

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2024

Hanna Varemäki

Mäskin UV-käsittely



Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2024 | 24 sivua

Hanna Varemäki

Mäskin UV-käsittely

Maailmassa syntyy mäskiä noin 39 miljoonaa tonnia vuodessa. Mäski pilaantuu herkästi, koska sillä on korkea vesipitoisuus sekä runsaasti mikrobeille sopivia typen ja hiilen lähteitä. Tämä mahdollistaa bakteerien, homeiden ja hiivojen voimakkaan kasvun. Mäskillä on varsin pienet mikrobimäärät vielä keiton jälkeen, mutta se alkaa pilaantua jo tunneissa, joten sen jatkojalostus on haastavaa. Suurin osa mäskistä päätyykin eläinten rehuksi, ja loput menevät biokaasulaitoksille tai kaatopaikalle.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia UV-valon tehokkuutta mäskin steriloinnaksi, jotta sen jatkojalostus olisi mahdollista. UV-valon tehokkuutta mitattiin erilaisilla etäisyyksillä ja altistusajoilla: 10 cm, 15 cm ja 20 cm, sekä 10 min, 20 min ja 30 min. UV-valoksi valittiin Sylvania G30W UV-C lamppu, jonka aallonpituus on 253,7 nm. Näytteistä mitattiin kasvukäyrä spektrofotometrillä, ja 15 cm etäisyydellä ja 30 min altistusajalla olevasta näytteestä tehtiin lisäksi mikrobiologinen viljelmä maljaustekniikalla.

Sekä spektrofotometri että maljaus paljastavat, että Ruokaviraston ja Elintarviketeollisuusliiton määrittelemät mikrobiologiset rajat ylittyvät reippaasti jo kolmantena päivänä. Samalla spektrofotometri paljastaa, ettei UV-valon etäisyydellä ollut vaikutusta tuloksiin. Tästä on vedettävä johtopäätös, että UV-valo ei ollut toimiva menetelmä mäskin steriloinnaksi, vaan mäski tulisi edelleen käyttää heti keiton jälkeen.

Asiasanat:

mäski, ultraviolettisäteily, säilöntämenetelmät, elintarvikemikrobiologia

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2024 | 24 pages

Hanna Varemäki

UV treatment of mash

About 39 million tons of mash is produced in the world per year. The mash spoils very easily because it has a high water content, as well as plenty of nitrogen and carbon sources suitable for microbes. This makes further processing challenging. That is why most of the mash ends up as animal feed and the rest goes to biogas plants or landfills.

The aim of this thesis was to investigate the effectiveness of UV light for sterilizing the mash so that its further processing is possible. The efficiency of UV light was measured at different distances and exposure times: 10 cm, 15 cm and 20 cm, and 10 min, 20 min and 30 min. A Sylvania G30W UV-C lamp with a wavelength of 253.7 nm was chosen as the UV light. The growth curve of the samples was measured with a spectrophotometer, and a microbiological culture was also made from the sample at a distance of 15 cm and with an exposure time of 30 min using the pour plate method.

Both the spectrophotometer and the culture reveal that the microbiological limits are quickly exceeded already on the third day. At the same time, the spectrophotometer reveals that the distance of the UV light had no effect on the results. The conclusion to be drawn from this is that UV light was not a viable method for sterilizing the mash, and it should still be used immediately after boiling.

Keywords:

mash, ultraviolet radiation, food preservation technique, food microbiology

Sisällys

1 Johdanto	1
2 Oluen valmistus	3
3 Mäski	5
3.1 Säilyvyys	7
3.2 Käyttömahdollisuudet	8
4 UV-käsittely	10
5 Tutkimusasetelma	12
5.1 Näytteiden valmistelu	14
5.2 Spektrofotometri	14
5.3 Maljaus	15
6 Tulokset	16
6.1 Spektrofotometri	16
6.2 Maljaus	18
7 Loppupäätelmät	20

Kuvat

Kuva 2. Mäskin kiertokulku. (Bianco, et al., 2020)	1
Kuva 1. Tuoretta mäskiä. (Bianco, et al., 2020)	5
Kuva 3. UV-laitteisto.	13
Kuva 4. 0. päivän malja.	19
Kuva 5. Yhdeksän päivää vanha mäski.	20

Kaaviot

Kaavio 1. Spektrofotometrilla saadut bakteerien kokonaismäärät.	17
Kaavio 2. Maljauksen tulokset.	19

Taulukot

Taulukko 1. Mäskin koostumus. (Castro & Colpini, 2021)	6
Taulukko 2. Mäskin alkuainekoostumus. (Castro & Colpini, 2021)	7
Taulukko 3. Peptoniveden resepti. (Pohjoismaiden elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2010)	12
Taulukko 4. Agarin resepti.	12
Taulukko 5. Spektrofotometrin tulokset.	16
Taulukko 6. Spektrofotometrilla mitattu kokonaisbakteerimäärä.	17
Taulukko 7. Maljauksen tulokset.	18

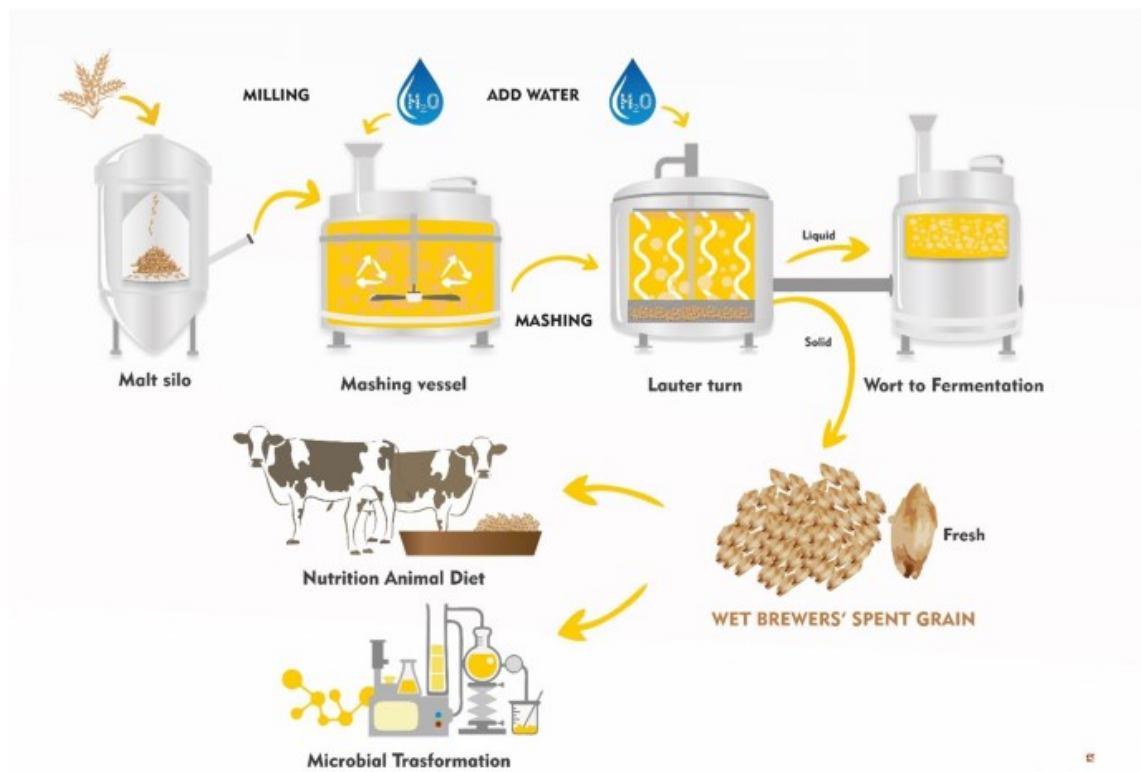
1 Johdanto

Tämä työ tehtiin Kupittaa Campus Brewerylle. Se on Turun ammattikorkeakoulun oma pienpanimo, joka on perustettu vuonna 2021. Työn tavoitteena on tutkia UV-valon tehokkuutta mäsken steriloinnissa.

Mäski on oluen valmistuksen sivutuote, josta päättyy maailmanlaajuisesti noin 70 % eläinten rehuksi ja loput biokaasun lähtöaineeksi sekä kaatopaikalle.

Mäskiä syntyy noin 21 – 22 kg per hehtolitra valmista olutta, yhteensä noin 39 miljoonaa tonnia vuodessa. (Bianco, et al., 2020)

Mäsken kiertokulkua on esitetty kuvassa 2.



Kuva 1. Mäsken kiertokulku. (Bianco, et al., 2020)

Mäski on kuitenkin hyvin ravintorikasta, joten on sääli tuhlaata sitä. Niinpä vuosien saatossa on alettu tutkia sen muita käyttömahdollisuuksia. Suurin ongelma mäsissä on, että se pilaantuu hyvin herkästi. Se on sekä kostea, että ravintorikasta, joten se on hyvä kasvualusta erilaisille mikrobeille.

UV-valolla sterilointi on nopeaa ja tehokasta, joten nyt tutkittiin voisiko sitä soveltaa myös mäskin sterilointiin, jotta sille saataisiin pidempi säilyvyysaika ja näin enemmän mahdollisuuksia jatkokäyttöä ajatellen. UV-valon tehoa tutkittiin erilaisilla etäisyys - käsittelyaika kombinaatioilla. Etäisyyksiä olivat 10, 15 ja 20 cm mäskin pinnasta, ja käsittelyaikoja oli 10, 20 ja 30 minuuttia. Tuloksia tutkittiin spektrofotometrillä ottamalla näytteet käsitellystä mäskistä joka toinen vuorokausi kahden viikon ajan. Lisäksi yhdistelmästä 15 cm – 30 min bakteerien kasvua tutkittiin maljausmenetelmällä, ja näistä näytteet otettiin kolmen vuorokauden välein.

2 Oluen valmistus

Olut on viljapohjainen alkoholijuoma, joka on yksi suosituimmista alkoholijuomista maailmassa. Vuonna 2020 olutta kulutettiin jopa noin 1,88 miljardia litraa maailmanlaajuisesti. (Gao, et al., 2024)

Olut valmistetaan käymisteitse yksinkertaisista raaka-aineista: maltaista, humalasta, hiivasta ja vedestä. Maltaat ovat viljojen jyviä. Ohramallas on yleisin käytetty mallas, mutta muitakin viljoja käytetään. Maltaasta saadaan fermentaatioissa vaaditut sokerit ja muut hiilihydraatit, kuten myös tyyppiyhdisteet, ja se antaa oluelle makua ja väriä. Humala on köynnöskasvi, jonka kukista saadaan oluen maku ja katkeruutta. Yleensä humala jaetaan karvaisiin tai aromaattisiin humaloihin niiden α - ja β -happopitoisuuksien perusteella. Hiivat puolestaan ovat yksisoluisia mikro-organismeja, jotka muuttavat maltaista saatuja sokereita etanoliksi ja hiilidioksidiksi. Hiivat tuottavat myös suuren määrän oluen makuun vaikuttavia yhdisteitä, kuten alkoholeja, estereitä, happoja ja rikkiyhdisteitä. (Saarela, et al., 2010)

Oluen tavallisimmassa valmistustavassa on kahdeksan eri vaihetta. Oluen valmistus aloitetaan maltaiden jauhatuksella. Maltaat jauhetaan myllyssä ja uuttaminen sekä hydrolyysi ovat sitä tehokkaampia mitä hienommaksi maltaat jauhetaan. Tällöin tärkkelyksen entsyymeillä on enemmän pinta-alaa, jolla toimia. Nimenomaan näitä entsyymejä käytetään hyödyksi mäsikäyksessä. Maltaita ei kuitenkaan saa jauhaa liian hienoksi, sillä hienoksi jauhettu mallas sitoo itseensä suuren määrän nestettä ja muodostaa näin paksun puuron, joka tekee siivilöinnistä hyvin hankalaa. (Mäkinen & Enari, 1993) (Barth, 2013)

Kun maltaat ovat jauhettu, siirrytään mäsikäykseen. Mäsikäyksessä rouhitut maltaat sekoitetaan veteen, ja niitä keitetään keitto-ohjelman mukaisesti 35 °C - 78 °C useamman tunnin ajan riippuen halutusta oluttyypistä. Mäsikäyksen päätavoite on saada tärkkelys hajoamaan sokereiksi, jotta hiiva voi edelleen tuottaa etanolia ja hiilidioksidia. Lisäksi tärkeitä reaktioita ovat proteiinien ja β -glukaanien hajoaminen liukeneviksi yhdisteiksi. (Barth, 2013) (Mäkinen & Enari, 1993)

Kun mäsikäys on päättynyt, mäsikäysjäte ja vesi, johon maltaiden ravintoaineet ovat liuenneet, erotetaan. Mäski huuhdellaan kuumalla vedellä, jotta mahdollisimman vähän ravintoaineita menisi hukkaan. Neste eli vierre jatkaa prosessia valmiiksi olueksi, ja jäljelle jäävä mäsikäysjäte eli mäski jatkaa tietään hävikkiin. (Mäkinen & Enari, 1993)

Mäsikäyksen jälkeen vierre keitetään. Keiton tarkoituksena entsyymien denaturoiminen, proteiinien ja polyfenolien muodostamien yhdisteiden saostaminen, vesi ja mahdollisesti haitallisten yhdisteiden haihduttaminen sekä vierteen sterilointi. Keiton aikana vierteeseen lisätään myös humalat makua antamaan. Humalat lisätään keittoon oluttyypistä riippuen eri aikoina. Keitto kestää yleensä noin 1,5–2 tuntia. (Mäkinen & Enari, 1993)

Keiton jälkeen vierre jäädytetään nopeasti käymislämpötilaan, noin 10 °C. Humalat ja mahdolliset muut makua tuottavat aineet poistetaan vierteestä. Tässä vaiheessa pitää olla hyvin varovainen kontaminaation suhteen, sillä se aiheuttaa oluelle pahoja sivumakuja ja sameutta. (Barth, 2013)

Jäädytyksen jälkeen vierteeseen lisätään hiiva fermentaation alkamiseksi. Vierteeseen lisätään happea, jotta hiivalla olisi tarvittavat elinolosuhteet toimiakseen. Hiiva lisätään vierteeseen, ja sen annetaan käydä. Hiiva käyttää sokeria ja tuottaa etanolia ja hiilidioksidia seuraavanlaisen kaavan mukaan:

$C_6H_{12}O_6$ (sokeri) \rightarrow 2 CO_2 (hiilidioksidi) + 2 C_2H_5OH (etanoli). (Barth, 2013)

Kun varsinainen käyminen on suoritettu, raakaolut siirretään vielä jälkikäymään. Ale-tyyppisille oluille jälkikäyminen vie muutaman päivän, kun taas esimerkiksi lager-tyyppisille oluille jälkikäyminen vie viikkoja. Jälkikäymisen viimeinen vaihe on yleensä suodatus, jolloin kaikki hiiva suodatetaan oluesta pois. Tämän jälkeen olut pakataan ja se on valmista nautittavaksi. (Barth, 2013)

3 Mäski

Mäski koostuu pääsääntöisesti maltaiden kuorista. Mäskin ulkonäköä on havainnollistettu kuvassa 1. Suurin osa maltaiden hiilihydraateista pilkkoutuu pienemmiksi molekyyleiksi, jotka liukenevat vierreeseen, mutta pääosa proteiineista, kuoriaineksista ja rasvasta jää mäskiin. Alkuperäisestä ravintosisällöstä on veteen liukenematonta jäljellä vielä noin 23 – 33 %. (Mäkinen & Enari, 1993)



Kuva 2. Tuoretta mäskiä. (Bianco, et al., 2020)

Mäskin ravintoarvo on varsin korkea ja itse asiassa suurin osa maltaan ravintoaineista jää mäskiin. On laskettu, että 5 g märkää mäskiä vastaa ravintoarvoltaan 1 kg ohraa. Mäskin kemiallinen koostumus on esitetty taulukossa 1. Koostumus voi vaihdella sen mukaan, mitä maltaita oluessa käytetään. (Mäkinen & Enari, 1993)

Taulukko 1. Mäskin koostumus. (Castro & Colpini, 2021)

Aine	%
kosteus	77,8
tuhka	2,3
proteiini	18,1
rasva	1,6
pelkistävä sokeri	2,6
ei-pelkistävä sokeri	0,5
tärkkelys	26,6
raakakuitu	21,6
NDF-kuitu (neutral detergent fibre)	36,8
ADF-kuitu (acid detergent fibre)	12,8
selluloosa	24,0
ligniini	3,4
hemiselluloosa	9,4

Mäski koostuu siis suurimmaksi osaksi kuiduista ja proteiineista. Hemiselluloosa ja selluloosa ovat sokereista koostuvia jakeita, joten sokerit vastaavatkin noin puolta mäskin koostumuksesta. Sokerien lisäksi myös proteiineilla on mäskissä suuri osuus. Näistä proteiineista noin 30 % on välttämättömiä aminohappoja, kuten lysiiniä ja leusiinia. Ei-välttämättömiä aminohappoja edustavat taas histidiini ja glutamiinihappo. (Mussatto, 2013)

Mäskin energiapitoisuuden on laskettu olevan noin 4825 kcal/kg, joka on varsin korkea. Mäskin alkuainekoostumus on puolestaan esitetty taulukossa 2. (Castro & Colpini, 2021)

Taulukko 2. Mäskin alkuainekoostumus. (Castro & Colpini, 2021)

Alkuaine	%
hiili	82,7
happi	16,0
pii	0,1
magnesium	0,3
kalium	0,1
kalsium	0,9

Lopuksi mäski sisältää myös mineraaleja, joista pii, kalium ja kalsium ovat huomattavimmat. Juuri hemiselluloosan ja proteiinien korkeiden pitoisuuksien vuoksi mäskin jatkojalostaminen elintarvike- ja bioteknologisiin tarkoituksiin olisi kannattavaa. (Mussatto, 2013)

3.1 Säilyvyys

Kun mäski keitto-ohjelman päätteeksi erotetaan vierteestä, siinä on vielä maltilliset mikrobimäärät ja sitä voisi käyttää sellaisenaan ilman erillistä sterilointia. Mäski vaatii kuitenkin useamman tunnin jäähtyäkseen, ja sinä aikana se alkaa jo pilaantua. Mäski pilaantuu todella herkästi, koska sillä on korkea vesipitoisuus sekä runsaasti proteiineja ja sokereita. Tämä mahdollistaa bakteerien, homeiden ja hiivojen voimakkaan kasvun. Siksi mäski tulisi stabiloida ja varastoida sopivissa olosuhteissa, jotta sen jatkokäyttö olisi mahdollista. (Mussatto, 2013) (Bianco, et al., 2020)

Mäskiä voidaan kuivata, jolloin sen säilyvyys paranee. Tällöin mäskistä poistetaan liika vesi ensin puristimilla, jonka jälkeen se siirretään esimerkiksi rumpukuivaajiin, jossa se kuivataan 60 °C. Kuivauksen jälkeen kuiva mäski vielä jauhetaan ja paletoidaan, jotta sitä olisi helpompi varastoida ja kuljettaa. Kuivaus vaatii kuitenkin paljon energiaa ja on siksi varsin kallista. Tehokkaita mäskin säilöntätapoja ovat myös autoklaavaus (120 °C 1 h) tai pakastus. (Mäkinen & Enari, 1993) (Bianco, et al., 2020)

3.2 Käyttömahdollisuudet

Mäskiä käytetään pääsääntöisesti eläinten rehuksi. Sitä voidaan lähettää tuoreena suoraan käyttäjille, esimerkiksi karjatiloilta, tai siitä voidaan tehdä säilörehua. Tällöin pilaantumisen estämiseksi sekaan lisätään happoa (suola-, fosfori-, muurahais-, tai maitohappoa). Ravintoarvojen parantamiseksi sekaan voidaan lisätä myös maitohappobakteeria sekä sopivaa rehua kuten ohraa tai muuta viljaa. (Mäkinen & Enari, 1993)

Mäskin lisäämisen ruokavalioon on todettu esimerkiksi lehmillä kasvattavan maidon tuotantoa sekä sen kokonaiskuiva-ainepitoisuutta samalla kun maidon rasvapitoisuus pienenee. (Mussatto, 2013)

Mäski on myös erittäin hyvä kasvatusalusta mikrobeille, kuten entsyymeille, antibiooteille, polysakkarideille ja aminohapoille. Mäskäysjäte ei yksinään riitä, koska siinä on liian vähän hiilihydraatteja, mutta sekoitettuna esimerkiksi viljaan tai myllyjätteisiin se on hyvin toimiva kasvatusalusta. (Mäkinen & Enari, 1993)

Mäski, joka ei päädy eläinten rehuksi, päättyy esimerkiksi biokaasulaitoksille, etanolin tuotantoon tai biopolttoaineen raaka-aineeksi. Mäskistä on myös tehty erilaista paperia sen kuitupitoisuuden ansiosta. Yksi lupaavimmista mäskin ominaisuuksista on sen kyky toimia adsorboivana aineena. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää esimerkiksi jätekaasun puhdistuksessa orgaanisista aineista, sekä jäteveden värjäytymien poistossa. Mäskistä voidaan myös tuottaa aktiivihientä, jota käytetään veden ja kaasujen puhdistuksessa. (Mussatto, 2013)

Koska mäskiä syntyy niin paljon ja se on niin ravintorikasta, sen käyttöä on alettu tutkia myös ihmisten ravintona. Kuivattua ja jauhettua mäskiä voidaan käyttää jauhon tapaan, ja siitä on sovellettu esimerkiksi leipiä, kakkuja, tortilloja ja erilaisia välipaloja. Mäskin lisääminen leipomuksiin lisää tuotteiden proteiini-, kuitu- ja aminohappopitoisuutta. Lisäksi mäski parantaa veden imeytymistä sekä alentaa rasvan imeytymiskykyä lopputuotteelle. Mäskiä ei voida kuitenkaan lisätä paljoa kerralla, sillä se on tumman väristä ja melko voimakkaan makuista. Yksi esimerkki mäskin käytöstä on makkaran valmistus.

Kun mäskiä lisätään makkaramassaan, sen kuitupitoisuus paranee ja samalla rasvapitoisuutta saadaan alemmas. Myös muihin lihatuotteisiin yhdistämistä on alettu tutkia. Uusimpia innovaatioita ovat myös kasvispohjaiset jogurtit. (Mussatto, 2013)

Mäski sisältää runsaasti bioaktiivisia fenoliyhdisteitä, joilla on antioksidanttivaikutuksia. Nämä voidaan ottaa talteen erilaisilla uutomenetelmillä ja käyttää siten luonnollisina lisäaineina keinotekoisien antioksidanttien sijaan. Mäskiä voidaan myös käyttää fermentaatioon, jolloin siitä voidaan tuottaa etanolia tai ksylitolia tai maitohappoa. Fermentaation kautta mäskiä voidaan myös yrittää palauttaa takaisin panimoiden käyttöön esimerkiksi tislattujen juomien kuten rommien ja viskien raaka-aineena. (Mussatto, 2013)

4 UV-käsittely

Ultraviolettisäteily on elektromagneettista säteilyä, jonka aallonpituus vaihtelee näkyvän valon ja röntgensäteilyn välillä, 100–400 nm. UV voidaan jakaa kolmeen eri luokkaan: UV-A, joka vaikuttaa välillä 315–400 nm, UV-B, joka vaikuttaa välillä 280–315 nm, ja UV-C, joka vaikuttaa välillä 100–280 nm. Perinteisesti UV-säteilyä on käytetty veden, ilman ja erilaisten pintojen sterilointiin. Erityisesti UV-C eli lyhyen aallonpituuden UV valo vahingoittaa bakteerien ja mikro-organismien solurakenteita estäen näin niiden kasvun ja lisääntymisen. UV-C sterilisaatio perustuu mikro-organismien vahingoittamiseen, erityisesti niiden nukleiinihappojen tuhoamiseen. Nukleiinihappo hajoaa 253,7 aallonpituudella. Niinpä kun ruokaa säteilytetään vähintään 254 aallonpituudella, nukleiinihapot hajoavat ja mikro-organismi ei enää kykene lisääntymään. (Teng, et al., 2023)

Tutkimuksissa on todettu UV-valon kykenevän tuhoamaan erilaisia viruksia, loisia ja vegetatiivisia soluja ja sieniä. UV-valo kykenee lisäksi vähentämään mykotoksiineja ja allergeeneja. Mikro-organismien herkkyys UV-valolle vaihtelee kuitenkin suuresti, koska niillä on esimerkiksi erilaiset soluseinien rakenteet, paksuudet, koostumukset, nukleiinihappojen rakenteet ja solujen kyky korjata UV-valosta aiheutuneet vauriot. (Yemmireddy, et al., 2022)

UV-sterilisaation on hyvä elintarvikkeiden sterilisoinnissa siksi, koska se on helppokäyttöinen eikä siinä käytetä mitään ylimääräisiä vahvoja kemikaaleja. UV-valo ei myöskään vahingoita raaka-aineen ulkonäköä eikä ravintosisältöä. Huonoja puolia ovat valon huono läpäisykyky (sillä voidaan steriloida vain raaka-aineen pinta, muttei sisältöä) sekä epätasainen annostus. (Teng, et al., 2023) (Yemmireddy, et al., 2022)

Esimerkkinä UV-valon heikosta läpäisykyvystä mainittakoon mehu. UV-valo kykenee läpäisemään mehua vain noin 1 mm 90 % valon absorptiolla. Siksi mehun onkin liikuttava steriloinnin aikana, jotta mahdollisimman paljon pinta-alaa saadaan altistettua valolle. Kirkkaassa nesteessä, esimerkiksi vedessä,

UV-valo menettää 30 % tehostaan jo 10 cm syvyydessä. (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, ei pvm)

UV-sterilisaatiota käytetään elintarviketeollisuudessa lähinnä nestemäisiin tuotteisiin, kuten maidon, mehujen ja hunajan sterilointiin. Sillä steriloidaan myös elintarvikkeiden pakkausmateriaaleja sekä ruuankäsittelyyn tarkoitettuja pintoja. Nykyisin UV-sterilointia käytetään myös tuoretuotteiden, kuten pilkkottujen hedelmien tai vihannesten, lihaleikkeiden yms. sterilointiin. (Yemmireddy, et al., 2022)

Vaikka UV-valon läpäisykyky on huono, sen huomattiin toimivan paremmin, kun mukaan otettiin vettä. Steriloitava raaka-aine upotetaan runsaaseen veteen, jolloin se pääsee vapaasti liikkumaan ja pyörimään, jolloin kaikki pinnat saavat UV-valosta annoksensa. Samalla voimakkaasti liikkuva vesi huuhtoo bakteereja raaka-aineen pinnalta, jolloin UV-valo saa ne paremmin tuhottua. (Liu, et al., 2015)

5 Tutkimusasetelma

Tämän työn käytännön osuudessa tutkittiin UV-valon tehoa maskin steriloinnissa. Aluksi valmistettiin peptonivettä, jota käytettiin näytteen laimentamiseen. Käytetty resepti on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Peptoniveden resepti. (Pohjoismaiden elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2010)

	Valmistaja	Tuotenumero	Eränumero	Määrä
natriumkloridi	VWR Chemicals	27810.295	22G124104	8,5 g
peptoni	Fluka Analytical	68971-500G- F	BCBM4768V	1 g
MQ-vettä				1 l

Peptoniveden ainekset punnittiin tarkkuusvaa'alla (Satorius laboratory, EL1129) säilöpulloon, minkä jälkeen peptonivesi autoklaavattiin 121 asteessa 15 minuuttia. (Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2010)

Lisäksi valmistettiin agarita taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. Agarin resepti.

	Valmistaja	Tuotenumero	Eränumero	Määrä
plate count agar	Difco	247940 – 500 G	2046187	23,5 g
MQ-vettä				1 l

Agar mitattiin tarkkuusvaa'alla dekanteriin ja sekaan lisättiin vesi. Tämä kuumennettiin kiehuvaan, ja annettiin kiehua yhden minuutin ajan. Tämän jälkeen seos siirrettiin säilöpulloon, ja se autoklaavattiin 121 °C 15 minuuttia.

Mäski saatiin maskäysohjelman jälkeen. Mäskiä hienonnettiin sauvasekoittimella kolmen minuutin ajan, jotta sen rakenne saataisiin rikki.

Tämän jälkeen dekantertiin mitattiin 100 g mäskiä ja 100 ml peptonivettä. Dekanttereita valmistettiin 11 kappaletta. Lisäksi yhteen dekantertiin punnittiin 200 g mäskiä, joka toimi nollanäytteenä eli se ei saanut UV-käsittelyä.

Seuraavaksi valmisteltiin UV-laitteisto, joka on esitelty kuvassa 3. Laitteisto rakennettiin laminaarikaappiin, ja UV-valona käytettiin kaapin omaa UV-lamppua, Sylvania G30W UV-C lamppua, jonka aallonpituus on 253,7 nm. UV-lamppu kiinnitettiin statiiviin, jotta sen etäisyyttä mäskistä voitiin säädellä. Kaappiin sijoitettiin tasoravistelija (IKA KS 260 Basic, BIO2100) ja dekanterit nostettiin siihen päälle. Tasoravistelija säädettiin teholle 200 1/min, jotta mäski pääsisi vapaasti liikkumaan peptonivedessä ja näin altistuisi kokonaisuudessaan UV-valolle.



Kuva 3. UV-laitteisto.

Laminaarikaappi peitettiin foliolla, jotta UV-valo heijastuisi mahdollisimman paljon mäskiin. UV-valo on lisäksi vaarallista ihmisille, joten samalla heitä suojattiin haitallisilta vaikutuksilta. Tässä työssä tutkittiin maskin altistusta UV-valolle erilaisilla aika-etäisyysyhdistelmillä:

- 10 cm – 10 min, 20 min ja 30 min
- 15 cm – 10 min, 20 min ja 30 min
- 20 cm – 10 min, 20 min ja 30 min.

Kun mäski oli ollut halutun aikaa UV-valon alla, se otettiin sieltä pois, ylimääräinen peptonivesi valutettiin pois ja dekanteri peitettiin huolellisesti kontaminaation välttämiseksi. Dekanterit siirrettiin lämpökaappiin 25 °C inkuboitumaan 11 vuorokaudeksi. (Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2010)

5.1 Näytteiden valmistelu

Dekanttereista otettiin aseptisesti 10 g näytettä. Tämä siirrettiin stomacherpussiin, jonne punnittiin seuraavaksi 90 g autoklaavissa steriloitua peptonivettä. Näytteiden annettiin seistä 30 min laminaarikaapissa. Tämän jälkeen näytteet homogenoitiin homogenisaattorissa (GWB Stomacher 400, EL1192) kahden minuutin ajan. Nämä näytteet vastasivat laimennosta 10^{-1} . (Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2010)

5.2 Spektrofotometri

Spektrofotometrillä mitattiin näytteistä niiden sameus eli absorbanssi, jotta saatiin bakteerien kasvukäyrä. Mittaus suoritettiin joka toinen päivä kahden viikon ajan, eli näytteet otettiin päivinä 0, 2, 4, 7, 9 ja 11. Ajoissa käytettiin muovisia kertakäyttökyvettejä (VIS), joihin mitattiin 1 ml näytettä. Nollanäytteenä käytettiin steriloitua peptonivettä, kuten näytteiden esikäsitelyssäkin. Kun näytteet oli esikäsitelty luvussa 4.1 mainitulla tavalla, mitattiin niistä absorbanssi aallonpituudella 600 nm.

5.3 Maljaus

Maljaus suoritettiin käsittelemättömästä näytteestä sekä yhdistelmästä 15 cm etäisyys UV-valosta – 30 min vaikutusaika.

Kun näytteet oli esikäsitelty, niistä tehtiin vielä lisälaimennokset 10-kertaislaimennoksilla peptoniliuoksella, eli 1 ml näytettä lisättiin 9 ml peptonivettä kunnes saavutettiin 10^{-7} -laimennos. (Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2010)

Yksi millilitra laimennosta pipetoitiin petrimaljalle, ja päälle lisättiin 15 ml agaria. Petrimaljoja pyöriteltiin pöydällä isossa kahdeksikossa, jotta näyte sekoittuisi kunnolla. Jokaisesta laimennoksesta tehtiin kaksi maljaa. Kun maljat olivat jähmettyneet, ne siirrettiin lämpökaappiin 30 °C 72 tunniksi. Tämän jälkeen maljoilta laskettiin pesäkkeet pesäkelaskurilla. (Pohjoismaiden elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2013)

6 Tulokset

Testeistä saatiin seuraavanlaiset tulokset.

6.1 Spektrofotometri

Spektrofotometrillä saatiin taulukossa 5 esitetyt tulokset.

Taulukko 5. Spektrofotometrin tulokset.

	0. päivä	2. päivä	4. päivä	7. päivä	9. päivä	11. päivä
käsittelemätön mäski	2,431	2,774	2,688	2,897	2,925	2,912
10 cm – 10 min	1,680	2,260	2,301	2,530	2,565	2,592
10 cm – 20 min	1,761	2,390	2,358	2,485	2,728	2,754
10 cm – 30 min	1,905	2,366	2,358	2,508	2,593	2,677
15 cm – 10 min	1,939	2,420	2,514	2,537	2,636	2,786
15 cm – 20 min	2,011	2,499	2,446	2,541	2,589	2,595
15 cm – 30 min	1,895	2,478	2,507	2,706	2,732	2,834
20 cm – 10 min	2,003	2,504	2,350	2,509	2,699	2,791
20 cm – 20 min	1,971	2,370	2,408	2,484	2,590	2,717
20 cm – 30 min	1,890	2,470	2,468	2,457	2,622	2,792

Käyttämällä E.Colin kokonaissolutiheyttä $OD_{600}: 1,0 = 8 * 10^8$ solua/ml saadaan taulukossa 6 esitetyt kokonaisbakteerimäärät. (Agilent Genomics, ei pvm)

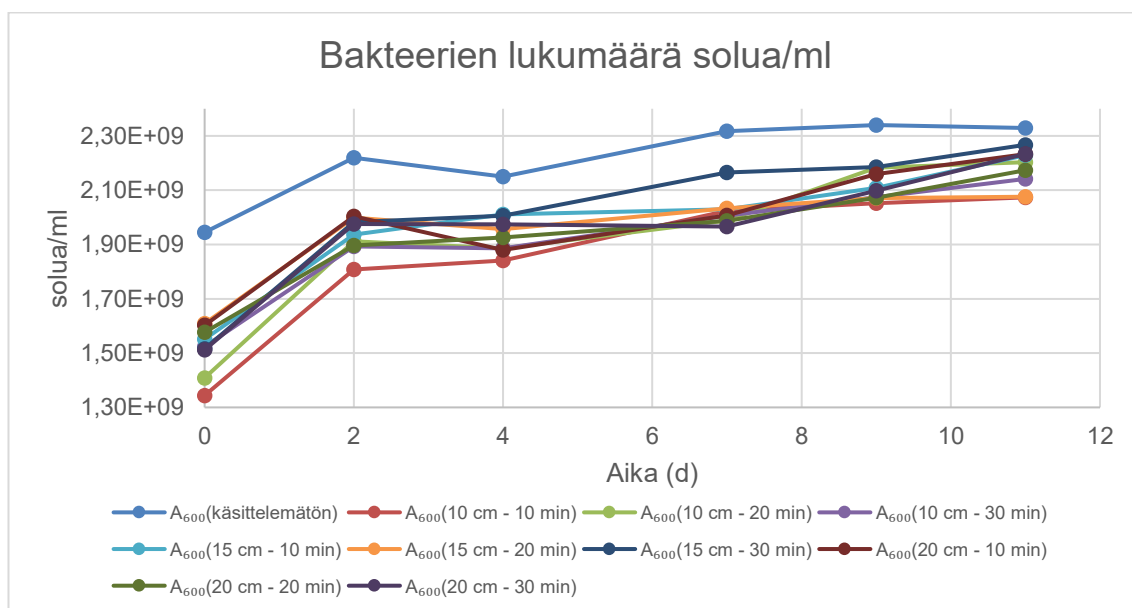
Taulukko 6. Spektrofotometrilla mitattu kokonaisbakteerimäärä.

	0. päivä (solua/ml)	2. päivä (solua/ml)	4. päivä (solua/ml)	7. päivä (solua/ml)	9. päivä (solua/ml)	11. päivä (solua/ml)
käsittelemätön mäski	$1,94 * 10^9$	$2,2 * 10^9$	$2,15 * 10^9$	$2,32 * 10^9$	$2,34 * 10^9$	$2,33 * 10^9$
10 cm – 10 min	$1,34 * 10^9$	$1,81 * 10^9$	$1,84 * 10^9$	$2,02 * 10^9$	$2,05 * 10^9$	$2,07 * 10^9$
10 cm – 20 min	$1,41 * 10^9$	$1,91 * 10^9$	$1,89 * 10^9$	$1,99 * 10^9$	$2,18 * 10^9$	$2,20 * 10^9$
10 cm – 30 min	$1,52 * 10^9$	$1,89 * 10^9$	$1,89 * 10^9$	$2,01 * 10^9$	$2,07 * 10^9$	$2,14 * 10^9$
15 cm – 10 min	$1,55 * 10^9$	$1,94 * 10^9$	$2,01 * 10^9$	$2,03 * 10^9$	$2,11 * 10^9$	$2,23 * 10^9$
15 cm – 20 min	$1,61 * 10^9$	$2,00 * 10^9$	$1,96 * 10^9$	$2,03 * 10^9$	$2,07 * 10^9$	$2,08 * 10^9$
15 cm – 30 min	$1,52 * 10^9$	$1,98 * 10^9$	$2,01 * 10^9$	$2,16 * 10^9$	$2,19 * 10^9$	$2,27 * 10^9$
20 cm – 10 min	$1,60 * 10^9$	$2,00 * 10^9$	$1,88 * 10^9$	$2,01 * 10^9$	$2,16 * 10^9$	$2,23 * 10^9$
20 cm – 20 min	$1,58 * 10^9$	$1,90 * 10^9$	$1,93 * 10^9$	$1,99 * 10^9$	$2,07 * 10^9$	$2,17 * 10^9$
20 cm – 30 min	$1,51 * 10^9$	$1,98 * 10^9$	$1,97 * 10^9$	$1,97 * 10^9$	$2,10 * 10^9$	$2,23 * 10^9$

Laskuesimerkkinä laskettiin 0. päivän käsittelemättömän mäskin kokonaisbakteerimäärä:

$$2,431 * (8 * 10^8) = 1,94 * 10^9 \text{ solua/ml.}$$

Näistä saadaan kaaviossa 1 esitetyt tulokset.



Kaavio 1. Spektrofotometrilla saadut bakteerien kokonaismäärät.

6.2 Maljaus

Maljaukselle saatiin taulukossa 7 esitetyt tulokset. Tuloksiksi valittiin maljat, joilla oli 10–150 pesäkettä. Tulokset laskettiin painotettuna keskiarvona jakamalla pesäkkeiden lukumäärä tutkitulla näytetilavuudella. (Ruokavirasto, 2019)

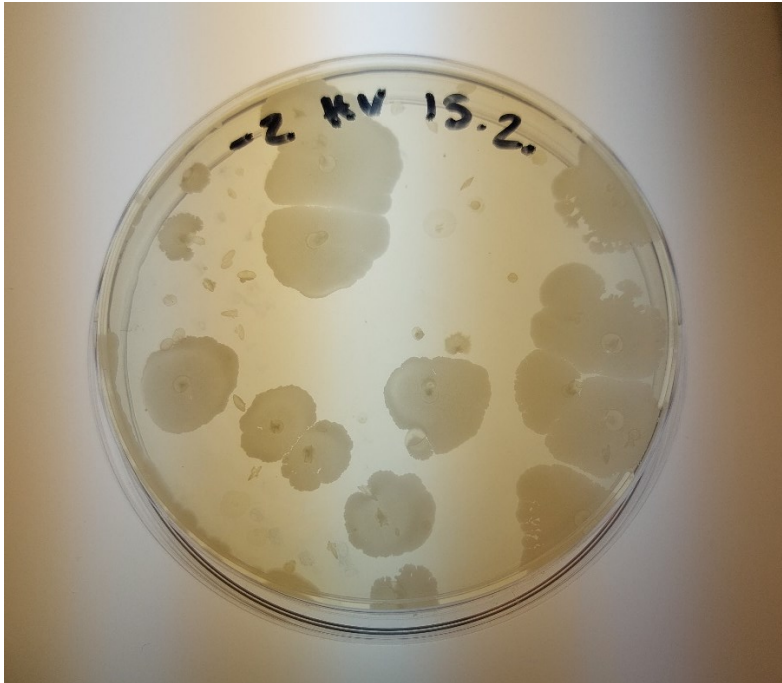
Taulukko 7. Maljauksen tulokset.

	Käsittelemätön mäski, pesäkkeet per laimennos (kpl)	Käsittelemätön mäski, bakteerien kokonaismäärä (pmy/ml)	15 cm – 30 min, pesäkkeet per laimennos (kpl)	15 cm – 30 min, bakteerien kokonaismäärä (pmy/ml)
0. päivä	10 ⁻² : 55 10 ⁻² : 60	5750	10 ⁻¹ : 61 10 ⁻¹ : 48 10 ⁻² : 14 10 ⁻² : 12	614
3. päivä	10 ⁻⁷ : 46 10 ⁻⁷ : 61	5,35 * 10 ⁸	10 ⁻⁵ : 273	2,73 * 10 ⁸
6. päivä	10 ⁻⁷ : 56 10 ⁻⁷ : 38	4,70 * 10 ⁸	10 ⁻⁶ : 16 10 ⁻⁶ : 19	1,75 * 10 ⁷
9. päivä	10 ⁻⁷ : 23 10 ⁻⁷ : 20	2,15 * 10 ⁸	10 ⁻⁵ : 118 10 ⁻⁵ : 124 10 ⁻⁶ : 14 10 ⁻⁶ : 18	1,25 * 10 ⁷

Laskuesimerkkinä lasketaan 0. päivän käsittelemättömän mäskin kokonaisbakteerimäärä:

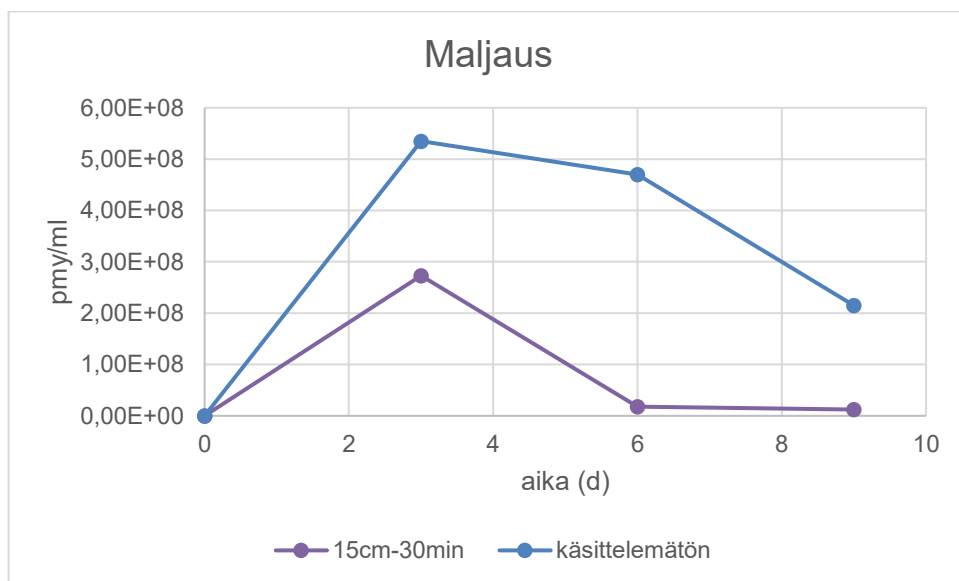
$$\frac{55+60 \text{ pmy}}{2 \cdot 10^{-2} \text{ ml}} = 5750 \text{ pmy/ml.}$$

Kuvassa 4 on 0.päivän malja, josta pesäkkeet on laskettu.



Kuva 4. 0. päivän malja.

Tulokset on esitetty myös kaaviossa 2.



Kaavio 2. Maljauksen tulokset.

7 Loppupäätelmät

Elintarvikeliitto ja Ruokavirasto määrittelevät mikrobiologiset rajat tuotteille niiden viimeisenä käyttöpäivänä tai parasta ennen- päivänä. Näitä ohjearvoja ei tulisi ylittää ja jos arvo ylittyy, tuote ei ole turvallista nautittavaksi. Vertailuarvoksi otettiin neutraalien kasvipohjaisten tuotteiden, muiden kuin nestemäisten tuotteiden (esimerkiksi tuorepuuro, smoothie) raja-arvo, joka on $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$ pmy / ml. (Elintarviketeollisuusliitto, 2022)

Sekä spektrofotometri, että maljausmenetelmä molemmat paljastavat, että raja-arvo ylittyy reippaasti jo kolmantena päivänä. Spektrofotometrin tuloksista nähdään lisäksi, että UV-valon etäisyydellä mäskestä ei ollut vaikutusta valon tehokkuuteen. Tämä tarkoittaa sitä, että UV-käsittelyllä ei ole haluttua vaikutusta, eikä se pidennä mäskin säilyvyyttä. Mäski tulisi siis edelleen käyttää heti mäskeyksen jälkeen.

Spektrofotometrillä saadut arvot olivat tosin hyvin suuria, yleensä niiden tulisi olla alle yhden. Puhtaan peptoniveden käyttö nollanäytteenä oli mahdollisesti liian kirkas, ja näin kontrasti suureni tarpeettoman suureksi. Näytteitä olisi voinut myös laimentaa, jotta saadut arvot olisivat olleet alle yhden. Tutkimusaika oli lisäksi pitkä. Spektrofotometria suositellaankin käytettäväksi vain kasvukäyrän alkupäässä, sillä se mittaa myös kuolleet solut, joita on useamman päivän jälkeen jo paljon.

Maljauksen tuloksista nähtiin, että mikrobien määrät kääntyivät laskuun jo kolmannen päivän jälkeen. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että mikrobeilta on loppunut ravintoaineet ja happi ja ne ovat siksi alkaneet kuolemaan.



Kuva 5. Yhdeksän päivää vanha mäski.

Mäski on tummaa ja tiivistä, joten UV-valo ei läpäise sitä kunnolla. Peptoniveden lisääminen mäskiin ja sen sijoittaminen tasoravistelijalle eivät olleet riittävän tehokas menetelmä auttamaan UV-valoa läpäisemään koko mäskin. Vettä olisi voinut lisätä paljon enemmän, jotta mäski olisi päässyt liikkumaan vapaammin. Toisaalta UV-valon olisi voinut sijoittaa myös mäskin sekaan, mutta siinä pelkona on, että puuromainen, tahmea mäski olisi palanut lamppuun kiinni ja näin estänyt UV-valon toiminnan. Täytyy lisäksi ottaa huomioon, että koulumme UV-lamppu oli jo ikääntynyt, joten sen tehosta ei voida olla varmoja.

Mäskin säilyvyyttä voidaan parantaa kuivaamalla tai pakastamalla. Pakastaminen tosin on varsin hankala säilöntämuoto, sillä volyymit ovat niin valtavat. Muita mahdollisia sterilointitapoja voisi olla autoklaavi tai kuumailmasterilointi, mutta näissä huonona puolena on, että ne ovat varsin kalliita investointeja.

Lähdeluettelo

Agilent Genomics, n.d. *E. coli Cell Culture Concentration from OD600 Calculator*. [Online]

Available at: <https://www.agilent.com/store/biocalculators/calcODBacterial.jsp>
[Accessed 28 05 2024].

Barth, R., 2013. In: *The Chemistry of Beer*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., pp. 131 - 133.

Bianco, A. et al., 2020. *The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain*. [Online]

Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>
[Accessed 20 05 2024].

Castro, L. E. N. & Colpini, L. M. S., 2021. *All-around characterization of brewers' spent grain*. [Online]

Available at: <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03860-5>
[Accessed 21 05 2024].

Elintarviketeollisuusliitto, 2022. *Elintarvikkeiden mikrobiologisia ohjausarvoja viimeisenä käyttöajankohtana tai parasta ennen- päivänä..* [Online]

Available at: https://www.etl.fi/wp-content/uploads/2023/08/etl_mikrobiologiset_ohjeavot_10-10-2022.pdf
[Accessed 24 05 2024].

Gao, Y.-F. et al., 2024. *Discrimination and quantification of volatile compounds in beer by FTIR combined with machine learning approaches*. [Online]

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101300>
[Accessed 07 06 2024].

Guerrero-Beltrán, J. & Barbosa-Cánovas, G., n.d. *Review: Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light*. [Online]

Available at: <https://doi.org/10.1177/1082013204044359>
[Accessed 02 06 2024].

Liu, C., Huang, Y. & Chen, H., 2015. *Inactivation of Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella Enterica on Blueberries in Water Using Ultraviolet Light*. [Online]

Available at: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12910>

[Accessed 02 06 2024].

Mussatto, S., 2013. *Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications*. [Online]

Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>

[Accessed 21 05 2024].

Mäkinen, V. & Enari, T.-M., 1993. Teoksessa: *Panimotekniikka*. Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu, pp. 75 - 215.

Pohjoismaiden elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2013. *No 86 5. painos. Aerobiset mikro-organismit. Määrittäminen elintarvikkeista lämpötiloissa 37 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C, 17/7 °C tai 6,5 °C pesäkelaskentamenetelmällä..* s.l.:s.n.

Pohjoismaiden elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 2010. *Nro 91, 6. painos. Näytteenotto ja esikäsittely kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten. Elintarvike- ja rehunäytteet..* s.l.:s.n.

Ruokavirasto, 2019. *Mikrobiologisten tulosten laskeminen*. [Online]

Available at:

https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriointi/ohjeita-laboratorioille/lab_703_mikrobiologisten_tulosten_laskeminen.pdf

[Accessed 24 05 2024].

Saarela, A.-M., Hyvönen, P., Määttälä, S. & von Wright, A., 2010.

Elintarvikeprosessit. In: Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu, pp. 204-207.

Teng, S. et al., 2023. *The Application of Ultraviolet Treatment to Prolong the Shelf Life of Chilled Beef*. [Online]

Available at: <https://doi.org/10.3390/foods12122410>

[Accessed 23 05 2024].

Yemmireddy, V., Adhikari, A. & Moreira, J., 2022. *Effect of ultraviolet light treatment on microbiological safety and quality of fresh produce: An overview.*

[Online]

Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.871243>

[Accessed 02 06 2024].