

---

**BAKTERIOFAGIEN MERKITYS  
VIOLA<sup>®</sup> SALAATTIJUUSTON HAPPANEMISESSA**



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma,  
meijeriteknologian suuntautumisvaihtoehto

Visamäki

15.4.2011

Laura Mutanen



Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma  
Visamäentie 35 B, PL 230  
13101 Hämeenlinna

Työn nimi                      Bakteriofagien merkitys Viola<sup>®</sup> salaattijuuston  
happanemisessa

Tekijä                              Laura Mutanen

Ohjaava opettaja              Tuija Pirttijärvi

Hyväksytty                      \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ .20 \_\_\_\_\_

Hyväksyjä                      \_\_\_\_\_  
Tuija Pirttijärvi



HÄMEENLINNA, Hämeen ammattikorkeakoulu  
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma  
Meijeriteknologia

---

<b>Tekijä</b>	Laura Mutanen	<b>Vuosi</b> 2011
<b>Työn nimi</b>	Bakteriofagien merkitys Viola <sup>®</sup> salaattijuuston happanemisessa	

---

## TIIVISTELMÄ

Valio Oy, Äänekosken tehdas valmistaa fetatyypistä Viola<sup>®</sup> salaattijuustoa. Juusto valmistetaan ultrasuodatustekniikalla ja kypsytämällä juustoa vuorokauden ajan pikareissa. Kypsymisen aikana juusto happanee eli pH alenee ja juustosta erottuu heraa. Juuston happanemista voivat häiritä estotekijät ts. bakteriofagit (bakteereiden virukset), prosessista johtuvat kontaminaatiot ja häiriöt ja maidon heikko mikrobiologinen laatu. Estotekijät voivat aiheuttaa hapatteen aktiivisuuden heikkenemistä ja vähentää siten hapatteen maitohappobakteerien maitohapon tuoton.

Opinnäytetyössä selvitettiin Viola<sup>®</sup> salaattijuuston happanemista häiritsevien estotekijöiden vaikutusta happanemisprosessiin ennen suolaveden lisäämistä. Tutkimuksen tulosten perusteella laadittiin prosessille hapatevaihtosuositus fagi-infektion ehkäisemiseksi. Bakteriofagipitoisuutta määritettiin juustosta erottuvasta herasta pH-eroon perustuvalla bakteriofagitestillä. Tutkimuksessa testattiin heranäytteiden mahdollisesti sisältämien estotekijöiden vaikutusta viiden eri hapatteen hapatuskyvyille. Bakteriofagitutkimusta varten tutkittavat näytteet kerättiin syksyllä 2010 viitenä eri tuotantopäivänä.

Tuloksissa tarkasteltiin hapatekohtaisesti viiden eri hapatteen herkkyyttä fagi-infektiolle. Hapatekohtaisista tuloksista laadittiin prosessille yhtenäisen suosituksen, jolloin hapate tulisi vaihtaa fagi-infektion ehkäisemiseksi. Bakteriofagitutkimuksessa määritettiin yhteensä 2 400 näytteen bakteriofagipitoisuudet ja laskettiin pitoisuuksien korrelaatio suhteessa juuston happanemiseen. Tuloksista n. 30 % pystyttiin selittämään, joka tarkoittaa, että näytteiden fagipitoisuus oli riittävän alhainen aiheuttaakseen merkittäviä happanemishäiriöitä prosessissa. Yhtenäiseksi hapatevaihtosuositusrajaksi saatiin, että pH-eroon perustuvalla bakteriofagitestillä, infektoituneen- ja kontrollinäytteen välinen pH-eron ylittäessä  $10^{-2}$  laimennoksella 0,2 pH-yksikköä, tulisi harkita hapatteen vaihtoa toisenlaiseen koostumukseen.

**Avainsanat** Bakteriofagi, juuston happaneminen, Viola<sup>®</sup> salaattijuuston valmistus

**Sivut** 31 s, + liitteet 8 s.

HÄMEENLINNA, University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering  
Dairy Technology

---

<b>Author</b>	Laura Mutanen	<b>Year</b> 2011
<b>Subject of Bachelor's thesis</b>	Significance of Bacteriophage in the Acidification of Viola <sup>®</sup> Salad Cheese	

---

**ABSTRACT**

Valio Ltd, Äänekoski factory manufactures feta typed cheese Viola<sup>®</sup>. The cheese is manufactured by an ultrafiltration technique and ripened for one day in a cup. During the ripening cheese acidification begins, i.e. pH decreases, and whey separates from the curd. The acidification of cheese can be disturbed by inhibitors i.e. by bacteriophages (viruses of bacteria), contaminations and interferences in the process and low microbiological quality in milk. Inhibitors may cause a low activity in culture and thereby reduce the production of milk acid in the culture.

The purpose of the thesis was to study the effect of the inhibitors on the Viola<sup>®</sup> cheese acidification process before adding brine to the curd. On the basis of the results of the study a recommendation was drawn up for the process to change culture into a different consistency to prevent phage infection. The bacteriophage concentration was determined in whey separated from the curd by a pH-difference based bacteriophage test. In the study the effect of inhibitors possibly contained in whey samples on the acidifiability was tested in five different kinds of culture. For a bacteriophage examination the samples were collected in the autumn 2010 in five different production days.

Based on the results the sensitivity of five different cultures to phage infection was examined. A uniform recommendation was drawn up for the process based on the results of each culture. This recommendation indicates when the culture should be changed to prevent phage infection. In the bacteriophage examination the bacteriophage concentration was determined for a total of 2 400 samples and the correlation of concentrations in relation to the acidification of cheese was calculated. Of all the results about 30 % could be explained, which means that the phage concentration in the samples was low enough to cause significant acidification interferences in the process. A common recommendation was obtained i.e. a culture should be changed into a culture with a different consistency if the difference in pH using a bacteriophage test exceeds 0.2 pH-units with a dilution of  $10^{-2}$  in the control and infected samples.

**Keywords** Bacteriophage, cheese acidification, Viola<sup>®</sup> salad cheese manufacture

**Pages** 31 p + appendices 8 p.



# SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	JUUSTON HAPPANEMINEN.....	2
2.1	Juustohapatteet.....	2
2.2	Hapatteen toiminta.....	3
3	JUUSTON HAPPANEMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT.....	4
3.1	Maidon mikrobiologinen laatu.....	4
3.1.1	Bakteerien ja somaattisten solujen pitoisuus.....	4
3.1.2	Estoaine- eli lääkejäämät.....	5
3.1.3	Maidon luontaiset estotekijät.....	6
3.1.4	Virhekäymistä aiheuttavat mikrobit.....	6
3.2	Pesu- ja desinfektioaineiden jäämät.....	7
4	BAKTERIOFAGIT.....	8
4.1	Bakteriofagien rakenne ja jaottelu.....	8
4.2	Bakteriofagien lisääntyminen.....	10
4.2.1	Lyyttinen ja lysogeeninen sykli.....	11
5	BAKTERIOFAGIEN TORJUNTA.....	13
5.1	Bakteriofagien resistenssimekanismit.....	13
5.1.1	Adsorption esto.....	13
5.1.2	Rajoitettu/modifioitu systeemi.....	13
5.1.3	Aborttiivinen infektio.....	13
5.2	Hapatteiden vuorottelu.....	13
5.3	Hygienia.....	14
5.3.1	Pesuaineet ja pesut.....	14
6	BAKTERIOFAGIKONTAMINAATORISKIT VIOLA <sup>®</sup> SALAATTIJUUSTON VALMISTUKSESSA.....	15
6.1	Esikäsittelyt.....	15
6.1.1	Raaka-aine.....	15
6.1.2	Separointi.....	16
6.1.3	Pastörinti.....	16
6.1.4	Panosvakiointi.....	16
6.1.5	Ultrasuodatus.....	17
6.1.6	Homogenointi.....	17
6.2	Esikypsytyt.....	18
6.2.1	Hapatelisäys.....	18
6.3	Juoksetteen lisäys massavirtaan.....	18
6.4	Kypsytyt.....	19
6.5	Pakkaus ja jakelu.....	19
6.6	Prosessikaavio valmistuksesta.....	20

7	BAKTERIOFAGITUTKIMUS .....	21
7.1	Analysoitavat näytteet .....	21
7.1.1	Bakteriofagitutkimus pH-eroon perustuvalla menetelmällä.....	22
7.2	Tilastolliset menetelmät .....	24
7.2.1	Korrelaatiokerroin .....	24
7.2.2	Selitysaste .....	25
7.2.3	Keskihajonta .....	25
8	BAKTERIOFAGITUTKIMUKSEN TULOKSET .....	26
8.1	Happanemiskäyrät .....	26
8.2	Hapatevaihtosuositukset.....	27
8.2.1	Yhteenvedo .....	28
8.3	Johtopäätökset ja tulosten luotettavuus .....	28
8.3.1	Jatkosuunnitelmat .....	31
9	LÄHTEET .....	32

Liite 1	HAPPANEMISKÄYRÄT TUOTANTOPÄIVITTÄIN
Liite 2	HAPPANEMISKÄYRÄT TIIVISTETANKEITTAIN
Liite 3	PH-EROON PERUSTUVAN BAKTERIOFAGITESTIN TULOKSET, HAPATE A
Liite 4	PH-EROON PERUSTUVAN BAKTERIOFAGITESTIN TULOKSET, HAPATE B
Liite 5	PH-EROON PERUSTUVAN BAKTERIOFAGITESTIN TULOKSET, HAPATE C
Liite 6	PH-EROON PERUSTUVAN BAKTERIOFAGITESTIN TULOKSET, HAPATE D
Liite 7	PH-EROON PERUSTUVAN BAKTERIOFAGITESTIN TULOKSET, HAPATE E

## 1 JOHDANTO

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimii Valio Oy, Äänekosken tehdas. Tehdas valmistaa Viola<sup>®</sup> salaattijuuston lisäksi Aura<sup>®</sup> sinihomejuustoa ja heratuotteita. Viola<sup>®</sup> salaattijuusto valmistetaan ultrasuodatustekniikalla ja kypsytämällä juustoa vuorokauden ajan pikareissa.

Juuston valmistuksen happanemishäiriöitä kypsymisen aikana voivat aiheuttaa estotekijät, jotka ovat prosessiin päässeet bakteriofagit, prosessista johtuvat kontaminaatiot/häiriöt tai maidon heikko mikrobiologinen laatu. Juustonvalmistuksessa käytetään maitohappobakteereita hapatteina, jotka lisäävät juuston happamuutta ja juustolle muodostuu sen ominainen rakenne ja aromi. Maitohappobakteereille spesifiset bakteriofagit ovat maitohappobakteereita infektoivia viruksia, jotka tuhoavat isäntäsolunsa ja siten heikentävät hapatteen aktiivisuutta ja hapontuottoa. Fagi-infektioita voidaan ehkäistä hyödyntämällä fagien spesifisyyttä. Sama bakteriofagikanta ei yleensä pysty infektoimaan useita erilaisia hapatebakteereita. Hapatteita vuorottelemalla fagi-infektiot mahdollisesti vähenevät.

Bakteriofagitutkimuksen tavoitteena oli laatia Viola<sup>®</sup> salaattijuuston valmistusprosessiin uusi suositus ajankohdasta, jolloin olisi syytä vaihtaa hapate fagi-infektion ehkäisemiseksi. Nykyinen hapateenvaihtosuositusraja oli havaittu liian tiukaksi, sillä raja-arvon ylityksistä huolimatta juuston happanemisessa ei ole havaittu merkittäviä poikkeavuuksia.

Bakteriofagitutkimuksessa testattiin käytössä olevan hapatteen lisäksi neljä varahapatetta. Tutkimuksella selvitettiin, mikä vaikutus oli juuston happanemista häiritsevillä estotekijöillä juuston happanemisprosessiin. Bakteriofagitestillä tutkittiin juustosta erottuvasta herasta bakteriofagipitoisuus ja muita hapatetta inhiboivien estotekijöiden esim. antibioottien pitoisuus.

Hapateenvaihtosuositusraja määritettiin bakteriofagitestillä, jossa infektioituneen näytteen pH:ta verrattiin kontrollinäytteeseen. Mahdollinen pH-ero näytteiden välillä ilmeni infektioituneessa näytteessä haponmuodostuksen vähenemisenä, jolloin merkittävä pH-ero merkitsi estotekijöiden läsnäoloa. Tulokseksi saatua pH-eroa verrattiin juuston pH-arvoon ja laskettiin näiden välinen korrelaatio.

Opinnäytetyön jatkosuunnitelmissa viitataan Pirkko Hukkasen opinnäytetyöhön bakteriofagien hallinta juustolassa (Hukkanen 2008). Viittauksilla verrataan bakteriofagitutkimuksen tuloksia Hukkasen tuloksiin ja analysoidaan tutkimustulosten luotettavuutta.

Bakteriofagitutkimuksen lisäksi opinnäytetyössä esitellään salaattijuuston valmistustekniikkaa ja tarkastellaan meijeriprosessin mahdollisia bakteriofagilähteitä sekä bakteriofagikontaminaatoriskejä valmistusprosessissa.

## 2 JUUSTON HAPPANEMINEN

Juuston happanemisella tarkoitetaan juuston happamuuden lisäämistä juustomaidossa ja itse juustossa. Happamuutta lisätään juustomaitoon tehävällä hapatellisäyksellä. Hapatteella maitohappobakteerien sisältämät proteolyttiset entsyymit hajottavat nimensä mukaisesti maidon valkuaista ja näin kypsytävät juustoa. Aromin muodostajat lisäävät juuston makua ja muodostavat kaasua, jota tarvitaan juuston kolojen muodostumiseen. Tyypillisimmät juustohapatteet ovat maitohappobakteeriviljelmiä sisältäviä mesofiilisiä tai termofiilisiä hapatteita. Mesofiiliset ja termofiiliset hapatteet eroavat toisistaan kasvatuslämpötilojen mukaan. Mesofiilisten hapatteiden kasvuoptimilämpötilat ovat +19 - 37 °C:een välillä, riippuen hapatelajista ja termofiilisten hapatteiden optimilämpötilat vaihtelevat +37 - 45 °C:een välillä. Maitohappobakteerit aikaansaavat juustomaidossa ja juustossa maitohappokäymistä, jolloin fermentaation tuloksena syntyy käymisaineita ja juustolle muodostuu sille ominainen aromi ja rakenne. (Tapaila 2011)

### 2.1 Juustohapatteet

Mesofiiliset hapatteet jaetaan maitohappobakteerikoostumuksen mukaan homo- ja heterofermentatiivisiin hapatteisiin. Homofermentatiivisessa maitohappokäymisessä muodostuu laktoosista maitohappoa ja joissakin tapauksissa aromia. Homofermentatiiviseen maitohappokäymiseen perustuvat bakteeriviljelmät ovat laktokokkeja eli *Lactococcus lactis* -lajeja. Mesofiiliset hapatteet voidaan jaotella maitohappokäymisen lisäksi O-, L-, D-, ja DL-hapatteisiin. O-hapatteet ovat *Lactococcus lactis subspensis lactis* -bakteerilajin haponmuodostajia, kun muut (L-, DL-, ja D-hapatteet) tuottavat haponmuodostuksen lisäksi aromia. L-hapate sisältää *Leuconostoc mesentroides subspensis cremoris* – bakteeria, D-hapate *Lactococcus lactis subspensis lactis* biovar. *diacetylactis* -bakteeria ja DL-hapate molempia, L- ja D-hapatebakteereja.

Heterofermentatiivisessa maitohappokäymisessä syntyy maitohapon lisäksi muitakin yhdisteitä, kuten asetaldehydiä ja hiilidioksidia mm. juuston kolonmuodostumiseen. Heterofermentatiivisiä hapatekantoja ovat leukonostokit mm. *Leuconostoc mesentroides* subsp. *cremoris* – lajit. (Tapaila 2005 s. 45–46)

Mesofiilisiä hapatteita käytetään tyypillisesti puolikovien ja pehmeiden juustojen valmistuksessa. Viola –salaattijuustot luetaan pehmeisiin juustoihin, joiden valmistuksessa käytetään aromia antavia homofermentatiivisiä O-lajin hapatteita.. (Valio Oy 2009; Tapaila 2011)

Termofiiliset hapatteet ovat tyypillisiä kovien juustojen valmistuksessa.. Termofiiliset bakteeriviljelmät ovat tavallisimmin *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*- ja *Lactobacillus helveticus* – lajien kantoja. (Tapaila 2011)



## 2.2 Hapatteen toiminta

Hapatteen ensisijainen tehtävä on pH:n lasku eli happamuuden lisääminen. Happamuus vaikuttaa oleellisesti juuston juoksettumaan ja sitä kautta juuston leikkaukseen, heran erottumiseen ja juuston rakenteeseen. Jos happaneminen häiriintyy prosessin aikana, näkyy se enemmän tai vähemmän juuston loppulaadussa. (Tapaila 2011)

Happaneminen voi olla joskus normaalia hitaampaa ja siihen on pääsääntöisesti kaksi mahdollista syytä; bakteriofagien toiminnasta johtuva happanemisen hidastuminen tai hapatteen alentunut aktiivisuus. Nykyisen tehokkaan estoainetestauksen takia lääkeainejäämiä ei esiinny eikä näin ollen niiden aiheuttamia happanemisongelmia. (Tapaila 2011)

### 3 JUUSTON HAPPANEMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

Juustonvalmistuksen tavoitteena on saavuttaa juustolle sen haluttu maku, rakenne ja säilyvyys. Tavoitteen saavuttamiseksi hapatteelle tulee suoda mahdollisimman hyvät lähtökohdat kasvaa ja muodostaa maitohappoa ja flavoria. Maidon happanemiskyky on merkittävä tekijä lopputuotteen laadussa. Tekijöitä, jotka vaikuttavat juuston happanemiskykyyn heikentävästi, ovat mm. maidon heikko mikrobiologinen laatu, pitkäaikainen kylmävarastointi, puhdistus- ja desinfektioainejäämät prosessissa ja bakteriofagit (bakteereiden viruksia). (Tapaila 2005 s.42)

#### 3.1 Maidon mikrobiologinen laatu

Hyvällä maitolaadulla tarkoitetaan, että maidon patogeenisten bakteerien pitoisuus on alhainen ja se on käsitelty asianmukaisesti maatilalla ja meijerissä. Maito on hyvin herkkä lämpötilavaihteluille ja on tärkeää, että maidon kylmäkuljetus on katkeamaton maatilalta meijeriin saakka. Lämpötilavaihtelut heikentävät maidon säilyvyyttä ja edistävät mikrobien kasvua. Hyvä hygienia lypsyn ja maidon kuljetuksen aikana ovat välttämättömiä, jotta raakamaidon bakteeripitoisuus pysyy riittävän pienenä. Maidon puhautaudella halutaan estää juuston happanemishäiriöitä ja kuluttajalla allergisia reaktioita sekä ruokamyrkytyksiä. (Maidon matkassa 2007 s.14–15)

##### 3.1.1 Bakteerien ja somaattisten solujen pitoisuus

Maidon bakteerit muuttavat juustoprosessin edetessä rasvoja, proteiineja ja laktoosia hapoiksi ja pahanmakuisiksi ja jopa myrkyllisiksi yhdisteiksi. Yhdisteet eivät hajoa jatkokäsittelyissä ja ilmentyvät lopputuotteen laadun heikkenemisenä. Pastöroinnilla saadaan tuhottua yleisimmät patogeeniset bakteerit, mutta on olemassa myös bakteereita, jotka eivät inaktivoidu lämpökäsittelyssä. Hyvälle juustomaidon laadulle on edellytys, että maito on peräisin terveistä lehmistä. Kokonaisbakteerit ja somaattiset solut aiheuttavat maidossa koostumuksen poikkeavuutta, alhaista happitasapainoa, alentavat maidon pH-arvoa ja häiritsevät hapatteen toimintaa. (Tapaila 2005 s.41–43,)

Vähintään kerran kuukaudessa määritellään koko karjan tuottajamaidosta solu- ja bakteeripitoisuudet. Utaretulehdusta ilmaisee solujen määrä, kun taas maidon hygieenistä laatua kuvaa bakteerien määrä. Piilevistä tai kroonisista utaretulehduksista saadaan tietoa solulukujen avulla. Jos soluluku on korkea, voi karjassa olla kroonista utaretulehdusta, vaikka näkyviä oireita ei olisikaan. (Manninen 2009)

Maidon solupitoisuus eli soluluku nousee, kun lehmän utare on tulehtunut. Somaattisia soluja erittyy lehmän elimistöstä utareisiin kun lehmä on altistunut infektiolle. Somaattiset solut jaetaan kahteen eri luokkaan; utareperäisiin eli epiteelisoluiksi ja verestä tulleiksi soluiksi eli erytrosyyteiksi ja leukosyyteiksi. Sairastuneen lehmän maitoa ei saa lähettää meijeriin. (Kammerlehner 2000; Manninen 2009)

Somaattisen solutestin tutkittavat maitonäytteet toimitetaan laboratorioon, jossa määritellään somaattisten solujen tarkka määrä. Maidontuottaja voi myös tutkia jo tilalla maidon solupitoisuutta solutestillä, eli CMT- testillä. Solupitoisuus arvioidaan epäsuorasti kemiallisen reaktion voimakkuuden perusteella. Testi tehdään ns. lettupannulla jossa testireagenssi ja maidon solujen sisältämä DNA reagoivat, jolloin seos hyytelöityy sitä voimakkaammin, mitä enemmän maidossa on soluja. Liuos sisältää lisäksi pH-indikaattorin (värireaktio), koska utaretulehduksessa maidon pH muuttuu. Mitä kokkareisemmaksi ja limaisemmaksi maito muuttuu, sitä enemmän siinä on soluja. Tulehdusmaito on happamampaa kuin normaali maito. Tämä näkyy testissä testiliuoksen värimuutoksena. Solutestiä käytetään pääasiassa yksittäisille lehmille, mutta maidontuottaja voi seurata sen avulla myös tilasäiliömaidon laatua. (Manninen 2009)

### 3.1.2 Estoaine- eli lääkejäämät

Jos maidossa on utaretulehdus- tai muun hoidon takia antibioottijäämiä, sitä ei saa toimittaa meijeriin. Maitohygienialaki kieltää lääkejäämiä sisältävän maidon toimittamisen meijeriin. Syynä tähän on se, että antibioottijäämät saattava aiheuttaa allergisia reaktioita kuluttajalla ja lisäksi jäämät haittaavat meijerissä käytettävien hapatebakteerien toimintaa.

Valion T&K:n hapatetutkimuksen kehittämällä ja hapatetuotannon valmistamalla T101 antibioottitestillä varmistetaan maidon puhtaus lääkejäämistä antibiootihoidon jälkeen. T101 on hyvin herkkä testi ja se pystyy tunnistamaan monia eri antibioottiryhmiä ja reagoi helposti Suomessa käytetyille mikrobilääkkeille. Vaikka näyte olisi testillä todettu vapaaksi antibiooteista, lääkityn lehmän maitoa ei saa lähettää meijeriin ennen kuin lääkkeen varoaika on ummessa. (Maito ja me 2002; Manninen 2009)

Antibioottitestin toiminta perustuu siihen, että lääkejäämät estävät testibakteerin, *Streptococcus thermophiluksen* kasvun. Testi suoritetaan siten, että tutkittavaa maitoa lisätään kuumennuksen ja jäähdytyksen jälkeen testibakteeria ja indikaattoriväriä sisältävään ampulliin tai mikrotiitterilevyille. Ampullien ja levyjen sisältämä indikaattoriväriaine muuttaa väriänsä happamuuden mukaan. Näytettä pidetään 42 asteen lämpöhauteessa 4,5 tuntia. Jos maito ei sisällä testibakteerin kasvua estävää antibioottia, tuottaa *Streptococcus thermophilus* silloin maitohappoa ja näytteen väri muuttuu sinisestä harmaankeltaiseksi. Vihertävä väri kertoo, että näyte sisältää hieman lääkejäämää ja tulos luetaan värikartan avulla joko positiiviseksi tai negatiiviseksi. Rinnakkaisnäyte terveen lehmän maidosta helpottaa tulkitsemaan värieron ja varmistaa samalla testin luotettavuuden. (Maito ja me 2002; Manninen 2009)

Virheellisiä tuloksia voi tulla käsittelyvirheistä ja epäkurantista maidosta. Maidon omat testibakteerin kasvua estävät aineet eivät vaikuta testiin, koska testin maito kuumennetaan ennen testin tekoa. Maitonäyte tulee olla tuore ja testi on suoritettava viimeistään 48 h kuluessa näytteenotosta. Näyte tulee säilyttää viileässä testin aloittamiseen saakka. Pitempi aikai-

nen säilytys tehdään pakastamalla. Liian vanhassa näytteessä antibioottipitoisuus on voinut hajota ajan kuluessa sekä maito on voinut hapantua. (Maito ja me 2002; Manninen 2009)

Pesu- ja desinfektioaineet sekä antiseptiset vedinvoiteet ja lääkevoiteet aiheuttavat vääristymiä vain suurina määrinä. Pesuaineiden yliannostus ja siitä johtuvat yli 5 %:n pesuainejäämät voivat aiheuttaa T101-testissä estovaikutusta. Tätä pienemmillä pitoisuuksilla ei ole havaittu olevan vaikutusta. (Hapatekirja 1989)

### 3.1.3 Maidon luontaiset estotekijät

Maito sisältää jo luonnostaan kaksi maitohappobakteerien kasvua estävää tekijää; laktoperoksidaasi-tiosyanaatti-vetyperoksidi –systeemi (LPS-systeemi) ja agglutiniini.

LPS-systeemin tuhoutuminen voidaan todeta lämpökäsittelyn jälkeen peroksidaasitestillä. LPS-systeemi vaikuttaa parhaiten gram-negatiivisiin bakteereihin, mutta estää myös maitohappobakteerien kasvua.

Agglutiniinit vaikuttavat maidon saostumiseen ja sen vaikutus hapatebakteerien kasvuun on vähäinen. Agglutiniinia esiintyy suurissa määrin etenkin ternimaidoissa. (Hapatekirja 1989)

### 3.1.4 Virhekäymistä aiheuttavat mikrobit

Voihappobakteeri-itiöillä (VHBI) (*Clostridium tyrobutyrium*) eli voihaappoklostridit ovat maaperän organismeja, jotka joutuvat maitoon lypsettäessä, jos lehmille tarkoitettu säilörehu on huonolaatuista ja lypsyhygienia on puutteellinen. Klostridi-itiöt ovat voihaappobakteerin säilymismuotoja, jotka sietävät hyvin lämpökäsittelyä. Lämpökäsittelyn läpäisseet klostridi-itiöt voivat aktivoitua jälleen kypsymisen aikana aktiiviseksi bakteereiksi, jolloin ne aiheuttavat runsaslukuisena juuston kypsymisen aikana voihaappokäymistä ja huonoimmassa tapauksessa juustoista tulee epäkurantteja ja ne joudutaan hävittämään biojätteisiin. (Kammerlehner 2000, s. 5-7; Maidon matkassa s.15)

Voihappobakteerien itiöiden poistamiseen raakamaidosta käytetään bakteeriseparaattoria eli baktofugointia tai mikrosuodatusta. Mikrosuodatuksen erotustehokkuus on tehokkaampi, mutta investointikustannuksiltaan suurempi. (Tapaila 2011). Voihaappokäymistä voidaan estää myös lisäaineiden, kuten nitraatin avulla. (Mäki ym.)

*Escherichia coli* on koliryhmän bakteeri, jota esiintyy ihmisten ja eläinten suolistossa. Koliryhmän bakteereiden ilmentyminen on merkki huonosta tuotantohygieniasta ja mahdollisesta ulostekontaminaatiosta. Meijeriteollisuudessa suurin koliryhmän bakteerilähde on raakamaito. Raakamaidon koliformiset bakteerit aiheuttavat harvoin virheitä juustossa, sillä ne tuhoutuvat pastöroinnin aikana. Jos juustossa ilmenee *E.coli* bakteeria, aihe-

uttaa se juustossa happanemiskyvyn hidastumista ja voi aiheuttaa kuluttajalla vatsakipuja ja suolistoperäisiä infektioita. *Escherichia coli* bakteerit määritetään siirrostamalla näytettä selektiiviselle VRB-kasvatusalustalle ja inkuboidaan vuorokausi. Inkuboinnin jälkeen maljoilta voidaan lukea mahdolliset kolipesäkkeet. (Weimer 2001 s. 45; Evira, enterobakteerien määrittäminen 2010)

*Bacillus cereus* –bakteerit ovat grampositiivisia itiöllisiä bakteereita, joita tavataan yleisesti maaperässä, vesistöissä, kasveissa, ilmassa ja pölyssä. Bakteeria esiintyy myös ihmisten ja eläinten suolistossa sekä pieninä pitoisuuksina elintarvikkeissa, kuten viljassa, riisissä, lihassa, kasviksissa ja maidossa. (Evira, *Bacillus cereus* -bakteerin määrittäminen ja alustava tunnistaminen 2006)

*B. cereus* kasvatavat sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. Itiömuodossaan ne kestävät korkeaa lämpötilaa, kuivuutta ja ravinnon puutetta (Salkinoja-Salonen s. 152). Jotkin *B. cereus* kannat voivat elää jopa 7 °C:ssa (Walstra ym. 1999 s. 192). Elintarvikkeisiin joutuneet itiöt sievät hyvin ruuan kuumentamista ja pystyvät lisääntymään ruoassa jäähtymisen aikana. *Bacillus cereus* -bakteereiden joutumista elintarvikkeisiin ei voida täysin estää, ja siksi niitä esiintyy lähes kaikissa elintarvikkeissa (Evira). Suurina pitoisuuksina *B. cereus* muodostaa endotoksiineja ja aiheuttaa tuotteissa saostumista ja makuvirheitä. *B. cereus* voidaan tuhota kuumentamalla 100 °C:ssa viiden minuutin ajaksi (Walstra ym., 1999 s. 192). *B. cereus* todetaan siirrostamalla näytettä bakteerille ominaiselle selektiiviselle MYP- kasvatusalustalle. Kasvatusalustat inkuboidaan ja mahdolliset pesäkkeet luetaan maljalta (Evira, *Bacillus cereus* -bakteerin määrittäminen ja alustava tunnistaminen).

### 3.2 Pesu- ja desinfektioaineiden jäämät

Juustojen hapatehäiriöitä voi myös aiheuttaa pesu- ja desinfektioainejäämät maidossa ja valmistuslaitteistossa. Pesuaineiden emäs- ja happo jäämät heikentävät maidon ja hapatteen happanemiskykyä ja vaikuttavat täten loppulaatuun rakenne, haju ja maku virheinä. Yleisesti meijeriprosesseissa laitteistojen pintaan sekä putkistoihin jää maitolikkaa, joka sisältää laktoosia, valkuaisaineita, suoloja, rasvaa ja likaa. Maitolikka edesauttaa mikrobien muodostumista mikrobikerrostumaksi eli mikrobiflooraksi, joka antaa bakteereille hyvän kasvualustan ja suojan lisääntymiselle. (Hassan ym. 2001 s.185; Maidon matkassa s. 180–181)

## 4 BAKTERIOFAGIT

Bakteriofagit ovat bakteereita infektoivia viruksia, jotka lisääntyvät isäntäsolussa. Bakteriofageista käytetään myös nimitystä fagi tai faagi. Sana fagi tulee kreikan sanasta fagos, joka tarkoittaa syömistä. Fagit ovat loisia, samankaltaisia kuten eläinten ja kasvien virukset, jotka tarvitsevat lisääntyäkseen bakteriofageille spesifisien bakteerien entsyymejä ja soluelimiä. Fageja esiintyy yleisesti siellä, missä niillä on spesifisiä isäntäsoluja tarjolla. (Salkinoja-Salonen 2002 s. 340 -348)

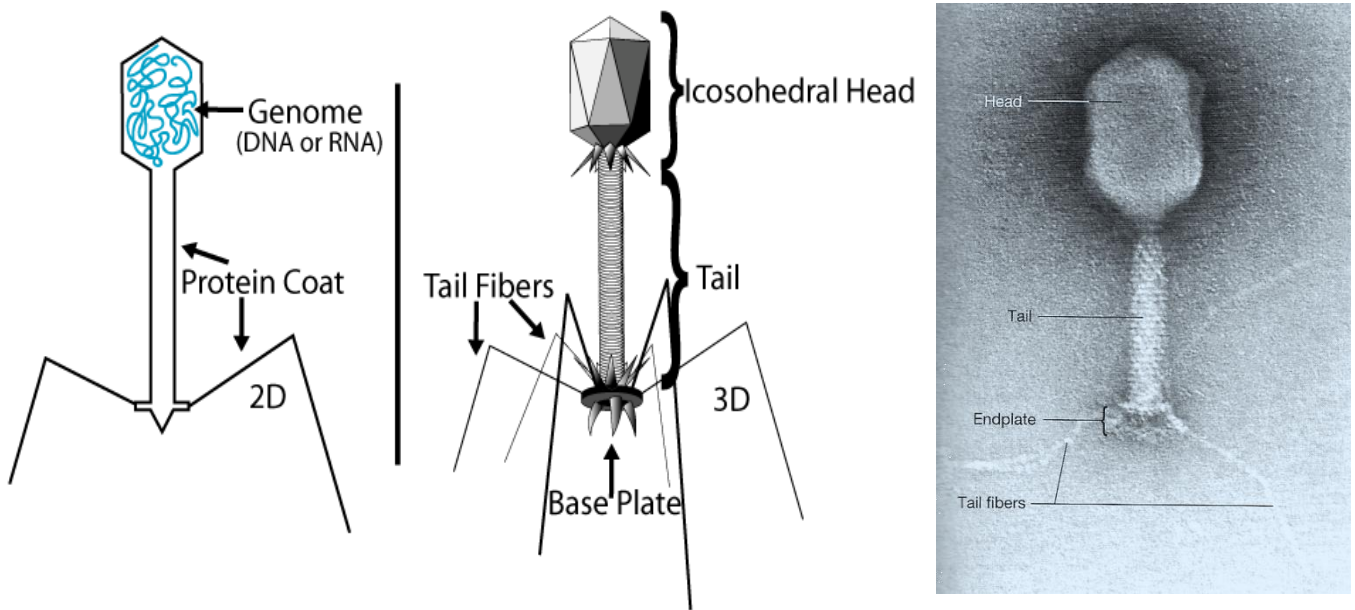
Mikrobeille sopivat kasvuolosuhteet saavutetaan, kun niille on tarjolla sopivasti ravinteita, lämpöä ja kosteutta. Fagit lisääntyvät ainoastaan isäntäsolussa, joka tarjoaa fageille lisääntymiseen tarvittavan ympäristön. Fagi-infektio vähentää tai lopettaa kokonaan maitohappobakteerien hapon tuoton, jolloin juustossa havaitaan happanemishäiriö (Valio oy 2010). Happanemishäiriössä juuston haluttu pH:n saavuttaminen jää tavoitteesta, jolloin juuston rakenne kärsii, esim. kovissa juustoissa kolonmuodostus heikentyy. Väistön (Väistö 2010) maisterin tutkielmassa on todettu, että meijeriteollisuudessa fagi-infektioit voivat aiheuttaa suuriakin taloudellisia tappioita, jos juusto havaitaan epäkurantiksi hapatehäiriön vuoksi.

### 4.1 Bakteriofagien rakenne ja jaottelu

Bakteriofagit jaotellaan niiden rakenteen ja muodon eli morfologian mukaan. Bakteriofagit eroavat niiden muodoltaan, mutta niiden yhteinen ominaisuus on perintöainees, joka koostuu yksi- tai kaksijuosteisista nukleiinihapoista, DNA:sta tai RNA:sta. (Salkinoja-Salonen 2002 s. 340 -348)

Fagien koko vaihtelee 20–300 nm:n välillä (Madigan ym. 2009, s. 253). Bakteriofagien genomia ja rakennetta suojaa proteiinikuori (protein coat) eli kapsidi (katso kuva 1). Bakteriofagien genomi sisältää fagin nukleiinihappoja eli perintöaineesia. Maitohappobakteereja infektoivat bakteriofagit koostuvat yleensä pää ja häntäosasta. Fagin pää on joko isometrinen tai prolaatti. Isometrinen pää sisältää 20 tasakokoista proteiinia, jotka muodostavat yhdessä isometrisen kapsidin (icosohedral head), kun taas prolaatti on navoilta venynyt. (Hassan ym. 2001 s. 173).

Perintöaineesen siirtämiseen fagit käyttävät häntäänsä (tail) ja häntärihmastoa (tail fibre). Kun fagin häntärihmasto ja pohjalevy (base plate) tunnistavat sopivan isäntäsolun, kiinnittyy fagi pohjalevyn piikkiensä ja häntärihmaston avulla solunkalvon pintaan ja siirtää genominsa sisältämän perintöaineesen hännän avulla solukalvon läpi solun sisälle.

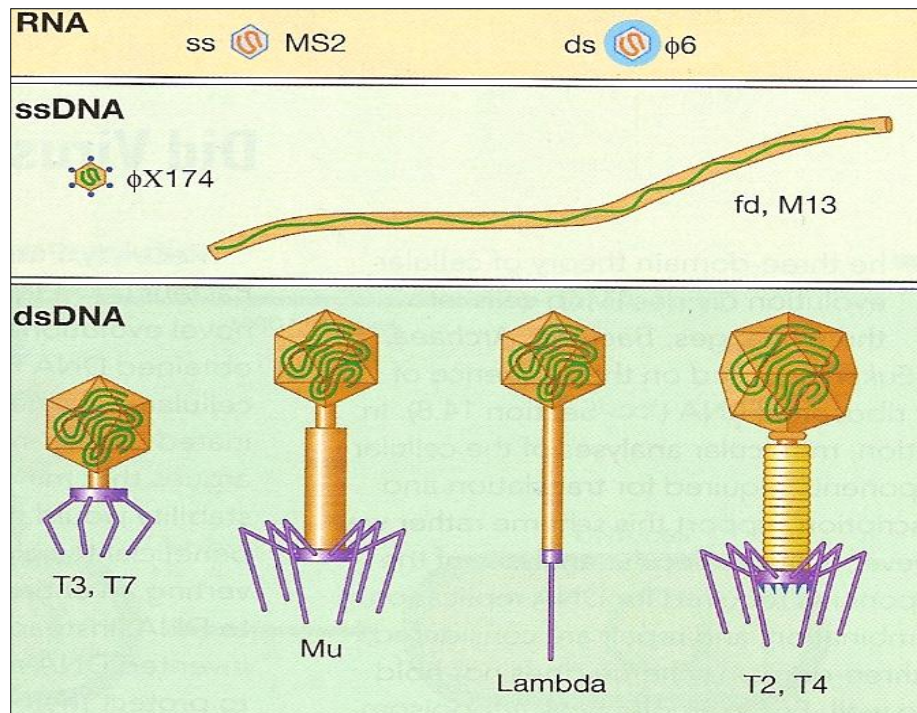


Kuva 1 Bakteriofagien rakenne 2D-, 3D- ja elektronimikroskooppikuvana. (Madigan ym 2000 s.241)

Bakteriofagien morfotyyppejä on monia ja ne voidaan jakaa genomiensa mukaan eri lahkoihin, heimoihin, sukuihin ja lajeihin. Meijereissä tyypillisimmät laktokokkien bakteriofagit kuuluvat *Caudovirales* –lahkoon, joiden ominaisuuksiin kuuluu häntä. Hännältään eroavia bakteriofageja, joiden on havaittu aiheuttavan yleisimmin happanemishäiriöitä meijereissä ovat *Caudovirales* –lahkon *Myoviridae*-, *Siphoviridae*- ja *Podoviridae* –heimot. (Deveau ym. 2006 ; Broadbent 2001 s. 263)

Laktokokkien bakteriofagit jaetaan 12 lajiin, jotka ovat morfotyybiltään kahdenlaisia; isometrisiä ja prolaatteja. *Siphoviridae* –heimoon kuuluvat ryhmät 936, c2 ja P335 (kuva 2, dsDNA fagit) on todettu aiheuttavan suurimmaksi osaksi laktokokkien hapatehäiriöistä. Yleisin hapatehäiriöitä aiheuttava ryhmä on 936, minkä jälkeen on c2 ja P335. Fagiryhmillä 936 ja P335 on isometrinen kapsidi kun c2 fagien kapsidi on prolaatti. (Lubbers ym. 1998)

Väistön (Väistö 2010) maisterin tutkielmassa on esitetty, että *Podoviridae* –heimon ryhmät P034 ja KSY1 ovat harvinaisempia ja niitä on havaittu lähinnä viilin valmistuksen yhteydessä. *Podoviridae* –heimon ryhmäläisillä on lyhyempi häntä kuin *Siphoviridae* –heimolaisilla.



Kuva 2 Bakteriofagien tyypillisimmät morfotyytit. dsDNA bakteriofageja on havaittu meijeriteollisuudessa eniten ja ne omaavat kaksijuosteisen (double-stranded DNA) DNA:n. ss-etuliite tarkoittaa yksijuosteista (single-stranded) DNA:ta tai RNA:ta. (Madigan ym. 2009, s. 263)

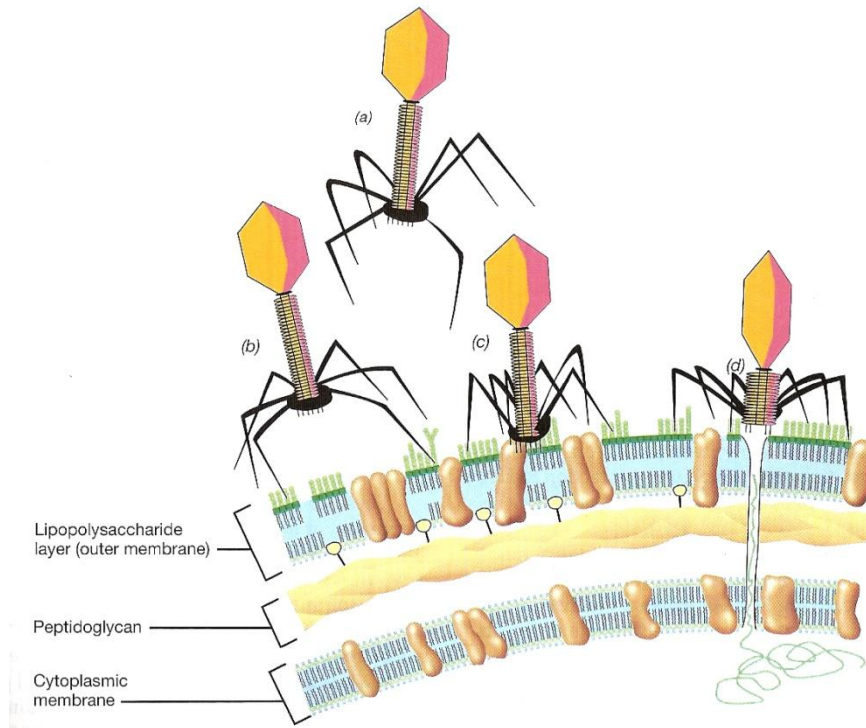
#### 4.2 Bakteriofagien lisääntyminen

Fagit lisääntyvät voimakkaasti elävissä isäntäbakteerissa ja ovat hyvin spesifisiä isäntäsolustaan. Fagit eivät sisällä aineenvaihduntaan ja lisääntymiseen tarvittavia ribosomeja ja siirtäjä-RNAta (tRNA). Tämän takia fagit tarvitsevat lisääntyäkseen isäntäsolun aineenvaihduntaa. (Salkinoja-Salonen 2002 s.340)

Bakteriofagi tunnistaa isäntäsolun pinnalta reseptorit häntärihmastoillaan ja pohjalevyllään (kuva 3, b). Isäntäsolun ollessa herkkä infektiolle bakteriofagien tuottama entsyymi muodostaa solukalvon läpi pienen reiän perintöaineen läpäisylle. Bakteriofagien tarttumista (kuva 3, c) solukalvon pintaan kutsutaan adsorptioksi ja perintöaineen siirtämistä (kuva 3, d) penetroitumiseksi. (Madigan ym. 2009, s. 259; Salkinoja-Salonen 2002 s. 344)

Sopiva isäntäsolu määräytyy sen reseptorien mukaan. Fagi adsorptoituu reseptoreihin ja aloittaa penetroitumisen. Reseptoreita ovat isäntäsolun pinnalla proteiinit, hiilihydraatit, glykoproteiinit, lipidit, lipoproteiinit tai näiden yhdisteet. Yleisesti tarttumiseen tarvitaan  $Mg^{2+}$  ja  $Ca^{2+}$  ionien läsnäoloa (Salkinoja-Salonen 2002 s. 344). Penetroitumisessa fagi siirtää perintöaineensa bakteerin sisään ja fagin proteiininirakenne jää suurimmaksi osaksi solun ulkopuolelle. Jos fagi ei tunnista sopivia reseptoreita, ei adsorptiota tällöin tapahdu. (Madigan ym. 2009, s. 259)





Kuva 3 Bakteriofagien adsorptoituminen ja penetroituminen. Kuvan esimerkkinä on *Escherichia coli* bakteerin solukalvo. (Madigan ym. 2000 s. 247)

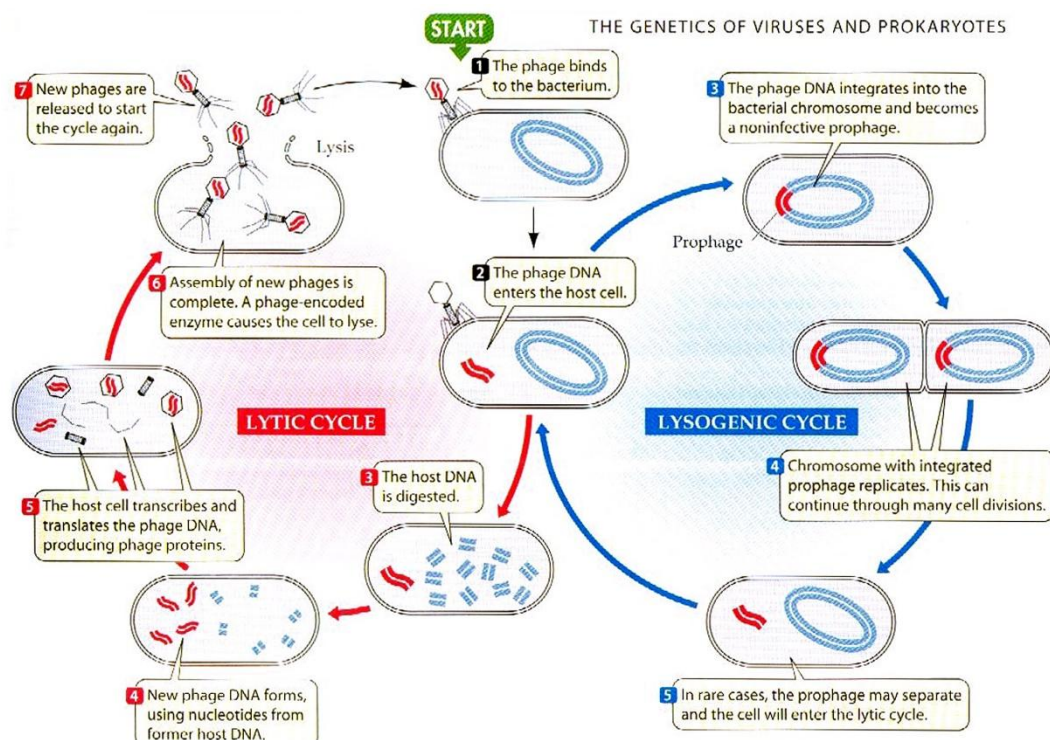
#### 4.2.1 Lyyttinen ja lysogeeninen sykli

Bakteriofagit jaetaan lisääntymiskäyttäytymisen perusteella kahteen osaan; virulentteihin ja lauhkeisiin ts. temperaattisiin fageihin. Virulentit fagit lisääntyvät lyyttisellä syklillä (lytic cycle) ja lauhkeat fagit lyyttisellä tai lysogeenisellä syklillä (lysogenic cycle) (kuva 4). Molemmissa sykleissä bakteriofagi adsorpoituu ja penetroi perintöaineensa bakteerin solun sisään. Penetroitumisen jälkeen lisääntymiskäyttäytyminen määräytyy fagigenomin transkription, DNA:n emäsjärjestyksen kopioitumista lähetti RNA:ksi, mukaan (kuva 4, kohdat 1 ja 2). (Salkinoja-Salonen 2002 s.345,301)

Lyyttisessä syklissä fagin perintöaines lyysaa eli tuhoaa lopulta isäntäbakteerin. Lyyttisen syklin transkriptio vaiheessa fagi DNA kopioituu lähetti RNA:ksi, joka ohjelmoi bakteerisolun ribosomit valmistamaan fagispesifisiä rakenneproteiineja, kuten DNA ja RNA polymeraaseja (kuva 4, vaiheet 3 ja 4). Maturaatio eli kypsymisvaiheessa uudet bakteriofagit muodostuvat rakenneproteiineista (Kuva 4, vaihe 5) isäntäbakteerin sytoplasmassa ja vapautuvat kypsymisen jälkeen lyysaamalla isäntäbakteerin. Laktokokkien fageilla lyyttinen sykli kestää 10–140 minuuttia olosuhteista riippuen, jolloin yhdestä syklistä vapautuu 10 tai yli 300 uutta bakteriofagia (engl. burst size). (Salkinoja-Salonen 2002 s. 344; Madigan ym. 2000 s. 258, 267; Hassan ym. 2001 s. 177).

Lysogeenisessä syklissä muodostuu lauhkeita fageja. Penetroitumisen jälkeen fagigenomi integroituu bakteerigenomiin, jolloin muodostuu profagi (kuva 4, vaihe 3). Fagin integroituminen bakteerigenomiin tekee bakteerin geeneistä toimintakyvyttömiä, mutta ei estä bakteereita jakaantumasta ja tuottamasta maitohappoa. Tällaisten fagigenomeja sisältävän bakteerin jälkeläiset eli lysogeenit sisältävät myös fageja (kuva 4, vaihe 4). Sopivissa olosuhteissa nämä lauhkeat fagit voivat aktivoitua ja liittyä lyyttiseen sykliin (kuva 4, vaihe 5) (Salkinoja-Salonen 2002 s. 344). Lauhkeiden eli temperaattien fagien vapautumisen voi aiheuttaa mm. antibiootit ja pesuainejäämät maidossa. Käytännössä temperaattifagien tunnistaminen on vaikeaa, sillä niiden ilmentyminen ei tule esille tavallisissa fagitesteissä. (Hapatekirja 8-2)

Fagit ovat spesifisiä isäntäsolustaan ja olosuhteista riippuvaisia. Sama fagi voi olla virulentti tai lysogeeni eri bakteerikannoille. Lauhkeat fagit voivat indusoitua eli liittyä lyyttiseen sykliin olosuhteiden muuttuessa. Indusointi voi alkaa spontaanisti tai sen voi käynnistää myös mm. lämpötilan nosto, UV-säteily tai muu ulkoisen tekijän muutos. (Salkinoja-Salonen 2002 s. 344–345)



Kuva 4 Lyttinen sykli (lytic cycle): 1.) Bakteriofagin kiinnittyminen, jota seuraa 2.) penetroituminen. 3.) Bakteerisolun DNA:n hajoaminen. 4.) Bakteriofagi DNA:n muodostuminen isäntäsolun nukleotidien avulla. 5.) Fagirakenneproteiinien muodostuminen ja fagien kypsyminen. 6.) Kypsyneet bakteriofagit lyysaavat bakteerin ja vapautuvat. Lysogeeninen sykli (lysogenic cycle): 3.) Fagigenomin integroituminen isäntäbakteerigenomiin, jolloin muodostuu profagi. 4.) Profagi kopioituu ja muodostuu lysogeenisiä jälkeläisiä. 5.) Lauhkeat fagit voivat aktivoitua sopivissa olosuhteissa ja liittyä lyyttiseen sykliin.

## 5 BAKTERIOFAGIEN TORJUNTA

Bakteriofageja voidaan torjua ulkoisilla tekijöillä ja bakteerien omilla resistenssimekanismeilla eli puolustusmekanismeilla. Bakteriofagit ovat hyvin pieniä viruksia ja vaativiakin olosuhteita sietäviä. Oikeanlaisilla pesuilla ja tuotantohygieniasta huolehtimalla bakteriofagien leviämistä voidaan estää tehokkaasti.

### 5.1 Bakteriofagien resistenssimekanismit

Bakteerit omaavat jo itsessään omia puolustusmekanismeja bakteriofageja vastaan. Ensisijaisesti bakteerit yrittävät estää fageja kiinnittymästä ja siirtämisestä perintöainettaan solun sisälle. Puolustusmekanismit ovat yleisesti bakteerin plasmidissa koodattuina.

#### 5.1.1 Adsorption esto

Fagit kiinnittyvät eli adsorpoituvat solun pintaan tunnistettuaan sopivat reseptorit. Bakteereilla adsorption estoa tapahtuu spontaanisti, jolloin bakteerisolun reseptorit ovat muuttuneet tai ne puuttuvat kokonaan. On havaittu, että joillain *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* kannoilla reseptorien muokkaukseen osallistuvat tekijät ovat polymeerejä sisältäviä ramnooseja ja/tai galaktoosia, joiden biosynteesi on plasmidi-koodaattua. (Walstra s. 383)

#### 5.1.2 Rajoitettu/modifioitu systeemi

Rajoitettu/modifioitu systeemi sisältää kaksi entsyymiä; rajoittavaa ja muokkaavaa. Rajoittava entsyymi hajottaa fagi-DNA:n solun sisällä ja modifioiva entsyymi muokkaa isäntäsolun-DNA:n immuuniksi fageille. Molemmat systeemit aktivoituvat vasta fagin adsorption ja penetroitumisen jälkeen. *Lactococcus lactis* lajilta on havaittu monia tämänkaltaisia rajoittavia/modifioivia entsyymejä. (Walstra s. 383)

#### 5.1.3 Abortiivinen infektio

Abortiivisessa infektiossa bakteriofagi-infektio keskeytyy lyyttisen syklin loppuvaiheessa. Abortiivinen infektio tuhoaa bakteerin, mutta uusia fageja muodostuu vähän tai ei ollenkaan. Keskeytyminen perustuu plasmidin geeneihin, jotka inhiboivat fagi-DNA:n tai proteiinirakenteiden muodostumista. (Walstra s.383)

### 5.2 Hapatteiden vuorottelu

Fagien aiheuttamia happanemishäiriöitä voidaan torjua hapatteiden vuorottelulla. Hapatteiden vuorottelu perustuu fagien spesifisyyteen. Sama bakteriofagikanta ei yleensä pysty infektoimaan useita erilaisia hapatebak-

teereita. Hapatteita vuorottelemalla fagi-infektiot mahdollisesti vähenevät. Hapатteen vaihdossa tulee ottaa huomioon se, että tiheä hapatekierto voi kehittää meijeriin laajan bakteriofagitason. Tämä voi merkitä sitä, että prosessille on jatkossa vaikeaa löytää fagi-infektion kestävää hapatetta. (Salkinoja-Salonen 2002 s. 344–345)

### 5.3 Hygienia

Hyvällä hygienialla voidaan ehkäistä fagi-infektioita tehokkaasti. Erityistä huomiota tulee kiinnittää siihen, että juustomassa ei joudu kosketuksiin vieraiden esineiden kanssa, laitteistot ovat puhtaita ja toimivat oikealla tavalla, ilmastointilaitteistoista tuotantotiloihin tuleva ilma on puhdasta ja henkilöstö on tietoinen tuotantohygieniasta. (Hapatekirja 1989)

Riittämätön pesu voi muodostaa biofilmejä, jotka antavat mikrobeille suotuisia kasvuolosuhteita lisääntymiselle. (Weimer 2001 s.62; Hassan ym. 2001 s.179)

#### 5.3.1 Pesuaineet ja pesut

Fagien tuhoamiseen tehoaa parhaiten peretikkahappo ja kloori, alkoholiin teho vaihtelee (Valio Oy 2006). Pesuaineet denaturoivat fageja eli hajottaa fagien proteiinirakennetta, jolloin fagit tuhoutuvat. Pesuaineiden tehokkuus eliöitä vastaan perustuu sen siirtymiskykyyn solukalvon lävitse sekä entsyymijärjestelmän tuhoavaan hapetusvaikutukseen. Putkistoissa pesuaineet hajottavat vähitellen putkistoihin kertyneitä saostumia ja mikrobifilmejä. (Kuittinen 2009) Pesu on silloin tehokasta, kun pesuun liitetään mekaaninen vaikutus, kemiallinen tekijä, lämpötila ja aika. (Hapatekirja 1989)

Kiertopesujärjestelmissä virtausnopeus on tehokkain mekaaninen tekijä. Turbulenttisella eli pyörteisellä virtauksella pesutehokkuus on suurempi kuin laminaarisella. Putkistopesuissa kaikki virtausesteet eli venttiilit, mutkat, putkiston supistuminen jne. aiheuttavat kiertopesussa painehäviötä. Tällöin mekaaninen pesutehokkuus laskee ja riskinä on mikrobien ja bakteriofagien kasvu niissä kohdin putkistoa, missä pesutehokkuus on ollut heikkoa. (Hapatekirja 1989)

## 6 BAKTERIOFAGIKONTAMINAATORISKIT VIOLA® SALAATTIJUUSTON VALMISTUKSESSA

Valio Viola® salaattijuustot ovat kreikkalaistyyppisiä salaattijuustoja, jotka maistuvat suolaisen kirpeältä ja happamalta. Viola® salaattijuusto on pehmeä rakenteeltaan, kuutiomuotoinen juusto, jonka valmistuksessa käytetään mesofiilisiä aromia antavia hapatteita.

Viola® salaattijuusto koki EU:n säädösten myötä nimenmuutoksen. Salaattijuusto tunnettiin ennen fetajuusto tyyppisenä, mutta nykyisin fetaksi saa kutsua vain alkuperäisellä menetelmällä Kreikassa valmistettua juustoa. Alun perin raaka-aineena on ollut lampaan- tai vuohenmaito tai seos, jossa on ollut myös lehmänmaitoa. Nykyisin suurin osa Kreikan fetajuustoista valmistetaan lehmänmaidosta.



Kuva 5 Valio Viola® salaattijuusto 180g, laktoositon

### 6.1 Esikäsittelyt

Esikäsittelyt ovat ne toimenpiteet, jotka käsittävät raaka-aineen prosessointia juustomaidoksi. (Tapaila 2011)

#### 6.1.1 Raaka-aine

Viola® salaattijuuston valmistuksessa käytetään raaka-aineena lehmänmaitoa. Tilalta tullut maito sisältää paljon eri mikrobeja ja on todennäköisin fagilähde. (Kammerlehner s. 180) Meijeriteollisuuden maidon jatkuva prosessointi edesauttaa fagien lisääntymistä ja leviämistä. Leviämiseen vaikuttaa fagien herkkyys esikäsittelyille ja hapatteiden herkkyys fagi-infektioille. Jos fagi-infektio tapahtuu prosessin aikana, on suuri mahdollisuus, että fagit leviävät muualle prosessiin ja lopputuotteeseen. Fagi-infektion mahdollistaa, jos pesut ovat puutteellisia tai laitteistoissa on jäämiä maitoliasta. Mahdollisia fagi-infektion osatekijöitä voivat olla; maitosiilot, maitotankit, putkistot, kiertopesujärjestelmät, pesuaineet, pesuvedet, ilmanvaihto ja etenkin juuston prosessoinnissa erottuva hera. (Kammerlehner 2009 s.180)

Fagit voivat kulkeutua ympäristöstä itse tuotteeseen tai raakamaitoon ilmateitse, henkilökunnan välityksellä, epätasaisilta pinnoilta, pintojen halkeamista, lattiakaivoista sekä hera/hapateputkistojen kautta, joilla on suora yhteys juustokattilaan. Fagit sietävät hyvin eri olosuhteita, niin kylmää kuin kuivaa, ja ne voivat olla infektiokykyisiä, mutta passiivisia pitkiäkin aikoja. Jos olosuhteet muuttuvat, voivat fagit aktivoitua ja levitä muualle prosessiin. Fageja voi olla kaikkialla, missä niille on tarjolla spesifisiä isäntäsoluja. (Valio Oy 2006)

Tehtaan raakamaidon bakteriofagipitoisuutta analysoitiin keväällä 2010 fagiauditoinnin yhteydessä. Tulokset osoittivat, että raakamaito sisältää fageja. Fagit ovat voineet siirtyä raakamaitoon jo tilalta tai maito oli kontaminoitunut vastaanoton yhteydessä. (Mykkänen 2010)

### 6.1.2 Separointi

Keskipakoisvoimaan perustuvalla separaattorilla erotetaan esilämmitetty maito kahteen komponenttiin; rasvaiseen (kerma) ja rasvattomaan (kuorittu maito). Separoinnin yhteydessä maidosta erottuu myös maitolimaa, joka sisältää runsaasti mikrobeja.

Separointi ei poista maidosta mahdollisia bakteriofageja. Bakteriofagikontaminaatoriski separoinnissa on suuri, sillä separointilaitteistolla käsitellään raakamaitoa. Jos separaattorin käytön jälkeinen pesu on puutteellinen, voi separointilaitteisto olla yksi bakteriofagikontaminaation levittäjä.

### 6.1.3 Pastörinti

Separoinnin jälkeen kerma ja kuorittu maito pastöroidaan eli lämpökäsitellään + 75 asteessa 15–20 sekunnin ajan. Pastöroinnin jälkeen juustomaidon komponentit jäädytetään + 4 asteeseen (Valio Oy 2009). Pastöroinnin tarkoituksena on tuhota tautia aiheuttavia patogeeneja ja parantaa maidon mikrobiologista laatua.

Bakteriofagien tuhoamiseen vaaditaan korkeaa lämpötilaa. + 65–70 asteen lämpökäsittelyllä voidaan vähentää bakteriofageja ja vasta + 90–95 asteen kuumennus 15–30 minuutin ajan tuhoaa. Minuutin ajan + 95 asteessa tuhoaa suurimmaksi osaksi lämpöä sietäviä fageja. (Kammerlehner 2009 s. 180; Walstra ym. 2006. s.383)

### 6.1.4 Panosvakiointi

Jäädytetyt juustomaitokomponentit vakioidaan panosvakioinnilla. Panosvakioinnissa yhdistetään ennalta lasketut maitokomponenttimäärät maitosiilossa ja sekoitetaan. Sekoituksen jälkeen maidosta määritetään rasva-, proteiini-, kuiva-ainepitoisuus, kolibakteerit sekä tarkastetaan pastöroinnin onnistuminen fosfataasikokeella. Fosfataasikokeella analysoidaan ovatko maidon luontaiset happanemista estävät laktoperoksidaasi-tiosyanaatti-

vetyperoksidi –systeemi (LPS-systeemi) ja agglutiniini tuhoutuneet lämpökäsittelyssä.

### 6.1.5 Ultrasuodatus

Juustomaito esilämmitetään 50 °C asteeseen ja konsentroidaan ultrasuodatuslaitteistolla, samalla säätäen maidon proteiinipitoisuus halutulle tasolle. Ultrasuodatustekniikka on puhdas, mekaaninen prosessi, jossa maito erotetaan kahdeksi erilliseksi virraksi, permeaatiksi ja retentaatiksi, puoliläpäisevää kalvoa ja paine-eroa hyödyntämällä. (Tapaila 2010; Bylund 2003)

Kalvojen huokoskoko ja käytettävä paine-ero määrää, mitkä molekyylit tai partikkelit läpäisevät kalvon. Paine-ero pakottaa kalvon huokosia pienemmät komponentit kalvon läpi (permeaatti), kun taas muut komponentit jäävät nesteeseen (retentaatti). Kalvon suuntaisesti liikkuva voimakas virta ehkäisee kalvon pinnan tukkeutumisen prosessin aikana. Tätä ilmiötä kutsutaan poikkivirtausuodatuksiksi (cross-flow filtration). (Tapaila 2010; Bylund 2003)

Viola<sup>®</sup> salaattijuuston valmistuksessa käytetään ultrasuodatustekniikkaa konsentroidamalla maidon proteiinit, bakteerit ja rasva retentaattivirraksi. Tällöin kalvon läpäisevä permeaattivirta koostuu maidon laktoosista ja mineraaleista. Ultrasuodatuksella saadaan juustomassasta hyvin proteiinipitoinen ja salaattijuustolle tyypillinen rakenne. Ultrasuodatuksen jälkeisen konsentroituneen massa pastöroidaan 86 asteessa 15 sekunnin ajan. (Valio Oy 2010; Tapaila 2010)

Bakteriofagien molekyylikoko vaihtelee 0,02–0,3 µm:n välillä, kun taas ultrasuodatuskalvon läpäisee 0,01–01 µm:n halkaisijaltaan olevat partikkelit. Tällöin on siis mahdollista, että bakteriofagit konsentroituvat retentaattiin, ja siirtyvät siten lopputuotteeseen.

### 6.1.6 Homogenointi

Juustomaito homogenoidaan salaattijuuston vaalea sävyn ja halutun maun saavuttamiseksi. Homogenoinnin seurauksena rasvapalloset pilkkoontuvat ja rasvan hajoaminen eli lipolyysi juustossa lisääntyy. Homogenointi estää juustossa kermoutumista juoksettumisajan ollessa pitkä ja juuston pinnan ”hikoilun” eli rasvan muodostumista juuston pinnalle. (Kammerlehner 2000)

Homogenointi tapahtuu suuressa paine-erossa, jossa maito puristetaan homogenisaattorin homogenointipään ahtaan aukon läpi 40 barin voimakkuudella. Maidon läpäistäessä homogenointipään, paine laskee radikaalisti, jolloin rasvapalloset pirstoutuvat useaksi pieniksi rasvapallosiksi. (Maidon matkassa 2007)

Teollisuudessa homogoinnin mekaaninen paine aiheuttaa osaksi maidon bakteereiden hajoamista, mutta ei kuitenkaan tuhoa bakteereita tai fageja kokonaan. Fagit kestävät heikosti osmoottista painetta, ja jos fageja suspendoidaan väkevään liuokseen ja laimennetaan nopeasti vedellä, hajoaa fagien pää ja nukleiinihappo purkautuu ulos (Salkinoja-Salonen 2002 s. 343). On osoitettu, että nukleiinihapon purkaumista tai proteiiniirakenteen hajoamista tapahtuu myös tavanomaista suurempaa painetta käytettäessä. Käytännössä kuitenkin teollisuudessa käytetyt homogointipaineet ovat alhaisempia, kuin mitä vaadittaisiin bakteriofagien tuhoamiseen. (Diels ym. 2006)

Homogoinnin jälkeen juustomaito jäädytetään ja siirretään tiivistetankkeihin.

### 6.2 Esikypsytytys

Esikypsytyksellä tarkoitetaan aikaa, joka kuluu hapatteen lisäyksestä juoksetteen lisäykseen. (Tapaila 2011)

#### 6.2.1 Hapatelisäys

Juustomaitoon tehtävä lisäys on hapate. Salaattijuuston valmistuksessa käytetään aromia antavia mesofiilisiä heterofermentatiivisia O-hapatteita. Mesofiilisten hapatteiden optimi kasvulämpötila on noin 30 °C. Hapatteiden ensisijainen tehtävä on lisätä juustossa happamuutta ja tuoda juustolle sen ominainen maku ja rakenne (Kammerlehner 2000 s. 38). Viola<sup>®</sup> salaattijuuston valmistuksessa käytettävät hapatteet ovat haponmuodostajia laktokokkeja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* –kantoihin pohjautuvia. (Valio Oy 2009)

Hapatteen aktiivisuuteen vaikuttaa bakteerilaji, hapatemäärä, valmistuslämpötila, pH, suolapitoisuus, veden aktiivisuus ja happanemishäiriöitä aiheuttavat tekijät. Hapatteen toiminta, tasaisesti ja hallitusti, on olennaista jatkuvalla juustontuotannolle. (Kammerlehner 2000 s. 38)

Fagit ovat spesifisiä isäntäsoluistaan, ja jos hapate on vastustuskyvytön, fagi infektoi hapatteen aiheuttaen happanemishäiriöitä. Väistö (Väistö 2010) on esittänyt maisterin tutkielmassaan, että hapate voi itsessään jo sisältää profageja, jolloin sopivissa olosuhteissa ne indusoituvat.

### 6.3 Juoksetteen lisäys massavirtaan

Viola<sup>®</sup> salaattijuuston valmistuksessa käytetään mikrobijuoksetta. Nestemäinen juoksete laimennetaan kylmään veteen, ja yhdistetään massavirtaan samanaikaisesti, kun massa valetaan pikareihin. Juoksettelisäys katkaisee K-kaseiini aminohapon 105 ja 106 välistä, jolloin aminohappo jakaantuu para-Kappa-kaseiiniksi ja GMP:ksi (glykomakropeptiini). GMP:n irtoamisen myötä miselli menettää negatiivisen varauksensa, jolloin misel-



lit voivat ”hyytelöityä”. Maidon saostumiseen tarvitaan mineraalisuoloja ennen kaikkea kalsiumia. (Kristensen 1995; Tapaila 2011)

Kaseiinimisellien järjestäytyminen haaroittumattomaksi ketjuksi aloittaa saostumisvaiheen. Prosessi on alussa hidas, mutta nopeutuu, kunnes hiutaloitumisaste on saavutettu. Saostuma on aluksi erittäin hauras. Juoksettumisen jatkuessa kolmiulotteinen verkosto tihenee, ja tuloksena on kiinteytyvä saostuma. (Kristensen 1995; Tapaila 2011)

Juoksetteen lisäys saostaa juustomassaa muodostaen proteiini matrixin. Fagit eivät pääse liikkumaan matrixin läpi, jolloin mahdollisten fagien lisääntyminen hidastuu. (Hassan ym. 2001 s. 179,181)

Juoksettumisen jälkeen juustomassa leikataan ja siirretään kypsytyshuoneeseen kypsymään vuorokauden ajaksi. (Valio Oy 2009)

### 6.4 Kypsytytys

Juusto kypsytetään pikareissa ilman kantta. Pikarit asetetaan häkkeihin riiveittäin ja kerroksittain siten, että juustomassa on kosketuksissa ainoastaan ilman kanssa. Häkkeihin mahtuu kerrallaan n. 1 000 pikaria. Tasaisen kypsytysolosuhteiden saavuttamiseksi häkit kelmutetaan ja häkkien ylä- ja alatasoille asetetaan levyt. Kelmutuksella ja levyjen asettamisella pyritään, että lämpötila olisi mahdollisimman tasainen koko häkin tilavuudelta. (Valio Oy 2009)

Tuoreella juoksete saostumalla on taipumus lujittua, koska misellien väliset sidokset pyrkivät lyhenemään ja sidoskohdat lisääntyvät. Samalla tapahtuu synereesi eli verkoston sisään sulkeutunutta heraa poistuu. Synereesi on itsestään tapahtuvaa, ilman ulkoisten voimien vaikutusta tapahtuvaa nesteen erottumista juoksettumasta tilavuuden samalla pienetessä. Juoksettuman kutistumisen alkamiseen vaikuttavat juoksetepitoisuus, lämpötila, happamuus pH, mineraalisuolapitoisuus ja koostumus. (Kristensen 1995; Tapaila 2011)

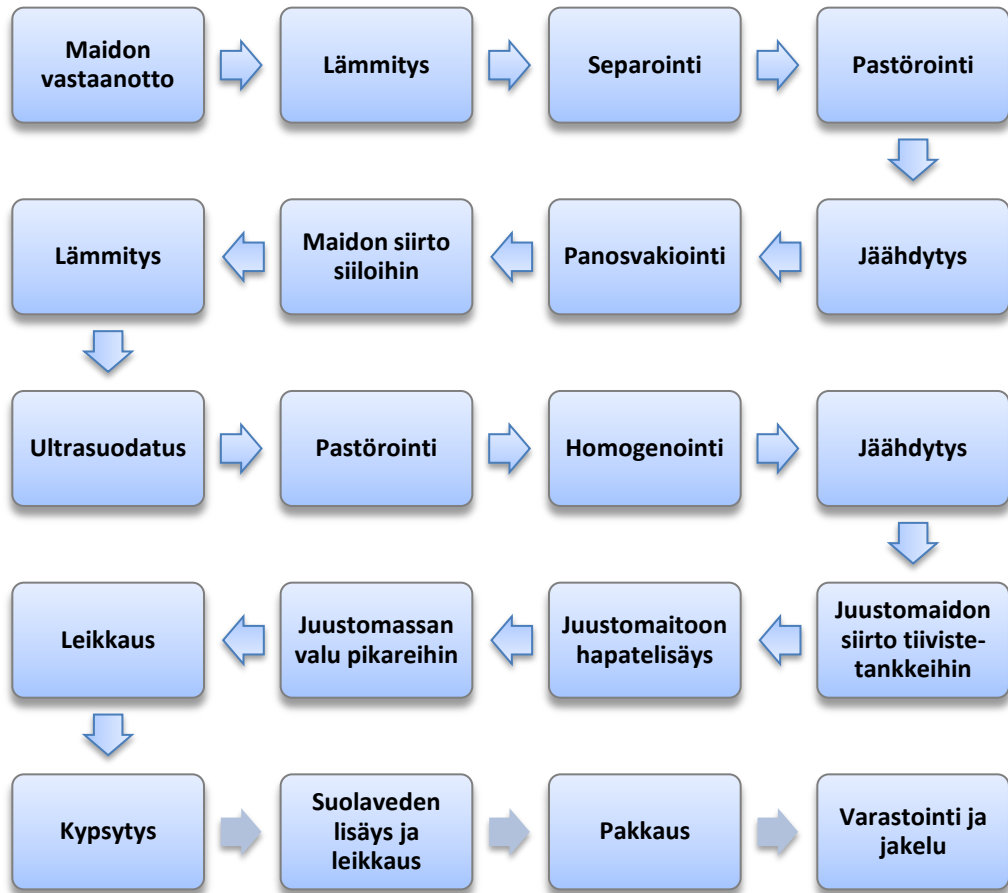
Synereesin voimistuessa fagit pääsevät liikkumaan juustossa. Hera on potentiaalinen kasvualusta fageille, sillä se tarjoaa fageille hyvät kasvuolosuhteet ja lisääntymiseen tarvittavia ravinteita. Alle 10 000 pfu/mL (plaque forming unit/ml) heran fagipitoisuus ei ole todettu aiheuttavan happanemishäiriöitä. (Hassan ym. 2001 s. 179,181)

### 6.5 Pakkaus ja jakelu

Kypsymisen jälkeen juustopikarit puretaan häkeistä ja leikataan toisen keran. Leikkauksen jälkeen juustopikareihin lisätään suolavesi. Suolavesi antaa juustolle makua ja parantaa juuston säilyvyyttä. Suolauksen jälkeen pikarit kansitetaan ja siirretään lämpövarastoon kypsymään neljäksi vuorokaudeksi. Lämpövarastoinnin jälkeen juustot kylmäkellaroidaan ja siitä edelleen jakeluun. (Valio Oy 2009)

6.6 Prosessikaavio valmistuksesta

Alla olevassa kuvassa on esitettyä Viola® salaattijuuston valmistuksen eri vaiheet kronologisessa järjestyksessä.



Kuva 6 Prosessikaavio Viola® salaattijuuston valmistuksesta.

## 7 BAKTERIOFAGITUTKIMUS

Tutkimuksen tavoitteena oli laatia Viola<sup>®</sup> salaattijuuston prosessille ajan-kohta suositus, jolloin olisi syytä vaihtaa hapate fagi-infektion ehkäisemiseksi. Nykyinen hapatevaihtosuositusraja oli havaittu liian tiukaksi, sillä raja-arvon ylityksistä huolimatta juuston happanemisessa ei ole havaittu merkittäviä poikkeavuuksia. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää pH-erostellillä bakteriofagien merkitys juuston eri happanemisvaiheissa ja päivittää hapatevaihdon suositusraja pH-eroon perustuvalla bakteriofagitestillä. Bakteriofagitesti suoritettiin juustosta erottuvasta herasta.

### 7.1 Analysoitavat näytteet

Analysoitavilla näytteillä haluttiin selvittää, kuinka mahdolliset bakteriofagit lisääntyvät tuotantopäivän edetessä. Tuotantopäivänä valmistetaan kolmessa eri tiivistetankissa juustomassaa, joka annostellaan pikareihin.

Bakteriofagitestiä varten näytteitä otettiin viitenä eri tuotantopäivänä. Yhden tuotantopäivän näytteet koostuivat kolmesta eri tiivistetankista. Jokaisen tiivistetankin massanlaskun jälkeen analysoitavat näytteet kerättiin tietyn väliajoin hapateenlisäyksestä. Tuotantopäivän ensimmäinen tutkittava näyte kerättiin tiivistetankista, ennen hapateenlisäystä ja loput näytteet kerättiin hihnalta tunnin päästä hapateenlisäyksen ja ensimmäisen leikkauksen jälkeen. Tulosten verrattavuuden vuoksi kerättävät näytteet olivat peräkkäisiä ja samalla tavalla kerättyjä. Kerättäviä näytteitä oli yhteensä yhdeksän per tankki, kahdeksan näytettä bakteriofagitestiä ja yksi näyte myyntiin hyväksyntä analyysia varten. Keräyksen jälkeen näytteet vietiin kypsytyshuoneeseen erilliseen metallihäkkiin, jonka sivut kelmutettiin, kuten tehdään normaalistikin juustonvalmistuksessa.

Näytteet kerättiin metallihäkistä ja esikäsiteltiin tietyn väliajoin taulukon 1 mukaisesti. Näytteistä mitattiin samalla lämpötila ja pH. Esikäsitelyssä hera esisuodatettiin tai sentrifugointiin ja mikro-suodatettiin 0,45 µm huokoskoon mikro-suodattimella steriiliin näyteputkeen. Suodattamisen jälkeen näytteet pakastettiin odottamaan varsinaista bakteriofagitestiä.

Bakteriofagitestiä varten näytteistä erotettiin hera mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen. Ensimmäisten kypsytystuntien aikana juustot olivat vielä saostuneessa muodossa ja heraa ei ollut vielä erottunut. Tämän vuoksi ensimmäiset viiden tunnin näytteet hapatettiin maitohapolla 40 °C:ssa vesihauteessa, kunnes juuston pH oli 4,5. Maitohappolisäyksen jälkeen hera alkoi erottua, jolloin näytteet sentrifugointiin ja mikro-suodatettiin.

Taulukko 1 Näytteiden kerääminen ja mittaukset bakteriofagitestiä varten.

Näytteistä tehtävät mittaukset			
Näyte	Bakteriofagitesti	pH	Lämpötila
Tiivistetankista ennen hapatellisäystä	x	x	x
Hapatellisäyksestä 1 h	x	x	x
Hapatellisäyksestä 3 h	x	x	x
Hapatellisäyksestä 5 h	x	x	x
Hapatellisäyksestä 7 h	x	x	x
Hapatellisäyksestä 9 h	x	x	x
Hapatellisäyksestä 11 h	x	x	x
Aamulla ennen suolavesilisäystä	x	x	x

Viideltä tuotantopäivältä analysoitavia näytteitä oli yhteensä 120 kpl. Tiivistetankit (3kpl) \* näytteet (8 kpl) \* 5 pv = 120 kpl.

Tutkimuksessa testattiin viiden eri hapatteen fagi-infektioherkkyyttä. Bakteriofagitestissä näyteputkia valmistettiin neljä (kuva 8) per juustonäyte, jolloin pH-mittauksia oli kokonaisuudessaan 2400 kpl:tta.

Hapatteet (5kpl) \* Näyteputket (4kpl) \* Näytteet (120 kpl) = 2400 kpl.

### 7.1.1 Bakteriofagitutkimus pH-eroon perustuvalla menetelmällä

pH:n muutokseen perustuvalla testausmenetelmällä määritetään fagipitoisuutta tuotantojuustojen herasta. Testissä verrataan kontrollinäytteen ja bakteriofageilla infektoituneen näytteen pH:ta keskenään inkuboinnin jälkeen. Testin perustana on infektoituneessa näytteessä hapatteen kasvun estyminen ja haponmuodostuksen väheneminen kontrolliin verrattuna.

Ennen testin alkua, kaikki heranäytteen kanssa olevat välineet pestiin ja steriloidiin ennen käyttöä. Tutkimuksessa käytettiin kertakäyttöisiä näyteputkia, jolloin niiden sterilointi oli tarpeetonta.

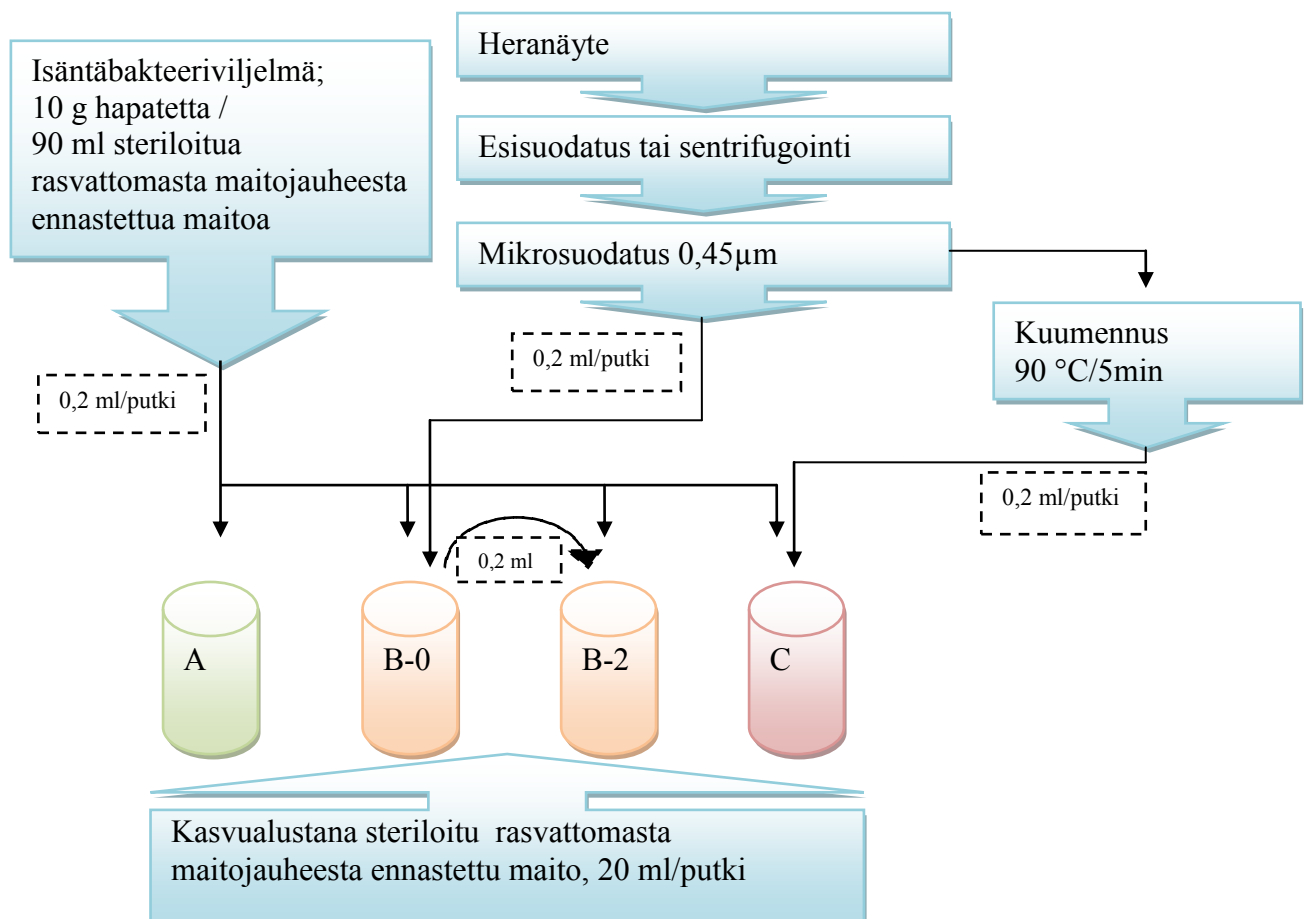
Tutkimuksessa näytteiden kasvualustana käytetään steriiliä, rasvattomasta maitojauheesta ennastettua maitoa. Isäntäbakteeria ja tutkittavaa heranäytettä pipetoidaan 1 % kokonaisnäytteen tilavuudesta (kuva 7). Tutkimuksessa näytteiden tilavuus oli 20 ml, jolloin hapatetta ja heranäytettä pipetoitiin näytteisiin 0,2 ml.

Testattavat hapatteen olivat cryofast eli pakastettuja hapatteita, joiden koostumus on raemainen. Rakeiden sulaessa hapate muuttuu hyvin viskoosiseksi liuokseksi. Viskoosisen olomuodon vuoksi hapateliuosta laimennettiin juoksevampaan olomuotoon mittaamalla hapatetta 10 ml 90

ml:n steriloituun maitojauheesta ennastettuun rasvattomaan maitoon. Laimennos sekoitettiin hyvin ja pipetoitiin jokaiseen putkeen.

Kontrollinäytteeseen pipetoitiin ainoastaan isäntäbakteeria (kuva 7, putki A). Putkiin B ja C pipetoitiin isäntäbakteerin lisäksi tutkittavaa heranäytettä. C putkessa tutkittava heranäyte kuumennettiin 90 °C:een viiden minuutin ajaksi. Kuumennuksella selvitettiin sisältääkö näyte mahdollisesti muita hapatetta inhiboivia tekijöitä esim. antibiootteja.

Mesofiilisiä näytteitä inkuboitiin  $30 \pm 1$  °C:ssa, kunnes kontrollinäytteen (putki A) pH oli 5,0 – 5,5. Inkuboinnin jälkeen jokaisesta näytteestä mitattiin pH välittömästi ja tulkittiin, onko näytteissä B ja C tapahtunut mahdollista fagi- infektiota ja haponmuodostuksen estymistä verrattuna putkeen A. Jokaisesta putkesta mitattiin pH vain kerran. Useampi pH-mittaus samasta näytteestä voi häiritä näytteiden happanemista ja täten aiheuttaa virheellisiä tuloksia.



Kuva 7 pH-muutokseen perustuva bakteriofagimääritys. Esi- ja mikrosuodatus ovat esikäsitteilyitä, joiden tarkoituksena on poistaa näytteestä proteiinit ja bakteerit. Kontrollinäytteeseen, putki A, pipetoidaan ainoastaan isäntäbakteeria. B putket ovat infektoituneita näytteitä, joista B-2 on  $10^{-2}$  laimennos. C putkea varten näyte kuumennetaan 90 °C:een viiden minuutin ajaksi.

Bakteriofagimäärityksen eli estokokeen tulokset olivat pH-yksikköinä. Tuloksista analysoitiin ensin infektoituneiden näytteiden (putket B ja C) ja kontrollinäytteiden (putki A) välinen pH-ero. Korrelaatiota laskettiin saatujen pH-erotuloksien ja juustojen pH-arvojen välillä. Korrelaatiolla pyrittiin todistamaan mahdollisten bakteriofagien kasvu prosessin aikana. Estokokeen näytteet ja pH-arvot olivat samasta juustosta, jolloin mahdollistettiin näytteiden luotettavampi verrannollisuus.

### 7.2 Tilastolliset menetelmät

Tulokset käsiteltiin Microsoft Office 2007 Excel-laskentaohjelmalla. Analyysien tuloksena saatiin bakteriofagien merkitys happanemisprosessiin selityksasteilla, korrelaatiokertoimilla ja keskihajonnoilla. Näillä menetelmillä selvitettiin kahden muuttujan yhteyttä eli korrelaatiota, tässä tapauksessa estotekijöiden vaikutusta juuston happanemiseen.

#### 7.2.1 Korrelaatiokerroin

Korrelaatiokerroin luku sijoittuu välille - 1 ja + 1. Tuloksen ollessa lähellä edellä mainittuja lukuja, on korrelaatio silloin vahva ja kahdella muuttujalla (x ja y) on selvästi vahva yhteys. Korrelaatiokertoimesta voidaan päätellä, kuinka luvut ovat yhteydessä lineaarisesti. Positiivinen korrelaatiokerroin kertoo nousevasta, kun negatiivinen laskevasta suorasta. Esim. Suomessa koulutus ja palkka ovat lineaarisesti nousevia. (Holopainen ym. 2008)

Jos muuttujat x ja y ovat toisistaan riippumattomia, on korrelaatiokerroin lähellä nollaa. Nollakorrelaation tulkinta voi aiheuttaa hankaluuksia, sillä korrelaatiokerroin laskee ainoastaan kahden muuttujan välistä riippuvuutta, ja jos (x tai y) tulokset liikkuvat tasapuolisesti nollan molemmiin puolin tulokset kumoavat toisensa, jolloin tuloksena on nolla. Tällöin korrelaatiokerroin ei kerro tulosten todellista yhteyttä. Tämä on oleellisesta ottaa huomioon tulosten analysoinnissa, sillä bakteriofagitesti tehtiin koko prosessin ajalta ja tarkoituksena oli tutkia kuinka pitoisuus vaihtelee tuotantopäivän edetessä. Myöhemmin esitettävissä tuloksissa voidaan havaita nousevaa ja laskevaa fagipitoisuutta prosessin aikana, vaikka juuston happaneminen etenee normaalisti. Tämä voidaan nähdä heikkoina korrelaatiokerroin tuloksina. (Holopainen ym. 2008)

Korrelaatiokertoimen heikkous on myös se, että se on hyvin herkkä tulosten poikkeavuudelle. Poikkeavuuksia voi aiheuttaa kolmas osatekijä, sillä korrelaatiokerroin ottaa huomioon ainoastaan kaksi muuttujaa. Kolmas tekijä tässä tapauksessa on esim. juuston lämpötilavaihtelut. Lämpötilalla voidaan hyvin vaikuttaa juuston happanemiseen. Alhaisella lämpötilalla juuston pH-arvo voi olla korkeampi ja täten aiheuttaa virheellisiä tuloksia. Etenkin pienissä aineistoerissä yksi poikkeava näyte voi vaikuttaa suurelta osin lopulliseen korrelaatiotulokseen. (Holopainen ym. 2008)

### 7.2.2 Selitysaste

Selitysaste  $R^2$  kertoo mallin hyvyttä eli kuinka suurelta osin prosentuaalisesti tulokset ovat selitettävissä kokonaisvaihtelusta ja lineaarisesti yhdenmukaisia. Selityskertoimella voidaan ilmaista kuinka monta prosenttia y-arvoista voidaan selittää muuttujan x avulla. (Holopainen ym. 2008)

### 7.2.3 Keskihajonta

Keskihajonta ilmaisee, kuinka tulokset ovat hajaantuneet keskiarvonsa ympärille. Havaintoarvojen keskittyessä tiiviimmäksi keskiarvon ympärille, sitä pienempi on keskihajonta. Hajallaan sijaitsevien eli keskenään kovin eri suurien lukujen keskihajonta on iso. (Holopainen ym. 2008)

## 8 BAKTERIOFAGITUTKIMUKSEN TULOKSET

Tutkimuksen tuloksista laadittiin yhteenveto taulukot juuston happanemisen edistymisestä ja hapatevaihtosuosituksista. Tarkemmat tulokset ovat esitettynä liiteosiossa.

## 8.1 Happanemiskäyrät

Analysoitavista juustoista mitattiin pH ja laadittiin pH-arvoista happanemiskäyrät tuotantopäivittäin ja tiivistetankeittain. Happanemiskäyrällä tarkoitetaan juuston happanemisen edistymistä hapatelisäyksestä suolaveden lisäykseen asti. Happanemiskäyrät laadittiin taulukossa 2 olevien tulosten perusteella. Happanemiskäyrät ovat esitettynä tarkemmin liiteosiossa.

Juuston tavoite pH ennen pakkausvaihetta on 4,8 (ohjausraja < 5). Tämä arvo toteutui jokaisessa analysoitavassa näytteessä. Juuston happaneminen oli toistuvasti samankaltainen tuotantopäivästä riippumatta. Pientä poikkeavuutta aiheutti kolmas tankki. Kolmannen tankin poikkeavuuksissa massantilavuus oli suhteessa muihin tankkeihin pienempi. Pienempi massatilavuus mahdollistaa hapatteen suuremman aktiivisuuden, jolloin happaneminen on nopeampaa. Toisekseen kolmannen tankin nopeampaan happanemiseen on vaikuttanut kypsytyshäkkien lämpötila. Tuotantopäivän edetessä lämpötila vaihtelee kypsytyshuoneessa, sillä kaikki ovenavaukset ja tuotantoon liittyvät liikkeet aiheuttavat ilmavirran sekoittumista. Päivän lopulla lämpötila tasaantuu ja viimeisen tankin massalla on tasaisempi kypsyyslämpötila.

Taulukko 2 Analysoitavien juustojen pH-arvot

Tuotantopäivä	Juustojen pH-arvot														
	060910			130910			041010			111010			261010		
Tankki	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tiivistetankista ennen hapatelisäystä	6,67	6,59	6,66	6,68	6,69	6,68	6,62	6,63	6,64	6,64	6,66	6,63	6,64	6,66	6,63
Hapatelisäyksestä 1 h	6,57	6,54	6,48	6,57	6,52	6,54	6,60	6,55	6,51	6,56	6,57	6,54	6,61	6,57	6,50
Hapatelisäyksestä 3 h	6,48	6,46	6,36	6,51	6,40	6,48	6,56	6,49	6,38	6,53	6,45	6,41	6,58	6,46	6,30
Hapatelisäyksestä 5 h	6,35	6,25	6,04	6,31	6,09	6,31	6,45	6,31	5,96	6,33	6,02	6,01	6,41	6,19	5,69
Hapatelisäyksestä 7 h	5,92	5,60	5,43	5,79	5,31	5,76	6,02	5,70	5,27	5,70	5,36	5,36	6,04	5,52	5,17
Hapatelisäyksestä 9 h	5,25	5,11	5,05	5,09	4,97	5,12	5,40	5,19	4,98	5,18	5,05	5,04	5,40	5,09	4,98
Hapatelisäyksestä 11 h	4,91	4,88	4,89	4,89	4,87	4,91	4,95	4,93	4,90	4,97	4,95	4,93	5,07	4,95	4,91
Aamulla ennen suolavesilisäystä	4,77	4,75	4,76	4,68	4,69	4,74	4,81	4,83	4,78	4,78	4,78	4,81	4,80	4,79	4,78



## 8.2 Hapatevaihtosuositukset

Bakteriofagitestituloksiin pohjautuen laadittiin viidelle eri hapatteelle ja yhteenvetona koko prosessille yhtenäinen hapatevaihtosuositus. Hapatevaihtosuositusrajat määritettiin laskemalla jokaiselle hapatteelle keskiarvot korrelaatiokertoimista, selitysasteista, keskihajonnoista sekä estokokeen pH-erotuloksista. Yhtenäinen hapatevaihtosuositusraja laskettiin keskiarvona hapatekohtaisista tuloksista.

Bakteriofagitestistä saaduissa tuloksissa oli havaittavissa nousevaa ja laskevaa estotekijöiden pitoisuutta. Pitoisuudet vaihtelivat juustojen välillä ja tulokset eivät olleet yhteneväisiä. Vaihtelu ilmeni siten, että yhden tiivistetankin juustomassalla saattoi olla alussa suurempi fagipitoisuus kuin tuotantopäivän lopussa. Tämä vaihtelu toistui samalla tavalla tai päinvastoin useassa tankissa. Vaihtelun vuoksi tuloksia analysoitiin kokonaisvaltaisesti. Tuloksissa otettiin huomioon hapatekohtaisesti jokainen tuotantopäivä, riippumatta tiivistetankkien eroista ja prosessin kulusta. Loppuyhteenvetona laskettiin keskiarvo viideltä tuotantopäivältä, jolloin saatiin laadittua jokaiselle hapatteelle hapatevaihtosuositus sekä selvitettyä onko saaduilla bakteriofagipitoisuuksilla merkitystä juuston happanemiselle.

Nykyisin hapatevaihtosuositus määräytyy bakteriofagitestin B<sup>2</sup>-A putken tuloksen perusteella, jolloin 0,1 pH-yksikön ylitys olisi suositus hapatevaihdokselle. Prosessille uudet hapatevaihtosuositukset laadittiin B<sup>0</sup>-A, B<sup>2</sup>-A ja C-A putkille analysoimalla yhteenveveto taulukkoa 2. Tarkemmat bakteriofagitestitulokset ovat esitetty liiteosiossa.

Taulukko 3 Keskiarvotulokset hapatekohtaisesti

Hapate	Korrelaatiokerroin			Selitysaste %			Keskihajonta			Keskiarvo estokokeen pH-eroista, hapatevaihtosuositus		
	B <sup>0</sup> -A	B <sup>2</sup> -A	C-A	B <sup>0</sup> -A	B <sup>2</sup> -A	C-A	B <sup>0</sup> -A	B <sup>2</sup> -A	C-A	B <sup>0</sup> -A	B <sup>2</sup> -A	C-A
Hapate A	0,15	0,32	0,15	26,50	30,86	32,90	0,10	0,09	0,10	0,03	0,12	0,07
Hapate B	-0,47	-0,39	-0,09	38,29	29,96	21,22	0,12	0,12	0,10	0,07	0,10	0,09
Hapate C	0,03	0,15	0,21	25,32	17,14	28,05	0,10	0,09	0,09	0,04	0,13	0,12
Hapate D	0,02	0,36	0,24	29,04	27,81	29,37	0,10	0,09	0,12	0,14	0,22	0,18
Hapate E	0,28	0,31	0,13	29,62	28,01	35,27	0,09	0,09	0,08	0,08	0,17	0,05
<b>Hapatevaihtosuositus</b>										<b>~ 0,1</b>	<b>~ 0,2</b>	<b>~ 0,1</b>

### 8.2.1 Yhteenveto

Testitulokseksi saatiin, että n. 30 % tuloksista voidaan selittää (taulukko 2). Suurempi selitysaste olisi merkinnyt fagipitoisuuden kasvua prosessin edetessä. Saatu tulos tarkoittaa, että testatut hapatteet ovat melko resistentsejä tuotannossa esiintyvälle estotekijöille. Näin ollen voidaan todeta, että testattujen näytteiden fagipitoisuuksilla tai muilla estotekijöiden pitoisuuksilla ei ollut suurta merkitystä testattujen juustojen happanemiselle.

Nykyinen hapatteenvaihtosuositusraja on B-2 putkella 0,1 pH-yksikköä, mikä tarkoittaa sitä, että kontrollinäytteen (putki A) ja testattavan näytteen (putki B-2) välinen pH-eron ylittäessä 0,1 pH-yksikköä merkitsee estotekijöiden läsnäoloa. Uudeksi yhtenäiseksi hapatevaihtosuositukseksi laskettiin keskiarvo kaikista hapatteista jokaiselle estokokeen putkelle. Tällöin B<sup>0</sup>-A putkelle suositus olisi 0,1 pH-yksikköä, B<sup>2</sup>-A putkelle 0,2 pH-yksikköä ja C-A putkelle 0,1 pH-yksikköä. On myös mahdollista, että uudet suositusrajat ovat alhaisempia todelliseen tilanteeseen nähden, ja hapatteet sietäisivät korkeampaakin bakteriofagipitoisuutta. Tällöin juuston aamu-pH:n tarkkailu olisi hyödyllisempää kuin fagipitoisuuden testaaminen. Kaikki testattavat juustot saavuttivat tavoitellun pH:n, vaikka juustoissa esiintyi heikosti happanemista häiritseviä estotekijöitä. Estotekijöiden pitoisuus ei kuitenkaan aiheuttanut juustoissa happanemishäiriöitä, jotka vahvistaa sitä, että estotekijöiden pitoisuus on ollut riittävän alhainen.

### 8.3 Johtopäätökset ja tulosten luotettavuus

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää kypsymisen ajalta bakteriofagipitoisuutta. Tulosten luotettavuutta olisi lisännyt, jos tutkimuksessa olisi otettu huomioon myös raakamaidon bakteriofagipitoisuus. Raakamaito on yleisin fagilähde, josta syystä raakamaidon fagipitoisuus olisi ollut hyvä testata tuotantopäiviltä, jolloin näytteitä otettiin. Tällöin olisi saatu tuotantopäiviltä fagipitoisuudet raaka-aineesta valmiiseen tuotteeseen saakka. Raakamaidon testaus olisi myös eliminoinut prosessista johtuvat mahdolliset fagikontaminaatiot. Äänekosken tehtaalla keväällä 2010 tehty fagiauditointi vahvistaa, että raakamaito sisältää fageja, mutta ei ole varmuutta sisälsikö opinnäytetyössä tutkittavien juustojen raakamaito fageja ja kuinka paljon.

Tulosten vaihtelevuuteen on vaikuttanut hapatemäärä ja massamäärä tiivistetankeissa. Hapatelisäysmäärä on joka tankissa sama, riippumatta tankissa olevasta massamäärästä. Tyypillisesti tankissa 1 ja 2 on saman verran tiivistemassaa, mutta viimeisessä eli tankki 3:ssa on tuotantopäivästä riippuen saman verran tai vähemmän tiivistemassaa. Hapatemäärän ollessa sama ja massamäärän ollessa pienempi, seuraa pienemmässä massamäärässä nopeampaa happanemista. Nopeampi happaneminen johtuu siitä, että hapatebakteereita on pienemmässä tiivistemassamäärässä suhteessa enemmän. Suurempi hapatebakteerimäärä antaa myös toisaalta mahdollisille fageille enemmän kasvualustaa, jolloin fagipitoisuus voi olla korkeampi kuin kahdessa muussa tankissa.

Lämpötilalla voidaan vaikuttaa olennaisesti juuston happanemiseen. Juustot kypsytetään normaalisti n. 1 000 kpl:n juustohäkeissä. Tutkittavat näytteet kerättiin erilliseen ja huomattavasti pienempään häkkiin, verrattuna prosessissa tavallisesti käytettäviin kypsytyshäkkeihin, jotta tuotantojuustojen kypsymisprosessi ei häiriintyisi tutkimuksesta. Prosessissa juustohäkkien kaikki sivut peitetään kelmulla sekä ylä- ja alatasot levyillä, jotta lämpötila olisi mahdollisimman tasainen ja juustot olisivat suojattu ulkoisilta tekijöiltä. Normaalissa tuotannossa häkit ovat suljettuina suolaveden lisäykseen saakka, jolloin kypsymisprosessi ja lämpötila pysyvät tasalaa-tuisempina. Pienemmässä häkissä lämpötila oli muutaman asteen alhaisempi kuin suuremmissa, jolloin happanemisprosessi oli hieman heikom-paa. Alhaisempaan lämpötilaan vaikutti myös se, että pienempää häkkiä avattiin tietyin väliajoin näytteenotonajaksi, jolloin lämpötilavaihtelua syntyi. Lämpötilavaihtelut olivat suurimmillaan prosessin alussa, jolloin näytteenottokertoja oli enemmän. Viimeisessä pH-mittauksessa lämpötila oli tasaantunut, sillä häkin avauskerrat vähenivät loppua kohti huomatta-vasti ja juustot saivat rauhassa kypsyä. Tulosten luotettavuuden kannalta juustonäytteet olisi pitänyt ottaa suuremmista kypsytyshäkeistä, jolloin lämpötila ja happaneminen olisivat olleet enemmän verrannollisia suhtees-sa tuotantoprosessiin.

Bakteriofagitutkimuksessa näytteitä otettiin prosessin alusta tietyin vä-liajoin hapatellisäyksestä. Normaalissa tuotannossa fagitesti tehdään yön yli kypsyneestä juustosta, jolloin hera on erottunut ja sen saa helposti mik-ro-suodatettua testiä varten. Tutkimuksessa ensimmäiset juustonäytteet oli-vat saostuneita, ja niistä ei ollut vielä heraa erottunut. Ensimmäisten kyp-sytystuntien juustonäytteet hapatettiin maitohapolla, kunnes pH oli 4,5 - 5 välillä. pH:n laskun myötä juustosta erottui heraa, jolloin juusto sentrifu-goitiin ja erottunut hera mikro-suodatettiin fagitestiä varten. Opinnäytetyön tutkimuksessa näytteet esikäsiteltiin normaalista poikkeavalla tavalla, jol-loin ei ollut varmuutta siitä, kuinka mahdolliset fagit reagoivat maitohap-polisäykseen. Fagit ovat herkkiä osmoottiselle paineelle ja voi olla mah-dollista, että äkillinen pH:n muutos on voinut tuhota fagien nukleiinihap-popään ja siten aiheuttaa fagitestissä vaihtelevia tuloksia. Lisäksi juokset-tuneessa juustossa fagit eivät pääse liikkumaan proteiinimatrixin läpi, jol-loin mahdollisten fagien lisääntyminen hidastuu. Nämä tekijät vaikuttavat tulosten vaihtelevuuteen, ja voi olla mahdollista, että näytteissä fagipitoi-suus oli niin pieni, että tulokset olivat sen takia negatiivisia.

Fagitestissä pipetoitiin 0,2 ml hapatetta ja tutkittavaa näytettä steriiliin maitojauheesta ennastettuun maitoon. Pipetoinnit suoritettiin samalla pipe-tillä ja steriileillä 1 ml tilavuuden vaihtokärjillä. Pipetoitava määrä oli hy-vin pieni, jolloin pienimmätkin hapatemäärän vaihtelut vaikuttavat olen-naisesti lopputulokseen. Pienemmässä hapatemäärässä on vähemmän mai-tohappobakteereja tuottamaan happoa, jolloin pH vaihteluita syntyy samo-jen näytteiden välillä. Pipetin vaihtokärkien tilavuutta mitattiin vedellä, punnitsemalla pipetinkärjen tilavuus analyysivaa'alla. Vedellä kontrolloin-ti ei kuitenkaan ole samalla tavalla verrannollinen laimennetun hapatteen kanssa, sillä hapatteen koostumus oli huomattavasti viskoosisempi ja on mahdollista, että tutkimuksessa hapatetilavuus oli pienempi kuin vedellä

mitattu. Tästä johtuen on mahdollista, että tulosten vaihtelevuuteen on vaikuttanut pipetoitu hapatemäärä.

Fagitestattavia näytteitä oli yhden päivän aikana n. 450 kpl:tta, jotka inkuboitiin 30 °C:een lämpökaapissa, kunnes kontrollinäytteiden pH oli 5 – 5,5. Näytemäärän ollessa hyvin suuri, ilmeni ongelmia inkubointikaapin lämpötilan tasaisuudessa. Ongelma ilmeni siten, että lämpökaapin reunojen myötäiset näytteet olivat lämpötilaltaan hyvät, kun lämpökaapin muut näytteet olivat lämpötilaltaan hieman alhaisempia. Lämpötilan tasaisuutta korjattiin nostamalla lämpökaapin lämpötilaa ja vaihtamalla näytteiden paikkoja reunan ja sisempien paikkojen välillä. Paikkojen vaihdoksen ja lämpötilan noston vuoksi näytteiden välillä oli lämpötilavaihteluita, jotka ovat osaltaan vaikuttaneet tulosten vaihtelevuuteen. Luotettavampia tuloksia olisi saatu, jos näytemäärä olisi ollut puolet pienempi, jolloin olisi mahdollistettu parempi tasalaatuisuus näytteiden välillä.

Suuren näytemäärän vuoksi bakteriofagitutkimus suoritettiin kahdella pH-mittarilla. Yhdellä pH-mittarilla näytteiden mittaaminen per hapate olisi kestänyt yli 30 min. Pitkällä aikavälillä loppunäytteet olisivat hapantuneet enemmän kuin alkupään näytteet, jolloin pH-eroa olisi ilmennyt enemmän. Kahdella mittarilla pystyttiin mittaukset tekemään n. 15 minuutissa per tutkittava hapate, jolloin pH-erot minimoitiin. Molempien mittareiden kuntoa kontrolloitiin kalibroimalla ennen tutkimuksen alkua ja tarkastamalla mittareita tutkimuksen aikana pH 4 ja pH 7 puskuriliuoksilla. Kalibroinnissa mittarit säädettiin puskuriliuoksilla 3,98 – 4,02 pH:n ja 6,98 – 7,02 pH:n välille, tällöin kalibrointitulokset ovat mahdollista vaihdella  $\pm 0,04$  pH-yksikön välillä. Tutkimuksen aikana molemmat mittarit säädettiin samalle tasolle, jotta vaihteluilta vältyttäisiin. On kuitenkin mahdollista, että tutkimuksen aikana pH-mittauksissa on tapahtunut mittaustarkkuuden vaihtelua, johtuen suurista mittauskertojen toistoista saman päivän aikana. Useat mittaustoistot voivat heikentää mittaustarkkuutta, ja tulosten luotettavuuden parantamiseksi mittarit olisi pitänyt kalibroida kolmella puskuriliuoksella (pH 4, 7 ja 10), joiden lämpötilaero tutkittavien näytteiden kanssa olisi ollut  $\leq \pm 0,1$  °C. (Lehtonen P. s.141)

Tutkimuksen hyödyllisyys oli hyvä, sillä tutkimuksessa otettiin tarkempaan huomioon varahapatteet. Saadut tulokset olivat kohtalaisia, mutta tuloksista ilmeni kuitenkin hapatteiden eroavaisuudet ja niiden resistenttisyys mahdollisten fagien läsnä ollessa. Saaduista tuloksista pystyttiin laatimaan prosessille hapatevaihtosuositukset, joka oli opinnäytetyön tavoite.

### 8.3.1 Jatkosuunnitelmat

Jatkossa, jos samankaltaiselle tutkimukselle on tarvetta, niin suosittelisin, että näytemäärää vähennettäisiin. Tarpeelliset tutkittavat näytteet olisi raakamaito, tiivistetankista otettu näyte ennen hapatelistäystä ja juustosta heranäyte ennen suolaveden lisäystä. Näytteiden keräys tapahtuisi tankeittain, kuten opinnäytetyössäkin. Näillä kolmella näytteellä saataisiin koko tuotannosta suuntaa antava käsitys bakteriofagipitoisuuksista. Opinnäytetyön kaltaista tutkimusta on mielestäni tarpeetonta tehdä uudestaan, vaan pikemminkin olisi parempi keskittyä edellä mainittuihin kolmeen näytteeseen. Näytteenotot olisivat verrannollisia muiden tuotantojuustojen kanssa, jos tutkittavat näytteet otettaisiin tankeittain ja suurista häkeistä. Näin olleen näytteet olisivat tasavertaisia ja muut happanemista häiritsevät osatekijät voidaan eliminoida.

Epäiltäessä voimakasta fagi-infektiota tulisi juustonäytteiden lisäksi määrittää bakteriofagipitoisuus tuotantotilojen ilmasta. Ilmanäyte tulisi ottaa etenkin silloin, kun samana tuotantopäivänä valmistetaan ja pakataan yhtä aikaa kahta eri erää. Ilmanäytteillä pystyttäisiin varmistamaan aiheuttaako kahden erän yhtä aikainen valmistus ja pakkaus fagikontaminaatioita keskenään.

Hukkasen opinnäytetyössä (Hukkanen 2008) määritettiin hapatevaihtosuositus Lapinlahden edam – ja emmentaljuustojen valmistusosastoille. Hapatevaihtosuositusrajaksi oli saatu  $10^{-2}$  laimennokselle 0,2 pH-yksikön ero infektoituneen ja kontrollinäytteen välille. Tulos on sama kuin Viola<sup>®</sup> salaattijuuston tuotannolle laskettu suositus. Hukkasen työssä korrelaatiota laskettiin  $10^0$  ja  $10^{-2}$  laimennosten välille, kun tässä opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata bakteriofagitestin tulosta suhteessa juuston pH-arvoon. Jatkossa, jos samankaltaiselle tutkimukselle on tarvetta, olisi hyvä verrata myös laimennosten välistä yhteyttä. Tällöin tulosten luotettavuutta voisi verrata kahdella eri tavalla. Lisäksi Hukkasen työssä koeosuudessa oli tehty kontrolliputki, jossa testattiin mikro-suodatuksen onnistumista. Putken kasvatusalustana toimi steriloitu ennastetusta maitojauheesta tehty maito. Putkeen pipetoidaan ainoastaan heranäytettä 1 %. Jos kontrolliputki happanee, on se merkki suodatuksen epäonnistumisesta ja tuloksen epäluotettavuudesta. Tämä on yksinkertainen tapa kontrolloida testin luotettavuutta.

Bakteriofagitestin lopputulokseen vaikuttaa moni eri tekijä. Luotettavampia tuloksia kertoo juuston todellinen pH-arvo, ja etenkin juuston tavoite pH-arvo. Tuloksiin pohjautuen fagipitoisuuksilla oli heikko korrelaatio juuston happanemiseen, tällöin painottaisin enemmän tarkkailua juuston happanemiseen kuin fagitestin suorittamiseen. Tutkimuksessa kaikki juustot saavuttivat tavoite pH:n, vaikka tuloksissa oli heikkoa fagipitoisuutta. Jos juustot eivät saavuta tavoite pH:ta, tulisi fagitesti suorittaa.

## 9 LÄHTEET

Broadbent J.R. 2001. Genetics of lactic acid bacteria. Teoksessa Marth E. H., Steele J. L. ja Dekker M., Applied dairy microbiology. New York. Marcel Dekker Inc. 2001. s 243-300

Bylund G. 2003. Dairy processing handbook. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB.

Diels A. M. J., Michiels C. W. 2006, High-Pressure Homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms.

Viitattu 9.2.2011.

[http://www.redorbit.com/news/science/770422/highpressure\\_homogenization\\_as\\_a\\_nonthermal\\_technique\\_for\\_the\\_inactivation\\_of/](http://www.redorbit.com/news/science/770422/highpressure_homogenization_as_a_nonthermal_technique_for_the_inactivation_of/)

Deveau H., Labrie S. J., Chopin M-C. ja Moineau S. 2006. 72(6): 4338–4346. Biodiversity and Classification of Lactococcal Phages, Appl Environ Microbiology. Viitattu 9.2.2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489595/>

Evira, *Bacillus cereus* -bakteerin määrittäminen ja alustava tunnistaminen 2006. Pesäkelaskentatekniikka. Menetelmäohje 3406/1, ISO 7932:2004. Viitattu 22.3.2011.

[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike\\_ja\\_rehutus/evira3406\\_v1\\_bacillus\\_cereus.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehutus/evira3406_v1_bacillus_cereus.pdf)

Evira, enterobakteerien määrittäminen 2010. Pesäkelaskentatekniikka. Menetelmäohje 3462/4, ISO 21528-2:2004. Viitattu 22.3.2011.

[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike\\_ja\\_rehutus/evira3462\\_v4\\_enterobakteerit\\_maaritys\\_pes\\_lask\\_tekn.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehutus/evira3462_v4_enterobakteerit_maaritys_pes_lask_tekn.pdf)

Hapatekirja 1989. Meriläinen, Leporanta K., Huurinen J., Lampi M., Kärki M., Manninen R., Saxelin M. Valio Oy 1989, Helsinki.

Hassan A. N. ja Frank J. F. 2001. Starter cultures and their use. Teoksessa Marth E. H., Steele J. L. ja Dekker M., Applied dairy microbiology. New York. Marcel Dekker Inc. 2001. s 151-206

Hukkanen P. 2008. Bakteriofagien hallinta juustolassa. Hämeen ammattikorkeakoulu. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma, Hämeenlinna. Opinnäytetyö.

Holopainen M. ja Pulkkinen P. 2008. Tilastolliset menetelmät, 5. uudistettu painos. WSOY oppimateriaalit oy, Helsinki.

Kammerlehner J. 2000. Juustonvalmistusteknologia. Helsinki. Valio Oy:n käänös kirjasta Labkäse Technologie. Käänös Tapani Kivelä ja Reijo Vihma.

Kammerlehner J. 2009. Cheese technology, englanninkielinen käännös kirjasta Käsetechnologie 2003. Käännös Axel Mia 2009, Yhdysvallat.

Kristensen J.M. Buch 1995. Cheese technology- a northern European approach. International Dairy books, Danish Dairy Board.

Kuittinen N. 2009. Fouling-torjuntaan käytettävän kemikaalin valintaperusteet, Principles for choosing a fouling prevention chemical. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Kandidaatintyö.

Lehtonen P. O. 1998. Potentiometrinen analyysi, pH- ja ISE-mittaukset. Oy Edita Ab, Helsinki.

Lubbers M., Schofield K., Waterfield N. ja Polzin M. 1998. Transcription Analysis of the Prolate-Headed Lactococcal Bacteriophage c2. Journal of Bacteriology. Vol. 180, No. 17, p. 4487-4496. Viitattu 23.3.2011.  
<http://jb.asm.org/cgi/content/full/180/17/4487?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&searchid=1&FIRSTINDEX=90&minscore=4000&resource=HWCIT>

Madigan M. T., Martinko J. M. ja Parker J. 2000. Brock, biology on micro-organisms ninth edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey.

Madigan M. T., Martinko John M., Dunlap Paul V. ja Clark David P. 2009. Brock, biology on micro-organisms twelfth edition. Pearson education, Inc. San Francisco.

Maidon matkassa 2007. Aho J. ja Hildén T. Edita Prima Oy, Helsinki.

Maito ja me 2002. T101 paljastaa antibioottijäämät. Viitattu 9.2.2011.  
[http://www.valio.fi/maitojame/laatuterveys\\_02/t101.htm#hapatetuotanto](http://www.valio.fi/maitojame/laatuterveys_02/t101.htm#hapatetuotanto)

Manninen R. 2009. Hapanmaitovalmistekurssin luentomonisteet, Hämeen ammattikorkeakoulu, Hämeenlinna.

Mykkänen P. 2010. Fagiauditoinnin tulokset. Valio Oy, Äänekosken tehdas.

Mäki M., Pahkala E., Tupasela T., Saarisalo E., Heikkilä T. ja Jaakkola S. 2006. Maidon prosessoitavuus ja hygieeninen laatu. MTT/Biotekniikka – ja elintarviketutkimus (BEL). Suomen Nurmijyhdistyksen julkaisu 24: 43-50, Jokioinen. Viitattu 9.2.2011  
[https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/nurmijyhdistys/Julkaisut/Rehuntuotantoteknologiankehitys/24\\_5\\_maidon\\_prosessoitavuus.pdf](https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/nurmijyhdistys/Julkaisut/Rehuntuotantoteknologiankehitys/24_5_maidon_prosessoitavuus.pdf)

Salkinoja-Salonen M., 2001. Mikrobien geneettiset ominaisuudet, DNA:n ominaisuudet ja toiminta. Teoksessa Salkinoja-Salonen M. (toim.), Mikrobiologian perusteita. Mikrobiologian julkaisuja 49/2001. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, Helsingin yliopisto. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä. s. 297-322

Salkinoja-Salonen M., 2001. Bakterivirukset ja niiden genomien toiminta. Teoksessa Salkinoja-Salonen M. (toim.), Mikrobiologian perusteita. Mikrobiologian julkaisuja 49/2001.. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, Helsingin yliopisto. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä. s. 340-351

Tapaila M. 2005. Juustot ja jauheet. Teoksessa Saarela, A-M. Määttä, S. Hyvönen, P. von Wright, A., Elintarvikeprosessit. Savonia-ammattikorkeakoulun julkaisusarja B 3/2005. Tampereen Yliopistopaino Oy Juvenes Print. s. 39-56

Tapaila M. 2010. Jäätelöt- ja erikoisvalmisteetkurssin luentomonisteet. Hämeen ammattikorkeakoulu, Hämeenlinna.

Tapaila M. 2011. Juustontuotantokurssin luentomonisteet. Hämeen ammattikorkeakoulu, Hämeenlinna.

Valio Oy 2009. Laatusuunnitelma, Viola salaattijuustokuutio. Valio Oy, Äänekosken tehdas.

Valio Oy 2006. Bakteriofagikoulutus. Taimisto A-M. Luentomonisteet.

Valio Oy 2010. pH-eroon perustuva bakteriofagi – määritysohje. Valio Oy:n sisäiseen käyttöön. Äänekoski.

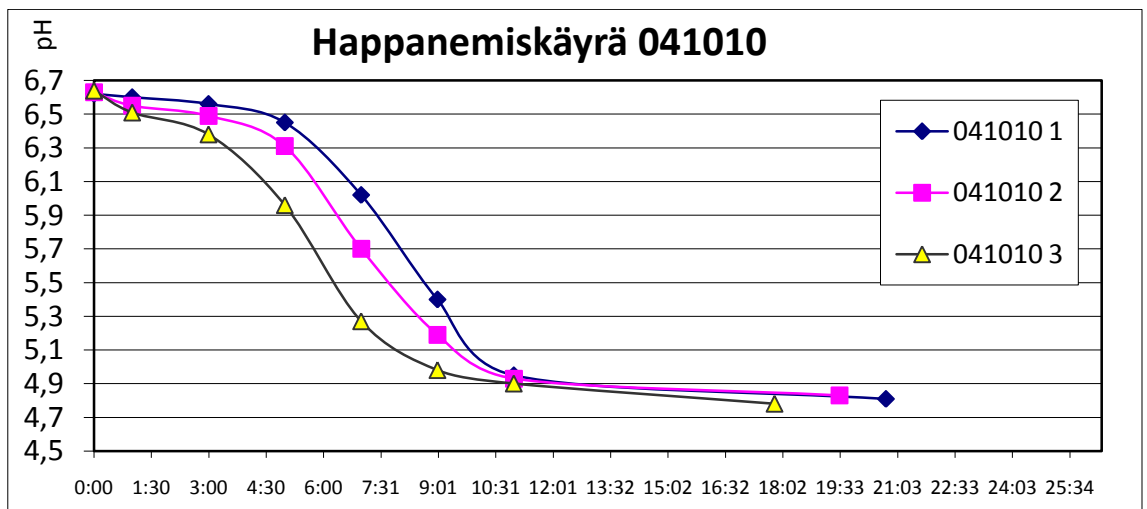
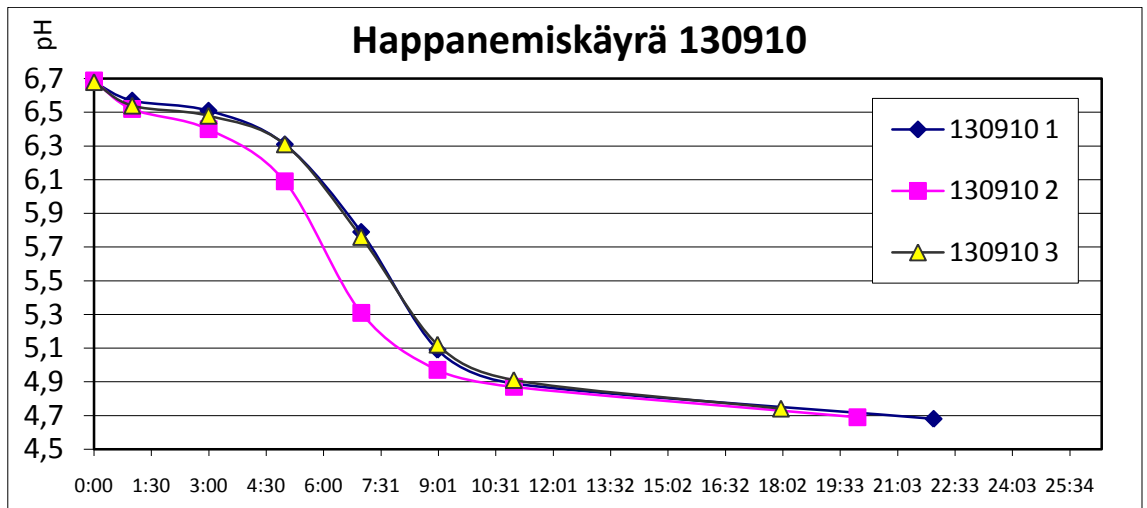
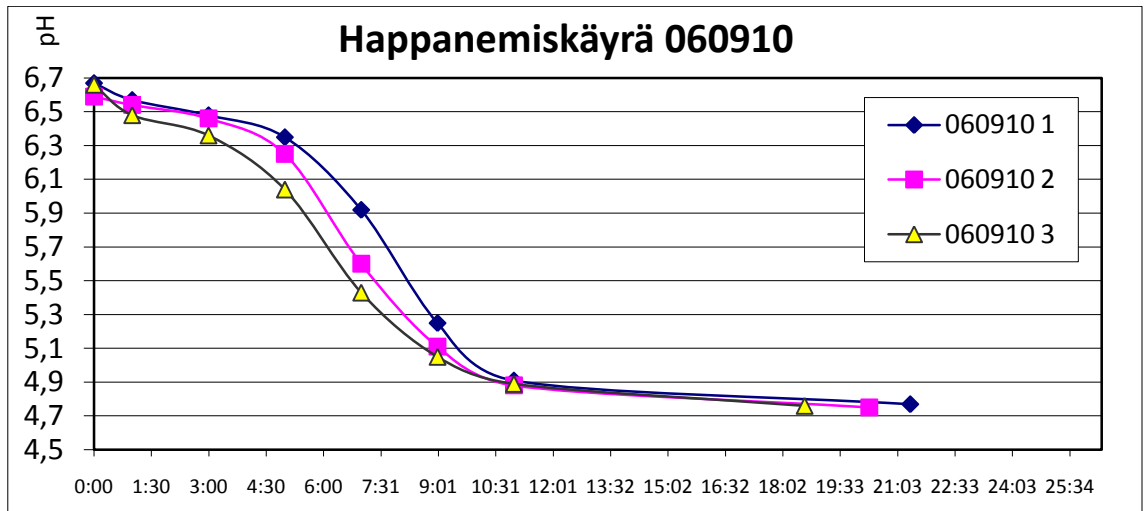
Väistö A. 2010. Viilin varahappatteen kehittäminen. Helsingin yliopisto, maatalous-metsätieteellinen, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. Helsinki. Maisterin tutkielma.

Walstra P., Wouters J. T. M, Geurts T. J. 2006. Dairy science and technology, second edition. CRC Press.

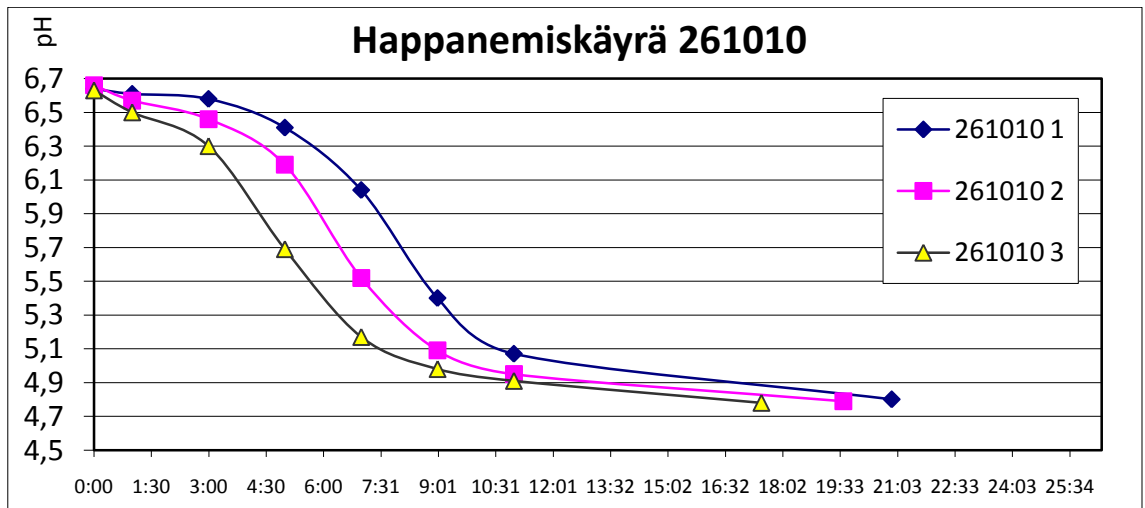
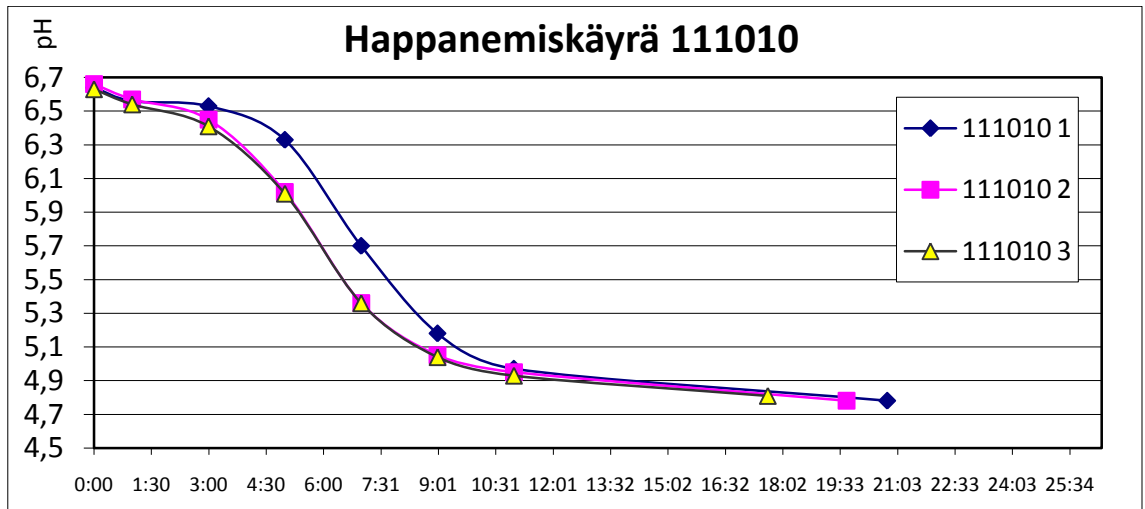
Weimer Paul J. 2001. Microbiology of the dairy animal. Teoksessa Marth E. H., Steele J. L. ja Dekker M., Applied dairy microbiology. New York. Marcel Dekker Inc. 2001. s 1-58



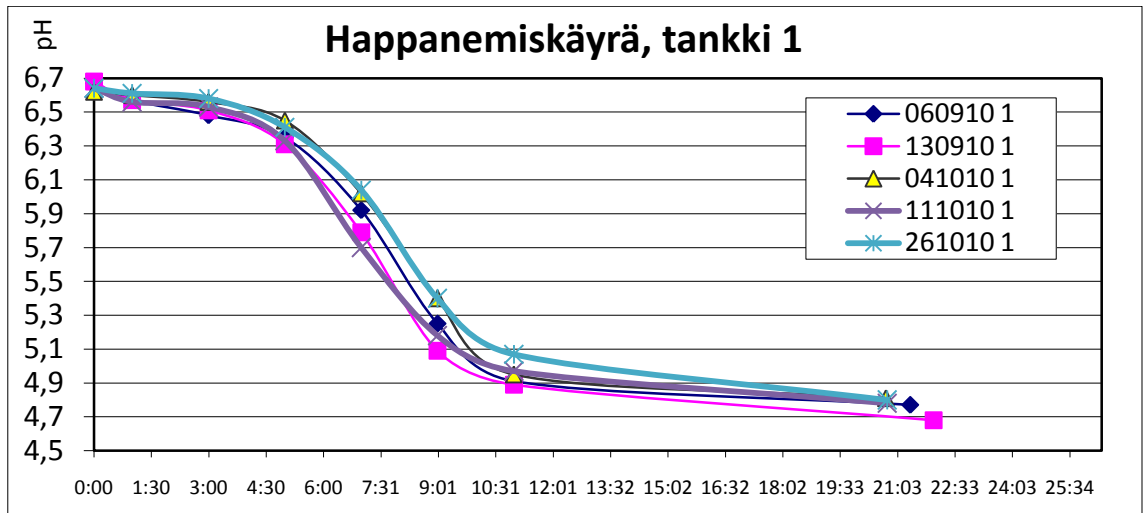
HAPPANEMISKÄYRÄT TUOTANTOPÄIVITTÄIN



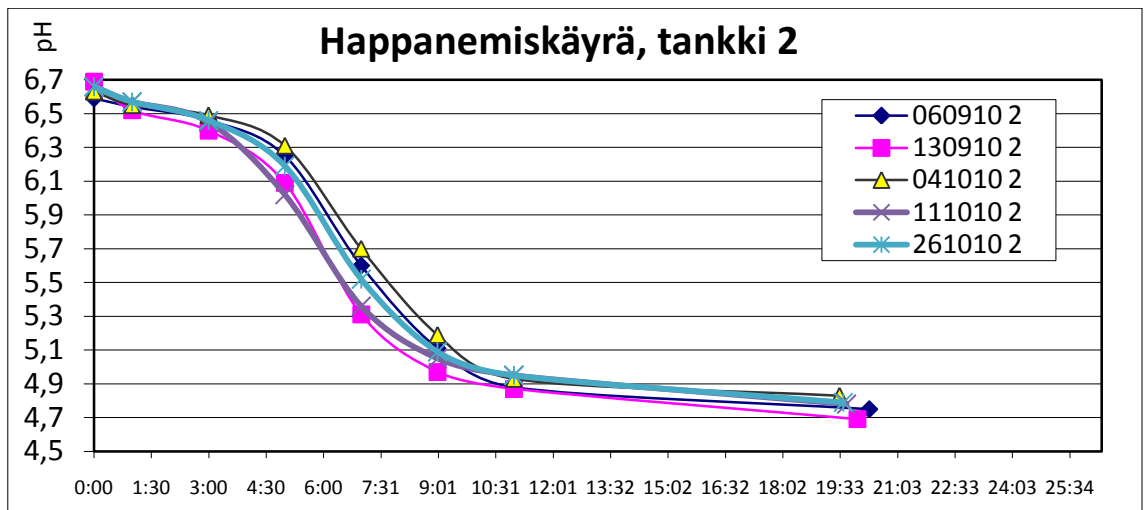
HAPPANEMISKÄYRÄT TUOTANTOPÄIVITTÄIN



HAPPANEMISKÄYRÄT TIIVISTETANKKEITTAIN



Kuva 8



Kuva 9

