ohjausta laboratorion henkilökunnalta. Analysointi ja tulosten tulkinta oli mielenkiintoista, useampien positiivisten näytteiden löytyminen olisi ollut vielä opettavaisempaa.

Kirjallisuusosion fokuksessa oli tiedon hankkiminen panimokontaminanteista ja tutkimusmenetelmistä sekä olemassa olevan tiedon koostaminen oppimistarkoituksessa, ei niinkään työn tilaajaa varten. Materiaali oli lähes yksinomaan englanninkielistä, mikä oli haastavaa etenkin aluksi. Haastavaa oli myös opinnäytetyön tekemisen venyminen pitkälle aikavälille. Kirjallisuusraporttini valmistui vasta vuonna 2015, kun käytännön työt, näytteenotto ja PCR-analysointi sijoituivat vuosille 2011–2012. Työtä viivästytti toisen AMK-tutkinnon suorittaminen samaan aikaan.



## LÄHTEET

Eurofins Genomics n.d. Viitattu 26.4.2015.  
<https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/qpcr-probes/lightcycler-probes.aspx>

Hartwall n.d. Viitattu 26.4.2015. <http://www.hartwall.fi/fi>

Heilimo, S. 2006. PCR-tekniikalla tutkitaan muunto-geenisyyttä, allergeenejä ja patogeenejä. *Kehittyvä elintarvike* 3. Viitattu 30.3.2015.  
<http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/24-pcr-tekniikalla-tutkitaan-muunto-geenisyytta-allergeeneja-ja-patogeeneja>

HighTech Finland n.d. Viitattu 26.4.2015.  
<http://www.hightechfinland.com/direct.aspx?area=htf&prm1=1026&prm2=article>

Iijima, K., Asano, S., Suzuki, K., Ogata, T. & Kitagawa, Y. 2008. Modified multiplex PCR methods for comprehensive detection of *Pectinatus* and beer-spoilage cocci. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 10, 2764–2766. Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry. Viitattu 20.4.2015.  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.80297>

Juvonen, R. 2009. DNA-based detection and characterisation of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria. VTT Publications 723. Valtion teknillinen tutkimuskeskus VTT. Helsinki: Edita Prima Oy. Saatavissa osoitteessa <http://www.vtt.fi/publications/index.jsp>

Juvonen, R., Koivula, T. & Haikara, A. 2003. PCR detection of Gram-negative brewery contaminants - present state. VTT Biotechnology. Viitattu 29.4.2015. [http://virtual.vtt.fi/virtual/proj5/brewproc/original/files/original\\_brewproc\\_website/httpdocs/brewproc\\_webbi\\_materiaali/2003-ebc\\_julkaisu\\_gram-pcr-final.pdf](http://virtual.vtt.fi/virtual/proj5/brewproc/original/files/original_brewproc_website/httpdocs/brewproc_webbi_materiaali/2003-ebc_julkaisu_gram-pcr-final.pdf)

Juvonen, R., Koivula, T. & Haikara, A. 2008. Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia. *International Journal of Food Microbiology* 2, 162–169. Viitattu 26.4.2015.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160508001657>

Kenyon College. MikrobeWiki n.d. Viitattu 26.4.2015.  
<http://biowiki.kenyon.edu/index.php/User:Alexandra.williams>

Lee, S. Y., Mabee, M. S. & Jangaard, N. O. 1978. *Pectinatus*, a New Genus of the Family *Bacteroidaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 4, 582–594. Viitattu 26.4.2015.  
<http://ijs.sgmjournals.org/content/28/4/582.full.pdf+html?sid=4cb243d7-a4a1-4282-92ba-c9a655d34e>

Lehtonen, L. 2012. Pienpanimon laadunvalvonta ja menetelmät. Hämeen ammattikorkeakoulu. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Opin-  
näytetyö. Saatavissa osoitteessa  
<http://www.theseus.fi/handle/10024/44167>

LookForDiagnosis n.d. Viitattu 26.4.2015.  
[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Pediococcus&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Pediococcus&lang=1)

MS Biotec n.d. Viitattu 26.4.2015.  
<http://www.msbiotec.com/lactipro/megasphaera-elsdenii.cfm>

Partanen, T. 2004. RT-PCR:n soveltuvuus elävien oluenpilaajabakteerien osoittamiseen. Helsingin yliopisto. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. Pro gradu -tutkielma. Viitattu 25.4.2015.  
[http://www3.vtt.fi/vtt\\_show\\_record.jsp?search=48799&view=abstract](http://www3.vtt.fi/vtt_show_record.jsp?search=48799&view=abstract)

Pittet, V., Haakensen, M. & Ziola, B. 2010. Rapid Screening for Gram-Negative and Gram-Positive Beer-Spoilage Firmicutes Using a Real-Time Multiplex PCR. Journal of ASBC 2, 89–95. American Society of Brewing Chemists. Viitattu 20.4.2015.  
[http://www.researchgate.net/profile/Barry\\_Ziola/publication/249300369\\_Rapid\\_Screening\\_for\\_Gram-Negative\\_and\\_Gram-Positive\\_Beer-Spoilage\\_Firmicutes\\_Using\\_a\\_Real-Time\\_Multiplex\\_PCR/links/542039a70cf203f155c2ef0a.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Barry_Ziola/publication/249300369_Rapid_Screening_for_Gram-Negative_and_Gram-Positive_Beer-Spoilage_Firmicutes_Using_a_Real-Time_Multiplex_PCR/links/542039a70cf203f155c2ef0a.pdf)

Roche Life Science. Real-time PCR Systems. n.d. Viitattu 30.3.2015.  
<http://qpcr.gene-quantification.info/>  
Roche Molecular Biochemicals. Selection of Hybridization Probe Sequences for Use with the LightCycler. Technical Note No. LC 6/99. n.d. Viitattu 30.3.2015. <http://www.tib-molbiol.com>

Sakamoto, K. & Konings, W. N. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology 89, 105–124. Viitattu 2.2.2015.  
<http://diyhop.us/~bryan/papers2/paperbot/Beer%20spoilage%20bacteria%20and%20hop%20resistance.pdf>

Satokari, R., Juvonen, R., von Wright, A. & Haikara, A. 1997. Detection of *Pectinatus* Beer Spoilage Bacteria by Using the Polymerase Chain Reaction. Journal of Food Protection 11, 1571–1573. Viitattu 26.4.2015.  
<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1997/00000060/00000012/art00018>

Satokari, R., Juvonen, R., Mallison, K., von Wright, A. & Haikara, A. 1998. Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. Artikkel. Journal of Food Microbiology 12, 119–127. Viitattu 23.4.2015.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924942>

Storgårds, E. 2000. Process hygiene control in beer production and dispensing. VTT Publications 410. Valtion teknillinen tutkimuskeskus VTT. Espoo: Otamedia Oy. Saatavissa osoitteessa <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/storgards/processh.pdf>

Taloussanommat n.d. Viitattu 26.4.2015.

<http://yritys.taloussanommat.fi/y/hartwall-ab-oy/helsingfors/0213454-7/>

University of California. Department of Viticulture & Enology n.d.

Viitattu 26.4.2015.

[http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/lactobacillus\\_brevis.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/lactobacillus_brevis.html)

PROSESSIKAAVIO: VIERRE-KÄYMISTANKKI-PUSKURITANKKI

