

TEOLLINEN RASKIFERMENTAATIO

Maitohappobakteerien orgaanisten happojen stabiilius



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka

Hämeenlinna, kevät 2018

Dimitri Petrov

Bio- ja elintarviketekniikka
Hämeenlinna

Tekijä	Dimitri Petrov	Vuosi 2018
Työn nimi	Teollinen raskifermentaatio – maitohappobakteerien orgaanisten happojen stabiilius	
Työn ohjaaja	Helena Kautola	

TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyössä kiinnitettiin huomiota nykyleipomoissa yleistyvien ruisraskin valmistamiseen tarkoitettujen fermentorien toimintaan. Eräässä keskisuuresta leipomosta automaation astetta tuotannossa on järjestelmällisesti nostettu jo kauan. Tekniikka tuo ajan ja työvoiman säästöä ja ennen kaikkea laadun varmistamista. Yrityksessä haluttiin selvittää edes alustavasti, voiko fermentorissa tuotettua ruisraskia pitää tasalaatuisena, lisääkö inhimillisten virheiden eliminointi raaka-aineiden annostelussa ja prosessin valvonnassa lopputuotteen stabiiliutta ja voiko lopputuotteen tasalaatuisuuteen luottaa.

Koneellisesti ohjatun fermentoritankin tuottamaa raskia analysoitiin puolentoista kuukauden ajan leivonnan kannalta olennaisimpien laatutekijöiden osalta, eli tuotettujen maito- ja etikkahappopitoisuuksien osalta. Myös hiivasolujen määrään kiinnitettiin huomiota.

Tutkimuksessa todettiin, että toivotut orgaaniset hapot syntyvät raskissa niin kuin fermentaatiossa kuuluu, mutta niiden osuutta ei voi sanoa tilastollisesti tasalaatuiseksi, ainakaan suoritetun pienimuotoisen tutkimuksen perusteella. Huomattiin myös, että raskiin kehittyy välillä muitakin happoja ja että hiivasolujen määrässä esiintyy suuria vaihtelua. Näin alustavasti ei siis voida pitää fermentorin toimintaa selkeän suoraviivaisena kemiallisena prosessina, vaan pitää ottaa huomioon aina myös mikrobiologiaan liittyvä ennalta arvaamattomuus.

Avainsanat ruisleivonta, raski, leipomotekniikka

Sivut 24 sivua, ei liitteitä

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering
Hämeenlinna

Author	Dimitri Petrov	Year 2018
Subject	Industrial Rye Sourdough Fermentation – the Stability of Organic Acids Produced by Lactobacilli	
Supervisors	Helena Kautola	

ABSTRACT

In this thesis it was studied the functionality of fermenters, as they become widespread in contemporary bakeries. In a certain medium sized Finnish bakery degree of automation on production site has been raised for a long time. The technology saves time and labour but above all ensures the quality of the product. The company wanted to find out even on a provisional level, if the quality of the sourdough produced in the fermenter could be considered equal, could the removal of human inaccuracies in measuring of raw materials and process monitoring improve the stability of the final product and could the steady quality of the product be reliable.

The rye sourdough from a tank fermenter controlled by a computer has been tested for one and a half months for the most substantial quality factors for baking industry, for the level of produced lactic and acetic acids. Also the attention was paid for content of yeast cells.

It was verified, that desired organic acids do appear in the sourdough as they should during the fermentation, but their concentration can't be considered as statistically stabile, at least on the grounds of carried out small-scale study. It was also noticed, that some other acids do form in the sourdough and that there is big variations in the quantity of yeast cells. So on provisional level the functionality of a fermenter cannot be perceived as straightforward chemical process, the unpredictability in microbiology should always be taken into account.

Keywords rye bread, rye sourdough, bakery equipment

Pages 24 pages, no appendices

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	TUTKIMUSKYSYMYKSET.....	1
3	TEORIAOSUUS.....	2
3.1	Raski ruisleivän valmistuksessa.....	2
3.2	Raskin mikrobit ja raskin kehitys.....	5
3.3	Leivontaprosessi.....	7
3.4	Raskin teollinen valmistus.....	7
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	9
4.1	Koesuunnitelma	10
4.2	Happoluvun määrittäminen	10
4.3	Orgaanisten happojen määrittäminen entsyymisesti	11
4.4	Muut hapot ja niiden todentaminen	13
4.5	Hiivasolutiheyden määrittäminen.....	13
4.6	Raskifermentaatiokyklin seuranta.....	14
5	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU.....	15
5.1	Raskin happoanalyysin tulokset.....	15
5.1.1	Maito- ja etikkahappo	15
5.1.2	Propionihappo.....	18
5.2	Hiivasolujen analyysitulokset	18
6	JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSET	21
	LÄHTEET.....	23

1 JOHDANTO

Opinnäytetyössä selvitettiin teollisessa fermentorissa tuotetun ruisraskin mikrobiologisen laadun stabiiliutta pidemmän seurantajakson aikana. Pääpainona työssä oli seurata leivonnan kahden tärkeimmän orgaanisen hapon pitoisuuksien määrittäminen sekä hiivasolujen pitoisuuden laskeminen. Maitohappobakteerien eli laktobasillien tuottamalla maitohapolla on suora vaikutus leivän rakenteeseen, etikkahappo taas on tärkeä leivän maulle ja säilyvyydelle. Hiivasolut vaikuttavat taikinan kaasunmuodostumiseen eli taikinan kohoamiseen.

Tietokoneohjattu fermentori säättää lähinnä vain raaka-aineiden syöttöä, sekoitusnopeutta ja kasvatusalustan lämpötilaa. Vaikka hapanjuuren mikrobikannat ovat tunnetusti melko pysyviä, raaka-aineiden laatuvaihtelut ja kasvatusolosuhteiden poikkeamat vaikuttavat raskin muodostumiseen. Isoissa leipomoissa seurataan säännöllisesti raskin mikrobiologista laatua. Pienimmissä tehtaissa sellaiseen ei ole resursseja. Mahdolliset laatupuutteet huomataan silloin lähinnä vain ulkoisesti, esimerkiksi pH-luvun riittämättömyydestä, taikinan heikosta noususta tai lopputuotteen virheellisestä rakenteesta ja mausta.

Automatiikalla voidaan tasoittaa laatuvaihteluja seuraamalla ohjelmoitujen parametrien stabiiliutta raskin muodostumisessa. Pitempiaikaisella raskin laadun seurannalla voi vähentää raskin tasalaatuisuutta ja teollisen raskituksen luotettavuutta.

Aihe tuli keskisuuren leipomoyrityksen toiveesta tasalaatuisemman tuotteen saamiseksi. Kyseessä on pitkälle automatisoitu leipomotehdas, jonka leivontaperinteet ja oman hapanjuuren kunnioitus ulottuvat automaatiosta huolimatta pitkälle menneisyyteen. Opinnäytetyössä päätettiin tutkia tarkemmin mikrobiologisin ja biokemiallisin keinoin, kuinka tasalaatuinen on tyyppillisessä fermentorissa tuotettu raski.

2 TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyölle asetetut kysymykset rajoitettiin seuraavaan kolmeen:

1. Fermentorissa kasvatetun raskin tasalaatuisuuden varmistaminen seuraamalla maitohappobakteerien tuottaman maito- ja etikkahapon osuuksien pysyvyyttä sekä hiivasolujen määrää.

Tarkoituksena oli ottaa näytteitä yrityksen käyttämästä ruisraskista kolmesti viikossa seitsemän viikon ajan ja suorittaa niille mikrobiologisia sekä

kemiallisia analyyseja – kokonainen happoluku titraamalla, hiivasolujen lukumäärän arviointi laskukammiomenetelmällä mikroskoopin avulla, maito- ja etikkahappojen pitoisuuksien määrittäminen spektrofotometrisesti käyttäen elintarviketeollisuudelle kehitettyä kaupallista entsyymatista kittiä. Pitempi seuranta-aika ja riittävä määrä näytteitä mahdollistavat syntyvien tulosten tarkastelua tilastollishypoteettisesti.

2. Onko valittu propagointiohjelma oikea tälle fermentaatiolle, vastaako valmis raski tuotannon tarvetta?

Tämä on lähinnä teoreettinen tutkimuskysymys, johon pyritään vastaamaan kirjallisuuden perusteella sekä ottaen huomioon kyseisen leipomon olosuhteita. Raskin kehitystä voi säätää eri parametreilla, esimerkiksi hiivat lisääntyvät nopeammin matalammissa fermentointilämpötiloissa, kun taas maitohappobakteerit korkeammassa; liian voimakas etikkahapon tuotto tukehduttaa hiivan kaasunmuodostamista, kun taas liian korkea maitohapon osuus antaa leivälle liian tunkkaisen maun ja niin edelleen. Yrityksessä vältetään leivinihiivan käyttöä, joten raskin omien hiivasolujen pitoisuuden on oltava tarpeeksi suuri tyydyttävän nostatuksen varmistamiseksi.

3. Löytyykö hapanjuuresta muita orgaanisia happoja ja ennen kaikkea propionihappoa?

Propionihappobakteereja joskus ilmestyy spontaanisesti mukaan ruiskisiin. Ne pystyvät kasvamaan samoissa muille bakteereille epäsuotuisissa olosuhteissa kuin maitohappoa tuottavat laktobasillit. Lisäksi ne pystyvät muokkaamaan maitohappoa propionihapoksi, joka pienenäkin pitoisuutena estää tehokkaasti homeitiöiden kasvua leivässä.

3 TEORIAOSUUS

Tässä luvussa perehdytään lyhyesti raskin rooliin perinteisessä ruisleivonnassa.

3.1 Raski ruisleivän valmistuksessa

Raski on vanha suomalainen termi ruishapanjuurelle. Sitä lisätään taikinaan happamuuden ja nostatusvoiman vuoksi. Kyseessä on hapana liemi, jossa varta vasten kasvatetaan biomassaa – viljan luonnollisia villihiivoja ja maitohappobakteereja. Pieni määrä tätä lientä säilytetään leipomossa niin sanottuna ymppinä, siemenraskina, jota lisätään päivittäin kasvatusalustaan, veteen sekoitettuun ruisjauhoon. Siemenraskissa laktobasillien (maitohappobakteerien) pitoisuus voi olla 10^9 pmy/g ja hiivasolujen 10^7 – 10^8 pmy/g (Salovaara 1998). Tämä on paljon enemmän kuin jauhojen tai veden

kanssa tulevien mikrobien pitoisuudet, joten ympin mikrobikannat valtaavat nopeasti uuden kasvatusalustan ja alkavat lisääntyä eksponentiaalisesti. Kyseessä on kantojen propagointi eli tarkoituksellinen viljeleminen. Samalla tapahtuu fermentaatiota eli mikrobien suorittamaa kasvatusalustan käyttöä ja muokkaamista. Rukiin hiilihydraatit ja valkuaisaineet muuttuvat karboksyylihapoiksi, hiilidioksidiksi, etanoliksi sekä erilaisiksi aromiaineiksi (mukana muun muassa estereitä, aldehydeja, ketoneja, vapaita aminohappoja). Fermentaatiotuotteiden kirjo vaihtelee eri mikrobikannoilla, eri hiivoilla ja laktobasilleilla. Sen takia on tapana puhua eri leipomoiden omista perinteisistä mauista, hapanjuurien leipään tuomista omista vivahteista, aromeista, jotka mielletään olevan vuosikymmeniä ja peräti vuosisatoja vanhoja.

Ruisleipää ei enää syödä niin paljon kuin vuosikymmeniä sitten. Nykyinen suomalaisen rukiin tuotanto on vain kolmasosa siitä, mitä se oli vuonna 1920 (Luke 2017), vaikka samassa ajassa maan väestö kasvoi kahdella ja puolella miljoonalla. Pohjoismaissa ruis ja ohra ovat olleet perinteisiä leipäviljoja, ehkä sen takia, että juuri ne kaikista muista viljakasveista ovat osanneet sopeutua parhaiten pohjoiseen viileään ilmastoon ja karuun happamaan maaperään. Muista viljoista poiketen ruista viljellään syyskylvökasvina, mikä tarkoittaa, että sen viljelysykli kylvöstä puintiin kestää tyypillisesti 330 päivää, kun vehnällä vastaava aika on 100 päivää ja ohralla 90 päivää. Tämä seikka ei ainakaan lisää viljelijän mielenkiintoa rukiin kasvatamiseen, kun eivät rukiin myyntihinnatkaan ole mitenkään korkeita.

Euroopassa ruisleipä on perinteisesti ollut suosiossa laajalti Pohjoismaissa, Venäjän pohjoisosissa sekä joissakin Itä- ja Keski-Euroopan maissa Baltiasta Puolaan ja aina Etelä-Saksaan asti, ulottuen paikallisesti jopa Pohjois-Italiaan (Rotsch & Schulz 1958). Muualla maailmassa ruis ei ole koskaan kunnolla päässyt laajaan suosioon, sitä lähinnä käytetään sivuviljana, lisänä perinteisessä makuisemmassa vehnäleivässä. Maailmanlaajuisessa viljan tuotannossa rukiilla on enää marginaalinen viiden promillen osuus¹. Sen suosio on tähän mennessä näyttävästi laskenut myös sen perinteisillä alueilla, Suomessakin. Pastat, riisi ja maissi ovat vieneet rukiilta kuluttajakuntaa viljasektorissa.

Vaikka ruis on vehnän ja ohran sukulaiskasvi ja näillä viljoilla on paljon yhteistä, niissä on kuitenkin myös selviä eroja. Tärkkelyksen ja hiilihydraattien pitoisuudet ovat suurin piirtein samaa tasoa, myös rasvojen ja valkuaisaineiden. Vehnän proteiinit kykenevät kuitenkin muodostamaan taikinaan sitkoa, kimmoisaa peptidiverkkoa, joka pitää sisällään kosteutta ja

¹ FAO:n tilastojen mukaan nykyinen rukiin tuotanto maailmanlaajuisesti käsittää noin 0,5 % koko viljantuotannosta (FAO 2017). Vuoden 2017 yli 2,6 miljardin tonnin tuotannosta maissi käsittää 41 %, vehnä 29 % ja riisi 19 %. Jopa ohraa (5,5 %) tuotetaan enemmän kuin ruista, tosin lähinnä mallas- ja rehukäyttöön, mihin tarkoitukseen ruis sopii paljon huonommin (tämä näkyy Suomessakin, jossa ohra on eniten kasvatettu vilja, vaikka sen osuus leivonnassa on nykyään mitätön; ks. Luke 2017).

kaasuja ja joka jäykistyy paistossa luonnollisen denaturoimisen sekä tärkkelyksen liisteröitymisen ja myöhemmän kovettumisen ansiosta, antaen leivälle sienimäisen ilmavan rakenteen. Sitkon muodostumisen arvellaan johtuvan voimakkaista sulfidiryhmien vuorovaikutuksista valkuaisaineiden peptidipäissä, kun proteiinin tiivis tertiäärirakenne hajoaa taikinassa fyysisen vaikutuksen eli taikinän vaivaamisen seurauksena. Rukiissa ja ohrassa näitä sisäisiä sulfidisidoksia ei synny niin paljon, joten varsinkin ohralla veden- ja kaasunpidättäminen taikinoissa on niukka (Häkämies 2014).

Sen sijaan rukiissa on paljon arabinoksyylaaneja (joista ennen yleisesti puhuttiin pentosaaneina), suurimmalta osin vesiliukoisia pentoosiketjuja, jotka muodostavat taikinaan hyvin viskoosisen, tarttuvan liman (Shewry & Bechtel 2001). Juuri näiden ansiosta ruistaikina sitoo niin hyvin vettä ja ilmaa. On todettu esimerkiksi, että liukoisten pentosaanien lisääminen vehnätaikinaankin parantaa taikinatulosta selvästi (Denli & Ercan 2001).

Ruistaikina voi kuitenkin hajota, lyyhistyä paiston (ja jopa nostatuksenkin) aikana rukiille ominaisen korkean entsyymiaktiivisuuden takia. Esimerkki tällaisesta "itsetuhoisasta" entsyymitoiminnasta näkyy hapattamattomassa ruisleivässä kuvassa 1. Tämä johtuu siitä, että ruisjauhon α -amylaasin (hiilihydraattiketjuja, ennen kaikkea tärkkelystä pilkkova entsyymi) ja pentosanaasin (pilkkoo nimenomaan arabinoksyylaaneja) toiminta on hyvin kiivas. Näiden vaikutuksesta hiilihydraattipolymeerit pirstoutuvat katkonaisiksi dekstriineiksi, taikina vetistyy, sen kaasunpidättämiskyky katoaa. Lisäksi rukiin tärkkelys liisteröityy jo 50 °C:ssa, ainakin kymmenen astetta alhaisemmassa lämpötilassa kuin vehnän tärkkelys. Tämä tarkoittaa sitä, että α -amylaasi (joka on aktiivinen vielä 90 °C:ssakin) saa enemmän aikaa purkaa taikinaa sisältä sekä nostatuksen että paistonkin aikana (Seibel & Weipert 2001). Jotta leipä säilyttäisi muotonsa, entsyymejä pitää vaimentaa, inaktivoida. Perinteiseksi inaktivoimismenetelmäksi on huomattu taikinän pH-tason alentaminen (ainakin alle pH 5:een), mikä saadaan lisäämällä siihen käynnyttä, maitohappoa sisältävää hapanjuurta.



Vehnäleipä

hapattamaton

Ruisleipä

hapattamaton

hapattu

Kuva 1. Hapattamisen vaikutus ruisleivän rakenteeseen (muokattu lähteestä Spicher & Stephan 1993).

On olemassa toki muita keinoja pH-tason alentamiseksi, esimerkiksi puh-taan maitohapon lisääminen suoraan taikinaan (Spicher & Stephan 1993). Hapanjuuren käyttö kuitenkin katsotaan luonnolliseksi tavaksi valmistaa leipää. Suomalaisessa hapanleivässä raskin käyttö on jo niin itsestäänsel-vyys, että hapanjuuri mielletään leivän valmistusprosessin vaiheena, ei erillisenä valmistusaineena, kuten esimerkiksi Saksassa tai Ruotsissa. Tästä on joskus ollut hauskoja seuraamuksia, kun suomalainen leivänvalmistaja unohtaa tuoda julki raskinsa ruotsinkielisessä valmistusaineluettelossa ja joutuu jälkeinpäin selittelemään asiaa kuluttajille (Engelbrektson 2014).

Raskituksella on muitakin vaikutuksia lopputuotteeseen. Alhainen pH-taso muuttaa valkuaisainemolekyylien tertiäärirakennetta ja parantaa ennes-tään vedensidontaa sekä tätä kautta taikinatulosta. Lisäksi isoimpien mo-lekyylien kohdalla tämä saa aikaan proteiinin hajoamista polypeptideiksi ja eteenpäin vapaiksi aminohapoiksi. Molemmilla on vaikutusta niin taikinan reologiaan kuin flavorin muodostumiseenkin. Happamuudella on vaiku-tusta myös leivän väriin – ruisleivän sisuksen tummuus on seurausta tyro-siini-aminohapon entsyymaattisesta hajoamisesta melaniini-pigmentiksi; entsyymitoiminnan vähentyessä myös pigmentin muodostaminen jää pie-nemmäksi ja sisus vaaleammaksi. Taikina nousee paremmin – valkuaisai-neiden tyyppi vapautuu liukoiseen muotoon ja edesauttaa hiivojen kaasun-tuottoa. Paistettu leipä kuivuu hitaammin, koska glykosididokset vahvis-tuvat happamuuden kasvaessa, tärkkelyksen vedensidonta vahvistuu. Leipä säilyy pitkään, koska karboksyylihapot (etenkin propioni- ja muura-haishappo) estävät mikrobien, myös homeiden kasvua paistetussa lei-vässä. Maku on rikkaampi – taikinan hapattamiseen osallistuvat maitohap-pobakteerit muokkaavat leivän makua enemmän kuin pelkkä hiivafermen-taatio. (Spicher & Stephan 1993; Seibel & Weipert 2001.)

3.2 Raskin mikrobit ja raskin kehitys

Hiivat ja maitohappobakteerit toimivat hapanjuuressa symbioosissa, täy-dentäen toisensa. Kumpaakin on jo valmiiksi ruisjauhoissa, niiden aktivoi-miseksi pitää vain nostaa jauhon kosteutta. Hiivat kasvavat paremmin ve-tisissä liuoksissa, maitohappobakteerit suosivat kuivempia raskeja (Seibel & Weipert 2001.).

Raski kehittyy tyypillisessä käymisreaktiossa. Kun ympin hiiva- ja laktobasil-likannat saavat uutta ravintoa ja elintilaa, ensin seuraa hidas lag-vaihe, sit-ten eksponenttikasvu, muodostuu kasvun sivutuotteita – hiilidioksidia, karboksyylihappoja, aromeja, jonkin verran etanolia. Kun mikrobipopulaa-tio saavuttaa maksimipitoisuutensa, seuraa luonnollinen kuihtuminen, sammuminen, alkaa niin sanottu stationäärifaasi. Se, milloin tämä vaihe alkaa, riippuu käymisreaktion nopeudesta, kantojen aktiivisuudesta, kas-vatusalustan ravitsevuudesta, lämpötilasta. Yleensä raski otetaan käyttöön ennen stationäärifaasin alkua, mutta tämäkin käytäntö riippuu tuotanto-prosessista ja talon tavoista. Osa kypsästä biomassasta siirretään säilön-tään siemenraskiksi eli seuraavan valmistuskerran ympiksi.

Tyypillisessä käyttövalmiissa raskissa on laktobasilleja 10^9 pmy/g, hiivasoluja ainakin kymmen- ellei satakertaisesti vähemmän (10^7 – 10^8 pmy/g), pH-arvo alle 4, happoluku jopa 15 ml, maitohapon pitoisuus yhden prosentin luokkaa ja etikkahapon osuus kymmenesosa jopa puoleen tästä pitoisuudesta (Salovaara 1998).

Hiivasolukannat eivät välttämättä ole perinteisiä *Saccharomyces cerevisiae* (ainakaan teollisuudessa), sillä ne kasvavat huonosti matalissa pH-arvoissa. Tutkittaessa suomalaisia vanhoja raskeja, kaikista on löydetty suvun *Candida milleri* -kantoja², usein myös *Saccharomyces exiguus* -kantoja. Kaikki kolme ovat melko läheistä sukua keskenään. Harvemmin on törmätty myös *Kluyveromyces lodderae* sekä *Saturnispora saitoi* -kantaan. (Mäntynen, Korhola, Turakainen & Lindström 1998; Toivo 1998; Spicher & Stephan 1993.)

Laktobasilleja on eritelty paljon enemmän. Yleisimmät ovat *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* ja *Lactobacillus sanfrancisco*. Muita yleisiä ovat *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pastorianus* ja *Lactobacillus buchneri*. Maitohappobakteerit voivat olla homofermentatiivisia tai heterofermentatiivisia, tai fakultatiivisesti heterofermentatiivisia, riippuen siitä, tuottuuko muita karboksyylihappoja maitohapon lisäksi. Yleensä suositaan heterofermentatiivisia kantoja, koska pelkkä maitohappo tekee leivästä laimeanmakuisen ja tunkkaisen, kun taas etikkahappo tuo raikkaan hapanleivän aromin. Säättämällä olosuhteita tietyille kannoille voi säätää näiden kahden karboksyylihapon osuutta, esimerkiksi lisättyllä hapensaannilla tai ravinteiden avulla, muun muassa heksoosisyötöllä. (Salovaara 1998; Spicher & Stephan 1993.)

Raskista löytyy muitakin bakteerikantoja, mm. *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus cerevisiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptobacterium spp.*, mutta näiden osallistuminen fermentaatioprosessiin on rajallinen tai olematon, ja raskituksen jatkuessa ne jäävätkin laktobasillien syrjäyttämiksi (Spicher & Stephan 1993; Madigan & Martinko 2006).

Paljon mielenkiintoisempi on *Propionibacterium acidipropionici* tai *Propionibacterium jensenii* -bakteerien rooli, koska ne kykenevät muuttamaan laktaattia propionihapoksi, joka on tosi tehokas homeenestäjä (Madigan & Martinko 2006). Tämä tosin vaatii pitkiä käymisaikoja, jotta laktaattia ehtisi kehittyä paljon. Lisäksi toistuvien takaisinraskitusytklien jatkuessa niiden elinvoima hiipuu ja lisääntymiskyky vähenee. Lukuisia tutkimuksia on tehty ja kehitetty keinoja säilyvyysaikojen "luontaiseksi" pidentämiseksi siirrostamalla näitä bakteereja raskiin. Tämä tapa lisää leivän säilyvyyttä

2 Joissakin lähteissä *Candida milleri* nimitetään *Torulopsis holmii*, kyse on lähinnä hiivojen taksonomisesta sekamelskasta, kun samalla kannalla voi olla useitakin eri nimityksiä erilaisista suvuista (Kurtzman & Fell 2000).

ilman propionaattisuolojen lisäämistä taikinaan ja säilöntäaineen deklaroitavuatuimuksia. (And 2013; Javanainen 1993; Javanainen & Skyttä 1998.)

3.3 Leivontaprosessi

Raski pitää herättää hyvissä ajoin ennen itse taikinan valmistusta, koska fermentaatioprosessi vaatii aikaa käynnistyäkseen. Eksponentiaalinen kasvuvaihe alkaa muutaman tunnin kuluttua siemenraskin lisäämisestä uuteen kasvatusalustaan ja jatkuu pitkälti ylöslyöntivaiheeseen. Kun tarpeeksi kehittynyt raski on lisätty taikinaan (raskia lisätään talon tavoista ja leivän reseptistä riippuen 20-40 % taikinan koko määrästä), annetaan fermentaation jatkua taikinassa vielä tunnin verran. Koko sen ajan muodostuu hiilidioksidia ja aromeja. Hiilidioksidia tuottavat niin hiivat kuten laktobasillitkin. Seuraavan nopean ylöslyöntivaiheen jälkeen fermentaatioprosessi jatkuu nostatusaihiossa tai paistovuoaassa. Ruistaikina ei vaadi vaivaa, koska sitkoa ei muutenkaan muodostu. Nostatukseen voi kulua toinenkin tunti kanssa tässä valmistusvaiheessa.

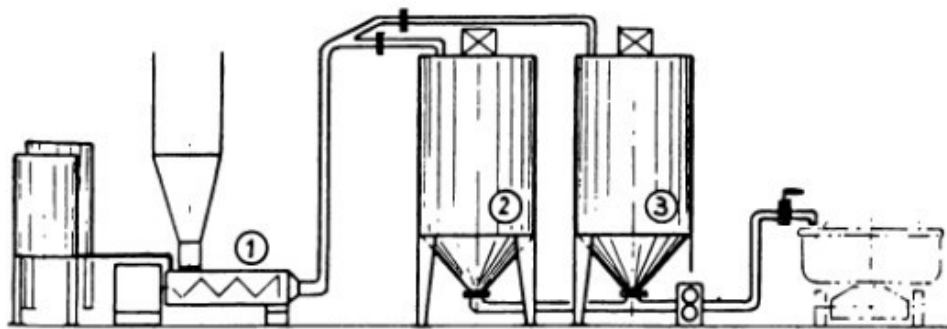
Ruistaikina on kosteampi kuin vehnätaikina ja johtaa tätäkin huonommin lämpöä. Myös tärkkelyksen liisteröinti alkaa ruistaikinassa alhaisemmassa lämpötilassa, jopa ennen proteiinien denaturoimista. Huolimatta osin inhiboiduista entsyymeistä, ruistaikinan hydrolyysi on voimakasta. Koko paiston aikana tapahtuu tärkkelyksen pirstoutumista dekstriineiksi ja isoimpien valkuaisaineiden hajoamista peptideihin ja vapaisiin aminohappoihin. Taikinaan sidottu vesi vapautuu siis nopeammin kuin liisteröityvä tärkkelyksen amylopektiini ehtii sitomaan. Tämän takia ruisleivän paistolämpötilojen kuuluu olla korkeampia kuin vehnäleivän paistossa. Alkupään lämpötilat ovat tyypillisesti 260-280 °C, joskus jopa 350 °C. Höyryä syntyy leivässä sitä mukaa kuin lämpö siirtyy hitaasti kohti sisusta. Sen sijaan sisällä oleva kosteus pysyy alle veden höyrystymislämpötilan, vain hyvin ohut kerros ulkokuorta kuivuu tarpeeksi, jotta sen lämpötila nousisi yli 100 °C:een. Siksi loppupaisto suoritetaan matalammassa lämmössä, 200-190 °C:ssa. Liika lämpö ei nopeuta sisuksen kypsennystä, sen sijaan kiihdyttää tarpeettomasti ulkokuoren sakkariidien pyrolyysia ja tekee kuoresta muutenkin kuivan ja liian paksun. (Seibel & Weipert 2001; Rotsch & Schulz 1958.)

3.4 Raskin teollinen valmistus

Tehtailla raskin valmistus tapahtuu nykyään tietokoneohjatuissa sekoitus-tankeissa, joista tyypillinen toimintakuviokuva on esitetty kuvassa 2 seuraavalla sivulla. Tankkeihin automatiikka pumpkaa toivotun ohjelman mukaan ennakoon laskettuna aikana tarvittava määrä ruisjauhoja, sopivan lämpöistä vettä sekä siemenraskia eli ymppeä. Seuraavien tuntien aikana tietokone seuraa valittuja parametreja – lähinnä lämpötilaa, happamuutta, mahdollisesti joskus jopa ATP-aktiivisuutta ja hiilidioksidin tuottoa. Tankeissa on

laipat, joilla biomassaa sekoitetaan hitaasti ja varmistetaan hapen tasaantuminen tankin sisällä. Raskin käyminen ei vaadi ilman pumppaamista liehen läpi. Ilmastus voi olla jopa vahingollista, sillä se aiheuttaisi liiallista hiivojen kasvamista, aktivointia ja etanolin erittämistä. Fermentoritankkien vaipoissa on lämmönvaihtimet, joihin automatiikka päästää tarvittaessa jäätynyttä kylmäainetta tai painehöyryä, pitäen täten raskin lämpötilan asetetuissa puitteissa. (Spicher & Stephan 1993.)

Automatiikka on hyvä keino varmistaa raskituksen tasalaatuisuutta, koska ihmisestä johtuvia raaka-ainemittausrvirheitä ei synny, ympin ulkoinen kontaminaatoriski on pieni, biomassan muodostus on valvottua ja parametrien säädöt tapahtuvat tarvittaessa nopeasti.



Kuva 2. Fermentoritankkien kokoonpano. 1 on raaka-aineiden (siemenraskin, jauhojen ja veden) annosteluyksikkö, 2 ja 3 fermentoritankit; fermentorit panostetaan viiveellä, jotta raski ehtisi kehittyä toisessa tankissa siihen mennessä, kun raski ensimmäisessä käytetään loppuun. (Spicher & Stephan 1993.)

Elävien organismien kasvuun liittyy kuitenkin aina tietyn asteista epävarmuutta. Mikrobin vuorovaikutus tapahtuu näkymättömästi ja se voi muodostua odottamattomasti. Raskin biomassan laatua ei voi määrittää silmä määräisesti tai astinvaraisesti, sitä voi seurata vain ulkoisista merkeistä: taikinan rakenteesta, kovuudesta, kaasunmuodostamisesta eli nousunopeudesta, sekä viimeistään lopputuotteen ulkonäöstä ja mausta. Suurissa leipomoissa ovat omat laboratoriot, joissa on mahdollista tutkia raskin mikrobiologinen laatu saman tien tuotannon ohessa. Pienemmissä leipomoissa sellaista mahdollisuutta ei ole. Täytyy vain luottaa, että syntyvän raskin laatu on vaaditulla tasolla.

Teoreettisesti jos raaka-aineet ovat samoja ja samoista tarkistetuista lähteistä tulevia, kasvatusolosuhteet tiukasti asetettuja ja hyvin seurattuja, joten vaihtelujen pitäisi olla minimaalisia. Jos variaatiota kuitenkin löytyy, enemmän kuin tilastollisen satunnaisvaihtelun puitteisiin mahtuva määrä, pitäisi miettiä, mitä parannuksia valmistusprosessiin ja fermentoritankin toimintaan voi ehdottaa, jotta raskin laatua voisi hallita paremmin.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Kokeellinen osuus suoritettiin keväällä 2018 varsinaisen tuotannon ohessa. Mitään muutoksia valmistusprosessiin ei tehty tutkimusjaksona eikä työrutiineihin puututtu. Tutkimus kesti kaikkiaan 48 päivää, jonka aikana otettiin 20 näytettä.

Näytteenoton olosuhteet pyrittiin pitämään aina samanlaisina ja näytteet ottamaan raskista siinä vaiheessa, kun se oli mahdollisimman pitkään kypsytetty, eli juuri ennen taikinasekoittamista. Yleensä ensimmäinen tankki tyhjenee tehtaassa aamukuuden jälkeen. Siihen mennessä raski on kasvanut noin 9,5 tuntia. Näytteet kerättiin siis aamuisin kello 5.50 ja 6.00 välillä.

Raskinäyte otettiin suoraan tankista, yläluukun kautta, puhtaalla mittasialla mahdollisimman keskeltä säiliötä. Näytteenoton yhteydessä mitattiin myös raskin pH-arvo ja lämpötila taikinantekijän käsikäyttöisellä pH-mittarilla. Raskia kaadettiin suunnilleen vakio määrä puhtaaseen näytepurkkiin, joka vielä jätettiin suljettuna 20 minuutiksi lähes kiehuvaan vesihauteeseen mikrobitoiminnan pysäyttämiseksi. Tyypillinen näytteen lämpökäsittely esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Näytteen lämpökäsittely mikrobitoiminnan pysäyttämiseksi.

Lopuksi tiiviisti suljetut purkit säilytettiin pakastimessa aina laboriopäivään saakka, jolloin kertyneet näytteet vietiin kerralla ilmaeristeisessä pussissa analysoitavaksi. Neljästi otettiin tutkittavaksi myös kuumentamaton raskinäytettä hiivasolulaskennan tarkoituksessa. Nämä näytteet jäähdytettiin perusteellisesti ennen laboratorioon kuljettamista.

Kaikkiaan laboratoriokertoja oli kuusi. Laboratoriossa näytteet laimennettiin analyyseja varten käänteisosmoosipuhdistetulla vedellä, homogenisoitiin, suodatettiin pieni määrä koeputkiin spektrofotometrasta analyysia varten, jäljellä olevista laimennoksista määritettiin happoluku titraamalla.

Analyysien välillä koeputket pidettiin jääkaapissa mahdollisen bakteeriaktiivisuuden estämiseksi. Vaikka kuumennus 85 °C:een ja seuraava jäädytys rikkoi tehokkaasti hiivasolut, joku määrä bakteereja jäi henkiin.

4.1 Koesuunnitelma

Kokeellinen osuus aloitettiin 23.3., mikä osui perjantaiksi. Koska viikonloppun aikana tehdas ei toiminut, seuraava näyte otettiin maanantaina ja keskiviikkona. Pääsiäisviikonloppun takia perjantain näyte otettiin torstaina 29.3. ja seuraavan viikon maanantainäyte vasta 3.4. Näin siis saatiin suunnitelluksi tarpeeksi pitkä seurantajakso, jonka kuluessa olisi otettavaa 20 näytettä, kolmesti viikossa seitsemän viikon aikana

Kalenterisuunnitelma näkyy kuvassa 4.

vko 12		19	20	21	22	23	24	25
						1	XXXXX	
vko 13		26	27	28	29	30	31	1
	2		X		3	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		
vko 14		2	3	4	5	6	7	8
	XXXXX	4	5		6	XXXXX		
vko 15		9	10	11	12	13	14	15
	7		8		9	XXXXX		
vko 16		16	17	18	19	20	21	22
	10		11		12	XXXXX		
vko 17		23	24	25	26	27	28	29
	13		14		15	XXXXX		
vko 18		30	1	2	3	4	5	6
	16	X	17		18	XXXXX		
vko 19		7	8	9	10	11	12	13
	19		20					

Kuva 4. Kokeellisen osuuden kalenteri. Numerot tarkoittavat näytteenotokertoja, ympäröidyt päivät ovat laboratoriopäiviä. Rastit merkitsevät päiviä, jolloin tuotantoa ei ollut.

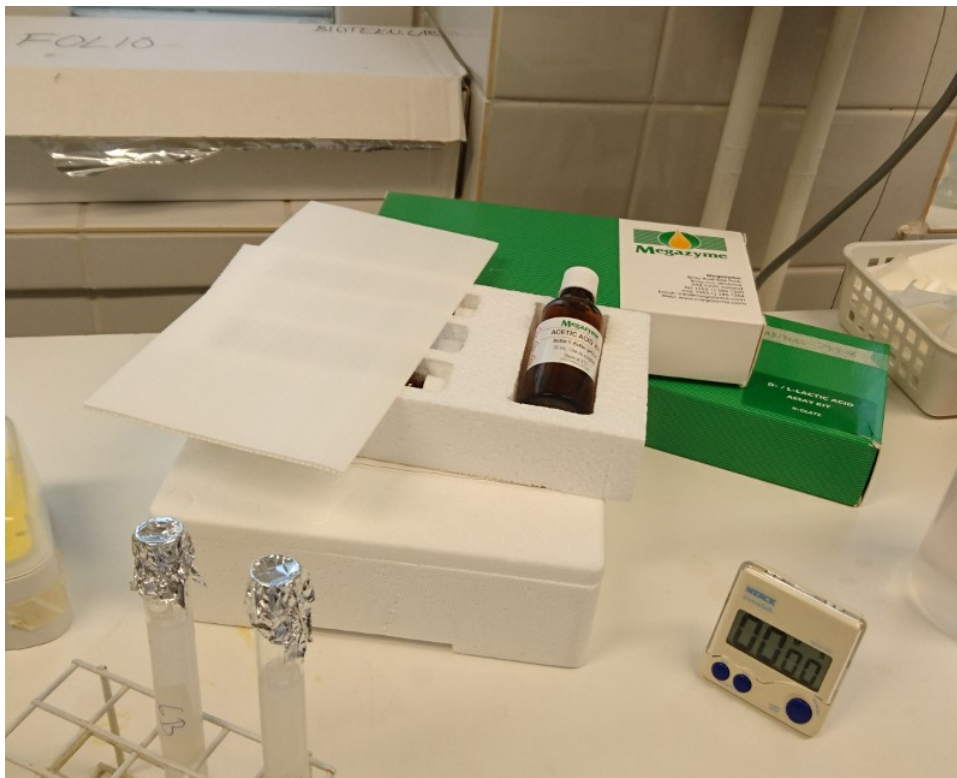
4.2 Happoluvun määrittäminen

Happoluku määritettiin perinteisellä byrettititrauksella opetusyksikön kemian laboratoriossa. Näyte laimennettiin mitta-astiaan käänteisosmoosipuhdistetulla vedellä suhteessa 10 g + 90 ml. Näyte sekoitettiin kymmenen minuuttia magneettisauvasekoittajalla, jonka jälkeen laimennokseen

lisättiin 0,1-molaarista NaOH-liuosta, kunnes näytteen pH-arvo oli 8,5. Kulunut natriumhydroksidiliuoksen tilavuus millilitroina on sama kuin raskinäytteen happoluku.

4.3 Orgaanisten happojen määrittäminen entsyymaattisesti

Orgaanisten happojen määrittämiseen käytettiin spektrofotometriaan soveltuvaa kaupallista entsyymaattista reagenssistä eli kittiä. Kitit on kehitetty elintarvikealan pienimmille yrityksille, joilla ei ole mahdollisuutta kromatografisiin laboratorioanalyysiin. Yksi tunnetuimmista kittien valmistajista on irlantilainen Megazyme-konserni. Sen valmistamat kaupalliset kitit (esimerkiksi kuvassa 5) ovat hyvin saatavilla, helppokäyttöisiä ja toimiviksi todettuja. Käytettiin Megazyme ACS-Manual K-Acet -kittiä etikkahapolle ja Megazyme Rapid Assay K-DLate -kittiä maitohapolle.



Kuva 5. Kokeessa käytetyt kaupalliset entsyymaattiset kitit.

Etikkahappokitin toimintaperiaate perustuu sarjaan kemiallisia reaktioita, jossa analysoitavan näytteen etikkahappo muuntuu reagenssien lisäyksestä muiksi yhdisteiksi, asetyyli-koentsyymi-A:ksi (niin sanotuksi aktiiviseksi etikkahapoksi) ja oksaaliasetaatiksi, sitten sitraatiksi ja lopulta omenahapoksi ja pelkistetyksi nikotiiniamidiadeniinidinukleotidiksi eli NADH:ksi. Syntyneen NADH:n pitoisuus mitataan lopulta spektrofotometrisesti. Valon absorbanssitason muutoksesta 340 nm:n aallonpituudessa lasketaan näytteen alkuperäisen etikkahapon määrä kitin mukana tulevilla laskukaavalla (Megazyme 2018a). Kyseiset hapetus-pelkistysreaktiot esiintyvät energian siirroissa solujen aineenvaihdunnassa karboksyylihappojen hajotessa sitruunahapposyklissä (Berg, Tymoczko, Stryer & Gatto 2012).

Maitohapon analyysikitin toimintaperiaate perustuu vastaavasti laktaatin vaiheittaiseen pelkistämiseen palorypälehapoksi ja NADH:ksi. Jälkimmäisen pitoisuuden kasvu muuttaa analysoituvan näyteliuoksen valonabsorbanssia 340 nm:n aallonpituudessa, arvojen erosta lasketaan taas alkuperäinen maitohappopitoisuus. (Megazyme 2018b.)

Raski tutkittiin käyttäen kittiä, joka paljastaa sekä L- että D-maitohapon enantiomeereja. Maitohappo käyttäytyy vähän eri tavalla polarisoidussa valossa ja muutenkin kemiallisesti sen molekyyleille ominaisen kiraalisen enantiomerian takia. Eli vaikka yhdisteen molekyylit rakentuvat samasta määrästä atomeja ja ovat kemian näkökulmasta samanarvoisia, niiden fyysinen rakenne, geometria voi erota toisistaan ja vastaavasti niiden biologinen aktiivisuus voi olla erilainen. Vasenkätinen maitohappo (S- tai perinteisemmin L-laktaatti, latinan vasenta tarkoittavista sanoista *sinister* tai *laevus*) on tutumpi ihmiselle ja eläimille. Sitä syntyy ihmisen lihaksissa, sitä löytyy enemmän eläinperäisistä ruoka-aineksista ja ihmisen makuaisti reagoi myös herkemmin vasenkätiseen maitohappoon. Mikrobin toiminnasta, mistä laktobasillikäyminen on käypä esimerkki, voi kuitenkin syntyä myös oikeakätistä laktaatti-enantiomeeria (R- tai D-maitohappo, latinan suoraa ja oikeaa tarkoittavista sanoista *rectus* ja *dextrus*). Esimerkiksi kananmunassa tai viinissä ylivoimaisesti kohonnut D-maitohapon pitoisuus on merkki tuotteen pilaantumisesta. (Berg ym. 2012; Megazyme 2018b.)

Tutkituissa näytteistä D-maitohapon pitoisuus oli aina pienempi kuin L-maitohapon. Pitoisuus oli kuitenkin merkittävä, eikä sitä voitu siksi sulkea pois maitohapon kokonaismäärästä.

Kittianalyyseja varten ei tarvinnut valmistaa kantaliuoksia eikä hahmottaa kalibrointikäyrää. Kitin valmistaja vakuuttaa menetelmän olevan luotettava ja lupaa oikein suoritettulle analyysille heti valmiin tuloksen sijoittamalla mitatut absorbanssiarvot kaavaan, mikäli vain reagenssit on mitattu oikein ja tutkittava happopitoisuus pysyy mittausalueen sisällä (0,03–0,2 g etikkahappoa ja 0,005–0,3 g L- tai D-maitohappoa litrassa esivalmistettua näytettä). Kitin mukana tulee kontrollina happojen kantaliuosta, jonka ilmoitettu pitoisuus pitäisi täsmätä. Sitä käytettiin menetelmän varmistamiseksi joka analysointikerralla, molemmalle hapolle. Saadut tulokset täsmäsivät melko tarkasti annettuun pitoisuuteen.

Entsyaattisissa määrittelyissä käytettiin UV-spektrofotometri Shimadzu-1800 –laitetta (Shimadzu Corporation, Japani) ja siihen soveltuvia standardikokoisia 2,5 ml muovisia kyvettejä. Absorbanssiarvot 340 nm:n aallonpituudella rekisteröitiin ennen ja jälkeen reagenssien lisäämisen tietokoneohjelmistolla ja sovitettiin kittien laskentakaavaan.

4.4 Muut hapot ja niiden todentaminen

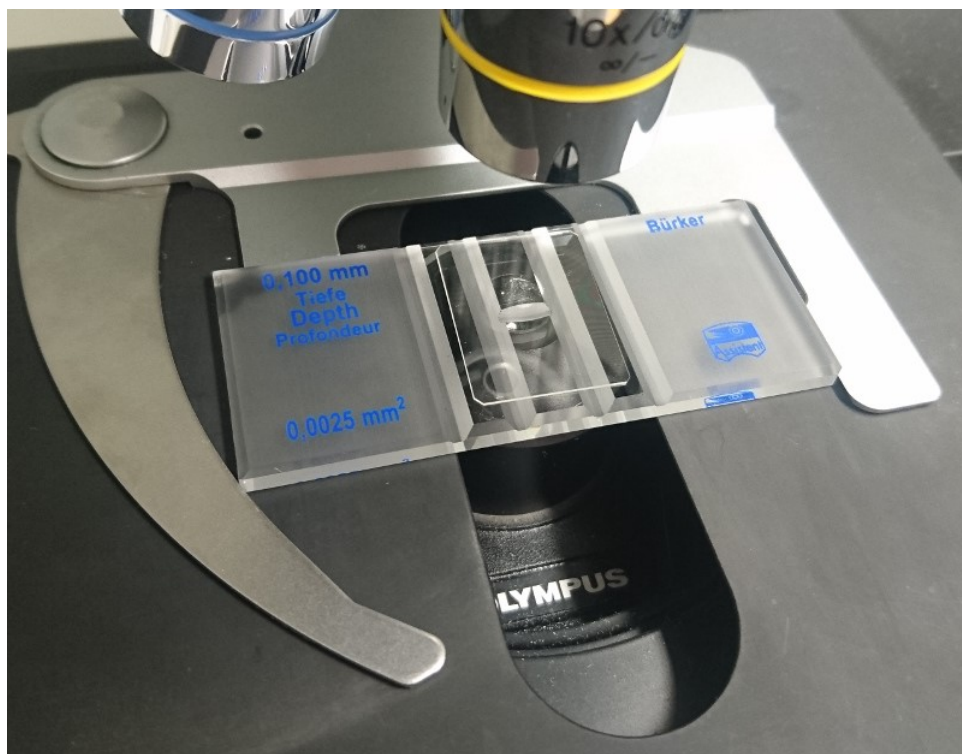
Kuten jo teoriaosuudessa tuli todettua, maito- ja etikkahapot ovat raskin käymisessä pääasiallisesti syntyviä tuotteita, mutta ei ainoita. Muitakin, niin karboksyyli- kuin aminohappoja syntyy mikrobikäymisen sivutuotteina, kirjallisuudessa esitetään näiden osuudeksi viidestä aina jopa 20 %:iin koko titrattavissa olevasta happojen määrästä.

Tutkimus päätettiin rajoittaa kahden yllä mainitun orgaanisen hapon pitoisuuksien mittaamiseen spektrofotometrisesti entsyymaattisella menetelmällä sekä kokonaishappojen titraamiseen. Tutkimuksen pääpaino oli kahden orgaanisen hapon pitoisuuksien stabiiliuden todentamisessa pitkällä aikavälillä.

Oli kuitenkin mielenkiintoista saada selville etenkin propionihapon esiintyvyys raskissa. Tämä on pohjustettu tutkimuskysymyksiä esitettävässä osiossa. Propionihappoanalyysi tilattiin siis erikseen ulkopuoliselta sertifioidulta laboratoriolta yhdelle näytteelle päivästä 27. Tämä analyysi suoritettiin kaasukromatografisesti (HP 6890 -kromatografi liekki-ionisaatiolla).

4.5 Hiivasolutiheyden määrittäminen

Hiivasoluja oli tarkoitus seurata laskukammion menetelmällä (kuva 6). Siinä laimennettu raskinäyte pipetoitiin mikroskooppiin asetetulle lasiselle laskukammionlehdelle ohuen peitinlasin reunaan ja tutkittiin ilmoitettu pinta-ala ($1/400 \text{ mm}^2$) 40-kertaisessa suurennoksessa. Laskettu solujen määrä ekstrapoloitiin kuutiosenttimetriin eli noin 1 millilitraan raskia.



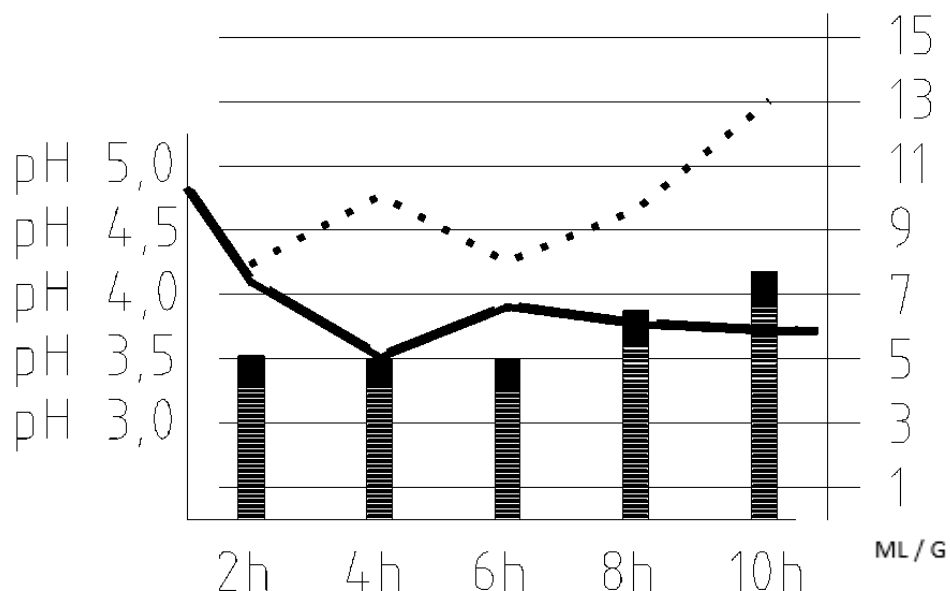
Kuva 6. Hiivasolujen laskukammionmittauslaitteisto.

Lämpökäsiteltyä raskia ei pystytty tutkimaan tällä menetelmällä, koska melkein kaikki hiivasolut olivat kuumennuksen ja seuraavan jäädytyksen takia hajonneet.

Toisessa näytteessä aamulla otettu tuoreraski ei ehtinyt jäähtymään kunolla ja hiivasolut lähtivät ilmeiseen kasvuun ennen aikojaan. Kolmannen ja neljännen kerran laskenta onnistui, ainakin mikrobitoimintaa rajoittavan kylmäketjun osalta. Toisaalta tulokset kaikista laskentakerroksista olivat liian hajanaisia, joten niiden uskottavuudesta ei oikein voinut vetää johtopäätöksiä.

4.6 Raskifermentaatioisyklin seuranta

Orgaanisten happojen kehitystä raskitankissa seurattiin yhden yön aikana. Huomiota kiinnitettiin lämpötilaan ja sekoittamiseen, joka toinen tunti otettiin raskinäyte happoanalyyseja varten.



Kuva 7. Raskivalmistuksen aikajana. Musta viiva osoittaa pH-tason laskua (vasen asteikko), katkoviiva kokonaishappolukua (emäsmillimetreinä oikean asteikon mukaan), pylväät maito- ja etikkahapon pitoisuutta raskissa (raidalliset ja mustat osuudet vastaavasti maito- ja etikkahapolle; grammaa / 100 g raskia, oikeanpuolisen asteikon mukaan).

Ylempänä olevassa kuvassa 7 on esitetty suuntaa antava hahmotelma happojen kehityksestä fermentaation aikana. Kesken raskin kehittymistä, noin viiden tunnin syklin alusta, tapahtuu uuden ruisjauhoannoksen ja veden lisääminen tankkiin. Tästä seuraa kuvaajassa havaittava happamuustason normalisointi ennen kuin mikrobitoiminta vilkastuu ja haponkehitys pääsee taas vauhtiin. Kuvaaja edustaa aika hyvin perinteistä alan kirjallisuudessa kuvattua raskifermentaation kehitysjanaa, tosin happojen kehitys on tässä tapauksessa huomattavan intensiivinen (Salovaara 1998).

5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

5.1 Raskin happoanalyysin tulokset

Orgaanisten happojen analyysit on jaettu spektrofotometrisesti suoritettuihin (maito- ja etikkahapot) ja kaasukromatograafisiin (propionihappo). Saadut tulokset esitetään erikseen analyysimenetelmän mukaan.

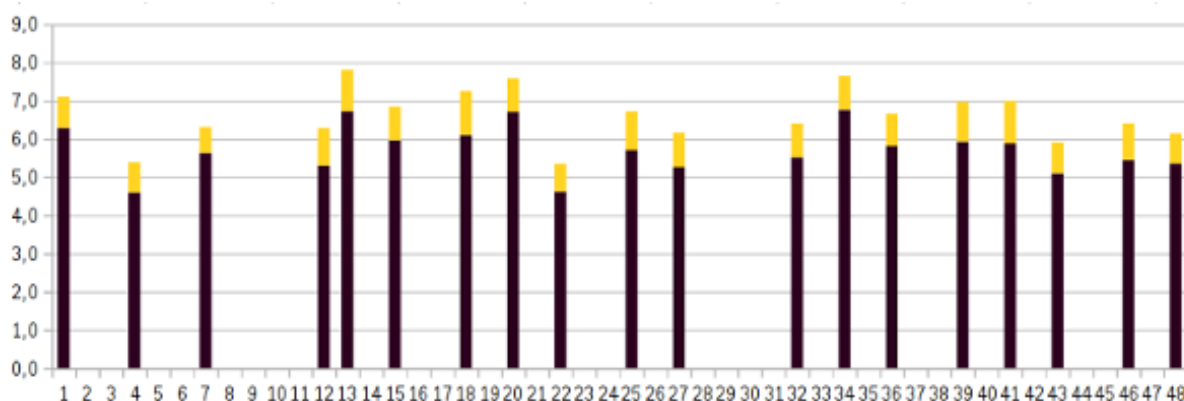
5.1.1 Maito- ja etikkahappo

Raskista analysoidut tulokset on esitetty graafisesti alla olevassa kuvassa 8 sekä seuraavan sivun taulukossa 1 (tulokset numeerisesti) ja taulukossa 2 (yleinen tilastollinen yhteenveto).

Mittaustulosten pylväsdiagrammissa (kuva 8) vaaka-akseli esittää seurantajakson kestoja päivissä ja pystyakseli pitoisuuksia maitohapon ja etikkahapon osalta. Maitohappopylväässä ei eroteltu molekyylien enantiomeereja, vaan L- ja D-maitohapot on laskettu yhteen.

Näytteitä ei lopulta ollut tavoiteltu 20 kappaletta, sillä päivän 29 näyte jouduttiin hylkäämään. Sen tulos oli selvästi liian alhainen molempien hapon kohdalla, eikä sitä voitu pitää uskottavana. Kuitenkaan näytteenoton hetkellä mitatut pH-arvo ja lämpötila sekä raskitusohjelman loki eivät anna mitään syytä epäillä, että raski olisi sinä aamuna epäonnistunut.

Tuloksista ensi silmäyksellä huomaa, kuinka suuret happoarvovaihtelut ovat. Näytteenotto-olosuhteet pyrittiin kuitenkin pitämään mahdollisimman samanlaisina ja näytteet käsiteltiin varoen. Eri päivien mitatut tulokset saattavat erota paljonkin. Keskihajonta on etikkahapon tapauksessa 0,13 g/100 g keskiarvon ollessa vain 0,907 g, eikä maitohapollakaan variatiokerroin ole parempi.



Kuva 8. Mittaustulosten graafinen esittely. Vaakasuunnassa seurantajakson päivät, pystyakselissa happopitoisuus: tumma osuus – maitohappo, keltainen - etikkahappo (g/100 g raskia).

Taulukko 1. Raskien happoanalyysimittausten yhteenvetotaulukko.

päivä	pH	happo- luku (ml)	etikka- happo (g / 100 g)	D-maito- happo (g / 100 g)	L-maito- happo (g / 100 g)	happojen suhde etikka – maito	suhdeluku maito / etikka
1 (23.3.)	3,80	12	0,818	2,080	4,213	10,3 % – 89,7 %	8,7
4 (26.3.)	3,83	12	0,795	1,485	3,117	12,8 % – 87,2 %	6,8
7 (29.3.)	3,94	13	0,678	1,990	3,646	9,7 % – 90,3 %	9,3
12 (3.4.)	3,95	13	0,983	1,692	3,614	13,5 % – 86,5 %	6,4
13 (4.4.)	3,88	11	1,078	2,752	3,809	12,1 % – 87,9 %	7,2
15 (6.4.)	3,90	11	0,879	2,223	3,591	11,4 % – 88,6 %	7,8
18 (9.4.)	3,90	11	1,152	2,175	3,701	13,7 % – 86,3 %	6,3
20 (11.4.)	3,88	13	0,881	2,709	3,754	10,4 % – 89,6 %	8,6
22 (13.4.)	3,84	12	0,728	1,909	3,177	12,0 % – 88,0 %	7,4
25 (16.4.)	3,90	11	1,014	2,481	3,803	13,1 % – 86,9 %	6,6
27 (18.4.)	3,87	13	0,897	2,353	3,666	12,7 % – 87,3 %	6,9
32 (23.4.)	3,86	12	0,886	2,142	3,206	12,1 % – 87,9 %	7,2
34 (25.4.)	3,91	12	0,883	2,468	4,085	10,3 % – 89,7 %	8,7
36 (27.4.)	3,88	10	0,846	2,036	3,592	11,3 % – 88,7 %	7,9
39 (30.4.)	3,87	11	1,043	2,597	4,183	13,0 % – 87,0 %	6,7
41 (2.5.)	3,87	11	1,112	2,741	3,988	13,7 % – 86,3 %	6,3
43 (4.5.)	3,86	12	0,809	2,139	3,700	12,0 % – 88,0 %	7,3
46 (7.5.)	3,83	11	0,961	2,367	3,864	13,0 % – 87,0 %	6,7
48 (9.5.)	3,83	12	0,788	2,325	3,800	11,4 % – 88,6 %	7,8

Taulukko 2. Analyysimittausten tilastollinen yhteenveto. Muissa kuin otoksessa ja prosenttimääräisissä riveissä yksikkönä on g happoa / 100 g raskia.

	Etikkahapon mittaukset	Maitohapon mittaukset
otos <i>n</i>	19	19
max arvo	1,152	6,774
min arvo	0,678	4,602
vaihteluväli	0,474	2,172
keskiarvo <i>x</i>	0,907	5,729
mediaani <i>Md</i>	0,883	5,716
keskihajonta σ	0,130	0,632
variaatiokerroin <i>Cv</i>	14,3 %	11 %
<i>t</i> -merkitsevyystaso	99,99998 %	99,99997 %

Tilastollista tarkistusta laatuvaihtelujen merkitsevyystasolle (prosentuaaliselle hylkäämisvirheen todennäköisyydelle) on turhaa laskea. Kuten tilastollisesta yhteenvetotaulukosta näkyy, se on suurin piirtein pyöreät sata prosenttia.

Jotta vastaavan koon näyteotannon tasalaatuisuus voitaisiin pitää tilastollisesti edes melkein merkitsevänä (tarkoittaa tilastotieteessä korkeintaan viiden prosentin tasoa), tulosten olisi pitänyt pysyä puitteissa 0,844–0,970 g / 100 g raskia etikkahapolle ja 5,424–6,034 g / 100 g raskia maitohapolle (laskettu käyttäen samaa keskiarvoa ja -hajontaa ja *t*-jakauman kriittistä arvoa vapausasteella $df=18$ kaksisuuntaisessa testissä).

Toisaalta tulosten kirjolle ei heti löydy selvää syytekijää. Pitkät levot viikonlopun aikana eivät nähtävästi vaikuta tähän, koska eri maanantailta löytyy hyvinkin erilaisia arvoja. Tankissa olevalla raskimäärällä ei myöskään ole niin isoa merkitystä: jo melkein loppuun imetty tankki voi osoittaa sekä pieniä että suuria happotasoja. Mielenkiintoista on, että raskin pH-arvo näytteenottohetkellä pysyy melko tasaisena (mediaani on pH 3,875). Tämä kertoo lähinnä siitä, että raski on kehittynyt täyteen potentiaaliinsa, että se on näytteenottohetkellä kypsä, "protoniaktiivinen" ääriään myöten ja näin estää tehokkaasti ruistaikin autolyyttistä lyyhistymistä, mikä onkin hapanleivonnan perimmäinen tarkoitus (katso luku 3.1). Siinä mielessä raski on valmistusprosessiin sopiva ja valitut kypsennysparametrit on valittu oikein.

Toisin kuin pH-arvo, happoluku vaihtelee paljon, jopa melkein protoniaktiivisuudeltaan samanarvoisilla ja samoissa olosuhteissa säilytyillä näytteillä. Happoluku oli minimissään 10 ml ja maksimissaan 13 ml. Mediaani on 12 ml, mikä on ihan uskottava ja hyvä luku ruiskille, joskin korkea). Lisäksi voitiin huomata, ettei happoluku korreloinut tutkitun kahden hapon pitoisuuksien kanssa. Tämä viittaa siihen, että raskiin kehittyi satunnaisesti muita orgaanisia happoja, jotka eivät näkyneet tässä testissä. Kuten luvussa 4.4 oli huomattu, tällaisten happojen osuus voi olla välillä hyvinkin korkea. Niiden syntyyn vaikuttavat ennen kaikkea lämpötila sekä jonkin verran myös hapen saanti. Maitohappoa syntyy varmemmin, jos raskia ei sekoiteta liikaa (Spicher & Stephan 1993). Satunnaista kasvua joidenkin asidofiilisten bakteerien tai hiivojen puolelta voi aina tapahtua, asialle ei oikein voi tehdä paljoakaan. Puhtaan siirrostuskannan käyttöönotto useammin kuin muutama kerta vuodessa voisi tulla kysymykseen, mutta se olisi toisaalta vaivalloista ja kallista.

Lämpötila-arvoissa näytteenottohetkillä on ollut paljon vaihtelua. Eroa löytyy jopa 5 °C seurantajakson aikana, eikä välttämättä kyseessä ole ollut tyhjäksi pumpatun tankin automaattinen kytkentä säilöntätilaan. Lämpötilalla, kuten edellä huomattiin, on ratkaiseva merkitys mikrobitoiminnan ohjauksessa, lämpötilan säätö on pitkälti ainoa tehokas, välittömästi vaikuttava keino ohjata raskifermentaation kulkua. Tämän takia riittävään

lämmitykseen ja nopeaan jäädytykseen olisi panostettavaa enemmän huomiota ja resursseja yrityksessä.

Edellä taulukossa 1 on myös esitetty kahden tutkitun hapon keskinäistä osuutta sekä osuuksien suhdetta. Tyypillisesti maitohappoa on vähän alle 90 % ja etikkahappoa vähän yli 10 % kokonaispitoisuudesta, Eli suhdeluku maito- / etikkahapolle vaihteli 6,3 ja 9,3 välillä (taulukko 1). Tässä saatu tulos on hyvin sopusoinnussa kirjallisuudessa esitettyjen arvojen kanssa.

Tarkasteltaessa tuloksia voi lisäksi huomata, että seuranta-jakson loppua kohti etikkahapon prosenttimääräinen osuus kasvaa jonkin verran, samalla kun maitohapon osuus laskee. Tämä voi olla joko merkki laktobasillien heterofermentatiivisten (katso luku 3.2) kantojen vaivihkaisesta valtaannoususta, tai vain seurausta vaihteellisesta lämpötilojen noususta kevään aikana lämpimine öineen ja johtovesineen.

5.1.2 Propionihappo

Ulkopuolisessa laboratoriossa suoritettu analyysi osoitti yhden satunnaisesti valitun päivän näytteen sisältävän pientä määrää propionihappoa (0,01 % raskiin suhteutettuna). Määrä on melko pieni, juuri todentamisrajoilla korkean erotuskyvyn kaasukromatografiallekin.

Tuon päivän näytteen titrattu happoluku oli 13 ml, kun maito- ja etikkahapon yhteinen pitoisuus oli vain 6,92 g / 100 g raskia. Näyte on siis juuri sellaisesta päivästä, jolloin muitakin happoja kaksi tutkittavaa näkyi muodostuneen. Propionihapon pitoisuus olisi samoin suhteutettuna 0,1 grammaa.

Tulos todisti ensinnäkin, että muita orgaanisia happoja muodostuu raskiin ja ennen kaikkea, että propionihappoa tuottavia bakteereja tosiaan löytyy tämän raskin bakteerikantojen joukosta.

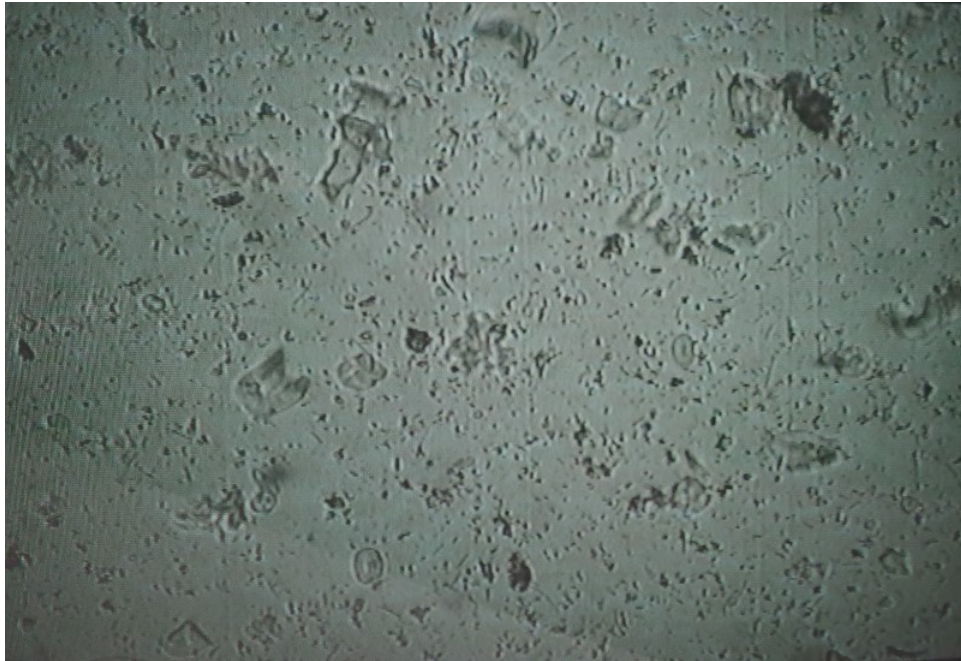
5.2 Hiivasolujen analysointitulokset

Raskin hiivasolujen mikroskooppinen laskukammionlaskenta yritettiin tehdä laboratoriossa viisi kertaa, mistä vain kolmessa jotenkin onnistuineesti. Kuumakäsitellyssä raskissa hiivasolut tuhoutuivat, kuten näkyy kuvassa 9 seuraavalla sivulla.

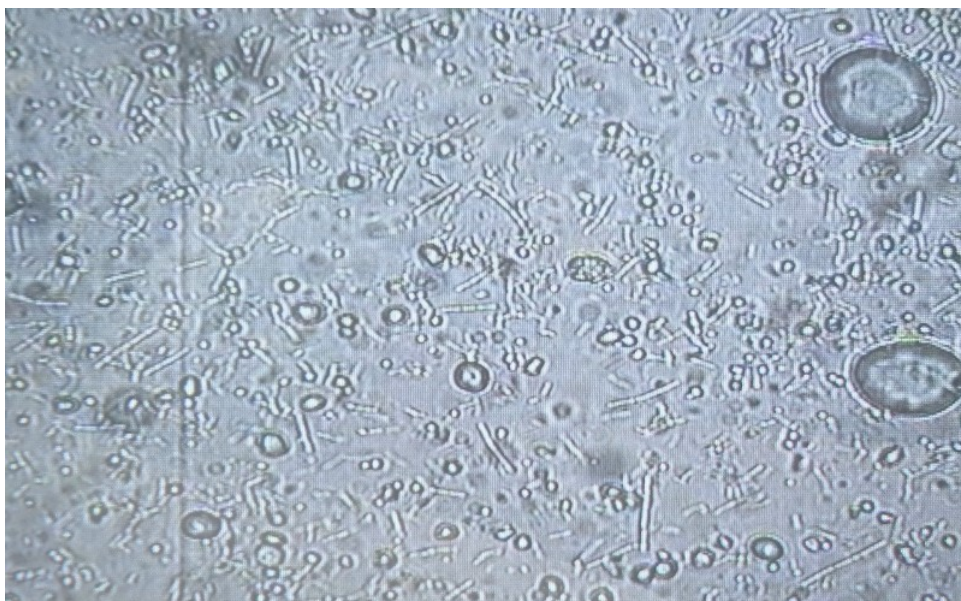
Seuraavaan analyysikertaan mukaan oli otettu saman aamun tuoretta raskia, mutta näyte ei ehtinyt jäähtyä kunnolla ennen kuljetusmatkaa ja raski lähti selvästi elämään. Koska se ei ollut enää edustuskelpoinen, näyte jäi harjoituskappaleeksi.

Kolmannen kerran tarpeeksi jäädytetty raskinäyte laimennettiin kymmenkertaisesti ja kammionlaskennassa saatiin laskettua neliömillimetriä

kohden 96 isoa *Saccaromyces*- kaltaisia hiivasoluja ja 520 pientä *Candida milleri* -tyyppistä. Lisäksi mikroskoopissa 40-kertaisessa suurennoksessa voitiin erottaa jopa kokonaisia laktobasilleja. Ne erottuvat hyvin esimerkiksi seuraavalla sivulla esitetyssä mikroskooppikuvakaappauksessa (kuva 10). Laktobasilleja laskettiin 3680 yksilöä laskukammion neliömillimetrille. Kertoen tämä pinta-ala kammion syvyyteen (0,1 mm), ottaen huomioon laimennoskerroin ja ekstrapoloiden saatu tiheys kuutiosenttimetrin tilavuuteen, saatiin raskin millilitralle määritettyä $9,6 \times 10^6$ pmy suuria hiivasoluja, 52×10^6 pmy pieniä hiivasoluja ja 368×10^6 laktobasilleja.



Kuva 9. Tuhoutuneiden hiivasolujen rippeet kuumakäsitellyssä raskissa. Mikroskooppikuvakaappaus, suurennus x10.



Kuva 10. Laimennettu raski 40-kertaisessa suurennoksessa. Hyvin erottuvat isot ja pienemmät hiivasolut. Hyvin näkyvät jopa sauvamaiset maitohappobakteerit. Mikroskooppikuvakaappaus.

Seuraavien laskentakertojen tulokset olivat toisaalta erilaisia. Suuria hiivasoluja löydettiin neliömillimetriä kohden vain $1,6 \times 10^6$ pmy, pieniä $89,6 \times 10^6$ pmy, näkyviä laktobasilleja 576×10^6 pmy. Sitä seuraavalla kerralla yli 12×10^6 isoja hiivasoluja ja 64×10^6 pieniä hiivoja, bakteereja ei laskettu.

Koska tulokset olivat joka kerta niin erilaiset, heräsivät epäilykset menetelmän pätevydestä. Ei toki ollut tarkoitus laskea soluja käsin joka näytteestä, mutta jopa jos niitä lasketaan kerran viikossa, vaihtelut ovat liian suuria ja ekstrapolointimenetelmä liian summittainen, jotta sillä olisi käytännön merkitystä. Viimeisessä laboratorioskerrassa soluja ei laskettu.

Hiivasoluja on siis tutkitussa raskissa 60–100 miljoonaa pmy / ml, laktobasilleja 400–600 miljoonaa pmy / ml. Toki näkyvien laktobasillien lisäksi raskissa on voinut olla pienempiä erottumattomia eliöitä, esimerkiksi kokkeja. Tulokset on esitetty taulukossa 3 alempana.

Taulukko 3. Yhteenveto hiivasolumäärien määrittämisestä.

Laskentapäivä	Hiivasolujen lasketut määrät (pmy / cm ² raskia)	Laktobasillien lasketut määrät (pmy / cm ² raskia)
3.4.	ei pystytty laskemaan	ei pystytty laskemaan
6.4.	ei pystytty laskemaan	ei pystytty laskemaan
11.4.	$61,6 \times 10^6$ ($9,6 \times 10^6$ isompia ja 52×10^6 pieniä)	368×10^6
18.4.	$91,2 \times 10^6$ ($1,6 \times 10^6$ isompia ja $89,6 \times 10^6$ pieniä)	368×10^6
27.4.	76×10^6 (12×10^6 isompia ja 64×10^6 pieniä)	ei laskettu
9.5.	ei laskettu	ei laskettu

6 JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSET

Kokeellisen osuuden päätyttyä voidaan todeta, että ruisraski ei ole mikrobiologiselta luonteeltaan kovin tasalaatuista, ainakaan suoritettun tutkimuksen puitteissa. Kun automatiikka hoitaa fermentaatiota, inhimillisen virheen riski vähenee huomattavasti ja lopputuotteen laatu paranee. Täydellisyyteen ei kuitenkaan päästä. Maitohappobakteerien tuottamien happojen pitoisuudet voivat vaihdella jopa peräkkäisinä päivinä suuntaan ja toiseen ja eri päivinä otetuista näytteistä voi löytää aivan eri määriä hiivasoluja ja laktobasilleja. Titrattavissa oleva happopitoisuus ei myöskään aina korreloi maito- ja etikkahappojen pitoisuuksien kanssa. Nuo kaksi ovat kuitenkin ruisraskin tärkeimmät orgaaniset hapot muiden spontaanisesti esiintyvien ollessa pikemminkin ei-toivottuja. Muitakin happoja kuitenkin muodostuu, vaikka fermentaatioprosessi olisi säädetty tarkasti merkittävillä parametreilla.

Toisaalta maitohappoa syntyy joka raskiin suurin piirtein yhden prosentin verran. Maitohapon ja etikkahapon suhde on melko tasainen päivästä toiseen. Hiivasoluja syntyy kymmeniä miljoonia kappaleita raskin joka millilitraan, joten nostatusvoimaa saadaan taikinaan joka kerta. Lisäksi useita tunteja fermentoitunut hapanjuuri sisältää juuri niin paljon aktiivisia protoneja, että ruistaikin autolyttinen toiminta saadaan estettyä. Nämä kriteerit täyttyvät siis hyvin. Jos tasalaatuisuudelle ei aseteta liian tiukkoja ehtoja, kuten gramman kymmenesosan tarkkuudella, voidaan pitää fermentorin tuottamaa raskia tarkoitukseen juuri sopivana.

Toki olisi mielenkiintoista tutkia, mitä sivutuotteita loppujen lopuksi raskiin syntyy aina välillä spontaanisesti, sekä miten näiden sivutuotteiden ilmentymistä voitaisiin hallita paremmin.

On ainakin tullut selväksi, että fermentaatio ei ole läheskään niin suoraviivainen kemiallinen prosessi, että se ei etene aina samojen sääntöjen mukaisesti, mukana on mikrobiologiaa, elämää ja elämään liittyvää ennalta arvaamattomuus.

Tässä on seurattu yhden teollisen raskifermentorin toimintaa tarpeeksi pitkänä aikajaksona. Seurannan tuloksena ainakin todettiin, ettei laatuvaihteluille löydy yksiselitteisiä ulkoisia tekijöitä, kuten pitkät keskeytykset tuotannossa. Huomattiin myös, että pitkässä juoksussa etikkahapon osuus kasvaa maitohapon suhteen. On myös huomattu, että juuri kyseisen fermentorin lämpötilasäätö voisi olla tehokkaampi.

Propionihappoja myös osoitettiin löytyvän pieni määrä, mikä osoittaa, että propionihappobakteereja tosiaan on yrityksen raskissa ja että ne ovat elinvoimaisia. Raskin mikrobikanta ei siis ole ihan homogeeninen. Tästä oli tosin saatu näyttöä myös happoluvun vaihteluista ja tutkittujen happojen pitoisuuksien epästabiiliudesta.

Raskin mikrobikantojen moninaisuus aiheuttaa siis sen, että lopputuotteen kehitystä on vaikeampaa ohjalla, mutta toisaalta kertoo myös raskin ainutlaatuisuudesta, tuo mielikuvia perinteisen hapanjuuren rikkaasta flavorista.

Kaikkiaan voidaan pitää asetettuihin tutkimuskysymyksiin löytyneen jos ei ihan tyhjentäviä, niin ainakin tarpeeksi aihetta kattavia vastauksia. Jatko-tutkimuskysymyksiä voidaan esittää esimerkiksi sille, miten fermentaatio-prosessia voisi elintarviketekniikassa ohjata vielä paremmin ja päästä paljon tasalaatuisimpiin lopputuotteisiin.

LÄHTEET

And, S. (2013). *Propionihappopitoisen raskifermentin kehittäminen*. Maisterin tutkielma. Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. HY.

Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. & Gatto, G. (2012). *Biochemistry*. 7. painos. New York: W. H. Freeman and Company.

Denli, E. & Ercan, R. (2001). Effect of added pentosans isolated from wheat and rye grains on some properties of bread. *European Food Research and Technology*. 212(3).

Engelbrektson, L. (2014). Surdegsbröd nästan utan surdeg. *Göteborgs-Posten* 11.3.2014. Haettu 17.5.2018 osoitteesta www.gp.se/livsstil/konsument/surdegsbr%C3%B6d-n%C3%A4stan-utan-surdeg-1.451848

FAO (2017) *Food Outlook on development of food and feed markets presented by Food and Agriculture Organization of UN*. (pdf-julkaisu.) Haettu 17.5.2018 osoitteesta www.fao.org/giews/reports/food-outlook/en/

Häkämies, A. (2014). *Hordeiinit ohrataikinan rakenteessa*. Maisterin tutkielma. Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. HY.

Javanainen, P. (1993). *Mixed culture pre-ferments of lactic and propionic acid bacteria for baking*. Väitöskirja. Biotekniikan ja elintarviketeknologian laboratorio. Helsingin teknillinen korkeakoulu.

Javanainen, P. & Skyttä, E. (1998). Leivän säilyvyyden parantaminen. Kat-sausartikkeli raportissa: Tekes (1998). *Tehoa raskista*. Ei julkinen.

Kurtzman, C. & Fell, J. (toim.) (2000). *The yeasts, a taxonomic study*. 3. painos. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Luke (2017). *Ruoka- ja luonnonvaratilastojen e-vuosikirja 2017*. Luonnonvarakeskuksen pdf-julkaisu. Haettu 17.5.2018 osoitteesta kuri.luke.fi/handle/10024/540980

Madigan, M. & Martinko, J. (2006). *Brock's Biology of Microorganisms*. 11. painos. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Megazyme (2018a). *Data booklet for Acetic Acid Assay Kit ACS Manual format*. (pdf-julkaisu.) Haettu 17.5.2018 osoitteesta secure.megazyme.com/files/Booklet/K-ACET_DATA.pdf

Megazyme (2018b). *Data booklet for D-/L-Lactic Acid Rapid Assay Kit* (pdf-julkaisu.) Haettu 17.5.2018 osoitteesta secure.megazyme.com/files/Booklet/K-DLATE_DATA.pdf

Mäntynen, V., Korhola, M., Turakainen, H. & Lindström, K. (1998). Suomalaisen hapanleipähiivojen luokittelu. Julkaisussa: Tekes (1998). *Tehoa raskista*. Ei julkinen.

Rotsch, A. & Schulz, A. (1958). *Taschenbuch für die Bäckerei und Dauerbackwarenherstellung*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Salovaara, H. (1998). Mikä on raski? Katsausartikkeli hankeraportissa: Tekes (1998). *Tehoa raskista*. Ei julkinen.

Seibel, W. & Weipert, D. (2001). Bread baking and other food uses around the world. Teoksessa: W. Bushuk (toim.) *Rye: production, chemistry, technology*. 2. painos. St. Paul: American Association of Cereal Chemists Inc.

Shewry, P. & Bechtel, D. (2001). Morphology and chemistry of the rye grain. Teoksessa: W. Bushuk (toim.) *Rye: production, chemistry, technology*. 2. painos. St. Paul: American Association of Cereal Chemists Inc.

Spicher, G. & Stephan, H. (1993). *Handbuch Sauerteig, Biologie, Biochemie, Technologie*. 4. painos. Hampuri: Behr's Verlag.

Toivo, M. (1998). Hiivakantojen ominaisuudet. Katsausartikkeli raportissa: Tekes (1998). *Tehoa raskista*. Ei julkinen.