

TADEUSZ TUSZYŃSKI, MAŁGORZATA MAKAREWICZ

## **DROŹDŹE DZIKIE W PRZEMYŚLE PIWOWARSKIM - ZAGROŻENIA I WYBRANE METODY WYKRYWANIA**

### Streszczenie

W pracy przedstawiono zagrożenia jakości oraz stabilności fizycznej, chemicznej i biologicznej, wynikające z obecności obcych szczepów drożdży w procesie produkcji piwa. Dokonano również przeglądu ważniejszych metod wykrywania, liczenia i identyfikacji drożdży dzikich.

### **Wprowadzenie**

Piwo jest produktem biochemicznej aktywności komórek drożdży, które przeprowadzają cykl przemian metabolicznych w chmielonej brzeczce słodowej lub też w brzeczce otrzymanej ze słodu i surowców niesłodowanych. Drożdże i inne mikroorganizmy mogą być odpowiedzialne za brak stabilności fizycznej, chemicznej i biologicznej piwa, a szczególnie za niestabilność smaku i aromatu. Właściwa pasteryzacja powinna zapewniać biologiczną trwałość, ale równocześnie przyspiesza reakcje między składnikami piwa i zmniejsza jego charakterystyczną świeżość. Biologiczną stabilność można osiągnąć także w procesie sterylnej filtracji, która usuwa mikroorganizmy, jednak metody takie nie są całkowicie obojętne dla zachowania oryginalności smakowej i odżywczej piwa. W rzeczywistości zakażenia są wciąż możliwe, szczególnie podczas filtracji oraz napełniania butelek i kegow.

Najważniejszą grupę drobnoustrojów w procesach produkcji piwa i innych napojów alkoholowych stanowią drożdże. Znaczenie komórek drożdży w procesach fermentacji i dojrzewania napojów, a szczególnie ich wpływ na powstawanie i modyfikację składników zapachu i smaku, był przedmiotem wielu badań [22, 24, 28, 33]. Obecne możliwości selekcji i ulepszania cech drożdży piwnych, poprzez stosowa-

nie metod genetycznych oraz techniki immobilizacji i koimmobilizacji stwarzają nowe perspektywy dla piwowarstwa i innych branż przemysłu fermentacyjnego. Modyfikacje genetyczne pozwalają między innymi zwiększyć aktywność enzymów amylolitycznych oraz uzyskać w drożdżach charakterystyczną cechę typu „killer”, która może chronić komórki przed zakażeniami obcą mikroflorą. Interesujące są również możliwości stosowania antymikrobiologicznych enzymów, głównie z grupy hydrolaz i oksydoreduktaz, do eliminowania szkodliwych drobnoustrojów [8]. Dotychczas w piwowarstwie wykorzystuje się zazwyczaj czyste kultury drożdży górnej i dolnej fermentacji, które różnią się głównie szybkością wzrostu w różnych temperaturach, zdolnością do flokulacji i wytwarzania produktów ubocznych oraz zapotrzebowaniem na substancje wzrostowe i różnorodną odpornością środowiskową. Spotyka się także specyficzne piwa, do produkcji których nie stosuje się dodatku czystych kultur. Przykładem może być tradycyjne piwo belgijskie Gueuze-Lambic o zawartości około 5% obj. alkoholu, otrzymywane poprzez spontaniczną fermentację brzezki, w której uczestniczy różnorodna mikroflora bakterii, drożdży i pleśni, bytująca w dębowych beczkach i kufach, powietrzu oraz brzezce słodowej. Nie bez przyczyny wzrasta zainteresowanie mieszanymi kulturami mikroorganizmów w technologii fermentacji.

Zarówno w technologii klasycznej piwa, jak też w produkcji wielkozbiornikowej aktualny jest w dalszym ciągu problem zakażeń mikrobiologicznych, które stanowią poważne zagrożenie dla stabilności i jakości piwa. Bezwzględna czystość mikrobiologiczna drożdży piwowarskich i całości procesu technologicznego jest trudna do zachowania, gdyż przyczyną zakażenia mogą być: zainfekowanie powietrza, woda, aparatura i instalacje technologiczne oraz personel. Pomimo ogromnego postępu w tym względzie, który jest głównie wynikiem stosowania nowoczesnych technik i technologii, w tym systemów mycia i dezynfekcji CIP, nie można zachować w browarze warunków pełnej jałowości. Dlatego też metody szybkiego wykrywania mikroorganizmów i ich metabolitów są ważnym instrumentem w kontroli jakości produkcji. Jednak najlepsze metody nie zastąpią solidności pracowników oraz rozwiązań technologicznych, które zapewnią wysoki poziom higieny produkcji. Zwykłe mycie zbiorników technologicznych i dezynfekcja 2% roztworem NaOH lub 0,07% kwasem nadoctowym ( $\text{CH}_3\text{COOOH}$ ) niszczy komórki drożdży w czasie 5-10 minut, z wyjątkiem *Debaryomyces hansenii* i *Hansenula saturnus*, które wymagają dłuższego czasu oddziaływania (10-20 minut) środków dezynfekujących [9, 11]. W niektórych browarach funkcjonują już procedury kontroli punktów krytycznych HACCP, które dają znacznie lepsze gwarancje czystości mikrobiologicznej, od systemów klasycznych, dotychczasowych, szczególnie w odniesieniu do zbiorników flotacyjnych, tanków ciśnieniowych, tankofermentorów, filtrów i butelek. Należy jednak pamiętać, że wprowadzenie i dobre funkcjonowanie nowoczesnych zasad monitorowania jest dość kosztowne i nie

musi stanowić jedynej alternatywy dla wysokiej i stabilnej jakości produkcji, szczególnie w zakładach małych i średnich - dostarczających do 250 tys. hl piwa na rok.

### Występowanie drożdży dzikich i ich wpływ na jakość i stabilność piwa

Wzrost drożdży i innych mikroorganizmów jest uzależniony od warunków środowiska. Graniczne wartości pH dla wzrostu różnych drożdży mieszczą się w szerokim zakresie od 1,5 do 9,05; a produkty, których pH zawiera się w przedziale 4,6-5,3 są kwalifikowane do tzw. grupy średniokwaśnych z przeznaczeniem do sterylizacji [18].

Dobrze odfermentowane piwo jest jednak podłożem zbyt ubogim w składniki odżywcze dla większości drobnoustrojów, a ponadto wykazuje stosunkowo niskie pH, minimalną zawartość tlenu, zawiera alkohol, CO<sub>2</sub> i substancje antyseptyczne z chmielu, które działają hamująco na rozwój mikroorganizmów, w tym chorobotwórczych. Pozytywnie oddziałują także niektóre związki barwne (produkty reakcji Maillarda oraz związki fenolowe chmielu i słodu), spełniające rolę przeciwutleniaczy (zmiataczy tlenu). Z kolei wpływ CO<sub>2</sub> na wzrost mikroorganizmów jest uzależniony od ich rodzaju i gatunku, zawartości CO<sub>2</sub>, temperatury, aktywności wody, pH, ciśnienia, ilościowej i jakościowej obecności składników ekstraktu oraz stanu fizjologicznego komórki. Wzrost większości drożdży, pleśni i bakterii jest wyraźnie hamowany dopiero przy koncentracji powyżej 5% obj. CO<sub>2</sub> [19, 20]. Natomiast bardzo małe zawartości CO<sub>2</sub> mogą nawet mieć wpływ stymulujący wzrost drobnoustrojów. Pomimo wielu naturalnych czynników ochronnych, nie można w pełni wyeliminować zakażeń obcymi gatunkami drożdży - określanymi ogólnym terminem „dzikich”, jak też bakteriami, a nawet pleśniami. Szczególnie szkodliwe w piwowarstwie są bakterie gramodatnie z rodzaju *Micrococcus* (dawniej *Sarcina*), bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* i *Pediococcus*, gramujemne beztlenowce z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz z rodzaju *Zymomonas*, *Megasphaera* i *Pectinatus*, jak również bakterie fermentacji octowej [3, 6, 29]. Jednak drożdże stanowią około 40% ogólnej ilości zakażeń występujących w browarnictwie [3]. Zakażenia piwa wywołują najczęściej drożdże zaklasyfikowane do rodzajów *Saccharomyces*, *Candida*, *Torula*, *Hansenula*, *Kloeckera* i *Pichia* (tab. 1).

Nie wszystkie drożdże obecne są szkodliwe dla piwa, jednak ich obecność podczas procesu technologicznego świadczy o istnieniu infekcji. Mogą one konkurować ze szczepami piwowarskimi, szczególnie wtedy gdy aktywność fizjologiczna tych ostatnich jest obniżona. Stwierdzono na podstawie badań, że dzikie drożdże charakteryzują się 1,5-2-krotnie krótszym czasem generacji i z reguły nie wykazują zdolności do flokulacji, co utrudnia proces klarowania piwa [6, 22]. Mogą także wytwarzać różnego typu metabolity wpływające niekorzystnie na właściwości organoleptyczne piwa,

Tabela 1

Najczęściej występujące w piwowarstwie gatunki drożdży dzikich [6, 20, 22].

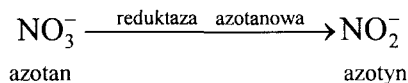
The most popular wild yeast species in brewery [6, 20, 22].

<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Hansenula anomala</i>
<i>B. clauseni</i>	<i>Han. fabianii</i>
<i>B. custersianus</i>	<i>Han. subpelliculosa</i>
<i>B. custersii</i>	<i>Han. saturnus</i>
<i>B. lambicus</i>	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida beecheii</i>	
<i>C. ernobii</i>	<i>Pichia farinosa</i>
<i>C. humilis</i>	<i>P. fermentans</i>
<i>C. intermedia</i>	<i>P. guilliermondii</i>
<i>C. krusei</i>	<i>P. membranaefaciens</i>
<i>C. norvegica</i>	<i>P. ohmeri</i>
<i>C. oleophila</i>	<i>P. onychis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. orientalis</i>
<i>C. sake</i>	
<i>C. solani</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>C. stellata</i>	
<i>C. tenuis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>S. bayanus</i>
<i>C. vartiovaarai</i>	<i>S. diastaticus</i>
<i>C. versatilis</i>	<i>S. ellipsoideus</i>
	<i>S. exiguus</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>S. logos</i>
	<i>S. pastorianus</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>S. unisporus</i>
<i>Debaryomyces marama</i>	<i>S. validus</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Dekkera intermedia</i>	
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
<i>Hsp. valbyensis</i>	
<i>Hsp. vineae</i>	

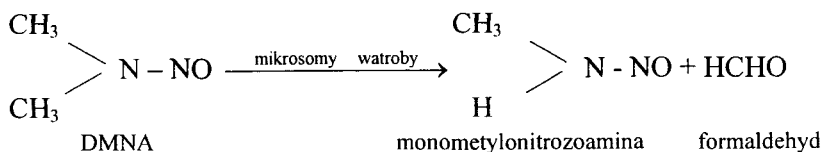
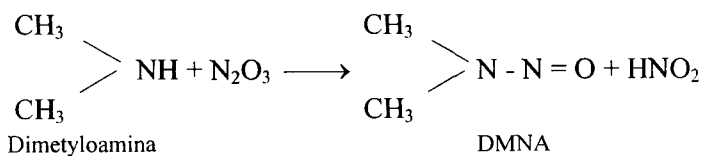
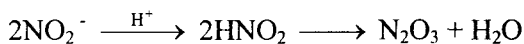
naruszają jego równowagę biologiczną, obniżają trwałość (zmętnienia, osady i błonki na powierzchni) i modyfikują skład chemiczny. Szczepy drożdży dzikich wykazują zazwyczaj większą aktywność pektynoesterazy, niż czyste kultury drożdży piwowar-

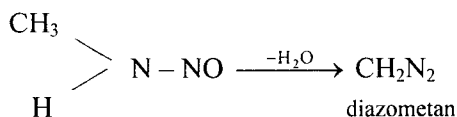
skich i w związku z tym zwiększa się ilość metanolu w piwie [33]. Skutkiem działania obcych drożdży jest też zmiana właściwości smakowo-zapachowych piwa, między innymi poprzez zwiększenie zawartości diacetylu - związku stanowiącego przyczynę tzw. „młodego smaku piwa” oraz estrów, związków siarkowych i innych [22, 25, 34]. Kilka gatunków z rodzaju *Brettanomyces*, *Candida* i *Saccharomyces* wytwarza związki fenolowe oraz estry i kwasy oddziałujące niekorzystnie na jakość organoleptyczną piwa, nadając mu nietypowy smak owocowy, drożdżowy lub fenolowy, silną nieprzyjemną goryczkę, przykry zapach octu, a także cierpkogorzki posmak [35].

Drożdże dzikie mogą ponadto charakteryzować się aktywnością reduktazy azotanowej - enzymu katalizującego redukcję azotanów do azotynów, które są jednym z prekursorów powstawania nitrozoamin.



Wykazano, że obecność w piwie drożdży *Hansenula anomala*, *Candida versatilis* oraz *Brettanomyces anomalus* i *Rhodotorula glutinis* zwiększa zawartość nitrozoamin [24, 25]. Ich działalność prowadzi w konsekwencji do powstawania w piwie azotynów, a z nich z kolei N - nitrozwiązków - substancji bardzo szkodliwych dla zdrowia człowieka. Szczególnie niebezpieczna jest dimetylonitrozoamina (DMNA) oraz diazometan i formaldehyd ze względu na rakotwórcze, mutagenne i embriotoksyczne działanie.





Ich prekursorami mogą być azotany i azotyny, mocznik, aminokwasy, aminy i amidy oraz pestycydy. Dopuszczalna zawartość nitrozoamin w piwie wynosi 0,5  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ , a w słodzie 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [26]. W celu ograniczenia zawartości tych związków w piwie należy eliminować z przerobu na sód ziarna spleśniałe i zainfekowane, przestrzegać prawidłowych zasad suszenia słodu i czystości mikrobiologicznej całego procesu produkcji piwa. Tworzenie się nitrozoamin jest częściowo hamowane obecnością substancji redukujących w piwie, zwłaszcza polifenoli. Z kolei drożdże *Saccharomyces diastaticus*, które stanowią zakażenie w piwowarstwie, wytwarzają glukozylazę - enzym usuwający reszty glukozy z amylodekstryn, przyczyniając się do nadmiernego odfermentowania piwa. Drobnoustroje te mogą rozwijać się zarówno w brzeczce jak i gotowym produkcie, gdzie najczęściej dostają się na skutek nieodpowiedniego odfermentowania ekstraktu reszkowego lub błędów popełnionych w czasie filtracji. Obecność drożdży dzikich podczas dojrzewania piwa, a także w napełnionych opakowaniach jednostkowych, powoduje zmętnienia i opalizację oraz wpływa niekorzystnie na jego skład chemiczny i stabilność [6, 25, 31].

Należy jednak podkreślić, że np. siarczyny wytwarzane przez różne gatunki drożdży dzikich i szlachetnych mają określoną zdolność stabilizacji aromatu wskutek hamowania reakcji utleniania, co zapobiega tworzeniu się wolnych rodników. Tego typu związki mogą również wykazywać aktywność tzw. zmiatania wolnych rodników i zapobiegają ich łańcuchowym reakcjom, powodując lepszą trwałość piwa. Połączenie siarczynu z aldehydem mrówkowym i octowym hamuje powstawanie zmętnień i stęchłego zapachu w czasie przechowywania piwa [15].

### Metody monitorowania zakażeń drożdżami dzikimi

Bezpieczeństwo spożywania i jakości żywności oraz napojów zależą od możliwości szybkiej i precyzyjnej kontroli wzrostu drobnoustrojów. Powszechnie zalecanym podłożem do określania ogólnej liczby drożdży i wykrywania grzybów pleśniowych jest brzeczka agarowa. Klasyczne techniki liczenia i identyfikacji drożdży uwzględniają obecnie różne modyfikacje płytkowej hodowli Kocho, np. automatyczny posiew zawieszony na ruchomą płytkę Petriego, w kształcie spirali Archimedesesa (technika płytek spiralnych) lub nanoszenie próbki na płytki kropkami (metoda kropelkowa) oraz hodowla na wewnętrznych ściankach próbek. Bardzo ważne są różne techniki usprawniające obliczanie wyrosłych kolonii. W tym względzie można stosować bezpośrednio liczenie pod mikroskopem, specjalne urządzenia do dokładnych rozcieńczeń

i przeliczanie powstałych kolonii na odpowiedniej siatce, za pomocą znacznika rejestrującego ich liczbę, jak również coraz powszechniejsze staje się użycie licznika laserowego. Metody ustalania liczby kolonii na podłożu stałym doczekały się już wielu modyfikacji, które upraszczają i automatyzują procedurę postępowania, jednak nie udało się wyraźnie zwiększyć ich dokładności.

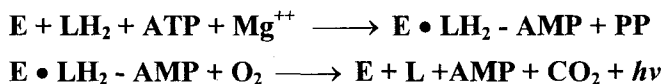
W tradycyjnych badaniach mających na celu określenie liczby obcych drożdży w badanych próbkach (metody ilościowe), zaleca się stosowanie podłoża brzczkowego o pH 3,5 z dawką aktidionu, przeważnie  $4 \text{ mg/dm}^3$  podłoża. Taka dawka jest wystarczająca do inhibicji wzrostu większości ras drożdży piwowskich. Ze względu na zmienność drobnoustrojów, należy w tym przypadku oceniać również, wrażliwość danego szczepu produkcyjnego na aktidion [5]. Wyniki analizy znane są dopiero po upływie 48-96 h.

Do oznaczania zawartości szkodliwych drobnoustrojów stosuje się również gotowe testy, np. w postaci pasków adhezyjnych, które przylepia się do badanej powierzchni, następnie przykleja do odpowiedniej płytki z podłożem wzrostowym [27]. Po okresie inkubacji odczytuje się liczbę mikroorganizmów przez porównanie z wzorcami. Testy tego rodzaju dostarczają tylko orientacyjnych informacji o stopniu zakażenia, a okres inkubacji w przypadku drożdży wynosi 3 dni.

Znaczne skrócenie czasu analizy ilościowej - do 30 minut (tzw. szybkie testy) - udało się uzyskać między innymi dzięki zastosowaniu metody oznaczania bezpośredniej epifluorescencji mikroorganizmów na membranie filtracyjnej DEFT (the direct epifluorescent filter technique). Komórki drożdży oddziela się przez filtrację od zawiesiny i odpowiednio zabarwia - odróżnienie komórek żywych. Do filtracji najczęściej stosuje się membrany z poliwęglanu, o średnicy porów  $0,2$  do  $0,6 \mu\text{m}$ , a do barwienia fluorescencyjnego używa się oranżu akrydynowego. Dzięki automatyzacji metody można badać do 100 próbek/h. Do tej grupy testów zalicza się również technikę fluorescencyjną do oznaczania mikrokolonii na filtrze membranowym MMCF (the membrane filter microcolony fluorescence method), stanowiącą połączenie metod liczenia kolonii z oceną mikroskopową, po wzbogaceniu kultury i dodaniu fluorescencyjnego barwnika [27]. Znane są również metody laserowej techniki skaningowej, umożliwiające automatyczne liczenie żywych komórek z równoczesnym użyciem różnego typu mikroelektrod służących do pomiaru pH i zawartości tlenu w skali mikroskopowej [21].

Metodą instrumentalną dającą wyniki analiz w ciągu kilku do kilkunastu minut jest określenie zawartości adenosynotryfosforanu (ATP) - substancji, która może wskazywać na stopień zakażenia produktu żywymi drobnoustrojami. Adenosynotryfosforan w niewielkim stopniu ulega zniszczeniu w procesach technologicznych i dlatego występuje także na powierzchni urządzeń i instalacji, względnie pochodzi ze słoju,

brzeczki, piwa oraz bakterii i drożdży dzikich. Całkowita zawartość ATP w komórkach drożdżowych wynosi około  $10^{-12}$  g/komórkę [4] i oznacza się go metodą bioluminescencyjną przy pomocy luminometru [16], gdzie jeden wyemitowany foton światła odpowiada w przybliżeniu jednej cząsteczce ATP. Wynikiem reakcji kompleksu enzym - substrat w postaci lucyferazy - lucyferyny jest przekształcenie energii chemicznej związanej z ATP, w światło wg poniższych reakcji [21].



E – lucyferaza

LH<sub>2</sub> – zredukowana lucyferyna

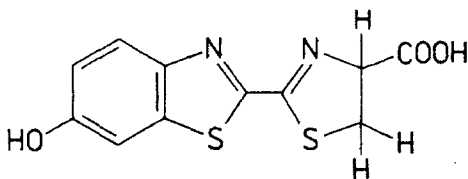
ATP – adenylozotryfosforan

E • LH<sub>2</sub> - AMP – kompleks lucyferyno-adenilowy

PP – pirofosforan

L – utleniona lucyferyna

hv – kwant światła



Rys. 1. Wzór lucyferyny wyizolowanej z owadów tropikalnych (rodzina *Lampyridae*).

Fig. 1. Formula of luciferin isolated from tropical insects (family *Lampyridae*).

Intensywność światła jest proporcjonalna do zawartości ATP, a więc ilości metabolicznie aktywnych komórek w badanej próbce [10]. Zastosowanie światłomierza w połączeniu z komputerem umożliwia, na podstawie pomiaru luminescencji, wykrycie w ciągu kilku minut mikroorganizmów i ewentualnych zanieczyszczeń organicznych powierzchni urządzeń lub produktów. Ze względu na różną zawartość ATP w mikroorganizmach, w środowisku o zróżnicowanej mikroflorze, dokonuje się tylko ogólnej oceny stopnia zakażenia, bez podania jego składu jakościowego [16]. Technika bioluminescencji można już wykryć 0,1 pg ATP ( $10^{-13}$  g ATP) co odpowiada przeciętnie 10 komórkom drożdży.

W przypadku metod elektrometrycznych (np. impedymetrycznej, konduktometrycznej) mierzony jest wzrost przewodnictwa i spadek oporu elektrycznego środowi-



ska, które są wynikiem przetwarzania substancji obojętnych elektrycznie w jonowe, na skutek rozwoju drobnoustrojów. Impedancja jest opornością falową, która dla przewodników wyraża się wzorem [16]:

$$Z = \sqrt{R^2 + (XI - Xc)^2} = \sqrt{R^2 + (2\pi fL - 1/2\pi fC)^2}$$

$Z$  – impedancja ( $\Omega$ )

$R$  – rezystancja ( $\Omega$ )

$XI$  – reaktancja indukcyjna ( $\Omega$ )

$Xc$  – reaktancja pojemnościowa ( $\Omega$ )

$L$  – indukcyjność (H)

$f$  – częstotliwość (Hz)

$C$  – pojemność (F)

$2\pi f = \omega$  – prędkość kątowna

Zmniejszenie impedancji (zmiany oporu w czasie) mierzy się przy pomocy impedymetrów współpracujących z komputerem, określając w ten sposób liczbę i aktywność metaboliczną drobnoustrojów. Czas detekcji - okres od początku pomiaru do momentu stwierdzenia zmian właściwości elektrycznych środowiska - jest odwrotnie proporcjonalny do stopnia zakażenia. Przy użyciu metod elektrometrycznych można otrzymać wyniki w znacznie krótszym czasie, (ok. 30%) niż przy stosowaniu konwencjonalnych technik płytkowych. W krajach zachodnich metoda impedymetryczna znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle napojów i soków owocowych [7].

Bardzo obiecujące są metody cytometryczne, szczególnie w aspekcie ich wykorzystania w przemyśle (cytometria przepływowa). Wiązka światła padająca na przepływające komórki ulega rozproszeniu. Na tej podstawie oraz w połączeniu z pomiarem DNA i barwieniem fluorochromami określa się liczbę i rodzaj komórek.

Ostatnie doniesienia dowodzą, że również za pomocą monitorów uwidaczniających zmienność temperatury (metody mikrokalorymetryczne) można przeprowadzić ocenę zepsucia mikrobiologicznego piwa [30]. Ilość ciepła wydzielana przez mikroorganizmy jest proporcjonalna do liczby komórek oraz intensywności ich wzrostu.

Drugą grupę metod stanowią analizy jakościowe, których celem jest określenie przynależności systematycznej wyizolowanej, czystej kultury drożdży. Pośród tradycyjnych technik nie ma idealnej metody umożliwiającej wyodrębnienie drożdży dzikich z występującej populacji. Zaleca się więc jednocześnie następującą kolejność postępowania [23]:

- Test odporności na temperaturę – 2–3 cm<sup>3</sup> drożdży rozcieńcza się sterylnym roztworem soli fizjologicznej i umieszcza na 20 minut w łaźni wodnej o temp. 50°C,

następnie szybko oziębia zimną wodą i dodaje do sterylnej brzeczki. Objawy fermentacji świadczą, że drożdże przetrwały test. Dla rozpoznania drożdży *Saccharomyces diastaticus*, można użyć całkowicie odfermentowanego piwa lub roztworu skrobi,

- Badania z zastosowaniem brzeczki agarowej i octanem oraz podobnego podłoża z fioletem krystalicznym - wykrywanie drożdży dzikich z rodzaju *Saccharomyces*, *Torula*, *Candida*, *Pichia*,
- Test z brzeczka agarową i lizyną - wykrywanie drożdży dzikich nie należących do rodzaju *Saccharomyces*.

Zestawienie powyższych metod dla poszczególnych rodzajów drożdży przedstawia tabela 2.

Tabela 2

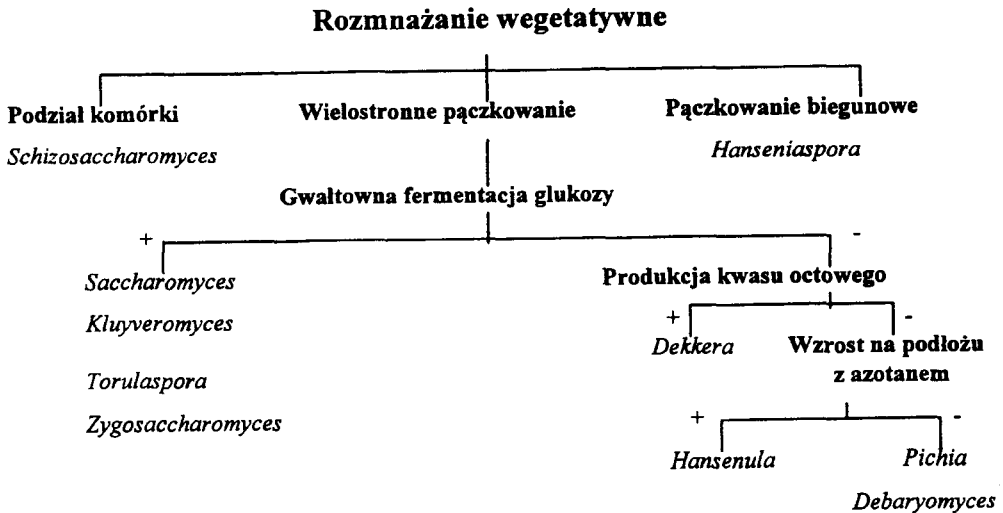
Schemat testu drożdżowego.

Scheme of yeast test.

Podłoże wzrostowe Medium	Drożdże szlachetne Yeasts	Drożdże dzikie <i>Saccharomyces</i> Wild yeast strains of <i>Saccharomyces</i>	Inne drożdże Other yeasts
Brzeczka agarowa	+	+	+
Test temperaturowy	-	+	- / +
Agar z fioletem krystalicznym	-	+	-
Agar lizynowy	-	-	+
Agar octanowy (tworzenie spor)	-	+	- / +

Należy zaznaczyć, że metoda różnicowania obcych drożdży na podstawie ich wzrostu lub braku rozwoju na podłożu lizynowym i agarze brzeczkowym jest utrudniona z uwagi na izolowanie szczepów, które mogą rosnąć na obu podłożach. Wyodrębnianie poszczególnych rodzajów drożdży należących do rodziny *Saccharomycetaceae* na podstawie zdolności wytwarzania askospor (podłoże Gorodkowej, Hermana) nie zawsze daje dobre rezultaty, ponieważ niektóre szczepy drożdży piwowskich wykazują ograniczoną zdolność ich wytwarzania [5].

Zasadę identyfikacji poszczególnych rodzajów drożdży dzikich na podstawie sposobu rozmnażania wegetatywnego i charakterystycznych produktów przemian biochemicznych przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Identyfikacja drożdży dzikich najczęściej występujących w przemyśle browarniczym na podstawie określonych cech fizjologicznych [20].

Fig. 2. Identification of wild yeast strains appearing in brewery.

Znacznie skuteczniejszą w różnicowaniu mikroorganizmów i określaniu ich witalności jest już wcześniej omawiana metoda MMCF, w której wyniki uzyskuje się po 48 h [13, 14]. Można również określać aktywność esteraz w oparciu o reakcje biochemiczne zachodzące w komórkach drożdży i powodujące hydrolytyczny rozpad substratu (dioctan fluoresceiny), z uwolnieniem barwnej fluoresceiny, którą wykrywamy poprzez pomiar fluorescencji.

Innym sposobem może być przeprowadzenie szybkiego testu immunofluorescencyjnego (kilka minut), na podstawie którego otrzymuje się informacje dotyczące zarówno ilościowego jak i jakościowego zakażenia piwa drobnoustrojami szkodliwymi. Użycie specyficznych przeciwciał i połączenie ich z immunoglobulinami znakowanymi barwnikami (fikoerytryna, fluoresceina, rodamina) umożliwi rozróżnienie w mikroskopie fluorescencyjnym poszczególnych rodzajów mikroorganizmów [13].

Wysoce czułe i powtarzalne są metody molekularne oparte na technikach stosowanych w inżynierii genetycznej, można do nich zaliczyć:

- **PFGE** (pulsed - field gel electrophoresis) - elektroforeza żelowa w polu pulsującym - technika, w której całe chromosomy poddawane są działaniu zmiennego pola elektrycznego. Na żelu odbywa się rozdział chromosomów w zależności od ich wielkości. Powstające prążki stanowią elektroforetyczny kariotyp danego mikroorganizmu [7].

- **PCR** (polymerase chain reaction) - metoda łańcuchowej reakcji polimerazy - skuteczność metody nie zależy od stanu fizjologicznego komórek i nie wymaga obecności dużej liczby drobnoustrojów w próbce, gdyż identyfikacja następuje na podstawie wyizolowanego DNA. Wynik można uzyskać już po 8 h od momentu pobrania próbki. Technika PCR pozwala na powielenie dowolnej sekwencji DNA o długości od kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów. Reakcja łańcuchowa polimerazy polega na przeprowadzeniu wielu cykli syntezy DNA z wykorzystaniem starterów flankujących jego określone odcinki. Każdy cykl reakcji składa się z trzech etapów:

Termicznej denaturacji powielanego DNA (temperatura ok. 90°C),

Asocjacji starterów z matrycą w temperaturze obniżonej do 40 – 60°C,

Polimeryzacji DNA w temperaturze 72 °C.

Wszystkie cykle reakcji zachodzą w jednej probówce Eppendorfa, do której oprócz matrycy i trifosforanów nukleotydów, dodaje się nadmiar starterów (zapobieganie reaturacji matrycowego DNA) oraz termostabilną polimerazę DNA wydzieloną z termofilnych bakterii. Po procesie powielenia DNA, jest on poddawany analizie restrykcyjnej, hybrydizacyjnej i następnie sekwencjonowaniu [7].

- **RAPD** (random amplified polymorphic DNA) - w technice tej ekstrahowane fragmenty DNA są powielane metodą PCR przy użyciu odpowiedniej sekwencji starterowej. Produkt reakcji jest poddawany elektroforezie w żelu agarozowym, który następnie po wybarwieniu ogląda się w świetle UV. Przeprowadzenie całej procedury do momentu uzyskania wyników trwa 1 dzień [7].
- **RFLP** (restriction fragment length polymorphism) - metoda polega na rozdzielaniu fragmentów restrykcyjnych DNA w żelu agarozowym i po ich denaturacji - przeniesieniu na bibułę nitrocelulozową. Związany z bibułą DNA hybryduje z wyznakowanym, komplementarnym do niego fragmentem DNA. Po wypłukaniu niezwiązanego DNA i wysuszeniu bibuły, wykonuje się jej autoradiografię, na kliszy fotograficznej, w celu zidentyfikowania pozycji zajmowanej przez radioaktywny fragment. Za pomocą tej metody można wykrywać bardzo małe ilości (poniżej 1pg) DNA, jednak do jej wykonania potrzeba ok. 3 dni [7].

Identyfikacja drożdży przy użyciu technik molekularnych bazujących na DNA jest bardziej dokładna niż w metodach tradycyjnych opartych na charakterystyce morfologicznej i fizjologicznej, jednak wymaga wyżej wykwalifikowanych pracowników i stosunkowo dużych nakładów finansowych na zakup odpowiednich materiałów.

## Podsumowanie

Aby skutecznie eliminować zakażenia należy dokładnie rozpoznać ich źródła. Najczęstszymi przyczynami powodującymi trudności w utrzymaniu wysokiej higieny

na wszystkich etapach linii produkcyjnej są wady konstrukcji zbiorników, maszyn, urządzeń i rurociągów, ich montażu, a także źle przeprowadzone procesy mycia i dezynfekcji oraz woda, powietrze i pracownicy. Urządzenia browaru powinny być myte i wyjaławiane w sposób tak skuteczny, aby wszelkie zanieczyszczenia były usuwane zgodnie z dobrymi zasadami higieny produkcji lub szczegółowymi procedurami krytycznych punktów kontroli.

Na podstawie dokonanego przeglądu wybranych metod wykrywania, liczenia i identyfikacji drożdży dzikich można stwierdzić, że obecnie nie dysponujemy idealną techniką w laboratorium mikrobiologicznym. Należy umiejętnie wybierać i łączyć poszczególne metody, tak, aby zastosowana procedura spełniła oczekiwania.

Wszystkie metody standardowe są pracochłonne i wymagają zwykle długiego czasu do uzyskania końcowych wyników. Nowoczesne systemy kontroli zalecają natomiast stosowanie szybkich testów mikrobiologicznych, które nie zawsze są precyzyjne. Dobrą perspektywę na przyszłość po wprowadzeniu dalszych udoskonaleń, stanowią metody elektroforetyczne, molekularne, immunologiczne i kolorymetryczne. Ich stosowanie wiąże się jednak z dużymi kosztami i posiadaniem odpowiednio przeszkolonego personelu.

Wydaje się, że ważne w ocenie stanu sanitarnego mogą być również zasady mikrobiologii prognostycznej, które bazują na reakcjach mikroorganizmów w odniesieniu do temperatury, aktywności wody, pH, niektórych składników produktów spożywczych i innych czynników, na podstawie których opracowuje się odpowiednie modele matematyczne i określa współczynniki szybkości wzrostu mikroorganizmów. Wszystkie metody liczenia i identyfikacji powinny charakteryzować się krótkim czasem wykonania, małą ilością zużywanej pożywki i małą pracochłonnością oraz niskimi kosztami. Należy sądzić, że ogromne postępy w doskonaleniu układów elektronicznych i biocujników (biosensorów) pozwoli w niedługim czasie na bieżące monitorowanie zakażeń mikrobiologicznych i odpowiednie atestowanie. Dotychczasowe prace z tego zakresu wskazują na duże szanse zastosowania w piwowarstwie urządzeń pomiarowych na bazie biosensorów z odpowiednimi enzymami i przeciwciałami.

## LITERATURA

- [1] Babuchowski A.: Mikrobiologiczne aspekty produkcji piwa, Wydawnictwo ART, Olsztyn, 1995, 1.
- [2] Buckle K.: 8<sup>th</sup> Australian Food Microbiology Conference, Trends Food Sci. Technol., 6 (5), 1995, 163.
- [3] Baca E.: Określanie punktów kontroli zagrożeń mikrobiologicznych dla linii technologicznej w browarze, Przem. Ferment. Owoc.-Warz., 3, 1997, 12.
- [4] Czajkowska D., Witkowska - Gwiazdowska A.: Ocena stanu higieny w zakładach piwowskich. Zastosowanie metody oznaczania ATP, Przem. Ferment. Owoc. - Warz., 6, 1996, 5.

- [5] Czajkowska D., Witkowska - Gwiazdowska A., Czajka J.: Wykrywanie mikroorganizmów szkodliwych w procesie produkcji piwa, *Przem. Ferment. Owoc. - Warz.*, **4**, 1997, 10.
- [6] Czajkowska D.: Szkodliwe mikroorganizmy w przemyśle piwowarskim, *Przem. Ferment. Owoc. - Warz.*, **10**, 1996, 12.
- [7] Deak T.: Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods, *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 1995, 287.
- [8] Fuglsang C. C., Johansen Ch., Christgan S., Adler - Nissen J.: Antymicrobial enzymes: Applications and future potential in the food industry, *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 1995, 390.
- [9] Grajecki Ch., Schmalz D.: Desinfektionsadditive für die Heißblauge, *Brauwelt*, **135 (31-32)**, 1995, 1553.
- [10] Griffiths M. W.: The role of ATP bioluminescence in the food industry - new light on old problems, *Food Technol.*, **50 (6)**, 1996, 62.
- [11] Hindrich J., Stahl U.: Grundlage und Wirkungsmechanismus der Reinigung und Desinfektion, *Brauwelt*, **135 (38-39)**, 1995, 1939.
- [12] Hutter K. J.: Simultane identifizierung von *L. brevis* und *P. damnosus* im filtrierten Bier, *Brauwelt*, **121 (41)**, 1981, 1797.
- [13] Hutter K. J.: A quick fluorescent serological test to identify microorganisms, *Brauwelt International*, **2**, 1992, 183.
- [14] Hutter K. J.: Biomonitoring der Betriebshefen, *Brauwelt*, **136 (40- 41)**, 1996, 1902.
- [15] Kanda H.: Contribution of carbonyl - bisulfite adducts to beer stability, *J. Agric. Food Chem.*, **42 (11)**, 1994, 2428.
- [16] Kitzman P.: Aktualny stan metod badawczych żywności w dziedzinie zautomatyzowanych systemów mikrobiologicznych analiz rutynowych. Praca zbiorowa pod red. S. Tyszkiewicza: Postęp w analizie żywności, Warszawa, 1990, 74.
- [17] Komornicki J.: Czy można wpływać na podatność piwa na infekcje?. *Przem. Ferment. Owoc. - Warz.*, **11-12**, 1990, 42.
- [18] Lange H. J.: Milieubedingungen für Mikroorganismen, *Die Industrielle Obst - und Gemüseverwertung*, **2**, 1995, 42.
- [19] Oberman H., Nowakowska - Waszczuk A.: Mikrobiologia przemysłowa laboratorium, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 1982
- [20] Priest F. G., Campbell I.: *Brewing Microbiology*, Elsevier Science Publishing, Co., INC 1987, USA
- [21] Robins M. M., Wilson P. D. G.: Food structure and microbial growth, *Trends Food Sci. Technol.*, **5 (9)**, 1994, 289.
- [22] Sałek A.: Wpływ dzikich drożdży na jakość gotowego piwa, *Przem. Ferment. Owoc.-Warz.*, **11-12**, 1982, 49.
- [23] Schmidt H. J.: Mikrobiologische Qualitätssicherung in der Brauerei., *Brauwelt*, **134 (44)**, 1994, 2342.
- [24] Smith N. A.: Redukcja azotanów i powstawanie N - nitrozwiązków w procesie produkcji piwa, *Przem. Ferment. Owoc.-Warz.*, **6**, 1994, 20.
- [25] Smith N.: Nitrate reduction and ATNC formation by brewery wild yeasts, *J. Inst. of Brew.*, 1992, 98, (5), 415.
- [26] Soberka R., Ściążko D., Tyrakowska-Bielec U.: Enzymatyczne oznaczanie azotanów w polskich piwach, *Przem. Ferment. Owoc.-Warz.*, **8**, 1995, 7.
- [27] Sperling Th., Raeuber H. J.: Mikrobiologische Qualitätssicherung - Schnellmethoden (Teil 1), *Z. Lebensmittelwirtsch. (ZFL)*, **45 (6)**, 1994, 52.

- [28] Suomalainen H.: Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages, *J. Inst. of Brew.*, **77 (2)**, 1971, 164.
- [29] Szelich W.: Kontrola laboratoryjna w zakładach przemysłu piwowarskiego, cz. II - Kontrola mikrobiologiczna, IPF Warszawa, 1984.
- [30] Šavel J.: Nové možnosti využití monitoru teploty v pivovarství, *Kvasny Prům.*, 1997, (1), 4.
- [31] Tompkins T. A. i in.: RAPD-PCR Characterization of brewery yeast and beer spoilage bacteria, *American Soc. of Brew. Chem., Inc.*, **54 (2)**, 1996, 91.
- [32] Trojanowska K., Giebel H., Gołębiowska B.: *Mikrobiologia żywności*, Wydawnictwo AR, Poznań, 1995.
- [33] Tuszyński T.: Fizyczne, chemiczne i biotechnologiczne aspekty występowania metanolu w moszczach i destylatach owocowych, *Rozprawa habilitacyjna nr 136, Zeszyty Naukowe AR, Kraków* 1980.
- [34] Wieczorek E.: Dwuacetyl w piwie i metody jego oznaczania, *Przem. Ferment. Owoc.-Warz.*, **11**, 1995, 7.
- [35] Wzorek W., Laškiewicz A.: Zakażenia mikrobiologiczne w procesie produkcji piwa, *Przem. Ferment. Owoc.-Warz.*, **8-9**, 1990, 3.

## **WILD YEAST STRAINS – A HAZARD TO BEER PRODUCTION PROCESS AND SOME METHODS OF THEIR DETECTION**

### S u m m a r y

The article analyses possible negative effects of wild yeast strains, present in beer production process, on its physical, chemical, and biological stability. In addition, a short review of methods of wild yeast strains detection, counting, and identification is presented. ☒