

Jenni Alho

# Lihapasteijan mikrobiologinen säilyvyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

27.10.2014



## Tiivistelmä

Tekijä Otsikko	Jenni Alho Lihapasteijan mikrobiologinen säilyvyys
Sivumäärä Aika	30 sivua + 4 liitettä 27.10.2014
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Elintarviketuotanto ja bioprosessit
Ohjaaja	Lehtori Carola Fortelius
<p>Opinnäytetyössä pyrittiin selvittämään leipomomyymälässä myytyjen lihapasteijoiden säilyvyyttä. Lihapasteijoista haluttiin tietää kauanko tuotteet säilyvät syöntikelpoisina ostopäivän jälkeen sekä jääkaappisäilytyksen vaikutus mikrobiologiseen säilyvyyteen.</p> <p>Mikrobiologista säilyvyyttä tutkittiin määrittämällä lihapasteijoiden kokonaisbakteerimäärä sekä <i>Bacillus cereus</i> -bakteeripitoisuus pesänlaskentatekniikoilla. Kokonaisbakteerimäärä selvitettiin viljelemällä maljavaluna bakteerilaskenta-agarille (PCA). <i>Bacillus cereus</i> -määrä selvitettiin viljelemällä näytteet pintalevityksenä selektiiviagarille (MYP) ja varmistamalla tyypilliset pesäkkeet siirrostamalla veriagarin pinnalle. Tulokset laskettiin pesäkemäärien perusteella ja saatuja mikrobipitoisuuksia verrattiin raja-arvoihin.</p> <p>Tuloksista huomattiin, että lihapasteijoiden mikrobiologinen laatu heikkenee hyvinkin nopeasti. Jo seuraavana päivänä mikrobipitoisuudet olivat raja-arvojen mukaan huonoja ja <i>Bacillus cereus</i> -pitoisuus oli kaksi vuorokautta valmistuksesta jopa ruokamyrkytyksiä aiheuttavalla tasolla. Jääkaappisäilytyksellä huomattiin olevan merkittävä vaikutus tuotteiden mikrobiologiseen säilyvyyteen. Kaikki jääkaapissa säilytetyt tuotteet olivat raja-arvojen mukaan hyviä.</p> <p>Tutkimuksesta saatujen tulosten ansiosta, voidaan leipomomyymälässä ohjeistaa asiakkaita säilyttämään ostamansa tuotteet oikein. Lihapasteijoita ostaessa on tuotteet nautittava joko valmistuspäivän aikana tai säilytettävä jääkaapissa.</p>	
Avainsanat	Säilyvyys, lihapasteija, bakteerilaskenta-agar, <i>Bacillus cereus</i> , pesänlaskenta

## Abstract

Author(s) Title	Jenni Alho Microbiological shelf life of a meat pastry
Number of Pages Date	32 pages + 4 appendices 27 October 2014
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food engineering
Specialisation option	Bioprocessing and quality management
Instructor(s)	Carola Fortelius, Lecturer
<p>This thesis aims to research the self-life of meat pastries sold in a bake house. The purpose of research was to know how long pastries are edible after baking and how storing in a refrigerator affects in microbiological shelf life.</p> <p>The microbiological self-life of pastries was specified by using colony-count techniques. The quantity of aerobic organisms and <i>Bacillus cereus</i> bacteria were specified. Aerobic organisms were researched with plate count agar (PCA), <i>Bacillus cereus</i> was researched with selective agar (MYP) and presumptive colonies were confirmed with sheep blood agar. All colonies were counted, and the method of calculation was used to get the final results. The results were compared to microbiological guidelines.</p> <p>The results showed that meat pastries contaminate fast. Even a day after the baking, microbiological values were over the guidelines. Two days after the baking, the values of <i>Bacillus cereus</i> were high enough to cause a food poisoning.</p> <p>Storing in a refrigerator increased the length of shelf life. All the pastries stored in a refrigerator were edible according to microbiological guidelines.</p> <p>Thanks to the results of this research, the bake house can now inform the customers to store the pastries right. The meat pastries should be eaten on the baking day or stored in a refrigerator.</p>	
Keywords	Shelf life, meat pastry, plate count agar, <i>Bacillus cereus</i> , colony count

## Sisällys

1	Johdanto	1
	KIRJALLINEN OSA	2
2	Tuotteiden säilyvyyteen vaikuttavat tekijät	2
2.1	Pilaantuminen	2
2.2	Sisäiset tekijät	4
2.2.1	Veden aktiivisuus	4
2.2.2	Happamuus	6
2.2.3	Ravinnekoostumus ja säilöntäaineet	7
2.3	Ulkoiset tekijät	7
2.3.1	Säilytyslämpötila	7
2.3.2	Ympäristön hapen määrä	8
2.3.3	Suhteellinen kosteus	8
2.4	<i>Bacillus cereus</i> ja muut bakteerit leipomotuotteissa	9
3	Lihapasteija	10
3.1	Tuotekuvaus ja ainesosat	10
3.2	Lisäaineet	11
3.3	Tuotteiden valmistus	11
3.4	Toimitus ja myynti	13
	KOKEELLINEN OSA	13
4	Tuotteiden säilyvyyden tutkiminen	13
4.1	Tutkimuksen suunnittelu	13
4.2	Kasvualustojen ja peptonisuolaliuoksen valmistaminen	15
4.2.1	Bakteerilaskenta -agar	15
4.2.2	<i>Bacillus cereus</i> -selektiiviagar	15
4.2.3	Veriagar	16
4.2.4	Puskuroitu peptonisuolaliuos	17
4.3	Näytteenkäsittely	18

4.4	Tutkimus ja tulokset	19
4.4.1	Kokonaisbakteerimäärän selvittäminen	19
4.4.2	Kokonaisbakteerimäärän laskeminen	19
4.4.3	<i>Bacillus cereus</i> -bakteerin määrittäminen	21
4.4.4	<i>Bacillus cereus</i> -bakteeripitoisuuden laskeminen	22
4.4.5	Tulosten tarkastelu	25
5	Yhteenveto	26
6	Lähteet	28
Liitteet		
	Liite 1. Prosessikaavio: lihapasteija-aihioiden valmistus	1 s.
	Liite 2. Prosessikaavio: lihapasteijan valmistus	1 s.
	Liite 3. Prosessikaavio: Näytteenkäsittely ja viljelyt	1 s.
	Liite 4. Bakteerilaskenta-agar -viljelyn tulokset	2 s.

## 1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää lihapasteijoiden mikrobiologista säilyvyyttä. Työ toteutettiin yhteistyössä leipomomyymälän kanssa, jossa myydään suuriin eriin pakattuja tuoreita leipomotuotteita. Myymälästä haluttiin selvittää kauanko tuoreet, myymälässä pakatut ja huoneenlämmöstä myytävät, kahvileivät säilyvät syömäkelpoisina. Erityistä kiinnostusta herätti lihapitoisten tuotteiden syömäkelpoisuusajan määrittäminen.

Lain mukaan helposti pilaantuvia leipomotuotteita (esim. lihapasteija ja riisipiirakka) voidaan myyntipaikassa valmistuspäivänä säilyttää huoneenlämmössä. Myymättä jääneet tuotteet on kuitenkin hävitettävä valmistuspäivän lopussa. Kyseisessä myymälässä tuotteita myydään suurissa erissä, jolloin tuotteiden nauttiminen saman päivän aikana on suurimmalle osalle asiakkaita mahdotonta. Asiakkailta tulee myyjille paljon kyselyjä tuotteiden turvallisesta nauttimisajasta. Tähän asti on tyydytty suositteluun tuotteen nauttimista saman päivän aikana tai ylimääräisten tuotteiden pakastamista. (1.)

Tutkittavaksi tuotteeksi valittiin lihapasteija, joka kuuluu helposti pilaantuviin leipomotuotteisiin. Lisäksi se kuuluu myös myymälän suosituimpiin tuotteisiin. Lihapasteijan täyte koostuu pääasiassa lihasta ja riisistä, jotka ovat molemmat helposti pilaantuvia raaka-aineita. Tuotteiden säilyvyyttä päätettiin arvioida mikrobiologisesti, tutkimalla tuotteiden kokonaispesäkemääriä eripituisten säilytysaikojen jälkeen. Lisäksi tuotteista haluttiin määrittää *Bacillus cereus* -pitoisuus juuri täytteen sisältämän riisin ja lihan vuoksi. Liha ja riisi ovat *Bacillus cereuksen* yleisimpiä välittäjäelintarvikkeina. *Bacillus cereusta* pidetään yhtenä yleisimpänä ruokamyrkytysten aiheuttajana. (2, s. 188; 3, s.8.)

## KIRJALLINEN OSA

### 2 Tuotteiden säilyvyyteen vaikuttavat tekijät

#### 2.1 Pilaantuminen

Pilaantumisella tarkoitetaan sitä, kun esimerkiksi leipomotuotteiden maku, haju, ulkonäkö tai muut ominaisuudet muuttuvat niin, etteivät tuotteet enää kelpaa myytäväksi tai nautittaviksi. Pilaantumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat biokemialliset reaktiot, fysikaaliset tekijät, tuholaiset sekä mikrobit. Pilaantuneet tuotteet voivat aiheuttaa terveydelle vaaraa sekä valmistajalle taloudellista tappiota. (4 ; 5, s. 113.)

Yleinen rasvaisten leipomotuotteiden pilaajista on biokemiallinen reaktio, joka aiheuttaa rasvojen härskiintymisen tai eltaantumisen. Tämä johtuu tuotteesta vapautuvien entsyymien käynnistämästä tyydyttymättömien rasvahappojen hapettumisesta. Reaktion johdosta tuotteeseen muodostuu laatua heikentäviä pahanhajuisia ja -makuisia yhdisteitä. Hapettumisesta voidaan estää käyttämällä esimerkiksi reaktiota vastustavia lisäaineita. Hapettumisenestoaineet ovat yleensä lisättyinä käytettävään rasvaan, jolloin niitä ei tarvitse erikseen lisätä leipomotuotteisiin. (4 ; 5, s. 61, 112.)

Fysikaalisesti tuotteet pilaantuvat kosteuden siirtymisellä, rakenteen kovenemisella sekä tärkkelyksen uskiteytymisellä. Tuotteen vanhetessa kosteus siirtyy tuotteen sisuksesta kohti ulko-osia, jolloin menetetään rapea ulkokuori. Parhaiten tämän huomaa lihapasteijoista, joiden rapea lehtitaikina sitkistyy. Leipomotuotteet yleensä myös kovenevat, koska paiston jälkeen lämpötila laskee ja tärkkelys uskiteytyy, jolloin tuotteet kovenevat. Tämä ei ole kuitenkaan yleistä esimerkiksi lihapasteijoissa, koska ne sisältävät paljon kosteutta pidättävää rasvaa. Rasva vähentää tärkkelyksen liisteröitymistä paiston aikana. Pakkaamisella voidaan jonkin verran vaikuttaa fysikaaliseen säilyvyyteen. Riittävä jäähdytys ennen muovipusseihin pakkaamista edesauttaa tuotetta säilyttämään tuoreen rakenteensa. Lämpimänä pussiin pakatut tuotteet luovuttavat kosteutta pussin sisäpinnoille, jolloin ulkokuori kostuu nopeammin. (5, s. 112 - 113.)

Tuholaisia ovat elintarviketuholaiset, sisätilojen tuholaiset, satunnaiset vierailijat ja haittaeläimet. Ne ovat haitallisia levittäessään sairauksia, liatessaan, pilatessaan sekä tuhotessaan pakkauksia. Elintarviketuholaisina pidetään kuoriaisia ja lentäviä hyönteisiä, jotka elävät etenkin kuivissa tuotteissa. Sisätilojen tuholaisia ovat esimerkiksi sokeritoukat ja torakat, jotka elävät yleensä muualla kuin elintarvikkeessa. Ne kuitenkin voivat saastuttaa elintarvikkeet välillisesti. Satunnaisina vierailijoina pidetään esimerkiksi muurahaisia ja hämähäkkejä, jotka elävät varsinaisesti ulkona. Ne voivat aiheuttaa hygieniaongelmia leipomossa. Hiiret, rotat ja linnut ovat haittaeläimiä, jotka saastuttavat elintarvikkeita muun muassa ulosteillaan. Tuholaisia voidaan estää esimerkiksi huolehtimalla puhtaudesta, järjestyksestä, jätehuollosta, asianmukaisesta varastoinnista sekä pitämällä tuotantolaitoksen ikkunat ja ovet suljettuina. (6.)

Yleisin elintarvikkeiden pilaantumiseen vaikuttava tekijä on mikrobien kasvu tuotteissa. Pilaajamikrobeja voivat olla bakteerit, virukset, homeet, hiivat sekä loiset, joista bakteerit, hiivat ja homeet ovat yleisimpiä leipomotuotteiden pilaajamikrobeja. Mikrobeja pääsee tuotteisiin muun muassa raaka-aineista, työympäristöstä sekä tuotteita valmistavasta henkilöstöstä. Tuotteiden paistaminen tappaa yleensä elävät suolut, mutta jotkin bakteerit ja homeet muodostavat kuumuutta, kuivuutta sekä kemiallisia aineita kestäviä lisääntymiskykyisiä itiöitä. Itiöt muuttuvat jakautumiskykyiksi soluiksi suotuisissa olosuhteissa. Tällöin mikrobien määrä lisääntyy, jolloin tuote pilaantuu ja voi pahimassa tapauksessa olla terveydelle vaarallinen, aiheuttaen ruokamyrkytyksiä. (7.)

Mikrobit lisääntyvät suotuisissa oloissa ajan funktiona, joten aika vaikuttaa oleellisesti tuotteiden pilaantumiseen. Ajan lisäksi mikrobikasvuun vaikuttavat tuotteiden sisäiset ja ulkoiset tekijät, joista on kerrottu tarkemmin kappaleissa 2.2 ja 2.3. Sisäisiä tekijöitä ovat veden aktiivisuus, pH, ravinnekoostumus ja lisäaineet. Ulkoisia tekijöitä ovat säilytyslämpötila, ympäröivän hapen määrä sekä suhteellinen kosteus. Tuotteiden säilyvyyttä voidaan parantaa asettamalla tuotteiden sisäiset ja ulkoiset tekijät mikrobien kasvulle epäedullisiksi. (5, s. 117; 8, s. 240.)



## 2.2 Sisäiset tekijät

### 2.2.1 Veden aktiivisuus

Mikrobien solun jakautumiseen liittyvät toiminnot tapahtuvat kaikki vesifaasissa, joten ne tarvitsevat elossa pysymiseen ja lisääntymiseen vettä. Veden aktiivisuudella ( $a_w$ ) tarkoitetaan tuotteen sitoutumattoman eli vapaan veden määrää. Vesi voi olla sitoutuneena valmistusaineisiin esimerkiksi sokereihin, joten tuotteen vesipitoisuus ei ole sama asia kuin tuotteen vesiaktiivisuus. Veden aktiivisuusarvo voi vaihdella nollan ja yhden välillä, joista arvo yksi on puhtaan veden arvo. Liuenneet pienimolekyyliset aineet, kuten sokeri ja suolat, laskevat tuotteen  $a_w$ -arvoa. Tämän vuoksi paljon sokeria sisältävien tuotteiden  $a_w$ -arvo on matala ja ne säilyvät yleensä hyvin, koska mikrobit eivät pysty kasvamaan niissä. (9, s. 20; 5, s. 118.)

Tuotteen  $a_w$ -arvo määritetään näytteen veden höyrynpaineen ja samassa lämpötilassa olevan puhtaan veden höyrynpaineen suhteella eli  $a_w = p/p_0$ . Aktiivisuus voidaan myös määrittää ilman suhteellisen kosteuden avulla eli  $a_w = ERH/100$ . ERH on ilman suhteellinen kosteus suljetussa tilassa, jossa ilman kosteus on tasapainossa tutkittavan näytteen kosteuden kanssa. (5, s. 119.)

Valmiiden leipomotuotteiden veden aktiivisuusarvot vaihtelevat yleensä välillä 0,80 - 1,0. Raaka-aineina käytettävien hillojen  $a_w$ -arvo voi olla 0,70 - 0,80 ja jauhojen jopa 0,60. Pilaajabakteerit ovat hyvin vaativia vesiaktiivisuuden suhteen. Useimmat niistä tarvitsevat kasvuunsa yli 0,90:n  $a_w$  arvoa ja ruokamyrkytyksiä aiheuttavat bakteerit jopa yli 0,95:n arvoa. Esimerkiksi *Bacillus cereus* -bakteerin  $a_w$ -arvon tulee olla vähintään 0,95. Homeet ja hiivat lisääntyvät kuivemmissakin. Homesienille riittää yleensä vähintään 0,80:n arvo ja hiivoille vähintään arvo 0,88. Mikrobeilta löytyy jonkin verran lajin sisäistä vaihtelua, joten  $a_w$ -arvot eivät ole pitäviä. On löydetty joitakin homeita, jotka ovat kasvaneet vesiaktiivisuuden ollessa vain 0,61. Lisääntymiseen vaadittavia minimivesiaktiivisuusarvoja on esiteltyinä taulukossa 1. Leipomotuotteiden säilyvyyttä voidaan parantaa laskemalla vesiaktiivisuutta esimerkiksi kuivamalla, lisäämällä soluutteja (esim. sokeria) sekä pakastamalla. (8, s. 245 - 246; 5, s. 120; 7. s. 20.)

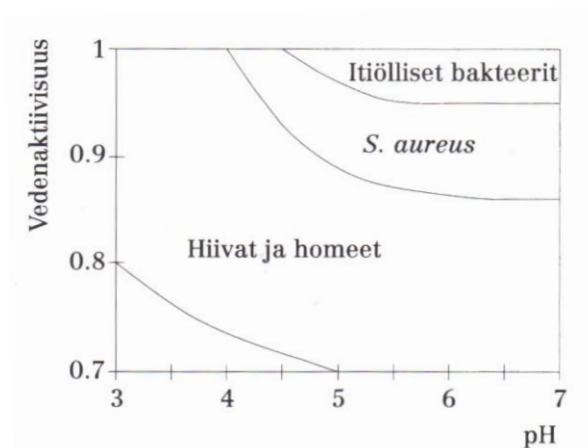
Taulukko 1. Ruokamyrkytyksiä ja elintarvikevälitteisiä infektioita aiheuttavien bakteerien kasvuvaatimukset (10, s. 13)

Bakteeri	Lämpötila		pH	aw minimi	NaCl %, estää kasvun	Erityispiirteitä
	Kasvualue °C	Optimi °C	Kasvualue			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3 – 45	15-20 tai 22-37	4,5 – 10,0	0,91	3,50 %	Eri kantojen kasvuominaisuudet vaihtelevat
<i>Bacillus cereus</i>	4 – 50	30 – 37	4,9 – 9,3	0,95	10,00 %	Itiöllinen, tuottaa enterotoksiineja
<i>Campylobacter spp.</i>	30 – 45	37–42	4,9 – 9 0	0,99	2,50 %	Mikroaerofiilisiä
<i>Clostridium botulinum A</i>	10 – 48	35	4,7 – 8,9	0,94	5,50 %	Itiöllinen, tuottaa neurotoksiineja
<i>Clostridium botulinum B</i>	Vaihtelee	30 – 35	4,7 – 8,9	0,94	5,50 %	Itiöllinen, tuottaa neurotoksiineja
<i>Clostridium botulinum E</i>	3 – 45	30	4,8 – 8,9	0,97	5,50 %	Itiöllinen, tuottaa neurotoksiineja
<i>Clostridium perfringens</i>	10 – 54	43	5,0 – 8,5	0,93	6-8 %	Itiöllinen, tuottaa enterotoksiineja
<i>Escherichia coli enterohemorraaginen</i>	7 – 50	30 – 40	4,4 – 9,0	0,95	8,50 %	Tuottaa Shigatok-siinin kaltaisia toksineja
<i>Listeria monocytogenes</i>	-0,4 – 44	35 – 37	4,1 – 9,6	<0,92	>10,0 %	Lisääntyy jääkaappilämpötilassa
<i>Salmonella spp.</i>	5 – 46	35 – 37	4,5 – 9,5	0,95	9,00 %	
<i>Shigella spp.</i>	7 – 46	37	2,5 – 9,2	0,95	>5,0 %	Huono kilpailija elintarvikkeissa
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 – 48	37 – 40	4,0 – 9,8	0,86	>15,0 %	Tuottaa enterotoksiineja
<i>Vibrio cholerae</i>	8 – 42	30 – 35	5,0 – 10,6	>0,95	10,00 %	Vedessä ja kalastustuotteissa
<i>Vibrio vulnificus</i>	8 – 43	37	5,0 – 10,0	0,96	0 % tai >8,0 %	Merivedessä ja kalastustuotteissa
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5 – 42	30 – 37	4,8 – 11,0	0,94	0 % tai >10,0 %	Merivedessä ja kalastustuotteissa
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-2 – 44	25 – 29	4,0 – 10,0	0,96	>5,0 %	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	5 – 43	25 – 29	5,0 – 9,6	0,96	>3,5 %	Muistuttaa kasvuvaatimuksiltaan <i>Y. Enterocoliticaa</i>

## 2.2.2 Happamuus

Happamuudella eli pH:lla on suuri vaikutus mikrobien lisääntymiseen leipomotuotteissa. Suurin osa mikrobeista tarvitsee kasvuunsa neutraalin pH:n. Varsinkin bakteerit ovat vaativia pH:n suhteen, ja ne lisääntyvätkin parhaiten pH:n ollessa 5.0 - 8.0 välillä. Epäsuotuisa pH mm. estää entsyymien toimintaa sekä vaikuttaa ravinteiden kuljettamiseen bakteerisolussa. On kuitenkin olemassa joitakin bakteerilajeja, jotka voivat kasvaa myös pH:n ollessa alle 4.0, esimerkiksi maitohappobakteeri. Homeet ja hiivat sietävät paremmin pH:n vaihteluja. Homesienet voivat kasvaa happamuusalueella 0 - 11 ja hiivat noin 1.5 - 8.5 alueella. Taulukossa 1 on esitelty joidenkin mikrobien pH optimit. (5, s. 119; 9, s. 19; 8, s. 241)

Leipomotuotteiden pH vaihtelee välillä 4 - 8. Hyvin happamat leivät pilaantuvatkin lähinnä homehtumalla, koska pH on liian matala monien bakteerien lisääntymiseen. Neutraalimmat leipomotuotteet, kuten riisipuurolla täytetyt riisipiirakat, tarjoavat optimaalisen pH:n ruokamyrkytyksiä aiheuttavien bakteerien kasvuun. Tuotteiden säilyvyyttä voidaankin parantaa alentamalla pH:ta esimerkiksi lisäämällä sitruunahappoa. Mikrobien kasvuun vaikuttavat pH:n lisäksi myös yhteisvaikutus tuotteen  $a_w$ -arvon kanssa. Esimerkiksi jos tuotteen  $a_w$ -arvo on matala pH:n ollessa neutraali, lisääntyy tuotteessa todennäköisesti vain hiivat ja homeet. Kuvassa 1 on esitettyä veden aktiivisuuden ja happamuuden yhteisvaikutus. (5, s. 117 - 119)



Kuva 1. Veden aktiivisuuden ja happamuuden yhteisvaikutus mikrobien kasvuun (5, s. 118)

### 2.2.3 Ravinneoostumus ja säilöntäaineet

Mikrobit tarvitsevat lisääntyäkseen veden ja suotuisten kasvuolosuhteiden lisäksi sopivasti ravintoa. Leipomotuotteet sisältävät yleensä mikrobikasvuun soveltuvia ravinteita. Mikrobit tarvitsevat energianlähteen, typenlähteen, vitamiineja ja vastaavia kasvutekijöitä sekä mineraaleja. Energianlähteenä käytetään tuotteissa olevia sokeita, alkoholeja ja aminohappoja. (9, s. 21.)

Säilöntäaineilla voidaan parantaa tuotteen säilyvyyttä hidastamalla mikrobien lisääntymistä. Säilöntäaineita voivat olla tuotteessa luontaisesti olevat tai lisätyt aineet, ne voivat olla myös luonnollisia tai synteettisesti valmistettuja. Elintarvikkeiden luontaisia antimikrobisia aineita löytyy muun muassa mausteista (valkosipulin allisiini) ja kasveista (kahvin kofeiinihappo). Leipomotuotteissa käytettäviä kemiallisesti valmistettuja säilyvyyttä parantavia lisäaineita ovat mm. kaliumsorbaatti (E202), sorbiinihappo (E200). (9, s. 22; 10.)

## 2.3 Ulkoiset tekijät

### 2.3.1 Säilytyslämpötila

Tuotteiden säilytyslämpötilalla voidaan merkittävästi vaikuttaa mikrobien lisääntymiseen. Mikrobit voidaan jakaa kolmeen ryhmään optimikasvulämpötilojensa perusteella. Termofiilit eli lämpöä suosivat mikrobit lisääntyvät parhaiten 55 - 65 °C:n lämpötilassa. Mesofiilit suosivat 20 - 40 °C:n lämpötilaa ja psykrofiilit eli kylmää sietävät mikrobit kasvavat pakkaslukemista 20 °C:n lämpötilavälillä. Optimikasvulämpötila on välillä 10 - 15 °C. (5, s. 120; 9, s. 22.)

Pilaajamikrobeja löytyy kaikista lämpötilaryhmistä, mutta leipomotuotteiden pilaantumisen kannalta merkittävimmät bakteeriryhmät kuuluvat mesofiileihin. Oikealla, tarpeeksi alhaisella, säilytyslämpötilalla voidaankin oleellisesti pidentää tuotteiden säilyvyyttä. Esimerkiksi liha- ja riisipiirakat ovat huoneenlämmössä säilytettynä päivän tuotteita, mutta heti valmistuksen jälkeen kylmässä säilytetyt lihapiirakat säilyvät jopa viikon.

Homeet ja hiivat kasvavat parhaiten lämpimässä. Homeiden optimilämpötila on välillä 18 - 25 °C ja hiivojen noin 30 °C. Molemmat voivat kasvaa myös huomattavasti alemmissakin lämpötiloissa. Taulukossa 1 on esitelty ruokamyrkytyksiä aiheuttavien bakteerien optimilämpötiloja. (5, s. 120.)

### 2.3.2 Ympäröivän hapen määrä

Ympäröivän hapen määrällä pystytään vaikuttamaan oleellisesti mikrobien kasvuun tuotteessa. Osa mikrobeista tarvitsee happea soluhengitykseensä ja osa mikrobeista ei pysty lisääntymään hapen läsnäollessa. Happea tarvitsevia mikrobeja kutsutaan aerobisiksi. Näitä ovat esimerkiksi homeet. Hapettomia oloja suosivia kutsutaan anaerobeiksi. Osa mikrobeista voi lisääntyä sekä happipitoisessa että hapetomissa olotiloissa. Näitä ovat esimerkiksi hiivat. Näitä kutsutaan fakultatiivisiksi anaerobeiksi sekä mikroaerofiileiksi. Mikroaerofiilit tarvitsevat happea kasvuun, mutta liika happipitoisuus estää kasvun. Taulukossa 1 on esitelty eräiden mikrobien happivaatimukset. (8, s. 248; 5, s. 120.)

Mikrobien happivaatimuksia käytetään hyödyksi suojakaasupakkaamisessa. Suojakaasupakkaamisessa pakkauksen sisälle jäävän ilman koostumus muutetaan mikrobikasvulle epäedulliseksi. Suojakaasuina käytetään esimerkiksi hiilidioksidia ja typpeä tai näiden seoksia. Kaasukoostumus valitaan aina tuotekohtaisesti. Leipomoteollisuudessa suojakaasupakkaamista käytetään muun muassa esipaistettujen leipien ja valmiiden, pitkään säilyvien, kakkupohjien pakkaamisessa. (5, s. 104.)

### 2.3.3 Suhteellinen kosteus

Säilytysympäristön suhteellisella kosteudella on vaikutusta elintarvikkeen pinnan vesiaktiivisuuteen. Vesiaktiivisuusarvoltaan matalat tuotteet voivat kostua, jos ilman suhteellinen kosteus on suuri. Kostumisen vuoksi pinnan  $a_w$  -arvo voi nousta pilaa-jamikrobien kasvulle suotuisalle tasolle, jolloin tuotteen mikrobipitoisuus lisääntyy. Tämä voi aiheuttaa tuotteiden ennen aikaista pilaantumista. (9, s. 22; 5, s. 119.)

## 2.4 *Bacillus cereus* ja muut bakteerit leipomotuotteissa

*Bacillus cereus*, jonka esiintymistä lihapasteijoissa tutkitaan tässä insinööriyössä, on grampositiivinen, hemolyyttinen ja fakultatiivisesti anaerobinen sauvabakteeri. Se itiöi-tyy helposti, eikä ole kasvuympäristönsä suhteen vaativa. *Bacillus cereus* pystyy li-sääntymään sekä aerobisesti että anaerobisesti lämpötilan ollessa välillä 4 - 50 °C ja pH:n ollessa 4,9 - 9,3. Minimi  $a_w$  -arvo on 0,95 (taulukko 1). Sitä esiintyy yleisesti maa-perässä, ihmisten ja eläinten suolistossa sekä elintarvikkeissa, kuten viljassa, riisissä, lihassa, kasviksissa ja maidossa. (8, s. 26 - 27; 9, s. 35; 2, s. 8.)

*Bacillus cereus* on yleinen ruokamyrkytyksiä aiheuttava bakteeri, joka aiheuttaa kahta erilaista ruokamyrkytysmuotoa. Bakteerin erittämä enterotoksiini aiheuttaa ripulimuo-  
don ja kereulidi-toksiini oksennusmuodon. Näistä yleisempi on oksennusmuoto. Ente-  
rotoksiinia muodostuu bakteerin lisääntyessä ohutsuolessa ja kereulidi-toksiinia bak-  
teerin lisääntyessä ruoassa. Useimmiten ruokamyrkytyksen aiheuttajana on ollut kon-  
taminoitunut riisi, jota on keitetty kerralla paljon ja jätetty kuivumaan lämpimään myö-  
hempää käyttöä varten. Tällöin *Bacillus cereus* on päässyt lisääntymään suotuisissa  
olosuhteissa muodostaen kereulidi-toksiinia. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavat infektiota-  
nokset on kuvattuna taulukossa 2. (8, s. 26 - 27; 9, s. 35 - 37.)

Taulukko 2. *Bacillus cereus* aiheuttamien ruokamyrkytysten ominaisuudet (9, s. 37)

Ominaisuus	Ripulimuoto	Oksennusmuoto
Toksiini	Enterotoksiini(t)	Kereulidi
Infektioannos	$10^5 - 10^7$ solua	$10^5 - 10^8$ solua
Toksiinin muodos- tumisaikka	Ohutsuoli	Elintarvike
Itämisaika	8 - 16 h	0,5 - 5 h
Taudin kesto	12 - 24 h	6 - 24 h
Oireet	Vatsakivut, ve- tinen ripuli, pa- hoinvointi	Pahoinvointi, oksentelu, huonovointisuus, joskus ripuli

*Bacillus cereusta* ei pystytä poistamaan kokonaan elintarvikkeista sen laajan esiintymisen vuoksi. Myrkytystapauksia pyritään ehkäisemään pitämällä bakteerimäärä niin pienenä, ettei se ylitä infektiomääriä. Bakteerimäärä voidaan pitää kurissa jäähdyttämällä keitetyt elintarvikkeet, jotka aiotaan säilyttää, nopeasti alle 7 °C lämpötilaan. Toinen keino on säilyttää ruoka jatkuvasti 60 °C ennen sen nauttimista. Myös keittiöhygienialla on vaikutusta. Nautittavat ja valmiit elintarvikkeet on suojattava siten, ettei niihin pääse multaa tai pölyä. (8, s. 28.)

Muita leipomotuotteiden raaka-aineissa esiintyviä pilaajabakteereita ovat muun muassa *Salmonella*, koliformiset bakteerit, *Clostridium perfringens*, mesofiilliset aerobit, aerobiset bakteerit, enterobakteerit, *Listeria* sekä *Staphylococcus aureus*. *Bacillus cereuksen* tavoin, näistä suurin osa on ruokamyrkytyksiä aiheuttavia bakteereja, joita on valmiina tuotteissa, mutta niiden pitoisuudet eivät ole terveydelle vaarallisissa rajoissa. Jos valmiita tuotteita kuitenkin säilytetään väärin tai tuotannossa on toimittu epähygieenisesti, voi bakteeripitoisuus nousta ja tuote aiheuttaa ruokamyrkytyksiä. Tärkeimpiä tekijöitä tuoteturvallisuuden parantamisessa onkin hyvät raaka-aineet, hyvä tuotantohygieenia, kylmäsäilytys ja lyhyet myyntiajat. (12; 9, s. 238.)

### 3 Lihapasteija

#### 3.1 Tuotekuvaus ja ainesosat

Lihapasteija on jauhelihalle ja riisillä täytetty, voitaikinaan leivottu suolainen leivonnainen. Tuotteen valmistukseen on käytetty vehnäjauhoja, vettä, osittain kovetettua kasvirasvaa, sian- ja naudanjauhelihaa, kasviöljyä, mausteita (sipuli, maustepippuri, sinappijauhe, valkosipuli, korianteri), riisiä, ohraa, soijaproteiinia, suolaa, glukoosia, perunakuitua, lisäaineita E471, E475, E621, E1422, E150d sekä aromit (liha, lipstikka, valkopippuri, selleri, muskottipähkinä, mustapippuri ja kurkuma).

### 3.2 Lisäaineet

Emulgointiaineina tuotteessa on käytetty lisäaineita E471 ja E475 eli rasvahappojen mono- ja diglyseridejä sekä polyglyseroliestereitä. Emulgointiaineet eli emulgaattorit toimivat pinta-aktiivisina aineina, alentaen pintajännitystä ja näin lisäämällä taikinan pysyvyyttä. Niiden tarkoituksena onkin parantaa taikinan rakennetta sekä nopeuttaa sen valmistusta. (11; 5, s. 50.)

Mononatriumglutamaattia eli E621:ta on käytetty arominvahventeena. Se on glutamiinihapon suola, jonka tarkoitus on parantaa tuotteen makua. Stabilointi- ja sakeuttamisaineena on käytetty muunnettua maissitärkkelystä eli E1422:ta. Sen tarkoituksena on parantaa tuotteen rakennetta sekä kapseloida makua ja hajua. Väriä on parannettu käyttämällä E150d:tä, joka on ammoniumsulfittimetelmän sokerikulööri. (11.)

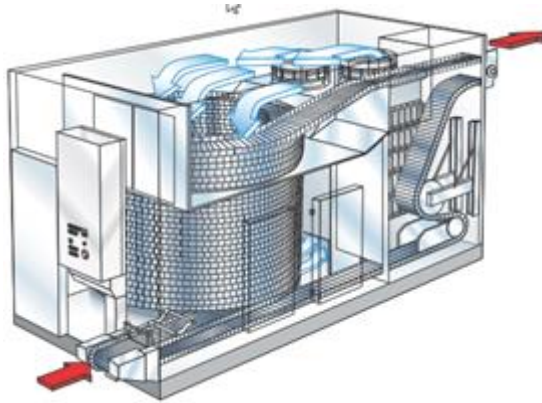
### 3.3 Tuotteiden valmistus

Lihapasteijoiden valmistus alkaa lihapasteija-aihioiden valmistamisella. Aihoiden taikinan raaka-aineet annostellaan automaattisesti ja sekoitetaan taikinaksi. Taikina ajetaan linjaa pitkin taikinatuuttiin, jolla muotoillaan ylä- ja alataikinat. Taikinoiden väliin sijoitetaan rasva, joka laminoidaan taikinaan. Valmiin taikinan annetaan levätä noin 17 °C:n lämpötilassa pari tuntia. Täytteen aineet sekoitetaan keskenään. (13.)

Valmis täyte annostellaan muotoiltuihin taikina-aihioiden ja leivotaan lihapasteijoiksi. Valmiit lihapasteija-aihiot pakastetaan spiraalipakastimella (ks. kuva 2). Tuotteet kulkeutuvat kuljetinhihnaa pitkin spiraalipakastimeen, jonka sisällä ne kulkevat spiraalin muotoista rataa noin -30 °C:n lämpötilassa. Pakastimen jälkeen jäiset tuotteet kuljetetaan metallipaljastimen läpi pakkaus koneelle. Tuotteet pakataan laatikoihin ja pinotaan lavoille. Valmiit tuotelavat kuljetetaan pakaskuljetuksena pakkasvarastolle säilytykseen. Lihapasteija-aihioiden valmistus on kuvattuna prosessikaaviossa (liite 1).



Pakkasvarastolta aihioita lähetetään tarvittavat määrät leipomoille, joissa ne säilytetään pakastimessa noin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilassa tuotteiden paistamiseen asti. (13; 14.)



Kuva 2. Spiraalipakastin (14)

Tuotteiden valmistaminen myyntiin aloitetaan pellittämisestä eli ladonnasta. Lihapasteija-aihiot ladotaan voideltujen peltien päälle ja nostetaan pinnavaunuihin. Aihioita sulatetaan huoneenlämmössä noin kaksi tuntia. Sulaneet ahiot paistetaan pinnavaunu-uunissa  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa noin 20 minuuttia. Täysin jäähtyneet lihapasteijat pakataan paperoituihin kierrätettäviin muovilaatikoihin, jotka pinotaan ja toimitetaan lähettämöön. Kuvassa 3 on esitelty valmiita lihapasteijoita leipomolaatikossa. Irtotuotteiden valmistuksen prosessikaavio kuvattuna liitteessä 2.



Kuva 3. Valmiit lihapasteijat leipomolaatikossa

### 3.4 Toimitus ja myynti

Toimitusvalmiit leipomolaatikot pinotaan kuormalavoille. Määrästä riippuen vaihtelee käytetäänkö FIN- tai EUR-lavoja. Pinotut lavat siirretään myymälän takahuoneeseen, josta myymälän henkilökunta purkaa kuorman.

Tuotteet pakataan läpinäkyviin muovipusseihin 8 - 20 kpl:n erissä. Tuotepussit asetellaan leipomolaatikoihin, jotka pinotaan sopivankorkuisiksi myyntipinoiksi ja viedään myymälään. Tuotteita myydään huoneenlämmöstä (n. 20 °C) valmistuspäivän ajan. Tuotteet saadaan myyntiin noin klo 7.00 - 11.00 välisenä aikana, ja määrästä riippuen niitä myydään enintään klo 18.00 asti.

## KOKEELLINEN OSA

### 4 Tuotteiden säilyvyyden tutkiminen

#### 4.1 Tutkimuksen suunnittelu

Tuotteiden mikrobiologista säilyvyyttä tutkittiin määrittämällä tuotteiden bakteeripitoisuus. Aerobisten bakteerien määrää tutkittiin kvantitatiivisesti pesänlaskentatekniikalla Eviran ohjeiden mukaisesti. Näin saatiin tietoon bakteerien kokonaispitoisuus. Määrittäminen tapahtui viljelemällä näytteestä valmistettua liuosta kasvualustalle, jolta voitiin inkuboinnin jälkeen laskea kasvaneiden pesäkkeiden määrä. Laskettua pesäkemäärää verrattiin ohjearvoihin (taulukko 3), joiden perusteella arvioitiin kelpaako tuote nautittavaksi vai ei.

Lisäksi tuotteista haluttiin määrittää *Bacillus cereus* -pitoisuus, koska *Bacillus cereus* -bakteerin tiedetään aiheuttaneen ruokamyrkytystapauksia muun muassa lihapiirakoiden ja -pasteijoiden välityksellä. Täytteen sisältämän lihan ja riisin vuoksi, väärin säilytetyn lihapasteijan uskotaan aiheuttavan ruokamyrkytyksiä melko lyhyelläkin aikavälillä. *Bacillus cereuksen* tiedetään myös olevan tyypillinen riisin pilaajabakteeri. (15, s.7.)

*Bacillus cereus* -pitoisuus selvitettiin pesänlaskentatekniikalla, mutta viljely suoritettiin selektiiviagarille ja tyypilliset pesäkkeet varmistettiin. Viljelyistä saatujen tulosten perusteella laskettiin kokonaisbakteeripitoisuus ja alustavan *Bacillus cereus* -bakteerin pitoisuus pesäkkeitä muodostavina yksiköinä grammassa näytettä (pmy/g). Saatuja tuloksia verrattiin taulukossa 3 esitettyihin ohjearvoihin.

Taulukko 3. Ohjearvot bakteerien määrälle elintarvikkeessa (pmy/g) (16)

Mikrobi	Hyvä	Välttävä	Huono
Aerobiset bakteerit	alle 100 000	100 000 – 1 000 000	yli 1 000 000
<i>Bacillus cereus</i>	alle 100	100 – 500	yli 500

Koska lihapasteijan veden aktiivisuusarvo ( $a_w$ ) arvioitiin yrityksessä 0,8 - 0,95 väliselle alueelle ja pH neutraalille alueelle, voitiin olettaa tuotteissa tapahtuvan mikrobiologista pilaantumista lyhyelläkin aikavälillä. Kuvasta 1 (s. 6) nähdään korkean  $a_w$ -arvon sekä neutraalin pH:n suotuisa yhteisvaikutus bakteerikasvulle. Näinollen päädyttiin tutkimaan lihapasteijoiden mikrobimäärien eroja valmistuspäivänä, vuorokauden jälkeen ja kahden vuorokauden jälkeen valmistuksesta. Kokeet pyrittiin tekemään noin 12, 36 ja 60 tunnin kuluttua tuotteiden valmistuksesta. Näin jäljiteltiin ajankohtaa, jolloin töistä kotiin palaava asiakas nauttii pasteijat.

Huoneenlämmön ja jääkaappisäilytyksen eroa pasteijoiden mikrobipitoisuuteen selvitettiin valitsemalla näytteiden säilytyslämpötiloiksi 20 °C tai 3 °C. Kaikki näytteet säilytettiin suljettuina samanlaisissa muovipusseissa, joten ympäröivän hapen vaikutusta ei selvitetty tässä työssä.

Viljelyt suoritettiin yhteensä kuudesta erilaisesta näytevaihtoehdosta, joista kustakin tehtiin rinnakkaiset näyteliuokset sekä näyteliuoksista rinnakkaiset viljelyt. Jokainen koe toistettiin kaksi kertaa. Kokeet tehtiin satunnaistetussa järjestyksessä tuntemattomien häiritsevien tekijöiden minimoimiseksi.

## 4.2 Kasvualustojen ja peptonisuolaliuoksen valmistaminen

### 4.2.1 Bakterilaskenta-agar

Bakterilaskenta-agaria valmistettiin kokonaisbakteeripitoisuuden määrittämiseen noin 400 maljavalua varten. Valmistuksessa käytettiin kuivaelatusainetta (Plate Count Agar), jonka koostumus on esitetty taulukossa 4. Agarliuos jaettiin 500 ml:n erlenmeyer-pulloihin, autoklavoitiin 121 °C:ssa 15 minuuttia ja jäähdytettiin vesihauteessa 44 - 47 °C:seen odottamaan valamista.

Taulukko 4. Bakterilaskenta-agar (PCA), 1 000 ml

Ensymaattisesti hajotettu kaseiini	5,0 g
Hiivauute	2,5 g
Glukoosi (vedetön) (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,0 g
Agar	9 – 18 g
Vesi (ionivaihdettu)	1 000 ml

### 4.2.2 *Bacillus cereus* -selektiiviagar

Selektiiviagaria valmistettiin *Bacillus cereus* -bakteerin määrittämistä varten noin 400 pintalevitystä varten. Veteen liuotettiin kuivaelatusaine (Bacillus Cereus Medium), autoklavoitiin 121 °C:ssa 15 minuuttia ja jäähdytettiin vesihauteessa 44 – 47 °C:seen. Jäähdyneeseen kasvualustaan lisättiin aseptisesti steriili polymyksiini-B-sulfaatti – liuos sekä keltuaiseemulsio ja valettiin petrialjoille. Selektiiviagarin valmistukseen tarvittavat reagenssit on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. *Bacillus cereus* -selektiiviagar (MYP), 1 000 ml

Lihaekstrakti	1,0 g
Entsyaattisesti hajotettu kaseiini	10,0 g
D-Mannitoli	10,0 g
Natriumkloridi (NaCl)	10,0 g
Fenolipuna (C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> S)	0,025 g
Agar	12 – 18 g
Vesi (ionivaihdettu)	900 ml
Polymyksiini-B-sulfaatti -liuos	10 ml
Keltuaiseemulsio	100 ml

#### 4.2.3 Veriagar

Veriagara valmistettiin *Bacillus cereuksen* varmistuskokeita varten noin 200 petri-maljan verran. Kuivaelatusaine (Blood Base Medium) liuotettiin ionivaihdettuun ve-teen, autoklavoitiin 121 °C:ssa 15 minuuttia ja jäähdytettiin vesihautteessa 44 - 47 °C:seen. Jäähdyneeseen kasvualustaan lisättiin aseptisesti defibrinoitu lampaanveri ja valettiin petriمالjoille. Veriagarin valmistukseen tarvittavat reagenssit on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Veriagar, 1 000 ml

Proteosipeptoni	15 g
Maksahydrolysaatti	2,5 g
Hiivauute	5 g
Natriumkloridi (NaCl)	5 g
Agar	12 – 18 g
Vesi (ionivaihdedtu)	1 000 ml
Defibrinoitu lampaanveri	50 – 70 ml

#### 4.2.4 Puskuroitu peptonisuolaliuos

Näytteenkäsittelyyn ja laimennossarjojen tekemiseen tarvittava puskuroitu peptonisuolaliuos valmistettiin liuottamalla Buffered Peptone Water -jauhe veteen. Koska lihapasteijoiden rasvapitoisuus on yli 20 %, lisättiin valmiiseen suolaliuokseen 1 - 10 g/l sorbitaanimonooleaatia (Tween 80) parantamaan näytteen emulsoitumista. Valmis puskuroitu peptonisuolaliuos mitattiin korkillisiin näytepulloihin sekä koeputkiin ja autoklavoitiin 121 °C:ssa 15 minuuttia. Peptonisuolaliuoksen valmistukseen tarvittavat reagenssit on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Puskuroitu peptonisuolaliuos, 1 000 ml

Peptoni	10,0 g
Natriumkloridi (NaCl)	5,0 g
Natriumvetyfosfaatti ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9,0 g
Kaliumdivetyfosfaatti ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Vesi (ionivaihdedtu)	1 000 ml
Sorbitaanimono-oleaatti (Tween 80)	2,8 g

#### 4.3 Näytteenkäsittely

Lihapasteija homogenoitiin näytteenottopussissa käsin painelemalla tasaiseksi massaksi. Massasta punnittiin kahteen steriiliin ja suodattimelliseen Stomacher-pussiin kuhunkin 30 g näytettä. Näin saatiin rinnakkaiset näytteet A ja B. Pusseihin lisättiin 270 ml autoklavoitua ja huoneenlämpöistä puskuroitua peptonisuolaliuosta. Näytettä homogenoitiin Stomacher-laitteella 120 sekunnin ajan nopeudella 230 rpm (kuva 4). Sakan annettiin laskeutua hetki ennen pipetointia. Liitteessä 3 on esitetty näytteenkäsittelyn työvaiheet.



Kuva 4. Homogenoitu näyte Stomacher-pussissa

Aluksi valmistettiin laimennossarja vain  $10^{-4}$  asti, joka osoittautui liian väkeväksi varsinkin 2 vrk  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilytettyjen lihapasteijoiden määrittämiseen. Osa kokeista jouduttiin uusimaan valmistamalla näytteestä laimennossarja  $10^{-8}$  asti.

Näytteistä valmistettiin laimennossarjat  $10^{-2}$  –  $10^{-8}$ . Näytteet ja laimennokset viljeltiin viimeistään 45 minuutin kuluessa alkususpension, laimennos  $10^{-1}$ , valmistuksen loppumisesta.

#### 4.4 Tutkimus ja tulokset

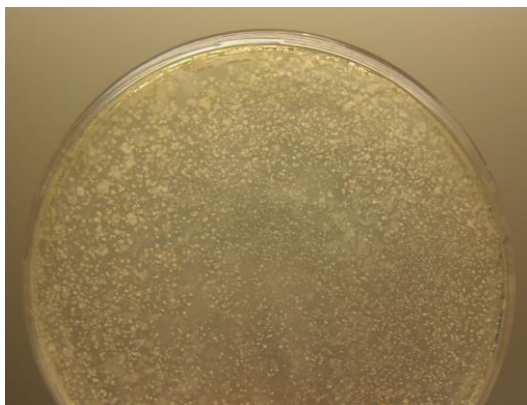
##### 4.4.1 Kokonaisbakteerimäärän selvittäminen

Kokonaisbakteerimäärä selvitettiin maljaamalla bakteerilaskenta-agarilla (PCA). Joista laimennosta,  $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ , pipetoitiin 1 ml steriilillä pipetillä kahdelle steriilille petrimaljalle. Kuhunkin petrimaljaan valettiin noin 20 ml  $44 - 47\text{ }^{\circ}\text{C}$  bakteerilaskenta-agarilla. Maljoja pyöritettiin varovasti, jotta siirrosteko sekoittui kasvualustan kanssa. Seoksen jähmetyttyä valetut maljat käännettiin ylösalaisin ja asetettiin inkuboitumaan  $29 - 31\text{ }^{\circ}\text{C}$  lämpökaappiin kolmeksi vuorokaudeksi. (17.)

##### 4.4.2 Kokonaisbakteerimäärän laskeminen

Pesäkkeet laskettiin maljoilta, joilla oli enintään 300 pesäkettä Eviran ohjeen mukaisesti. Maljoja tarkasteltiin tarvittaessa mikroskoopilla, jottei näytteen liukenematomia partikkeleita laskettu pistemäisiksi pesäkkeiksi. Kuvassa 5 on pesäkkeitä PCA -maljalla. (17)





Kuva 55. Pistemäisiä pesäkkeitä PCA -maljan pinnalla näytteestä 2 vrk 20 °, laimennos  $10^{-4}$

Kokonaispesäkeluku laskettiin painotettuna keskiarvona jakamalla pesäkkeiden lukumäärä tutkitun näytteen tilavuudella (kaava 1). (18)

$$N = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{n_1 \times V_1 + n_2 \times V_2 \dots + n_n \times V_n}$$

(kaava 1)

missä:

$N$  = pesäkkeiden lukumäärä ml:ssa tai g:ssa näytettä

$C_1 + C_2 + \dots + C_n$  = pesäkkeiden lukumäärä jokaiselta tuloksen laskentaan käytetävältä maljalta

$n_1$  = ensimmäisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä

$n_2$  = toisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä

$V_1$  = ensimmäistä pesäkelukua vastaava näytetilavuus (alkuperäistä näytettä)

$V_2$  = toista pesäkelukua vastaava näytetilavuus (alkuperäistä näytettä) jne.

Laskuesimerkki:

$$N (2 \text{ vrk } 20 \text{ °C}) = \frac{49+13}{1 \times 0,1 \text{ ml} \times 10^{-6} + 1 \times 0,1 \text{ ml} \times 10^{-7}} = 563636364 \approx 6 \times 10^8 \text{ pmy/g}$$

Kaikkien näytteiden kokonaisbakteerimäärät on esitetty taulukossa 8. Liitteessä 4 on esitetty myös näytteiden pesäkemäärät.

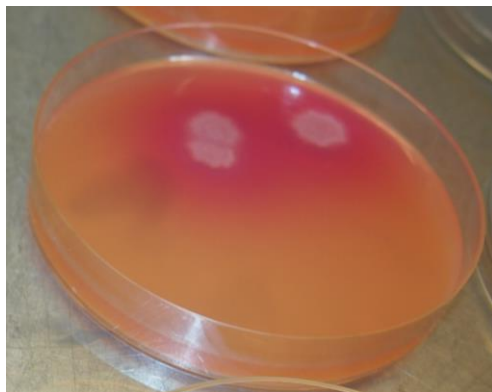
Taulukko 8. Lihapasteijoiden lasketut kokonaisbakteerimäärät (liite 3)

Kokonaisbakteerimäärät	
Näyte	Pitoisuus (pmy/g)
0 vrk 3 °C	$8 \times 10^2$
0 vrk 20 °C	$7 \times 10^2$
1 vrk 3 °C	$3 \times 10^2$
1 vrk 20 °C	$5 \times 10^6$
2 vrk 3 °C	$1 \times 10^4$
2 vrk 20 °C	$5 \times 10^8$

#### 4.4.3 *Bacillus cereus* – bakteerin määrittäminen

*Bacillus cereus* -bakteerin määrä selvitettiin pintalevityksenä selektiiviagarille (MYP) sekä varmistamalla tyypilliset pesäkkeet viljelemällä veriagarille. Jokaista laimennosta,  $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ , pipetoitiin 0,1 ml steriilillä pipetillä kahdelle steriilille selektiiviagar-maljalle. Levitettiin steriilillä kulmasauvalla nopeasti ja varovasti, varoen koskettamasta maljan reunoja. Näytteen imeytyttyä kasvualustaan maljat käännettiin ylösalaisin ja asetettiin inkuboitumaan 29 - 31 °C lämpökaappiin 18 - 24 tunniksi. Jos pesäkkeitä ei ollut selvästi havaittavissa inkubointijakson päättyessä, jatkettiin inkubointia vielä toiset 18 - 24 tuntia. Inkuboinnin jälkeen pesäkkeet laskettiin maljoilta, joilla oli enintään 150 pesäkettä, Eviran ohjeen mukaisesti. Tyypillisimmät pesäkkeet valittiin varmistuskokeisiin. (19.)

Tyypillisesti *Bacillus cereus* kasvaa maljoilla suurina, vaaleanpunaisina pesäkkeinä, joita ympäröi lesitinaasin muodostumisesta aiheutunut saostumavyöhyke (kuva 6). Kaikki kannat eivät kuitenkaan tuota lesitinaasia tai tuottavat sitä vähän, jolloin saostumavyöhykettä ei aina näy. Myös vaaleanpunainen väri voi jäädä näkymättä, jos maljalla kasvaa runsaasti mannitolia käyttäviä mikrobeja, joiden tuottama happo muuttaa maljan värin keltaiseksi. (19.)

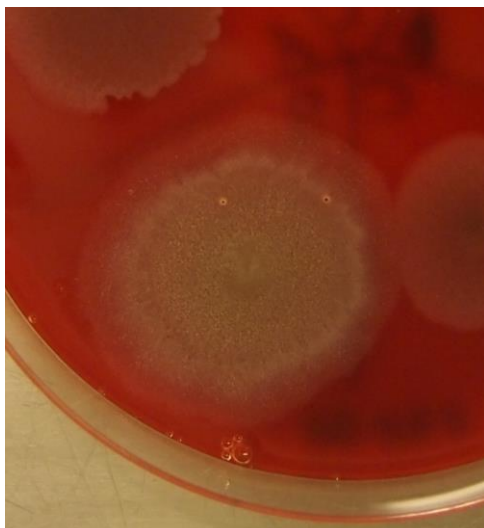


Kuva 6. Tyypillisiä *Bacillus cereus*-pesäkkeitä selektiiviagarilla, näyte 1 vrk 20 °C, laimennos 10<sup>-5</sup>

Kultakin maljalta varmistettiin viisi pesäkettä. Jos maljalla kasvoi vähemmän kuin viisi tyypillistä pesäkettä, varmistettiin maljalta kaikki pesäkkeet. Pesäkkeet siirrotettiin viljelysilmukalla veriagarin pintaan. Viljelmiä inkuboitin ylösalaisin 29 - 31 °C:ssa 22 - 26 tuntia. (19.)

#### 4.4.4 *Bacillus cereus* – bakteeripitoisuuden laskeminen

Inkuboinnin jälkeen maljoilta laskettiin varmistuneiden pesäkkeiden määrä. Tyypillisesti pesäkkeet ovat vihertävänharmaita, mattapintaisia, epäsäännöllisiä ja isoja. Ympärillä on yleensä kirkas hemolyysivyöhyke, koska bakteeri hajottaa veriagarin punasoluja. Hemolyysivyöhykettä ei kuitenkaan aina näy, koska myös non-hemolyyttisiä kantoja esiintyy. Kuvassa 7 näkyy varmistunut pesäke, josta hemolyysivyöhyke kuitenkin puuttuu. (19.)



Kuva 7. Varmistunut pesäke veriagarilla, näyte 1 vrk 20 °C, laimennos  $10^{-5}$

*Bacillus cereus* -pesäkkeiden kokonaislukumäärä saatiin laskettua kaavalla 2. Pesäkkeiden lukumäärän ( $C_n$ ) arvo saatiin varmistuneiden pesäkkeiden osuudesta (kaava 2), joka pyöristettiin kokonaisluvuksi.

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad (\text{kaava 2})$$

missä:

a = varmistuneiden pesäkkeiden osuus

b = veriagarilla *Bacillus cereus*ksi varmistuneiden pesäkkeiden määrä  
(yleensä  $\leq 5$ )

A = tyypilliset pesäkkeet, jotka valitaan selektiiviagarilta varmistuskokeisiin  
(yleensä 5)

C = laskettujen tyypillisten/epäilyttävien pesäkkeiden lukumäärä

Laskuesimerkki laimennoksien  $10^{-4}$  ja  $10^{-5}$  varmistuneiden pesäkkeiden määristä:

$$a(1 \text{ vrk } 20 \text{ °C } 10^{-4} \text{ a-näyte}) = \frac{4}{5} \times 13 = 10$$

$$a(1 \text{ vrk } 20 \text{ °C } 10^{-4} \text{ b-näyte}) = \frac{4}{5} \times 11 = 9$$

$$a(1 \text{ vrk } 20 \text{ °C } 10^{-5} \text{ a-näyte}) = \frac{1}{2} \times 2 = 1$$

$$a(1 \text{ vrk } 20 \text{ °C } 10^{-5} \text{ a-näyte}) = \frac{1}{2} \times 2 = 1$$

*Bacillus cereus* -pitoisuus (pmy/g) saatiin sijoittamalla varmistuneiden pesäkkeiden osuus (a) kaavaan 1.

$$N(1 \text{ vrk } 20 \text{ °C}) = \frac{10 + 9 + 1 + 1}{(2 \times 1,0 \text{ ml} + 2 \times 0,1 \text{ ml}) \times 10^{-4}} = 95456 = 9,6 \times 10^4 \text{ pmy/g}$$

Kaikkien näytteiden *Bacillus cereus* -pitoisuudet on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Lasketut *Bacillus cereus* -bakteeripitoisuudet

<i>Bacillus cereus</i> -bakteeripitoisuudet (pmy/g)	
Näyte	Pitoisuus
0 vrk 3 °C	0
0 vrk 20 °C	0
1 vrk 3 °C	0
1 vrk 20 °C	$4 \times 10^4$
2 vrk 3 °C	$6 \times 10^1$
2 vrk 20 °C	$1 \times 10^7$

#### 4.4.5 Tulosten tarkastelu

Viljelyjen tulokset vaikuttavat melko loogisilta. Liittessä 4 nähtävät kokonaismikrobimäärityksen pesäkemäärät pienenevät liikuttaessa pienemmästä laimennoksesta suurempaan. Myös näytteiden mikrobipitoisuuksissa huomataan ajan ja säilytyslämpötilan vaikutus. Verrattaessa 20 °C:ssa säilytettyjä näytteitä, huomataan mikrobiologisen laadun heikentyvän ajan kuluessa. 3 °C:ssa säilytetyissä näytteissä huomataan epäloogisuutta näytteiden 0 vrk 3 °C ja 1 vrk 3 °C kohdalla. Viljelyjen perusteella näyttäisi vuorokauden säilytetty näyte mikrobiologisesti laadultaan hieman paremmalta kuin suoraan analysoitu. Tämä on tosin selitettävissä myös erien välisellä vaihtelulla, koska kokeita jouduttiin tekemään pitkällä aikavälillä.

Verrattaessa kokonaismikrobimäärityksen tuloksia taulukossa 3 esitettyihin raja-arvoihin, huomataan 0 vrk:n ja 1 vrk 3 °C -näytteet mikrobiologisesti laadultaan hyväksi. 2 vrk 3°C -näyte on laadultaan välttävä kun taas näytteet 1 vrk 20°C ja 2 vrk 20°C ovat laadultaan huonoja. Nämä tulokset olivat oletettuja jo tutkimuksen alussa. Näiden tulosten perusteella koetta voidaan pitää melko luotettavana, koska tulokset ovat odotettuja.

Tarkastellessa laskettuja *Bacillus cereus* -bakteeripitoisuuksia (taulukko 9), huomataan myös niissä loogisuutta. Pidempään säilytettäessä mikrobiologinen laatu heikenee, ja säilytyslämpötilalla on huomattava vaikutus tuotteiden laatuun. Verrattaessa tuloksia taulukossa 3 esitettyihin raja-arvoihin, huomataan 0 vrk:n, 1 vrk 3 °C ja jopa 2 vrk 3 °C -näytteet laadultaan hyväksi. Huoneenlämmössä säilyttäminen heikentää laatua huomattavasti, koska 1 vrk 20 °C ja 2 vrk 20 °C -näytteet luokitellaan molemmat huonoiksi, joista jälkimmäinen jopa mahdollisesti ruokamyrkytystä aiheuttavaksi (taulukko 2).

Tulokset vaikuttavat melko luotettavilta, mutta varmemman tuloksen saamiseksi olisi kokeita pitänyt tehdä enemmän. Kokeisiin olisi kaivattu enemmän rinnakkaisia kokeita sekä koetoistoa. Näin olisi tarkemmin pysytty määrittämään tuotteiden bakteeripitoisuudet. Työn tuloksista saatiin nyt kuitenkin suuntaa antavia tuloksia, joiden perusteella on helppo ohjeistaa myymälän henkilökuntaa ja asiakkaita.

## 5 Yhteenveto

Työssä tutkittiin leipomossa valmistetun lihapasteijan mikrobiologista säilyvyyttä sekä huoneenlämmön ja jääkaappisäilytyksen vaikutusta säilyvyyteen. Säilyvyyttä tutkittiin määrittämällä näytteistä aerobisten mikrobien määrä sekä *Bacillus cereus*-bakteeripitoisuus. Määritykset suoritettiin maljaviljelyillä, joiden pesäkemäärien perusteella laskettiin näytteiden mikrobipitoisuudet. Saatuja mikrobipitoisuuksia verrattiin määriteltyihin raja-arvoihin. Lisäksi työssä selvitettiin leipomotuotteiden säilyvyyteen vaikuttavia tekijöitä.

Työssä oli aluksi ongelmia sopivan laimennospitoisuuden määrittämisen kanssa, jolloin liian väkevän näyteliuoksen takia osa kokeista jouduttiin uusimaan. Uusittujen kokeiden myötä saatiin tuloksia, joista pystyttiin laskemaan järkevääntuntuksia pitoisuuksia. Tuloksista huomattiin, että lihapasteijoiden mikrobiologinen laatu heikkenee hyvinkin nopeasti. Jo seuraavana päivänä valmistuksesta sekä kokonaisbakteerimäärä että *Bacillus cereus*-pitoisuudet olivat nousseet niin korkealle, että tuotteet olivat käytettyjen raja-arvojen (taulukko 3) mukaan huonoja. Kaksi päivää säilytetyt tuotteet olivat laaduiltaan jo niin huonoja, että mm. *Bacillus cereus*-pitoisuus oli ruokamyrkytyksiä aiheuttavalla tasolla.

Jääkaappisäilytyksellä huomattiin olevan paljonkin merkitystä tuotteiden säilyvyyteen. 3 °C:ssa säilyttäminen hidasti mikrobien lisääntymistä tuotteissa niin paljon, että jopa kaksi vuorokautta säilytetyt tuotteet olivat raja-arvojen mukaan hyviä. Jääkaappisäilytyksen huomattiinkin olevan ehdoton jos tuotteita ei aiota nauttia valmistuspäivänä. Myymälässä olisikin syytä miettiä mahdollisuutta myydä tuotteita viileästä.

Työssä opittiin, että lihapasteijoiden mikrobipitoisuus kasvaa hyvinkin nopeasti ruokamyrkytyksiä aiheuttavalle tasolle. Asiakkaita tulisikin kehottaa nauttimaan tuotteet ostopäivänä tai siirtämään tuotteet mahdollisimman pian jääkaappiin ja nauttimalla tuotteet viimeistään seuraavana päivänä. Vaikka tuotteita myydäänkin toistaiseksi huoneenlämmöstä, tulisi asiakkaille kertoa että tuotteet on syytä säilyttää jääkaapissa.



## 6 Lähteet

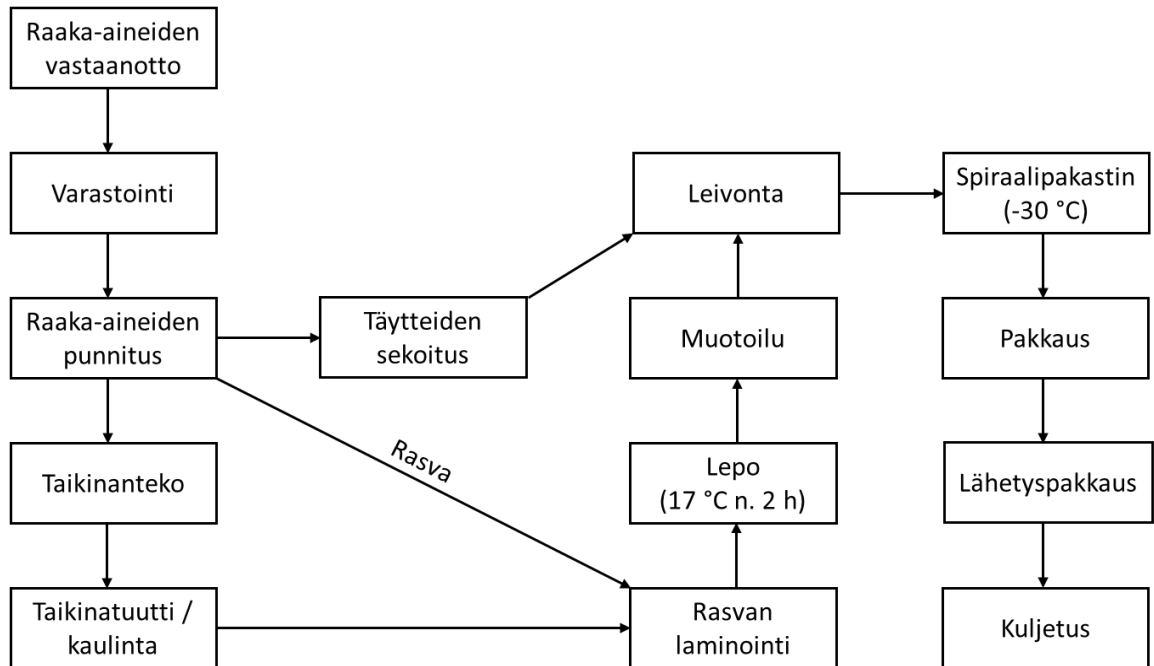
1. Maa- ja metsätalousministeriön asetus ilmoitettujen elintarvikehuoneistojen elintarvikehygieniasta 1367/2011. Helsinki. Maa- ja metsätalousministeriö. 20.12.2011.
2. Niemi Veli-Mikko, Rahkio Marjatta, Siitonen Anja. 2004. Ruoka-turvallisuuden käsikirja. Helsinki: Art House.
3. Borgström Outi. 2013. Myymälöiden palvelumyynnissä olevien sellaisenaan syötävien elintarvikkeiden mikrobiologinen laatu Helsingissä vuosina 2010 ja 2011. Helsinki: Helsingin kaupungin ympäristökeskus.
4. Elintarvikkeiden saastuminen (kontaminaatio) ja pilaantuminen. 2012. Verkko-dokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/elintarvikkeiden+saastuminen++kontaminaatio++ja+pilaantuminen/>> Luettu 20.11.2013.
5. Heinonen Jaana, Jouppila Kirsi, Salovaara Hannu. 2003. Kondiittorin käsikirja. Helsinki: Suomen Vesanpaino oy.
6. Tuhoeläintorjunta. 2012. Verkkodokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/tuhoelaintorjunta/>> Luettu 20.10.2013.

7. Yleistä mikrobeista. 2013. Verkkodokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto. < <http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/elintarvikkeiden+riski-+ja+vaaratekijat/mikrobiologiset+vaaratekijat/yleista+mikrobeista/>> Luettu 20.10.2013.
8. Pönkä Antti. 1999. Ruokamyrkytykset ja elintarvikehygienia. Helsinki: Suomen ympäristöterveys Oy.
9. Korkeala Hannu. 2007. Elintarvikehygienia. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.
10. Hallanvuo Saija, Johansson Tuula. 2010. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira.
11. E-koodiavain. 2011. Verkkodokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto. < file:///C:/Users/Jenni/AppData/Local/Temp/\_www\_webapps\_webapp\_evira\_2\_data\_products\_1303797828482\_e-koodisuomi\_ok\_20.4.2011.net.pdf> Luettu 20.11.2013.
12. Elintarviketeollisuuden HACCL-pohjainen omavalvontaohje, Leipomoteollisuus. 2006. Verkkodokumentti. Laatuketju, Elintarviketurvallisuusvirasto, Elintarviketeollisuusliitto. < [http://www.etl.fi/www/fi/julkaisut/Julkaisut/HACCP\\_leipomo21.pdf](http://www.etl.fi/www/fi/julkaisut/Julkaisut/HACCP_leipomo21.pdf)> Luettu 20.11.2013.
13. Torvinen. 2013. Kehittämispäällikkö. Puhelinkeskustelu 31.11.2013.

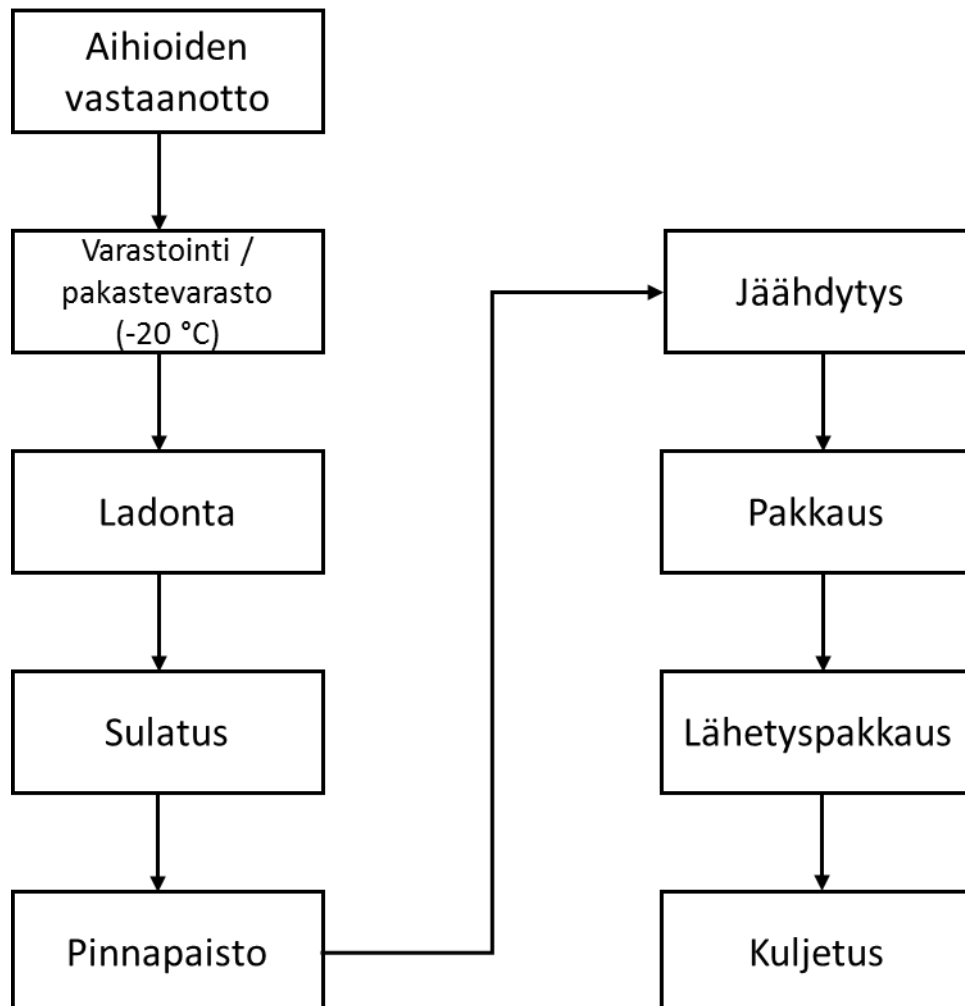
14. Pakastus. 2012. Verkkodokumentti. SoloTop.  
<<http://www.solotop.fi/index.php/teollisuus/pakastus>> Luettu 1.12.2013.
15. Eskelinen Paula, Saarijärvi Paula. 2014. Konditoriatuotteiden mikrobiologinen laatu Helsingissä. Helsinki: Kopio Niini Oy.
16. Valmisruokien ja lihavalmisteiden mikrobiologiset ohjausarvot viimeisenä käyttöpäivänä. 2012. Verkkodokumentti. Elintarviketeollisuusliitto.  
<[http://www.etl.fi/www/fi/julkaisut/Julkaisut/HACCP\\_valmisruoat\\_ja\\_lihavalmiste\\_et.pdf](http://www.etl.fi/www/fi/julkaisut/Julkaisut/HACCP_valmisruoat_ja_lihavalmiste_et.pdf)> Luettu 13.9.2014.
17. Mikrobin lukumäärän määrittäminen. Pesänlaskentatekniikka maljavalumene-  
telmällä. 2006. Verkkodokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto, Elintarvike- ja  
rehumikrobiologia.  
<[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/  
elintarvike\\_ja\\_rehututkimus/mibi/evira\\_3420\\_v3\\_mikrobien\\_lukum\\_internet.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/evira_3420_v3_mikrobien_lukum_internet.pdf)>  
Luettu 23.10.2013.
18. Mikrobiologisten tulosten laskeminen. 2011. Verkkodokumentti. Elintarviketur-  
vallisuusvirasto, Elintarvike- ja rehumikrobiologia.  
<[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/  
elintarvike\\_ja\\_rehututkimus/mibi/lab\\_703\\_v3\\_mikrobiologisten\\_tulosten\\_laskeminen.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/lab_703_v3_mikrobiologisten_tulosten_laskeminen.pdf)  
> Luettu 23.10.2013.
19. Alustavan *Bacillus cereus* –bakteerin ja itiöiden määrittäminen. Pesänlaskenta-  
tekniikka. 2006. Verkkodokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto, Mikrobiologian  
tutkimusyksikkö.  
<[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/  
elintarvike\\_ja\\_rehututkimus/mibi/evira\\_3406\\_alustavan\\_bacillus.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/evira_3406_alustavan_bacillus.pdf)> Luettu  
23.10.2013.

## Liitteet

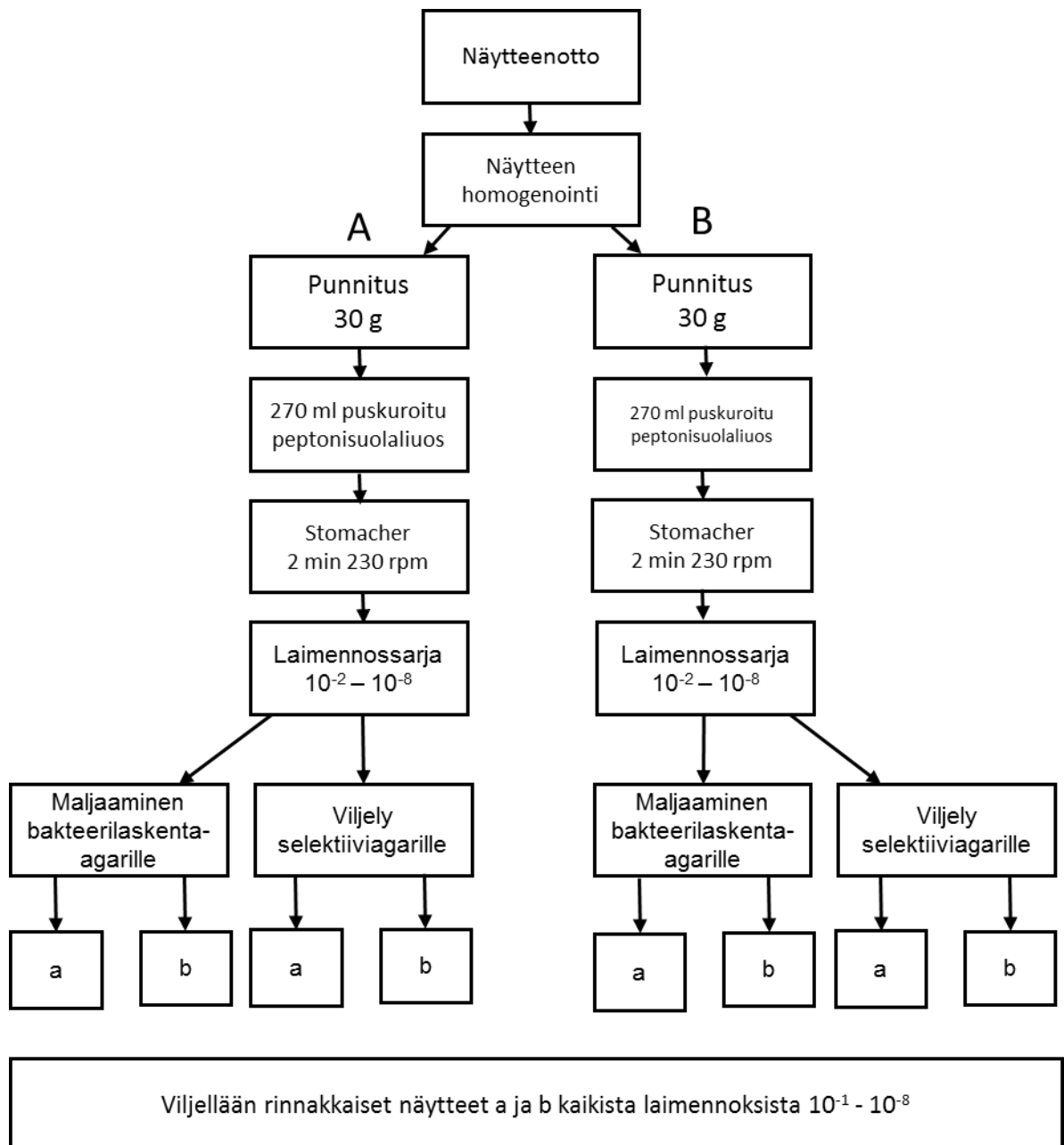
## Liite 1. Prosessikaavio: lihapasteija-aihioiden valmistus



## Liite 2. Prosessikaavio: lihapasteijan valmistus



### Liite 3. Prosessikaavio: Näytteenkäsittely ja viljelyt



#### Liite 4. Bakteerilaskenta-agar -viljelyn tulokset

Kaikkien lihapasteijanäytteiden (a - f) keskimääräiset pesäkemäärät sekä lasketut bakteeripitoisuudet (pmy/g). Sinisellä merkityt kentät ovat laskentaan käytetyt tulokset, harmaalla merkityt ovat hylättyjä tuloksia.

a.) Näyte: 0 vrk 3 °C

0 vrk 3°C	
Laimennos	Pesäkemäärä
10 <sup>-1</sup>	8
10 <sup>-2</sup>	1
10 <sup>-3</sup>	0
10 <sup>-4</sup>	0
10 <sup>-5</sup>	0
10 <sup>-6</sup>	0
10 <sup>-7</sup>	0
10 <sup>-8</sup>	0
Näytteen bakteeripitoisuus (pmy/g)	8 x 10 <sup>2</sup>

b.) Näyte: 0 vrk 20 °C

0 vrk 20°C	
Laimennos	Pesäkemäärä
10 <sup>-1</sup>	6
10 <sup>-2</sup>	2
10 <sup>-3</sup>	0
10 <sup>-4</sup>	0
10 <sup>-5</sup>	0
10 <sup>-6</sup>	0
10 <sup>-7</sup>	0
10 <sup>-8</sup>	0
Näytteen bakteeripitoisuus (pmy/g)	7 x 10 <sup>2</sup>

c.) Näyte: 1 vrk 3 °C

1 vrk 3°C	
Laimennos	Pesäkemäärä
10 <sup>-1</sup>	3
10 <sup>-2</sup>	1
10 <sup>-3</sup>	0
10 <sup>-4</sup>	0
10 <sup>-5</sup>	0
10 <sup>-6</sup>	0
10 <sup>-7</sup>	0
10 <sup>-8</sup>	0
Näytteen bakteeripitoisuus (pmy/g)	3 x 10 <sup>2</sup>

d.) Näyte: 1 vrk 20 °C

1 vrk 20°C	
Laimennos	Pesäkemäärä
10 <sup>-1</sup>	Yli 300
10 <sup>-2</sup>	Yli 300
10 <sup>-3</sup>	Yli 300
10 <sup>-4</sup>	51
10 <sup>-5</sup>	11
10 <sup>-6</sup>	1
10 <sup>-7</sup>	0
10 <sup>-8</sup>	0
Näytteen bakteeripitoisuus (pmy/g)	7 x 10 <sup>6</sup>

e.) Näyte: 2 vrk 3 °C

2 vrk 3°C	
Laimennos	Pesäkemäärä
10 <sup>-1</sup>	30
10 <sup>-2</sup>	7
10 <sup>-3</sup>	1
10 <sup>-4</sup>	0
10 <sup>-5</sup>	0
10 <sup>-6</sup>	0
10 <sup>-7</sup>	0
10 <sup>-8</sup>	0
Näytteen bakteeripitoisuus (pmy/g)	3 x 10 <sup>3</sup>

f.) Näyte: 2 vrk 20 °C

2 vrk 20°C	
Laimennos	Pesäkemäärä
10 <sup>-1</sup>	Yli 300
10 <sup>-2</sup>	Yli 300
10 <sup>-3</sup>	Yli 300
10 <sup>-4</sup>	Yli 300
10 <sup>-5</sup>	Yli 300
10 <sup>-6</sup>	47
10 <sup>-7</sup>	12
10 <sup>-8</sup>	1
Näytteen bakteeripitoisuus (pmy/g)	5 x 10 <sup>8</sup>