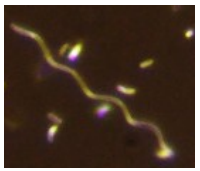
Микробиологический контроль качества в процессе пивоварения

Максимилиан Михель (Dr.-Ing.)



Мюнхенский технический университет,
Исследовательский центр в Вайенштефане
по изучению качества пива и продуктов питания

Research Center Weihenstephan
for Brewing and Food Quality

Technische Universität München

Результаты микробиологического контроля

Результаты микробиологии 2 + 2

= чаще всего 5

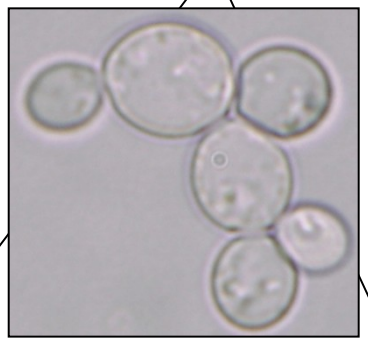
= иногда 3

= редко 4

Источник: Dipl.-Ing. Josef Englmann, TU München, Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality

Микрофлора

Дрожжи



Культурные дрожжи

Дикие дрожжи

Сопутствующая микрофлора

Потенциально вредные микроорганизмы

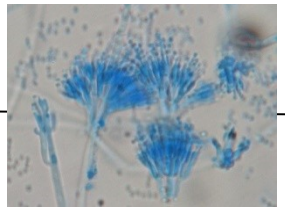
Бактерии

Стартовая культура

Сопутствующая микрофлора

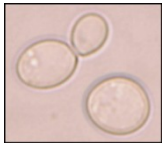
Потенциально вредные микроорганизмы

Плесень



Сопутствующая микрофлора

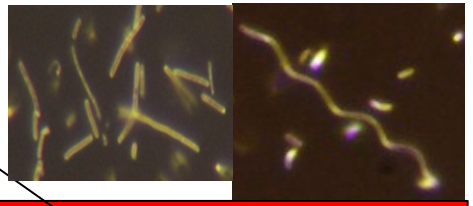
Микрофлора



Культурные штаммы

Сопутствующая микрофлора

Распространенные повсеместно микроорганизмы

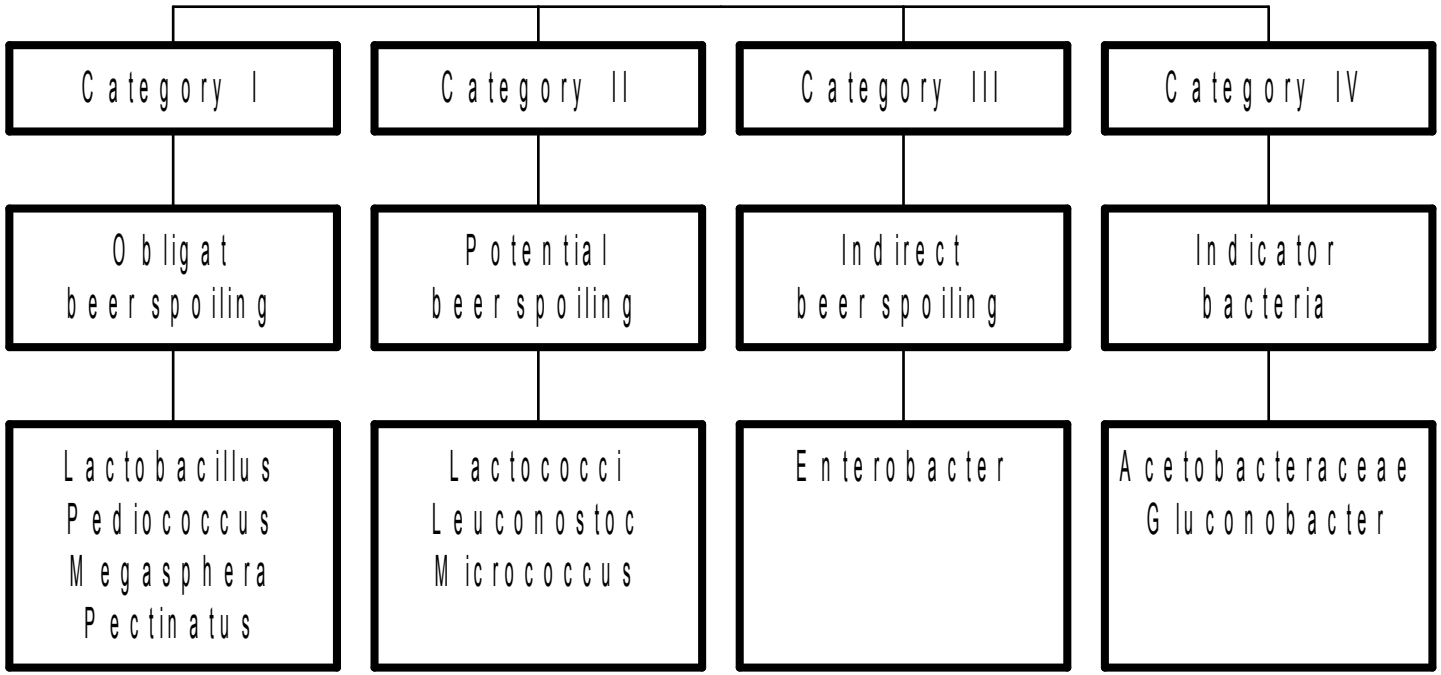


Вредные микроорганизмы

(косвенно, потенциально, безусловно вредные) + крайне опасные формы вредного воздействия

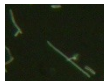
Индикатор микроорганизмов

Beer spoiling bacteria
Classification acc. to Prof.Back



Микрофлора

Technische Universität München

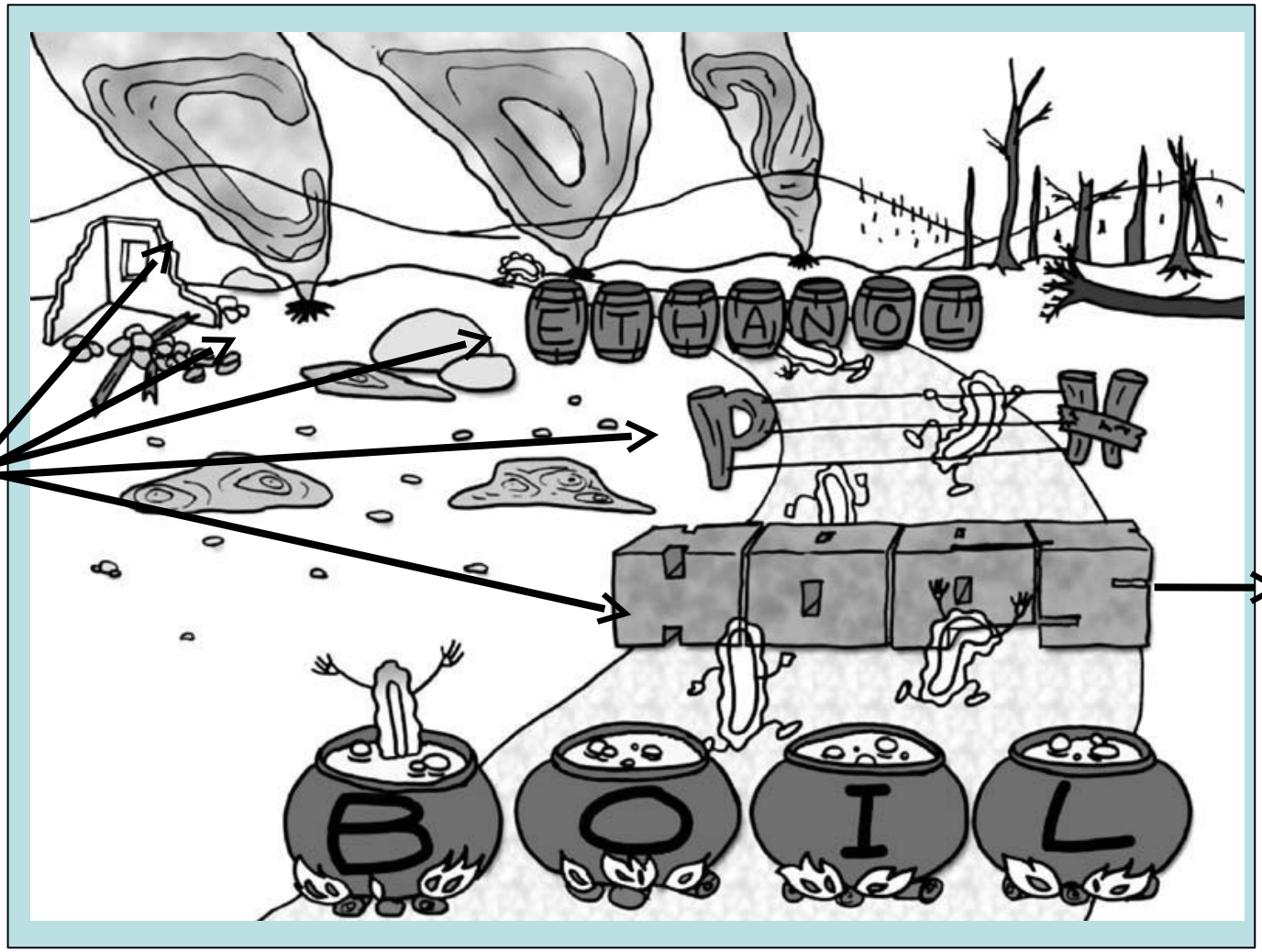
 Bacteria	rods / cocci	gram	catalase	beer spoilage potential	hop tolerance	ethanol tolerance	growth at pH = 4.3	primary/secondary contamination	observed slime formation of brewery isolates
L. acetotolerans	R	+	-	+	+/-	+	+	s>p	-
L. backi	R	+	-	++	++	++	+	p>s	-
L. brevis	R	+	-	++	++	++	+	s>p	+
L. (para-)buchneri	R	+	-	+	+	+	+	p>s	+
L. (para-)casei	R	+	-	+	+/-	+	+	s>p	-
L. coryniformis	R	+	-	+	+/-	+	+	s>p	-
L. (para-)collinoides	R	+	-	++	++	++	+	s>p	-
L. lindneri	R	+	-	++	++	++	+	p>s	-
L. perolens	R	+	-	+	+/-	+	+	s>p	-
L. paucivorans	R	+	-	++	++	++	+	p	-
L. plantarum	R	+	-	+	+/-	+	+	s>p	-
L. rossiae	R	+	-	+	+/-	+	+	s>p	+
Lac. lactis	C	+	-	-/+	-/+	+/-	+	s>p	-
Leuc. (para)mesenteroides	C	+	-	-/+	-/+	+/-	+	s>p	+
Meg. cerevisiae	C	-	-	++	++	+	-/+	s	-
Meg. paucivorans	C	-	-	++	++	+	+	s	-
Meg. sueciensis	C	-	-	+	++	+	-/+	s	-
Micrococcus kristinae	C	+	+	-/+	+/-	+	-	s	-
P. damnosus	C	+	-	++	++	+	+	p>s	-
P. claussenii	C	+	-	+	+/-	+	+	p>s	v
P. inopinatus	C	+	-	+	+/-	+	+	p>s	-
Pec. cerevisiiphilus	R	-	-	++	++	+	-/+	s	-
Pec. frisingensis	R	-	-	++	++	+	-/+	s	-
Pec. haikarae	R	-	+	++	++	+	-/+	s	-
Zymomonas mobilis	R	-	+	-/+	++	++	+	p	-
L.= Lactobacillus, Lac.= Lactococcus, Leuc.= Leuconostoc, Meg.= Megasphaera, P.= Pediococcus, Pec.= Pectinatus									
Indirect beer spoilage bacteria or potential beer spoilage bacteria of less importance: *Bacillus sp., Citrobacter freundii, Enterobacter sp., Klebsiella sp., L. curvatus, L. malefermantans, Obesumbacterium proteus, Pantoea agglomerans, P. acidilactici, P./L. dextrinicus, P. pentosaceus, Rahnella sp., Selenomonas lacticifex, Serratia sp., Zymophilus sp.*									

Микрофлора

Yeast	budding	growth at 37 °C	formation of ascospores	fermentation intensity	oxygen requirement
Dekkera anomala	multilateral	+/-	+	+	+
Dekkera bruxellensis	multilateral	+	+	+	+
Saccharomyces bayanus	unilateral	-	+	++	-/+
Saccharomyces cerevisiae	multilateral	+	+	++	-/+
Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus	multilateral	+	+	++	-/+
Saccharomyces pastorianus	unilateral	-	-/+	++	-/+
Wickerhamomyces anomalus	multilateral	+/-	+	+	+
Indirect beer spoilage yeasts or potential beer spoilage yeast of less importance: *Candida spp., Debaryomyces hansenii, Issatchenkia orientalis, Hanseniaspora uvarum, Kazachstania exigua, Pichia fermentans, Pichia guilliermondii, Pichia membranifaciens, Rhodotorula spp., Saccharomyces kudriavzevii, Saccharomyces paradoxus*					
++=very high/strong, += strong/high or positive, +/-= positive tendency or most strains or adaption necessary, v= variable, -/+= negative tendency or few strains or strong adaption necessary, -= negative or no growth, p = primary contamination, s= secondary contamination, s>p= more cases with secondary contaminations observed, p>s = more cases with primary contaminations observed					

HUTZLER M., MUELLER-AUFFERMANN K., KOOB J., RIEDL R., JACOB F. (2013): Beer spoiling microorganisms – a current overview, **Brauwelt International**, I (2013), 23-25

Микробиологические барьеры пива



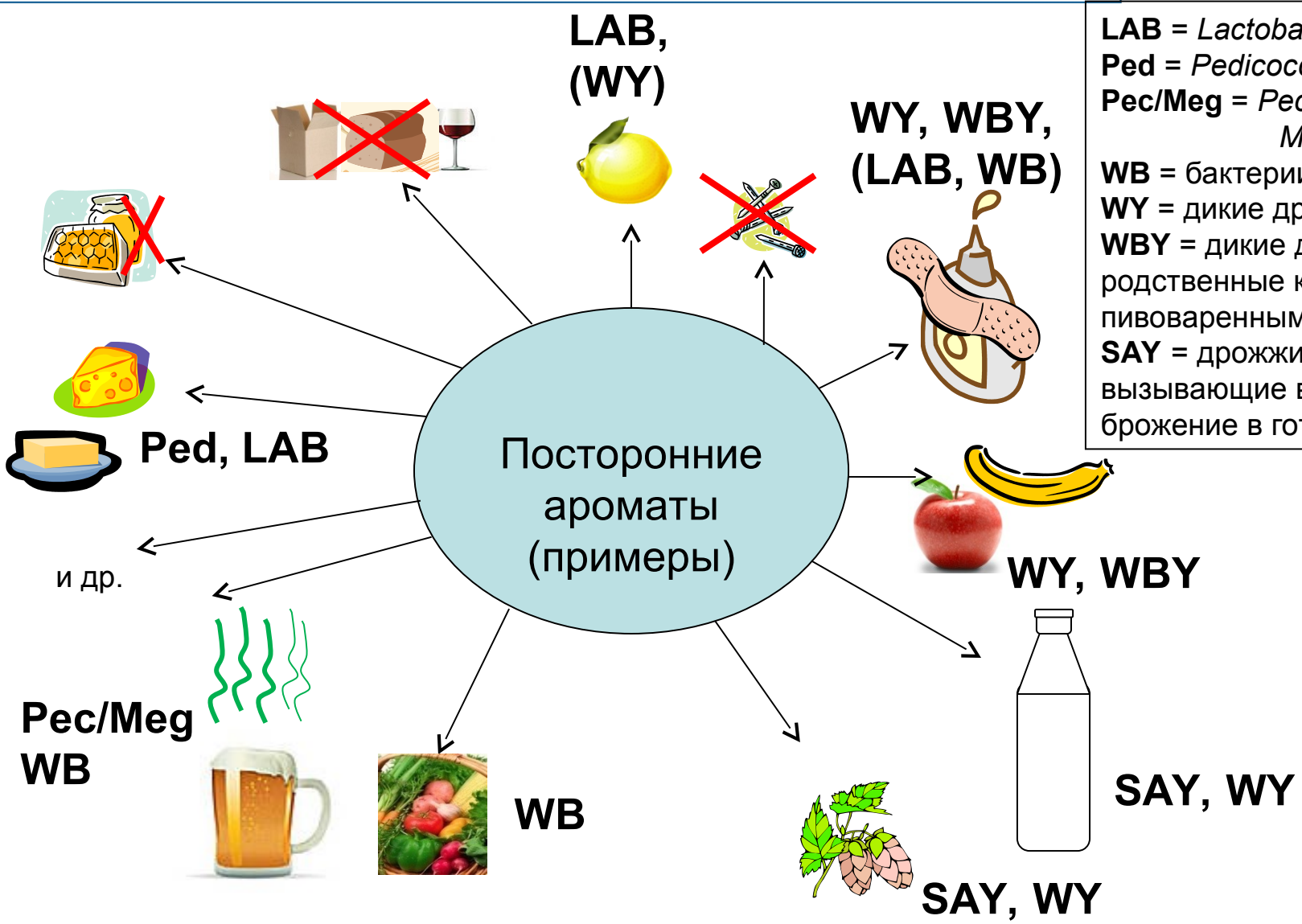
Решающее значение

Menz, G., Aldred, P.Vriesekoop, F. (2009). Pathogens in Beer. In Beer in health and disease prevention (Preedy, V. R., ed.), pp. 403-413. Elsevier/Academic Press, London. 9780123738912.

Микробиологический барьер хмель

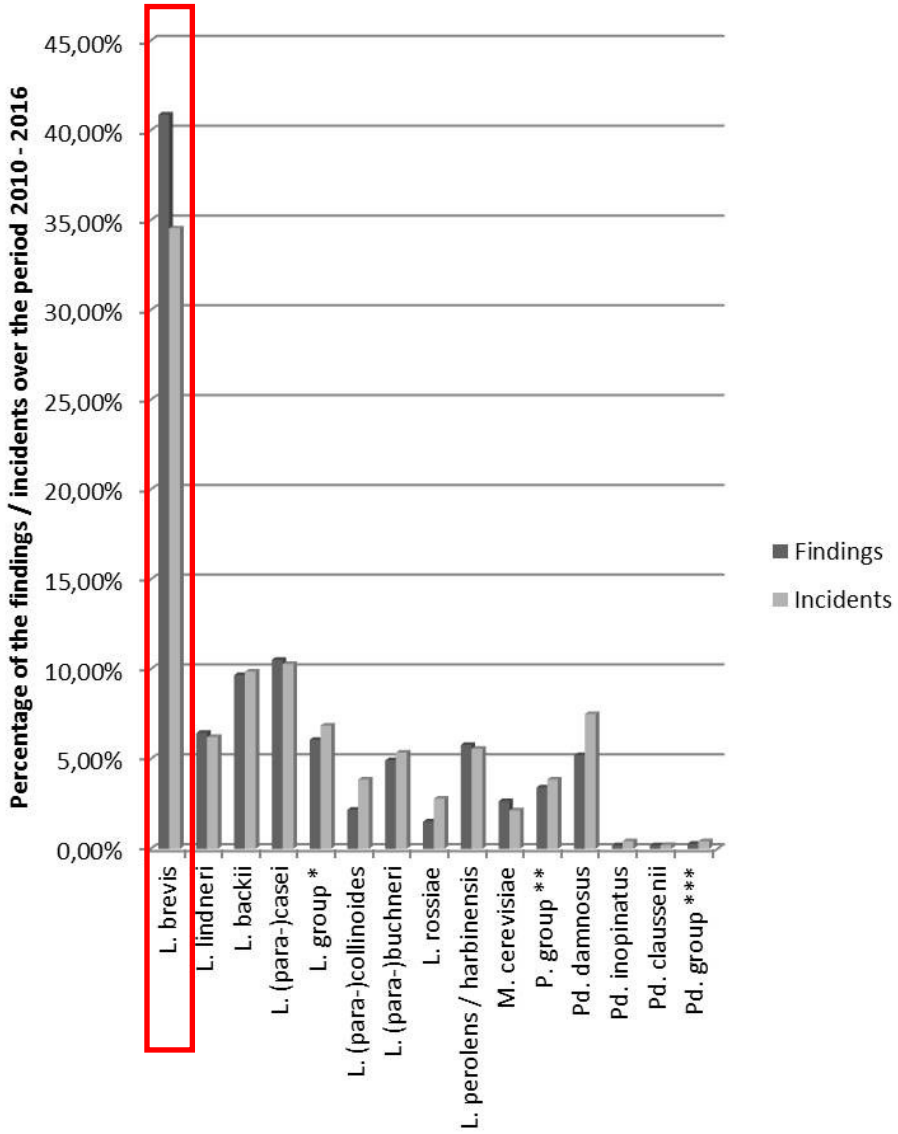
	Lager Beer (pH > 4,4) (BU EBC >18)	German Wheat Beer(pH > 4,4) (BU EBC <15)
L. brevis	+	+
L. lindneri	+	+
L. backi	+	+
L. collinoides	+	+
Pediococcus damnosus	+	+
Pectinatus sp.		
Megasphaera sp.	+	+
(lower alcohol tolerance)	+	+
L. casei/paracasei	-/w	+/-
L. coryniformis	-/w	+/-
P. inopinatus	-/w	+/-
L. plantarum	-	+/-
L. rossiae	-	+/-
L. buchneri/parabuchneri	-	+/-
L. perolens	-	+/-
P. claussenii	-	+/-
P. spp. (others)	-	+/-
Lc. lactis	-	+/-
Leuconostoc sp.	-	+/-

Посторонние ароматы из-за микробиологической контаминации



LAB = *Lactobacillus* sp.
Ped = *Pedicoccus* sp.
Pec/Meg = *Pectinatus*/ *Megasphaera*
WB = бактерии сусла
WY = дикие дрожжи
WBY = дикие дрожжи, родственные культурным пивоваренным дрожжам
SAY = дрожжи, вызывающие вторичное брожение в готовом пиве

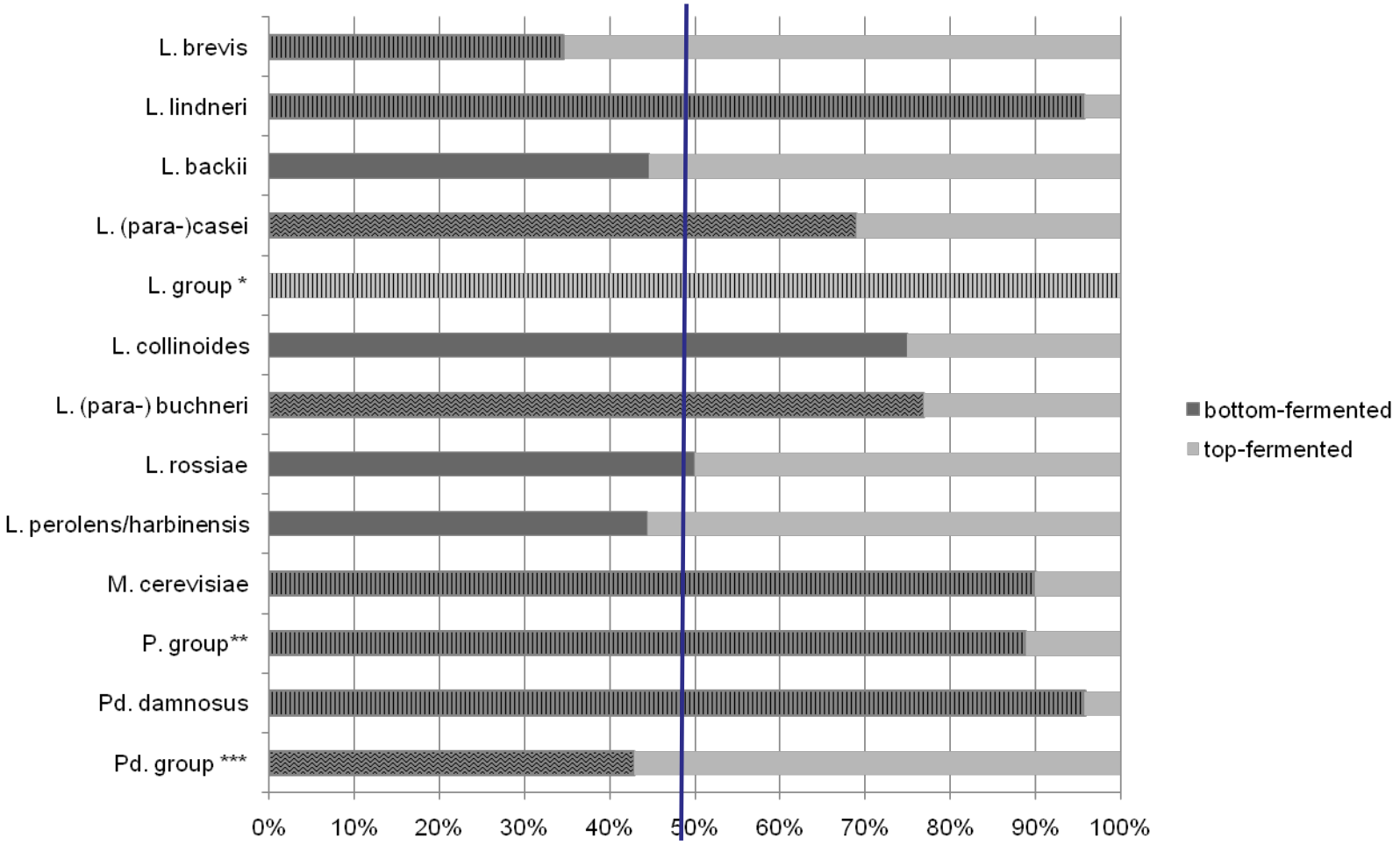
Статистика



Средние значения в процентах обнаруженных контаминаций и серьезных проблем на пивзаводах по различным микроорганизмам за период 2010–2016 г.г.
**= L. (para-)plantarum, L. coryniformis;*

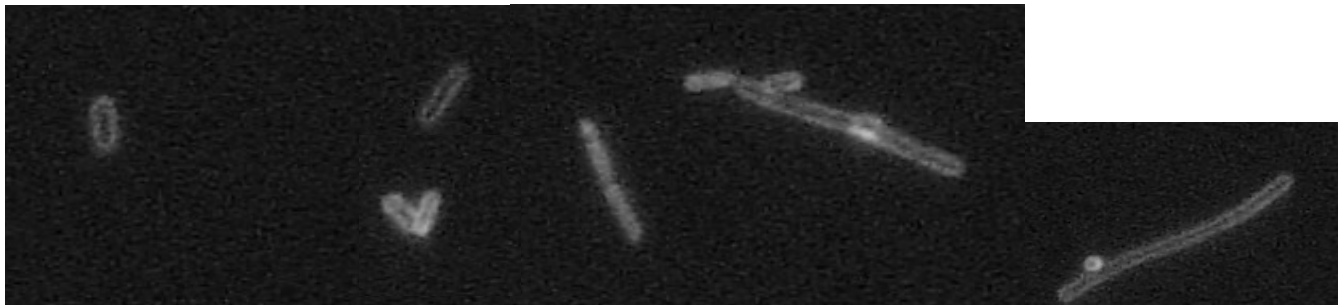
*** = P. cerevisiiphilus, P. frisingensis, P. haikarae;*** = Pd. parvulus, Pd. pentosaceus, Pd. acidilactici*

Статистика



Значения в процентах рас бактерий, характерных для пива низового и верхового брожения, в сравнении

Lactobacillus brevis



Тип клетки: палочка

Морфология клетки: короткие, длинные и очень длинные клетки (некоторые > 50 мкм)
длина зависит от среды (твердой или жидкой)

Внешний вид : обычно отдельные клетки, некоторые объединены в пары

Газобразование: положительное (гетероферментативное)

Условия для роста: оптимальное значение pH 5,0–6,5 оптимальная температура ~ 30°C

- Отсутствие цепочек
- Тонкие, параллельно расположенные стенки клеток
- Некоторые клетки способны изгибаться и змеевидны
- Форма в виде стрелки и длинные клетки часто указывают на *L. brevis*

Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus

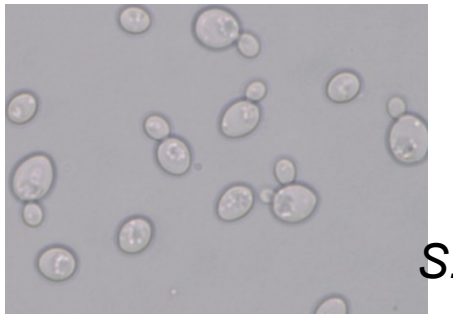
Технические Университет München

Морфология: маленькие (диаметром ок. 5 мкм) клетки в форме овала, эллипса, отдельные клетки, почки, иногда клеточные сообщества, возможны короткие цепочки

Физиология: амилазы, амилоглюкозидаза , сбраживает декстрины и крахмал

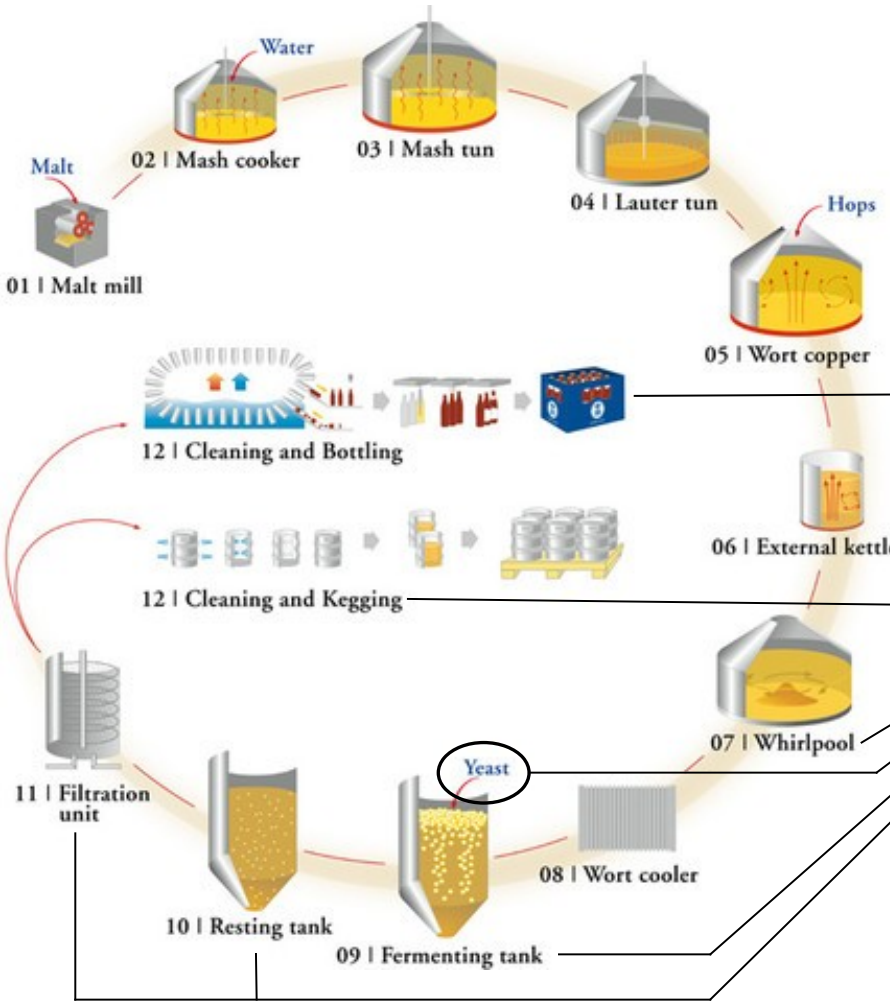
Распространение: в большинстве случаев вторичная контаминация в зоне линии розлива (машина для укупорки пива кроненпробкой), представляет очень большую опасность в зоне линии розлива пива в бутылки, в редких случаях – первичный контаминант

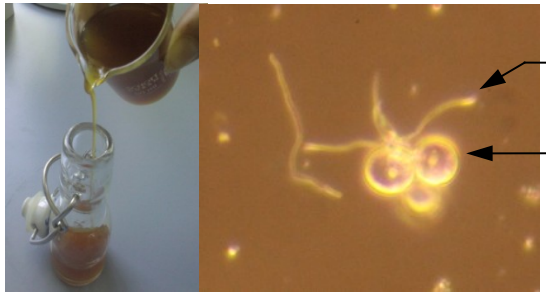
Пороки пива: вторичное брожение в готовом пиве,
мутность, донный осадок,
пустой вкус, остающаяся горечь,
опасность бомбажа,
посторонний фенольный флейвор



S. c. var. *dia.* B95 105

Отбор проб на пивзаводе





Микробиологический контроль качества

Обогащение проб в селективных и неселективных культуральных средах с последующим инкубированием

Источник иллюстрации: hofbraeu-muenchen.de

Отбор проб на пивзаводе

Какие пробы как анализировать

Обогащение в жидкой среде

Содержащие дрожжи пробы, отобранные на пивзаводе

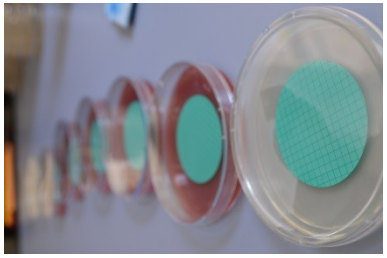
Отдельные культуры / тестовая пластина

Тупфер

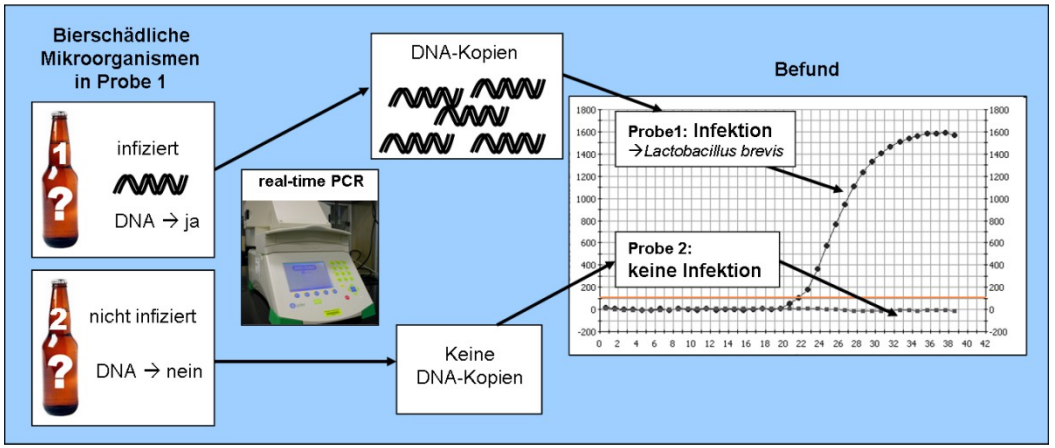
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) после выделения ДНК/ прямая ПЦР

Порядок микробиологического исследования

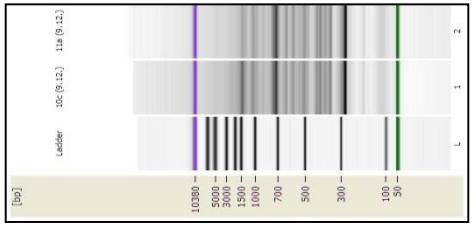
Культивирование



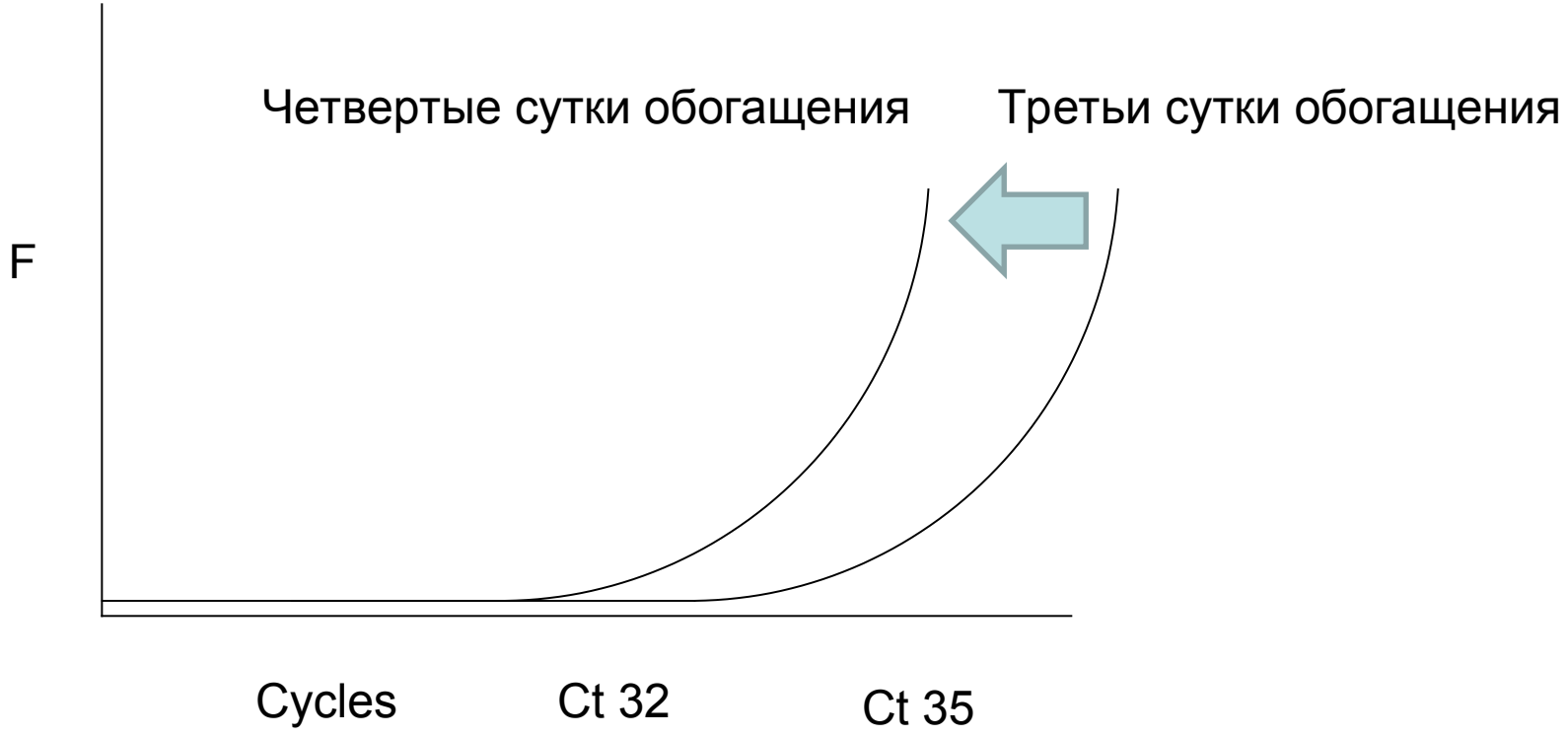
Идентификация (ПЦР)
+ ПЦР
толерантности к хмелю



ДНК-фингерпринтирование
(сравнение штаммов)

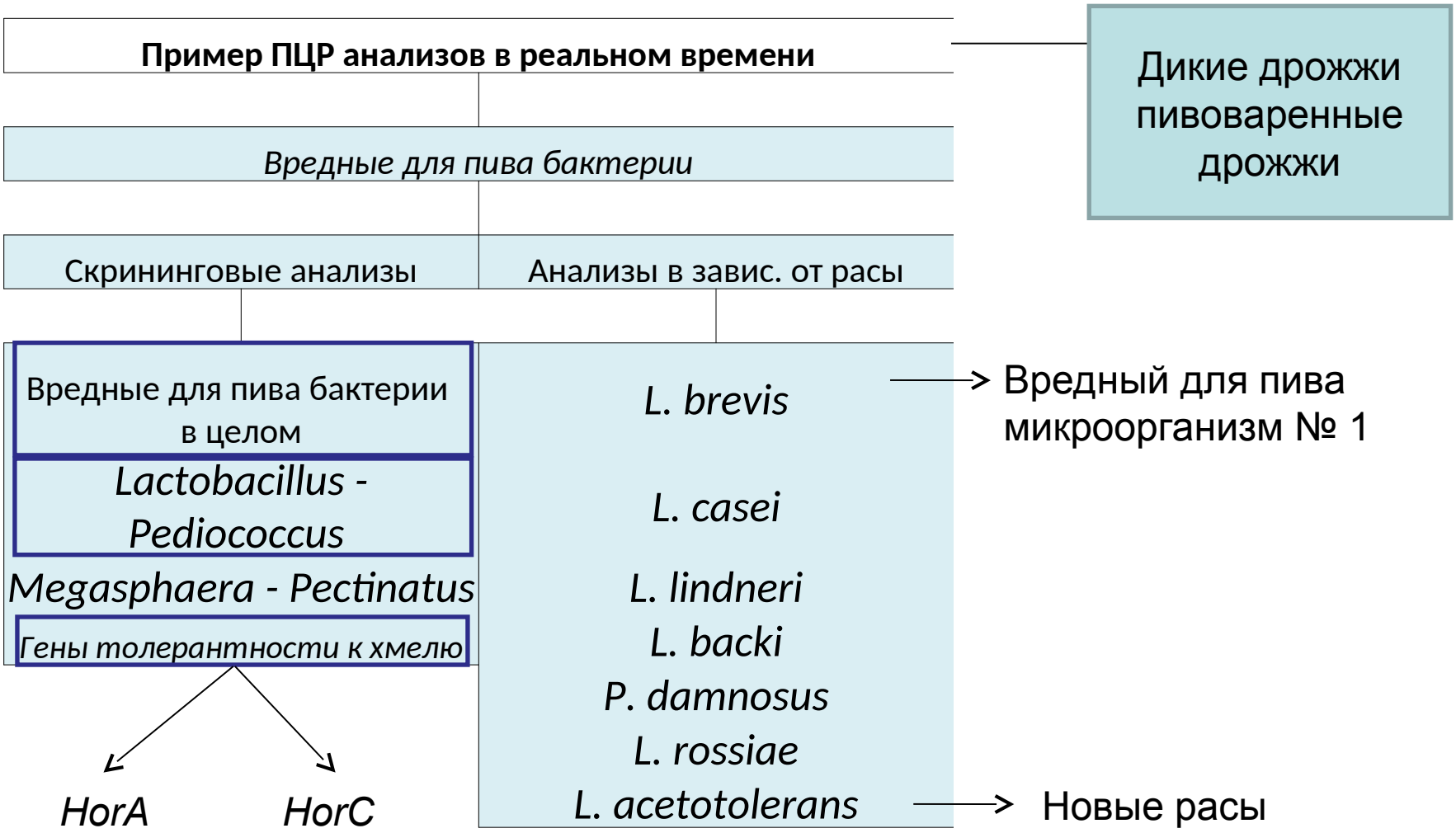


Простое дифференцирование живых/мертвых микроорганизмов



Изменение Ct после суток более длительного обогащения → живые микроорганизмы

Основной принцип применения ПЦР на пивзаводе



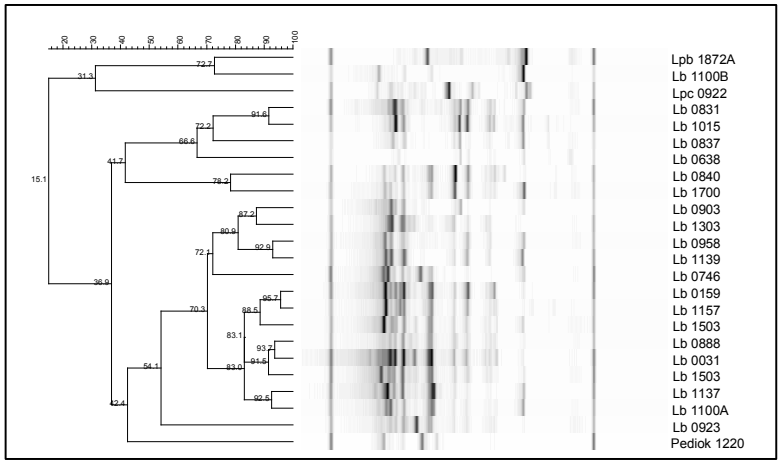
Типизация *L. brevis* (вредного для пива микроорганизма № 1)

Primer-Anealing

Amplification of sequences, framed by conserved repetive units over the whole genome

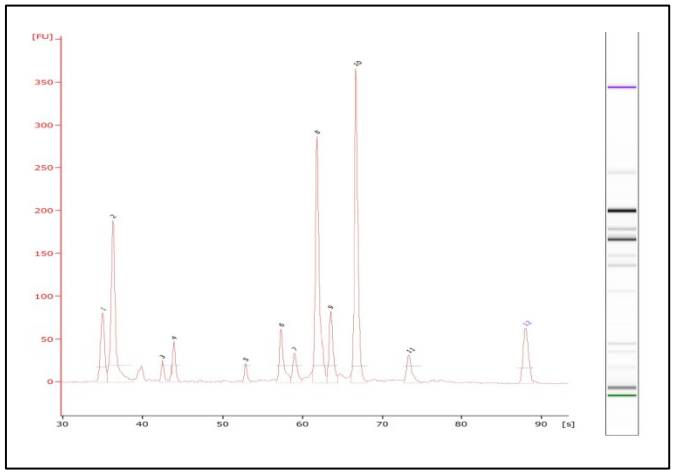
PCR-fragments of various length

capillary gel electrophoresis



database-comparison

\+ increasing fragment size -

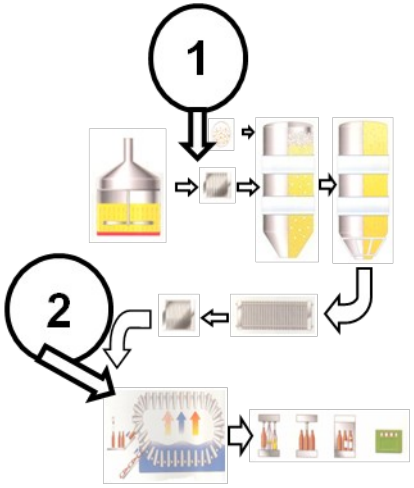


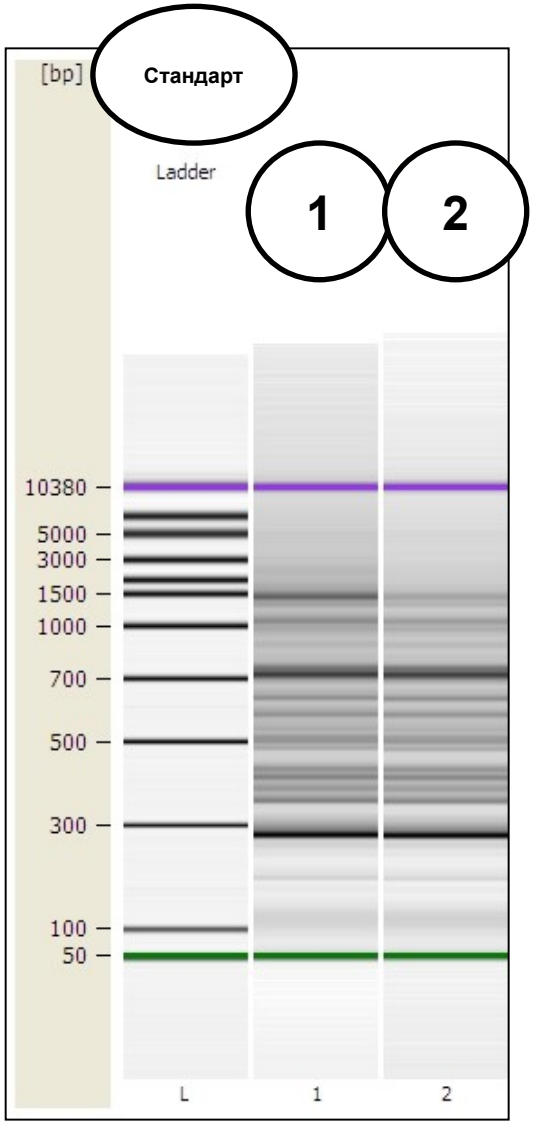
„Fingerprint“

Обнаружение контаминации L. brevis

L. brevis
2 обособленных места

Обнаружение источника контаминации

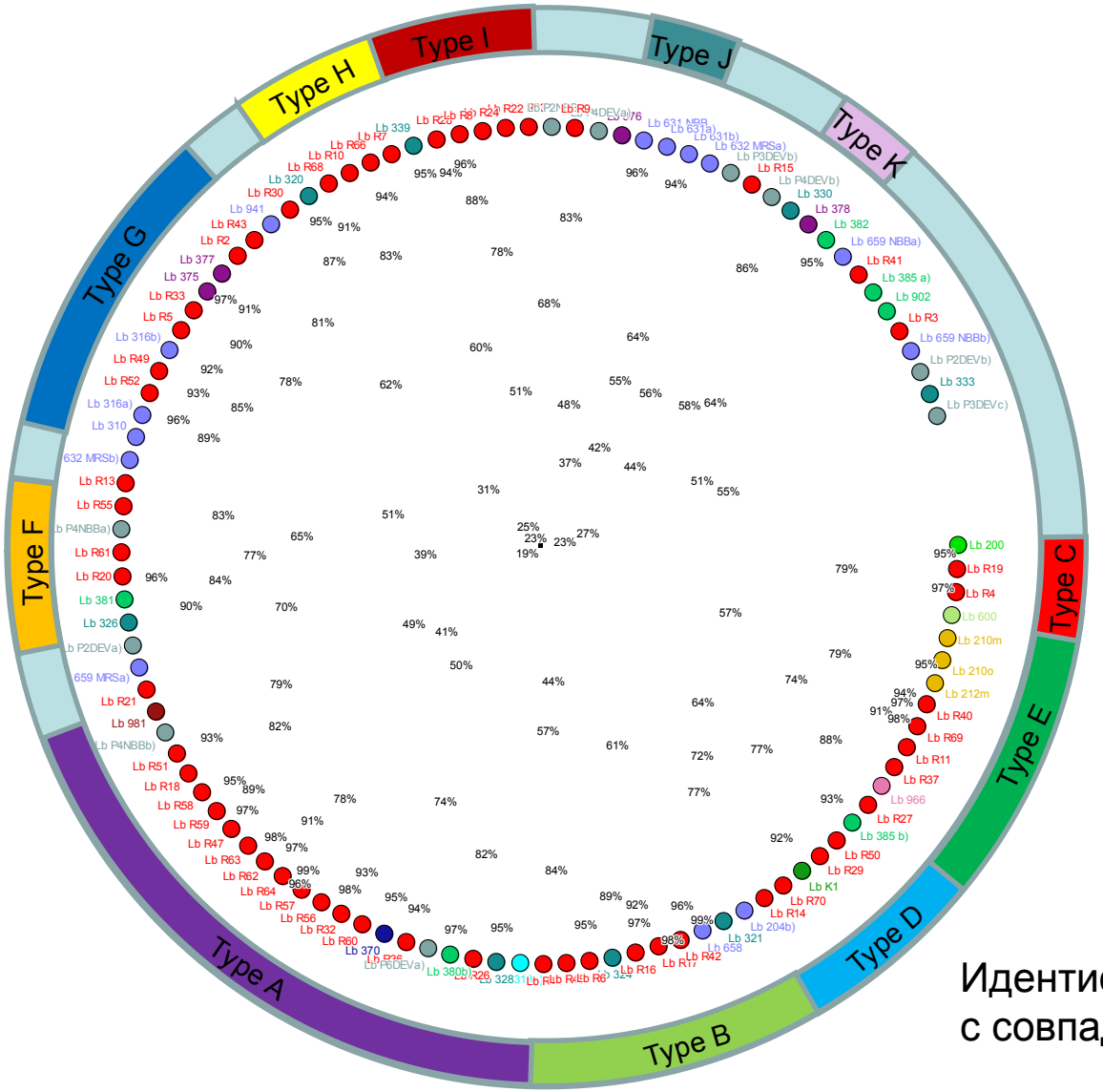




1 — Проба на тупфере с уплотнения теплообменника сусла

2 — Пиво в форфасе

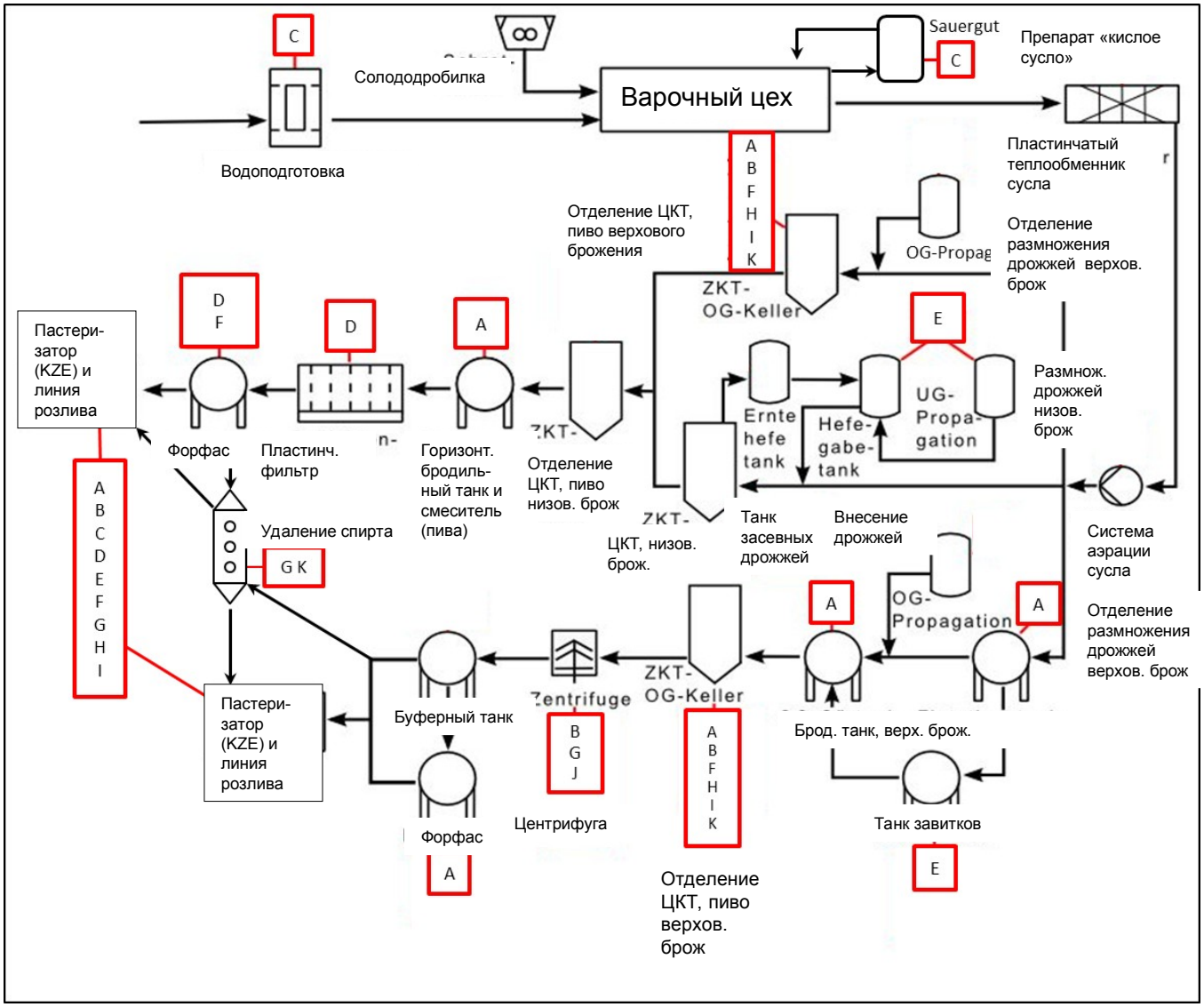
Типизация *L. brevis* (вредного для пива микроорганизма № 1)



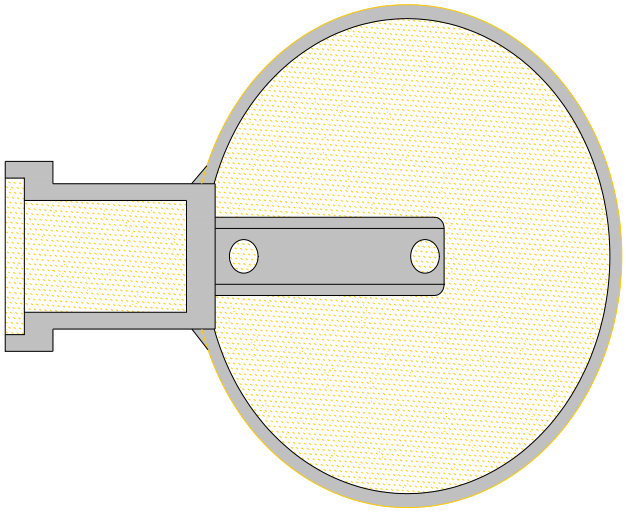
- lactic acid culture tank
- flash pasteurisation infeed
- centrifuge slurry
- BF-propagation
- storage tank horizontal
- Wheatbeer cellar
- BF cellar
- dealcoholisation plant
- bright beer tank
- Water treatment
- harvest yeast tank
- flotation tank
- filtration
- room air sample
- TF fermentation cellar
- BF cellar

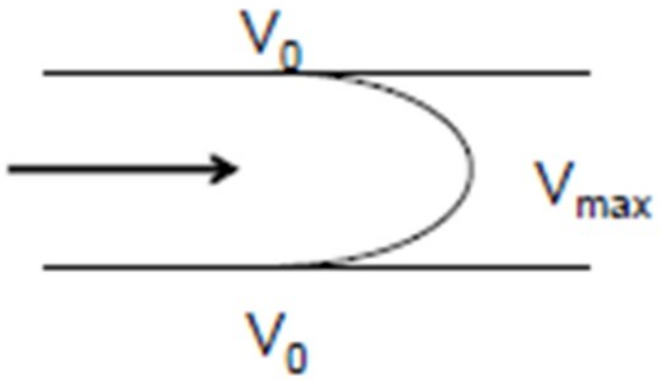
Идентификация не менее 11 групп с совпадением мин. 70%

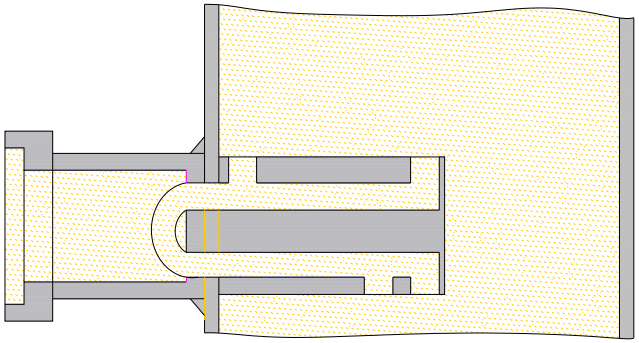
Типизация *L. brevis* (вредного для пива микроорганизма № 1)



Правильный автоматический отбор проб

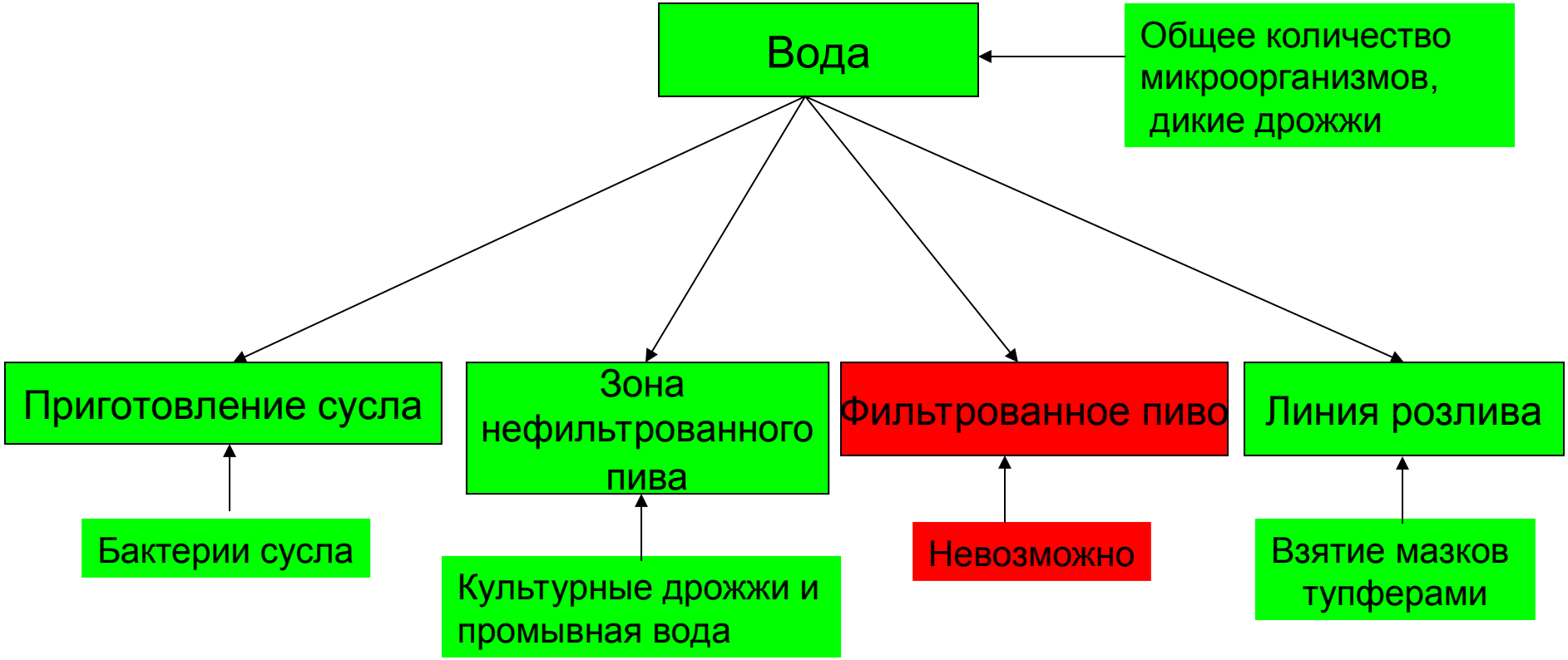






Использование индикаторов микроорганизмов

Мониторинг гигиены с помощью индикаторов микроорганизмов

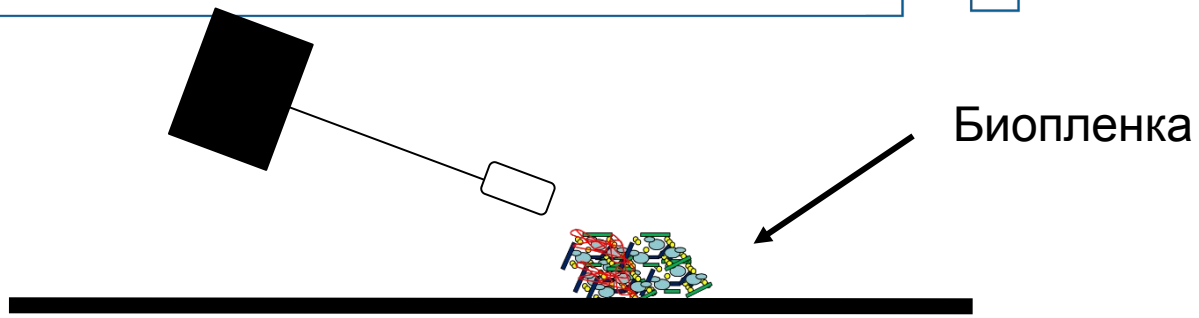


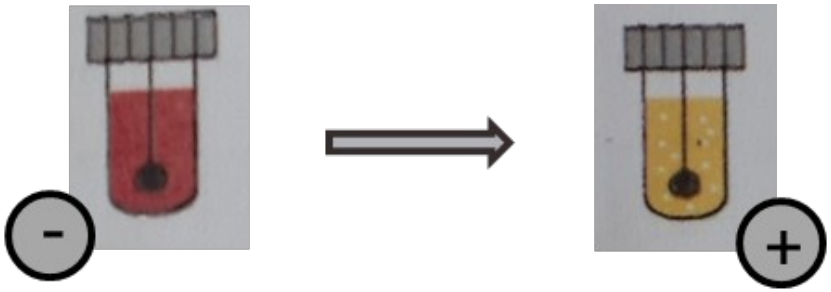
Что делать в сложных ситуациях

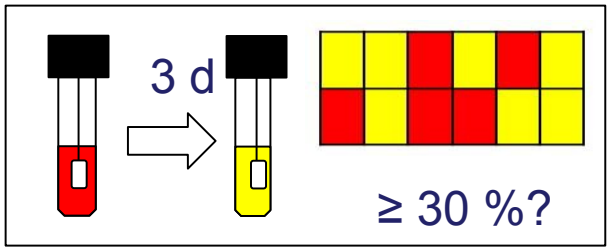
=> Стратегия успешного мониторинга гигиены

- Увеличение объема пробы
- Работа с индикаторами микроорганизмов
  - Пробы воды: => общее количество клеток ранее
  - Подготовка
  - Пробы сусла: => бактерии сусла
  - Зона нефильтров. пива: => культурные дрожжи в последней промывной воде в танках и трубопроводах
  - Пастеризатор KZE: => второе автоматическое устройство отбора проб перед KZE
  - Розлив / укупорка: => взятие мазков тупферами и оценка по проф. Баку

Мониторинг биопленки по проф. Баку







Взятие мазков тупферами в критических местах установки розлива с последующей статистической оценкой

Другие возможности контроля гигиены

Средства и методы обнаружения и идентификации уязвимых мест

- УФ-лампа (контроль биопленки, свечение)
- Тупферы для определения АТФ (аденозинтрифосфата)
- Эндоскоп
- Состав-индикатор для нанесения распылением (например, TM Smart Gel фирмы Thonhauser)
- Рибофлавиновый тест

http://www.isv-buero-od.com/

//www.thonhauser.net/html/d/home.htm

Повышение микробиологической стабильности

- Мойка, дезинфекция, улучшение гигиены за счет гигиенического исполнения оборудования, уменьшение биопленки (сушка)
- Стерилизация
- Поточный пастеризатор KZE
- Пастеризация бутылок и банок (туннельный пастеризатор)

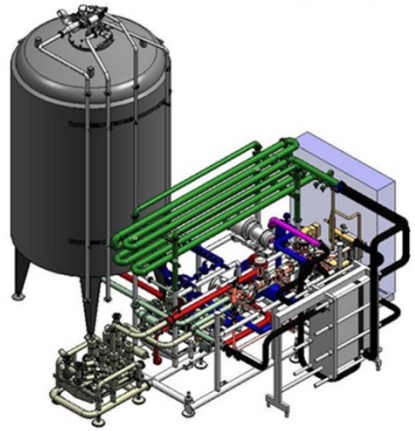
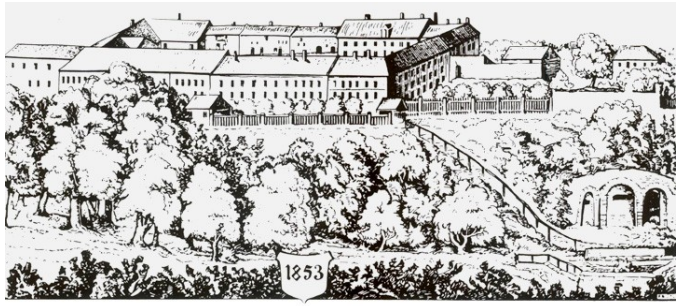


Bild: Krones AG

- Консерванты, Velcorine (диметилдикарбонат) для смешанных напитков на основе пива, дисульфит калия, экстракты хмеля
- Промывка дрожжей фосфорной кислотой, низином (низаплином)

Спасибо

Команда Исследовательского центра в Вайенштефане Мюнхенского технического университета



Weihenstephan im Jahre 1853

Dr.-Ing. Maximilian Michel
Consulting
Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality TU München
Alte Akademie 3
85354 Freising-Weihenstephan
Telefon: +49 (0) 8161 / 71- 3384
Telefax: +49 (0) 8161 / 71- 4181
E-Mail: m.michel@tum.de
www.blq-weihenstephan.de