



# Evaluation of microbiological sampling methods in the beer brewing process

Andreas Moberg

*Master thesis for the Programme Food Science, SLU  
Performed at Spendrups Brewery, Vårby*

Supervisor: Monika Öberg, Spendrups Brewery

---

Department of Microbiology  
Swedish University of Agricultural  
Sciences

Master thesis 2007:1

Uppsala

ISSN 1101-8151

ISRN SLU-MIKRO-EX-07/1-SE

---





# Utvärdering av mikrobiologiska provtagningsmetoder inom ölbryggningsprocessen

Andreas Moberg

---

Institutionen för mikrobiologi  
Sveriges lantbruksuniversitet

Examensarbete 2007:1

Uppsala

ISSN 1101-8151

ISRN SLU-MIKRO-EX-07/1-SE

---



## **FÖRORD**

Det var mitt intresse för öl som gjorde att jag valde detta ämne för mitt examensarbete. Sedan några år tillbaka brygger jag öl hemma och den hobbyen i kombination med min utbildning gör att jag ständigt försöker utöka mitt vetande kring ämnet öl. Den utbildning som jag läst är livsmedelsagronomprogrammet på SLU som ska ge en helhetsbild över hur livsmedel produceras och ge en djup kunskap om kemien och mikrobiologin beträffande livsmedel. Spendrups bryggeri i Vårby var villiga att hjälpa till med examensarbetet, så arbetet utfördes mestadels på bryggeriet. Under den tid examensarbete har pågått har jag hunnit lära mig mycket om hur ett bryggeri fungerar i verkligheten. De resultat som jag presenterar i rapporten, hoppas jag ska bidra till att göra ytterligare förbättringar på bryggeriet. Jag vill passa på att tacka min handledare på Spendrups, Monika Öberg och min examinator på SLU, Hans Jonsson, för den hjälp jag fått på vägen. Personalen på laboratoriet i Vårby, Anki, Barbara, Tesfa, Peter och Britt har hjälpt mig mycket under den tid jag varit där. Till sist vill jag tacka alla de som jag varit i kontakt med på bryggeriet med frågor eller praktiska problem, Ulf, Rickard, Christian med fler, tack!



## **ABSTRACT**

### **Evaluation of microbiological sampling methods in the beer brewing process**

The aim of this study was to establish knowledge about the most suitable substrate for cultivating different kinds of anaerobic beer spoilage bacteria in the brewing industry. During the study, two other aspects were investigated; if the sample volume affects the results and which anaerobic beer spoilage bacteria are present in the micro flora at the brewery. The method used was standard cultivation with four different substrates; Universal Beer Agar, Nachweismedium Bierschädliche Bakterien, Raka Ray and VLB S7-S. During the identification of bacteria in the micro flora, a method using PCR was used. None of the substrates showed a significant advantage over the others. A sample volume of 500 µl shows only 16-36 % of the colonies obtained with 100 µl sample volume, which shows that the smaller volume gives a more accurate result. The identified species were: *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus warneri/pasteuri*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus oligofermentans*. The conclusion is that Spendrups brewery should change the sample volume to 100 µl and in a future perspective, obtain laboratory equipment using PCR technology.

Keywords: Brewing, beer, beer spoilage bacteria, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus oligofermentans*, *Pediococcus damnosus*, *Staphylococcus warneri/pasteuri*.





## SAMMANFATTNING

### Utvärdering av mikrobiologiska provtagningsmetoder inom ölbryggningsprocessen

Målet med studien var undersöka vilket substrat som var mest lämpligt för odling av anaeroba ölskadliga bakterier inom bryggeriindustrin. Under studiens gång undersöktes två andra aspekter; om provvolymen påverkar resultaten och vilka anaeroba ölskadliga bakterier som förekommer i bryggeriets mikroflora. Metoden som användes var standardodling av bakterier med fyra olika substrat: Universal Beer Agar, Nachweismedium Bierschädliche Bakterien, Raka Ray och VLB S7-S. För identifieringen av bakterierna i mikrofloran, gjordes sekvensering av 16 Sr DNA. Inget av substraten visade några tydliga fördelar framför något av de övriga. En provvolym på 500 µl visar endast 15-36 % av kolonierna som detekteras med en provvolym på 100 µl, vilket visar att den mindre volymen ger ett bättre resultat. De identifierade bakteriearterna var: *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus warneri/pasteuri*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus brevis* och *Lactobacillus oligofermentans*. Slutsatsen är att Spendrups bryggeri ska ändra provvolymen till 100 µl och att man i framtiden borde skaffa utrustning som använder PCR-teknik.

Sökord: ölbryggning, öl, ölskadliga bakterier, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus oligofermentans*, *Pediococcus damnosus*, *Staphylococcus warneri/pasteuri*.



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>INLEDNING</b>	11
Studiens syfte	11
Ölets historia i korthet	11
Ölbryggningens principer	12
<i>Mäskning och vörtkokning</i>	13
<i>Jäsning och lagring</i>	13
Olika typer av öl	14
Förbättringspotential i bryggeriindustrin	14
<b>ÖLFÖRSTÖRARE OCH DERAS DETEKTION</b>	15
Traditionell odling	16
<i>Odlingssubstrat</i>	16
<i>Identifiering av bakterier</i>	16
PCR-teknik	17
<b>METODER</b>	18
Jämförelse mellan substrat	18
<i>Substratberedning</i>	18
Jämförelse av provvolymmer	19
Förekommande bakteriearter	19
<b>RESULTAT</b>	20
Jämförelse mellan substrat	20
Jämförelse av provvolymmer	22
Förekommande bakteriearter	23
<b>DISKUSSION</b>	25
Jämförelse mellan substrat	25
<i>Metod och resultat</i>	25
<i>Förslag till förändringar</i>	25
Jämförelse av provvolymmer	26
<i>Metod och resultat</i>	26
<i>Ytterligare studier</i>	26
Förekommande bakteriearter	26
<i>Metod och resultat</i>	26
<i>Lactobacillus brevis</i>	27
<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	27
<i>Lactococcus lactis</i>	27
<i>Pediococcus damnosus</i>	28
<i>Staphylococcus pasteurii eller warneri</i>	28
<i>Ytterligare studier</i>	28
Slutsats	29
<b>REFERENSER</b>	30



## INLEDNING

### Studiens syfte

Idén från början var att hitta ett substrat för odling av ölskadliga bakterier som bäst skulle passa de förhållanden som finns på Spendrups bryggeri i Vårby. Genom en jämförelse av olika substrat och dess lämplighet gentemot den lokala mikrofloran på bryggeriet, skulle det bästa substratet väljas. De krav som ställs på substraten är att de ska:

- Ge tillförlitliga svar
- Påskynda tillväxten av ölskadliga bakterier
- Vara enkla att hantera
- Effektivt hämma jäst

Under arbetets gång utvärderades fyra olika substrat för ölskadliga bakterier och dessutom gjordes försök med flytande medium samt hur olika provvolymen påverkar resultatet. För att få en djupare kunskap om vilka bakteriearter som förekom i försöken, gjordes DNA-prover på fyra utvalda organismer som sedan sekvenserades.

### Ölets historia i korthet

Att brygga öl är något som människan gjort under mycket lång tid, en del historiker hävdar till och med att ölet är samtida med det första brödet som också gjordes på korn. Denna dryck kan mer liknas vid en alkoholhaltig välling, baserad på olika sädesslag eller bröd som blötts upp och fått jäsa (Jackson 1998). Det var i området kring de två floderna Eufkrat och Tigris som de första odlingarna av säd uppstod för ungefär 5000 år sedan. Den dryck som gjordes var en mer närande dryck än dagens öl, men hade även då som nu en social funktion (Glover 1997).

De tidiga bryggarna fanns inte bara i tvåflodslandet utan så snart olika folk blev mer bofasta och började odla de sädesslag som fanns i området, utvecklades samhället som de skapade. Under tiden hittade människorna på nya sätt att använda säden. Generellt så användes durra eller hirs i Afrika, ris var den vanligaste råvaran i alkoholhaltiga drycker i Asien medan i Europa och Mellanöstern användes korn, vete eller råg (Jackson 1998).

De tidiga ölen var ofta kryddade; egyptierna använde enbär, saffran och örter för att smaksätta ölet. På Jylland i Danmark begravdes en kvinna ca 1300 f.Kr. som hade fått med sig en spann med öl i graven. Brygden var gjord på vete och kryddad med tranbär, blåbär och myrten. Med tiden så utvecklades tekniken att brygga öl och det var egyptierna som började med mältning av korn. I Europa övergick man allt mer till att använda korn som har flera fördelar jämfört med vete. Ölbryggningen skedde både i hemmen och i kloster innan det blev en professionell sysselsättning (Glover 1997).

Humlen började användas på 1100-talet och kom i allt större utsträckning bli den dominerande kryddningen av öl. En annan egenskap humlen har, förutom att den ger ölet beska och doft, är att den har en bakteriostatisk effekt. Detta upptäckte säkert dåtidens bryggare och använde därför humle istället för, eller i kombination, med andra kryddor (Jackson 1998).

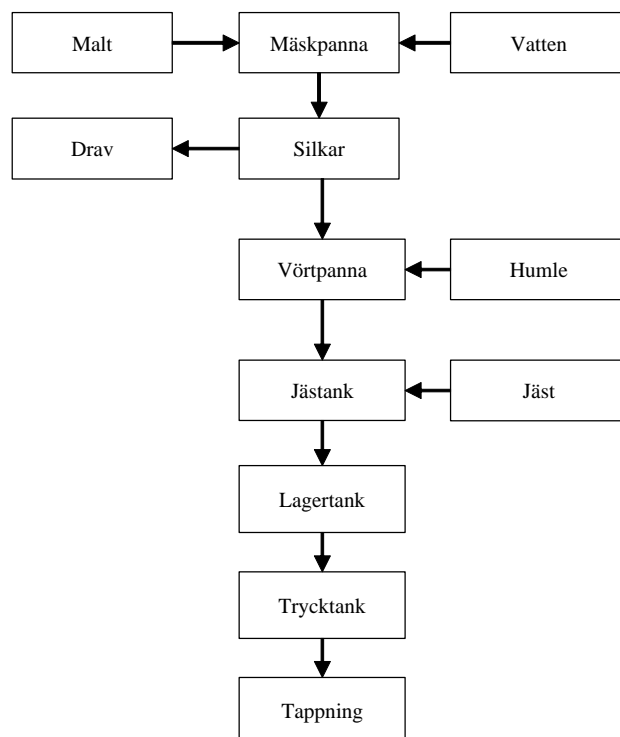
Utvecklingen ledde så småningom till att man försökte förbättra ölets egenskaper på olika sätt. Bland annat började man lagra öl i källare eller grottor under de varma sommar-månaderna för att bättre kontrollera jäsningsen. Här kom man att ta vara på den jäst som trivdes bäst i de svala förhållandena, vilket var så kallad underjäst.

Under 1800-talet började stora bryggerier växa upp, den industriella revolutionen gällde även för bryggeriindustrin. Louis Pasteur visade att jäst är en levande organism och att det fanns bakterier som kunde infektera denna och orsaka de problem som så många bryggare hade fått erfara. Arbetet fortsatte på Carlsbergbryggeriets laboratorium av dansken Emil Hansen, som lyckades renodla stammar av *Saccharomyces cerevisiae*. När detta var gjort, blev det möjligt att använda en viss jäststam för ett visst öl.

Idag är öl till stor del en industriell produkt där bryggerierna framställer mycket stora kvantiteter. Under 1900-talet har bryggerierna gått samman, blivit uppköpta eller lagts ner om de inte har kunnat få stora försäljningsvolymerna. Under de senaste årtiondena har dock en annan typ av bryggerier pånyttfötts som är betydligt mindre, har en mer nischad produktion och är mer hantverksmässiga. Dessa bryggerier kallas ofta för mikrobryggerier på grund av deras ringa storlek och omsättning. Mikrobryggerierna erbjuder konsumenten en stor variation av olika öl och har inte den moderna lagerölen som sin viktigaste produkt (Glover 1997).

## Ölbryggningens principer

För att kunna brygga ett modernt öl behövs fyra grundläggande ingredienser: vatten, korn, humle och jäst. Processen visas i sin enkelhet i figur 1.



Figur 1. Flödesschema för ölprocessen på ett bryggeri.

## ***Mältning***

Processen startar med att få kornet att gro, vilket görs genom att stöpa (blöta) kornet i vatten. När kornet fått en vattenhalt på 42-46 % avskiljs vattnet och kornet får gro i 4-5 dagar vid 15°C innan groningen avslutas (Bejram 1998). Målet med groningen är att kornet ska bilda mycket enzymer men förbruka lite energi i form av stärkelse (Hoseney 1998). För att avbryta groningsprocessen och få önskad färg och smak på malten, kölmar man kornen. Detta innebär att man torkar malten i en kölma med het luft och genom att variera temperaturen och längden på kölningen, bestäms maltens egenskaper. Malt som ska vara till ljust öl kölmas vid låg temperatur, 80-85°C, och kort tid. Malt som ska användas till färgmalt torkas i mycket högre temperatur, cirka 200°C (Bejram 1998).

## ***Mäskning och vörtkokning***

Nästa steg i bryggingsprocessen är mäskningen, där maltens stärkelse ska omvandlas till enklare sockerarter som jästen kan använda vid sin fermentering. Enzymerna som utnyttjas är  $\alpha$ -amylas och  $\beta$ -amylas, som bryter ner stärkelsen på olika sätt och har olika optimal arbetstemperatur (Fennema 1996). Vid mäskningen tillsätts vatten (eventuellt med justerat pH och tillsats av vissa salter) och malt. Blandningen värms upp till de temperaturer där enzymerna är som mest aktiva, ca 60°C för  $\beta$ -amylas och ca 70°C för  $\alpha$ -amylas (Hoseney 1998). Stärkelsen i malten gelatiniseras och blir löslig mellan 52-59°C vilket ökar stärkelsens tillgänglighet för enzymerna (Adams och Moss 2000). Mäskningen pågår ungefär en timme eller tills det inte finns någon stärkelse kvar att försockra (Hoseney 1998). Temperaturen höjs därefter till 100°C för att denaturera enzymerna. Vätskan, kallad sötvört, silas av och malten, som nu benämns drav, avskiljs och kan användas som djurfoder. När silningen äger rum, drar man nytta av kornets skaldelar som gör att draven bildar ett sillager. Detta bidrar till att sila bort partiklar som kan göra sötvörten grumlig (Bejram 1998).

Sötvörten värms sedan upp i en vörtpanna där den får koka under 1-1,5 timme, varvid humle tillsätts i flera givor (Bejram 1998). Humlen ger ölet doft och dess beska smak dessutom bidrar den även till att göra ölet mer motståndskraftigt mot bakterier. Anledningen är att en del bakterier är känsliga för iso- $\alpha$ -syror som uppstår vid kokningen av humle. De bakterier vars tillväxt hindras är grampositiva, men det finns en del bakterier i denna grupp som är resistenta mot iso- $\alpha$ -syror. Kokningen gör även att vörten blir steril (Sakamoto och Konings 2003).

## ***Jäsning och lagring***

Vörten kyls ner och förs till en jästank där jästen tillsätts. Den jästart som används är *Saccharomyces cerevisiae* och dess underarter. Beroende på vilken slutprodukt man vill uppnå används *S. cerevisiae carlbergensis* eller *cerevisiae*, den förstnämnda används främst till lageröl medan den sistnämnda används till ales. Jäsningen fortgår så länge som jästen har socker att förjäsa. Jästen kan återvinnas ett antal gånger, beroende på bra kvalitet den har, vilket påverkas av bakterieinfektioner och jästens allmänna tillstånd (Adams och Moss 2000).

Lageröl kommer efter jäsningen att genomgå en mognadsprocess i lagertankar, jäsningen fortsätter långsamt eftersom temperaturen är lägre, ca 0°C (Hoseney 1998).

## Olika typer av öl

Genom att variera mängden av olika maltsorter, humlesorter, jäststammar och koncentrationen av olika mineraler i vattnet kan man uppnå en oändlig variation. En enkel uppdelning kan dock användas för att få en översikt av de vanligaste öltyperna. Man skiljer på öl som jäses vid olika temperaturer, öl som jäses vid hög temperatur, det vill säga 12-18°C, kallas överjästa och ingår i gruppen ale. Öl som jäses vid lägre temperatur, 8-12°C, kallas underjästa och undergår för det mesta en tids lagring och de ingår i gruppen lager (Adams och Moss 2000). En tredje grupp är spontanjästa öl, där man inte tillsätter en speciell jäst utan låter vildjäst i luften få tillgång till vörten. Här kommer även olika bakterier att medverka under jäsningsen, deras fermentationsprodukter spelar en stor roll för slutresultatet. Bakterierna och vildjäst är något man i de flesta fall försöker undvika inom de andra två grupperna av öl. Spontanjäst öl som produceras smakar mycket annorlunda jämfört med de tidigare nämnda grupperna (Glover 1997).

## Förbättringspotential i bryggeriindustrin

Idag finns det en mycket stor kunskap om ölbryggning och problemen som kan uppstå i samband med denna. Det här arbetet inriktar sig på de bakterier som kan förstöra ölet eller orsaka problem i ölprocessen. Det finns ett fåtal arter bakterier som kan klara av att leva i de betingelser som finns i öl. De måste överleva en alkoholkoncentration på ca 5 volymprocent, lågt pH och små mängder av näringsämnen. De organismer som växer i öl är inte många, men de finns oftast i mikrofloran på bryggeriet. Laboratoriets uppgift är att övervaka förekomsten av ölskadliga bakterier så att man kan minska infektionsrisken för ölet.

### Ölförstörande organismer

De ölförstörande bakterier som är vanligast inom bryggeriindustrin är först och främst olika arter av mjölksyraproducerande bakterier. De mest förekommande grampositiva arterna är *Pediococcus*, *Lactobacillus* och *Lactococcus* (Madigan et.al. 2003). Förutom dessa finns det ytterligare några arter som kan orsaka problem, bland annat *Megasphaera* och *Pectinatus* (Haikara 1984).

Det fanns inga säkra uppgifter om vilka bakterier som finns bland mikrofloran på Spendrups bryggeri i Vårby. De vanligaste ölskadliga organismerna som anges (Jespersen och Jakobsen 1998, Haikara 1984, Bascomb, Manafi 1996) visas i tabell 1 och 2. För själva verksamheten på bryggeriet är det inte så viktigt att veta vilken art eller underart bakterierna tillhör, utan betydelsen ligger i att bakteriernas förekomst kan förstöra ölet och försvåra produktionen. Det är dock intressant att jämföra mikrofloran på bryggeriet för att se hur väl den överensstämmer med de i litteraturen vanligaste arterna.

Tabell 1. Vanligt förekommande gramnegativa bakterier i ölprocessen.

<i>Pectinatus</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>Zymomonas</i>	<i>Zymophilus</i>
<i>P. cerevisiiphilus</i>	<i>S. lactificex</i>	<i>M. cerevisiae</i>	<i>Z. mobilis</i>	<i>Z. raffinivorans</i>
<i>P. frisingensis</i>				



Tabell 2. Vanligt förekommande grampositiva bakterier i ölprocessen.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>L. lactis</i>	<i>M. kristinae</i>
<i>L. lindneri</i>	<i>P. inopinatus</i>		
<i>L. curvatus</i>	<i>P. dextrinicus</i>		
<i>L. casei</i>			
<i>L. buchneri</i>			
<i>L. coryneformis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. brevisimilis</i>			
<i>L. malefermentans</i>			
<i>L. parabuchneri</i>			

Under arbetets gång utvärderades fyra olika substrat för ölskadliga bakterier, dessutom gjordes försök om hur provvolymen påverkar resultatet. För att få en djupare kunskap om vilka bakteriearter som förekom i försöken, gjordes DNA-prover på fyra utvalda organismer som sedan sekvenserades.

## ÖLFÖRSTÖRARE OCH DERAS DETEKTION

Det finns flera olika metoder för att upptäcka de ölförstörande bakterierna på bryggeriet, där en del metoder drar nytta av selektiva medier medan andra utnyttjar amplifiering av bakteriernas DNA. Provtagningen följer en fastställd plan och proverna behandlas enligt denna. På Spendrups bryggeri följer man grunderna i European Brewery Convention (EBC). Vissa variationer förekommer men metoderna bygger på samma principer som EBC anger.

De metoder som används idag varierar mellan olika bryggerier, vilket dels beror på hur stort företaget är och dels på hur stora problemen med ölförstörande mikroorganismer är. Dessutom sker det nu en övergång från mer traditionell odling av bakterier på olika typer av agarplattor till att använda mer snabba metoder som bygger på PCR-teknik och DNA-analys. De metoder som används på Spendrups bryggeri idag baseras på prover som odlas upp på agarplattor och det tar 3 dygn för få resultat från aeroba bakterier och 5 dygn för anaeroba bakterier. För att snabbare kunna vidta åtgärder för att hindra spridningen av en infektion, finns det ett behov att förkorta tiden mellan provtagning och resultat.

### Provtagning

Varje steg i ölbrygningsprocessen övervakas med mikrobiologisk provtagning. Provmängden som tas ut beror på vilken metod som ska användas. Vid filtrering genom membranfilter används 200 ml prov medan man inte kan använda mer än 1,0 ml prov för utstryk på agarplattor. Tabell 3 visar var prover tas och hur de behandlas.

Tabell 3. Provtagningschema och provbehandling.

Provställe	Provmängd (ml)	Metod	Odlingen visar
Vörtpanna	1,0	Utstryk	Anaeroba bakterier
Jästank	1,0	Utstryk	Anaeroba bakterier
Lagertank	1,0	Utstryk	Anaeroba bakterier
Trycktank	200	Membranfiltrering	Bakterier, jäst och mögel
Produkt	200	Membranfiltrering	Bakterier, jäst och mögel
Jästodling	1,0	Utstryk	Anaeroba bakterier

Anledningen till att alla prover inte filtreras är att jästceller eller partiklar sätter igen filtret och förhindrar genomströmningen. En stor provmängd är annars önskvärd.

### **Traditionell odling**

Denna teknik beskrivs utförligt i EBC och ger flera alternativ hur man kan använda den. Spendrups använder membranfiltrering för de prover där så är möjligt och membranfiltret som används skärs itu och sätts på två agarplattor med olika innehåll i substratet. På detta sätt kan man upptäcka både anaeroba och aeroba bakterier samt mögel och jäst. För de prover som inte filtreras används bara en typ av substrat, här kommer bara anaeroba bakterier att upptäckas.

### ***Odlingssubstrat***

Det finns ett flertal substrat som passar de bakterier som förekommer i öl, en del är utvecklade specifikt för ölindustrin. Det substrat som används av Spendrups bryggeri är Universal Beer Agar (UBA). För de prover som enbart ska visa bakterier använder man UBA med en tillsats av cycloheximid (actidion), ett antibiotikum som hämmar proteinsyntesen hos eukaryoter, det vill säga organismer med cellkärna. Bakterierna, som är prokaryoter och saknar cellkärna, påverkas inte av cycloheximiden medan jästen hindras att tillväxa. Resultatet blir agarplattor med enbart kolonier av bakterier och är mer lättolkat än då jäst, mögel och bakterier växer samtidigt (Obrig et al 1971).

Det finns andra substrat som är lämpliga för detektering av ölskadliga bakterier, flera nämns i EBC och bland dessa finns Raka-Ray, NBB och VLB-S7-S. De har olika positiva egenskaper, till exempel visar NBB och VLB färgomslag när bakterier som producerar syra växer på dem och NBB kan användas som flytande medium.

### ***Identifiering av bakterier***

För att särskilja de olika organismerna används mikroskopering, enzymtest och ett test för att avgöra om organismen är grampositiv eller gramnegativ. Mikroskoperingen används för att snabbt skilja på organismernas morfologi och avgöra om de är bakterier, jäst eller mögel om man inte redan avgjort detta med en visuell inspektion av koloniernas utseende på agarplattan. I enzymtesten prövas förekomsten av två enzymer, katalas och cytokromoxidas.

Vid katalastest används en droppe 3 %-väteperoxid till en liten mängd av en bakteriekoloni. Vid ett positivt resultat bildas bubblor i vätskan då enzymet spjälkar molekylerna till syrgas och vatten. Oxidastestet, påvisandet av cytokromoxidas, görs med färdigpreparerade teststickor. För att avgöra vilken typ av cellvägg organismerna har, görs ett gramtest med 3%-kaliumhydroxid på samma sätt som med katalastestet. Blandningen rörs om med en tandpetare och om det bildas seiga trådar är bakterierna gramnegativa.

Förutom dessa tester, blir erfarenheten en viktig del av identifieringen av organismerna. Efter en tid upptäcks små skillnader i koloniernas utseende och utifrån dessa kan man snabbt dra en slutsats. Tveksamma fall testas givetvis för att få ett definitivt resultat, erfarenheten är svårt att överföra men bidrar till att jobbet kan göras snabbt.

## PCR-teknik

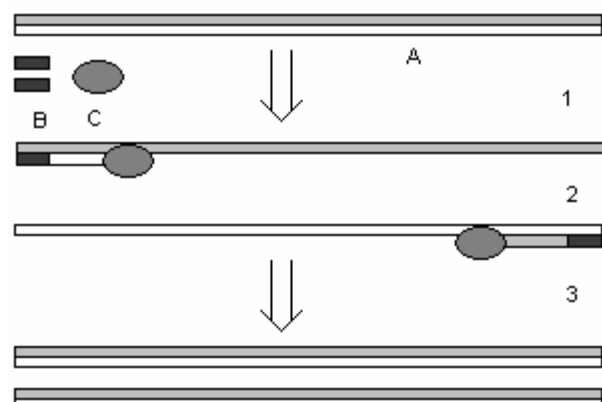
Polymerase chain reaction, PCR, är en annan teknik som kan användas för att identifiera bakterier. Metoden går ut på att utnyttja ett enzym: DNA-polymeras. Enzymet har egenskapen att det kan kopiera DNA och därför kan en ytterst liten mängd DNA göra det möjligt att identifiera organismen som bar på arvsmassan.

Genom att utnyttja enzym från bakterier som är termofila kan man få reaktionen att fungera. Enzymet som används kommer ursprungligen från bakterierna *Thermophilus aquaticus* (*Taq* polymerase) eller *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* polymerase). Dessa bakterier lever i mycket varma miljöer och har därför proteiner som inte denatureras vid höga temperaturer. *Pfu* polymerase tål något högre temperaturer än *Taq* polymerase, som är stabilt till 95°C. Dessutom har *Pfu* polymerase en funktion som gör att det DNA som bildas kan kontrolleras och eventuella felaktiga kopplingar mellan basparen kan repareras av enzymet. För att kunna utvinna tillräckligt mycket av de två enzymerna har generna som kodar för dessa klonats in i *Escherichia coli*.

För att reaktionen ska fungera behövs en liten mängd DNA, primers, DNA-polymeras och byggstenarna för DNA. Först delas DNA-strängen med värme, därefter sänks temperaturen och primers (som finns i stort överskott i förhållande till DNA-materialet) fäster vid DNA-strängarnas ändrar. Primers behövs för att DNA-polymeraset ska kunna hitta en startpunkt. Temperaturen justeras till 72°C där kopieringen sker. DNA-polymeraset fäster på primers och kompletterar de befintliga strängarna så att det till sist bildas två kopior av den ursprungliga DNA-strängen. Genom att repetera cykeln ett antal gånger, bildas en stor mängd kopior som sedan kan användas vid sekvensering eller smältanalys (figur 2). PCR-teknik används idag inom många olika områden, från olika forskningslaboratorier till undersökningar av mumier eller på brottsplatser (Madigan et. al. 2003).

För bryggeriindustrin finns analysinstrument som använder sig av PCR-teknik. Instrumenten kräver en snabb uppodling av bakterierna i provet, vilket kan ske i NBB-buljong. Efter själva PCR-reaktionen värms provet långsamt upp och vid en viss temperatur kommer DNA-strängarna att separera. Denna smälttemperatur beror på fördelningen av baspar, kopplingen mellan adenin och thymin har två vätebindningar och är svagare än kopplingen mellan cytosin och guanin, som har tre vätebindningar. Genom att använda två fluorescerande ämnen som kan binda till DNA-materialet kan instrumentet registrera fördelningen av baspar (Kiehne et.al. 2005). Ultraviolet ljus kan också användas för att avgöra när DNA-strängarna separerar, eftersom absorptionen av UV-ljus förändras (Madigan et. al.2003). Resultatet jämförs sedan med en resultatsmall som finns inprogrammerat i instrumentet. Ett tjugotal vanligt förekommande bakterier inom bryggeriindustrin kan identifieras med denna metod (Kiehne et.al. 2005).

Figur 2. Principen för kopiering av en gen (A). Efter uppvärmning (1) separerar strängarna och primers (B) kan fästa vid dessa. DNA-polymeraset (C) kan då bygga på strängen med nukleotider (2). Efter att DNA-polymeraset kompletterat hela strängen släpper den taget och kvar återstår två kopior av den första genen (3).



## **METODER**

### **Jämförelse mellan substrat**

De fyra substraten förbereddes på olika sätt, men alla behandlades likadant efteråt. Agarplattor gjöts och på dessa spreds 100 µl prov från jäs- och lagertankar och racklades ut. Vid varje provomgång användes 10 plattor av varje substrat. Plattorna inkuberades anaerobt i 28°C och observerades efter 3, 4 och 5 dygn. För att få en syrefri atmosfär användes Oxoid AnaeroGen. Efter 5 dygn gjordes katalas- och oxidastest, gramtest och mikroskopering för att avgöra vilken typ av bakterier som fanns i provet.

### ***Substratberedning***

#### Universal Beer Agar (UBA)

500 g med UBA-pulver (Oxoid, CM0651, Universal Beer Agar) blandas med 6 liter destillerat vatten, kokas sedan upp och får koka i 5 minuter. Därefter tillsätts 2 liter öl (ljst starköl) med 5,3 volymprocent alkohol (Norrlands Guld Export). Vätskan hålls sedan över till flaskor för att autoklaveras, 121°C, 15 minuter (Varioklav, H+P Labortechnik GmbH, Deutschland).

UBA med actidion/cycloheximid (UBA+a): cycloheximid (Sigma, C-7698, Cycloheximide) tillsätts vätskan, samtidigt som ölen tillsätts. Koncentrationen av cycloheximidlösningen är 1 mg cycloheximid/ml, slutkoncentrationen i substratet blir 10 µg cycloheximid/ml.

#### Nachweismedium Bierschädliche Bakterien (NBB)

300 g med NBB-pulver (Döhler, NBB-P, 2.04716.462) blandas med 2,5 liter destillerat vatten och 37,5 g bakteriologisk agar (Oxoid, LP0011, Agar bacteriological (Agar No.1)) och kokas i 5 minuter. Därefter tillsätts 2,5 liter öl (ljst starköl) med 5,3 volymprocent alkohol (Norrlands Guld Export). Vätskan hålls över i flaskor för att autoklaveras, 115°C, 10 minuter.

För att blanda till NBB i flytande form utförs samma procedur som ovan, med undantaget att agar utesluts. Autoklavering sker på samma sätt som ovan.

#### Raka Ray

150 g Raka Ray-pulver (Difco, 218671, Raka-Ray No. 3 Medium) blandas med 2 liter destillerat vatten, 20 ml polysorbate 80 (Vendico Chemical, Montanox 80 VG DF) tillsätts i vätskan som värms upp. Under uppvärmningen tillsätts 14 ml cycloheximidlösning (Sigma, C-7698, Cycloheximide) med koncentrationen 1 mg cycloheximid/ml, slutkoncentrationen blir 7µg cycloheximid/ml. Vätskan kokas 1 minut och hålls sedan över till flaskor för att autoklaveras, 121°C, 15 minuter.

#### VLB S7-S

Substratet levereras på flaskor och behöver bara värmas upp tills det smälter. VLB S7-S tillverkas av Versuchs- und Lehreranstalt für Brauerei in Berlin.

## Jämförelse av provvolymer

Universal Beer Agar användes för att undersöka om provvolymen påverkade odlingsresultatet. Substratet bereddes som vanligt och på plattorna spreds två provvolymer, 100 µl eller 500 µl. Vid varje provomgång användes 20 plattor till varje volym. Till proverna användes en liten mängd laktobakterier från en renodlad koloni av *Lactobacillus brevis*, dessa späddes med sterilt vatten till olika koncentrationer som skulle motsvara 10-1000 CFU/ml. Plattorna inkuberades anaerobt i 28°C i 5 dygn, därefter räknades kolonierna och katalas- och oxidastest, gramtest och mikroskopering gjordes för att säkerställa att det var samma typ av bakterier som fanns i provet från början.

## Förekommande bakteriearter

Fem olika bakterier insamlade under försöken med olika substrat isolerades med renstryk på NBB, renstryken upprepades två gånger. Plattorna inkuberades anaerobt i 28°C i 4-6 dygn, därefter testades bakterierna med katalas- oxidas- och gramtest, samt observerades i mikroskop. Tolv provrör fylldes med NBB-agar, varje bakterie ympades i två provrör som djupstick. Två provrör ympades inte och var nollprover. Proceduren med djupstick upprepades en månad senare. Provrören inkuberades anaerobt i 28°C i 3-4 dygn. Därefter förvarades de mörkt i normal atmosfär i 20°C.

Bakterierna odlades upp på agarplattor med NBB-agar. Bakterier från djupsticken togs upp och ympades på 20 plattor. Dessa inkuberades anaerobt i två olika temperaturer, hälften i 30°C och hälften i 37°C i två dygn.

En koloni från vardera av de odlade bakterierna plockades upp och sedan följdes instruktionerna DNeasy® Tissue Handbook (Qiagen group 2004). Bakteriernas DNA gjordes tillgängligt och renades inför följande PCR. Till reaktionen används Ready-To-Go PCR Beads, som är PCR-provrör som innehåller de flesta komponenter för PCR. Till provrören tillsattes: 0,5 µl DNA-material, 1 µl 16 ss primer, 1 µl 16 sr primer (båda med koncentrationen 10 pmol/µl) och 22,5 µl H<sub>2</sub>O. PCR-programmet som användes var följande: 30\*(94°C, 30 s; 49°C, 30 s; 72°C, 4 min); 72°C, 10 min. Därefter kylde provrören ner till 4°C och förvarades i kylskåp. Sekvenseringen skedde på Rudbeckslaboratoriet i Uppsala.

## RESULTAT

### Jämförelse mellan substrat

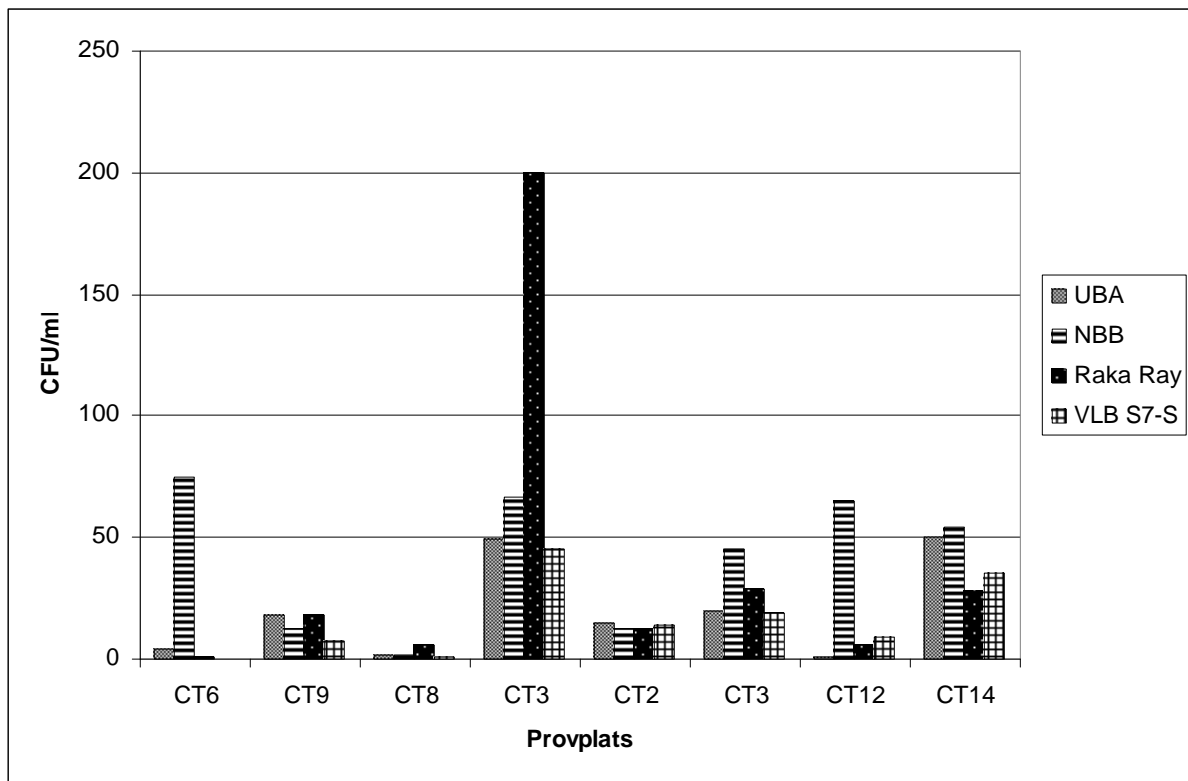
Utvärderingen av substraten gjordes genom att ta prover från jäs- och lagertankar efter 3-5, respektive 5-8 dygn efter att ölet hade fyllts på i respektive tank. De tankar som användes var så kallade Combitankar, som används både för jäsning och för lagring. Provkranarna går att göra rent med CIP (Cleaning In Place) och sköljs kontinuerligt med vatten. Risken för att få felaktiga resultat på grund av eventuella infektioner i rör, kranar och andra detaljer minskas därmed. Omsättningen av öl i tankarna är stor och ger möjlighet till många provtillfällen.

Totalt gjordes 7 försök med jästtanksprover och 9 försök med prover från lagertankar. På grund av en alltför stor provvolym ändrades metoden under försöket, från att använda 500 µl prov till 100 µl prov. Detta innebär att 1 jästtanksprov och 2 lagertanksprover faller bort. Eftersom det inte alltid finns infektioner i ölet saknas det data för de kvarvarande försöken, 3 jästtanksprover och 2 lagertanksprover visade inga kolonier. Totalt finns data från 8 försök som har behandlats. Vissa värden från dessa försök avviker avsevärt och bör därför undantas. Nedan i tabell 4, visas odlingsresultaten från försöken efter 5 dygns inkubation.

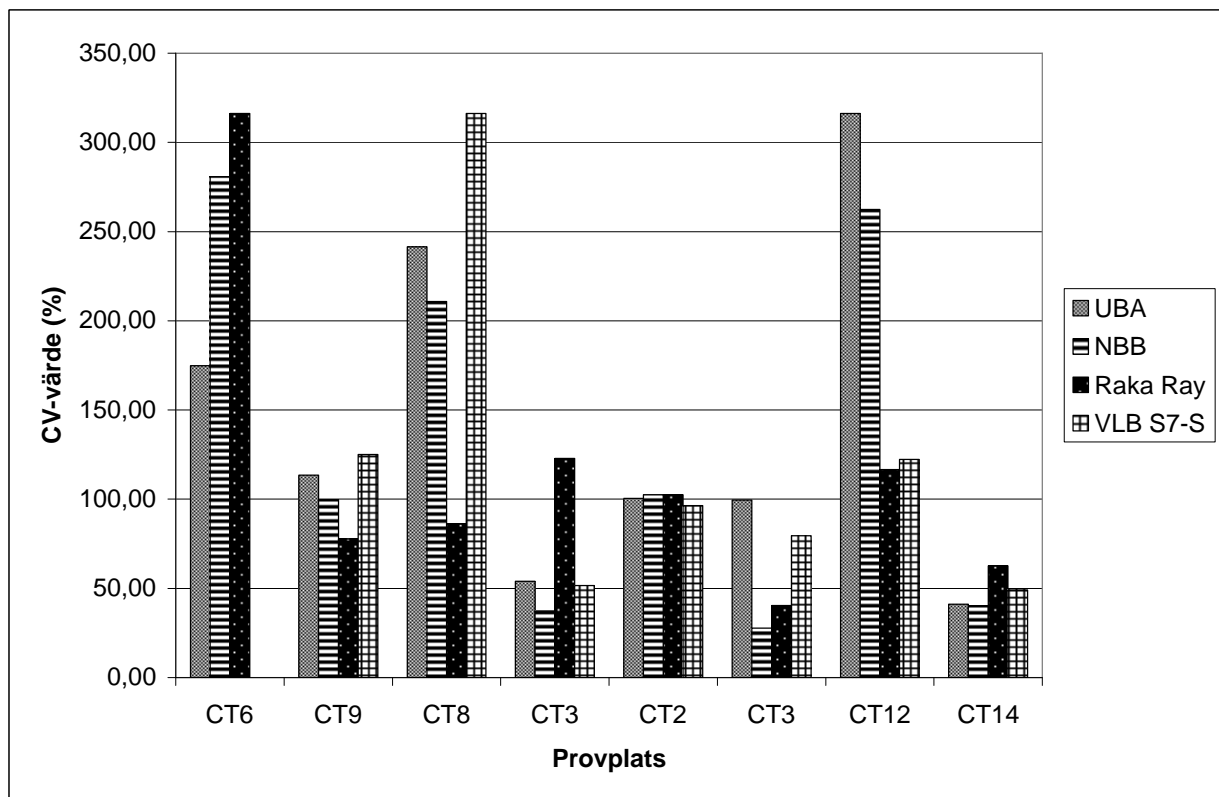
Tabell 4. Resultat av prover från jäs- och lagertankar, CFU/ml, värden inom parentes är starkt avvikande.

Provkälla	Tanknr.	UBA+a	NBB	Raka Ray	VLB S7-S
Jästtankar	CT6	4	(75)	1	0
	CT9	18	12	18	7
	CT8	2	2	6	1
Lagertankar	CT3	49	67	(200)	45
	CT2	15	12	12	14
	CT3	20	45	29	19
	CT12	1	(65)	6	9
	CT14	50	54	28	35

Dock är standardavvikelseerna inom varje försök så stora, att en jämförelse är svår att göra. Variationskoefficienten (CV) är ett mått på hur stor standardavvikelsen är av medelvärdet. Ett litet värde på CV betyder att spridningen av proverna runt medelvärdet är liten. För att jämföra försöken visas medelvärdet för varje försöksomgång i figur 3. Vid vissa punkter sammanfaller medelvärdena för de olika substraten, men det finns också stora variationer. Figur 4 visar hur variationskoefficienten ser ut hos de fyra substraten vid varje provomgång. Höga värden indikerar att spridningen runt medelvärdet är stor. Detta betyder att det finns en stor osäkerhet om hur väl medelvärdet representerar den verkliga förekomsten av ölförstörande bakterier i proverna.



Figur 3. Jämförelse av medelvärdena hos de fyra substraten vid försöken, de tre första resultaten är från jästanksprover, övriga är lagertanksprover.



Figur 4. Jämförelse av variationskoefficienten hos de fyra substraten vid försöken, de tre första resultaten är från jästanksprover, övriga är lagertanksprover.

## Jämförelse av provvolymer

De inledande försöken visade en stor variation inom proverna, för att undersöka detta närmare och för att se om själva provvolymen påverkade resultatet gjordes en noggrannare studie av detta. Totalt gjordes fem serier med bakterielösningar av olika koncentration. Data som insamlades under försöken har behandlats statistiskt med Minitab 14. För att undersöka om det fanns någon signifikant skillnad mellan provvolymerna gjordes ett dubbelsidigt t-test för var och en av de fem provgrupperna. Signifikansnivån sattes till 99 %, det betyder att det finns en statistiskt signifikant skillnad om sannolikhetsvärdet (p-värdet) är mindre än 0,01. I tabell 5 nedan visas resultaten från den statistiska analysen.

Tabell 5. Jämförelse mellan två olika provvolymer, t-testet prövar om det finns någon sannolikhet att de olika resultaten ändå kan härröra ur ett prov med samma koncentration (CFU/ml). P-värden mindre än 0,01 visar att provvolymen påverkar resultatet.

Provgrupp	Koncentration av bakterier i prover		p-värde	Frihetsgrader (n-1)
	100 µl-prov (CFU/ml)	500 µl-prov (CFU/ml)		
1	42	11	0,00	38
2	3486	750	0,00	38
3	506	156	0,00	38
4	254	40	0,00	38
5	47	17	0,001	38

Eftersom den ursprungliga koncentrationen av bakterier var densamma för båda provvolymerna i varje provomgång, visar resultaten att provvolymen påverkar de uppmätta värdena. Försöken med en provvolym på 500 µl visar endast 16-36 % av kolonierna jämfört med motsvarande försök med 100 µl provvolym, se tabell 6 nedan.

Tabell 6. Andel av beräknat medelvärde för 500 µl-prov jämfört med 100 µl-prov i provgrupperna.

Provgrupp	Medelvärde (CFU/ml)		Andel (%)
	100 µl-prov	500 µl-prov	
1	42	11	26
2	3486	750	22
3	506	156	31
4	254	40	16
5	47	17	36

Variationskoefficienten (CV) för proverna varierar till viss del beroende på vilken koncentration bakterielösningen har. En hög koncentration (provgrupp 2, 3 och 4) gör att CV blir mindre för 100 µl-proverna än för 500 µl-proverna. Låga bakteriekoncentrationer (provgrupp 1 och 5) gör att 500 µl-proverna får ett bättre CV-värde. Dock är alla värden på CV höga, vilket visar att det finns en stor spridning av resultatet inom varje grupp. Tabell 7 visar standardavvikelse och variationskoefficient.



Tabell 7. Medelvärde, standardavvikelse och variationskoefficient för provvolymerna i samtliga provgrupper.

Provgrupp	Provvolym	Medelvärde (CFU/ml)	Standardavvikelse	CV (%)
1	100 µl	42	23,75	56,6
1	500 µl	10,9	4,33	39,7
2	100 µl	3486	301,30	8,6
2	500 µl	749,5	215,05	28,7
3	100 µl	506	117,22	23,2
3	500 µl	156,1	47,81	30,6
4	100 µl	253,5	66,12	26,1
4	500 µl	40,1	16,70	41,6
5	100 µl	47	35,26	75,0
5	500 µl	16,5	7,28	44,1

### Förekommande bakteriearter

Under försöken med de fyra olika substraten, isolerades fem till synes olika bakteriearter. Skillnaden hos de olika bakterierna var främst deras morfologi och hur de reagerade vid katalastestet. Efter att ha observerat bakteriernas morfologi och ovan nämnda tester, renströks bakterierna två gånger på NBB. Organismernas egenskaper visas i tabell 8. Därefter förbereddes djupstick i provrör med NBB för att kunna förvara organismerna en längre tid, för att senare transporteras till Genetikcentrum på SLU, Uppsala

Tabell 8. Ursprung och egenskaper hos fem renodlade bakterier från ölprocessen.

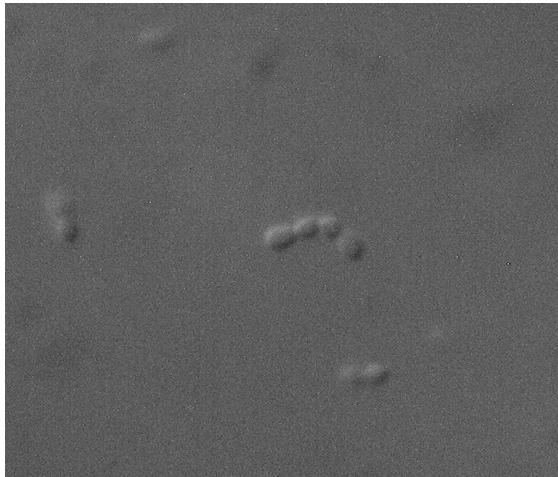
Organism	Ursprung	Morfologi	Katalas	Oxidas	Gram
1	Jästank	Kocker, klumpar	-	-	+
2	Jästank	Kocker, kedjor, parvis	+	-	+
3	Jästank	Kocker, parvis	-	-	+
4	Lagertank	Stavar, mest korta	-	-	+
5	Jästank	Stavar, krokiga, smala	-	-	+

Av de fem olika bakterierna kunde fyra odlas upp på NBB-plattorna, medan den femte inte växte. Denna kompletterades med samma metod vid ett senare tillfälle. De övriga bakterierna växte alla vid 28°C men *Lb. oligofermentans* växte inte vid 37°C. DNA-material från organismerna isolerades och sekvenserades på Rudbeckslaboratoriet. Sekvenserna prövades på National Center of Biotechnology Information (NCBI) på Internet, resultaten visas i tabell 9.

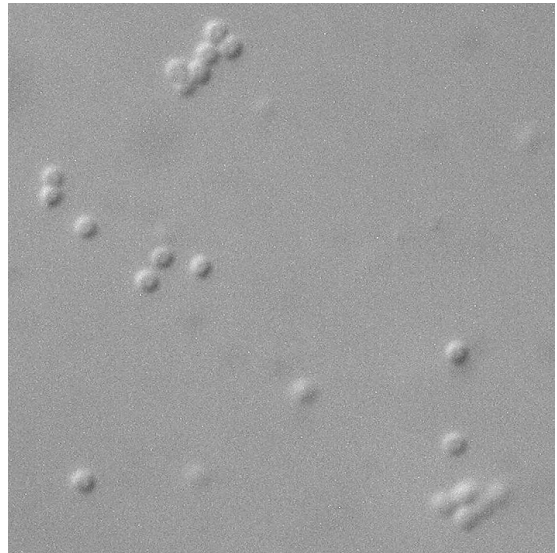
Tabell 9. Identifierade organismer och deras tillväxt vid olika temperaturer.

Organism	Trolig bakterie	Växt vid 28°C	Växt vid 37°C
1	<i>Pediococcus damnosus</i>	Ja	-
2	<i>Staphylococcus pasteurii</i> eller <i>warneri</i>	Ja	Ja
3	<i>Lactococcus lactis</i>	Ja	Ja
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	Ja	Ja
5	<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	Ja	Nej

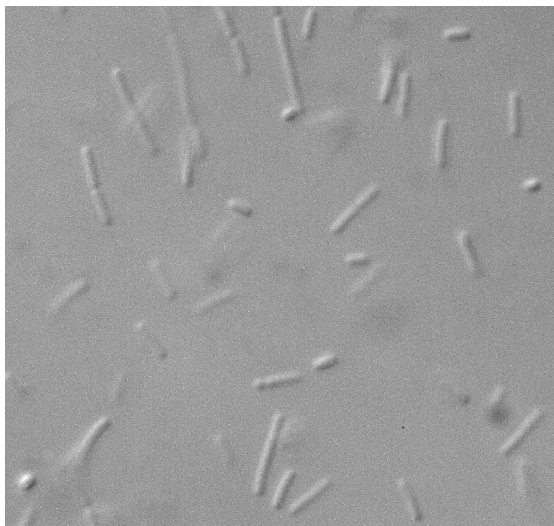
Bakterierna fotograferades genom ett mikroskop, bilderna presenteras i figur 5-8. Bilderna har något olika skala för att kunna visa så tydliga bilder av bakterierna som möjligt, för mer exakta storleksförhållanden, se stycket "Förekommande bakteriearter" i diskussionsdelen.



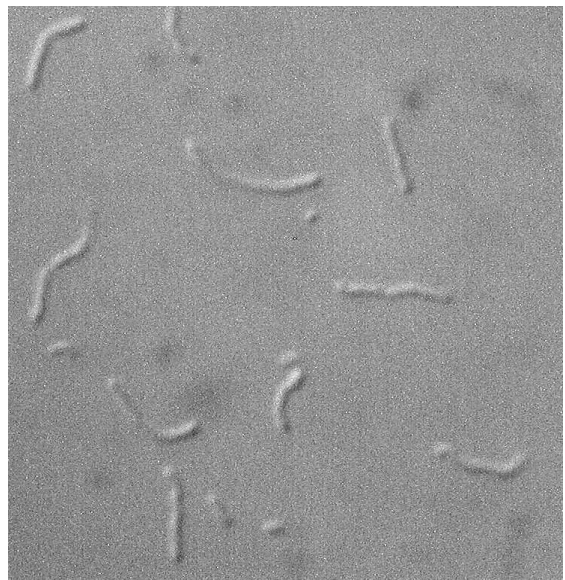
Figur 5. *Lactococcus lactis*, på bilden syns den typiska korta kedjan, samt parvisa celler.



Figur 6. *Staphylococcus warneri/pasteuri*, cellerna finns enskilda, i par och i klumpar.



Figur 7. *Lactobacillus brevis*. Cellernas längd varierar, några stavar sitter ihop.



Figur 8. *Lactobacillus oligofermentans*. Stavarna är mer krokiga jämfört med *L. brevis*.

## DISKUSSION

Denna diskussion är, liksom resultatdelen, indelad i tre delar där metoderna och resultaten, samt betydelsen av dessa, granskas och diskuteras. I slutet av diskussion finns synpunkter som kan användas vid framtida studier eller som grund för ändringar vid provtagning och hantering av mikrobiologiska prover.

### Jämförelse mellan substrat

#### *Metod och resultat*

Resultaten från försöken i denna del av studien har inte kunnat användas på ett tillfredsställande sätt. Detta beror på att proverna som användes inte går att jämföra på något praktiskt sätt. Metoden gick ut på att ta prover från produktionen, därmed skulle de bakterier som fanns på bryggeriet, det vill säga mikrofloran, kunna observeras på de olika substraten. Samtidigt så innebär en sådan provtagning stora variationer i antalet bakterier/ml och av vilken bakterieart som finns just då. Problemet uppstod även därför att alla prover inte innehöll några bakterier utan var fria från infektioner, något som i sig är positivt. Ovanstående nackdelar gjorde att metoden blev ineffektiv och att jämförelser blev svåra att göra.

Figur 3 och 4 ger en bild över skillnaderna hos de olika substraten, och även fast olikheter finns, så är det förmodligen på grund av de stora variationerna inom varje provgrupp. Även om extremvärden inom varje grupp tas bort, kvarstår att spridningen är mycket stor. Därför kan inget av substraten sägas vara bättre än något av de andra. Det som återstår är att jämföra andra aspekter, som ekonomiska eller arbetsmässiga fördelar.

Det substrat som krävde minst arbete var VLB S7-S, som levererades färdigt i flaskor, dock är priset relativt högt för detta substrat. Substratet gav dessutom färgomslag, vilket underlättar upptäckten av mjölksyrabakterier. Raka Ray behöver dels en tillsats av cycloheximid, dels en tillsats av polysorbat 80 samtidigt som det är dyrare än UBA. NBB har vissa fördelar i och med att det visar ett färgomslag och endast agar behöver tillsättas för att göra fast medium, samtidigt är det dyrare än UBA. Det substrat som används idag är UBA, som liksom de övriga substraten både har för- och nackdelar. Nackdelen är främst att man behöver hantera cycloheximid (som är cancerogent), samtidigt har det fördelen att kunna fungera som ett bra universalmedium på laboratoriet, till skillnad från NBB, som bara skulle kunna användas för bakterieodlingar. Eftersom UBA är enkelt och beprövat, är också priset lägre än för de övriga substraten. Substraten hämmade förekomsten av jäst lika bra, det fanns aldrig några kolonier med jäst på agarplattorna.

Som en sammanfattning kan sägas att samtliga ovanstående substrat skulle fungera bra att använda. För att välja något av dem måste en avvägning göras om de fördelar som finns är tillräckliga för att berättiga det högre priset. Därför anser jag att man bör behålla UBA tills det visar sig att det finns ett klart bättre alternativ.

#### *Förslag till förändringar*

För att göra en bättre jämförelse mellan substraten behövs en mer standardiserad metod som fortfarande använder bryggeriets mikroflora. En sådan metod kan gå ut på att göra renodlingar av förekommande bakterier, som man misstänker vara av olika arter. Sedan kan spädningar med bakterier göras för att sedan spridas på plattor med olika substrat. Genom att testa en art i

taget på samtliga substrat skulle man kunna jämföra hur bra varje substrat passar och sedan välja det substrat som antingen är bäst eller ger den bästa kompromissen.

## **Jämförelse av provvolym**

### ***Metod och resultat***

Resultaten som framkom under försöken var lätta att tolka och de var entydiga, provvolymen har en stor påverkan av det resultat (CFU/ml) som fås när plattan läses av. Det är främst mediets förmåga att absorbera vätskan i provet som utgör problemet. En liten mängd vätska (100 µl) absorberas snabbt och samtliga mikrober får en fast yta att fästa vid. En större mängd vätska ( $\geq 500$  µl) kan inte absorberas snabbt, om plattorna får stå och torka kan problemet överbryggas, men tiden för ett sådant förfarande finns inte alltid. Den stora skillnaden mellan de två provserierna, där en provvolym på 500 µl visar 16-35 % av kolonierna jämfört med en provvolym på 100 µl, gör att en förändring är nödvändig.

Jag anser att förändringarna bör innebära att man använder en provvolym på 100 µl för de prover som sprids på medium i petriplattor. Gränsvärden för dessa prover måste revideras för att bättre passa metodens känslighet.

### ***Ytterligare studier***

En litet prov ger större osäkerhet kring hur nära det egentliga värdet man ligger, därför är en stor provvolym önskvärd. För att gå djupare in i frågan, kan man undersöka hur stor provvolym som är möjlig. Resultatet visar att 500 µl är för mycket, men säger inget om 200 eller 300 µl skulle vara genomförbart. Samtidigt skulle man kunna experimentera med medium där extra agar tillsats för att se om vätskan i provet absorberas snabbare.

## **Förekommande bakteriearter**

### ***Metod och resultat***

De resultat som uppnåddes genom PCR-teknik och följande sekvensering visar att det relativt lätt går att identifiera flera olika arter av bakterier på bryggeriet. Metoden som användes är anpassad för forskning och laborativt arbete i mindre skala, därför kan man identifiera väldigt många olika arter. De instrument för realtids-PCR som finns på marknaden är begränsade i och med de bara identifierar de vanligaste ölförstörande bakterierna. Samtidigt är deras syfte att arbeta med hög kapacitet och snabbt ge ett korrekt svar.

Resultaten av detta försök återspeglar till viss del bryggeriets mikroflora, det förekommer tre bakteriearter som brukar omnämnas i litteraturen som vanliga ölförstörare. Samtidigt finns det två andra bakteriearter som inte har nämnts alls i samband med detta. Anledningen till att de inte omnämns kan vara att inte särskilt mycket forskning har utförts för att finna alla bakterier som kan finnas på bryggerier. Samtidigt så är mikrofloran annorlunda på varje bryggeri, det är därför svårt att få en samlad bild av de bakterier som skulle kunna finnas. I följande stycken beskrivs de fem bakteriearterna kortfattat för att ge en liten inblick i mikrofloran på bryggeriet.

### ***Lactobacillus brevis***

Denna bakterie nämns i flera studier och den är bland de vanligast förekommande arterna av *Lactobacillus* på bryggerier. Problemen som den orsakar är, liksom övriga ölförstörande bakterier, en försurning av produkten i samband med att den fermenterar sockerarter. Dessutom kan nämnas att den kan fermentera både dextrin och stärkelse, något som ytterligare förvärrar skadorna på produkten (Jespersen och Jakobsen 1996). Bakterien används även inom mejeriindustrin, där dess egenskaper utnyttjas vid tillverkning av syrade mjölkprodukter som exempelvis kefir (Walstra et. al. 2006).

Det är inte förvånande att *Lactobacillus brevis* hittas på bryggeriet, dess förmåga att fermentera stärkelse och dextrin utöver de vanliga sockerarterna, gör att den trivs bra på ett bryggeri. Just den här bakterien hittades i provet från en lagertank, men förmodligen förekommer den överallt där det finns näring som den kan utnyttja.

### ***Lactobacillus oligofermentans***

De första fynden av denna bakterie gjordes så sent som i augusti 2005 i samband med en finsk studie av färsk och marinerad kyckling, förpackad i modifierad atmosfär. *Lactobacillus oligofermentans* hittades då i marinerad kyckling. Den ingår i en grupp av bakterier inom släktet *Lactobacillus* som i huvudsak fermenterar pentoser. Den använder sig främst av sockerarterna ribos, L-arabinos och D-xylos, medan glukos och maltos inte fermenteras i lika stor utsträckning. Bakterien är stavformad med rundade ändar, längden varierade mellan 5 och 27 µm, bredden var mellan 0,8 och 3,1 µm. Vid försöken såg man tillväxt vid 4°C och god tillväxt vid 15°C. Vid 37°C syntes ingen tillväxt av bakterien (Koort et. al. 2005).

*Lactobacillus oligofermentans* hittades i prover från en jästank, den verkar trivas bra på både UBA och NBB och visar god tillväxt vid 28°C. Den morfologi som observerades, var annorlunda jämfört med andra *Lactobacillus* då stavarna var smalare och krokigare. Bakteriens krav på näringsämnen kan uppfyllas i miljön på bryggeriet, dessutom kan den utnyttja andra sockerarter än de favoriserade och kan därmed överleva.

### ***Lactococcus lactis***

Den här arten utgör en viktig del inom tillverkning av fermenterade mjölkprodukter. Där vill man utnyttja bakteriens förmåga att fermentera laktos till mjölksyra (laktat) för att på så sätt ändra mjölkens egenskaper. Förändringarna leder till ändrad konsistens, smak och ger längre hållbarhet, då andra mikroorganismer har svårt att leva i den sura miljön. Vid tillverkningen av messmör används flera underarter av *Lactococcus lactis*, varav en kan producera diacetyl (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*).

Bakterien växer bra även vid så låga temperaturer som 10°C, därför kan den tillväxa under både jäsning och lagring på bryggeriet (Walstra et. al. 2006). De växer som kocker i kortare kedjor och kan därför särskiljas från *Pediococcus* och *Staphylococcus* (Madigan et. al. 2003). Dess positiva effekter inom mejeriindustrin får motsatt verkan på bryggeriet. Bakteriernas fermentation av enklare sockerarter gör att ölet försuras och försämras.

### ***Pediococcus damnosus***

Av arterna i släktet *Pediococcus*, finns det tre potentiella ölförstörare. Av dessa är *Pediococcus damnosus* den som orsakar störst problem. Den kan överleva under svårare förhållanden än de övriga arterna i släktet, tillväxten kan ske även om pH-värdet understiger 4,2 eller om alkoholhalten är relativt hög. Dessutom visar *P. damnosus* resistens mot humlens iso- $\alpha$ -syror (Jespersen och Jakobsen 1996).

*P. damnosus* växer som kocker i par eller i klumpar om fyra celler (Madigan et. al. 2003). Den växer anaerobt och producerar diacetyl som kan förändra ölets smak (Sakamoto och Konings 2003). Arterna inom släktet *Pediococcus* används inom livsmedelsindustrin för framställning av olika fermenterade produkter (Adams och Moss 2000).

### ***Staphylococcus pasteurii* eller *warneri***

Metoden som användes kunde inte ge tillräckligt mycket information för att kunna separera de här två arterna. En forskargrupp har däremot testat flera snarlika arter ur släktet *Staphylococcus* och funnit en metod för att identifiera dem (Chesneau et. al. 1993). Fenotypiskt kan de två arterna inte särskiljas på ett säkert sätt, istället utnyttjas DNA-teknik för ändamålet. *Staphylococcus pasteurii* och *warneri* är formade som kocker, 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  i diameter, de växer som enskilda celler, i par, tetraden eller i större klumpar. Vissa underarter kan bilda ett gult pigment som syns på kolonierna. De två arterna växer bra i temperaturer mellan 15-45°C och är katalaspositiva. Under anaeroba förhållanden fermenterar bakterierna främst glukos till L- och D-laktat (Chesneau et. al. 1993).

Arter inom *Staphylococcus* kan vara patogena för människor (*Staphylococcus aureus*) men det finns även gott om arter som inte har någon negativ effekt för människan. De två arterna i det här fallet verkar utnyttja förekomsten av glukos inom bryggeriets olika delar och eftersom de är fakultativt aeroba, kan de klara sig i miljöer utan tillgång till syre (Madigan et. al. 2003).

### ***Ytterligare studier***

Eftersom selekteringen av organismer var rent subjektiv och de organismer som förekom ofta eller som verkade annorlunda valdes ut, kan man inte vara säker på hur väl fynden representerar mikrofloran på bryggeriet. För att få en mer detaljerad bild av hur denna ser ut, måste en stor mängd bakterier testas för att skaffa en tydlig bild av mikrofloras sammansättning. Dock är en sådan studie både tidskrävande och av mer akademiskt värde än nyttig för den vanliga produktionen på bryggeriet.

## Slutsats

Som avslutning kan sägas att två saker kan förändras, som kan komma till nytta för det laborativa arbetet och för bryggeriet som helhet. Jag anser att följande förändringar ska göras:

- Ändra provvolymen från 500 µl till 100 µl.
- Införskaffa ett instrument för realtids-PCR.

Av dessa två åtgärder är den förstnämnda viktigast, detta har motiverats i diskussion och resultaten är entydiga, en alltför stor provvolym är inte önskvärd.

Den andra förändringen är mer långsiktig. För att kunna minska tiden från provtagning till avläsning av resultatet finns det inget annat praktiskt alternativ. Idag tar det cirka 5 dygn innan provsvaren finns till hands och åtgärder kan vidtas. Med ett instrument som klarar av realtids-PCR tar det endast 2 dygn. Därmed kan man spara både arbetsbörda för laboratoriet och inom ölprocessen som helhet. Genom snabbare beslut gör man även ekonomiska vinster som kommer till gagn för hela företaget. Instrumentet är inte en lösning eller ett motmedel mot bakterieinfektioner, utan ett verktyg för att få en bättre bild av situationen.

## REFERENSER

- Adams, M.R., Moss, M.O. 2000. Food Microbiology, second edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Thomas Graham House.
- Bascomb, S., Manafi, M. 1998. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic gram-positive cocci. Clinical microbiology reviews, April 1998, p. 318-340.
- Bejram, B. 1998. Bryggeriboken. Bara, Bejram och Partner. Kristianstad, Kristianstads boktryckeri AB.
- Chesneau, O., Morvan, A., Grimont, F., Labischinski, H., El Solh, N. 1993. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal and food specimens. International journal of systematic bacteriology, April 1993, p. 237-244.
- Fennema, O.R. 1996. Food chemistry, third edition. New York, Marcel Dekker, Incorporated.
- Glover, B. 1997. The world encyclopedia of beer. London, Anness Publishing Limited.
- Haikara, A. 1984. Beer spoilage organisms – occurrence and detection with particular reference to a new genus *Pectinatus*. Espoo, Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT, Statens tekniska forskningscentral, Finland).
- Hoseney, R.C. 1998. Principles of cereal science and technology, second edition. St. Paul, American Association of Cereal Chemists, Incorporated.
- Jackson, M. 1998. Stora boken om öl. London, Dorling Kindersley Limited.
- Jespersen, L., Jakobsen, M. 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. International journal of food microbiology, 33 (1996) 139-155.
- Kennedy, A. 2001. Analytica-Microbiologica-EBC. Nürnberg, Fachverlag Hans Carl.
- Kiehne, M., Grönwald, C., Chevalier, F. 2005. Detection and identification of beer-spoilage bacteria using real-time polymerase chain reaction. MBAA TQ, vol 42. no.3, 2005, pp. 214-218.
- Koort, J., Murros, A., Coeney, T., Eerola, S., Vandamme, P., Sukura, A., Björkroth, J. 2005. *Lactobacillus oligofermentans* sp. nov., associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged poultry products. Applied and environmental microbiology, Aug. 2005, p. 4400-4406.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. Brock Microbiology of Microorganisms, tenth edition. Upper Saddle River, Pearson Education Incorporated.



- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L., Hardesty, B. 1971. Mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulate ribosomes. *The Journal of biological chemistry*, vol. 246, no 1, Issue of January 10, p. 174-181, 1971.
- Qiagen group, March 2004. DNeasy® Tissue Handbook. Qiagen incorporated, Valencia, California. Appendix E, pp. 33, pp. 19-20, step 4 to 8.
- Sakamoto, K., Konings, W.N. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology* 89:105-124.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. 2006. *Dairy science and technology*, second edition. Boca Raton, Taylor and Francis Group.