

BACILLUS CEREUKSEN MÄÄRITTÄMINEN TEMPEN VALMISTUKSESSA



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka, Hämeenlinna

Kevät, 2021

Jouni Hiltunen

TIIVISTELMÄ

Bacillus cereus on hyvin tavallinen maaperän bakteeri, jota esiintyy yleisesti myös ruokatarvikkeissa. Suurina määrinä kasvaessaan se saattaa aiheuttaa oksennus- ja ripulityyppisiä ruokamyrkytyksiä. Itiöllisenä bakteerina *Bacillus cereus* kestää hyvin elintarvikeprosessien lämpökäsittelyjä, joten bakteerin hallintaan tarvitaan myös muita keinoja, kuten nopea jäähdytys, kylmäsäilytys ja raaka-aineiden puhtaus. *Bacilluksen* lisäksi myös *Clostridium*-suvussa on itiöllisiä ruokamyrkytysbakteereja, joiden torjunta pitää hallita.

Toimeksiantajana oli tammisaarelainen Oy Soya Ab Jalofoods, joka valmistaa tofua ja tempeä Raaseporissa. Tässä työssä keskityttiin tempenvalmistukseen. Kirjallisuuskatsauksen pohjalta käytiin läpi yleisimmät ruokamyrkytysbakteerit ja niiden merkitys tempeprosessissa. *Bacillus cereuksen* lisäksi *Clostridium botulinumin* todettiin olevan merkityksellinen ja vaativan erityisiä hallintakeinoja. Raaka-aineiden ja prosessin eri vaiheista otettujen näytteiden tutkimiseksi tarvittiin menetelmä, jolla näytteen *Bacillus cereus* -pitoisuus saadaan nopeasti määritettyä. Kirjallisten lähteiden avulla tutustuttiin neljään maljalaskentamenetelmään, joista Compact Dry -kuivamalja arvioitiin ominaisuuksiltaan sopivimmaksi. Papujen liotusveden happolisäyksen merkitystä selvitettiin pH-mittauksilla eri prosessivaiheissa ja höyrytyksen tehokkuutta itiöiden torjunnassa arvioitiin papujen lämpötilaa seuraamalla.

Työn tuloksena tempetehtaalle saatiin käyttöön menetelmä, jonka avulla reseptimuutosten ja uusien kehitettävien tuotteiden tuoteturvallisuutta voidaan edistää.

Avainsanat *Bacillus cereus*, tempe, Compact Dry

Sivut 28 sivua ja liite 1 sivu

Author Jouni Hiltunen

Year 2021

Subject Determination of *Bacillus cereus* in Tempeh Process

Supervisor Juha Isokangas

ABSTRACT

Bacillus cereus is a very common spore-forming bacterium in environment and foodstuffs. When growing in large numbers in food, it may cause an emetic intoxication or an infection in the small intestine. The spores of *Bacillus cereus* are very heat tolerant. In addition to heat treatments, also rapid cooling, cold storage and clean raw materials are needed to control the growth of the bacteria. In the genus *Clostridium* there are also spore forming species capable of causing foodborne diseases.

The commissioner of the thesis was Oy Soya Ab Jalofoods and this work focused on tempeh making. The most common foodborne disease-causing bacteria were explored based on a literature review and their occurrence in tempeh process was assessed. Both *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* were found to have significance. A rapid method for analyzing *Bacillus cereus* from process samples was needed. Four common plate-counting methods were compared based on a literature review. Compact Dry-plate was chosen and the testing started. The significance of adding acid to the soaking water of the beans was studied by measuring the pH in various stages of the process and the efficiency of the steaming was assessed by monitoring the temperature of the beans during the heat-treatment.

As an outcome of the study, a new tool for analyzing *B. cereus* was implemented. This will advance the quality and safety of new tempeh products.

Keywords *Bacillus cereus*, tempeh, Compact Dry

Pages 28 pages and appendix 1 page

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Fermentoidut elintarvikkeet	2
2.1	Tempe	2
2.2	Tempen raaka-aineet	3
2.3	Tempeprosessi	4
2.4	Tempen mikrobiologiset ja kemialliset muutokset	4
3	Ruokamyrkytysbakteerit	5
3.1	<i>Bacillus cereus</i>	6
3.2	<i>Clostridium botulinum</i>	8
3.3	<i>Clostridium perfringens</i>	10
3.4	EHEC-bakteeri	11
3.5	Kampylobakteerit	11
3.6	<i>Listeria monocytogenes</i>	12
3.7	Salmonella	12
3.8	<i>Shigella</i>	12
3.9	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.10	<i>Vibriot</i>	13
3.11	Yersiniabakteerit	14
4	Ruokamyrkytysbakteerit tempen valmistuksessa	14
5	<i>Bacillus cereus</i> -maljat	16
5.1	ISO-standardi	16
5.2	NMKL-standardi	17
5.3	Kromogeeninen agar	17
5.4	Compact Dry -kuivamalja	18
6	<i>Bacillus cereus</i> -määrittäminen Compact Dry -maljalla	19
6.1	Näytteenkäsittely	19
6.2	pH:n mittaaminen	20
7	Raaka-aineiden testaus	20
8	Liotuskokeet	21
9	Höyrytyskokeet	22
10	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset	24

Kuvat, taulukot ja kaavat

Taulukko 1. Näytteiden pesäkemäärät Compact Dry -maljalla.....	21
Taulukko 2. Soijatempen valmistuksessa mitattuja pH-arvoja	22
Taulukko 3. Lämpökäsittelyjen teho psykrotrofiin <i>C. botulinum</i> -itiöihin	24

Liitteet

Liite 1	Psykrotrofisten <i>Clostridium botulinum</i> -itiöiden 6D-vähennys
---------	--

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehdään tammisaarelaisen Oy Soya Ab Jalofoodsin toimeksiannosta. Soya Oy valmistaa luomuraaka-aineita suosien perinteisiä aasialaisia kasvisruokia tofua ja tempeä. Molemmat ovat proteiinipitoisia, helppokäyttöisiä ja terveellisiä aterian pääkomponentteja. Soya Oy:n tuotemerkit Jalotofu ja Jalotempe löytyvät markettien valikoimista kautta maan sekä suurtalouspakkauksina tukuissa. Jalotofu tunnetaan jo kuluttajien keskuudessa ja sitä löytyy usein ravintoloiden listoilta. Sitä viedään myös pohjoismaihin ja markkinoidaan siellä yhteistyökumppanien merkeillä. Jalotempen valmistuksessa kotimaiset raaka-aineet vihreä ja keltainen herne, härkäpapu, tattari ja sinilupiini ovat vahvasti mukana itävaltalaisen soijapavun ohella. Tempe tekee vasta tuloaan Suomessa ja on melko tuntematon, mutta potentiaalia olisi kohtalaiseen menestykseen.

Elintarvikkeiden valmistuksessa mikrobiologinen turvallisuus on hyvin tärkeää. Uusia tuotteita kehitettäessä ja vanhojen tuotteiden prosesseja muutettaessa pitää varmistua siitä, etteivät muutokset heikennä elintarviketurvallisuutta. Yleiskuvan luomiseksi tässä työssä käydään kirjallisuuden avulla läpi yleisimmät ruokamyrkytyksiä aiheuttavat bakteerit ja arvioidaan niiden esiintymistä tempen valmistuksessa. *Bacillus cereus* on itiöllinen, ruokamyrkytyksiä aiheuttava ja vaikeasti tuhottava bakteeri, jota esiintyy myös tempeprosesseissa. Soya Oy:n omavalvonnassa tempestä määritetään useita mikrobeja, myös *B. cereus*. Omavalvontanäytteet tutkitaan hyväksytyssä viranomaislaboratoriossa standardin mukaisin menetelmin ja näin toimitaan jatkossakin. Omavalvonnan lisäksi tarvitaan menetelmä, jolla selvitetään nopeasti prosessi- ja reseptimuutosten vaikutus *B. cereuksen* kasvuun. Eri määrittymenetelmät kuvaillaan ja arvioidaan kirjallisten lähteiden pohjalta. Valitulla menetelmällä tutkitaan tempeprosessin alkuosaa raaka-aineiden, liotuksen ja kypsennyksen osalta. Opinnäytetyössä etsitään vastauksia kysymyksiin:

- Mitkä ruokamyrkytysbakteerit aiheuttavat vaaraa tempen elintarviketurvallisuudelle?
- Millainen menetelmä sopii parhaiten *Bacillus cereuksen* määrittymiseen Soya Oy:n tempetehtaalla?

- Miten liotusveden happopitoisuus vaikuttaa *B. cereuksen* kasvuun papujen liotuksessa?
- Miten eri lämpötilan ja ajan yhdistelmät vaikuttavat *B. cereuksen* vähenemiseen papujen kypsennyksen aikana?

2 Fermentoidut elintarvikkeet

Fermentoinnilla on kaksi toisistaan poikkeavaa määritelmää. Suppeampi ja tarkemmin määritelty on käytössä biokemiallisissa yhteyksissä. Se tarkoittaa energian vapauttamista hiilihydraateista ja muista orgaanisista yhdisteistä ilman, että happimolekyylit toimii elektronin vastaanottajana. Puhutaan myös anaerobisesta energiantuotosta. Yleiseen käyttöön fermentointi-sana on otettu tarkoittamaan mikrobien ja niiden tuottamien entsyymien orgaanisissa aineissa aiheuttamia kemiallisia muutoksia. Fermentoidut elintarvikkeet ovat tässä laajemmassa mielessä fermentoituja. (Li, 2004, s. 685).

Fermentoitavissa raaka-aineissa on hiilihydraatteja, proteiineja ja rasvoja sekä muita yhdisteitä. Niitä hajottaa ja muokkaa yhtä aikaa iso joukko mikrobeja ja entsyymejä. Hiilihydraatteja hajottavia reaktioita kutsutaan fermentatiivisiksi reaktioiksi ja niissä muodostuu mm. maitohappoa, etanolia ja etikkahappoa. Proteiinien hajoaminen pienemmiksi osiksi on nimeltään proteolyysiä ja rasvojen pilkkoutuminen lipolyysiä. Luonnollisissa ruoka-aineiden fermentaatioissa fermentatiivisten, proteolyyttisten ja lipolyyttisten reaktioiden määrät vaihtelevat. Se, minkä tyyppiset reaktiot ovat hallitsevia, riippuu lähtöaineista, mikrobikoostumuksesta ja fermentointiolosuhteista. Yksinkertaisimmissa fermentoinneissa mikrobit ovat peräisin raaka-aineista ja olosuhteita säätämällä pyritään lisäämään toivottujen mikrobien kasvua epätoivottujen kustannuksella. Suolan tai startterin eli mikrobiviljelmän käytöllä saadaan mikrobien kasvu tarkempaan hallintaan. (Li, 2004, ss. 685–686).

2.1 Tempe

Tempe on indonesialainen fermentoitu ruoka-aine, joka koostuu kuorituista, pehmeäksi kypsennetyistä pavuista ja sienirihmasta. Pavut ovat yleensä soijapapuja ja rihmaston

muodostaa *Rhizopus*-sukuinen home. Valmis tempe on noin 3 cm paksu tiivis, valkoinen kakku. Tempeä ei nautita raakana, vaan se leikataan tavallisesti siivuiksi ja paistetaan tai uppopaistetaan. Ruoaksi valmistaminen on nopeaa ja helppoa. Makua on kuvailtu pähkinäiseksi, juustomaiseksi, sienimäiseksi tai samalla tavalla hiivamaiseksi kuin tuore leipä. Indonesiassa tempe myydään tavallisesti tuoreena, mutta länsimaissa kauppojen kylmähyllystä tai pakastimesta. (Shurtleff & Aoyagi, 1979, s. 8).

2.2 Tempen raaka-aineet

Soijapapu on ylivoimaisesti yleisin tempen raaka-aine. Soijatempen maku ja rakenne ovat hyviä ja ravintoarvo korkea. Tuoreessa soijatempeessä on noin 20 % hyvälaatuista proteiinia ja runsaasti kuitua. Tempeä voi valmistaa myös muista palkokasveista, viljoista, siemenistä, elintarvikkeiden valmistuksen sivutuotteista ja näiden yhdistelmistä. Palkokasveista esim. mung-papua, lupiinia, härkäpapua ja kikhernettä käytetään. Viljoista sopivat riisi, ohra, hirssi, vehnä ja kaura ja siemenistä esimerkiksi seesaminsiemen. Indonesiassa on yleistä hyödyntää kasviöljyjen ja tofun puristuskakut tempen raaka-aineena. (Shurtleff & Aoyagi, 1979, ss. 8–9).

Papujen liotuksessa pyritään saamaan aikaan hapan ympäristö, joka vaikeuttaa haitallisten bakteerien kasvua ja vähentää tarvittavan homeviljelmän määrää myöhemmässä vaiheessa. Länsimaissa raaka-aineiden liotusveteen lisätään maito- tai etikkahappoa tai happo lisätään viimeistään kypsennyksen jälkeen papuihin. Indonesiassa kuorelliset pavut liotetaan yön yli lämpimässä vedessä, jolloin veteen päätyneet bakteerit hapattavat liotusveden.

Keittämiseen voidaan käyttää hanavettä ja tavallisesti se sopii tarkoitukseen oikein hyvin. Tempen valmistuminen saattaa kuitenkin viivästyä joitakin tunteja, jos vesi on kovaa tai siinä on poikkeuksellisen paljon klooria. Parhaan kasvuvauhdin homeelle antaa puhtaassa lähde- tai kaivovedessä keittäminen. (Shurtleff & Aoyagi, 1979, s. 105).

Fermentoinnin käynnistämiseksi tarvittava homeviljelmä eli -startteri saadaan joko riisinjyvissä tai soijapavuissa kasvatetusta itiöivästä kasvustosta, itiöivästä tempestä tai itiöimättömästä tuoreesta tempestä. Länsimaissa myynnissä on itiöpohjaisia puhdasviljelmiä, joissa on vain yhtä homelajia. Indonesialaisille tempepajoille tyypillisiä ovat itiöivään tai itiöimättömään tempeen perustuvat sekaviljelmästartterit. Niissä voi olla homeita, bakteereita ja hiivoja, joista toiset saattavat olla fermentoinnille hyödyllisiä.

Esimerkiksi *Klebsiella pneumoniae* -bakteeri tuottaa tempeen B12-vitamiinia. Kehittynein startterityyppi on eri puhdasviljelmien sekoitukset. (Shurtleff & Aoyagi, 1979, s. 117).

2.3 Tempeprosessi

Indonesialainen ja pohjoisamerikkalainen tempeprosessi eroavat toisistaan. Indonesiassa liotetaan yön yli kokonaisia, kuorellisia soijapapuja. Pavuista, ympäristöstä ja välineistä liotusveteen päätyneet bakteerit esifermentoivat liotusveden ja pavut. Aamulla lionneet pavut kuoritaan ja halkaistaan käsin, jaloin tai myllyllä. Kuoritut pavut keitetään avokattilassa ja samalla irtoaa lisää kuoria. Keitetyt pavut levitetään metrin halkaisijaltaan oleville bambuvadeille tuulettimien eteen jäähtymään ja kuivumaan. Jäähtyneisiin papuihin lisätään startteri ja ympätyt pavut kauhotaan rei'itettyihin muovipusseihin tai banaaninlehtiin. Banaaninlehdissä fermentoitu tempe on yleensä laadultaan parempaa. Kasvatus kestää kaksi vuorokautta huoneenlämmössä, minkä jälkeen valmis tempe myydään torilla muovipussissaan tai lehtikäärössään. (Tibbott, 2004, ss. 677–678).

Pohjois-Amerikassa uunissa kuivatut soijapavut halkaistaan myllyssä ja irronneet kuoret imetään pois. Kuorittuja pavunpuolikkaita keitetään 60 minuuttia avokattilassa. Viljanjyviä ja siemeniä voidaan lisätä keittämisen aikana. Keitetyt pavut jäähdytetään ja kuivataan isossa lingossa lyhyen aikaa pyörittämällä. Jäähdytetyt pavut siirretään sekoittimeen ja lisätään startteri sekä mahdollisesti myös etikkaa. Ympätyt pavut annostellaan rei'itettyihin muovipusseihin tai hampurilaispihvimuotteihin. Pussit litistetään, asetellaan ritilöille ja siirretään kasvatuskaappiin. Kasvatus kestää 24 tuntia +32 °C:ssä, minkä jälkeen tempet ovat valmiita, kiinteitä, valkoisia ja tuoksuvia kakkuja. Jotkut valmistajat pakastavat tempen tässä vaiheessa, mutta yleisempää on pakata tempet vakuumiin ja pastöroida ne pakkauksessaan. Pastöroitu tempe jäähdytetään ja myydään jääkaappilämpötilassa. Parasta ennen -päiväys on noin kolme kuukautta valmistuksesta. (Tibbott, 2004, s. 680).

2.4 Tempen mikrobiologiset ja kemialliset muutokset

Kypsennettyyn raaka-aineeseen ripoteltu *Rhizopus*-homeen itiö putoaa lämpimälle ja kostealle pavun pinnalle. Hieman hapan ympäristö sopii homeelle hyvin. Itiö imee itseensä vettä ja turpoaa, rikkoo itiökuoren ja alkaa kasvattaa rihmaa. Hyvin pian rihman kasvu

haarautuu joka suuntaan ja yläviistoon suuntaa rönsymäisiä kaaria. Paikkaan, jossa kaari palaa pavun pinnalle, muodostuu solmu. Solmukohtassa rihma ankkuroituu raaka-aineeseen kasvattamalla kasvin juuria muistuttavan ulokkeen noin kaksi solukerrosta pavun sisälle. Solmusta ylöspäin lähtee ilmahaara, jonka päähän muodostuu itiöpesäke. Pesäkkeessä kasvavat itiöt muuttuvat kypsyttyään mustiksi ja itiökuoren rikkouduttua erottuvat hyvin taustastaan. Tempe on valmis, kun papukakku on runsaan ja tiiviin valkoisen rihmaston peitossa, eikä itiöinti ole vielä alkanut. (Shurtleff & Aoyagi, 1979, ss. 177–178).

Homerihmat erittävät entsyymejä ympärilleen ja pilkkovat näin alustastaan itselleen ravintoa. Proteolyyttinen ja lipolyyttinen *Rhizopus oligosporus* on tempehomeista yleisin. Soijapapu sisältää paljon proteiinia ja rasvaa ja siten se sopii hyvin *R. oligosporukselle*. Amylaasiaktiivisuus sen sijaan on heikko, mikä on hyvä asia tärkkelyspitoisia raaka-aineita käytettäessä. *Rhizopus oryzaen* amylaasiaktiivisuus on korkea, eikä se sovellu tärkkelyspitoisille raaka-aineille, kuten viljoille. Amylaasi-entsyymi pilkkoo tärkkelystä sokereiksi ja sokerit fermentoituvat edelleen orgaanisiksi hapoiksi, jotka tuottavat epämiellyttävää makua, hajua ja tummaa väriä. Keski- ja Itä-Jaavalla *R. oryzaeta* arvostetaan pitkien rihmojen vuoksi. Niiden ansiosta rihmastosta muodostuu hyvin tiivis ja soijatempekakuista kiinteitä. (Shurtleff & Aoyagi, 1979, s. 180).

3 Ruokamyrkytysbakteerit

Ruokamyrkytyksiä aiheuttavia bakteereita saattaa päästä myytäviin elintarvikkeisiin raaka-aineista, elintarvikkeita käsittelevän työntekijän välityksellä tai tuotantovälineistä. Sairastumiseen tarvittava bakteerimäärä vaihtelee muutamasta bakteerista miljooniin riippuen bakteerilajista. Ruokamyrkytyksen oireet ovat tyypillisesti oksentelu ja ripuli lievempänä tai vaikeampana versiona. Bakteerien aiheuttamiin ruokamyrkytyksiin voi liittyä jälkitauteja ja myrkytykset voivat olla kohtalokkaita varsinkin riskiryhmäläisille. Jotkut bakteerien tuottamat hermomyrkyt ovat hyvin vaarallisia. Yleisimpiä ruokamyrkytyksiä aiheuttavia bakteereita ovat *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, EHEC-bakteeri, kampylobakteerit, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibriot* ja yersiniabakteerit. Kasvulliset bakteerit voidaan tuhota pastöroinnilla, mutta itiöt vaativat kovemman lämpökäsittelyn. Itiöllisiä bakteereita ovat *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* ja *Clostridium perfringens*. (Ruokavirasto, 2019).

3.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus on kaikkialla läsnä oleva, elintarvikkeissa hyvin usein tavattava ja itiöitä muodostava bakteeri, joka aiheuttaa ruokamyrkytyksiä kahdella eri tavalla. Eräät läheisesti toisiaan muistuttavat *B. cereus* -kannat voivat tuottaa elintarvikkeeseen emeettistä, eli oksentelua aiheuttavaa kereulidi-toksiinia. Kasvaakseen ja myrkyä tuottaakseen ne tarvitsevat happea ja vähintään +10 °C lämpötilan. Toisilla *B. cereus* -kannoilla on kyky tuottaa enterotoksiinia ohutsuolessa, mistä seuraa ripulityypin ruokamyrkytys. Myrkytyksen voivat aiheuttaa sekä ruoan mukana nautitut kasvulliset bakteerit, että itiöt, jotka itävät kasvullisiksi ruoansulatuksen aikana. Myrkytyksissä *B. cereuksen* kasvullisten bakteerien ja itiöiden yhteismäärä ruoassa on ollut 10^5 – 10^8 kpl/g, mutta eräissä tapauksissa niitä on ollut vain 10^3 – 10^4 kpl/g. Ruokatarvikkeissa *Bacillus cereus* on enimmäkseen itiömuodossa ja alle sen määrän, mikä ruokamyrkytykseen vaaditaan. Sopivissa olosuhteissa itiöt voivat kuitenkin itää ja lisääntyä haitallisiin määriin asti. Suurin osa *B. cereus* -myrkytyksistä on aiheutunut lämpimien ruokien nauttimisesta. Riisi- ja pastaruoat ovat tavallisimpia oksennustyyppin myrkytyksen aiheuttajia. *Bacillus cereuksen* itiöt kestävät hyvin lämpöä ja niiden täydellinen tuhoaminen onnistuu vain säilykkeen valmistuksen lämpökäsittelyillä. Miedomman lämpökäsittelyn saaneet ruokatuotteet tulee jäähdyttää käsittelyn jälkeen mahdollisimman nopeasti jääkaappilämpöön, koska pikajäähdytys rajoittaa itiöiden itämistä ja kasvamista. Alle +4 °C lämpötila estää *B. cereuksen* kasvun kokonaan, samoin kuin alle 4,5 pH ja alle 0,92 veden aktiivisuus. Alle +7 °C kasvamaan pystyvät kannat eivät ole yleisiä *B. cereusten* joukossa. Alle +10 °C bakteerien kasvu myös hidastuu huomattavasti. (EFSA, 2005).

Kylmässä kasvat *Bacillus cereus* -itiöt ovat paljon vastustuskykyisempiä kuumuudelle kuin kylmässä kasvavien *Clostridium botulinum* -bakteerien itiöt. Kylmäsäilytystä vaativien tuotteiden pastörointi on usein mitoitettu tuottamaan 10^6 -kertaisen vähennyksen psykrotrofisten *C. botulinum* -itiöiden määrään. On hyvä tiedostaa, että tällainen lämpökäsittely jättää osan *B. cereuksen* itiöistä henkiin. (Liite 1). *Bacillus cereuksen* itiöiden lämmönkestävyyteen vaikuttaa vallitseva happamuus. Alemmassa pH:ssa lämpökäsittelyn teho nousee ja tarvittava aika vähenee. Tutkimuksessa todettiin, että pH:n laskeminen 7:stä 4:ään vähensi itiöiden tuhoamiseen tarvittavaa aikaa 3–10 -kertaisesti. (Mazas ym., 1998).

Hollannissa tutkittiin vuonna 1986 tempen mikrobiologista laatua. Tutkimuksessa analysoitiin 110 kaupoista, tuotantolaitoksilta ja ravintoloista kerättyä kaupallista tempenäytettä. Tempe on tullut Hollantiin indonesialaisten siirtolaisten mukana ja sitä on maassa yleisesti saatavilla. Tulokset osoittivat, että suuressa osassa tempejä bakteriologinen laatu on huono. Esimerkiksi 11 prosentissa näytteistä *Bacillus cereuksen* määrä ylitti 100 000 pmy/g. Tutkijat antoivat viisi suositusta: 1) Hapon lisäys liotusveteen ja liko alhaisessa pH:ssa potentiaalisten patogeenien, erityisesti *B. cereuksen*, kasvun estämiseksi. 2) Riittävä keittoaika. 3) Hygieniset olosuhteet valmistuksen ja varastoinnin aikana. 4) Varastointi alle 7 °C rajoitetun ajan. 5) Lisää tutkimusta mahdollisuuksista vähentää fermentoinnin aikaista bakteerikasvua alentamalla liotettujen papujen pH:ta. (Samson ym., 1987).

Nout ym. tutkivat liotusveden happamuuden vaikutusta *B. cereukseen* soijatempeissä. Tutkijat hapattivat kuoritut pavut ja liotusveden bakteerien avulla jäljitellen Indonesian spontaania esifermentaatiota. 24 h liotuksen jälkeen pH vaihteli alle 4,85 ja 6 välillä. Osaan liotusvesistä lisättiin kasvullista *Bacillus cereusta* liotuksen alussa. Liotetut pavut huuhdeltiin, keitettiin 20 minuuttia, jäädytettiin ja valmistettiin tempeksi. Tempe kasvatettiin petrimaljoilla 45 h +30 °C:ssä ja valmiit tempet varastoitettiin 17 vrk +4 °C:ssä. Kasvullinen *Bacillus cereus* ja *B. cereuksen* itiöt määritettiin liotetuista pavuista, keitetyistä pavuista, tuoreesta tempestä ja varastoidusta tempestä. Määritysraja oli 500 pmy/g *B. cereukselle* ja 50 pmy/g itiöille. Kun liotusveden pH oli alle 4,85, kasvullisten *B. cereusten* ja itiöiden määrät jäivät alle määritysrajan jokaisessa tutkitussa vaiheessa. Tempe oli laadultaan erinomaista ja pH 6,65. Kun liotusvesi ympättiin *B. cereuksella* (10^5 pmy/g papuja), oli kasvullisia liotuksen lopussa alle määritysrajan ja itiöitä noin 10^3 pmy/g. Myöhemmissä prosessivaiheissa molempia oli alle määritysrajan, pH 6,3–6,5 ja tempen laatu hyvä. Kun liotusveden pH jäi välille 5,7–6,0, oli kasvullisten bakteerien määrä liotuksen lopussa lähes 10^4 pmy/g, mutta itiöt alle määritysrajan. Keitetyissä pavuissa sekä kasvullinen *B. cereus* että itiöt olivat alle määritysrajan. Valmiissa ja varastoidussa tempessä kasvullisten *B. cereusten* määrät olivat $10^{8,41}$ pmy/g ja $10^{8,85}$ pmy/g ja itiöiden määrät $10^{7,5}$ pmy/g ja $10^{8,58}$ pmy/g. *Bacillus* saattoi olla peräisin pavuista, keiton jälkeen kontaminanttina tullutta tai sekä että. Valmis tempe oli pahan hajuinen, ruskehtava ja tahmea, pH 7,4. (Nout ym., 1987).

Saman ryhmän toisessa kokeessa soijapavut steriloidtiin autoklaavissa ja jäähtymisen jälkeen ympättiin sekä tempehomeella että *Bacillus cereuksella*. Näiden lisäksi papuihin lisättiin joko

maito- tai etikkahappoa ja kasvatettiin 30 °C lämpötilassa 45 tuntia. Maitohapolla tempe kasvoi hyvin pH-alueella 4,35-5,95 ja heikosti, kun pH oli 3,95. *Bacillus cereus* ei kasvanut kaikkein happamimmissa pavuissa, mutta jo pH:ssa 4,45 se saavutti yli 10^4 pmy/g tason. Korkeimmassa mitatussa pH:ssa eli pH 5,95 *B. cereusten* kasvu oli runsasta, melkein 10^9 pmy/g. Etikkahapolla pH 6,0 ja 5,9 tuottivat hyvälaatuista tempeä, jossa oli paljon *B. cereuksia*, noin 10^7 pmy/g. Happamammassa, eli pH 4,9, 5,0 ja 5,5, *B. cereus* ei kasvanut, mutta ei myöskään tempehome, joten tempeä ei muodostunut. (Nout ym., 1987).

Eräessä tutkimuksessa tehtiin soijatempeä *Rhizopus microsporus var. microsporus* -homeella. Kasvatusajat olivat 24, 48, 72, 96 ja 120 tuntia. Valmiista tempeistä valmistettiin uutokset tislattuun veteen. Myös keitetyistä soijapavuista ja eri alustoilla kasvaneesta *Rhizopus*-homeesta tehtiin uutoksia. Uutteita lisättiin *Bacillus cereus* -kasvatuksiin. Tempeuutteen lisäämisen vaikutus oli välitön. Ensimmäisen puolen tunnin aikana kasvullisten *B. cereus* -bakteerien määrä väheni $10^{3,7}$ pmy/ml. Mikroskoopilla havaittiin, että *B. cereusten* solukalvot olivat kärsineet tuntuvia vaurioita. Bakteerien logaritmiseen kasvuun lähtö viivästyi 12,5 tunnilla verrattuna kasvatukseen, johon ei lisätty tempeuutetta. Kun tempeuutetta lisättiin *B. cereuksen* itiöihin, itäminen häiriintyi ja kasvuvaihe viivästyi 8 tunnilla. Soijapapu-uutteella tai muiden alustojen uutteilla ei ollut juuri mitään vaikutusta. Tempeuutteista tehokkain oli 24 h -tempeute ja vaikutus oli suurimmillaan pH-alueella 8–9. Kun tempeuutteseeseen lisättiin proteaaseja, se menetti tehonsa eräissä tapauksissa. Myös yli 60 °C lämpötiloissa teho alkoi asteittain hävitä ja keittämisen jälkeen 24 h -tempeuutteen tehosta oli jäljellä enää 30 %. (Roubos-van den Hil ym., 2010).

3.2 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum on hapettomissa oloissa kasvava, itiöitä muodostava ja vakavia ruokamyrkytyksiä aiheuttava bakteeri. Sitä esiintyy yleisesti itiöinä maaperässä, pohjaliejussa ja kalojen sekä muidenkin eläinten suolissa, mistä bakteeri siirtyy helposti elintarvikkeiden raaka-aineisiin. Elintarvikkeessa bakteeri-itiö voi itää ja muuttua kasvulliseksi soluksi, joka tuottaa elintarvikkeeseen botuliini-nimistä hermomyrkyä. Alle 1-vuotiailla ruoan mukana syödyt *C. botulinum* -itiöt saattavat itää kasvullisiksi myrkyä tuottaviksi bakteereiksi, koska heillä vatsan pH on aikuisia korkeampi. Säilykepurkeissa ja vakuumpakkauksissa vallitsevat hapettomat olosuhteet ovat otollisia *C. botulinumin* kasvulle ja myrkyä tuotolle. Säilytyt

elintarvikkeet on lämpökäsiteltävä huolellisesti itiöiden tuhoamiseksi. Henkiin jääneet itiöt aktivoituvat lämmön vaikutuksesta kasvullisiksi ja voivat tuottaa botuliinia pitkän säilytyksen aikana. Vakuumiin pakatuilla tuotteilla lämpökäsittely on lievempi kuin säilykkeillä ja ne saattavat sisältää pienen määrän henkiinjääneitä *C. botulinum* -bakteereja. Vakuumpakatut tuotteet pitää säilyttää jääkaappilämpötilassa eikä kylmäketjua saa katkaista. Sama sääntö koskee suojakaasuun pakattuja tuotteita. Erikseen on annettu säädös suojakaasu- ja tyhjiöpakattuihin kalajalosteisiin liittyen. Nämä tulee säilyttää 0–3 °C välillä vähittäismyynnissä. (Ruokavirasto, 2019).

Tanaka ym. tekivät soijatempeä ilman happolisäystä. *Clostridium botulinum* -itiöille annettiin 15 minuutin ja +80 °C lämpöshokki ja ne lisättiin soijapapuihin yhtä aikaa *Rhizopus oligosporus* -tempehomeen kanssa. Tempeä kasvatettiin 3 vrk petrimaljoilla +30 °C lämpötilassa. *C. botulinum* kasvoi hyvin, mutta vielä 1 vrk jälkeen tempeen ei ollut muodostunut toksiinia. 2 vrk jälkeen yhdessä kolmesta tempestä toksiinia oli jo havaittavissa ja 3 vrk kohdalla sitä löytyi kaikista tempeistä. Ryhmä tutki myös *C. botulinum*in lisäämistä höyrytetyn tempen pinnalle, tempen pakkaamista vakuumiin ja säilyttämistä 5, 10, 15 ja 25 °C lämpötiloissa. Toksiinia muodostui viidessä päivässä +25 °C:ssä ja neljässä viikossa +15 °C:ssä, mutta 5 ja 10 °C lämpötiloissa sitä ei muodostunut kuuden viikon seurantajakson aikana. (Tanaka ym., 1985).

Clostridium botulinum voi muodostaa itiöitä, jos kasvuolot eivät ole suotuisat. Toksiinin muodostus tapahtuu kuitenkin kasvullisissa soluissa logaritmisin kasvun loppupuolella. *C. botulinum* -kantojen ominaisuudet poikkeavat paljon toisistaan ja ne voidaan jakaa neljään ryhmään, I-IV. Ryhmät I ja II aiheuttavat ihmisille botulismia. Ryhmän I kannat ovat proteolyttisiä ja mesofiilisiä, kasvuoptimi 35–37 °C. Ne eivät kasva lainkaan alle +10 °C:ssa ja pH 4,3–4,5 pysäyttää niiden kasvun. Ne sietävät 10 % suolaliuoksen ja itiöt ovat hyvin kuumuutta kestäviä. Ryhmän I aiheuttamat ruokamyrkytykset liittyvät usein kotona valmistettuun suolalihaan tai säilykkeisiin, joiden lämpökäsittely ei ole ollut riittävää. Ryhmän II kannat ovat psykrotrofisia ja ei-proteolyttisiä. Ne kasvavat optimaalisesti 26–30 °C lämpötilassa, mutta voivat kasvaa jopa +3 °C:ssa. Kasvua rajoittaa alle 5 pH ja 5 % suolaliuos. Ryhmän II itiöt kestävät huonommin kuumaa kuin ryhmän I itiöt, mutta saattavat selvitä osittain hengissä miedommista pastörintikäsitteistä. Ne aiheuttavat riskin teollisesti valmistetuille, vakuumiin pakatuille ja kylmäsäilytystä vaativille tuotteille, joilla on

pitkä myyntiaika. Näissä tuotteissa ei ole juurikaan suolaa tai säilöntäaineita, joten turvallisuus perustuu kylmäsäilytykseen. Myymälöiden kylmätiskeissä ja kotijääkaapeissa lämpötila voi olla jopa +10 °C, jolloin ryhmän II bakteerit voivat kasvaa ja tuottaa myrkyä. (Lindström ym., 2006).

European Chilled Food Federation on julkaissut suosituksia ruoka-alan toimijoille. Suositukset koskevat valmiiksi pakattujen ja jääkaappisäilytystä vaativien ruokien valmistamista. ECFF suosittelee pakkauksessaan pastöroitaville tuotteille 6D-lämpökäsittelyä (Liite 1) ja sen jälkeen nopeaa jäähdytystä. Lämpökäsittely vähentää kylmässä kasvavien ryhmän II *C. botulinum* -itiöiden määrän miljoonasosaan. Bakteerien tuhoutumisnopeutta kuvataan D-arvolla. 1D tarkoittaa sitä aikaa tietyssä lämpötilassa, jossa elävien bakteerien määrä vähenee 1/10-osaan. Ryhmän II psykrotrofisille *C. botulinum* -itiöille 6D-vaikutukseen vaaditaan 10 minuuttia 90 °C lämpötilassa tuotteen hitaimmin lämpenevästä kohdasta mitattuna. Sama vaikutus saavutetaan myös esimerkiksi 100 minuutissa 83 °C:ssä tai 1 minuutissa 100 °C:ssä. (Liite 1). Käsittely tappaa samalla kaikki kasvulliset bakteerit, koska niille riittäisi 6D-käsittelyyn jo 2 minuuttia 70 °C:ssä tai 2 sekuntia 83 °C:ssä. Ryhmän I mesofiilisille *C. botulinum* -itiöille vaadittaisiin paljon kovempaa lämpökäsittelyä 6D-vaikutuksen saavuttamiseksi. Tuotteessa voi siksi olla henkiin jääneitä ryhmän I itiöitä, jotka lämpökäsittely aktivoi kasvamaan. Nopea jäähdytys pastöroinnin jälkeen alle 10 asteeseen kuitenkin estää niiden kasvamisen. (ECFF, 2006, ss. 4–14).

3.3 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens on itiöllinen bakteeri, jonka aiheuttamat ruokamyrkytykset ovat olleet varsin tavallisia. Bakteeria esiintyy yleisesti maassa, vesissä ja pölyssä sekä ihmisten ja eläinten suolistoissa. Myrkytysten välittäjinä ovat toimineet liha- ja kalaruoat, joiden kuumennus on ollut puutteellista, jäähdytys liian hidasta ja säilytyslämpö turhan korkea. Toisaalta myös kuivatut elintarvikkeet, mausteet, yrtit ja vihannekset voivat kantaa bakteeria. *C. perfringens* kestää itiömuodossaan hyvin kuivuutta, ravinnon puutetta ja kuumuutta. Itiöt säilyvät hengissä +100 °C lämpötilassa 30–120 minuuttia. Keittolämpötila aktivoi eloon jääneet itiöt muuttamaan kasvullisiksi soluiksi. *C. perfringens* voi kasvaa vain hapettomissa olosuhteissa lämpötila-alueella 10–54 °C. Bakteerin kasvuille optimaalinen lämpötila on 43–47 °C, jolloin bakteerisolun pystyy jakautumaan jopa 7 minuutin välein.

Clostridium perfringens myrkyllisyyden aiheuttaa enterotoksiini, jota vapautuu, kun kasvulliset bakteerit muodostavat itiöitä. Tätä ei yleensä tapahdu ruoassa, eikä elintarvikkeeseen muodostuvaa toksiinia pidetä ruokamyrkytysriskinä. Sen sijaan ihmisen suolistossa vapautuva toksiini aiheuttaa myrkytyksen, jos bakteereita on riittävästi, eli noin 10^8 kpl. Ruoan yli 10^5 pmy/g bakteeripitoisuuksia pidetään riskitasona. Ruoan kuumentaminen kauttaaltaan yli 75 °C:een tuhoaa kasvulliset *C. perfringens* -bakteerit. (Ruokavirasto, 2010, ss. 44–46, Ruokavirasto, 2019).

3.4 EHEC-bakteeri

Escherichia coli kuuluu ihmisten ja eläinten normaaliin suolistoflooraan ja pitää osaltaan yllä suoliston tasapainoa ja hyvinvointia. Osa *E. coli*ista, kuten EHEC, on kuitenkin muuntunut paksusuolentulehdusta aiheuttavaksi. Naudat ja muut märehitijät kantavat EHEC-bakteeria oireettomina. Elintarvikkeen EHEC on aina peräisin ulosteista. Vihannesten kastelu- ja käsittelyvesi voi olla saastunutta tai lannoitus virheellistä. Bakteeri voi joutua elintarvikkeeseen likaisista työvälineistä tai tartuntaa kantavan henkilön käsistä. Jo muutama bakteeri on riittävä annos aiheuttamaan tartunnan. Ruoka-aineista naudanliha ja maito ovat suurimmat riskit, mutta myös tuoreet kasvikset pitää huuhdella hyvin. Käsien pesu ja hyvä henkilökohtainen hygienia estävät EHECin leviämistä. Tärkein torjuntakeino on lämpökäsittely, yli 70 °C kuumentaminen riittää tuhoamaan EHECin. (Ruokavirasto, 2019).

3.5 Kampylobakteerit

Kampylobakteerit elävät tasalämpöisten eläinten ja lintujen suolistossa, minkä lisäksi niitä voi olla luonnonvesissä. Kampylobakteerit viihtyvät parhaiten noin 40 asteessa vähähappisessa ympäristössä. Suurin osa suomalaisten tartunnoista on saatu ulkomailla ja kotimaiset tapaukset yleensä siipikarjan lihasta tai saastuneesta juomavedestä. Ruokamyrkytystapauksissa syynä voi olla saastunut raaka-aine, ristikontaminaatio, liian vähäinen lämpökäsittely tai bakteeria kantava työntekijä. Kampylobakteerit tuhoutuvat riittäväällä kuumennuksella. Siipikarjanlihalle suositellaan yli 75 °C kuumentamista, muille elintarvikkeille yli 70 °C kuumuutta ja maidolle pastörintia. (Ruokavirasto, 2019).

3.6 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes on maan ja ympäristön bakteeri, joka voi joutua elintarvikkeisiin ja aiheuttaa syöjälleen listerioosin. Iäkkäille, heikentyneesti vastustuskykyisille, sikiöille ja vastasyntyneille listerioosi saattaa aiheuttaa jopa kuoleman. *L. monocytogenes* voi esiintyä lämpökäsittämättömissä tai lämpökäsitellyissä, mutta jälkisaastuneissa elintarvikkeissa. Se pystyy kasvamaan kylmässä ja sietää runsasta suolaa, eikä kuole pakkasessa tai kuivassa. Riskiryhmäläisille suositellaan kuumentamatta käytettävien elintarvikkeiden nauttimista jo hyvissä ajoin ennen viimeistä käyttöajankohtaa. *L. monocytogenesin* määrä ei saa ylittää 100 pmy/g tuotteen myyntiaikana. Riskielintarvikkeita ovat monet kala- ja lihatuotteet, leikkeleet, valmissalaatit ja -leivät, einekset riittämättömästi kuumennettuina, pastöroimaton maito, home- ja kittijuustot sekä pakastevihannekset ja pesemättömät kasvikset riittämättömästi kuumennettuina. Riski on vielä suurempi, jos myyntiaika on pitkä. (Ruokavirasto, 2019). *L. monocytogenes* on kasvullisista ruokamyrkytysbakteereista parhaiten lämpöä kestävä. 6D-vähennykseen riittää 2 minuuttia 70 °C lämpötilassa tai vastaavan tehoinen lämpökäsittely. (EFCC, 2006, s. 13).

3.7 *Salmonella*

Salmonellat ovat eläinten suolistobakteereja, jotka aiheuttavat ihmiselle joko vakavan yleisinfektion tai kuumeisen ripulin. Bakteerit leviävät villieläinten ulosteista ympäristöön, ja sieltä saastuneen rehun tai juomaveden kautta tuotantoeläimiin. Kansallinen salmonellaohjelma valvoo tilannetta tuotantoeläimissä ja niistä saatavissa elintarvikkeissa. Suomen salmonellatilanne on monia muita maita parempi ja myrkytystapaukset ovat yleensä ulkomailta tuotuja. *Salmonella* leviää tavallisimmin eläinperäisten raaka-aineiden, mutta myös ulkomaisten itujen ja salaatin välityksellä. Toisinaan levittäjä on tartuntaa kantava elintarviketyöntekijä. Tartunta voi olla myös oireeton ja jatkua viikoista kuukausiin. Pastörinti tuhoaa *Salmonellan*. (Ruokavirasto, 2019).

3.8 *Shigella*

Shigella-bakteereita voi esiintyä vain ihmisen ja apinoiden suolistossa. Ihmisillä ne voivat aiheuttaa jo pieninä annoksina punataudiksi kutsuttua veriripulia. Suomessa ilmenneet

tapaukset ovat enimmäkseen ulkomaanmatkoilla saatuja. *Shigella* voi päätyä elintarvikkeisiin vihannesten ja juuresten saastuneen kastelu- tai huuhteluveden kautta, mutta yleisimmin bakteeria kantavan henkilön huonon käsihygienian seurauksena. Pastörointi tuhoaa *Shigellan*. (Ruokavirasto, 2019).

3.9 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus on yleinen bakteeri ihmisten ja lämminveristen eläinten nenän ja nielun limakalvoilla, iholla ja ulosteissa. Ihmisistä noin puolet on bakteerin kantajia. Osa *S. aureus* -kannoista tuottaa enterotoksiineja, jotka eivät tuhoudu elintarvikkeiden lämpökäsittelyissä vaikka bakteeri itse tuhoutuu. *S. aureus* voi joutua elintarvikkeeseen työntekijän käsistä, yskäisyistä, aivastuksesta tai pudonneesta hiuksesta. Hyvä hygienia on korostetun tärkeää *S. aureuksen* torjumiseksi. Ruokaa ei kosketa käsin vaan aina suojakäsineillä. Käsineitä vaihdetaan tai vähintään desinfioidaan usein. Jos käsissä on tulehtuneita haavoja, ei ruokaa saa käsitellä. Tavalliset haavat pitää laastaroida. Hiukset on peitettävä ja kasvojen koskettelua sekä yskimistä vältettävä. (Ruokavirasto, 2019; EFCC, 2006, s. 14).

Amerikkalaistutkimuksessa ilman happolisäystä tehdyllä soijatempeillä tutkittiin myös *S. aureuksen* kasvua ja toksiinin tuottoa. *S. aureusta* lisättiin 10^2 pmy/g samaan aikaan tempehomeen kanssa. Kasvatus kesti 3 vrk $+30\text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilassa petrimaljoilla. 1 vrk jälkeen *S. aureus* oli lisääntynyt lähes 10^7 pmy/g tasolle, mutta enterotoksiinia ei ollut vielä muodostunut. 2 vrk jälkeen *S. aureuksia* oli yli 10^8 pmy/g ja 3 vrk kuluttua jo melkein 10^9 pmy/g. Sekä 2 vrk että 3 vrk näytteissä havaittiin enterotoksiinia. (Tanaka ym., 1985).

3.10 *Vibriot*

Vibriot ovat pääasiassa suolaisten, mutta toisinaan myös makeiden vesien bakteereita. Ne ovat harvinaisia Suomessa. Ulkomailla *Vibrioita* tavataan kaloissa ja äyriäisissä sekä jäteveden purkualueelta pyydystetyissä ostereissa ja simpukoissa. Eniten *Vibrioita* esiintyy loppukesällä lämpimien vesien aikaan. *Vibrio cholerae* on kolerana tunnetun voimakkaan vesiripulin aiheuttajabakteeri. *Vibriot* tuhoutuvat lämpökäsittelyissä jo $60\text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilassa. (Ruokavirasto, 2019).

3.11 Yersiniabakteerit

Yersinia enterocolitica ja *Yersinia pseudotuberculosis* ovat yleisiä suolistotulehdusten aiheuttajabakteereja Suomessa. Niitä löytyy linnuista, kaloista, sammakoista, nisäkkäistä, maasta ja vesistä. Molemmilla bakteereilla on riski siirtyä elintarvikkeisiin ja ne pystyvät kasvamaan myös jääkaappilämpötiloissa ja vakuumpakatuissa tuotteissa. *Yersinia enterocolitica*-tartunta saadaan usein sianlihasta, koska bakteeri kuuluu sian ruoansulatuskanavan normaaliin bakteeristoon. Hygieniavirheiden tai puutteellisen kuumennuksen johdosta *Y. enterocolitica* voi päätyä myytäviin tuotteisiin. *Y. pseudotuberculosis* on aiheuttanut epidemioita raakamaidon ja kotimaisten kasvien välityksellä. Varsinkin yli talven säilötyt porkkanat ovat toistuvasti olleet syyllisiä ruokamyrkytyksiin. Porkkanan käsittelyyn on annettu ohjeistusta ja pastöroimatonta maitoa kehoitetaan välttämään. Pastörinti riittää *Yersinian* tappamiseen. (Ruokavirasto, 2019).

4 Ruokamyrkytysbakteerit tempen valmistuksessa

Kirjallisuuskatsauksen pohjalta arvioitiin bakteerien mahdolliset reitit tempeprosessiin ja verrattiin niitä tempehtaan käytäntöihin, joilla kontaminaatiota vähennetään. Bakteerien mahdollisuuksia kasvaa ja hallintaa lämpökäsittelyillä ja jäähdytyksillä arvioitiin myös. Bakteerien mahdollisiksi kulkeutumisreiteiksi tempen tuotantotilaan arvioitiin ulkovaatteet ja -kengät, siirtoalustat, ristikontaminaatio varaston ja tuotannon välillä, pöly, tempeä valmistavat työntekijät ja raaka-aineet. Vieraita ja ulkopuolisia työntekijöitä varten on tempeuotannon eteiseen varattu kertakäyttöisiä hiussuojia, kenkäsuoja ja paperisia vierailijan takkeja, jotka puetaan ulkovaatteiden päälle. Ulkovaatteita voi myös jättää naulakkoon. Vierailijat lukevat läpi ja kuittaavat luetuiksi kirjalliset hygieniaohjeet. Omat työntekijät käyttävät työasua, työkenkiä ja hiussuojia. Työkengissä ei mennä ulos eikä työasussa ruokailla. Siirtoalustoilla kuljetetaan tempe- ja raaka-ainelaatikoiden pinoja likaisen ja puhtaan alueen välillä. Pyörissä saattaisi kulkeutua epäpuhtauksia ja siksi eri osastojen lattioihin oviaukkojen kohdalle on kiinnitetty tarramattoja. Siirtoalustalla ajetaan aina tarramaton yli ja pyörät puhdistuvat. Ristikontaminaatiota varaston ja tuotannon välillä estetään varaamalla molemmille osastoille omat välineet, joita ei vaihdella keskenään, ja pesemällä tuotannon välineet hyvin. Pavut kaadetaan liotusveteen varastossa, jolloin papupöly jää varastoon. Varaston ja tuotannon välinen ovi pidetään suljettuna ja lattioita

pestään säännöllisesti siivousohjelman mukaisesti. Ylärakenteiden pölyt siivoaa ulkopuolinen yritys säännöllisesti, tuloilmakoneessa on hepa-suodatin ja tuotannon ulko-ovi pidetään suljettuna. Tempeä valmistavat työntekijät pesevät kätensä ja käyttävät suojakäsineitä, joita aina tarvittaessa desinfioidaan. Työvaatteita vaihdetaan usein ja hiussuojusta käytetään tuotantotiloissa aina. Korona-aikana on annettu uusia ohjeita, kuten kättelyn välttäminen, hihaan aivastaminen ja turvavälit. Edellä mainitut käytännöt arvioitiin hyväksi.

Tempen raaka-aineet ovat kuivia ja itiölliset bakteerit niissä todennäköisesti itiömuodossa. Papujen, herneiden ja tattarin seassa voi olla puitaessa pellolta tullutta maa-ainesta, joka on mennyt myös kuorinnasta läpi. Määrät ovat kuitenkin pieniä, sillä tavarantoimittajien kuorintaprosesseihin kuuluvat seulonta ja kivenerotus. Kuoritut raaka-aineet ovat kuorimattomia puhtaampia, koska siemenkuori suojaa sisusta lialta ja bakteereilta. Palkokasveilla suoja on kaksinkertainen palon ansiosta. Itiöt pysyvät itiömuodossa myös happamassa liotusvaiheessa. Saaveissa liotusta seuraa höyrykeitto uunissa, minkä tehoa happamuus lisää. Suurin osa itiöistä kuolee, mutta hyvin pieni osa selviytyy ja voi muuttua kasvullisiksi bakteereiksi. Uunin jälkeen pavut jäähdytetään nopeasti huoneenlämpöön ja niihin sekoitetaan homestartteri. Startterin mukana papuihin joutuvat bakteeri-itiöt saattavat itää ja lisääntyä fermentointivaiheessa. Tempefermentoinnissa olosuhteet ovat lämpötilan, ravinteiden, pH:n ja kosteuden puolesta bakteereiden kasvuun muuten sopivat, mutta anaeroobeille klostrideille happea voi olla liikaa. Fermentoinnin jälkeen valmis tempe pakataan vakuumiin ja pastöroidaan, jolloin kasvulliset bakteerit tuhoutuvat. Riittävän tehokas pastörinti tuhoaa myös psykrotrofisten *C. botulinum* -kantojen itiöt (Liite 1). Pastöroinnin jälkeen nopealla jäähdytyksellä alle +6 °C lämpötilaan estetään mesofiilisten *C. botulinum* -kantojen, *C. perfringensin* ja mesofiilisten *B. cereus* -kantojen itäminen ja kasvu. Vasta alle +4 °C estäisi täysin psykrotrofisten *B. cereus* -kantojen kasvun, joten ne saattavat lisääntyä hitaasti pitkän kylmäsäilytyksen aikana 4–10 °C lämpötiloissa.

Itiöttömiä bakteereita saattaa päästä tempeprosessiin uunin jälkeisissä vaiheissa ja lisääntyä fermentoinnin aikana kohtalaiseen määrään. Tempen pastörinti on kuitenkin riittävä lämpökäsittely tuhoamaan ne täysin, eikä jälkisaastumistakaan voi tapahtua suljetussa vakuumpakkauksessa. *Staphylococcus aureus* saattaa muodostaa myöhemmissä kasvun vaiheissaan lämpökestoista toksinia, joka ei hajoa pastöroinnissa. Tempefermentaatio kestää noin vuorokauden ja tämä on liian lyhyt aika toksinin muodostumiseen.

5 *Bacillus cereus* -maljat

Ruokaviraston menetelmäluettelossa on alustavalle *Bacillus cereus* -määritykselle kaksi menetelmää: Asetuksen mukainen menetelmä SFS-EN ISO 7932:2004 ja vaihtoehtoinen menetelmä NMKL 67: 2010 käyttäen *Bacillus cereus* -selektiiviagarina (PEMBA). (Ruokavirasto, 2019a). Muita menetelmiä ovat kromogeeniset agarmaljat ja kuivamaljat.

5.1 ISO-standardi

Eviran mikrobiologian yksikön menetelmäohje Evira 3406/1 perustuu standardiin ISO 7932:2004. Menetelmä soveltuu alustavaan *Bacillus cereus* -bakteerin tai sen itiöiden määrittämiseen elintarvikkeista. Näyte siirrostetaan pintaviljelynä selektiiviselle Mossel-agarmaljalle. Jos halutaan määrittää näytteen itiöpitoisuus, nestemäistä näytettä tai kiinteän näytteen ensimmäistä laimennosta kuumennetaan ensin vesihauteessa 10 min 80 °C:ssa kasvullisten solujen tuhoamiseksi. Maljoja kasvatetaan 1–2 vrk +30 °C:ssa. Tyypilliset pesäkkeet lasketaan ja tuloksen perusteella ilmoitetaan alustava *B. cereus* -bakteerin tai itiöiden pitoisuus /g tai /ml näytettä. *B. cereus* kasvaa Mossel-maljalla suurina, vaaleanpunaisina pesäkkeinä, joita yleensä ympäröi saostumavyöhyke. Saostumavyöhykkeen aiheuttaa lesitinaasin muodostus. Jotkut *B. cereus* -kannat tuottavat hyvin vähän tai eivät lainkaan lesitinaasia. Tyypilliset lesitinaasi-negatiiviset ja lesitinaasi-positiiviset pesäkkeet varmistetaan viljelemällä ne naudan- tai lampaanveriagarille. *B. cereus* kasvaa veriagarilla isoina, epäsäännöllisinä, mattapintaisina, vihertävänharmaina pesäkkeinä, jotka ovat yleensä ison hemolyysivyöhykkeen ympäröimiä, mutta vyöhyke voi puuttuakin. (Evira, 2006).

Mossel-agarjauhetta myydään esimerkiksi nimellä *Bacillus Cereus* (P.R.E.P.) Medium (MYP). MYP tulee sanoista Mannitoli-egg Yolk (keltuainen)-Polymyksiini. Elatusaineen kaksi reaktiota erottavat *B. cereuksen* muista *Bacillus*-suvun jäsenistä. Nämä ovat mannitolin käyminen ja lesitinaasin tuotanto. Mannitolin käyminen antaa pesäkkeille keltaisen värin. *B. cereus* on mannitolinegatiivinen ja tuottaa punaisia pesäkkeitä. *B. cereuksen* tuottama lesitinaasi pilkkoo kananmunankeltuaisen lesitiiniä ja tämä näkyy valkoisena saostumana pesäkkeiden ympärillä. Polymyksiiniä lisätään estämään koliformien kasvua, mutta jotkut *Proteukset* ja gram-positiiviset kokit saattavat kasvaa. Alusta valmistetaan näin: 46 g jauhetta

sekoitetaan 900 ml:aan tislattua vettä, steriloidaan autoklaavissa ja jäädytetään vesihauteessa 47 °C:een. Alustaan lisätään aseptisesti 100 ml munankeltuaisemulsiota ja polymyksiini, sekoitetaan hyvin ja kaadetaan maljoille. Valmiita maljoja voi varastoida 7 vuorokautta 2–8 °C:ssa pimeässä varastossa. (Labema, n.d.-a)

Verimalja on ravinteikas yleiselatusaine, jolla tutkitaan erityisesti streptokokkien kykyä aiheuttaa hemolyysiä. (Oxoid, 2021). HUS-labissa verimaljan pohjana käytetään Oxoidin Sheep Blood Agar Base -jauhetta. Jauhe liuotetaan ionivaihdettuun veteen, seos autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia ja jäädytetään jakelulämpötilaan. Jakeluvaiheessa seokseen lisätään aseptisesti steriiliä lampaanverta. Valmiin tuotteen pH on 7,1–7,5 ja säilyvyys 4 viikkoa jääkaappilämpötilassa. (Savolainen, 2015).

5.2 NMKL-standardi

MetropoliLab Oy:n analyysi on standardin NMKL 67:2010 mukainen. Menetelmässä tunnettu määrä näytettä tai sen laimennosta viljellään pintaviljelynä veriagarille. Inkuboinnin jälkeen lasketaan tyypilliset isot, epäsäännölliset, harmaanvalkoiset pesäkkeet, joilla on hemolyyttinen vyöhyke. Lopullinen varmistus suoritetaan selektiivisellä kasvualustalla, jolla *B. cereus* -ryhmän pesäkkeen ominaisuudet ovat lesitiinin saostuminen ja kyvyttömyys käyttää mannitolia. (Suominen, 2021).

Menetelmän selektiivinen agar on nimeltään PEMBA. Kuten Mosselissakin, myös PEMBAssa on mannitolia, keltuaista ja polymyksiiniä. Indikaattoriväri on toinen ja *Bacillus cereus* -pesäkkeet näkyvät maljalla sinisinä. Valmistusohje PEMBA-maljalle: 41 g jauhetta sekoitetaan 950 ml:aan tislattua vettä, steriloidaan autoklaavissa ja jäädytetään vesihauteessa 47 C:een. Alustaan lisätään aseptisesti 50 ml munankeltuaisemulsiota ja polymyksiini-supplementti, sekoitetaan hyvin ja kaadetaan maljoille. Valmiita maljoja voi varastoida 7 vuorokautta 2–8 C:ssa pimeässä varastossa. (Labema, n.d.-b).

5.3 Kromogeeninen agar

Kromogeeninen elatusaine sisältää väriaineen, joka on sitoutunut substraattiin. Bakteerin kasvaessa maljalla se erittää entsyymiä, joka vapauttaa väriaineen eli kromogeenin

substraatista. Vapautunut väriaine värjää kasvavan pesäkkeen. Bakteeripesäkkeet värjäytyvät joillakin maljoilla pH:n muutoksen tai rikkivedyn tuoton johdosta, mutta nämä maljat eivät ole kromogeenisiä. (Kärpänoja, 2007). CHROMAgar valmistaa erilaisia kromogeenisiä agareita. Valikoimasta löytyy agar myös *B. cereuksen* pesäkkeiden laskemiseen ympäristö- ja elintarvikenäytteistä. Maljalla kasvavat *Bacillus cereus* -pesäkkeet värjäytyvät sinisiksi ja niiden ympärille muodostuu valkoinen kehä. Muut *Bacillukset* muodostavat kehättömiä sinisiä tai valkoisia pesäkkeitä tai niiden kasvu estyy. Myös gram-negatiivisten bakteerien, hiivojen ja homeiden kasvu estyy. Kasvatusalusta valmistetaan seuraavasti: 33 g kromogeenista agarjauhetta sekoitetaan 1 litraan puhdistettua vettä, steriloidaan autoklaavissa ja jäähdytetään vesihauteessa 47 °C:een. 40 ml:aan puhdistettua vettä lisätään 3 g lisäainejauhetta, sekoitetaan 30 minuuttia magneettisekoittajalla, steriloidaan autoklaavissa ja jäähdytetään vesihauteessa 47 °C:een. Agar laitetaan magneettisekoitukseen, lisätään lisäaine agariin aseptisesti ja sekoitetaan pari minuuttia. Valmis alusta kaadetaan välittömästi maljoille, joiden annetaan jähmettyä. Valmiita maljoja voi varastoida jopa kaksi kuukautta 2–8 °C:ssa valolta ja kuivumiselta suojattuna. (Chromagar, 2021).

5.4 Compact Dry -kuivamalja

HyServe valmistaa Compact Dry X-BC kuivamaljoja *Bacillus cereuksen* määrittämiseen ruokanäytteistä. Ne ovat pienikokoisia, kromogeenisiä, käyttövalmiita ja helppokäyttöisiä. Keskelle maljaa pipetoidaan 1 ml näytettä, jolloin kuivamalja muuttuu geelimäiseksi. Näyte leviää tasaisesti ilman levittämistä. Maljoja kasvatetaan 24 h +30 °C lämpötilassa, minkä jälkeen mahdolliset *Bacillus cereus* -pesäkkeet erottuvat maljalla sinivihreinä. Myös *B. thuringiensis* -pesäkkeet ovat sinivihreitä, eikä niitä voi erottaa *B. cereuksista*. Mahdollisesti kasvavat muut bakteerit muodostavat valkoisia pesäkkeitä, joten vain sinivihreät pesäkkeet lasketaan. Compact Dry -maljojen antamia tuloksia on verrattu standardimenetelmillä saatuihin tuloksiin, ja ne ovat olleet toisiaan vastaavia. Hyvän selektiivisyyden ansiosta pesäkkeen varmistusta toiselle alustalle ei tarvitse tehdä, joten ajan säästö on huomattava. Muita etuja ovat 18 kuukauden säilyvyysaika ja mahdollisuus säilyttää maljoja huoneenlämmössä. (HyServe, n.d).

6 *Bacillus cereus* -määritys Compact Dry -maljalla

Bacillus cereus -bakteerin määrittämiseen ruokanäytteistä on useita menetelmiä. Yleisimmät niistä ovat ISO- ja NMKL-standardien mukaiset menetelmät, joita hyväksytyjen laboratoriodien on viranomais- ja omavalvontatutkimuksissa käytettävä. Standardeissa käytettävät Mossel-, PEMBA- ja verimaljat ovat monimutkaisia valmistaa ja niiden säilyvyysaika on lyhyt. Ne sopivat ammattimaisille laboratorioille, joissa *B. cereus* -analyysjä tehdään jatkuvasti ja paljon. Kromogeeninen agar on askel eteenpäin sellaisille laboratorioille, joiden ei tarvitse noudattaa standardin menetelmiä. Valmistus on hieman yksinkertaisempaa ja maljojen säilyvyysaika moninkertainen. Tempetehtaalla käytettävissä ei ole laboratoriotason laitteita, joten sopivin vaihtoehto oli Compact Dry -kuivamaljat. Niitä ei tarvitse valmistaa, koska ne ovat käyttövalmiita. Ne menevät pieneen tilaan, eivät vaadi kylmäsäilytystä, eivätkä mene pilalle, jos niitä ei hetkeen tarvita.

6.1 Näytteenkäsittely

Välineitä hankittaessa oli vaatimuksena, että ne eivät saa olla sirpaloituvia. Lasi ja heikot muovit rajautuivat tällä perusteella pois. Valinta osui PP-muovisiin kierrekorkkisiin ja isosuisiin pulloihin, jotka ovat autoklavoitavia. Ensilaimennokselle eli 1/10-laimennokselle hankittiin 125 ml pulloja ja jatkolaimennoksille 30 ml pulloja. Näytteen sekoitus laimennusliuokseen tehdään yleensä stomacher-laitteella, mutta tässä menetelmässä näytettä ravistellaan käsin. Laimennusliuokseksi valittiin yleisesti käytetty pepsu, jossa on 0,1 % peptonia ja 0,85 % suolaa. Liuos valmistetaan siten, että 9,5 g pepsujauhetta liuotetaan 1 litraan tislattua vettä, annostellaan pulloihin ja steriloidaan painekattilassa. Koska käytössä on painekattila eikä autoklaavi, lämpökäsittelyä annetaan varmuuden vuoksi 20 minuuttia tavallisen 15 minuutin sijasta. Ensilaimennuspulloon oli tarkoitus saada jäämään 90 g pepsua ja jatkolaimennuspulloihin 9 g. Steriloinnissa osa pepsusta haihtuu, joten selvitettiin, paljonko haihtumishäviö on. Todettiin, että isompaan pulloon tulee punnita $92 \pm 0,5$ g ja pienempään pulloon 9,1 g liuosta.

Näytteenottoon käytetään steriloituja teelusikoita. Näytettä punnitaan 10 g vaa'alla olevaan steriiliin ensilaimennuspulloon. Pullon korkki suljetaan ja odotetaan 15 minuuttia. Sitten pulloa ravistellaan voimakkaasti 1 minuutin ajan, avataan korkki ja pipetoidaan steriilillä

kärjellä 1 ml ensilaimennosta -1 maljalle. Jos tehdään jatkolaimennoksia, niin jatkolaimennospullon korkki avataan ja pipetoidaan pulloon 1 ml ensilaimennosta. Suljettu pullo ravistellaan kevyesti sekaisin ja pipetoidaan siitä 1 ml -2 maljalle. Laimennussarjaa voi tästä vielä jatkaa. Jos näytteestä halutaan tutkia *Bacillus cereus* -itiöiden määrä, ensinäyte lämpökäsitellään ensin padassa 10 minuutin ajan 80 °C lämpötilassa ja jäähdytetään. Tällöin kasvulliset bakteerit kuolevat ja itiöt aktivoituvat muuttumaan kasvullisiksi. Maljoja kasvatetaan ylösalaisin 24 tuntia + 30 °C lämpökaapissa ja maljalle kasvaneet siniset tai sinivihreät pesäkkeet lasketaan. Näytteen *Bacillus cereus* -pitoisuuden laskemisessa noudatetaan Ruokaviraston ohjetta ”Mikrobiologisten tulosten laskeminen”, joka löytyy internetistä. Käytetyt maljat steriloidaan tappopussissa painekattilassa ennen sekajätteenä hävittämistä.

6.2 pH:n mittaaminen

Käytössä oli nesteiden mittaamiseen tarkoitettu pH-mittari, mutta tarkoituksena oli mitata pH kiinteistä näytteistä. Tarvittiin menetelmä, jolla näytteestä tehdään suspensio ilman, että veden lisääminen muuttaa pH:ta. Tammisaaren kaupungin sivuilla ilmoitetaan juomaveden pH:ksi 7,9 (Tammisaaren Vesi, 2020). Lievä emäksisyys saattaisi vääristää pH-mittauksen tulosta, joten vedeksi valittiin tislattu vesi, jota myydään yleisesti akkuvetenä. Laimennussuhteeksi valittiin 1 osa näytettä ja 2 osaa tislattua vettä. Sekoitusvälineenä kokeiltiin ensin sauvasekoitinta, mutta se teki näytteistä vaahtoa jo pienimmällä nopeudella. Seuraavaksi kokeiltiin pyöritellä näytettä dekantterilasissa, mutta se ei ollut tehokasta. Näytteen ja tislattun veden punnitseminen 125 ml pulloon ja ravistaminen osoittautui hyväksi menetelmäksi. Myöhemmissä testeissä voitiin verrata liotusveden ja siinä lionneiden papujen pH:ta. Liotusveden pH mitattiin suoraan liotussaavista ja papujen pH uudella menetelmällä. Menetelmän tulokset olivat 0,1–0,4 pH-yksikköä korkeampia.

7 Raaka-aineiden testaus

Ensimmäiseksi näytteiksi uuden menetelmän kokeilemiseen valittiin kuivat soijapavun ja herneen puolikkaat, molempia kaksi erilaista. Näytteistä tehtiin ensilaimennos, pipetoitiin sitä maljoille ja kasvatettiin maljoja lämpökaapissa 45 tuntia. 1 vrk jälkeen hernemaljoilla ei näkynyt mitään kasvua, mutta toisella soijamaljalla oli valkoinen läiskä. 45 h jälkeen tältä

maljalta havaittiin läiskän lisäksi 2 pientä valkoista pesäkettä. Myös toisella soijamaljalla todettiin nyt 5 valkoista pesäkettä. Hernemaljat olivat edelleen puhtaita. (Taulukko 1). Pesäkkeiden valkoinen väri tarkoitti, että ne eivät olleet *Bacillus cereus*. Koska kasvullisia *B. cereus* ei löytynyt, päätettiin testata herneet vielä itiöiden suhteen. Herneistä tehtiin ensilaimennokset ja annettiin niille itiöiden aktivoimiskäsittely, 10 minuuttia + 80 °C lämpötilassa. Näytteiden annettiin jäähtyä 5 minuuttia huoneenlämmössä ja sitten pipetoitiin 1 ml kuivamaljoille. 24 tunnin kasvatuksen jälkeen kasvua ei ollut havaittavissa, kuten ei myöskään 42 tunnin jälkeen. (Taulukko 1).

Seuraavana tutkittavaksi valittiin jauhemainen tuote, jossa epäiltiin vahvasti oleva *Bacillus cereus*. Tuotteen kahden vuoden takaisesta valmistuserästä oli määritetty runsaasti *B. cereus*, mutta nyt analysoitiin uudempaa erää. Näytteestä tehtiin ensilaimennoksen lisäksi -2 ja -3 laimennokset ja -maljat. 24 h jälkeen -1 maljalla kasvoi 31 sinistä pesäkettä, -2 maljalla 7 pesäkettä ja -3 maljalla 2 pesäkettä. (Taulukko 1). Osa pesäkkeistä oli levinneitä, ehkä jauhon vuoksi. Ensinäytettä ravistettiin juuri ennen pipetointia, mikä saattoi olla virhe.

Taulukko 1. Näytteiden pesäkemäärät Compact Dry -maljalla

Näyte	Kasvulliset (k) vai itiöt (i)	1 vrk pmy	2 vrk pmy
		<i>B.cereus</i> / muut	<i>B.cereus</i> / muut
vihreä herne	k	0/0	0/0
keltainen herne	k	0/0	0/0
soija 1	k	0/1	0/3
soija 2	k	0/0	0/5
soija 1+2 liotettu	k	0/0	0/1
soija 1+2 uunitettu	k	0/0	0/0
vihreä herne	i	0/0	0/0
keltainen herne	i	0/0	0/0
jauhenäyte -1 malja	i	31/0	ei tutkittu
jauhenäyte -2 malja	i	7/0	ei tutkittu
jauhenäyte -3 malja	i	2/0	ei tutkittu

8 Liotuskokeet

Ilman happolisäystä yön yli liotetuista soijapavuista mitattiin kasvullisten *Bacillus cereus* määrä. Ajatuksena oli selvittää, muuttuvatko mahdolliset itiöt kasvullisiksi bakteereiksi

neutraalissa pH:ssa. Liotusvedestä mitattiin aamulla pH 6,7 ja lionneista pavuista 7,1. Papunäytteestä tehtiin pelkkä ensilaimennos, koska arvioitiin bakteereita olevan melko vähän. 27 h kasvatuksen jälkeen malja oli vielä puhdas ja 50 h jälkeen siinä kasvoi yksi valkoinen pesäke. Kasvullisia *Bacillus cereuksia* ei ollut. (Taulukko 1).

Liotetuista pavuista ei tehty muita *B. cereus* -testejä. Hapon vaikutuksen arvioimiseksi tehtiin pH-mittauksia eri hapon määrillä ja eri vaiheissa tempen valmistusta (Taulukko 2).

Taulukko 2. Soijatempen valmistuksessa mitattuja pH-arvoja

	pelkkä happo + vesi	vesi 25 h jälkeen	pavut 25 h jälkeen	pavut uunin jälkeen	22 h tempe
ilman maitohappoa	8,0	6,7	6,9	7,0	7,4
1/3 määrä maitohappoa	2,9	6,0	6,4	6,8	7,3
normaali maitohappo	2,5	4,9	5,0	6,0	6,7

9 Höyrytyskokeet

Papujen ja herneiden kypsennys tehtiin uunissa 100 % höyryohjelmalla. Yön yli lionneet pavut kauhottiin rei'itettyihin teräsvuokiin, joita uuniin mahtuu 15 kpl. Täydessä uunissa voi kypsentää kerrallaan 70 kg papuja. Ensin haluttiin selvittää, kuinka tasaisesti lämpö jakautuu uunin eri osiin. 14 vuoan ja 70 kg:n soijapapuerään sijoitettiin 4 dataloggeria mittaamaan lämpötiloja minuutin välein. Loggerit sijaitsivat ylimmässä, seitsemännessä ja alimmassa vuoassa keskellä sekä seitsemännen vuoan nurkassa, kaikissa puolivälissä papumassaa. Lämpötilan säätö oli 115 °C. Jokaisessa mitatussa kohdassa lämpö kohosi 15–16 minuuttia,

saavutti 99–100 °C lämpötilan ja pysyi siinä höyrytyksen loppuun saakka. Toisessa esikokeessa 60 kg härkäpapuerän keskimmäiseen vuokaan keskelle sijoitettiin 3 dataloggeria: yksi pohjalle, toinen puoliväliin ja kolmas lähelle pintaa. Lämpö nousi kaikissa 12–13 minuuttia ja pysyi 99–100 °C:ssa höyrytyksen loppuun saakka. Lämpötila oli säädetty 120 °C:een. Tuloksista voitiin päätellä, ettei uunin tai vuokan eri osien välillä ole huomioon otettavia eroja höyrytyksen tehokkuudessa.

Ilman happoa liotetuista ja 60 min 100 °C höyrytetystä soijapavuista tutkittiin kasvullisten *B. cereusten* määrä. Uunihöyrytyksen jälkeen mahdolliset hengissä selvinneet *Bacillus cereus* -bakteerit ovat luultavasti aktivoituneet muuttumaan itiömuodosta kasvullisiksi. Tämän päätelmän pohjalta uunin jälkeen otettua näytettä ei lämpökäsitelty itiöiden aktivoimiseksi, vaan pavuista tehtiin ensilaimennos ja pipetoitiin sitä maljalle. Maljaa kasvatettiin 48 h +30 °C lämpökaapissa eikä kasvua havaittu. (Taulukko 1).

Eri lämpötila-aika-yhdistelmien tehokkuutta bakteeri-itiöiden tuhoamisessa arvioitiin *Bacillus cereus* -analyysien sijaan laskemalla teho dataloggereiden mittaaman tiedon pohjalta. Uuniin menevän papukuorman suuruus vaikutti lämpötilan nousunopeuteen höyrytyksen alussa. Täydellä 70 kg määrällä nousu kesti 15 minuuttia, mutta 10–20 kg kuormalla vain 5 minuuttia. Säädetty lämpötila vaikutti hieman papujen lämpötilaan. 120 °C säädöllä maksimilämpö oli 100 °C ja pysyi siinä. 115 °C säädöllä ison papuerän maksimilämpö vaihteli 98–99 °C välillä, mutta lähempänä 99 °C. Pienemmällä papumäärällä samalla säädöllä kuumuus nousi täyteen 100 °C lämpötilaan ja pysyi siinä. 105 °C säädöllä vaihtelu oli 98 ja 99 °C välillä, mutta enemmän 98 °C.

Kirjallisuudesta oli hankala löytää sopivaa D-arvoa *B. cereuksen* itiöille, joten vertailu tehtiin psykrotrofisen *C. botulinumin* pastörintitaulukon pohjalta (Liite 1). D-arvoksi +90 °C lämpötilassa mainitaan noin 1,5 minuuttia ja 6D-arvoksi 10 minuuttia. Dataloggerin pavuista mitaamat yli 84 °C lämpötilat otettiin mukaan laskuihin (data ei ole nähtävissä). Kutakin lämpötilaa vastaavalla Lethal Rate -kertoimella kerrottiin minuutit kyseisessä lämpötilassa ja lopuksi eri lämpöasteiden tulokset laskettiin yhteen. Yhteistulos kertoi, montaako minuuttia +90 °C lämpötilassa lämpökäsittely vastasi. Jakamalla tämä minuuttimäärä 1,5:llä saatiin tietää, kuinka monen kertainen lämpökäsittelyn teho oli verrattuna psykrotrofisen *C. botulinumin* 1D-arvoon. Näin laskettiin tehot neljälle lämpökäsittelylle (Taulukko 3).

Taulukko 3. Lämpökäsittelyjen teho psykrotrofisiin *C. botulinum* -itiöihin

höyrytyskerta	papujen määrä (kg)	höyryuunin lämpötilasäätö (°C)	lämpökäsittelyn kesto (min)	psykrotrofisten <i>C. botulinum</i> -itiöiden vähennys
1.	60	120	25	80 D
2.	70	115	45	145 D
3.	40	115	45	230 D
4.	30	105	60	230 D

10 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Itiöttömät ruokamyrkytysbakteerit tuhoutuvat varmasti tempen valmistuksen molemmissa lämpökäsittelyissä, eivätkä muodosta riskiä. Jo kaksi minuuttia 72 °C lämpötilassa riittäisi kasvullisten bakteerien tappamiseen, mutta tempeprosessin miedompikin lämpökäsittely vastaa useaa minuuttia 90 °C:ssa eli on teholtaan moninkertainen. Pakkauksessaan pastöroidun ja kylmässä säilytettävän tempen suurin mikrobiologinen haaste ovat psykrotrofiset eli kylmässä kasvavat itiölliset bakteerit *Bacillus*- ja *Clostridium*-suvuista. Kylmimmillään tällaiset *B. cereukset* pystyvät kasvamaan +4 °C ja *C. botulinumit* +3 °C lämpötilassa. Riittävän tehokas pastörinti tuhoaa psykrotrofisen *C. botulinumin* itiöt ja tuotteeseen mahdollisesti jo muodostuneen botuliini-toksiinin. ECFF suosittelee pastörintia, joka tuottaa 6D-vähennyksen psykrotrofisen *C. botulinumin* itiöiden määrään. Pastöroinnissa tuotteen laatu kärsii sitä enemmän, mitä kovempi lämpökäsittely on. Tästä syystä pastörinti ei voi olla niin tehokas, että se tappaisi kaikki psykrotrofisen *Bacillus cereuksen* itiöt, jotka ovat huomattavasti psykrotrofisen *C. botulinumin* itiöitä kestävämpiä. Osa psykrotrofisen *B. cereuksen* itiöistä voi jäädä henkiin, mutta kasvu saadaan rajoitettua nopealla jäädytyksellä pastöroinnin jälkeen ja riittävän kylmällä säilytyslämpötilalla. Lisäksi

on tärkeää estää raaka-aineista tuleva suuri itiökuorma tarkkailemalla raaka-aineiden ja varsinkin startterin laatua.

Bacillus cereus -analyysin vaihtoehtoiksi löydettiin neljä menetelmää. Niistä yksi oli sopiva tempetuotannon teollisiin oloihin ja käytettävissä oleviin välineisiin nähden ja muut kolme olivat mikrobiologisiin laboratorioihin tarkoitettuja. Compact Dry -kuivamalja valikoitui joukosta hyvien ominaisuuksiensa ansiosta. Se on käyttövalmis, säilyy huoneenlämmössä 18 kuukautta ja erottelee *B. cereuksen* muista bakteereista luotettavasti ilman varmistusta toisella maljalla. Se on helppokäyttöinen, koska näytettä ei tarvitse levittää ja on pienikokoisena mukava käsitellä sekä lopuksi hävittää jätteenä. Kaikki nämä ominaisuudet olivat yhtä hyviä tai parempia kuin muiden menetelmien maljoilla. Näytteen laimennuksessa todettiin hyviksi 125 ml ja 30 ml polypropeenipullot. Steriloinnit onnistuivat painekattilassa ja kasvatukset lämpökaapissa. pH-mittauksessa pyrittiin välttämään mittausvirheitä. Näytteen ja veden 1:2 laimennussuhde ei laimentanut kiinteän näytteen vetyionikonsentraatiota liikaa ja tislattun veden käyttö vesijohtoveden sijaan poisti yhden mahdollisen virhelähteen.

Compact Dry -menetelmää testattiin ensin kuorittuihin herneen- ja soijapavunpuolikkaisiin. Kahdelle eri herneelle tehtiin sekä kasvullisten bakteerien että itiöiden määrittäminen, mutta *Bacillus cereus* ei havaittu. Kaksi soijapapuerää testattiin, samoin ilman happoa lionneet soijapavut ennen ja jälkeen uunin: ei kasvullisia *B. cereus* -bakteereja. Vaikutti siltä, etteivät kuoritut pavut ja herneet olleet merkittäviä *Bacillus cereuksen* lähteitä. Toisaalta menetelmän toimivuus haluttiin varmistaa näiden puhtaiden näytteiden jälkeen. Mahdollisesti *B. cereusta* sisältävästä kuivasta näytteestä saatiin itiökäsittelyn jälkeen näkymään tyypillistä *Bacillus cereus* -kasvua sekä ensilaimennos- että jatkolaimennosmaljoilla. Tässä työssä pääpaino oli menetelmän kehittämisessä ja järjestelmällisempää näytteiden analysointia tullaan tekemään jatkossa tuotannon ohessa.

Hapon vaikutusta pH-lukemaan tempen valmistuksessa tutkittiin kolmella eri maitohapon määrällä liotusvedessä. Vain nykyinen maitohapon määrä oli riittävä pitämään pavut happamina uunivaiheeseen saakka. Uunihöyrytyksen teho bakteeri-itiöiden tappamisessa on riippuvainen papujen happamuudesta.

Höyrytyskokeissa todettiin lämpöjakauman uunin sisällä olevan hyvin tasainen ja vuoaan keskimmäisten papujen saavan saman verran kuumakäsittelyä kuin pintapapujenkin. Papukuorman suuruus vaikutti suuresti papujen lämpötilan nousunopeuteen, joten pitkiä höyrytyksiä voi suositella täysille uuneille. Uunin lämpötilan säätö 120 °C riitti pitämään papujen lämpötilan 100 °C:ssa, mutta 105 °C säädöllä papujen lämpötila oli noin 1,5 astetta alempi. Tempeprosessin uunihöyrytyksen tehoa verrattiin pastöroinnin tehokkuuteen psykrotrofisen *C. botulinum* itiöiden tappamisessa. Uunissa neljällä höyrytyksellä saavutettiin 80 D – 230 D tehot ja pastöroinnin tavoitetehto on 6 D. Uunihöyrytys on näin laskien 13–38 kertaa tehokkaampi lämpökäsittely kuin pastörointi.

Lähteet

Chromagar. (2021). CHROMagar™ B.cereus Instructions For Use.

http://www.chromagar.com/fichiers/1542790606NT_EXT_068_NOTICE_BC.pdf

ECFF. (2006). Recommendations for the production of prepackaged chilled food.

https://www.ecff.net/wp-content/uploads/2018/10/ECFF_Recommendations_2nd_ed_18_12_06.pdf

EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal* (2005) 175,1-48.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.175>

Evira. (2006). *Bacillus cereus* -bakteerin määrittäminen ja alustava tunnistaminen.

Pesäkelaskentatekniikka. *Menetelmäohje Evira 3406/1*.

HyServe. (n.d.). Compact Dry X-BC.

<https://hyserve.com/produkt.php?lang=en&gr=1&pr=269>

Kärpänoja, P. (2007). Kromogeeniset maljat, periaate, tausta. [https://docplayer.fi/49325996-](https://docplayer.fi/49325996-Kromogeeniset-maljat-periaate-tausta-pauliina-karpanoja-laaduntarkkailupaivat-2007.html)

[Kromogeeniset-maljat-periaate-tausta-pauliina-karpanoja-laaduntarkkailupaivat-2007.html](https://docplayer.fi/49325996-Kromogeeniset-maljat-periaate-tausta-pauliina-karpanoja-laaduntarkkailupaivat-2007.html)

Labema. (N.d.-a). *Bacillus Cereus* (P.R.E.P.) Medium (MYP). [https://www.labema.fi/tuote-](https://www.labema.fi/tuote-NCM0062A)

[NCM0062A](https://www.labema.fi/tuote-NCM0062A)

Labema. (N.d.-b). PEMBA (*Bacillus Cereus* Medium). [https://www.labema.fi/tuote-](https://www.labema.fi/tuote-NCM0165A)

[NCM0165A](https://www.labema.fi/tuote-NCM0165A)

Li, K-Y. (2004). Fermentation: Principles and Microorganisms. Teoksessa Stanfield, P. S.

(toim.), *Handbook of food and beverage fermentation technology*. (ss. 685–700). CRC Press LLC.

Lindström, M., Kiviniemi, K. & Korkeala, H. (2006). Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 108, Issue 1, 15 April 2006, Pages 92-104.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.003>

Mazas, M., López, M., González, I., González, J., Bernardo, A. & Martín, R. (1998). *Journal of Food Safety* Vol 18, Issue1 March 1998 ss. 25–36. [https://doi.org/10.1111/j.1745-](https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1998.tb00199.x)

[4565.1998.tb00199.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1998.tb00199.x)

Nout, M.J.R., Beernink, G. & Bonants-van Laarhoven, T.M.G. (1987). Growth of *Bacillus*

cereus in soyabean tempeh. *International Journal of Food Microbiology*, 4 (1987) ss.

293–301. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90004-3)

- Oxoid. (2021). Product detail. Dehydrated Culture Media. BLOOD AGAR BASE (SHEEP).
http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0854&cat=&c=UK&lang=EN
- Roubos-van den Hil, P.J., Dalmas, E., Nout, M.J.R. & Abee, T. (2010). Soya bean tempe extracts show antibacterial activity against *Bacillus cereus* cells and spores. *Journal of Applied Microbiology*, Volume109, Issue1 July 2010 ss. 137–145.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04637.x>
- Ruokavirasto. (2010). Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. Eviran julkaisuja 1/2010.
https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/julkaisut-/julkaisusariat/julkaisuja/elintarvikkeiden_mikrobiologiset_vaarat.pdf
- Ruokavirasto. (2019a). Elintarvikemikrobiologisten menetelmien ja niille vaihtoehtoisten menetelmien luettelo. <https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/-vertailulaboratoriot/ohjeita-laboratorioille/suositteltavat-menetelmat/>
- Ruokavirasto. (2019). *Ruokamyrkytyksiä aiheuttavia bakteereja*.
<https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/>
- Samson, R.A., van Kooij, J.a. & de Boer, E. (1987). Microbiological Quality of Commercial Tempeh in The Netherlands. *J Food Prot* (1987) 50 (2): 92–94.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.2.92>
- Savolainen, T. (2015). HUSLAB palvelutuotanto, resepti. Veri-malja.
- Suominen, T. (2021). Tiina Suominen, Metropolilab, sähköposti 8.4.2021.
- Shurtleff, W. & Aoyagi, A. (1979). *The Book of Tempeh* professional edition. Harper & Row.
- Tanaka, N., Kovats, S.K., Guggisberg, J.A, Meske, L.M. & Doyle, M.P. (1985). Evaluation of the Microbiological Safety of Tempeh Made from Unacidified Soybeans. *J Food Prot* (1985) 48 (5): 438–441. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.5.438>
- Tammisaaren Vesi. (2020). Ekenäs-centrum-Tammisaaren-keskusta-5.5.2020-V.
<https://www.raseborg.fi/wp-content/uploads/2020/05/Eken%C3%A4s-centrum-Tammisaaren-keskusta-5.5.2020-V.pdf>
- Tibbott, S. (2004). Tempeh: The “Other” White Beancake. Teoksessa Stanfield, P. S. (toim.), *Handbook of food and beverage fermentation technology*. (ss. 671–684). CRC Press LLC.

Liite 1: Psykrotrofisten *Clostridium botulinum* -itiöiden 6D-vähennys. (ECFF, 2006, s. 14).Table 3: Lethal rates for *Clostridium botulinum* (i.e. equivalent heat treatments achieving a Log 6 reduction of *Clostridium botulinum*)¹¹

Temperature (°C)	Time (mins)	Lethal rate
80	270.3	0.037
81	192.3	0.052
82	138.9	0.072
83	100.0	0.100
84	71.9	0.139
85	51.8	0.193
86	37.0	0.270
87	27.0	0.370
88	19.2	0.520
89	13.9	0.720
90	10.0	1.000
91	7.9	1.260
92	6.3	1.600
93	5.0	2.000
94	4.0	2.510
95	3.2	3.160
96	2.5	3.980
97	2.0	5.010
98	1.6	6.310
99	1.3	7.940
100	1.0	10.000

Remarks

- These data are supplied as an example of the necessary process to achieve a Log 6 reduction of psychrotrophic *Clostridium botulinum* type B¹²;
- It is important to note that the values have been extrapolated assuming a linear z-value¹³ of 7°C below 90°C and 10°C above 90°C (reference is 90°C)
- Typical D value¹⁴ for psychrotrophic *C. botulinum* at 90°C is 1.5. Most bacterial spores, including spores from mesophilic *C. botulinum* and cold growing *B. cereus* are much more heat resistant than those from cold growing *C. botulinum* and will not be inactivated by the pasteurisation treatments presented in this table.

¹¹ Taken from *Code Voor de Productie, Distributie en Verkoop van Gekoelde, Lang Houdbare Gepasteuriseerde Maaltijden*, Belgian, Dutch Working Group.

¹² There is some evidence that products containing lysozyme or enzymes with lysozyme activity may increase heat resistance of *Clostridium botulinum* spores. Additional heat treatments and/or use of other hurdles may be required

¹³ z value = temperature change required to increase/reduce the D-value by a factor 10

¹⁴ D is the time required to reduce the number of microorganisms by a factor 10 at a certain temperature