
Emmental valmistusprosessin bakteriofagit ja niiden lämpöherkkyys



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka

Visamäki, kevät 2013

Risto Sirén



VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Meijeriteknologia

Tekijä	Risto Sirèn	Vuosi 2013
Työn nimi	Emmental valmistusprosessin bakteriofagit ja niiden lämpöherkkyys	

TIIVISTELMÄ

Bakteriofagit ovat bakteerien viruksia, jotka monistuessaan tuhoavat isäntäbakteerin. Juuston valmistuksessa maidon hapattaminen tapahtuu maitohappobakteereilla, joten bakteriofagien hallinta juuston valmistusprosessissa on tärkeää. Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, missä vaiheessa juuston valmistusprosessia bakteriofagit pääsevät monistumaan ja samalla löytää keinoja prosessin bakteriofagien vähentämiseksi. Lisäksi haluttiin saada selville, miten juustomaidolle ja heralle tehtävät lämpökäsittelyt vaikuttavat bakteriofageihin.

Opinnäytetyön tutkimusosuudessa määritettiin Valio Oy Lapinlahden juustolan emmental valmistusprosessin bakteriofagien määriä epäsuorasti kasvuneston määrityksellä. Lisäksi tutkittiin emmental hapatteena käytettävän *Streptococcus thermophilus* bakteerin bakteriofagien lämpöherkkyyttä eri lämpökäsittelyillä. Lämpökäsittelyjen vaikutus todettiin plakkitestillä. Tulokset osoittivat, että bakteriofagit monistuivat pääasiassa laskuaitailla herankierrätyksestä johtuen. Kehitysehdotuksena suositeltiin herakierron katkaisua kahdesti pesujen välillä yhdistettynä riittävään välipesuun, jolla saadaan poistettua rakeistojaamat laitteista ja putkistoista. Lämpöherkkyyskokeiden pohjalta tehtiin monimuuttujamalli, jolla voidaan ennustaa lämpökäsittelyjen vaikutusta bakteriofageihin. Mallin mukaan heran pastörintiin käytettävä 63 °C/15 s lämpökäsittely ei vaikuta bakteriofagitiitteriin merkittävästi ja juustomaidon pastörinti 74 °C/15 s laskee bakteriofagitiitteriä noin kolme lg- yksikköä.

Kirjallisuudessa tarkastellaan bakteriofagien esiintyvyyttä, vaikutuksia ja kontaminaatioreittejä teollisessa juustonvalmistusprosessissa. Lisäksi luodaan tarkempi katsaus *S. thermophilus* bakteereita infektioivien bakteriofagien yleisiin ominaisuuksiin. Tutkimusosuuden tuloksia peilataan teoriaosuudessa esitettyihin faktoihin. Tämä opinnäytetyö oli toimeksianto Valio Oy:n Tutkimus ja Tuotekehitys- yksiköltä.

Avainsanat Bakteriofagi, *Streptococcus thermophilus*, juuston valmistus, lämpökäsittely

Sivut 29 s. + liitteet 4 s.

VISAMÄKI

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering
Dairy technology**Author**

Risto Sirén

Year 2013**Subject of Bachelor's thesis**

Bacteriophages of emmental manufacturing process and their heat sensitivity

ABSTRACT

Bacteriophages are bacterial viruses that destroy their host bacterium while replicating. In cheese manufacture the fermenting of milk is done with lactic acid bacteria so it is important to control bacteriophages in the cheese manufacturing process. The aim of the thesis was to determine the stages of cheese manufacturing process that bacteriophages replicate in and at the same time to find ways to reduce the amount of bacteriophages in the process. Another aim was to find out how the heat treatments used for cheese milk and whey affect bacteriophages.

In this bachelor's thesis amounts of bacteriophages in emmental manufacturing process of Valio Ltd Lapinlahti cheese factory was determined indirectly by inhibition of growth- method. Heat sensitivity of the bacteriophages of *Streptococcus thermophilus*, an emmental cheese starter, was also examined by different heat treatments. The effect of the heat treatments was examined by plaque test. The results of the study showed that bacteriophage replication occurred mainly in the pre-pressing vats due to whey circulation. It was recommended that whey circulation should be interrupted twice between cleanings combined with adequate additional cleaning which removes curd residuals from equipment and piping. A multivariate model was made based on the heat sensitivity tests, which can be used to make predictions of the effects of the heat treatments on bacteriophages. According to the model, the whey heat treatment of 63 °C/15 s does not have significant effect on bacteriophages and the cheese milk heat treatment of 74 °C/15 s lowers bacteriophage titer by approximately three lg- units.

The literature part examines the prevalence, effects and contamination routes of bacteriophages in an industrial cheese manufacturing process. Also, general properties of bacteriophages infecting *S.thermophilus* bacteria are reviewed in detail. The results of the study are compared to the facts presented in the literature part. This bachelor's thesis was commissioned by Valio Ltd Research and Product Development unit.

Keywords Bacteriophage, *Streptococcus thermophilus*, cheese making, heat treatment

Pages 29 p. + appendices 4 p.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	BAKTERIOFAGIT JUUSTONVALMISTUSPROSESSISSA JA NIIDEN HAVAITSEMINEN	2
2.1	Raakamaito.....	2
2.2	Prosessitilat ja -laitteet.....	2
2.2.1	Ilma.....	2
2.2.2	Juuston valmistuslaitteet.....	3
2.2.3	Muut pinnat	3
2.3	Hapatteen valmistus	4
2.4	Profagit.....	4
2.5	Bakteriofagien havaitseminen.....	4
3	STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS BAKTERIOFAGIT	6
3.1	Morfologia ja jaottelu.....	6
3.2	Lämpöherkkyys	7
4	EMMENTALJUUSTON VALMISTUSPROSESSIN BAKTERIOFAGITUTKIMUS	8
4.1	Tavoite	8
4.2	Menetelmät ja toteutus	8
4.2.1	Kasvuneston määrittäminen pH- eroon perustuvalla menetelmällä.....	9
4.3	Kasvuneston määrittämisen tulokset	10
4.4	Kasvuneston määrittämisen tulosten tarkastelu.....	12
4.5	Kasvuneston määrittämisen tulosten pohjalta tehdyt koeajot	14
4.5.1	Katkaistun herakierron koeajojen tulokset.....	14
4.5.2	Katkaistun herakierron koeajojen tulosten tarkastelu	15
4.6	Suosittelavat jatkotoimenpiteet	16
4.7	Johtopäätökset emmental valmistusprosessin bakteriofagitutkimuksesta	16
5	STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS BAKTERIOFAGIEN LÄMPÖHERKKYYSTUTKIMUS	17
5.1	Tavoite	17
5.2	Materiaalit ja menetelmät	17
5.2.1	Käytetyt bakteriofagit.....	17
5.2.2	Hera	18
5.2.3	Kasvualustat	18
5.2.4	Kuumennuskäsittelyt.....	18
5.2.5	Bakteriofagitiitterin määrittäminen plakkitestillä	19
5.3	Lämpöherkkyystutkimuksen tulokset	19
5.4	Lämpöherkkyystutkimuksen tulosten tarkastelu	26
5.5	Johtopäätökset lämpöherkkyystutkimuksesta	27
	LÄHTEET	28

-
- Liite 1 Estokokeiden tulokset näytteenottopäivänä A
 - Liite 2 Estokokeiden tulokset näytteenottopäivänä B
 - Liite 3 Estokokeiden tulokset näytteenottopäivänä C
 - Liite 4 Estokokeiden tulokset siilomaitonäytteistä

1 JOHDANTO

Juuston happanemisen onnistuminen on erittäin tärkeää juuston lopullisen aistittavan laadun kannalta. Jotta happaneminen saadaan aikaan hallitusti ja samalla tavalla joka juustoerälle, on prosessin parametrit oltava jokaisella erällä samat. Näin saadaan aikaan tasalaatuinen ja hyvä lopputuote. Koska juuston happaneminen on kiinni elävistä organismeista, eli maitohappobakteereista, ei prosessin toistettavuus ole itsestään selvää. Etenkin bakteriofagit voivat aiheuttaa prosessiin vaihtelua. Bakteriofagit ovat bakteerien viruksia, jotka lisääntyvät monistumalla isäntäorganismien sisällä samalla tuhoten isäntänsä. Huomionarvoista on myös se, että bakteriofagit lisääntyvät huomattavasti isäntiään nopeammin. Tällöin bakteriofagi-infektio vaikuttaa juustonvalmistuksessa käytettävän hapatteen haponmuodostuskykyyn alentavasti ja voi jopa pysäyttää hapatteen toiminnan kokonaan, jolloin seurauksena voi olla suuri määrä hävikkiä. Haponmuodostuskyvyn vaihtelu aiheuttaa edelleen vaihtelua juuston lopulliseen aistittavaan laatuun ja tasalaatuisuus kärsii. Tästä syystä bakteriofagien hallinta juustonvalmistusprosessissa on ensiarvoisen tärkeää.

Valio Oy:n Lapinlahden juustolan emmental valmistusprosessista otetaan aina viimeisestä rakeiston laskusta ennen kierto pesuja bakteriofaginäyte laskuherasta, josta analysoidaan pH-ero isäntäbakteerin kasvunestoon perustuvalla menetelmällä. Estokokeista saadut tulokset ovat osoittaneet vuoden 2011 ja 2012 aikana pH-eron kasvua emmentalprosessissa, joten päätettiin kartoittaa prosessista kohdat, joissa bakteriofagit pääsevät monistumaan sekä tutkia bakteriofagin lämpöherkkyttä etenkin prosessissa käytettyjen lämpötilojen osalta. Lapinlahden juustolassa käytetään juuston hapattamiseen *Streptococcus thermophilus* hapatetta.

Opinnäytetyön kirjallisuusosiossa tarkastellaan bakteriofagien kontaminaatioreittejä ja juustonvalmistusprosessin vaiheita, joissa bakteriofagien monistuminen on mahdollista. Lisäksi käsitellään tarkemmin *S.thermophilus* bakteereja infektioivien bakteriofagien ominaisuuksia.

2 BAKTERIOFAGIT JUUSTONVALMISTUSPROSESSISSA JA NIIDEN HAVAITSEMINEN

Bakteriofageilla on käytännössä useita eri reittejä päästä kontaminoimaan juustomaito tuotantolaitoksessa; raakamaidon välityksellä, profaagien välityksellä, prosessitilojen ilman ja maidon kohdatessa, henkilökunnan huonon hygienian ja prosessilaitteiden kautta, mikäli laitteiston pesutulos on puutteellinen (Marcó, Moineau, Quiberoni. 2012; Kammerlehner 2009, 148).

2.1 Raakamaito

Raakamaito on tärkein ja jatkuva uusien bakteriofagien lähde tuotantolaitokseen. Madera, Monjardín & Suárez 2004 havaitsivat tutkimuksessaan *Lactococcus lactis*-bakteriofageja esiintyvän noin 10 % tutkimukseen valituilta Pohjois-Espanjalaisilta tiloilta otetuista näytteistä. Näin suuri esiintyvyys tarkoittaa jatkuvaa uusien, virulenttien bakteriofagien pääsyä tuotantolaitokseen. Lisäksi bakteriofagien on todettu kestävän pastörintitason lämpökäsittelyt inaktivoitumatta kokonaan, joten raakamaidon välityksellä juustonvalmistusprosessiin pääsee jatkuvasti uusia bakteriofageja. (Capra, Neve, Sorati, Atamer, Hinrichs, Heller, Quiberoni 2012) Etenkin kun tuotantolaitoksessa valmistetaan tuotteita alhaisemmalla lämpökäsittelyllä eli termisoinnilla bakteriofageja voi olla paljon jo keiton alkuvaiheessa. Koska juustomaidon hapatukseen käytettävät mikrobikannat ovat usein maidossa luonnollisesti esiintyviä kantoja (mm. *Streptococcus thermophilus*-kannat) tai niistä jalostettuja, vaikuttavat raakamaidon bakteriofagit erittäin paljon juustonvalmistusprosessin onnistumiseen, mikäli bakteriofagit kestävät juustomaidon lämpökäsittelyn. Bruttin, Desiere, d'Amico, Guérin, Sidoti, Huni, Lucchini, Brüssow 1997 tutkivat raakamaitonäytteitä ja havaitsivat niissä *S. thermophilus* bakteriofageja 2 lg. Usein juustoloissa kierrätetään hapatteita bakteriofagiongelman välttämiseksi. Vaihtoväliä voidaan tarkkailla esimerkiksi kasvuneston määrityksellä laskuherasta, eli hapate vaihdetaan kun pH-ero on noussut tietylle ennalta määritellylle tasolle. Tutkimuksissa on kuitenkin huomattu, että vaikka *S. thermophilus* hapatekantaa vaihdetaan, niin uutta kantaa infektoivat bakteriofagit voivat raakamaidon välityksellä päästä tehtaaseen jo alle viikon päästä hapatteen vaihdosta. (Atamer, Hinrichs 2010; Marcó ym. 2012.)

2.2 Prosessitilat ja -laitteet

2.2.1 Ilma

Hygienialla on suuri merkitys bakteriofagien esiintyvyydelle tuotantolaitoksessa. Vaikka raakamaito onkin tärkein reitti bakteriofageille tuotantolaitoksen sisään, pääsevät bakteriofagit silti leviämään muuallekin tuotantolaitokseen mm. ilman välityksellä. Bakteriofagit esiintyvät ilmassa erikokoisina aerosoleissa. Siirtyminen maidosta tai herasta ilmaan voi tapahtua nesteiden tai laitteiden siirtämisen yhteydessä ja henkilökunnan

toiminnan- tai nesteiden loiskumisen seurauksena. Myös erilaisilta pinnoilta (työtasot, lattiat) bakteriofagit voivat siirtyä ilmaan lähellä tapahtuvan liikkeen synnyttämän ilmapvirran voimasta. Ilmassa esiintyvien bakteriofagien vuoksi on tärkeää eristää laitoksen eri osastot toisistaan fyysisesti tai ilmanpaine-erolla siten, että ilma ei pääse kulkeutumaan niiden välillä. Näin saadaan minimoitua bakteriofagien leviämismahdollisuudet yhdeltä osastolta koko tehtaaseen. Kokonaan bakteriofagien esiintymistä tuotantolaitoksen ilmassa on lähes mahdotonta estää, joten tämä luo vaatimuksia niin henkilökunnalle hygienian suhteen, kuin prosessilaitteistollekin. Kaikki laitteet tulisi olla mahdollisuuksien mukaan suljettuja. (Verreault, Gendron, Rousseau, Veillette, Masse, Lindsley, Moineau, Duchaine 2011; Marcó ym. 2012.)

2.2.2 Juuston valmistuslaitteet

Laitteiden peseytyvyys on tärkeää niin pilaajamikrobin, kuin bakteriofagienkin osalta. Huonon pesutuloksen seurauksena laitteisiin ja putkiin jää biofilmiä, jossa bakteriofagit selviävät seuraavaan juuston valmistukseen tai jopa pääsevät monistumaan, mikäli tarjolla on isäntämikrobeja. Juustokattilassa ja sen jälkeisissä prosessin vaiheissa tuotteessa on suuri hapatemikrobipitoisuus, eli näiden laitteiden puhtaus on erittäin tärkeää bakteriofagien lisääntymisen estämiseksi. (Kammerlehner 2009, 148.)

Teollisessa juuston valmistuksessa juustoa valmistetaan usein keskeytymättömästi ja tämä lisää haasteita laitteiston puhtaana pitämiseen. Kun pyritään maksimoimaan laitteiden käyttöaikoja, joudutaan samoja laitteita käyttämään useita keittoja peräkkäin ilman pesua, mikä antaa bakteriofageille tilaisuuden päästä monistumaan kattiloissa, putkissa sekä laskualtailla. Tästä syystä laitteiden välihuuhtelujen tulee olla tehokkaita niin, että hera- ja rakeistojäämät saadaan huuhdeltua laitteista kokonaan tyhjennyksen ja täytön välillä. Kriittisiä kohteita, joihin rakeistojäämiä helposti jää, ovat muun muassa juustokattilan leikkurit tai sekoittimet, lämpötila-anturit ja laskualtaiden puristuslevyt. Laitteistosta voidaan tuhota bakteriofageja myös kemiallisilla käsitelyillä. Esimerkiksi kloorikäsittelyllä täyttöjen välissä pystytään yleensä inaktivoimaan mahdolliset bakteriofagit laitteiden pinnoilta. Tarvittava pitoisuus (100 – 800 ppm) vaihtelee eri bakteriofagien välillä. (Capra, Quiberoni, Reinheimer 2004.)

2.2.3 Muut pinnat

Valmistusprosessin laitteiden lisäksi bakteriofageja on havaittu esiintyvän myös muilla pinnoilla tuotantolaitoksessa. Verreault ym. 2011 eristivät tutkimuksessaan bakteriofagien geneettistä materiaalia useilta eri pinnoilta, kuten lattioilta, ovenkahvoista, siivoustarvikkeista, seinistä ja toimiston pöydiltä. Vaikka geneettisen materiaalin löytyminen ei välttämättä tarkoita elävien virulenttien bakteriofagien läsnäoloa, on niitä todennäköisesti jossakin vaiheessa ollut läsnä. Koska bakteriofagit saattavat siirtyä pinnoilta ilmaan liikkeen aiheuttaman ilmapvirran

vaikutuksesta tai ihmisten käsiin ja vaatteisiin, tulee henkilökunnan ymmärtää pintojen puhtauden tärkeys. Ovenkahvoista löytyneet positiiviset näytteet korostavat käsihygienian merkitystä entisestään, sillä juuston keitossa juoksetteen kovuuden tarkistus ja hapatteiden valmistuksessa siirrostus tapahtuu usein käsin.

2.3 Hapatteen valmistus

Bakteriofagi-infektio käyttöhapatteen kasvatustankissa olisi seurauksiltaan vakava. Hapatteen kasvatusaika on pitkä verrattuna esimerkiksi juuston keittoaikaan, minkä vuoksi bakteriofagit saattavat ehtiä tuhoamaan koko hapatteen. Tästä syystä hapatteen siirrostuksessa tulee noudattaa aseptisia työskentelytapoja ja hapatteen kasvatustilat tulee olla asianmukaiset. Kun tilat ovat fyysisesti erotettu tuotantotiloista ja paineistettu suodatetulla ilmalla, bakteriofagien pääsy kasvatustiloihin ilman välityksellä vaikeutuu huomattavasti. Tällöin todennäköisin reitti hapattetankin bakteriofagi-infektioon on ihmisen välityksellä siirrostustilanteessa, minkä vuoksi suojavaatteisiin pukeutuminen ja huolellinen käsihygienia ovat siirrostustilanteessa välttämättömiä asioita. (Marcó ym. 2012.)

2.4 Profagit

Profagiksi kutsutaan lysogeenisessä syklissä osaksi bakteerin DNA:ta integroitunutta virus DNA:ta. Profagilla infektioitunut bakteeri pystyy toimimaan ja jakautumaan täysin normaalisti. Kuitenkin mikäli bakteeri vaurioituu tai altistuu stressille (lämpötila, paine jne.), voi profagi aktivoitua ja monistua, mikä johtaa uusien virulenttien bakteriofagien vapautumiseen. Profagit ovatkin raakamaidon ohella toinen, piilevä lähde bakteriofageille tuotantolaitokseen. (Maloy, Cronan, Freifelder. 1994; Mercantia, Carminatib, Reinheimer, Quiberonia. 2011.)

Monien meijeriteollisuudessa laajasti käytettyjen *Lactococci*- ja *Lactobacillus*-kantojen on havaittu kantavan profageja. Mercantia ym. (2011) huomasivat tutkimuksessaan 25:n tutkitusta 30:stä probioottisesta *Lactobacillus*-kannasta sisältävän profageja. Eri *S.thermophilus*-kannoilla profagien esiintyminen puolestaan on huomattavasti harvinaisempaa. Joissakin tutkimuksissa profageja ei ole löytynyt ollenkaan (Bruttin ym. 1997) ja osassa on raportoitu 1-2 % esiintyvyyttä. (Marcó ym. 2012.)

2.5 Bakteriofagien havaitseminen

Bakteriofagien havaitsemistavat voidaan karkeasti jakaa kahteen osaan; suoriin ja epäsuoriin. Suorat menetelmät havaitsevat lyyttisten bakteriofagien tai niiden osasten läsnäolon näytteessä ja epäsuorilla menetelmillä voidaan sen sijaan havaita bakteriofagien aiheuttamia vaikutuksia, joista voidaan edelleen päätellä onko näytteessä bakteriofageja vai ei. Yleisessä käytössä ovat suoriin menetelmiin kuuluvat mikrobiologiset menetelmät. Näihin kuuluu mm. plakkitesti, joka ovat helppo toteuttaa ja lisäksi sillä pystytään erottamaan bakteriofagit muista estotekijöistä (mm. antibiootit). Plakkitestillä pystytään

bakteriofagien läsnäolon toteamisen lisäksi määrittämään niiden lukumäärä tilavuusyksikköä kohden. Plakkitestin huonot puolet ovat useiden tuntien kasvatusaika (usein yön yli) ja vaatimus tarkasta indikaattorimikrobikannasta. (Marcó ym. 2012; Capra, Neve, Sorati, Atamer, Hinrichs, Heller, Quiberoni 2013.)

Plakkitestiä huomattavasti nopeampi bakteriofagien havaitsemistapa on PCR (polymerase chain reaction) menetelmä; sillä tulos saadaan tunneissa ja usein saman päivän aikana. PCR-menetelmiä on kehitetty jopa luokittelemaan yleisimpien hapatemikrobien bakteriofageja eri matriiseissa, kuten hera- ja maitonäytteissä. Nopeutensa ansiosta PCR-menetelmällä voidaan seurata kasvatus- tai käymisprosessin bakteriofagien määrää lähes reaaliajassa. (Cruz Martín, del Rio, Martínez, Magadán, Alvarez 2008.) PCR-menetelmällä ei kuitenkaan pystytä havaitsemaan pieniä bakteriofagimääriä näytteestä. Parhaimmillaan havaitsemistarkkuudeksi on saatu 2 lg. (Ly-Chatain, Durand, Riqobello, Vera, Demariqny. 2011.) Koska PCR-menetelmä perustuu ainoastaan bakteriofagin DNA:n havaitsemiseen, jolloin tällä menetelmällä ei pystytä erottamaan toisistaan aktiivista ja inaktiivista geneettistä materiaalia. Tästä saattaa joissain tapauksissa seurata vääriä hälytyksiä. PCR-laite on myös kallis investointi rutiininomaiseen bakteriofagiseurantaan. Jotta saadaan mahdollisimman paljon ja tarkkaa tietoa bakteriofaginäytteestä, on PCR-menetelmiä ja mikrobiologisia menetelmiä järkevää käyttää yhdessä. Tällöin voidaan saada selville bakteriofagin tyyppi, kelvolliset isäntäbakteerit ja bakteriofagitiitteri. (Marcó ym. 2012.)

Yleisimmissä epäsuorissa menetelmissä bakteriofagien läsnäolo todetaan perinteisillä menetelmillä isäntämikrobin hapontuoton muutoksesta. Mikäli näytteessä on bakteriofageja, sen hapatebakteerin hapontuotto vähenee tai estyy verrattuna kontrollinäytteeseen, jossa ei ole bakteriofageja. Hapontuoton muutos voidaan todeta pH-erona tai indikaattorivärillä. Nämä menetelmät ovat meijereissä yleensä rutiininomaisessa käytössä bakteriofagien seurantaan. Testin tulosta pitää kuitenkin tulkita varauksella, mikäli on kyse monikantahapatteesta, koska bakteriofagit ovat usein isäntäspesifisiä ja yhden kannan bakteriofagi ei välttämättä estä koko hapatteen hapontuottoa, jolloin tuloksena voi olla virheellisesti negatiivinen tulos. (Marcó ym. 2012.)

Uudempia epäsuoria menetelmiä on kehitetty bakteriofagien seurantaan reaaliajassa. Michelsen, Cuesta-Dominiquez, Albrechtsen, Jensen 2007 havaitsivat virtaussytometrillä bakteriofagien infektoimat solut, koska infektiokierron loppuvaiheessa isäntäsolujen soluseinien tiheys laskee niin, että virtaussytometri havaitsi sen. Menetelmällä pystyttiin havaitsemaan bakteriofagit jo infektion alkuvaiheessa (1-2 % isäntäsoluista infektoitunut), joten bakteriofagitartunnan sattuessa onnistuneen väliintulon mahdollisuus kasvaa.

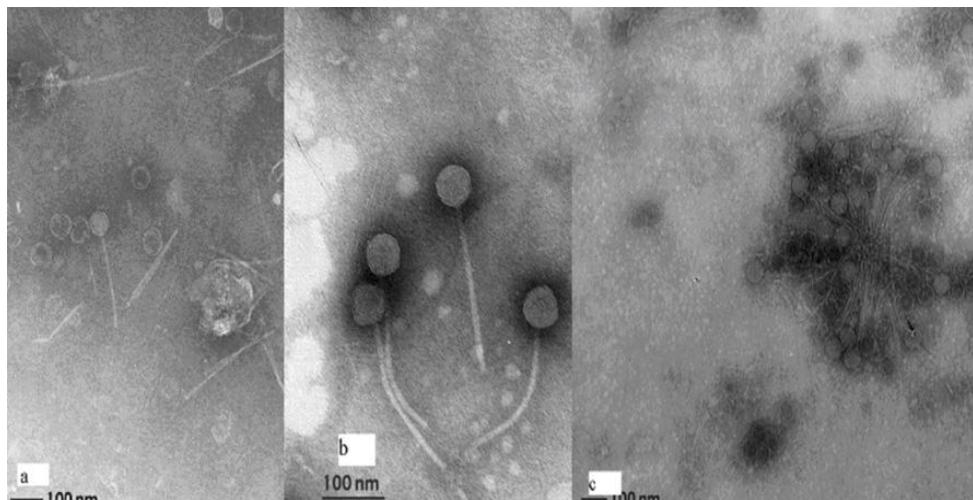
3 STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS BAKTERIOFAGIT

Streptococcus thermophilus-hapatteita infektoivia bakteriofageja on löydetty ainakin 345 erilaista. Näiden bakteriofagien ominaisuudet mahdollistavat niiden menestymisen juustonvalmistusolosuhteissa ja näin ollen voivat aiheuttaa ongelmia teollisuudessa. *S. thermophilus* bakteriofagit ovat hyvin lämmönkestäviä, niillä on lyhyt latenttiaika ja bakteerin tuhoutuessa vapautuvien virusten määrä on suuri. (Quiberoni, Moineau, Rousseau, Reinheimer, Ackerman 2010.)

3.1 Morfologia ja jaottelu

Bakteriofagien nimeämiseen ei ole olemassa sovittuja yksiselitteisiä sääntöjä. Nimeämisessä on käytetty erilaisia vaihtelevia tapoja, kuten erilaisten kreikkalaisten kirjaimien-, numerokoodien- ja morfologisten ominaisuuksien käyttöä. Myös ihmisten ja paikkojen nimiä ja jopa fiktiivisiä hahmoja on käytetty bakteriofagien nimeämisessä. Sääntöjen puuttumisesta johtuen nimien päällekkäisyyksiä esiintyy melko paljon ja esimerkiksi nimellä P1 tunnetaan kuusi eri bakteriofagia. *S. thermophilus* bakteriofageja on siis myös nimetty näiden periaatteiden mukaan, joten tietyn bakteriofagin nimestä ei voi päätellä mistä bakteriofagista on kysymys. (Kropinski, Prangishvili, Lavigne. 2009.)

Kaikki löytyneet *S. thermophilus*-kantoja infektoivat bakteriofagit kuuluvat *Siphoviridae*-sukuun ja *Caudovirales*-lahkoon, jonka tunnuspiirteitä ovat isometrinen kapsidi ja supistumaton häntä. Osalla *S. thermophilus* bakteriofageista on havaittu pitkiä kuituja, pieni aluslevy tai kuiduista muodostunut massa häntäpäässä. Joillain bakteriofageilla häntäpäät saattavat liimautua keskenään, jolloin muodostuu suuria ryppäitä (kuva 1). (Quiberoni ym.2010.)



Kuva 1. *S. thermophilus* bakteriofageja. a) Φ 231-X9, 60000 kertaisella suurennoksella. b) Φ B3-X18, 100000 kertaisella suurennoksella. c) Φ 709-X4 45000 kertaisella suurennoksella. Kuvassa c näkyy bakteriofagien muodostama ryppäs. (Soykut ym. 2010.)

Bakteriofagien ja niiden osien mitat ovat usein epätarkkoja, koska eri tutkimuksissa käytetyt menetelmät eivät ole yhteneväisiä (eri elektronimikroskooppeja ja suurennuksen kontrolloinnin puute). Tästä syystä yksiselitteisiä mittoja on eri tutkijoiden eri laitteilla tekemistä tutkimuksista hankala sanoa (Quiberoni ym.2010).

Soykut ja Tunail (2010) tutkivat 25 erilaista *S. thermophilus* bakteriofagia elektronimikroskoopilla. Havaittiin, että bakteriofagien kapsidit olivat isometrisiä sekä kuusikulmaisia ja niiden pituus vaihteli välillä 47 – 74 nm, kun supistumattomat hännät olivat 182 – 290 nm pitkiä ja 7 – 14 nm leveitä. Kaikki tutkitut bakteriofagit kuuluivat *Siphoviridae*-sukuun.

S. thermophilus bakteriofagit on useissa tutkimuksissa todettu isäntäspesifiseksi (Quiberoni ym. 2010). Spesifisyys aiheutuu bakteriofagin adsorpoituessa tapahtuvasta vuorovaikutuksesta bakteriofagin antireseptorin ja isännän reseptorin välillä. Tämä antireseptori siis määrittää mitä kantoja bakteriofagi voi käyttää isäntinään. (Duplessis, Moineau 2001.)

3.2 Lämpöherkkyys

Kuten useat muutkin bakteriofagit, myös *S. thermophilus* bakteriofagit kestävät perinteisen pastörintitason lämpökäsittelyt. Suarez, Quiberoni, Binetti, Reinheimer 2002 totesivat *S. thermophilus* bakteriofagien säilyneen virulenteina 63 °C/45 min ja 72 °C/12 min lämpökäsittelyn jälkeen. Myös erittäin lämpökestäviä *S.thermophilus* bakteriofageja on löydetty. Bakteriofagit CGL-3 ja CGL-4 olivat virulenteja vielä 90 °C/35 min käsittelyn jälkeen (Capra ym. 2013). Samassa tutkimuksessa kontrollibakteriofagi 031-D inaktivoitui samassa lämpötilassa kokonaan 5-10 minuutissa, joten *S.thermophilus* bakteriofagien lämpöherkkydessä on suurta vaihte l u a.

4 EMENTALJUUSTON VALMISTUSPROSESSIN BAKTERIOFAGITUTKIMUS

Valion sisäisissä bakteriofagiauditoinneissa ennen varsinaista juuston keittoa prosessista ei ole kasvunestonmäärityksellä havaittu merkittäviä pH-eroja. Sen sijaan kattilamaitonäytteistä on saatu korkeampia tuloksia ja korkeimmat pH-erot ovat löytyneet laskuherasta.

4.1 Tavoite

Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään miten bakteriofagien määrä kehittyy päivän juustoerien aikana prosessin eri vaiheissa. Tarkoitus oli löytää prosessista kohtia, joissa bakteriofagit pääsevät monistumaan ja etsiä keinoja, joilla sitä voitaisiin ehkäistä. Tutkimuksessa keskityttiin maidon esikäsittelyn jälkeisiin ja puristusta edeltäviin prosessin vaiheisiin ja otettiin seuraavat näytteet:

- Siilomaito
 - o Tällä näytteellä pyrittiin selvittämään tuleeko yhteiskäsittelystä juustonvalmistusprosessiin bakteriofagipitoista maitoa. Siilomaito on pastöroitu yhteiskäsittelyssä 74 °C/15 s.
- Esihera
 - o Bakteriofagimäärien kehitystä juuston keiton aikana selvitettiin esiheränäytteillä ja lisäksi pyrittiin saamaan selville, kuinka paljon bakteriofagimäärät nousivat kattiloilla pesujen välillä. Esihera poistettiin kattilasta rakeiston leikkauksen jälkeen.
- Laskuhera
 - o Tällä näytteellä selvitettiin laskuheran bakteriofagimäärien nousu laskualtailla pesujen välillä.

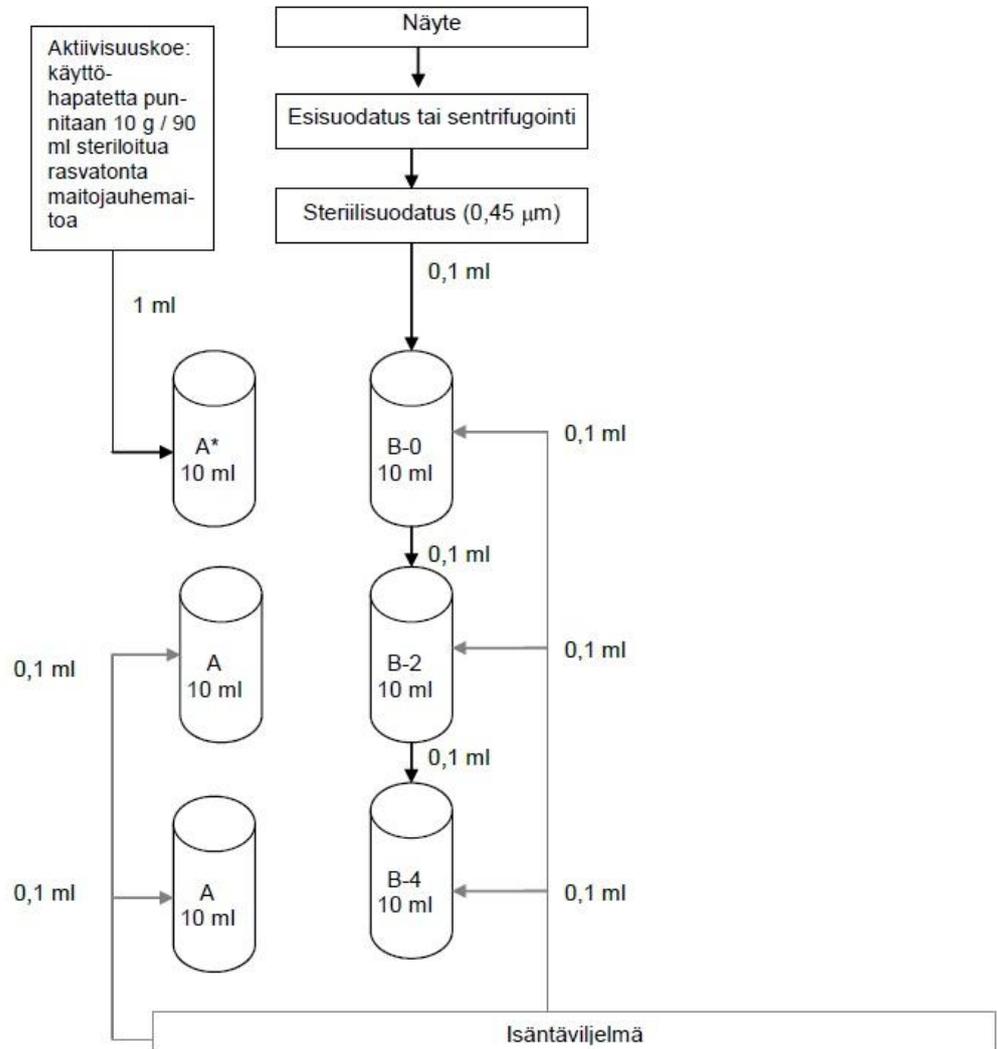
Yhdessä näiden näytteiden katsottiin antavan kattavan kuvan koko prosessin bakteriofagimäärien kehittymisestä.

4.2 Menetelmät ja toteutus

Siilomaitonäytteet otettiin juustomaidon esilämmittimeltä, esiheränäyte juustokattilasta esiheran poiston yhteydessä ja laskuheränäyte laskualtalta rakeiston laskun päätyttyä. Otetuista heränäytteistä mikro-suodatettiin välittömästi näytteenoton jälkeen 0,45 µm suodattimella isäntäbakteerit pois, jotta bakteriofagit eivät pääse monistumaan näytteessä. Maitonäytteet saostettiin maitohapolla ja saostuneesta maidosta erotettiin sentrifugoimalla hera, josta suodatettiin 0,45 µm suodattimella isäntäbakteeri pois. Näin menetelmällä näytteitä ei joutunut analysoimaan välittömästi, koska ilman isäntäbakteeria bakteriofagit eivät pääse monistumaan näytteessä. Näytteitä otettiin niin suuri määrä, että tämä oli välttämätöntä.

4.2.1 Kasvuneston määrittys pH-eroon perustuvalla menetelmällä

Koska bakteriofagit estävät isäntäbakteerinsa kasvua ja näin vaikuttavat suoraan hapatteen hapontuottoon, pystytään bakteriofagien läsnäolo toteamaan näytteestä epäsuorasti pH-eroon perustuvalla isäntäbakteerin kasvuneston määrittämisellä (kuva 2). Mitä suurempi pH-ero testillä saadaan, sitä enemmän estokijöitä näytteessä on. Mutanen (2011) on kuvannut menetelmän tarkasti opinnäytetyössään.



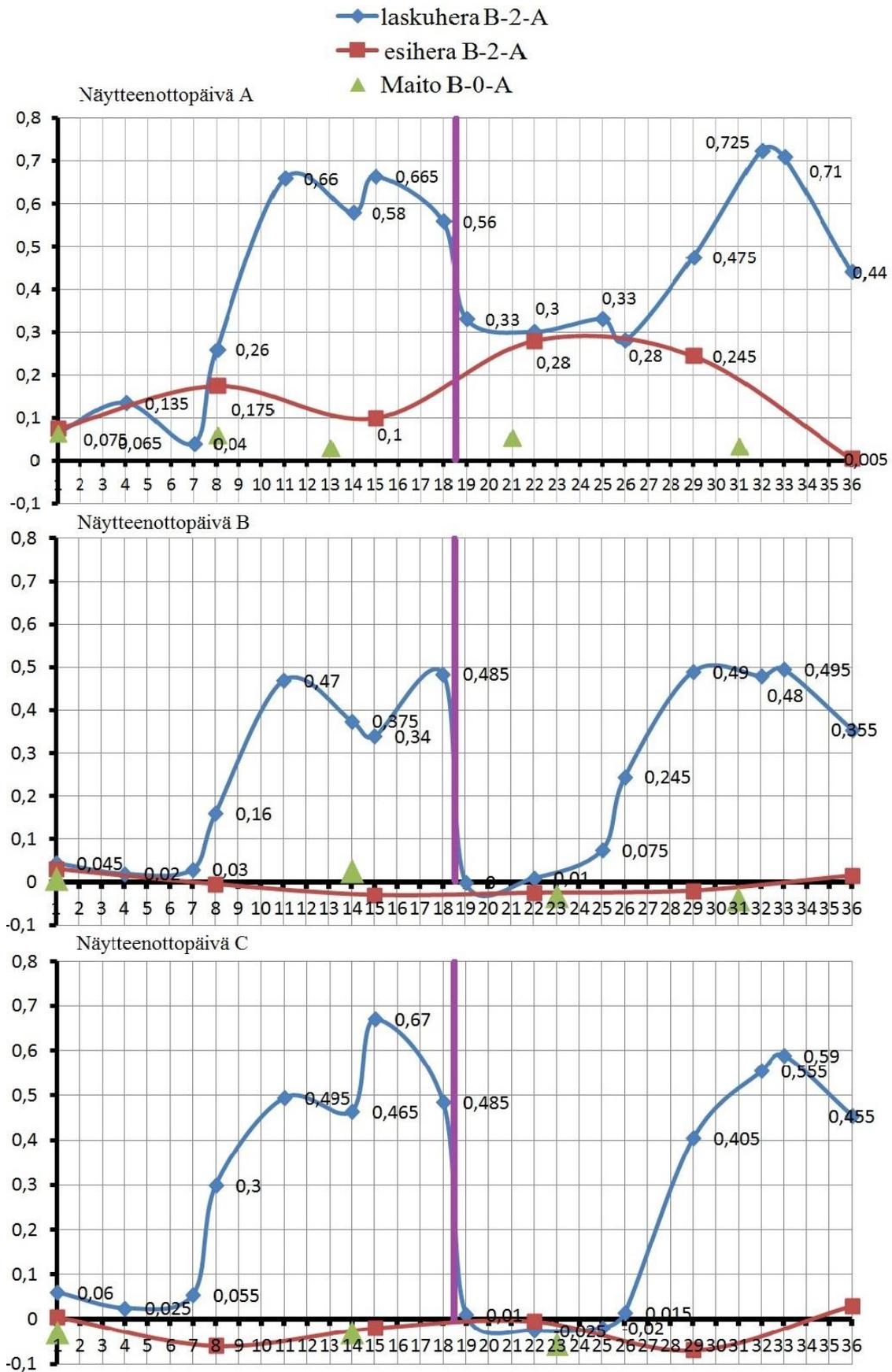
Kuva 2. pH eroon perustuva hapatebakteerin kasvuneston määrittys Valion oman ohjeen pohjalta

4.3 Kasvuneston määrittämisen tulokset

Tehdyistä kasvuneston määrittämisistä saadut tulokset on esitetty kuviossa 1. Kuviot on piirretty liitteissä 1-4 olevien kasvunestokokeiden tulosten pohjalta.

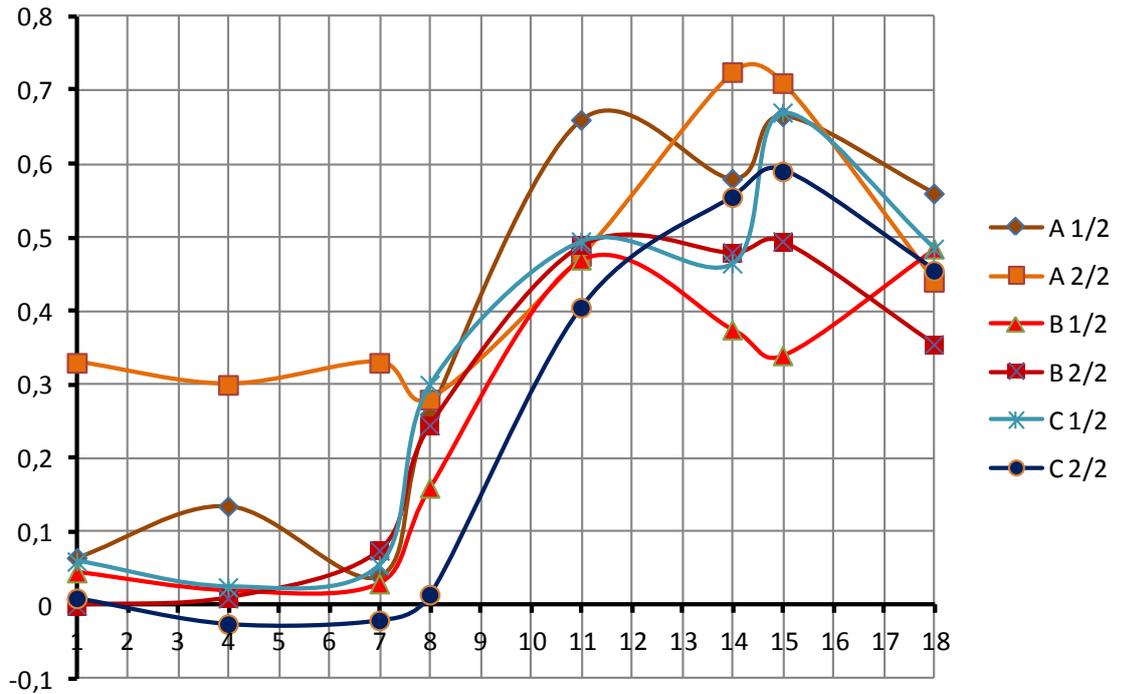
Laskuheran ja esiheran pH-ero on esitetty B-2 laimennoksesta saadusta tuloksesta, koska tehtaalla käytetään tätä laimennosta laskuherasta tehtävien kasvuneston määrittämisen tulosten kirjauksessa. Siilomaitonäytteiden tulokset ovat B-0-laimennoksesta, koska niissä bakteriofagimäärät ovat yleensä pienempiä ja näin ollen näytteitä ei tarvitse laimentaa. Siilomaitonäytteiden tulokset ovat esitetty kuviossa 1 sen keiton kohdalla, jossa uudesta siilosta on alettu ottamaan maitoa kattiloille.

Tulosten tarkastelussa tulee ottaa huomioon Lapinlahden juustolan laskualtailla tehtävä herankierrätys. Lasku suoritetaan siten, että ensimmäisestä kattilasta otetaan esihera laskualtaalle, johon rakeisto lasketaan. Kun laskualtaalla suoritettava esipuristus on ohi, siirretään hera laskualtaasta toiseen, johon lasketaan taas seuraavan keiton rakeisto ja tämän laskun jälkeen hera siirretään takaisin ensimmäiseen laskualtaaseen ja niin edelleen. Herää siis kierrätetään laskualtailla koko pesujen välisen ajan eikä herää pumpata kertaakaan kokonaan heran käsittelyyn, ennen viimeisen laskun päättymistä ja pesujen aloitusta.



Kuvio 1. Kasvunestokokeiden tulokset. X-akselilla keiton numero ja y-akselilla pH-ero. Kuvioissa on koko vuorokauden keitot ja pesut ovat 18. ja 19. keiton välissä (violetti pystyviiva). Siniset viivat edustavat laskuheranäytteistä-,

punaiset viivat esiheränäytteistä ja vihreät datapisteet siilomaitonäytteistä saatuja tuloksia.



Kuvio 2. Laskuheran pH-erotulokset näytteenottopäiviltä A, B ja C. Kustakin näytteenottopäivästä on piirretty kaksi viivaa. Viivat 1/2 edustavat keittoja 1-18 ja viivat 2/2 keittoja 19-36. X-akselilla keiton numero ja y-akselilla pH-ero.

4.4 Kasvuneston määrittämisen tulosten tarkastelu

Näytteenottopäivän A siilomaitonäytteissä on havaittavissa positiivista pH-eroa, mutta vain pieniä määriä. Näin pienistä pH-eroista ei voi varmuudella sanoa, onko näytteessä estotekijöitä. Bakteriofagi-infektion riski on olemassa, mikäli B-0 tulos on yli 0,1. Näytteenottopäivänä A myös esiheränäytteistä löytyi pH-eroa. Esiheran pH-ero vaihteli eri keittojen välillä. Tähän saattaa olla syynä eri maitoerät. Kuviosta 1 nähdään, että jokainen esiheränäyte näytteenottopäivänä A paitsi 22.- ja 29. keiton näytteet olivat lähtöisin eri siilojen maidosta. Lisäksi 22.- ja 29. keiton esiheränäytteet ovat lähellä toisiaan (0,035 ero). Tämä viittaa siihen, että maitoerän vaihtuminen saattaa vaikuttaa esiheran pH-eroon. Tämä johtopäätös edellyttää sitä, että raakamaidossa olisi *S. thermophilus* bakteriofageja, jotka selviävät maidolle tehtävän 74 °C/15 s lämpökäsittelyn. Lämpökäsittelyn jälkeen bakteriofagien määrä olisi kuitenkin niin pieni, että ne eivät vaikuttaisi merkittävästi kasvunestokokeen tulokseen. Juuston keiton aikana, kun maitoon siirrostetaan suuri määrä isäntäbakteereja, ne ehtisivät kuitenkin monistumaan esiheran poistoon mennessä siinä määrin, että ne voidaan havaita pH-erona. Eri maitoerien väliset vaihtelut voisivat selittyä sillä, että bakteriofagipitoista raakamaitoa on voinut olla eri määriä vastaanoton siiloissa, jolloin sitä voi päästä erilaisia määriä eri juustomaitoeriin.

Esiheränäytteistä ei ole havaittavissa pH-eroa, kuin yhtenä päivänä. Mikäli edellä tehty hypoteesi raakamaidon mukana tulevasta *S. thermophilus* bakteriofageista pitäisi paikkansa, voisi päiväkohtaista pH-ero vaihtelua selittää sillä, että jokaisen tilan maidossa ei olisi *S. thermophilus* bakteriofageja. Tätä johtopäätöstä tukee tutkimus jossa havaittiin 10 % tutkituilta maitotiloilta esiintyvän virulentteja bakteriofageja. (Madera, ym. 2004.) Kyseisessä tutkimuksessa analysoitiin *Lactococcus lactis* bakteriofageja, mutta raakamaito on todettu todennäköiseksi lähteeksi myös *S. thermophilus* bakteriofageille. (Bruttin ym. 1997.)

Kuviossa 1 esiintyy myös negatiivisia tuloksia. Nämä tulokset selittyvät sillä, että heralisäys saattaa joissain tapauksissa kiihdyttää happanemista, mikäli herassa ei ole estotekijöitä. (Loguercio, Halfhide, Janzen, Elsborg. 2000)

Jokaisena näytteenottopäivänä laskuheran pH-ero nousee samankaltaisesti esiheran pH-erosta riippumatta. Koska pH-ero nousee nimenomaan laskualtailla voidaan päätellä, että bakteriofagiongelma johtuu suurelta osin laskualtaiden välillä tapahtuvasta heran kierrätyksestä. Näin toimiessa bakteriofagit pääsevät monistumaan päivän keittojen aikana, koska heraa ei kertaakaan tyhjennetä kokonaan herankäsittelyyn, eikä laskujen välillä tapahtuva lyhyt kylmävesihuuhtelu ole riittävä huuhtelemaan rakeistojäämiä laskualtaista. Laskualtailla pH-ero alkaa nousta eksponentiaalisesti seitsemännen tai kahdeksannen keiton jälkeen (Kuvio 2).

Näytteenottopäivänä A esiheränäytteistä saadut pH-erot ovat korkeammat, kuin muina päivinä ja tästä syystä myös laskuheränäytteiden pH-erot ovat koholla jo ensimmäisistä rakeiston laskuista lähtien. Etenkin 19. ja 36. keiton välisten esiheränäytteiden pH-erot ovat korkeat ja tästä syystä käyrä A 2/2 alun pH-ero on kaikkein korkein. Luultavasti samasta syystä A 2/2 käyrän huippu on korkeammalla kuin muut käyrät.

Tuloksien perusteella vaikuttaa siltä, että pH-ero ei pääse kattilassa esiheran poistoon mennessä juurikaan nousemaan, paitsi jos raakamaidon mukana prosessiin pääsee *S. thermophilus* bakteriofageja. Koska bakteriofagit eivät näytä ehtivän monistua merkittävästi juuston keiton aikana, niiden vaikutus juuston happanemiseenkin jäänee pieneksi, koska liikkuakseen uusien isäntäsolujen luo bakteriofagit tarvitsevat nesteen kantaajakseen, eli puristettu juustomassa toimii fyysisenä esteenä bakteriofagien ja infektoituneiden bakteerien liikkumiselle uusien isäntien luo. (Fox, Guinee, Cogan, McSweeney 2000, 90.)

Pitää kuitenkin tiedostaa, että bakteriofagi-infektio ei aiheuta ongelmia ainoastaan päähapatemikrobille. Emmentalin valmistuksessa käytetään myös apuhapatteita kuten propionihappobakteereita. Nämä muodostavat juuston kypsymisen aikana hiilidioksidia, joka muodostaa emmentaljuustolle tyypilliset kolot, sekä propionihappoa, joka antaa emmentalille tyypillisen pähkinäisen aromin. Propionihappobakteerien toiminta voi kuitenkin hidastua päähapatemikrobin bakteriofagi-infektion seurauksena. Propionihappobakteerit käyttävät propionihappokäymisen

raaka-aineena päähapatemikrobin tuottamaa maitohappoa. Jos hapontuotto bakteriofagi-infektion seurauksena ei ole normaalia, ei juuston kypsyminen tällöin välttämättä etene normaalisti propionihappobakteerien osalta mikäli maitohappoa ei ole riittävästi. Seurauksena voi olla koloton juusto ja vääränlainen maku ja aromi. Eli juuston keitto, lasku, puristus ja suolaus voivat onnistua lievästä bakteriofagi-infektioista huolimatta, mutta kypsytyksen aikana ei silti välttämättä päästä haluttuun lopputuotteeseen mikäli maitohappoa ei ole muodostunut riittävästi propionihappobakteerin optimaaliselle toiminnalle. Mikäli bakteriofagi-infektion seurauksena maidon kaikki laktoosi ei ole fermentoitunut maitohapoksi, kasvaa myös riski ei-hapatteesta peräisin olevien maitohappobakteerien kasvulle juustossa ja tätä kautta riski virhemakujen ja -aromien muodostumiselle. (Piveteau, Condon, Cogan 2002.)

4.5 Kasvuneston määrityksen tulosten pohjalta tehdyt koeajot

Bakteriofagien voimakas monistuminen vaikutti alkavan seitsemännen ja kahdeksannen kattilan jälkeen. Tästä syystä päätettiin kokeilla minkälainen vaikutus saataisiin päivän viimeisen laskun pH-eroon katkaisemalla herakierto ennen voimakkaan monistumisen vaihetta aina kuuden laskun välein. Kuudennen laskun jälkeen laskuallas tyhjennettiin herankäsittelyyn sekä huuhdeltiin ja seitsemäs keitto laskettiin omaan esiheraansa, jolloin bakteriofagipitoista heraa ei jäänyt altaisiin. Näin saatiin ”nollattua” heran bakteriofagimäärä. Samalla tavoin toimittiin 12. ja 13. keiton välillä. Tällä koeajolla ei pystytty kuitenkaan vaikuttamaan altaissa olevaan rakeistojäämään eikä putkistoon ja laitteisiin jääviin faageihin, koska koeajossa ei tehty minkäänlaista pesua, ainoastaan kylmähuuhtelua.

Kokeen onnistumista mitattiin parittaisella yksisuuntaisella t-testillä. Tällä menetelmällä voitiin selvittää, onko viimeisen laskun pH-ero laskenut tilastollisesti merkittävästi verrattuna satunnaisotoksella valittuihin normaaleihin viimeisen laskun heranäytteisiin. Tähän riittävä otoskoko on viisitoista, koska aineisto on normaalisti jakautunut.

4.5.1 Katkaistun herakierron koeajojen tulokset

Taulukossa 1 olevat arvot edustavat jokaisen koeajokerran viimeisen laskun estokokeen tulosta.

Taulukko 1. Katkaistulla herakierrolla ajettujen koeajojen tulokset. Arvot edustavat jokaisen koeajokerran viimeisen laskun estokokeen tulosta

Koeajo	Estokokeen tulos
1	0,42
2	0,63
3	0,62
4	0,64
5	0,39
6	0,56
7	0,39
8	0,61
9	0,58
10	0,52
11	0,40
12	0,68
13	0,46
14	0,47
15	0,50
16	0,41

Taulukko 2. Koeajojen ja satunnaisotannalla valittujen ei katkaistun herakierron ajojen pohjalta lasketut tunnusluvut

Tilastollinen tunnusluku	Arvo
Tulosten keskiarvo	0,52
Normaalien ajojen keskiarvo	0,54
Keskiarvojen erotus	0,02
Tulosten keskihajonta	0,10
Normaalien ajojen keskihajonta	0,14
Yksisuuntainen p-arvo	0,30

Koeajojen tuloksia on verrattu normaaleihin laskuheran bakteriofaginäytteiden tuloksiin. Otos otettiin satunnaisotannalla vuoden 2012 keitoista. Taulukosta 2 nähdään, että tuloksena saatu p-arvo on 0,30. Toisin sanoen koeajojen alempi keskiarvo johtuu 30% todennäköisyydellä sattumasta, eli pelkällä herakierron katkaisulla ei ollut merkitsevää vaikutusta laskualtaiden bakteriofagiongelmaan.

4.5.2 Katkaistun herakierron koeajojen tulosten tarkastelu

Koeajojen tulokset johtuivat luultavasti altaisiin ja putkiin jääneestä rakeistosta. Rakeistossa bakteriofagit säilyvät seuraavaan laskuun ja isäntäbakteerijakin on runsaasti, jolloin bakteriofagien monistumista voi tapahtua. Tuloksista voidaan siis päätellä, että ainoastaan heran kierrätys altaiden välillä ei todennäköisesti aiheuta bakteriofagimäärien nousua vaan myös rakeistojäämillä on luultavasti merkitystä asiassa. Näin ollen bakteriofagimääriä voitaneen laskea välipesulla, joka on riittävän

voimakas poistaakseen rakeistojäämät altaista ja putkistoista, sekä herakierron katkaisun yhdistelmällä.

4.6 Suositeltavat jatkotoimenpiteet

Koeajot suunniteltiin suoritettavan myös välipesulla, mutta se ei ollut mahdollista laitteista johtuen. Välipesulliset koeajot vaativat useiden venttiilien uusimista, koska toisessa laskualtaassa olisi tuotetta samaan aikaan kun toisessa olisi kiertopesu käynnissä. Tällöin vierekkäisissä putkistoissa kulkisi samaan aikaan toisessa tuotetta ja toisessa pesunestettä, jotka erottaisi toisistaan kolmitieventtiili. Jotta tuoteturvallisuus säilyisi, pitäisi tämän venttiilin olla vuodon tunnistava. Venttiilien vaihto uusiin olisi vaatinut niin pitkän tuotantotauon, että sitä ei pystytty toteuttamaan

Koeajoja varten laskettiin, että altaan tyhjenemisen ja uusien muottien altaalle oton välissä pystyy pesemään laskualtaita 13 minuutin ajan viidennen ja kuudennen sekä 11. ja 12. laskun jälkeen. Tätä varten tehtiin myös emäspesuohjelma. Välipesuista saattaa tulla päällekkäisyyksiä muiden samalla pesulinjalla olevien pesujen kanssa eli varminta olisi vaihtaa laskualtaat eri pesulinjalle, etenkin jos välipesut otettaisiin pysyvään käyttöön. Mikäli tarvittavat venttiilit uusitaan, tulisi ajaa koeajot laskualtaiden välipesulla.

4.7 Johtopäätökset emmental valmistusprosessin bakteriofagitutkimuksesta

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää kasvuneston määrityksellä miten bakteriofagimäärä kehittyy päivän juuston valmistuksen aikana ja ennen kaikkea missä bakteriofagit pääsevät monistumaan. Tässä onnistuttiin ja tuloksista voidaan päätellä, että monistuminen tapahtuu pääasiassa laskualtailla herankierrätyksestä johtuen. Juustokattiloissa pH-eron perusteella bakteriofagien määrä vaikuttaa ajoittain nousevan, mikä johtunee raakamaidon mukanaan tuomista bakteriofageista. Katkaistulla herakierrolla suoritettujen koeajojen tulokset viittaavat siihen, että bakteriofagimäärien alentaminen laskualtailla vaatii välipesua laskujen välillä.

5 STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS BAKTERIOFAGIEN LÄMPÖHERKKYYSTUTKIMUS

Valio Oy Lapinlahden juustolassa käytetään heran pastörintiin 63 °C/15 s lämpökäsittelyä. Laskuheran bakteriofagiongelman takia heran pastörintin tehokkuus bakteriofagien inaktivointiin haluttiin testata. Aiemmin tässä tutkimuksessa tehtiin johtopäätös, että bakteriofagipitoista maitoa saattaa päästä yhteiskäsittelystä juustolaan. Tämä tarkoittaisi sitä, että bakteriofagit olisivat kestäneet emmentalin valmistukseen käytettävän maidon 74 °C/15 s lämpökäsittelyn.

5.1 Tavoite

Valion T-101 hapattetta infektoivien bakteriofagien lämpöherkyyttä ei oltu aiemmin tutkittu. Näin ollen ei myöskään tiedetty, miten prosessin lämpökäsittelyt, juustomaidon- ja heran pastörinti, vaikuttavat bakteriofageihin. Tästä syystä haluttiin tutkia, näiden lämpötilojen vaikutusta ja saada selville minkälaiset lämpökäsittelyt ovat riittäviä inaktivoimaan bakteriofageja.

5.2 Materiaalit ja menetelmät

Käsittelyt toteutettiin vesihauteessa jonka jälkeen näytteet sekoitettiin isäntäbakteerin kanssa maljalla, jota inkuboitiin yön yli. Maljoilta laskettiin bakteriofagien isäntäbakteerikasvustoon muodostamat plakit, josta saatiin bakteriofagitiitteri eli plakkia muodostavaa yksikköä millilitrassa (pfu/ml). Lämpökäsittelykokeet tehtiin Valio Oy tutkimus ja tuotekehitys laboratoriossa Helsingissä.

Koska mikrobien kuolemiskäyrä vakio­lämpötilassa on lineaarinen logaritmisella asteikolla ajan funktiona, niin tätä käytettiin lähtöhypoteesina tutkimuksessa. Tarkoitus siis oli sovittaa prosessilämpötiloille logaritmisella asteikolla lineaarinen regressiosuora ajan funktiona. Lisäksi päätettiin selvittää, päteekö sama hypoteesi vakio ajalla. Tätä varten tehtiin vakio ajassa tehdyistä kuumennuksista eri lämpötiloissa logaritmisoitu kuvaaja bakteriofagitiitteristä lämpötilan funktiona ja sovitetiin tähän regressiosuora. Mallien hyvyttä tarkasteltiin tilastollisin menetelmin.

5.2.1 Käytetyt bakteriofagit

Lämpökäsittelyissä käytetyt bakteriofaginäytteet olivat peräisin Lapinlahden T-101 käyttöhapatteesta, joka oli valmistettu 14.3.2011. Hapatteesta erotettiin hera sentrifugoimalla ja hera suodatettiin 0,45 µm suodattimella

5.2.2 Hera

Kuumennuksessa käytetty steriili hera oli erotettu lämpökäsitellystä (90°C 30 min) rasvattomasta maidosta. Ensin maito siirrostettiin piimä- tai kermahapatteella ja syntynyt saostuma suodatettiin suodatuspaperin läpi, jolloin hera erosi saostumasta. Talteenoton jälkeen hera steriloidtiin 15 min 115°C. Jos steriloidessa syntyi saostumaa, se erotettiin dekantoimalla ja kirkas hera steriloidtiin uudestaan.

5.2.3 Kasvualustat

M17-pohja-agar

- Kaseiinihydrolysaatti 2,5 g
- Lihahydrolysaatti 2,5 g
- Soijahydrolysaatti 5,0 g
- Hiivauute 2,5 g
- Lihauute 5,0 g
- β -Dinatrium-glyserofosfaatti (C₃H₇O₆PNa₂) 19,0 g
- Magnesiumsulfaatti (MgSO₂ x 7H₂O) 0,25 g
- Askorbiinihappo 0,5 g
- Agari 15,0 g
- Deionisoitu vesi 950 ml

M17-pinta-agar on koostumukseltaan samanlainen kuin pohja-agar, mutta agarin määrä on 6 g heikomman jähmettyvyyden saavuttamiseksi.

5.2.4 Kuumennuskäsittelyt

Käsittelyt toteutettiin vesihauteessa kuumentamalla steriiliä heraa lasisessa koeputkessa tavoitelämpötilaan ja lisäämällä bakteriofaginäyte kuumaan heraan pipetillä. Näytteen ja heran suhde putkessa oli 1/10 heran määrän ollessa 1350 μ l ja näytteen 150 μ l. Näin menetelmällä saatiin aikaan lähes välitön näytteen kuumeneminen.

Näytteen lisäämisen jälkeen odotettiin vielä viisi sekuntia, jonka jälkeen mitattiin varsinainen pitoaika. Tällä varmistettiin se, että näyte on tavoitelämpötilassa. Käsittelyajan täytyttyä näyte jäähdytettiin välittömästi jäävedellä. Jäähymisaika mitattiin ja näytteellä kesti noin 3-5 sekuntia, riippuen käsittelylämpötilasta, jäähtyä 45°C:een, joka ei enää vaikuta bakteriofagiin inaktiivisesti, koska se on lähellä isäntäbakteerin optimilämpötilaa.

Kaikista lämpötila/aikayhdistelmistä tehtiin kolme samanlaista käsittelyä, eli saatiin kolme rinnakkaista laimennossarjaa, joista valettiin maljat. Lisäksi jokaisen päivän käsittelyille määritettiin oma lähtötiitteri siltä varalta, että bakteriofagien aktiivisuus muuttuisi näytteessä varastoinnin aikana. Lähtötiitteri määritettiin myös kolmella rinnakkaisella laimennossarjalla.

Kuumennuksissa päätettiin käyttää prosessilämpötiloja eli heran- ja juustomaidon pastörintilämpötiloja (hera 63°C, maito 74°C), jotta saadaan selville niiden käsittelyjen vaikutus bakteriofagitiitteriin, ja sen lisäksi 15 sekunnin kuumennuksia korkeammassa lämpötiloissa. Korkeammat lämpötilat otettiin mukaan, koska bakteriofagien on huomattu selviävän pitkiäkin aikoja pastörintitason lämpötiloissa, joten haluttiin nähdä miten korkeat 15 sekunnin lämpökäsittelyt vaikuttavat. (Atamer, Ali, Neve, Heller, Hinrichs 2011)

5.2.5 Bakteriofagitiitterin määrittäminen plakkitestillä

Näytteen sekaan sekoitettiin koeputkessa 40 µl 1 M kalsiumkloridia, 200 µl isäntäbakteeria ja 3 ml LM-17 soft-agaria. Seosta sekoitettiin koeputkisekoittajalla, jonka jälkeen se kaadettiin pohja-agarin päälle ja maljaa kallistamalla levitettiin tasaiseksi. Maljoja inkuboitin yön yli 42°C, jonka jälkeen maljoilta laskettiin bakteriofagitiitteri plakkia muodostavana yksikkönä per millilitra näytettä.

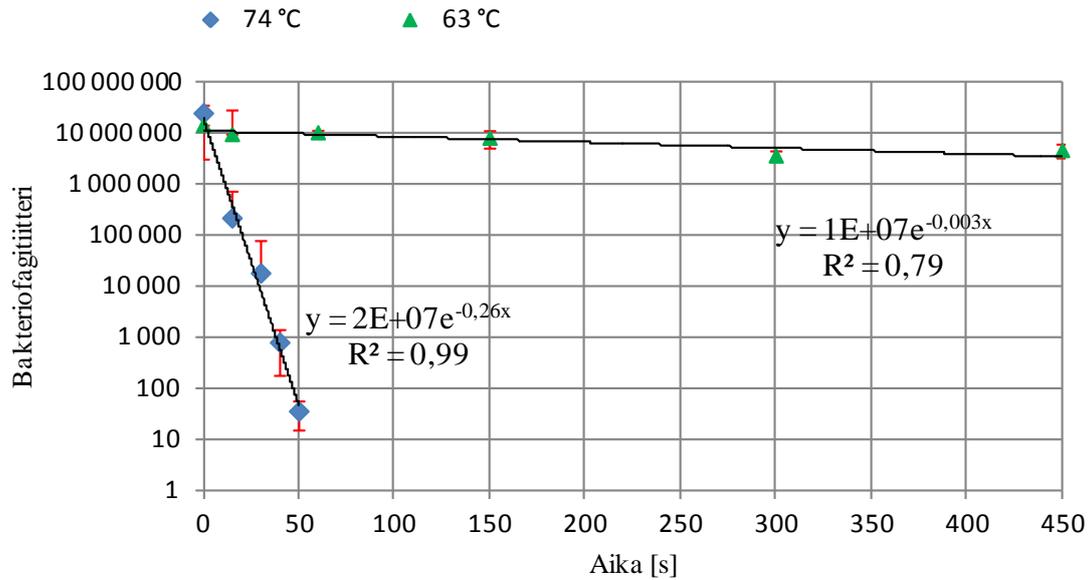
5.3 Lämpöherkkyystutkimuksen tulokset

Kustakin kolmesta laimennossarjasta saatiin oma bakteriofagitiitteri (pfu/ml) ja näistä laskettiin keskiarvo, joka on esitetty taulukossa 3, sarakkeessa ”bakteriofagitiitteri”.

Taulukko 3. Kuumennuskäsittelyjen tulokset. Lämpökäsittelymättömästä näytteestä on kaksi eri tulosta. Tämä johtuu siitä, että lämpökäsittelyä tehtiin eri päivinä ja tällöin näytteen aktiivisuus ehti muuttumaan hieman. Tiitterin alenema on lähtötiitterin ja lämpökäsittelyn jälkeisen tiitterin erotus. Tiitterin keskihajonta on saatu kolmesta rinnakkaisesta laimennossarjasta saaduista kolmesta eri tiitteristä.

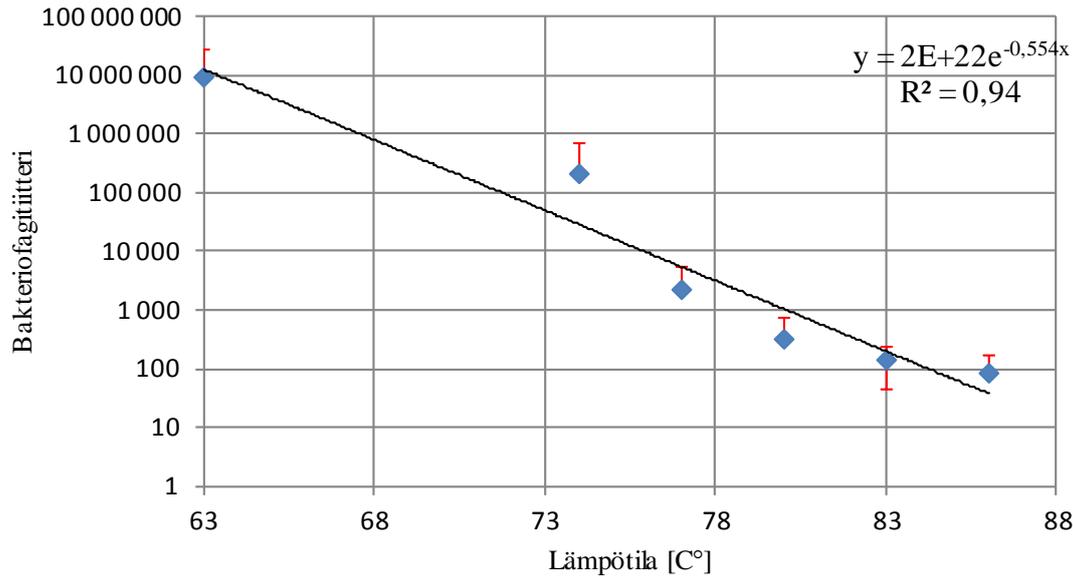
Käsittely	Bakteriofagi tiitteri	Tiitterin alenema	Tiitterin keskihajonta
Ei lämpökäsittelyä	24 233 333	0	10 250 004
74C/15s	210 000	24 023 333	491 905
74C/30s	17 333	24 216 000	57 664
74C/40s	750	24 232 583	582
74C/50s	33	24 233 300	19
74C/60s	0	24 233 333	0
Ei lämpökäsittelyä	14 277 778	0	11 276 195
63C/15s	9 333 333	4 944 444	18 384 081
63C/1min	10 083 333	4 194 444	956 991
63C/2,5min	7 900 000	6 377 778	2 967 743
63C/5min	3 533 333	10 744 444	812 916
63C/7,5min	4 533 333	9 744 444	1 370 778
77C/15s	2 217	14 275 561	3 239
80C/15s	317	14 277 461	419
83C/15s	140	14 277 638	95
86C/15s	83	14 277 694	85

Kuvioista 3 nähdään, että bakteriofagit kuolevat lineaarisesti logaritmisella asteikolla vakio ajassa, eli lähtöhypoteesi pitää paikkansa. Selitysaste (R^2) on 74 °C kuumennuksissa 99 % ja 63 °C kuumennuksissa 79 %.

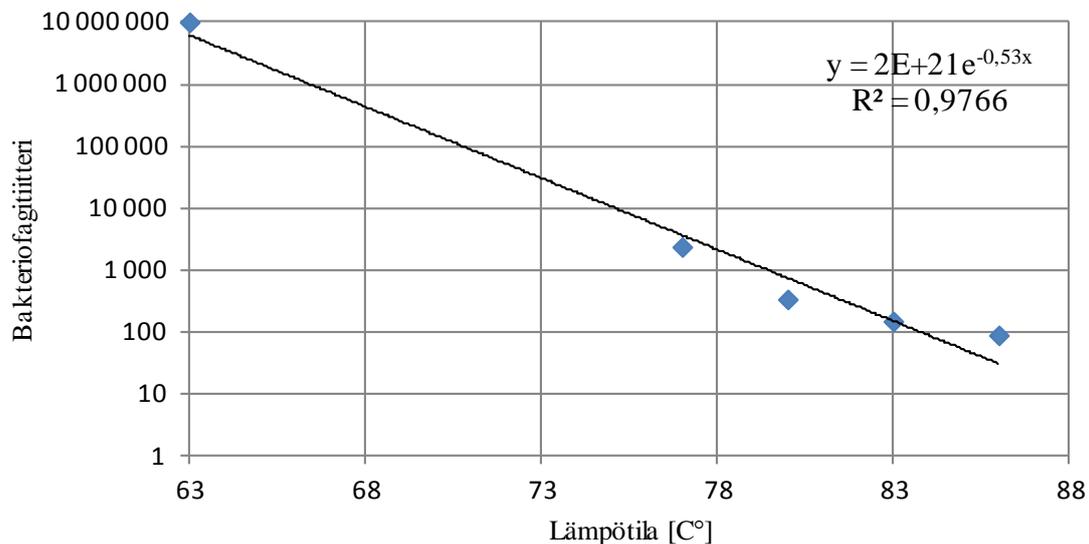


Kuvio 3. 74 °C ja 63 °C kuumennuksista tehdyt lineaariset regressiot logaritmisella asteikolla. Keskihajonta on laskettu kunkin datapisteen kolmesta rinnakkaisesta laimennossarjan tiitteristä.

Tarkoituksena oli testata, onko lämpötilamuutoksella vakio ajassa samanlainen vaikutus bakteriofagitiiteriin kuin ajan muutoksella vakio lämpötilassa. Kuvioista 4 nähdään, että bakteriofagitiiteri laskee lämpötilan funktiona lineaarisesti logaritmisella asteikolla 94 % selitysasteella. Kuvion 4 tuloksissa tulee ottaa huomioon 74°C datapiste. Tämä piste on tulos eri päivän kuumennuksesta, jossa lähtiitiiteri oli korkeampi. Kuvioista 4 nähdäänkin, että 74°C datapiste poikkeaa regressiosuorasta eniten, mikä huonontaa selitysastetta jonkin verran.



Kuvio 4. Vakio ajassa (15s) muuttuvassa lämpötilassa kuumennettujen bakteriofaginäytteiden tulokset ja niistä tehty lineaarinen regressio logaritmisella asteikolla. Keskihajonta on laskettu kunkin datapisteen kolmesta rinnakkaisesta laimennossarjan tiitteristä.

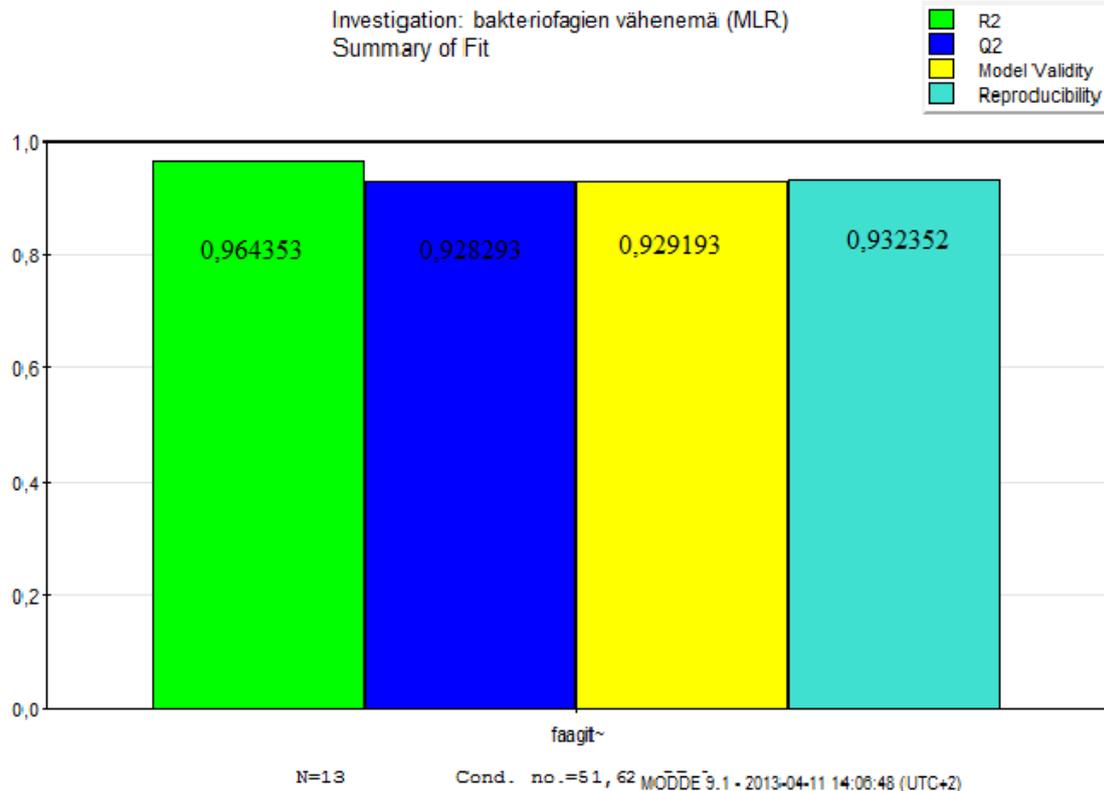


Kuvio 5. 15 sekunnin kuumennukset ilman 74°C/15s datapistettä.

Kuviossa 5 on esitetty sama asia ilman 74°C kuumennusta. Selitysaste parantui hieman 74°C datapisteen poistamisella (vrt. kuvio 4). Kuvioista huomataan, että sekä lämpökäsittelyn lämpötilan, että lämpökäsittelyajan muutoksella suurempaan, saadaan aikaan lineaarista bakteriofagitiiterin alenemaa logaritmisella y-akselilla. Näin ollen tehtiin myös lineaarinen monimuuttuja regressioanalyysi samalla aineistolla.

Malli tehtiin käyttämällä Modde 9.1 ohjelmaa. Analysoinnin tuloksissa tulee ottaa huomioon, että koesuunnittelua ei tehty Moddella eli

koesuunnitelman hyvyttä ei päästä tässä tarkastelemaan, ainoastaan itse mallia. Jotta mallista saadaan lineaarinen, on lämpökäsittelyistä saadut tulokset logaritmisoitu. Koska lämpökäsittelyjen vaikutuksessa bakteriofageihin kiinnostaa lähinnä käsittelyn aiheuttama logaritminen bakteriofagitiitterin alenema, mallin datapisteet otettiin vähentämällä käsittelyn seurauksena saatu tiitteri bakteriofaginäytteen lähtötiitteristä.



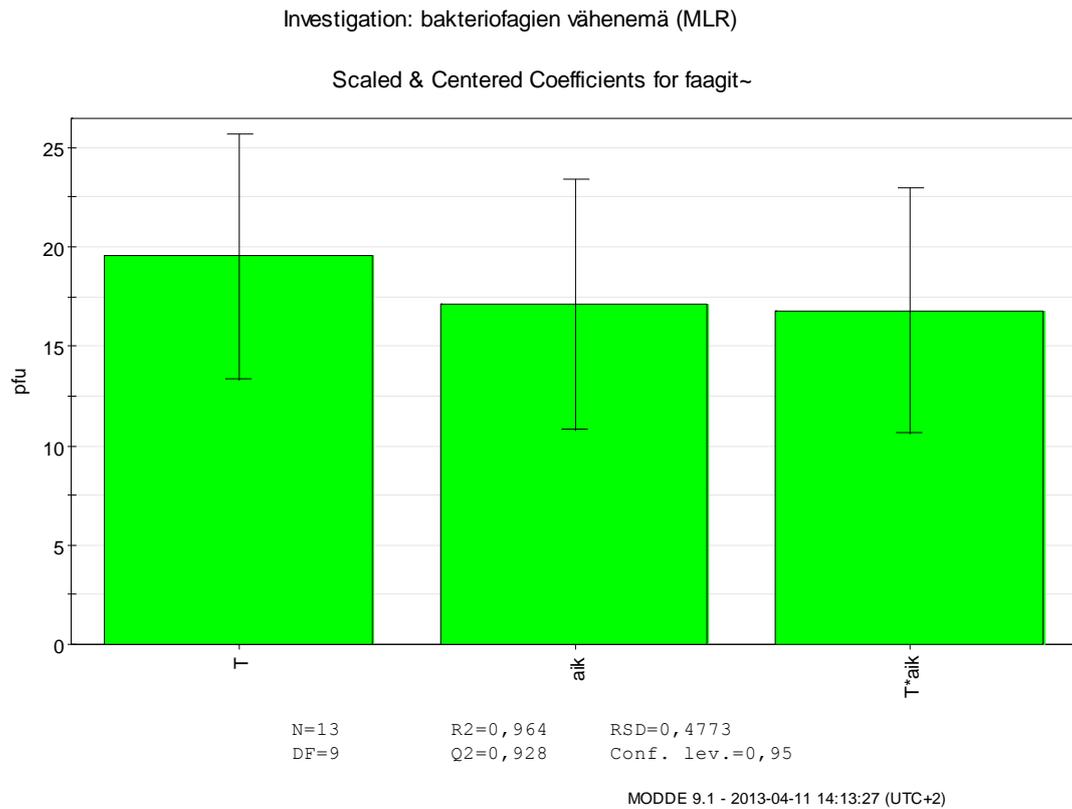
Kuvio 6. Mallin yhteenveto. Palkit kuvaavat vastaavan väristä tilastollista tunnuslukua.

Mallin selitysaste R^2 on 0,964 eli malli selittää noin 96,4 % aineiston kokonaisvaihtelusta. Selitysaste on erittäin hyvä.

Hyvän mallin Q^2 -arvon (ennustettavuus) tulisi olla yli 0,5. Tällä mallilla se ylittyy ollen noin 0,93.

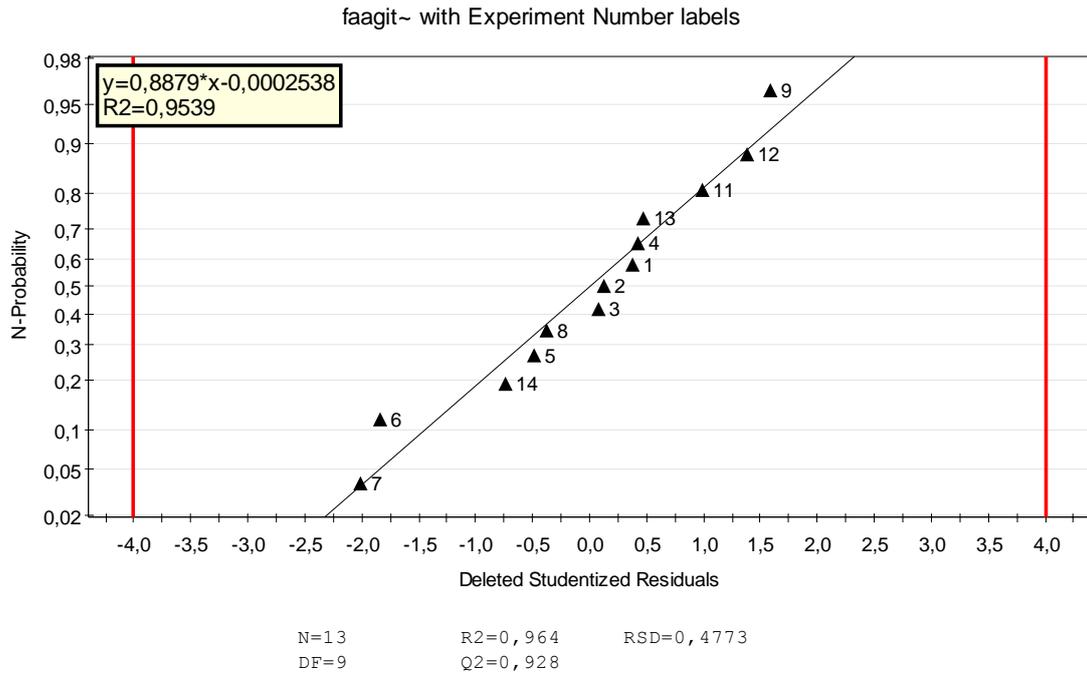
Modde laskee mallin oikeellisuutta ja kuvaa sitä model validity-arvolla, joka testaa useita erilaisia malleihin liittyviä ongelmia. Alle 0,25 arvo saattaa tarkoittaa ongelmia mallissa, kuten useiden arvojen poikkeavuuksia, vääränlaista mallia tai väärää muunnosta. Tässä mallissa arvo on noin 0,93

Mallin toistettavuutta Modde kuvaa reproducibility-arvolla, jonka hyvällä mallilla tulisi olla yli 0,5. Tällä mallilla arvo on n. 0,93.



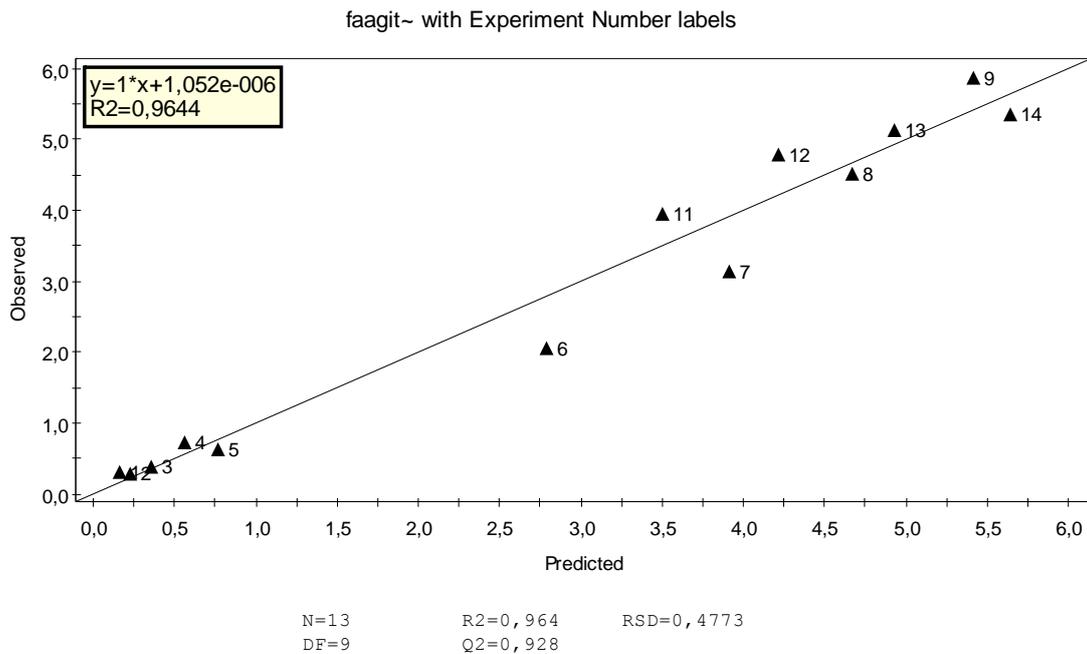
Kuvio 7. Keskitetyt muuttujat. Kuviossa esitetty termien vaikutusten voimakkuus vasteeseen.

Kaikki termit vaikuttavat vasteeseen, eli tiitterin vähenemään, positiivisesti. Suurin vaikutus on lämpötilalla. Analyysiin otettiin mukaan termi lämpötila*aika. Tämä tehtiin sen takia, että nähdään miten suuri yhteisvaikutus ajalla ja lämpötilalla on lopputulokseen.



Kuvio 8. Havaintosarjan normaalijakautuneisuus. Mikäli datapisteet ovat x-akselilla -4 ja 4 välillä sekä seuraavat regressiosuoraa on havaintosarja normaalisti jakautunut.

Havaintosarja on erittäin voimakkaasti normaalijakautunut, koska regressiosuoran selitysaste on 95% ja yksikään datapiste ei ole -4,4 välin ulkopuolella.



Kuvio 9. Kuvassa on verrattu varsinaisia datapisteitä mallin avulla ennustettuihin pisteisiin. Mitä lähempänä datapisteet ovat suoraa viivaa, sen lähempänä ne ovat toisiaan.

Kuvioon 9 tehdyn regressiosuoran selitysaste on 96,4 %, joten sovitettava malli vastaa erittäin hyvin havaintopisteitä.

Taulukko 4. Monimuuttuja regressioanalyysistä saadun yhtälön kertoimet

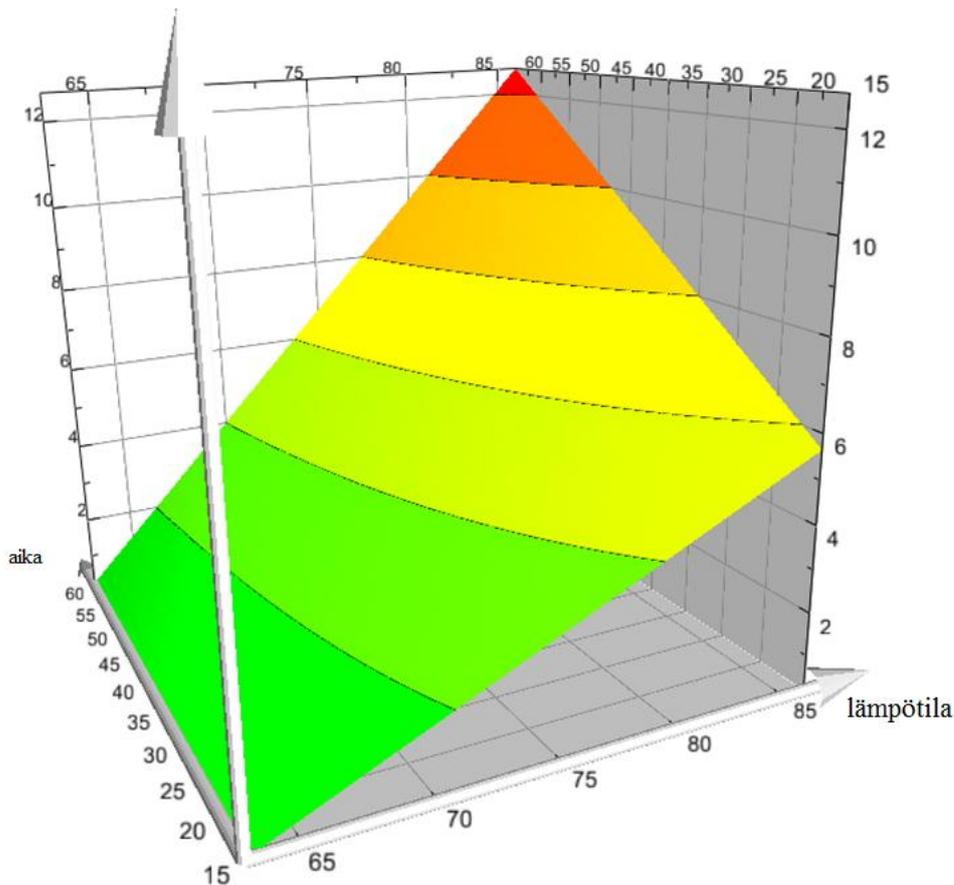
Termi	Kerroin
Constant	-8,53399
T	0,137746
t	-0,421419
T*t	0,00671102

Kertoimista saatiin seuraava yhtälö:

$$\text{pfu alenema} = 0,137746T - 0,421419t + 0,00671102Tt - 8,53399$$

Sijoittamalla tähän yhtälöön lämpötila T celsius asteina ja aika t sekunteina, saadaan mallin ennustama bakteriofagitiitterin alenema kymmenkantaisena logaritmina. Jos esimerkiksi sijoitetaan lämpötilaksi T=74 ja ajaksi t=15, saadaan 74 °C / 15 s lämpökäsittelyn aiheuttamaksi bakteriofagitiitterin logaritmiseksi alenemaksi noin 2,79 lg.

tiitterin vähenemä



Kuvio 10. Mallista saadun yhtälön muodostama pinta välillä 15 – 60 s ja 63 – 86 °C.

5.4 Lämpöherkkyystutkimuksen tulosten tarkastelu

Malli ennustaa lämpökäsittelyn aiheuttamaa bakteriofagitiitterin laskua välillä 15 – 450 s ja 63 – 86 °C. Tilastollisten tunnuslukujen pohjalta malli vaikuttaa luotettavalta tavalla arvioida eri lämpökäsittelyjen tehoa bakteriofagien inaktivoimiseksi. Mallin heikkoutena voidaan kuitenkin pitää sitä, että korkeissa lämpötiloissa ei tehty pitkiä, minutteja kestäviä, lämpökäsittelyjä koska tiitterit olisivat olleet teoreettisesti alle nollan. Tästä syystä mallin ennustamia pitkiä lämpökäsittelyjä korkeissa lämpötiloissa ei pystytä vertaamaan olemassa oleviin datapisteisiin.

Taulukko 5. Mallin avulla lasketut prosessilämpötilojen vaikutukset bakteriofagitiitteriin. Vertailun vuoksi mukana korkeamman lämpötilan ja pidemmän ajan lämpökäsittelyjä.

T[°C]	t[s]	Tiitterin alenema lg
63	15	0,17
74	15	2,79
86	15	5,65
74	45	5,04
86	37	9,07
80	180	23,27

Mallin perusteella heran pastörointiin käytettävä 63 °C/15 s lämpökäsittely alentaa bakteriofagitiitteriä ainoastaan 0,17 lg. Koska bakteriofagitiitteri on korkeimmillaan nimenomaan herassa voidaan todeta, että heran pastöroinnilla ei ole suurta merkitystä bakteriofagitiitteriin. Tällä ei ole juuston valmistusprosessin kannalta kuitenkaan merkitystä, koska hera pumpataan pastöroinnin jälkeen suoraan levylämmönvaihtimelta jauhetehtaalle käsiteltäväksi, eikä se pääse kosketuksiin maidon tai juustolan ilman kanssa. Mikäli herasta valmistettua jauhetta käytetään raaka-aineeksi hapatusprosessilla valmistettaviin tuotteisiin, on bakteriofagitiitterillä merkitystä jos bakteriofagit selviävät jauheen valmistusprosessin korkeat lämpötilat virulenteina. Jauheen valmistuksessa käytetään ennen haihdutusta 80 – 85 °C/3 min lämpökäsittelyä (Ylitalo, haastattelu 9.5. 2013). Mallin mukaan tämä lämpökäsittely alentaa bakteriofagitiitteriä 23,27 lg. (Taulukko 5.) Atamer ym. (2010) suosittelivat 9 lg faagitiitterin alenemaa, mikäli halutaan varmistaa, että tuotteeseen ei jää lämpökäsittelyn jälkeen bakteriofageja. Mallin perusteella vaikuttaa, että *S. thermophilus* bakteriofagit inaktivoituvat herajauheiden valmistusprosessissa.

9 lg tiitterin alenemaa olisi hankala saada aikaan heran pastöroinnilla, koska heraproteiinit denaturoituvat herkästi lämpötilan vaikutuksesta. Heran lämpökäsittely saisi olla maksimissaan 72 °C/15 s suuruusluokkaa. Jos käytetään tätä korkeampia lämpötiloja heraproteiinit saostuvat ja voivat aiheuttaa ongelmia muun muassa ioninvaihtoprosessissa. (Hoppe, Higgins 1992.)

Raakamaidon lämpökäsittely (74°C/15s) alentaa mallin mukaan bakteriofagitiitteriä 2,79 lg. Kun tätä verrataan Bruttin ym. 1997

tutkimukseen, jossa havaittiin raakamaidossa *S.thermophilus* bakteriofageja 10^2 pfu/ml, voitaisiin olettaa, että 74 °C/15s lämpökäsittely on riittävä. Kuitenkin kuviossa 1 (s.11) nähdään, että näytteenottopäivänä A siilomaidoissa ja etenkin esiherassa oli havaittava määrä pH-eroa. Tällöin siilomaidossa on saattanut olla bakteriofageja. Jotta mallia voidaan käyttää jatkossa hyväksi pitäisi Lapinlahden tehtaalle vastaanotetusta maidosta tutkia bakteriofagitiitteri, jolloin mallin perusteella voidaan sanoa onko lämpökäsittely riittävä. Tietenkään lämpökäsittelyjen tehoa ei voi loputtomiin nostaa pelkästään bakteriofageja silmälläpitäen mm. heraproteiinien denaturoitumisen vuoksi.

5.5 Johtopäätökset lämpöherkkyystutkimuksesta

Tavoitteena lämpöherkkyystutkimuksessa oli saada selville emmentalin valmistusprosessissa käytettyjen lämpötilojen vaikutus *S. thermophilus* bakteriofageihin, ja selvittää millaiset käsittelyt ovat riittäviä inaktivoimaan niitä. Tämä onnistuu tutkimuksen pohjalta tehdyllä monimuuttujamallilla. Mallilla voidaan ennustaa eri lämpökäsittelyjen vaikutusta bakteriofagitiitteriin. Mallin avulla saatiin selville, että heran pastöintiin käytettävä lämpökäsittely (63°C/15s) ei ole riittävä. Juustomaidon pastöintiin käytettävä 74° C/15 s tehosta voidaan mallin pohjalta tehdä johtopäätökset raakamaidon bakteriofagitiitterin tutkimisen jälkeen. Mallia käytettäessä tulee muistaa, että kokeet tehtiin laboratoriomittakaavassa ja näin ollen mallia ei voi soveltaa varauksetta suoraan tuotantoon, vaan sitä tulee käyttää suuntaa antavana.

LÄHTEET

- Atamer Z., Hinrichs J. 2010 Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. *Garbenstr: International Dairy Journal*. 20 (3) 163 – 168.
- Atamer Z., Ali Y., Neve H., Heller K.J., Hinrichs J. 2011. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*. 21(5) 327-334
- Bruttin A., Desiere F., d'Amico N., Guérin J.P., Sidoti J., Huni B., Lucchini S. and Brüssow H. 1997. Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (8) 3144 – 3150.
- Capra M.L., Neve H., Sorati P.C., Atamer Z., Hinrichs J., Heller K.J., Quiberoni A. 2013. Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: Updating traditional phage detection methodologies. *International Dairy Journal*. 30(2) 59-63.
- Capra M.L., Quiberoni A., Reinheimer J.A. 2004. Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Letters in Applied Microbiology*. 38 (6) 499 – 504.
- Cruz Martín M., del Rio B., Martínez N., Magadán A.H., Alvarez M.A. 2008. Fastreal-time polymerase chain reaction for quantitative detection of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages in milk. *Food Microbiology*. 25 (8) 978 – 982.
- Duplesis M., Moineau S. 2001. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Molecular Microbiology* 41 (2) 325-336.
- Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. 2000 *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers Inc.
- Hoppe, G. K., Higgins J.J. 1992. Demineralization. *Teoksessa Zadom, J.G. Whey and Lactose Processing*. Essex: Elsevier Science Publishers Ltd, 77, 102
- Kammerlehner J. 2009 *Cheese technology*. Freising: Josef Kammerlehner.
- Kropinski M., Prangishvili D., Lavigne R. 2009. The creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea. *Environmental Microbiology* 11 (11) 2775-2777.
- Loguercio M., Halfhide B., Janzen T., Elsborg K. Suomentanut Vihma R. 2000 *Bakteriofagi – Meijeriteollisuuden piilevä ongelma*. Chr Hansen.

Ly-Chatain M.H., Durand L., Rigobello V., Vera A., De marigny Y. 2011. Direct Quantitative Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages from Milk and Whey by Real-Time PCR: Application for the Detection of Lactococcal Bacteriophages in Goat's Raw Milk Whey in France. *International Journal of Microbiology*. Viitattu 15.4. 2013. <http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2011/594369/>

Madera C., Monjardín C., Suárez J. 2004 Milk Contamination and Resistance to Processing Conditions Determine the Fate of *Lactococcus lactis* Bacteriophages in Dairies. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (12) 7365 – 7371.

Maloy S.R., Cronan J.E., Freifelder D.M. *Microbial Genetics*. 1994. London: Jones & Bartlett Publishers International.

Marcó M.B., Moineau S., Quiberoni A. 2012 Bacteriophages and dairy fermentations. *Landes Bioscience*. 2 (3) 149 – 158.

Mercantia D.J., Carminatib D., Reinheimer J. A., Quiberonia A. 2011. Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *International Journal of Food Microbiology*. 144 (3) 503 – 510.

Mutanen L. 2011. Bakteriofagien merkitys Viola® salaattijuuston happanemisessa. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö.

Piveteau P.G., Condon S., Cogan T.M. 2002. Interactions between lactic and propionic acid bacteria. *Le Lait* 82 (1) 33-44

Quiberoni A., Moineau S., Rousseau G.M., Reinheimer J., Ackermann H-W. 2010 *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal*. 20 (10) 657-664.

Soykut E.A., Tunail N. 2010 Morphological characterization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* virulent phages. *GIDA* 35 (5) 317-323.

Suárez V.B., Quiberoni A., Binetti A.G., Reinheimer J.A. 2002. Thermophilic Lactic Acid Bacteria Phages Isolated from Argentinian Dairy Industries. *Journal of Food Protection* 65 (10) 1597-1604

Verreault D, Gendron L, Rousseau G, Veillette M, Masse D, Lindsley W, Moineau S, Duchaine C. 2011 Detection of Airborne Lactococcal Bacteriophages in Cheese Manufacturing Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2) 491 – 497.

Ylitalo A. 2013. Prosessiasiantuntija. Valio Oy. Haastattelu. 9.5.2013.

Liite 1. Estokokeiden tulokset näytteenottopäivänä A

NÄYTTEENOTTOPÄIVÄ A

Kohde	Keitto nro	Kattila	Klo	A-putki	Oa	Ob	-2a	-2b	0 k.a.	-2 k.a.	Erotus B-0-A	Erotus B-2-A
Laskuhera	1	28	9:00	5,36	5,56	5,52	5,41	5,44	5,54	5,43	0,18	0,07
Laskuhera	4	24	10:30	5,33	5,66	5,66	5,43	5,5	5,66	5,47	0,33	0,14
Laskuhera	7	27	12:00	5,32	6,1	6,11	5,35	5,37	6,11	5,36	0,79	0,04
Laskuhera	8	28	12:30	5,26	6,1	6,06	5,55	5,49	6,08	5,52	0,82	0,26
Laskuhera	11	24	14:00	5,26	6,16	6,16	5,92	5,92	6,16	5,92	0,90	0,66
Laskuhera	14	27	15:30	5,26	6,15	6,15	5,85	5,83	6,15	5,84	0,89	0,58
Laskuhera	15	28	16:00	5,27	6,25	6,21	5,92	5,95	6,23	5,94	0,96	0,67
Laskuhera	18	24	17:30	5,18	6,09	6,1	5,73	5,75	6,10	5,74	0,92	0,56
Laskuhera	19	25	21:00	5,18	5,53	5,54	5,51	5,51	5,54	5,51	0,36	0,33
Laskuhera	22	28	22:30	5,21	5,6	5,62	5,52	5,5	5,61	5,51	0,40	0,30
Laskuhera	25	24	00:00	5,21	5,88	5,9	5,54	5,54	5,89	5,54	0,68	0,33
Laskuhera	26	25	00:30	5,21	6	5,98	5,49	5,49	5,99	5,49	0,78	0,28
Laskuhera	29	28	02:00	5,18	6,05	6,05	5,6	5,71	6,05	5,66	0,87	0,48
Laskuhera	32	24	03:30	5,26	6,24	6,23	5,99	5,98	6,24	5,99	0,98	0,73
Laskuhera	33	25	04:00	5,26	6,23	6,23	5,98	5,96	6,23	5,97	0,97	0,71
Laskuhera	36	28	05:30	5,46	6,21	6,18	5,89	5,91	6,20	5,90	0,74	0,44
Esihera	1	28	7:15	5,36	5,47	5,47	5,43	5,44	5,47	5,44	0,11	0,08
Esihera	8	28	10:45	5,3	5,46	5,45	5,49	5,46	5,46	5,48	0,16	0,18
Esihera	15	28	14:15	5,27	5,47	5,41	5,38	5,36	5,44	5,37	0,17	0,10
Esihera	22	28	20:45	5,2	5,54	5,49	5,48	5,48	5,52	5,48	0,32	0,28
Esihera	29	28	00:15	5,2	5,53	5,51	5,44	5,45	5,52	5,45	0,32	0,25
Esihera	36	28	03:45	5,46	5,52	5,53	5,47	5,46	5,53	5,47	0,07	0,00

Liite 2. Estokokeiden tulokset näytteenottopäivänä C

NÄYTTEENTOTTOPÄIVÄ B

Kohde	Keitto nro	Kattila	Klo	A-putki	0a	0b	-2a	-2b	0 k.a.	-2 k.a.	Erotus B-0-A	Erotus B-2-A
Laskuhera	1	28	9:00	5,42	5,59	5,65	5,47	5,46	5,54	5,47	0,12	0,04
Laskuhera	4	24	10:30	5,42	5,87	5,88	5,45	5,43	5,66	5,44	0,24	0,02
Laskuhera	7	27	12:00	5,42	5,87	5,87	5,45	5,45	5,66	5,45	0,24	0,03
Laskuhera	8	28	12:30	5,42	6,01	6,06	5,61	5,55	5,81	5,58	0,39	0,16
Laskuhera	11	24	14:00	5,42	6,11	6,16	5,91	5,87	6,01	5,89	0,59	0,47
Laskuhera	14	27	15:30	5,49	6,12	6,14	5,92	5,81	6,00	5,87	0,51	0,38
Laskuhera	15	28	16:00	5,5	6,17	6,17	5,95	5,73	6,01	5,84	0,51	0,34
Laskuhera	18	24	17:30	5,46	6,22	6,19	5,92	5,97	6,08	5,95	0,61	0,49
Laskuhera	19	25	21:00	5,46	5,54	5,49	5,46	5,46	5,49	5,46	0,03	0,00
Laskuhera	22	28	22:30	5,45	5,68	5,74	5,49	5,43	5,59	5,46	0,14	0,01
Laskuhera	25	24	00:00	5,46	6,06	6,04	5,55	5,52	5,79	5,54	0,33	0,08
Laskuhera	26	25	00:30	5,46	6,11	6,1	5,65	5,76	5,91	5,71	0,44	0,25
Laskuhera	29	28	02:00	5,45	6,23	6,22	5,93	5,95	6,08	5,94	0,63	0,49
Laskuhera	32	24	03:30	5,48	6,24	6,22	5,98	5,94	6,10	5,96	0,62	0,48
Laskuhera	33	25	04:00	5,47	6,24	6,2	5,98	5,95	6,09	5,97	0,62	0,50
Laskuhera	36	28	05:30	5,42	6,19	6,03	5,83	5,72	5,94	5,78	0,52	0,36
Esihera	1	28	7:15	5,42	5,36	5,45	5,44	5,46	5,43	5,45	0,01	0,03
Esihera	8	28	10:45	5,42	5,46	5,44	5,43	5,4	5,43	5,42	0,01	0,00
Esihera	15	28	14:15	5,49	5,45	5,47	5,43	5,49	5,46	5,46	-0,03	-0,03
Esihera	22	28	20:45	5,45	5,54	5,44	5,41	5,44	5,46	5,43	0,01	-0,02
Esihera	29	28	00:15	5,45	5,46	5,46	5,42	5,44	5,45	5,43	0,00	-0,02
Esihera	36	28	03:45	5,43	5,67	5,71	5,46	5,43	5,57	5,45	0,14	0,02

Liite 3. Estokokeiden tulokset näytteenottopäivänä C

NÄYTTEENOTTOPÄIVÄ C

Kohde	Keitto nro	Kattila	Klo	A-putki	Oa	Ob	-2a	-2b	0 k.a.	-2 k.a.	Erotus B-0-A	Erotus B-2-A
Laskuhera	1	28	9:00	5,4	5,69	5,63	5,46	5,46	5,56	5,46	0,16	0,06
Laskuhera	4	24	10:30	5,4	5,84	5,81	5,42	5,43	5,63	5,43	0,23	0,02
Laskuhera	7	27	12:00	5,45	5,09	6,04	5,51	5,5	5,54	5,51	0,09	0,05
Laskuhera	8	28	12:30	5,44	6,16	6,12	5,76	5,72	5,94	5,74	0,50	0,30
Laskuhera	11	24	14:00	5,5	6,24	6,21	6	5,99	6,11	6,00	0,61	0,50
Laskuhera	14	27	15:30	5,37	6,23	6,24	5,86	5,81	6,04	5,84	0,67	0,47
Laskuhera	15	28	16:00	5,37	6,26	6,25	6,05	6,03	6,15	6,04	0,78	0,67
Laskuhera	18	24	17:30	5,44	6,21	6,19	5,94	5,91	6,06	5,93	0,62	0,49
Laskuhera	19	25	21:00	5,43	5,45	5,44	5,42	5,46	5,44	5,44	0,01	0,01
Laskuhera	22	28	22:30	5,44	5,7	5,64	5,42	5,41	5,54	5,42	0,10	-0,03
Laskuhera	25	24	00:00	5,46	5,99	5,92	5,42	5,46	5,70	5,44	0,24	-0,02
Laskuhera	26	25	00:30	5,45	6,1	6,04	5,45	5,48	5,77	5,47	0,32	0,01
Laskuhera	29	28	02:00	5,47	6,22	6,19	5,92	5,83	6,04	5,88	0,57	0,41
Laskuhera	32	24	03:30	5,46	6,27	6,26	6,05	5,98	6,14	6,02	0,68	0,56
Laskuhera	33	25	04:00	5,46	6,27	6,26	6,08	6,02	6,16	6,05	0,70	0,59
Laskuhera	36	28	05:30	5,5	6,24	6,22	5,99	5,92	6,09	5,96	0,59	0,46
Esihera	1	28	7:15	5,4			5,41	5,4	5,41	5,41	0,00	0,00
Esihera	8	28	10:45	5,44			5,38	5,38	5,41	5,38	-0,03	-0,06
Esihera	15	28	14:15	5,4			5,37	5,39	5,50	5,38	0,10	-0,02
Esihera	22	28	20:45	5,43			5,41	5,44	5,42	5,43	-0,01	0,00
Esihera	29	28	00:15	5,47			5,39	5,41	5,44	5,40	-0,03	-0,07
Esihera	36	28	03:45	5,42			5,44	5,46	5,63	5,45	0,21	0,03

Liite 4. Estokokeiden tulokset siilomaitonäytteistä

Näytteenottopäivä A

1. kattila	Siilo nro	klo	A-putki	0 a	0 b	-2 a	-2 b	0 k.a.	-2 k.a.	erotus B- 0-A	Erotus B- 2-A
1	S2	8.15	5,4	5,46	5,47	5,47	5,48	5,47	5,48	0,06	0,07
8	S60	9.00	5,39	5,44	5,46	5,42	5,44	5,45	5,43	0,06	0,04
13	S1	12.50	5,39	5,43	5,41	5,4	5,4	5,42	5,40	0,03	0,01
21	S2	22.30	5,4	5,45	5,46	5,46		5,46	5,46	0,05	0,06
31	S60	2.10	5,43	5,47	5,46	5,45	5,45	5,47	5,45	0,04	0,02

Näytteenottopäivä B

1. kattila	Siilo nro	klo	A-putki	0 a	0 b	-2 a	-2 b	0 k.a.	-2 k.a.	erotus B- 0-A	Erotus B- 2-A
1	S1	11:50	5,45	5,47	5,45	5,43	5,48	5,46	5,46	0,01	0,00
14	S60	13:50	5,44	5,48	5,45	5,47	5,46	5,47	5,47	0,02	0,02
23	S2	22:35	5,48	5,47	5,44	5,42	5,46	5,45	5,44	-0,03	-0,04
31	S1	00:45	5,46	5,47	5,42	5,38	5,41	5,42	5,40	-0,04	-0,07

Näytteenottopäivä C

1. kattila	Siilo nro	klo	A-putki	0 a	0 b	-2 a	-2 b	0 k.a.	-2 k.a.	erotus B- 0-A	Erotus B- 2-A
1	S60	9:15	5,48	5,46	5,43	5,45	5,47	5,45	5,46	-0,03	-0,02
14	S1	19:30	5,48	5,44	5,46	5,45	5,46	5,45	5,46	-0,03	-0,03
23	S60	23:45	5,49	5,43	5,43	5,46	5,42	5,44	5,44	-0,05	-0,05