

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Elintarviketekniikka

2013

Toni Lehtinen

# MUSTAHERUKKAPOHJAISEN PROBIOOTIN KASVATUS JA KUIVAUS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Elintarviketekniikka

2013 | 32 sivua

FM Kari Haajanen, Turun ammattikorkeakoulu

FT Juha Lappalainen, Galilaeus Oy

Toni Lehtinen

## MUSTAHERUKKAPOHJAISEN PROBIOOTIN KASVATUS JA KUIVAUS

Työn tavoitteena oli valmistaa mustaherukkapitoista, kuivattua maitohappobakteerituotetta käytettäväksi probioottisten elintarvikkeiden valmistuksessa. *Lactobacillus plantarum* -bakteereita kasvatettiin mustaherukkapitoisessa kasvatusliuoksessa, jonka jälkeen solumassa ja kiintoaine erotettiin vedestä ja vesiliukoisista aineista sentrifugoimalla. Vesiliukoinen osa spray-kuivattiin ja kiintoaineos kylmäkuivattiin.

Spray-kuivatusta osasta määritettiin kuivatun jauheen kosteuspitoisuus sekä veden aktiivisuus. Kuivausprosessia optimoitiin lisäämällä kuivattavaan liukseen inuliinia, jolla kuivatun jauheen kosteuspitoisuutta sekä veden aktiivisuutta pyrittiin alentamaan.

Spray-kuivatun jauheen kosteuspitoisuuden sekä veden aktiivisuuden havaittiin alenevan inuliinin määrää lisätessä. Tuote muuttui myös tahmeasta ja kovasta massasta irtonaiseksi ja pehmeäksi jauheeksi, kun inuliinia lisättiin riittävästi.

Solumassa sekä marjoista peräisin oleva kiintoaine kuivattiin kylmäkuivurissa. Kuivatusta jauheesta määritettiin maitohappobakteerien elävyys ennen ja jälkeen kuivauksen sekä veden aktiivisuus kuivauksen jälkeen. Kylmäkuivauksessa tutkittiin myös inuliinin lisäämisen vaikutusta solujen elävyyteen.

Inuliinin lisäämisellä kylmäkuivattavaan solumassaan ei havaittu olevan merkittävää vaikutusta solujen elävyyteen välittömästi kuivauksen jälkeen. Inuliinin lisääminen vähensi kuitenkin veden aktiivisuutta kuivatussa solumassassa, joten sillä saattaa olla myönteinen vaikutus maitohappobakteerien pitkäaikaiselle säilymiselle.

### ASIASANAT:

bioreaktorit, kylmäkuivaus, maitohappobakteerit, mikrobivalmisteet, probiootit, spray-kuivaus

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Food Technology

2013 | 32 pages

Kari Haajanen, M.Sc., Turku University of Applied Sciences

Juha Lappalainen, PhD, Galilaeus Oy

Toni Lehtinen

## FERMENTING AND DRYING OF PROBIOTIC PRODUCT CONTAINING BLACKCURRANT

The objective of this study was to develop a dried product containing blackcurrant and *Lactobacillus plantarum* to be used in the manufacturing of probiotic foods. The lactic acid bacteria were fermented in a medium containing blackcurrant powder, after which the medium was centrifuged. The water-soluble part was spray dried, and the centrifuged cells and insoluble parts of the berries were freeze dried.

Water content and water activity were determined from the spray dried powder. The spray drying process was optimized by adding inulin to the solution, aiming to lower both the water content and water activity in the powder.

The water content and the water activity were found to decline when inulin was added. Furthermore, the dried powder became softer and less adhesive when sufficient inulin was added, making it easier to use in downstream processing.

The centrifuged cells and insoluble blackcurrant solids were freeze dried, and bacterial viability and water activity were determined before and after drying. Water activity was also determined from the dried powder. The effect of inulin on the viability of the bacteria after drying was also studied.

The inulin addition was not found to have a significant effect on the viability of the cells in the short term. However, it did lower the water activity in the dried powder, so it might have a more discernible effect on the long-term viability, which was not included in this study.

### KEYWORDS:

bioreactors, freeze drying, lactobacilli, microbial products, probiotics, spray drying

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 PROBIOOTIT JA PREBIOOTIT</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	7
2.2 Mustaherukka <i>Ribes nigrum</i>	8
2.3 Inuliini	8
<b>3 KASVATUS BIOREAKTORISSA</b>	<b>9</b>
<b>4 KYLMÄKUIVAUS</b>	<b>12</b>
4.1 Kuivurin rakenne	14
4.2 Kuivauksen vaiheet	15
<b>5 SPRAY-KUIVAUS</b>	<b>17</b>
5.1 Rakenne	17
5.2 Toimintaperiaate	18
<b>6 TYÖN SUORITUS</b>	<b>20</b>
6.1 Kasvatus	20
6.2 Spray-kuivaus	21
6.3 Kylmäkuivaus	21
6.4 Elävyysmääritykset	22
6.5 Kosteusmääritykset	23
6.6 Veden aktiivisuus	23
<b>7 TULOKSET</b>	<b>24</b>
7.1 Reaktorikasvatus	24
7.2 Spray-kuivaus	25
7.3 Elävyysmääritykset	27
<b>8 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>29</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>31</b>

## **LIITTEET**

- Liite 1. Käytetyt reagenssit ja laitteet
- Liite 2. Toisen kylmäkuivauksen kuvaaja
- Liite 3. Kasvatuksen 0424FF pH-käyrä
- Liite 4. Kasvatuksen 0523FF pH-käyrä
- Liite 5. Kasvatuksen 0606FF pH-käyrä
- Liite 6. Näytekoodit
- Liite 7. Maljojen pesäkelaskenta

## **KUVAT**

- Kuva 1. Reaktorin kaaviokuva. 9
- Kuva 2. Bakteerien yleinen kasvukäyrä (8). 11
- Kuva 3. Faasidiagrammi (12). 13
- Kuva 4. Kylmäkuivurin rakennekaavio (13). 14
- Kuva 5. Spray-kuivaimen rakennekaavio. 18

## **KUVIOT**

- Kuvio 1. Inuliinin vaikutus kosteuspitoisuuteen. 26
- Kuvio 2. Inuliinin vaikutus veden aktiivisuuteen. 26
- Kuvio 3. Inuliinin vaikutus kylmäkuivattujen näytteiden elävyyteen. 28

## **TAULUKOT**

- Taulukko 1. Kylmäkuivausohjelma 22
- Taulukko 2. Kasvatusten tulokset. 25
- Taulukko 3. Spray-kuivausten tulokset. 25
- Taulukko 4. Elävyyismääritykset. 27

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tavoitteena oli kasvattaa *Lactobacillus plantarum* -bakteereja mustaherukkaa sisältävässä kasvatusliuoksessa, sekä optimoida kasvatustuotteiden kuivausprosessia. Kuivaus suoritettiin kahdessa osassa siten, että kasvatuksen jälkeen kasvatussuspensiosta eroteltiin sentrifugin avulla kiinteä sekä vesiliukoinen osa, jotka kuivattiin erikseen kylmäkuivaimella sekä spraykuivaimella. Kuivauksen jälkeen jauheet yhdistettiin lopulliseksi tuotteeksi. Työssä tutkittiin, miten marjajauheen käyttö kasvatuksessa vaikuttaa saatavaan bakteerimäärään, sekä miten eri parametrit kuivausvaiheissa vaikuttavat lopullisen tuotteen elävyyteen ja säilyvyyteen. Lisäksi tutkittiin inuliinin soveltuvuutta ja tarpeellisuutta kuivauksissa suoja-aineena parantamassa tuotteen lopullista elävyyttä. Pitkäaikaisen säilyvyyden todentaminen ei kuulunut tämän opinnäytetyön piiriin.

Kehiteltävä tuote oli suunnattu luontaistuote- ja ravintolisämarkkinoille probiootiseksi tuotteeksi. Tämä opinnäytetyö on osa suurempaa tuotekehitysprojektia, jossa kasvatusresepti sekä menetelmät on kehitetty aiemmin, ja jonka seuraava askel on suuren mittakaavan pilottiajo ja lopulta täysimittainen tuotanto.

Työn toimeksiantajana toimi Galilaeus Oy, joka on bioaloilla toimiva eurooppalainen sopimusvalmistaja. Yritys tarjoaa asiakkailleen muun muassa erilaisia tuotekehitys- ja tuotantoratkaisuja.

## 2 PROBIOOTIT JA PREBIOOTIT

WHO:n (World Health Organization, Maailman terveysjärjestö) raportin mukaan probiooteilla tarkoitetaan eläviä mikrobeja, jotka riittävässä määrin nautittuna edesauttavat ihmisen terveyttä (1). Eniten käytettyihin probioottisiin bakteereihin kuuluvat *Lactobacillus*- sekä *Bifidobacterium*-sukujen bakteerit. Probioottisten ravintolisien sekä elintarvikkeiden kehityksessä on otettava huomioon, että mikrobien on selviydyttävä elinkykyisenä ruoansulatuskanavan poikki pakusuoleen asti, jotta niillä olisi haluttu vaikutus. *Lactobacillus plantarum* soveltuu tarkoitukseen hyvin, koska se kestää luonnostaan mahalaukun happamia oloja hyvin (2).

Mustaherukka, *Ribes nigrum*, on Euroopassa yleinen pensasmarja, jolla on monia terveydelle edullisia ominaisuuksia. Marjassa on myös runsaasti hiilihydraatteja, joita *L. plantarum* kykenee käyttämään ravintonaan.

Työssä tutkitaan myös inuliinin vaikutusta valmistettavan tuotteen säilyvyyden parantamiseen. Inuliini on myös prebiootti, eli ihmisen ruoansulatus ei pysty sulattamaan sitä, mutta suoliston terveyttä edistävät bakteerit pystyvät käyttämään sitä hyväksi (3).

### 2.1 *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* on fakultatiivisesti heterofermentatiivinen, eli se fermentoi heksooseja (kuusihiiliatomisia sokereita) kuten glukoosia maitohapoksi. Lisäksi se kykenee fermentoimaan pentooseja (viisihiiliatomisia sokereita) tai glukonaatteja. *L. plantarum* on myös aerotolerantti, koska se kykenee pelkistämään happiradikaaleja vetyperoksidiksi ja siitä edelleen molekylaariseksi hapeksi ja vedeksi. Tähän *L. plantarum* tarvitsee mangaania, joten sitä täytyy olla runsaasti saatavilla bakteerin kasvuvaiheen aikana. Hapensietokyky ja monipuoliset ravinnonlähteet yhdistettynä happojen kestävyteen tekevät *L. plantarumista* helpokäyttöisen ja monipuolisen probiootin. (2)

Työssä käytetty bakteerikanta *Lactobacillus plantarum* 299v on eristetty ihmisen suoliston limakalvolta. Kannalla on havaittu olevan kyky tarttua ihmisen suoliston limakalvoilla olevaan mannoosiin, mihin kannan probioottinen vaikutus perustuu. (2)

## 2.2 Mustaherukka *Ribes nigrum*

Mustaherukka on pensaassa kasvava, Suomessa ja Euroopassa luonnossakin kasvava marja. Se kasvaa pensaissa, jotka voivat kasvaa 1 – 1,5 metrin korkuiseksi. Mustaherukan terveysvaikutteisista ainesosista merkittävimpiä ovat runsas C- ja A-vitamiinipitoisuus, sekä runsas kivennäisainepitoisuus (mm. kalium, kalsium, fosfori, rauta). Mustaherukka on myös tehokas antioksidantti. Korkean antosyaanipitoisuus taas ehkäisee tulehduksia ja hillitsee kolibakteerien kasvua. Marjoissa on myös huomattavan korkea pektiinipitoisuus, mikä täytyy ottaa huomioon marjojen käsittelyssä pektinaasin käytön muodossa. (4)

## 2.3 Inuliini

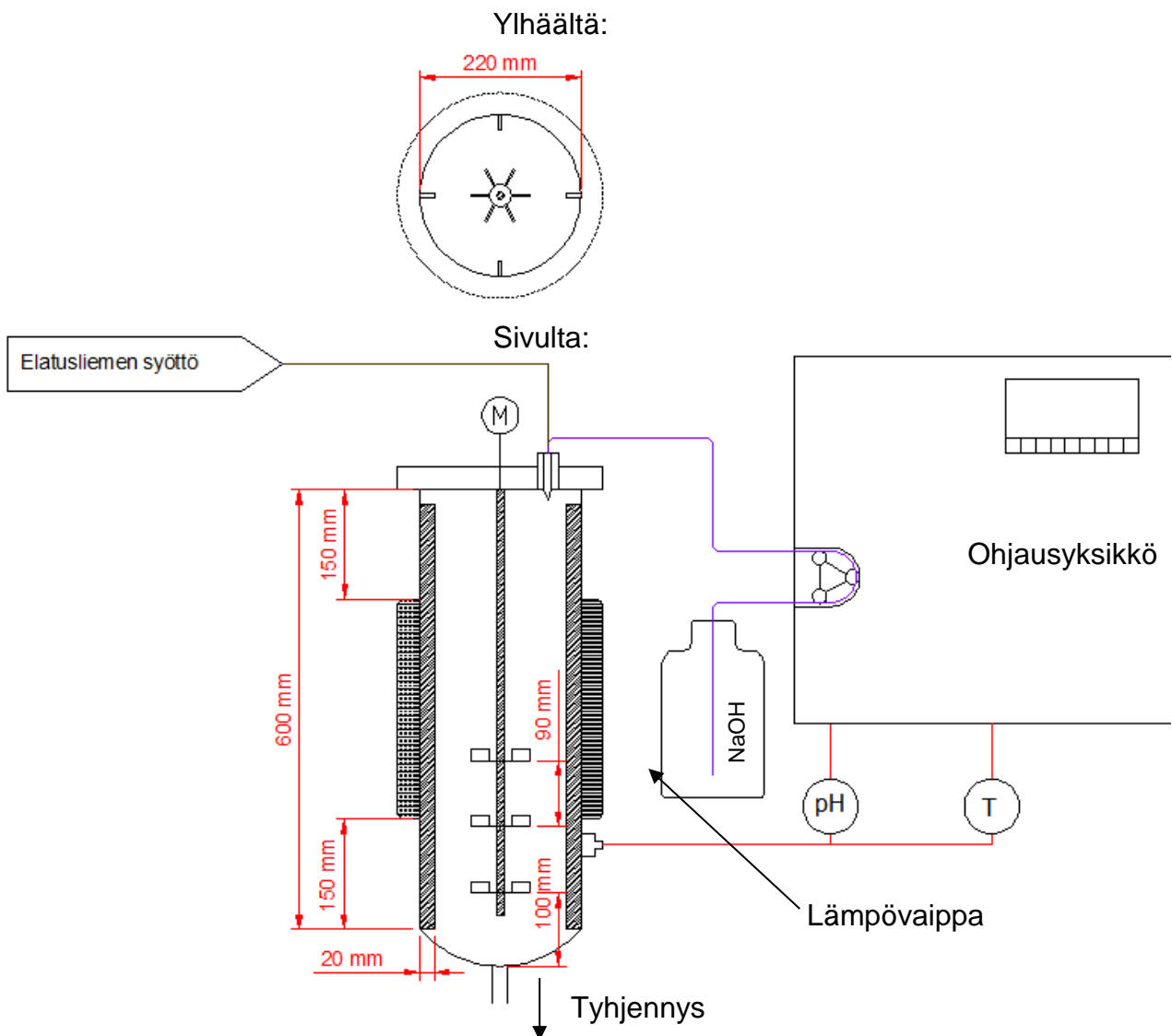
Inuliini on luonnossa esiintyvä polysakkaridiryhmä, jonka molekyylit ovat eripituisia polysakkarideja, jotka koostuvat pääosin toisiinsa yhdistyneistä fruktooseista. Näitä polysakkarideja kutsutaan yleisesti fruktaaneiksi. Polysakkaridiketjujen pituus vaihtelee yleensä kahden ja 60 sokerin ketjujen välillä mutta ne voivat olla pidempiäkin. Inuliiniksi luetaan fruktaanit, joiden sakkariidiketjut eivät ole haarautuneita. Inuliinia eristetään yleisesti mm. sikurijuuresta. (3)

Inuliinin liukoisuus veteen vaihtelee sakkariidiketjujen pituuden mukaan. Elintarvikkeissa ja luontaistuotteissa käytetään yleensä suhteellisen lyhytketjuista inuliinia, koska se liukenee veteen paremmin ja on siten helpommin työstettävä (5). Inuliinia on myös saatavilla luomutuotteiden valmistusta varten, joten sitä päätettiin käyttää tässä työssä.



### 3 KASVATUS BIOREAKTORISSA

Työohje kasvatusta varten saatiin toimeksiantajalta. Elatusliemen reagenssien valinnassa on huomioitu se, että mahdollisimman suuri osa niistä on luomutuotteita. Tästä syystä mm. tavallisten puskurien sijaan käytetään luonnonmukaisia vastineita. Käytetyt reagenssit ovat lueteltuna liitteessä 1. Työssä käytettiin bakteerien kasvatukseen B. Braun Internationalin valmistamaa Biostat C15-reaktoria. Reaktorin suurin tilavuus on 15 litraa, ja työssä tehtyjen kasvatuserien suuruus oli n. 10 litraa. Reaktorin kaaviokuva on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Reaktorin kaaviokuva.

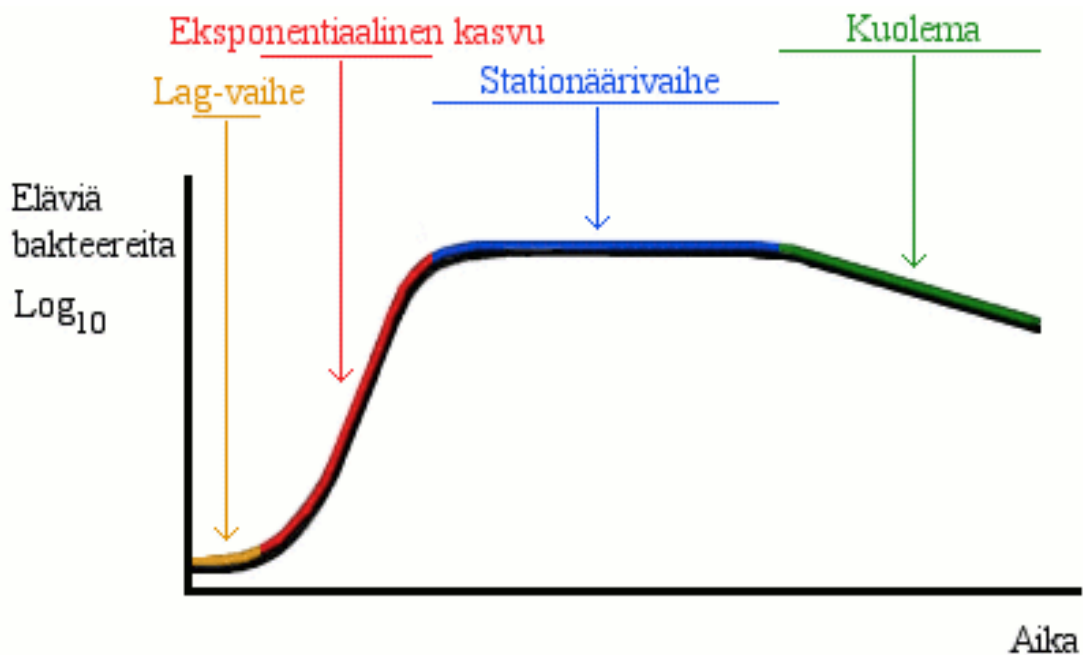
Ajon aikana lämpötila pidettiin vakiona (37 °C) ja kasvatusnesteen pH 5,8. Koska elatusliemi on marjojen takia luonnostaan melko hapanta ja koska *L. plantarum* tuottaa kasvaessaan maitohappoa, käytettiin pH:n säätämisessä 5 M vahvuista natriumhydroksidiliuosta. Koska liuoksen pH alenee luonnostaan kasvamisen edetessä, ei happoa tarvinnut erikseen lisätä pH:n säätämiseksi. Ilmastusta ei käytetty kasvatuksen aikana, koska *L. plantarum* ei tarvitse happea kasvamiseen.

Kontaminaatioiden välttämiseksi reaktori ja elatusliemi steriloidaan 15 minuuttia lämpötilassa 121 °C. Sterilointi tehdään kahdessa osassa. Ensimmäisessä vaiheessa steriloidaan reaktori sekä elatusliemi lukuun ottamatta hiivauutteita ja hiivapeptonia. Toisessa osassa steriloidaan muista aineista erillään hiivauutteet sekä hiivapeptoni. Näin toimiessa vältetään Maillardin reaktioiden aiheuttama ei-toivottu tummuminen. Maillardin reaktioksi kutsutaan reaktiosarjaa, jossa hiivauutteen proteiinit ja vapaat aminohapot reagoivat mustaherukkajauheen sokereiden kanssa (6). Ne muodostavat yhdisteitä, jotka vaikuttavat tuotteen ulkonäköön ja makuun. Marjaliuos ja hiivauuteliuos yhdistetään steriloinnin jälkeen aseptisesti reaktorissa, minkä jälkeen valmiiseen elatusliemeen lisätään maitohappobakteereita etukäteen kasvatetulla siirrosteviljelmällä.

Koska reaktorin lämmitys tapahtuu reaktorin kyljessä olevan lämpövaipan avulla ja reaktoriin lisätään natriumhydroksidia ajon aikana, täytyy reaktoria sekoittaa. Sekoitus varmistaa myös, että solut ja muut liukenemattomat liemen osat eivät sakkaudu pohjaan, vaan liemi pysyy heterogeenisenä koko ajon ajan. Sekoitusnopeudeksi valittiin 200 RPM (revolutions per minute, kierrosta minuutissa).

Bakteerisolujen kasvu voidaan jakaa neljään eri vaiheeseen (kuva 2). Välittömästi bakteerien siirrostamisen jälkeen alkaa lag-vaihe, jonka aikana bakteerit sopeutuvat uuteen ympäristöönsä. Seuraavaksi alkaa eksponentiaalisen kasvun vaihe, jolloin bakteerien määrä kasvaa nopeasti. Vaihe jatkuu niin kauan kuin kasvuolosuhteet ovat bakteerille suotuisat. Kun ympäristössä tapahtuu muutoksia, kuten jonkin ravinteen loppuminen, kasvu lakkaa käytännössä kokonaan, ja stationäärivaihe alkaa, jolloin bakteerien määrä pysyy käytännössä

muuttumattomana. Lopuksi bakteerit alkavat kuolla ja niiden määrä alkaa vähentymään. (7)



Kuva 2. Bakteerien yleinen kasvukäyrä (8).

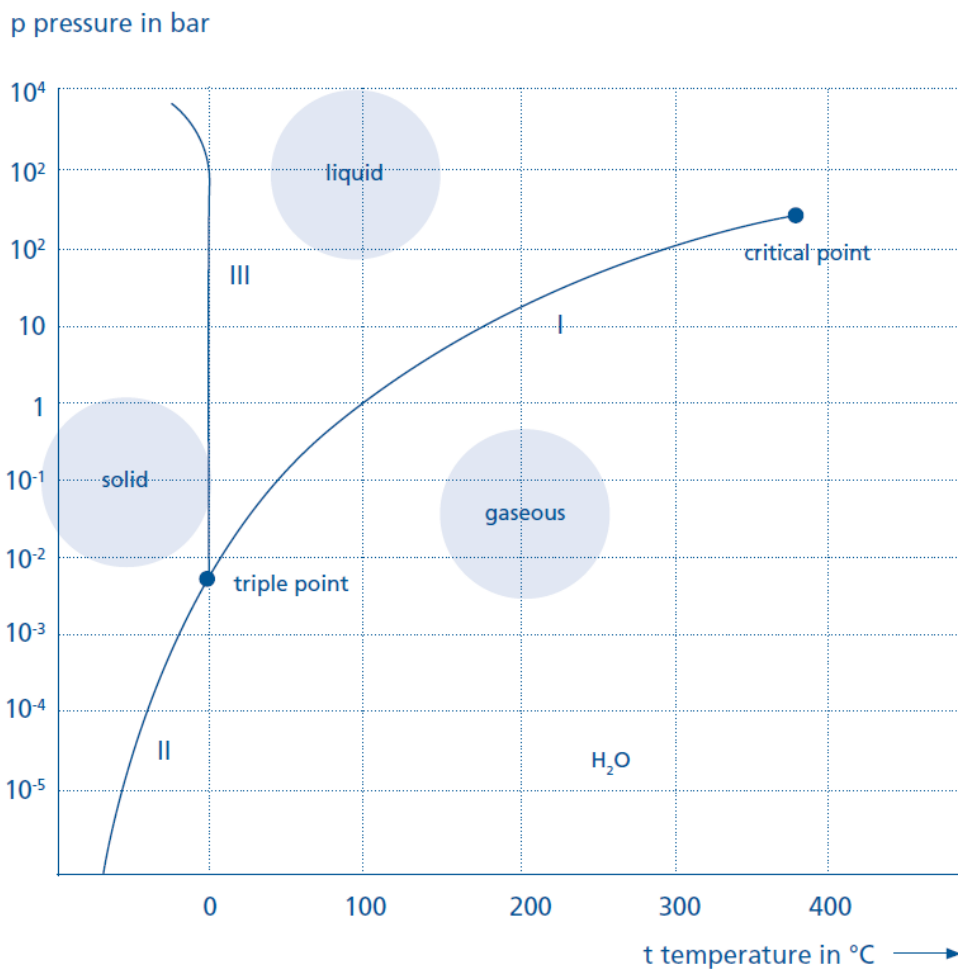
Koska elävien bakteerien määrä pyritään saamaan mahdollisimman suureksi, pyritään kasvatus lopettamaan stationäärivaiheen alettua. Eksponentiaalisen kasvuvaiheen odotettiin kestävän n. 10–11 tuntia, joten kasvatusajaksi valittiin 12 tuntia. Kasvuvaiheen loppuminen voitiin todeta maitohapon tuotannon ja sen myötä natriumhydroksidin kulutuksen pysähtymisestä.

## 4 KYLMÄKUIVAUS

Kylmäkuivaus on menetelmä tuotteen stabiiliuden sekä myynti- ja käyttöiän kasvattamiseen. Kylmäkuivauksessa tuotteen vesipitoisuutta lasketaan ilman, että tuotetta joudutaan kuumentamaan, joten menetelmä mahdollistaa myös esimerkiksi mikrobien elinkelpoisuuden säilyttämisen varastoinnin aikana. Kylmäkuivattua tuotetta on myös helpompi säilyttää kuin esimerkiksi vastaavaa pakastettua tuotetta, koska kylmäkuivattu tuote ei vaadi säilytykseltä yhtä vaativia olosuhteita, vaan sitä voidaan säilyttää esimerkiksi jääkaapissa. Kylmäkuivuri koostuu yleisesti kuivauskammioista, tyhjiöpumpusta ja kondensaattorista. (9)

Kylmäkuivaustekniikka kehitettiin ensimmäisen kerran vuonna 1890 Altmanin (10) toimesta, ja pääpiirteiltään nykyisen kaltaisia laitteistoja on kehitetty vuodesta 1909 lähtien, L. F. Shackellin (11) kehittäessä varhaisimpana pidetyn menetelmän, joka käyttää kuivauskammiota, erillistä kondensaatiokammiota ja mekaanista tyhjiöpumppua.

Kuivaustekniikka perustuu sublimaatioon. Kuvassa 3 havainnollistetaan veden käyttäytymistä eri paineissa ja lämpötiloissa. Normaalissa, noin 1 barin paineessa, vesi jäätyy nesteestä kiinteäksi, kun sen lämpötilaa lasketaan alle 0 °C:n (kuvassa faasiraja III). Kun painetta alennetaan tarpeeksi, ylitetään faasiraja II, jolloin tapahtuu veden sublimaatio kiinteästä kaasuksi. Tällöin tuote ei missään vaiheessa pääse sulamaan, mutta se menettää silti vettä, mikä laskee mikrobien aktiivisuutta.

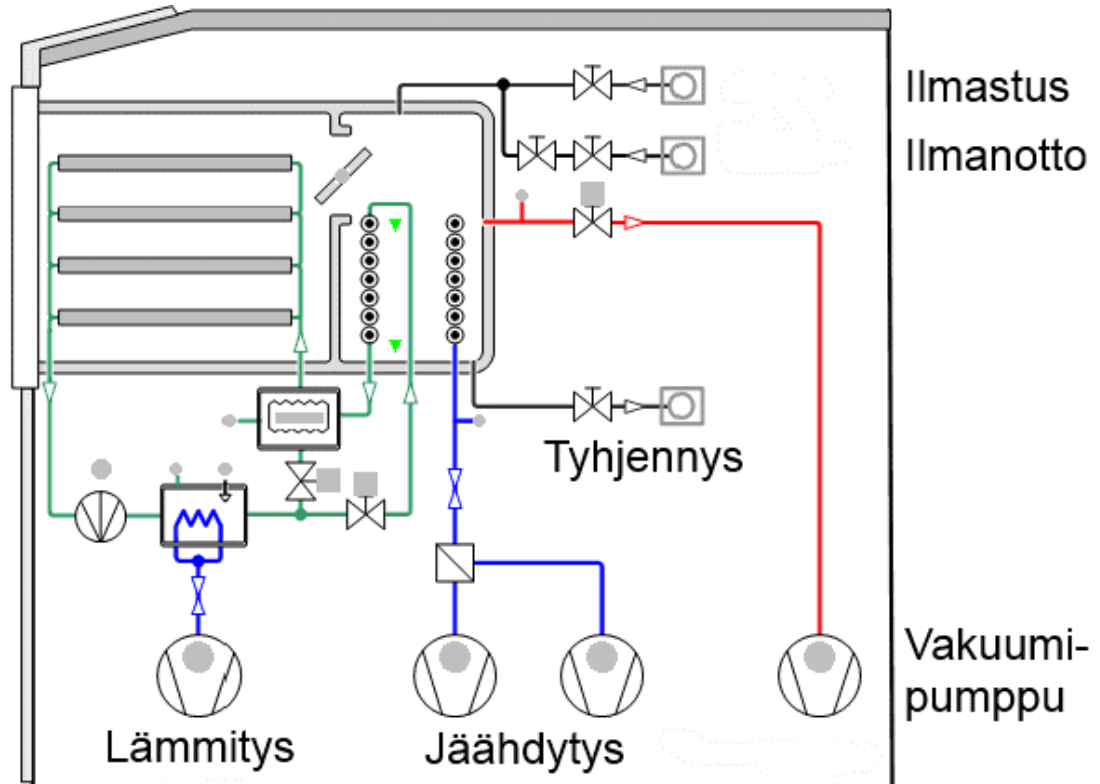


Kuva 3. Faasidiagrammi (12).

Kylmäkuivaus jakaantuu kolmeen päävaiheeseen, jotka ovat jäädytys, primääri-  
nen eli pääkuivaus, ja sekundäärinen eli jälkikuivaus. Jäädytyksessä tuote jää-  
dytetään joko kylmäkuivurissa itsessään tai erillisessä pakastimessa. Pääkuiva-  
uksessa kuivauskammion painetta lasketaan, jonka jälkeen tuotteen lämpötilaa  
asteittain nostetaan, jotta sublimaatio saadaan tapahtumaan. Tämä vaihe jatkuu  
tuotteen laadusta riippuen niin kauan, että solujen ulkopuolinen vapaa vesi on  
sublimoitunut pois. Jälkikuivauksessa painetta alennetaan ja lämpötilaa noste-  
taan edelleen niin, että soluissa sitoutuneena oleva vesi kulkeutuu solun pin-  
taan, josta se sublimoituu pois hidastaen solun metaboliaa (9).

#### 4.1 Kuivurin rakenne

Kuivurin rakenteen pääosat ovat kuivauskammio, kondensaatiokammio sekä tyhjiöpumppu.



Kuva 4. Kylmäkuivurin rakennekaavio (13).

Kuivauskammiossa tuotehyllöjen sisällä kulkee lämmönsiirtoainetta, jolla tuotetta tarpeen mukaan pystytään joko lämmittämään tai jäähdyttämään. Lämpöä täytyy siirtää laitteessa johtamalla, koska kuivauksen aikana lämpötilaa on vaikeaa säätää konvektion avulla johtuen pienestä ilmanpaineesta. Tämän takia tuote täytyy kuivata astioissa, joiden pohja on mahdollisimman tasainen, jotta lämmönsiirto tapahtuisi mahdollisimman suuren pinta-alan läpi. Työssä käytettiin kuivausalustoina alumiinivuokia, joiden pohjan mitat olivat 8 cm \* 10,5 cm.

## 4.2 Kuivauksen vaiheet

Ensimmäiseksi kuivattava tuote on jäädytettävä. Jäädytyksen tavoitteena kylmäkuivauksessa on erottaa vedessä oleva kiintoaine, kuten solut, vesifaasista sekä rajoittaa biologisten ja kemiallisten reaktioiden etenemistä ja rajoittaa nesteiden ja nestevälitteisten aineiden liikkumista ja vuorovaikutusta. Jää luo myös oivan tukirakenteen kuivattavalle tuotteelle, koska se ei juuri estä haihtuvien vesihöyryjen poistumista tuotteesta. (9)

Pääkuivauksen tavoitteena on poistaa suurin osa liuottimena toimivasta vedestä tuotteesta ilman, että tuote pääsee sulamaan kuivauksen aikana. Pääkuivauksen alkaessa jäädytetyn ja jäähdytetyn tuotteen sisältävässä kuivauskammiossa painetta lasketaan siten, että faasidiagrammissa (kuva 3.) saavutetaan faasiraja II. Kun tässä vaiheessa systeemiin tuodaan hieman lämpöä lämmityshyllyjen välityksellä, alkaa sublimoituminen, jossa kiinteä vesi höyrystyy sulamatta nesteeksi välissä. Sublimoitunut vesihöyry poistuu vakuumpumpun avulla kondensaatiokammioon, jossa vesihöyry kondensoituu vedeksi.

Tärkeimmät parametrit pääkuivauksen aikana ovat kuivauskammion paine, hyllyn lämpötila sekä tuotteen lämpötila. Hyllyä lämmittämällä tuotteeseen siirretään energiaa, joka kuluu veden haihtumiseen. Pitämällä paine riittävän alhaisena estetään tuotteen sulaminen, kun siihen johdetaan lämpöä. Jos painetta tai lämpötilaa nostetaan liikaa, tuote saattaa sulaa tai sen huokoinen rakenne saattaa romahtaa, jolloin täydellinen kuivuminen hidastuu.

Pääkuivauksen päättymisen ja jälkikuivauksen alkamisen välinen raja ei aina ole selkeä, koska solujen sisäinen vesi alkaa haihtumaan samaan aikaan, kun niitä ympäröivät jääkristallit ovat sublimoituneet pois. Käytännössä pääkuivausvaiheen päätyminen voidaan todeta esimerkiksi siitä, että tuotteen lämpötila seuraa hyllyn lämpötilan muutoksia vain pienellä viiveellä.

Jälkikuivauksessa tavoitteena on poistaa jäljellä olevasta kosteudesta niin suuri osa, etteivät biologiset tai kemialliset reaktiot enää etene. Tässä vaiheessa saavutetaan myös kylmäkuivauksen säilyvyyttä lisäävä vaikutus, minkä takia

jälkikuivauksen huolellinen suorittaminen on tärkeää. Jälkikuivauksessa hyllyn ja tuotteen lämpötilaa nostetaan samalla, kun paine pidetään edelleen alhaisena tai sitä lasketaan entisestään. Tässä vaiheessa kuivausta tuotteessa on jäljellä enää siihen absorptoituneet pakokaasut pääkuivauksesta, pinnoille kerääntynyt vesikaasu sekä soluihin sitoutunut vesi.

Inuliini vaikuttaa kylmäkuivauksessa soluja suojaavasti. Se sitoo itseensä vettä solujen ulkopuolella ja nostaa ympäristön osmoottista painetta, jolloin vapaan veden määrä myös solujen sisällä vähenee, mikä ehkäisee suurien jääkristallien muodostumista solujen sisälle jäädyttämisen aikana. (13)

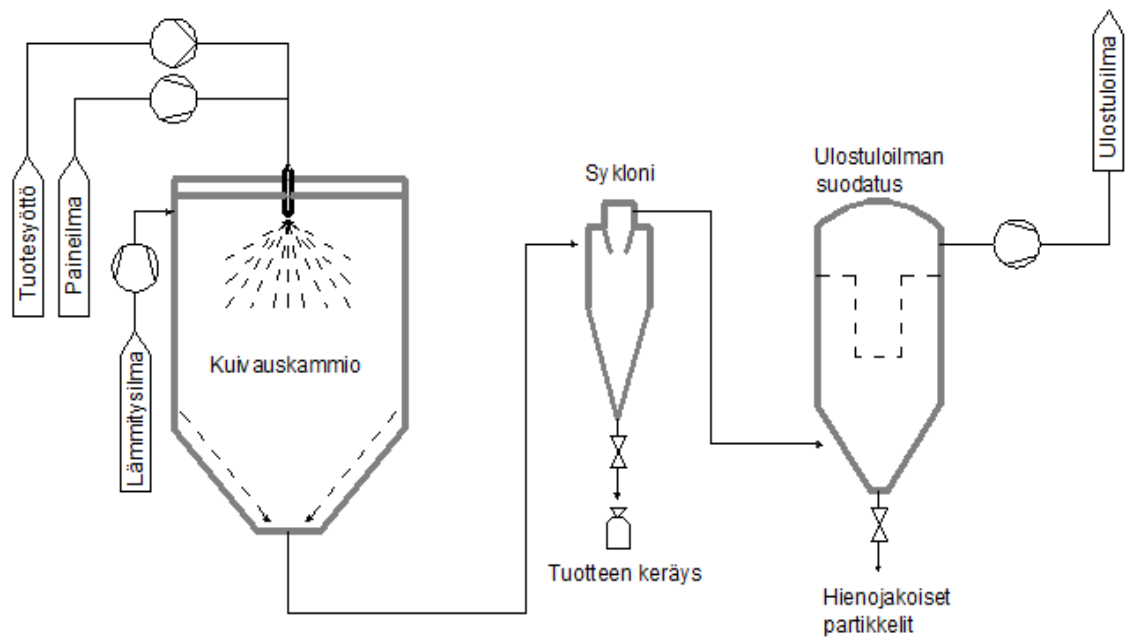


## 5 SPRAY-KUIVAUS

Spray-kuivauksessa kuivattava tuote sumutetaan pieniksi pisaroiksi, jotka kuivataan kuumassa ilmassa nopeasti siten, että pisaroista jäljelle jäävät kiinto-ainehiukkaset muodostavat kuivan jauheen, jonka säilyvyys on parempi kuin veteen suspensoidulla tuotteella. Yleisiä spray-kuivauksella valmistettavia tuotteita ovat mm. maitojauhe ja pikakahvi. Koska kuivaus perustuu lämmitykseen, se on mikrobeille hieman rasittavampi kuin kylmäkuivaus. Lämpötilat eivät kuitenkaan ole niin suuria, että ne aiheuttaisivat proteiinien denaturoitumista tai ruskettumisreaktioita (14). Menetelmä on myös huomattavasti nopeampi ja edullisempi kuin kylmäkuivaus, eikä supernatantissa oletettu olevan suuria määriä bakteereja sentrifugoinnin jälkeen, joten sitä kannatti hyödyntää työssä neste-liukoisten ainesosien kuivaamisessa.

### 5.1 Rakenne

Työn spray-kuivaus tehtiin Niro Mobile Minor -kuivurilla, joka on suunniteltu laboratorio- ja pilottimittakaavan kuivauksiin. Kuivain toimii myötävirtausperiaatteella, eli tuote ja kuivauskammioon syötetty paineilma syötetään samansuuntaisesti kammioon ylhäältä päin. Spray-kuivain koostuu sumuttimesta, kuivauskammioista ja syklonista. Kuivaimen rakennekaavio on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Spray-kuivaimen rakennekaavio.

Kuivattava neste pumpattiin suuttimen läpi kuivauskammioon, johon sen kanssa johdetaan paineilmaa samansuuntaisesti nestesyötön kanssa. Suuttimen pieni koko sekä voimakas ilmavirta nestevirran ulostulon ympärillä aiheuttavat nesteen pisaroitumisen, ja pisaroiden vajotessa kohti kuivauskammion pohjaa neste haihtuu pisaroista, jättäen jäljelle kiintoainepartikkeleita. Partikkelit siirtyvät ilmavirran mukana ulos kuivauskammioista, jonka jälkeen ne kerätään talteen syklonissa. Lopuksi ulostulevasta ilmasta suodatetaan erittäin hienojakoinen jauhe pois ennen kuin ilmavirta päästetään ulos.

## 5.2 Toimintaperiaate

Kuivauksen kannalta tärkeimmät parametrit ovat kuivauskammion lämpötila, tuotteen ulostulolämpötila, pisarakoko ja leijunta-aika. Pisarakokoon vaikuttaa kaksivirtaussuutinta käytettäessä suuttimen ilmanpaine. Suurempi ilmanpaine aiheuttaa nesteeseen suuremman leikkausvoiman, jolloin se pilkkoutuu pienemmiksi pisaroiksi. Jotta pisaroituminen tapahtuu odotetusti, ilmaa täytyy syöttää suuttimen läpi riittävästi suhteessa syötettävään nesteeseen. (15) Käytännössä ilmaa syötetään suuttimen läpi kolme kertaa niin paljon kuin kuivattavaa

nestettä pisaroinnin takaamiseksi (16). Leijunta-aika riippuu siitä, missä kullmassa pisarat sumutetaan kammioon. Jos sumu tulee suuttimesta kapeana kartiona, jää leijunta-aika lyhyeksi eivätkä pisarat välttämättä ehdi kuivua kunnolla. Leveä sumutuskartio pidentää leijunta-aikaa, mutta liian leveälle sumutettaessa pisarat saattavat osua kuivauskammion seinämiin ja kuivua niihin kiinni.

Kuivauskammion ja ulostuloilman lämpötiloista voidaan arvioida lämpö määrä, jonka pisarat saavat kuivauskammiossa ollessaan. Tarvittava lämpö määrä riippuu kuivattavan nesteen syöttönopeudesta, pisarakoosta ja pisaroiden kiintoainepitoisuudesta. (15) Tarkkojen arvojen laskeminen ei kuitenkaan ole kuivusta tehtäessä aina tarpeen, vaan usein voidaan käyttää kokemuspohjaisia likiarvoja.

Kuivattu jauhe on spray-kuivauksen jälkeen amorfista. Jos aineelle ominaista lasisiirtymälämpötilaa  $T_g$  ei ole ylitetty, jauhe on lasitilassa, jolloin se on irtonaista ja helposti käsiteltävää. Jos lasisiirtymälämpötila ylittyy, aine menee kumitilaan, jolloin se takertuu toisiin hiukkasiin ja astioiden seiniin sekä kiteytyy kovaksi ja hyvin vaikeasti muokattavaksi. Kuivattavaan supernatanttiin mustaheikkajauheesta lienneet sakkaroosi, fruktoosi ja glukoosi laskevat lasisiirtymälämpötilaa, joten sen kuivaaminen sellaisenaan on vaikeaa. (14)

Erilaisten polysakkaridien, kuten maltodekstriinin, on havaittu nostavan lasisiirtymälämpötilaa, joten työssä tähän pyrittiin lisäämällä inuliinia supernatanttiin vesiliuoksena sekä jauheena.

## 6 TYÖN SUORITUS

Työ jakaantui kolmeen kasvatukseen ja niille tehtyihin jatkotoimenpiteisiin. Ensimmäisestä kasvatuksesta saatua sentrifugoitua supernatanttia spray-kuivattiin, supernatantin kiintoainepitoisuus määritettiin ja sen elävyys määritettiin. Lisäksi reaktorissa kasvatetun liuoksen elävyys määritettiin. Spray-kuivatuista jauheista määritettiin kosteuspitoisuus sekä veden aktiivisuus. Toisesta kasvatuksesta määritettiin kasvatetun liuoksen sekä sentrifugoidun solumassan elävyys. Solumassaa kylmäkuivattiin, supernatanttia spray-kuivattiin ja näistä määritettiin kosteuspitoisuudet sekä veden aktiivisuus. Kolmannesta kasvatuksesta suoritettiin solumassan kylmäkuivaus.

### 6.1 Kasvatus

Kasvatus aloitettiin valmistamalla siirrostusliemi MRS-liemeen edeltävänä päivänä. Siirrostetta inkuboitiiin ravistelijassa 17 tuntia lämpötilassa 30 °C ravistelunopeudella 150 RPM.

Elatusliemi valmistettiin liuottamalla marjajauhe veteen ja lisäämällä siihen pektinaasientsyymiä. Marjaliuosta kuumennettiin lämpötilaan 50 °C 60 minuutin ajaksi, jonka jälkeen siihen lisättiin luonnolliset stabilointi- ja puskuriaineet Q-naturale ja Aquamin S sekä mangaanijauheet. Elatusnesteeseen pH säädettiin natriumhydroksidilla ja se steriloitiin lämpötilassa 121 °C 15 minuuttia.

Hiivauutteet ja hiivapeptoni liuotettiin veteen ja steriloitiin erillään, ja lisättiin reaktoriin samaan aikaan, kun siirrostetta lisättiin. Reaktorin lämpötilaksi säädettiin 37 °C, sekoitus asetettiin nopeudelle 200 RPM, pH arvoon 5,8 ja pH:n automaattinen säätö kytkettiin päälle. Kasvatusaika oli 12 tuntia.

Kasvatuksen päätteeksi solumassa sentrifugoitiin 3000 g:ssä 10 minuuttia, jonka jälkeen supernatantti valmisteltiin spray-kuivausta ja solumassa kylmäkuivausta varten.

## 6.2 Spray-kuivaus

Ennen spray-kuivausta supernatantista määritettiin kiintoainepitoisuus, jonka perusteella spray-kuivurin asetukset valittiin. Spray-kuivaus suoritettiin Niro Mobile Minorilla. Kuivauksessa kuivauskammion lämpötilaksi valittiin 200 °C, ja tuotteen ulostulolämpötilaksi 80 °C. Lämpötilat olivat samaa suuruusluokkaa kuin maitohappobakteereita kuivatessa (17), vaikka supernatantissa ei oletettu olevan merkittävää määrää bakteereita jäljellä. Näillä arvoilla kuivatun tuotteen kosteuspuiteisuus oli kuitenkin riittävän alhainen säilyvyyttä ajatellen (18). Ulostulolämpötilaa kontrolloitiin säätelämällä sisään pumpattavan nesteen virtausnopeutta. Pisarointisuuttimen ilmanpaine pidettiin 2 barissa, ja ilmavirran määrä valittiin kuivattavan aineen kiintoainepitoisuuden mukaan. Suuttimen ilmanpaine määrittää pisarakoon kuivauskammiossa, suuremman paineen tuottaessa pienempiä pisaroita. Ilmavirran haluttiin olevan kolme kertaa niin suuri kuin syötettävän tuotteen virta. Tuotteen syöttövirta määritettiin kuivauskammion ja ulostuloilman lämpötilan mukaan. Mitä suurempi kammion lämpötila on, sitä nopeammin pisaroista pystytään haihduttamaan kosteutta, ja sitä nopeammin tuotetta pystytään syöttämään kuivuriin. Tuotteen syöttönopeutta määritettäessä otettiin huomioon myös tuotteen kiintoainepitoisuus, sillä se vaikuttaa haihdutettavan veden määrään. (16)

## 6.3 Kylmäkuivaus

Ensimmäinen kylmäkuivaus suoritettiin ulkopuolisen tahon toimesta, ja siinä käytetyistä parametreista ei ole tietoja saatavilla. Toinen kylmäkuivaus suoritettiin Christ Epsilon 1-6D -laitteella. Kuivattuja näytteitä punnittiin 84 cm<sup>2</sup>:n suuruisille alumiinivuolille 60 g kuivattavan kerrospaksuuden ollessa 0,3 – 0,9 cm:n välillä. Käytetty kuivausohjelma on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Kylmäkuivausohjelma

Vaihe	Tyyppi	Aika (h)	Lämpötila (°C)	Paine (mbar)	Varoraja (mbar)
1	Lastaus		-10		
2	Jäädytys	1	-30		
3	Jäädytys	1	-30		
4	Pääkuivaus	0,33	-35	1,030	
5	Pääkuivaus	0,25	-35	0,220	1,650
6	Pääkuivaus	4	-30	0,220	1,650
7	Pääkuivaus	8	-20	0,220	1,650
8	Pääkuivaus	3	-15	0,220	1,650
9	Pääkuivaus	2	-10	0,220	1,650
10	Jälkikuivaus	1	20	0,220	1,650
11	Jälkikuivaus	8	20	0,220	1,650

Kuivausohjelman pituus oli n. 29 tuntia. Kuivauksen etenemistä esittävä kuvaaja on esitetty liitteessä 2.

#### 6.4 Elävyysmääritykset

Elävyysmääritys suoritettiin maljaviljelynä MRS-maljoille toimeksiantajan antamien työohjeiden mukaisesti. Kiinteitä näytteitä punnittiin 5 grammaa 45 grammaan peptonivettä erlenmeyer-pullossa, jota ravisteltiin 1 tunti nopeudella 200 RPM. Tämän jälkeen saatua liuosta pipetoitiin 5 ml 45 ml:aan, jonka jälkeen näytettä pipetoitiin 1 ml 9 ml:aan peptonivettä 8 kertaa saavuttaen lopulta  $10^{-10}$  laimennoksen. Laimennoksia pipetoitiin kaksille rinnakkaisille MRS-maljoille. Maljoja inkuboitiin anaerobisesti 2-3 vuorokautta lämpötilassa 37 °C. Tulokset laskettiin maljoista työohjeesta saadulla kaavalla:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Jossa:

$N$  = Elävyys muodossa CFU/g (Colony forming units, pesäkkeen muodostamia yksiköitä)

$\Sigma C$  = Kahden peräkkäisen laimennosten yhteenlaskettu pesäkemäärä

$V$  = Maljoille pipetoitu nestetilavuus millilitroissa

$n_1$  = Pienimmästä laimennoksesta saatujen maljojen lukumäärä

$n_2$  = Suuremmasta laimennoksesta saatujen maljojen lukumäärä

$d$  = Pienimmän laimennoksen laimennoskerroin

## 6.5 Kosteusmääritykset

Supernatantista sekä spray-kuivatuista ja kylmäkuivatuista jauheista määritettiin kosteuspitoisuus gravimetrisesti punnitsemalla näytettä noin viisi grammaa tarkasti petrimaljoille, joita inkuboitiin lämpökaapissa +50 °C:ssa, jauheita yksi vuorokausi ja nestemäisiä näytteitä kolme vuorokautta.

## 6.6 Veden aktiivisuus

Veden aktiivisuudella ( $a_w$ -arvo) tarkoitetaan tuotteessa olevan vapaan veden määrää. Se lasketaan suhteellisen kosteuden tapaan tuotteen veden osapaineen ja veden suhteen kylläisen ilman osapaineen suhteena. Mitä pienempi  $a_w$ -arvo on, sitä harvempi mikrobi kykenee kasvamaan tuotteessa. Kun  $a_w$ -arvo on alle 0,6 mikrobit eivät enää kykene lisääntymään tuotteessa (19).

Veden aktiivisuus mitattiin Rotronic Hygroskop BT-RS1 -laitteella. Laitteen määrittämiskammioon laitettiin näytettä noin kaksi grammaa, josta laite mittasi veden aktiivisuuden automaattisesti.

## 7 TULOKSET

Solujen kasvatuksissa seurattiin pH:n muutosta sekä natriumhydroksidin kulu-  
tusta kasvatuksen aikana. Kuvaajat näiden muutoksista ovat nähtävissä liitteis-  
sä 3-5. Sentrifugoinnissa eroteltu solumassa vastaa noin 30 % kasvatuksen  
kokonaismassasta. Työn eri vaiheissa olevat näytteet on nimetty formaatissa  
kuukausi-päivä-työvaihe-erottelunumero-rinnakkaisnäyte. Päivämäärä on kysei-  
sen erän kasvatuksen aloituspäivä. Työvaiheet ovat nimetty seuraavasti:

FF = kasvatus

GG = sentrifugoitu solumassa

SS = spray-kuivaus

KK = Kylmäkuivaus

Erottelunumero on spray-kuivauksissa järjestysnumero, ja kylmäkuivauksissa  
näytteen inuliinipitoisuus. Rinnakkaisnäytteet erotellaan A- ja B-kirjaimilla. Esi-  
merkiksi toisesta kasvatuksesta tehdyn 5 % inuliinia sisältävän näytteen en-  
simmäinen rinnakkaisnäyte saa koodin 0523KK5A. Kaikki näytteet ja niiden tie-  
dot ovat lueteltuna liitteessä 6.

### 7.1 Reaktorikasvatus

Taulukossa 2 on esitetty reaktorikasvatusten pH:n muutokset, natriumhydroksi-  
din kulutus sekä bakteerien elävyys kasvatuksen lopussa.



Taulukko 2. Kasvatusten tulokset.

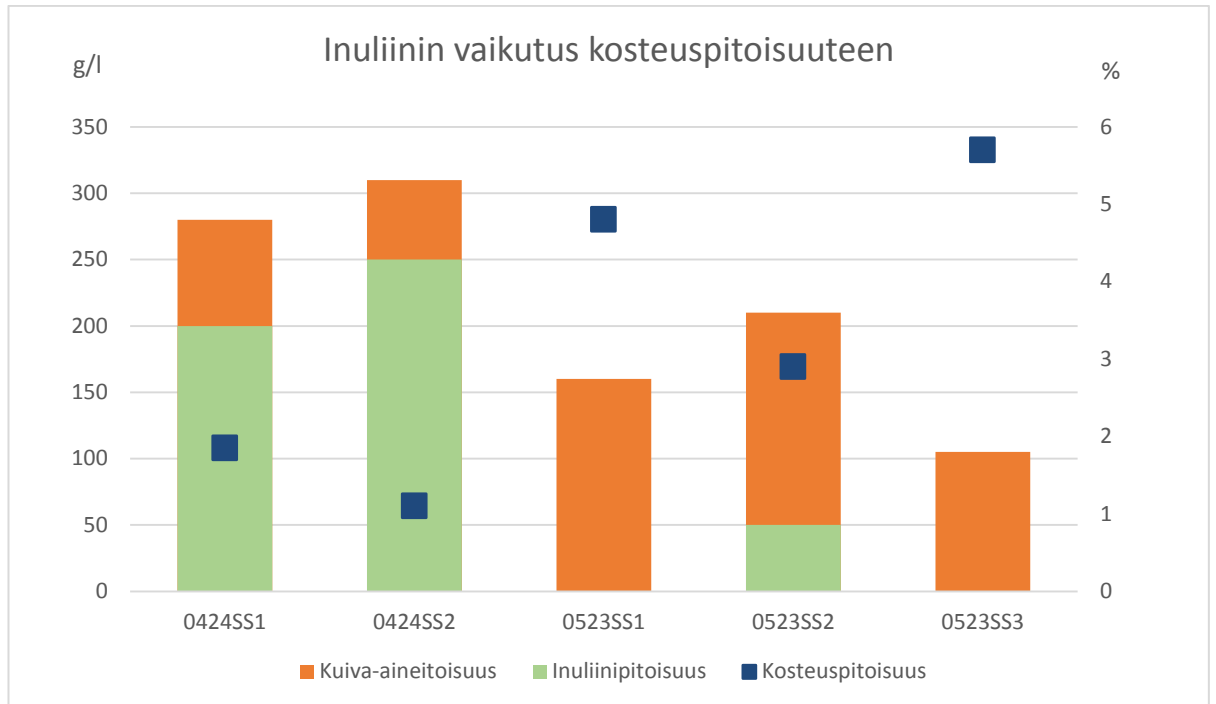
Kasvatuserä	0424FF	0523FF	0606FF
pH kasvatuksen alussa	6,6	5,5	5,9
pH kasvatuksen lopussa	4,5	4,8	5,8
natriumhydroksidin kulutus	-	500 ml	960 ml
bakteerien elävyys	$6,7 \cdot 10^9$ CFU/ml	$8,8 \cdot 10^{10}$ CFU/ml	$2,5 \cdot 10^{10}$ CFU/ml

## 7.2 Spray-kuivaus

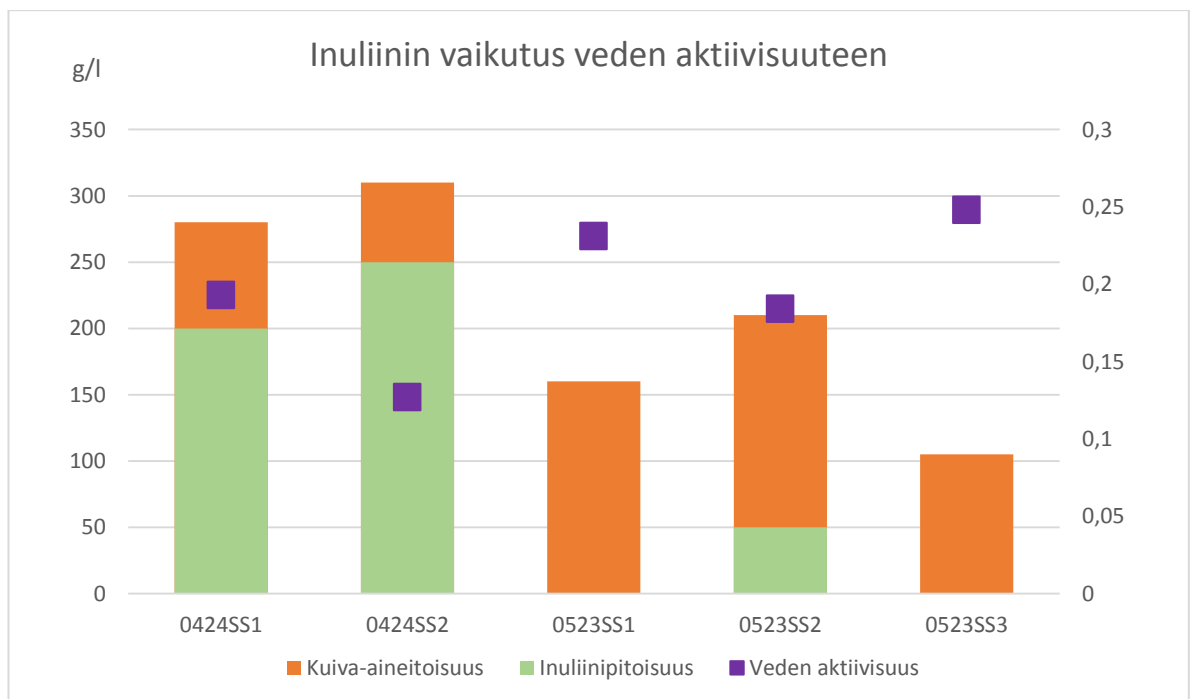
Supernatantin kuiva-ainepitoisuudeksi määritettiin 16 %. Taulukossa 3 on esitelty spray-kuivattujen näytteiden laskennalliset inuliini- ja kuiva-ainepitoisuudet sekä kuivatusta jauheista mitatut kosteuspitoisuudet ja veden aktiivisuudet. Kuviot 1 ja 2 havainnollistavat kuiva-ainepitoisuuksien muutoksen vaikutusta kosteuspitoisuuteen sekä veden aktiivisuuteen.

Taulukko 3. Spray-kuivausten tulokset.

Kuivauserä	0424SS1	0424SS2	0523SS1	0523SS2	0523SS3
Inuliinia	200 g/l	250 g/l	0 g/l	50 g/l	0 g/l
Muuta kuiva-ainetta	80 g/l	60 g/l	160 g/l	160 g/l	105 g/l
Kosteuspitoisuus kuivauksen jälkeen	1,85 %	1,1 %	4,8 %	2,9 %	5,7 %
veden aktiivisuus kuivauksen jälkeen	0,193	0,127	0,231	0,184	0,248



Kuvio 1. Inuliinin vaikutus kosteuspitoisuuteen.



Kuvio 2. Inuliinin vaikutus veden aktiivisuuteen.

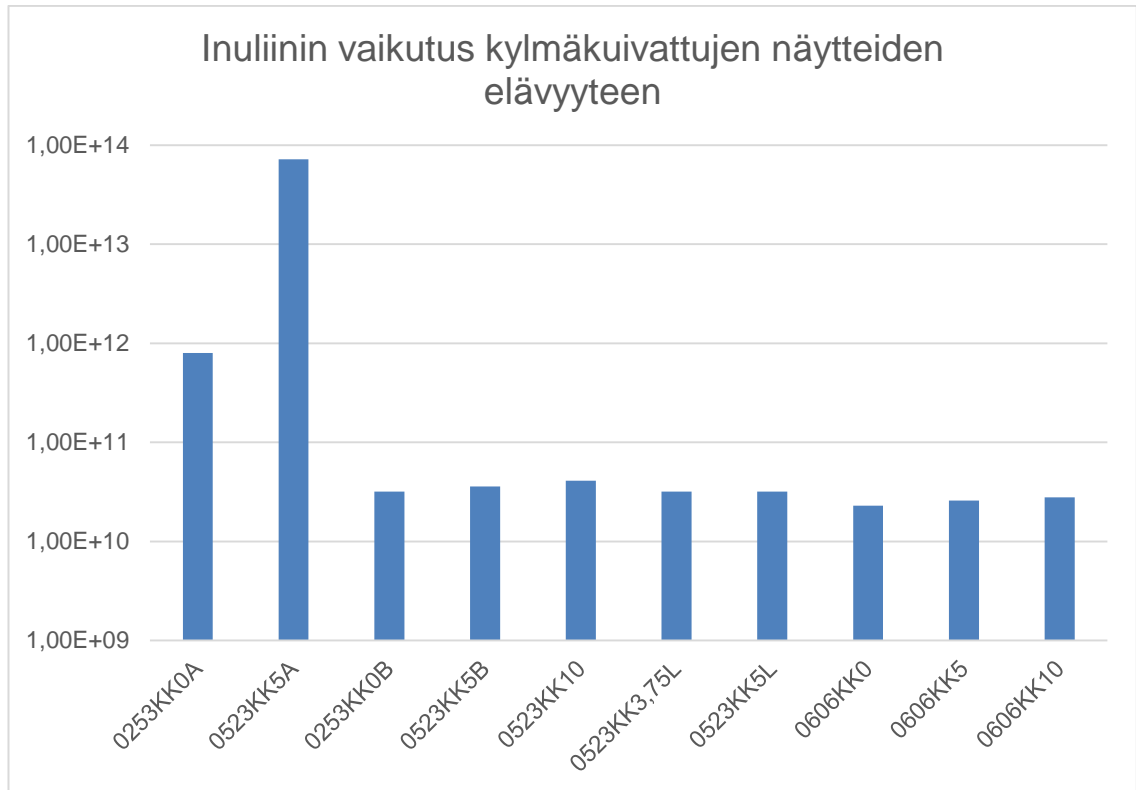
### 7.3 Elävyyismääriykset

Elävyyislaskuissa käytetyt maljalaskennat ja esimerkkilasku ovat liitteessä 7. Kaikkien elävyyismääriytysten tulokset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Elävyyismääriykset.

Näyte	Elävyyis (CFU/g)
0424FF	6,4E+09
0523FF	8,8E+10
0606FF	2,5E+10
0523GG	2,3E+12
0606GG	1,3E+11
0523KK0A	8,0E+11
0523KK5A	7,2E+13
0523KK0B	3,2E+10
0523KK5B	3,6E+10
0523KK10	4,1E+10
0523KK3,75L	3,2E+10
0523KK5L	3,2E+10
0606KK0	2,3E+10
0606KK5	2,6E+10
0606KK10	2,8E+10

Kylmäkuivauksista suoritettujen elävyyismääriytysten suhdetta toisiinsa havainnollistetaan kuviossa 3.



Kuvio 3. Inuliinin vaikutus kylmäkuivattujen näytteiden elävyyteen.

## 8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Verrattaessa työn aikana tehtyjä kasvatuksia toimeksiantajalta saatuihin tietoihin laboratoriomittakaavan koekasvatuksista havaittiin, että natriumhydroksidin kulutus oli huomattavasti odotettua suurempi. Ensimmäisessä kasvatuksessa (0424FF) tätä ei selkeästi havaittu, koska natriumhydroksidin pumppausjärjestelmä oli viallinen, ja vain osa pumpatusta natriumhydroksidista päätyi todellisuudessa reaktoriin. Liitteen 3 kuvaajasta havaitaan, että pumpun käynnistyttyä se käytti kaiken saatavilla olevan natriumhydroksidin muutamassa tunnissa, minkä jälkeen kasvatusnesteen pH alkoi laskea asetetun rajan (5,8) alapuolelle. Toisessa kasvatuksessa (0523FF, liite 4) havaittiin, että kasvatukselle varattu natriumhydroksidimäärä loppui noin yhdeksän tuntia kasvatuksen aloituksesta. Elävyydestä kuitenkin voidaan päätellä, että tällä ei ollut kovin suurta vaikutusta kasvatuksen tuloksiin. Natriumhydroksidin maksimikulutus haluttiin kuitenkin tietää, joten kolmannessa kasvatuksessa (0606FF, liite 5) natriumhydroksidia varattiin ylimäärin. Lopullinen natriumhydroksidin kulutus, 960 ml, oli lähes kaksi kertaa niin paljon kuin etukäteen oli odotettu.

Sentrifugointi erotti kiintoaineen supernatantista niin tehokkaasti, että supernatantille ei tarvinnut tehdä juurikaan lisäkäsittelyä ennen spray-kuivausta. Supernatantti seulottiin silti varmuuden vuoksi 200 nm seulalla, jotta spray-kuivuri ei varmasti menisi tukkoon.

Kuviosta 1 voidaan päätellä, että spray-kuivatun jauheen kosteuspitoisuus on kääntäen verrannollinen kuivattavan nesteen kiintoainepitoisuuteen. Tästä voidaan päätellä, että inuliinin lisääminen vesiliuoksena ei välttämättä ole kannattavaa, koska se laskee muiden kiintoaineiden pitoisuutta kuivattavassa nesteessä. Kuviosta 2 kuitenkin havaitaan, että inuliinin lisääminen laskee veden aktiivisuutta kuivatussa jauheessa. Ilman inuliinin lisäystä kuivatut jauheet olivat myös hyvin tahmaisia ja vaikeita käsitellä, joten vähintään 50 g/l inuliinimäärän lisääminen kuivattavaan supernatanttiin on tarpeen. Inuliinin huonosta liukoisuudesta ja taipumuksesta geeliytyä johtuen inuliinia ei kuitenkaan kannata lisätä tätä paljoa suurempia määriä. Alle 130 g/l pitoisuuksissa ongelmaa ei kuiten-

kaan pitäisi esiintyä (5), ja tarvittaessa inuliinin voi myös liuottaa supernatanttia lämmittämällä ainakin 250 g/l pitoisuuksiin asti.

Kylmäkuivauksissa massasta saatiin riittävän kuivaa, ja elävyydet olivat tyydyttävän suuruisia. Näytteiden 0523KK0A ja 0523KK5A:n elävyydet olivat selkeästi suurempia kuin muiden näytteiden, joten on syytä olettaa, että niiden suuri elävyys johtui määrityksessä tapahtuneesta kontaminaatiosta. Muuten kuivauksen jälkeisessä elävyydessä ei ollut havaittavissa selkeitä eroja, joiden voitaisiin sanoa johtuvan inuliinin lisäyksestä. Inuliinin mahdollisesti suojaava vaikutus nähtäneenkin vasta pitkäaikaissäilyvyyttä tutkiessa. Mikäli myöhemmin havaitaan, että inuliinin lisäys ennen kylmäkuivausta ei vaikuttanut soluihin riittävästi, voisi inuliinin lisäämisellä jo kasvatusvaiheessa saada positiivisia tuloksia (20). Liitteestä 2 nähdään, että kylmäkuivausohjelman siirtyessä jälkikuivaukseen tuotteessa oli vielä hieman kosteutta, koska tuotteen lämpötila ei seurannut hyllyn lämpötilaa lineaarisesti. Kylmäkuivausohjelmaa pitäisi pidentää tai painetta, jossa kuivaus suoritettiin, pitäisi nostaa. Tällöin sublimoituvan vesihöyryn tilavuus pienenee, ja sublimoituminen pääsee tapahtumaan nopeammin.

Saadut tulokset näyttävät valmistetun maitohappobakteerivalmisteen tuotteistamisen kannalta rohkaisevilta. Jos bakteerit osoittautuvat elinkykyisiksi myös pidemmällä ajanjaksolla, jauhetta on mahdollista pakata esimerkiksi pillereiksi tai käyttää probioottisten elintarvikkeiden valmistuksessa. Myös spraykuivauksen käyttäminen supernatantin kuivaamiseen antoi rohkaisevia tuloksia, koska kuivaus oli mahdollista suorittaa ilman monimutkaisia työvaiheita ennen kuivausta.

## LÄHTEET

1. WHO, (2001). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. [viitattu 9.5.2013] saatavilla [www-muodossa: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
2. Molin, G. (2010) *Lactobacillus plantarum*, [viitattu 28.5.2013] saatavilla [www-muodossa: http://probi.se/en/files/2009/07/LP299v-101.pdf](http://probi.se/en/files/2009/07/LP299v-101.pdf).
3. Kelly, G. (2008) Inulin-Type Prebiotics - A Review: Part 1. Alternative Medicine Review, osa 13. [viitattu 1.6.2013] saatavilla [www-muodossa: http://www.altmedrev.com/publications/13/4/315.pdf](http://www.altmedrev.com/publications/13/4/315.pdf).
4. Piippo, S. (2010) Suomalaiset marjat, ss 101-105, Minerva Kustannus Oy, Hämeenlinna, Suomi.
5. Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P., Petrovsky, N. (2010) Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. J. Excipients and Food Chem. 1. (3), 2010.
6. Food-info (2013) Maillard reactions [online, viitattu 17.6.2013]. saatavilla [www-muodossa: http://www.food-info.net/uk/colour/maillard.htm](http://www.food-info.net/uk/colour/maillard.htm).
7. Mijnbeek, G. ym. (1992) Bioreactor Design and product yield, Butterworth-Heinemann Ltd, GB, ss. 104-111.
8. Solunetti, (2006) Mikrobipopulaation kasvuvaiheet [viitattu 16.6.2013] saatavilla [www-muodossa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mikrobipopulation\\_kasvuvaiheet/3/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mikrobipopulation_kasvuvaiheet/3/).
9. Jennings, T. A. (1999) Lyophilization. Introduction and Basic Principles ss. CRC Press LLC, USA.
10. Altman, R. (1890) die Elementer Organism and ihre Beziehungen zu den Zellen. Vert and Co. (viitattu Jennings 1999).
11. Shackell, L. F. (1909) Am. J. Physiol., 24:325. (Viitattu Jennings 1999).
12. Martin Christ, Smart Freeze Drying. [viitattu 19.4.2013] saatavilla [www-muodossa: http://martinchrist.de/index.php?id=63&L=1](http://martinchrist.de/index.php?id=63&L=1).
13. Martikainen, J (2009) Hapatekonsentraattien kylmäkuivausprosessin tehostaminen ja säilyvyys-tulosten mallintaminen. Insinööriyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu ss. 22.
14. Mikkonen, T. (2011) Puolukkamehun sumutuskuivaus ja puolukkamehujauheen käyttösovellukset. Helsingin Yliopisto.
15. Barbosa-Cánovas G. V. ja Vega-Mercado H. (1996) Dehydration of Foods, ss 185-225, Chapman & Hall, USA.
16. Niro A/S, Mobile minor, perusmallin käyttöohje.
17. Leja, K., Dembczynski, R., Bialas, W., Jankowski, T. (2009) Production of dry *Lactobacillus Rhamnosus* GG preparations by spray drying and lyophilization in aqueous two-phase systems. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 8(4), ss 39-49.

18. Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. (2004) Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* 96, ss 1024-1039.
19. edu.fi, (2013) Veden aktiivisuuden vaikutus elintarvikkeiden pilaantumiseen. [online, viitattu 19.6.2013] saatavilla www-muodossa:  
<http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/hygieniaosaaminen/vedenaktiivisuus.htm>.
20. Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., Danner, H. (2009) Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 107, ss. 167-177.

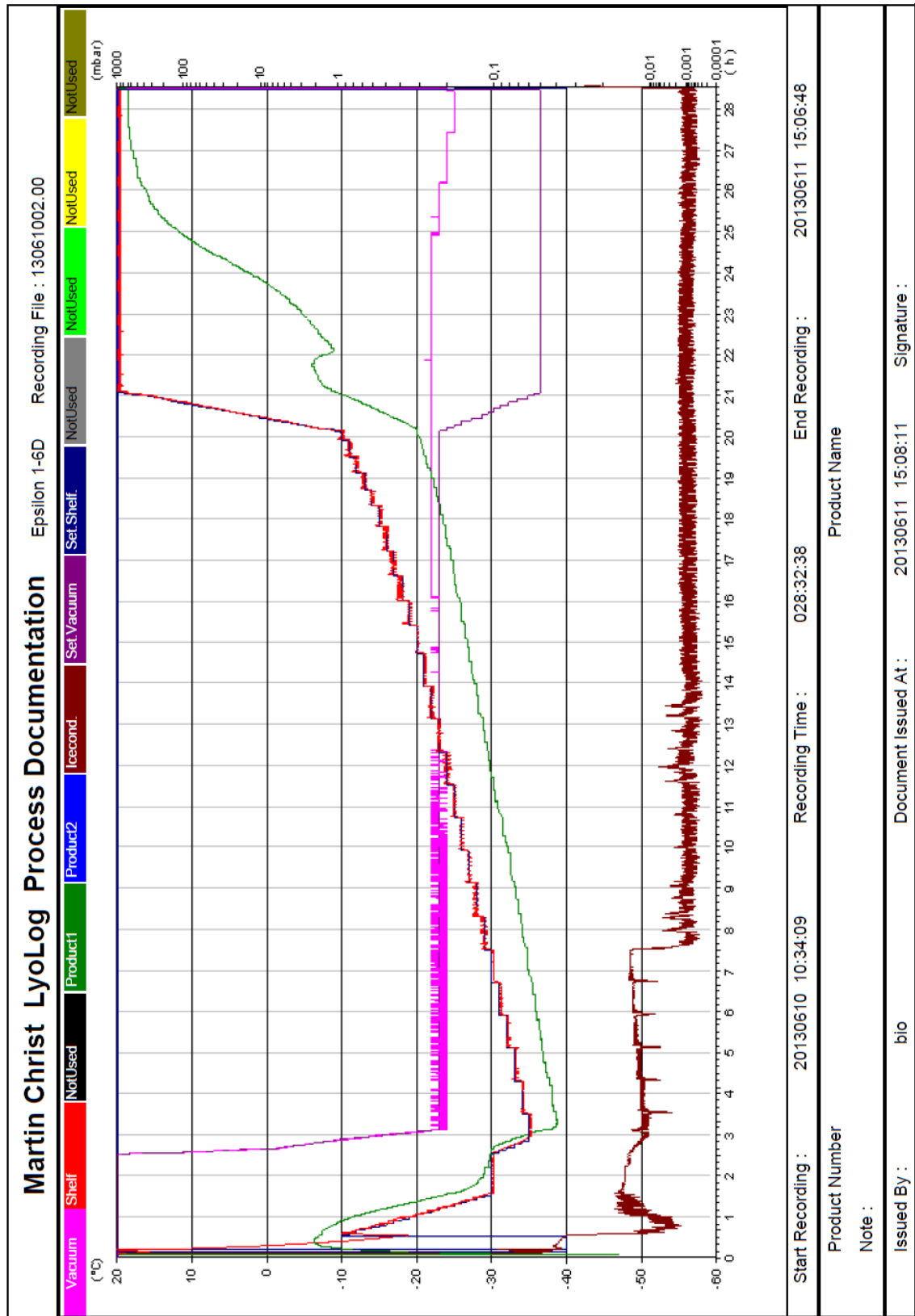


## Käytetyt reagenssit ja laitteet

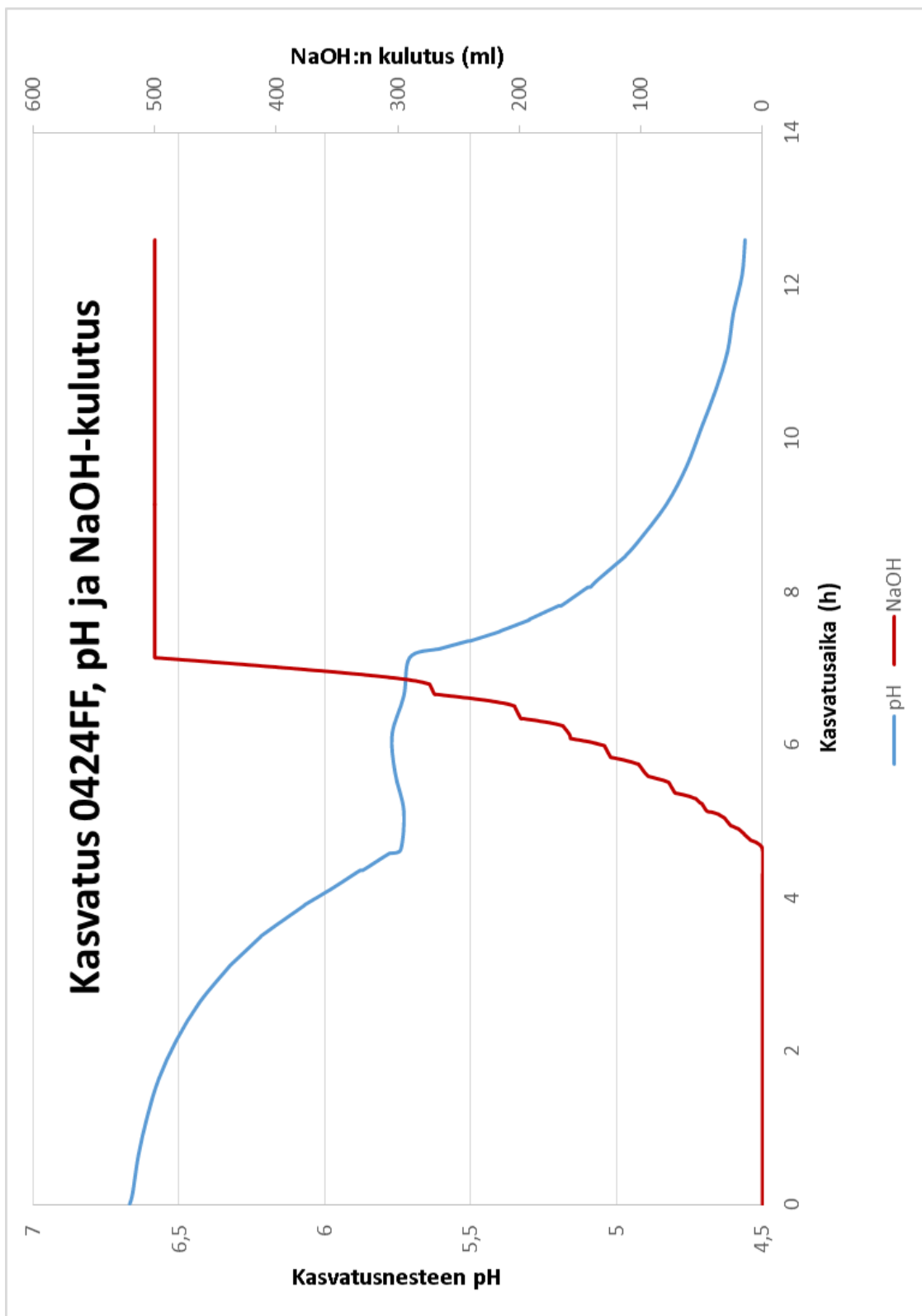
Laitteet	
Laite	Valmistaja/Malli
Bioreaktori	B. Braun Biotech International/Biostat C 15
Sentrifugi	Sartorius/Sigma 6K15
Kylmäkuivuri	Martin Christ/Epsilon 1-6D
Spray-kuivuri	Niro AS/Mobile Minor
Veden aktiivisuusmittari	Rotronic Hygroskop BT-RS1

Reagenssit	
Reagenssi	Valmistaja
Kasvatus	
MRS-liemi	Biokar Diagnostics BK 176HA, lot 10E581A
Mustaherukkajauhe	Oy, Batch 1312800
Pektinaasi	Rohapect 10L
Mangaanisulfaatti	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O, Merck
Mangaani	PB Manganese 5,0 %
Aquamin Soluble	Marigot Ltd, batch 108835
Q-naturale	National Starch Food Innovation, batch 051212 02
Natriumhydroksidi	VWR, 28244.295
Hiivauute	Gistex Standard 2441, batch YH55A73
Hiivauute	Springer 0251/0-MG-L, batch 07 11 0380 0
Hiivapeptoni	Springer HYP A, batch 12 0000 5
Kuivaukset	
Inuliini	Frutafit HD, batch 7431801137
Elävyyismääritykset	
MRS-agar	MRS agar, Merck 1.10660.0500
Peptoni	Fluka Analytical 70169-100g, lot BCBG6734V
Natriumkloridi	NaCl, VWR 27810.262, batch 12E250019

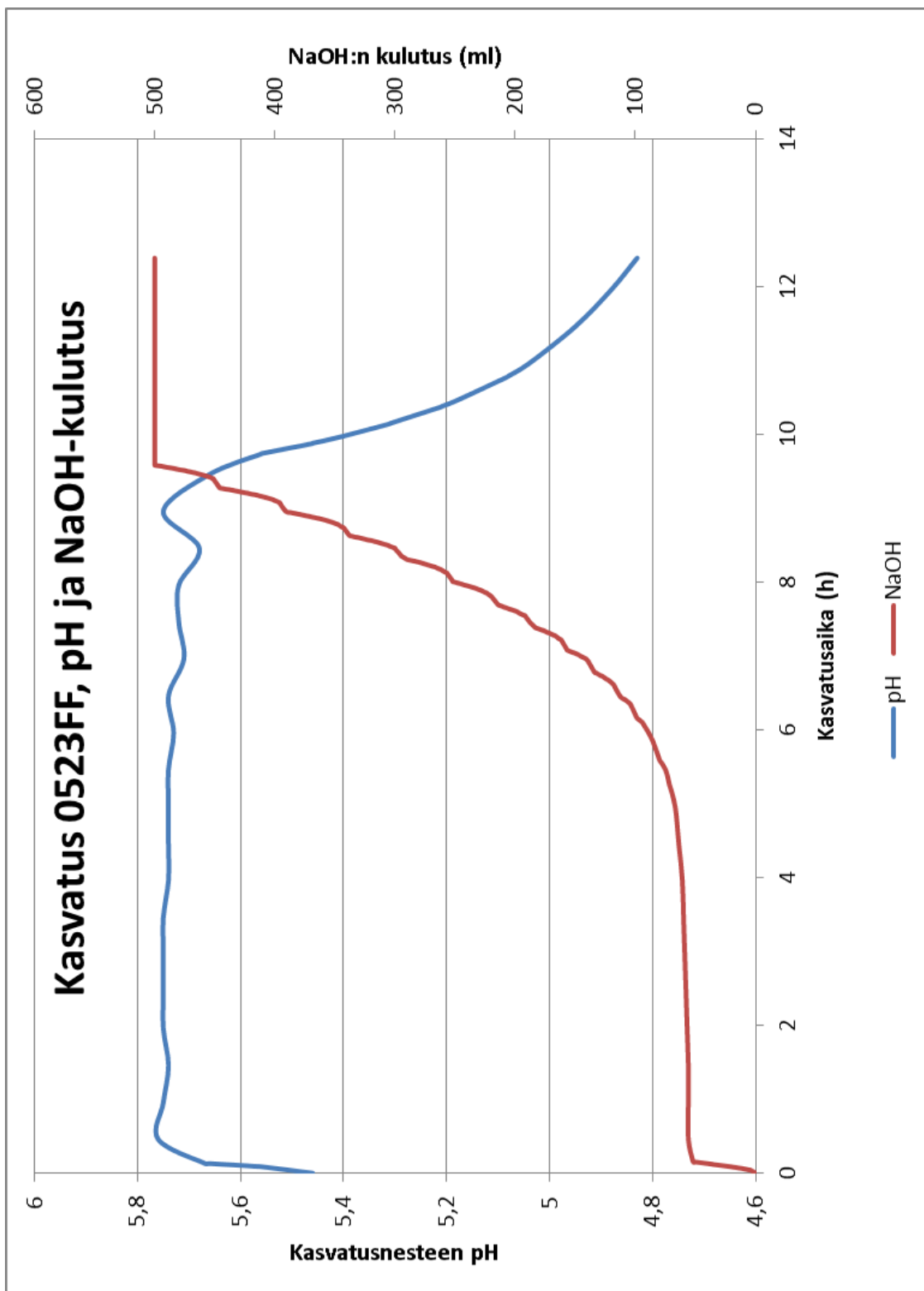
# Toisen kylmäkuivauksen kuvaaja



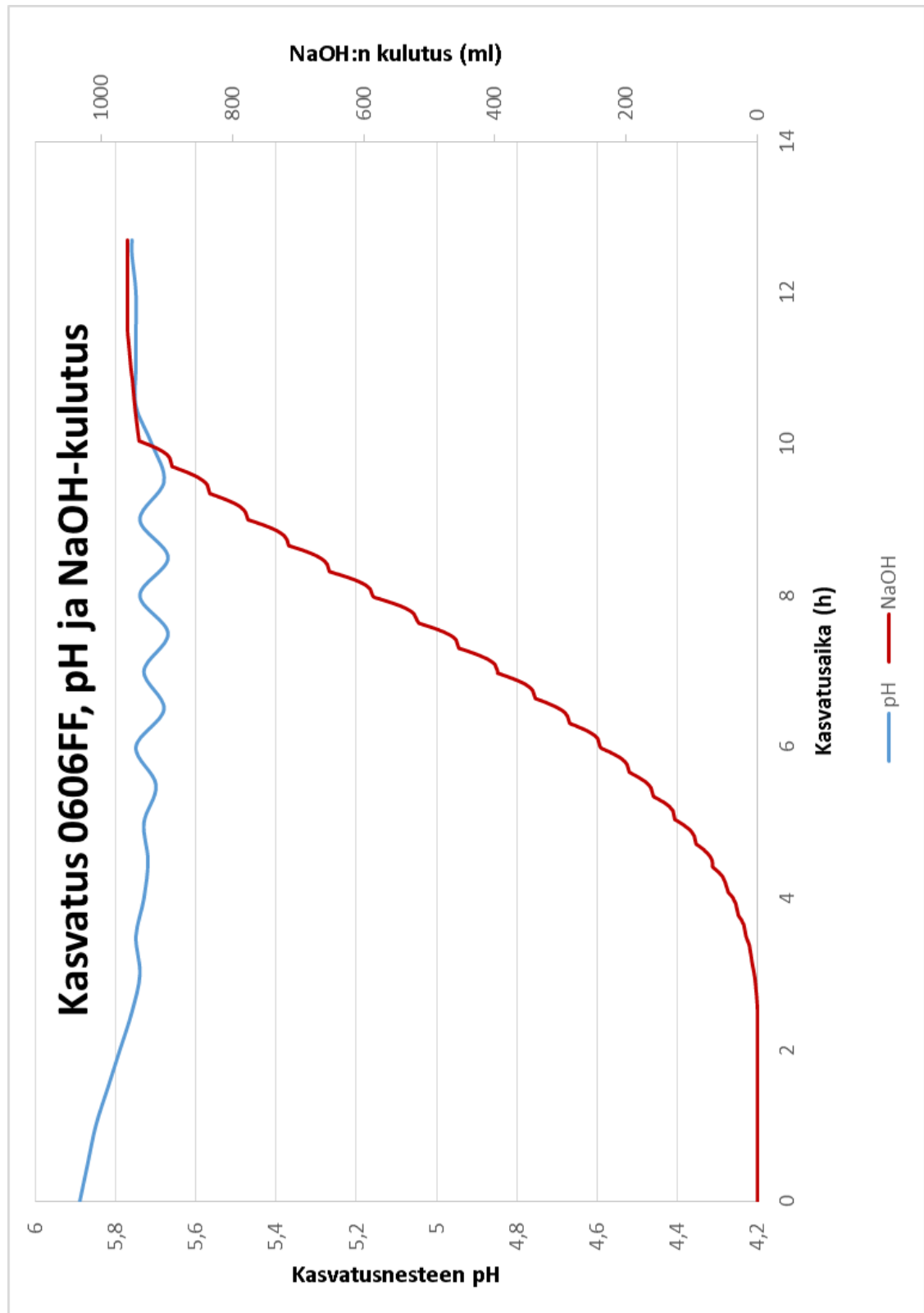
## Kasvatuksen 0424FF pH-käyrä



## Kasvatuksen 0523FF pH-käyrä



## Kasvatuksen 0606FF pH-käyrä



## Näytekoodit

Koodi	Näytteen tyyppi	Huomiot
0424FF	Kasvatusneste	
0424SS1	Spray-kuivattu jauhe	450 ml supernatanttia ja 450 ml 40 % inuliiniliuosta
0424SS2	Spray-kuivattu jauhe	375 ml supernatanttia ja 625 ml 40 % inuliiniliuosta
0523FF	Kasvatusneste	
0523GG	Sentrifugoitu solumassa	
0523SS1	Spray-kuivattu jauhe	Pelkkää supernatanttia
0523SS2	Spray-kuivattu jauhe	1000 ml supernatanttia ja 50 g inuliinijauhetta
0523SS3	Spray-kuivattu jauhe	660 ml supernatanttia ja 330 ml vettä
0523KK0A	Kylmäkuivattu jauhe	100 g solumassaa
0523KK5A	Kylmäkuivattu jauhe	95 g solumassaa, 5 g inuliinijauhetta eli inuliinia 5 %
0523KK0B	Kylmäkuivattu jauhe	20 g solumassaa
0523KK5B	Kylmäkuivattu jauhe	19 g solumassaa, 1 g inuliinijauhetta eli inuliinia 5 %
0523KK10	Kylmäkuivattu jauhe	18 g solumassaa, 2 g inuliinijauhetta eli inuliinia 10 %
0523KK3,75L	Kylmäkuivattu jauhe	15 g solumassaa, 5 g 15 % inuliiniliuosta eli inuliinia 3,75 %

<b>0523KK5L</b>	Kylmäkuivattu jauhe	15 g solumassaa, 5 g 20 % inuliini-liuosta eli inuliinia 5 %
<b>0606FF</b>	Kasvatusneste	
<b>0606GG</b>	Sentrifugoitu solumassa	
<b>0606KK0</b>	Kylmäkuivattu jauhe	60 g solumassaa
<b>0606KK5</b>	Kylmäkuivattu jauhe	57 g solumassaa, 3 g inuliinijauhetta eli inuliinia 5 %
<b>0606KK10</b>	Kylmäkuivattu jauhe	54 g solumassaa, 6 g inuliinijauhetta eli inuliinia 10 %

## Maljojen pesäkelaskenta

Näyte		-8	-9	-10	-11	-12
0424FF	A	<b>8</b>	0	0		
	B	<b>4</b>	<b>2</b>	0		
0523FF	A	152	<b>107</b>	<b>15</b>		
	B	173	<b>63</b>	<b>8</b>		
0523GG	A	TNTC	<b>175</b>	<b>75</b>		
	B	TNTC	<b>167</b>	<b>91</b>		
0606FF	A	<b>11</b>	<b>7</b>	3		
	B	<b>32</b>	<b>5</b>	3		
0606GG	A	<b>92</b>	<b>67</b>	94		
	B	<b>70</b>	<b>58</b>	66		
0523KK0A	A		<b>55</b>	<b>47</b>	50	31
	B		<b>66</b>	TNTC	20	38
0523KK5A	A		TNTC	TNTC	TNTC	<b>13</b>
	B		TNTC	TNTC	<b>47</b>	<b>26</b>
0523KK0B	A		<b>4</b>	<b>1</b>	0	
	B		<b>1</b>	<b>1</b>	0	
0523KK5B	A		<b>4</b>	<b>1</b>	0	
	B		<b>3</b>	<b>0</b>	0	
0523KK10	A		<b>4</b>	<b>1</b>	1	
	B		<b>3</b>	<b>1</b>	1	
0523KK5L	A		<b>2</b>	<b>1</b>	0	
	B		<b>3</b>	<b>1</b>	1	
0523KK3,75L	A		<b>4</b>	<b>0</b>	0	
	B		<b>2</b>	<b>1</b>	0	
0606KK0	A	<b>22</b>	<b>6</b>	1	0	
	B	<b>18</b>	<b>4</b>	0	0	
0606KK5	A	<b>27</b>	<b>2</b>	0	0	
	B	<b>22</b>	<b>6</b>	0	0	
0606KK10	A	<b>11</b>	<b>2</b>	1	0	
	B	<b>46</b>	<b>2</b>	0	0	

Laskuihin valitut maljat ovat taulukossa lihavoituna.



Elävyyismääriityksen laskukaava:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Esimerkkilasku:

$$N_{0606KK10} = \frac{(11+46+2+2)}{0,1\text{ml} \cdot (2 \cdot 1 + 2 \cdot 0,1) \cdot 10^{-8}} = 2,8\text{E}+10 \text{ CFU/g}$$