

Z výzkumu a praxe

RYCHLÉ METODY STANOVENÍ KONTAMINACE PIVA

Ing. IDA HOLLEROVÁ, Pivovarský ústav Praha, VÚPS a.s.

Klíčová slova: pivo, kontaminace, mikrobiologické stanovení

1. ÚVOD

Ani koncem minulého století nebyla podceňována mikrobiologická čistota v průběhu výroby piva, a čištění a dezinfekce provozu byla věnována již tenkrát velká pozornost [1]. Nynější celosvětový trend ke zvyšování výstavu piva v jednotlivých pivovarech zvyšuje logicky také požadavky na zavádění nových technologických postupů, což s sebou automaticky přináší i potřebu průběžné a současně i rychlé kontroly nejen finálního výrobku. Kontrola kvality používaných surovin a meziproduktů v průběhu výroby je naprosto nezbytná a je nutné znát její výsledky co nejdříve.

Pivo našťastí není příliš příznivým prostředím pro přežívání či dokonce pomnožování mikroorganismů. Ve finálním výrobku je již pro ně většinou příliš málo esenciálních živin a zvláště pak nízké pH, přítomnost ethanolu, hořkých chmelových látek a CO_2 potlačují rozvoj kontaminace, přicházející v pivovaru ať již jako primární nebo sekundární [2, 3]. To ovšem neplatí pro všechny stupně výrobního procesu. Tam se může kontaminace vyskytovat v daleko větším měřítku a způsobit leckdy velmi těžce napravitelné škody.

Zatímco chemická analytická kontrola používá již mnoho moderních postupů, umožňujících mnohdy téměř okamžité posouzení jakosti testovaného vzorku, doba průkazu a stanovení v oblasti mikrobiologické kontroly většinou zůstává neustále časově náročná.

2. STANDARDNÍ METODY BIOLOGICKÉ KONTROLY

K tradičním metodám stanovení kontaminace patří především přímé pozorování mikroskopem a kulturační techniky. Pro dostačující zařazení kontaminantů však tyto metody nestačí. K hrubému určení kontaminace se používají selektivní a diagnostická média s inhibitory jednotlivých skupin mikroorganismů přidávanými do živné půdy. Pro bližší určení se používají další jednotlivé testy, které mohou pomoci kontaminaci zařadit [4, 5, 6]. Jsou to především: Gramovo barvení, zkvašování laktózy a testy – KOH, katalázový, aminopeptidázový, oxidázový a benzidinový. K hrubému rozeznání stupně nebezpečnosti nalezených izolátů tyto metody většinou postačují, ale předpokládají primární namnožení zkoumaného mikroorganismu, což opět vyžaduje další časovou prodlevu. Již samo používání selektivních půd a zavedení

membránové filtrace do mikrobiologického zkoušení velice urychlily biologickou kontrolu potravinářských provozů a jejich výrobků, ale mnoho mikrobiologů, zabývajících se problematikou kontroly kvality v pivovarském průmyslu, upírá svou pozornost k tzv. „rychlým metodám“ stanovení kontaminace, jichž bylo vyvíjeno a zdokonalováno v několika posledních desetiletích dosti velké množství.

3. RYCHLÉ METODY BIOLOGICKÉ KONTROLY

Rychlé metody stanovení kontaminace se mohou zařadit do jednotlivých kategorií různými způsoby. Rozdělí-li se podle principu a způsobu stanovení, dá se vytvořit následující přehled:

a) fyzikální metody

turbidimetrie
impedimetrie
radiometrie
mikrokolorimetrie
průtoková cytometrie

b) mikroskopické metody

počítání mikrokoloníí
epifluorescence
analýza obrazu

c) molekulárně – genetické metody

polyakrylamidová gelová elektroforéza
a chromatografie
hybridizační metoda
Protein Fingerprinting
Chromosome Fingerprinting (karyotypizace)
PCR (Polymerase Chain Reaction)

d) imunochemické metody

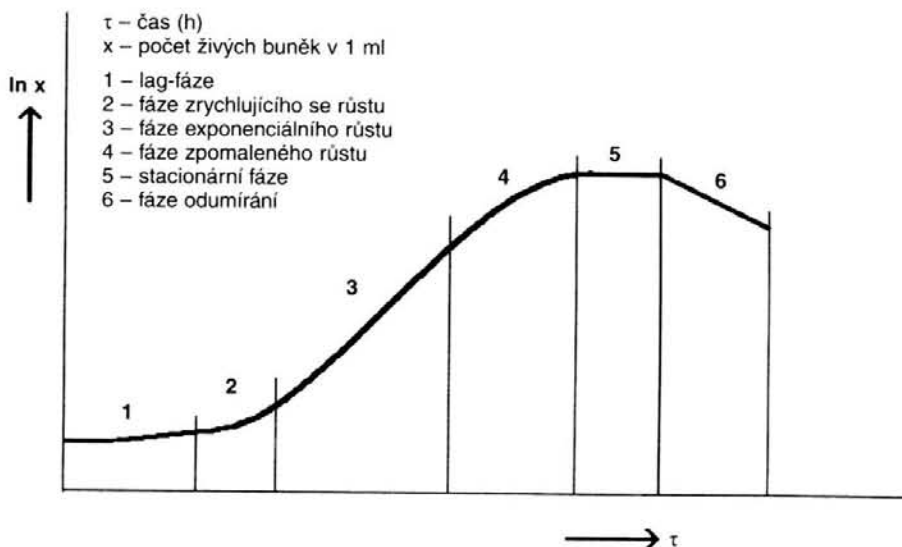
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

e) bioluminescence

3.1. Fyzikální metody

Tyto metody stanovení jsou většinou založeny na principu měření změn jednotlivých fyzikálních veličin, k nimž dochází v průběhu růstu mikroorganismů. Během tohoto růstu, graficky znázorněného klasickou Monodovou křivkou [6] (tab. 1), dochází k první měřitelné změně testované fyzikální veličiny na zlomu mezi lag-fází a exponenciální fází růstu. Naočkuje-li se zkoumaný vzorek do tekuté selektivní půdy, po určitém čase se změni hodnota měřené fyzikální veličiny.

Době, která uplyne od zaočkování vzorku do první měřitelné změny, se říká detekční čas a ten je nepřímo úměrný množství jedinců obsažených ve zkoumaném vzorku. V případě *turbidimetrie* se spektrofotometricky měří zvýšení zákalu, *impedimetrie* detekuje počátek růstu mikroorganismů na základě změn vodivosti růstového média. Malé množství tepla, uvolňující se při přechodu do exponenciální fáze růstu, se měří při metodě *mikrokolorimetrické*. Naopak při provádění *radiometrické* metody je detegován CO_2 , uvolňující se z radioaktivně značených substrátů. U všech těchto metod je v literatuře uváděna hodnota 105–106 KTJ/ml jako prahová hladina stanovení [3]. *Průtoková cytometrie* patří mezi metody přímého počítání buněk. Při ní je kapalina obsahující mikro-



Tab. 1 Monodova růstová křivka

organismy transportována tryskou rovnoměrnou rychlostí na místo, kde je ozářena laserovým paprskem. Intenzita světla se rozptýlí pod různým úhlem podle dopadu na procházející buňky a dává tak informaci nejen o počtu procházejících jedinců, ale i o jejich tvaru, velikosti, životaschopnosti a morfologii.

3.2. Mikroskopické metody

Tyto metody nacházejí použití především při přímých mikroskopických analýzách za pomoci rozličných selektivních fluorescenčních barviv či optických zjasňovačů [2, 3, 6, 7, 8]. Touto metodou se dají rozlišit prostým okem neviditelné *mikrokolonie*, které při velkém zvětšení je možno rozeznat někdy i o několik desítek hodin dříve, nežli by se daly rozeznat pouhým okem. Přímá *epifluorescenční filtrační* metoda umožňuje zjistit pod fluorescenčním mikroskopem množství jednotlivých buněk přítomných na membránovém filtru, přes nějž byl zakonzentrován určitý objem zkoumaného vzorku. Tyto velmi rychlé metody stanovení kontaminace v analyzovaném vzorku jsou ovšem velmi náročné pro pracovníka provádějícího vlastní stanovení, neboť jsou příliš únavné pro oči a tudíž rychle snižují jeho pozornost. V současné době s nesmírně pokročilým vývojem počítačové techniky je umožněno daleko širší využití těchto metod, a to pomocí *analýzy obrazu* [7, 8]. Ta je založena na spojení: kvalitní mikroskop, kamera s co nejlepší rozlišovací schopností, jednotka pro digitalizaci obrazu a počítač s obrazovkou, na níž je přenášén mnohokrát zvětšený analyzovaný obraz, což eliminuje chyby způsobené únavou obsluhy. Software, umožňující příslušné analýzy, je vyvinut v mnoha modifikacích a další varianty jsou vyvíjeny postupně, což je pro tyto způsoby stanovení kontaminace výhledově velmi optimistické.

3.3. Molekulárně-genetické metody

Polyakrylamidová gelová elektroforéza a chromatografie (PAGE) je uváděna v této publikaci jako první z molekulárně-genetických metod, ačkoliv se jedná o techniku, která se používá jako konečný rozlišovací krok u většiny ostatních metod této skupiny. Elektroforéza i chromatografie se používá podle potřeby buď jednorozměrná nebo dvourozměrná, vzorek je nanášen na gel s fluorescenčním barvivem a vyhodnocován pomocí počítače nebo analýzy obrazu [3, 6, 9, 10, 11, 12, 13].

Nanášeným vzorkem mohou být proteiny izolované z narostlých kolonií – metoda *Protein Finger Printing* [3, 6], izolovaná DNA – v případě *hybridizační* metody [3, 6, 14], anebo také přímo samotných chromozómů, jak je tomu u *karyotypizace* – *Chromosome Finger Printing* [3, 6, 14, 15]. Všechny tyto metody se používají především k dokonalému kvalitativnímu rozlišení jednotlivých mikroorganismů a jejich taxonomickému zařazování podle tzv. dendrogramů, sestavených dle jejich molekulárně-genetické příbuznosti.

Velkého rozvoje doznala v posledních letech metoda všeobecně známá pod názvem *PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Je to metoda, pomocí níž se na bázi DNA dají určit specifické genetické vlastnosti zkoumaného jedince. Stanovují se při ní různé délky fragmentu DNA, ohraničeného oblastmi se známým pořadím nukleotidovýchází. Tyto hranice se označí tzv. primery, (oligonukleotidy obsahující 20–30 nukleotidů). Takto ohraničený úsek DNA je následně kopírován v několika cyklech, přičemž se vždy v každém jednotlivém cyklu počet ohraničených segmentů zdvojnásobí. Tímto způsobem se získá dostatečné množství materiálu pro následnou gelovou elektroforézu. Ta umožňuje určení polymorfismu – rozdílnost délky úseků zkoumané DNA – specifického pro jednotlivé druhy mikroorganismů, ale třeba i jejich mutanty, kupříkladu při využití teplotního gradientu [3, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16].

Jistou modifikací této metody je metoda *RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*, při níž se používají k označení fragmentů DNA primery menších délek (asi 10 nukleotidů), komerčně lépe dosažitelné, které vyhledávají polymorfismy na všech místech zkoumané DNA, kde naleznou odpovídající frekvenci nukleotidů, tedy náhodně [3, 9, 15].

3.4. Imunochemické metody

Také imunochemické metody se v současné době stále více využívají pro průkazy mikroorganismů. Tyto metody jsou založeny na interakci mezi antigenem (analyt) a protilátkou (specifické činidlo). Antigenem může být samotný mikroorganismus, jeho část, nebo také enzym či toxin jím vylučovaný (například stanovení titru protilátek u klišťové boreliózy). *Enzymová imunoanalýza – ELISA* – (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) kupříkladu využívá k detekci antigenu protilátku značenou enzymem a analytické vyhodnocení se pak děje kolorimetrickým stanovením enzymu. Při vlastním stanovení se k původní protilátce, adsorbované na pevném nosiči přidá vzorek obsahující analyzované antigeny – bakterie, které se naváží na primární protilátku. Po vymytí přebytečného vzorku se přidá sekundární protilátka s enzymem. Tato sekundární protilátka se naváže na vázaný antigen a vytvoří s ním a s původní protilátkou tzv. sendvič. Vzniklá vazba se pak deteguje přidávkou selektivního, většinou fluorescenčního, barviva [3, 6, 7].

3.5. Bioluminescence

Mezi rychlé techniky detekce mikroorganismů se řadí také metody využívající chemi- a bioluminescenčních pochodů. Zakládají se na částečné přeměně chemické energie, která vzniká při oxido-redukčních reakcích, na energii světelnou. Pro detekci mikroorganismů se používá *bioluminescenční* metoda, která stanovuje ATP (adenosintrifosfát), obsažený v každé živé buňce, ať už jako zdroj energie, nebo jako produkt látkové výměny, zatímco v mrtvých buňkách

se nevyskytuje. Princip metody spočívá v tom, že chemickou reakcí uvolněný ATP reaguje za přítomnosti kyslíku a luciferázového činidla (směs luciferinu a luciferázy) za vzniku oxiluciferinu, AMP (adenosinmonofosfátu), CO_2 a emitovaného světla, fotometricky měřitelného při 560nm, jehož množství se vyjadřuje v RLU – relativních světelných jednotkách – [2,3, 6,7].

Tato elegantní metoda, schopná stanovit ve vzorku skutečně pouze živé buňky, může nalézt široké uplatnění při velmi rychlém zjišťování především úrovně sanitace. Řada firem vyrábí na tomto principu založené fotoluminescenční přístroje a soupravy ke stanovení přítomnosti biomasy, cenově poměrně dostupné. Drobnou nevýhodou této metody je ovšem to, že neumí rozlišit mezi bakteriálním a kvasničným ATP, což si následně většínu vyžaduje složitější přípravu vzorku a dvojitě stanovení, například stanovení celkového ATP a jeho stanovení po předchozím usmrcení kvasinek ve vzorku. Prahová detekční mez metody je v literatuře uváděna jako koncentrace 10^2 kvasničných a 10^3 bakteriálních buněk v 1 ml zkoumaného vzorku [17,18,19].

4. DISKUSE

Je možno předpokládat, že z tohoto stručného výčtu tzv. „rychlých metod“, metody molekulárně-genetické a imunochemické zůstanou doménou pouze základního výzkumu. Poměrně složitá příprava vzorku k vlastnímu stanovení a nutnost speciálního vybavení laboratoře je z běžné potravinářské praxe prozatím vylučují. Také zmiňované mikroskopické metody budou ještě nějakou dobu pro běžné pivovarské provozy komerčně nedostupné. Naproti tomu některé z fyzikálních metod (turbidimetrie, impedimetrie), by bylo možno v dohledné době do provozních laboratoří zavést. Ovšem kupříkladu bioluminescenční stanovení mikrobiologického znečištění v našich provozech může dosáhnout většího rozšíření, obzvláště při kontrole úrovně sanitace. Navíc tato metoda biologické kontroly má být zařazena mezi referenční metody v manuálu EBC Analytica Microbiologica II [20, 21].

5. ZÁVĚR

V současné době již nikdo z vedení potravinářských podniků nepochybuje o nutnosti kvalitní mikrobiologické kontroly, zvláště v souvislosti se schválením zákona o potravinách a zaváděním systému HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) pro zaručení nezávadnosti potravin. Ještě před schválením těchto zákonných norem mnohé podniky zaváděly při kontrole jakosti ISO normy řady 9000, poněvadž si uvědomovaly důležitost jakosti finálního výrobku. Ale že si tuto nutnost uvědomovali už i pivovarníci v minulém století, se potvrzuje v již citované publikaci „Pivovarský katechismus“ [1], kde se mimo jiné praví: „Každý sládek, který vyrábí mok pochybné ceny, pomáhá přivržencům prohibice, neboť vypěstovává v obecnstvu pijícím pivo vlastně lho-

stejnost k existenčnímu boji pivovarského průmyslu. Dobré, výživné a zdravé pivo si však žádný národ nedá vzíti.“

LITERATURA

- [1] LENSE, K.: Pivovarský katechismus, J. Jelen, Mělník, 1942, 6. vydání
- [2] SIMPSON, W. J.: Brew. Guardian **6**, 1991, s. 30
- [3] DOWHANICK, T. M.: Cerevisia Biotechnol. **20**, 1995, s. 40
- [4] SCHMIDT, H. J.: Brauwelt **133**, 1993, s. 142
- [5] TASCHAN, H.: Brauwelt **136**, 1996, s. 1014
- [6] ADAMS, M. R., MOSS, M. O.: Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995
- [7] An.: Brauwelt **136**, 1996, s. 1348
- [8] HUTTER, K. J.: Mschr. Brauwiss. **49**, 1996, s. 164
- [9] TSUCHIYA, Y.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **50**, 1992, č.2, s.64
- [10] TAGUCHI, H.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Brusel, 1995, s. 621
- [11] VOGESER, G.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Brusel, 1995, s. 629
- [12] TSUCHIYA, Y.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **52**, 1994, č.3, s. 95
- [13] VOGESER, G.: Brauwelt, **135**, 1995, s. 1635
- [14] XXV. výroční konference o kvasinkách 24.–26. 4. 1996, Smolenice
- [15] VOGEL R. F.: Molekulare Biotechnologie für die Brauwirtschaft Brauwelt, 10–11, 1996, s. 478
- [16] KRAUS, I.: Kvasny Prum. **42**, 1996, s.215
- [17] DAVIES, A. M.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Brusel, 1995, s. 637
- [18] DOWHANICK, T. M.: Proc. Eur. Brew. Chem. Congr., Brusel, 1995, s. 645
- [19] EGER, C.: Proc. Eur. Brew. Chem. Congr., Brusel, 1995, s. 653
- [20] EBC Analytica Microbiologica II. EBC Microbiology Group, 1992
- [21] KELLNER, V.: Kvasny Prum. **43**, 1997, s. 276

*Zpracováno podle přednášky
na XVII. PS dnech,
Frýdek-Místek
Do redakce došlo 19.1.1998*