



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Jukka Järvi

Fermentoidun härkäpapuelintarvikkeen pakkaaminen ja säilyvyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

19.4.2021

Tekijä Otsikko	Jukka Järvi Fermentoidun härkäpapuelintarvikkeen pakkaaminen ja säilyvyys
Sivumäärä Aika	27 sivua + 9 liitettä 19.4.2021
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Lehtori Carola Fortelius-Sarén Myyntijohtaja, elintarvikealan asiantuntija Markku Lilja
<p>Insinööriyön tavoitteena oli selvitys fermentoidulle härkäpavulle parhaasta pakkausmenetelmästä säilyvyyden näkökulmasta. Työssä tutkittiin eri vaihtoehtojen soveltuvuutta teoriapohjalta ja valittiin soveltuvimmat ja toteutuskelpoisimmat vaihtoehdot mikrobiologisiin tutkimuksiin. Tehtyyn valintaan vaikuttivat rajaaminen toteutettavissa oleviin vaihtoehtoihin, sillä yritys on vahvassa kasvussa ja sen takia kehityskohteen monipuolisella hyödyntämisellä usealle eri tuotteelle on toiminnallinen arvo. Toisin sanoen lämpökäsittelyä voidaan hyödyntää kaikille yrityksen tuotteille, mutta muut mahdolliset säilyvyyttä parantavat menetelmät edellyttäisivät investointia kahteen laitteistoon.</p> <p>Säilyvyyttä kehitettäessä tulee huomioida eri menetelmien luoma estevaikutus, jolloin usean eri tekijän avulla saavutetaan paras lopputulos. Tähän mikrobien elinolojen tukalaksi tekemiseen kuuluvat pH:n säätö, vapaan veden (a_w) huomioiminen ja säätö mahdollisuuksien rajoissa, hapetus–pelkistys-potentiaalin huomioiminen ja soveltuvien lisäaineiden käyttö. Kuluttajien toiveista johtuen lisäaineiden käyttöä pyritään välttämään.</p> <p>Mikrobiologiset mittaukset tukivat hypoteesia lämpökäsittelyllä tuotteelle saavutettavasta säilyvyyden parantumisesta. Aistinvaraisissa arvioissa pitäydyttiin mittauksen yhteydessä tehtäviin haju-, maku- ja näkö havaintoihin, koska näillä katsottiin saavutettavan tuotteiden luonteesta johtuvat riittävät tulokset. Aistinvarainen arviointi oli ainoastaan lisänä. Kuten ruokaviraston ohjeistuksessa todetaan, aistinvaraisesti moitteettomaksi arvioitu tuote voi olla elintarvikkeeksi kelpaamaton.</p> <p>Tulokset vahvistivat lämpökäsittelyn merkityksen säilyvyyden näkökulmasta. Tuloksia voidaan hyödyntää myös matalammille lämpökäsittelyille hyödyntämällä esitettyjä kaavoja tai hakemalla lämpötila-aikayhdistelmät tuotteelle soveltuvasta taulukosta. Tällöin tulee huomioida itiöllisten mikrobien säilyminen ja siten mahdollisesti lyhyempi säilyvyysaika.</p> <p>Tutkitun perusteella lämpökäsittelty vakuumpakkaus on kokonaisuuden kannalta paras pakkausmenetelmä yrityksen valmistamille tuotteille.</p>	
Avainsanat	mikrobiologia, pakkaaminen, autoklavointi, säilyvyys

Author Title	Jukka Järvi Packaging and Shelf Life of Fermented Fava Bean Foodstuff
Number of Pages Date	27 pages + 9 appendices 19 April 2021
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemistry
Professional Major	Food Technology
Instructors	Carola Fortelius-Sarén, Senior Lecturer Markku Lilja, Sales Director, Food Industry Connoisseur
<p>The scope of this bachelor's thesis was to find and evaluate the optimal packaging method for the food products the company produces. On a theoretical basis, the methods were screened to select the most suitable and feasible methods for microbiological tests. There are many possible methods for food packaging with long shelf life but when the efficiency of package sizes and cost structure are considered as needed in commercial business, vacuum packaging is a fast and versatile option. In combination with heat treatment in autoclave, the result is user friendly and has a shelf life long enough to meet the requirements of modern food industry.</p> <p>It is important to accept that the result of a long shelf life is a combination of hurdles that will prevent the microbes from spoiling or altering the composition of a packed product. These hurdles include the adjustment of pH, the measurement and adjustment of active water, the reduction oxidation potential, the amount of oxygen available and the ambient temperature. When all these are considered through the supply chain there are good possibilities to enjoy the taste of food also on the best before date.</p> <p>The microbiological measurements supported the hypothesis of the heat treatment as a functional and efficient method to extend the shelf life of the food product.</p> <p>The results show that the heat treated vacuum package is the best packaging method for the products the company is producing. The high pressure processing and lyophilization are interesting ways to prolong shelf life and those should be considered as serious additional ways when the production capacity has been expanded. Specially lyophilization could benefit both shelf life and sales possibilities abroad.</p>	
Keywords	microbiology, packaging, autoclave, shelflife

Sisällys

Lyhenteet ja käsitteet

1	Johdanto	1
2	Pakkauksen funktio	2
2.1	Tuotteen pakkaaminen	2
2.2	Pakatun tuotteen säilymiseen vaikuttavat tekijät	3
2.3	Pakatun tuotteen säilyvyyden parantaminen	5
3	Elintarvikkeiden pilaajamikrobit	7
3.1	Pilaantumisen tunnistaminen	7
3.2	Mikrobien kasvuun vaikuttavat tekijät	8
3.3	Elintarvikkeiden prosessoinnin ja pakkaamisen vaikutus säilyvyyteen	10
3.4	Fermentointi	16
3.5	Mittaaminen ja raja-arvot	16
4	Soveltuvat pakkausmenetelmät	17
5	Materiaalit ja menetelmät	19
5.1	Koesuunnitelma	19
5.2	Näytteenotto	19
5.3	Näytteiden mikrobiologinen analysointi	19
5.3.1	Näytteen lämpökäsittely	20
5.3.2	Näytteiden laimennus	20
5.3.3	Hiiva/home määritykset Petrifilmi-viljelyllä	20
5.3.4	Kokeellinen osuus	20
5.3.5	Viljelyolosuhteet	23
5.3.6	Tulosten lukeminen	23
6	Tulokset	24
7	Tulosten tarkastelu	26
8	Yhteenveto ja johtopäätökset	26

Liitteet

Liite 1. Kammiopakkaus koneen toimintaperiaate

Liite 2. Laboratoriotyöskentelysuunnitelma

Liite 3 Ruokavirasto toimintaohje 703/1, tulosten laskeminen

Liite 4. Laboratoriopöytäkirja, aloitus

Liite 5. Laboratoriopöytäkirja, näytteet 14 päivää

Liite 6. Laboratoriopöytäkirja, näytteet 32 päivää

Liite 7. Ruokavirasto toimintaohje 728/1, näytteiden käsittely

Liite 8 3M Petrifilmi-ohje kokonaisbakteerien laskemiseksi

Liite 9 3M Petrifilmi-ohje hiivojen ja homeiden laskemiseksi

Lyhenteet ja käsitteet

a_w	Active water, veden aktiivisuus
D-arvo	Decimal reduction time, kuvaa mikrobin lämmönkestoa
Eh	Hapetus-pelkistyspotentiaali
ESL	Extended Self Life eli pidennetty säilyvyys
F-arvo	Sterilointiarvo, aika joka tarvitaan tietyssä lämpötilassa
Kontaktimateriaali	Materiaalit ja tarvikkeet jotka ovat kosketuksissa suoraan tai välillisesti elintarvikkeen kanssa
MAP	Modified Air Packaging, suojakaasupakkaaminen
Mesofiili	Mikrobit jotka kasvavat parhaiten 20–40 °C:n lämmössä.
pH	Kuvaa happamuutta, $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}_3\text{O}^+]$, riippuu lämpötilasta
PMY	Pesäkettä muodostavaa yksikköä, CFU englanniksi
Psykrotrofi	Mikrobit jotka kasvavat hyvin jääkaappilämpötilassa.
REFPED	Refrigerated Processed Foods of extended durability, pastöroitu tyhjiö- tai suojakaasupakkaukseen pakattu valmisruoka.
Z-arvo	Bakteeripopulaation Log1 tuhoamiseen tarvittava lämpötilamuutos

1 Johdanto

Työn tavoitteena oli selvittää paras pakkausmenetelmä yrityksen valmistamille elintarvikkeille. Pakkaamisen laadun kriteeriksi valittiin tuotteen mikrobiologisen ja aistinvaraisen laadun säilyminen hyvänä. Säilyvyys todennettiin pakatuista näytteistä tehtyjen mikrobiologisten testien avulla ja aistinvarainen arvio tehtiin mikrobiologisten näytteiden oton yhteydessä arvioimalla tuotteen makua, hajua ja koostumusta.

Yritys valmistaa härkäpavusta fermentoimalla elintarvikekomponentteja elintarviketeollisuuden, julkisen ruokahuollon ja ravintoloiden tarpeisiin. Tuotteet ovat maukkaita, eettisesti kestävän kehityksen mukaisia, gluteenittomia, laktoosittomia ja raaka-aineen pienen hiilijalanjäljen ansiosta ilmaston näkökulmasta positiivisia. [1.]

Tuotannon kasvaessa syntyi tarve sopivan teollisen pakkaamisen menetelmän selvittämiseksi, jotta asiakkaiden toive vähintään 30 päivän säilyvyydestä ja tuotannon joustavasta toiminnasta saataisiin kohtaamaan.

Tutkimuksessa keskityttiin kahden eri primääripakkausmenetelmän tuomiin mahdollisuuksiin säilyvyyden varmistamiseksi. Menetelmät olivat vakuumpakkaus ja steriloitu vakuumpakkaus. Muut pakkausmuodot, kuten säilyke ym. ja sekundääri-, tertiääripakkaukset sekä suojakaasun käyttö, rajattiin tutkimuksen ulkopuolelle käytännön syistä. Selvityksen taustalla vaikutti markkinoilla tehty havainto: steriilisti pakattuna yrityksen valmistaman tuotteen pitäisi säilyä reilusti yli 30 päivää [2, s. 785].

Säilymisen näkökulmasta tuotteita tarkasteltiin valmisruokana sanan ”ready-to-eat” -merkityksessä, koska valmistusmenetelmän ansiosta pakattu tuote on valmis syötäväksi sellaisenaan [3, s. 246]. Tuotteiden käyttö jakautuukin sellaisenaan salaatteihin käytettävänä ja osana elintarvikkeen tai ruoan valmistuksessa komponenttina käytettävänä.

Tutkimuksen ulkopuolelle rajattiin myös pakkauksen ulkoasuun ja ilmeeseen liittyvät asiat, pakkausmerkinnät, sekä sekundääri- ja tertiääripakkausten vaikutus, koska primääripakkaus on ratkaisevassa roolissa säilyvyyden näkökulmasta. Tutkitun tuotteen

käyttäjäkunta on ruokateollisuuden ja julkisen ruokahuollon puolella, jossa pakkauksesta tulee käydä ilmi tuotteen nimi, EAN-koodi, pakkauskoko, säilyvyysaika, allergeenit, säilytyslämpötila, valmistaja, erätunnus ja mahdollisesti käyttöohje. [4.]

Härkäpapu on kuitu- ja mineraalipitoisuudeltaan sekä aminohappokoostumukseltaan tärkeä kasvi Euroopassa. Sillä on terveyttä edistäviä vaikutuksia, mutta sen sisältämien tanniinien sekä proteaasien estäjien ja visiinien takia käyttö on rajattua. Näihin terveydelle haitallisiin tekijöihin voidaan vaikuttaa kuumennuskäsittelyllä sekä fermentoimalla. [18, s. 2.] Nimestään huolimatta härkäpapu (*Vicia faba*) ei ole papu, vaan kuuluu virnakasveihin (*Vicia*). Käytön kannalta Ruokavirasto suosittelee tälle käsittelyä kuten pavuille (*Phaseolus*) [5].

2 Pakkauksen funktio

Pakkauksen tehtävänä on suojata tuotetta ympäristöltä ja vastaavasti ympäristöä tuotteelta. Tavoitteena on, että hyvin pakattu tuote säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti aistinvaraisesti arvioituna maukkaana ja mikrobiologisesti testattuna turvallisena. Lisäksi sen tulee kertoa tuotteesta, mahdollistaa tehokas jakelu, lisätä käyttömukavuutta ja olla mielellään edullinen. [6, s.12.]

Mikrobiologisen turvallisuuden raja-arvot tulevat elintarvikelainsäädännöstä, jossa määritellään tuotteissa sallitut mikrobien enimmäismäärät [7]. Suojakaasupakkaamisen ideana on hidastaa mikrobien kasvua rajoittamalla saatavilla olevaa hapetta [8, s. 316].

2.1 Tuotteen pakkaaminen

Pakkaaminen on yrityksen näkökulmasta kustannus, ja toisaalta mahdollisuus vaikuttaa tuotteen säilyvyyteen [6, s. 183–184]. Aseptinen pakkaaminen ja jatkuvatoiminen sterilointi mahdollistavat autoklavointiin perustuvaa sterilointia laadullisesti paremman lopputuloksen. Pakattava tuotteen olomuoto huomioiden valmiissa pakkauksessa tapahtuva sterilointi on kuitenkin lopputuloksen ja työnkulun kannalta tässä tapauksessa aseptista pakkaamista ja jatkuvatoimista sterilointia parempi vaihtoehto, sillä

jatkuvatoiminen sterilointi sopii paremmin nestemäisille tuotteille ja aseptiseen pakkaamiseen. [6, s. 220.]

Tyhjiö- eli vakuumpakkaamisessa pakkauksesta poistetaan ilma, jolloin tuotteen säilyvyys paranee pilaantumisen hidastuessa, koska pilaaville mikrobeille on vähemmän ilmaa tarjolla [6, s. 221].

Tuotteet pakataan tällä hetkellä kammiovakuumpakkauslaitteella, jonka toimintaperiaate on esitelty liitteessä 1 [6, s. 222]. Suojakaasupakkaamisessa (eng. Modified Atmosphere Packaging, MAP) pakkauksen kaasukoostumusta muutetaan säilyvyyden parantamiseksi. Tähän käytetään yleensä hiilidioksidia CO₂, typpeä N₂, happea O₂ tai näiden yhdistelmää riippuen pakattavasta tuotteesta. Typpeen verrattuna hiilidioksidin hyvänä puolena on sen mikrobien kasvua hidastava tai estävä vaikutus. Toisaalta hiilidioksidi vaikuttaa tuotteen happamuuteen, jos tuotteessa on korkea kosteus. [6, s. 223.]

2.2 Pakatun tuotteen säilymiseen vaikuttavat tekijät

Elintarvikkeen säilömisessä tavoitteena on säilyttää elintarvikkeen ominaisuudet ja ravintoarvot mahdollisimman pitkään. Tämä on etenkin varaston hallinnan ja sujuvan jakelun kannalta merkittävässä roolissa hävikin minimoimiseksi. Keskusliikkeet, joiden kautta jakelu tapahtuu, eivät mielellään ota omaan varastoonsa tuotteita alle 21 päivän säilyvyydellä. Tällöin keräily ja toimitus tulee tehdä terminaalimallilla. Terminaalimallissa tuotteet virtaavat keskusvaraston läpi tilausten perusteella. Vaihtoehtoisesti pidempi säilyvyysaika mahdollistaisi keskusliikkeiden sisäänostot, koska prosessi ennen tuotteen saapumista kauppaan syö tärkeitä myyntipäiviä. Pidempi säilyvyysaika helpottaa tuotannon suunnittelua ja varaston hallintaa tasaamalla kysynnän vaihtelusta johtuvaa kuormitusta. Eri tuotteilla on erilaisia arvoja, joita säilymisessä painotetaan liittyen rakenteeseen, makuun, elintarviketurvallisuuteen ja miellyttävään käyttökokemukseen. [8, s. 3–5.]

Elintarvikkeen pitkän säilymisen edellytys on kaikkien säilymiseen vaikuttavien tekijöiden huomioiminen. Pilaavien bakteerien edellytykset kasvulle ovat riippuvaisia lämmöstä, ravinteista, kosteudesta ja kasvulle sopivasta happamuudesta. Vaikuttamalla näihin

sisäisiin tekijöihin mikrobien kannalta epäedullisesti saadaan tuotteen säilyminen maksimoitua. Pakkauksen tehtävä suojata tuotetta ympäristöltä ja ympäristöä tuotteelta on hyvä alku ulkoisena suojatekijänä. Lisäksi tulee käyttää mahdollisuuksien mukaan suojakaasua. Näistä hiilidioksidi CO₂ estää tehokkaasti bakteerien, hiivojen ja homeiden kasvua. Vaikutus perustuu hiilidioksidin liukenemiseen vesifaasiin aiheuttaen tuotteen pH:n laskun. Sopiva hiilidioksidin määrä tulee testata aistinvaraisesti, koska käyttö voi aiheuttaa muutoksia makuun ja väriin. Suojakaasuna typpi N₂ on inertti eikä se liukene veteen, mutta se ei estä mikrobien kasvua. Typpi syrjäyttää pakkauksesta hapen, mikä parantaa säilyvyyttä. Suojakaasuun pakatessa tulee sopivan kaasuseoksen koostumus testata. Tässä apuna ovat pakkauslaittevalmistajan ja kaasuntoimittajan suositukset. [6, s. 223.]

Näiden lisäksi tulee hyödyntää säilyvyyteen vaikuttavaa niin kutsuttua aita-efektiä. Tässä menetelmässä tuotetta pilaavien mikrobien mahdollisuuksia menestyä heikennetään edellä mainittu osa-alue kerrallaan siten, että yhteisvaikutuksena syntyy hyvin säilyvä tuote. Suolalla ja sokerilla luodaan osmoottista painetta ja pienennetään vapaan veden määrää. Vapaa vesi pyritään sitomaan, jotta mikrobit joutuvat näkemään enemmän vaivaa veden saamisessa käyttöönsä. Tarvittaessa pH lasketaan neutraalista happamaksi happamuudensäätöaineella, jotta tuotteen kemiallinen ympäristö saadaan pilaajamikrobeille vähemmän suotuisaksi. Tämän lisäksi huomioidaan säilytyslämpötila alle +6 °C, jolloin menestymisedellytykset laskevat psykrotrofeihin. [3, s. 189.]

Käyttäjien terveyskäsitukset sekä toiveet mahdollisimman luonnollisista tuotteista asettavat reunaehdot suolan, sokerin ja happamuuden säätöön soveltuvien lisäaineiden käytölle [3 s. 246]. Tämän vuoksi lämpökäsittely on hyvä menetelmä parantaa säilyvyyttä ilman lisäaineita. Lämpökäsittelynä sterilointi autoklaavissa mahdollistaa pastörintia pidemmät säilyvyysajat bakteeri-itiöt tuhoavan vaikutuksen ansiosta [3, s. 247].

Valmistuksen jälkeisessä jäädytyksessä nopeus ja kylmäketjun jatkuvuus mahdollistavat pitkän säilyvyyden. Jäädytys tulee tehdä jäädytysmenetelmästä riippumatta mahdollisimman nopeasti 0–3 °C:n lämpöön, jotta etenkin mahdollisesti tuotteessa olevat ryhmän II *Clostridium botulinum* -bakteeri-itiöt eivät pääsisi germinoitumaan. Pakkaamisessa käytetään usein tyhjiö- eli vakuumpakkausta, koska sillä saadaan estettyä happea vaativien pilaajamikrobien kasvu. Tämä tosin tekee tilaa

psykrotrofeille anaeroobeille, jotka voivat lisääntyä hapettomissa ja viileissä ympäristöissä. [3, s. 248.]

Pastöroinnin hyöty menetetään, jos tuotetta ei pakata välittömästi käsittelyn jälkeen. Valmisruokien pääasialliset pilaantumisen aiheuttajat ovat homeet ja hiivat. Estämällä näiden kasvu pakkaamalla tuote vakuumpakkaukseen säilyvyys paranee. [6, s. 54, 58.]

Homeet jaetaan neljään luokkaan fysiologiansa ja muodostamiensa itiöiden perusteella. Luokat ovat zykomykeetit, esimerkiksi maassa yleinen rhizobus ja leipähome *R. Stolonifer.*, askomykeetit eli kotelosienet, basidomykeetit eli lakkisienet sekä vaillinaissienet, fungi imperfekti. Homeet ovat kasvuedellytyksiltään arobeja. Niitä myös käytetään ruuan valmistuksessa tuomaan makua ja parantamaan säilyvyyttä. Ne voivat aiheuttavaa kontaminaatioita, joiden seurauksena elintarvikkeeseen syntyy ei-toivottuja muutoksia. [8, s. 220.]

Tietyt hiivat muodostavat etanolia, hiilidioksidia, flavori- ja aromiaineita [8 s 220]. Hiivat käyttävät ravinnokseen lyhyketjuisia sokereita eivätkä pilko suurimolekyylisiä hiilihydraatteja kuten tärkkelystä. Nitriitit [NO₂⁻] ovat hiivalle myrkyllisiä. [9, s. 115].

2.3 Pakatun tuotteen säilyvyyden parantaminen

Jo vuonna 1953 havaittiin, että veden aktiivisuudella on yhteys tuotteen pilaantumisherkkyteen ja siten vapaan veden hallinta on veden kokonaismäärää tärkeämpää. Patogeeniset bakteerit eivät elä veden aktiivisuuden ollessa alle 0,85. Suola, pH, säilöntäaineet ja lämpökäsittely voivat nostaa tai laskea tätä arvoa. Pakastaminen alle -18 °C:n lämpötilassa pysäyttää mikrobiologisen kasvun ja hidastaa entsymaattista muutosta. [8, s 11–12.]

Yleensä valmisruuat pastöroidaan 60–90 °C lämpötilassa vegetatiivisten bakteerien tuhoamiseksi. Tärkein lämpökäsiteltyihin valmisruokiin liittyvä patogeeni on ryhmän II *C. botulinum*, jota on maaperässä ja vesistöissä. Valmisruokien suola ja lisäainepitoisuudet eivät estä *C. botulinumin* kasvua. Vegetatiivimikrobiston puuttuessa se saa vakuumpakkauksessa kilpailuedun. Tämä koskee lähinnä vakuumpakattuja lämminsavukalatuotteita.

Bakteerit jaetaan neljään luokkaan niiden vaarallisuuden perusteella. Luokkaan I kuuluvat vaarattomat kuten leiviniiva. Luokan II bakteerit voivat aiheuttaa ruokamyrkytyksen, mutta tähän löytyy lääkkeitä. Luokan III bakteeri voi muodostaa epidemioita, esimerkiksi kolibakteeri, mutta tällekin luokalle löytyy estokeinot. Luokkaan IV kuuluvat vaaralliset bakteerit, joihin ei ole rokotteita ja jotka leviävät helposti, esimerkiksi ebola.

Yksi ruokamyrkytysbakteeri, *Listeria monocytogenes* kasvaa jopa 0 °C lämpötilassa, mutta tuhoutuu lämpökäsittelyssä. Jälkikontaminaatiomahdollisuus suolauksessa tai pakkaamisen yhteydessä tulee sulkea pois tuotannon suunnittelun avulla, sillä laitospinnat voivat pesiä tuotantolaitteisiin pitkäksi aikaa. Pinnat voivat olla resistenttejä desinfektioaineille ja voivat kiinnittyä metallipintoihin.

Tuotteiden riittävä lämpökäsittely, katkeamaton kylmäketju ja hyvä tuotantohygienia edistävät valmisruuan säilymistä turvallisena tuotannosta kuluttajalle. [3, s. 248–249.]

Kylmässä säilytettävillä valmisruuilla, joiden myyntiaika on yli 10 vuorokautta, suositellaan valmistuksessa 6D-käsittelyä, 10 min 90 °C tai letaliteetille vastaava lämpökäsittely. Lisäksi säilymiseen vaikuttaa säilytyslämpötila. Alhaisessa lämpötilassa tuotteessa mahdollisesti olevien mikrobien toiminta hidastuu, mutta ei kuitenkaan pysähdy. Tähän säilymiseen vaikuttavat lämpö, a_w , pH, O_2 ja pakkauksen suojaava vaikutus hapelta. [10.]

Kuluttajien toiveita vastaamaan tuoreista vähän käsitellyistä elintarvikkeista laitevalmistajat ovat kehittäneet säilöntämenetelmäksi elintarvikkeiden korkeapainekäsittelyn [8 s. 815–816]. Korkeapainekäsittely perustuu Le Châtelier'n periaatteelle, jonka mukaan aineiden pitoisuuksien, reaktiolämpötilan tai reaktiopaineen muuttaminen vaikuttaa reaktion tasapainoasemaan [16 s. 99]. Paine käsittelyssä käsiteltävä pakkaus tai ruoka-aine puristetaan erittäin korkealla 400–700 MPa paineella lyhyen aikaa. Tämän seurauksena ruuassa olevien mikrobien toiminta loppuu. Itiöllisiin mikrobeihin tämä ei kuitenkaan vaikuta. Niitä varten tarvitaan lämpökäsittely tai sterilointi. Kova puristus ei vaikuta tuotteen muotoon, koska se kohdistuu tasaisesti kaikista suunnista. [8, s. 816.]

3 Elintarvikkeiden pilaajamikrobit

Elintarvikkeen pilaantumiselle on mekaanisia, fysikaalisia, kemiallisia ja mikrobiologisia tekijöitä, joiden vaikutus pyritään poistamaan tai minimoimaan säilymisen maksimoimiseksi [8, s. 6]. Käsiteltävän tuotteen säilyvyyden näkökulmasta ajan vaikutuksen hidastaminen mikrobiologisiin muutoksiin on tehokkain säilyvyyttä pidentävä tekijä, sillä pakkaus suojaa tuotteen fyysisesti. Mikrobiologisesta näkökulmasta vapaan veden (a_w) ja pH:n hallinta ovat merkittävimmät tekijät, joihin tuotteessa voidaan vaikuttaa ennen pakkaamista. Vaikutusmahdollisuudet vapaan veden määrään ovat rajatut, koska suolan ja sokerin määrät ovat tässä rajaavat tekijät. Lisättyä sokeria ei tuotteessa käytetä ja suolapitoisuus tulee säilyttää alle 0,7 g/100 g. Tällä määrällä suolan vaikutus säilyvyyteen on marginaalinen. [8, s. 9.]

3.1 Pilaantumisen tunnistaminen

Tuotteen aistinvarainen arviointi on elintarvikkeen laadun määrittämisen kannalta oleellista. Pilaantuminen käsittää kaikki tuotteesta aistittavat ominaisuudet, joilla on epäedullinen vaikutus tuotteen makuun, hajuun, rakenteeseen tai ulkonäköön. Pilaantuneen ja elintarvikkeeksi kelpaamattoman elintarvikkeen ero on, että pilaantuneen elintarvikkeen voi havaita aistinvaraisin keinoin, mutta elintarvikkeeksi kelpaamaton tuote voi olla aistinvaraisesti moitteeton, vaikka se sisältää ruokamyrkytykselle riittävän määrän bakteereita. [3, s. 178.] Pilaantuneessa elintarvikkeessa mikrobien määrät ovat luokkaa 10^6 – 10^{10} pmy/g [3, s. 181].

Pilaantumisen aistittavat ominaisuudet ovat sidoksissa elintarvikematriisiin ja vaihtelevat siten raaka-aineen ja aiheuttajamikrobien mukaan. Elintarvikkeen ravintotekijöillä, prosessoinnilla ja mahdollisella kontaminaatiolla on suora yhteys muodostuvaan mikrobistoon. Tunnistamisessa voidaan hyödyntää kemiallisiin ja fysikaalisiin tekijöihin liittyvää päättelyä. Näin voidaan kohdistaa mikrobiologiset analyysit kyseiselle elintarvikkeelle ominaisiin pilaajamikrobiryhmiin. [3, s. 179.]

Aistinvarainen arvio elintarvikkeesta on osa laadun tutkimista. Tätä tulosta verrataan tutkittavalle tuotteelle ominaiseen laatuun, joka tulee tuntea, jotta arviointi on mahdollinen. [3 s. 181.] Tuotteena fermentoitu härkäpapu ei valmistusprosessin

läpäistyään kuulu herkästi pilaantuviin elintarvikkeisiin koska mikrobien toiminta on pysäytetty valmistuksessa pastöroimalla. Lämpökäsittely tuhoaa vegetatiivisessa kasvuvaiheessa olevan mikrobiston. Säilyvyys perustuu nopeaan jäähdytykseen ja jatkuvaan kylmäsäilytykseen. [3, s. 247.] Hapen pääsy tuotteeseen on estettävä, koska happamat olosuhteet mahdollistavat hiivojen kasvun [3, s. 234].

3.2 Mikrobien kasvuun vaikuttavat tekijät

Mikrobien tuhoutumista lämpökäsittelyssä voidaan arvioida kaavassa 1 esitetyllä yhtälöllä. Yleisimmille patogeeneille löytyy kirjallisuudesta valmiita taulukoita, joten käsittelyaikoja suunniteltaessa ei välttämättä tarvitse lähteä soveltamaan kaavoja.

$$\frac{dC}{dt} = -kC^n \quad (1)$$

Kaava 1 esittää mikrobien tuhoutumista lämpökäsittelyssä, jossa

dC/dt = konsentraation C muutos ajan t funktiona

k = reaktiovakio

C = tutkittava pitoisuus

n = reaktion aste

Mikrobien lämmönkestoa kuvataan desimaalisella pienentymisajalla D (decimal reduction time), joka kuvaa tarvittavaa lämmitysaikaa tietyssä lämpötilassa, jolla saavutetaan 90 %:n väheneminen olemassa olevalle mikrobikannalle (log 1). [8, s. 700.]

Mikrobien kasvuun vaikuttavat sisäiset ja ulkoiset tekijät pH, a_w , hapetus pelkistyspotentiaali (Eh), antimikrobiset aineet, biologiset suojaavat rakenteet ja ravintosisältö [3, s. 18].

Mikrobien kasvuun vaikuttavat tekijät jaetaan sisäisiin ja ulkoihin tekijöihin. Kun tekijät saadaan epäsuotuisaksi solun jakautumiselle, lag-vaihe pitenee ja kasvu hidastuu. Toisin kuin steriloinnilla, jolla pyritään poistamaan ”kaikki” mikrobit, muilla säilönnässä hyödynnettävillä menetelmillä pyritään pidentämään lag-vaihetta. Solut ovat edelleen hengissä, mutta edellytykset niiden kasvulle on tehty epäsuotuisiksi. [3, s. 17.]

Bakteerit kasvavat parhaiten neutraaleissa olosuhteissa (pH 6,6–7,5). Hiivat ja homeet viihtyvät myös happamammassa olosuhteissa. Esimerkiksi etikka- ja maitohappo luovat maitohappobakteereille epäedullisemmat olosuhteet, kuin sitruuna-, suola-, fosfori- tai viinihappo. Täydellisten raja-arvojen määrittely eri bakteerilajeille tietyssä pH:ssa ja suolapitoisuudessa ei ole mahdollista. Lisäksi tulee huomioida elintarvikkeen proteiinien luontainen kyky neutraloida happamuutta. Tämä vaikuttaa happamuudensäätöaineiden teoriaa heikompaan tehoon käytännössä. Happamuus vaikuttaa bakteerisoluun estämällä entsyymien toimintaa ja ravinteiden kuljettamista edellyttämällä mikrobilta suurempaa energiaa ravinteen saamiseksi. [3, s. 19.]

Useimmat pilaajabakteerit tarvitsevat vesiaktiivisuutta yli 0,91, patogeenit yli 0,94. Hiivojen kasvu estyy, kun a_w on alle 0,8, homeiden kun a_w on alle 0,7. Tämän vuoksi vapaan veden hallinnalla vaikutetaan bakteerien kasvun edellytyksiin elintarvikkeessa. Kun myös muut olot tehdään mikrobin kasvulle epäsuotuisaksi, alentunut a_w estää kasvua tehokkaammin. [3, s. 320.] Sisäiset ja ulkoiset tekijät tehostavat toistensa vaikutusta kasvun estämisessä. Siksi absoluuttisia raja-arvoja ei voida antaa. Vesiaktiivisuuteen voidaan vaikuttaa kuivaamalla, pakastamalla, sekä lisäämällä sokeria ja suolaa. Eri aineilla on erilainen vaikutus mikrobeihin. Esimerkiksi glyserolin vaikutus on pienempi kuin NaCl:n tai sakkaroosin. Alhaisen vapaan veden säilövä vaikutus perustuu lisääntyville bakteerille aiheutuneeseen osmoottiseen stressiin, ja tämän seurauksena jakautuminen pysähtyy ja solu saattaa kuolla. [3, s. 20.]

Vapaa vesi vaikuttaa patogeenien kasvumahdollisuuksiin [8, s. 11]. Vapaan veden määrällä on kokonaisvesimäärää suurempi merkitys tuotteiden säilymisen näkökulmasta. Vapaan veden määrää voidaan hallita kuivaamalla tai käyttämällä liukenevia aineita kuten suolaa tai sokeria. Myös ekstruusio ja paistaminen pienentävät vapaan veden pitoisuutta. [8 s. 448.] Lämpötila vaikuttaa veden aktiivisuuteen. Muutosta voidaan arvioida Clausius-Clayperon -lausekkeella. Vapaa vesi vaikuttaa myös tuotteen

termodynaamisiin ominaisuuksiin, kuten jäätymis- ja kiehumispisteeseen. Proteiini ja tärkkelys sitovat vettä enemmän kuin rasva tai sokeri. [8, s. 452–454.]

Mikrobien kasvu edellyttää vettä, typpeä, vitamiineja sekä mineraaleja. Energianlähteiksi mikrobeille kelpaavat sokerit, alkoholit ja aminohapot. Typpeä mikrobit hankkivat pilkkomalla proteiineja aminohapoiksi. Kaikki mikrobit eivät kuitenkaan pysty hajottamaan proteiineja, vaan tarvitsevat vapaita aminohappoja. Etenkin grampositiiviset bakteerit ovat energiatarpeeltaan vaativia. [3, s. 20.]

Hapetus-pelkistyspotentiaali (Eh) kertoo, kuinka hyvä hapetin tai pelkistin aine on. Tämä potentiaali voidaan mitata sähköisenä jännite-erona ja siihen voidaan vaikuttaa pakkaamisella poistamalla happi mikrobien saatavilta. Aerobisten mikrobien kasvu edellyttää positiivista Eh-lukemaa, anaerobiset negatiivista. Mikroaerofiilit kaipaavat jonkin verran pelkistynyttä olosuhdetta. [3, s. 21.]

Lämpötilan vaikutus säilymiseen on merkittävin elintarviketeollisuuden käyttämä menetelmä säilyvyyden hallinnassa. Kylmävarastointi on nostanut psyrokrofitien mesofiilien aiheuttamia mikrobiologisia riskejä koskien patogeeneja ja pilaajabakteereita. Mesofiilit kasvavat 20–40 °C:ssa ja psykrotrofitit viileässä 0–35 °C:ssa. Hiilidioksidi estää mikrobien kasvua, mutta sen vaikutus vähenee, jos mikrobeja on runsaasti. [3, s. 338]. Sporulaation eli itiöinnin aikana itiö alkaa kasvaa vapautuakseen lopulta useiden vaiheiden jälkeen emosolusta. Itiöityminen on usein seurausta ravinnon puutteesta. [3, s. 24.]

Germinaatiossa itiö muuttuu takaisin kasvukykyiseksi soluksi ja on siten sporulaatiolle vastakkainen tapahtuma. Germinoituminen aktivoituu tyypillisesti lämmön vaikutuksesta. Lisäksi aminohapot, sokerit, epäorgaaniset suolat ja dipikoliinihappo voivat aktivoida germinoitumisen. Germinaatiota seuraa solun kasvuunlähtö, joka vaatii ulkopuolista energiaa. [3, s. 25.]

3.3 Elintarvikkeiden prosessoinnin ja pakkaamisen vaikutus säilyvyyteen

Kaupan ja logistiikan toiveet vaativat elintarvikkeille riittävän pitkiä myyntiaikoja. Pitkä myyntiaika helpottaa myös valmistajan varaston hallintaa ja jakeluun liittyviä järjestelyjä.

Keskusliikkeet ottavat lyhyellä säilyvydellä olevat tuotteet terminaalijakeluna, kun riittävän pitkä säilyvyys mahdollistaa jakelun lavatoimituksina keskusvarastolle. Säilyvyyden lisääminen saadaan aikaan joko tuhoamalla mikrobit tai estämällä niiden kasvu. Tuhoamiseen yleisin menetelmä on kuumennuskäsittely, sillä pakastaminen ei aina tuhoa mikrobeja, ainoastaan hidastaa tai estää kasvun.

Useimmat elintarvikkeita pilaavat ja patogeeniset bakteerit tuhoutuvat 60–70 °C:n lämpötilassa. Muutamat bakteeri-itiöt kestävät jopa 130 °C:n lämpötiloja. Tällaisten lämpöjen käytöllä on helposti heikentävä vaikutus elintarvikkeen aistinvaraiseen laatuun ja ravitsemukseen, minkä takia itiöiden täydellisen tuhoamisen sijaan keskitytään itiöllisten bakteerien germinaation ja kasvun estämiseen. Käytännössä säilykkeitä valmistettaessa pyritään tuhoamaan kestävimmätkin bakteeri-itiöt. Kaupallisesti steriili lopputuote saavutetaan 121 °C:n kuumennuskäsittelyllä. Tällöin tuotteessa ei ole patogeenisiä bakteereita. Itiöitä niissä voi olla. [3, s.298–299.]

Pastöroinnissa pyritään tuhoamaan ei-itiölliset patogeenibakteerit. Itiöllisten bakteerien germinaation ja kasvun estämiseksi pastöroidut tuotteet tulee säilyttää jääkaappilämpötiloissa. Pastöroidut ruuat pakataan tyhjiöpakkaukseen tai suojakaasuun, jolloin saavutetaan useiden viikkojen säilyvyys kylmässä. Patogeenista etenkin *L. monocytogenes* voi aiheuttaa jälkikontaminaatioita, mikäli tuotetta käsitellään kuumennuksen jälkeen. Tuotteen pastörointi pakkauksessa estää jälkikontaminaation mahdollisuuden tehokkaasti. Itiölliset bakteerit saattavat selvitä tällaisesta käsittelystä ja kasvaa hapettomissa olosuhteissa. Merkittävin näistä on ryhmän II *C. botulinum* joka tuottaa neurotoksiinia. [3, s. 300.]

Bakteeripopulaation tuhoutuminen noudattaa ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa, jolloin populaatio pienenee saman prosenttiosuuden kun aika ja lämpö ovat vakiot. Tärkeitä termejä ovat D-arvo joka ilmaisee tarvittavan ajan tietyssä lämpötilassa bakteeripopulaation pienentämiseksi yhden logaritmisin yksikön (\log_{10}) eli 90 % populaatiosta. D-arvo lasketaan kaavalla 2, jossa T on käytetty lämpötila, t kuumennusaika, N_0 bakteerien määrä kuumennuksen alussa ja N_t bakteerimäärä kuumennusajan t jälkeen.

$$D_T = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t} \quad (2)$$

Kaava 2 bakteeripopulaation lämpötuhoutumiskäyrän laskemiseksi.

D_T = D-arvo tutkitussa lämpötilassa

T = käytetty lämpötila

t = kuumennusaika

N_0 = bakteerimäärä kuumennuksen alussa

N_t = bakteerimäärä kuumennusajan t jälkeen.

D-arvo kuvaa bakteeripopulaation tuhoutumisnopeutta tietyssä lämpötilassa. D-arvot vaihtelevat bakteerilajeittain ja saman lajin kantojen välillä. Itiöiden D-arvot ovat vegetatiivibakteereita huomattavasti suuremmat. Elintarvikematriisissa olevat proteiinit ja rasva suojaavat bakteereita tuhoutumiselta nostoen D-arvoa. [3, s. 301–302.]

Z-arvo ilmaisee bakteeripopulaation yhden logaritmisesti yksikön tuhoamiseen tarvittavan lämpötilamuutoksen (°C). Z-arvo voidaan määrittää kuvassa 1 esitetystä bakteeripopulaation lämpötuhoutumisaikakäyrästä tai laskea kaavalla 3. [3, s. 304.]

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_{T_1} - \log D_{T_2}} \quad (3)$$

Kaava 3. Z-arvon laskeminen:

z = bakteeripopulaation tuhoamiseen yhdellä logaritmisella yksiköllä tarvittava lämpötilamuutos

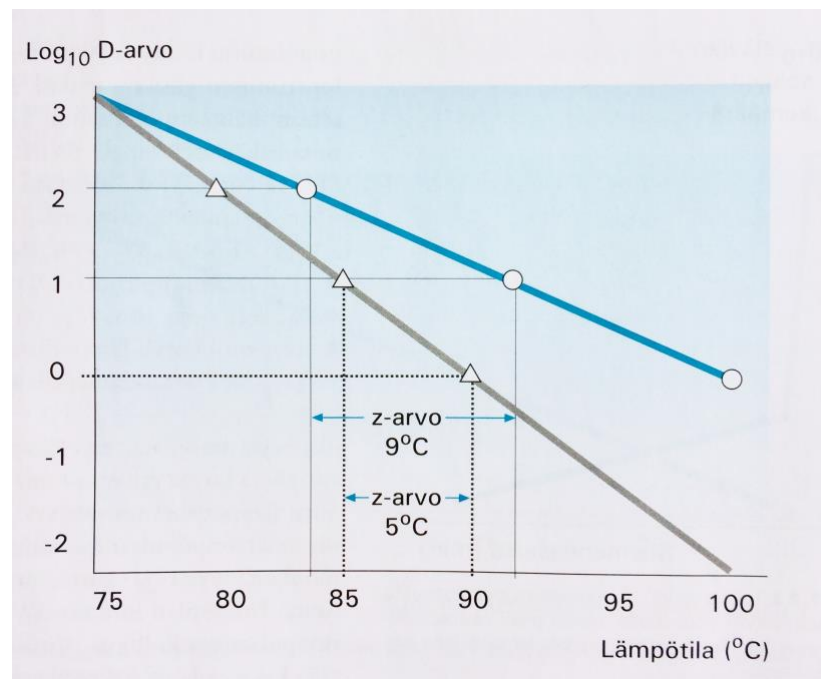
T_1 = lämpötila jossa D_{T_1} on määritelty

T_2 = lämpötila jossa D_{T_2} on määritely

D_{T_1} = D-arvo lämpötilassa T_1

D_{T_2} = D-arvo lämpötilassa T_2

Z-arvot kuvaavat bakteeripopulaation suhteellista lämmönkestävyyttä. Arvot määritellään laboratorionkokeissa bakteerilaji- ja kuumennusmatriisikohtaisesti. [3, s. 303.]



Kuva 1. Z-arvon vaikutus lämpötilaan. Toisen bakteeripopulaation z-arvo 9 °C, toisen 5 °C. [3, s. 304.]

Lämpökäsittelyä arvioitaessa termi F-arvo (min) kuvaa tarvittavaa aikaa z-arvoltaan tietynlaisen homogeenisen bakteeripopulaation tuhoamiseen tietyssä lämmössä. Tälle käytetään myös termiä P-arvo (min) kuvaamaan pastöroinnin vaikutusta miedommissa lämpötiloissa käsiteltäessä. Tavoite ja lopputulos on molemmilla termeillä kuitenkin sama, kuvata bakteeripopulaation tuhoamiseen tarvittava aika minuutteina. [3, s. 304.]

Kaavalla 4 voidaan laskea letaalisuudeltaan vastaava prosessointiaika eri lämpötiloissa. $F_{T_{ref}}$ tunnettu prosessointiaika tunnetussa lämpötilassa, z itiöpopulaation z -arvo

$$F_{T_1} = \frac{F_{T_{ref}}}{10^{\frac{T_1 - T_{ref}}{z}}} \quad (4)$$

Kaava 4. Vaikutukseltaan vastaava prosessointiaika eri lämpötiloissa:

$F_{T_{ref}}$ = tunnettu prosessointiaika tunnetussa lämpötilassa

z = bakteeripulaation z -arvo

T_1 = tutkittava lämpötila

Bakteeripopulaation lämpötuhoutumiskäyrällä ja siten z -arvolla on elintarvikematriisin ohella huomattava merkitys ekvivalenttiprosessien tuloksiin. Väärin valitulla z -arvolla voi olla elintarviketurvallisuuden näkökulmasta kohtalokkaita vaikutuksia lopputulokseen, jos prosessi arvioidaan jonkin bakteeripopulaation osalta turvalliseksi prosessin tuhotessa vain osan bakteereista. Tämän takia laskennassa tulee käyttää arvoja, jotka on määritelty kaikkein kestävimälle itiöpopulaatiolle määritetyssä tuotteessa. [3, s. 305.]

Kaupallisessa steriloinnissa lähtöarvona käytetään lämpökäsittelyä, jolla tuhoetaan *C. botulinum* kanta 10^{12} eli 12D. Tällöin keittoaika on 2,4 min ja lämpötila 121 °C [3, s. 305].

Koska lämpötila harvemmin on läpi tuotematriisin vakio, kannattaa laskennassa käyttää paremmin käytäntöä mallintavaa kaavaa, joka huomioi lämmön vähittäisen nousun tuotteessa. Tämä saadaan integroimalla prosessin hetkittäiset $\frac{F}{t}$ -arvot prosessiajan (t_0 - t_n) funktiona kaavan 5 mukaisesti. [3, s. 306.]

$$F = \int_{t_0}^{t_n} 10^{\frac{T_{ref} - T}{z}} dt \quad (5)$$

Kaava 5. Vaikutukseltaan vastaava prosessointiaika eri lämpötiloissa, kun lämpötilan vähittäinen nousu huomioidaan.

T_{ref} = prosessin tavoitelämpö tai valittu viitelämpötila

T = tuotteen todellinen lämpötila hetkellä dt

z = bakteeripopulaation z -arvo

Edellä lasketun pohjalta voidaan laskea prosessin letaalisuus bakteeripopulaatiolle, eli D -arvo kun tunnetaan bakteeripopulaation D_{ref} -arvo. Tämä lasketaan jakamalla bakteeripopulaation D_{ref} -arvo integroimalla lasketulla F -arvolla. Koko prosessin letaalisuuden laskeminen bakteeripopulaatiolle kaava 6. [3, s. 306.]

$$D = \frac{D_{ref}}{\int_{t_0}^{t_n} 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}} dt} = \frac{D_{ref}}{F} \quad (6)$$

Kaava 6. Prosessin letaalisuus bakteeripopulaatiolle.

D_{ref} = bakteeripopulaatiolle tunnettu vertailuarvo

F = kaavalla 5 laskettu prosessointiaika

Korkea vesiaktiivisuus (a_w) edistää bakteerien tuhoutumista lämpökäsittelyssä proteiinien tehostuneen denaturaation ansiosta. Rasva ja proteiinit suojaavat mikrobeja lämmön tuhoavalta vaikutukselta. Hiilihydraateista mikrobien lämmönkestävyyttä lisäävät eniten sakkaroosi ja glukoosi, vähiten glyseroli ja fruktoosi. Hiilihydraattien suojaava mekanismi perustuu elintarvikematriisiin pienentyneeseen vesiaktiivisuuteen. Mikrobien kuntoon ja siten niin lämmönkestävyyteen voidaan vaikuttaa stressaamalla niitä ennen kuumakäsittelyä ultraäänellä. Tällöin niiden lämmönkestävyys heikkenee oleellisesti.

[3, s. 307.]

Lämpötilan nousunopeudella on bakteeripopulaation tuhoutumiseen huomattavasti suurempi merkitys, kuin kuumennusajan pidentämisellä. Kuumentaminen tulee aina tehdä mikrobien lämpökuolemispistettä korkeammassa lämpötilassa. Alemmassa lämpötilassa mikrobit eivät kuole, on kuumennusaika mikä tahansa. [3, s. 308.]

Matalissa lämpötiloissa mikrobien reaktiot hidastuvat. Kylmäsäilytyksessä, 0–8 °C:ssa tuote on usein pastöroitu ja pakattu tyhjiöön tai suojakaasuun. Alle 0 °C:n lämpötilassa bakteerien kasvu pysähtyy ja alle -8 °C:ssa bakteerikasvu on lähes pysähdyksissä. Tämän takia pakastaminen on tuotantoketjun ja tuotannon hallinnan kannalta tehokas säilytysmenetelmä. Kylmäsäilytyksessä pilaaja- ja patogeenibakteeriryhmä ovat psykrotrofit. [3, s. 308.]

Pakastamisessa tuotteen sisälämpötila lasketaan alle -18 °C ja pidetään siinä jatkuvasti. Tehokkaassa teollisessa pakastuksessa tuote jäädytetään nopeasti, jotta vältetään suurten solun ulkoisten vesikiteiden muodostumisilta ja siten sulatuksessa aistinvaraisen laadun heikkenemiseltä. Pakastetun tuotteen maksimisäilyvyysaika ei liity mikrobiologiseen arvoon, vaan tuotteen aistinvaraiseen laatuun. Mitä alhaisempi säilytyslämpö, sitä pidempi säilyvyysaika. Pakastaminen tuhoaa termofiilisiä ja mesofiilisiä bakteereita jättäen psykrotrofeille kilpailuedun sulatuksen jälkeen. Tämä nopeuttaa sulatetun tuotteen pilaantumista. Siksi sulatettua tuotetta ei saa pakastaa uudelleen. [3, s. 310–311.]

3.4 Fermentointi

Fermentoinnilla tarkoitetaan substraattitason fosforylaatiota. Kemiallisesti kyseessä on hapetus-pelkistysreaktio. Myös elintarvikkeiden valmistustapaa, jossa mikrobit tekevät kasvumetaboliensa kautta elintarvikkeeseen rakenteelliset ja säilyvyyttä lisäävät muutokset, kutsutaan fermentoinniksi.

Fermentoidussa elintarvikkeissa käytetään usein maitohappobakteereja hyväksi. Kaikki maitohappobakteerit eivät ole ihmisille ja eläimille turvallisia. Maitohappobakteerien ohella homeita, hiivoja ja fermentatiivisia bakteereita hyödynnetään elintarvikkeiden valmistuksessa. [3, s. 333–334.]

3.5 Mittaaminen ja raja-arvot

Tuotteen hyllyiän määrittämiseen on useita lähestymistapoja, koska tuote voi muuttua käyttökelvottomaksi usealla eri tavalla. Tämän takia ensimmäisenä tulee määrittää,

seurataanko rakenteen, mikrobiologian tai aistinvaraisen arvion muutoksia. Tässä apuna on mahdollisten riskien todennäköisyyksien arviointi ja siten tutkimusten keskittäminen todennäköisimpään hyllykään vaikuttavaan tekijään. [17, s. 32.] Mikrobiologisen mittaamisen ohella hyllyiän ennustamiseen ja arviointiin on luotu matemaattisia malleja, joilla voidaan arvioida elintarvikkeen kelvollista hyllyikää. Näissä on kuitenkin ollut haasteena arvojen määrittäminen kasvun edellytyksille. [8, s. 902.] Ruokaviraston ohjeista löytyy linkkejä tällaisiin sovelluksiin, mutta niiden käyttöönotto näyttäisi olevan oma projektinsa [15, s. 27].

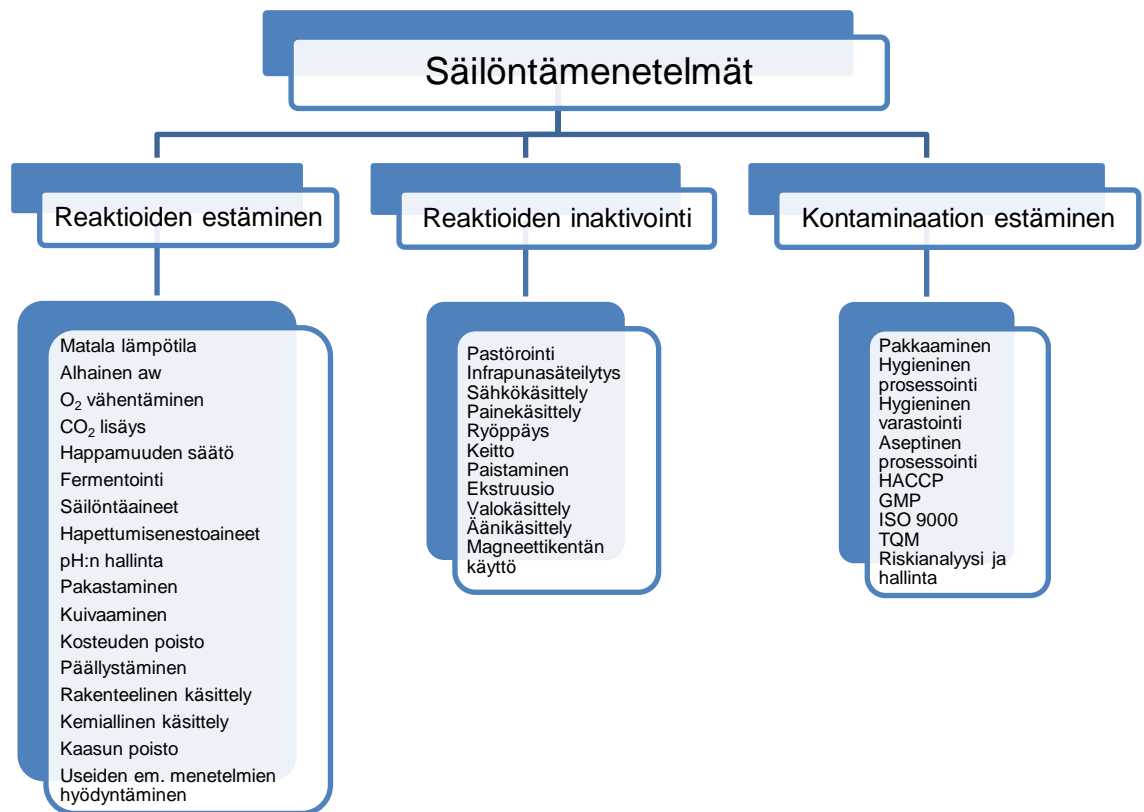
4 Soveltuvat pakkausmenetelmät

Elintarvikkeen säilöminen voidaan jakaa kolmeen vaikutustapaan. Kemiallisen ja mikrobiologisen kasvun hidastamiseen, bakteerien inaktivointiin ja uudelleenkontaminoitumisen estämiseen. [8, s. 8.] Pakkauksen tehtävänä on säilyttää tuotteen aistittava ja mikrobiologinen laatu loppukäyttäjälle asti [3, s. 336]. Taulukossa 1 sivulla 18 esitellään säilömismenetelmät ja niiden jako alaluokkiin sekä tekijät, joihin näissä voidaan vaikuttaa.

Tyhjiöpakkaamisessa pakkauksesta poistetaan ilmaa pilaantumisen hidastamiseksi. Suojakaasupakkaamisessa ilma korvataan yhdellä tai useammalla kaasulla elintarvikkeen säilyvyyden parantamiseksi. [3, s. 340–341.]

Estämisessä lämpötilan, vapaan veden (a_w) ja pH:n hallinta ovat vahvimmat kandidaatit. Suojakaasupakkaamisella ja säilöntäaineilla voidaan estää kasvua, mutta käyttäjien toiveet mahdollisimman luonnollisista tuotteista ja elintarvikelainsäädännön asetukset sallituista käyttömääristä asettavat reunaehoja säilöntäaineiden käytölle. Hyväksyttävä päivittäinen enimmäissaanti (ADI) hiivoja ja homeita vastaan tehokkaille bentsoehapolle ja sen suoloille E210-213 on näiden yhteismäärälle 5 mg/kg/vrk [11].

Näiden säilövä vaikutus perustuu pH:n laskuun ja diffuusion kautta mikrobin solukalvon läpi tunkeutumiseen. Tehoa rajoittaa mikrobien kyky käyttää orgaanisia happoja hiilen lähteenä. [8, s. 10.]



Kuva 2. Kaaviokuva menetelmistä, joilla voidaan vaikuttaa säilymiseen.

Kuvassa 2 esitetään pääasialliset menetelmät elintarvikkeiden säilömisen näkökulmasta. Menetelmät on jaettu kolmeen osa-alueeseen kasvun estämiseksi, kasvun pysäyttämiseksi ja uudelleenkontaminoitumisen estämiseksi. [8, s. 8.]

Muovit ovat käytännöllisiä pakkausmateriaaleja, mutta niiden heikkoutena on kaasujen ja höyryjen läpäisevyys sekä mahdolliset vaikutukset pakattavaan materiaaliin. Tämän vuoksi muoveissa suositetaan useampikerroksisia yhdistelmiä, laminaatteja, jolloin eri raaka-aineilla parhaat ominaisuudet saadaan hyödynnettyä. Esimerkiksi vakuumpakkaamisessa käytetään polypropeenikerrosta sisäpinnassa kuumasaumautuvuutensa ja hyvän kosteuden läpäisemättömyyden takia ja tämän päällä hapen läpäisyä estämässä polyvinyylideeni (PVDC) -kerros. 1,5 µm:n polyetyleni (PE) -kerros polypropyleenin päällä parantaa kuumasaumattavuutta. [8, s. 918, 923.]

Metalli antaa pakkaukselle hyvät suojaominaisuudet valoa ja kaasuja vastaan. Lisäksi metallit soveltuvat steriloitaviin säilykkeisiin, mutta isommissa 2 kg, 3 kg, 5 kg:n pakkauksissa metallin käyttö olisi epäkäytännöllistä. [8, s. 929.]

Lasi on isommissa pakkauksissa materiaalina raskas ja herkästi hajoavana epäkäytännöllinen [8, s. 933].

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Koesuunnitelma

Insinööriyön kokeellisesta osasta tehtiin koesuunnitelma, liite 2, johon kirjattiin tutkittavat tuotteet, säilytyslämpötilat ja säilytysajat. Laboratoriokerroille tehtiin omat Microsoft Excel -tiedostot, joihin luotiin valmiiksi laskentakentät peptoni–suola (PEPSU) -liuoksen punnitsemiselle, sekä näytteiden punnitsemiselle. Näin varmistettiin oikeiden ainesuhteiden säilyminen ja saatiin laskettua pesäkkeiden kokonaismäärät Ruokaviraston ohjeen 703/1 mukaan, liite 3 [13]. Laboratoriokertojen toteutukset liitteissä 4–6.

5.2 Näytteenotto

Näytteet otettiin tuotantoerästä satunnaisotannalla, säilytettiin kylmiössä ohjeen mukaisessa lämpötilassa, alle +6 °C ja avattiin käytettäessä. Säilytyksen lämmön seurannassa oli lämpömittari. Näytteet säilytettiin mittausten välillä Metropolian elintarvikelaboratorion kylmiössä, jossa lämpötila oli +3...+6 °C.

5.3 Näytteiden mikrobiologinen analysointi

Käytetty työskentelymenetelmä oli Ruokaviraston toimintaohje 728/1, liite 7. Menetelmänä käytettiin ohjeen kohtaa 15.7.2. muut ei-jauhemaiset tuotteet, koska kyseessä ei ole liha-, kala- tai kanavalmiste, maitotuote tai vilja sellaisenaan, vaan

härkävavusta luotu elintarvike. Ohjeen kohta 15.9 fermentoidut tuotteet huomioitiin toteamalla, että tässä kokeessa ei ole tarkoitus tutkia tuotteessa mahdollisesti olevia mikrobeja, joita on käytetty fermentoinnissa, koska tuote lämpökäsitellään ennen pakkaamista säilyvyyden parantamiseksi. Täten kokonaisbakteerien, sekä hiivojen ja homeiden tulosten odotetaan jäävän alle elintarvikelainsäädännössä asetettujen arvojen. [12.]

5.3.1 Näytteen lämpökäsittely

200 gramman näytepusseja asetettiin autoklaavikoriin pystyyn, jotta höyry pääsee vaikuttamaan jokaiseen pakettiin tasaisesti. Yhteen pakettiin asennettiin lämpötila-anturi mittaamaan tuotteen sisälämpötilaa.

5.3.2 Näytteiden laimennus

Näytteet laimennettiin valmistamalla liitteenä 7 olevan ohjeen mukaisesti laimennusliuos punnitsemalla 700 grammaa ionivaihdettua vettä, 0,85% suolaa, ja 0,1% peptonia 1000 ml:n erlenmeyer pulloihin. Liitteenä 4–6 olevissa laboratoriosuunnitelmissa esitetään laboratoriokertakohtaiset suunnitellut ja toteutuneet punnitustulokset. Suola oli jodioimatonta karkeaa merisuolaa ja peptoni mallia Lab M Limited Bacteriological peptoni MC024. Liuokset steriloitiin Systec VE-65 autoklaavilla 121 °C 15 minuutin ajan.

5.3.3 Hiiva/home määritykset Petrifilmi-viljelyllä

Petrifilmien käyttöön päädyttiin työn ohjaajan ja materiaalitoimittajan kanssa käytyjen keskustelujen perusteella. Vaihtoehtona olisi ollut valmismaljat, mutta käytettävyyden näkökulmasta Petrifilm katsottiin paremmaksi vaihtoehdoksi. [19.]

5.3.4 Kokeellinen osuus

Kokeelliset jaksot tehtiin liitteenä 4–6 olevien pöytäkirjojen mukaisesti. Peptoni-suola liuoksen (PEPSU) steriloinnin jälkeen pullot jäähdytettiin altaassa kylmällä vedellä ohjeen mukaisesti alle 20 °C, jotta lämpötila ei vaikuta tuloksiin. Jäähdytyksen jälkeen autoklavoidut näytteet ja PEPSU punnittiin laboratoriosekoittemelle homogenoitiin

valmistettuihin Stomacher -pusseihin ja homogenoitiin Seward GWB Stomacher 400 -homogenisaattorilla 30 sekunnin ajan asetusnopeudella ”normaali”.

Kuvassa 3 näytteet homogenoinnin jälkeen.



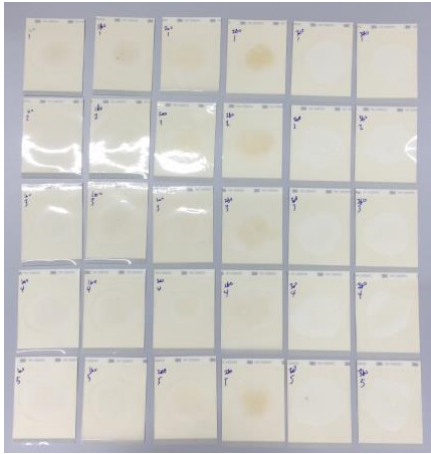
Kuva 3. Homogenoinnin jälkeen kiinteästä näytteestä on pipetoitavissa liuos pipetointia varten.

Homogenoidusta näytteestä pipetoitiin 1 ml näyte kertakäyttöpipetillä laimennosputkiin, joihin oli lisätty ionivaihdettu vesi (kuva 4). Sekoituksen jälkeen pipetointi 3M Petrifilmille.



Kuva 4. Laimennokset tehtiin koeputkiin ja värikoodattiin korkeilla.

Kuvissa 5 ja 6 on nähtävissä, kuinka siirrostettavien näytteiden määrä nousee käytettävien osanäytteiden seurauksena useisiin kymmeneen laboratorioskertaan kohden.



Kuva 5. Hiivat ja homeet näytteet siirrostettuna.



Kuva 6. Kokonaisbakteeri-näytteet siirrostettuna,

valmiina inkubointiin.

5.3.5 Viljelyolosuhteet

Petrifilmit inkuboitii ohjeiden mukaisissa lämpötiloissa Metropolian Myyrmäen kampuksen mikrobiologian inkubointihuoneen lämpökaapeissa. Kokonaisbakteerit (TPC) inkuboitii aerobisesti $+30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 72 \pm 3h ja hiivat sekä homeet (Y&M) aerobisesti $+25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 5 vuorokautta.

5.3.6 Tulosten lukeminen

Ohjeen mukaisen inkuboinnin jälkeen laskettiin pesäkkeet Petrifilmeiltä ja kirjattiin taulukkoon. Tämän perusteella laskettiin ohjeen LAB 703/1 kohdan 2.1 kaavalla (Kaava 7) pesäkkeiden lukumäärä N tutkitussa näytteessä.

$$N = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{n_1 V_1 + n_2 V_2 + \dots + n_n V_n} \quad (7)$$

N pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä grammassa

C_1, C_2 , pesäkkeiden lukumäärä jokaiselta tulokseen laskettavalta maljalta

n_1 ensimmäisen laskentaan käytettävien rinnakkaisten näytteiden lukumäärä

n_2 seuraavan laskentaan käytettävien rinnakkaisten näytteiden lukumäärä jne

V_1 ensimmäistä pesäkelukua vastaava näytetilavuus alkuperäistä näytettä

V_2 toista pesäkelukua vastaava näytetilavuus alkuperäistä näytettä jne.

Pesäkkeiden määrittelyssä ja laskussa inkuboiduista näytteistä käytettiin apuna liitteissä 8 ja 9 olevia 3M Petrifilmin laskentaohjeita.

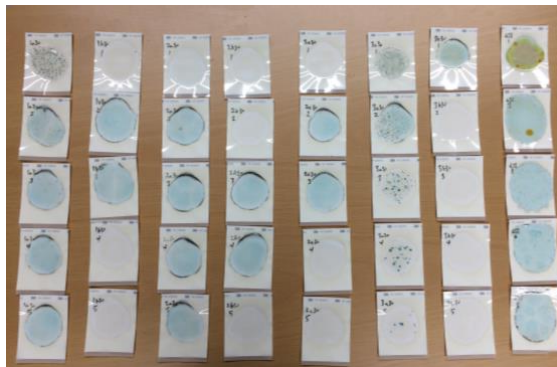
6 Tulokset

Liitteenä 4 olevista tuloksista voidaan havaita, että autoklavoidun näytteen pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä on jo alussa 50% vähemmän kuin lämpökäsittelemättömässä. Liitteessä 5 olevasta 14 päivän säilytyksen jälkeisissä mittaustuloksissa ero on kasvanut merkittävästi. Lämpökäsittelemättömien näytteiden 2a ja 3a pesäkkeet eivät olleet enää 14 päivän kohdalla laskettavissa ensimmäisistä laimennoksista. Tämä huomioitiin seuraavalla kerralla 30 päivän näytteitä tutkittaessa laimentamalla näytteet 10^{-1} – 10^{-5} . Taulukossa 2 lasketut pesäkkeitä muodostavat yksiköt yhteenvetona.

Taulukko 1. Inkubointien tulokset. Yksikkö pmy/g. TNTC, too numerous to count = liikaa laskettavaksi.

	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3
Alku	kokonaisbakteerit 30 autoklavoimaton 800 Hiivat & homeet 20 autoklavoimaton 112	kokonaisbakteerit 300 autoklavoimaton 620 Hiivat & homeet 63 autoklavoimaton 154	kokonaisbakteerit 300 autoklavoimaton 1100 Hiivat & homeet 50 autoklavoimaton 30
14 päivää	kokonaisbakteerit 5 autoklavoimaton 1900 Hiivat & homeet 35 autoklavoimaton 3500	kokonaisbakteerit 425 autoklavoimaton TNTC Hiivat & homeet 20 autoklavoimaton 10	kokonaisbakteerit 440 autoklavoimaton TNTC Hiivat & homeet 95 autoklavoimaton TNTC
32 päivää	kokonaisbakteerit $7 \cdot 10^3$ autoklavoimaton $1 \cdot 10^7$ Hiivat & homeet 9 autoklavoimaton 2493	kokonaisbakteerit $1 \cdot 10^3$ autoklavoimaton $1 \cdot 10^6$ Hiivat & homeet 0 autoklavoimaton 18	kokonaisbakteerit $1 \cdot 10^4$ autoklavoimaton $1 \cdot 10^6$ Hiivat & homeet 45 autoklavoimaton $2 \cdot 10^4$

Liitteessä 6 on tulokset 32 päivän säilyvyyden osalta. Alkuperäisen suunnitelman mukainen 21 päivän näyte jouduttiin jättämään käytännön syistä tekemättä. Tällä ei kuitenkaan ole merkittävää vaikutusta lopputulosten kannalta, sillä tavoite oli selvittää vähintään 30 päivän säilyvyys. Kuvassa 7 ja 8 hiivat ja homeet, sekä kokonaisbakteerit inkuboinnin jälkeen.



Kuva 7. 30 päivän näytteiden hiivat ja homeet inkuboinnin jälkeen. Kasvua havaittavissa.



Kuva 8. 30 päivän näytteiden kokonaisbakteerit inkuboinnin jälkeen.

7 Tulosten tarkastelu

Tutkitun perusteella autoklavoinnilla käsitelty vakuumpakkaus säilyy kylmässä (alle +6 °C) mikrobiologisesti hyväksyttävien rajoissa, kun viitearvoina ovat elintarviketeollisuusliiton mikrobiologiset ohjausarvot viimeisenä käyttöpäivänä [14]. Autoklavoiduissa näytteissä ei myöskään ollut havaittavissa ylimääräisiä sivumakuja tai hajuja pitkänkään säilytyksen jälkeen. Autoklavoinnissa näytteissä oli havaittavissa lievä happamuuden kasvu maistettaessa ja kokonaisbakteerien määrien viitearvojen ylittyminen.

8 Yhteenveto ja johtopäätökset

Laboratoriotyöskentely, punnitukset, mittaukset ja autoklaavin käyttö onnistuivat suunnitellusti. Tässä auttoi mikrobiologian laboratoriokurssilta hankittu käytännön kokemus. Työskentely vahvisti ulkopuolisen akreditoitun laboratorion käytön hyödyt vaivattomana vaihtoehtona mittausten tekoon verrattuna siihen, että ylläpitäisi omaa laboratoriota ja tekisi kaiken itse.

Tuotteen yksinkertaisesta rakenteesta johtuen autoklavointi antaa merkittävän edun tuotteen säilyvyyteen. Suolan ja happamuudensäätöaineen käyttö ei merkittävässä määrin ole mahdollista toisin kuin esimerkiksi kastikkeissa tai sidosaineilla rakennetuissa elintarvikkeissa. Tässä tutkimuksessa ei otettu kantaa autoklavoinnin ravitsemuksellisiin vaikutuksiin. Yhteenvetona tuotteet kannattaa autoklavoida tai ainakin lämpökäsitellä säilyvyyden parantamiseksi.

Tutkimuksen tuloksia voidaan pitää saatujen lukujen osalta korkeintaan suuntaa antavina, sen verran monta työvaihetta ja siten virhemahdollisuutta näytteiden valmistamiseen sisältyy, alkaen Petrifilmien käytöstä, vaikka ne ohjeen mukaan tekeekin. Tulosten vahvistamiseksi kokeet tulisi toistaa, mutta se kannattaa jättää auktorisoidun elintarvikelaboratorion tehtäväksi. Aistinvaraisten arvioiden perusteella lämpökäsitelty tuote on pitkässä säilytyksessä lämpökäsittämätöntä parempi säilyttäen makunsa neutraalina.

Pakkausten autoklavointi rahtipalveluna ei alustavan selvityksen perusteella Suomessa ole vaihtoehto. Tämä tarkoittaa, että tuotantoon on hankittava oma tuotantomittakaavan autoklaavi tai suunniteltava tuotanto siten että vastaava lämpövaikutus saadaan aikaiseksi ilman autoklaavia esimerkiksi höyryuunilla tai HPP High Pressure Processing eli korkeapainekäsittelyllä. Aivan täysin sama vaikutus ei ilman autoklaavia onnistu, sillä lähellä 100 °C ja sen yli mentäessä tarvitaan autoklaavin mahdollistama ylipaine, jotta pakkauksissa oleva neste ei ala kiehua ja hajota pakkausta. Lämpökäsittely kuitenkin parantaa säilyvyyttä ja sopiva lämpötilan ja tarvittavan ajan yhdistelmä löytyy käytössä olevista taulukoista.

Investointina tuotantoon sopiva teollisen mittakaavan autoklaavi on asennettuna alkaen luokkaa 150 000–200 000 €. Toimitusaika noin 6 kuukautta.

Toinen säilyvyyteen vaikuttava menetelmä on pakkaskuivaus, jota saa rahtipalveluna lähimmillään Virossa ja Tanskasta. Pakkaskuivauksen tuotantomittakaavan laiteinvestointi on kustannuksiltaan ja toimitusajaltaan samaa suuruusluokkaa autoklaavin kanssa.

Korkeapainekäsittely on menetelmä, jossa korkealla paineella parannetaan pakatun elintarvikkeen säilyvyyttä. Tämä on mielenkiintoinen vaihtoehto autoklavoinnille, mikäli halutaan välttyä korkean lämmön aiheuttamilta vaikutuksilta ravintoarvoille tai tuotteen rakenteelle.

Investointeja suunnitellessa tulee huomioida laitteiston investointikustannuksen lisäksi elinkaarimallin mukaiset käyttökustannukset, sekä valitun menetelmän mahdollistaman käsittelyn vaikutukset varaston hallintaan. Vaihtoehtoisesti rahtipalveluna tehtäville töille tulee laskea aika ja kuljetus vaikutus ja huomioida että ainoastaan korkeapainekäsittelylle löytyy teollista tarjontaa Suomesta.

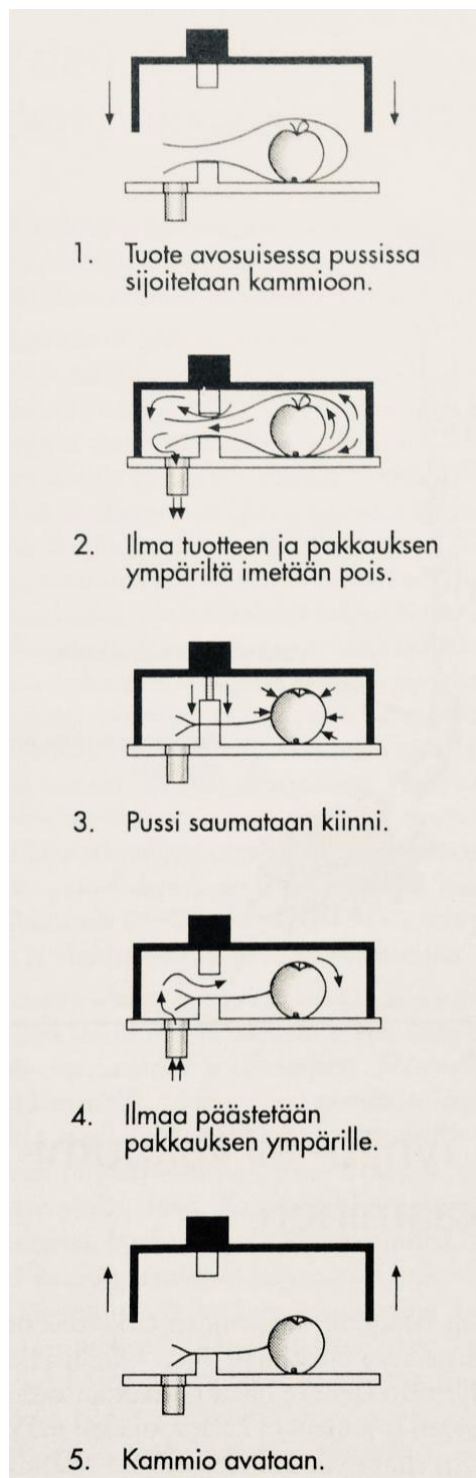
Nyt tehdyn työn perusteella autoklavointi- ja pakkaskuivausinvestointeihin liittyvien kannattavuuslaskelmien tekeminen on suositeltavaa. Korkeapainekäsittelyn osalta käsittelyn vaikutus yrityksen valmistamille tuotteille tulee tutkia ja tarkastella kokonaisuutena, voidaanko yhdellä investoinnilla saavuttaa koko tuotetarjoaman kattava ratkaisu.

Suomessa rahtipalveluna toimitettavan pakkaskuivauksen huonon saatavuuden takia kannattaa pakkaskuivauslaitteiston investointilaskelmissa huomioida marginaalinen mahdollisuus kuivauskapasiteetin myyntiin rahtipalveluna suomalaisille marjankuivaajille. Tällöin pakkaskuivauslaitteiston käyttöastetta voidaan nostaa kausiluontoisesti, mikäli se tuotannon puolesta muutoin on mahdollista.

Lähteet

- 1 <https://www.tarhuringipapu.fi> päivitetty 6.8. 2020, luettu 7.9.2020.
- 2 Madigan Michael, Martinko John, Stahl, David, Clark David. 2012. Brock Biology of microorganisms. 13. painos. International edition. Pearson.
- 3 Korkeala Hannu, toim. 2007. Elintarvikehygieniä 1. painos. Helsinki. WSOY Oppimateriaalit.
- 4 <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/pakkausmerkinnat/pakolliset-pakkausmerkinnat/> päivitetty 11.4.2020, luettu 3.1.2021.
- 5 <https://www.ruokavirasto.fi/yritykset/elintarvikeala/valmistus/elintarvikkeista-annettavat-tiedot/pakkausmerkinnat/kayttoohje-ja-varoituserkinta/pavut/> luettu 14.2.2021.
- 6 Järvi-Kääriäinen Terhen, Ollila Margareetta (toim.). 2007. Toimiva pakkaus. Helsinki. Pakkausteknologia-PTR.
- 7 https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-oppaat/elintarviketieto_opas_fi.pdf luettu 13.7.2020.
- 8 Rahman Shafiur M. (toim.) 2007. Handbook of food preservation. 2. painos. Florida. CRC Press.
- 9 Enari Tor-Magnus, Mäkinen Veijo. 2014. Panimotekniikka. 3. uudistettu laajennettu painos. Espoo. Panmolaboratorio-Bryggerilaboratorium.
- 10 <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/kasittely-ja-sailyttaminen/sailyvyyden-parantaminen/> luettu 18.3.2021.
- 11 [<https://www.ruokavirasto.fi/yritykset/elintarvikeala/valmistus/yhteiset-koostumusvaatimukset/elintarvikeparanteet/lisaaineet/e-koodit/e210/>] luettu 14.3.2021.
- 12 https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriotoiminta/ohjeita-laboratorioille/lab_728_naytt_kasittely_laim_kvantit_tutkim_varten_fi.pdf käyttöönotto 1.2.2012, luettu 10.9.2020.

- 13 https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriointi/ohjeita-laboratorioille/lab_703_mikrobiologistent_tulostenlaskeminen.pdf
käyttöönotto 1.1.2019, luettu 17.9.2020.
- 14 <https://www.etl.fi/media/aineistot/suosituksset-ja-ohjeet/elintarvikkeiden-mikrobiologisia-ohjausarvoja-viimeisena-kayttopaivana-2017-suositus.pdf>
Päivitetty 2017, luettu 10.9.2020.
- 15 https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-oppaat/elintarvikkeiden-mikrobiologiset-vaatimukset_ohjeita-toimijoille.pdf
Päivitetty 3/2020, luettu 19.4.2021.
- 16 Hänninen Hanna, Karppinen Maarit, Leskelä Markku, Pohjankallio Maija. 2018. Tekniikan Kemia. 14. uudistettu painos. Helsinki. Edita.
- 17 Robertson L. Gordon (toim.). 2009. Food Packaging and shelf life. Taylor & Francis group, Pro Quest Ebook Central.
- 18 Sozer Nesli, Melama Leena, Silbir Selim, Rizello G Carlo, Flander Laura, Poutanen Kaisa. 2019. Foods 2019 Volume 8 Issue 431
<https://www.mdpi.com/2304-8158/8/10/431>
- 19 Iiris Perälä Labema Oy, Carola Fortelius-Sarén Metropolia. [puhelinkeskustelu Perälä–Järvi 9.9.2020, sähköpostikeskustelu Fortelius-Sarén–Järvi 8.9.2020]

Kammiopakkauskonteen toimintaperiaate [6 s. 222].

Laboratoriotyöskentelysuunnitelma

Koesuunnitelma. Optimi pakkausmenetelmä elintarvikkeille.
Valmistus väline, väkkuimi/steriili
Tarvittavat materiaalit

Koesuunnitelma: Tarvikkeet

3M petrifilm hiivat ja homeet 2x50 kpl = 100 kpl, 152,13€, tuotenumero C6407 = 189€
3M kokonajabakteerit 2 x 50 kpl = 100 kpl, 103,66€ tuotenumero C6400 = 129 € + 25€ € + alv. = 318 €
pepsu liuos tai 30 grammaa peptonia, 150 grammaa suolaa ja ionivahdettua vettä + steriloitui autoklaavoimalla Bakteerologinen peptoni NCM0259A, Hinta: 59,74 € 500 G
1 ml kertakäyttöpipettejä 500 kpl (27 kpl)
kertoakuumipussuja 30x40 cm, 100 kpl
pyrex pulloja (1000 ml) / 250 ml
Stomacher pussuja 4 tutkimuskertana x 3 eri tuotetta/kerta = 12 kpl
3 tutkimuskerralla 2 pussia = 6 pussia ja 4, kerralla 3 pussia = 9 pussia/ tuote
3 tuotetta => 3 x 9 stomacher pussia = 27 stomacher pussia

pepsun valmistus ja autoklaavointi

Laimennosliuos PEPSU 0,1% peptoni, 0,85% suola, ionivahdettu vesi (Ruokavirasto ohje LAB 728/1)

1. kerta: 2 litraa (2 x 270 ml x 3 = 1620 => 2 litraa)
2. kerta: 2 litraa (14 päivää alolukusesta) (2 x 270 ml x 3 = 1620 => 2 litraa)
3. kerta: 2 litraa (21 päivää alolukusesta) (2 x 270 ml x 3 = 1620 => 2 litraa)
4. kerta: 3 litraa (30 päivää näytelet + huoneenlämmössä säilytetty autoklaavoitu näyte) 3*270 ml x 3 = 2430 ml => 3 litraa

näytteiden autoklaavoimist seuraavasti

valmistettu 119, kylmäsiiliitys +2°C vakumoitu 15,9.

Näyte 1	valmistettu	pakattu	autoklaavoitu	alstimvarainen arvo
1a0	5 11,9.	15,9.	18,9.	
1b14	2 11,9.	15,9.	18,9.	
1b21	2 11,9.	15,9.	18,9.	
1b30	2 11,9.	15,9.	18,9.	
1b0	5 11,9.	17,9.	18,9.	autoklaavoimalla ei havaittavaa vaikutusta rakenteeseen tai makuun
1b14	2 11,9.	17,9.	18,9.	
1b21	2 11,9.	17,9.	18,9.	
1b30	5 11,9.	17,9.	18,9.	
T ref	11,9.	17,9.	18,9.	
1c	2 11,9.	17,9.	18,9.	

- 1 autoklaavoitu 30 pv huoneenlämpö +21°C 2
- + varanäyte autoklaavoimist keilpaavassa pussissa

valmistettu 19,8, pakastettu 20,8., sulatettu 14,9, vakumoitu 15,9. (200 g)

Näyte 2	valmistettu	pakattu	autoklaavoitu	alstimvarainen arvo
2a0	5 19,8.	15,9.	18,9.	
2b14	2 19,8.	15,9.	18,9.	
2b21	2 19,8.	15,9.	18,9.	
2b30	2 19,8.	15,9.	18,9.	
2b0	5 19,8.	17,9.	18,9.	sisällön tuntuu tulevan "steriili" hajui ja maku, rakenteesta pysyy todella miellyttävien napakana
2b14	2 19,8.	17,9.	18,9.	
2b21	2 19,8.	17,9.	18,9.	
2b30	5 19,8.	17,9.	18,9.	
T ref	19,8.	17,9.	18,9.	
2c	2 19,8.	17,9.	18,9.	

Huomi: Tarjasta autoklaavoitaven saumat, varanäyte valkutti llyyällä autoklaavin mermessä.

200 g

Näyte 3	valmistettu	maastettu	pakattu	autoklaavoitu	alstimvarainen arvo
3a0	5 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
3a14	2 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
3a21	2 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
3a30	2 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
3b0	5 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	autoklaavoimalla ei havaittavaa vaikutusta rakenteeseen tai makuun
3b14	2 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
3b21	2 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
3b30	5 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
T ref	11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	
3c	2 11,9.	16,9.	17,9.	18,9.	

oanäytteet/eri

Ruokaviraston ohje LAB 703/1 mikrobiologisten tulosten laskemiseen



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Vastuuhenkilö Maria Aarnio

Sivu/sivut 1 / 7

Hyväksyjä Anna-Liisa Myllyniemi

Toimintaohje **LAB 703/1**
Käyttöönotto 1.1.2019

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

Mikrobiologisten tulosten laskeminen

1 Pesäkkeiden laskeminen maljoilta

1.1 Yleistä

Pesäkkeitä laskettaessa tarvittaessa apuna käytetään suurennuslasilla varustettua pesäkelaskijaa. Siihen kuuluu neliösenttimetrin suuruisiin alueisiin jaettu muovilevy sekä tumma pohjalevy. On varottava laskemasta pesäkkeiksi muita hiukkasia kuten liukene-matonta näytettä, saostumia tai pölyä. Näiden erottamiseksi pesäkkeistä voidaan käyttää apuna esim. suurennuslasia tai stereomikroskooppia.

Pesäkkeet pyritään laskemaan vähintään kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta ja tu-los ilmoittamaan painotettuna keskiarvona. Laimennoksista viljellään vähintään kaksi rin-nakkaismaljaa. Laskettavien pesäkkeiden maksimimäärässä/malja on menetelmäkohtai-sia eroja. Esimerkiksi kokonaispesäkelukua määritettäessä lasketaan enintään 300 pe-säkettä/malja, *Bacillus cereusta* määritettäessä korkeintaan 150. Pesäkelaskennan ylä-rajaa ilmoitetaan menetelmäohjeissa.

Pesäkkeet pyritään laskemaan heti inkuboinnin jälkeen. Mikäli tämä ei ole mahdollista, maljoja voidaan säilyttää jääkaappilämpötilassa enintään kolme vuorokautta. Pesäkkei-den tyypillinen ulkonäkö voi indikaattorialustoilla kärsiä kylmäsäilytyksestä, mutta lyhyt in-kubointi optimilämpötilassa palauttaa tyypillisen ulkonäön.

Joissakin menetelmissä maljoilta lasketaan kaikki pesäkkeet, esimerkiksi kokonais-pesäkelukua määritettäessä myös hiivat ja homeet. Toisissa menetelmissä pesäkkeiden tulee olla tietynlaisia, joko tyypillisiä ja/tai epäilyttäviä pesäkkeitä. Joissakin menetelmissä osalle pesäkkeistä suoritetaan varmistuskokeita ja varmistuneiden pesäkkeiden osuuden perusteella lasketaan määritettävän bakteerilajin tai -suvun osuus lasketuista tyypillisistä pesäkkeistä.

Pesäkkeiden laskija merkitsee tulosten yhteyteen nimikirjaimensa ja laimennokset, joista pesäkkeet on laskettu, sekä mahdolliset poikkeamat inkubointiajassa.

1.2 Pesäkkeiden laskentasäännöt

1.2.1 Pesäkkeitä enintään maksimimäärä kaikilla maljoilla

Kaikki pesäkkeet lasketaan ja tulokset merkitään muistiin.

1.2.2 Leviävät pesäkkeet

Ruokaviraston ulkopuolisen laboratorion on itse varmistettava ohjeen toimivuus omissa laboratorioissaan sekä varmistettava ohjeen ajantasaisuudesta osoitteesta ruokavirasto.fi

Laboratoriopöytäkirja, aloitus

Labra 18.9.2020 Labrakerran lopuksi jokaisessa keltaisessa kohdassa tulee olla merkintä. Pesäkkeet ja tunit
Aloitettu keräilemillä tarvittavat pullot ja kerkki, sekä peptoni ja stomacher pussit. Klo 9

	H2O ibi-ioni Suunnittelu	peptoni Suunnittelu	LAB Bacteriological peptone MCD24 Suunnittelu	suola (pohjoimaton, merisuola) Suunnittelu
	g	g	g	g
	2000	2	17	17

	1	2	3	osuuksissa	osuuksissa
tehdään kolmeen 1 l erimeyer pullon 8 700 ml	700	700,69	0,701	0,694	5,956
	0,694	0,701	0,702	0,697	5,956
	0,697	0,701	0,702	0,697	5,956
	0,697	0,701	0,702	0,697	5,956
	0,697	0,701	0,702	0,697	5,956

10-13 valmis autoklaaviv
11:00 kolme 1000 ml erimeyeriä joissa 700 ml pepsua ja yksi lämpötilanferenssipullo (ionivaihdettu vesi)
lisäksi pohjalle omaan kotiin maustamaton näyte suolapainassa, jotta todennetaan että pakkaus ei räjähdi autoklaavissa.
Laboline Syntec VE-65 autoklaavi
sterilointiohjelma 8, liuku, kestää noin tunnin

13:30 näyteiden sterilitänti valmis. Pepsut jäljittymässä ohjeen mukaan, jotta liian suuri lämpötilaero ei stressaa näytteitä
punnittu ja siirretty asepsieetti 30 g näytettä stomacher pussiin. Työalut desinfioidu ennen käyttöä ja laajon jälkeen.

pepsua valmistus ja autoklaavointi
Laimennosliuos PEPSU 0,1% peptoni, 0,85% suola, ionivaihdettu vesi (Ruokavirasto ohje IAB 728/1)
1. kerta 2 litraa (2 x 270 ml x 3 = 1620 => 2 litraa)
2. kerta 2 litraa (14 päivää alokulussa) (2 x 270 ml x 3 = 1620 => 2 litraa)
3. kerta 2 litraa (21 päivää alokulussa) (2 x 270 ml x 3 = 1620 => 2 litraa)
4. kerta 3 litraa (30 päivää näytteet + huoneenlämmössä säilyneitä autoklaavoitu näyte) 3*270 ml *3 = 2430 ml => 3 litraa

	T (°C)	t (min)
Pepsua autoklaavointi (sterilointi)	121	15

	näyte 1 b	T (°C)	t (min)
Steriloitavien näyteiden autoklaavointi	121	15	15
	toimitus	121	15

	näyte 2 b	T (°C)	t (min)
Näyteiden homogeenointi	121	15	15
	toimitus	121	15

	näyte 3 b	T (°C)	t (min)
Määrä stomacher 400 pussiin	121	15	15
	toimitus	121	15

	2 näyte 3a0	g(laimennosliuos (g))
Stomacher pussi	30	270
	mitattu	29,93
		278,67

	1 ja 2	3 näyte 3a0	g(laimennosliuos (g))
Määrä stomacher 400 pussiin	30	30	270
	mitattu	30,38	275,69
			273,42

	1 näyte 200	g(laimennosliuos (g))
Homogeenointi Seward GWB stomacher 400	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 200	g(laimennosliuos (g))
Petrifilmien pipetointi	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Petrifilmien pipetointi	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

	1 näyte 100	g(laimennosliuos (g))
Huomi!	30	270
	mitattu	30,92
		278,65

Laboratoriopöytäkirja, näytteet 14 päivää

Lähtö 2.10.2023, 14 päivää		Mittaus 19.10.2023, 14 päivää		Mittaus 20.10.2023, 15 päivää		Mittaus 21.10.2023, 16 päivää		Mittaus 22.10.2023, 17 päivää		Mittaus 23.10.2023, 18 päivää		Mittaus 24.10.2023, 19 päivää		Mittaus 25.10.2023, 20 päivää		Mittaus 26.10.2023, 21 päivää		Mittaus 27.10.2023, 22 päivää		Mittaus 28.10.2023, 23 päivää		Mittaus 29.10.2023, 24 päivää		Mittaus 30.10.2023, 25 päivää		Mittaus 31.10.2023, 26 päivää		Mittaus 01.11.2023, 27 päivää		Mittaus 02.11.2023, 28 päivää		Mittaus 03.11.2023, 29 päivää		Mittaus 04.11.2023, 30 päivää				
Alkuperäinen näyte
...

Laboratoriopöytäkirja, näytteet 32 päivää

Näyte	Näytteen kuvaus	Määritys	Yksikkö	Tulos		Huomioita
				Arvo	Yksikkö	
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

Ruokaviraston ohje LAB 728/1 näytteen käsittelyä ja laimentamista varten



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Vastuuhenkilö	Hakkinen Marjaana	Sivu/sivut	1 / 17
Hyväksyjä	Myllyniemi Anna-Liisa	Toimintaohje	LAB 728/1
		Käyttöönotto	1.2.2012

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 8261/ IDF 122: 2001

ISO 6887, Parts 1-4; Part 1, 1999; Part 2, 2003; Part 3, 2003; Part 4, 2003

- 1) Standardissa ISO 8261/ IDF 122:2001 mainittuja lasihelmiä ei käytetä vanukkaiden ja jälkiruokien sekoittamiseen.
- 2) Voinäytteitä punnitaan 25 g/21 ml. Rasvakerrosta ei imetä pois, vaan pipetoidaan rasvakerroksen alta.
- 3) Laimennusliuosta voidaan esilämmittää 45 ± 1 °C vesihautessa helpottamaan rasvaisten tuotteiden liukenemistä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu maidolle ja maitovalmisteille (ISO 8261/IDF 122: 2001) sekä muille elintarvikkeille (ISO 6887: 1-4) ja rehuille laimennussarjan osalta. Muut esikäsittelyohjeet ovat menetelmäkohtaisia.

3 Määritelmä(t)

Esikäsittelyn tarkoituksena on saada näytteestä edustava osanäyte tutkimusta varten mahdollisimman aseptisesti. Laimentamisen tarkoituksena on laimentaa mikrobien määrä tilavuusyksikköä kohti sopivaksi mikrobiologiseen tutkimukseen.

4 Periaate

Yleensä 10 g näytettä homogenoidaan 90 ml:aan tai 90 g:aan laimennusliuosta, jolloin saadaan ensilaimennos. Homogenoinnin avulla mikrobit saadaan jakautumaan mahdollisimman tasaisesti liukseen.

Jatkolaimennokset saadaan sekoittamalla tietty tilavuus ensilaimennosta 9-kertaiseen määrään laimennusliuosta (esim. 1 ml + 9 ml) sekä toistamalla tämä menettely jokaisesta näin saadusta laimennoksesta. Tavoitteena on saada laimennettua alkuperäinen näyte sellaiselle alueelle, että laimennussarjasta viljellyiltä maljoilta pystytään laskemaan pesäkkeitä.

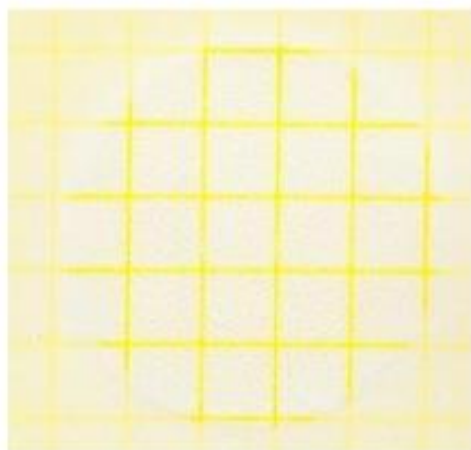
Ruokaviraston ulkopuolisen laboratorion on itse varmistettava ohjeen toimivuus omassa laboratoriossaan sekä varmistuttava ohjeen ajantasaisuudesta osoitteesta ruokavirasto.fi

Ohjekuvat kokonaisbakteerien laskemiseksi

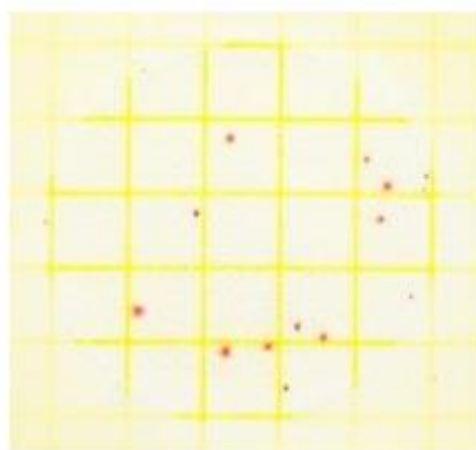
KÄYTTÖOHJEET: 3M™ PETRIFILM -TUOTTEET



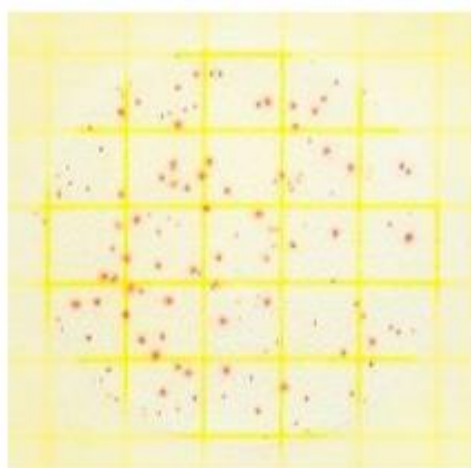
Aerobic Count Plate, kokonaisbakteerit



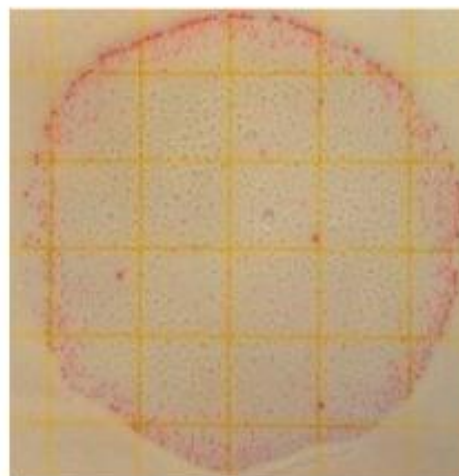
Laskentatulokset = 0



Laskentatulokset = 16



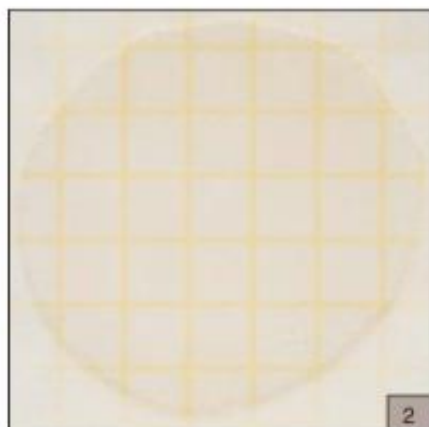
Laskentatulokset = 143



Laskentatulokset = TNTC

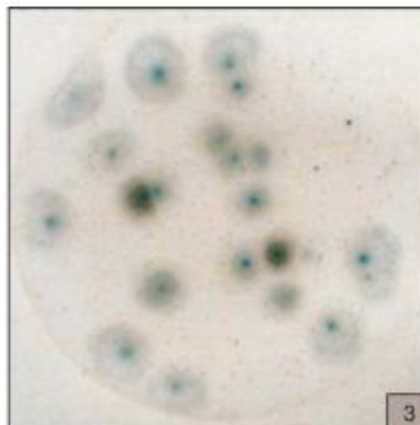
Ohje hiivojen ja homeiden laskemiseen inkuboinnin jälkeen.

3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate



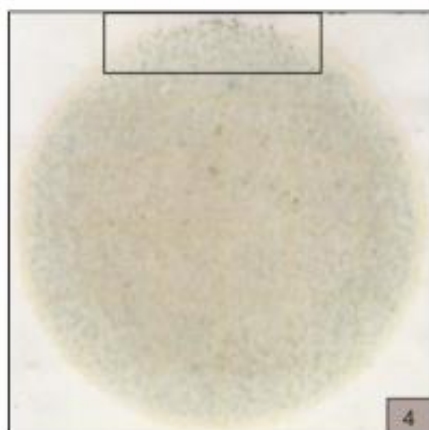
Yeast and Mold Count = 0

Figure 2 shows a Petrifilm YM Plate without yeast or molds.



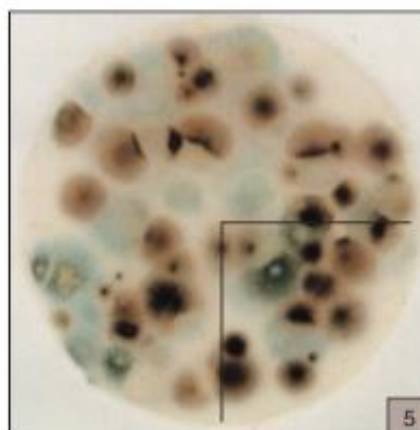
Estimated Total Count ~ 500
Estimated Yeast Count ~ 480
Mold Count = 21

When colonies number more than 150, estimate the count. Determine the average number of colonies in one square (1 cm²) and multiply it by 30 to obtain the total count per plate. The inoculated area is approximately 30 cm². Yeast colonies may range in color from tan (as in this example) to pink to blue-green.



Estimated Yeast Count - TNTC (actual count > 10⁶)

The Petrifilm YM Plate in figure 4 contains yeast colonies too numerous to count (TNTC). The small, blue colonies at the edge of the plate (highlighted in the box) are present throughout the entire plate although less visible.



Estimated Mold Count ~ 64

The mold colonies in figure 5 are beginning to crowd and overlap each other on the plate. Count each colony margin or focus. The plate can be divided into sections to assist in counting. In this example, approximately 1/4 of the plate was counted, then the number of colonies counted was multiplied by 4 to get the estimated count on the plate. The section shown has 16 molds.