



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU  
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Adalmina Karvinen

---

## Hiivasolujen laskennan käyttöönotto

Opinnäytetyö

Syksy 2024

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Adalmina Karvinen

Työn nimi alaotsikoineen: Hiivasolujen laskennan käyttöönotto

Ohjaaja: Ilmari Äijö

Vuosi: 2024

Sivumäärä: 32

Liitteiden lukumäärä: 4

---

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada luotua työohjeet hiivasolujen laskentamenetelmästä opinnäytetyön toimeksiantajalle. Toimeksiantajana työssä toimii eräs panimo. Toimeksiantaja yrityksen nimi sekä panimon hiivojen nimet pidetään salassa. Hiivasolut lasketaan hemocytometriä käyttäen. Työohjeista tehtiin sellaiset, että niiden avulla panimon työntekijät pystyvät käyttämään niissä opastettua menetelmää. Työohjeiden opastaman menetelmän avulla saadaan laskettua hiivasolujen määrä hiivalietteessä. Tämän ansiosta vierrettä pystytään hiivaamaan optimaalisesti. Tämän ansiosta säästytään ylihiivaukselta.

Työn teoriaosuudessa käsitellään oluen käymistä, varastokäymistä sekä hiivaa ja sen toimintaa, jaottelua ja käyttäytymistä. Lisäksi teoriaosuudessa käydään läpi hemocytometrin käyttöä, laboratoriossa toimimista sekä työohjeiden luomista.

Työohjeiden luomista varten menetelmään käytiin tutustumassa toimeksiantajan panimolla. Lisäksi menetelmää harjoiteltiin paljon, jotta se tulisi tutuksi. Kun menetelmää oli harjoiteltu, menetelmä testattiin kahdesti toimeksiantajan tiloissa. Valmiit työohjeet vielä testattiin, jotta voitiin olla varmoja niiden toimivuudesta.

Opinnäytetyön lopputuloksena oli hiivasolujen laskemiseen liittyvä työohjeistus, joka otettiin käyttöön panimolla. Työohjeessa on jokaisen työvaiheen aluksi listattu siihen tarvittavat välineet, jonka jälkeen on kohta kohdalta käyty läpi, mitä pitää tehdä. Lisäksi työohjeisiin on lisätty kuvia havainnollistamaan joitain vaiheita. Lopuksi työohjeissa on esitetty laskukaava, jonka avulla saadaan laskettua hiivasolujen määrä halutussa määrässä hiivalietettä. Työohjeisiin on myös lisätty esimerkki lasku havainnollistamaan laskukaavan käyttöä

<sup>1</sup> Asiasanat: olut, hiiva, käyminen, solut, panimoteollisuus

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Degree programme: Food processing and Biotechnology

Specialisation: Food Technology

Author/s: Adalmina Karvinen

Title of thesis: Implementation of yeast cell counting

Supervisor(s): Ilmari Äijö

Year: 2024

Number of pages: 32

Number of appendices: 4

---

The goal of this thesis was to create operating instructions for the yeast cell counting method for the commissioning brewery. The name of the commissioning brewery and the names of the brewery's yeast strains are kept confidential. Yeast cells are counted using a hemocytometer. The operating instructions were designed so that the brewery staff can use the method outlined in them. The method guided by the operating instructions allows the yeast cell concentration in the yeast slurry to be calculated. As a result, the yeast can be pitched optimally, preventing over-pitching.

The theoretical section of the thesis covers the fermentation process of beer, secondary fermentation, as well as yeast and its activity, division, and behavior. Additionally, the theoretical section discusses the use of the hemocytometer, laboratory work practices, and the creation of operating instructions.

To create the operating instructions, the method was first studied at the commissioning brewery. The method was also practiced extensively to ensure familiarity. After the method had been practiced, it was tested twice at the brewery. The final operating instructions were then tested to ensure their functionality.

The outcome of the thesis was a set of operating instructions for yeast cell counting, which was implemented at the brewery. The operating instructions list the required equipment for each step at the beginning of the section, followed by a detailed step-by-step guide. Additionally, images were included to illustrate some of the steps. Finally, the instructions present a formula for calculating the yeast cell concentration in a specific amount of yeast slurry. An example calculation was also included to demonstrate how the formula is applied.

<sup>1</sup> Keywords: beer, yeast, fermentation, cells, brewing industry

## SISÄLTÖ

|   |    |
|---|----|
| Opinnäytetyön tiivistelmä .....                             | 2  |
| Thesis abstract .....                                       | 3  |
| SISÄLTÖ .....   | 4  |
| Käytetyt termit ja lyhenteet.....                           | 6  |
| 1 JOHDANTO .....  | 7  |
| 1.1 Työn tavoite ja rakenne .....                           | 7  |
| 1.2 Tietoa pienpanimoista ja oluen valmistamisesta .....    | 7  |
| 2 OLUEN KÄYMINEN .....                                      | 9  |
| 2.1 Pääkäymisen kulku .....                                 | 9  |
| 2.2 Varastokäyminen.....                                    | 11 |
| 3 HIIVA .....   | 14 |
| 3.1 Hiivojen ryhmittely .....                               | 14 |
| 3.2 Hiiva oluessa .....                                     | 15 |
| 3.3 Hiivan puhdistus .....                                  | 16 |
| 3.4 Hiivanmassan säilytys .....                             | 17 |
| 3.5 Panimohiivan suhtautuminen happeen ja lämpötilaan ..... | 18 |
| 3.6 Kuolleet hiivasolut oluessa .....                       | 19 |
| 4 LABORATORIOSSA TOIMIMINEN .....                           | 20 |
| 4.1 Aseptinen näytteenotto.....                             | 20 |
| 4.2 Turvallinen laboratoriotyöskentely .....                | 20 |
| 5 HEMOCYTOMETRIN KÄYTTÖ.....                                | 21 |
| 5.1 Hemocytometrin käyttö.....                              | 21 |
| 5.2 Solujen laskeminen hemocytometrillä .....               | 21 |
| 6 TYÖOHJEIDEN LUOMINEN .....                                | 23 |
| 7 MENETELMÄT .....  | 24 |
| 7.1 Menetelmään tutustuminen .....                          | 24 |
| 7.2 Työohjeiden tekeminen ja testaaminen .....              | 25 |
| 8 TULOKSET .....  | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 9 POHDINTA .....                        | 28 |
| 9.1 Pohdintaa työstä.....               | 28 |
| 9.2 Arviointia työn toteutuksesta ..... | 29 |
| 9.3 Kehitysehdotukset .....             | 29 |
| LÄHTEET .....                           | 31 |
| LIITTEET .....                          | 33 |

## Käytetyt termit ja lyhenteet

**Hemocytometri** Hemocytometri on lasinen levy, joka on suunniteltu solujen laskemiseen mikroskoopilla. Lasiseen levyyn on kaiverrettu kammiot, jotka mahdollistavat solujen laskemisen määritetyllä alueella.

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Työn tavoite ja rakenne

Tässä työssä toimeksiantajana toimii eräs panimoalan yritys. Työssä halutaan selvittää uudelleen käytettävästä hiivasta siinä olevien aktiivisten hiivasolujen määrää. Panimo pystyy tämän tiedon avulla annostelevaan optimimääräisesti uudelleen käytettävän hiivan määrää. Toimeksiantaja tahtoo, että yrityksen nimi sekä työssä laskettujen hiivojen nimet pidetään salassa. Hiivat erotellaan siitä syystä opinnäytetyössä numeroilla niiden oikeiden nimien sijaan.

Opinnäytetyön tavoitteena on saada otettua toimeksiantajalle käyttöön hiivasolujen laskentamenetelmä ja luoda siihen ohjeistus. Hiivan määrän laskeminen on tärkeää panimoprosessissa, koska sen avulla saadaan parannettua tuotteiden tasalaatuisuutta sekä tuotantotehokkuutta, koska tällä hetkellä ei tiedetä hiivauksessa käytettävien hiivasolujen tarkkaa määrää. Kun menetelmä saadaan otettua käyttöön toimeksiantajalla, saa toimeksiantaja selville, kuinka paljon mitäkin hiivaa tulee lisätä vierteeseen, jotta saadaan paras mahdollinen tulos.

Opinnäytetyössä käydään ensin läpi teoriaa aiheeseen liittyen. Teoriassa käsitellään oluen pääkäymistä ja varastokäymistä. Lisäksi käsitellään hiivoja ja sitä, mikä niiden osuus on oluessa. Teoriassa käsitellään myös laboratoriotyöskentelyä eri näkökulmista sekä työohjeiden luomista. Seuraavaksi työssä käsitellään menetelmiä. Menetelmäosuudessa käydään läpi, kuinka menetelmään tutustuttiin ja kuinka menetelmää toteutetaan. Viimeisimpinä osuuksina käsitellään opinnäytetyön tulokset ja johtopäätökset.

## 1.2 Tietoa pienpanimoista ja oluen valmistamisesta

Pienpanimoilla on pieni tuotantomäärä (Alko, i.a). Pienpanimoksi määritellään Suomessa panimot, jotka valmistaa alle 15 miljoonaa litraa olutta vuodessa (Leppänen, 2021, s.41). Pienpanimoiden määrä Suomessa on kaksinkertaistunut muutaman vuoden aikana (Alko, i.a). Suomessa olutkulttuuri on kehittynyt nopeasti. Lisäksi pienpanimo-oluita kohtaan kiinnostus on kasvanut. Suomessa pienpanimotoimintaa on ollut pitkään, kuitenkin sen

luonne on vaihdellut (Pienpanimoliitto, i.a.). Jo 1900-luvun alussa Suomessa on ollut yli 150 erikokoista panimoa. Ensimmäinen uusi pienpanimo perustettiin 1985. 1990-luvun lopussa panimoita alkoi olemaan paljon. 1990-luvulla suomalaiset kuluttajat halusivat vaihtoehtoja toisiaan muistuttaville massa oluille (Leppänen, 2021, s.39). Vuosikymmenen alkupuolella alkoi pienpanimobuumi ja voimistui sen puolivälissä.

Pienpanimoala koki 2010-luvulla toisen nousukauden ja pienpanimoiden määrä kasvoi kolmestakymmenestä yli sataan. Suomessa oli alle 40 pienpanimoa vuonna 2010, mutta vuonna 2020 pienpanimoita oli jo melkein 120 (Alko i.a). Pienpanimoille on tyypillistä tavoitella laatua, lisäksi kokeilun halu sekä käsityön arvostaminen. Pienpanimot tuovat perinteisistä oluttyypeistä markkinoille uusia tulkintoja. Oluen kulutus on määrällisesti vähentynyt Suomessa, mutta nykyisin suomalaiset kuluttavat laadukkaampia tuotteita, kuin aiemmin (Pakarinen, i.a.).

Oluen historia ulottuu pitkälle ja oluen valmistuksen varhaisimmat merkit ovat jopa 10 000 vuoden takaisia (Hartwall, 2024). Vanhimmat todisteet oluen kaltaisen alkoholijuoman valmistuksesta on löydetty Israelista 11000 eaa (Koskinen, 2022, s.10). Ensimmäisten mallastusten uskotaan olleen vahinko, mutta pian sitä opittiin hyödyntämään (Hartwall, 2024). Oluen juonnista ensimmäiset kuvaukset ovat jopa 6000 vuotta vanhoja ja ensimmäiset reseptit 5000 vuotta vanhoja. On epäilty, että vehnää ja ohraa on alettu viljellä, jotta saataisiin valmistettua enemmän olutta. On epäilty, että alkusysäys hiivan löytämiselle on ollut oluenpano. Olut on ollut myös ruokavalion peruspilari, ja suurteollisuudeksi oluenpano on kasvanut jo 1700-luvulla.

Oluen raaka-aineet ovat mallas, humala, hiiva ja vesi (Koskinen, 2022, s.50–51). Oluen valmistus alkaa maltaan rouhinnalla (Sinebrychoff, i.a). Mallas on itänyttä ja kuivanutta viljaa (Koskinen, 2022, s.52). Seuraavaksi maltaat mäskätään ja sitten vierteestä erotetaan mäski (Sinebrychoff, i.a). Tämän jälkeen vierre keitetään ja humaloidaan. Seuraavina vaiheina ovat selkeytys ja jäähdytys. Sitten vierre hiivataan ja ilmataan. Hiiva muuntaa mallassokerit vierteessä alkoholiksi ja hiilidioksidiksi (Alko, i.a). Tämän jälkeen on käymisvaihe (Sinebrychoff, i.a). Käymisen aikana vierteessä oleva sokeri muuttuu alkoholiksi ja hiilidioksidiksi. Oluen pääkäyminen kestää kolmesta päivästä reiluun viikkoon riippuen siinä käytetystä hiivasta. Olutta kypsytetään vielä 1–2 viikkoa ja lopuksi olut voidaan vielä suodattaa kirkkaaksi.

## 2 OLUEN KÄYMINEN

Oluen valmistus aloitetaan kuivattamalla idätetyt maltaat (Sinebrychoff, i.a). Kuivatetut maltaat rouhitaan ja mäskätään. Tämän jälkeen tärkkelys pilkkoutuu sokereiksi. Tässä syntyy vierre, johon lisätään humalaa. Vierre keitetään, jonka jälkeen siitä poistetaan jäänteet humalasta ja se pumpataan selkeytysastian ja jäähdyttimen läpi. Vierteeseen lisätään hiiva ennen käymisvaihetta. Käymisvaiheessa hiiva muuntaa vierteessä olevan sokerin alkoholiksi ja hiilidioksidiksi. Pääkäyminen kestää pintahiivaoluilla 3–8 päivää, kun taas pohjahiivaoluilla se kestää yli viikon.

### 2.1 Pääkäymisen kulku

Pääkäymisen varsinainen tavoite on alkoholin muodostuminen (Enari & Mäkinen, s.150, 2014). Panimovierteessä on paljon käymiskelpoisia sokereita, glukoosia, maltoosia sekä maltotriooseja (Enari & Mäkinen, 2014, s.148). Pilkkoutumiskelpoiset sokerit hiiva pilkkoo hiilidioksidiksi ja alkoholiksi (Strömberg & Syvänen, 1990, s.64). Oleellinen piirre pohjahiivakäymiselle on se, että käymisen aikana lämpötila on alhaisempi, usein korkeinaan 16 °C. Pintahiivakäymisessä lämpötila on taas 18–25 °C, eli selkeästi korkeampi (Enari & Mäkinen, 2014, s.148). Pääkäymisvaiheessa hiiva alkaa syödä vierteessä olevia sokereita toden teolla ja lisääntymään voimakkaasti (Koskinen, 2022, s.88).

Kirkastettu vierre jäähdytetään muutama aste käymislämpötilaa viileämmäksi, eli 8–14 °C:een (Enari & Mäkinen, 2014, s.148–149). Jäähdytyksen jälkeen vierteeseen ”pulputetaan” happea tai ilmaa. Alkoholikäyminen on anaerobinen prosessi, mutta jotta käyminen alkaisi halutulla nopeudella, niin hiivan on ensin lisääntyttävä jonkin verran. Pääkäymisen alussa hiivaa kasvatetaan ensin. Happi loppuu kuitenkin hyvin nopeasti, jonka jälkeen varsinainen alkoholikäyminen alkaa välittömästi. Hiiva ei enää lisääny hapen loppumisen jälkeen. Hiivan lisääntyminen loppuun vaikuttaa myös hiilidioksidin sekä alkoholin inhiboiva vaikutus.

Aluksi hiivalla on lepovaihe käymistankissa, ja sen aikana hiiva sopeutuu tankin olosuhteisiin (Enari & Mäkinen, 2014, s. 149). Lepovaiheen pituus riippuu hiivamassan laadusta, koosta ja iästä. Lepovaiheen kesto on muutamia tunteja. Ensimmäiset käymisen

merkit alkavat näkyä 12–24 tunnin kuluttua hiivauksesta. Tällöin vierteen yläpintaan alkaa ilmestyä pieniä kuplia, jotka ovat merkki siitä, että vierre on kyllästynyt hiilidioksidilla. Pian pinnalle muodostuu valkoinen, tasainen, pienikuplainen kerros vaahtoa. Hiivan aineenvaihdunnan kiihtymisen johdosta vierteen lämpötila alkaa kohota hitaasti. Vierteen pH alkaa laskea sekä hiivan metabolian että hiilidioksidin kyllästymisen tuloksena.

Kun hiivauksesta on kulunut kaksi vuorokautta alkaa ”matalan vaahton” vaihe, joka kestää noin 1–2 päivää (Enari & Mäkinen, 2014, s.149). Nämä ajat koskevat pohjahiivakäymisiä sekä normaalivahvuisia oluita. Hiivan toiminta vilkastuu yhä, ja hiilidioksidia muodostuu kiihtyvällä tahdilla ja sitä kohoaa pintaan yhä enemmän. Tämän johdosta vaahtokerros tihenee, kasvaa ja muuttuu kirjavaksi, koska sen sekaan saostuu vierteen aineosia.

Kun käymisliuoksen pH laskee, humalan hartsien liukenevuus huononee ja niitä irtoaa vaahton sekaan (Enari & Mäkinen, 2014, s.149). Samoin saostuu myös tanniini-proteiini-partikkeleita. Tämän vaiheen aikana lämpötila saa kohota 2 °C. Näennäinen uutepitoisuus alenee vuorokaudessa 0,4–1,0 p-%.

Seuraavana käymisvaiheena on ”korkeanvaahton vaihe”, joka kestää noin kolme päivää (Enari & Mäkinen, 2014, s.149). Käymisnopeus ja hiivan aineenvaihdunta ovat tällöin suurimmillaan. Tällöin näennäinen uutepitoisuus laskee päivässä jopa 2 %. Tässä vaiheessa syntyy runsaasti lämpöä, jonka takia tankkia on jäähdytettävä. Vierteen pH laskee arvoon 4,1–4,4.

Viimeinen vaihe pääkäymisessä on ”peitteen muodostuksen” vaihe (Enari & Mäkinen, 2014, s.149). Tämä vaihe kestää yhdestä kolmeen vuorokautta. Hiilidioksidin muodostus heikkenee, jonka seurauksena vaahto painuu kasaan ja sen komponenteista syntyy nuoroluen pinnalle tummanruskea kerros. Paksu, vaaleahko ja kiinteä peite on merkki hyvin edistyneestä käymisestä sekä hyvistä raaka-aineista. Peitteen muodostuksen aikana uutepitoisuus laskee 1–1,5 p-%. Kuitenkaan pH ei enää muutu. Lämpötilaa saatetaan kuitenkin vielä pudottaa jäähdytyksellä, joka edistää hiivan sedimentoitumista.

Tämän jälkeen pääkäyminen päättyy (Enari & Mäkinen, 2014, s.149). Kokonaisuudessaan pääkäyminen kestää 7–9 vuorokautta. Tätä pidemmät tai lyhyemmät pääkäymisajat ovat poikkeuksellisia. Käymisen aikana hiivamäärä voi lisääntyä jopa viisinkertaiseksi

(Koskinen, 2022, s.89). Hiiva lopettaa työnsä, kun se on syönyt kelpuuttamansa sokerit ja käyminen rauhoittuu (Koskinen, 2022, s.88). Pääosin hiiva poistetaan lopullisesta oluesta (Koskinen, 2022, s.66). Olut joko siirretään kypsytyksastiaan pois hiivan päältä tai hiiva poistetaan käymisastiasta (Koskinen, 2022, s.88).

## 2.2 Varastokäyminen

Kun pääkäyminen on saatu päätökseen, olut johdetaan suljettuihin varastotankkeihin jälkikäymistä varten (Enari & Mäkinen, 2014, s.154). Varastointi voidaan toteuttaa yhtäjaksoisena prosessina samassa tankissa, kuin pääkäyminen. Varastokäymisen kolme päämäärää ovat oluen maun kypsyminen, oluen kyllästäminen hiilidioksidilla ja samennuspartikkelien saostaminen eli oluen kirkastaminen.

Viirteen uutepitoisuudesta on jäljellä vielä yli 10 % käymiskelpoisista sokereista pääkäymisen loputtua (Enari & Mäkinen, 2014, s.154). Maltoosi on normaalisti käytetty pääkäymisen aikana loppuun, joten varastokäyminen on jäljellejääneen maltotriosisin fermentointia. Jos käytetty hiivakanta käyttää hitaasti maltotriosisia varastokäymisessä uutepitoisuus laskee erittäin hitaasti, mikä ei ole toivottua.

Lämpötilasta riippuu hiilidioksidin liukeneminen olueen (Enari & Mäkinen, 2014, s.154). Mitä alhaisempi lämpötila on, sitä enemmän hiilidioksidia liukenee nesteeseen. Tästä syystä käymislämpötila kannattaa pudottaa mahdollisimman alas. Suositettu lämpötila-alue varastokäymiselle on 1–3 °C. Suljetussa tankissa kaasun paine nesteen päällä suurenee käymisen jatkuessa. Hiilidioksidi liukenee etanoliin paremmin kuin veteen, joten liukoisuus lisääntyy oluen alkoholipitoisuuden kasvaessa.

Etenkin alhaisissa lämpötiloissa jälkikäyminen on hidasta (Enari & Mäkinen, 2014, s.154). Varastokäymisvaihe tapahtuu useimmiten samassa lämpötilassa varsinaisen alkoholikäymisen kanssa. Käymistankit on varustettu paineensäätölaitteistoilla, jotka takaavat vastapaineen riittävän muodostuksen ja pysymisen. Kojeisto on säädetty toimimaan halutulla paineella ja jos tankin paine ylittää tämän, niin laite päästää kalvoventtiilin kautta kaasua ulos.

Perinteisesti kojeistoon on kuulunut vesikuppi, jonka kautta hiilidioksidi kuplii (Enari & Mäkinen, 2014, s.155). Näin kaasunmuodostus ja ulosvirtaus on voitu havaita. Jokainen tankki on tavallisesti varustettu omalla tulppakojeistolla, kuitenkin useita tankkeja voidaan myös kytkeä yhteiseen kolonnitulputukseen letkujen avulla.

Jotta toiminta olisi onnistunutta, on tärkeää aloittaa tankin paineensäätö oikeaan aikaan (Enari & Mäkinen, 2014, s.154). Tankin tulpittaessa heti täyttymisen jälkeen vilkkaasti alkava jälkikäyminen helposti tahrii kojeiston ja saattaa näin aiheuttaa jopa tukoksia. Liian myöhäinen sulkeminen taas johtaa siihen, ettei hiilihappoa muodostu riittävästi, eikä paine nouse tarpeeksi suureksi. Tulputuksen aloittamisen ajankohta riippuu käymiskelpoisten sokereiden, eli jäännösuutteen määrästä sekä lämpötilasta. Ajankohta on valittu oikein, kun pian sulkemisen jälkeen paine alkaa kohoamaan hitaasti ja suurenee päivä päivältä. Kaasun kuplimisen on oltava tasaista.

Tulputuspaineena käytetään useimmiten 0,30–0,45 barin yläpainetta (Enari & Mäkinen, 2014, s.155). Lämpötila vaikuttaa oleellisesti paineeseen, mitä korkeampi lämpötila suurempaa painetta käytetään ja päinvastoin. Käytettävään paineeseen vaikuttaa myös varastointiajan pituus. Lyhyt varastointiaika edellyttää kohotettua painetta.

Painetta valittaessa on otettava huomioon varastotankin nestekorkeus (Enari & Mäkinen, 2014, s.156). Nestekorkeuden ollessa 10 metriä on hydrostaattinen paine noin 1 bar. Tämän takia korkeissa tankeissa on eri korkeuksissa eri paine. Käymistankeissa tapahtuu aina kuitenkin sekoittumista luonnollisen nesteliikkeen vuoksi. Oluen laatuominaisuudet ovat käymisen lopussa lähestulkoon tarkalleen samat tankin eri osissa.

Korkeassa hydrostaattisessa paineessa tankin alaosassa sitoutunut hiilihappo ei vapaudu, vaikka sekoittumisen johdosta olut siirtyy tankin yläosaan, jossa on alhaisempi hydrostaattinen paine (Enari & Mäkinen, 2014, s.156). Haluttu hiilihappopitoisuus voidaan säätää ennen pakkaamista nykyaikaisissa panimoissa.

Oluen maun kypsyminen on monivaiheinen tapahtumasarja (Enari & Mäkinen, 2014, s.156). Oluen flavori on pääkäymisen jälkeen raaka, kitkerä ja vastenmielinen. Siitä huolimatta pääkäyminen on flavorin kannalta ratkaiseva. Flavoria voidaan vain pehmentää

ja kypsentää varastoinnilla. Jos pääkäymisessä on tullut makuvirhe, niin sitä ei todennäköisesti saada varastoinnilla paremmaksi.

### 3 HIIVA

Hiivat ovat mikroskooppisen pieniä yksisoluisina eläviä kasveja (Enari & Mäkinen, 2014, s.112). Kasvitieteellisessä systematiikassa hiivat luetaan sieniin kuuluviksi. Hiivat ovat toisen varaisia, koska ne ovat lehtivihreättömiä. Hiivat ovat yksisoluisia sieniä, jotka elävät kosteissa ympäristöissä, missä on saatavilla sokereita, kuten puunkuorella, hedelmissä tai kukissa (solunetti, i.a.). Hiivat lisääntyvät muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta kasvullisesti kuroutumalla (Enari & Mäkinen, 2014, s.112). Hiivojen tarpeet kasvutekijöihin liittyen vaihtelee paljon (Walker, 1998, s.57).

#### 3.1 Hiivojen ryhmittely

Oluenpanosta ei tulisi mitään ilman hiivaa (Strömberg & Syvänen, 1990, s.73). Erilaisten hiivojen käytöllä oluet jaetaan kahtia. Hiivat jaetaan tieteellisesti kahteen ryhmään, itiöllisiin (sporogeeniset) ja itiöttömiin (asporogeeniset) (Enari & Mäkinen, 2014, s.112). Itiöllisillä lajeilla tavataan suvullista lisääntymistä, kun taas itiöttömillä lajeilla tavataan vain kasvullista lisääntymistä. Monet itiöttömistä lajeista on voitu osoittaa olevan ovat suvullisesti lisääntyvien lajien muotoja. Ne poikkeavat toisistaan ainoastaan lisääntymiskyvyn puolesta.

Hiivat voidaan jakaa kulttuurihiivoihin ja villihiivoihin (Enari & Mäkinen, 2014, s.112–113). Nämä ovat lajeja, joita ihmiset viljelevät erilaisia tarkoituksia varten. Hiivoja on tämän jaon perusteella panimohiivoja, viinihiivoja, leipomohiivoja, polttimohiivoja ja reuhiivoja. Joitain hiivalajeja viljellään moniin eri tarkoituksiin. Kaikki lajit, jotka kasvavat luonnossa ilman viljelytoimenpiteitä ovat villihiivoja. Hiivalajeista suurin osa kuuluu villihiivoihin.

Hiivat jaetaan kahteen kategoriaan myös sen perusteella, kuinka ne käyttäytyvät nestemäisessä alustassa kasvaessaan (Enari & Mäkinen, 2014, s.113). Nimensä mukaisesti pohjahiiva on käymisen aikana pohjalla ja pintahiiva pinnalla (Koskinen, 2022, s.89). Kuitenkin lopuksi molemmat saostuvat käymisastian pohjalle.

Hiivat voidaan jakaa fermentatiivisiin ja oskidatiivisiin hiivoihin sen mukaan, miten ne tarvitsevat hapetta kasvaessaan (Enari & Mäkinen, 2014, s.113). Fermentatiiviset hiivat

ovat tyypillisesti matala-alkoholisten juomien pilaajia siitä syystä, että ne pystyvät fermentoimaan sokereita vähähappisissa ja happamissa oloissa (Puhakka, 2019. s.7).

### 3.2 Hiiva oluessa

Oluen valmistuksessa voidaan käyttää pinta- ja pohjahiivoja (Enari & Mäkinen, 2014, s.143). Lager on yleisnimitys pohjahiivalla käyneille oluille (Strömberg & Syvänen, 1990, s.96). Tunnusomaista pintahiivalle on sen käymislämpötila (Strömberg & Syvänen, 1990, s.73). Ne käyvät yleensä 15 – 25°C lämpötilassa.

Olutta valmistessa pääkäyminen alkaa, kun hiiva lisätään jäähdytettyyn ja ilmastettuun vierteeseen (Enari & Mäkinen, 2014, s.143). Vierteeseen lisättävän hiivan ominaisuuksilla on ratkaisevasti merkitystä käymisen häiriöttömälle edistymiselle ja valmiin tuotteen laatuun. Yleensä olut valmistetaan yhdellä hiivakannalla, joka tunnetaan tarkasti ja on viljelty puhtaaksi, eikä useamman hiivakannan seoksia suositella. Kuitenkin eri tankeissa käymisessä voidaan käyttää hiivauksessa eri hiivalajeja.

Hiivan merkitys oluelle on oleellinen paitsi sen alkoholintuottamiskyvyn takia, on se myös olennainen oluen maun kannalta (Strömberg & Syvänen, 1990, s.77). Oluessa käytetty hiiva vaikuttaa sen flavorissa useaan tekijään, ja hiivat antavatkin jokaiselle oluelle niille ominaisen maun (Koskinen, 2022, s.66). Oluessa maistuu hiivan tuottamat aineet, esterit, jotka hiivalajista riippuen ilmenevät hedelmällisyytenä tai mausteisuutena (Koskinen, 2022, s.67–68). Noin huoneenlämmössä käyvät pintahiivat tuottavat enemmän makuaineita. Viileässä käyvät pohjahiivat taas tuottavat vähemmän makuaineita

Hiiva alkaa syömään sokereita ja lisääntymään, kun se lisätään vierteeseen (Koskinen, 2022, s.66). Hiiva syö ensin yksinkertaiset sokerit. Hiiva ei jaksa pilkkoa komplekseja sokereita ja ne jäävät olueen makeudeksi ja paksuudeksi.

Vierteen hiivauksessa käytetään aikaisemmista käymisistä saatua hiivaa tai puhdasviljeltyä hiivamassaa (Enari & Mäkinen, 2014, s.143). Hiivan puhdasviljely alkaa laboratoriossa, jossa kannan varastoviljelmästä otetaan aseptisesti soluja nestemäiseen steriloituun ravintoalustaan. Ravintoalustana voidaan käyttää esimerkiksi vierrettä. Hiivan annetaan kasvaa vuorokauden ajan, jonka jälkeen se kaadetaan noin puoleen litraan

steriiliä vierrettä. Hiivan annetaan taas kasvaa vuorokauden verran, jonka jälkeen se kaadetaan noin viiteen litraan steriiliä vierrettä. Tässä vaiheessa hiivan kasvatusikä on 2–3 vuorokautta.

Panimon hiivakellarissa puhdasviljelylaitteistoissa pystytään jatkamaan hiivan kasvatusta (Enari & Mäkinen, 2014, s.143). Propagointiastiat, eli hiivan kasvatusastiat valmistetaan yleensä ruostumattomasta teräksestä. Propagointiastiat ovat suljettuja säiliöitä ja ne on tavallisesti varustettu jäähdytysvaipalla sekä höyrysterilointijärjestelmällä.

Tätä laitteistoa voidaan käyttää keskeytymättömästi hiivan kasvatukseen, jolloin astiaa ei tyhjennetä kokonaan, vaan sinne jätetään pieni siirros, jonka jälkeen astia voidaan täyttää uudelleen steriilillä vierteellä (Enari & Mäkinen, 2014, s.143). Kun käytetään keskeytymätöntä kasvatusta, on oltava todella varovainen kontaminaatioiden suhteen. Tulee käyttää vain steriloituja ravintoliuoksia sekä työskenneltävä todella aseptisesti.

Hiivan ominaisuudet hitaasti muuttuvat, eli hiiva degeneroituu, jonka vuoksi hyvän tuloksen saamiseksi on propagointiastiaan vaihdettava uusi laboratorioissa kasvatettu puhdasviljelmä vuodessa 1–3 kertaa (Enari & Mäkinen, 2014, s.143).

### **3.3 Hiivan puhdistus**

Käymistankissa sedimentoitunut hiiva sopii hiivaukseen yleensä hyvin (Enari & Mäkinen, 2014, s.144). Sedimentissä on kolme kerrosta, pohjakerros, ydinkerros ja pintakerros. Ydinkerros on näistä parasta hiivausmassaa. Yleensä pohjakerros on sedimentin saastunein osa, ja sen vuoksi se voidaan poistaa käymisen alkupuolella kartiopohjatankissa. Sedimentin pintakerros taas sisältää paljon komponentteja, kuten humalan liukenemattomia hartseja, tanniinipartikkeleita sekä proteiinisaostumia, jotka on erottunut vaahtopeitteeseen.

Hiiva on puhdistettava ennen käyttöönottoa, koska myös ydinhiiva sisältää kuolleita hiivasoluja, sekä monenlaisia kersaostuneita partikkeleita (Enari & Mäkinen, s, 144, 2014). Nämä voivat aiheuttaa autolyysistä johtuvia makuvirheitä. Täryseulaa voidaan

käyttää hiivan puhdistamiseen, koska se poistaa suurimman osan kiinteistä epäpuhtauksista tehokkaasti. On kuitenkin huomioitava kontaminoitumisriski. Hiivaa voidaan pestä myös kylmällä, happirikkaalla ja puhtaalla vedellä tai miedolla hapolla. Useimmin käytetään fosforihappoa. Hiivamassan mikrobiologinen puhtaus tutkitaan pesun jälkeen. Hiivaukseen ei saisi käyttää ns. villihiivaa tai vaarallisia kontaminantteja sisältävää hiivaa.

### 3.4 Hiivanmassan säilytys

Uuden käymispanoksen hiivaukseen ei aina oteta hiivaa välittömästi käyttöön, jolloin sitä voidaan joutua säilyttämään useita vuorokausia (Enari & Mäkinen, 2014, s.144). Hiivaa säilytetään tavallisesti jäähdytysvaipoilla varustetuissa hiiva-astioissa. Säilytyslämpötilan tulee olla 0–2°C ja hiivan päällä olevan veden tulee olla kovaa vettä. Hiiva heikkenee nopeasti pehmeässä vedessä, koska hiivasoluista diffundoituu ulos sytoplasman komponentteja. Jos hiiva tulee nopeasti uudelleenkäyttöön sitä ei jäähdytetä juurikaan.

Säilytyksen aikana hiivasolut käyttävät elintoimintoihinsa solunsisäistä vararavintonaan, glykogeeniä (Enari & Mäkinen, 2014, s.144). Jos hiivaa säilytetään kauan, ja sen glykogeenivarannot loppuvat voidaan veden sijasta käyttää esimerkiksi laimennettua vierrettä. Hiiva alkaa käyttämään laimennettua vierrettä hitaasti alhaisessa lämpötilassa.

Hiivaa kierrätettäessä sen fermentointiominaisuudet paranevat (Enari & Mäkinen, 2014, s.145). Fermentointiprosessissa hiivat lisääntyvät käyttäen tiettyjä tärkkelyksen sokereita ravintonaan muuttaen ne lopulta alkoholiksi (Denny, 1953, s.12). Koska sedimentoitunut hiiva on sopeutunut puhdasviljelyhiivaa paremmin käymistankin olosuhteisiin, fermentoi käymistankin ensimmäinen sedimenttahiiva vierteen puhdasviljelystä otettua hiivaa nopeammin (Enari & Mäkinen, 2014, s.145). Hiivan fermentoimiskyky pysyy hyvänä monenkin kierrätyksen aikana, jos mikrobiologinen puhtaus pysyy riittävän hyvänä. Hiiva kuitenkin heikkenee, eli degeneroituu vähitellen, jolloin se on otettava pois käytöstä. Nopea käyntiinlähdon varmistamiseksi hiivaa voidaan esivalmentaa antamalla hiivalle vierrettä ja happea ennen hiivausta.

### 3.5 Panimohiivan suhtautuminen happeen ja lämpötilaan

Panimohiivat ovat fakultatiiveja, eli ne elävät ja lisääntyvät sekä hapen läsnä ollessa että poissa ollessa (Enari & Mäkinen, 2014, s.116). Kun happea on saatavilla käyttää hiiva sitä solun hengitykseen pilkkoen sokerin täydellisesti ja näin tuottaen vettä energia-aineenvaihdunnan lopputuotteena. Koska energiaa on käytettävissä runsaasti, on kasvu tällöin voimakasta. Jos hiivalla ei ole saatavilla happea se käyttää sokerit eli fermentoi tuottaen etanolia, sekä hiilidioksidia. Tällöin kasvu on vähäistä, koska etanolimolekyyleihin jää paljon energiaa käyttämättä.

Hapettomat olosuhteet ovat alkoholin muodostumisen kannalta välttämättömät, mutta kasvun kannalta hapelliset olosuhteet ovat eduksi (Enari & Mäkinen, 2014, s.116). Eräiden solumembraanin komponenttien, sterolien ja tyydyttämättömien rasvahappojen synteesiin hiiva vaatii happea. Hiivan solumembraani rakentuu puutteellisesti, tai se ei muodostu ollenkaan, jos se ei saa kasvun aikana happea. Ennen vierteen hiivausta se ilmataan, jotta käymiseen saadaan riittävä hiivan kasvu, mutta saadaan vältettyä hiivan turha kasvattaminen. Tämä on ainoa hetki oluen valmistuksessa, kun mukaan varta vasten halutaan ilmaa (Koskinen, 2022, s.89). Ilman sijalla voidaan käyttää puhdasta happea, varsinkin vahavierretekniikkaa käytettäessä (Enari & Mäkinen, 2014, s.116). Happitaso ei kuitenkaan saa nousta liian korkeaksi, mikä puhtaan hapen kanssa toimiessa on vaarana. Vaikkakin käyminen on tehokkaimmillaan anaerobisissa olosuhteissa, panimohiivat pystyvät muodostamaan alkoholia myös hapen läsnä ollessa.

Panimohiivat ovat mesofiilejä, eli niiden kasvun optimilämpötila on 20–40°C (Enari & Mäkinen, 2014, s.117). Panimohiivojen optimilämpötila kasvuun ja käymiseen on 25–30°C. Ne kuitenkin viihtyvät hyvin laajalla lämpötila-alueella. Hiiva tuottaa sitä enemmän makuja, mitä lämpimämpi käyminen on (Koskinen, 2022, s.89). Kuitenkin on hiivasta riippuen, niillä on oma optimilämpötila. Panimopintahiivat viihtyvät pohjahiivoja huonommin alhaisissa lämpötiloissa. Niinpä pintahiivakäymisessä lämpötila on yli 15°C, kun taas pohjahiivakäymisessä lämpötila on yleisesti 10–15°C. 40°C:ssa hiivojen kasvu tyrehtyy, ja hiivat kuolevat viimeistään 60°C:ssa (Enari & Mäkinen, 2014, s.117).

### 3.6 Kuolleet hiivasolut oluessa

Panimohiivat ovat erittäin kestäviä organismeja, joilla on vahvat soluseinät ja kyky selviytyä happamissa olosuhteissa ja alkoholiliuoksissa (Philliskirk, 2024). Ne eivät kuitenkaan ole kuolemattomia, ja lopulta antautuvat erilaisille rasituksille käymisen, käsittelyn ja pitkäaikaisen varastoinnin aikana. Autolyysi on näiden lopputulos.

Kuolleiden hiivasolujen hajoamista kutsutaan autolyysiksi (beerselect, 2021). Autolyysi vapauttaa hiivasolujen sisällön. Autolyysi tarkoittaa itsetuhoa (Philliskirk, 2024). Hiivasolut koostuvat pääasiassa aminohapoista ja entsyymeistä (beerselect, 2021). Autolyysillä on useita seurauksia, joista tärkeimpiä ovat maku muutokset ja entsyymaattinen ruoansulatus (Philliskirk, 2024).

Maun muutokset havaitaan helposti (Philliskirk, 2024). Maku on yleensä terävä ja karvas ja jonka lihainen ja rikkimäinen reuna johtuu joistakin hiivassa olevista aminohapoista ja nukleotideista. Autolyysin voi estää valitsemalla laadukkaan hiivan, tarkkailemalla lämpötilaa käymisen aikana ja varmistamalla riittävä hapensaanti (beerselect, 2021).

Heikot ja epäterveet hiivasolut tuhoavat itsensä paljon nopeammin, kuin vahvat hiivasolut (beerselect, 2021). Siksi on selvää, että laadukkaan hiivan käyttö vähentää autolyysin mahdollisuutta. Autolyysi voi johtua oluen liian nopeasta kuumentamisesta tai jäähtymisestä käymisen aikana. Jos hiivasolut eivät lisääntyessään saa riittävästi happea, ne heikkenevät ja alkavat tuhota itseään nopeammin. Vierteen ilmaus on tarpeen kuolleiden hiivasolujen välttämiseksi. Paljon hiivaa sisältävä, ja liian kauan säilytetty olut voi myös sisältää paljon kuolleita hiivasoluja.

Vaurioituneiden ja kuolleiden hiivasolujen osuuden kasvu johtaa oluen sameuden lisääntymiseen (Meledina & Davydenko & Dedegkaev, 2015, s.99). Entsyymaattinen pilkkominen liittyy erityisesti proteaaseihin, jotka vuotavat soluista ja pilkkovat oluessa olevia proteiineja (Philliskirk, 2024). Tämä johtaa vaahdon nopeaan romahtamiseen ja tasaisen oluen vaikutelmaan.

## 4 LABORATORIOSSA TOIMIMINEN

### 4.1 Aseptinen näytteenotto

Aseptisen näytteenottovälineen täytyy olla sellaisesta materiaalista valmistettu, ettei se voi saastuttaa näytteitä (Ruokavirasto, 2022). Aseptisen näytteenottovälineen on sovelluttava laadultaan, materiaailtaan ja rakenteeltaan aseptisessä näytteenotossa käytettäväksi. Kaikkien näytteenottovälineiden, jotka joutuvat kosketuksiin näytteen kanssa on oltava soveltuvia aseptiseen näytteenottoon. Ennen näytteen ottoa näytteenottovälineiden on oltava puhtaita, kuivia ja desinfioituja

Aseptisuuden vaatimus on huomioitava varusteiden valinnassa (Ruokavirasto, 2022). Myös näytteenottokohteen ja näytteenottotilan puhtausvaatimukset tulee ottaa huomioon. Käsinäytteenotossa käytettävien välineiden tulee olla valmistettu ruostumattomasta teräksestä tai muusta materiaalista, joka soveltuu aseptiseen näytteenottoon. Käsiteltäessä aseptisesti otettavia näytteitä on kaikki toimenpiteet tehtävä koskematta näytteenottovälineiden desinfioituihin pintoihin.

### 4.2 Turvallinen laboratoriotyöskentely

Laboratoriossa työskenneltäessä on erilaiset kemikaalit aina läsnä (Somersalo, 2021). Työskentelyn edellytyksenä on turvallinen laboratorio. Lainsäädäntö antaa tähän raamit. Lainsäädännön ansiosta kemikaalien turvallinen käyttö ja säilytys on mahdollista. Kaikkialla missä käytetään kemikaaleja, tulee soveltaa kemikaalilainsäädäntöä. Suomessa oleva kemikaalilainsäädäntö perustuu EU:n kemikaalisäädöksiin, joita jatkuvasti kehitetään (Karinen, 2018). Työskentely laboratoriossa vaatii siisteyttä, huolellisuutta sekä järjestelmällisyyttä. Nämä ovat erityisen tärkeitä onnettomuuksien estämiseksi. Siisteyttä ja järjestystä tulee noudattaa. Työpöytä sekä työvälineet on pidettävä siisteinä.

## 5 HEMOCYTOTOMETRIN KÄYTTÖ

### 5.1 Hemocytometrinn käyttö

Ennen käyttöä tulee varmistaa, että hemocytometri ja sen päällyslasi ovat puhtaita poistamalla pölyhiukkaset linssipaperilla (Grigoryev, 2021). Peitinlasi tulee laittaa hemocytometrinn päälle ennen solususpension pipetointia. Pipettiin otetaan näytettä ja pipetin pää asetetaan johonkin V:n muotoisista kuopista. Peitinlasi alla oleva alue peittyy kapillaari toiminnalla. Näytettä tulee lisätä riittävästi, jotta peilattu pinta juuri täyttyy, yleensä noin 10 µl. Näytettä ei saa kuitenkaan lisätä liikaa. Hemocytometri asetetaan mikroskoopin tasolle ja laskentaristikoon tarkennetaan. Peitinlasia ei tule liikutella, koska se saattaa aiheuttaa ilmakuplia, joka voi vaikeuttaa laskemista.

### 5.2 Solujen laskeminen hemocytometrillä

Hemocytometrinn täysi ruudukko koostuu yhdeksästä neliöstä, joista jokainen on 1mm<sup>2</sup> (Grigoryev, 2021). Hemocytometrinn keskilaskenta alue sisältää 25 suurta ruutua, ja jokaisessa on 16 pienempää ruutua. Soluja laskiessa suspension tulee olla riittävän laimeaa, ettei solut mene päällekkäin ruudukossa ja ne jakautuisivat tasaisesti. Kuolleiden solujen tunnistusmenetelmä metyleenisinin avulla on laajalti käytetty (Meledina & Davydenko & Dedegkaev, 2015, s.993). Metyleenisini värjää sytoplasman proteiineja, kuolleet solut ovat sinisiä.

Solujen laskennassa on huomioitava, että lasketaan neliöitä keskellä sijaitsevalla 1 mm:n 2-viivaisella alueella (White Labs Technical Team, 2021). Esimerkiksi yläviivalla ja oikealla olevalla viivalla olevia tai niitä koskettavia soluja ei lasketa, kun taas alaviivalla ja vasemmalla viivalla olevia ja niitä koskettavat solut lasketaan. Tämä siksi, ettei soluja lasketa kahdesti (Grigoryev, 2021).

Laskennan suorittamiseksi määritetään halutun solutyypin tunnistamiseen tarvittava suurennus, jonka jälkeen lasketaan järjestelmällisesti solut valituista neliöistä (Grigoryev, 2021). Suuria soluja varten voi laskea solut neljän suuren kulmaneliön ja keskimmäisen neliön sisällä. Pienten solujen tiheämpää suspensiota varten voi laskea solut keskusneliön

neljästä uloimmasta ja keskimmäisestä neliöstä tai valmistaa laimeampi suspensio. Kunkin kulman neliön pinta-ala on 1 mm x 1 mm, eli 1mm<sup>2</sup>. Jokaisen neliön syvyys on 0,1 mm.

Selukonsentraatio lasketaan kaavan avulla (Grigoryev, 2021). Jos haluaa tietää, paljonko soluja on alkuperäisessä näytteessä, kerrotaan solupitoisuus näytteen kokonaistilavuudella.

## 6 TYÖOHJEIDEN LUOMINEN

Työohjeisiin tiedot tulisi saada lyhyesti ja ytimekkäästi (Lavikainen & Makkonen, 2020). Kirjallinen suunnitelma tulee tehdä aina opastuksen tueksi (Työturvallisuuskeskus, i.a). On tärkeää, että työohjeen jäsentely on oikeaoppista, siten ohjeen seuraaminen on helpompaa ja työvaiheet suoritetaan oikeassa järjestyksessä (Lavikainen & Makkonen, 2020). Kaikkea tietoa ei ole järkevää tai mahdollista saada työohjeisiin. Jos kaikki vähäkin informaatio työn suorittamiseen liittyen koitetaan saada sisällytettyä työohjeisiin, on vaarana, että työohjeen pituudesta tulee liian pitkä, jolloin sen lukeminen voi muuttua liian raskaaksi. Työohjeessa on järkevää hyödyntää niin paljon kuvia kuin mahdollista. Kuviin saadaan taltioitua paljon informaatiota ja niillä on helppo osoittaa, mistä mikäkin tieto löytyy, mikä saattaa kirjoitettaessa olla hankalampaa.

Työohjeet ovat työhön perehdyttäessä hyvä apuväline (Lavikainen & Makkonen, 2020). Niitä voidaan myös käyttää muistilistana työtä tehtäessä. Työopastus on tarpeen esimerkiksi silloin, kun työtehtävä tai menetelmä vaihtuu tai työ on tekijälleen uusi (Työturvallisuuskeskus, i.a). Työtehtäviin perehdyttämistä tarvitaan työn alkaessa, työn muuttuessa ja pitkän poissaolon jälkeen. Prosessien ongelmakohdat tulevat hyvin esiin työohjeita laatiessa (Lavikainen & Makkonen, 2020). Työvaiheita kirjattaessa huomataan monesti, että jotkut vaiheet aiheuttavat ylimääräistä työtä. Kehittämällä näitä asioita, säästetään työntekijöiden työaika samalla tehostaen yrityksen prosesseja. Työohjeet lisäävät työpaikalla työtehtävien läpinäkyvyyttä ja siten voidaan myös helpommin selvittää, jos jokin työtehtävä ei kuulu kenenkään vastuualueeseen. Työohjeiden avulla esihenkilöt pystyvät ymmärtämään paremmin heidän alaistensa työtehtäviä. Siten he pystyvät paremmin arvioimaan heidän alaistensa ajankäyttöä sekä työtehtäviin liittyviä haasteita.

Työtehtävissä, joissa vaihtelu on suurta, tulee haasteita (Lavikainen & Makkonen, 2020). Työohjeiden ajan tasalla pitäminen tuo myös oman haasteensa. Työohjeita tulee päivittää aina, kun työn sisältö muuttuu tai jos yrityksen prosesseja päivitetään. Tämä monesti unohdetaan, jolloin työohjeet jäävät vanhenemaan sen jälkeen, kun ne on tehty. Työohjeet auttavat monia eri tahoja yrityksen sisällä. Hyvin laadittuna työohjeet tehostavat prosessien toimintaa, nopeuttavat uusien työntekijöiden perehdyttämistä, jakavat vastuuta tasaisemmin ja tekee toiminnasta läpinäkyvää.

## 7 MENETELMÄT

### 7.1 Menetelmään tutustuminen

Opinnäytetyön alussa tutustuttiin hiivasolujen laskemiseen hemocytometrillä. Aluksi piti myös tutustua tarkemmin mikroskoopin käyttöön sekä hemocytometrin lukemiseen. Näiden hallitseminen vaati usean tutustumiskerran. Harjoitukset suoritettiin Seinäjoen ammattikorkeakoulun laboratoriossa.

Hiivasolujen laskennan opettelua varten tehtiin liuos, johon laitettiin yksi gramma tuorehiivaa litraan tislattua vettä. Liuokseen lisättiin vielä metyleenisiniä, jotta erotettaisiin kuolleet hiivasolut elävistä. Liuoksia tehtiin ensin eri vesimäärillä, jotta löydettiin laimennos, jossa hiivasoluja oli sopiva määrä yhdessä ruudussa. Liuos sekoitettiin tasaiseksi niin, että hiiva oli täysin liuennut veteen oikean tuloksen varmistamiseksi. Liuosta pipetoitiin hemocytometriin ja se laitettiin mikroskoopin alle. Ensin kymmenkertaisella objektiivilla hemocytometristä etsittiin ruudukko. Kun mikroskoopilla saatiin koko ruudukko esiin, vaihdettiin satakertaiseen objektiiviin. Tämän jälkeen mikroskoopilla etsittiin hemocytometristä yksi halutun kokoinen ruutu ja siitä laskettiin hiivasolut. Tämä toistettiin kymmenelle samankokoiselle ruudulle, jolloin hiivasolut saatiin laskettua kymmenestä ruudusta.

Hiivasolut laskettiin kymmenestä ruudusta siten, että ruudun yläreunaan ja oikeaan reunaan osuvia hiivasoluja ei laskettu. Tätä toistettiin useita kertoja, kunnes mikroskoopin käyttö ja hemocytometrin ruudukon löytyminen sekä hiivasolujen laskeminen sujui ongelmitta. Kun hiivasoluja oli laskettu useampaan otteeseen ja se alkoi sujua, varmistettiin, että laskettu tulos oli oikea. Oikea tulos varmistettiin laskemalla hiivasolujen määrä litrassa vettä käyttäen siihen tarkoitettua laskukaavaa. Laskukaavalla saamaa tulosta verrattiin liuokseen käytetyn hiivan paketissa esitettyyn hiivasolujen määrään. Kun saatu tulos täsmäsi liuoksessa käytetyn hiivan paketissa kerrotun hiivasolujen määrän kanssa, tiedettiin, että hiivasolut oli laskettu oikein.

Työssä ensimmäiseksi laskettiin toimeksiantajan hiivalietteistä hiivasoluja. Hiivojen nimet ja numerot on salaista tietoa. Tämän avulla saatiin käsitys siitä, kuinka eri hiivat eroavat toisistaan ja mitä asioita pitää ottaa huomioon niitä laskiessa. Elävien hiivasolujen määrä

laskettiin seitsemästä eri hiivasta. Jokaisesta laskettavasta hiivasta otettiin aseptisesti näytepurkkiin näytettä. Hiivasolut laskettiin kaikista hiivoista kaksi kertaa ja laskukertojen välillä oli neljä päivää. Hiivasta tehtiin laimennos, johon laitettiin 100–200 ml tislattua vettä, 1 ml hiivaa ja muutama tippa metyleenisiniä. Aluksi laimennokset tehtiin 100 ml:aan tislattua vettä, mutta joidenkin hiivojen kohdalla laimennoksesta ei tullut tarpeeksi laimeaa, jolloin hiivasoluja oli yhtä ruutua kohden niin monta, että hiivasolut menevät päällekkäin ja niitä on mahdoton laskea. Laimennoksia tehtiin eri vesimäärillä, kunnes niihin saatiin sopiva pitoisuus. Sopiva pitoisuus oli silloin, kun yhtä ruutua kohti hiivasoluja oli sen verran, että ne pystyttiin laskemaan luotettavasti. Kuitenkin haluttiin, että yhtä ruutua kohti hiivasoluja on useampi, että tulos olisi mahdollisimman luotettava. Tarkkaa toivottua hiivasolujen määrää ei kuitenkaan ollut määritetty.

Kaikkiin laimennoksiin pipetoitiin 1 ml hiivalietettä ja lopuksi laimennoksiin pipetoitiin vielä muutama tippa metyleenisiniä. Metyleenisini värjää kuolleet hiivasolut ja tämän avulla pystyttiin määrittämään ja laskemaan elävät hiivasolut. Kun oli saatu sopiva laimennos tehtyä, sitä pipetoitiin puhdistettuun hemocytometriin. Hemocytometri asetettiin mikroskoopin alle ja siitä etsittiin ruudukko.

Hiivasolut laskettiin hemocytometrillä kymmenestä samankokoisesta ruudusta, siten, ettei ruudun yläreunaan tai oikeaan reunaan osua soluja laskettu. Hiivoista laskettiin hiivasolut kahdesti. Ensimmäiset laskut suoritettiin toimeksiantajan laboratoriossa ja toisen kerran hiivasolut laskettiin neljän päivän päästä Seinäjoen ammattikorkeakoulun laboratoriossa. Hiivasolut laskettiin samoista hiivanäytteistä ja niiden laskemiseen käytettiin samaa hemocytometriä, mahdollisimman luotettavan tuloksen saavuttamiseksi.

Kun hiivasolut oli laskettu, laskettiin niiden keskiarvo summaamalla kymmenen ruudun laskettu hiivasolujen määrä ja jakamalla se laskettujen ruutujen määrällä eli kymmenellä. Hiivasolujen keskiarvon mukaan saatiin laskettua elävien hiivasolujen määrä yhdessä millilitrassa hiivaa.

## **7.2 Työohjeiden tekeminen ja testaaminen**

Kun eri hiivoista oli laskettu hiivasolut, tehtiin hiivasolujen laskentamenetelmästä työohjeet toimeksiantajalle saatujen tietojen perusteella. Työohjeet luotiin siten, että niillä saataisiin

opastettua mahdollisimman hyvin luotu menetelmä ja, että ne olisivat mahdollisimman kattavat. Työohjeiden luomisessa oli tärkeää, että niiden avulla myös henkilö, joka ei ole koskaan käyttänyt kyseistä menetelmää pystyisi ohjeiden avulla laskemaan hemocytometrillä hiivasoluja. Työohjeista haluttiin mahdollisimman tarkat ja yksityiskohtaiset, mutta myös mahdollisimman selkeät ja yksinkertaiset, että niiden lukeminen ja ymmärtäminen olisi mahdollisimman helppoa. Työohjeeseen ei haluttu lisätä mitään ylimääräistä. Työohjeissa on ohjeistettu aseptinen näytteenotto, liuoksen teko, hemocytometrin käyttö, solujen laskenta hemocytometrillä ja tulosten laskenta.

Jokaisessa työohjeiden kohdassa on listattu siinä tarvittavat välineet ja työohjeissa ohjeistetaan kohta kohdalta, kuinka missäkin vaiheessa tulee toimia. Työohjeet on tehty sen mukaan, kuinka toimeksiantajan tiloissa toimitaan. Esimerkiksi aseptinen näytteenotto on ohjeistettu sen mukaisesti kuin toimeksiantaja panimolla näytteenotossa toimitaan.

Kun työohjeet oli saatu valmiiksi, ne testattiin toimeksiantajalla. Ensin työohjeet käytiin toimeksiantajan kanssa läpi ja työohjeisiin tehtiin vielä pieniä muutoksia. Kun työohjeet olivat siltä osin valmiit, ne testattiin, jotta voitiin olla varmoja niiden toimivuudesta.

Työohjeita testatessa kokeiltiin laimennoksia tehdä erilaisilla automaatiopipeteillä, kunnes löytyi se, jolla laimennokseen kannattaa otettua hiivalietenäytettä pipetoida. Työohjeiden testaamisen yhteydessä otettiin vielä kuvia, jotka liitettiin työohjeisiin selkeyttämään niitä. Työohjeiden testauksen jälkeen ohjeet ja niissä käytetty menetelmä käytiin läpi toimeksiantajalla työskentelevän laborantin kanssa.

## 8 TULOKSET

Opinnäytetyössä tehtiin toimeksiantajalle työohjeet hiivasolujen laskemiseen. Työohjeissa ohjeistetaan aseptinen näytteenotto, liuoksen valmistaminen, hemocytometrin käyttö, sekä hiivasolujen laskenta mikroskoopilla. Ohjeessa käydään joka kohdassa läpi, mitä välineitä sen työvaiheen toteuttamisessa tarvitaan. Välineiden listauksen jälkeen on listattu työvaiheet kohta kohdalta. Tämä toistettiin jokaisen työvaiheen kohdalla.

Joissain kohdissa työvaiheiden listauksen jälkeen on vielä kirjoitettu, mitä kyseisessä kohdassa pitää ottaa huomioon. Ohjeeseen lisättiin myös kuvia havainnollistamaan joitain kohtia. Kuvat havainnollistavat myös, miltä esimerkiksi tehdyn liuoksen tai täytetyn hemocytometrin tulisi näyttää.

Ohjeissa lopuksi on ohjeistettu, kuinka laskettujen hiivasolujen määrällä saadaan laskettua hiivasolujen määrä halutussa määrässä hiivalietettä. Ohjeeseen on kirjattu siihen tarvittava kaava. Lisäksi ohjeeseen laitettiin esimerkkilasku havainnollistamaan, kuinka kaavaa käyttäen saadaan laskettua hiivasolujen määrä 1 ml:ssa hiivalietettä.

Ohje käytiin vielä ennen testausta läpi toimeksiantajan kanssa ja sitä muokattiin, jotta se vastaa paremmin toimeksiantajan menetelmiä. Valmis ohje testattiin, jotta voitiin olla varmoja sen toimivuudesta. Työohjeen testaamisen jälkeen se esiteltiin sitä mahdollisesti tulevaisuudessa käyttävälle työntekijälle.

Toimeksiantaja validoi ohjeen, ja se pystytään sellaisenaan ottamaan yrityksessä käyttöön. Toimeksiantajan omalle vastuulle jää ottaa työohjeet käyttöön sekä tarvittaessa menetelmän yksityiskohtaisempi opastaminen työntekijöille.

Ohjeissa opastetun menetelmän ansiosta toimeksiantajan panimolla saadaan laskettua, kuinka paljon hiivasoluja on missäkin määrässä hiivalietettä. Työohjeissa ohjeistetun menetelmän ansiosta toimeksiantajan yrityksessä pystytään hiivaamaan vierre optimaalisesti. Menetelmän käyttöönoton ansiosta he pystyvät laskemaan tarkan hiivasolumäärän, jonka he lisäävät vierteeseen. Näin vierrettä ei yli hiivata tai ali hiivata.

## 9 POHDINTA

### 9.1 Pohdintaa työstä

Opinnäytetyössä oli tarkoituksena ottaa käyttöön hiivasolujen laskenta menetelmä toimeksiantajan yrityksessä. Käyttöön otetussa menetelmässä hiivassa olevat hiivasolut lasketaan hemocytometrillä, jolloin saadaan laskettua hiivasolujen määrä halutussa tilavuudessa hiivaa. Sitä varten osaa toimeksiantajan käyttämistä hiivoista laskettiin, jotta saatiin kartoitettua, kuinka heillä tulee toimia hiivasolujen laskennassa ja kuinka heillä otetaan näytteitä. Jotta toimeksiantajalle saatiin hiivasolujen laskenta menetelmä käyttöön, piti heille luoda siihen työohjeet.

Vaikka hiivasolut laskettiin samasta näytteestä vain neljän päivän erolla, oli elävien hiivasolujen määrässä suurta hajontaa joidenkin hiivojen kohdalla. Hiivasolut eivät jakaudu täysin tasaisesti hemocytometriin, jolloin pientä hajontaa voi tulla, vaikka solut laskettaisiin aivan peräkkäin. Kuitenkin, jos samasta näytteestä lasketaan solut usean päivän erolla, on mahdollista, että ero on suuri. Hiivalla ei näytepurkissa ole ravintoa, jolloin hiivasoluja kuolee tasaisesti ja mitä pidempään näytteen ottamisesta on.

Hiivasolujen määrä on hyvä laskea kullekin hiivalle tasaisesti. Vanhasta näytteestä laskiessa hiivasolujen määrä ei välttämättä kuvaa todenmukaisesti koko erän hiivasolujen määrää. Elävien hiivasolujen määrä voi vaihdella paljon lyhyenkin ajan sisällä, jos hiivalla ei ole ravintoa. Siksi jokaisella laskukerralla tulee ottaa uusi näyte, jotta laskettu tulos on mahdollisimman luotettava.

Samana hiivan elävien solujen keskiarvo voi vaihdella, joten tarkemman tuloksen saa laskemalla hiivasolujen määrän useammasta samankokoisesta ruudusta ja laskemalla niistä keskiarvon. Jos hiivasolut lasketaan useammasta hemocytometrin ruudusta, tulee tuloksia laskettaessa muistaa käyttää oikeaa ruutujen määrää laskukaavassa.

Työohjeet luotiin siten, että myös uusi työntekijä pystyisi niiden avulla käyttämään menetelmää. Vaikka työohjeista on pyritty tekemään mahdollisimman kattavat, voi olla mahdollista, että jotkut voivat tarvita lisäksi myös opastusta esimerkiksi näytteen ottamisesta tai mikroskoopin käytössä. Mikroskoopin käyttöä ei ole työohjeissa erikseen

opastettu, koska oletus on, että laboratoriossa työskentelevät osaavat mikroskooppia käyttää.

Työohjeet on tehty toimeksiantajalle heidän tarpeisiinsa ja työohjeissa on käytetty heidän toimintatapojaan esimerkiksi näytteenotossa. Työohjeet siis eivät ole suoraan käytettävissä esimerkiksi muissa yrityksissä ja niitä tulee muokata, jos esimerkiksi toimeksiantajalla jokin työohjeissa olevista työvaiheista muuttuu. Työohjeet käytiin toimeksiantaja yrityksessä työskentelevän laborantin kanssa, mutta työohjeiden opettelu ja käyttöönotto jäi täysin heidän omalle vastuulleen.

## **9.2 Arviointia työn toteutuksesta**

Työn toteutus meni mielestäni hyvin. Työohjeiden luominen oli selkeää, kun olin aiemmin käynyt toimeksiantajalla laskemassa hiivasoluja. Se selvensi, kuinka heillä menetelmä kannattaisi ja pitäisi tehdä ja siten ohjeistaa. Mikroskoopin käyttö ja hemocytometrin ruudukon lukeminen olivat itselleni ennestään aika vieraita, joten hiivasolujen laskennan opettelu vaati aikaa ja pitkäjänteistä harjoitusta. Menetelmää piti harjoitella paljon, jotta sain selville, kuinka mikäkin kohta kannattaisi tehdä. Kun harjoitusta oli tarpeeksi, työohjeiden luominen onnistui hyvin.

Työohjeiden käyttöönotto ei kuitenkaan enää kuulunut itselle, vaan jää toimeksiantajan omalle vastuulle. Mahdollisesti myös tämän työvaiheen olisi voinut itse toteuttaa siten, että olisin esimerkiksi ohjeistanut menetelmän jollekin heillä tätä menetelmää tulevaisuudessa käyttävälle, koska itselle menetelmä on nyt tuttu.

## **9.3 Kehitysehdotukset**

Työohjeita testatessa selvisi, että hemocytometrissä oleva ruudukko näkyi todella haaleana. Tämä vaikeuttaa ruutujen hahmottamista ja siten hiivasolujen laskentaa valtavasti. Vaihtoehtoina on, että toimeksiantajan laboratoriossa oleva mikroskooppi tai siinä oleva valo eivät ole parhaat mahdolliset hiivasolujen laskentaan, tai sitten syy saattoi olla myös käytetyn hemocytometrin ruudukoissa. Ruudukko saattoi olla kulunut, vaikka käytetty hemocytometri oli vähän käytetty ja uusi.

Asiaa käytiin toimeksiantajan kanssa läpi ja pohdittiin, olisiko uusi hemocytometri, mikroskoopin lamppu tai mikroskooppi mahdollisesti tarpeen, jotta hiivasolujen laskeminen olisi mahdollisimman helppoa. Tämän ongelman korjaaminen jäi heidän vastuulleen.

## LÄHTEET

- Alko. (i.a.) *Oluen valmistus: Hiivan merkitys oluenpanemisessa*. <https://www.alko.fi/juoma-ruoka/juomatietous/panimotuotteet/oluttieto/hiiva>
- Alko. (i.a.) *Pienpanimo-oluet ovat tekijöidensä taidonnäytteitä*. <https://www.alko.fi/juoma-ruoka/juomatietous/panimotuotteet/oluttieto/pienpanimo-oluet>
- Beer select. (2021). *Off-flavours and brewing errors*. <https://beerselect.be/en/off-flavours-and-brewing-errors/>
- Davydenko, S. G., Dedegkaev, A. T., & Meledina, T. V. (2015). *Yeast physiological state influence on beer turbidity*. *Agronomy Research*, 13(4), 1-12. [https://agronomy.emu.ee/vol134/13\\_4\\_13\\_B5.pdf](https://agronomy.emu.ee/vol134/13_4_13_B5.pdf)
- Denny, M. (1953). *Froth! The science of beer*. (s.12). The John Hopkins university press.
- Enari, T-M., & Mäkinen, V. (2014). *Panimotekniikka*. (s. 112–156). Panimolaboratorio.
- Grigoryev, Y. (29.6.2021). *Cell counting with a hemocytometer: As easy as 1,2,3*. Bitesize Bio. <https://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>
- Hartwall. (2024). *Oluen historia on pitkä ja värikäs*. <https://www.hartwall.fi/inspiroidu/olut/oluen-historia-on-pitka-ja-varikas/>
- Karinen, K. (20.9.2018). *Occupational safety at the school*. Aalto university school of chemical engineering. [https://openlearning.aalto.fi/pluginfile.php/69214/mod\\_resource/content/1/occupational\\_safety\\_v7.8.pdf](https://openlearning.aalto.fi/pluginfile.php/69214/mod_resource/content/1/occupational_safety_v7.8.pdf)
- Koskinen, J. (2022). *Oluiden maailma: Kotikaljasta ohrapirtelöön*. (s. 10–89) Readme.fi.
- Lavikainen, P., & Makkonen, S. (2020). *Työohjeet apuna asiantuntijatyössä*. LAB Pro. <https://www.labopen.fi/lab-pro/tyoohjeet-apuna-asiantuntijatyossa/>
- Leppänen, K. (2021). *Suomalaisen olutkulttuurin jäljillä*. (s.39–41) Vastapaino.
- Pakarinen, L. (i.a) *Pienpanimot kasvattavat suosiotaan*. Alko. <https://www.alko.fi/juoma-ruoka/makujen-maailma/juomatrendit/pienpanimot-kasvattavat-suosiotaan>
- Philliskirk, G. (2024). *The Oxford companion to beer definition of autolysis*. Craft beer & brewing. <https://beerandbrewing.com/dictionary/DQXAk4DwuE/>
- Pienpanimoliitto. (i.a.) *Olutkulttuurin nousu*. <https://pienpanimoliitto.fi/historia>

- Puhakka, H. (2019). *R1 pullotuslinjan prosessihygienian kehittäminen* (Maisteritutkielma, Helsingin yliopisto). <https://helda.helsinki.fi/server/api/core/bitstreams/98f08960-216e-4744-a7d0-e0643daba0df/content>
- Ruokavirasto. (30.12.2022). *Näytteiden ottaminen, valmistaminen ja pakkaaminen*. <https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/rehut/rehut-ja-rehualan-toimijat/valvonta/sisamarkkinakauppa-ja-tuonti/tuontirehujen-salmonellatutkimukset/ohje-viranomaisnaytteenotto-erityisen-riskialttiista-tuontirehuista/4-naytteiden-ottaminen-valmistaminen-ja-pakkaaminen/>
- Sinebrychoff. (i.a.) *Oluen valmistus Sinebrychoffilla*. <https://sinebrychoff.fi/olut/oluen-valmistus-sinebrychoffilla/>
- Solunetti. (2006). *Hiivat*. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hiivat/2/>
- Somersalo, V. (19.5.2021). *Turvallinen työskentely kemikaalien parissa*. HAMK Bio. <https://blog.hamk.fi/hamkbio/turvallinen-tyoskentely-kemikaalien-parissa/>
- Syvänen, M., & Strömberg, J. (Toim.) (1990). *Suomalainen olutkirja*. (s. 64–96). (2. painos). Tietosanoma Oy.
- Työturvallisuuskeskus. (i.a.) *Perehdyttäminen ja työnopastus*. <https://ttk.fi/tyoturvallisuus/vastuut-ja-velvoitteet/tyonantajan-yleiset-velvollisuudet/perehdyttaminen-ja-tyonopastus/>
- Walker, G. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. (s.57). Wiley.
- White Labs Technical Team. (29.7.2021). *Cell counting your yeast culture*. <https://www.whitelabs.com/news-update-detail?id=53>

## **LIITTEET**

**Liite 1. Ensimmäisellä laskukerralla lasketut hiivasolut**

**Liite 2. Toisella laskukerralla lasketut hiivasolut**

**Liite 3. Hiivasolujen määrä 1 ml:ssa hiivalietettä**

**Liite 4 Työohje**

Liite1. Laskettujen hiivasolujen määrä per ruutu ensimmäisellä laskukerralla:

| hiiva 1              | hiiva 2              | hiiva 3              | hiiva 4              | hiiva 5              | hiiva 6              | hiiva 7              |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu |
| 20                   | 21                   | 26                   | 23                   | 60                   | 12                   | 24                   |
| 29                   | 16                   | 30                   | 28                   | 62                   | 38                   | 29                   |
| 26                   | 14                   | 31                   | 22                   | 59                   | 34                   | 16                   |
| 23                   | 13                   | 26                   | 21                   | 57                   | 24                   | 22                   |
| 27                   | 28                   | 25                   | 25                   | 43                   | 30                   | 17                   |
| 22                   | 20                   | 27                   | 29                   | 37                   | 24                   | 22                   |
| 27                   | 13                   | 29                   | 17                   | 36                   | 20                   | 30                   |
| 22                   | 18                   | 23                   | 22                   | 43                   | 20                   | 40                   |
| 28                   | 15                   | 26                   | 22                   | 42                   | 20                   | 30                   |
| 27                   | 19                   | 25                   | 18                   | 46                   | 18                   | 23                   |
| ka: 25,1             | ka: 17,7             | ka: 26,8             | ka: 22,7             | ka: 48,5             | ka: 24               | ka: 25,3             |

## Liite 2. Laskettujen hiivasolujen määrä per ruutu toisella laskukerralla:

| hiiva 1              | hiiva 2              | hiiva 3              | hiiva 4              | hiiva 5              | hiiva 6              | hiiva 7              |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu | hiivasolua/<br>ruutu |
| 23                   | 6                    | 15                   | 21                   | 37                   | 19                   | 31                   |
| 23                   | 11                   | 25                   | 16                   | 32                   | 12                   | 23                   |
| 27                   | 11                   | 28                   | 12                   | 44                   | 18                   | 18                   |
| 25                   | 10                   | 21                   | 21                   | 41                   | 16                   | 30                   |
| 17                   | 6                    | 17                   | 21                   | 44                   | 15                   | 16                   |
| 15                   | 11                   | 14                   | 21                   | 44                   | 30                   | 16                   |
| 26                   | 7                    | 21                   | 28                   | 50                   | 21                   | 24                   |
| 10                   | 13                   | 21                   | 19                   | 39                   | 26                   | 27                   |
| 13                   | 8                    | 25                   | 17                   | 43                   | 25                   | 25                   |
| 18                   | 11                   | 17                   | 25                   | 35                   | 23                   | 18                   |
| ka: 19,7             | ka: 9,4              | ka: 20,4             | ka: 20,5             | ka: 40,9             | ka: 20,5             | ka: 22,8             |

Liite 3. Hiivasolujen määrä 1 ml:ssa hiivaa per hiiva ensimmäisellä laskukerralla:

|          |          |          |          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| hiiva 1  | hiiva 2  | hiiva 3  | hiiva 4  | hiiva 5  | hiiva 6  | hiiva 7  |
| solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml |
| 6275000  | 4425000  | 6700000  | 5675000  | 12125000 | 6000000  | 6325000  |

Hiivasolujen määrä 1 ml:ssa hiivaa per hiiva toisella laskukerralla:

|          |          |          |          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| hiiva 1  | hiiva 2  | hiiva 3  | hiiva 4  | hiiva 5  | hiiva 6  | hiiva 7  |
| solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml | solua/ml |
| 4925000  | 2350000  | 5100000  | 5125000  | 10225000 | 5125000  | 5700000  |

## Liite 4. **1 Näytteenotto aseptisesti**

### **Tarvittavat välineet**

- liekitin
- desinfiointiaine
- steriloitu 80 ml mittapurkki

### **Työvaiheet**

1. Avaa tankin näytehanan korkki.
2. Suihkuta sinolia näytteenotto hanaan.
3. Liekitä näytteenottohana.
4. Liekitä kansi ja purkki.
5. Odota, että tuli sammuu.
6. Avaa hana ja ota purkkiin hiivalietettä näytteenottohanasta.
7. Kun näytettä on tarpeeksi sulje hana.
8. Sulje purkin kansi.
9. Suihkuta sinolia näytteenottohanaan uudelleen ja liekitä se. Odota, että liekki sammuu.
10. Laita tankin näytehanan korkki kiinni.
  - **Varmista lopuksi, että liekittimen kaasuhana on kiinni!**



Kuvassa steriloitu 80 ml mittapurkki.



Kuvassa tankin näytteenottohana.

## 10 Liuoksen teko

### Tarvittavat välineet

- dekantterilasi tai muu vastaava astia
  - 100 – 200 ml tislattua vettä
  - metyleenisini
  - hiivalietettä (otettu näyte)
  - lasisauva tai muu sekoittaja
- 

### Työvaiheet

1. Mittaa dekantterilasiin 100 ml tislattua vettä.
  2. Pipetoi koon 2 automaatiopipetillä dekantterilasiin 1 ml hiivalietettä.
  3. Lisää liuokseen 2-3 tippaa metyleenisiniä.
  4. Sekoita seos tasaiseksi esimerkiksi heiluttaen tai lasisauvaa käyttäen.
- 

Jos liuoksessa, jossa on 100 ml tislattua vettä hiivasoluja per ruutu on yli 40, kannattaa liuos tehdä uudelleen ja laittaa tislattua vettä 200 ml.



Kuvassa 2 koon pipetti, joka on säädetty 1ml:aan.



Kuvassa valmis liuos.

## 11 Hemocytometrin käyttö

### Tarvittavat välineet

- hemocytometri
- peitelasi
- kertakäyttöpipetti
- linssipaperi

### Työvaiheet

#### Hemocytometrin puhdistus tarvittaessa

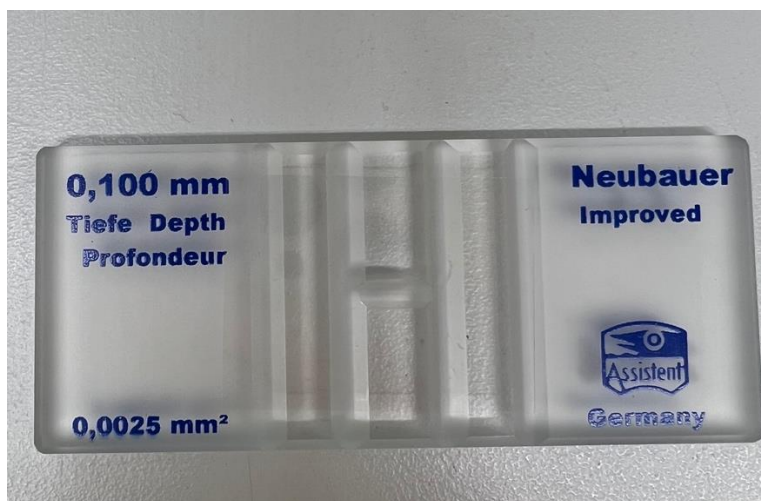
Ennen käyttöä hemocytometri ja peitinlasi täytyy puhdistaa, jos ne eivät ole puhtaita.

1. Aseta hemocytometri paperin päälle ja suihkuta siihen tislattua vettä.
2. Kuivaa hemocytometri linssipaperilla (tai vastaavalla) kevyesti taputellen.

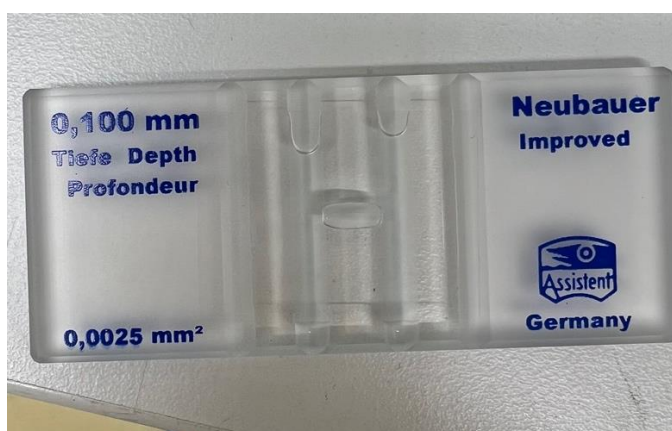
**Hemocytometriä ei saa hangata, ettei siinä olevat ruudukot kulu!**

#### Liuoksen pipetointi hemocytometriin

1. Kun on varmistettu, että hemocytometri on puhdas ja kuivattu aseta kertakäyttöinen peitelasi hemocytometrin päälle.
2. Sekoita tehty liuos kunnolla lasisauvalla 10 sekunnin ajan.
3. Pipetoi sekoitettua liuosta hemocytometrin keskimmäisiin kuoppiin siten, että liuos täyttää kuopat tasaisesti.



Kuvassa puhdas hemocytometri.



Kuvassa hemocytometri, johon on pipetoitu liuosta.

## 12 Solujen laskenta hemocytometrillä

### Tarvittavat välineet

- hemocytometri, johon pipetoitu näytettä
- peitinlasi
- mikroskooppi

### Työvaiheet

1. Aseta hemocytometri, johon on pipetoitu liuosta, mikroskoopin alle.
2. Valitse 40 kertainen objektiivi.
3. Säädä mikroskooppia siten, että ruudukon yksi halutun kokoinen ruutu ja siinä olevat hiivasolut näkyvät selkeästi. Varo, ettei objektiivi osu peitinlasiin tai hemocytometriin.
4. Hiivasolut lasketaan kymmenestä **samankokoisesta** ruudusta.
5. Laske ruudussa olevat hiivasolut siten, että yläreunaan ja vasempaan reunaan osuvia hiivasoluja ei lasketa.

Metyleenisini värjää kuolleet solut tummiksi. **Kuolleita soluja ei lasketa mukaan.**

### 13 Tulosten laskenta

Kun hiivasolut on laskettu kymmenestä samankokoisesta ruudusta, lasketaan elävien solujen keskiarvo per ruutu. Tämä lasketaan siten, että summataan kaikkien ruutujen elävien solujen laskettu määrä yhteen ja tulos jaetaan kymmenellä.

Lasketaan hiivasolujen määrä per millilitra.

Solujen määrä =

*((Pipetoidun hiivan määrä/ruudun tilavuus) \* hiivasolujen keskiarvo) \* näytekooko ml*

Esimerkki:

$((1 \text{ ml}/0,000004) * 19,7) * 100 \text{ ml} = 492\,500\,000 \text{ solua} / 100 \text{ ml}$

$492\,500\,000 \text{ solua} / 100 = 4\,925\,000 \text{ solua} / 1 \text{ ml}$

**Laskiessa tulee varmistaa, että kaikki yksiköt ovat oikein.**