



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Susanna Närvä

Kahden eri säilöntäaineen vertailu gluteenittomassa leivässä

Opinnäytetyö

Kevät 2023

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Susanna Närvä

Työn nimi: Kahden eri säilöntäaineen vertailu gluteenittomassa leivässä

Ohjaaja: Merja Kyntäjä

Vuosi: 2023

Sivumäärä: 39

Liitteiden lukumäärä: 3

Opinnäytetyön tavoitteena oli vertailla kemiallisen ja luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutusta gluteenittomassa leivässä esiintyvän homeen kasvuun. Työssä myös havainnointiin, aiheuttaako luonnonmukainen säilöntäaine muutoksia tuotteen aistittavaan laatuun. Lopuksi arvioitiin, voidaanko kemiallinen säilöntäaine korvata luonnonmukaisella vaihtoehdolla. Opinnäytetyön toimeksiantaja ja tutkittavat säilöntäaineet ovat salaisia.

Työn teoriaosuudessa käsitellään homeita ja niiden torjuntakeinoja leivässä. Työn käytännön osuudessa tutkitaan säilöntäaineiden vaikutusta homeen kasvuun kahdella eri menetelmällä: mikrobiologisella viljelyllä ja Bioscreen C -analysointilaitteella. Luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutusta gluteenittoman leivän aistittavaan laatuun arvioitiin toimeksiantajan työntekijöiden suorittamalla aistinvaraisella arvioinnilla.

Tutkimukset osoittivat, että happamuuden alentaminen tehosti merkittävästi kummankin säilöntäaineen vaikutusta ja heikensi tutkittavan homeen kasvua. Kumpikaan säilöntäaine ei kuitenkaan pystynyt merkittävästi estämään homekasvua neutraalimmassa, tavallisen hiivaleivän happamuudessa. Luonnonmukainen säilöntäaine kuitenkin osoittautui laboratoriotutkimuksissa ehkäisevän homekasvua jokseenkin paremmin kummallakin tutkittavalla happamuudella. Aistinvaraisessa arvioinnissa luonnonmukaisen säilöntäaineen ei havaittu aiheuttavan merkittäviä virheitä gluteenittoman leivän aistittavaan laatuun. Tutkimusten perusteella voidaan todeta, että kemiallinen säilöntäaine olisi mahdollista korvata luonnonmukaisemmalla vaihtoehdolla.

¹ Asiasanat: aistinvarainen arviointi, home, laatu, leipä, säilöntäaineet

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food Technology

Author/s: Susanna Närvä

Title of thesis: Comparison of two different preservatives in gluten-free bread

Supervisor(s): Merja Kyntäjä

Year: 2023

Number of pages: 36

Number of appendices: 7

The aim of the thesis was to compare the effect of chemical and natural preservatives on the growth of mold in gluten-free bread. The study also observed whether the natural preservative causes a change in the perceptible quality of the product. Finally, it was evaluated whether the chemical preservative can be replaced with an organic alternative.

The theory part of the study considers molds and their control methods in bread. The practical part examines the effect of preservatives on mold growth using two different methods: microbiological cultivation and the Bioscreen C analyzer. The effect of the natural preservative on the perceptible quality of gluten-free bread was evaluated by sensory evaluation performed by the client's employees.

The research showed that lowering the acidity enhanced the effect of both preservatives and weakened the growth of mold. Neither preservative was able to completely prevent the mold growth in the acidity of yeast bread. However, in the laboratory studies, the organic preservative appeared to be somewhat more effective in preventing mold growth in both acidities.

In the sensory evaluation, the organic preservative was not found to cause serious defects to the perceptible quality. Based on the research, it can be concluded that it would be possible to replace the chemical preservative with a more natural alternative.

¹ Keywords: sensory evaluation, mould, quality, bread, preservatives

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä	2
Thesis abstract	3
SISÄLTÖ	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo	6
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	7
1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET	8
2 HOMEET	9
2.1 Mykotoksiinit.....	9
2.2 Homelajit ja niiden tunnistaminen.....	10
2.3 Homeiden eristäminen ja viljely.....	12
3 HOMEIDEN TORJUNTA LEIVÄSSÄ.....	13
3.1 Tuotantoprosessi ja -tilat	13
3.2 Suojakaasupakkaaminen	14
3.3 Veden aktiivisuus	14
3.4 Happamuus.....	15
3.5 Säilöntäaineet.....	15
3.5.1 Kemiaallinen säilöntäaine	16
3.5.2 Luonnonmukainen säilöntäaine	17
4 AISTINVARAINEN ARVIOINTI JA MONIVERTAILUTESTI	18
5 TYÖN TOTEUTUS JA MENETELMÄT	20
5.1 Mikrobiologinen viljely	21
5.2 Bioscreen C -analysointori	22
5.3 Aistinvarainen arviointi	24
6 TULOKSET	26
6.1 Mikrobiologinen viljely	26
6.1.1 Homekasvun havaitsemiseen kulunut aika	26
6.1.2 Homepesäkkeiden määrä	28
6.1.3 Homepesäkkeiden ulkonäkö	31
6.2 Bioscreen C -analysointori	32

6.3 Aistinvarainen arviointi	34
7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	36
LÄHTEET	38
LIITTEET	40

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. Toimeksiantajan toimittama näyte.	20
Kuva 2. Bioscreen C -analysointilaitteisto.....	22
Kuva 3. Inkubointitarjotin mittauksen jälkeen.	23
Kuva 4. Kasvatusalustat, jotka on altistettu 100 pmy/g homeelle, viidentenä tutkimuspäivänä.	31
Kuva 5. Kasvatusalustat vasemmalta oikealle: ilman säilöntäainetta, kemiallinen säilöntäaine 0,1 % ja luonnonmukainen säilöntäaine 0,6 %.	31
Kuvio 1. Leivonnin prosessikaavio.....	25
Kuvio 2. Näkyvän homekasvun havaitsemisaika, kun homepitoisuus on 10^4 pmy/g.	26
Kuvio 3. Näkyvän homekasvun havaitsemisaika, kun tutkittava homepitoisuus on 10^3 pmy/g.	27
Kuvio 4. Näkyvän homekasvun havaitsemisaika, kun tutkittava homepitoisuus on 100 pmy/g.	28
Kuvio 5. Kemiallisen säilöntäaineen vaikutus tutkittavan homeen kasvuun.	33
Kuvio 6. Luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutus tutkittavan homeen kasvuun.	34
Taulukko 1. Yleisimmät leipähomeet ja niiden kuvaukset (Salovaara ym., 2017, s. 223).	11
Taulukko 2. Pesäkemäärän muutos verrattuna säilöntäaineettomaan kasvualustaan 100 pmy/g homepitoisuudella.	30

Käytetyt termit ja lyhenteet

Absorbanssi	Optinen tiheys, näytteeseen imeytyneen valon määrä
Bio Screen C	Automaattisesti toimiva värinmuodostusta tai sameutta mittaava laite
Home	Mikrosieni, joka muodostaa monisoluisia rihmastoja
Inkubointi	Lämpökaapissa pitäminen
Kontaminaatio	Saastuminen
Malt Extract Agar	Elatusaine, jonka raaka-aineina on käytetty mallasuutetta, peptonia ja agaria
pmy/g	Pesäkkeitä muodostavia yksiköitä per gramma
Raski	Hapan esitaikina, joka sisältää pääasiassa maitohappobakteereja ja hiivoja.
Selektiivinen kasvualusta	Alusta, joka mahdollistaa vain tiettyjen mikrobien kasvun
Säilöntäaine	Synteettinen tai luonnollinen aine, jonka tarkoitus on ehkäistä tuotteen mikrobiologista pilaantumista
YES-rikastusliemi	Homerikastusliemi, jonka raaka-aineita ovat hiivauute, sukroosi, magnesiumsulfaatti ja agar
Ylöslyönti	Työvaiheet, jotka liittyvät taikinan paloitteluun ja muotoiluun ennen nostatusta

1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET

Leivän säilyvyyttä ja myyntikelpoisuutta uhkaavat ensisijaisesti leivän rakenteen koveneminen ja mikrobiologinen pilaantuminen. Kotimaassamme mikrobiologisen pilaantumisen aiheuttaa pääasiassa homehtuminen. Leivän osuus ruokahävikistä on suuri ja pidentämällä sen säilyvyysaikaa pystytään vähentämään sekä kuluttajien että vähittäiskauppojen ruokahävikkiä merkittävästi. Yksi yleinen keino ehkäistä mikrobiologista pilaantumista on säilöntäaineiden käyttö. Kuitenkin yhä useammat kuluttajat arvostavat elintarvikkeiden luonnonmukaisuutta ja välttelevät kemiallisten säilöntäaineiden käyttöä, mikä asettaa haasteita leipomoille vastata kuluttajien toiveisiin ja samalla säilyttää korkean mikrobiologisen laadun tuotteessa.

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimii gluteenittomia tuotteita valmistava leipomo. Opinnäytetyön toimeksiantaja ja tutkittavat säilöntäaineet ovat salaisia. Opinnäytetyön tavoite on tutkia kahden eri säilöntäaineen vaikutusta gluteenittomassa leivässä esiintyvään leipähomeeseen. Ensimmäinen tutkittava säilöntäaine on kemiallisesti valmistettu ja se on tällä hetkellä käytössä toimeksiantajalla. Toinen tutkittava säilöntäaine luokitellaan luonnonmukaiseksi ainesosaksi, jolla on säilyvyyttä lisäävä vaikutus. Kumpaakin säilöntäainetta tutkitaan kolmella eri pitoisuudella. Tutkittavat pitoisuudet on määritetty yhdessä toimeksiantajan kanssa huomioiden säilöntäaineiden valmistajien antamat suosituspitoisuudet. Tutkimus suoritetaan kahdella eri happamuudella, pH 6 ja pH 4,8, jotka vastaavat tavallisen hiivaleivän ja hapatetun leivän happamuuksia. Tutkittavan homeen tunnistaminen rajataan pois työstä, koska homeen tarkkaan tunnistamiseen vaadittavaa menetelmää ei ole käytettävissä laboratoriossa.

Työn tavoitteena on myös tutkia säilöntäaineiden vaikutuksia gluteenittoman leivän aistittaviin ominaisuuksiin, kuten ulkonäköön, hajuun, makuun ja rakenteeseen. Lopuksi arvioidaan, voitaisiinko tutkimustulosten perusteella korvata toimeksiantajalla jo käytössä oleva säilöntäaine uudella, luonnonmukaisemmalla vaihtoehdolla.

2 HOMEET

Homeet ovat mikrosieniä, jotka muodostavat monisoluisia rihmastoja (Salovaara ym., 2017, s. 222 – 224). Ne lisääntyvät ja leviävät itiöiden avulla. Sopivassa kasvun vaiheessa homeet muodostavat suuria määriä itiöitä, jotka leviävät ilmatilaan ja ovat osa pölyä. Koska homeitiöt ovat hyvin kevyitä, ne voivat pysyä pitkään ilmatilassa, leijailta kauas ja löytää tiensä ahtai-siinkin paikkoihin. Homeitiöt voivat säilyä elinkykyisinä jopa vuosia. Kun vettä ja ravinteita on saatavilla, itiöt alkavat itää ja ne alkavat kasvattaa uutta rihmastoja. Ijäs ja Saloniemi (2021, s. 24) ottavat esiin homeiden kyvyn lisääntyä myös rihmaston kappaleista, jotka niin ikään kulkeutuvat helposti ilmapirran mukana paikasta toiseen. Homeen muodostama rihmasto ei ole itsessään värillistä vaan pesäkkeiden värin muodostavat homeitiöt. Eri homesuvut muodostavat erivärisiä pesäkkeitä.

Homeet tarvitsevat ehdottomasti happea elääkseen, mutta ovat melko vaatimattomia sekä ravinnon että kosteuden suhteen (Ijäs & Välimäki, 2004, s. 17 – 18). Homeet tarvitsevat elääkseen vain pienen määrän vettä, mutta ne myös selviävät kosteissa olosuhteissa. Stranks (2007, s. 271) toteaa, että homeet reagoivat veden aktiivisuuteen ja jotkut homelajit voivat sietää matalaakin veden aktiivisuustasoa. Homeet viihtyvät laajalla pH-alueella, mutta parhaiten ne kasvavat lievästi happamassa ympäristössä. Lämpötilan suhteen homeet menestyvät parhaiten huoneenlämmössä. Homeet ja niiden itiöt eivät kestä yli 75 °C lämpötilaa, jolloin ne tuhoutuvat (Ijäs & Välimäki, 2004, s. 17 – 18).

2.1 Mykotoksiinit

Mykotoksiinit ovat homeen muodostamia homemyrkkyjä, jotka ovat myrkyllisiä sekä ihmisille että eläimille (Niemi ym., 2004, s. 273). Ne voivat aiheuttaa erilaisia äkillisiä ja kroonisia oireita, kuten oksentelua, ripulia, hermostollisia oireita, munuaisten toiminnan vajausta ja maksasyöpää. Pönkä (1999, s. 235) kuitenkin muistuttaa, että mykotoksiinien aiheuttamien ruokamyrkytysten merkitys on maassamme hyvin vähäinen.

Jotkin leipää pilaavat homeet voivat tuottaa mykotoksiineja (Salovaara ym., 2017, s. 223). Esimerkiksi jauhoista voidaan löytää *Fusarium*-homelajeja ja vähäisiä määriä sen toksiineja. *Aspergillus ochraceus* -home voi tuottaa toksiineja kosteana varastoidussa viljassa, vaikka sen ei ole raportoitu kasvavan ja tuottavan toksiineja leivässä. Niemi ym. (2004, s. 273) kuitenkin mainitsevat, että homeiset leivät voivat sisältää myös *Aspergillus*- ja *Penicillium* -

lajien tuottamaa patuliinia. Huomioitavaa on myös, että viljatuotteiden saastuminen homesienillä voi tapahtua jo pellolla ja varastoinnin aikana.

Vaikka näkyvä homekasvusto poistetaan elintarvikkeesta, mahdollisesti syntynyt myrkkyy jää tuotteeseen eikä se häviä esimerkiksi uudelleen kuumentamalla (Ijäs & Välimäki, 2004, s. 23). Homehtuneessa elintarvikkeessa saattaa esiintyä homeen makua, vaikka silmin nähtävää kasvustoa ei ole ehtinyt kehittyä.

2.2 Homelajit ja niiden tunnistaminen

Homeiden tunnistaminen perustuu pääasiassa kuromankannattimien rakenteisiin, suvuttomien kuromaitiöiden syntytapaan ja itse kuromaitiöiden ominaisuuksiin (Aro ym., 2018, s. 312). Tämän vuoksi homeiden tunnistaminen ilman mikroskooppia on vaikeaa tai jopa mahdotonta. Kuromaitiöiden ulkonäkö, kuten muoto ja koko, vaihtelevat suuresti. Kuromaitiöt voivat olla yksi-, kaksi- tai monisoluisia, pallomaisia, sukkulamaisia tai soikeita, nystermä- tai siileäpintaisia sekä väriltään kellertäviä, vihertäviä, harmaita tai melkein värittömiä. Kuromaitiöt voivat muodostua erilaisissa itiöpesäkkeissä, esimerkiksi kuromapullossa, -pylväässä, -pakkassa tai itiöpesäkkeessä tai ilman itiöemää sienirihman päässä. Kuromaitiöiden synty tapa ja kuromakannattimien rakenne on vaikea saada selville luonnonalustalla kasvavasta homeesta. Tämän vuoksi niitä kasvatetaan laboratoriossa erilaisilla kasvatusalustoilla, joiden avulla voidaan tarkastella homeen muita ominaisuuksia, esimerkiksi rihmaston kasvunopeutta, runsautta ja kasvun säännöllisyyttä, itiöemien muodostumista ja värin kehittymistä sekä rihmaston että kasvualustaan. Tunnistaminen helpottuu, kun tarkastellaan edellä mainittuja ominaisuuksia yhdessä mikroskooppisten tuntomerkkien kanssa. Tarkempi tunnistus tapahtuu kuitenkin DNA:n emäsjärjestyksiä vertailemalla.

Salovaara ym. (2017, s. 223) toteavat, että homelajeja tunnetaan tuhansia. Muutamat homelajit tai -suvut ovat leivässä yleisempiä kuin toiset ja osa homelajeista on helpommin torjuttavissa kuin toiset. Homelajien välillä on eroja muun muassa siinä, miten korkeita säilöntäainepitoisuuksia ja miten alhaista pH:ta ne sietävät. Homelajien nimet voivat aiheuttaa sekaannusta, sillä samalla organismilla voi olla useita eri nimiä. Tämä johtuu tunnistusmenetelmien eroista ja niiden kehittymisestä.

Taulukossa 1 on lueteltu yleisimpiä leivässä esiintyviä homeita ja niiden erityispiirteitä.

Taulukko 1. Yleisimmät leipähomet ja niiden kuvaukset (Salovaara ym., 2017, s. 223).

Homelaji -tai suku	Yleinen kuvaus	Erytyspiirteitä
<i>Rhizopus stolonifer</i> (<i>Mucor mucedo</i>)	Tavallinen musta leipähome	Nuppineulamaiset sporangiot, itiöt mustia
<i>Penicillium</i> sp., esim. <i>P. verrucosum</i>	Ns. pensselihome. Useita lajeja.	Pensselimäiset sinivihreät konidiot. Vaikeita torjua; sietävät alhaisen pH:n ja korkeita säilöntäainepitoisuuksia.
<i>Penicillium roqueforti</i>	Sinihomejuustossa käytetty home.	Sinivihreä. Villit kannat voivat kasvaa ruisleivällä. Vaikea torjua.
<i>Neurospora sitophila</i> (<i>Monilia sitophila</i>)	"Punainen leipähome"	Nopeakasvuinen. Kasvaa korkeissa lämpötiloissa.
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (<i>Endomyces fibuliger</i>)	Ns. liituhome	Oikeastaan hiiva. Kasvusto valkoinen. Voi kasvaa esim. ruisleipäviipaleella. Leviää kosketuksesta.
<i>Aspergillus niger</i>	Mustat itiöt, "musta home", "yleinen leipähome"	Pilaa myös hedelmiä ja kasviksia. Tiettyjä kantoja käytetään entsyymien ja sitruunahapon tuottamiseen.
<i>Eurotium rubrum</i> , <i>Eurotium</i> sp. (<i>Aspergillus glaucus</i>)	Kellertävä, ruskea	Yleinen ulkoilmassa. Voi kasvaa myös suhteellisen kuivilla elintarvikkeilla.
<i>Cladosporium</i> sp.	Tummanvihreä/musta "kellarihome"	Aiheuttaa kasvitauteja
<i>Fusarium</i> sp.	(esim. <i>Fusarium graminearum</i>)	Punertava. Useita lajeja. Ns. punahome viljassa, kasvitauti. Voi muodostaa toksiineja. Ei tietävästi kuitenkaan raportteja siitä, että aiheuttaisi leivän homehtumista tai muodostaisi toksiineja leivässä.

2.3 Homeiden eristäminen ja viljely

Homeita voidaan tutkia puhdasviljelminä (Aro ym., 2018, s. 315). Luonnonnäytteistä, kuten elintarvikkeista, saadaan puhdasviljelmä pitämällä näytettä kostean imupaperin päällä 2 – 3 vuorokautta ja ottamalla näytteen pinnalle kasvaneesta rihmastosta pala tai itiöitä puhtaalle ravintoalustalle. Toinen keino puhdasviljelmän saamiseksi on laimentaa näytettä niin paljon, että maljalle viljeltäessä syntyy yksittäisiä pesämäisiä kasvustoja. Jokainen kasvusto poimitaan omalle maljalleen.

Homeiden eristämiseen käytetään ravinteetonta vesialustaa sekä mallasta tai maissijauhoa sisältäviä kasvualustoja (Aro ym., 2018, s. 315). Kasvualustoihin voidaan lisätä antibioottia esimerkiksi streptomysiiniä estämään bakteerien kasvua. Suurin osa homeista kasvaa + 15 – 25 °C lämpötilassa ja tunnistamista varten useimmiten riittää 5 – 10 vuorokauden kasvatusaika. Valo aktivoi pigmentin muodostumista ja homeiden itiöintiä. Homeiden alkuperäisiä ominaisuuksia, kuten taudinaiheuttamis- tai selluloosan hajotuskykyä, kuitenkin heikentää jatkuva ravinteikkaalla alustalla viljely. Homeiden kasvutapa vaihtelee eri alustoilla. Homeet itiöivät helposti, joten maljat tulee sulkea happea läpäisevällä, mutta tiiviillä kalvolla. Riittävä suojautuminen on tärkeää homeiden kanssa työskenneltäessä, koska homealtistus voi aiheuttaa allergiaa ja niin sanotun homepölykeuhkon.

3 HOMEIDEN TORJUNTA LEIVÄSSÄ

3.1 Tuotantoprosessi ja -tilat

Paiston aikana leivän pinnan lämpötila nousee niin korkeaksi, että leivässä olevat homeet ja niiden itiöt tuhoutuvat (Salovaara ym., 2017, s. 228). Homehtumisen kannalta kriittisiä vaiheita ovat paiston jälkeiset tapahtumat leivän pakkaamiseen asti. Leipä voi kontaminoitua leipomoilmasta tai kuljettimien, pakkausmateriaalien ja työntekijöiden kosketuksesta.

Cauvain (2015, s. 279 – 280) toteaa, että leipomoympäristö ei ole steriili. Kuivat raaka-aineet, erityisesti jauhot, sisältävät homeitiöitä ja jauhopöly leviää helposti ilmassa. On arvioitu, että 1 g jauhoa sisältää jopa 8000 homeitiötä. Jotkin prosessivaiheet, kuten raaka-aineiden punnitseminen ja sekoittaminen, lisäävät homeiden määrää leipomon ilmassa. Suuremmissa leipomoissa jauhojen käsittely tehdään erillään valmiiden leipien jäähdytys- ja pakkausalueilta. Tätä kutsutaan puhdistila-tekniikaksi eli valmiit tuotteet pidetään erillään normaalista leipomotilasta paistosta pakkaamiseen asti (Salovaara ym., 2017, s. 229). Ulkopuolelta tulevien homeitiöiden pääsyä siirto-, jäähdytys- ja pakkaustiloihin estetään ylipaineistamisella ja johtamalla tiloihin puhdasta ilmaa erityissuodattimien läpi. Tämän lisäksi on tärkeää huolehtia työskentelytapojen ja pakkausmateriaalien korkeasta hygieniasta.

Työskentelytavoilla voidaan ehkäistä pölyn ja jauhopölyn leviäminen (Salovaara ym., 2017, s. 224). Laitteet eivät saisi edistää jauhopölyn leviämistä ja rakenteiden tulisi olla helposti puhdistettavia. Veden käsittelyyn tulee kiinnittää huomiota, ettei homeille ja niiden itiöille synny kasvualustaa esimerkiksi laitteiden alle tai lattian rakoihin. Myös työntekijöiden ja vieraiden suojavaatetukseen tulisi kiinnittää huomiota, jotta voidaan vähentää ulkoa tulevien homeitiöiden määrää leipomossa.

Paistetun leivän kuori on kuiva ja leipomon suhteellisen ilmankosteuden ollessa alle 90 %, homeet eivät pääse kasvamaan kuoren päällä (Cauvain, 2015, s. 280). Sen sijaan korkeassa ilmankosteudessa homeet kasvavat nopeasti. Jos leipä pakataan lämpimänä, vesi kondensoituu pakkauksen sisälle lisäten ilmankosteutta. Leivän viipalointi ennen pakkaamista paljastaa leivän homeelle alttiin sisäosan. Tämän vuoksi viipaloitu ja pakattu leipä on suurimmassa riskissä homehtua, koska leivän kosteat ja leikatut pinnat ovat ideaali kasvualusta homeelle pakkauksen estäessä kosteuden poistumisen.

3.2 Suojakaasupakkaaminen

Suojakaasupakkaamisessa pakkauksen sisällä olevaa normaalia ilmaa muokataan kaasuseoksen avulla tästä poikkeavaksi (Ahvenainen-Rantala & Helen, 2010, s. 269 – 270). Suojakaasuina käytetään hiilidioksidia (CO_2), typpeä (N_2) ja happea (O_2). Pakkauksen kaasutus voidaan tehdä joko tyhjiömällä ja kaasuttamalla kaasuseoksella tai huuhtelemalla kaasuseoksella. Jälkimmäistä tapaa voidaan käyttää leipomotuotteille, sillä ne eivät kestä tyhjiöintiä.

Hiilidioksidin käyttö pakkauksessa lisää leivän säilyvyysaikaa ilman, että suojakaasu vaikuttaa tuotteen makuun, tuoksuun tai ulkonäköön (Cauvain, 2015, s. 284). Hiilidioksidi hidastaa homeiden kasvua hiilidioksidipitoisuuden ollessa pakkauksessa yli 20 %. Nostettaessa hiilidioksidipitoisuus lähelle 100 %, hiilidioksidin antimikrobinen vaikutus maksimoidaan. Mitä suurempaa hiilidioksidipitoisuutta pakkauksessa käytetään sitä pidempään tuote säilyy homeetomana.

3.3 Veden aktiivisuus

Mikrobien lisääntyminen riippuu elintarvikkeiden veden aktiivisuudesta (a_w , lyhennys sanoista water activity) (Pönkä, 1999, s. 245). Veden aktiivisuudella tarkoitetaan tuotteen vesihöyryn paineen suhdetta puhtaan veden höyrynpaineeseen samassa lämpötilassa. Puhtaan veden veden aktiivisuus on 1.0. Useiden tuoreiden elintarvikkeiden veden aktiivisuus on yli 0,99. Yleisesti ottaen elintarvikkeita pilaavat bakteerit vaativat veden aktiivisuuden olevan vähintään 0,90. Homeet kuitenkin lisääntyvät kuivemmassakin kasvuympäristössä veden aktiivisuusarvon ollessa vähintään 0,8. Tuoreen leivän veden aktiivisuus on 0,95 – 0,96 (Salovaara ym., 2017, s. 21).

Veden aktiivisuuteen elintarvikkeissa voidaan vaikuttaa muun muassa suolan tai sokerin lisäämisellä tuotteeseen tai kuivaamalla (Pönkä, 1999, s. 245). Leivän valmistuksessa suolalla on suuri vaikutus leivän maun ja rakenteen lisäksi myös mikrobiologiseen säilyvyyteen (Salovaara ym., 2017, s. 66). Suolan sitoessa voimakkaasti vettä, se pienentää veden aktiivisuutta leivässä ja pidentää leivän homeetonta aikaa.

3.4 Happamuus

Homehtumista voidaan ehkäistä säätämällä leivän pH tarpeeksi alhaiseksi (Salovaara ym., 2017, s. 228). Taikinaa voidaan hapattaa esimerkiksi käyttämällä raskia leivonnassa (mts. 120). Raskikäymisessä tapahtuu sekä maitohappokäymistä että alkoholikäymistä. Maitohappokäymisessä maitohappobakteerit fermentoivat jauhon sokereita pääasiassa maitohapoksi ja etikkahapoksi, mikä laskee raskin pH:n alhaiseksi. Jos leipätaikinan pH lasketaan esimerkiksi 4,7 – 4,8:aan saadaan yleensä riittävä suoja homeetta vastaan (mts. 228). On kuitenkin olemassa homelajeja, jotka kestävät melko hyvin happamuutta ja ne voivat kasvaa hyvinkin happamissa olosuhteissa. Happamuuden lisäämisen vaikutus perustuu siihen, että itiöiden kasvuun lähteminen ja itse solujen kasvu hidastuu. Leivän homehtumisen torjunnassa riittää monesti jo se, että hidastetaan homeen kasvuun lähtöä ja siten saadaan pidennetyksi homeetonta aikaa muutamilla päivillä. Leivän pH:n säätämisen vaikutusta voidaan tehostaa säilöntäaineilla, kuten sorbiinihapolla tai propionihapolla ja niiden suoloilla.

3.5 Säilöntäaineet

Elintarvikelisäaineet ovat aineita, joita lisätään tarkoituksella elintarvikkeeseen niiden teknologisen vaikutuksen, kuten elintarvikkeen säilyvyyden takaamisen, vuoksi (Ruokavirasto, 21.9.2021). Lisäaineet voivat olla peräisin luonnosta, mutta niitä voidaan valmistaa myös kemiallisesti tai mikrobien avulla (Ruokatieto, i.a.) Luonnossa esiintyviä lisäaineita voidaan eristää kasvi- tai eläinperäisestä raaka-aineesta laboratorio-olosuhteissa. Luonnossa esiintyvien lisäaineiden kaltaisia tai täysin synteettisiä lisäaineita, joille ei ole luonnossa vastinetta, voidaan valmistaa kemiallisesti.

Säilöntäaineet määritellään aineiksi, jotka pystyvät estämään, hidastamaan tai pysäyttämään mikro-organismien kasvua, niiden aiheuttamaa pilaantumista tai pilaantumisen aiheuttamia muutoksia elintarvikkeessa (Adams ym., 2016, s. 109). Säilöntäaineeksi ei lasketa aineita, jotka estävät kemiallisista reaktioista johtuvaa pilaantumista esimerkiksi härskiintymistä tai joita käytetään pääasiassa muiden teknologisten vaikutusten vuoksi, mutta samalla ehkäisevät mikrobiologista pilaantumista. Säilöntäaineet voivat joko tuhota mikro-organismeja tai ehkäistä niiden kasvua, mikä yleensä riippuu säilöntäaineen annostelusta. Korkeat säilöntäainepitoisuudet tuhoavat mikrobeja, kun taas alhaisemmat, elintarvikkeissa sallitut pitoisuudet

estävät niiden kasvua. Tämän vuoksi kemialliset säilöntäaineet ovat hyödyllisiä vain, kun pyritään hillitsemään lievän kontaminaation aiheuttamaa mikrobien kasvua eikä tavoitteena ole paikata huonoa elintarvikehygieniaa.

Ennen kuin lisäaine hyväksytään käyttöön, sen on käytävä läpi perusteellinen turvallisuusarviointi (Ruokavirasto, 21.9.2021). Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen, EFSA (European Food Safety Authority), arvioi Euroopan unionissa lisäaineiden turvallisuutta. Turvallisuusarvioinnin perusteella määritetään lisäaineen Acceptable Daily Intake – arvo eli ADI-arvo. ADI-arvo kuvaa lisäaineen päivittäistä hyväksyttävää enimmäissaantia, jolle ihminen voi altistua periaatteessa joka päivä koko elämänsä ajan ilman terveydellisiä haittavaikutuksia. ADI-arvo pätee sekä aikuisiin että lapsiin. Arvo ilmoitetaan milligrammoina henkilön painokiloa ja vuorokautta kohden. ADI-arvoja käytetään lainsäädännön apuvälineenä määriteltäessä, miten paljon ja missä elintarvikkeessa lisäainetta saa käyttää. Tarkoituksena on, ettei yksittäisen lisäaineen määrä ylitä hyväksyttävää saantirajaa tavanomaisessa ruokavaliassa. ADI-arvo voi kuitenkin ylittyä, jos lisäainepitoisten elintarvikkeiden osuus ruokavaliassa on suuri tai jos yksittäistä lisäainepitoista elintarviketta käytetään suuria määriä kerralla.

Jos tutkimuksissa todetaan, että lisäaineen toksisuus on erittäin vähäinen, voidaan sille antaa "ADI not specified" -luokitus (Korkeala, 2007, s. 295). Tällöin lisäainetta voidaan käyttää pienin mahdollinen pitoisuus, joka tuottaa toivotun teknologisen tuloksen. Määritetyt ADI-arvot eivät ole välttämättä pysyviä, vaan uusi toksikologinen tieto voi muuttaa niitä.

3.5.1 Kemiallinen säilöntäaine

3.5.2 Luonnonmukainen säilöntäaine

4 AISTINVARAINEN ARVIOINTI JA MONIVERTAILUTESTI

Aistinvaraisen arvioinnin menetelmien katsotaan kuuluvan elintarviketieteisiin, mutta ne ovat kehittyneet monien tieteenalojen, kuten psykologian, ravitsemustieteen, tilastotieteen, luonnontieteiden, lääketieteen ja kuluttajatutkimuksen, vuorovaikutuksessa (Lapveteläinen, 2010, s. 368). Elintarviketeollisuudelle aistinvarainen arviointi tuo välitöntä tietoa muun muassa tuotekehityksen ja laadunvalvonnan hyödynnettäväksi. Parhaimmassa tapauksessa aistinvaraisen arvioinnin menetelmät voivat toimia yrityksen strategisten päätösten työkaluina.

Aistinvaraisen arvioinnin menetelmiä käytetään aistinvaraisessa tutkimuksessa, jossa koulutettu raati arvioi elintarvikkeiden ulkonäköä, makua, hajua ja rakennetta (Tuorila ym., 2008, s. 15). Raati toimii mittalaitteen tavoin ja luo tietoa elintarvikkeiden ominaisuuksista. Aistinvaraista arviointia käytetään myös ruoan hyväksyttävyystudkimuksessa, jossa tehtävään kouluttamaton kuluttajaraati arvioi elintarvikkeen miellyttävyyttä ja kiinnostavuutta kyseisten kuluttajien käyttöön. Tutkimuksen perusteella saadaan kokonaiskuva siitä, keitä elintarvike miellyttää ja mitkä elintarvikkeet menestyisivät markkinoilla. Luotettavien tulosten saamiseksi on tärkeää huomioida mieltymysten ja laatuominaisuuksien mittaamisen ero. Koulutettu laboratorio raati arvioi laatueroja ja kouluttamaton kuluttajaraati tekee mieltymysarvioita.

Aistinvaraisen arvioinnin menetelmiä voidaan käyttää monipuolisesti ja niiden käyttö vaihtelee tutkimuskysymysten mukaan (Tuorila & Appelbye, 2005, s. 21). Menetelmillä voidaan tutkia:

- miten eri ainesosat, valmistusmenetelmät, pakkaus ja varastointi vaikuttavat tuotteen aistittavaan laatuun.
- miten miellyttävinä elintarvikkeen ominaisuuksia pidetään eri olosuhteissa ja koehenkilöryhmissä sekä miten elintarvikkeen ominaisuuksia havaitaan, tunnistetaan ja muistetaan.
- voidaanko aistinvarainen mittaus korvata nopealla ja toistettavalla fysikaalisella tai kemiallisella menetelmällä ja kuvaako tulos tuotteen aistittavan laatuominaisuuden vaihtelua.
- uusia menetelmiä ja menetelmien vastaavuuksia.

Monivertailutestillä voidaan määrittää, aiheuttaako raaka-aineiden tai valmistusprosessin muutos, pakkaus tai varastointi eroja tuotteisiin (Tuorila ym., 2008, s. 83). Tavallisesti sitä käytetään, kun halutaan selvittää, aiheuttavatko edellä mainitut tekijät aistinvaraisesti havaittavaa virhettä tuotteeseen. Monivertailutestillä saadaan tietoa näytteiden välisen eron suuruudesta. Aluksi arvioija tutustuu ensin vertailunäytteeseen, jonka jälkeen hän saa useita tuntemattomia näytteitä. Arvioijan tehtävänä on verrata tuntemattomia näytteitä vertailunäytteeseen kysytyn ominaisuuden osalta ja arvioida eroja kolmi- tai viisiportaisella asteikolla. Arvioijille voi esittää kahdesta viiteen näytettä arvioitavaksi, joista yhden on hyvä olla tuntemattomana esitetty vertailunäyte. Tämän avulla saadaan käsitys arvioinnin luotettavuudesta.

5 TYÖN TOTEUTUS JA MENETELMÄT

Tutkimus käynnistettiin lokakuussa 2022 Seinäjoen ammattikorkeakoulun analyysilaboratoriossa. Tutkittavan homekannan saamiseksi toimeksiantaja homehdutti leipänäytteitä ja toimitti ne tutkittavaksi Seinäjoen ammattikorkeakoululle. Aluksi voitiin havaita, että jokaisen leipänäytteen pinnalla kasvoi samanlaista vihertävää homea, joka on nähtävissä kuvassa 1. Tämän vuoksi päädyttiin tutkimaan vain yhden leivän homekasvustoa. Homeen vihertävän värin vuoksi voidaan arvella, että home voisi kuulua *Penicillium* -homesukuun. Homelajin tarkka tunnistaminen rajattiin kuitenkin pois työstä. Tunnistaminen vaatisi DNA:n emäsjärjestyksen vertailua, johon tarvittavaa menetelmää ei ollut käytettävissä laboratoriossa.



Kuva 1. Toimeksiantajan toimittama näyte.

Tutkittavasta leivästä otettiin 10 g näytepala, johon lisättiin 90 ml 0,9-prosenttista saliniliuosta. Seos homogenisoitiin Stomacher 400 -homogenisaattorilla. Tämän jälkeen näytettä laimennettiin ottamalla 1 ml näytettä ja siirtämällä se 99 ml:aan saliniliuosta niin kauan, että laimennossuhteeksi saatiin 10^{-10} . Jokainen laimennos siirrostettiin petrialjalle ja valettiin Malt

Extract Agar -elatusaineella, johon oli lisätty etanoliin liuotettua chloramphenicol -antibioottia. Elatusaineen pH oli 5,5. Maljat siirrettiin inkuboitumaan lämpökaappiin 5 vuorokaudeksi 25 °C lämpötilaan.

Kasvatusajan jälkeen maljoilla voitiin havaita homekasvustoa. Laimennoksesta 10^{-5} saatiin eristettyä yksittäisiä pesäkkeitä, joista otettiin silmukalle homekasvustoa ja siirrostettiin 20 ml:aan YES-rikastuslientä. Rikastusliemi laitettiin inkuboitumaan 25 °C lämpökaappiin 5 vuorokaudeksi, jonka jälkeen se oli valmis käytettäväksi tutkimuksiin.

5.1 Mikrobiologinen viljely

Mikrobiologisen viljelyn avulla pystytään tutkimaan, miten eri säilöntäaineet ja niiden pitoisuudet vaikuttavat tutkittavan homeen pesäkemäärään ja niiden muodostumiseen. Luonnonmuokaista säilöntäainetta tutkittiin 0,6 %:n, 0,7 %:n ja 0,8 %:n pitoisuuksilla. Kemiallisen säilöntäaineen vaikutuksia tutkittiin 0,1 %:n, 0,15 %:n ja 0,2 %:n pitoisuuksilla. Valmistamalla selektiivinen mallasuutealusta saatiin homeen kasvulle suotuisa kasvualusta, joka estää muiden mikrobien kasvua. Muokkaamalla kasvualustan happamuutta ja lisäämällä siihen säilöntäainetta voitiin tutkia, miten ne vaikuttavat tutkittavan homeen kasvuun. Vertailunäytteenä toimi kasvualusta, johon ei ollut lisätty säilöntäainetta.

Työn alussa valmistettiin 2,5 litraa mallasuuteagaria, joka jaettiin kahteen osaan. Toisen osan happamuus säädettiin pH-mittaria käyttäen pH 6:een natriumhydroksidilla (NaOH) ja toinen osa elatusaineesta säädettiin pH 4,8:aan vetykloridihapon (HCl) avulla. Tämän jälkeen elatusaine autoklavoitiin 121 °C:ssa 15 minuuttia. Steriloinnin jälkeen tarkistettiin elatusaineiden pH ja tarvittaessa säädettiin ne sopiviksi välttämättä kontaminaatiota. Kun elatusaineet olivat hieman jäähtyneet, punnittiin kumpaakin elatusainetta ja eri säilöntäaineita steriileihin 250 ml:n lasipulloihin haluttujen säilöntäainepitoisuuksien aikaansaamiseksi. Säilöntäaineen annettiin liueta elatusaineeseen.

Tämän jälkeen laimennettiin aiemmin valmistettua homerikastuslientä, jotta saatiin aikaan tutkittavat homepitoisuudet eli 10^2 pmy/g, 10^3 pmy/g ja 10^4 pmy/g. Näytteet siirrostettiin petri-maljoille ja ne valettiin elatusaineilla, joiden happamuus oli säädetty halutunlaisiksi ja niihin oli lisätty tutkittava määrä säilöntäainetta. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä. Jähmettyneet maljat siirrettiin inkuboitumaan lämpökaappiin 25 °C lämpötilaan 5 vuorokaudeksi.

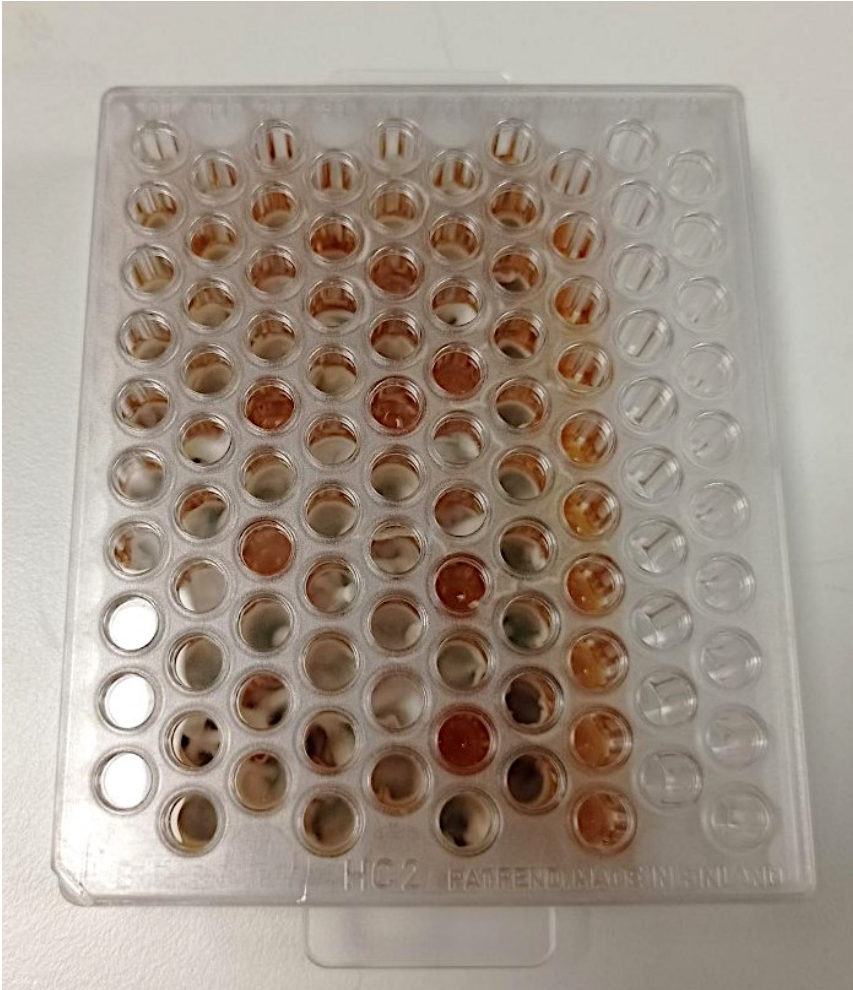
5.2 Bioscreen C -analysointilaitte

Kuvassa 2 on Bioscreen C -analysointilaitte, joka on automaattisesti toimiva värinmuodostusta tai sameutta mittaava laite (Seinäjoen ammattikorkeakoulu, 2014). Näytteen solumäärän kasvussa liemiviljelmä muuttuu yhä sameammaksi (Sojakka & Välimäki, 2011, s. 89). Analysointilaitteella voidaan tutkia aerobisten ja anaerobisten bakteerien, hiivojen, homeiden, levien, solujen ja bakteriofagien kasvua (Bioscreen, 2021).



Kuva 2. Bioscreen C -analysointilaitte.

Laitteeseen mahtuu kaksi 100-paikkaista inkubointitarjotinta eli kyvetiä, joka on havaittavissa kuvassa 5. Yhteen kyvetin kuppiin mahtuu enintään 400 µl näytettä ja jokaisen kupin kasvua voidaan seurata erikseen. Analysointilaitteeseen voidaan määrittää haluttu inkubointilämpötila ja -aika, mittausväli, mittausaika ja aallonpituus. Mittauksen aikana laitteessa oleva fotometri lähettää valoa alapuolelta näytesuspension läpi detektorille. Optinen halogeenilamppu emittoi valonsäteet, jotka on viety UV-peiliin ja hajottimen läpi suodatinyksikölle. Valokuitu ohjaa valon mittauslaitteen linssille ja valo päättyy detektorille lävistettyään kupin (Seinäjoen ammattikorkeakoulu, 2014).



Kuva 3. Inkubointitarjotin mittauksen jälkeen.

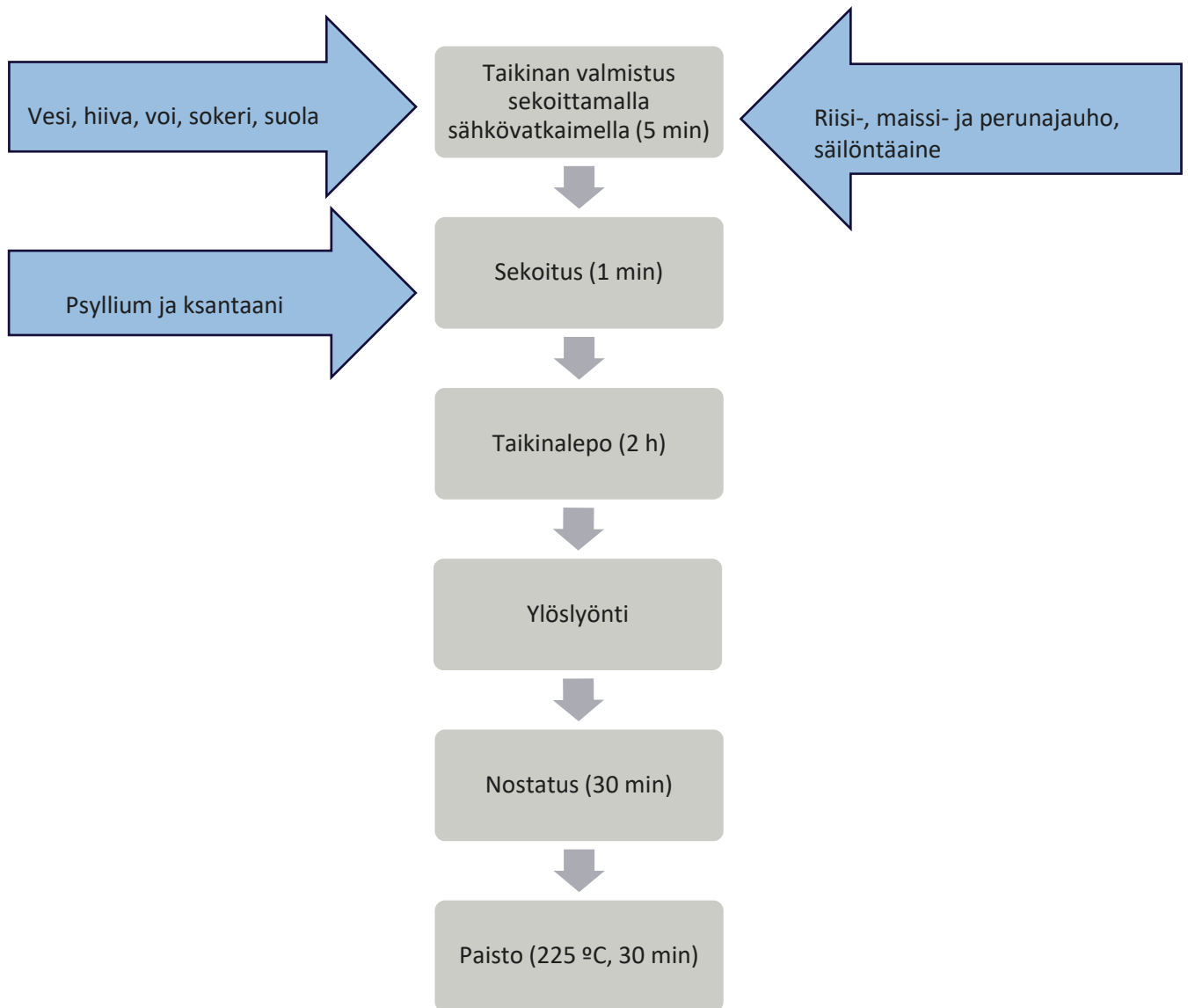
Työn aluksi valmistettiin 800 ml YES-rikastuslientä Garcia ym. (2021, s. 3) tutkimusartikkelin mukaan. Rikastusliemi jaettiin kahteen osaan, joista toisen happamuus säädettiin pH 6:een ja toinen osa pH 4,8:aan vetykloridihappoa (HCl) käyttäen. Tämän jälkeen rikastusliemet autoklavoitiin 121 °C 15 minuuttia, jonka jälkeen niiden pH:t tarkistettiin. Rikastuslientä punnittiin steriileihin 100 ml lasipulloihin ja lisättiin säilöntäaineita halutun pitoisuuden aikaansäämiseksi. Säilöntäaineen annettiin liueta rikastusliemeen.

Seuraavaksi kutakin rikastuslientä pipetoitiin Bioscreen C -analysointilaitteen kyvetteihin 200 µl ja lisättiin homerikastuslientä 10 µl, joka vastaa homepitoisuutta 10⁵ pmy/g . Kustakin rikastusliemestä tehtiin viisi rinnakkaisnäytettä. Tämän jälkeen analysointilaitteeseen asetettiin inkubointilämpötilaksi 25 °C, mittausväliksi 30 minuuttia, aallonpituudeksi 600 nm ja mittausajaksi 5 vuorokautta. Lopuksi käynnistettiin mittaus.

5.3 Aistinvarainen arviointi

Aistinvaraisessa arvioinnissa keskityttiin tutkimaan ainoastaan luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutuksia aistittaviin ominaisuuksiin. Kemiallinen säilöntäaine on tällä hetkellä käytössä toimeksiantajalla, joten sen on todettu täyttävän toimeksiantajan asettamat kriteerit. Luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutuksia gluteenittoman leivän aistittaviin ominaisuuksiin tutkittiin kolmella eri pitoisuudella (0,6 %, 0,7 % ja 0,8 %) tuotteen kypsästä painosta. Tutkittavia näytteitä verrattiin säilöntäaineettomaan vertailunäytteeseen monivertailutestin periaatteen mukaisesti. Tutkimus aloitettiin joulukuussa 2022 valmistamalla gluteenittomia sämpylöitä Entistä parempaa gluteenitonta leipää -kirjan (Blohm & Frej, 2016, s. 29) reseptillä.

Tutkimuksen aluksi valmistettiin lisäaineeton vertailunäyte. Vertailunäytteestä laskettiin sämpylän paistohäviö, joka oli 13,5 %. Tämän tiedon perusteella voitiin laskea, paljonko säilöntäainetta lisätään kuhunkin tutkittavaan näytteeseen. Jokainen näyte valmistettiin alla olevan prosessikaavion mukaisesti (kuvio 1).



Kuvio 1. Leivonnan prosessikaavio.

Valmiiden sämpylöiden annettiin jäähtyä, jonka jälkeen ne pakattiin numerokoodattuihin pusseihin ja lähetettiin toimeksiantajalle arvioitaviksi. Näytteiden mukana lähetettiin arviointilomake (liite 2).

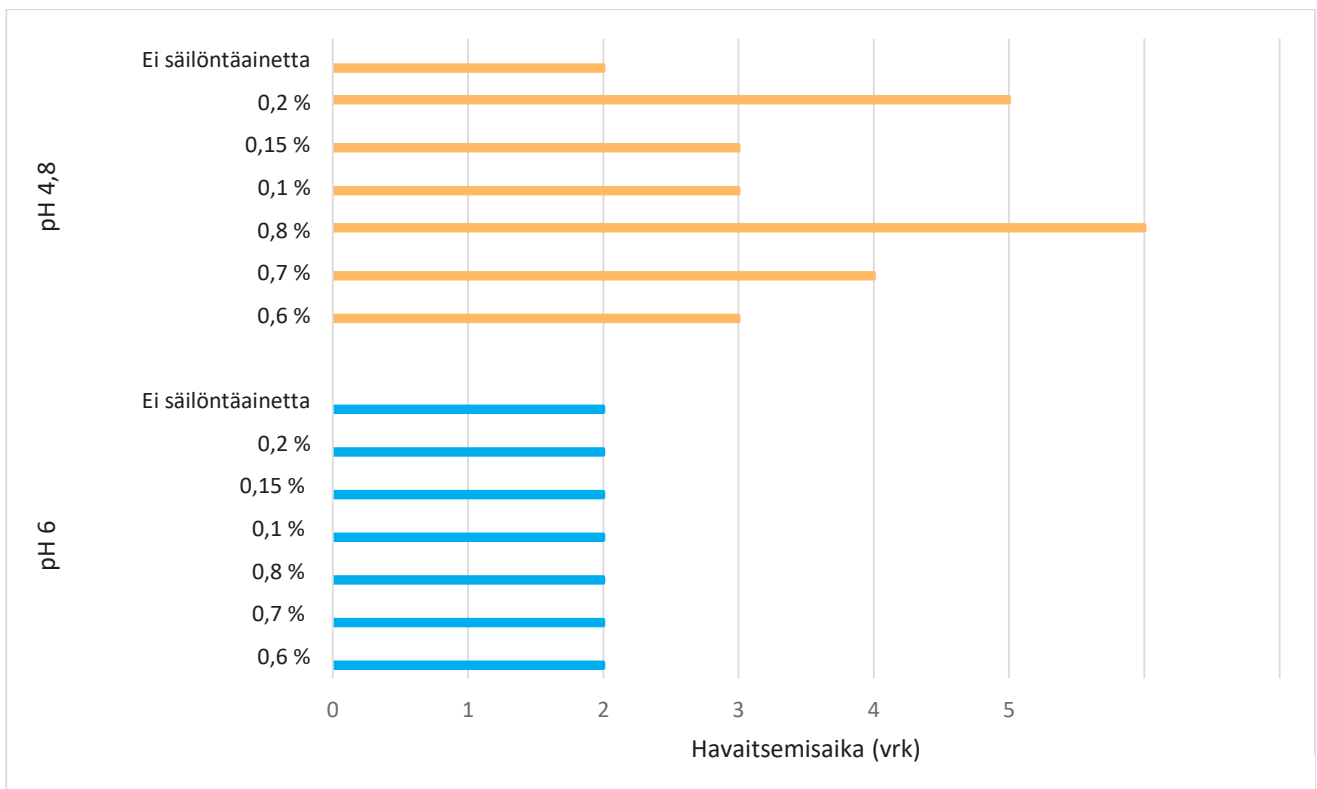
6 TULOKSET

6.1 Mikrobiologinen viljely

Homeen muodostumista kasvatusalustoille tarkasteltiin päivittäin viiden vuorokauden ajan. Tulosten analysoinnissa otettiin huomioon näkyvän homeen havaitsemiseen kulunut aika, pesäkemäärä ja pesäkkeiden ulkonäkö.

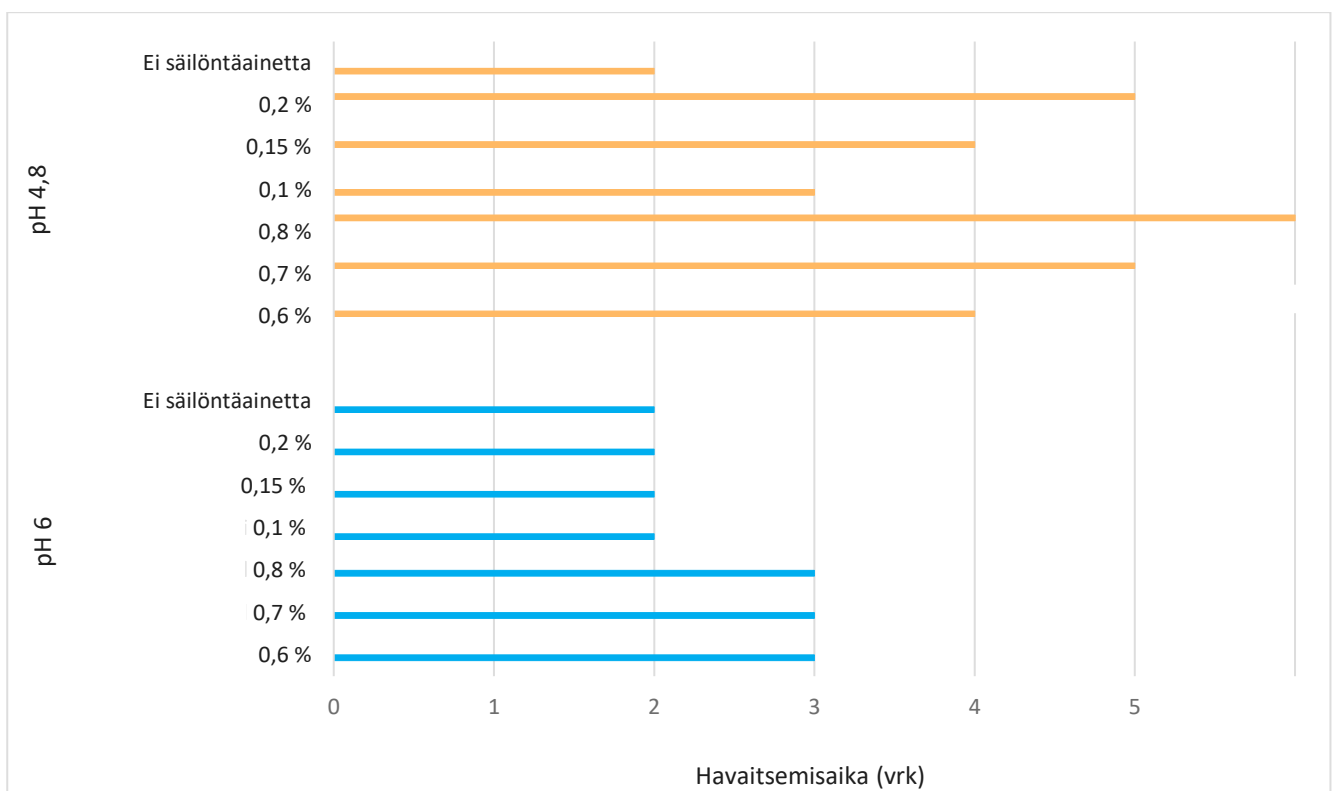
6.1.1 Homekasvun havaitsemiseen kulunut aika

Kuviossa 2 on esitetty homeen havaitsemiseen kulunut aika, kun kasvatusalustat altistetaan 10^4 pmy/g pitoisuudelle tutkittavaa hometta. Homeen kasvua on havaittavissa jo toisena tutkimuspäivänä sekä kummassakin säilöntäaineettomassa alustassa että kaikissa säilöntäaineellisissa alustoissa, joiden pH on 6. Happamuuden alentaminen pH 4,8:aan pidentää homeetonta aikaa merkittävästi kaikilla säilöntäaineilla. Luonnonmukainen säilöntäaine 0,8 % pitoisuudella estää homeen kasvun koko tutkimuksen ajaksi. Myös kemiallisen säilöntäaineen suurin pitoisuus ehkäisee homekasvua viimeiseen tutkimuspäivään saakka.



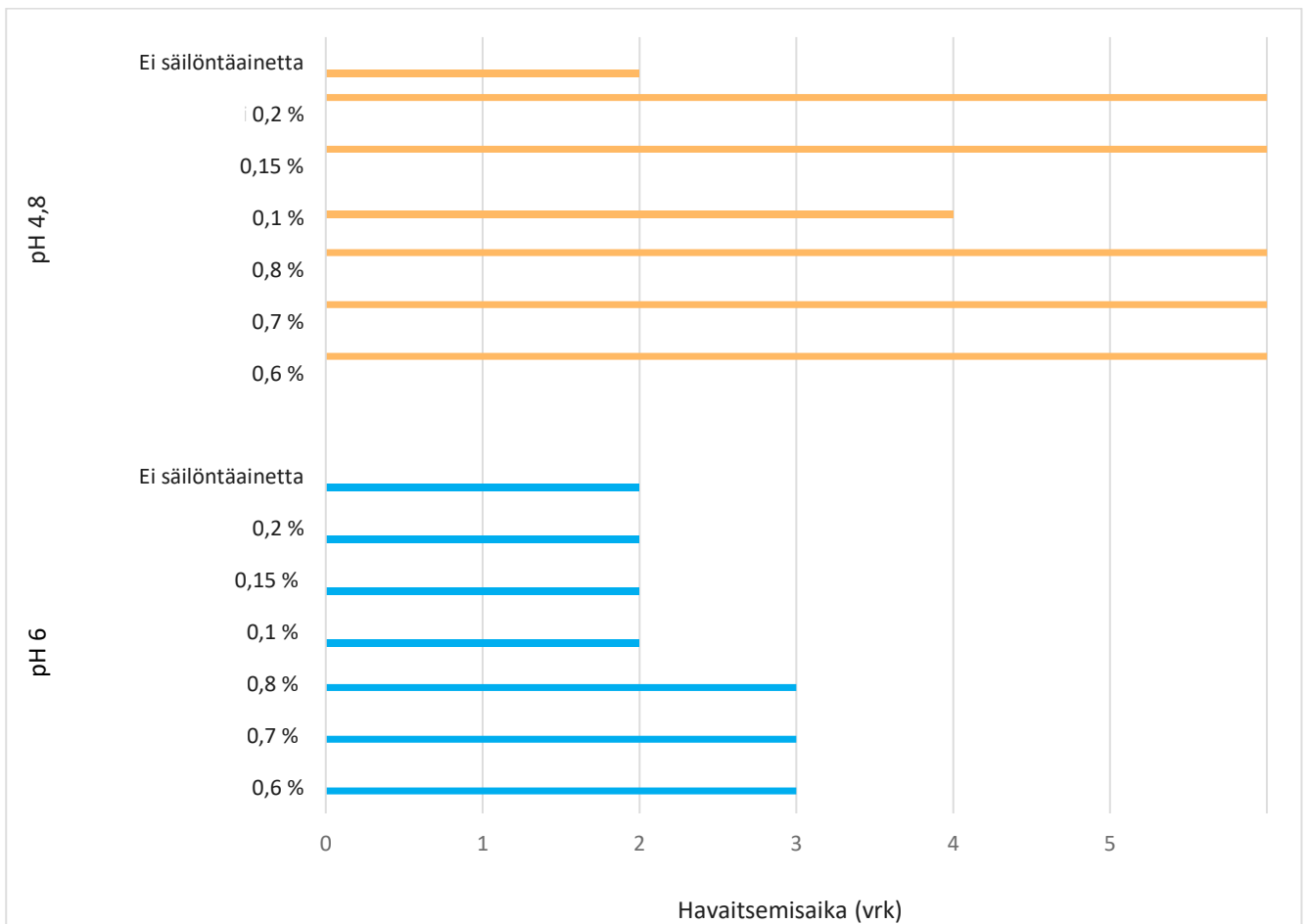
Kuvio 2. Näkyvän homekasvun havaitsemisaika, kun homepitoisuus on 10^4 pmy/g.

Kuviossa 3 kuvataan, milloin tutkittava home havaitaan kasvatusalustoilta, kun homepitoisuus on 10^3 pmy/g. Happamissa pH 4,8 kasvatusalustoissa homeen havaitsemiseen kulunut aika on pidempi kuin korkeammassa pH 6:ssa. Kemiallinen säilöntäaine 0,2 %:n pitoisuudella esti homeen näkyvää kasvua viisi vuorokautta happamalla kasvatusalustalla. Homekasvua ei ollut havaittavissa lainkaan mittausjakson aikana happamalla kasvatusalustalla, johon oli lisätty luonnonmukaista säilöntäainetta 0,8 %:n pitoisuudella. Happamuuden ollessa pH 6 kemiallinen säilöntäaine esti homeen kasvua vain kaksi vuorokautta kaikilla eri pitoisuuksilla, kun taas luonnonmukainen säilöntäaine ehkäisi homekasvua päivän pidempään kaikilla tutkittavilla pitoisuuksilla.



Kuvio 3. Näkyvän homekasvun havaitsemisaika, kun tutkittava homepitoisuus on 10^3 pmy/g.

Kuvio 4 kuvaa näkyvän homeen havaitsemisaikaa, kun kasvualusta altistetaan 100 pmy/g pitoisuudelle homeetta. Kasvualustan happamuuden ollessa pH 4,8 kaikki tutkittavat pitoisuudet luonnonmukaista säilöntäainetta sekä kemiallinen säilöntäaine 0,15 % ja 0,2 % pitoisuuksilla estävät näkyvän homekasvuston syntymisen koko tutkimuksen ajaksi. Happamassa kasvualustassa kemiallinen säilöntäaine 0,1 %:n pitoisuudella tehoa heikoiten. Kasvualustan happamuuden ollessa pH 6, kaikissa kemiallista säilöntäainetta sisältävissä maljoissa on havaittavissa kasvua kahden vuorokauden jälkeen. Luonnonmukaisen säilöntäaineen pitoisuudet ehkäisevät näkyvää homekasvua vuorokauden pidempään.



Kuvio 4. Näkyvän homekasvun havaitsemisaika, kun tutkittava homepitoisuus on 100 pmy/g.

6.1.2 Homepesäkkeiden määrä

Liitteessä 1 on taulukoitu kaikkien tutkittavien maljojen pesäkemäärien keskiarvot. Jokaisesta tutkittavasta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä.

Kasvatusalustat, joihin ei ole lisätty säilöntäaineita, olivat ylikasvuisia sekä 10^4 pmy/g että 10^3 pmy/g homepitoisuudella jo kahden vuorokauden kuluttua. Kun kasvatusalustat altistuivat 100 pmy/g pitoisuudelle tutkittavaa hometta, pystyttiin maljoilta laskemaan yksittäisiä pesäkkeitä. Kasvualustan happamuuden kasvaessa pesäkemäärätkin vähenivät. Viidentenä päivänä alemmassa pH 4,8:ssa oli 15 % vähemmän homepesäkkeitä kuin neutraalimmassa pH 6:n happamuudessa.

Kun kasvatusalustat altistettiin suurimmalle tutkittavalle homepitoisuudelle (10^4 pmy/g), kumpikaan tutkittavista säilöntäaineista ei pystynyt estämään homeen kasvua vaan kaikki maljat olivat ylikasvaneet pH 6:ssa jo toisena tutkimuspäivänä. Kun happamuutta nostettiin pH 4,8:aan, ainoastaan kummankin säilöntäaineen suurimmat pitoisuudet vähensivät homepesäkkeiden lukumäärää. Luonnonmukainen säilöntäaine esti kasvun täysin ja kemiallista säilöntäainetta sisältävässä kasvualustassa homepesäkkeitä kasvoi 14000 pmy/g viidentenä tutkimuspäivänä.

Kun kasvatusalustat altistettiin 10^3 pmy/g homepitoisuudelle havaittiin, että toisena tutkimuspäivänä kaikki kemiallista säilöntäainetta sisältävät kasvatusalustat olivat ylikasvaneita pH 6:ssa eikä luonnonmukaista säilöntäainetta sisältävillä alustoilla kasvanut tällöin vielä mitään. Kolmantena tutkimuspäivänä kaikki tutkittavat maljat olivat kuitenkin ylikasvaneita.

Kun pH:ta alennettiin 4,8:aan huomattiin, että neljäntenä tutkimuspäivänä sekä luonnonmukainen säilöntäaine 0,6 %:n pitoisuudella että kemiallinen säilöntäaine 0,1 %:n ja 0,15 %:n pitoisuuksilla olivat ylikasvaneita. Muilla kasvatusalustoilla ei kasvanut lainkaan hometta. Viidentenä päivänä luonnonmukaista säilöntäainetta 0,7 % sisältävältä kasvatusalustalta löytyi 60 000 pmy/g ja 0,8 % pitoisuus oli estänyt täysin homekasvun. Kasvatusalustassa, johon oli lisätty kemiallista säilöntäainetta suurin tutkittava pitoisuus, kasvoi hometta 20 000 pmy/g viidentenä tutkimuspäivänä.

Kasvatusalustan altistuminen 100 pmy/g homepitoisuudelle pienensi kauttaaltaan havaittävien homepesäkkeiden lukumäärää näytteissä eikä ylikasvua ollut enää havaittavissa edes säilöntäaineettomassa vertailunäytteessä. Tämän vuoksi tällä homepitoisuudella pystyttiin tarkemmin vertailemaan säilöntäainepitoisuuden ja happamuuden vaikutusta pesäkemäärään. Taulukossa on ilmoitettu pesäkemäärien prosentuaalinen muutos verrattuna säilöntäaineettomaan kasvatusalustaan viimeisenä tutkimuspäivänä. Tästä voidaan huomata, että pH

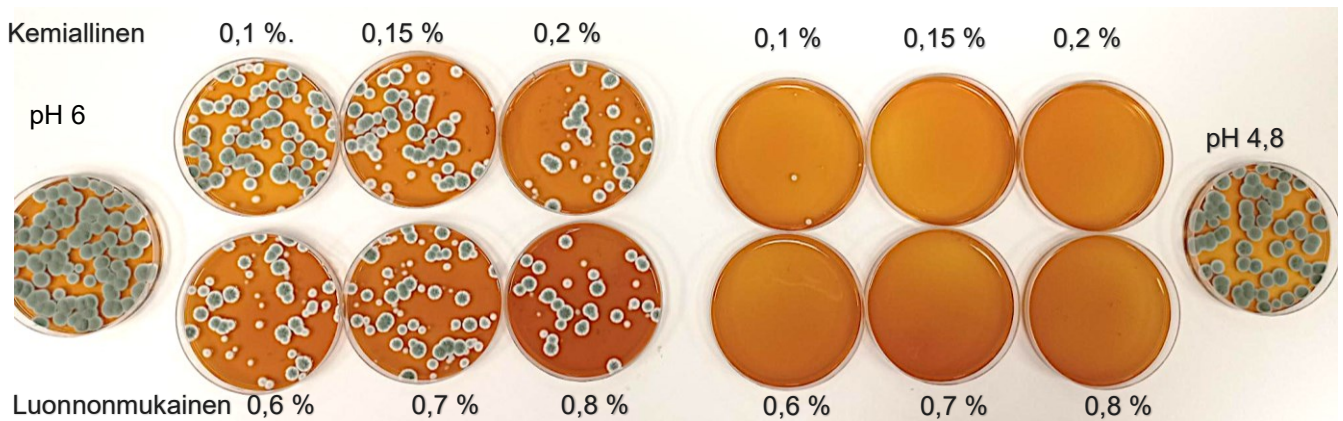
6:ssa luonnonmukainen säilöntäaine esti yleisesti ottaen pesäkkeiden määrällistä kasvua hie-
man paremmin kuin kemiallinen säilöntäaine. pH 4,8:ssa homeen kasvu estyi täysin jokai-
sessa tutkittavassa näytteessä paitsi kemiallisen säilöntäaineen pienimmällä tutkittavalla pi-
toisuudella. Pesäkemäärien prosentuaalinen muutos pH 6:ssa ei etene lineaarisesti eri pitoi-
suuksien välillä, mikä voi johtua mikrobiologisen tutkimuksen mittaepävarmuudesta. Pesäke-
määrien prosentuaalinen muutos on kuitenkin jokaisessa näytteessä samaa suuruusluokkaa
eikä siten merkittäviä eroja ollut havaittavissa eri säilöntäaineiden ja niiden pitoisuuksien vä-
lillä.

Taulukko 2. Pesäkemäärän muutos verrattuna säilöntäaineettomaan kasvualustaan 100
pmy/g homepitoisuudella.

Säilöntäaine	Pesäkemäärän muutos verrat- tuna säilöntäaineettomaan kas- vualustaan (pH 6)	Pesäkemäärän muutos verrattuna säilöntäaineettomaan kasvualustaan (pH 4,8)
Luonnonmukainen 0,6 %	- 30 %	-100 %
Luonnonmukainen 0,7 %	- 26 %	-100 %
Luonnonmukainen 0,8 %	- 35 %	-100 %
Kemiallinen 0,1 %	- 25 %	- 60 %
Kemiallinen 0,15 %	- 25 %	- 100 %
Kemiallinen 0,2 %	- 25 %	- 100 %

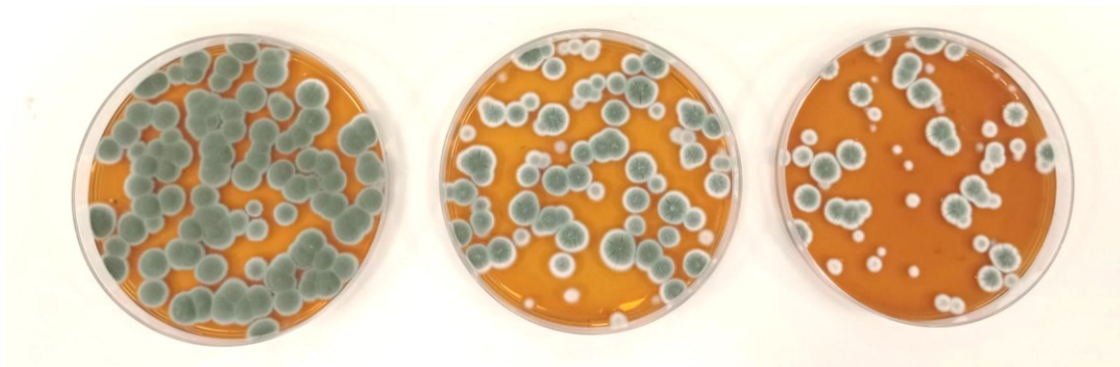
6.1.3 Homepesäkkeiden ulkonäkö

Homepesäkkeiden koossa ja värissä oli havaittavissa eroavaisuuksia eri säilöntäaineiden ja niiden pitoisuuksien välillä. Kuvassa 4 voidaan havaita huomattava ero pH 6:ssa ja pH 4,8:ssa kasvaneiden homeiden välillä, kun kasvatusalustat on altistettu 100 pmy/g pitoisuudelle tutkittavaa hometta. Happamampi kasvualusta on ehkäissyt homekasvun tehokkaasti. Ainoastaan kemiallista säilöntäainetta 0,1 %:n pitoisuudella sisältävällä maljalla kasvaa hometta, jotka ovat pieniä ja vaikeammin havaittavia kuin neutraalimmassa happamuudessa kasvaneet homeet. pH 6:ssa kasvaneet homeet ovat muodostuneet kookkaiksi, tyypillisiksi homepesäkkeiksi. Säilöntäainetta sisältävien alustojen pesäkkeet ovat jääneet pienemmiksi ja reunoiltaan vaaleiksi verrattuna säilöntäaineettomiin kasvualustoihin.



Kuva 4. Kasvatusalustat, jotka on altistettu 100 pmy/g homeelle, viidentenä tutkimuspäivänä.

Luonnonmukaista säilöntäainetta sisältävien kasvatusalustojen homepesäkkeet ovat yleisesti tarkastellen hieman pienempiä ja reunoiltaan vaaleampia kuin kemiallista säilöntäainetta sisältävien kasvatusalustojen pesäkkeet. Kuvassa 5 voidaan nähdä näiden pesäkkeiden eroavaisuudet kummankin tutkittavan säilöntäaineen pienimmällä pitoisuudella.



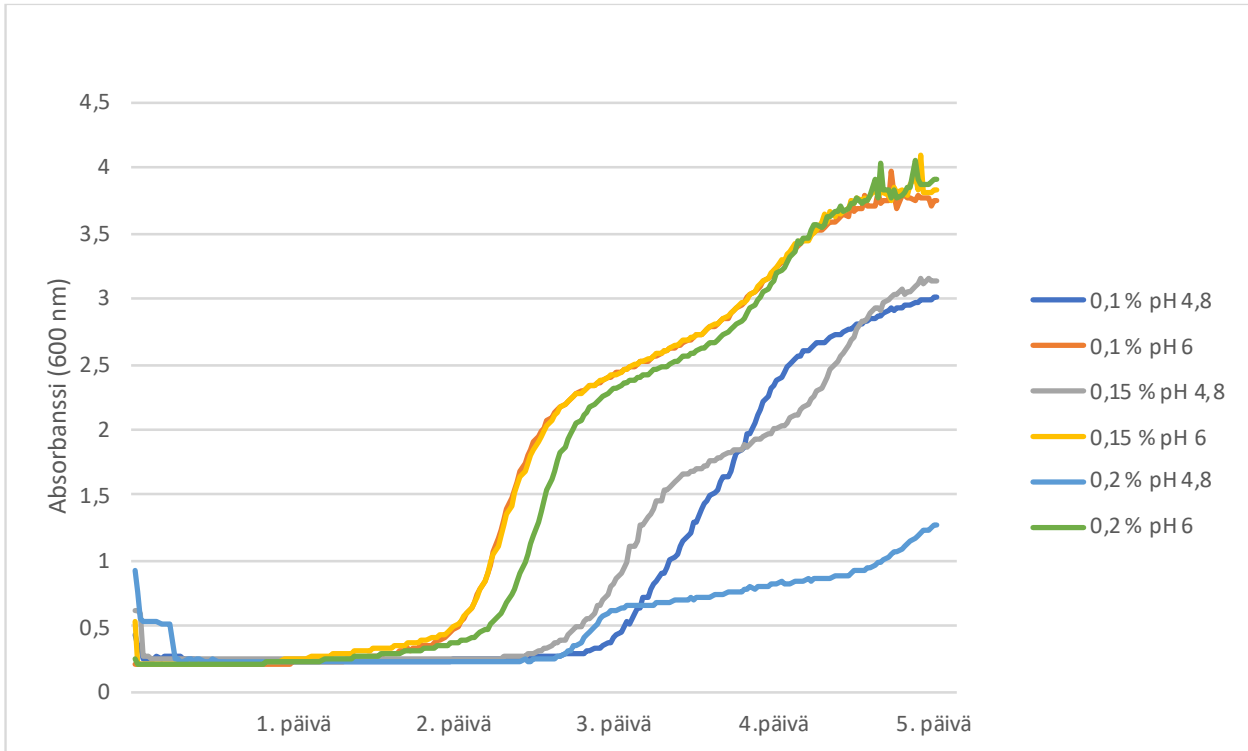
Kuva 5. Kasvatusalustat vasemmalta oikealle: ilman säilöntäainetta, kemiallinen säilöntäaine 0,1 % ja luonnonmukainen säilöntäaine 0,6 %.

6.2 Bioscreen C -analysointori

Bioscreen C -analysointorin tulokset tukevat mikrobiologisella viljelyllä saatuja tuloksia. Bioscreen C:n tuloksissa voidaan havaita, miten happamuus vaikuttaa tutkittavan homeen kasvuun. Kun pH on 6, liuoksen sameus kasvaa nopeammin kuin happamuuden ollessa pH 4,8.

Kuviossa 5 on esitetty homeen kasvukäyrä viiden rinnakkaisnäytteen keskiarvona, kun tutkitaan kemiallisen säilöntäaineen vaikutusta homekasvuun. Korkeammassa pH 6:n happamudessa ei ole havaittavissa merkittävää eroa säilöntäaineen 0,1 %:n ja 0,15 %:n pitoisuuksilla. Toisena päivänä homeiden kasvu alkaa samantahtisesti. Jos säilöntäainetta käytetään 0,2 %:n pitoisuudella, homeiden kasvuun lähtö hieman viivästyy. Kuitenkin neljäntenä mittauspäivänä kaikkien liuosten sameudet kasvavat samalle tasolle eikä eroa ole havaittavissa eri pitoisuuksien välillä.

Happamuuden ollessa pH 4,8, homekasvu hidastuu selkeästi ja se alkaa kolmantena tutkimuspäivänä. Kasvukäyrät 0,1 %:n ja 0,15 %:n säilöntäainepitoisuuksilla ovat samansuuntaisia eikä niissä ole havaittavissa merkittävää eroa. Suurin tutkittava pitoisuus säilöntäainetta estää tehokkaimmin homekasvua ja tällöin kasvukäyrä pysyy loivana.

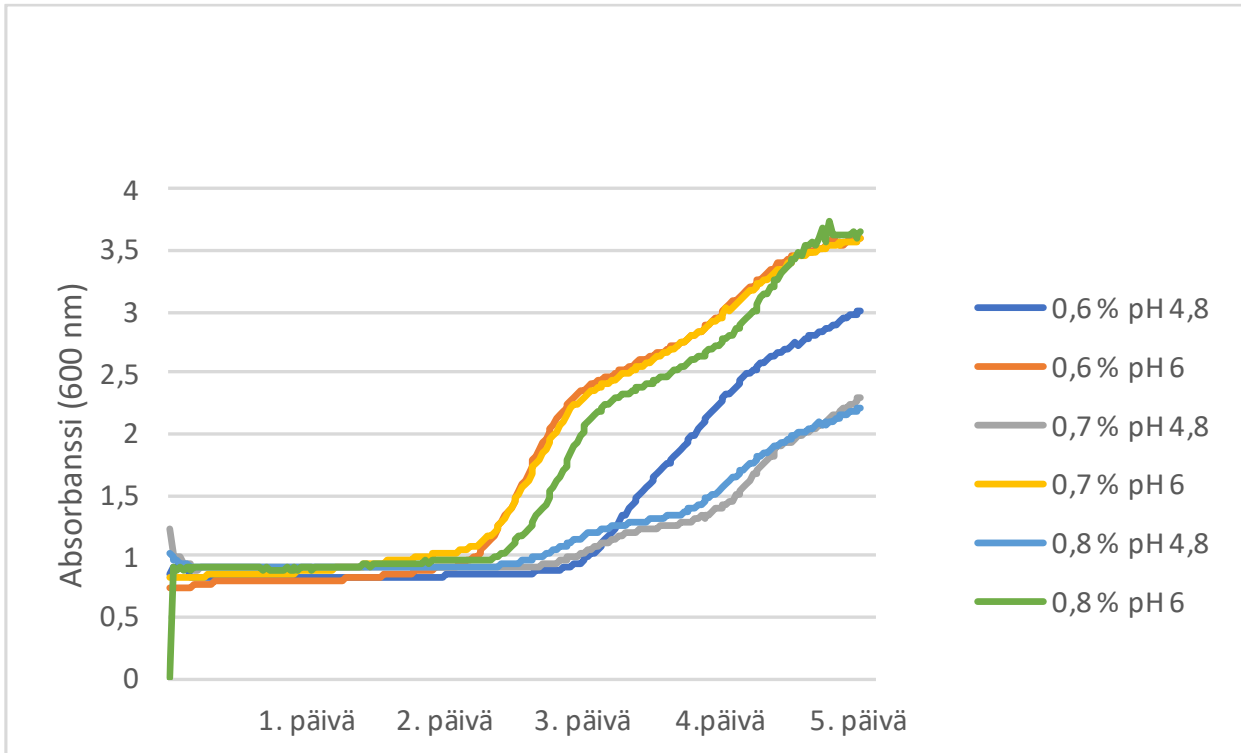


Kuvio 5. Kemiallisen säilöntäaineen vaikutus tutkittavan homeen kasvuun.

Kuviossa 6 on esitetty homeen kasvukäyrä viiden rinnakkaisnäytteen keskiarvona, kun tutkitaan luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutusta homekasvuun. Happamuuden ollessa pH 6, homekasvu alkaa säilöntäaineen 0,6 %:n ja 0,7 %:n pitoisuuksilla toisen päivän lopulla samantahaisesti. 0,2 %:n pitoisuus viivästyttää homekasvua hieman pidempään ja liuos pysyy kirkkaampana neljänteen päivään saakka. Neljäntenä päivänä liuokset ovat yhtä sameita kaikilla pitoisuuksilla.

Kun liuoksen happamuutta lasketaan pH 4,8:aan, liuokset muuttuvat sameammiksi kolmantena tutkimuspäivänä. 0,6 %:n säilöntäainepitoisuudella homekasvu on huomattavasti nopeampaa kuin kahdella suurimmalla pitoisuudella. Sameus muuttuu sekä 0,7 %:n että 0,8 %:n säilöntäainepitoisuudella käsi kädessä eikä homekasvun estokyvyyssä ole huomattavaa eroa.

Kemiallisen ja luonnonmukaisen säilöntäaineen Bioscreen C:llä saamia tuloksia ei kuitenkaan voida verrata keskenään. Luonnonmukainen säilöntäaine muuttaa tutkittavan liuoksen lähtökohtaisesti sameammaksi kuin kemiallinen säilöntäaine, mikä estää luotettavan tulosten vertailun.



Kuvio 6. Luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutus tutkittavan homeen kasvuun.

6.3 Aistinvarainen arviointi

Aistinvaraisen arvioinnin raatina toimi toimeksiantajan työntekijät. Näytteet lähetettiin toimeksiantajalle näytteiden valmistumisen jälkeisenä päivänä ja arviointi suoritettiin kahden vuorokauden kuluttua näytteiden valmistuksesta. Raati arvioi tutkittavien näytteiden eroja vertailunäytteeseen arviointilomakkeen mukaisesti. Aistinvaraisen arviointiin osallistui neljä henkilöä, joten otanta jäi suppeaksi. Numeerinen arviointi ei osoittautunut luotettavaksi, sillä keskiarvo oli lähes jokaisen arvioitavan ominaisuuden ja näytteen, myös tuntemattomana esitetyn vertailunäytteen, kohdalla ”heikko poikkeama” tai ”selvä poikkeama”. Myös keskihajonta oli suuri vastausten välillä. Vastausten sanallisten kuvausten perusteella voidaan tehdä kuitenkin muutamia arvioita luonnonmukaisen säilöntäaineen vaikutuksesta leivän aistittaviin ominaisuuksiin (liite 3).

Näytteiden ulkonäössä havaittiin eroavaisuuksia. Tuntemattomana esitetty vertailunäyte arviointiin pääasiassa ulkonäöltään samanlaiseksi kuin vertailunäyte. Näyte, johon oli lisätty 0,6 % säilöntäainetta, arviointiin hieman vertailunäytettä tummemmaksi. Näytteet, joihin oli lisätty 0,7

% ja 0,8 % tutkittavaa säilöntäainetta, arvioitiin selkeästi tummemmiksi kuin vertailunäyte ja paistoväri arvioitiin paremmaksi.

Sekä vertailunäytteen että tuntemattomana arvioidun vertailunäytteen hajua arvioitiin epämiellyttäväksi. Säilöntäainetta sisältävien näytteiden tuoksua kommentoitiin miellyttävämmäksi ja miedommaksi kuin vertailunäytteen tuoksua. Leipien rakenteen arvioinnissa ei ollut havaittavissa selkeää yksimielistä linjaa arvioijien kesken. Tähän voi vaikuttaa mahdolliset eroavaisuudet näytteiden ylöslyönnissä, jotka aiheuttivat erot näytteiden välillä.

Arvioijat kokivat säilöntäainetta sisältävät näytteet selkeästi paremman makuisiksi kuin vertailunäyte ja tuntemattomana esitetty vertailunäyte. Vertailunäytteessä havaittiin vahvaa ja epämiellyttävää makua. Säilöntäainetta sisältävät näytteet arvioitiin murenevammiksi ja leipämäisemmän makuisiksi, vaikkakin maku koettiin heikoksi.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli vertailla toimeksiantajalla jo käytössä olevaa kemiallista säilöntäainetta luonnonmukaiseen säilöntäaineeseen ja arvioida niiden vaikutusta toimeksiantajan tuotteesta eristettyyn homeeseen. Opinnäytetyön laboratoriotutkimuksissa todettiin toimeksiantajan näytteestä eristetyn homeen reagoivan happamuuden alenemiseen ja heikentävän tutkittavan homeen kasvua. Tutkimus vahvisti Salovaaran ym. (2017, s. 228) huomion siitä, että happamuuden alentaminen tehostaa säilöntäaineen vaikutusta. Kumpikaan säilöntäaine ei pystynyt estämään homekasvua tavallisen hiivaleivän happamuudessa (pH 6), kun kasvatusalusta altistettiin suurelle pitoisuudelle hometta. Happamuuden alentaminen lähelle hapatetun leivän happamuutta (pH 4,8) vaikutti merkittävästi säilöntäaineiden tehoon ja kummankin säilöntäaineen suurimmat tutkittavat pitoisuudet ehkäisivät tuolloin homekasvua tehokkaasti.

Mitä pienemmälle määrälle hometta kasvatusalusta altistettiin sitä paremmin myös pienemmät säilöntäainepitoisuudet toimivat hapatetun leivän pH:ssa. Tavallisen hiivaleivän happamuudessa ei ollut havaittavissa yhtä voimakasta vaikutusta. Voitiin kuitenkin havaita, että tutkimuksen mukaan luonnonmukainen säilöntäaine suojasi näkyvältä homekasvulta noin vuorokauden pidempään kuin kemiallisesti valmistettu säilöntäaine. Luonnonmukainen säilöntäaine myös hidasti homepesäkkeiden kehittymistä jonkin verran paremmin kuin kemiallinen säilöntäaine, jolloin pesäkkeet eivät viidentenä päivänä olleet kehittyneet yhtä tyypillisen näköisiksi kuin kemiallista säilöntäainetta sisältävissä kasvatusalustoissa. Opinnäytetyön tutkimusten perusteella voitaisiin todeta, että luonnonmukaisella säilöntäaineella pystyttäisiin hidastamaan homeen kasvua ainakin yhtä tehokkaasti kuin kemiallisella säilöntäaineella ja mahdollisesti pidentämään myyntiaikaa. Tämä lisäisi kilpailuetua leipomolle ja samalla vähentäisi jälleenmyyjien ja kuluttajien ruokahävikkiä.

Tutkimuksissa havainnollistettiin se, etteivät säilöntäaineet pysty suojaamaan leipää pitkään, jos se altistuu suurelle määrälle hometta. Varsinkin tavallinen hiivaleipä on altis homehtumaan säilöntäaineiden käytöstä huolimatta. Tämän vuoksi leipomoissa on tärkeää ottaa huomioon se, miten estetään homeitiöiden pääsy leipään paiston jälkeen. On olennaista, että leipomot tunnistavat tuotannon prosesseissa ne kohdat, jotka voivat aiheuttaa kontaminaatorisikin. Tämän jälkeen voidaan pyrkiä tekemään kontaminaatorisikiä pienentäviä toimenpiteitä, ja tällöin säilöntäaineen tarkoituksiksi jää vain lievän kontaminaation aiheuttaman homekasvun ehkäiseminen.

Toinen opinnäytetyön tavoite oli tutkia, miten säilöntäaineet vaikuttavat gluteenittoman leivän aistittaviin ominaisuuksiin. Aistinvarainen arviointi rajattiin koskemaan vain luonnonmukaista säilöntäainetta, koska kemiallinen säilöntäaine on jo käytössä toimeksiantajalla ja sen on todettu täyttävän leipomomien vaatimukset. Aistinvaraisen arvioinnin otanta oli suppea, jonka vuoksi arviointia voidaan ajatella vain suuntaa antavana. Lisäksi oman haasteensa toi arvioinnin suorittaminen ilman, että pääsin itse paikalle kertomaan osallistujille tutkimuksesta ja sen käytännöistä. Aistinvaraisen arvioinnin tulosten numeerinen arviointi jätettiin vähemmälle huomiolle tuloksia tarkastellessa ja keskityttiin lähinnä sanalliseen arviointiin. Tutkimuksessa havaittiin, että luonnonmukaista säilöntäainetta sisältävät näytteet arvioitiin yleisesti ottaen miellyttävimmiksi kuin säilöntäaineeton vertailunäyte. Tästä voidaan päätellä, että säilöntäaine ei aiheuttanut merkittäviä haitallisia muutoksia leivän ulkonäköön, hajuun ja makuun vaan se ehkäisi ajan tuomaa laadun heikentymistä. Näytteiden rakenne-eroihin voi vaikuttaa erot ylösleivonnassa, joka tehtiin käsin. Tarkempien tulosten saamiseksi aistinvarainen arviointi tulisi suorittaa aiempaa suuremmalla otannalla ja leivonta tulisi suorittaa toimeksiantajan omalla reseptillä. Tällöin tuote olisi tuttu raadille ja se pystyisi arvioimaan tarkemmin säilöntäaineen vaikutuksia tuotteen aistittaviin ominaisuuksiin.

Kolmas opinnäytetyön tavoite oli arvioida, voisiko luonnonmukaista säilöntäainetta käyttää nykyisen kemiallisen säilöntäaineen sijaan. Laboratoriotutkimusten mukaan luonnonmukainen säilöntäaine ehkäisi homekasvua jokseenkin paremmin kuin kemiallisesti valmistettu säilöntäaine. Entistä tarkempien tulosten saamiseksi laboratoriotutkimukset voitaisiin suorittaa suuremmalla määrällä rinnakkaismäärittämiä. Rinnakkaismäärittämisen avulla mikrobiologisen tutkimuksen mittaepävarmuus pienenee ja siten pystyttäisiin arvioimaan entistä luotettavammin säilöntäaineiden vaikutusta homekasvuun. Aistinvaraisessa arvioinnissa ei havaittu häiritseviä virheitä aistittavassa laadussa. Näiden tulosten valossa voisin kuitenkin pitää mahdollisena, että luonnonmukainen säilöntäaine voisi korvata käytössä olevan kemiallisen säilöntäaineen leipomoissa.

LÄHTEET

- Adams, M., McClure, P., & Moss, M. (2016). *Food microbiology* (4. uud. painos). Royal Society of Chemistry.
- Ahvenainen-Rantala, R. & Helen, H. (2010). *Pakkaustekniikat*. Teoksessa Saarela, A-M., Hyvönen, P., Määttä, S. & von Wright, A. (toim.), *Elintarvikeprosessit*. (3. uudistettu painos). Savonia-ammattikorkeakoulu.
- Aro, N., Koponen, H., & Lankinen, P. (2018). *Homeet*. Teoksessa S. Timonen & J. Valkonen (toim.), *Sienten biologia*. (2. uud. laitos). Gaudeamus. <http://hdl.handle.net/10138/313222>
- Belitz, H.-D. & Grosch, W. (1999). *Food chemistry* (2. uud. painos). Springer-Verlag.
- Bioscreen. (2021). *Bioscreen C Pro*. http://www.bioscreen.fi/?page_id=55
- Blohm, M. & Frej, J. (2016). *Entistä parempaa gluteenitonta leipää* (L. Beck, käänt.). MS Printing. (2015).
- Cauvain, S. (2015). *Technology of breadmaking* (3. painos). Springer
- Damodaran, S. & Parkin, K. (2017). *Fennema's food chemistry* (5. uud. painos). CRC Press.
- Garcia, M., Garcia-Cela, E., Magan, N., Venturini Copetti, M. & Medina, A. (8.6.2021). *Comparative growth inhibition of bread spoilage fungi by different preservative concentrations using a rapid turbidimetric assay system*. *Frontiers in Microbiology*, 12 (678406), 1 – 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678406>
- Hallanvuori, S., & Johansson, T. (2010). *Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat* (Eviran julkaisu 1/2010). Evira.
- Ijäs, T., & Saloniemi, M. (2021). *Hallitse elintarvikehygienia* (1. uud. painos). Hygieniakonsultointi Saloniemi Oy.
- Ijäs, T., & Välimäki, M. (2004). *Elintarvikehygienia -lainsäädäntö* (uud. laitoksen 2. painos). Otava.
- Korkeala, H. (toim.). (2007). *Elintarvikehygienia*. WSOY Oppimateriaalit Oy.
- Lapveteläinen, A. (2010). *Aistinvarainen arviointi*. Teoksessa Saarela, A-M., Hyvönen, P., Määttä, S. & von Wright, A. (toim.), *Elintarvikeprosessit*. (3. uudistettu painos). Savonia-ammattikorkeakoulu.

- Niemi, V., Rahkio, M., & Siitonen, A. (2004). *Ruokaturvallisuuden käsikirja*. Art House.
- Pönkä, A. (1999). *Ruokamyrkytykset ja elintarvikehygienia*. Suomen Ympäristöterveys Oy.
- Ruokatieto. (i.a.). *Esimerkki: lisäaineet*. <https://www.ruokatieto.fi/sv/node/28771>
- Ruokavirasto. (30.3.2020). *Elintarvikelisäaineryhmät*. <https://www.ruokavirasto.fi/yritykset/elintarvikeala/valmistus/yhteiset-koostumusvaatimukset/elintarvikeparanteet/lisäaineet/lisäaineryhmat/>
- Salovaara, H., Ignatius, A., Jussila, A., & Hurri-Martikainen, M. (2017). *Leivonnin teknologia: Ruokaleipä*. Suomen Leipuri liitto ry.
- Seinäjoen ammattikorkeakoulu. (25.11.2014). *Bioscreen C*. [Opintomateriaali]. SeAMK.
- Sojakka, K. & Välimäki, M. (2011). *Ammatillinen mikrobiologia*. Opetushallitus.
- Stranks, J. (2007). *The A – Z of food safety*. Thorogood Publishing Ltd.
- Tuorila, H. & Appelbye, U. (toim.). (2005). *Elintarvikkeiden aistinvaraiset tutkimusmenetelmät*. Yliopistopaino.
- Tuorila, H., Parkkinen, K. & Tolonen, K. (2008). *Aistit ammattikäyttöön*. WSOY Oppimateriaalit Oy.

LIITTEET

Liite 1. Mikrobiologisen viljelyn homepesäkemäärät

Liite 2. Aistinvaraisen arvioinnin lomake

Liite 3. Aistinvaraisen arvioinnin tulokset

Liite 1. Mikrobiologisen viljelyn homepesäkemäärät

Vrk	0,6 % (pmy/g)	0,7% (pmy/g)	0,8 % (pmy/g)	0,1 % (pmy/g)	0,15 % (pmy/g)	0,2 % (pmy/g)
1	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³
2	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³
3	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³
4	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³
5	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³

Pesäkemäärä kasvualustassa, jonka pH on 6 ja johon on siirrostettu 10 000 pmy/g tutkittavaa hometta

Vrk	0,6 % (pmy/g)	0,7% (pmy/g)	0,8 % (pmy/g)	0,1 % (pmy/g)	0,15 % (pmy/g)	0,2 % (pmy/g)
1	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³
2	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³
3	1000	<10 ³	<10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	<10 ³
4	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	<10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	<10 ³
5	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	<10 ³	>150 x 10 ³	>150 x 10 ³	14 x 10 ³

Pesäkemäärä kasvualustassa, jonka pH on 4,8 ja johon on siirrostettu 10 000 pmy/g tutkittavaa hometta

Vrk	0,6 % (pmy/g)	0,7% (pmy/g)	0,8 % (pmy/g)	0,1 % (pmy/g)	0,15 % (pmy/g)	0,2 % (pmy/g)
1	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴
2	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴
3	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴
4	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴
5	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴

Pesäkemäärä kasvualustassa, jonka pH on 6 ja johon on siirrostettu 1000 pmy/g tutkittavaa hometta

Vrk	0,6 % (pmy/g)	0,7% (pmy/g)	0,8 % (pmy/g)	0,1 % (pmy/g)	0,15 % (pmy/g)	0,2 % (pmy/g)
1	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴
2	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴
3	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	>150 x 10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴
4	>150 x 10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	<10 ⁴
5	>150 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	<10 ⁴	>150 x 10 ⁴	>150 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴

Pesäkemäärä kasvualustassa, jonka pH on 4,8 ja johon on siirrostettu 1000 pmy/g tutkittavaa hometta

Vrk	0,6 % (pmy/g)	0,7% (pmy/g)	0,8 % (pmy/g)	0,1 % (pmy/g)	0,15 % (pmy/g)	0,2 % (pmy/g)
1	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵
2	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	9 x 10 ⁵	12 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵
3	66 x 10 ⁵	65 x 10 ⁵	62 x 10 ⁵	71 x 10 ⁵	72 x 10 ⁵	72 x 10 ⁵
4	67 x 10 ⁵	68 x 10 ⁵	62 x 10 ⁵	73 x 10 ⁵	72 x 10 ⁵	73 x 10 ⁵
5	68 x 10 ⁵	72 x 10 ⁵	63 x 10 ⁵	73 x 10 ⁵	73 x 10 ⁵	73 x 10 ⁵

Pesäkemäärä kasvualustassa, jonka pH on 6 ja johon on siirrostettu 100 pmy/g tutkittavaa hometta

Vrk	0,6 % (pmy/g)	0,7% (pmy/g)	0,8 % (pmy/g)	0,1 % (pmy/g)	0,15 % (pmy/g)	0,2 % (pmy/g)
1	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵
2	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵
3	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵
4	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	14 x 10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵
5	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	33 x 10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵

Pesäkemäärä kasvualustassa, jonka pH on 4,8 ja johon on siirrostettu 100 pmy/g tutkittavaa hometta

Vrk	pH 6 10^{-3}	pH 6 10^{-4}	pH 6 10^{-5}	pH 4,8 10^{-3}	pH 4,8 10^{-4}	pH 4,8 10^{-5}
1.	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	$<10^5$	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	$<10^5$
2.	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	72×10^5	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	52×10^5
3.	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	93×10^5	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	79×10^5
4.	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	96×10^5	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	81×10^5
5.	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	97×10^5	$>150 \times 10^3$	$>150 \times 10^4$	82×10^5

Ilman säilöntäainetta

Liite 2. Aistinvaraisen arvioinnin lomake

Gluteenittoman leivän aistinvarainen arviointi

Päivämäärä:

1. Ulkonäkö

Arvioitavasi on vertailunäyte 100 ja neljä muuta näytettä. Tutustu ensin 100-näytteen ulkonäköön ja tarkastele sitten muita näytteitä yksi kerrallaan. Arvioi näytteiden mahdollisen poikkeavuuden voimakkuus vertailunäytteeseen nähden pisteyttämällä ne seuraavasti:

- 0 = ei poikkeamaa
- 1 = juuri huomattava poikkeama
- 2 = heikko poikkeama
- 3 = selvä poikkeama
- 4 = voimakas poikkeama
- 5 = erittäin voimakas poikkeama

Luonnehdi mahdollisesti havaitsemaasi poikkeamaa sanallisesti.

Näyte	Poikkeama 0-5	Sanallinen kuvaus
101	-----	-----
102	-----	-----
103	-----	-----
104	-----	-----

2. Haju

Tutustu ensin 100-näytteen hajuun ja haista sitten muita näytteitä yksi kerrallaan. Arvioi näytteiden mahdollisen poikkeaman voimakkuus vertailunäytteeseen nähden pisteyttämällä ne seuraavasti:

- 0 = ei poikkeamaa
- 1 = juuri huomattava poikkeama
- 2 = heikko poikkeama
- 3 = selvä poikkeama
- 4 = voimakas poikkeama
- 5 = erittäin voimakas poikkeama

Luonnehdi mahdollisesti havaitsemaasi poikkeamaa sanallisesti.

Näyte	Poikkeama 0-5	Sanallinen kuvaus
101	-----	-----
102	-----	-----
103	-----	-----
104	-----	-----

3. Rakenne

Tutustu ensin viipaloidun vertailunäytteen rakenteeseen ja tarkastele sitten muita näytteitä yksi kerrallaan. Arvioi näytteiden mahdollisen poikkeaman voimakkuus vertailunäytteeseen nähden pisteyttämällä ne seuraavasti:

- 0 = ei poikkeamaa
- 1 = juuri huomattava poikkeama
- 2 = heikko poikkeama
- 3 = selvä poikkeama
- 4 = voimakas poikkeama
- 5 = erittäin voimakas poikkeama

Luonnehdi mahdollisesti havaitsemaasi poikkeamaa sanallisesti.

Näyte	Poikkeama 0-5	Sanallinen kuvaus
101	_____	_____
102	_____	_____
103	_____	_____
104	_____	_____

3. Maku ja suutuntuma

Tutustu ensin 100-näytteen makuun ja suutuntumaan. Maista sitten muita näytteitä yksi kerrallaan. Arvioi näytteiden mahdollisen poikkeaman voimakkuus vertailunäytteeseen nähden pisteyttämällä ne seuraavasti:

- 0 = ei poikkeamaa
- 1 = juuri huomattava poikkeama
- 2 = heikko poikkeama
- 3 = selvä poikkeama
- 4 = voimakas poikkeama
- 5 = erittäin voimakas poikkeama

Luonnehdi mahdollisesti havaitsemaasi poikkeamaa sanallisesti.

Näyte	Poikkeama 0-5	Sanallinen kuvaus
101	_____	_____
102	_____	_____
103	_____	_____
104	_____	_____

Muita huomiota: _____

Liite 3. Aistinvaraisen arvioinnin tulokset

	0,8 %	0,6 %	0,7 %	Vertailunäyte (ei säilöntäainetta)
Ulkonäkö	1	2	1	2
	3	2	2,5	1,5
	4	3	3	1
	3	2	4	1
Keskiarvo	2,8	2,3	2,6	1,4
Keskihajonta	1,1	0,4	1,1	0,4
Kommentit	<ul style="list-style-type: none"> tummempi sisus ja kuori tummempi, pienempi, isompia rakkuloita hyvä paistoväri 	<ul style="list-style-type: none"> tummiä kohtia vähän tummempi vaaleampi 	<ul style="list-style-type: none"> hyvä paistoväri vähän tummempi, matalampi 	<ul style="list-style-type: none"> kuohkeampaa sisus vähän tummempi, kuori vaalea hieman korkeammaksi jäänyt vaaleampi
Haju	1	1	1	1
	4	4	4	1
	4	3	3	1
	1	2	2	4
Keskiarvo	2,5	2,5	2,5	1,8
Keskihajonta	1,5	1,1	1,1	1,5
Kommentit	<ul style="list-style-type: none"> miellyttävämpi haju leipämäisempi haju 	<ul style="list-style-type: none"> miellyttävämpi haju tunkkainen haju 	<ul style="list-style-type: none"> miellyttävämpi haju raikkaampi haju 	<ul style="list-style-type: none"> todella voimakas haju, vielä tujumpi kuin vertailunäytteessä paha voimakas haju, kissanpissamainen voimakkain tuoksu
Rakenne	1	1	1	2
	3	2	2	1
	4	2	3	3
	1	1	1	1
Keskiarvo	2,3	1,5	1,8	1,8
Keskihajonta	1,3	0,5	0,8	0,8
Kommentit	<ul style="list-style-type: none"> isompia huokosia, vähän murenevampi isoja rakkuloita sisällä, sitkeämpi 	<ul style="list-style-type: none"> tiivimpi huokosrakenne ei niin kuohkea rakenne 	<ul style="list-style-type: none"> tiivimpi huokosrakenne tiivis alaosa, kuohkeampi yläosa 	<ul style="list-style-type: none"> kuohkeamman tuntuinen vähän tiiviimpi huokosrakenne muuten samantyylinen rakenne, mutta sitkeämpi
Maku	1	1	1	1
	3	3	3	2
	2	2	3	3
	1	1	1	1
Keskiarvo	1,75	1,75	2	1,75
Keskihajonta	0,8	0,8	1	0,8
Kommentit	<ul style="list-style-type: none"> leipämäisempi maku, mutta heikko murenevampi, miellyttävämpi 	<ul style="list-style-type: none"> leipämäisempi maku, mutta heikko murenevampi, miellyttävämpi 	<ul style="list-style-type: none"> leipämäisempi maku, mutta heikko viljan maku 	<ul style="list-style-type: none"> pistävä teollinen maku, etova vahva hiivan maku tai joku muu vähän epämiellyttävä
Yleiset kommentit	<p>Suuntuntuma sama, mutta suolanmäärä lisääntyy Vertailunäyte maistuu vanhalta hiivaleivältä Haju ei hyvä Suola olisi tuonut makuja paremmin esiin Verrokki oli huonon makuinen</p>			