

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

2022

Antti Pohjonen

Virtaussytometrin käyttö oluen mikrobiologisessa laadunvalvonnassa



Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikan koulutusohjelma

Syky 2022 | 79 sivua + 6 liitesivua

Antti Pohjonen

Virtaussytometrin käyttö oluen mikrobiologisessa laadunvalvonnassa

Opinnäytetyö tehtiin Turun ammattikorkeakoululle. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää yksi tai kaksi toimivaa virtaussytometrinenetelmää, joilla voitaisiin nopeasti ja luotettavasti valvoa oluen laatua. Turun ammattikorkeakoululla ei ollut aiemmin kehitettyä toimivaa selektiivistä menetelmää, jolla saataisiin sekä hiiva- että bakteerisolupopulaatiot havaittua nopeasti ja luotettavasti. Olutnäytteistä oli tarkoituksena havaita mahdolliset hiiva- ja bakteerilajit, jotka saattavat aiheuttaa oluen pilaantumista. Näyteliuoksina käytettiin kolmea kaupallista ja yhtä itse valmistettua olutta. Opinnäytetyö oli luonteeltaan määrällinen eli kvantitatiivinen. Havaittuja hiiva- ja bakteerilajeja ei pyritty kvalitatiivisesti tunnistamaan.

Virtaussytometriä varten kehitettiin hiivasuspensio- ja bakteerisuspensio- menetelmät, joilla saatiin sekä panimohiiva että *E. coli* -bakteerilaji näkymään peptonivesinäytteiden pistekuvaajissa omina pistejoukkoinaan. Haasteeksi tulivat sekä suodattamattomat että suodatetut oluet, joiden väri absorboi EGFP:n lähettämän signaalin. Hiivasolupopulaatiot saatiin näkymään olutnäytteiden pistekuvaajissa ja histogrammeissa. Hiivasolususpensio- menetelmä kehitettiin onnistuneesti.

Asiasanat:

bakteeri, hiiva, laadunvalvonta, panimotekniikka, proteiini, virtaussytometri

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Bio and Chemical Engineering

Autumn 2022 | 79 pages + 6 appendices

Antti Pohjonen

Use of flow cytometer in microbiological quality control of beer

The thesis was carried out for Turku University of Applied Sciences. The aim of this thesis was to develop one or two functional flow cytometry methods that could quickly and reliably measure the quality of beer. The Turku University of Applied Sciences did not have a previously developed functional selective method to detect both yeast and bacterial cell populations quickly and reliably. The purpose of the beer samples was to detect possible yeast and bacterial species that could cause beer contamination. Three commercial and one self-made beer were used as sample solutions. The thesis was quantitative in nature. No qualitative identification of observed yeast and bacterial species was performed.

For the flow cytometry, a yeast suspension and bacterial suspension method were developed to detect both brewing yeast and *E. coli* strains. Said strains were detected on the dot plots of the peptone water samples. Both unfiltered and filtered beers' colour absorbed the signal sent by EGFP. On the other hand, yeast cell populations were shown in beer samples dot plots and histograms. Yeast suspension method was successfully developed.

Keywords:

bacterium, brewing technology, flow cytometer, protein, quality control, yeast

Sisältö

Käytetyt lyhenteet tai sanasto	9
1 Johdanto	12
2 Panimoprosessi	13
2.1 Maltaiden rouhinta	13
2.2 Mäskäys	14
2.3 Olutvierteen keitto	15
2.4 Jäähdytys	15
2.5 Käyminen	16
2.6 Pakkaus ja varastointi	17
3 Pilaajamikrobit	18
3.1 Bakteerit	19
3.2 Proteiinit	21
3.3 Hiivat	21
4 Oluen mikrobiologisen laadunvalvonnan perinteisiä menetelmiä	23
4.1 Hygicult-testi	23
4.2 ATP-testi	24
4.3 Maljakasvatusmenetelmät	25
4.4 PCR	26
5 Virtaussytometri ja sen toimintaperiaate	27
5.1 FSC eli suorasirontadetektorit	31
5.2 SSC eli sivusirontadetektorit	31
5.3 Fluoresenssi	32
5.4 Optiset suodattimet	32
5.5 Detektorit	32
5.6 Virtaussytometri elintarviketekniikassa	33
6 Menetelmän kehitys	37
6.1 Viritys- ja näyteliuokset	38

6.2 Hiivasuspensiomenetelmän kehitys	40
6.3 Bakteerisuspensiomenetelmän kehitys	53
6.4 Ajoparametrit	67
7 Tulokset	71
8 Loppupäätelmät	72
8.1 Yhteenveto	72
8.2 Virhelähteet	73
8.3 Pohdinta	74
Lähteet	76

Liitteet

Liite 1. Hiivasuspensiomenetelmän pikatyöohje.

Liite 2. Bakteerisuspensiomenetelmän pikatyöohje.

Liite 3. Työssä käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit.

Kaavat

Kaava 1. Etanolin käymisreaktio (Nautiskelija 2022).	16
Kaava 2. ATP:n bioluminesenssireaktio (3M Health Care 2015, 3).	25
Kaava 3. Hiivasolupopulaation konsentraation laskukaava (BD Bioscience 2002).	35
Kaava 4. Tarvittavan panimohiivan teoreettinen tiheys.	40
Kaava 5. Tarvittavan panimohiivan teoreettinen punnittava massa.	40

Kuvat

Kuva 1. Turun AMK:n Lemminkäisenkadun kampuksen virtaussytometrilaiteisto.	27
--	----

Kuva 2. Virtausytometr in metallinen n ay teneula.	28
Kuva 3. Virtausytometr in toimintaperiaate (https://doctorlib.info/hematology/rodak-hematology-clinical-principles-applications/33.html).	29
Kuva 4. Peptoniveden valmistus.	42
Kuva 5. Valmistettujen n ay tteiden sameusmittauksia.	43

Kuviot

Kuvio 1. Panimoprosessikaavio (mukaillen Sinebrychoff 2022).	13
Kuvio 2. Virtausytometr in k ay t o n prosessikaavio (mukaillen BD Biosciences 2013, 30).	30
Kuvio 3. Liun (2018) virtausytometripistekuvaajia (Liu ym. 2018).	36
Kuvio 4. MilliQ-veden referenssin ay tteen pistekuvaaja ja histogrammi (350 μ L).	47
Kuvio 5. MilliQ-veden pistekuvaaja ja histogrammi yhdell ä hiivasuspensiotipalla.	48
Kuvio 6. MilliQ-veden pistekuvaaja ja histogrammi kahdella hiivasuspensiotipalla.	48
Kuvio 7. Karhu New England IPA:n pistekuvaaja ja histogrammi kahdella hiivasuspensiotipalla.	49
Kuvio 8. Karhu Pale Alen pistekuvaaja ja histogrammi kahdella hiivasuspensiotipalla.	49
Kuvio 9. Peptoniveden panimohiivasuspension ay tteen pistekuvaaja ja histogrammi.	50
Kuvio 10. Karhu New England IPA panimohiivasuspension ay tteen pistekuvaaja ja histogrammi.	50
Kuvio 11. Karhu Pale Ale panimohiivasuspension ay tteen pistekuvaaja ja histogrammi.	51
Kuvio 12. Peptoniveden panimohiivasuspension ay tteen pistekuvaaja ja histogrammi.	51

Kuvio 13. KOFF-oluen panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaajat ja histogrammi.	52
Kuvio 14. Hope IPA -oluen panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	52
Kuvio 15. Peptoniveden leimattoman <i>E. coli</i> -näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	54
Kuvio 16. Peptoniveden leimattua <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	55
Kuvio 17. Peptoniveden leimattua <i>E. colia</i> ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	55
Kuvio 18. Karhu New England IPA:n leimattua <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	56
Kuvio 19. Karhu New England IPA:n leimattua <i>E. colia</i> ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	57
Kuvio 20. Karhu Pale Alen leimattua <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	57
Kuvio 21. Karhu Pale Alen leimattua <i>E. colia</i> ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	58
Kuvio 22. Peptonivesinäytteen leimaamattoman <i>E. colin</i> pistekuvaaja ja histogrammi.	59
Kuvio 23. Peptoniveden leimattua <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	60
Kuvio 24. Peptoniveden leimattua <i>E. colia</i> ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	61
Kuvio 25. KOFF-oluen leimaamatonta <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	62
Kuvio 26. KOFF-oluen leimattua <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	63
Kuvio 27. KOFF-oluen leimattua <i>E. colia</i> ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	63
Kuvio 28. Hope IPA:n leimaamatonta <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	64

Kuvio 29. Hope IPA:n leimattua <i>E. colia</i> sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	64
Kuvio 30. Hope IPA:n leimattua <i>E. colia</i> ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.	65
Kuvio 31. Peptonivesi- ja olutnäytteiden absorbanssi eri aallonpituuksilla.	66
Kuvio 32. FITC-kanavan mukaisesti tarkennettu kuvaaja.	67

Taulukot

Taulukko 1. Panimoprosessissa havaittavat pilaajamikrobit (mukaillen Enari & Mäkinen 2014, 234).	19
Taulukko 2. Virtaussytometriassa käytettyjä fluoresoivia leima-aineita.	33
Taulukko 3. Viritys- ja näyteliuosten valmistustilavuudet.	39
Taulukko 4. Peptonivesi-panimohiivasuspension sameusmittaukset.	41
Taulukko 5. Näyteajosuunnitelma vakioidulla näytetilavuudella.	45
Taulukko 6. Näyteajosuunnitelma vakioidulla hiivasuspension määrällä.	46
Taulukko 7. Näyteajosuunnitelma bakteerisuspensiomenetelmän testaamiseksi.	53
Taulukko 8. Näyteajosuunnitelma 700 µL:n näytetilavuuksilla.	59
Taulukko 9. Ajoparametrien säätäminen volttilukeman mukaan.	69
Taulukko 10. Yhtenäiset ajoparametrien volttilukemat.	70

Käytetyt lyhenteet tai sanasto

Lyhenne	Lyhenteen selitys (Lähdeviite)
ATP	ATP tarkoittaa adenosiinitrifosfaattia, joka on runsasenerginen yhdiste, jota kaikissa elollisissa eliöissä esiintyy. ATP on suoraan verrannollinen suhteellisen valon määrään (RLU) testatulla pinnalla. (3M Health Care 2015, 3.)
Bakteeri	Yksisolainen mikrobi, joka voi lisääntyä suvuttomasti jakautumalla kahtia. Bakteerit voidaan lajitella karkeasti aerobisiin ja anaerobisiin bakteereihin. Osa bakteereista voi tuottaa myrkkyä eli toksiinia, joka voi aiheuttaa ruokamyrkytyksen. (Ruokavirasto 2019.)
CFU	Pesäkettä muodostava yksikkö eli PMY (eng. <i>Colony Forming Unit</i>). Voidaan ilmoittaa tutkittavan näytteen olomuodon mukaan joko muodossa PMY/cm ² tai PMY/mL. (Aidian Oy 2021.)
CS&T Beads	Valoa heijastavia polystyreenihelmiä sisältävä kaupallinen tuote, jota käytetään vertailu- ja viritysliuosten valmistukseen (BD Biosciences 2013).
EGFP	Englanniksi <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> eli tehostettu vihreä fluoresoiva proteiini; kiinnittyy kohdesolun koodaavaan osaan, jolloin se värjää solun vihreäksi (Ilagan ym. 2010).
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> eli fluoreseiini-isotiosyanaatti on virtausytometrin vihreän fluoresenssin yhdiste (BD Biosciences 2002, 13).
FSC	Suorasirontadetektor, joka havaitsee tutkittavan yhdisteen bakteerien, proteiinien, hiivasolujen yms. koon sekä määrän (BD Sciences 2006).
Hiiva	Yksisolainen sieni, joka lisääntyy kuroutumalla (Enari & Mäkinen 2014, 209).
Home	Sieni, joka muodostaa rihmastoja ja lisääntyy itiöiden avulla. <i>Fusarium</i> -punahomesuvun tietyt lajit voivat

tuottaa homemyrkyjä eli mykotoksiineja. (Enari & Mäkinen 2014, 209 & 217.)

Keg(i)	Metallinen oluen säilytysastia (eng. <i>keg</i>), johon olut voidaan astioida käymisvaiheen jälkeen varastointia varten.
NTU	<i>Nephelometric Turbidity Unit</i> eli Nefelometrinen sameusyksikkö ilmoittaa valosironnan määrän nestemäisessä näytteessä (HACH Company 2008, 31).
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolavesi (eng. <i>Phosphate Buffered Saline</i>), jota käytetään viritysliuosten luomisessa.
PCR	Polymeraasiketjureaktio on mikrobiologinen laadunvalvontamenetelmä, jota käytetään panimotekniikassa (Enari & Mäkinen 2014, 238–239).
Proteiini	Aminohappojen muodostama polypeptidiketju (Solunetti 2006).
RLU	RLU tarkoittaa suhteellisen valon yksikköä ja se tulee sanoista Relative Light Unit. RLU on suoraan verrannollinen ATP:n määrään testipinnalla. (3M Health Care 2015, 3.)
SSC	Sivusirontadetektor, joka havaitsee tutkittavan yhdisteen solujen sisäisen rakenteen ja rakeisuuden (BD Sciences 2006).
SIT	<i>Sample Injection Tube</i> on metallinen näyteneula, joka imee viritys- ja näyteliuokset virtaussytometrilaitteiston sisälle (BD Sciences 2006, 17).
TPC	Aerobinen pesäkemäärä, joka tulee sanoista <i>Total Plate Count</i> . Hygicult TPC:llä voidaan määrittää bakteerien, hiivojen ja homeiden määrää esimerkiksi kasvatustientä sisältävällä näyteliuskalla. (Aidian Oy 2021.)
Villihiiwa	Villihiivoiksi kutsutaan sellaisia hiivalajeja, joita ei käytetä oluen valmistamiseen. Villihiivoja esiintyy oluen valmistuksen aikana sekä valmistusprosessin jälkeen. (Enari & Mäkinen 2014, 211–213.)

Virtauskyvetti

Flow cell eli virtauskyvetti on virtaussytometrilaitteiston osa, jossa lasersäteet läpäisevät halutun liuoksen (BD Sciences 2006, 17).

Virtaussytometri

Laite, jolla voidaan havaita tarkasti ja nopeasti bakteereja, proteiineja ja hiivoja. Laitetta voidaan käyttää kliiniseen lääketieteelliseen tutkimukseen ja elintarviketekniikan laadunvalvontaan. (BD Sciences 2006.)

1 Johdanto

Turun ammattikorkeakoulun bio- ja kemiantekniikan koulutusohjelmassa valmistetaan olutta sekä kaikille pakollisilla projektikursseilla että elintarviketekniikan erikoistumiskursseilla. Oluen mikrobiologista laatua valvotaan useilla eri mittausmenetelmillä; ATP, Hygicult, maljakasvatusmenetelmät ja PCR. Bakteerit ja hiivat toimivat oluissa sekä käymisreaktion oleellisina komponentteina että oluen pilaajina. Bakteerit ja hiivat voivat pilata oluen maun, hajun ja kokonaisaromin tuottamalla olueen ei-haluttuja yhdisteitä. Myös proteiinimassaa saattaa alkaa saostumaan, kun olut on joko valmistettu ilman suodatinta tai kun olut on ollut pitkäaikaisessa säilytyksessä. Tällöin puhutaan oluen saastumisesta. Saastumista voi tapahtua oluen valmistus-, pakkaus- ja varastointivaiheissa. Siksi onkin oleellista saada ajantasaista tietoa oluen laadusta.

Virtaussytometrillä voidaan selektiivisesti havaita eri mikrobilajit samanaikaisesti samasta näytteestä. Oluen säilyvyyden kannalta tällä on oleellinen merkitys; voidaanko tölkkiin, pulloon tai kegiin säilötty olut myydä asiakkaille. Virtaussytometrin käytön haasteena on tulosten analysointi. Saadut mittaustulokset esiintyvät usein x-y-asteikollisessa pistekuvaajassa omina pistejoukkoinaan, jotka kuvaavat yksittäisten bakteeri-, hiiva- ja proteiinisolujen määrää olutnäytteessä. Leima-aineita eli väriaineita voidaan käyttää apureagensseina, kun halutaan tietyt mikrobit erottumaan muun näytteen joukosta virtaussytometriaajoissa. Nämä leima-aineet värjäävät halutut mikrobit tietyllä värillä (esim. EGFP:n vihreä väri), jolloin ne myös erottuvat mittauksissa kyseisellä värillä.

Opinnäytetyön tavoitteena on kehittää yksi tai kaksi toimivaa virtaussytometri-menettelmää, joilla saataisiin tutkittua oluen laatua mahdollisimman nopeasti, tarkasti ja toistettavasti. Menetelmiä kehitetään tutustumalla virtaussytometriin liittyviin tutkimuksiin, kirjallisuuteen sekä kokeilemalla uusia tapoja. Virtaussytometrinäytteitä ajetaan sekä ilman leima-aineita että leima-aineiden kanssa.

2 Panimoprosessi

Oluen valmistuksessa pääraaka-aineita ovat vesi, mallas, humala ja hiiva. Oluen panemisessa vedestä, maltojen sokereista, humaloista sekä hiivasta valmistetaan käymisteitse etanolipitoista olutta (Kuvio 1). (Enari & Mäkinen 2014, 76; Sinebrychoff 2022.)



Kuvio 1. Panimoprosessikaavio (mukaillen Sinebrychoff 2022).

Turun ammattikorkeakoulun Kupittaa Campus Breweryn opiskelijapanimon oluen tuotantoprosessi voidaan kuvion 1. mukaisesti jakaa karkeasti seitsemään yksikköprosessivaiheeseen. Nämä seitsemän prosessivaihetta ovat maltojen rouhinta, mäskäys, virtteen keitto, jäähdytys, käyminen, pakkaus ja varastointi.

Panimoprosessivaiheet riippuvat panimon koosta ja tuotantokapasiteetista. Mikäli kyseessä olisi suurempi yritys, voitaisiin yksikköprosessivaiheita lisätä prosessiketjuun; esimerkiksi selkeytys, suodatus ja pastörinti. (Obi 2018; Sinebrychoff 2022.)

2.1 Maltojen rouhinta

Ensimmäisessä vaiheessa oluen valmistukseen tarvittavat viljat eli maltaat rouhitaan pienemmiksi esimerkiksi vasaramyllyllä, jolloin sokerit vapautuvat helpommin vienteeseen. Viljan jyvän kuoren eli akanan on tarkoitus rikkoutua vain osittain, jotta vienteeseen ei pääsisi kuoren osia. (Lappo.fi 2022.)

2.2 Mäskäys

Toisessa vaiheessa vedessä liotetaan maltaita eri lämpötiloissa eripituisia ajanjaksoja. Mäskäysvaiheessa (eng. *Mashing*) pyritään muuttamaan tärkkelys sokeriksi ja aktivoimaan entsyymitoimintaa, jolla saadaan lisää sokeria panimohiivalle. (Obi 2018.)

Tässä vaiheessa voidaan myös muokata olutvierteen keittämiseen tarkoitetun veden makuprofiilia lisäämällä kalsiumkloridia (CaCl_2), kalsiumsulfaattia (CaSO_4), natriumkloridia (NaCl) ja/tai magnesiumsulfaattia (MgSO_4) sekä maitohappoa. Sulfaatit katkeroivat makua, korostaen humaloita ja kloridit loiventavat makua, korostaen maltaita. (Lappo.fi 2022.)

Alfa- ja beeta-amylaasi ovat entsyymejä, jotka pilkkovat ohramaltaassa luontaisesti esiintyviä amyloosia ja amylopektiiniä lyhytketjuisemmiksi sokereiksi, kuten glukoosiksi ja fruktoosiksi. Alfa-amylaasi aktivoidaan noin $+70\text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa ja beeta-amylaasi noin $+60\text{ }^\circ\text{C}$... $+65\text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa. Molemmat entsyymit pysyvät aktiivisina optimilämpötilansa ulkopuolellakin, tuottaen lisää käymiskelpoisia sokereita. (Smith 2020.)

Mäskäysvaiheessa voidaan ottaa olutnäyte, jota tutkitaan joditestin avulla. Joditestillä varmistetaan, että kaikki tärkkelys on hajonnut pienemmiksi sokeryhdisteiksi. Joditestissä yksi tippa olutnäytettä pipetoidaan keraamisen lautasen jommallekummalle laidalle. Tämän jälkeen yksi tippa jodia pipetoidaan vertailunäyteeksi valkoiselle keraamiselle lautaselle ja toinen tippa pipetoidaan olutnäytetipan päälle. Olutnäytetipan värjäytyessä tummanrusehtavaksi, on tärkkelyksen hajoamisreaktio kulunut odotetusti. Vastaavasti olutnäytetipan värjäytyessä violetiksi, on olutvierteessä vieläkin tärkkelystä. Tässä tapauksessa mäskäystä jatketaan, kunnes kaikki tärkkelys on hajonnut pienemmiksi sokeryhdisteiksi.

2.3 Olutvierteen keitto

Kolmannessa vaiheessa saatu olutvierre keitetään. Tässä vaiheessa lisätään humalat halutuissa ajanjaksoissa ennen kiehumisen loppumista ja tarvittaessa sen jälkeenkin (kuivahumalointi). Kiehumisvaiheessa mahdolliset olutta pilaavat mikrobit suurimmaksi osaksi kuolevat. (Lappo.fi 2022.)

Olueen lisätyt humalat hidastavat bakteerien kasvua, saostavat proteiineja sekä alentavat olutvierteen pH-arvoa. Olutvierteen keittovaihe kestää yleensä noin 60–120 minuuttia, riippuen humalan lisäsaikataulusta, keiton voimakkuudesta sekä oletetusta haihtuvan olutvierteen määrästä. Olutvierteen keiton tulisi olla tasaista ja voimakasta koko keittovaiheen ajan. (Obi 2018.)

Sekä mäsikäys- että keittovaiheessa tapahtuu Maillard-reaktio. Maillard-reaktiossa pelkistävät sokerit ja aminohapot muodostavat ruskeita maku- ja väriaineita. Syntyvät yhdisteet antavat olutvierteelle mallasmaisen maun. Olutvierteen mäsikäysvaiheessa Maillard-reaktiotuotteita muodostuu ja keittovaiheessa reaktiotuotteita sekä syntyy että haihtuu. (Enari & Mäkinen 2014, 93.)

2.4 Jäähdytys

Keitetty vierre viilennetään jäähdyttimen avulla. Jäähdytysvaiheessa pyritään välttämään kaikkea ylimääräistä kontaktia itse keittoastian kanssa, jotta se ei aiheuttaisi mikrobiperäistä kontaminaatiota, eikä siten aiheuttaisi maku-, hajua tai aromivirheitä olutvierteen käymisvaiheessa. Jäähdytettyyn vierteeseen lisätään Irish Moss -proteiinin saostusreagenssia ja annetaan proteiinimassan saostua mäsikäysastian pohjalle. (Lappo.fi 2022.)

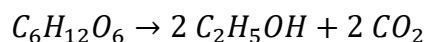
Jäähdytyksen tarkoituksena on valmistella olutvierre hiivan optimikäymislämpötilaa varten. Olutvierteen lämpötila viilennetään esimerkiksi levylämmönvaihtimen avulla. Hiiva ei pääse muuntamaan mäsikäys- ja keittovaiheissa vapautuneita sokereita etanoliksi, mikäli olutvierteen lämpötila on joko liian korkea tai liian matala. Panimohiivoilla on laji- ja kantakohtaiset

optimikäymislämpötilat, jotka on ilmoitettu panimohiivapakkauksen etiketissä. Esimerkiksi SafAle US-05 -panimohiivan optimikäymislämpötilaväli on +18 °C...+28 °C (Lappo.fi 2022).

Jäähdytysvaiheen tarkoituksena on myös kirkastaa olutvierrettä. Matalat lämpötilat ja vähäinen hapen määrä olutvierteen joukossa alentavat sameutta, toisin kuin korkeat lämpötilat ja runsas hapen määrä.

2.5 Käyminen

Siirretään viilennetty olutvierre käymisastiaan. Käymisastia voi olla esimerkiksi metallinen keg-astia tai suurempi metallinen tankki. Käymisastiaan siirron jälkeen olutvierteeseen lisätään hiiva. Hiiva syö maitaiden sokerit ja muuttaa ne etanoliksi ja hiilidioksidiksi (Kaava 1). Etanoli, hiilidioksidi ja humala ovat antimikrobisia eli ne tuhoavat pieneliöitä. Koko käymisvaiheen ajan itse käymisastia pidetään suljettuna, jolloin pyritään välttämään huoneilmaa ja valoa kontaminoimasta valmista olutta. (Lappo.fi 2022.) Pääkäymisvaihe kestää noin 3–7 päivää (Sinebrychoff 2022).



Kaava 1. Etanolin käymisreaktio (Nautiskelija 2022).

Sokerina käytetään pääasiassa glukoosia, jota saadaan rouhituista maltaista. Hiivan entsyymit muuntavat sokerit (glukoosin ja fruktoosin) etanoliksi ja hiilidioksidiksi hapettomissa, eli anaerobisissa, olosuhteissa. Kemiallisessa reaktiossa syntynyt hiilidioksidi vähentää vapaana olevan hapen määrää, jota myöskään haitalliset pilaajamikrobit eivät pääse tällöin käyttämään. Etanoli itsessään tuhoaa pilaajamikrobeja. (Enari & Mäkinen 2014, 128–134, 210.)

Oluen käymisvaihe alkaa siitä hetkestä, kun panimohiiva on lisätty viilennettyyn olutvierteeseen. Olutvierrettä voidaan tässä vaiheessa kutsua olueksi. Maltaasta vapautetut sokerit, kuten maltoosi, maltotriooosi, glukoosi, fruktoosi ja sakkaroosi muuntuvat panimohiivan aineenvaihdunnan kautta etanoliksi ja

hiilidioksidiksi käymisvaiheessa. Useimmat panimot käyttävät sylinterikartiomallisia käymisastioita, joilla on noin 70 asteen aukkukulma. Tällaiset sylinterikartiomalliset käymisastiat varmistavat sen, että hiiva kulkeutuu ulos käymisastiasta käymisvaiheen jälkeen. (Obi 2018.)

Aikaisemmat vaiheet ovat toisin sanoen valmistelleet raaka-aineet panimohiivan hyödynnettäväksi.

2.6 Pakkaus ja varastointi

Pakkausvaiheessa valmis olut voidaan pakata tölkkeihin, pulloihin tai kegeihin. Pakkausvaiheen jälkeen olutta sisältävät pakkaukset varastoidaan, kunnes ne joko myydään asiakkaille tai käytetään tutkimukseen. Käymisessä, pakkauksessa ja varastoinnissa on oleellista, että olut säilytetään sille ominaisessa lämpötilassa, jolloin lämpötila ei pääse tuottamaan virhemakuja, -hajuja tai -aromeja. (Enari & Mäkinen 2014, 232–233.)

Oluen primaarisaastuminen voi tapahtua raaka-aineiden tai keittoastioiden heikon puhtaustason vuoksi. Sekundaarisaastumista voi tapahtua pakkausvaiheessa eli pulloituksen, tölkkityksen tai kegityksen yhteydessä. Noin puolet olutkontaminaatiotapauksista on tapahtunut sekundaarisaastumisena pakkausvaiheessa. (Obi 2018.)

Pakkausvaiheen jälkeen oluen annetaan jälkikäydä noin 1–4 viikkoa ennen asiakkaille toimittamista. Jälkikäymisessä oluen hiiva muuntaa sokerit etanoliksi ja hiilidioksidiksi samoin kuin pääkäymisvaiheessa. Oluen väri kirkastuu ja olut kyllästyy hiilidioksidilla jälkikäymisen aikana. (Sinebrychoff 2022.)

Oluen pakkausvaiheessa voidaan ottaa näytteitä myös värin, katkeroaineiden, etanolipitoisuuden, sameuden ja sokerien tutkimiseksi. Väri ja katkeroaineet tutkitaan spektrofotometrillä. Sameutta tutkitaan sameusmittarilla. Etanolipitoisuutta ja oluen sisältämiä muita alkoholeja tutkitaan kaasukromatografilla. Oluen sisältämiä sokereita tutkitaan nestekromatografialaitteistolla.

3 Pilaajamikrobit

Bakteerit, villihiivat ja homeet ovat yleisimpiä oluen kontaminantteja eli saastuttajia. Oluen pilaavia bakteereita ovat maitohappo-, asetaatti- ja enterobakteerit sekä *Pectinatus*-, *Megasphaera*- ja *Zymomonas* -lajien bakteerit. Homeet voivat tuottaa mykotoksiineja eli homemyrkkyjä. Bakteereita, hiivoja ja homeita tutkittaessa on otettava huomioon näiden patogeenisuus eli kyky aiheuttaa ihmiselle tauti. (Enari & Mäkinen 2014, 209–218; Obi 2018.)

Turun ammattikorkeakoulun opiskelijoiden tuottamia oluita ei ole suodatettu, eli niistä saattaa löytyä bakteereja, villihiivaa ja proteiinimassan jäänteitä. Bakteereja, hiivoja sekä proteiineja tutkittiin kvantitatiivisesti eli määrällisesti. Mikrobien ja proteiinien tunnistamista eli karakterisointia ei suoritettu opinnäytetyön yhteydessä. Proteiinit olivat kooltaan nanometreissä, kun vastaavasti bakteeri- ja hiivasolupopulaatiot olivat mikrometrien kokoisia. Tässä opinnäytetyössä ei tutkittu homeita.

Harvat mikrobilajit kykenevät selviytymään olutvierteessä hiivan lisäyksen jälkeen (Taulukko 1). Hiivan lisäyksen jälkeen mikrobien kasvun rajoittavia tekijöitä ovat happamuus, hapen puute, hiilidioksidin läsnäolo, humala, ravinteiden niukkuus, etanolin läsnäolo sekä matala käymislämpötila. Olut on yleisesti ottaen niin hapanta, etteivät useimmat mikrobit kykene lisääntymään niin alhaisessa pH:ssa. Useimmat mikrobit tarvitsevat happea lisääntyäkseen (pois lukien anaerobiset mikrobilajikkeet, jotka lisääntyvät hapettomissa oloissa). Käymishiiva kuluttaa suurimman osan ravinteista käymisprosessin aikana, jolloin erilaisille mikrobeille ei ole ravinteita käytössään. Hiilidioksidi, oluen sisältämät humalat, käymisprosessissa syntynyt etanoli sekä matala käymislämpötila rajoittavat mikrobien kasvua luontaisesti. (Enari & Mäkinen 2014, 210–211.)

Pilaajamikrobeja on listattu taulukkoon 1. Mukaan ei ole otettu oluen suodatusvaiheen jälkeen esiintyviä pilaajamikrobeja, sillä Kupittaa Campus Breweryn oluita ei suodateta. Plusmerkki tarkoittaa, että kyseistä mikrobia esiintyy tarkkailtavassa panimoprosessin vaiheessa ja vastaavasti miinusmerkki

tarkoittaa, ettei kyseistä mikrobia esiinny tarkkailtavassa panimoprosessin vaiheessa.

Taulukko 1. Panimoprosessissa havaittavat pilaajamikrobit (mukaillen Enari & Mäkinen 2014, 234).

Mikrobiryhmä	Olutvierre	Käyminen
Villihyvät	+	+
Panimohiiva	-	-
Maitohappobakteerit	-	+
Enterobakteerit	+	+
Etikkahappobakteerit	+	(+)

Pilaajamikrobeista *Pectinatus*- ja *Megasphaera*-bakteerit on jätetty kokonaan pois virtaussytometrimittauksista yleisen mikrobiologisen turvallisuuden takia. Turun ammattikorkeakoulun laboratoriotilojen mikrobiologinen turvallisuusluokitus on taso 2, mikä ei riitä kyseisten bakteerilajien tutkimiseen. Vastaavasti esimerkiksi panimo- ja villihiivoista sekä maitohappo- että etikkahappobakteereista ei aiheudu vaaraa opiskelijoille tai henkilökunnalle. Virtaussytometrimittauksiin käytettiin sekä leimattuja että leimaamattomia *E. coli* -kantoja.

3.1 Bakteerit

Maitohappo- ja etikkahappobakteerien korvikelajina käytettiin enterobakteeria, *E. coli*. Enterobakteeri *E. coli*a käytettiin sekä leimaamattomana että leimattuna lajina, jotka oletuksella sijoittuvat samoihin kohtiin pistekuvaajia ja histogrammeja kuin maitohappo- ja etikkahappobakteerien pistejoukot. Yksittäisiä bakteerilajeja ei pyritty kvalitatiivisesti tunnistamaan. Opinnäytetyössä käytetyt bakteerilajit eivät aiheuttaneet terveystarpeita tutkittaessa. Kaikki bakteereja sisältävät liukset valmistettiin laminaarikaapissa

visiiri alhaalla, huomioiden suojavaatetus, suojakäsineet ja suojalasit. Bakteereja sisältäviä näyteliuoksia käsiteltiin aina suojakäsineet kädessä.

Yleisimpiä olutta pilaavia maitohappobakteereja ovat *Lactobacillus brevis* ja *L. lindneri* (Paradh 2015, 175–182). Yleisimpiä olutta pilaavia etikkahappobakteereja ovat *Acetobacter aceti*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter pastorianus* ja *Acetobacter hansii* (Suzuki 2015, 141–173). Näistä *Lactobacillus*- ja *Acetobacter*-kantoja tutkittiin yleisellä tasolla, eikä eri alalajeja pyritty tunnistamaan toisistaan.

Lactobacillus harbinensis -lajin bakteerit voivat aiheuttaa oluen kontaminoitumista tuottamalla oluen sekaan lopputuotteenaan maitohappoa ja sivuaineenvaihduntatuotteinaan etikkahappoa ja diasetyyliä. Maitohappo, etikkahappo ja diasetyyli kaikki aiheuttavat olueen makuvirheitä. (Liu ym. 2018.)

Maitohappobakteerit ovat gramnegatiivisia ja etikkahappobakteerit grampositiivisia bakteereita. Toisin sanoen, maitohappobakteerit värjäytyvät vaaleanpunaisiksi ja etikkahappobakteerit violeteiksi gramvärjäyksen jälkeen. Väriero johtuu grampositiivisen bakteerin kaksoiseinämästä, jota vastaavasti gramnegatiivisilla bakteereilla ei ole; niiden soluseinä on yksinkertainen. (Smith & Hussey 2005.)

Gramvärjäys sopisi virtaussytometrin sijaan spektrofotometriselle laitteistolle, jossa näytteiden havaitseminen perustuu valon imeytymiseen, eli absorbanssiin (Smith & Hussey 2005). Virtaussytometri vastaavasti tarvitsee jonkin leima-aineen, joka virittyy eli eksitoiduu tietylle aallonpituudelle ja lähettää eli emittoi valoa aallonpituudella, jonka virtaussytometri havaitsee (BD Biosciences 2006).

Maitohappobakteerit ovat anaerobisia, eli ne eivät tarvitse happea lisääntyäkseen. Maitohappobakteerit esiintyvät käymistankissa käymisen aikana. Etikkahappobakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobisia, eli ne voivat lisääntyä joko hapen läsnä ollessa tai hapettomissa olosuhteissa. Etikkahappobakteereita havaitaan nykyään lähinnä hanalaitteistoissa sekä kypsytystynnyreissä. Bakteerit voivat yleisesti ottaen aiheuttaa oluen makuvirheitä. (Enari & Mäkinen 2014, 234–237.)

3.2 Proteiinit

Polyfenolit muodostavat proteiinien kanssa hapettuessaan suurimolekyylisiä yhdisteitä, jotka aiheuttavat olueen fysikaaliskemiallista samentumista. Proteiinit koostuvat aminohappoketjuista. Samentumiseen osallistuvat proteiinit sisältävät proliini-nimistä aminohappoa. Samentumista edistäviä tekijöitä ovat happi ja korkeat lämpötilat. Myös erilaiset hiivat, maitohappobakteerit sekä *Pectinatus*-että *Megasphaera*-lajien bakteerit aiheuttavat mikrobiologista samentumista. (Enari & Mäkinen 2014, 229–230.)

Olueen voi erottua proteiinisakkaa Kupittaa Campus Breweryn laitteistolla jo keittoastiasta käymisastiaan siirrettäessä, sillä koululla valmistettuja oluita ei suodateta. Suodattamaton olut sellaisenaan on sameaa. Sameutta voi aiheuttaa esimerkiksi kuollut proteiinimassa, joka flokkuloidaan ProtaFlac-nimisellä kaupallisella valmisteella olutvierteen pintaan ennen keittoastiasta käymisastiaan siirtoa. Värivirheiden lisäksi proteiinit voivat vaikuttaa vaahdon syntyyn ja pysyvyyteen (Enari & Mäkinen 2014, 229–230).

3.3 Hiivat

Hiivat lisääntyvät kuroutumalla, eivätkä ne tuota itiöitä. Oluessa esiintyvät hiivat voidaan jakaa villihiivoihin ja panimohiivoihin. Villihiivat ovat oluessa ei-toivottuja hiivoja, jotka voivat aiheuttaa makuvirheitä. Villihiivat voivat lisääntyä käymisen aikana sekä hanalaitteistossa. Panimohiivat ovat olueen lisättyjä hiivoja, joilla pyritään tuottamaan mäskäysvaiheessa olutvierteeseen saaduista sokereista etanolia mahdollisimman tehokkaasti. Mikäli kaikkea sokeria ei saada hyödynnettyä, saattavat villihiivat alkaa kasvamaan käymistankissa. Yleisimpiä oluen panemiseen käytettyjä hiivasukuja ovat *Saccharomyces* ja *Dekkera*. (Enari & Mäkinen 2014, 211–213.)

Hiivoista tutkittiin yleisesti käytettyä panimohiivakantaa, *Saccharomyces cerevisiae*, jota käytetään panimotekniikassa käymisvaiheen aloittamiseksi. Eri hiivalajeja tai niiden alalajeja ei pyritty tunnistamaan. Hiivaa sisältävät

näyteliuokset valmistettiin identtisesti bakteereja sisältävien liuosten tapaan eli laminaarikaappiolosuhteissa ja suojakäsineet kädessä.

4 Oluen mikrobiologisen laadunvalvonnan perinteisiä menetelmiä

Perinteisiä oluen laadunvalvontamenetelmiä ovat muun muassa Hygicult- ja ATP-testi sekä kasvatusmaljojen pesäkelaskentamenetelmä että PCR. Hygicult- ja ATP-testi ovat pintahygieniatestejä, joilla voidaan valvoa oluen käsittelypintojen puhtautta. Kasvatusmaljoja voidaan valmistaa oluesta itsestään sekä pinnoilta, joilla olutta on valmistettu. PCR-menetelmällä monistetaan olutta pilaavien mikrobien DNA:n määrä ja ajetaan esimerkiksi agarosigeelielektroforeesimittauksella. PCR-laadunvalvontanäyte otetaan oluesta.

Näytteen saastuminen saattaa vaikuttaa tutkimustuloksiin virheellisesti. Tällöin muutoin negatiivisesta tuloksesta saattaakin tulla positiivinen tulos tai päinvastoin. Väärät positiiviset ja negatiiviset tulokset voivat tuottaa yksityisyrityksille suuria taloudellisia tappioita, sillä virheelliset tuote-erät joudutaan vetämään asiakkailta takaisin ja hävittämään. Tuotteiden takaisinvedoilla pyritään turvaamaan yksityishenkilöiden terveys.

4.1 Hygicult-testi

Hygicult-testeillä voidaan valvoa pintahygienistä puhtautta tuotantotiloissa. Hygicult-testejä voidaan ottaa kaikilta pinnoilta, joilla on käsitelty haluttua tuotetta. Oluen valmistusprosessissa Hygicult-testi voidaan ottaa oluen keittopadasta, käymisastiasta ja varastointiastioista käytön jälkeen. Edellä luetellut astiat tulee pestä ennen pintahygieniatestin ottamista, jotta saadaan mahdollisimman ajantasainen kuva pinnan puhtaudesta.

Hygicult Y&F-testiputki on tarkoitettu homeiden ja hiivojen kasvatukseen. Hygicult Y&F-testiputki sisältää kaksipuolisen testiliuskan, jonka molemmilla puolilla on mallas-agar-kasvatuslientä. Bakteerien kasvu on Y&F-testiliuskalla estetty. Näyte otetaan painamalla molemmat puolet testattavaa pintaa vasten noin 3–4 sekunnin ajan, yksi puoli kerrallaan. Testiliuska asetetaan suljettuun

muoviputkeen ja muoviputki laitetaan lämpökaappiin hautumaan +27 °C ...+30 °C:een lämpötilaan noin 3–5 vuorokauden ajaksi. (Aidian Oy 2021.)

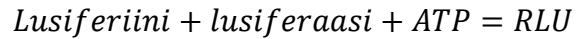
Vastaavasti Hygicult TPC -testiputki on tarkoitettu yleiseen pintahygienian testaukseen ja sen testiliuskat sisältävät TPC-agaria. Hygicult TPC -putkea inkuboidaan noin +27 °C...+30 °C:ssa noin kahden vuorokauden ajan. Molempien testiputkien tulokset ilmoitetaan muodossa PMY/cm² eli pesäkettä muodostavaa yksikköä per neliösenttimetri. Mikäli testattaisiin mikrobiologista puhtautta esimerkiksi nestepinnasta, ilmoitettaisiin saadut tulokset muodossa PMY/mL eli pesäkettä muodostavaa yksikköä per millilitra. Saatuja tuloksia tarkastellaan visuaalisesti ja verrataan käyttöohjeiden mukana tulevaan mallitauluun. (Aidian Oy 2021.)

4.2 ATP-testi

ATP-testiä käytetään pintahygienisen puhtauden valvontaan tuotantotiloissa. ATP:n määrää voidaan testata kaikilta pinnoilta, jolla on työstetty eloperäisiä näytteitä. Testin haasteena on sen yleisluonteisuus; testi ei erottele energianlähdettä. Toisin sanoen ATP-testillä saatu mittaustulos kertoo yleisesti ATP:n määrän testatulla pinnalla, muttei sitä, mistä ATP on peräisin. ATP voi siis olla peräisin esimerkiksi käsittelystä tuotteesta, tuotteeseen tarvittavista raaka-aineista, kontaminanttimikrobeista tai kaikista mainituista lähteistä (3M Health Care 2015, 3).

ATP tulee englannin kielen sanoista *Adenosine Triphosphate* ja tarkoittaa adenosiinitrifosfaattia. ATP on erittäin runsasenerginen yhdiste, jota löytyy sekä ihmisistä, eläimistä että pieneliöistä. Samalla ATP on yhdisteenä indikaattori yleisestä puhtaustasosta, sillä mitattava yksikkö on *RLU* eli *Relative Light Unit*. ATP-testi on nopea, luotettava ja helposti toistettava pintahygieniatesti, jonka tulokset ovat vertailukelpoisia keskenään. ATP:n määrä korreloi lineaarisesti RLU:hun, eli mitä enemmän ATP:tä, sitä enemmän havaitaan relatiivisia valon yksiköitä. (3M Health Care 2015, 3.)

ATP-mittaus perustuu ATP:n, lusiferaasientsyymin sekä lusiferiinin väliseen bioluminesenssireaktioon, jossa ATP:n energia muuttuu valoksi kuten kaava 2:ssa on kuvattu (Enari & Mäkinen 2014, 238).



Kaava 2. ATP:n bioluminesenssireaktio (3M Health Care 2015, 3).

Toisin sanoen ATP on suoraan verrannollinen valon määrään testatulla pinnalla. Tällöin korkea ATP-testitulokset tarkoittaa mahdollisen mikrobisaastumisen, lian ja/tai pölyn suurta määrää testatulla pinnalla. Ongelmaksi muodostuu se, ettei ATP-testi ole spesifi mitään pieneliötä tai kontaminaatiolähdettä kohtaan, vaan se havaitsee kaiken adenosiinitrifosfaatin testipinnalta alkuperästä riippumatta.

4.3 Maljakasvatusmenetelmät

Kasvatusmaljoilla voidaan kasvattaa mikrobeja agarissa.

Maljakasvatusmenetelmiä on olemassa kaksi: pintavalu- ja pohjavalumenetelmä. Pintavalumenetelmässä näyte pipetoidaan kasvatusliemen päälle. Pohjavalumenetelmässä ensiksi kasvatusmaljalle pipetoidaan näyte ja sen jälkeen kaadetaan kasvatusliemi kasvatusmaljalle.

Molemmissa menetelmissä näyte ja kasvatusliemi sekoitetaan kahdeksikkokuviolla ja laitetaan lämpökaappiin inkuboitumaan.

Inkuboitumisaika ja -lämpötila riippuvat kasvatettavasta pieneliöstä. Inkuboinnin tuloksena pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärä lasketaan ja ilmaistaan joko muodossa PMY/mL tai PMY/cm².

On olemassa yleiselatusaineita, joissa kasvavat useimmat bakteeri-, home- ja hiivakannat, esimerkiksi *PCA; Plate Count Agar* (Merck Life Science Oy 2021). Vastaavasti on olemassa myös tietyille mikrobilajeille soveltuvia kasvatusliemiä, esimerkiksi *TSA; Tryptic Soy Agar* (Merck Life Science Oy 2021). TSA soveltuu esimerkiksi *E. coli* ja *S. aureus* -bakteerilajien viljelyyn (Merck KGaA 2018).

Sellaista yleiskasvatusalustaa ei ole, joka sopisi jokaiselle mikrobityypille samaan aikaan. Useimmat oluen pilaajamikrobit kasvavat vain joko hapettomassa tai vähähappisessa ympäristössä. Hapettomilla viljelyillä voidaan todeta oluen pilaajamikrobit ja hapellisessa viljelyssä todetaan yleinen puhtaustaso. Kasvatusalusta ja kasvatolosuhteet tulisi valita tutkittavan mikrobin mukaan. (Enari & Mäkinen 2014, 236–237.)

4.4 PCR

PCR on lyhenne, joka tulee englanninkielisistä sanoista *Polymerase Chain Reaction* eli polymeraasiketjureaktio. PCR on periaatteeltaan halutun DNA-pätkän monistamista moninkertaiseksi määräksi alkuperäisestä näytteestä. PCR voidaan jakaa karkeasti kolmeen vaiheeseen: denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen ja polymerisaatio. Denaturaatiovaiheessa halutun oluen pilaajamikrobin DNA-juosteet erotetaan toisistaan nostamalla lämpöhauteen, eli PCR-laitteen, lämpötilaa +90 °C ...+95 °C:een. Toisessa vaiheessa kiinnitetään DNA-alukkeet toisiinsa +40 °C ...+60 °C:n lämpötilassa. Kolmannessa vaiheessa DNA:ta monistetaan +70 °C ...+75 °C:n lämpötilassa. (Enari & Mäkinen 2014, 238–239.)

Näiden kolmen vaiheen peräkkäistä toteutumista kutsutaan monistusreaktioksi. Toistamalla monistusreaktioita 20–30 kertaa saadaan tuotettua tutkittavaa näytettä tarpeeksi. Haittapuolena PCR-menetelmällä on herkkyys näytteiden saastumiselle. Mikäli näyteliuos saastuu, monistuu myös saastuttajan eli kontaminantin DNA moninkertaisesti. (Pärssinen ym. 2012, 179–183.)

5 Virtaussytometri ja sen toimintaperiaate

Alun perin FACSCanto II on tarkoitettu kliiniseen hematologiaan eli esimerkiksi verinäytteiden immunologisiin tutkimukseen ja syöpäkasvainten pahanlaatuisuusmäärittäisiin verinäytteistä. Panimotekniikassa vastaavasti pyritään tutkimaan kvantitatiivisesti bakteerien, hiivojen ja, mikäli mahdollista, myös proteiinien määrää olutnäytteissä.

FACS Canto -virtaussytometrilaitteisto koostuu virtaussytometrasta, nestekärrystä ja tietokonetyöpisteestä (Kuva 1). Virtaussytometri itsessään on laitteiston osa, josta kaikki viritys- ja näyteliuokset ajetaan. Nestekärrystä lähtevät pesu- ja huuhteluliuokset. Nestekärryyn kerätään jäteliuos omaan astiaansa. Tietokonetyöpistettä käytetään laitteiston hallitsemiseen aina parametrien asettamisesta ja viritysluosten ajosta pesuliuosten ajoon, tuloksina saatujen kuvaajien tulkintaan sekä laitteiston turvalliseen sammutukseen. Virtaussytometrilaitteisto ei vaadi erillistä erikoistilaansa tai tiettyä puhtaustilaluokitusta. (BD Sciences 2006, 16–23.)



Kuva 1. Turun AMK:n Lemminkäisenkadun kampuksen virtaussytometrilaitteisto.

Virtaussytometrin käyttö perustuu näytteen havaitsemiseen halutuilla aallonpituuksilla. Virtaussytometri sisältää kolmelle eri värille oman valonlähteensä; sininen (488 nm), punainen (633 nm) ja violetti (405 nm). Valonlähteestä lähetettävä valo tarkentuu halutuille aallonpituuksille puolisuodattavien peilien ja tarkennuslinssin avulla. Lasersäteet on säädetty halutuille aallonpituuksille, jolloin pyritään havaitsemaan tietyn värisiä näytteitä ja vertailuliukoja. Kaikki viritys- ja näyteliuokset ajetaan metallisen näyteneulan (SIT) läpi FACSFlow-ajoliuksen avulla, josta virtaus kuljettaa halutut liuokset virtauskyvetiin (Kuva 2). Virtauskyvetissä lasersäteet kulkevat liuoksen läpi (Kuva 3).

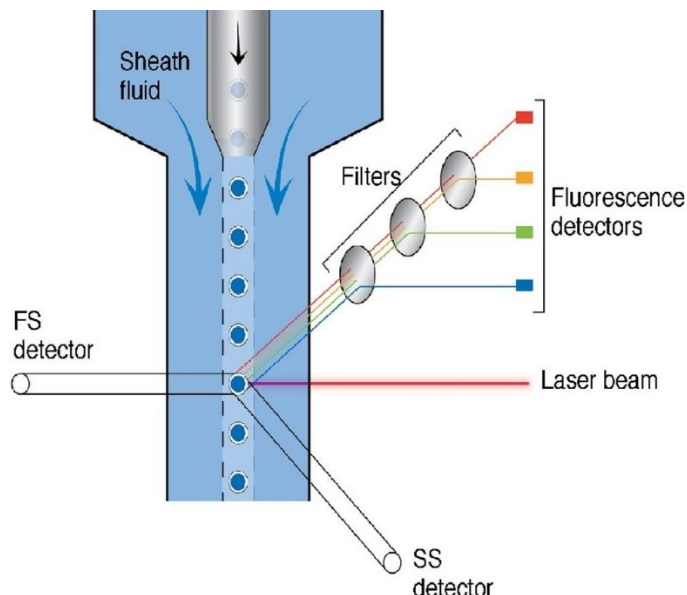


Kuva 2. Virtaussytometrin metallinen näyteneula.

Kuvassa 2 metallinen näyteneula on oikealla. Muoviset Falcon-näyteputket kiinnitetään näyteneulan ympärille yksi kerrallaan. Näyteputket kiinnitetään ja poistetaan manuaalisesti. Jokaisen näyteajon jälkeen virtaussytometri huuhtelee neulan automaattisesti FACSFlow-liuoksella.

Virtaussytometrin lasersäteet virittävät solut perustilasta viritystilaan. Viritystilasta tutkimuksen kohteena olevat pieneliöt emittoivat eli lähettävät valoa, jonka virtaussytometrin detektorit havaitsevat eri väreinä. Eriväriset mittauspisteet näkyvät "tapahtumina" (eng. events) pistekuvaajassa. Halutut kohdemikrobit voidaan myös värjätä ennen ajoa fluoresoivalla leima-aineella, jolloin detektorit havaitsevat mikrobit tietyn värisinä. (BD Sciences 2006, 106–108.)

Kuvassa 3 näytteiden läpi kulkevan valon havaitsevat suora- ja sivusirontadetektorit, jotka muodostavat ajokuvaajat tietokoneohjelmiston avulla tietokoneen näytölle. Suorasirontadetektori havaitsee solupopulaatioiden yksittäisten solujen koon ja määrän. Sivusirontadetektori havaitsee tutkittavien solujen sisäisen rakenteen. Haluttaessa näytteitä voidaan ajaa myös ilman sivusirontadetektoria tai fluoresoivia väriaineita. (BD Sciences 2006, 109–110.)



Kuva 3. Virtaussytometrin toimintaperiaate

(<https://doctorlib.info/hematology/rodak-hematology-clinical-principles-applications/33.html>).

Virtaussytometrin käyttö aloitetaan ajolaitteiston käynnistämisestä (Kuvio 2). Tämä tarkoittaa sekä virtaussytometrilaitteiston että pöytätietokoneen käynnistämistä. Laitteiden käynnistyksen jälkeen virtaussytometrille suoritetaan FACSDiva -ohjelmiston mukainen toiminnan tarkistus (Fluidics Startup). (BD Sciences 2006, 52.)

Ennen testin suorittamista virtaussytometri viritetään viritysliuksella (Taulukko 2). Tämän jälkeen voidaan joko valita olemassa oleva ajo-ohjelma tai luoda uusi. Ajo-ohjelmalla voidaan ajaa sekä viritys-, näyte- että pesuliukuksia. Ajo-ohjelma ja sen parametrit on aina valittava tarpeen mukaan; esimerkiksi näyteliukuksille on oma ajo-ohjelmansa ja pesuliukuksille omansa. (BD Sciences 2006, 52.)

Kun virtaussytometrilaitteisto suorittaa haluttua ajo-ohjelmaa, se kerää tietokoneelle tietoa suoritetusta ajosta dot plot -pistekuvaajalle. Pistekuvaajista voidaan havaita eri kokoisia ja eri aallonpituuksilla erottuvia hiukkasia (ks Kuvio 3). Tulosten analysointi voidaan suorittaa visuaalisesti arvioimalla pistekuvaajassa erottuvien tapahtumien määränä. Myös virtaussytometrilaitteiston havaitsemat tapahtumien määrä voidaan asettaa halutulle tasolle FACSDiva -ohjelmiston avulla. (BD Sciences 2006.)



Kuvio 2. Virtaussytometrin käytön prosessikaavio (mukaillen BD Biosciences 2013, 30).

Fluidics Shutdown -toiminnon suorittamisen jälkeen tietokoneelta voi vielä tallentaa ajotuloksia esimerkiksi USB-muistitikulle. Ajotulokset voidaan tallentaa FCS- tai PDF- tiedostomuodossa. FACS-tiedostomuotoon tallennetut ajotulokset voidaan avata Flowing Software -ilmaisohjelmistolla tai FACSCanton omalla FACSDiva-ohjelmistolla. PDF-tiedostomuotoiset ajotulokset voidaan vastaavasti avata esimerkiksi Adobe Acrobat Readerillä ja kopioida

sellaisenaan halutulle tekstinkäsittelyohjelmistolle. FCS-tiedostomuodon etuna on se, että kuvaajia voi vielä muokata, kun vastaavasti PDF-tiedostomuotoon tallennettuja ajokuvaajia voidaan muokata vain joko venyttämällä suuremmiksi tai supistamalla pienemmiksi. Tällöin esimerkiksi yksittäisiä kanavia, logaritmi- tai lineaariasteikkoja tai muita asetuksia ei voida muokata kuvaajassa näkyväksi.

5.1 FSC eli suorasirontadetektor

FSC on lyhenne, joka tulee sanoista *Forward Scatter Light* ja tarkoittaa suomeksi valon suorasirontaa. Se valo, joka heijastelee lasersäteen suuntaisesti, on suorasirontaa. Suorasironnalla määritetään tutkittavien solujen tai hiukkasten määrä ja koko. (BD Sciences 2006, 109–110.)

Näyteliuosanalyseissä voidaan käyttää suorasirontadetektoria ilman sivusirontadetektoria, jos näytteistä halutaan selvittää mikrobien kokoja sekä määriä. Tällöin kohteina olevien mikrobien tulisi erottua mahdollisimman selkeästi näyteliuksesta kokonsa ja määränsä mukaan, joko fluoresoivan väriaineen avulla tai ilman. Näyteliuksen liian tumma tai sakea väri saattaa aiheuttaa sen, etteivät kohdemikrobit erotu mitattavan liuksen joukosta. Olutnäytteiden kannalta tämä voi olla ongelmallista, mikäli kyseessä on suodattamaton olut. Suodattamaton olut saattaa sisältää proteiinisakkaa, joka voi sakeuttaa oluen väriä ja näin ollen vaikeuttaa mittauksen onnistumista.

5.2 SSC eli sivusirontadetektor

SSC on lyhenne, joka tulee sanoista *Side Scatter Light* ja tarkoittaa suomeksi sivusirontaa. Sivusironta on valoa, joka havaitaan lasersäteestä poikittain säteilevänä. Sivusironnan avulla voidaan määrittää tutkittavien solujen tai hiukkasten sisäistä rakennetta ja rakeisuutta eli granulaarisuutta. (BD Sciences 2006, 109–110.)

5.3 Fluoresenssi

Leima-aineella värjätyt kohdesolut kulkeutuvat lasersäteen läpi ja leima-aineet virittyvät perustilasta viritystilaan absorboidessaan fotoneja. Palautuessaan viritystilasta takaisin perustilaan, kohdesolujen leima-aineet lähettävät, eli emittoivat, valoa. Tällaista valon lähettämistä kutsutaan fluoresenssiksi. (BD Sciences 2006, 111.)

Eksitaatiolla tarkoitetaan viritystilaan virittymistä ja emissiolla valon lähettämistä. Eksitaatiota voidaan merkitä $E_x \lambda$ tai λ_{ex} ja emissiota $E_m \lambda$ tai λ_{em} . Molempien yksikkönä on nanometri, nm. Kreikan kielen kirjain Lambda, λ , tarkoittaa aallonpituutta. (FPbase 2020.)

5.4 Optiset suodattimet

Suodattimet säätelevät valon hajontaa ja tunnistimille ohjattavaa fluoresenssia. Suodatin joko välittää lävitseen, imee itseensä tai heijastaa poispäin valoa. BD FACSCanto II -virtaussytometri käyttää kahta erilaista suodatintyyppiä: Longpass (LP) ja Bandpass (BP). LP-suodattimet päästävät vain haluttua aallonpituutta pidemmät aallonpituudet lävitseen ja imevät itseensä tai heijastavat poispäin haluttua lyhyemmät aallonpituudet. BP-suodattimet eli kaistanpäästösuodattimet päästävät halutulla leveydellä aallonpituutta lävitseen. Esimerkiksi asettamalla mitattava aallonpituus 500 nm:iin ja 50 nm:n kaistaleveydellä, BP-suodatin päästää lävitseen valoa aallonpituusvälillä 475–525 nm. (BD Sciences 2006, 112–113.)

5.5 Detektorit

Detektorit eli tunnistimet ottavat vastaan sen valosäteilyn, jonka optiset suodattimet päästävät läpi. Tunnistimet muuntavat havaitun valosäteilyn elektronisiksi signaaleiksi, joka voidaan havainnollistaa tietokoneruudulla pistekuvaajana. BD FACSCanto II -virtaussytometri käyttää kahta erilaista

tunnistintyyppiä: valodiodia ja valomonistinputkea (eng. *Photo Multiplier Tube, PMT*). Valodiodit havaitsevat sinisen laserin tuottaman valon voimakkaamman suorasirotonsignaalin. Herkemmät valomonistinputkitunnistimet havaitsevat vastaavasti kaikki heikompaa valosignaalia lähettävät sivusirotonsignaalit ja kaikkien fluoresenssikanavien lähettämät valosignaalit. (BD Sciences 2006, 114–116.)

5.6 Virtausytometri elintarviketekniikassa

Taulukkoon 2 on koottu elintarviketekniikan virtausytometritutkimuksissa käytettyjä fluoresoivia leima-aineita. Omin sarakkeinaan ovat leima-aineen nimi, eksitaatio- ja emissioaallonpituus sekä käyttötarkoitus. Käyttötarkoituksen yhteydessä selviää myös kohdemikrobi. Samoille leima-aineille on useampia kohdemikrobeja, joten niiden mikrobikohtaiset tiedot on eritelty omiin soluihinsa.

Taulukko 2. Virtausytometriassa käytettyjä fluoresoivia leima-aineita.

Leima-aine	Ex λ (nm)	Em λ (nm)	Käyttötarkoitus
FITC	488	530	Näyttää halutut solut vihreän valon aallonpituudella.
Propidiumjodidi	535	617	kuolleiden bakteerisolujen laskeminen
SYTO 9	485	498	elävien bakteerisolujen laskeminen
SYTO BC	480	500	bakteerisolujen laskeminen
Propidiumjodidi	490	635	kuolleiden hiivasolujen laskeminen
SYTO 9	480	500	elävien hiivasolujen laskeminen

SYTO BC -leima-ainetta voidaan käyttää bakteerien kokonaismäärän määrittämiseen maito- ja olutnäytteistä. SYTO BC virittyy ja emittoi vihreän valon aallonpituudella. SYTO 9 -leima-aineella voidaan testikitistä riippuen määrittää joko elävien bakteerien tai elävien hiivasolujen määrää. Propidiumjodidia voidaan käyttää joko kuolleiden bakteerien tai kuolleiden hiivasolujen määrittämiseen. SYTO 9 ja propidiumjodidi virittyvät vihreän valon aallonpituudella. SYTO 9 emittoi vihreää valoa ja propidiumjodidi punaista valoa. (Liu ym. 2018, Invitrogen Ltd. 2007, Thermo Scientific Fisher 2005 & 2022.)

Badrudinin (2019) tutkimuksessa tavoitteena oli selvittää panimohiivan elinvoimaisuus ja lisääntymiskyky käyttämällä samoja hiivakantoja useampia käymiskertoja. Hiivakantoja testattiin laadunvalvontamenetelmillä sekä mikrobiologisesti selektiivisillä kasvatusliemillä yleisimpien saastuttajien havaitsemiseksi. Jo kertaalleen käytettyä hiivaa pyrittiin hyödyntämään uudelleen oluen panemisessa. Uudelleenkäytetyn hiivan elinvoimaisuutta testattiin virtaussytometrillä. Panimohiiva värjättiin metyleenisinisellä ja sillä saatuja tuloksia vertailtiin SYTO9+propidiumjodidi- sekä DIBAC₄-värjätyillä hiivasoluilla saatuihin virtaussytometrikuvaajiin ja -histogrammeihin. Tutkimuksessa käytettiin Thermo Scientific Fischerin *LIVE/DEAD*® FungaLight™ -hiivan elinvoimaisuustestikitteä. Testikitin SYTO9-leima-aineella elävät hiivasolut värjättiin vihreiksi ja kuolleet hiivasolut propidiumjodidilla punaiseksi. (Badrudin 2019.)

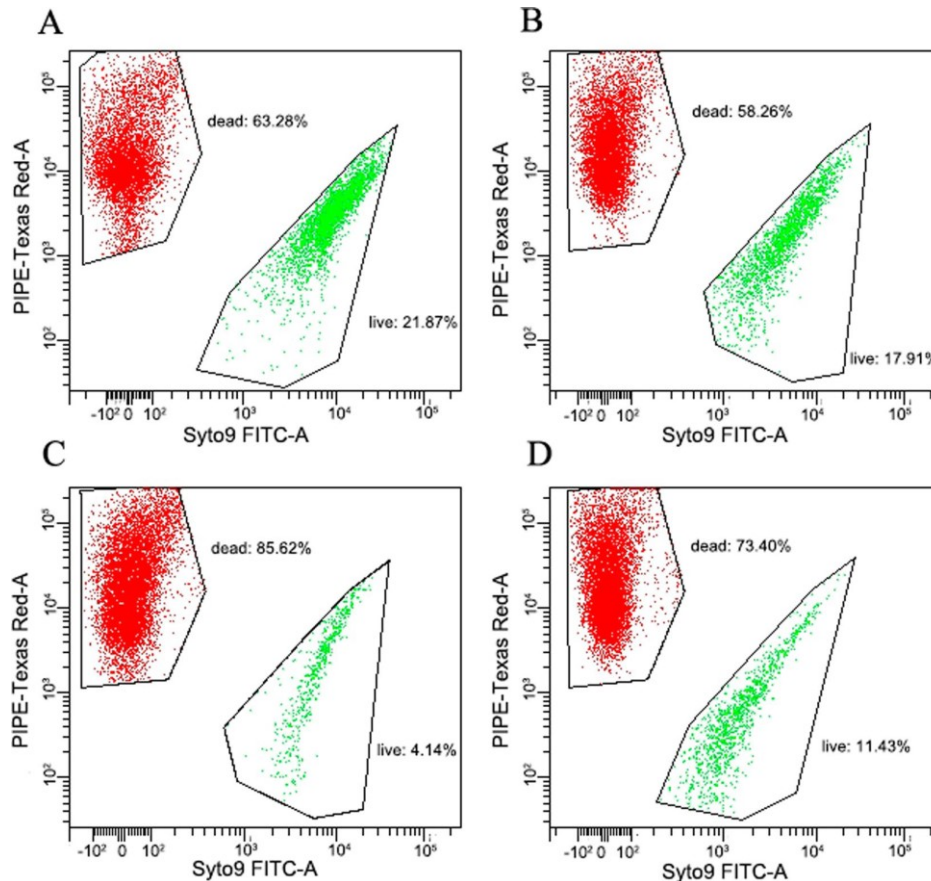
BD Bioscience (2002) tutki virtaussytometrin avulla hiivan elinvoimaisuutta ja konsentraatiota viinin käymisen aikana sekä rypälemehun joukossa. Hiivan elinvoimaisuuden ja konsentraation lisäksi virtaussytometrillä voi pyrkiä havaitsemaan kontaminantteja, kuten *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* ja *Lactobacillus*. Virtaussytometrin fluoresoivina väriaineina käytettiin SYTO16:ta ja Tiatsolioranssia (TO), koska ne läpäisivät kaikkien solujen kalvon. Vastaväriaineena käytettiin propidiumjodidia, joka ei läpäissyt elävien solujen kalvoa. Yhtenä huomiona nostettiin laskukaava (Kaava 3), jonka avulla voi laskea hiivasolupopulaation konsentraation. (BD Bioscience 2002.)

$$\frac{\text{tapahtumien määrä rajatulla solupopulaatioalueella}}{\text{tapahtumien määrä helmipopulaatiossa}} \cdot \frac{\text{helmien määrä per näyte}}{\text{näytetilavuus}} \cdot \text{laimennuskerroin} = \text{hiivasolupopulaation konsentraatio}$$

Kaava 3. Hiivasolupopulaation konsentraation laskukaava (BD Bioscience 2002).

Tapahtumien määrä oli rajattu pistekuvaajiin tehdyillä solupopulaatioiden rajauksilla. Pistekuvaajissa joko rypälemehu tai valmis viini oli rajattu omalla värillään ja havaittu hiivasolupopulaatio omalla värillään. Myös käytetyt BD Liquid Beads -helmien tapahtumat oli rajattu omiksi alueikseen pistekuvaajissa. (BD Bioscience 2002.)

Liun (2018) tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää, mistä väärät negatiiviset oluen kontaminaatiotulokset johtuivat. Tutkimuksessa elvytettiin elinkelpoisia, mutta ei-viljeltäviä *Lactobacillus harbinensis* BM-LH14723-kannan maitohappobakteereja. Maitohappobakteerit värjättiin näyteliuoksissaan ja niiden solupopulaatiot havaittiin virtaussytometrin pistekuvaajissa sekä histogrammeissa. Tutkimuksessa elinkelpoiset bakteerisolut värjättiin SYTO 9 -leima-aineella ja kuolleet solut propidiumjodidilla. Vihreinä näkyvät elinkelpoiset bakteerisolut havaittiin FITC-kanavalla ja punaisina näkyvät kuolleet bakteerisolut havaittiin Texas Red -kanavalla (ks. Kuvio 3). Kyseisessä tutkimuksessa käytettiin Thermo Scientific Fischerin LIVE/DEAD® BacLight™ -bakteerien elinvoimaisuus ja laskentakittiä. (Liu ym. 2018.)



Kuvio 3. Liun (2018) virtausytometripistekuvaaja (Liu ym. 2018).

Kuvion 3 pistekuvaajista voidaan havaita, että solupopulaatiot ovat jakautuneet siististi omiksi pistejoukoikseen. Olut ei ole Liun tutkimuksessa tuottanut häiritsevää taustaa, sillä värjätyt solupopulaatiot ovat erottuneet FITC- ja Texas Red -kanavilla vihreän ja punaisen värisinä. Suorasironta- ja sivusirontakanavia tarkasteltaessa pistekuvaaja saattaisi näyttää erilaiselta.

6 Menetelmän kehitys

Oluen mikrobiologiselle laadunvalvonnalle ei ole olemassa Turun ammattikorkeakoululla kehitettyä ajo-ohjelmaa tai menetelmää, jolla saataisiin oluen pilaajamikrobien määrä selville. Mikrobeja mitattiin virtausytometri-laitteiston suorasironta- ja sivusirontadetektoreilla, jolloin saatiin selville koko, määrä ja rakenne. Pilaajamikrobeja mitattiin sekä ilman fluoresoivia merkkiaineita että fluoresoivien merkkiaineiden kanssa.

Turku Bioscience Centre on Turun yliopiston ja Åbo Akademin yhteinen bioteknologian tutkimusyksikkö, jossa Flowing Software on solukuvantamisen ja virtausytometrian tutkimusprojekti. Perttu Terho on kehittänyt Flowing Software -ohjelmiston solujen kuvantamistutkimusta varten. Flowing Software -ohjelmistoa ei aktiivisesti enää kehitetä. (Turku Bioscience 2018.)

Tulosten tarkastelu suoritettiin ilmaisella Perttu Terhon Turku Biosciencelle kehittämällä Flowing Software -ohjelmistolla. Virtausytometrin ajotulokset siirrettiin muistitikulle, muistitikulta pöytätietokoneelle ja pöytätietokoneelta Flowing Software -ohjelmistoon. Flowing Software -ohjelmistolla luotiin tarvittavat dot plot -kuvaajat ja histogrammit (Turku Bioscience 2018). Flowing Softwarella luotiin lineaariset pistekuvaajat ja histogrammit. Tuloksia tarkasteltiin pääosin virtausytometrin omalla FACSDiva-ohjelmistolla, jolloin saatiin logaritmiset asteikot näkyville selkeästi. FACSDiva-ohjelmistolla luodut pistekuvaajat ja histogrammit olivat selkeämpiä tulkita.

Tässä opinnäytetyössä käytetyt liuokset rajoittuivat viritys-, vertailu- ja näyteliuoksiin. Mikään käytetyistä liuoksista tai niiden komponenteista ei ollut ympäristölle vaarallinen tai ihmiselle myrkyllinen. Käytetyt liuokset valmistettiin automaattipipetillä laminaarikaapissa 5 mL:n Falcon-koeputkiin ja sekoitettiin Vortex-koeputkisekoittimella n. 20 sekunnin ajan. Bakteerisuspensioliuokset ja niihin käytetyt välineet autoklaavattiin käytön jälkeen.

MilliQ-vesi on ultrapuhdasta laboratoriovettä, joka ei sisältänyt vesijohtovedessä esiintyviä epäpuhtauksia (Solunetti 2006). MilliQ-vettä käytettiin viritysliuosten

sekä ensimmäisten ajojen vertailunäyteliuosten valmistamiseen.

Suspensiomenetelmiä kehittäessä MilliQ-vesi korvattiin peptonivedellä, jolloin varmistuttiin siitä, etteivät virtaussytometrillä tutkittavat pilaajamikrobit hajoaisi osmoottisen paineen vaikutuksesta. Oluen väri täytyi ottaa huomioon mitattavia soluja tutkittaessa; bakteerit ja hiivat eivät välttämättä erottuneet liian tummasta taustasta. Suurin osa olutnäytteistä oli vaalean keltaisen ja kirkkaan oranssin värien väliltä eli näytteistä piti ainakin värin perusteella erottua bakteeri- ja hiivasoluja. Tämän vuoksi virtaussytometrinäytteitä varten kehitettiin hiiva- ja bakteerisuspensiomenetelmät, joilla oli tarkoitus saada näkyviin hiiva- ja bakteerisolupopulaatiot pistekuvaajissa sekä histogrammeissa näkyviin. Hiiva- ja bakteerisuspensiomenetelmille kirjoitettiin omat pikatyöohjeet liitesivuille.

Kaikissa viritys- ja näyteliuosten ajoissa virtaussytometrin virtausnopeus pidettiin keskiasetuksella (eng. Medium) eli näytekyvetin läpi kulkeva nestevirtaus oli nopeudeltaan noin 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ (BD Sciences 2006, 149). Nestevirtauksen nopeus pidettiin vakiona. Ajoparametreja pyrittiin säätämään muuttamalla eri kanavien volttilukemia.

6.1 Viritys- ja näyteliuokset

Viritysluoksina käytettiin *CST Beads* -liuosta MilliQ-veteen tai *PBS*-liuokseen laimennettuna (ks. Taulukko 3). Kyseinen viritysliuos ajettiin jokaisen käyttökerran alussa laitteiston läpi, jotta saatiin laitteisto viritettyä halutuille asetuksille. Baseline-liuos on vertailuliuos, joka ajettiin kerran virtaussytometrilaitteiston läpi.

Taulukko 3. Viritys- ja näyteliuosten valmistustilavuudet.

Liuos	CST Beads	PBS-liuos tai MilliQ-vesi	Karhu New England IPA	Karhu Pale Ale
Baseline- vertailuliuos	3 tippaa	500 µL	-	-
Viritysliuos	1 tippaa	350 µL	-	-
Näyteliuos (Karhu NEIPA)	1 tippaa	-	350 µL	-
Näyteliuos (Karhu Pale Ale)	1 tippaa	-	-	350 µL

Viritys- ja vertailuliukset valmistettiin 5 mL:n läpinäkyviin Falcon-koeputkiin. CST Beads -liuos ravistettiin ennen käyttöä ja puristettiin omasta pullostaan. Sille ei tarvittu mitään erityistä mittavälinettä. Tämän jälkeen Falcon-putken sisältö sekoitettiin Vortex-koeputkisekoittimella. PBS-liuos ja MilliQ-vesi automaattipipetoitiin dekanterilasista. Kaikki opinnäytetyön aikana valmistetut liuokset valmistettiin ja käsiteltiin laminaarikaapissa. Laminaarikaapin tarkoitus oli suojella käsiteltävää tuotetta kontaminaatiolta.

Näyteliuokset valmistettiin samanlaisiin läpinäkyviin 5 mL:n Falcon-koeputkiin kuin viritys- ja vertailuliuksetkin. Näyteliuoksina käytettiin kaupallisia oluita; Karhu New England IPA:a ja Karhu Pale Alea. Koulun opiskelijoiden valmistamiin oluiden ero kaupallisiin verrokkituotteisiin on se, että kaupalliset oluet ovat prosessiltaan vakinaistettuja, eikä yksittäisen kaupallisen oluen reseptikassa ole merkittäviä eroja eri valmistuserien välillä. Kaupalliset oluet olivat suodattamattomia oluita eli niissä saattoi olla bakteerien, proteiinimassan ja/tai hiivasolujen jäänteitä.

Osa *E. coli* -bakteerisuspensionäytteistä sisälsi EGFP-leima-ainetta, jonka tavoitteena oli antaa parempi kokonaiskuva siitä, mitä olut sisältää. Leima-aineet eli väriaineet tarkentavat haluttujen solujen tai hiukkasten osuutta

näytteestä, jolloin niiden avulla saadaan korostettua esimerkiksi hiivasolut omaksi havaintomatriisikseen pistekuvaajassa sekä histogrammissa.

6.2 Hiivasuspensiomenetelmän kehitys

Näyteliuoksista johtuvaa epävarmuutta pyrittiin pienentämään luomalla hiivasuspensio peptonivedestä ja panimohiiva SafAle US-05:stä. Punnittavan panimohiivan teoreettinen määrä laskettiin Kupittaa Campus Breweryn käyttämien panimoresepteissä käytettyjen panimohiivan ja olutvierteeseen tulevan veden tiheytenä kaavan 4 mukaisesti.

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{140 \text{ g}}{200 \text{ L}} = \frac{140 \text{ g}}{200000 \text{ mL}} = 0,0007 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

Kaava 4. Tarvittavan panimohiivan teoreettinen tiheys.

ρ = tiheys (g/mL)

m = massa (g)

V = tilavuus (mL)

Peptonivesi-hiivasuspensio valmistettiin 25 mL:n mittapulloon kaavan 5 mukaisesti.

$$m = \rho \cdot V = 0,0007 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \cdot 25 \text{ mL} = 0,0175 \text{ g}$$

Kaava 5. Tarvittavan panimohiivan teoreettinen punnittava massa.

Peptonivesi-hiivasuspensio valmistettiin jokaisella ajokerralla uudestaan, jotta voitiin testata hiivasuspension toistettavuus sameusmittauksen avulla.

Taulukossa 4 on peptoniveteen valmistettujen hiivasuspensioiden sameusmittauksia, jotka mitattiin sameusmittarin avulla, jolloin voitiin varmistaa valmistusprosessin toistettavuus. Käänteisosmoosilla suodatettua laboratoriovettä käytettiin referenssi- eli vertailuliuoksena peptonivesi-hiivasuspensionäyteliuoksille.

Taulukko 4. Peptonivesi-panimohiivasuspension sameusmittaukset.

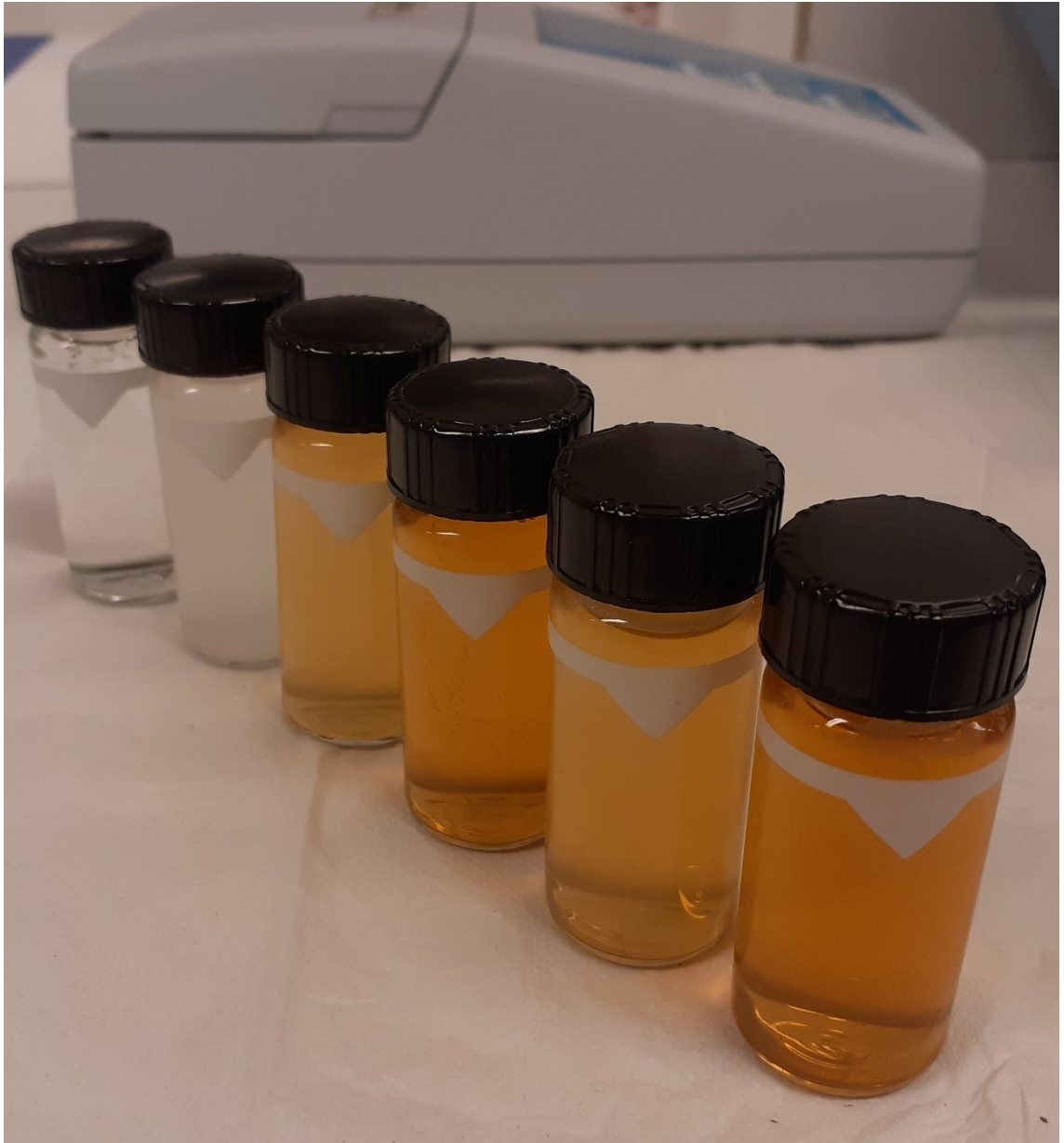
Päivämäärä	Laboratoriovesi (REF.)	Peptonivesi-hiivasuspensio
26.10.2022	0.08 NTU	360 NTU
27.10.2022	0.06 NTU	409 NTU
31.10.2022	0.11 NTU	325 NTU
09.11.2022	0.12 NTU	369 NTU
14.11.2022	0.04 NTU	427 NTU
15.11.2022	0.06 NTU	220 NTU

Laboratoriovettä käytettiin vertailuliuksena hiivasuspension sameutta määrittämisessä. Laboratoriovesi oli sellaisenaan läpinäkyvää, jolloin sameusmittauksen tulos oli lähellä arvoa 0. Peptonivesi oli myös läpinäkyvää, kunnes se sekoitettiin punnitun panimohiivan kanssa mittapullossa (Kuva 4). Mittapullossa sekoitettu peptonivesi-panimohiivasuspensio oli väriltään harmaata, eikä se ollut läpinäkyvää (Kuva 5).



Kuva 4. Peptoniveden valmistus.

Peptonivesi autoklaavattiin säilöpullossa valmistuksen jälkeen. Peptonivettä käytettiin viritys- ja näyteliuosten valmistuksessa.



Kuva 5. Valmistettujen näytteiden sameusmittauksia.

Kuvan 5 näytteet vasemmalta oikealle lueteltuna: laboratoriovesi, peptonivesi-hiivasuspensio, Karhu New England IPA (nollanäyte), Karhu Pale Ale (nollanäyte), Karhu New England IPA (lisätty hiivasuspensiota), Karhu Pale Ale (lisätty hiivasuspensiota).

Luotuja hiivasuspensioita hyödynnettiin virtaussytometrinäytteiden ajoissa.

Taulukoissa 5 ja 6 on havainnollistettuina kaksi erilaista näyteajosuunnitelmaa. Taulukon 5 näyteajosuunnitelmassa näytetilavuus on pidetty vakiona (350 μ L)

ja hiivasuspension määrä muuttuvana tekijänä (0–2 tippaa per näyte). Vastaavasti taulukon 6 näyteajosuunnitelmassa on pidetty hiivasuspension määrä vakiona (1 tippa per näyte) ja näytetilavuutta muuttuvana tekijänä (näytetilavuudet vaihtelivat 500 μL :n ja 3000 μL :n välillä). Jokaisen näytteen jälkeen ajettiin MilliQ-vettä 30 sekunnin ajan, jotta edellisen näytteen liuosjäämät eivät häiritsisi seuraavaa näytemittausta.

Näytetilavuus pyrittiin vakioimaan viritysluoksen mukaisesti, jolloin mahdollinen hiivasolupopulaatio sijoittuisi oletuksella samaan paikkaan pistekuvaajalla, näyteliuksesta riippumatta. Näyteliukset automaattipipetoitiin 5 mL:n Falcon-putkiin, kuten aiemmissakin näyteajoissakin. Hiivasuspensio pipetoitiin Pasteur-pipetillä näyteliuosten joukkoon. Hiivasuspensiolisäyksen jälkeen liukset Vortex-sekoitettiin ennen näytteiden ajamista virtausytometrillä. Vertailuliuksiin ei pipetoitu hiivasuspensiota lainkaan joukkoon.

Vertailuliuokset merkittiin lyhenteellä *REF.*, joka tulee englannin kielen sanasta *reference*. Referenssinäytteet olivat toisin sanoen nollanäytteitä, joihin ei lisätty mitään.

Taulukko 5. Näyteajosuunnitelma vakioidulla näytetilavuudella.

Näyte	Näytetilavuus (μL)	Hiivasuspension määrä (tippaa)
Virityслиuos	350	0
MilliQ (REF.)	350	0
MilliQ + 1	350	1
MilliQ + 2	350	2
Peptonivesi (REF.)	350	0
Peptonivesi + 1	350	1
Peptonivesi + 2	350	2
Karhu NEIPA (REF.)	350	0
Karhu NEIPA + 1	350	1
Karhu NEIPA + 2	350	2
Karhu Pale Ale (REF.)	350	0
Karhu Pale Ale + 1	350	1
Karhu Pale Ale + 2	350	2

Taulukon 5 näyteajojen pituuksista voitiin havaita, että MilliQ- ja peptonivesi-nollanäytteissä ei ollut hiivasuspensiota. Hiivasuspensio saattoi jäädä suodattamattoman oluen värin, hiivan, bakteerien, proteiinimassan sekä sameuden vuoksi havaitsematta. Hiivasuspensio erottui MilliQ- ja peptonivesinäytteiden pistekuvaajissa (ks. Kuviot 4–14). Vastaavasti olutnäytteistä peptonivesi-panimohiivasuspensio ei aluksi erottunut (ks. Kuviot 7 ja 8).

Seuraavaksi kokeiltiin muuttaa näytetilavuutta ja pitää hiivasuspension määrä vakiona: 1 tippa peptonivesi-panimohiivasuspensiota per näyte (ks. Taulukko 6).

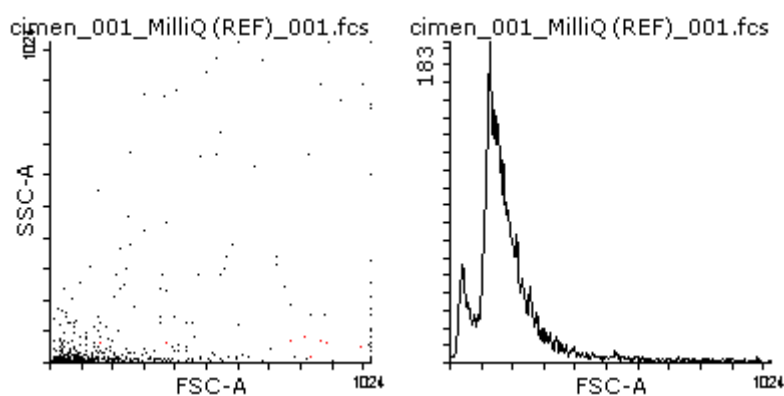
Taulukko 6. Näyteajosuunnitelma vakioidulla hiivasuspension määrällä.

Näyte	Näytetilavuus (μL)	Hiivasuspension määrä (tippaa)
Viritysluos	350	0
MilliQ	500	1
MilliQ	1000	1
MilliQ	2000	1
MilliQ	3000	1
Peptonivesi	500	1
Peptonivesi	1000	1
Peptonivesi	2000	1
Peptonivesi	3000	1
Karhu NEIPA	500	1
Karhu NEIPA	1000	1
Karhu NEIPA	2000	1
Karhu NEIPA	3000	1
Karhu Pale Ale	500	1
Karhu Pale Ale	1000	1
Karhu Pale Ale	2000	1
Karhu Pale Ale	3000	1

Näytetilavuutta muuttelemalla pyrittiin selvittämään hiivasolupopulaation sijoittuminen pistekuvaajalla; sijoittuisiko se samaan kohtaan kuvaajaan näytetilavuuden vaihtelusta riippumatta vaiko ei. Viritysluokseen ei tässäkään näyteajosuunnitelmassa pipetoitu ollenkaan hiivasuspensiota. Molempien taulukoiden näytteet valmistettiin identtisesti automaattipipetin sekä Pasteur-pipetointien osalta. Oleellisina eroina olivat näytetilavuudet sekä hiivasuspension määrä näytteissä. Molemmissa ajoissa tapahtumien määrä rajoitettiin 10000 tapahtumaan, jolloin virtausytometrilaitteisto lopetti näytteen ajamisen heti kerättyään 10000 tapahtumaa pistekuvaajalle.

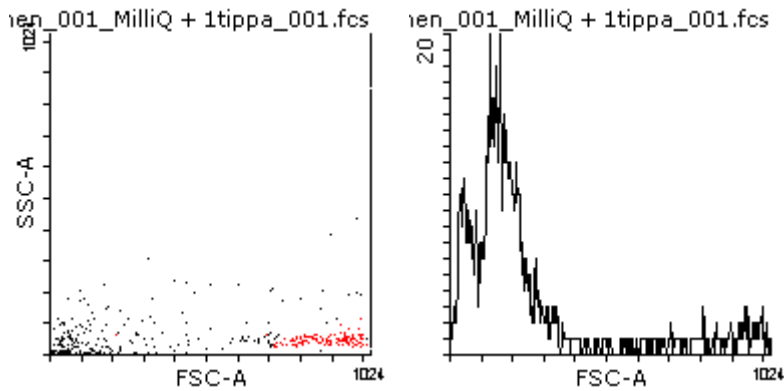
Kuviossa 4 havainnollistettiin ultrapuhtaan laboratorioveden eli MilliQ-veden nollanäytteen ajotuloksia. Kuvion 4 pistekuvaajassa ja histogrammissa ei havaittu panimohiivaa omana pistejoukkonaan. Yksittäiset punaiseksi värjäytyneet pisteet olivat taustaa. Taustan erottuminen saattoi johtua ajoparametrien herkkyysasetuksista.

Pistekuvaajissa x-akselille merkitty suorasilontakanava ilmaisee havaittujen solujen kokoa ja määrää. Pistekuvaajan y-akselille merkitty sivusilontakanava kertoo solujen sisäisestä rakenteesta; mitä monimutkaisempi yhdiste, sitä lähempänä se on pistekuvaajan oikeanpuoleista reunaa. Histogrammeissa y-akseli merkitsee solupopulaatioiden lukumäärää ja x-akseli solupopulaatioiden kokoa (FSC) tai vihreän valon fluoresenssia (FITC). FITC-kanavalla havaittujen solujen fluoresenssin lisäksi kyseinen kanava havainnollisti solujen kokoa suorasilontakanavan tavoin.



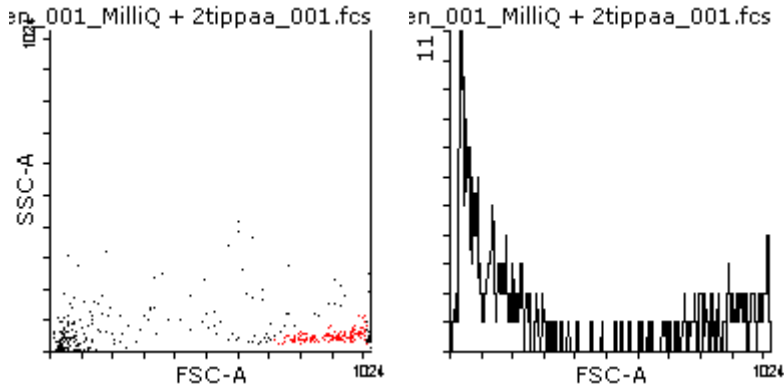
Kuvio 4. MilliQ-veden referenssinäytteen pistekuvaaja ja histogrammi (350 µL).

Kuvioissa 5 ja 6 hiivasuspensio erottui omana pistejoukkonaan. Hiivasuspensio värjättiin punaiseksi, jotta se erottuisi selkeästi muusta taustasta.



Kuvio 5. MilliQ-veden pistekuvaaja ja histogrammi yhdellä hiivasuspensiotipalla.

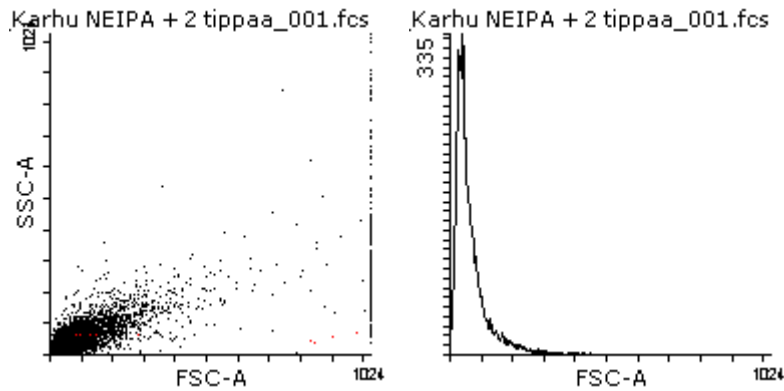
Kuvioiden 5 ja 6 histogrammeissa voitiin havaita selkeitä nousukohtia loppupuolella, kun hiivasolut alkoivat erottumaan. Vastaavia nousukohtia ei ollut referenssinäytteen histogrammissa.



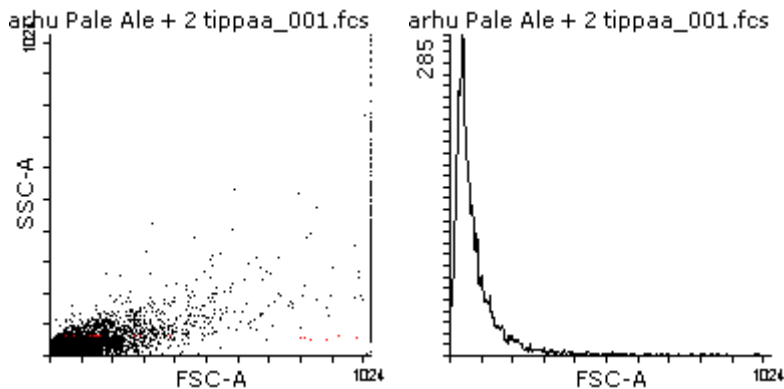
Kuvio 6. MilliQ-veden pistekuvaaja ja histogrammi kahdella hiivasuspensiotipalla.

Hiivasuspensio on jostain syystä jäänyt erottumatta olutnäytteissä, näytteestä riippumatta. Olutnäytteissä on niin paljon taustaa, ettei yksittäisiä alueita

pystytty rajaamaan hiivasuspension näkymiseksi, kuten kuvioiden 7 ja 8 pistekuvaajista sekä histogrammeista selvisi.



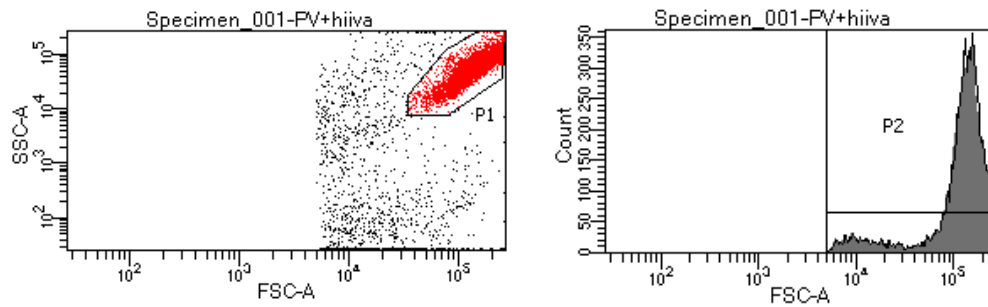
Kuvio 7. Karhu New England IPA:n pistekuvaaja ja histogrammi kahdella hiivasuspensiotipalla.



Kuvio 8. Karhu Pale Alen pistekuvaaja ja histogrammi kahdella hiivasuspensiotipalla.

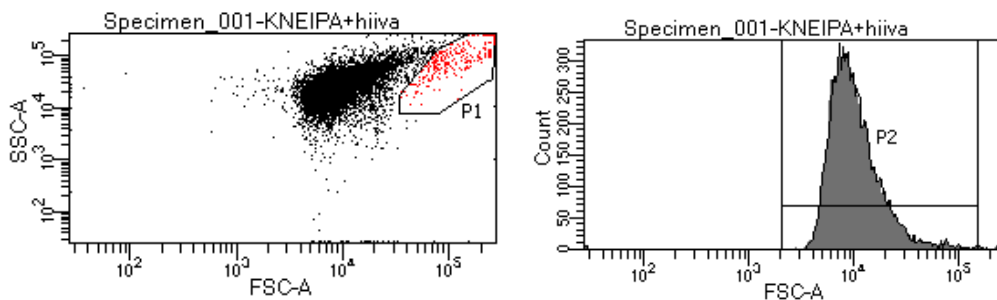
Kuvioiden 7 ja 8 histogrammeissa ei erottunut hiivasuspensiolle ominaisia nousukohtia. Toisin sanoen peptonivesi-panimohiivasuspensio peittyi oluen värin ja sameuden joukkoon. Panimohiivasoluja ei leimattu, joten sekin saattoi olla syynä heikkoon havaittavuuteen olutnäytteiden joukosta.

Flowing Softwarella tehdyt pistekuvaajat ja histogrammit olivat lineaarisella asteikolla. FACSDiva-ohjelmistolla tehdyt pistekuvaajat ja histogrammit olivat logaritmisella asteikolla. Kuviosta 8 alkaen ajotuloksia luotiin FACSDiva-ohjelmistolla selkeyden vuoksi. Logaritmisella asteikolla saatiin selkeämmin näkymään halutut solupopulaatiot (Kuvio 9 ja 10).



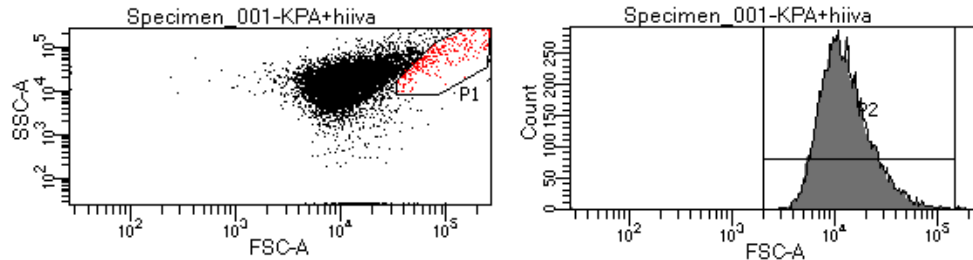
Kuvio 9. Peptoniveden panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Peptoniveteen valmistetun panimohiivasuspension hiivasolupopulaatio erottui selkeästi peptonivesinäytteistä pistekuvaajalla ja histogrammissa. Rajaus tehtiin automaattirajauksena FACSDiva-ohjelmiston omalla rajaustyökalulla. Hiivasolupopulaation rajattua aluetta (eng. *gate*) käytettiin oluiden panimohiivasuspensiota sisältävissä näytteissä sekä myös leimattua *E. colia* sisältävissä peptonivesi- ja olutnäytteissä.



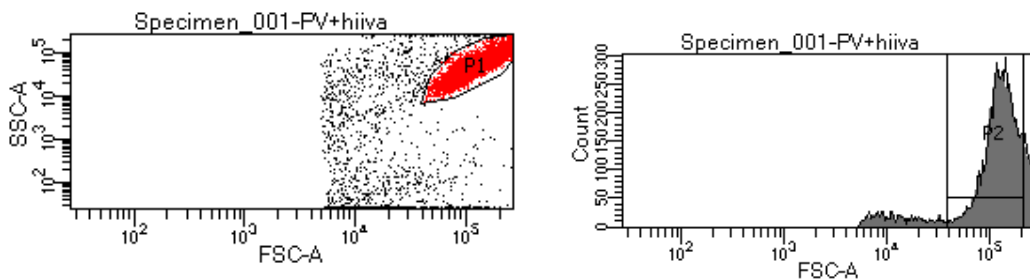
Kuvio 10. Karhu New England IPA panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Karhu New England IPA- ja Pale Ale-näytteistä hiivasolupopulaatio erottuu omana pistejoukkonaan, vaikkakin heikommin kuin peptonivesinäytteessä. Molempien olutnäytteiden hiivasolupopulaatiot erottuivat selkeästi histogrammilla.



Kuvio 11. Karhu Pale Ale panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

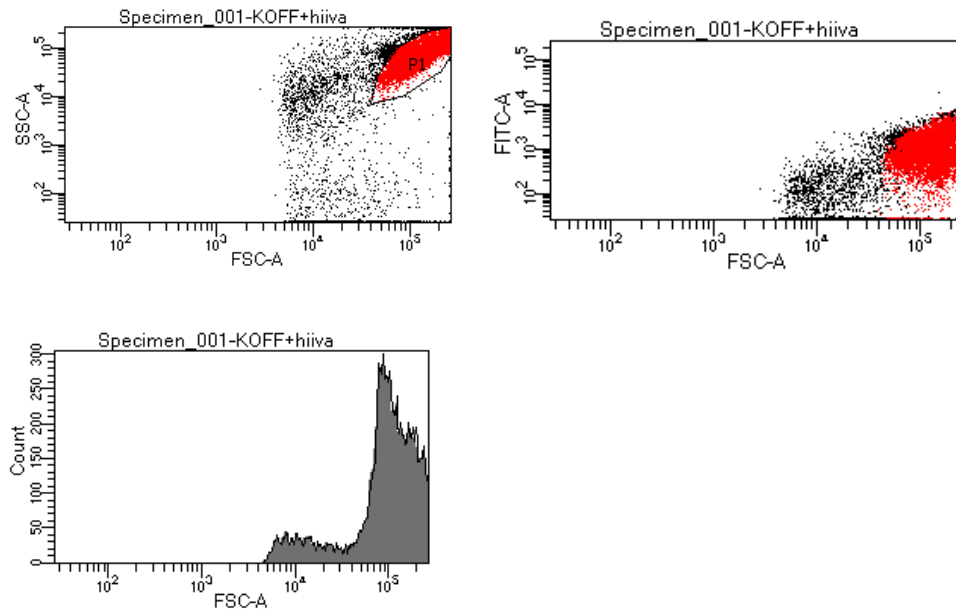
Peptonivesi-panimohiivasuspensionäytteitä ajettiin myös Sinebrychoffin suodatetussa KOFF-olueissa sekä Kupittaa Campus Breweryn suodattamattomassa Hope IPA-olueissa (ks. Kuvio 13 ja 14).



Kuvio 12. Peptoniveden panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

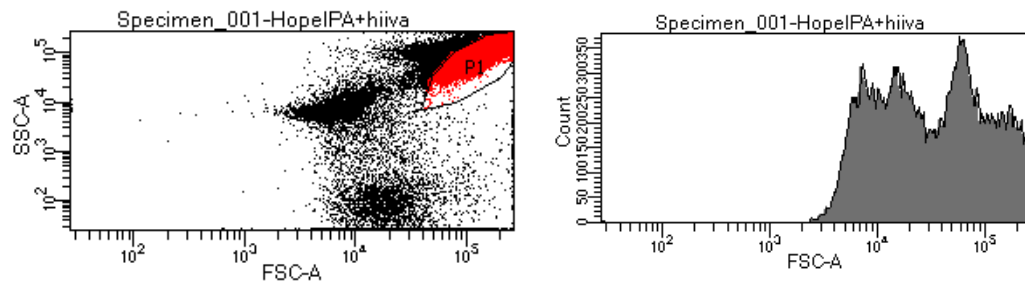
Hiivasolupopulaatio saatiin jälleen rajattua omaksi alueekseen.

Hiivasolupopulaatio erottui pistekuvaajassa P1-nimisenä alueena ja histogrammissa P2-nimisenä alueena (Kuvio 12). Alueiden rajaukset suoritettiin FACSDiva-ohjelmiston automaattirajaustryökalulla. Näin pyrittiin vähentämään inhimillisen virheen riskiä.



Kuvio 13. KOFF-oluen panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaajat ja histogrammi.

Hiivasolupopulaatio erottui KOFF-olutnäytteestä suorasironta- ja sivusirontakanavilla. Myös autofluoresenssia erottui FITC-kanavalla. Autofluoresenssi saattaa osittain selittyä oluen värillä.



Kuvio 14. Hope IPA -oluen panimohiivasuspensionäytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Hope IPA:n joukosta erottui hiivasolupopulaatio, mutta myös paljon taustaa. Suodattamattoman oluen taustasta johtuen on hankalaa sanoa, mitä kaikkea pistekuvaajassa ja histogrammissa esiintyy omina populaatioinaan.

6.3 Bakteerisuspensiomenetelmän kehitys

Bakteerisuspensiomenetelmää lähdettiin kehittämään käyttämällä *E. coli* -siirrostuksia sekä ilman fluoresoivaa merkkiainetta että fluoresoivan merkkiaineen kanssa taulukon 7 mukaisesti. Taulukon 7 näyteliuosten tilavuus pidettiin vakiona; 350 µL:aa. *E. coli* -solut siirrostettiin muovisella siirrostussilmukalla laminaarikaapissa. Kaikki *E. coli* käsittelyyn käytetyt välineet autoklaavattiin. Näytteet valmistettiin laminaarikaapissa ja kaikki näyteliuokset Vortex-sekoitettiin sekä heti valmistuksen jälkeen että juuri ennen virtausytometriajoja.

Taulukko 7. Näyteajosuunnitelma bakteerisuspensiomenetelmän testaamiseksi.

Näyte	Hiivasuspensio	<i>E. coli</i> (ei leimaa)	<i>E. coli</i> + EGFP
Peptonivesi+hiiva	1 tippa	-	-
Peptonivesi+ <i>E.coli</i>	-	1 tippa	-
Peptonivesi+ <i>E.coli</i> +EGFP	-	-	1 tippa
Peptonivesi+ <i>E.coli</i> +EGFP+hiiva	1 tippa	-	1 tippa
Karhu NEIPA+ hiiva	1 tippa	-	-
Karhu NEIPA+ <i>E.coli</i>	-	1 tippa	-
Karhu NEIPA+ <i>E.coli</i> +EGFP	-	-	1 tippa
Karhu NEIPA+ <i>E.coli</i> +EGFP+hiiva	1 tippa	-	1 tippa
Karhu Pale Ale+ hiiva	1 tippa	-	-
Karhu Pale Ale+ <i>E.coli</i>	-	1 tippa	-
Karhu Pale Ale+ <i>E.coli</i> +EGFP	-	-	1 tippa
Karhu Pale Ale+ <i>E.coli</i> +EGFP+hiiva	1 tippa	-	1 tippa

Taulukon 7 mukaisista peptonivesinäytteistä pyrittiin rajaamaan hiivasolu- ja bakteerisolupopulaatiot ennen olutnäytteiden ajamista (Kuvio 15–17).

Peptonivesinäytteisiin tehtyjä rajauksia hiiva- ja bakteerisolupopulaatioille käytettiin olutnäytteissä.

Näytetilavuutta päätettiin kasvattaa 350 μL :sta 700 μL :aan, valmistamalla näytteet identtisesti kuin taulukossa 7 (vrt. Taulukko 8). Suurempi näytetilavuus takasi haluttujen näyteliuosten riittävyyden ajoparametreja säädettäessä.

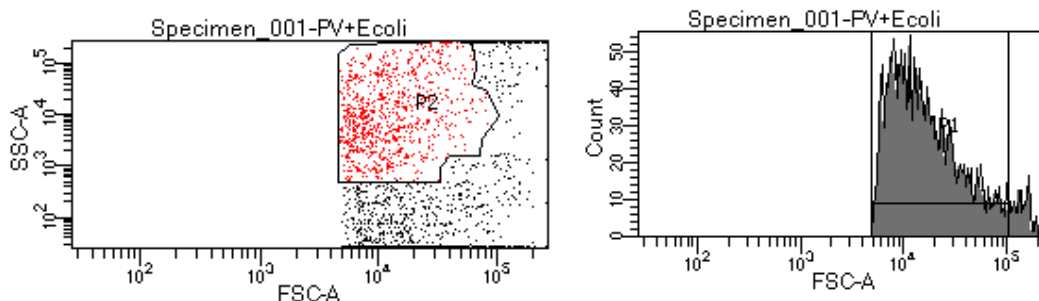
Ajoparametrien säätämiseen virtaussytometriajon täytyi olla aktiivinen, jotta mahdolliset muutokset ajoparametreihin saatiin tehtyä.

FSC-, SSC- ja FITC-kanavien herkkyyttä säädettäessä leimaton *E. coli* lakkasi näkymästä peptonivesinäytteistä, kuten kuvioista 15 ja 22 voidaan havaita.

Kanavien herkkyyksiä kokeiltiin kasvattaa volttilukemia suurentamalla.

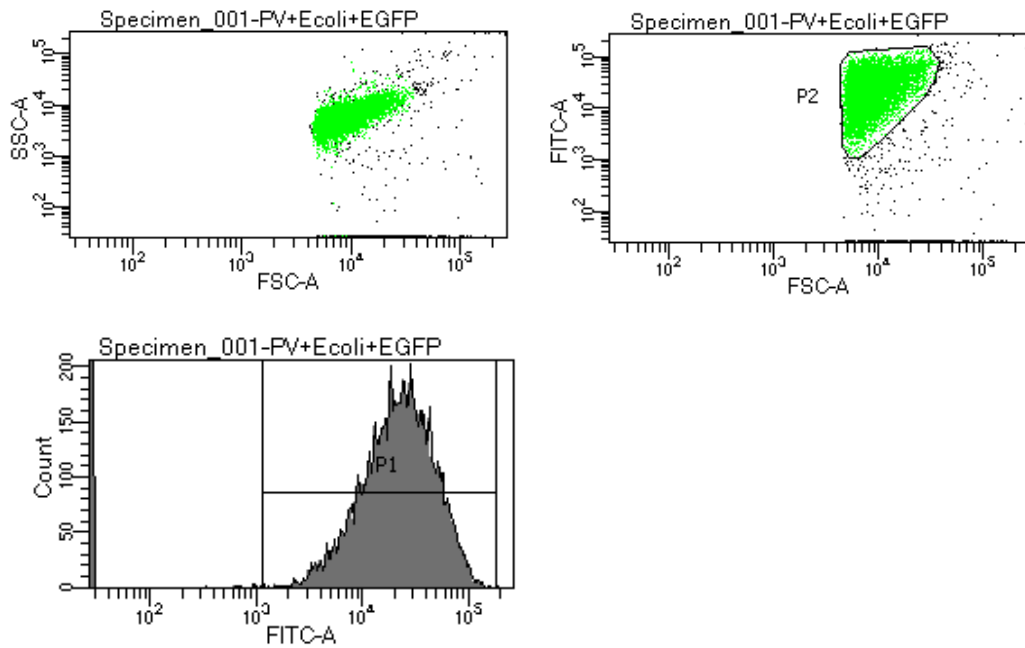
Kanavaherkkyyksiä kokeiltiin myös vähentää volttilukemia pienentämällä.

Pienemmillä kanavaherkkyyksillä näytteistä saatiin osa taustasta erotettua pois ja näkyviin saatiin haluttuja solupopulaatioita.

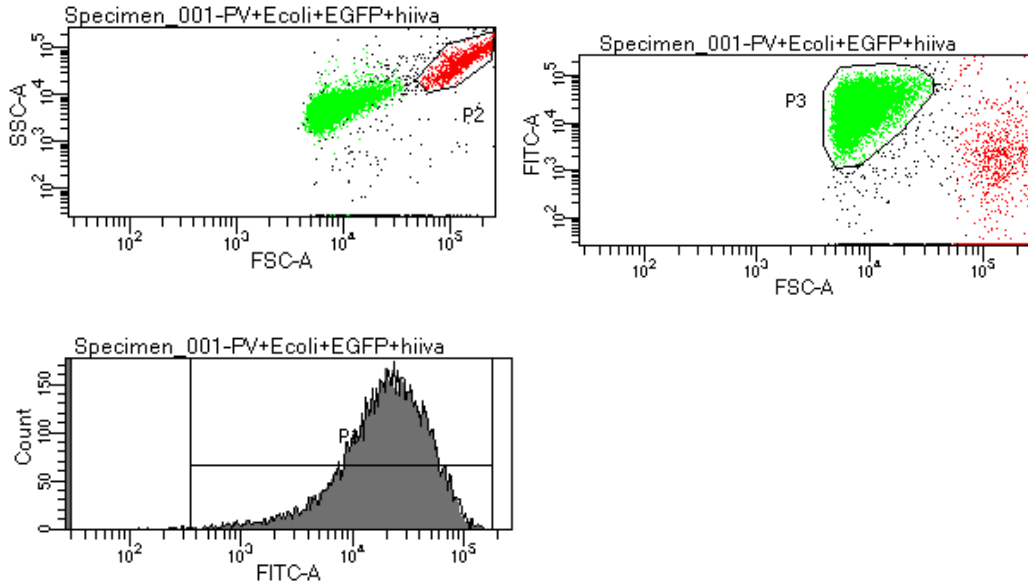


Kuvio 15. Peptoniveden leimattoman *E. coli* -näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Kuvioista 16 ja 17 voitiin havaita, että EGFP:llä leimattu *E. coli* erottui selkeästi suorasisironta-, sivusironta- ja FITC-kanavalla omana pistejoukkonaan.



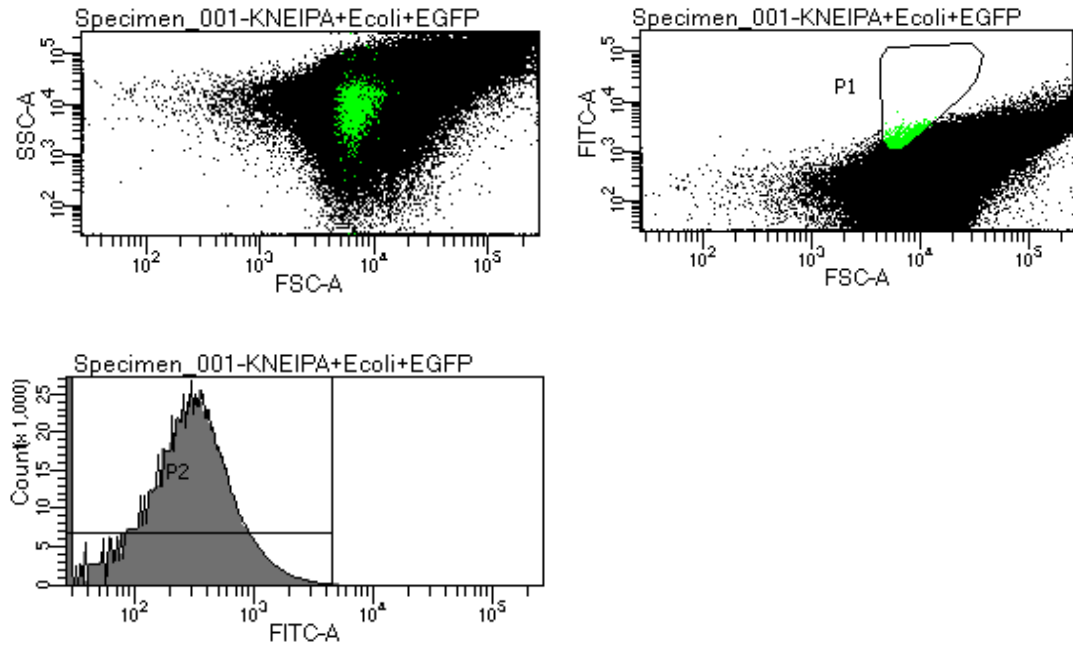
Kuvio 16. Peptoniveden leimattua *E. coli*a sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.



Kuvio 17. Peptoniveden leimattua *E. coli*a ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

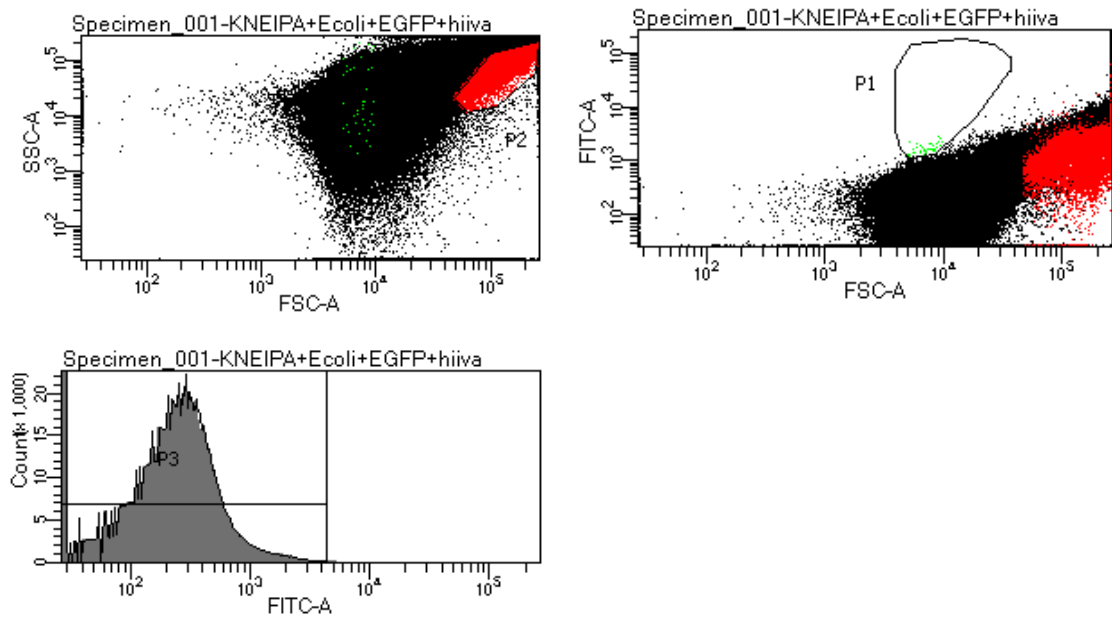
Peptonivedestä siirryttäessä olutnäytteisiin jälleen haasteeksi syntyi leimatun *E. coli*n erottuvuus oluen joukosta. Kuvioissa 18–21 leimattua *E. coli*a sisältävät

näytteet ajettiin sekä yleisesti 10000 pistekuvaajatapahtumaan saakka, että rajauksen kautta. Rajatun alueen kautta 10000 tapahtuman havaitseminen koitui haasteelliseksi, eikä valmistetut näyteliuokset olisi riittäneet rajauksen kautta suoritettuun näyteajoon (700 μ L/näyte).



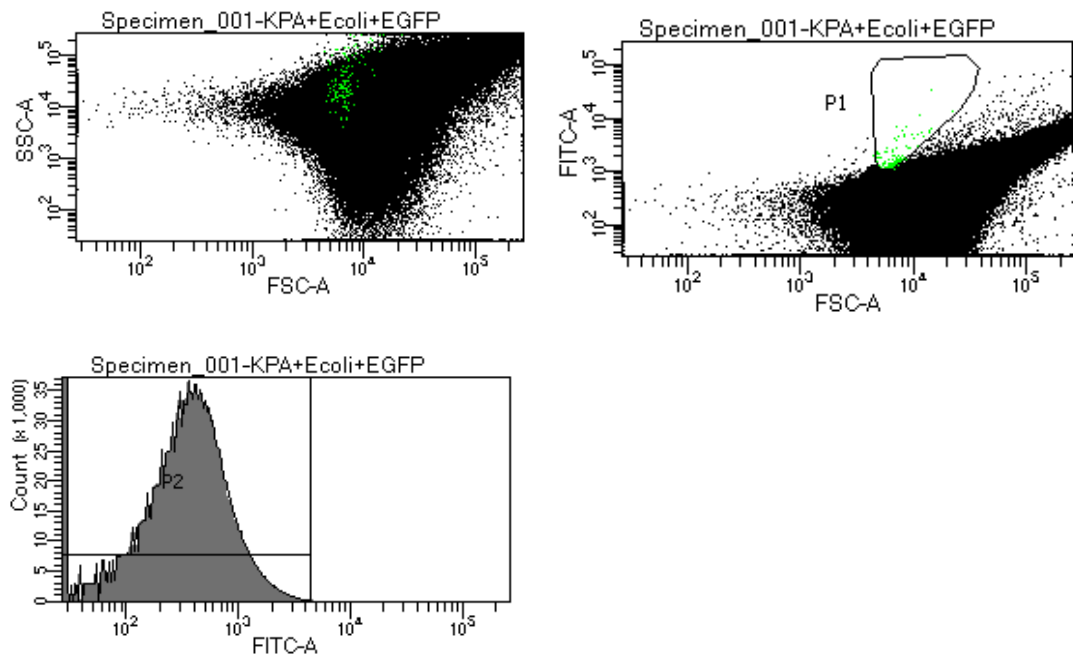
Kuvio 18. Karhu New England IPA:n leimattua *E. coli* sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

EGFP:llä leimattu *E. coli* erottui heikosti Karhu New England IPA:n joukosta. Selittäviä tekijöitä saattavat olla suodattamattoman oluen väri ja sameus. Leimatun *E. coli*n rajauksena käytettiin peptonivesinäytteiden pistekuvaajien FITC-kanavalle tehtyjä rajauksia. Rajauksen sisälle jääneet pistekuvaajatapahtumat erottuivat vaaleanvihreänä värinä pistekuvaajissa. Punaisella värillä erottuneet pistepopulaatiot olivat peptonivesi-panimohiivasuspensiota. Mustalla värillä erottuvat pisteet olivat olutta.

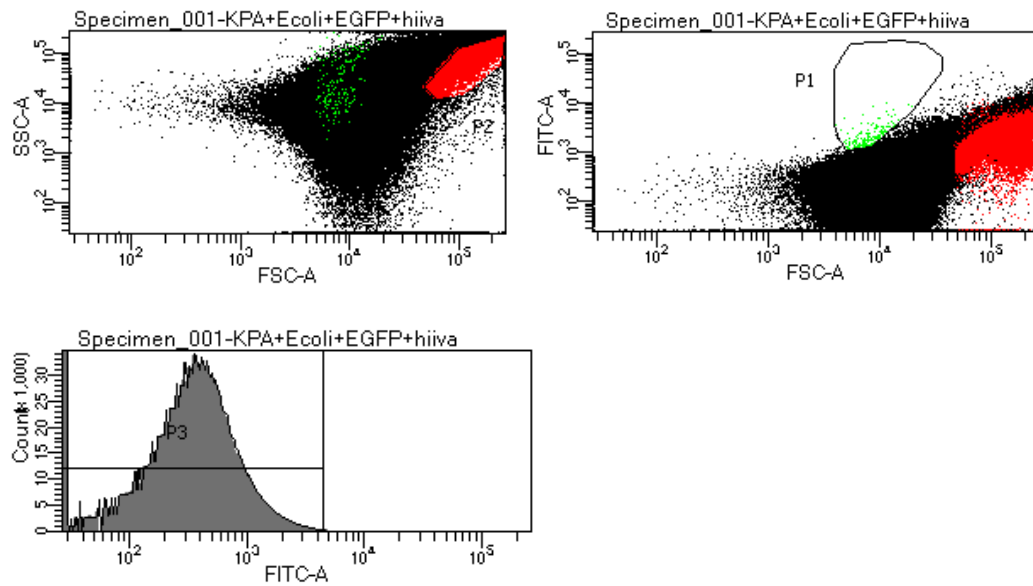


Kuvio 19. Karhu New England IPA:n leimattua *E. colia* ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Pistekuvaajat ja histogrammit olivat oluen osalta samanlaisia, vaikka näytteinä käytettäviä oluita vaihdettiin.



Kuvio 20. Karhu Pale Alen leimattua *E. colia* sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.



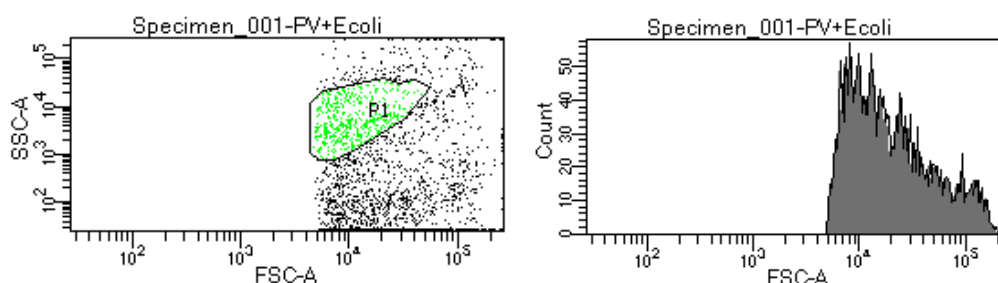
Kuvio 21. Karhu Pale Alen leimattua *E. coli*a ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

700 μ L:n näytetilavuuksilla kokeiltiin näyteajoa myös Sinebrychoffin suodatetulla KOFF-oluella sekä Kupittaa Campus Breweryn valmistamalla, suodattamattomalla Hope IPA-oluella taulukon 8 mukaisesti. Molemmista oluista ajettiin referenssinäytteet, joihin ei lisätty mitään. Peptonivesi-panimohiivasuspensiota lisättiin poikkeuksellisesti kaksi tippaa yhden tipan sijaan, koska hiivasuspension sameus oli tällä valmistuskerralla noin puolet aikaisempiin hiivasuspensioihin verrattuna (220 NTU).

Taulukko 8. Näyteajosuunnitelma 700 µL:n näytetilavuuksilla.

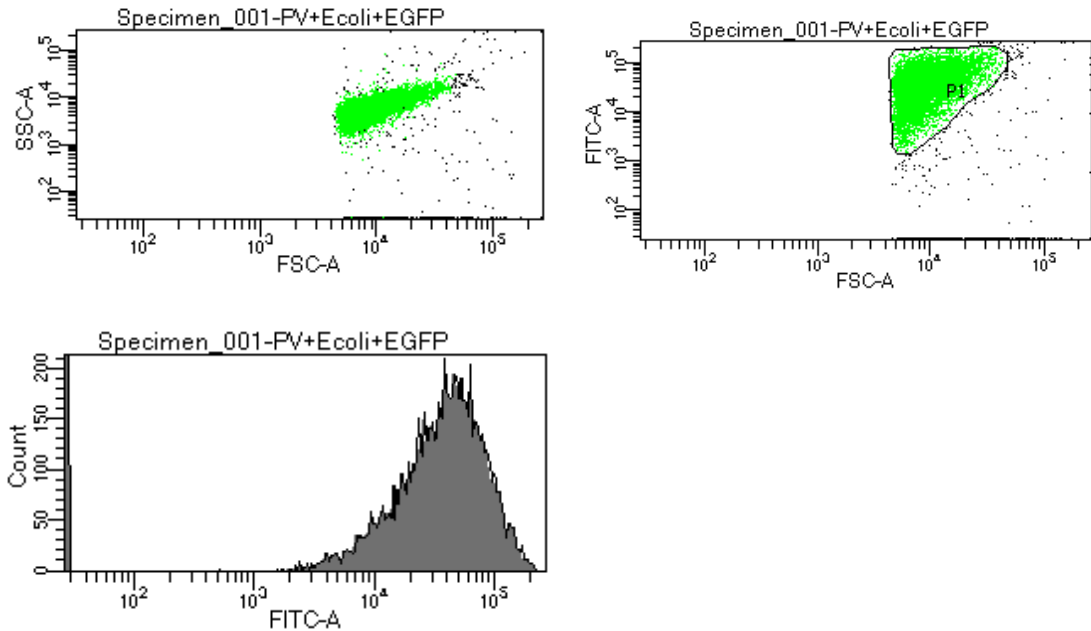
Näyte	Hiivasuspensio	<i>E. coli</i> (ei leimaa)	<i>E. coli</i> + EGFP
Peptonivesi+hiiva	2 tippaa	-	-
Peptonivesi+ <i>E. coli</i>	-	1 tippaa	-
Peptonivesi+ <i>E. coli</i> +EGFP	-	-	1 tippaa
Peptonivesi+ <i>E. coli</i> +EGFP+hiiva	2 tippaa	-	1 tippaa
Koff (REF.)	-	-	-
Koff+hiiva	2 tippaa	-	-
Koff+ <i>E. coli</i>	-	1 tippaa	-
Koff+ <i>E. coli</i> +EGFP	-	-	1 tippaa
Koff+ <i>E. coli</i> +EGFP+hiiva	2 tippaa	-	1 tippaa
Hope IPA (REF.)	-	-	-
Hope IPA+hiiva	2 tippaa	-	-
Hope IPA+ <i>E. coli</i>	-	1 tippaa	-
Hope IPA+ <i>E. coli</i> +EGFP	-	-	1 tippaa
Hope IPA+ <i>E. coli</i> +EGFP+hiiva	2 tippaa	-	1 tippaa

Kuviossa 22 näkyvä rajausta tehtiin peptoniveden leimatun *E. coli* -näytteen FITC-kanavalle pistekuvaajassa (Kuvio 23).



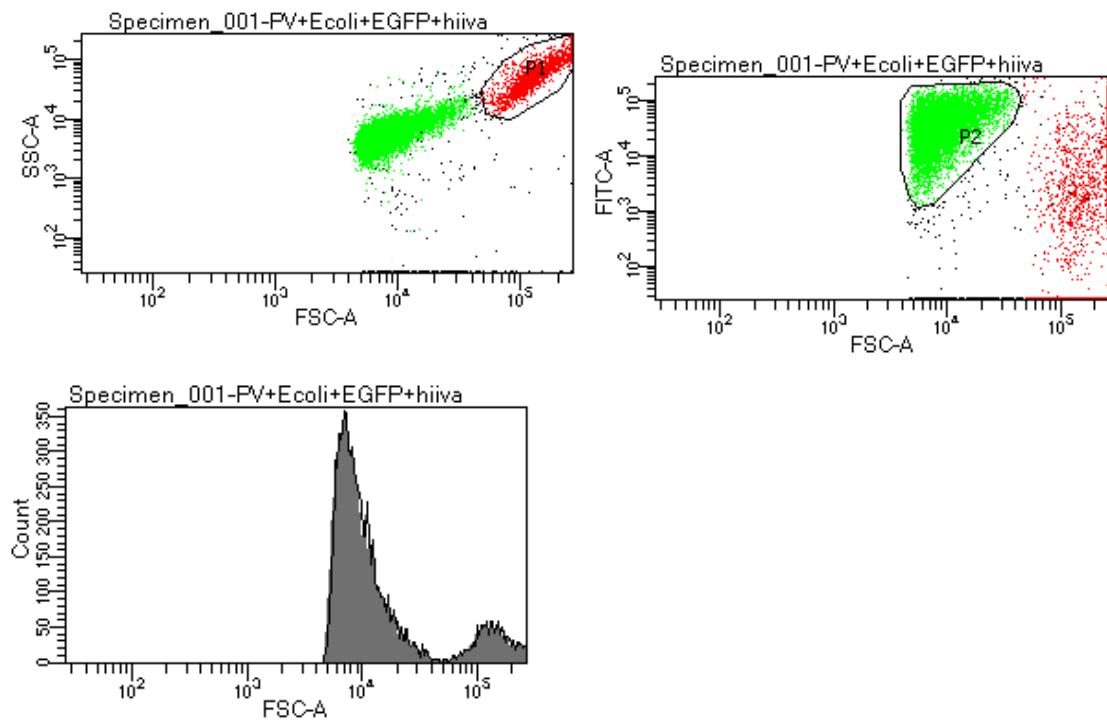
Kuvio 22. Peptonivesinäytteen leimaamattoman *E. coli* pistekuvaaja ja histogrammi.

Kuvion 23 pistekuvaajissa EGFP:llä leimattu *E. coli* erottui selkeästi taustattomasta peptonivedestä. Samainen leimattu *E. coli* erottui selkeästi myös histogrammissa omana solupopulaatiopiikkinään.



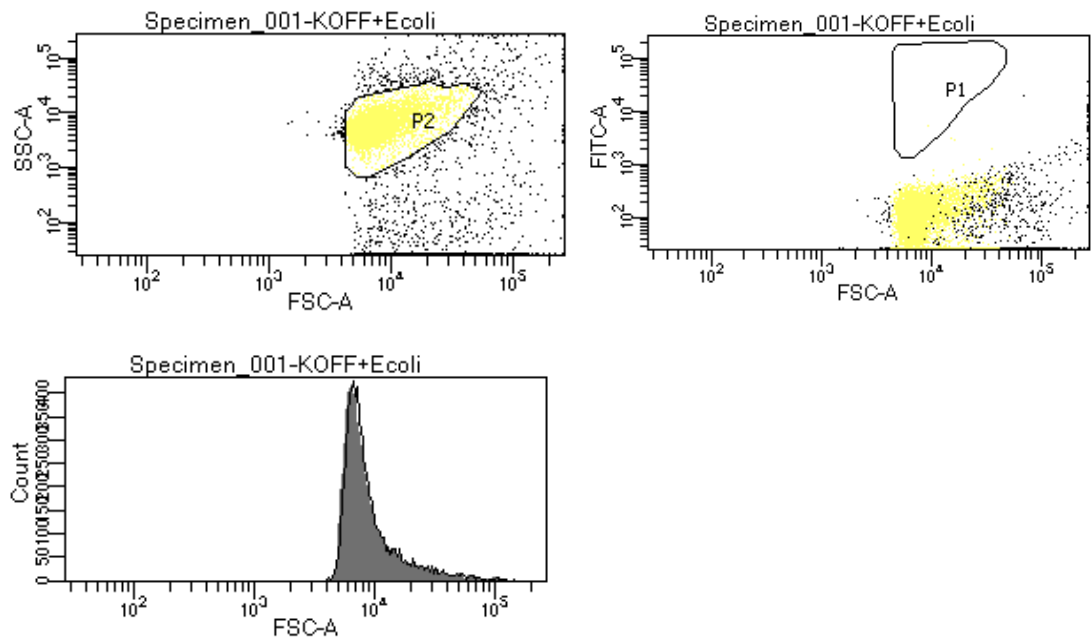
Kuvio 23. Peptoniveden leimattua *E. coli*a sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Kuviossa 24 panimohiivan rajaus tehtiin pistekuvaajan suorasironta- ja sivusirontakanaville. Leimattun *E. coli*n rajaus tehtiin pistekuvaajan FITC-kanavalle.



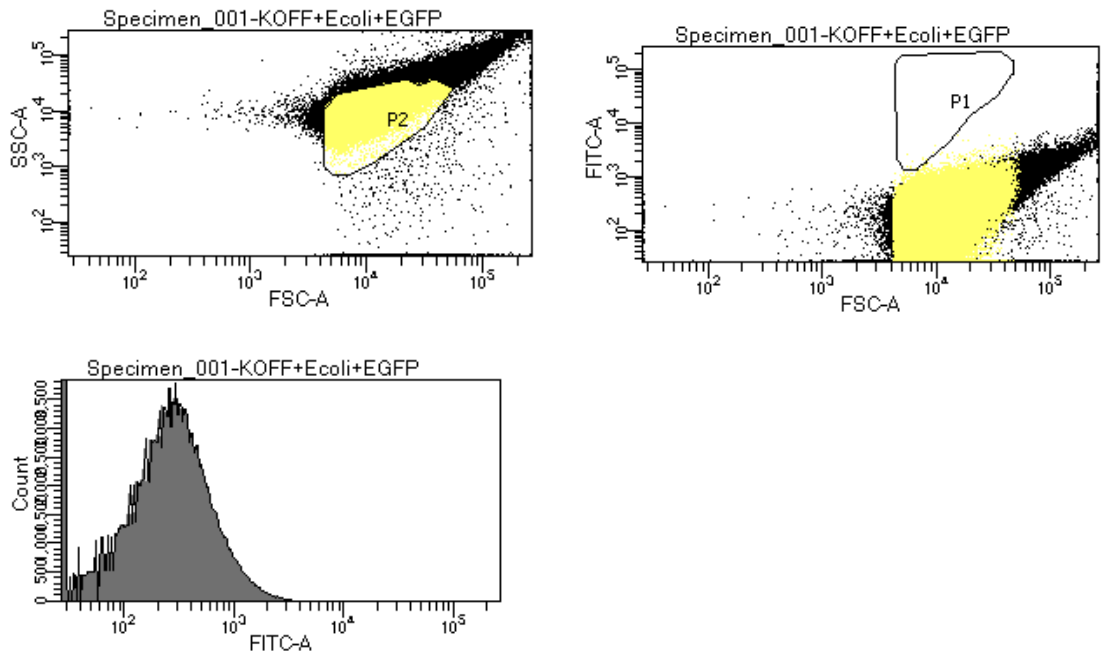
Kuvio 24. Peptoniveden leimattua *E. coli*a ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Molemmilla näytetilavuuksilla ongelmaksi tuli EGFP:n erottamattomuus. Suodattamattomista ja suodatetuista oluista valmistetuissa näytteissä EGFP:n vihreä fluoresoiva väri erottui joko erittäin heikosti tai se ei erottunut ollenkaan (ks. Kuvio 25–30). Syitä saattoivat olla säädetyt detektorien herkkyyasetukset sekä oluiden oma väri (ks. Kuvio 31 ja 32).



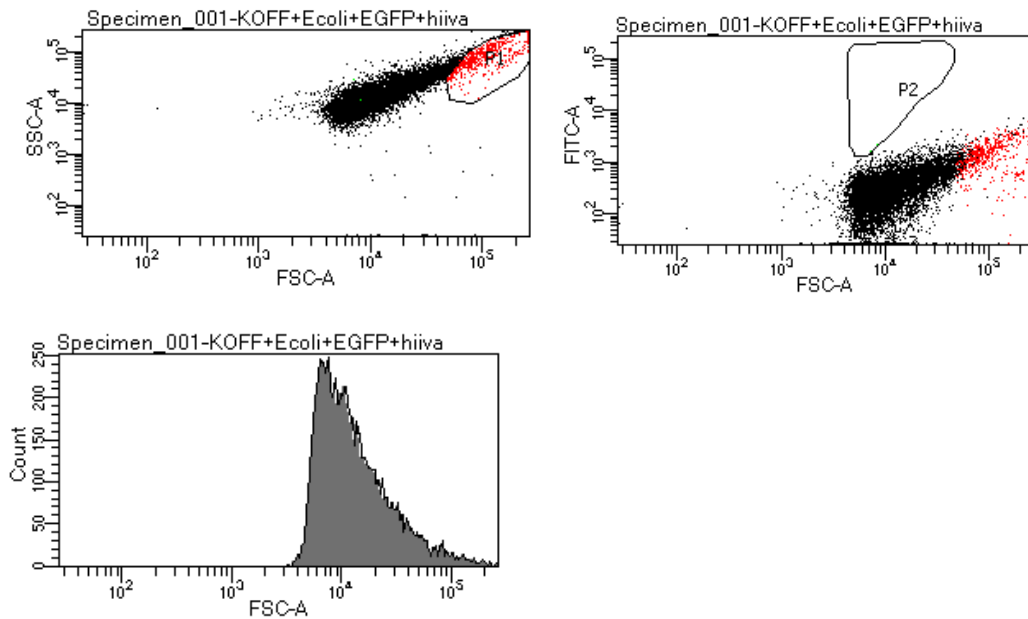
Kuvio 25. KOFF-oluen leimaamatonta *E. colia* sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

KOFF-näytteissä keltaiseksi ja Hope IPA-näytteissä oranssiksi rajattu alue oli oluen omaa väriä. Rajaukset tehtiin EGFP:llä leimattua *E. colia* sisältävän peptonivesinäytteen mukaan. FITC-kanavalla havaittiin, ettei EGFP erottunut oluen oman autofluoresenssin joukosta.

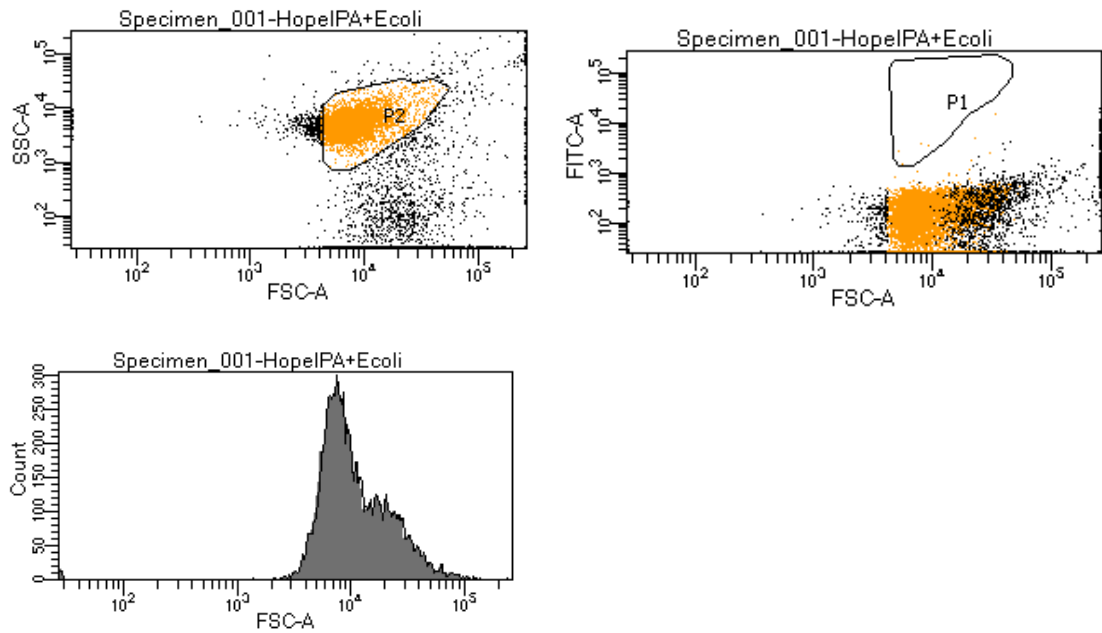


Kuvio 26. KOFF-oluen leimattua *E. coli* sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Suodatetusta KOFF-oluesta oletettiin havaittavaksi sekä hiivasolu- että bakterisolupopulaatiot. Vain hiivasolupopulaatiot havaittiin oluiden joukosta.

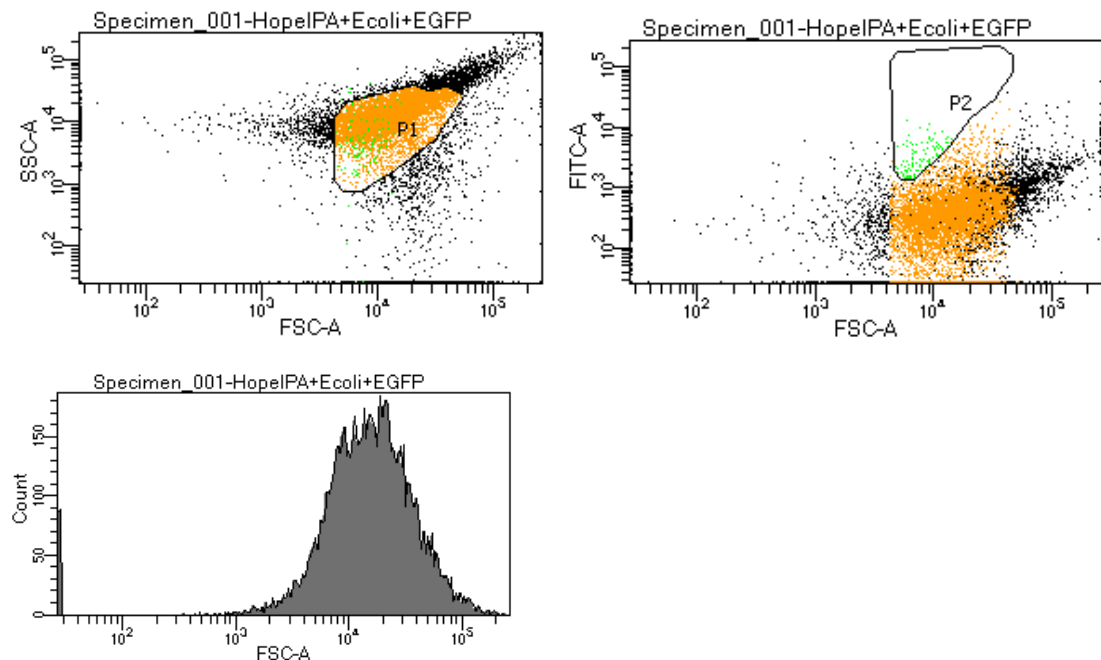


Kuvio 27. KOFF-oluen leimattua *E. coli* ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

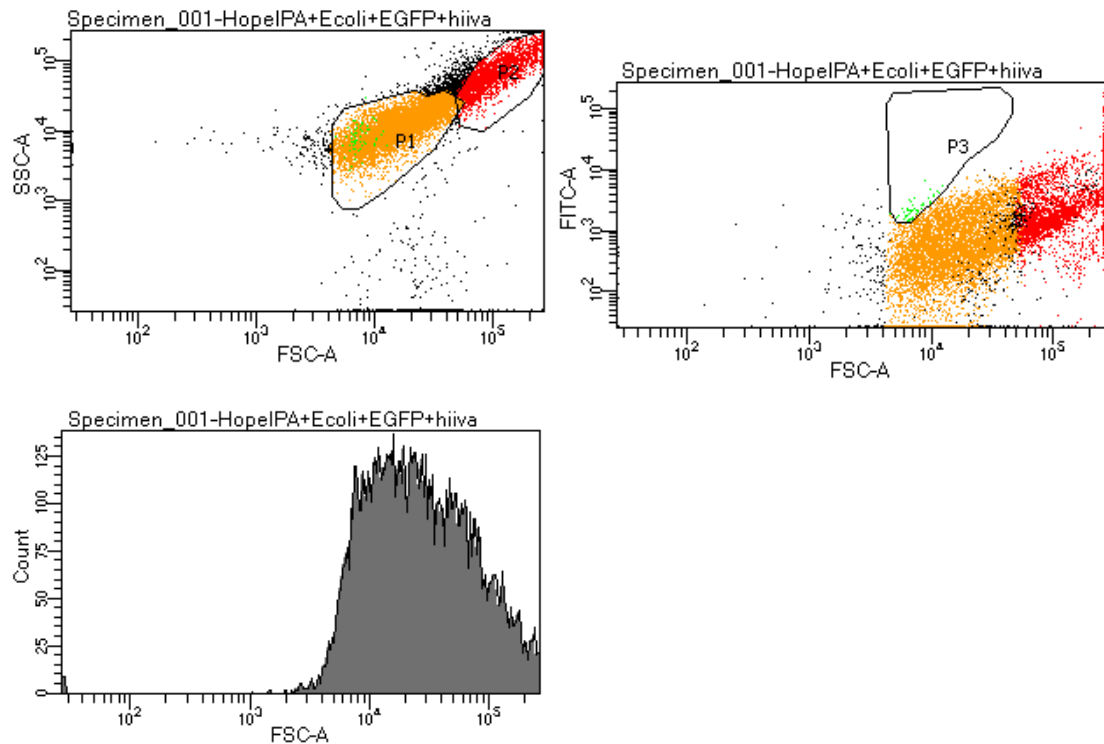


Kuvio 28. Hope IPA:n leimaamatonta *E. colia* sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Hope IPA:n joukosta erottui yksittäisiä bakteerisoluja (ks. Kuviot 29 ja 30).



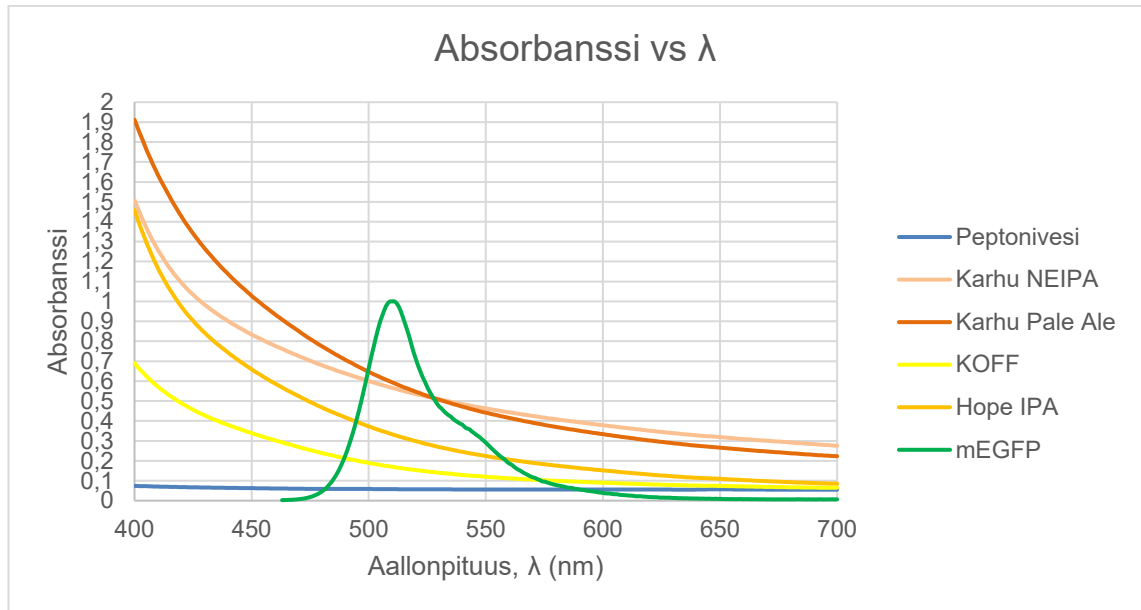
Kuvio 29. Hope IPA:n leimattua *E. colia* sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.



Kuvio 30. Hope IPA:n leimattua *E. coli*a ja panimohiivasuspensiota sisältävän näytteen pistekuvaaja ja histogrammi.

Sama ongelma esiintyi myös suodatetussa KOFF-olussa sekä suodattamattomassa Hope IPA -olussa; oluen värin joukosta ei saatu parametreja vaihtelemallakaan näkyviin EGFP:n vihreänä fluoresoivaa väriä. Hiivasolupopulaatiot erottuivat näytteissä tavanomaiseen tapaansa, vaikka hiivasoluja ei oltu värjätty millään leima-aineella.

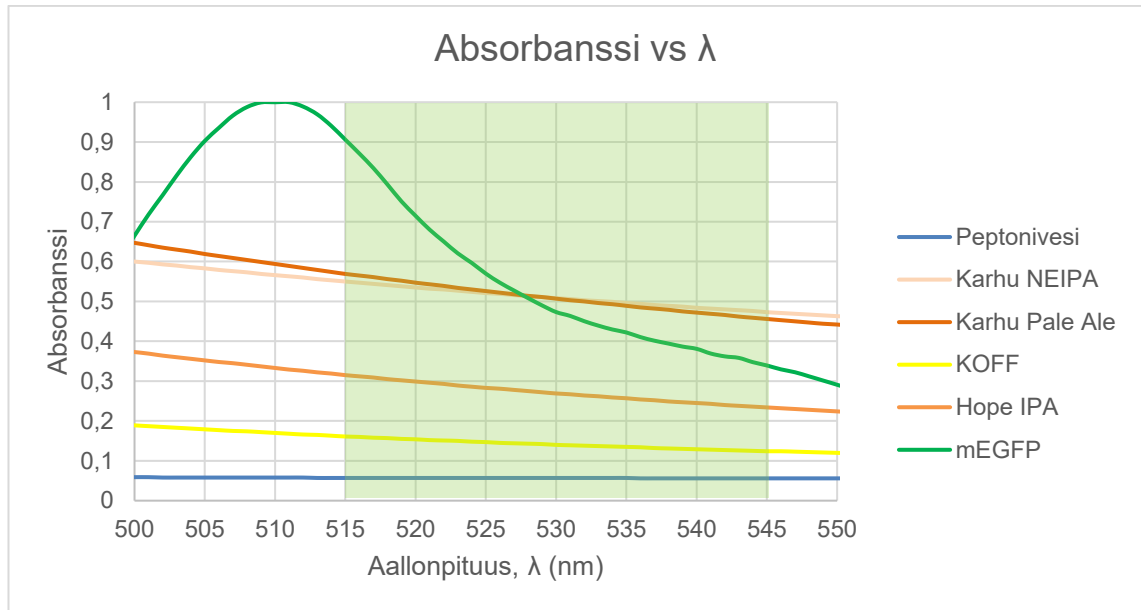
Peptonivesi ja kaikki neljä olutta ajettiin spektrofotometrillä, aallonpituusvälillä 400–700 nm (Kuvio 30). Spektrofotometri mittasi jokaisen näytteen absorbanssin 1 nanometrin välein. Kuvioihin 31 ja 32 on myös merkitty fluoresoivan mEGFP-leima-aineen emissiosuora.



Kuvio 31. Peptonivesi- ja olutnäytteiden absorbanssi eri aallonpituuksilla.

Kuvion 30 mukaan voitiin havaita, että osa fluoresoivan merkkiaineen lähettämästä valosignaalista absorboituu eli imeytyy oluen värin joukkoon. Tämä saattoi olla syynä olutnäytteiden pistekuvaajissa sekä histogrammeissa näkyvään heikkoon EGFP-signaaliin.

Kuvioon 32 rajattiin FITC-kanavan mukaan erottuva vihreän värin alue aallonpituusvälille 515–545 nm. Kuviossa 32 sinisellä värillä esitetty peptoniveden absorbanssikuvaaja oli ainoa näyteliuos, joka ei peittänyt EGFP:n lähettämää vihreää valoa yhdelläkään testatulla aallonpituudella.



Kuvio 32. FITC-kanavan mukaisesti tarkennettu kuvaaja.

FITC-kanavalla pitäisi erottua kaikki vihreän valon aallonpituusalueella vihreää valoa lähettävät merkkiaineet. Tarkennetussa kuviossa havaittiin, ettei kaikki EGFP:n lähettämä vihreä valo erottunut oluen värin joukosta. Eri olutnäytteiden väri ja sameus peittivät EGFP:n lähettämän valon joko lähes kokonaan tai kokonaan. Vastaavaa ongelmaa ei havaittu peptonivesinäytteistä.

Taustattomista peptonivesinäytteistä leimattu *E. coli* erottui selkeästi omana bakteerisolupopulaationaan sekä pistekuvaajissa että histogrammeissa.

6.4 Ajoparametrit

Tavoitteena oli kehittää yksi tai kaksi toimivaa menetelmää, joilla saataisiin nopeasti ja luotettavasti tuotettua laadunvalvontadataa suodattamattoman oluen senhetkisestä laadusta. Ajoparametreja säädettiin olutnäytteiden ja niistä luotujen kuvaajien perusteella. Kaikki numeraalisessa muodossa ilmoitetut volttilukemat olivat Voltteja, V.

Ajoparametreja pyrittiin säätämään saatujen ajotulosten tapahtumien (eng. *event*; *evt*) määrällä. Yksittäinen tapahtuma on virtaussytometrilaitteistolla havaittu solu tai pienhiukkanen. CST-ajo-ohjelma lähti oletuksesta, että 10000

tapahtumaa haluttiin nähtäväksi pistekuvaajalla ja 15000 tapahtumaa mitattavaksi. Ilman lisättyjä leima-aineita yli 10000 tapahtumaa mitattiin usein jo muutaman sekunnin ajon jälkeen. Kyse oli suodattamattomista olutnäytteistä eli yli 10000 tapahtumaa sekunnissa oli voinut johtua oluen värin ja sameuden luomasta ”taustasta”, josta halutut bakteerit ja hiivat eivät erottuneet.

Ajoparametreina kokeiltiin taulukoiden 5 ja 6 näyteajojen osalta yhteensä 10000 tapahtuman näyttämistä pistekuvaajalla ja 50000 tapahtuman mittaamista.

Suuremmat tapahtumamäärät eli esimerkiksi 100000 tapahtuman näyttäminen ja mittaaminen saivat nopeasti virtaussytometrin ilmoittamaan liiallisen mittadatan määrästä, jota laitteisto ei kyennyt käsittelemään (eng. *data overflow*). Virtaussytometrijot asetettiin loppumaan automaattisesti 10000 pistekuvaajatapahtuman jälkeen.

Ajoparametrejä säädeltiin näyteajojen aikana volttilukemien avulla.

Volttilukemien avulla säädeltiin detektorien herkkyksiä. Mitä suurempi volttilukema, sitä herkempi detektori on kyseisellä kanavalla havaittaville solupopulaatioille. Mitä pienempi volttilukema, sitä vähemmän oli herkkyyttä detektoreissa.

Taulukon 9 mukaisesti ajoparametrejä säädettiin muuttamalla volttilukemia sen mukaan, miten näytteet sijoituivat pistekuvaajalle ja histogrammille. Haasteeksi tuli se, ettei tietyllä volttilukemalla saatu näkymään kahta eri solupopulaatiota samalla pistekuvaajalla.

Taulukko 9. Ajoparametrien säätäminen volttilukeman mukaan.

Näyte sisältää	Säädettävä ajoparametri	Volttilukema (V)
Peptonivesi- hiivasuspensio	FSC	200
	SSC	200
	FITC	100
<i>E. coli</i> (ilman fluoresoivaa leimaa)	FSC	700
	SSC	500
	FITC	100
<i>E. coli</i> + EGFP	FSC	700
	SSC	500
	FITC	500
<i>E. coli</i> + EGFP + peptonivesi- hiivasuspensio	FSC	700
	SSC	500
	FITC	500

Volttilukemia säätelemällä pyrittiin saamaan sekä bakteeri- että hiivasolupopulaatiot näkymään samassa kuvaajassa ja samoilla volttilukemilla. Samoja volttilukemia käyttämällä pistekuvaajista ja histogrammeista saatiin vertailukelpoisia.

Hiiva- ja bakteerisolupopulaatiot saatiin näkyviin samanaikaisesti pistekuvaajilla ja histogrammeilla säätämällä ajoparametrit taulukon 10 mukaisesti.

Taulukko 10. Yhtenäiset ajoparametrien volttilukemat.

Näyte sisältää	Ajoparametri	Volttilukema (V)
Hiiva- ja/tai bakteerisuspensio	FSC	400
	SSC	400
	FITC	500

Yllä mainituilla ajoparametreilla hiivasolupopulaatiot saatiin näkyviin. Ongelmiksi jäivät edelleen leimaton *E. coli*, jota ei havaittu peptonivesinäytteistä eikä olutnäytteistä sekä EGFP:llä leimattu *E. coli*, jota ei havaittu olutnäytteistä. Lähes kaikista ajetuista virtaussytometrinäytteistä hiivasolupopulaatiot saatiin näkyviin.

7 Tulokset

Virtaussytometrille saatiin kehitettyä hiivasuspensiomenetelmä, jolla saadaan hiivasolupopulaatiot näkymään pistekuvaajalla ja histogrammissa.

Hiivasolupopulaatiot saatiin näkymään sekä referenssinäytteinä käytetyissä peptonivesinäytteissä että olutnäytteissä. Bakterisuspensiomenetelmää ei saatu toimimaan oluen kanssa. Peptonivesinäytteissä EGFP:llä leimattu *E. coli* erottui selkeästi omana solupopulaationaan suorasisironta-, sivusironta- ja FITC-kanavilla. Oluen joukosta bakterisuspensio ei erottunut. Syynä saattoivat olla oluen väri ja sameus, jotka absorboivat EGFP:n emittoiman valon itseensä.

Haluttu tavoite saavutettiin: hiivasolususpensiomenetelmä saatiin kehitettyä onnistuneesti oluen mikrobiologista laadunvalvontaa varten. Vastaavasti bakterisolususpension kohdalla samaa tavoitetta ei saavutettu.

8 Loppupäätelmät

8.1 Yhteenveto

Turun ammattikorkeakoululla ei ollut oluen mikrobiologiselle laadunvalvonnalle virtaussytometrinen menetelmä olemassa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää yksi tai kaksi virtaussytometrinen menetelmä, joilla saataisiin halutut pilaajamikrobit näkyviin pistekuvaajissa ja histogrammeissa.

Kupittaa Campus Breweryn panimoprosessin eri vaiheet ovat maltaiden rouhinta, mäsäys, olutvierteen keitto, jäähdytys, käyminen, pakkaus ja varastointi. Panimoprosessin pakkausvaiheessa otettaisiin tarvittavat näytteet. Virtaussytometrin olutnäytteinä käytettiin Karhun kaupallisia New England IPA – ja Pale Ale – oluita.

Pilaajamikrobeista alun perin bakteerisolu-, hiivasolu- ja proteiinipopulaatioita haluttiin havaita tutkittavista olutnäytteistä. Tarkemmin tutkittaviksi pilaajamikrobeiksi valittiin maitohappo- ja etikkahappobakteerit sekä villihiivat.

Oluen tuotannon mikrobiologisen laadunvalvonnan perinteisiä menetelmiä ovat ATP, Hygicult, maljakasvatusmenetelmät ja PCR. Mainitut laadunvalvontamenetelmät ovat pintahygieniatestejä, joiden ongelmana on niiden yleisluontoisuus. Tietyt mikrobilajit voivat täten jäädä joko huomaamatta tai peittyvät muiden mikrobilajien sekaan. ATP-testi mittaa kaiken samalla pinnalla esiintyvän adenosinitrifosfaatin, eikä siitä selviä ATP:n alkuperäistä lähdettä tai lähteitä. Hygicult-testikiteillä voidaan vastaavasti mitata, kasvaako testatulla pinnalla bakteeri-, hiiva- tai homepesäkkeitä.

Maljakasvatusmenetelmillä voidaan kasvattaa mikrobipesäkkeitä halutulla kasvatusliemellä. Hygicult- ja maljakasvatusmenetelmien haasteena on niiden spesifit lämpötila- ja aikavaatimukset; esimerkiksi Hygicult TPC -testikitti tarvitsee +27°C...+30°C:n lämpötilan noin kahden vuorokauden ajan. PCR:n haasteena on mahdollinen häiriötausta, josta ei eroteta tutkittavia näytteitä.

PCR:n häiriötaustan pienentämiseksi halutun mittauslaitteen herkkyyttä täytyy säätää pieneksi, jolloin haluttuja näytteitä ei välttämättä havaita.

Virtaussytometri on laite, jolla voidaan tutkia nestemäisiä näytteitä. Nestemäiset näyteliuokset kulkevat pienhiukkanen kerrallaan lasersäteiden läpi, jonka jälkeen detektorit havaitsevat tutkittavat pienhiukkaset erivärisillä kanavilla ja muodostavat pistekuvaajat sekä histogrammit FACSDiva-ohjelmistolla. Virtaussytometrillä voidaan havaita samanaikaisesti eri mikrobeja omina solupopulaatioinaan ja rajata näytteistä halutut mikrobit omiksi alueikseen havaitusta näytteestä.

Virtaussytometrille kehitettiin hiiva- ja bakteerisuspensiomenetelmät, joille kirjoitettiin myös omat pikatyöohjeet liitesivuille. Ajoparametrejä pyrittiin säätämään muuttamalla eri kanavien volttilukemia. Volttilukemia säätämällä saatiin säädelyä kanavien herkkyyttä: mitä suurempi volttilukema, sitä herkemmin tietyllä kanavalla näkyi solupopulaatiot pistekuvaajilla ja histogrammeilla.

Opinnäytetyö tuotti yllättävän tuloksen: peptonivesi-panimohiivasuspensio saatiin näkymään lähes kaikissa näytteissä, mahdollisesta taustasta riippumatta. Vastaavasti bakteerisuspensio ei erottunut olutnäytteistä. Peptonivesi-panimohiivasuspensiomenetelmä saatiin kehitettyä virtaussytometrille. Bakteerisuspensiomenetelmää ei saatu onnistuneesti kehitettyä. Jatkossa hiiva- ja bakteerisuspensiomenetelmiä voidaan kehittää pidemmälle ja tarkemmiksi.

8.2 Virhelähteet

Olutvierteeseen sekä käymisvaiheen läpikäyneeseen olueen saattoi jäädä suodattamatonta proteiinimassaa, joka aiheutti oluen värin sameutta sekä proteiinimassan saostumista esimerkiksi käymistankin pohjalle.

MilliQ- ja peptonivesinäytteistä ei erottunut taustaa, vaan itse tutkittavat mikrobit. Vastaavasti leimatonta *E. colia* sisältävistä olutnäytteistä bakteerisolu-

populaatioita ei saatu näkyviin ilman leima-ainetta. Ilman fluoresoivaa leima-ainetta halutut pilaajabakteerit hukkuivat taustaan. Oluen väri ja sameus saattoivat yhdessä peittää tutkittavia pilaajamikrobeja.

FITC-kanavalla peptonivesi-hiivasuspensio- ja leima-aineettomista *E. coli* -näytteistä havaittiin autofluoresenssia eli solupopulaatiot havaittiin vihreän valon kanavalla, vaikkei kumpiinkaan kyseisiin näytetyyppeihin oltu lisätty mitään fluoresoivaa merkkiainetta. Autofluoresenssi saattoi johtua FITC-kanavan volttilukemasta, joka oletusasetuksilla on noin 700 ja säätöjen jälkeen 500.

Haasteeksi Flowing Softwaren käytössä osoittautui se, ettei ajokuvaajia voinut rajata reaaliaikaisesti, toisin kuin FACSDiva-ohjelmistolla.

Virtaussytometrinäytteitä ajettaessa mahdollisten solupopulaatioalueiden rajaus oli huomattavasti helpompaa reaaliaikaisesti suoritettuna kuin jälkikäteen suoritettuna. Jälkikäteen oli hankala havainnoida, mikä oli havaittua solupopulaatiota ja mikä mahdollista näytteestä johtuvaa taustaa.

Kolme suodattamatonta olutta ja yksi suodatettu olut tuottivat tuloksena sen, ettei leimattu bakteerisolususpensio erottunut oluen värin ja sameuden vuoksi pistekuvaajilla ja histogrammeilla.

8.3 Pohdinta

Virtaussytometrille ei saatu kehitettyä menetelmää, jolla saataisiin sekä bakteerisolut että hiivasolut samanaikaisesti näkyviin joka kerta. Menetelmän kehitystä voidaan jatkaa tulevaisuudessa esimerkiksi joko opinnäytetyönä tai projektikurssin aiheena.

Suodatetusta, kaupallisesta oluesta luultavasti löytyy vähemmän pilaajamikrobeja kuin suodattamattomasta oluesta. Suodatetussa oluessa on oletuksella vähemmän häiriötä aiheuttavaa taustaa kuin suodattamattomassa oluessa. Virtaussytometrilaitteiston lisäksi haluttuja mikrobeja voidaan yrittää tutkia esimerkiksi UV-spektrofotometrin, HPLC-laitteiston tai Hidex:n avulla ja vertailla saatuja tuloksia keskenään.

Virtaussytometrilaitteiston käyttöä voitaisiin tulevaisuudessa ehdottaa esimerkiksi joko yksilöopinnäytetyöksi tai ryhmätyöksi projektikursseille. Käyttötarkoituksesta riippumatta virtaussytometrilaitteiston käyttö tulisi opettaa mahdollisimman monelle halukkaalle opiskelijalle esimerkiksi projektikurssin yhteydessä, jolloin vältyttäisiin käyttötauoilta. Virtaussytometrin pitkät, esimerkiksi useamman viikon tai kuukauden, käyttötauot tarkoittavat aina sitä, että ennen käyttöä laitteella tulisi ajaa Long Clean -syväpuhdistusohjelma sekä asettaa Baseline halutulla CS&T Beads -liuoksella että ajaa viritysliuos hyväksytysti. Ilman käyttötauoja virtaussytometrille täytyy suorittaa vain viritysliuoksen hyväksytyt ajo jokaisella käyttökerralla. Tällöin vältytään suurilta kaupallisten BD Biosciencen puhdistusaineiden käytöltä sekä mahdollisen lian kertymiseltä virtaussytometrilaitteiston putkistoon.

Lähteet

3M Health Care, 2015. 3M™ Clean-Trace™ NGi Luminometer and Docking Station. Viitattu 13.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://multimedia.3m.com/mws/media/919873O/3mclean-trace-ngi-luminometer-and-docking-station-user-manual.pdf>

Aidian Oy, 2021. Hygicult® TPC-käyttöohje. Viitattu 19.9.2022. Noudettu osoitteesta https://www.aidian.eu/uploads/COM-Documents-and-materials/Hygicult/IFUs/132252-34_Hygicult_TPC_web.pdf

Aidian Oy, 2021. Hygicult® Y&F (Easicult M) -käyttöohje. Viitattu 19.9.2022. Noudettu osoitteesta https://www.aidian.eu/uploads/COM-Documents-and-materials/Hygicult/IFUs/132253-27_HygicultYF_easicultM_web.pdf

Badrudin, M., 2019. Microbiology applied to a microbrewery: from yeast management to quality control. Viitattu 1.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/1689244997260350/artigo%20mb.pdf>

BD Biosciences, 2002. Evaluation of Yeast Viability and Concentration during Wine Fermentation Using Flow Cytometry. Viitattu 28.11.2022. Noudettu osoitteesta https://www.bdj.co.jp/flow-reagent/articles/hkdqj200000hsnkc-att/ApNote_23-6289-01.pdf

BD Biosciences, 2002. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Viitattu 16.11.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>

BD Biosciences, 2013. BD™ Cytometer Setup and Tracking Application Guide. Viitattu 19.9.2022. Noudettu osoitteesta https://content.ilabsolutions.com/wp-content/uploads/2015/08/CS_T-Application-Guide.pdf

BD Sciences, 2006. BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual. Viitattu 27.8.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.marshallscientific.com//v/vspfiles/files/manuals/CantoManual.pdf>

Enari, T.-M. & Mäkinen, V., 2014. *Panimotekniikka*. 3. uusittu ja laajennettu painos. toim. Espoo: Oy Panimolaboratorio-Bryggerilaboratorium Ab.

FPbase, 2020. Glossary of Terms. Viitattu 29.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://help.fpbases.org/glossary>

HACH Company, 2008. PORTABLE TURBIDIMETER Model 2100P Instrument and Procedure Manual. Viitattu 1.11.2022. Noudettu osoitteesta https://messi.turkuamk.fi/tyotilat/389/2/laitteet/Valmiit_ohjeet/Sameusmittari_HACH2100P_manual.pdf

Ilagan, R. ym., 2010. A new bright green-emitting fluorescent protein: Engineered monomeric and dimeric forms. Viitattu 12.11.2022. Noudettu osoitteesta <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2010.07618.x>

Invitrogen Ltd., 2007. Bacteria Counting Kit. Viitattu 29.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2Fmp07277.pdf>

Lappo.fi, 2022. Humala - mitä sen ominaisuudet oikeastaan ovat. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://lappo.fi/ohjeet/humala-mita-sen-ominaisuudet-oikeastaan-ovat/>

Lappo.fi, 2022. Kalsium, kloridi, sulfaatti, oh my. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://lappo.fi/ohjeet/vesi-neljas-elementti/>

Lappo.fi, 2022. Kirkastusaine Irish Moss 100 g. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://lappo.fi/tuote/kirkastusaine-irish-moss-100-g/>

Lappo.fi, 2022. Kuivattu oluthiiva SafAle US-05 11.5 g. Viitattu 1.11.2022. Noudettu osoitteesta <https://lappo.fi/tuote/kuivattu-oluthiiva-safale-us-05-11-5-g/>

Lappo.fi, 2022. Oluen valmistus täysmäskäämällä. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://lappo.fi/ohjeet/oluen-valmistus-taysmaskaamalla/>

Liu, J. ym., 2018. Discovery and control of culturable and viable but non-culturable cells of a distinctive *Lactobacillus harbinensis* strain from spoiled beer. Viitattu 1.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28949-y>

Merck KGaA, 2018. 22091 Tryptic Soy Agar. Viitattu 29.9.2022. Noudettu osoitteesta

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/122/065/22091dat.pdf>

Merck Life Science Oy, 2021. Plate Count Agar (70152) - käyttöturvallisuustiedote. Viitattu 19.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.sigmaaldrich.com/FI/fi/sds/sial/70152>

Merck Life Science Oy, 2021. Tryptic Soy Agar (22091) - käyttöturvallisuustiedote. Viitattu 19.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.sigmaaldrich.com/FI/fi/sds/sial/22091>

Nautiskelija.fi, 2022. Alkoholikäyminen. Viitattu 9.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.nautiskelija.fi/Sana.aspx?id=106>

Noonan, G., 2014. Understanding Malt Analysis Sheets. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.probrewer.com/library/malt/understanding-malt-analysis-sheets/>

Obi, C. N., 2018. Brewery Contaminants, Challenges and Remedies - A Review. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta https://www.researchgate.net/publication/328031318_Brewery_Contaminants_Challenges_and_Remedies-A_Review

Paradh, A. D., 2015. Gram-negative spoilage bacteria in brewing. *Brewing Microbiology*. A. Hill, toim. Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 175 - 182.

Pärssinen, R., Suominen, I. & Haajanen, K., 2012. DNA:n monistaminen polymeraasiketjureaktiolla (PCR). *Biogeeni*. Turku: Juvenes Print - Suomen Yliopistopaino Oy, pp. 179–183.

Ruokavirasto, 2018. Hyödylliset mikrobit. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/hyodylliset-mikrobit/>

Ruokavirasto, 2019. Yleistä mikrobeista. Viitattu 27.8.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/>

Sinebrychoff, 2022. Oluen valmistus Sinebrychoffilla. Viitattu 3.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.sinebrychoff.fi/olut/oluen-valmistus-sinebrychoffilla/>

Sinebrychoff, 2022. Pieni olutsanasto. Viitattu 21.10.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.sinebrychoff.fi/olut/pieni-olutsanasto/>

Smith, A. C. & Hussey, M. A., 2005. American Society for Microbiology. Viitattu 19.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>

Smith, B., 2020. Enzymes in the Mash and Mash Temperatures for Beer Brewing. Viitattu 5.10.2022. Noudettu osoitteesta <https://beersmith.com/blog/2020/03/17/enzymes-in-the-mash-and-mash-temperatures-for-beer-brewing/>

Solunetti, 2006. Laboratoriovesi. Viitattu 12.11.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/laboratoriovesi/>

Solunetti, 2006. Proteiinit. Viitattu 22.12.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valkuaisaineet/2/>

Suzuki, K., 2015. Gram-positive spoilage bacteria in brewing. *Brewing Microbiology*. A. Hill, toim. Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 141 - 173.

Thermo Scientific Fisher, 2005. LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit, for flow cytometry. Viitattu 29.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp34952.pdf>

Thermo Scientific Fisher, 2022. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (L34856). Viitattu 29.9.2022. Noudettu osoitteesta <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L34856>

Turku Bioscience, 2018. Flowing Software. Viitattu 21.10.2022. Noudettu osoitteesta <https://bioscience.fi/services/cell-imaging/flowing-software/>

Turku Bioscience, 2018. Turku Bioscience Centre. Viitattu 21.10.2022. Noudettu osoitteesta <https://bioscience.fi/about-us/>

Hiivasuspensiomenetelmän pikatyöohje

Laske oluen käymisvaiheessa käytetyn panimohiivan teoreettinen tiheys olutvierteeseen käymisvaiheessa lisätyn panimohiivan massan ja olutvierteen osamääränä:

$$\rho \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{m(g)}{V(mL)} = \underline{\hspace{2cm}}$$

Laske panimohiivan teoreettinen punnittava massa panimohiivan tiheyden ja käytettävän mittapullon tilavuuden tulona:

$$m(g) = \rho \left(\frac{g}{mL} \right) \cdot V(mL) = \underline{\hspace{2cm}}$$

Punnitse panimohiivaa noin teoreettisen määrän verran analyysivaa'alla muoviselle punnitusalustalle. Punnittu massa = (g)

Siirrä punnittu määrä panimohiivaa kvantitatiivisesti mittapulloon ja huuhtelee peptonivedellä. Tarvittaessa lämmitä peptonivesi-panimohiivasuspensiota lämpimän vesihanan alla.

Täytä mittapullo peptonivedellä merkkiin asti ja sekoita hyvin. Täytä sameusmittarikyvetti peptonivesi-panimohiivasuspensiolla. Mittaa hiivasuspension sameus sameusmittarilla ja käytä referenssinä laboratoriovetä. Ilmoita sameus yksikössä NTU ja kirjaa sameusmittarin tarkka lukema ylös.

Näyte	(pvm.)	(pvm.)	(pvm.)
Lab. vesi (REF)	NTU	NTU	NTU
Hiivasuspensio	NTU	NTU	NTU

Kirjaa pystysarakkeiden ensimmäiseen soluun mittauspäivämäärä.

Pipetoi Pasteur-pipetillä haluttu määrä hiivasuspensiota virtausytometri-näytteisiin ja aja näytteet virtausytometrillä. Muista valmistaa peptonivesi-panimohiivasuspensio aina uudelleen sitä tarvittaessa, ellei opettaja ole muuta ohjeistanut. Peptonivesi-panimohiivasuspensio hävitetään viemäriin runsaan vesimäärän kera.

Tarvittavat laitteet, välineet ja reagenssit:

- Analyysivaaka
- Automaattipipetti ja automaattipipetin kärkiä
- Dekanterilaseja
- Laminaarikaappi
- 25 mL:n mittapullo ja korkki
- 5 mL:n korkillisia Falcon-putkia näytteille ja koeputkiteline
- Panimohiiva
- Pasteur-pipettejä
- Peptonivesi
- Virtaussytometri
- Vortex-sekoitin

Bakteerisuspensiomenetelmän pikatyöohje

Bakteerisuspensio valmistetaan 5 mL:n korkilliseen Falcon-putkessa peptoniveteen. Pipetoi 3 mL:aa automaattipipetillä peptonivettä. Siirrosta muovisella 1 µL:n siirrostussilmukalla joko leima-ainetta sisältävää tai leima-aineetonta *E. coli* -kanta peptoniveden joukkoon. Heitä käytetty siirrostussilmukka autoklaavauspussiin. Sulje Falcon-putki korkilla ja sekoita Vortex-koeputkisekoittimella noin 10–20 sekuntia.

Pipetoi joko Pasteur-pipetillä tai automaattipipetillä haluamasi määrä bakteerisuspensiota näyteliuoksen joukkoon ja sekoita näyteliuos koeputkisekoittimella. Käytä korkillisia 5 mL:n Falcon-putkia näyteliuosten valmistukseen ja ajamiseen virtaussytometrilla. Näyteliuoksia voidaan valmistaa myös esimerkiksi mittapulloihin, jolloin sopiva määrä täytyy siirtää Falcon-putkeen käyttämällä dekantterilasia ja automaattipipettiä.

Kaikki työn aikana *E. colin* käsittelyyn käytetyt kertakäyttökäsineet, koeputket, dekantterilasit, Pasteur-pipetit, automaattipipetinkärjet, yms. astiat, välineet ja *E. colia* sisältävät liuokset autoklaavataan työkerran päätteeksi tai laitetaan erilliseen autoklaavijätteille Lean 5S -järjestelmän mukaisesti rajatulle alueelle vetokaappiin. Autoklaavauksen jälkeen *E. colin* käsittelyyn käytetyt kertakäyttökäsineet ja -välineet voidaan hävittää jätteiden mukana, henkilökunnan ohjeistusten mukaisesti. Vastaavasti *E. colia* sisältävät autoklaavatut liuokset voidaan kaataa viemäriin runsaan vesimäärän kera.

Tarvittavat laitteet, välineet ja reagenssit:

- Autoklaavi
- Automaattipipetti ja automaattipipetin kärkiä
- Dekanterilaseja
- *E. colin* leimattu ja leimaamaton kanta → Kysy henkilökunnalta!
- Laminaarikaappi
- 25 mL:n mittapullo ja korkki
- 5 mL:n korkillisia Falcon-putkia näytteille ja koeputkiteline
- Pasteur-pipettejä
- Peptonivesi
- Siirrostussilmukoita
- Virtaussytometri
- Vortex-sekoitin

Työssä käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit

Laitteet

Analyysivaaka, Mettler Toledo, PB303 DeltaRange, TURKU AMK BIO 1283B,
Max. 310 g, Min. 0.02 g, e = 10 mg, d = 10 mg/1 mg

Autoklaavi, Systec, VX-65, BIO2057

Laminaarikaappi, KOJAIR, 5/A125

Spektrofotometri, Shimadzu, UV SPECTROPHOTOMETER UV-1800, TURKU
AMK BIO 2035, SERIAL NO. A114547, SHIMADZU CORP. 33892

Virtaussytometri, FACS Canto II, KEM2244

Välineet

1000 mL:n tummennettuja, korkillisia säilöpulloja

500 mL:n kirkas säilöpullo ja korkki

500 ja 25 mL:n mittapullo ja korkki

50–100 mL:n dekantterilaseja

50 ja 5 mL:n korkillisia Falcon-putkia näytteille ja koeputkiteline

Automaattipipetti, Biohit, 500–5000 µL, 110–5

Automaattipipetti, Biohit, 100–1000 µL, 110–6

Kyvettejä, VWR Cuvettes PS semi-micro, VWR, Batch No.: 0000004931

Pasteur-pipettejä

Siirrostussilmukka, VWR, LOORS 1 UL SOFT, EXP. 2021/02, L. 1724134,
BATCH 055C09, STERILE, R, IVD

Vortex-sekoitin, ELMI, Sky Line, TURKU AMK BIO 2142

Reagenssit

BD FACSDiva CS&T Research Beads, BD Biosciences, Bead Lot: 91-0850-31881, REF: 655050, Lot: 212257, Exp: 2024-03-31

E. coli + mEGFP w/o TEV, T7 Express, Empty 13.25 g

Kasvatusmalja, XL-1 *E. coli*, 27.10.2022

Olutnäytteet

Hope IPA, Kupittaa Campus Brewery, TURKU AMK, Alcohol 6,61%, Best before: 140423

Karhu New England IPA, Sinebrychoff, Kerava, Finland, Alc. 4.8% Vol., Lot: E2210205:15, BBE: 29.07.2023

Karhu Pale Ale, Sinebrychoff, Kerava, Finland, Alc. 5.0% Vol., Lot: E2148201:22, BBE: 28.05.2023

KOFF, Sinebrychoff, Kerava, Finland, 4.6%, Lot: E2265220:07, BBE: 22.09.2023

Panimohiiva, SafAle-05, Active dry yeast, Fermentis, PROD 02/2021, BBE 02/2024, Lot: AB H5 2100070 KB

PBS, Phosphate Buffered Solution, SIGMA-ALDRICH, Lot#RNBG7539, pH 7.4, liquid, sterilefiltered, suitable for cell culture, 806552 – 500 ML

Peptonivesi

Natriumkloridi, Sodium Chloride, VWR, 11/21, Lot: 21E054106, MW: 58,44, Use by: 25-Dec-02

Peptoni, Peptone special, Fluka Analytical, 4/14, Exp: DEC/18, Lot: BCBM4768V, SIGMA-ALDRICH, 68971-500G-F

MilliQ-vesi

T7 Express *E. coli* incl. pET32b(+)+mEGFP w/o TEV, 25/11/2021