

Niko Nurmi

Klostridi-itiöiden aiheuttaman voihappokäymisen ehkäiseminen sulatejuustossa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

20.10.2012

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Niko Nurmi Klostridi-itiöiden aiheuttaman voi happokäymisen ehkäiseminen sulatejuustossa 43 sivua + 5 liitettä 20.10.2012
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Elintarvikkeiden tuotekehitys ja laadunvalvonta
Ohjaajat	Tuotekehittäjä Paula Virolainen Yliopettaja Veli-Matti Taavitsainen Lehtori Carola Fortelius
<p>Sulatejuustojen yleisin mikrobiologinen haitta on niiden voi happokäyminen. Voi happokäymistä aiheuttavat anaerobiset itiöitä muodostavat <i>Clostridium</i>-suvun bakteerit. Klostridi-itiöt alkavat usein germinoitua, kun kylmäketju katkeaa tai sulatejuustoa säilytetään liian lämpimässä. Työssä vertailtiin kirjallisuudesta esiin tulleita tekijöitä, joilla voidaan ehkäistä sulatejuuston voi happokäymistä.</p> <p>Työn tarkoituksena oli tutkia nisiinin, sorbiinihapon ja Joha HBS® -sulatesuolan inhiboivia vaikutuksia klostridi-itiöiden aiheuttamaan voi happokäymiseen sulatejuuston keittokokeilla. Lisäksi tutkittiin, täyttääkö säilöntäaineeton sulatejuusto sen säilyvyysvaatimukset.</p> <p>Koesuunnitelma ja tulosten tilastollinen käsittely tehtiin R-tilasto-ohjelmalla. Tulokset analysoitiin regressioanalyysin ja vastepintojen avulla.</p> <p>Tulosten perusteella nisiini oli yksin käytettynä paras säilöntäaine estämään voi happokäymistä, kuitenkin paras vaikutus saatiin käyttämällä nisiiniä ja Joha HBS® -sulatesuolaa yhdessä. Säilöntäaineeton sulatejuusto ei täyttänyt säilyvyysvaatimuksia opinnäytetyössä suoritettussa koetilanteessa.</p>	
Avainsanat	sulatejuusto, klostridi-itiöt, voi happokäyminen

Author Title Number of Pages Date	Niko Nurmi Preventing <i>Clostridium</i> -spores causing butyric acid fermentation in processed cheese 43 pages + 5 appendices 20 October 2012
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio- and Foodtechnology
Specialisation option	Product Development and Quality Management
Instructor(s)	Paula Virolainen, Product Developer Veli-Matti Taavitsainen, Principal Lecturer Carola Fortelius, Lecturer
<p>Butyric acid fermentation caused by anaerobic <i>Clostridium</i> spores is the biggest microbiological disadvantage in processed cheese. <i>Clostridium</i> spores start to germinate if growing conditions are suitable.</p> <p>Previous publications have showed that butyric acid could be inhibited by several factors. In this thesis, three different factors that inhibit butyric acid fermentation in processed cheese are compared. These factors are nisin, sorbic acid and the Joha HBS® emulsifying salt.</p> <p>The aim of the thesis project was to investigate inhibition effects of the three factors on butyric acid fermentation in processed cheese. Nisin, sorbic acid and the Joha HBS® emulsifying salt were examined by experimental cooking. It was also examined whether preservative-free processed cheese fulfills its shelf-life requirements.</p> <p>The experimental layout and statistical analysis were made using the R statistical software. Results were analyzed by linear regression and response surfaces.</p> <p>Results showed that nisin used alone proved to be the best preservative whereas nisin combined with Joha HBS® proved to prevent butyric acid fermentation even better. Preservative-free processed cheese did not meet the stability requirements in the tests carried out during the thesis project.</p>	
Keywords	processed cheese, <i>Clostridium</i> spores, butyric acid fermentation

Sisällys

1	Johdanto	1
	KIRJALLISUUSOSIO	2
2	Sulatejuusto yleisesti	2
2.1	Sulatejuuston valmistusprosessi	2
2.2	Raaka-ainejuustotyypit	4
2.3	Sulatejuustoon muut raaka-aineet	4
2.4	Veden merkitys sulatejuuston valmistuksessa	5
2.5	Sulatesuolat	5
2.5.1	Sulatesuolojen merkitys sulatejuustossa	5
2.5.2	Erilaiset sulatesuolat	9
3	Klostridi-itiöt juustossa	10
3.1	<i>Clostridium</i> -suvun bakteerit yleisesti	10
3.2	Itiöiden lämmönkestävyys	11
3.3	Itiöiden rakenne ja biologia	11
3.4	Yleisimmät klostridi-bakteerit juustoissa	13
3.5	Maidon kontaminoituminen	14
4	Klostridi-itiöiden itämisen ehkäiseminen	15
4.1	Nisiini	15
4.2	Sorbiinihappo	16
4.3	Rasva	16
4.4	Sulatesuolojen antimikrobiset vaikutukset	17
4.4.1	Joha HBS® -sulatesuola	17
4.4.2	Maidon baktofugointi	18
	Kokeellinen osa	19
	Työn tausta ja tavoitteet	19
5	Materiaalit ja menetelmät	19
5.1	Keittokokeissa käytetyt raaka-aineet	19
5.2	Klostridi-itiöiden määrittäminen ja MPN-menetelmä	19
5.3	Sulatejuustojen säilyvyyskoe	20
5.4	Haihtuvat karboksyylihapot sulatejuustossa	21
5.5	Sulatejuusto – keittokokeet ja tilastollinen koesuunnittelu	21

5.5.1	Koesuunnittelun keskeiset periaatteet	22
5.5.2	Koesuunnitelma ja tulosten analyysimenetelmät	23
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	26
6.1	Keittokokeiden raaka-ainejuustoseoksien klostridi-itiöpitoisuudet	26
6.2	Keittokokeiden tulokset	27
6.2.1	Tulokset jääkaappisäilytetystä sulatejuustosta	28
6.2.2	Tulokset +37 °C:ssa 2 viikkoa säilytetyistä sulatejuustoista	33
6.2.3	Haihtuvat karboksyylihapot keittokokeista	38
6.3	MPN-menetelmän ja mikrobiologisten tuloksien arviointi	39
7	Yhteenveto ja pohdintaa	40
	Lähteet	41
	Liitteet	
	Liite 1: Klostridi-itiöiden kasvualusta	
	Liite 2: MPN-taulukko	
	Liite 3: Keittokokeista (+37 °C ja +30 °C 4 viikkoa) tehdyt klostridi-itiömääritykset.	
	Liite 4: Keittokokeista tehdyt haihtuvat karboksyylihapot	
	Liite 5: R-käskyt	

1 Johdanto

Sulatejuustojen yleisin mikrobiologinen haitta on voihappokäyminen. Voihappokäymistä aiheuttavat anaerobiset itiöitä muodostavat *Clostridium*-suvun bakteerit. *Clostridium tyrobutyricum* on pääasiallinen voihappokäymistä aiheuttava bakteeri, mutta myös *C. beijerinckii*, *C. butyricum* ja *C. sporogenes* -bakteerien tiedetään aiheuttavan voihappokäymistä. (Le Bourhis ym. 2007) Huokoinen rakenne ja paha haju ovat merkkejä klostridi-itiöiden aiheuttamasta voihappokäymisestä.

Klostridi-itiöiden pääasiallinen pääsyreitti maitoon on ulosteen kautta lypsyn yhteydessä. Ulosteeseen klostridi-itiöt pääsevät pilaantuneen rehun kautta. Juuston valmistuksessa klostridi-itiöiden määrä konsentroituu, ja näin pienikin määrä itiöitä voi aiheuttaa ongelmia juustoissa. (Ledenbach & Marshall 2010: 48-50)

Klostridi-itiöt selviävät hengissä sulatejuustojen kuumennuskäsittelyssä ja saattavat itää ja kasvaa sulatejuustossa, jos kasvuolosuhteet ovat suotuisat. Emmental-, edam- ja goudajuustoissa klostridi-itiöiden aiheuttamaa voihappokäymistä esiintyy useammin kuin muissa juustoissa, koska niissä on korkea pH, kosteuspitoisuus ja matala suolapitoisuus verrattuna muihin juustoihin. Näitä juustoja käytetään yleisesti sulatejuustojen valmistuksessa. (Doyle & Beuchat 2007: 150)

Tutkimuksen hypoteesina on, että raaka-aine juustoissa olevat klostridi-itiöt aiheuttavat voihappokäymistä sulatejuustossa. Tavoitteena on ehkäistä voihappokäymistä säilöntäaineilla ja sulatesuoloilla.

KIRJALLISUUSOSIO

2 Sulatejuusto yleisesti

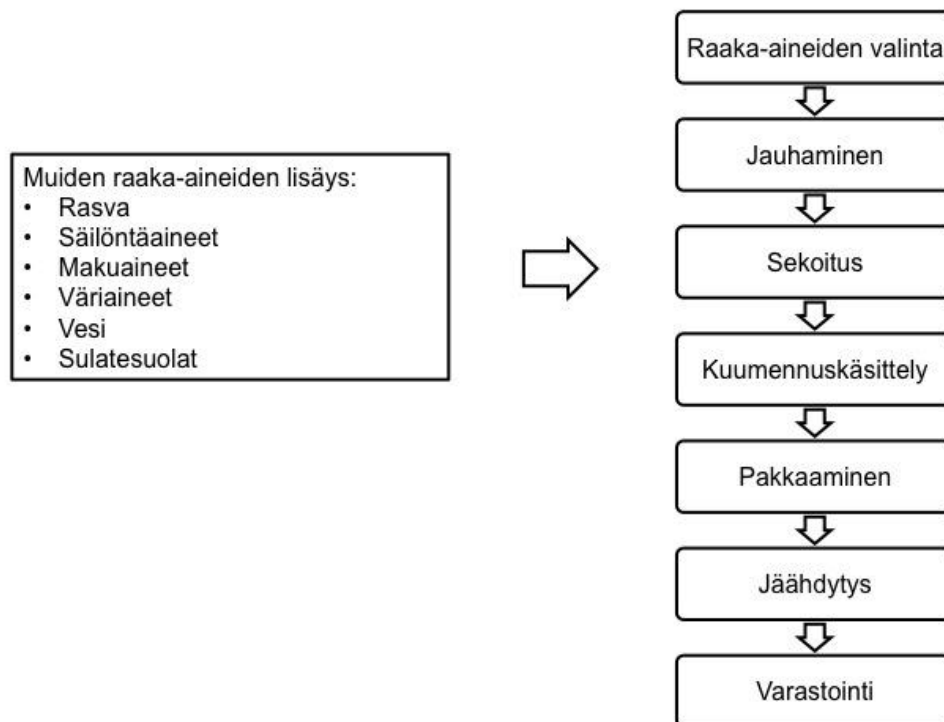
Sulatejuusto on eri juustotyypeistä valmistettu homogeeninen seos. Sulatejuustoja valmistetaan monen erimakuista ja -tyyppisiä, kuten viipaleita, levitteitä ja leikattavia blokkeja. Sulatejuustotyyppien suurimpana erona ovat niiden kuiva-ainepitoisuudet, joiden avulla saadaan niille tyyppisiä ominaisuuksia, kuten levitettävyyttä.

Sulatejuuston etuja ovat muun muassa, että sen valmistuksessa pystytään hyödyntämään juustonpakkauksessa syntyviä leikkauskantteja ja 2. luokan juustoja, jotka ovat esimerkiksi juustoja, joiden valmistuksessa on tapahtunut virheitä ja joita ei voida laittaa myyntiin sellaisenaan. Sulatejuustojen kuumennuskäsittelyn vuoksi niissä ei ole patogeenisiä mikro-organismeja ja niiden säilyvyysaika on noin 3-12 kuukautta. Sulatejuustoissa ravintosisältö on myös hyvä, niissä on paljon proteiineja, vitamiineja ja mineraaleja. (Gouda & El-Nour 2003: 1108)

2.1 Sulatejuuston valmistusprosessi

Sulatejuusto valmistetaan kuumentamalla erityyppisiä juustoja. Valmistusprosessin ensimmäisessä vaiheessa raaka-ainejuustot jauhetaan. Tämän jälkeen lisätään vesi, jauheet, mausteet, voi ja sulatesuolat. Sulatesuolat toimivat paremmin, kun raaka-aineet on jauhettu ennen keittämistä, koska ne saavat enemmän kosketuspinta-alaa juustojen kanssa. Seos keitetään yleensä yli 75 °C:ssa, jotta sulatesuolat alkavat toimia ja näin varmistetaan tuotteen pastöroituminen. (Gouda & El-Nour 2003: 1112-1113) Keittoaika- ja lämpötila riippuvat valmistettavasta sulatejuustotyypistä. Esimerkiksi leikattavien blokkityyppisten sulatejuustojen keittoaika on noin 4-8 minuuttia 80-85 °C:ssa. Levitettävät sulatejuustot vaativat yleisesti pidemmän keittoajan, joka on yleisesti 8-15 minuuttia 85-95 °C:ssa. (Meyer 1973: 149-150) Kuumennus voidaan tehdä suoralla höyryllä tai vaippalämmityksellä. Sulatejuustomassan panoskoko vaihtelee yleisesti noin 200 - 800 kg välillä. Keittämisen jälkeen sulatejuusto pakataan kuumana (> 71 °C), jotta pystytään ehkäisemään vegetatiivisten bakteerien kontaminaatio valmiissa tuotteessa. Pakkaamisen jälkeen sulatejuustot ovat vielä melko lämpimiä, ja ne jäähdytetään huoneenlämpötilaan sulatejuustotyypille sopivalla ajalla ja tavalla. Levitettävät sulatejuustot jäähdytetään 30-60 minuutissa, jotta vältetään sulatejuuston ylik-

moittumiselta, joka saattaa aiheuttaa rasvan ja veden erottumisen sulatejuustosta. Leikkavien sulatejuustojen jäähdyttäminen voi kestää jopa 10-15 tuntia, jotta saadaan blokkijuustolle ominainen rakenne. Vaarana tässä on itiöitä muodostavien mikro-organismien kasvaminen. Kun sulatejuusto on jäähdytetty, sitä tulisi säilyttää 5-10 °C:ssa. On suositeltavaa pitää sulatejuusto yli 0 °C:n, jotta estettäisiin sen jäätyminen, ja alle 20 °C:n, jotta välttyttäisiin mikro-organismien aiheuttamilta haitoilta. Kuviossa 1 on vielä esitetty sulatejuuston valmistusprosessi vaiheittain. (Gouda & El-Nour 2003: 1112-1113)



Kuvio 1. Sulatejuuston valmistusprosessi. (Kapoor & Metzger 2008. Muokattu.)

2.2 Raaka-ainejuustotyypit

Juustojen tyyppi ja kypsyytys vaikuttavat sulatejuuston makuun ja rakenteeseen. Juustotyypillä tarkoitetaan pehmeitä, puolikovia ja kovia juustoja. Esimerkiksi parmesaani on kova juusto, edam puolikova ja brie pehmeä juusto. Sulatejuuston valmistukseen käytetään pääasiassa vain kovia ja puolikovia juustoja. Pehmeitä juustoja käytetään yleisesti makujen antamiseen sulatejuustossa. Yhdistelemällä raaka-aineeksi pitkän ja lyhyen kypsytysajan juustoja voidaan vaikuttaa sulatejuuston rakenteeseen ja makuun. Esimerkiksi pelkistä nuorista juustoista valmistettu sulatejuusto maistuu lattealta ja sen rakenne on kova. (Gouda & El-Nour 2003: 1110)

2.3 Sulatejuustoon muut raaka-aineet

Sulatejuuston valmistuksessa käytetään usein esisulatetta, joka on kertaalleen keitettyä sulatejuustomassaa. Esisulatettua juustoa saadaan usein sulatejuustosta, jonka valmistuksessa on esimerkiksi tapahtunut pakkausvirheitä ja jota ei voida laittaa myyntiin. Esisulatettua juustoa saadaan myös pakkaamatta jääneestä valmiista sulatejuustosta. Esisulatteen käyttö parantaa tuotteen kermoittumista. (Berger ym. 1998: 89) Voit lisätä sulatejuustoon nostamaan rasvapitoisuus halutulle tasolle. Rasvan lisäys vähentää huomattavasti viskositeettia ja tekee sulatejuustomassan koostumuksen pehmeämmäksi. (Berger ym. 1998: 96)

Sulatejuustomassaan voidaan lisätä esimerkiksi maitojauhetta ja herajauhetta. Maitojauhe tukee yleisesti kermoittumista, mutta maun takia sitä ei voi käyttää yli 10 %:a koko sulatejuuston panoksesta. Herajauhe alentaa viskositeettia ja sen käyttöä suositellaan kermoittuvan raaka-aineen kanssa. Herajauhetta ei tule myöskään käyttää yli 10 %:a koko sulatejuuston panoksesta, koska se aiheuttaa sulatejuuston makeansuolaisen heran maun. (Meyer 1973: 89-92) Sulatejuustoon lisätään usein myös mausteita ja väriaineita. Ne lisätään seoksen kuumennusprosessin alussa, millä taataan niiden sekoittuminen ja pastöroituminen. (Berger ym. 1998: 99)

2.4 Veden merkitys sulatejuuston valmistuksessa

Vesi on välttämätön homogeenisen sulatejuuston valmistuksessa. Se mahdollistaa sulatesuolojen toiminnan ja soolin muodostumisen juustojen sulaessa mekaanisten toimintojen ja lämmityksen seurauksena. Suurin osa raaka-ainejuustojen vedestä on sidottuna kaseiiniin, joten juustojen vesipitoisuus ei ole riittävä sulatejuuston valmistukseen. Vettä joudutaan lisäämään dispersion muodostumiseksi. Lisättävän veden määrä pystytään laskemaan raaka-aineiden ja lopputuotteen kuiva-ainepitoisuuksien avulla. (Berger ym. 1998: 91-92)

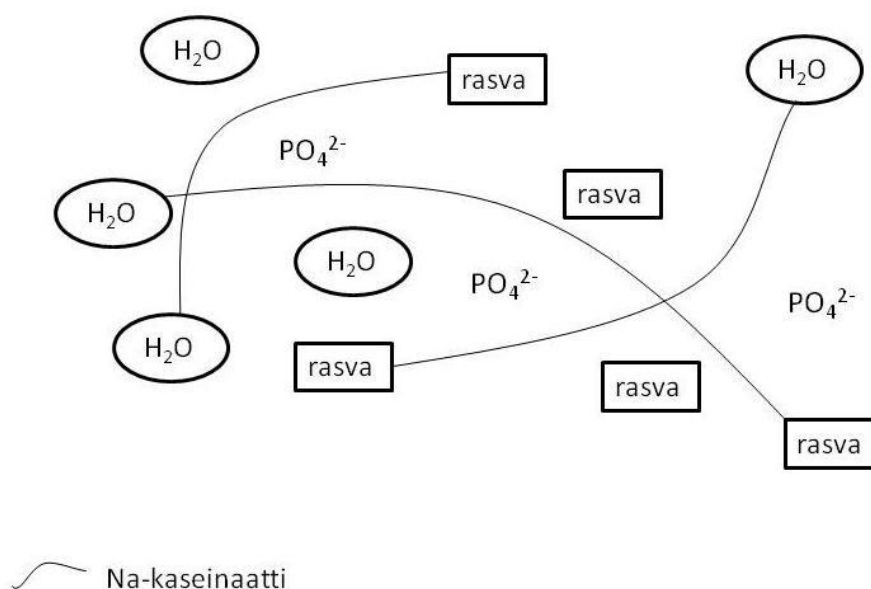
Vesi voidaan lisätä juustoseokseen kerralla tai kahdessa osassa. Osissa lisäämisen etuna on kaseiinin parempi absorptiokyky konsentroituneemman suolaliuoksen ansiosta. Vedenlisäyksen tapa riippuu raaka-aineiden ominaisuuksista ja tuotteen tyypistä eli siitä, onko tuote levitettävä tai leikattava sulatejuusto. Leikattavissa sulatejuustoissa vesi lisätään tyypillisesti kerralla ja levitettävissä kahdessa osassa, mikä parantaa levitettävän sulatejuuston kermoittumista. (Berger ym. 1998: 91-92)

2.5 Sulatesuolat

2.5.1 Sulatesuolojen merkitys sulatejuustossa

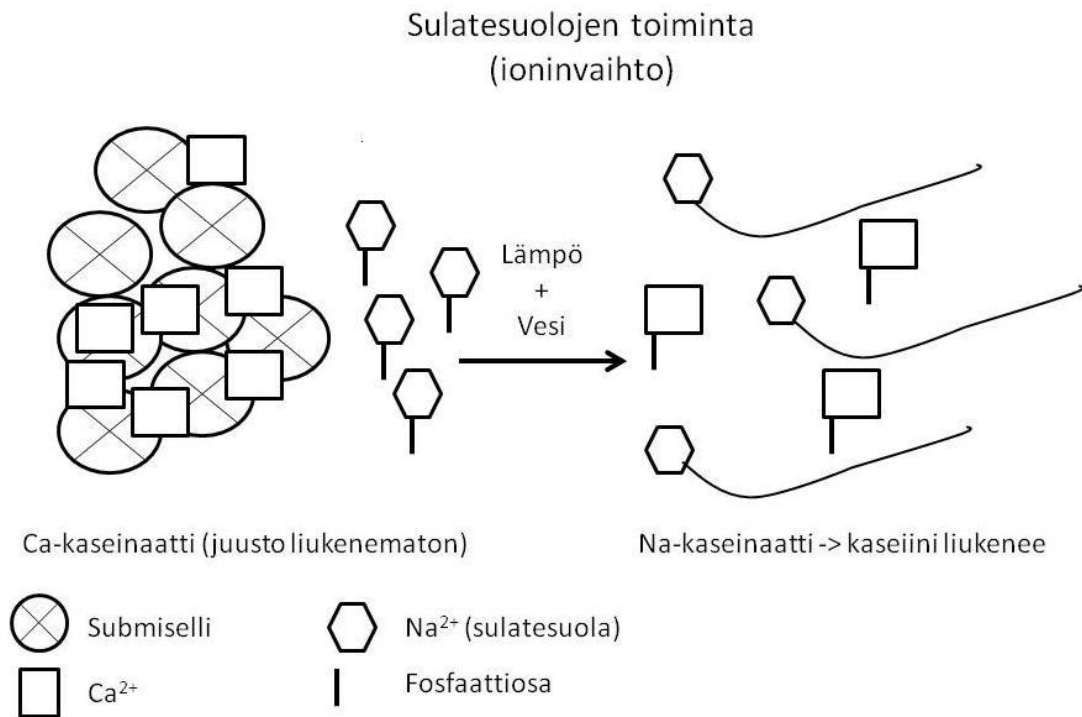
Sulatesuolat ovat sulatejuuston valmistuksessa käytettäviä suoloja, joiden avulla sulatejuuston rakenne saadaan tasaiseksi emulsioksi. Normaalisti juustossa on öljy vedessä -emulsio, jota juustoproteiinit pitävät kasassa. Kuitenkin tämä emulsio hajoaa sulatejuuston valmistuksessa, jossa muun muassa juustoa kuumennetaan, sekoitetaan ja pH:ta säädetään. Sulatesuoloilla estetään proteiinien ja rasvojen erottuminen toisistaan. (Gouda & El-Nour 2003: 1111) Na-kaseinaatti on hyvä emulgaattori, se sitoo toiseen päähänsä rasvan ja toiseen veden. Näin muodostuu verkkomainen rakenne, joka sitoo irrallaan olevan rasvan, veden ja kalsiumin sisäänsä. Emulgoitunut sulatejuusto ei veny eikä ole tahmea. Se tuntuu suussa sileältä ja massa on kiiltävää. (Berger ym. 1998: 52-53). Kuviossa 2 on esitetty sulatejuuston emulgoituminen.

Emulgoituminen eli kermoittuminen



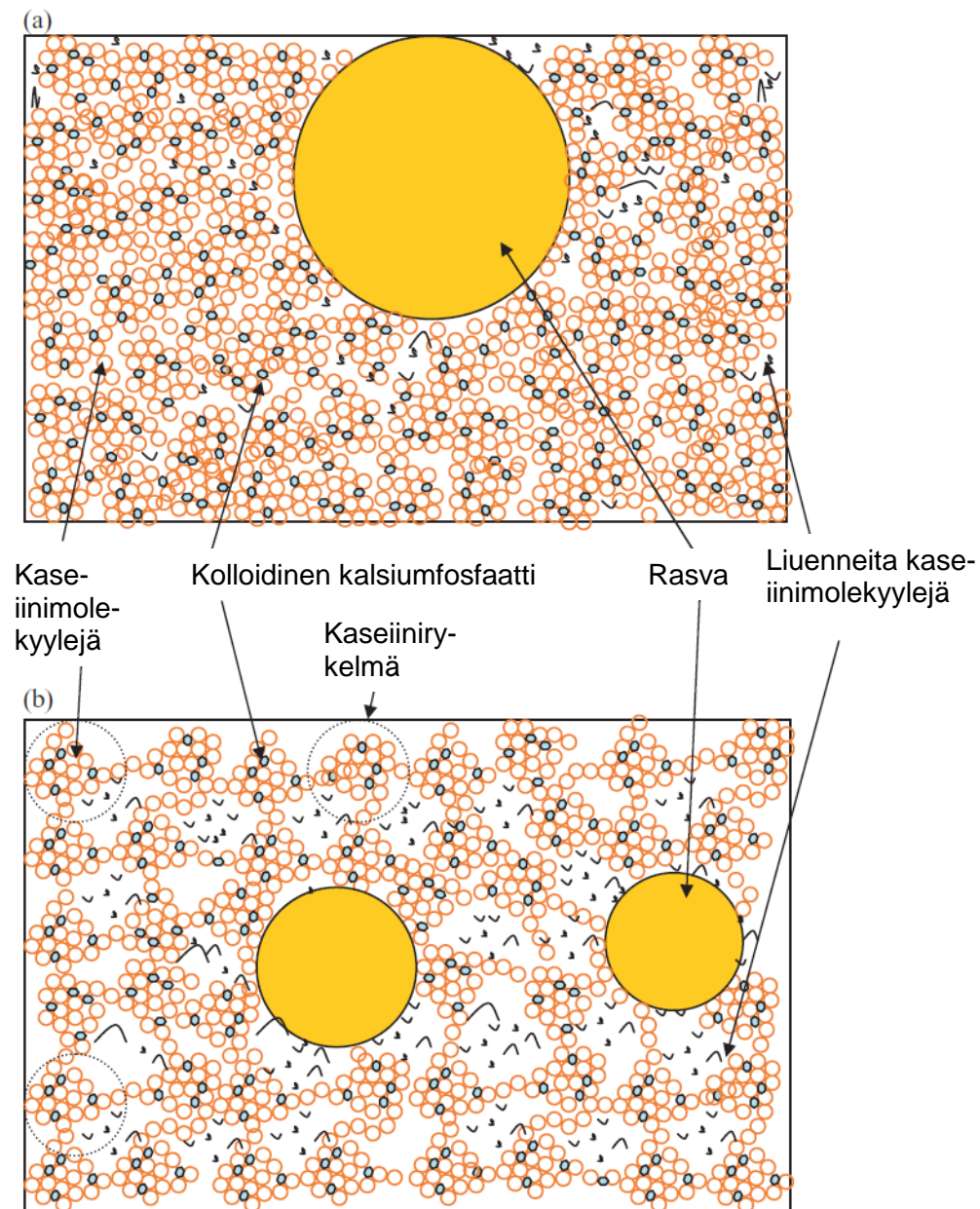
Kuvio 2. Na-kaseinaatti luo verkkomaisen rakenteen sitoessaan rasvan ja veden sisäänsä. Emulgoitunut sulatejuusto ei veny eikä ole tahmea, ja sen suutuntuma on hyvä. (Virolainen 2012)

Polyfosfaateilla on suuri sitomiskyky moniarvoisille kationeille. Niiden tehtävänä sulatejuustossa on sitoa kaksiarvoinen kalsium, joka määrittää juustogeelin rakenteen vakauden. Sitomisen seurauksena juusto muuttuu juoksevaan muotoon eli sooliksi, joka jäähtyessään muuttuu vakaaksi homogeeniseksi geeliksi. (Maier ym. 1999) Pääasiassa sulatesuolat, joita käytetään sulatejuuston valmistuksessa, ovat sekoituksia, jotka sisältävät erilaisia sitraatteja ja fosfaatteja. Sulatejuustojen valmistuksessa käytetään noin 2 % - 3 % sulatesuoloja, riippuen käytettävästä raaka-aineesta ja suhteellisesta kaseiinipitoisuudesta. Suhteellinen kaseiinipitoisuus on liukenemattoman kaseiinitypen suhde kokonaistypen määrään. Korkean suhteellisen kaseiinipitoisuuden omaavat juustot soveltuvat parhaiten sulatejuuston valmistukseen. Suhteellinen kaseiinipitoisuus pienenee juuston kypsyessä. Kuviossa 3 on esitetty sulatesuolojen toiminta. (Gouda & El-Nour 2003: 1110)



Kuvio 3. Sulatesuola muuntaa juuston veteen liukenemattoman Ca-kaseinaatin liukoiseksi. Sulatesuolojen Na^+ -ionit korvaavat Ca-kaseinaatin Ca^{2+} -ionit. Tästä syntyvä Na-kaseinaatti toimii emulgaattorina rasva- ja vesiosien välillä. (Virolainen 2012)

Sulatejuustogeelin muodostuessa juuston kaseiinarakenteet ovat hajonneet ja muodostaneet rykelmiä. Sulatejuuston valmistuksessa rasva hajoaa pienemmiksi rasvapalloiksi. Kuviossa 4 on esitelty sulatejuuston ja kypsytetyn juuston rakenne-erot. (Kapoor & Metzger 2008.)



Kuvio 4. Kuvassa a on kypsytetyn juuston rakenne ja kuvassa b on sulatejuuston rakenne. Kuvista huomaa sulatejuuston pienemmät rasvapallot sekä kaseiinimolekyylirykelmät, jotka ovat edellytykset sulatejuuston geelimäiselle rakenteelle. (Kapoor & Metzger 2008. Muokattu.)

2.5.2 Erilaiset sulatesuolat

Monofosfaatit

Monofosfaatit ovat fosforihapon suoloja, ja ne valmistetaan luonnon mineraaleista, kuten kalsiumsuoloista rikkihapon tai lämpökäsittelyn avulla. Monofosfaateista valmistetaan mononatrium-monofosfaatteja, dinatrium-monofosfaatteja ja trinatrium-monofosfaatteja. Yleisesti monofosfaatit ovat vesiliukoisia, ja niillä on hyvä puskurikyky. (Berger ym. 1998: 68-69) Mono- ja trinatrium-monofosfaatteja käytetään yleisesti pH:n säätämiseen. Monofosfaateilla ei ole kermoittumiskykyä, ja pelkästään monofosfaatteja käytettäessä sulatejuuston rakenne jäisi melko ohueksi. Monofosfaattien suurimmat mahdolliset haittapuolet on hiekkamaisen rakenteen ja saippuamaisen maun aiheuttaminen sulatejuustoon. (Meyer 1973: 43–44)

Polyfosfaatit

Polyfosfaatteja saadaan kuumentamalla monofosfaatteja. Yleisimmät sulatejuuston valmistuksessa käytettävät polyfosfaatit ovat mono-, di-, tri- ja tetranatrium-difosfaatit. Difosfaattien kalsiumin sidontakyky ja liukoisuus ovat alhaiset, mutta vedensidontakyky on hyvä. Polyfosfaattien voimakas kermoittumiskyky saattaa johtaa ylikermoittumiseen ja massan kovettumiseen, joka on sulatejuuston valmistuksessa yleisimpiä valmistusvirheitä. (Berger ym. 1998: 68-70)

Sitraatit

Sitraatit valmistetaan sitruunahaposta, yleisimmät ovat mono-, di-, ja trinatriumsitraatit. Sitraateilla on hyvät kalsiumin sitomis- ja proteiinien liuottamis-ominaisuudet. Sitraattien käyttö tekee sulatejuuston rakenteen elastiseksi ja kiinteäksi, minkä takia se soveltuu hyvin leikattavien sulatejuustojen valmistukseen. (Berger ym. 1998: 71-72) Sitraattien haittapuolina ovat huono kermoittumiskyky ja heikot bakteriostaattiset ominaisuudet (Meyer 1973: 43).

Sulatesuoloilla on myös hyvät antimikrobiset vaikutukset sulatejuustossa, joista lisää kohdassa 4.4. Alla olevassa luettelossa on yhteenvetona sulatesuolojen pääasialliset tehtävät sulatejuustojen valmistuksessa.

- Kalsiumin poistaminen proteiineista
- Proteiinien dispersion muodostaminen
- Proteiinien hydraatio ja kermoittuminen
- Sulatejuuston emulsion ja pH:n kontrolloiminen ja stabiloiminen
- Mikrobiologisen pilaantumisen estäminen
(Gouda & El-Nour 2003: 1111)

3 Klostridi-itiöt juustossa

3.1 *Clostridium*-suvun bakteerit yleisesti

Clostridium-suvun bakteerit ovat grampositiivisia sauvamuotoisia bakteereita, jotka liikkuvat peritrikkisten flagellojen avulla. Klostridit fermentoivat sokereita, polyalkoholeja, aminohappoja, orgaanisia happoja ja orgaanisia yhdisteitä. Yleensä ne ovat ehdottoman anaerobisia. (Breed ym. 1957: 634) Klostridit ovat yleisiä maaperän bakteereita kaikkialla maailmassa, ja niitä esiintyy myös merten pohjalla. Klostridit muodostavat itiöitä, minkä vuoksi niitä on vaikea tuhota. Itiömuodossa ne sietävät happea, kuivuutta pakastamista ja keittämistä. Itiöillä on kuitenkin merkitystä vain, mikäli ne pääsevät germinoitumaan ja lisääntymään vegetatiivisoluina. (James 1992: 22) Monet *Clostridium*-suvun bakteerit aiheuttavat tauteja ihmisessä ja eläimissä sekä pilaavat elintarvikkeita. *Clostridium botulinum* on klassisin ja pelätyin taudin aiheuttaja, joka voi aiheuttaa hengenvaarallisen botulismitaudin. *Clostridium perfringens* taas aiheuttaa lievempiä ruokamyrkytyksiä. *C. perfringens* -bakteerien aiheuttama ripulitauti ei ole kovin vaarallinen mutta sitäkin yleisempi. Elintarvikkeiden pilaajina ovat yleensä *Clostridium*-suvun bakteerit, jotka eivät aiheuta ruokamyrkytyksiä ihmiseen. Juustojen voi happokäyminen on yleinen klostridien aiheuttama pilaantumisprosessi. (Hielm 2002: 652-653)

3.2 Itiöiden lämmönkestävyys

Itiöitä muodostavat bakteerit ovat usein ongelma elintarviketeollisuudessa. Ne aiheuttavat sairauksia ja elintarvikkeiden pilaantumista. Yleensä itiöt aiheuttavat ongelmia vähähappamissa (pH >4,6) elintarvikkeissa, jotka on pakattu tölkkeihin, pulloihin tai vakuumiin ja jotka ovat lämpökäsiteltyjä. Itiöiden tuhoaminen vaatii rajumman kuumentuskäsittelyn kuin vegetatiiviset solut. *Clostridium botulinum* -bakteerien itiöt ovat kaikkein lämpökestävimmät patogeeniset itiöt ja niiden tuhoaminen on täyssäilykkeiden valmistuksessa pääasiallinen tehtävä. Yleensä vähähappamat tölkitetyt elintarvikkeet kuumentetaan 3 – 6 minuuttia 121 °C:ssa, jotta varmistutaan *Clostridium botulinum* – bakteerien itiöiden tuhoaminen. (Montville & Matthews 2008. 39-41) Useita elintarvikkeita ei voida kuumentaa niin paljon, että kaikki itiöt tuhoutuisivat, koska kovat kuumentuskäsittelyt aiheuttavat usein virheitä elintarvikkeen rakenteeseen ja makuun, joten itiöiden itäminen täytyy usein estää säilöntäaineilla. Itiöt kestävät hyvin lämpöä johtuen niiden suuresta pyridiini-2,6-dikarboksyylihappopitoisuudesta (Prescott ym. 1996: 67-68).

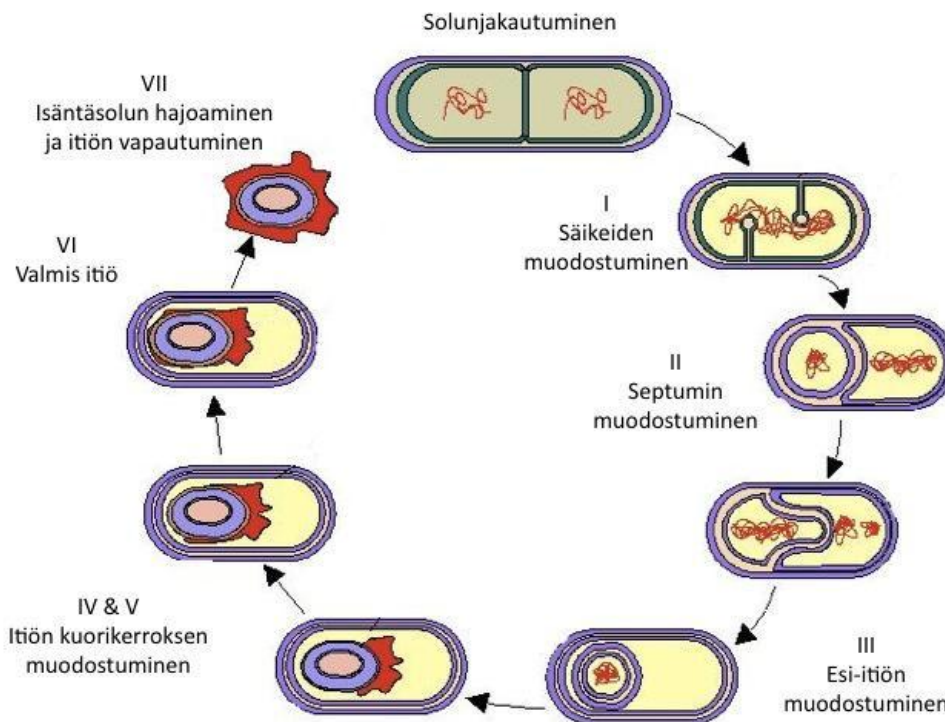
3.3 Itiöiden rakenne ja biologia

Eräät grampositiiviset bakteerit voivat muodostaa erittäin vastustuskykyisiä lepotilassa olevia itiöitä. Itiöt muodostuvat vegetatiivisista bakteereista. Itiöt ovat bakteerien lepo-
muotoja, joiden muodostuminen alkaa usein silloin, kun solun normaali kasvu loppuu ravinnonpuutteen vuoksi. Itiöiden muodostuminen on monimutkainen prosessi, ja se koostuu seitsemästä osasta, jotka ovat esitelty kuviossa 5. (Prescott ym. 1996: 67)

Ensimmäisessä vaiheessa itiön ydin ja säikeet alkavat muodostua (vaihe I), tämän jälkeen septumi alkaa muodostua ja sulkee sisäänsä osan DNA:sta (vaihe II). Membraani jatkaa kasvuaan ja luo toisen kuorikerroksen (vaihe III). Kuorikerroksien väliin muodostuu kalsiumia ja pyridiini-2,6-dikarboksyylihappoa (vaihe IV). Proteiinipäälyste muodostuu ulomman kuorikerroksen päälle (vaihe V). Tämän jälkeen itiö kypsyy valmiiksi (vaihe VI) ja on valmis irtaantumaan isäntäsolusta tämän tuhoutumisen seurauksena (vaihe VII). Tässä vaiheessa itiö on lepotilassa. (Prescott ym. 1996: 67-69) Itiöt eroavat kemiallisesti, rakenteellisesti ja fysiologisesti vegetatiivisista soluista. Itiöt ovat metabolisesti lepotilassa, joka johtuu sen matalasta vesipitoisuudesta. Lepotilan ansiosta itiöt

selviävät todella pitkiä aikoja ilman ravinteita. Toiseksi itiöt ovat melko resistentteja lämmölle, säteilylle, kemikaaleilla ja kuivaukselle. (Montville ym. 2008: 47-51)

Itiön aktivoituminen vegetatiiviseksi bakteeriksi on kolmivaiheinen prosessi, jossa itiö aktivoituu, itää ja lopulta muodostuu vegetatiivinen bakteeri. Itiön aktivoituminen on palautuva prosessi, joka herättää itiön itämiselle. Itiöt aktivoituvat lepotilasta, kun lämpötila ja muut kasvuolosuhteet ovat sille suotuisat. Uloskasvamisen aikana itiö saa vegetatiiviselle solulle tyypilliset ominaisuudet, kuten kyvyn syntetisoida aminohappoja, nukleotideja ja muita molekyyliä. (Prescott ym. 1996: 67-69)



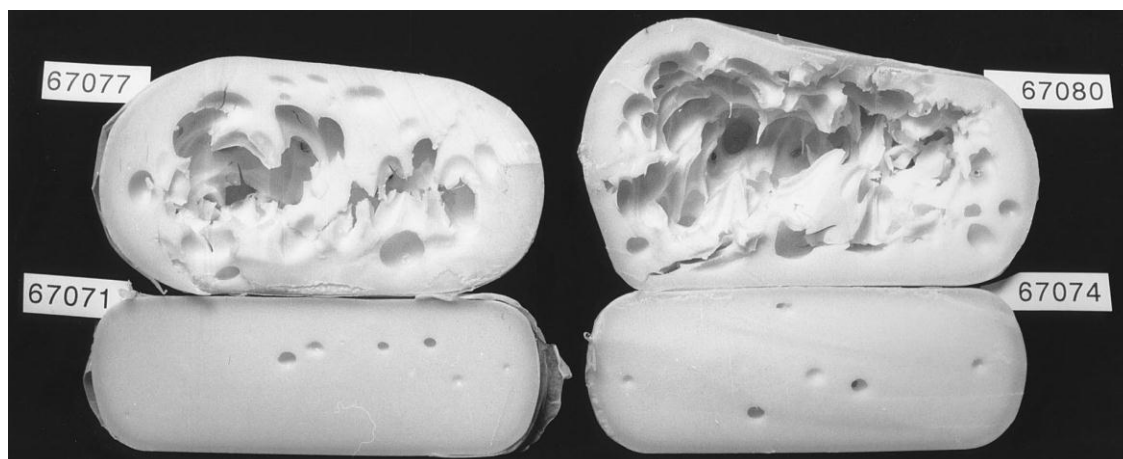
Kuvio 5. Itiön muodostuminen vegetatiivisesta solusta vaiheittain. (Montville ym. 68. Muokattu.)

3.4 Yleisimmät klostridi-bakteerit juustoissa

Clostridium-suvun bakteerit kuten *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* ja *C. sporogenes* ovat yleisimmät virheitä aiheuttavia itiöitä juustoissa. *C. tyrobutyricum* -bakteerit aiheuttavat sulatejuuston pullistumista, *C. butyricum* voi happokäymistä ja *C. sporogenes* mätäkäymistä. Klostridi-itiöt selviävät hengissä sulatejuustojen kuumennuskäsittelyssä ja saattavat itää ja kasvaa juustossa, jos kasvuolosuhteet ovat suotuisat. Niiden yleisin haitta juustoissa on kaasun muodostaminen ja hajuhaitat. Nämä bakteerit muodostavat happea ja hiilidioksidia hapettomissa olosuhteissa. Emmental-, edam- ja goudajuustoissa klostridien muodostamaa kaasua esiintyy useammin kuin muissa juustoissa, koska niissä on korkea pH, kosteuspitoisuus ja matala suolapitoisuus verrattuna muihin juustoihin. Gouda- ja edamjuustot kypsytetään 16 °C:ssa ja emmentaljuustot jopa 24 °C:ssa (Walstra ym. 1999). Varsinkin emmentaljuustojen korkea kypsytyslämpötila voi mahdollistaa joidenkin *Clostridium tyrobutyricum* -kantojen itämisen. Goudaa, edamia ja emmentalia käytetään yleisesti sulatejuustojen valmistuksessa. (Doyle & Beuchat 2007: 150)

C. tyrobutyricum ja voi happokäyminen

Kaasuja tuottavista *Clostridium*-suvun bakteereista *C. tyrobutyricum* tuottaa eniten kaasuja juustoissa (Le Bourhis ym. 2007). Sen optimimaalinen kasvu lämpötila on 30 – 37 °C:ssa. 25 °C:ssa kasvu on vähäistä, ja 45 °C:ssa se on maltillista tai kasvua ei esiinny ollenkaan. *C. tyrobutyricum* -bakteerin vegetatiiviset solut eivät selviä pastöroinnista (75 °C, 15–30 s), mutta itiöt ovat lämmönkestäviä 120 °C:seen asti. Optimi-pH kasvulle on 5,0 – 5,4. pH:n ollessa alle 5,0 *C. tyrobutyricum* -bakteerin kasvu ei ole mahdollista. *C. tyrobutyricum* ei kykene kasvamaan maidossa. Kuviossa 6 esitelty *C. tyrobutyricum* -bakteerin aiheuttamaa voi happokäymistä goudajuustossa. (Klantschitsch 1999: 4-5)



Kuvio 6. Ylhäällä (67077 ja 67080) olevat juustot on valmistettu maidosta, joka on kontaminoitunut *C. tyrobutyricum* -itiöillä ja niissä on tapahtunut laktaatin käymistä. Juustot (67071 ja 67074) olivat kontrollinäytteitä. (Klijn ym. 1995)

Kaasun muodostuminen johtuu laktaatin käymisestä, jonka seurauksena syntyy voi-happoa, etikkahappoa, hiilidioksidia ja happea. Tätä ilmiötä kutsutaan nimellä ”late blowing”. (Lena & Borch. 2006) *Clostridium tyrobutyricum* -itiöt rikastuvat maidossa juuston valmistuksessa (Doyle & Beuchat 2007: 150).

C. tyrobutyricum -itiöiden D-arvo 90 °C:ssa on 6,5–21 minuuttia. Tämä tarkoittaa että tuolla aikavälillä riippuen pH:sta ja matriisista itiöitä kuolee 90 %. Vaikka D-arvo vaihtelee paljon, tämä kertoo suuntaa antavaa tietoa *C. tyrobutyricum* -itiöiden lämmönkestävyydestä. (Cerf ym. 1967)

3.5 Maidon kontaminoituminen

Klostridi-itiöt pääsevät maitoon lehmistä, jotka syövät kontaminoitunutta säilörehua. Rehun mukana itiöt kulkevat eläimen ruoansulatuskanavan läpi ja pääsevät lannasta lehmän karvoihin, navettailmaan ja utareisiin. Tällöin lypsyn yhteydessä itiöiden on helppo kontaminoida maito, jollei hygieniasta huolehdita erityisen hyvin. Hyvällä utareiden hygienialla itiöiden määrää voidaan vähentää maidossa jopa kymmenkertaisesti. Utareen peseminen hypokloritilla ja kuivaaminen paperipyyhkeellä vähentää itiöiden määrää maidossa merkittävästi. Vuodenajan on myös huomattu vaikuttavan itiöiden määrään maidossa. Rehun itiöpitoisuudet ovat suurimmat talvikuukausina, jolloin rehua on säilötty jo suhteellisen pitkään. Alhaisin itiöpitoisuus on kesällä, jolloin rehu on tuoreinta. Maidon ja rehun itiöpitoisuudella on todettu olevan selkeä korrelaatio keske-

nään. Myös lehmien syömässä rehussa ja niiden ulosteessa on suora korrelaatio itiöpi-toisuuksissa. (Ledenbach & Marshall 2010: 48-50)

Yleistä raja-arvoa sille, kuinka paljon *C. tyrobutyricum* -itiöitä juustossa täytyy olla, jotta voi happokäymisestä aiheutuvat haitat tulevat esiin, ei ole määritelty, koska se riippuu täysin juustotyypistä. Se kuitenkin tiedetään, että jo muutama itiö/g maidossa voi aiheuttaa voi happokäymistä juustossa, jos kasvuolosuhteet ovat suotuisat, koska itiöt rikastuvat juuston valmistuksessa. *C. tyrobutyricum* ei ole patogeeninen bakteeri ihmisille ja eläimille. (Doyle & Beuchat 2007: 150)

4 Klostridi-itiöiden itämisen ehkäiseminen

4.1 Nisiini

Nisiini on luonnollinen antimikrobinen aine, jota syntyy *Lactococcus lactis* -bakteerin käymisen seurauksena ja jota esiintyy luontaisesti maidossa. Nisiini on siis maitohappobakteerin tuottama bakteriosiini. Bakteriosiinit ovat bakteerien tuottamia peptidejä, joilla on bakteerien kasvua estävä ja tuhoava vaikutus. Nisiiniä ei voida valmistaa synteettisesti, joten sitä tuotetaan *Lactococcus lactisen* avulla. Sitä käytetään yleisesti säilöntäaineena ruoka- ja maitoteollisuudessa, eikä sen käyttö aiheuta maku- tai hajuhaittoja. Nisiinillä on tehokas toimintakyky mikro-organismeja vastaan pH-alueella 3,5-8,0, joten sitä voidaan käyttää moniin elintarvikkeisiin. Nisiinillä on todistetusti inhihoiva vaikutus laajaa joukkoa grampositiivisia bakteereita vastaan, etenkin itiöitä muodostavia bakteereja vastaan. Nisiini ei kuitenkaan tehoa sieniin ja gramnegatiivisiin bakteereihin. Itiöt ovat yleisesti vastustuskykyisempiä bakteriosiineille kuin vegetatiiviset solut. Nisiini estää itiöiden itämistä diffundoitumalla soluun ja estämällä solun entsyymitoimintaa. Nisiini myös herkistää itiöitä kuumennukselle, joten kuumennuslämpötiloja ja -aikoja voidaan pienentää. (Danisco 2002: 1-7) Esimerkiksi kuumennuskäsittely heikosti happamille tölkitetyille elintarvikkeille vaatii F_0 -arvoksi 6-8, jotta varmistutaan *Clostridium botulinum* ja muiden pilaajamikro-organismien inaktivointi. Kun nisiini on läsnä samassa prosessissa, F_0 -arvoksi riittää 3, jolloin saadaan mikrobiologisesti turvallinen elintarvike (James 1992: 271-272). Nisiinille ei ole määritelty päivittäistä enimmäis-saantia eli ADI-arvoa (Evira. Lisäaineopas 2009: 27). Suomessa sen suurin sallittu käyttömäärä sulatejuustossa on 12,5 mg/kg (FINLEX 2012).

Nisiinin aktiivisuus laskee, kun elintarviketta prosessoidaan ja säilötään. Tämä johtuu elintarvikkeen lämpötilasta, pH:sta ja muista komponenttien muutoksista. Tämän vuoksi nisiinin käyttömäärän määrittäminen on välttämätöntä, jotta elintarvike pysyy stabiilina koko säilyvyysajan. (Delves-Broughton 1990; Hakovirta ym. 2005) Nisiini on vesiliukoinen ja liukenee huomattavasti paremmin happamaan liuokseen kuin neutraaliin tai heikosti emäksiseen liuokseen (Glass & Doyle 2005: 6).

4.2 Sorbiinihappo

Sorbiinihappoa esiintyy luontaisesti monissa marjoissa, mutta sitä valmistetaan synteettisesti krotonialdehydeistä ja keteeneistä. Sorbiinihappo on lyhytketjuinen tyydyttymätön rasvahappo, ja se liukenee kolme kertaa paremmin rasvaan kuin veteen. Sorbiinihappo ja sen suolat (sorbaatit) tehoavat parhaiten hiivoihin, homeisiin ja moniin bakteereihin lukuun ottamatta maitohappobakteereita. Yleisesti sorbiinihappo tehoaa paremmin katalaasipositiivisiin bakteereihin kuin katalaasi-negatiivisiin, ja aerobiset bakteerit ovat sille herkempiä kuin anaerobiset. Sorbiinihappo estää itiöiden muodostumista estämällä itiön vapautumisen isäntäsolusta. Sorbaattien antimikrobinen vaikutus on riippuvainen pH:sta. Sorbiinihappo toimii parhaiten hieman happamissa elintarvikkeissa, joissa pH on alle 6,0. Kun pH on lähellä 6,5:tä, sorbiinihappo on lähes toimintakyvytön. Sorbiinihappoa käytetään säilöntäaineena yleisesti muun muassa juustoihin ja hilloihin. (James 1992: 254-255). Sen päivittäinen hyväksyttävä enimmäisaanti (ADI) on 25 mg/kg/vrk. (Evira, Lisäaineopas 2009: 26). Suomessa sorbiinihapon suurin sallittu käyttömäärä sulatejuustossa on 2000 mg/kg (FINLEX 2012).

4.3 Rasva

Anaerobisten bakteerien kasvua pystytään ehkäisemään rasvapitoisuutta alentamalla sulatejuustossa. Tämä havaittiin, kun verrattiin muuten samanlaiseen tuotteeseen, jossa on sama pH-, suola- ja kosteuspitoisuus (Teir Steel ym. 1995). Tarkkaa syytä rasvan vähentämisen antimikrobiseen vaikutukseen ei tiedetä, mutta rasva luo suojaisen mikroympäristön bakteereille ja suojaa bakteereita antimikrobeilta tuotteen vesifaasisa. Vähärasvaiset sulatejuustot sisältävät usein maun vahvistajia, ja jotkut näistä vähentävät veden aktiivisuutta tai edistävät antimikrobisten aldehydien, peroksidien ja vapaiden rasvahappojen toimintaa. Nämä estävät klostridi-itiöiden kasvua. Rasvalla on heikentävä vaikutus useisiin antimikrobisiin aineisiin kuten nisiiniin ja sorbiinihappoon.

Kuitenkin joillakin rasvahapoilla, kuten kapriinihappo C₁₀, lauriinihappo C₁₂, öljyhappo C_{18:1} ja linolihappo C_{18:2}, on antimikrobisia vaikutuksia juustossa. (Glass & Doyle 2005: 5)

4.4 Sulatesuolojen antimikrobiset vaikutukset

Sulatesuolojen teknisten ominaisuuksien lisäksi niillä on hyvät antimikrobiset vaikutukset. Etenkin fosfaateilla on hyvät bakteriostaattiset vaikutukset. Ne eivät tapa mikro-organismeja, eikä niitä tämän vuoksi voi kutsua säilöntäaineiksi. Fosfaatit hidastavat mikro-organismien kasvua ja täten lisäävät sulatejuuston säilyvyysaikaa. Tämä pätee varsinkin polyfosfaateille, jotka ovat osoittaneet paljon suuremman bakteriostaattisen vaikutuksen kuin monofosfaatit. Tämä selittyy sillä, että monien mikro-organismien soluseinät ja -membraanit ovat tasapainossa Ca²⁺-ionien avulla. Polyfosfaateilla on kyky läpäistä solumembraani. Ne sitovat Ca²⁺-ioneja systeemistä muodostaakseen komplekseja ja täten ehkäisevät kalsiumin kykyä stabiloida mikro-organismien pintakerrosta. (Berger ym. 1998: 89)

4.4.1 Joha HBS® -sulatesuola

Joha HBS® -sulatesuolalla on sulatesuolan teknisten ominaisuuksien lisäksi hyvät antimikrobiset vaikutukset varsinkin grampositiivisia bakteereita vastaan. Maier ym. (1999) tutkivat Joha HBS® -sulatesuolan antimikrobisia vaikutuksia eri bakteereita vastaan sulatesuolalisäyksillä 0,1 % ja 1,0 %. 0,1 %:n lisäyksellä bakteerien kasvua saatiin hieman laskemaan, mutta 1 %:n lisäyksellä useimpien bakteerien kasvu saatiin lähes kokonaan loppumaan. Sulatejuuston pullistumista aiheuttava grampositiivinen *C. tyrobutyricum* -bakteerin kasvu estyi lähes kokonaan Joha HBS® -sulatesuolan avulla. Gramnegatiivisia bakteereita vastaan Joha HBS® -sulatesuolalla ei ollut niin suurta vaikutusta. (Maier ym. 1999)

4.4.2 Maidon baktofugointi

Klostridi-itiöiden aiheuttamia haittoja pyritään vähentämään emmentaljuustojen valmistuksessa baktofugoinnilla. Baktofugointi on mikrobien mekaaninen vähentämisprosessi. Se perustuu bakteereiden ja itiöiden separointiin keskipakoisvoiman avulla. Baktofugoinnin tärkein tehtävä on poistaa maidon voi-happobakteerien itiöitä. Se poistaa jopa 80 % itiöistä. Baktofugointi suoritetaan normaalisti noin 60 °C:ssa. (Wilbey ym. 1998: 132-133) Taulukossa 1 on esitelty baktofugoinnin vähentäviä vaikutuksia itiöihin.

Taulukko 1. Bakteerien ja itiöiden prosentuaalinen vähentyminen maidossa pastöroinnin ja pastöroinnin baktofugoinnin jälkeen. Muokattu. (Wilbey ym. 1998: 133)

	Pastöroitu (%)	Pastöroitu baktofugoinnin jälkeen (%)
Kokonaisbakteerit	99,2	99,8
Aerobiset itiöt	13	77
Anaerobiset itiöt	0	79

Baktofugointi on erittäin tehokas anaerobisille itiöille, mutta se ei kuitenkaan aina yksin riitä torjumaan itiöiden aiheuttamia haittoja sulatejuustossa. Baktofugoinnin lisäksi usein tarvitaan usein korkea kuumennuskäsittely tai jokin säilöntäaine estämään voi-happokäymistä.

Kokeellinen osa

Työn tausta ja tavoitteet

Elintarvikkeiden viimeaikaisena trendinä on ollut niiden luonnollisuus ja lisäaineettomuus. Nykypäivän laadukkaiden raaka-aineiden vuoksi opinnäytetyössä tutkittiin, täytääkö säilöntäaineeton sulatejuusto sen säilyvyysvaatimukset. Työssä myös vertailtiin eri säilöntäaineita ja niiden tehokkuuksia sulatejuuston voi happokäymistä vastaan, ja tutkittiin, onko Valion käyttämä sorbiinihappo paras säilöntäaine työssä käytetyn valmistusprosessin kaltaisille sulatejuustoille.

Opinnäytetyössä sulatejuustosta tehtiin eri säilöntäaineilla keittokokeita ja niiden vaikutuksia tutkittiin rasisuskokeen ja itiömääritysten avulla. Keittokokeiden avulla pyrittiin selvittämään säilöntäaineiden merkitys sulatejuustossa ja löytämään tehokkain tapa ehkäistä sulatejuustojen voi happokäymistä.

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Keittokokeissa käytetyt raaka-aineet

Keittokokeita varten saatiin edam- ja emmentaluustoja, joissa oli havaittu voi happokäymistä. Näistä raaka-ainejuustoista tehtiin mahdollisimman homogeeninen seos jauhamalla, minkä jälkeen juustoseoksesta määritettiin klostridi-itiöt.

5.2 Klostridi-itiöiden määrittäminen ja MPN-menetelmä

Klostridi-itiöt määritettiin Valio Oy:n Klostridi-itiöt (muut kuin raaka-maito näytteet) -ohjeen mukaan (Bergere & Sivelä 1990). Määrittämisessä käytetty kasvualusta on esitetty liitteessä 1.

Juustonäytettä punnittiin 10 g ja siihen näytteeseen lisättiin 90 ml dikaliumvetyfosfaattia, jonka jälkeen näyte homogenoitiin. Näytettä pipetoitiin BB-laktaatti-putkiin laimennokset 10^{-1} , 10^{-2} ja 10^{-3} , ja jokaisesta laimennoksesta 3 rinnakkaista näytettä eli yhteensä yhdeksään putkeen. Putkiin annosteltiin tämän jälkeen noin 2 ml steriloitua pa-

rafiiniöljyä. Putkia kuumennettiin 75 °C:n vesihauteessa 12 minuutin ajan, jolloin vegetatiivisolut tuhoutuivat. Heti kuumennuksen jälkeen putket jäähdytettiin kylmässä vesihauteessa. Putkia inkuboitii 7 vuorokautta 37 ± 1 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen laskettiin positiivisten putkien määrä. Kaasun muodostus Durham-putkessa oli osoitus positiivisesta tuloksesta. Klostridi-itiöiden pitoisuus luettiin MPN-taulukosta (liite 2).

Putkiviljely eli MPN-menetelmä

Klostridi-itiöiden tulokset ilmoitettiin MPN-lukuina. MPN-luku (Most Probable Number) kertoo todennäköisimmän itiöpitoisuuden tutkittavasta näytteestä näytegrammaa tai –millilitraa kohti. Putkiviljelyssä käytettiin kolmea rinnakkaista putkea. Käyttämällä vain kolmea rinnakkaista putkea luottamusväli tuloksissa on melko suuri. Esimerkiksi MPN-luku 43 tulee positiivisista putkista 3, 1 ja 0, eli -1-laimennoksessa kaikki kolme putkea ovat positiivisia, -2-laimennoksessa 1/3 on positiivinen ja -3-laimennoksessa ei ole yhtään positiivista putkea. MPN-luvulle 43 luottamusväli 95 % todennäköisyydellä on 9-181, joten kolmella rinnakkaisella putkella tulokset eivät ole kovin tarkkoja. Tarkempia tuloksia olisi saatu lisäämällä rinnakkaisten putkien määrää. Suurten näytemäärien vuoksi putkiviljelyt tehtiin kolmella rinnakkaisella putkella. Tutkimuksessa ei ollut tarkoituskaan saada tarkkaa tietoa paljon klostridi-itiöitä tutkittavassa näytteessä, vaan MPN-luvun suuruusluokka antaa riittävän tarkkaa tietoa. Tulosten tarkastelussa tuloksista otettiin 10-kantainen logaritmi ennen niiden tilastollista analysointia.

5.3 Sulatejuustojen säilyvyyskoe

Sulatejuustojen säilyvyyttä seurataan yleensä rasituskokeella ja parasta ennen -päivämäärän arvioinnilla. Sulatejuustot säilytetään jääkaappilämpötilassa, ja parasta ennen -päivämääränä niille tehdään aistinvarainen arviointi, jossa arvioidaan tuotteen laatu ja säilyvyysvaatimuksien täyttyminen. Rasituskoe suoritetaan yleisesti 4 viikkoa +30 °C:ssa tai 2 viikkoa +37 °C:ssa. Jos pullistumista ei havaita rasituskokeen aikana, voidaan olettaa, että tuote täyttää säilyvyysvaatimuksensa. Rasituskokeen lämpötila perustuu *C. tyrobutyricum* -itiöiden optimaaliseen kasvulämpötilaan. (Lycken & Borch 2006)

Keittokokeista valmistetuille sulatejuustoille suoritettiin myös rasituskoe 4 viikkoa +30 °C:ssa ja + 37 °C:ssa sekä 2 viikkoa +37 °C:ssa.

5.4 Haihtuvat karboksyylihapot sulatejuustossa

Clostridium tyrobutyricum -bakteerin aiheuttaman voi happokäymisen seurauksena syntyy voi happoa, etikkahappoa, hiilidioksidia ja happea (Lena & Borch 2006). Voi happo ja etikkahappo ovat haihtuvia yhdisteitä, joten niiden määrä voidaan määrittää kaasukromatografialla.

Voi hapon ja etikkahapon määrä määritettiin keittokokeista tehdyistä sulatejuustoista. Haihtuvien happojen määrää verrattiin itiömääritysten tuloksiin ja pohdittiin, voiko haihtuvien happojen perusteella kertoa, kuinka paljon tuotteessa on klostridi-itiöitä. Valion tutkimus- ja tuotekehitysyksikön kemian osasto määrittäi haihtuvat karboksyylihapot. (Jong & Badings 1990)

5.5 Sulatejuusto – keittokokeet ja tilastollinen koesuunnittelu

Keittokokeet tehtiin Stephan UMC 5 -keittokattilalla, joka oli pilot-mittakaavan laite (kuvio 7). Keittokokeissa kattilaan lisättiin koesuunnitelman mukaan kaikki raaka-aineet (juustot, voi, vesi ja jauheet). Tämän jälkeen suljettiin kattila ja ajettiin alipaine vakuumpumpulla. Alipaineen muodostuttua aloitettiin lämmitys vaippahöyryllä. Juustoseokset lämmitettiin 90 °C:seen, johon aikaa kului noin 9 minuuttia. Tämän jälkeen sulatejuusto pakattiin välittömästi muovipikareihin. Keittokokeet ja pakkaaminen suoritettiin Valio T&K:n laboratoriotiloissa. Tulokset analysoitiin R-tilasto-ohjelmalla.



Kuvio 7. Stephan UMC 5.

5.5.1 Koesuunnittelun keskeiset periaatteet

Koesuunnitelmaa laadittaessa aluksi on hyvä miettiä kaikki mahdolliset häiriötekijät ja pyrkiä minimoimaan niiden vaikutus tuloksiin. Häiriötekijöitä tuloksiin aiheuttavat muun muassa raaka-ainevaihtelut ja työntekijä. Olosuhteista aiheutuvan virheen ehkäisemiseksi jokainen koe on pyrittävä suorittamaan samanlaisissa olosuhteissa. Koejärjestys on aina satunnaistettava, jotta varmistetaan koetulosten tilastollinen riippumattomuus. Satunnaistamisen avulla koetuloksien systemaattista virhettä saadaan pienennettyä. (Montgomery 1991: 8-9)

Koetulokset on tärkeää analysoida oikealla menetelmällä. Koesuunnitelma määrää sen, millä tilastollisella tekniikalla tuloksia voidaan analysoida. Tuloksia analysoidessa on tärkeää selvittää tärkeimmät tunnusluvut. Tuloksien esittämiseen kannattaa käyttää graafisia esityksiä niiden havainnollisuuden vuoksi. (Montgomery 1991: 8-9)

5.5.2 Koesuunnitelma ja tulosten analyysimenetelmät

Keittokokeisiin valittiin 2^3 -koesuunnitelma, jossa suunnitelmamuuttujat ovat sorbiinihappo, nisiini ja Joha HBS®. Koesuunnitelmassa kukin muuttuja esiintyy kahdella tasolla (± 1), ja se sisältää kaikki kahden tason kombinaatiot. (Montgomery 1991: 270-271) Koesuunnitelmaan lisättiin kolme keskipistekoetta, joiden perusteella pystyttiin arvioimaan mallin lineaarisuutta. (Montgomery 1991: 306)

Keittokokeiden tulokset analysoitiin usean muuttujan regressioanalyysillä, yhteensopimattomuustestillä ja vastepintojen avulla. Regressioanalyysissä tarkastellaan valittujen suunnitelmamuuttujien vaikutusta vastemuuttujaan. (Montgomery 1991: 479-480) Tilastollisen testien tärkeimmät tunnusluvut ovat R^2 , Q^2 ja yhteensopimattomuus- ja regressioanalyysin p-arvot.

Mallin selitysaste R^2 kertoo, kuinka suuren osuuden vastemuuttujan vaihtelusta regressiomalli kykenee selittämään, kun vaihtelua mitataan varianssilla. Mallin selitystasetta pidetään yleisesti hyvänä, kun se on suurempi kuin 0,80. (Niemi 1994: 80-81)

Ristiinvalidoinnin tunnusluku on ennustusselitysaste Q^2 . Se on hyvä tapa arvioida mallin luotettavuutta. Ennustusselitysaste Q^2 kuvaa, kuinka hyvin mallin avulla voidaan ennustaa. Ennustaminen perustuu kuitenkin laskentaan, jossa mallista jätetään kukin tulos vuorollaan pois ja lasketaan poisjätetty arvo mallin avulla. Ennustusselitysaste on aina pienempi kuin tavallinen selitysaste. Kuitenkin hyvässä mallissa nämä ovat samaa suuruusluokkaa. Ristiinvalidointi esitetään yleisesti graafisesti, mistä nähdään hyvin mallin ennustuskelpoisuus. (Karjalainen 2012)

Regressioanalyysin yhteydessä testataan jokaisen selittävän muuttujan osalta, onko niillä vaikutusta selitettävään muuttujaan eli eroavatko ne tilastollisesti merkittävästi nolasta. Koko mallille lasketaan myös oma p-arvo. P-arvoa käytetään yleisesti kokeellisten tutkimusten tulosten merkitsevyyden tunnuslukuna. P-arvo ilmoittaa virheellisen

päätelmän todennäköisyyden. Siis mitä pienempi p-arvo, sitä varmemmin havaittu ero on todellinen eikä sattuman vaikutusta. Yleisen sopimuksen mukaisesti tulosta pidetään "tilastollisesti merkitsevä", jos p-arvo on pienempi kuin 0,05 (merkitsevyytaso). Nollahypoteesina yleisesti on, että tutkittavilla muuttujilla ei ole vaikutusta selitettävään vastemuuttujaan. Tämä nollahypoteesi hylätään, jos mallin p-arvo on pienempi kuin 0,05. (Karjalainen 2012)

Yhteensopimattomuustestillä tutkitaan mallin sopivuutta saatuihin tuloksiin. Yhteensopimattomuus tarkoittaa sitä, että todellinen riippuvuus on monimutkaisempaa, kuin malli kykenee selittämään. Yhteensopimattomuustestin p-arvo tulee olla suurempi kuin 0,05, jolloin sitä voidaan pitää hyvänä eikä siinä ole merkittävää yhteensopimattomuutta. (Karjalainen 2012)

Vastepintamenetelmässä pyritään kuvaamaan vasteen riippuvuutta siihen vaikuttavista tekijöistä ja approksimoimaan tekijöiden polynomimuotoisella funktiolla. Vastepintamenetelmän tavoitteena on löytää faktoreiden tasojen kombinaatio, mikä optimoi vastefunktion. Menetelmään liittyy oleellisesti näiden graafinen tarkastelu. Graafisessa tarkastelussa muutetaan kahta muuttujaa ja pidetään muut vakioina. (Montgomery 1991: 521-523)

Sorbiinihapon, nisiinin ja Joha HBS® -sulatesuolan määrät keittokokeissa on valittu Valion aikaisempien kokemusten sekä kirjallisuudesta löytyvien tietojen perusteella. Nisiini lisättiin Daniscon valmistaman Nisaplin®-yhdisteen muodossa, joka sisältää 2,5 % nisiiniä. Loput Nisaplin® valmisteessa olevat yhdisteet ovat on natriumkloridia, proteiineja ja hiilidraatteja. (Danisco 2002: 1-7) Taulukossa 2 on esitelty koesuunnitelma koodatuissa ja taulukossa 3 fysikaalisissa yksiköissä. Keittokokeet suoritettiin kaikki samana päivänä satunnaisessa järjestyksessä, jolla pyrittiin minimoimaan systemaattinen virhe. (Lokki 1980: 367) Mallin luotettavuusarvioinnin parantamiseksi keittokokeet tehtiin kaksi kertaa eri päivinä.

Taulukko 2. Koesuunnitelma koodatuissa yksiköissä.

koe	sorbiinihappo	Joha HBS®	Nisaplin®
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Taulukko 3. Koesuunnitelma fysikaalisissa yksiköissä. Määrät ovat prosentuaalinen osuus yhdestä panoksesta.

koe	sorbiinihappo	Joha HBS®	Nisaplin®
1	0,00	0,00	0,00
2	0,10	0,00	0,00
3	0,00	0,50	0,00
4	0,10	0,50	0,00
5	0,00	0,00	0,02
6	0,10	0,00	0,02
7	0,00	0,50	0,02
8	0,10	0,50	0,02
9	0,05	0,25	0,01
10	0,05	0,25	0,01
11	0,05	0,25	0,01

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

6.1 Keittokokeiden raaka-ainejuustoseoksien klostridi-itiöpitoisuudet

Jokaisesta sulatejuustokoekeitoksen raaka-ainejuustoseoksesta otettiin näyte ja tehtiin klostridi-itiömääritys, jotta saatiin selville itiöpitoisuudet eri sulatejuustokeittokokeissa. Tulosten perusteella arvioitiin klostridi-itiöiden jakautuneisuutta juustosekoituksessa. Taulukossa 4 on esitelty molempien koekeittopäivien juustoseoksien klostridi-itiöpitoisuudet.

Taulukko 4. Molempien keittokoepäivien raaka-ainejuustoseoksien klostridi-itiöpitoisuudet.

Päivä 1		Päivä 2	
Keittokoe	Klostridi-itiöt MPN/g	Keittokoe	Klostridi-itiöt MPN/g
1	4600	1.1	2400
2	2400	2.1	930
3	930	3.1	240
4	2400	4.1	930
5	1500	5.1	930
6	750	6.1	930
7	430	7.1	430
8	930	8.1	4600
9	430	9.1	2400
10	930	10.1	2400
11	930	11.1	1500

Keittokokeiden klostridi-itiöpitoisuuksien keskiarvo on noin 1500 MPN/g. Kaikissa raaka-ainejuustoseoksissa oli paljon klostridi-itiöitä. Tulosten olisi periaatteessa pitänyt olla samat kaikissa raaka-aineseoksissa, mutta edustavan 10 g näytteen ottaminen yhdestä kilosta on haastavaa. Näyte ei voi myöskään mitenkään olla mikrobiologisesti tasalaatuista, vaikka ennen näytteenottoa raaka-ainejuustot jauhettiin todella pieniksi paloiksi ja sekoitettiin mahdollisimman huolellisesti. Huolellisen jauhamisen ja sekoittamisen perusteella opinnäytetyössä tehtiin oletus, että jokaisen keittokokeen raaka-aineet sisälsivät yhtä paljon klostridi-itiöitä.

6.2 Keittokokeiden tulokset

Keittokokeet tarkoittavat koesuunnitelman mukaan tehtyjä sulatejuuston koekeitoksia. Tulosten tilastolliseen tarkasteluun valittiin jääkaappisäilytyksessä sekä +37 °C:ssa 2 viikkoa säilytetyt sulatejuustot. Jääkaappisäilytetyjen sulatejuustojen tuloksista saadaan arvokasta tietoa, koska se kuvaa sulatejuustojen normaalia käyttötilannetta. Rasituskokeista tehtyjen itiömääritysten tulokset olivat kaikki saman suuntaisia, ja tämän vuoksi tulosten tilastolliseen tarkasteluun valittiin vain +37 °C:ssa 2 viikkoa rasituskokeessa olleet sulatejuustot. Rasituskokeen avulla saadaan tietoa siitä, kuinka hyvin Nisaplin®, sorbiinihappo ja Joha HBS® estävät klostridi-itiöiden itämistä. Taulukossa 5 on klostridi-itiöiden määrittäminen tuloksia MPN/g, joista on otettu 10-kantainen logaritmi. Loput keittokokeista tehtyjen itiömääritysten tulokset on esitetty liitteessä 3.

Taulukko 5. Klostridi-itiöiden määrät jääkaappi- ja +37 °C:ssa 2 viikkoa säilytetyistä sulatejuustoista. MPN/g:n tuloksista on otettu 10-kantainen logaritmi.

sorbiinihappo	Joha HBS®	Nisaplin®	klostridi-itiöt jääkaappisäilytys	klostridi-itiöt +37 °C 2 viikkoa
-1	-1	-1	3,38	3,38
1	-1	-1	2,38	2,97
-1	1	-1	2,38	2,36
1	1	-1	2,97	2,97
-1	-1	1	1,57	3,38
1	-1	1	2,32	0,85
-1	1	1	1,46	0,85
1	1	1	0,85	1
0	0	0	2,32	2,63
0	0	0	1,97	3,38
0	0	0	2,38	2,36
-1	-1	-1	3,38	2,63
1	-1	-1	2,38	2,97
-1	1	-1	2,63	3,38
1	1	-1	2,97	2,97
-1	-1	1	1,46	3,38
1	-1	1	2,97	0,85
-1	1	1	0,9	1,23
1	1	1	0,9	1
0	0	0	2,18	2,63
0	0	0	2,97	2,63
0	0	0	2,38	1,64

6.2.1 Tulokset jääkaappisäilytetystä sulatejuustosta

Keittokokeen jälkeen jääkaappisäilytyksessä olleiden sulatejuustojen regressioanalyysin ja yhteensopimattomuustestin tulokset klostridi-itiömäärityksistä on esitelty taulukossa 6. Kohdassa 6.5.2 on teoriaa tulosten tilastollisesta tarkastelusta. Liitteessä 5 on käskyt R-tilasto-ohjelmalle, joilla analyysit toteutettiin.

Taulukko 6. Jääkaappisäilytyksessä ennen klostridi-itiömäärityksiä olevien sulatejuuston regressioanalyysin ja yhteensopimattomuustestin tulokset.

	estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	2,23	0,0567	39,4	2,00e-16	***
Joha HBS®	-0,299	0,0664	-4,50	3,65e-04	***
Nisaplin®	-0,628	0,0664	-9,45	6.02e-08	***
sorbiinihappo x Nisaplin®	0,170	0,0664	2,56	2,10e-02	*
Joha HBS® x Nisaplin®	-0,227	0,0664	-3,42	3,48e-03	**
sorbiinihappo x Joha HBS® x Nisaplin®	-0,362	0,0664	-5,46	5.29e-05	***
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

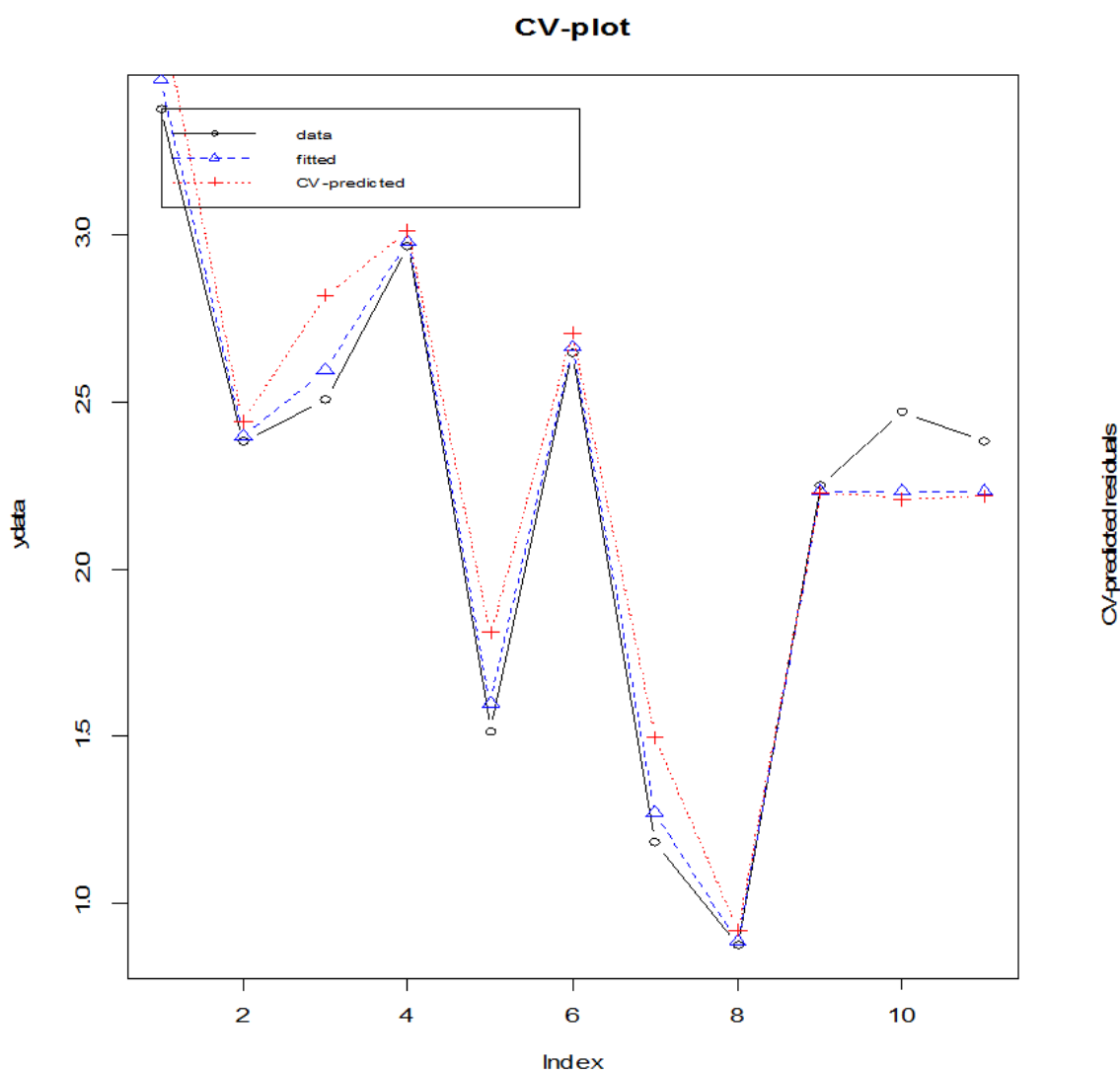
Residual standard error	0,266
R ²	0,908
korjattu R ²	0,879
F-arvo	31,5
p-arvo	9,72e-08
pLOF	0,529

Mallista tiputettiin ei merkitsevät sorbiinihappo ja Joha HBS® x sorbiinihappo - yhdistelmä pois, käyttäen vain merkitseviä tekijöitä sovitetuksi malliksi saatiin:

Itiömäärä = 2,23 – 0,299 x (Joha HBS) – 0,628 x (Nisaplin) + 0,170 x (sorbiinihappo x Nisaplin) – 0,227 x (Joha HBS x Nisaplin) – 0,362 x (sorbiinihappo x Joha HBS x Nisaplin)

Mallin tilastollisen merkitsevyyden tunnusluvuiksi saatiin malli, jonka F-arvo 31,5 jolloin p-arvo on tällöin 9,72e-08. Malli on siis tilastollisesti erittäin merkitsevä. Selitysasteeksi R² saatiin noin 0,91. Yhteensopimattomuustestin (Lack of Fit) p-arvo on noin 0,53, jonka perusteella mallissa ei ole merkitsevää yhteensopimattomuutta.

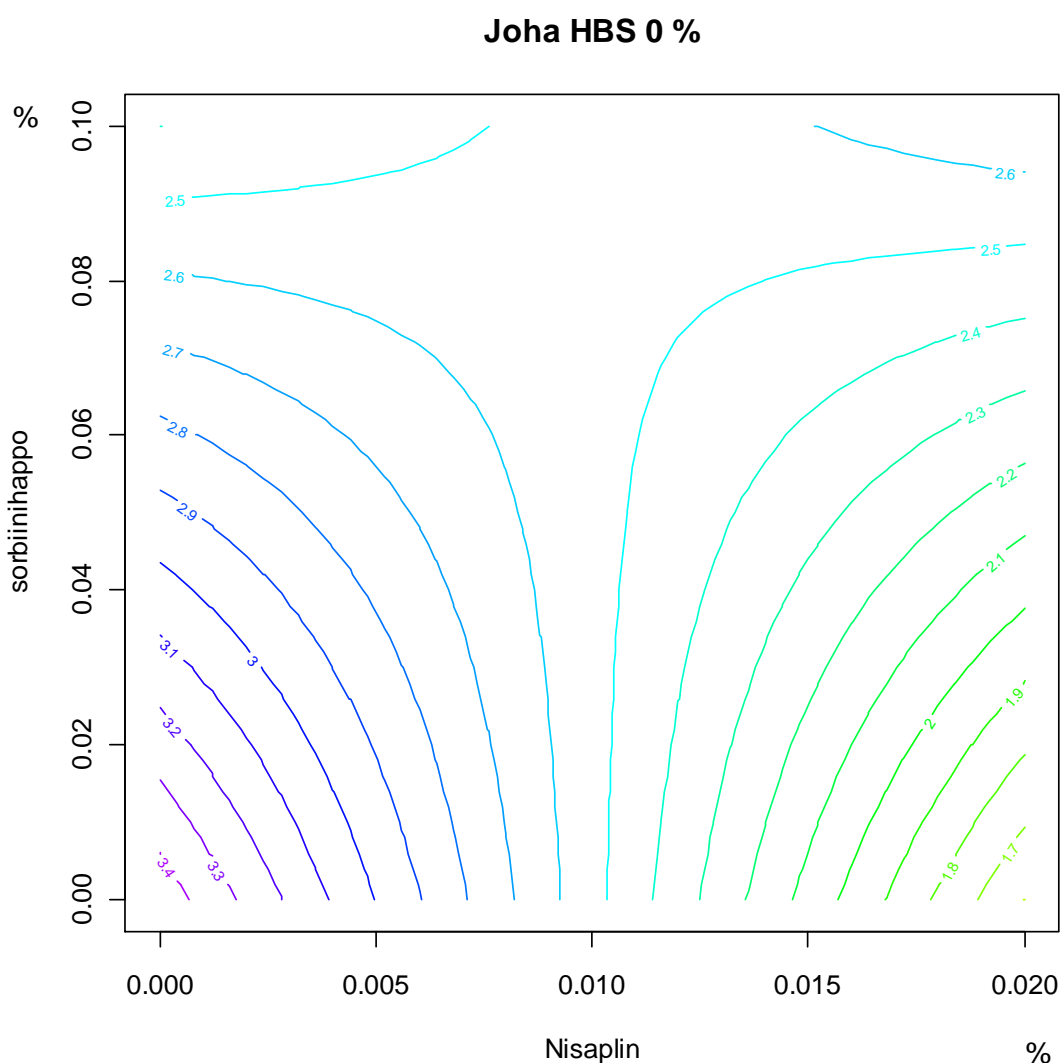
Ristiinvaldointia (CV-plot-kuva) varten laskettiin toistokokeista keskiarvot. Keskiarvot laskettiin, koska toistokokeiden toinen tulos olisi häirinnyt ristiinvaldointia eikä luotettavia tuloksia olisi saatu. Toistokokeiden keskiarvojen oton jälkeen mallin selitysaste on noin 0,98 ja ennustusselitysaste on noin 0,92. Mallin ennustusselitysaste on siis varsin hyvä. Tulosten tilastollisen tarkastelun perusteella malli on hyvä. Kuvion 8 ristiinvaldointi kuvaajasta nähdään myös, että mitatut ja mallin avulla ennustetut pisteet ovat hyvin samaa luokkaa.



Kuvio 8. Jääkaappisäilytetyn sulatejuuston ristiinvaldointikuvaaja.

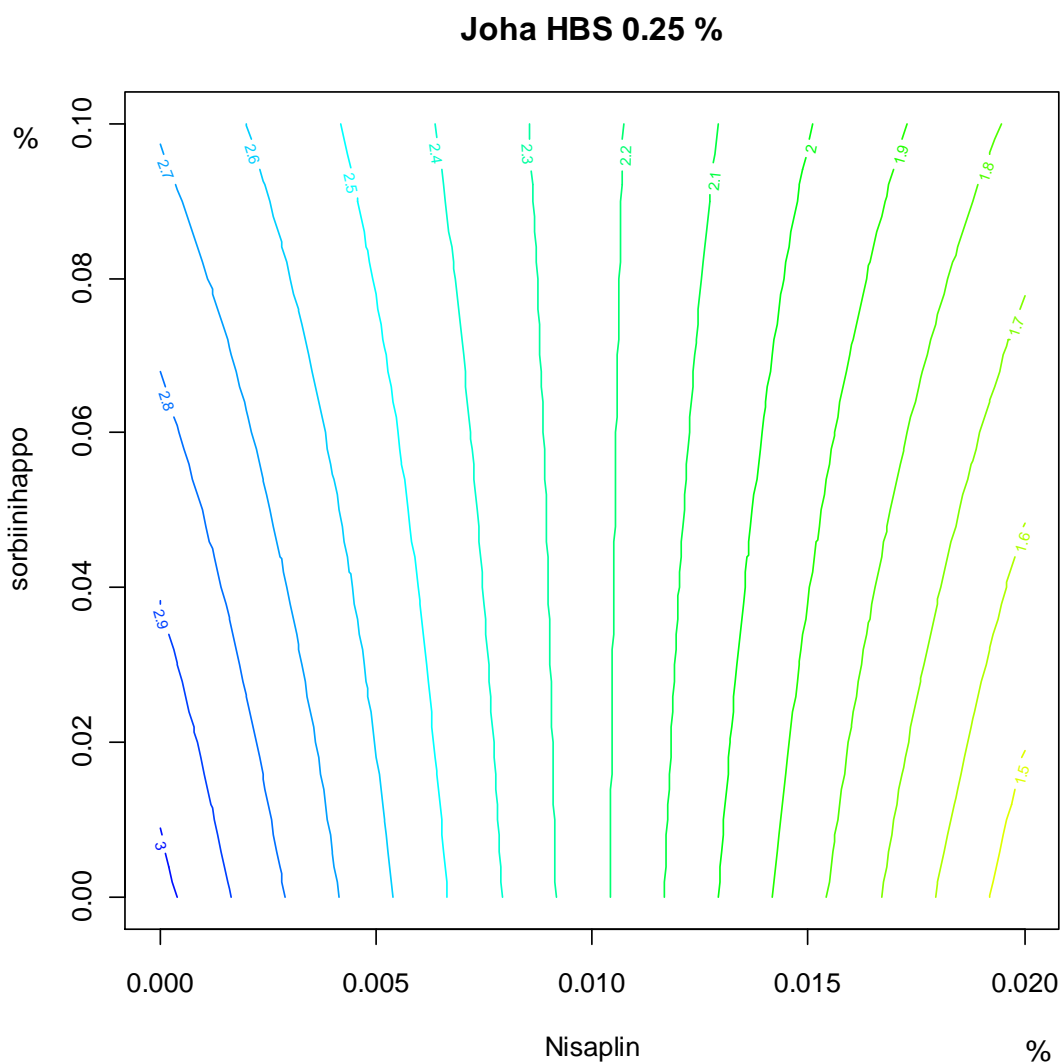
Vastepintakuvaajissa Joha HBS® -sulatesuolan määrä pidetään vakiona ja Nisaplinin® ja sorbiinihapon määrät pystyy lukemaan kuvaajista. Vastepinnat ovat piirretty MPN-tuloksien 10-kantaisesta logaritmistä.

Kuviosta 9 nähdään tilanne jääkaappisäilytetystä sulatejuustosta, jossa ei ole lisätty Joha HBS® -sulatesuolaa. Tässä tilanteessa pienin itiömäärä saadaan, kun käytetään maksimimäärä Nisaplinia®. Käytettäessä Nisaplinia® 0,02 % koko sulatejuustopanoksen massasta saadaan klostridi-itiöpitoisuudeksi noin 1,7, joka tarkoittaa MPN/g-lukua 50 ($10^{1,7} \approx 50$ MPN/g). Kuvion 9 tilanteessa sorbiinihapon merkitys on melko vähäistä.



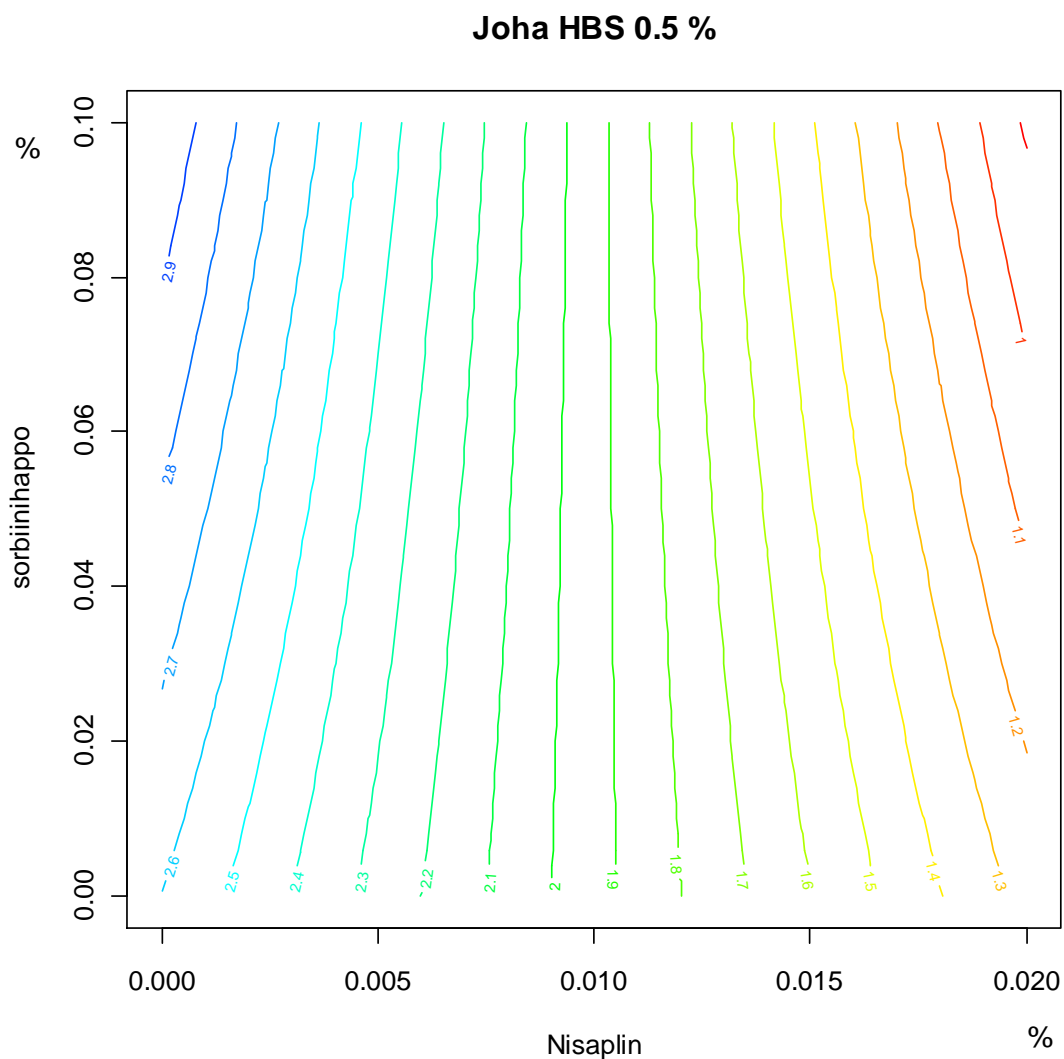
Kuvio 9. Vastepinta jääkaappisäilytetystä sulatejuustosta, jossa ei ole lisättyä Joha HBS® -sulatesuolaa (koodattuna -1).

Kuviossa 10 näkyy tilanne, jossa Joha HBS® -sulatesuolaa on lisätty 0,25 % koko sulatejuustomassan panoksesta. Pienin klostridi-itiömäärä saadaan, kun nisiiniä käytetään maksimimäärä. Tällöin itiöpitoisuudeksi saadaan noin 32 MPN/g ($10^{1,5} \approx 32$ MPN/g). Sorbiinihapon käytöllä ei näytä tässäkin tilanteessa olevan käytännön vaikutusta.



Kuvio 10. Vastepinta jääkaappisäilytetystä sulatejuustosta Joha HBS® -sulatesuola lisäyksellä 0,25 % (koodattuna 0).

Kuviossa 11 Joha HBS® -sulatesuolaa on nyt maksimimäärä. Pienin klostridi-itiöpitoisuus saadaan laittamalla Nisaplinia®, sorbiinihappoa ja Joha HBS® -sulatesuolaa maksimimäärät. Tällöin itiöpitoisuudeksi tulee noin 10 MPN/g ($10^{0,9} \approx 10$ MPN/g). Vastepinnasta kuitenkin huomaa, että sorbiinihapon merkitys ei ole kovin suuri. Jättämällä sorbiinihappo pois ja laittamalla maksimimäärä nisiiniä ja Joha HBS® -sulatesuolaa saadaan klostridi-itiöpitoisuudeksi noin 17 MPN/g ($10^{1,25} \approx 17$ MPN/g). MPN-lukujen 10 ja 17 välillä ei ole käytännön merkitystä, koska putkimenetelmä kolmella rinnakkaisella putkella on melko epätarkka.



Kuvio 11. Vastepinta jääkaappisäilytetystä sulatejuustosta Joha HBS® -sulatesuola lisäyksellä 0,5 % (koodattuna +1).

Yhtä säilöntäainetta käytettäessä Nisaplinilla® oli selkeästi suurin inhiboiva vaikutus jääkaappisäilytetyn sulatejuuston itiöiden itämiseen. Sorbiinihappo ja Joha HBS® yksin ja yhdessä inhiboivat itiöiden itämistä, mutta heikolla tehokkuudella. Tässä mallissa Nisaplinin®, Joha HBS® -sulatesuolan ja sorbiinihapon yhteisvaikutus oli paras kombinaatio ehkäistä klostridi-itiöiden itämistä. Lähes yhtä hyvään tulokseen päästiin Nisaplinin® ja Joha HBS® -sulatesuolan kombinaatiolla, jossa molempia käytettiin keittokokeen maksimimäärät. Käytännössä ei ole järkevää käyttää sorbiinihappoa kolmantena inhiboivana tekijänä, koska sen vaikutukset voi happokäymiseen ovat heikot, eikä elintarvikkeisiin haluta laittaa kuin välttämättömät säilöntäaineet.

6.2.2 Tulokset +37 °C:ssa 2 viikkoa säilytetyistä sulatejuustoista

Rasituskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa ennen klostridi-itiömäärytyksiä olevien sulatejuustojen regressioanalyysin tulokset on esitelty taulukossa 7. Rasituskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa olleissa sulatejuustoissa ei tapahtunut pakkauksien pullistumista, mutta kaasukuplien muodostumista havaittiin läpinäkyvien pikarien läpi (kuvio 12).



Kuvio 12. Kuvan pikari on ollut +37 °C:ssa 2 viikkoa.

Taulukko 7. +37 °C:ssa 2 viikkoa rasituskokeessa ennen klostridi-itiömäärittystä olevien sulatejuuston regressioanalyysin ja yhteensopimattomuustestin tulokset.

	estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	2,34	0,0954	24,5	6,65e-13	***
sorbiinihappo	-0,314	0,112	-2,81	1,39e-02	*
Joha HBS®	-0,290	0,112	-2,59	2,11e-02	*
Nisaplin®	-0,694	0,112	-6,21	2,28e-05	***
sorbiinihappo x Joha HBS®	0,329	0,112	2,94	1,07e-02	*
sorbiinihappo x Nisaplin®	-0,329	0,112	-2,94	1,07e-02	*
Joha HBS® x Nisaplin®	-0,257	0,112	-2,29	3,77e-02	*
sorbiinihappo x Joha HBS® x Nisaplin®	0,295	0,112	2,64	1,94e-02	*
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Residual standard error	0,447
R ²	0,855
korjattu R ²	0,783
F-arvo	11,8
p-arvo	6,40e-05
pLOF	0,187

Mallin kaikki termit olivat merkitseviä ja sovitetuksi malliksi saatiin:

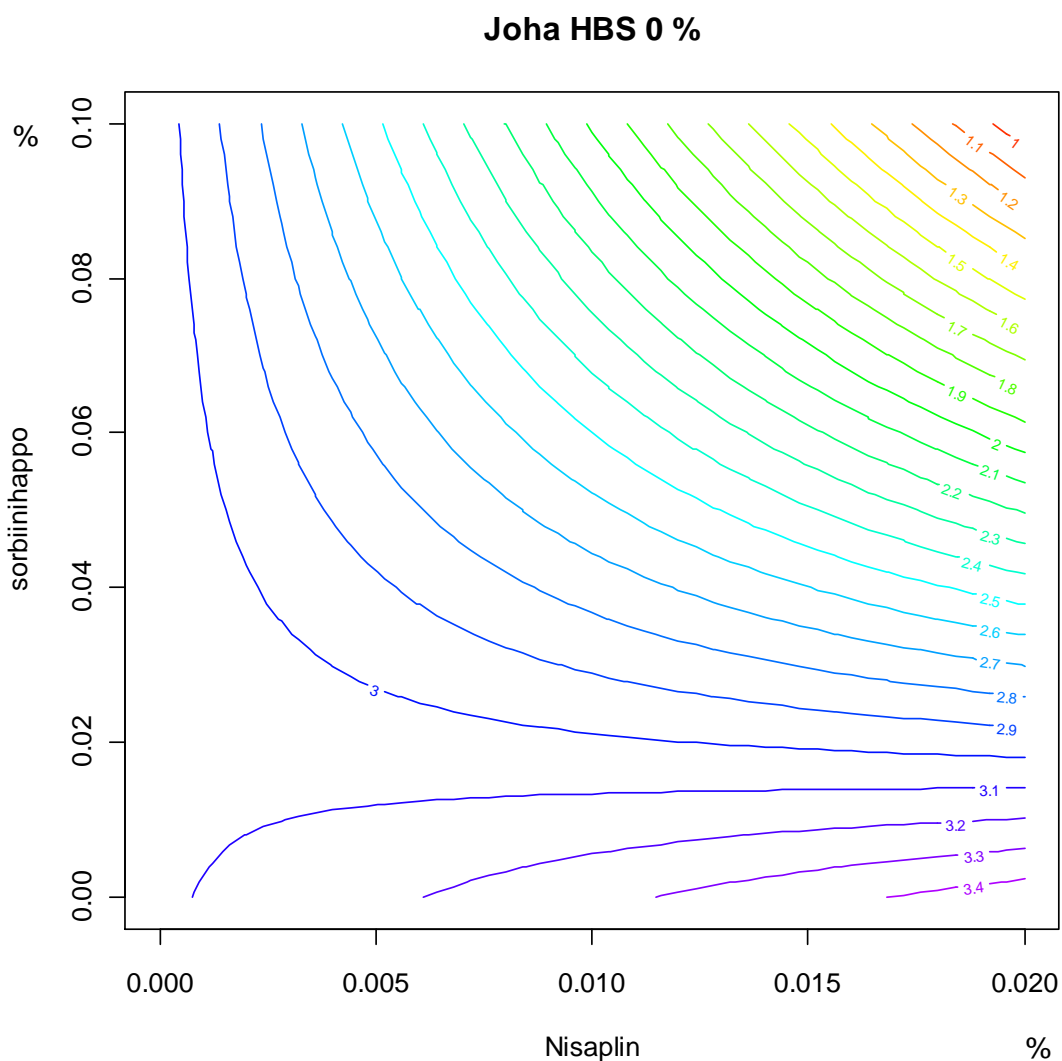
Itiömäärä = 2,34 – 0.314 x (sorbiinihappo) – 0,290 x (Joha HBS) – 0,694 x (Nisaplin) + 0,329 x (sorbiinihappo x Joha HBS) – 0,329 x (sorbiinihappo x Nisaplin) – 0,257 x (Joha HBS x Nisaplin) + 0,295 x (sorbiinihappo x Joha HBS x Nisaplin)

Mallin tilastollisen merkitsevyyden tunnusluvuiksi saatiin malli, jonka F-arvo 11.8 ja p-arvo on tällöin 6,40e-05. Malli on siis tilastollisesti erittäin merkitsevä. Selitysasteeksi R² saatiin noin 0,86. Yhteensopimattomuustestin (Lack of Fit) p-arvo on noin 0,19, jonka perusteella mallissa ei ole merkitsevää yhteensopimattomuutta.

Toistokokeiden keskiarvotuloksista laskettu ennustusselityksen arvo oli todella huono (Q² ≈ -2,1). Mallin avulla ennustettaessa saadaan huonoja tuloksia. Huono ennustusselitysaste vähentää mallin luotettavuutta, mutta ei tee siitä kuitenkaan kelvotonta.

Rasituskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa olleiden sulatejuustojen klostridi-itiöpitoisuuksien vastepinnat on esitelty kuvioissa 13, 14 ja 15.

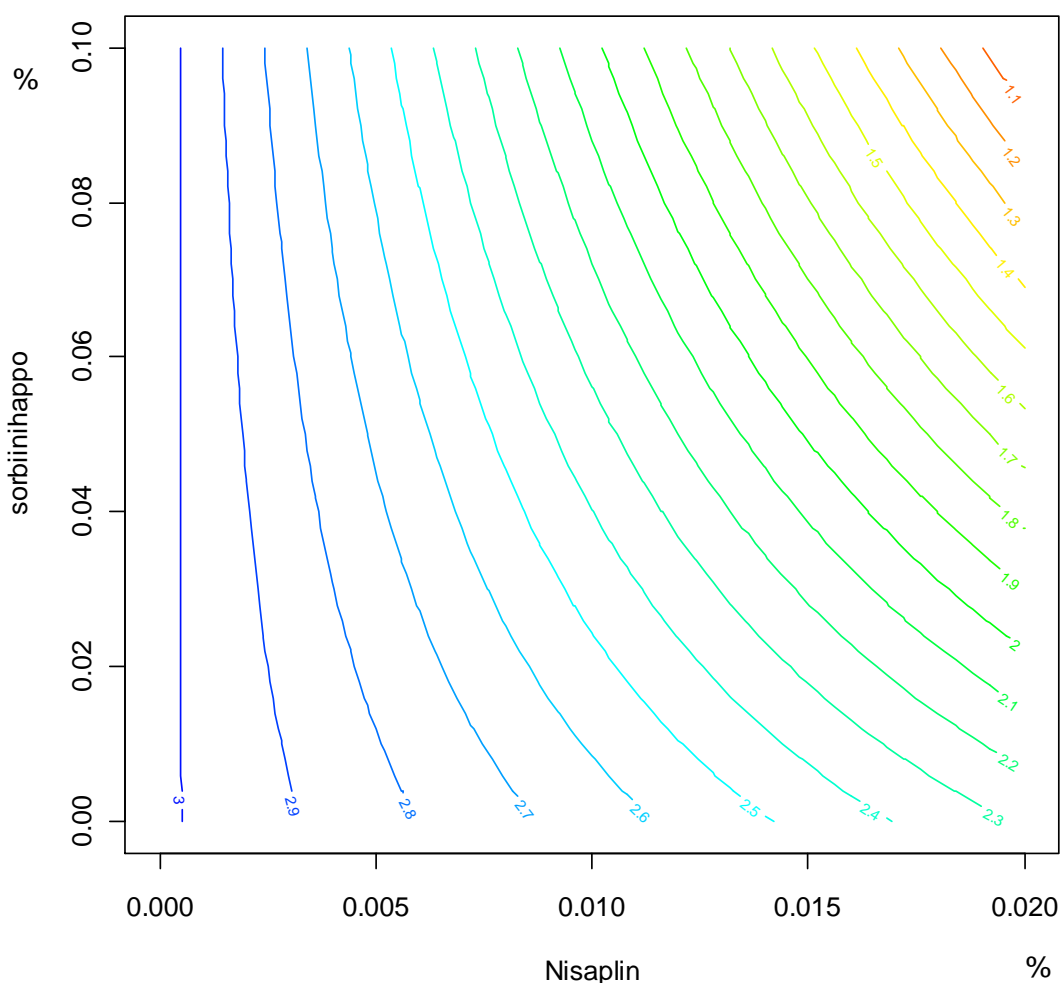
Kuviosta 13, jossa ei ole Joha HBS® -sulatesuolaa lisätty ollenkaan, nähdään, että paras klostridi-itiöitä inhiboiva vaikutus saadaan, kun on maksimimäärä sorbiinihappoa ja Nisaplinia®. Tällä kombinaatiolla klostridi-itiöpitoisuudeksi saadaan $10^1 \approx 10$ MPN/g. Yksin Nisaplinia® tai sorbiinihappoa käytettäessä, saataisiin huonoja tuloksia.



Kuvio 13. Vastepinta rasiuskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa ollut sulatejuusto, jossa ei ole Joha HBS® -sulatesuolaa (koodattuna -1).

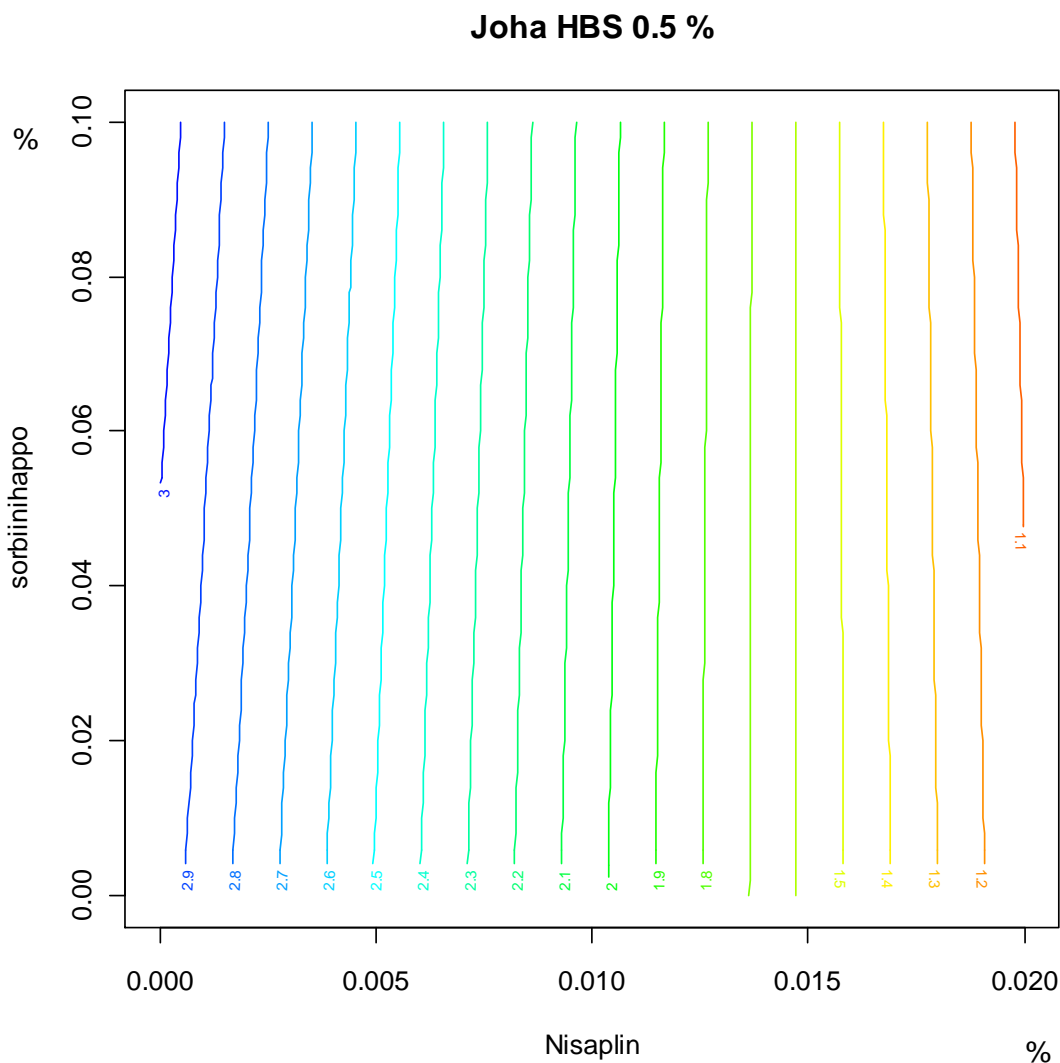
Kuviossa 14 Joha HBS® -sulatesuolan lisäyksellä 0,25 % parhaimman vaikutuksen itiöiden itämistä vastaan saadaan maksimimäärällä Nisaplinia® ja sorbiinihappoa. Tällä kombinaatiolla klostridi-itiöpitoisuudeksi saadaan noin 13 MPN/g ($10^{1,1} \approx 13$ MPN/g). Vastepinnasta kuitenkin huomaa, että Joha HBS® -sulatesuolaa ollessa 0,25 % ja lisäämällä pelkästään sorbiinihappoa klostridi-itiöiden itämisen estäviä vaikutuksia ei ole juuri ollenkaan. Nisaplinilla® on kyllä inhiboivia vaikutuksia, mutta ei kuitenkaan niin paljon kuin sorbiinihapon kanssa yhdessä.

Joha HBS 0.25 %



Kuvio 14. Vastepinta rasituskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa ollut sulatejuusto Joha HBS® lisäyksellä 0,25 % (koodattuna 0).

Kuviossa 15 Joha HBS® 0,5 % lisäyksillä parhaimman vaikutuksen itiöiden itämistä vastaan saadaan maksimimäärällä Nisaplinia® ja sorbiinihappoa 13 MPN/g ($10^{1,1} \approx 13$ MPN/g). Vastepinnasta huomataan selkeästi, että kun Joha HBS® -sulatesuolan määrä on maksimissa, niin sorbiinihapon käytöllä ei ole käytännössä merkitystä ollenkaan.



Kuvio 15. Vastepinta rasituskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa ollut sulatejuusto Joha HBS® -sulatesuolan lisäyksellä 0,5 % (koodattuna +1).

Tässäkin mallissa Nisaplinilla® oli selkeästi suurin inhiboiva vaikutus sulatejuuston itiöiden itämiseen. Sorbiinihapon ja Joha HBS® -sulatesuolan vaikutukset olivat mitättömät yhdessä sekä erikseen. Nisaplin® ja Joha HBS® -sulatesuolan yhteisvaikutus oli paras kombinaatio ehkäistä klostridi-itiöiden itämistä.

6.2.3 Haihtuvat karboksyylihapot keittokokeista

Kaikista keittokoesulatejuustoista määritettiin haihtuvat karboksyylihapot, joista erityisesti tarkkailtiin klostridi-itiöiden aiheuttaman voi happokäymisen seurauksena muodostuvaa voi happoa ja etikkahappoa. Voi hapon ja etikkahapon määrät eivät korreloineet sulatejuustojen itiömäärien kanssa. Sorbiinihapolla, Nisaplinilla® ja Joha HBS® -sulatesuolalla ei ollut havaittavia vaikutuseroja voi hapon ja etikkahapon muodostukseen missään säilytysolosuhteissa (jääkaappi, +37 °C 2 viikkoa, +37 °C 4 viikkoa ja +30 °C 4 viikkoa). Kuitenkin säilytysolosuhteilla oli selvästi eroja voi hapon ja etikkahapon määrän muodostukseen. Jääkaappisäilytetyillä sulatejuustoilla oli kaikista suurimmat voi- ja etikkahappopitoisuudet. Voi- ja etikkahapon pitoisuudet sulatejuustossa pienenevät säilytysajan- ja lämpötilan kasvaessa, toisin sanoen +37 °C:ssa 4 viikkoa säilytetyissä sulatejuustoissa oli pienimmät voi- ja etikkahappo pitoisuudet. Hypoteesi oli juuri päinvastainen, eli mitä kauemmin sulatejuustoja säilytettiin rasisuuskokeessa, sitä enemmän voi- ja etikkahappoa muodostuisi.

Sulatejuustomatriisista ei yleisesti määritetä kyseisellä menetelmällä voi- ja etikkahapon määriä. Pohdiskelujen jälkeen epäiltiin, että osa haihtuvista hapoista haihtui pikarilen avaamisen jälkeen ennen määrittystä. Mitä luultavammin voi- ja etikkahappoa muodostui eniten +37 °C:ssa 4 viikkoa säilytetyissä sulatejuustoissa ja hypoteesi piti paikkansa. Menetelmä ei vain soveltunut sulatejuustomatriisille. Voi- ja etikkahapon tulokset sulatejuustoissa on esitelty liitteessä 4.

6.3 MPN-menetelmän ja mikrobiologisten tuloksien arviointi

Mikrobiologiisiin määrittelyyn liittyy aina epävarmuustekijöitä sekä virhelähteitä. Mikrobiologiassa mittaustulosten virheeseen vaikuttavat monet eri näytteen käsittelyvaiheet, kuten punnitseminen, homogoinen, siirrostaminen ja laimentaminen. Näytteenotto aiheuttaa myös hankaluuksia luotettavien tulosten saamiseksi, koska mikrobit eivät ole jakautuneet tasaisesti näytteeseen. Myös tulosten lukemisesta ja tulkitsemisesta aiheutuu virheitä tuloksiin. (Niemi 2001: 14) Mikrobiologisissa mittaustuloksissa on siis valtavasti virhelähteitä, joten tuloksiin on syytä suhtautua kriittisesti.

Tutkimuksessa käytetty MPN-menetelmä on hyvin epätarkka, jos putkien lukumäärä on pieni. Menetelmä antaa kuitenkin suuntaa antavaa tietoa itiöpitoisuuksista. MPN-menetelmän tuloksien perusteella voidaan kyllä sanoa, mikä aine tai kombinaatio testattavista muuttujista inhiboi parhaiten klostridi-itiöiden itämistä. Kuitenkaan näiden tulosten perusteella ei voi sanoa, kuinka suuret inhiboivat erot todellisuudessa on Nisaplinin®, sorbiinihapon ja Joha HBS® -sulatesuolan välillä klostridi-itiöiden itämiseen. Tuloksien perusteella sorbiinihappo olisi syytä vaihtaa Nisapliniin® sulatejuustoissa, joissa sitä käytetään. Kuitenkin kokeet tuotantomittakaavassa ovat välttämättömät.

7 Yhteenveto ja pohdintaa

Työn tarkoituksena oli tutkia nisiinin, sorbiinihapon ja Joha HBS® -sulatesuolan inhiboivia vaikutuksia klostridi-itiöiden aiheuttamaan voi happokäymiseen sulatejuustossa ja sitä, täyttääkö säilöntäaineeton sulatejuusto sen säilyvyysvaatimukset

Yksin käytettynä Nisaplin® oli selkeästi paras säilöntäaine ehkäisemään klostridi-itiöiden germinoitumista. Parhaimman yhdistelmän klostridi-itiöiden germinoitumista vastaan muodostivat Nisaplin® ja Joha HBS® -sulatesuola. Usein myös pelkästään Nisaplinia® käytettäessä päästiin hyviin tuloksiin. Säilöntäaineeton sulatejuusto ei täyttänyt säilyvyysvaatimuksia koetilanteessa, jossa sulatejuusto kuumennettiin 90 °C:seen noin 9 minuutin aikana. Vastaavanlaisissa prosesseissa on siis syytä käyttää säilöntäainetta, kuten Nisaplin®.

Keittokokeilla tutkittujen tekijöiden tasot olisivat voineet olla suuremmat selkeämpien erojen saamiseksi. Koesuunnitelman mukaan nisiinin maksimimäärä keittokokeissa oli 5 mg/kg ja suurin sallittu käyttömäärä sulatejuustossa on 12,5 mg/kg. Sorbiinihapon suurin sallittu käyttömäärä sulatejuustossa on 2000 mg/kg ja keittokokeissa maksimimäärä oli 1000 mg/kg. Säilöntäaineiden tasoja nostettaessa niiden erot olisivat näkyneet selkeämmin.

Tulosten perusteella nisiinin vaihtaminen sorbiinihapon tilalle olisi perusteltua. Suuremman mittakaavan jatkotutkimukset ovat kuitenkin tarpeen ennen säilöntäaineen vaihtamista. Myös käytössä olevien sitraattien määrää voitaisiin korvata polyfosfaateilla niiden antimikrobisten vaikutusten vuoksi. Näillä muutoksilla saataisiin todennäköisesti entistä paremmin säilyvä sulatejuusto.

Lähteet

- Berger W., Klostermeyer, H. ja Hargreaves G. 1998. Processed Cheese Manufacture: A JOHA Guide. Ladenburg: BK Giulini Chemie GmbH.
- Bergère J.-L., Sivelä S. 1990. Detection and enumeration of clostridial spores related to cheese quality – classical and new methods. s. 15-23. Teoksessa: Methods of detection and prevention of anaerobic spore formers in relating to the quality of cheese. Bulletin of the International Dairy Federation nro 251.
- Breed R. S., Murray E. G. D. ja Smith N. R. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology 7. painos. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Cerf P. O., Bergere J. L. ja Hermier J. 1967. Thermorésistance des spores de *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium butyricum*. Journal of Dairy Research. 34:221-229.
- Danisco. 2002. Introduction to Nisaplin® Natural Antimicrobial. Brabrand: Danisco.
- De Jong C. Ja Badings H. T. 1990. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. Journal of High Resolution Chromatography. 13:94-98.
- Delves-Broughton J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology. 44:101–117.
- Doyle M. P. ja Beuchat L. R. 2007. Food Microbiology, Fundamentals And Frontiers. 3. Painos. Washington, D.C: ASM press.
- FINLEX® - Sääöstietopankki 2012. (WWW-dokumentti)
<<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2007/20070752>> Luettu 17.8.2012
- Glass K. ja Doyle M. E. 2005. Safety of Processed Cheese – A Review of the Scientific Literature. Madison: Food research Institute.
- Gouda A. ja El-Nour A. A. 2003. Cheese/Processed Cheese. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2. Painos) Ismailia: Elsevier Science Ltd.
- Hakovirta J., Reunanen J. ja Saris P. E. J. 2006. Bioassay for Nisin in Milk, Processed Cheese, Salad Dressings, Canned Tomatoes, and Liquid Egg products. Applied And Environmental Microbiology. 72, 1001-1005.
- Hielm S. 2002. Mikrobiologian perusteita. Mikrobiologian julkaisuja. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- James J. M., Loessner M. J. ja Golden D. A. 1992. Modern Food Microbiology. 4. Painos. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Kapoor R ja Metzger L. E. 2008. Process Cheese: Scientific and Technological Aspects-A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 7: 194-214.

Karjalainen E. E. 2012. Koesuunnittelun koulutusmateriaali Sig Sixma. Helsinki 10.2.2012.

Evira 2006. Katalaasitesti. (WWW-dokumentti)
<http://www.evira.fi/attachments/elintauti_ja_elintarviketutkimus/mbi_ohjeet/mibi117_v1_katalaasitesti.pdf> Luettu 17.8.2012.

Klantschitsch T. 1999. Influence of microfiltration on the quality of semi-hard cheese from raw milk with particular emphasis on *Clostridium tyrobutyricum* spores. Opinnäytetyö. Zürich: Swiss Federal Institute of Technology.

Klijn N., Nieuwenhof F. F. J., Hollwerf J. D., Van Der Waals C. B. ja Weerkmap A. H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the Causative Agent of Late Blowing in Cheese by Species-Specific PCR Amplification. Applied and Environmental Microbiology. 61: 2919-2924.

Le Bourhis A. G., Doré J., Carlier J. P., Chamba J. F., Popoff M. R. and Tholozan J. 2007. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. International Journal of Food Microbiology. 113:154–163.

Ledenbach L. H. ja Marshall R. T. 2010. Microbiological Spoilage of Dairy Products. Teoksesta Sperber W. H. ja Doyle M. P. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. New York: Springer.

Evira 2009. Lisäaineopas. (WWW-dokumentti)
<<http://www.evira.fi/portal/fi/evira/julkaisut/?a=view&productId=134>>
Luettu 20.3.2012.

Lokki O. 1980. Tutkimustulosten tilastollinen hallinta ja käyttö. Helsinki: Insinööritieto Oy.

Lycken L. ja Borch E. 2006. Characterization of *Clostridium* spp. Isolated from Spoiled processed Cheese Products. Sweden: SIK – The Swedish Institute for Food and Biotechnology.

Maier S., Scherer S. ja Loessner M. J. 1999. Polyphosphates and their antimicrobial Effect. Seminaari. Sonthofen.

Meyer A. 1973. Processed cheese manufacture. London: Food Trade Press.

Montgomery D. C. 1991. Design and Analysis of Experiments. 3. painos. New York: John Wiley & Sons Wiley.

Montville T. J. ja Matthews K. R. 2008. Food Microbiology An Introduction 2. painos. Washington, DC: ASM Press.

Niemelä S. I. 2001. Mikrobiologian kvantitatiivisen viljelymääritysten mittausepävarmuus. Metrologian neuvottelukunta, kemian jaosto, mikrobiologinen työryhmä. Helsinki: Mittatekniikan keskus.

Niemi A. 1994. Todennäköisyyslaskennan ja tilastomatematiikan perusteet: Insinööri-
koulutusta varten. Helsinki: Opetushallitus.

Prescott L. M., Harley J. P. ja Klein D. A. 1996. Microbiology. 3. Painos. Dubuque :Wm.
C. Brown Publishers.

Ter Steeg P. F., Cuppers H. G. A. M., Hellemons J. C. ja Rijke G. 1995. Growth of pro-
teolytic *Clostridium botulinum* in process cheese products. 1. Data acquisition for mod-
elling the influence of pH, sodium chloride, emulsifying salts, fat dry
basis, and temperature. Journal of Food Protection. 58: 1091–1099.

Virolainen P. 2012. Tuotekehittäjä, Valio Oy, Helsinki. Sulatejuustokoulutus
28.2.2012.

Walstra P., Geyerts T. J., Noomen A., Jellema A. ja Van Boekel M. A. J. S. 1999. In
Dairy technology – Principles of milk properties and processes. New York, USA: Marcel
Dekker, Inc.

Wilbey R. A., Scott J.E. ja Richard K. R. 1998. Cheesemaking Practice 3. painos. New
york: Plenum Publishers.

Liite 1: Klostridi-itiöiden kasvualusta**Bryant ja Burkey –alusta (BB-laktaatti)**

Kaseiinipeptoni	15,0 g
Lihauute	7,5 g
Hiivauute	5,0 g
Natriumasetaatti (CH ₃ COONa \cdot 3H ₂ O)	5,0 g
Kysteiinihydrokloridi	0,5 g
Natriumlaktaatti	5,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Lähde: Valio Oy, 2012.

Liite 2: MPN-taulukko

Positiivisten putkien lukumäärä			MPN-luku
Laim. 10 ⁻¹	Laim. 10 ⁻²	Laim. 10 ⁻³	Tulos MPN/g
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	1	1	6
0	2	0	6
0	3	0	9
1	0	0	4
1	0	1	7
1	0	2	11
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
1	2	1	15
1	3	0	16
2	0	0	9
2	0	1	14
2	0	2	20
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27

Positiivisten putkien lukumäärä			MPN-luku
Laim. 10 ⁻¹	Laim. 10 ⁻²	Laim. 10 ⁻³	Tulos MPN/g
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	3	0	29
2	3	1	36
3	0	0	23
3	0	1	38
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

Lähde: Valio Oy, 2012.

**Liite 3: Keittokokeista (+37 °C ja +30 °C 4 viikkoa) tehdyt klostridi-
itiömääritykset.**

MPN/g tuloksista on otettu 10-kantainen logaritmi.

	sorbiinihappo	Joha HBS®	Nisaplin®	itiöt +37 °C 4 vko	itiöt +30 °C 4 viikkoa
1	-1	-1	-1	1,64	2,97
2	1	-1	-1	1,38	3,18
3	-1	1	-1	1,38	1,97
4	1	1	-1	1,64	1,97
5	-1	-1	1	1,18	0,00
6	1	-1	1	0,00	0,70
7	-1	1	1	0,90	0,00
8	1	1	1	1,20	0,70
9	0	0	0	0,70	1,57
10	0	0	0	1,59	1,00
11	0	0	0	0,90	1,64
	sorbiinihappo	Joha HBS®	Nisaplin®	itiöt 37 °C 4 vko	itiöt 30 °C 4 vko
1.1	-1	-1	-1	1,88	3,38
2.1	1	-1	-1	1,64	1,64
3.1	-1	1	-1	2,38	1,97
4.1	1	1	-1	2,38	1,97
5.1	-1	-1	1	0,90	0,00
6.1	1	-1	1	1,34	1,20
7.1	-1	1	1	0,00	0,85
8.1	1	1	1	1,20	0,00
9.1	0	0	0	1,20	1,20
10.1	0	0	0	0,00	1,46
11.1	0	0	0	1,48	2,97

Liite 4: Keittokokeista tehdyt haihtuvat karboksyylihapot
Tulokset ovat esitetty muodossa mg/100g.

	sorbinihappo	Joha HBS	Nisaplin®	Haihtuvat hapot jääkaappi		Haihtuvat hapot 37 °C 2vko		Haihtuvat hapot 37 °C 4vko		Haihtuvat hapot 30 °C 4vko	
				etikkahappo	voihappo	etikkahappo	voihappo	etikkahappo	voihappo	etikkahappo	voihappo
1	-1	-1	-1	150	8	110	7	69	8	48	2
2	1	-1	-1	170	10	110	8	54	4	49	2
3	-1	1	-1	170	9	160	9	86	6	140	10
4	1	1	-1	140	9	140	7	91	7	100	7
5	-1	-1	1	160	10	130	7	65	5	65	5
6	1	-1	1	160	10	140	8	89	6	110	7
7	-1	1	1	150	8	150	8	95	6	120	8
8	1	1	1	160	9	150	9	99	6	67	4
9	0	0	0	140	8	140	7	83	5	75	5
10	0	0	0	150	9	140	7	120	7	60	4
11	0	0	0	160	9	140	7	61	4	97	7
	sorbinihappo	Joha HBS	Nisaplin®	Haihtuvat hapot jääkaappi		Haihtuvat hapot 37 °C 2vko		Haihtuvat hapot 37 °C 4vko		Haihtuvat hapot 30 °C 4vko	
				etikkahappo	voihappo	etikkahappo	voihappo	etikkahappo	voihappo	etikkahappo	voihappo
1.1	-1	-1	-1	160	8	130	9	39	20	49	3
2.1	1	-1	-1	160	9	140	10	65	7	110	8
3.1	-1	1	-1	160	9	140	7	99	6	93	7
4.1	1	1	-1	140	8	150	8	79	5	98	7
5.1	-1	-1	1	150	9	110	7	110	7	75	6
6.1	1	-1	1	170	10	150	8	74	5	110	7
7.1	-1	1	1	150	9	160	9	84	6	98	7
8.1	1	1	1	150	9	140	7	86	6	80	5
9.1	0	0	0	150	8	140	7	86	6	63	5
10.1	0	0	0	190	10	140	7	51	3	83	6
11.1	0	0	0	170	9	150	8	53	4	71	5

Liite 5: R-käskyt

2³-koesuunnitelma luominen

```
minx <- c(0.0,0.0,0.0)
maxx <- c(0.02,0.5,0.1)

Z <- mton(2,3,3)

z <- decode(Z,minx,maxx,c("Nisaplin","Joha HBS","sorbiinihappo"))
```

Jääkaappisäilytetyn sulatejuuston R-käskyt

```
source('http://users.metropolia.fi/~velimt/Koesuunnittelu/DOE_functions_v4.2.R')

data <- read.table('Data.txt',header=TRUE)
y1 <- log(1+data[, 'itiöt_jääkaappi'],10)
X <- data[, 1:3]
malli1 <- lm(y1 ~ sorbiinihappo*Joha_HBS*Nisaplin-sorbiinihappo:Joha_HBS-
sorbiinihappo,data=data)

CV.plot(malli1)
print(summary(malli1))
malli1$LOF.test <- LOF.test(malli1,X,y1)
print('malli1/LOF')
print(malli1$LOF.test)

graphics.off()
par(mfrow=c(1,3))
minx <- c(0,0,0)
maxx <- c(0.1,0.5,0.02)
quad.plot(malli1,xlim=c(0,0.02),ylim=c(0,0.1),zlevels=seq(0.9,4,0.1),

ixy=c(3,1),xother=0,minx=minx,maxx=maxx,varlabels=colnames(data)[1:3],color.palett
e=rainbow)
```

```
title('Joha_HBS = 0')
quad.plot(malli1,xlim=c(0,0.02),ylim=c(0,0.1),zlevels=seq(0.9,4,0.1),

ixy=c(3,1),xother=0.25,minx=minx,maxx=maxx,varlabels=colnames(data)[1:3],color.pal
ette=rainbow)
title('Joha_HBS = 0.25')
quad.plot(malli1,xlim=c(0,0.02),ylim=c(0,0.1),zlevels=seq(0.9,4,0.1),

ixy=c(3,1),xother=0.5,minx=minx,maxx=maxx,varlabels=colnames(data)[1:3],color.pale
tte=rainbow)
title('Joha_HBS = 0.5')

# Jääkaappisäilytetyn sulatejuuston keskiarvojen otto ristiinvalidointia varten

data <- read.table('Data.txt',header=TRUE)

y1 <- log(1+data[, 'itiöt_jääkaappi'],10)

X <- data[,1:3]

y1b = (y1[1:11]+y1[12:22])/2

Xb = (X[1:11,]+X[12:22,])/2

cbind(Xb,y1b)

malli1b <- lm(y1b ~ sorbiinihappo*Joha_HBS*Nisaplin-sorbiinihappo:Joha_HBS-
sorbiinihappo,data=cbind(Xb,y1b))
summary(malli1b)
CV.plot(malli1b)
print(summary(malli1b))
```

Rasituskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa olleen sulatejuuston R-käskyt

```
data <- read.table('Data.txt',header=TRUE)
y1 <- log(1+data[, 'ltiöt_37_2vko'],10)
X <- data[,1:3]
malli1 <- lm(y1 ~ sorbiinihappo*Joha_HBS*Nisaplin,data=data)

CV.plot(malli1)
print(summary(malli1))
malli1$LOF.test <- LOF.test(malli1,X,y1)
print('malli1/LOF')
print(malli1$LOF.test)

graphics.off()
par(mfrow=c(1,3))
minx <- c(0,0,0)
maxx <- c(0.1,0.5,0.02)
quad.plot(malli1,xlim=c(0,0.02),ylim=c(0,0.1),zlevels=seq(0.9,4,0.1),

ixy=c(3,1),xother=0,minx=minx,maxx=maxx,varlabels=colnames(data)[1:3],color.palett
e=rainbow)
title('Joha_HBS = 0')
quad.plot(malli1,xlim=c(0,0.02),ylim=c(0,0.1),zlevels=seq(0.9,4,0.1),

ixy=c(3,1),xother=0.25,minx=minx,maxx=maxx,varlabels=colnames(data)[1:3],color.pal
ette=rainbow)
title('Joha_HBS = 0.25')
quad.plot(malli1,xlim=c(0,0.02),ylim=c(0,0.1),zlevels=seq(0.9,4,0.1),

ixy=c(3,1),xother=0.5,minx=minx,maxx=maxx,varlabels=colnames(data)[1:3],color.pale
tte=rainbow)
title('Joha_HBS = 0.5')

# Rasituskokeessa +37 °C:ssa 2 viikkoa olleen sulatejuuston keskiarvojen otto ristiin-
validointia varten
```

```
data <- read.table('Data.txt',header=TRUE)

y1 <- log(1+data[, 'Itiöt_37_2vko'],10)

X <- data[,1:3]

y1b = (y1[1:11]+y1[12:22])/2

Xb = (X[1:11,]+X[12:22,])/2

cbind(Xb,y1b)

malli1b <- lm(y1b ~ sorbiinihappo*Joha_HBS*Nisaplin,data=cbind(Xb,y1b))

summary(malli1b)
CV.plot(malli1b)
print(summary(malli1b))
```