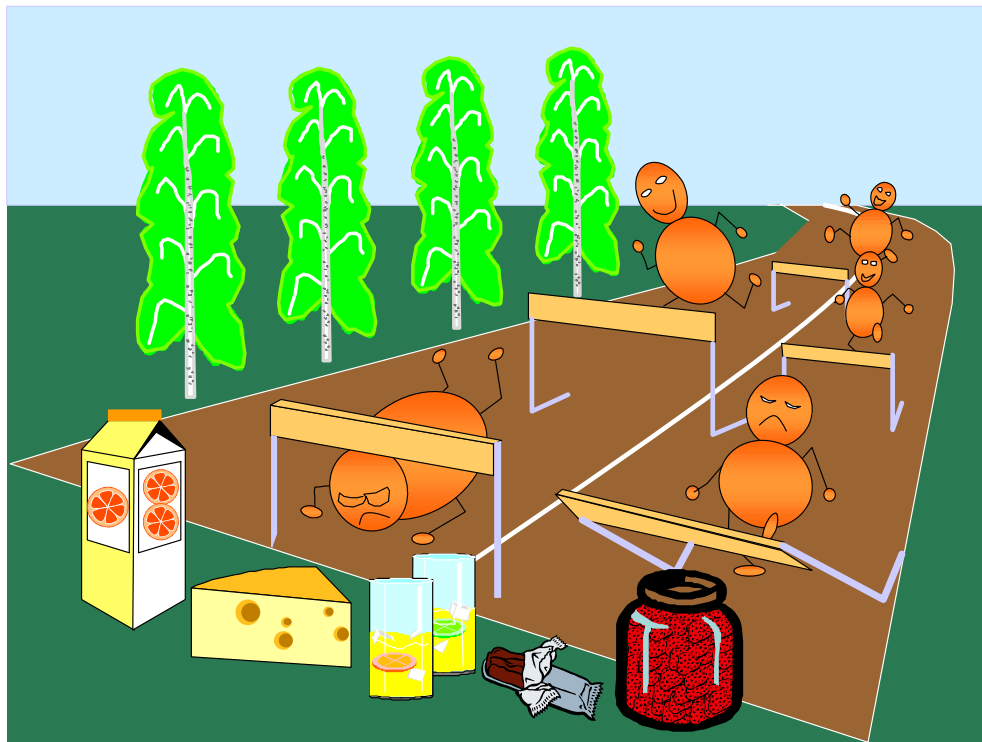


Riikka Juvonen, Liisa Nohynek, Erna Storgårds, Gun Wirtanen, Kaisu Honkapää, Tuija Lyijynen, Mirja Mokka & Auli Haikara

Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa

Kirjallisuusselvitys



Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa

Kirjallisuusselvitys

Riikka Juvonen, Liisa Nohynek, Erna Storgårds, Gun Wirtanen,
Kaisu Honkapää, Tuija Lyijynen, Mirja Mokka & Auli Haikara

VTT Biotekniikka



ISBN 951-38-5905-3 (nid.)
ISSN 1235-0605 (nid.)

ISBN 951-38-5906-1 (URL: <http://www.inf.vtt.fi/pdf/>)
ISSN 1455-0865 (URL: <http://www.inf.vtt.fi/pdf/>)

Copyright © Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT) 2001

JULKAISIJA – UTGIVARE – PUBLISHER

Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT), Vuorimiehentie 5, PL 2000, 02044 VTT
puh. vaihde (09) 4561, faksi (09) 456 4374

Statens tekniska forskningscentral (VTT), Bergsmansvägen 5, PB 2000, 02044 VTT
tel. växel (09) 4561, fax (09) 456 4374

Technical Research Centre of Finland (VTT), Vuorimiehentie 5, P.O.Box 2000, FIN-02044 VTT, Finland
phone internat. + 358 9 4561, fax + 358 9 456 4374

VTT Biotekniikka, Mikrobiologia, Tietotie 2, PL 1500, 02044 VTT
puh. vaihde (09) 4561, faksi (09) 455 2103

VTT Bioteknik, Mikrobiologi, Datavägen 2, PB 1500, 02044 VTT
tel. växel (09) 4561, fax (09) 455 2103

VTT Biotechnology, Microbiology, Tietotie 2, P.O.Box 1500, FIN-02044 VTT, Finland
phone internat. + 358 9 4561, fax + 358 9 455 2103

Juvonen, Riikka, Nohynek, Liisa, Storgårds, Erna, Wirtanen, Gun, Honkapää, Kaisu, Lyijynen, Tuija, Morkkila, Mirja & Haikara, Auli. Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa. Kirjallisuusselvitys [Control of yeast contaminations in food industry. Literature study]. Espoo 2001. Valtion teknillinen tutkimuskeskus, VTT Tiedotteita – Meddelanden – Research Notes 2107. 144 s.

Avainsanat food industry, contamination, yeasts, food processing, identification, phenotype, genotype, biofilms, disinfection, packaging, yeast spoilage, control

Tiivistelmä

Hiivat tunnetaan lähinnä hyötyorganismeina oluen, viinin ja leivän valmistuksessa. Hii-voilla voi olla myös epäedullisia vaikutuksia elintarvikkeisiin. Hallitsematon hiivakasvu tuotantoketjun eri vaiheissa voi johtaa tuotanto-ongelmiin ja tuotteiden aistittavan laadun heikkenemiseen ja siten taloudellisiin tappioihin. Elintarvikkeen mikrobiologisen laadun takaaminen edellyttääkin koko tuotantoketjun mikrobiologian hallintaa.

Tämä katsaus on laaja tietopaketti elintarvikkeiden pilaajahiivoista sekä niiden hallinta-, tunnistus- ja jäljityskeinoista. Aluksi tarkastellaan hiivojen yleisiä ominaisuuksia ja luokittelua sekä hiivojen esiintymistä ja vaikutuksia erityyppisissä elintarvikkeissa. Katsauksen painopiste on pilaajahiivojen kasvun hallintaan vaikuttavien tekijöiden esittelyssä. Mikrobikontaminaatioiden ehkäisyssä tuotantohygienia on avainasemassa. Katsaukseen on koottu vähäinen kirjallisuudesta saatava tieto elintarvikeperäisten hiivojen kyvystä muodostaa prosessipinnoille biofilmiä sekä niiden tuhoamiseen testatuista pesu- ja desinfiointiaineista. Katsaukseen on kerätty myös uusin tutkimusaineisto elintarvikkeiden sisäisten ja ulkoisten tekijöiden sekä eri prosessointi- ja säilöntämenetelmien vaikutuksista pilaajahiivoihin. Uusista menetelmistä esitellään suurpaine, ultraääni, valopulssit sekä erilaiset pakkaus- ja yhdistelmätekniset menetelmät. Perinteisten prosessointi- ja säilöntäkäsittelyjen teho pilaajakantoihin on usein huono eivätkä uudet kevennetyt tekniikat yleensä yksin käytettynä riitä estämään pilaantumista. Kevennettyjen tekniikoiden yhdistelmäkäyttö voisi kuitenkin olla varteenotettava vaihtoehto pilaajahiivojen kasvun rajoittamisessa. Tutkimus- ja kehitystyötä tarvitaan vielä runsaasti. Kontaminaation sattuessa on tärkeää paikallistaa ja tunnistaa teollisuuden prosesseihin pesiytyneet pilaajahiivat nopeasti, jotta osattaisiin valita tehokkaat puhdistustoimet ja kohdistaa ne kriittisiin kohtiin. Katsauksessa selostetaan yksityiskohtaisesti hiivojen tunnistamiseen ja tyyppittämiseen kehitetyt tekniikat sekä niiden edut, haitat ja sovellukset sekä tarkastellaan niiden käyttöön liittyviä näkökohtia. Painotus on perimän analysointiin perustuvissa DNA-sormenjälkitekniikoissa. Lopuksi esitellään perinteisiä ja nopeita menetelmiä hiivojen osoittamiseen ja määrittämiseen elintarvikkeista.

Juvonen, Riikka, Nohynek, Liisa, Storgårds, Erna, Wirtanen, Gun, Honkapää, Kaisu, Lyijynen, Tuija, Mokka, Mirja & Haikara, Auli. Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa. Kirjallisuusselvitys [Control of yeast contaminations in food industry. Literature study]. Espoo 2001. Technical Research Centre of Finland, VTT Tiedotteita – Meddelanden – Research Notes 2107. 144 p.

Keywords food industry, contamination, yeasts, food processing, identification, phenotype, genotype, biofilms, disinfection, packaging, yeast spoilage, control

Abstract

Yeast are usually known for their beneficial role in the production of fermented foods. However, yeast can also act as food spoilage agents. Abundant growth of unwanted yeasts during various stages of production can lead to production problems and quality defects in the final product. Hence, the production of microbiologically wholesome food is usually best achieved by controlling microbial contaminations throughout the whole production chain.

This literature review is an extensive information package about foodborne yeasts and their control and identification methods. First, general properties and the classification system of yeasts are summarised alongside with the occurrence and effects of yeast in various types of food. The review focuses on the presentation of different factors controlling the contamination and growth of yeasts in food. Good production hygiene has a key role in the prevention of contaminations. The few published articles about the biofilms formed by foodborne yeasts and about the effects of different cleaning and disinfecting agents on yeasts are summarised, and the latest information about the effects of different physical, chemical and biological factors on yeasts is presented. Traditional and state-of-the-art food preservation methods and their effectiveness against yeast are summarised. Traditional methods, such as chemical preservatives, are often ineffective against food spoilage strains and there is a tendency to avoid their use. Recently, promising results have been obtained with the combined use of different minimal processing methods. However, much research work is still needed in this field. The solving of contamination problems and the selection of appropriate intervention measures often necessitates rapid tracing and identification of the contaminating organisms. In this publication, phenotypic and genotypic methods for the identification, typing and detection of foodborne yeasts are reviewed in detail and their practicality in routine food control is discussed.

Alkusanat

Tämä kirjallisuuskatsaus on tehty vuonna 2000 käynnistyneessä Teknologian kehittämisskeskuksen (Tekes), Valtion teknillisen tutkimuskeskuksen (VTT) sekä kahdeksan elintarvikealan yrityksen rahoittamassa projektissa "Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa".

Projektimme tavoitteena on parantaa elintarviketeollisuuden mahdollisuuksia ennaltaehkäistä ja ratkaista pilaajahiivojen aiheuttamia tuotanto-ongelmia selvittämällä pilaajahiivojen kiinnittymiseen, kasvuun ja kuolemiseen vaikuttavia tekijöitä sekä kehittämällä entistä tehokkaampia menetelmiä hiivakasvun rajoittamiseen sekä pilaajahiivojen tunnistamiseen ja jäljittämiseen elintarvikeprosesseista. Elintarvikkeiden pilaajahiivat ja niiden hallinta on kansallisesti uusi tutkimusalue ja halusimme koota aiheeseen liittyvän taustatiedon yhdeksi tietopakettiaksi palvelemaan niin teollisuuden kuin tutkimuksen tarpeita kotimaassa.

Kiitämme projektin rahoittajia sekä muita johtoryhmätyöskentelyyn osallistuneita henkilöitä ja toivomme, että katsaus antaa kattavan kuvan olemassaolevista hiivakontaminaatioiden hallinta- ja tunnistuskeinoista sekä niiden sovellettavuudesta ja tutkimus- ja kehitystarpeista. Katsaus perustuu kirjallisuushakuun.

Kirjoittajat

Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	3
Abstract.....	4
Alkusanat.....	5
1. Hiivasolun rakenne ja metabolia.....	9
1.1 Hiivasolun rakenne.....	9
1.2 Hiivan fysiologia.....	11
2. Hiivojen luokittelu ja tunnistaminen.....	13
2.1 Hiivojen nimeäminen ja luokittelu.....	13
2.1.1 Nimeäminen.....	13
2.1.2 Luokitteluperiaatteet.....	14
2.1.3 Nykyinen luokittelu.....	16
2.2 Hiivojen tunnistaminen ja tyypittäminen.....	19
2.3 Fenotyyppiin perustuvat tunnistus- ja tyypitysmenetelmät.....	20
2.3.1 Standardimenetelmä.....	21
2.3.2 Standardimenetelmän yksinkertaistetut muunnokset.....	24
2.3.3 Kaupalliset tunnistuskittit ja -systeemit.....	25
2.3.4 Erottelevat ja valikoivat alustat.....	27
2.3.5 FT-IR (Fourier Transform Infrared) -spektroskopia.....	28
2.3.6 Rasvahappoanalyysi.....	28
2.3.7 Proteiinianalyysi.....	29
2.4 Genotyyppiin perustuvat tunnistus- ja tyypitysmenetelmät.....	30
2.4.1 Hiivasolun nukleiinihapot.....	30
2.4.2 Nukleiinihappojen eristäminen hiivasoluista.....	33
2.4.3 Hybridisaatio spesifisillä koettimilla.....	34
2.4.4 DNA/DNA-hybridisaatio (reassosiaatio).....	35
2.4.5 PCR spesifisillä alukkeilla.....	35
2.4.6 DNA:n emäsjärjestyksen määrittäminen (sekvenointi).....	37
2.4.7 DNA-sormenjälkitekniikat.....	38
3. Hiivojen esiintyminen.....	51
3.1 Hiivat ympäristössä.....	51
3.2 Elintarvikkeita pilaavat hiivat.....	52
3.2.1 Tuoreet ja prosessoidut hedelmät ja marjat.....	55
3.2.2 Tuoreet ja prosessoidut vihannekset.....	56
3.2.3 Meijerituotteet.....	56

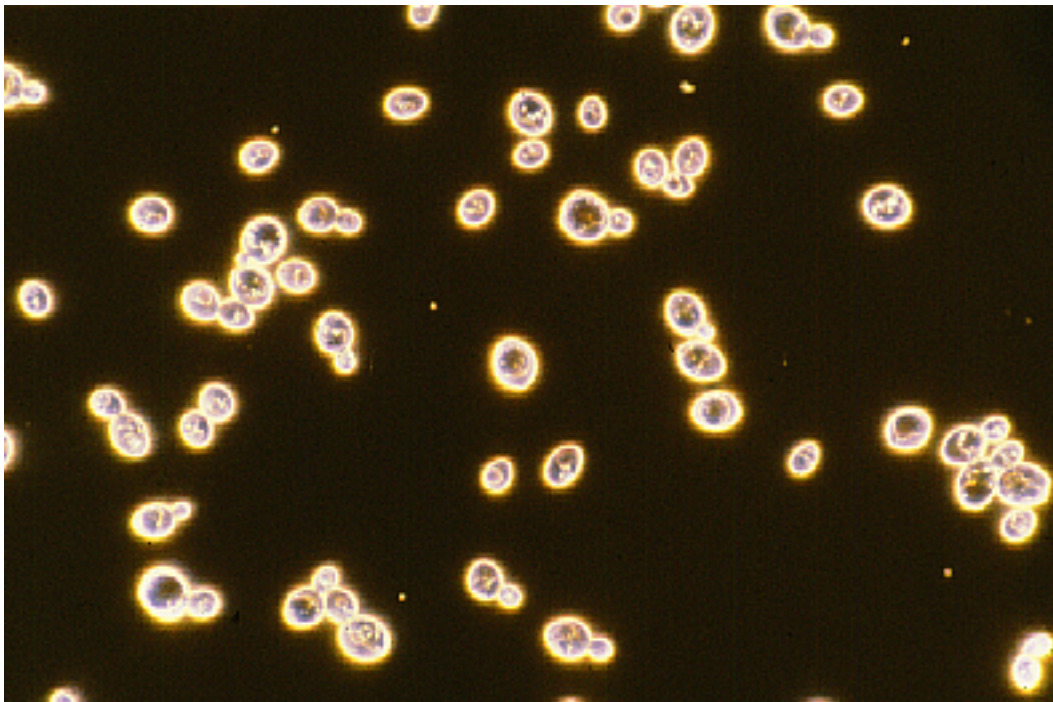
3.2.4	Lihatuotteet	57
3.2.5	Kastikkeet ja majoneesit	58
3.2.6	Makeiset	58
3.2.7	Virvoitusjuomat.....	58
3.2.8	Alkoholipitoiset juomat.....	58
4.	Pilaajahiivojen kasvun hallintaan vaikuttavat tekijät.....	60
4.1	Tuotantohygienia.....	60
4.1.1	Biofilmit elintarviketeollisuudessa.....	61
4.1.2	Hiivojen muodostamat biofilmit	62
4.1.3	Hiivojen kiinnittymiseen vaikuttavat tekijät	64
4.2	Elintarviketuotannossa käytetyt desinfiointiaineet.....	66
4.2.1	Yleistä desinfiointiaineista	66
4.2.2	Desinfiointiaineiden tehon testaus	71
4.2.3	Desinfiointiaineiden vaikutukset hiivoihin	75
4.3	Tuoteominaisuuksien vaikutus hiivoihin.....	78
4.3.1	Veden aktiivisuus	78
4.3.2	Happamuus.....	79
4.4	Tuotteeseen lisättävien aineiden vaikutus hiivoihin.....	81
4.4.1	Säilöntäaineet	81
4.4.2	Biologiset tekijät	82
4.5	Prosessimenetelmien vaikutus hiivoihin	84
4.5.1	Lämpökäsittely	84
4.5.2	Kylmäsäilytys.....	85
4.5.3	Paine	86
4.5.4	Ultraääni	89
4.5.5	Valopulssit.....	89
4.6	Pakkaustekniset menetelmät.....	90
4.6.1	Suojakaasupakkaaminen	90
4.6.2	Hapenpoistajat.....	90
4.6.3	Hiilidioksidin erittäjät	93
4.6.4	Etanolinerittäjät	93
4.6.5	Kosteudenpoistajat	94
4.6.6	Antimikrobiset kalvot.....	95
4.7	Yhdistelmätekniisten menetelmien vaikutus hiivoihin	95
4.8	Mikrobien kasvun ja tuhoutumisen ennustaminen matemaattisilla malleilla ..	96
5.	Hiivojen osoittaminen elintarvikkeista	99
5.1	Viljelymenetelmät	99
5.2	Mikroskopiaan perustuvat menetelmät.....	102
5.2.1	DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique).....	102
5.2.2	Mikropesäketekniikka	103

5.3	Virtaussytometria	104
5.4	Impedimetria.....	106
5.5	ATP-bioluminesenssimenetelmä.....	109
	Kirjallisuus	112

1. Hiivasolun rakenne ja metabolia

1.1 Hiivasolun rakenne

Hiivat ovat eukaryoottisia eli aitotumallisia sienten ryhmään kuuluvia mikrobeja, jotka esiintyvät pääasiallisesti yksisoluisina ja lisääntyvät suvuttomasti yleensä kuroutumalla. Määritelmä kattaa laajan joukon erilaisia organismeja. Tyypillinen hiivasolu on kooltaan bakteeria suurempi, halkaisijaltaan noin 2–20 µm ja muodoltaan pyöreä tai soikea (kuva 1). Lisääntymisvaiheessa olevissa soluissa voi erottua yksi tai useampi kurouma, josta on kasvamassa tytärsolu (blastokonidia). Yhdestä emosolusta voi kuroutua enimmillään 25 tytärsolua. Joillakin hiivoilla voi esiintyä nk. valerihmasto, jolloin tytärsolut eivät irtoa emosolustaan, vaan muodostavat väliseinälistä, haaroittuvaa rihmastoja (kuva 2). Osa hiivoista on dimorfisia eli ne kasvavat sekä yksittäisinä soluina että rihmastona. Suurin osa hiivoista lisääntyy myös suvullisesti muodostamalla kotelo- tai kantaitiöitä. Näitä hiivoja kutsutaan teleomorfisiksi erotuksena anamorfisista hiivoista, joiden on todettu lisääntyvän vain suvuttomasti (Boekhoet *et al.*, 1998; Kurzman, 1998a).



Kuva 1. Tyypillinen hiivasolu.



Kuva 2. Valerihmastoja muodostava hiiva.

Hiivat muodostavat yleensä pyöreitä, pehmeitä, kosteita tai kuivia pesäkkeitä kiinteällä pinnalla kasvatettaessa. Pesäkkeet ovat tavallisimmin väriltään valkoisia tai kermankeltaisia, mutta myös ruskeita, vaaleanpunaisia ja oransseja pesäkkeitä muodostavia hiivakantoja esiintyy (kuva 3).



Kuva 3. Elintarviketeollisuuden prosesseista ja tuotteista eristettyjä hiivakantoja YM-agar-maljoilla.

Hiivan soluseinä koostuu mannoproteiineista, kompleksisista glukoosipolymeereista (β 1,3- ja β 1,6-glukaani) ja kitiinistä (*N*-asetyyli-glukosamiini-ketjuja) (Lipke & Ovalle, 1998; Brul & Coote, 1999; Kapteyn *et al.*, 2000). Valtaosa soluseinän materiaalista on β -glukaania (50–60 % soluseinän kuivapainosta) ja mannoproteiineja (30–40 %). Kitiiniä on soluseinäessä 0,6–3 %. Glukaani ja kitiini ovat kovalenttisesti sitoutuneet yhteen muodostaen jäykän makromolekulaarisen rakenteen, joka on perusta hiivasolun muodolle ja fysikaaliselle vahvuudelle. β 1,3-glukaani-kiitiini-kompleksi sijaitsee soluseinän sisemmässä osassa ja β 1,6-glukaani sitoo tämän kompleksin soluseinän ulkopinnalla tiiviinä kerroksena oleviin mannoproteiineihin. Mannoproteiinit rajoittavat aineiden kulkeutumista soluun, vastaavat isännän immuunivasteen herättämisestä ja ilmentävät solun pinnan ominaisuuksia kuten hiivasolun tarttumiskykyä toisiin soluihin. Tietyillä mannoproteiinien proteiinikomponenteilla (Cwp1p ja Cwp2p) on merkittävä osuus normaalin hiivasolun soluseinän muodostumisessa (Dielbandhosing *et al.*, 1998). Lisäksi Cwp2p-proteiinikomponentin on todettu vastaavan hiivasolun kyvystä suojautua antimikrobisia peptidejä vastaan (Dielbandhosing *et al.*, 1998).

Hiivan soluseinän alla sijaitseva solumembraani koostuu fosfolipideistä, proteiineista sekä eukaryoottisoluille ominaisista steroleista. Lipidikaksoiskerros estää polaaristen aineiden vapaan liikkumisen solukelman läpi ja sterolit stabiloivat solukelmua tehden sen jäykäksi ja ehkäisten aineiden kulkeutumisen kelman läpi. Solunsisäisinä organelleina hiivoilla on solumembraanin erottama tuma, keskusvakuoli, varastoainerakkuloita ja mitokondrioita, joissa tapahtuu soluhengitys.

1.2 Hiivan fysiologia

Noin puolet hiivoista on fakultatiiveja eli kykenee tuottamaan energiaa hiiliyhdisteistä aerobisesti respiraatiolla tai anaerobisesti fermentaatiolla. *Cryptococcus*- ja *Rhodotorula*-sukujen hiivat kasvavat yleensä vain aerobisissa olosuhteissa. Hiivat voivat käyttää aerobiseen kasvuun energianlähteenään mm. heksoosi- ja pentoosisokereita, alkoholeja ja orgaanisia happoja. Anaerobisella fermentaatiolla tuotetun energian lähteenä hiivat käyttävät lähinnä heksooseja ja oligosakkarideja. Metaboliatuotteina syntyy etanolia ja hiilidioksidia (Déak, 1992).

Hiivat voivat käyttää typenlähteenään sekä orgaanista että epäorgaanista typpeä kuten ureaa, amiineja, aminohappoja ja ammoniumsuloja. Hiivoilla on hyvin erilaiset vaatimukset vitamiinien ja hivenaineiden suhteen. Useimmat hiivat eivät pysty valmistamaan itse biotiinia, niasiinia, tiamiinia, pantoteiinihappoa, foolihappoa tai riboflaviinia (Déak, 1991).

Hiivoilla kuten muilla soluseinäisillä organismeilla solunsisäinen osmoottinen paine on korkeampi kuin solunulkoinen paine, jolloin solu pystyy ottamaan vettä sisäänsä kasvua varten ja ylläpitämään nk. turgor-painetta. Solun ulkoisen nesteen laimentuessa turgor-paine solussa kasvaa, mikä vaikuttaa hiivan solumembraaniin ja -seinään.

Erilaiset fysiologiset suojautumismekanismit ovat ympäristöolosuhteiden muuttuessa tärkeitä etenkin elintarvikkeita pilaavien hiivojen elinkyvyn säilyttämisessä. *Saccharomyces cerevisiae* reagoi nopeasti ympäristön muutosten aiheuttamaan stressiin aktivoimalla erilaisia "mitogeeni-aktivoitu proteiinikinaasi" -reittejä, joiden avulla se pyrkii sopeutumaan uuteen ympäristöön (Gustin *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2000). Reittejä on löydetty viisi, joista *cell integrity* -reitti aktivoituu lämpötilan noustessa tai solua ympäröivän liuoksen laimentuessa ja *high-osmolarity glycerol response* (HOG) -reitti osmoottisen paineen kasvaessa solun ulkopuolella (Gustin *et al.*, 1998). Reittien aktivoitumisen on havaittu vaikuttavan mm. soluseinäkomponenttien synteesiin ja solunsisäiseen glyserolipitoisuuteen (Gustin *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2000). Carvalheiro *et al.* (1999) ovat havainneet, että *S. cerevisiae* kerää soluun trehaloosia ja glyserolia suojautuakseen ympäristön muutosten, kuten kohonneen lämpötilan ja osmoottisen paineen, aiheuttamalta stressiltä.

2. Hiivojen luokittelu ja tunnistaminen

2.1 Hiivojen nimeäminen ja luokittelu

2.1.1 Nimeäminen

Hiivojen ja muiden sienten nimeämistä ja luokittelua säätelee kerran kuudessa vuodessa ilmestyvä eri artikloista koostuva The International Code of Botanical Nomenclature (ICBN). Sen mukaan jokainen hiivakanta (= hiivayksilö) on luokiteltava kuuluvaksi tiettyihin toisilleen alisteisiin biologisiin kokonaisuuksiin eli taksoneihin. Luokittelun perusyksikkö on laji, jonka yksilöt edustavat sen ominaisuuksia. Muut taksonit muodostuvat jäsenistä, jotka ovat jonkun tai joidenkin määriteltyjen ominaisuuksien suhteen samanlaisia. Jokaisen taksonin nimi ja ominaisuudet on kiinnitetty tyyppiin, jota edustaa alemman taksonin kokonaisuus. Esimerkiksi lajia edustaa tyyppikanta. Jokaisella taksonilla on vain yksi virallinen nimi, joka on sen vanhin sääntöjen mukaisesti kuvattu nimi. Muut nimet ovat synonyymejä. Eri taksonilla on tunnusomaiset latinankieliset päätteet (Gams *et al.*, 1998; Kurzman & Fell, 1998a):

- jakso -mycota esim. Ascomycota
 - alajakso -mycotina esim. Ascomycotina
 - luokka -mycetes esim. Hemiascomycetes
 - lahko -ales esim. Saccharomycetales
 - heimo -aceae esim. Saccharomycetaceae
 - suku vaihtelee esim. *Zygosaccharomyces*
 - laji vaihtelee esim. *bailii*

Lajilla on kaksiosainen latinankielinen nimi esimerkiksi *Zygosaccharomyces bailii* (Lindner) Guillermond (1912) eli suku --> laji ---> (alkuperäisen lajikuvauksen tehnyt henkilö) ---> lajin nyky muodossa kuvannut henkilö ---> (vuosiluku).

Monien hiivalajien elinkierto on suvullinen eli teleomorfinen ja suvuton eli anamorfinen vaihe, joilla on yleensä omat nimensä. Hiivan teleomorfimuodon nimi kattaa myös sen anamorfimuodon ja viittaa siten koko hiivaan (holomorfi). Teleomorfিনিimi on hiivan virallinen nimi. Osa hiivoista ei lisäännä suvullisesti eli ne ovat holomorfisia anamorfeja ja niillä on vain yksi nimi. Mikäli teleomorfimuoto löytyy myöhemmin, se on kuvattava uutena lajina (Gams *et al.*, 1998). Taulukossa 1 on lueteltu elintarvikeperäisten hiivojen teleo- ja anamorfimuotojen nimiä.

Taulukko 1. Eräiden elintarvikkeissa tavattavien hiivojen suvullisten (teleomorfi) ja suvuttomien (anamorfi) muotojen nimet (Kurzman & Fell, 1998b).

Teleomorfin nimi	Anamorfin nimi
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>
<i>Dekkera anomala</i>	<i>Brettanomyces anomalus</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	<i>Kloeckera apis</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	<i>Candida sorbosa</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida spherica</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>Pichia anomala</i>	<i>Candida pelliculosa</i>
<i>Pichia guillermondii</i>	<i>Candida guillermondii</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	<i>Candida japonica</i>
<i>Rhodosporeidium sphaerocarum</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>

2.1.2 Luokitteluperiaatteet

Nyky mielipiteen mukaan hiivojen luokittelun tulisi heijastaa mahdollisimman pitkälle niiden luontaisia sukulaisuussuhteita (Gams *et al.*, 1998). Luokittelussa käytetyt kriteerit ja menetelmät sekä niiden painoarvo muuttuvat koko ajan ja siksi myös luokittelu ja nimeäminen muuttuvat (Kreger-van Rij, 1987; Kurzman & Phaff, 1987; van der Walt, 1987; Boekhout *et al.*, 1998; Kurzman, 1998a).

Luokittelukriteereinä voidaan käyttää erilaisia piirteitä, joiden suhteen eri hiivat eroavat toisistaan (taulukko 2). Piirteiden tulisi olla mahdollisimman stabiileja (Kreger-van Rij, 1987).

Taulukko 2. Esimerkkejä hiivojen luokittelussa käytetyistä ominaisuuksista.

Ominaisuus	Erottelu- kyky	Viite
Fenotyyppiset		
• Solun ja solun osien morfologia ja hienorakenne	suku --->	Kreger-van Rij, 1987; Moore, 1998
• Fysiologiset ominaisuudet	laji, suku	Kreger-van Rij, 1987; Yarrow, 1998
• Soluseinän ja kapselien polysakkaridikoostumus	suku --->	Phaff, 1998
• Koentsyymi Q:n homologien tunnistaminen	suku --->	Yamada, 1998
• Entsyymiprofiilit	laji	Yamazaki <i>et al.</i> , 1998
• Mykosiinit	vaihtelee	Golubev, 1998
Biologiset		
• Kyky tuottaa elinkelpoisia jälkeläisiä	laji	van der Walt, 1987
Genotyyppiset		
• DNA:n emäskoostumus (G+C mol-%)	laji	Kurzman, 1998b
• DNA-DNA/RNA hybridisaatio	laji/suku	Kurzman, 1998b
• rRNA/rDNA:n emäsjärjestys	laji --->	Kurzman & Blanz, 1998

Perinteisesti hiivat on luokiteltu niiden fysiologisten, biokemiallisten ja etenkin morfologisten ominaisuuksien perusteella. Fysiologisista kriteereistä tärkeimpiä ovat kyky fermentoida erilaisia sokereita sekä kyky käyttää aerobisesti erilaisia hiili- ja typpiyhdisteitä ainoana energian tai typen lähteenä (ks. 2.3.1). Hiivojen morfologisia ominaisuuksia, kuten solumuotoa, lisääntymistapaa, kykyä muodostaa rihmastoa tai valerihmastoa, suvullisten itiöiden ominaisuuksia, kotelo- ja kantasolujen muotoa sekä soluseinän ja -septumin hienorakennetta, on käytetty lajin, suvun ja sitä korkeampien taksonien rajaamisessa (Kreger-van Rij, 1987; Moore, 1998). Hiivojen luokittelussa hyödynnetään myös solun eri makromolekyylien ja rakenneosien kuten soluseinän polysakkaridien ja entsyymien kemiallisessa koostumuksessa esiintyviä eroja (Yamazaki *et al.*, 1998; Phaff, 1998). Monet fenotyyppiset ominaisuudet ovat vain yhden tai muutaman geenin koodaamia, ja siten ne ilmentävät mahdollista taksonien välistä vaihtelua hyvin rajoitusti. Lisäksi monet piirteet ovat vaihtelevia esim. lajin sisällä (Kurzman & Phaff, 1987). Kaikki fenotyyppiset ominaisuudet eivät kuitenkaan ole arvottomia luokittelussa (Boekhout *et al.*, 1998; Kurzman & Blanz, 1998). Hiivalajien kuvaus, erottelu ja tunnistaminen perustuvatkin edelleen fenotyyppisiin piirteisiin (Barnett *et al.*, 2000; Yarrow, 1998).

Hiivalaji voidaan rajata myös biologisesti, koska yleensä vain samaan lajiin kuuluvat yksilöt kykenevät tuottamaan lisääntymiskykyisiä jälkeläisiä. Hiivakantojen biologista samankaltaisuutta tutkitaan risteytystekniikoilla. Biologisen lajikäsitteen käyttökelpoisuutta rajoittaa se, että 1) monet hiivat eivät lisäänty suvullisesti ja 2) osa lajeista on itsesiittoisia (van der Walt, 1987).

Viime vuosina molekyylogeneettiset menetelmät ovat mullistaneet mikrobien luokittelun. Näillä menetelmillä voidaan tutkia eroja organismien perimässä eli genotyypissä

(ks. 2.4.1). Mitä kaukaisempia toisilleen organismit ovat sitä enemmän niiden DNA:ssa esiintyy eroja. DNA:n emäskoostumuksen (G + C mol-%) määrittämisellä kaksi kantaa voidaan osoittaa kuuluviksi eri lajeihin, jos niiden emäskoostumus eroaa 1,0–2,5 %. DNA/DNA-hybridisaatiossa (ks. 2.4.4) määritetään koko genomin samankaltaisuusaste tutkittavilla kannoilla. Menetelmä soveltuu lajitason sukulaisuussuhteiden tutkimiseen (Kurzman, 1998b). Sukujen välisiä suhteita voidaan tutkia ribosomaalisen DNA:n (rDNA) ja genomisen DNA:n hybridisaatiota mittaavilla menetelmillä. Ribosomaalisen DNA:n (rDNA) tai rRNA:n emäsjärjestyksen määrittäminen eli sekvenointi (ks. 2.4.6) on monipuolisesti olemassa oleva menetelmä hiivojen fylogeneettisten suhteiden arvioimiseksi. Sitä voidaan käyttää sekä kaukaisten että läheisten sukulaisuussuhteiden määrittämisessä (Kurzman & Blanz, 1998).

Hiivat ovat siis heterogeeninen joukko organismeja eikä niiden luokittelu voida kuvata yhtä oikeaa menetelytapaa. Eri menetelmien sopivuus ja painoarvo riippuvat sekä taksonista että taksonitasosta. Tulevaisuudessa luokittelu perustuu todennäköisesti enenevästi molekyylibiologisten menetelmien antamaan fylogeneettiseen tietoon. Useiden tutkijoiden mielestä luotettava luokitusjärjestelmä voi perustua vain polyfaasisen lähestymistapaan, jossa huomioidaan mahdollisimman monesta kannasta mahdollisimman monia ominaisuuksia (van der Walt, 1987; Phaff, 1998).

2.1.3 Nykyinen luokittelu

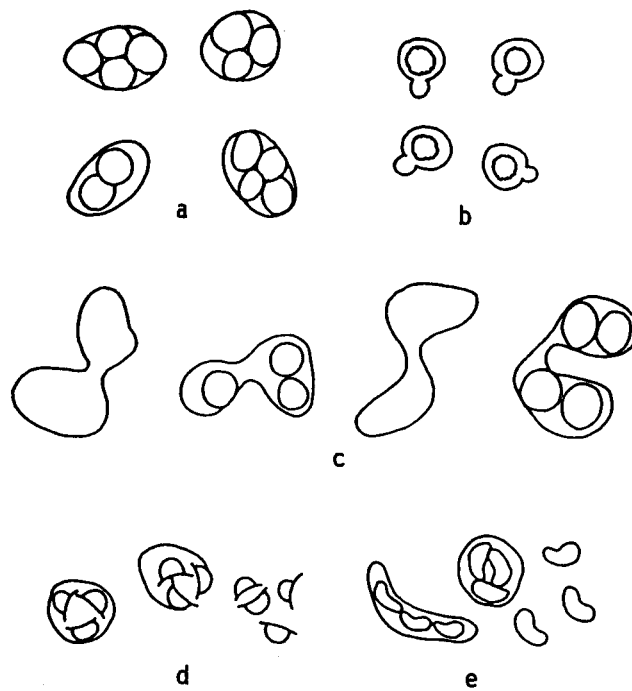
Sienikunta (Fungi) on jaettu neljään pääjaksoon: Zygomycota (yhtymäsienet), Ascomycota (kotelosienet), Basidiomycota (kantasienet) ja Chytridiomycota (Gams *et al.*, 1998). Jaottelu perustuu lähinnä suvulliseen lisääntymiseen liittyviin ominaisuuksiin. Hiivoja ja hiivankaltaisia organismeja on Basidiomycota- ja Ascomycota-jaksoissa. Aikaisemmin anamorfitiset hiivat luokiteltiin omaksi ryhmäkseen (Kreger-van Rij, 1987), mutta nykyään ne on sijoitettu basidio- tai askomykeetteihin geno- ja fenotyypisten ominaisuuksien perusteella (taulukko 3) (Kurzman, 1998a; Boekhoet *et al.*, 1998). Hiivasukuja on tällä hetkellä noin 90 ja lajeja noin 800.

Taulukko 3. Askomykeetti- ja basidiomykeettihiivojen eroja.

Ominaisuus*	Askomykeetti	Basidiomykeetti	Viite
Suvullinen lisääntyminen	koteloitiöistä	kantaitiöistä	Kreger-van Rij, 1987
Soluseinä			
* kerrosten lkm	2	> 2	Moore, 1998
* pyrofosfaattihappoa	-	+	"
* α -glukaan	-	+	Kreger-van Rij, 1987
* ksyloosia	-	+/-	Moore, 1998
* kitiiniä	vähän	paljon	"
Diatsoniumsini B-reaktio	+	-	"
Ureaasiaktiivisuus	- (+)	+	"
Deksiribonukleaasiaktiivisuus	-	+	Kreger-van Rij, 1987
Karotenoidipigmenttien muodostus	-	+	Boekhoet <i>et al.</i> , 1998
Ballistokonidiat	-	+	"
Kuroutumistyyppi	holoblastinen	enteroblastinen	"
Koentsyymi Q	6, 7, 8, (9)	(8), 9, 10	Déak & Beuchat, 1987
G+C mol-%	27–50	50–70	Kurzman, 1998b

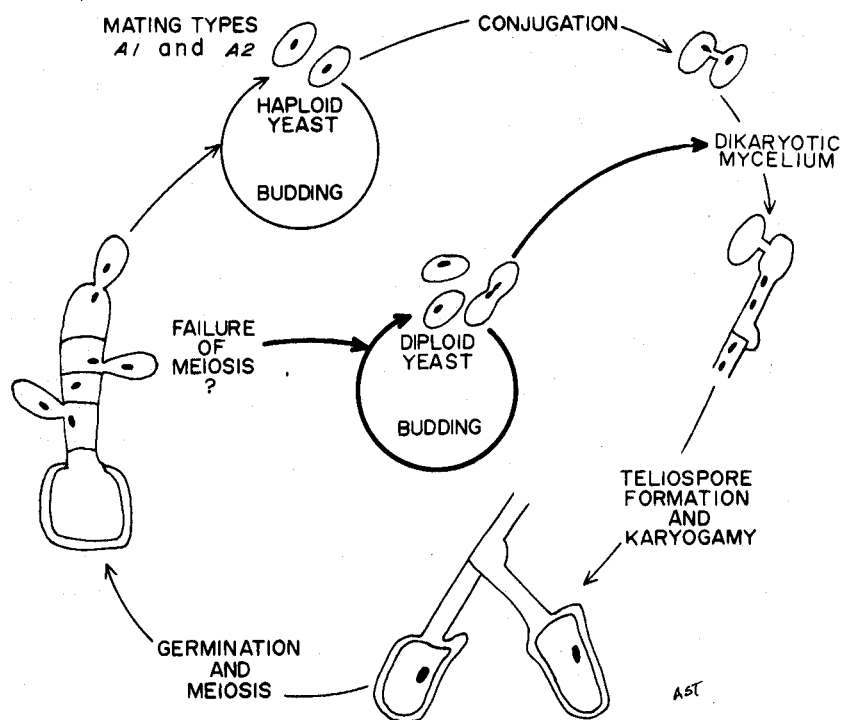
* osa ominaisuuksista vaihtelee ko. ryhmien sisällä

Askomykeettihiivat lisääntyvät suvullisesti koteloitiöistä (kuva 4) ja eroavat muista askomykeeteistä (Euscomycetes) siinä, että itiöt eivät muodostu erityisen itiöemän sisällä. Ne on nykyään sijoitettu fylogeneettisesti erillisiin Hemiascomycetes- ja Archiascomycetes-luokkiin, joissa on yhteensä noin 54 hiivasukua ja noin 500 lajia. Hemiascomycetes-luokan hiivat kuuluvat Saccharomycetales-lahkoon (synonyymi Endomycetales), joka on suurin hiivalahko ja sisältää 11 heimoa. Useat tämän luokan heimot ja suvut ovat lähinnä diagnostisia, koska niiden varmentamiseksi ei toistaiseksi ole riittävästi tutkimustietoa. Saccharomycetaceae-heimo käsittää sellaiset yleiset hiivasuvut, kuten *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* ja *Kluyveromyces*. Saccharomycodaceae-heimon hiivoille on tyypillistä bi-polaarinen kuroutuminen, jossa kurouma muodostuu solun molempiin päihin. Dipodascaceae-heimon hiivat kasvavat yksinomaan rihmastona. Useat Endomycetaceae- ja Cephaloascaceae-heimon hiivat itiöivät vanhojen itiöidensä sisälle. Niiden koteloitiöt ovat usein hatunmuotoisia. Kaikki anamorfiset askomykeetit kuuluvat Candidaceae-heimoon, joka on heimoista suurin ja sisältää noin 230 lajia. Näistä lajeista 160 kuuluu *Candida*-sukuun. Pieneen Archiascomycetes-luokkaan kuuluu vain murto-osa hiivoista. Tällaisia ovat kahtia jakautumalla lisääntyvät *Schizosaccharomyces*-suvun hiivat sekä *Taphrina*-, *Protomyces*-, *Saitoella*- ja *Pneumocystis*-sukujen hiivat. Luokka käsittää neljä heimoa (Kurzman, 1998a; Gams *et al.*, 1998).



Kuva 4. Askomykeettihiivojen suvullinen lisääntyminen. a) Kotelotiöiden muodostuminen kasvullisen solun sisään, b) kotelotiöiden muodostuminen kurouman ja emäsolun yhtymisen jälkeen, c) kotelotiöiden muodostuminen kahden solun yhtymisen jälkeen, d) hatunmuotoisia kotelotiöitä, e) munuaisenmuotoisia kotelotiöitä (Gams et al., 1998).

Basidiomykeettihiivoja on 11 lahkossa, jotka kaikki kuuluvat Heterobasidiomycetes-luokkaan. Tällä hetkellä tunnetaan 36 sukua ja noin 220 lajia (50 teleomorfia ja 170 anamorfia). Teleomorfiset basidiomykeettihiivat erotetaan toisistaan kantasolun morfologian, septumin hienorakenteen sekä soluseinän koostumuksen perusteella. Monet lajit ovat dimorfisia. Hiivamuoto on yleensä elinkierron suvuton vaihe, joka vuorottelee suvullisen rihmastovaiheen kanssa (kuva 5). Hiivavaiheen solut syntyvät tavallisesti kantaitiöistä tai suoraan kantasoluista ja ne ovat usein haploideja ja lisääntyvät kuroutumalla. Kantaitiöt tuottava kantasolu (basidium) muodostuu joko suoraan rihmasta tai paksuseinäisestä esi-itiöstä (telioitiö). Yksisoluvaihe päättyy kaksitumaiseen rihmastovaiheeseen. Yleensä heterobasidiomykeetit ovat heterotallisia eli pariutumiseen tarvitaan eri pariutumistyyppiä olevat solut. Monet lajit ovat kasvien tai toisten sienten loisia tai elävät saprofyytteinä. Tällä hetkellä vain osa basidiomykeettilajeista on kunnolla karakterisoitu ja niiden taksonomia ei kaikilta osin heijasta luonnollisia sukulaisuussuhteita (Kreger-van Rij, 1987; Boekhout *et al.*, 1998).

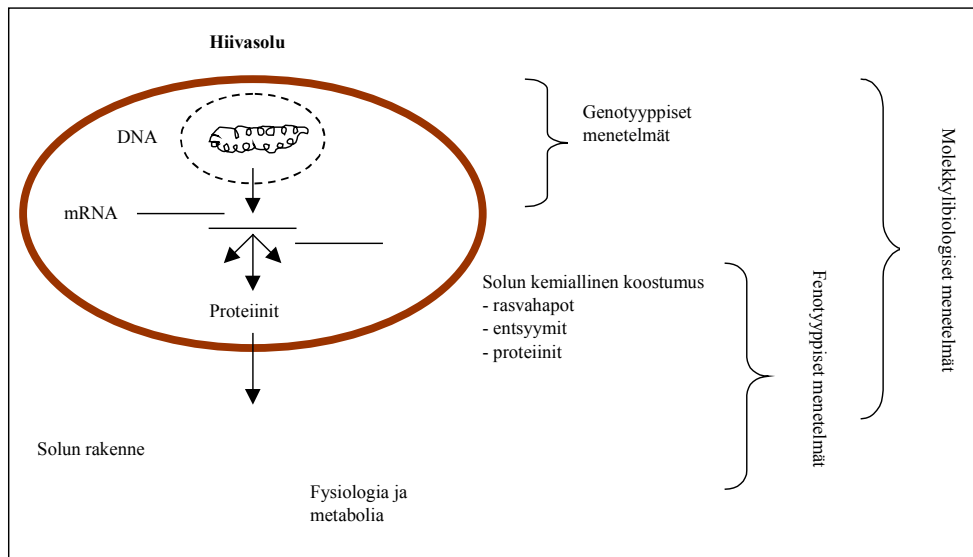


Kuva 5. Esimerkki teleomorfisen basidiomykeettihiivan elinkierrosta.

Useat anamorfiset basidiomykeetit esiintyvät vain hiivamuotona. Ne on sijoitettu joko Cryptococcaceae- tai Sporobolomycetaceae-heimoon. Molemmat heimot ovat keinokeksisiä ja niitä ylläpidetään lähinnä käytännöllisyyden vuoksi. Karotenoidipigmenttien muodostus on yleistä anamorfisille lajeille. Sporobolomycetaceae-hiivat muodostavat suvuttomia ballistokonidioita, jotka solu laukaisee ympäristöönsä.

2.2 Hiivojen tunnistaminen ja tyypittäminen

Hiivojen tunnistamiseksi ja tyypittämiseksi on kehitetty erilaisia menetelmiä, jotka perustuvat joko hiivojen ilmenevissä (fenotyypisissä) tai perinnöllisissä (genotyypisissä) ominaisuuksissa esiintyviin eroihin (kuva 6). Fenotyypisiin perustuvissa menetelmissä voidaan mitata esimerkiksi fysiologisia, biokemiallisia ja morfologisia ominaisuuksia tai solun erilaisia kemiallisia komponentteja kuten rasvahappoja ja proteiineja. Sen sijaan genotyypisissä menetelmissä määritetään eroja solujen perimäaineksessa eli DNA:ssa.



Kuva 6. Hiivojen tunnistusmenetelmien jaottelu.

Yleensä tutkittavasta näytteestä eristetyistä hiivoista valitaan tunnistettavaksi kaikki erinäköisen pesäkkeen muodostavat yksilöt eli kannat. Pesäkkeiden valinnassa kannattaa käyttää apuna stereomikroskooppia (10–20 x suurennos) tai suurennuslasia (4 x suurennos). Lisäksi solut kannattaa mikroskopoida (400 x suurennos), koska samannäköisen pesäkkeen muodostavat yksilöt eivät välttämättä ole samoja.

Hiivakanta on yleensä puhdistettava tunnistusta varten. Primaarimaljalta valittu, muista pesäkkeistä erillinen pesäke voidaan puhdistaa hajottamalla solumassaa silmukalla yleisalustan pinnalle erillispesäkkeiden aikaansaamiseksi. Vaihtoehtoisesti mahdolliset kontaminantit voidaan laimentaa pois laimennussarjassa ennen pintaviljelyä. Puhdistusta jatketaan, kunnes kaikki viljelmän pesäkkeet ovat samannäköisiä, kuitenkin vähintään kahdesti peräkkäin. Mikäli viljelmässä on kuitenkin vielä toistuvien puhdistusten jälkeen erinäköisiä pesäkkeitä, ne voivat edustaa hiivan eri rakenne- tai pariutumistyyppisiä. Tällöin molemmat tyytit kannattaa ottaa talteen jatkotutkimuksia varten (Yarrow, 1998).

2.3 Fenotyyppiin perustuvat tunnistus- ja tyyppitysmenetelmät

Fenotyypisissä menetelmissä kasvatusolosuhteet, kuten inkubointiaika ja -lämpötila sekä alustan koostumus, on tarkasti standardoitu, koska ne vaikuttavat solun fysiologiaan ja kemialliseen koostumukseen (Yarrow, 1998).

2.3.1 Standardimenetelmä

Hiivojen standarditunnistusmenetelmä perustuu noin 50–100 fysiologisia, rakenteellisia ja biokemiallisia ominaisuuksia (taulukko 4) mittaavaan testiin. Eri ominaisuuksien testauksessa käytetään yleisesti hyväksytyjä standardoituja menetelmiä, joiden uusimmat kuvaukset on esitetty Kurzman & Fell (1998b) ja Barnett *et al.* (2000) taksonomia-teoksissa. Eri tutkijoiden menettelytavoissa on yleensä pieniä eroja, koska saman testin suorittamiseksi on eri vaihtoehtoja. Myös käytettyjen testien määrä vaihtelee. Tunnistuskäytäntö riippuu lisäksi tunnistettavien kantojen määrästä, tutkimuksen tarkoituksesta ja kohteesta.

Taulukko 4. Hiivojen tunnistuksessa käytetyt ominaisuudet.

Ominaisuus	Kurzman & Fell (1998b) standardilajikuvaus ¹	Barnett <i>et al.</i> (2000) standardilajikuvaus	CBS:n tunnistus- menetelmä ²
1. Morfologiset			
Suvullinen lisääntyminen			
* itiöiden muodostus	1	1	1
* itiöiden ominaisuudet (muoto, lkm)	1	3	1
* itiöpesän ominaisuudet	1	1	1
Suvuton lisääntyminen			
* lisääntymistapa	1	4	1
* suvuttomien itiöiden muodostus	1	2	1
* solun muoto	1	1	1
* (vale)rihmastonmuodostus	1	3	1
Makroskooppinen kasvu			
* nesteviljelmä	1	0	0
* kiinteä alusta	1	1	1
2. Fysiologiset			
* hiiliyhdisteiden assimilaatiotestit	36(≥ 9)	44	26
* typpiyhdisteiden assimilaatiotestit	1 (≥ 5)	9	4
* sokereiden fermentaatio	7	14	6
* vitamiinivaatimukset	1 (10)	10	0
* kasvu eri lämpötiloissa	(≥ 4)	5	1
* kasvu alhaisessa a _w :ssä	(≥ 6)	2	0
* sykloheksimidiresistenssi	(2)	2	1
* 1% etikkahapon toleranssi	(1)	1	0
* ureaasiaktiivisuus	(1)	1	0
* diatsoniumsini B reaktio	(1)	1	0
* hapon tuotto glukoosista	(1)	1	0
* tärkkelysmäisten yhdisteiden erityys	(1)	1	0
* rasvan hajotus	(1)	0	0
* proteiinien hajotus	(1)	0	0
3. Biokemialliset, geneettiset			
G+C mol-%	1	1	0
Soluhydrolysaatit	basidiomykeetit	0	0
Koentsyymi Q:n rakenne	1	1	0

¹ numerot sarakkeissa ilmaisevat perustestien lukumäärän, lisätetit ovat suluisissa

² CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Hollanti

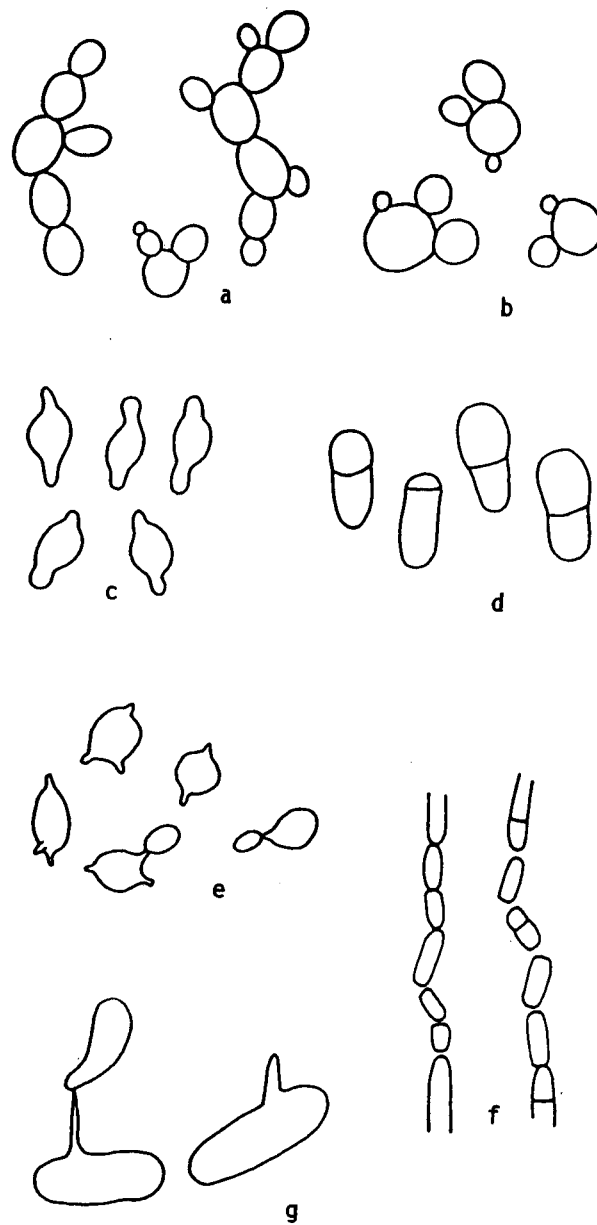
Tunnistettavan viljelmän tulisi olla nuori ja aktiivisesti kasvava. Kasvatustilapöytä riippuu kannasta, mutta useimmille 25 °C on sopiva. Seuraavassa on esitetty lyhyesti tärkeimmät tunnistustestit.

Suvulliseen ja suvuttomaan lisääntymiseen liittyvillä morfologisilla ominaisuuksilla on suuri painoarvo tunnistuksessa. Hiivat lisääntyvät suvullisesti joko kotelo- tai kanta-itiöistä (ks. 2.1.3, kuvat 4 ja 5). Itiöinnin indusoimiseksi on kehitetty useita erityisalus- toja, joilla itiöintinopeus vaihtelee päivistä viikkoihin. Itiöivää viljelmää mikroskopoi- taessa tulisi kiinnittää huomiota mm. itiöpesäkkeen ja itiöiden sekä mahdollisen rih- maston rakenteeseen ja väriin. Itiöitä voi olla vaikea havaita useista eri syistä, vaikka kanta olisi suvullisesti lisääntyvä. Hiivat lisääntyvät suvuttomasti kuroutumalla, kahtia jakautumalla, pilkkoutumalla tai konidioimalla (kuva 7). Eräät lajit voivat lisäksi muo- dostaa suvuttomia itiöitä. Suvuttomaan lisääntymiseen liittyvien ominaisuuksien tutki- miseen soveltuvat mm. peruna-dekstroosi-, maissijauho- ja riisiagar. Myös neste- ja agarviljelmän makroskooppisista ja mikroskooppisista ominaisuuksista voi olla hyötyä tunnistuksessa.

Fysiologiset ominaisuudet ovat tärkeitä lajin ja joskus myös suvun määrittämisessä. Tun- nistus voi perustua myös yksinomaan fysiologisiin ominaisuuksiin. Hiiliyhdisteiden assimilaatiotesteillä tutkitaan hiivan kykyä käyttää erilaisia sokereita, sokerialkoholeja ja orgaanisia happoja ainoana hiilenlähteenä aerobiseen kasvuun. Tutkittava yhdiste (2 % tai 50 mM) lisätään joko kiinteään tai nestemäiseen hiilettömään perusalustaan. Nes- teviljelmiä inkuboidaan 1–4 viikkoa, jonka jälkeen tulos arvioidaan sameuden perus- teella. Kiinteillä alustoilla testaus suoritetaan käyttämällä auksanogrammi- tai kopioin- titekniikkaa. Kasvatusaika on noin viikko. Maljamenetelmien käyttö säästää aikaa ja materiaalia, koska yhdellä maljalla voidaan analysoida useita kantoja tai ominaisuuksia. Maljoilta on myös helppo havaita kontaminantit.

Typpiyhdisteiden assimilaatiotesteissä tutkitaan hiivan kykyä kasvaa tutkittava yhdiste ainoana typenlähteenä. Erityisesti nitraatin assimilaatiotesti on hyödyllinen lajin määri- tyksessä. Muita käyttökelpoisia yhdisteitä ovat mm. nitriitti, kadaveriini, etyyliamiini ja L-lysiini. Tutkittava yhdiste lisätään typpöttömään perusalustaan, mutta muutoin typpi- ja hiiliyhdisteiden assimilaatiota tutkitaan samoilla tekniikoilla.

Hiivojen kyky käyttää anaerobisesti eli fermentoida erilaisia sokereita vaihtelee. Ar- vioita noin puolet tunnetuista hiivoista fermentoi ainakin glukoosia. Määrittäminen perustuu käymisessä muodostuvan hiilidioksidin toteamiseen. Kasvatukset tehdään kierrekorkilla suljetuissa Durham-putkissa, joiden pohjalla on pieni kaaasunkeräysputki. Ravinteikkai- seen perusalustaan lisätään yleensä 2 % tutkittavaa sokeria.



Kuva 7. Hiivojen suvuton lisääntyminen. a) Eri-ikäiset kuroumat voivat jäädä kiinni toisiinsa muodostaen soluryppäitä tai soluketjuja. b) Multipolaarinen kuroutuminen, jossa kurouma voi muodostua mihin tahansa kohtaan solua. c) Bi-polaarinen kuroutuminen, jossa kuroumat muodostuvat solun molempiin päihin. d) Kahtiajakautuva hiiva-solu. e) Sterigmatokondidioita eli kuroumia, jotka muodostuvat lyhyen varren päähän. f) Artrokonidioita, jotka syntyvät solurihmasta, kun siihen muodostuu väliseiniä. g) Ballistokonidiat ovat kuroumia, jotka solu laukaisee ympäristöönsä lyhyen varren päästä.

Hiivojen vitamiinien tarvetta voidaan tutkia kasvattamalla kantaa ilman yhtä tai kaikkia vitamiineja. Hiivojen sykloheksimidin, etikkahapon ja sokerin sietokyvyssä esiintyy myös eroja. Sykloheksimidiresistenssiä testataan 0,1 ja 0,01 % sykloheksimidiliuoksissa. Yhdiste inhiboi useilla hiivoilla proteiinisynteesin. Etikkahappoalustaa (1 %) voidaan käyttää *Z. bailii*n ja *Z. bisporuksen* erottamiseen *Z. rouxi*ista. Osmotoleranssia testataan 50 % ja 60 % glukoosia sisältävillä alustoilla. Vain muutamat hiivalajit kasvavat yli 40 %:n sokeripitoisuudessa.

Ureaasi- ja diatsoniumsini B -testejä käytetään askomykeettihiivojen erottamiseen basidiomykeettihiivoista. Basidiomykeetit hydrolysoivat ureaa ammoniaksi ja hiilihapoksi, mikä aiheuttaa testialustan pH:n nousun ja värinmuutoksen. Diatsoniumsini B -reaktion mekanismia ei tunneta. Vain basidiomykeettihiivat muuttavat yhdisteen tummanpunaiseksi tai violetiksi.

Tuntemattoman kannan nimeämiseksi testituloksia verrataan tunnettujen lajien ominaisuuksiin käyttämällä esimerkiksi taksonomiateosten tunnistuskaavioita tai -taulukoita (Barnett *et al.*, 2000; Kurzman & Fell, 1998b) tai hiivojen tunnistamiseen kehitettyjä tietokoneohjelmia (mm. Török & King, 1991, Déak & Beuchat, 1993). Tietokoneohjelmien käytössä on huomioitava, etteivät ne tunnista uusia lajeja eikä korkea tunnistustodennäköisyys merkitse välttämättä aina oikeaa tunnistusta. Lopuksi tunnistus varmistetaan vertaamalla kannan ominaisuuksia lajin standardikuvaukseen (Barnett *et al.*, 2000; Kurzman & Fell, 1998b).

Standardimenetelmä on tarkoitettu hiivalajin määrittämiseen. Sillä ei voi erotella hiivoja kantatasolla, eikä se tästä syystä sovellu esimerkiksi kontaminaatiolähteiden jäljitykseen tai spesifisten hiivakantojen (esim. teolliset hiivakannat, patenttikannat) tunnistamiseen. Standardimenetelmä edellyttää huomattavaa asiantuntemusta ja kokemusta ja on myös liian työläs ja aikaa vievä (1–4 viikkoa) rutiinilaadunvalvontaan tai ekologisiin tutkimuksiin. Tunnistaminen fenotyyppisten ominaisuuksien perusteella on toisinaan epäluotettavaa tai mahdotonta. Esimerkiksi osa lajeista eroaa toisistaan vain muutaman vaihtelevan piirteen suhteen (Baleiras Couto *et al.*, 1994; Kurzman, 1990) eivätkä erityisoloihin (esim. teollisuusprosesseihin) sopeutuneet kannat aina muistuta lajin tyyppikantaa (Prillinger *et al.*, 1999). Lisäksi osa hiivoista ei kasva ollenkaan tai kasvaa huonosti standardiolosuhteissa (Déak & Beuchat, 1987, 1988, 1993). Muutamat hiivat eivät kasva laboratorio-olosuhteissa lainkaan (Mäntynen, 1999).

2.3.2 Standardimenetelmän yksinkertaistetut muunnokset

Elintarvikeperäisten hiivojen tunnistukseen on kehitetty myös erilaisia yksinkertaistettuja menetelmiä. SIM-menetelmässä (Simplified Identification Method) standardime-

netelmän testeistä on eliminoitu noin 80 % ottamalla mukaan vain ne testit, jotka tehokkaimmin erottelevat elintarvikeperäiset hiivat toisistaan (Déak & Beuchat, 1987, Déak 1992). Yhden kannan alustavaan tunnistukseen tarvitaan kaksi petrimaljaa ja kolme koeputkea. Petrimaljoilla testataan kymmenen eri hiiliyhdisteen assimilaatiokyky. Glukoosin fermentaatio-, nitraatin assimilaatio- ja ureaasitesti tehdään putkissa. Lisäksi menetelmä käsittää viljelmän makroskooppisen ja mikroskooppisen tarkastelun, sillä pelkät biokemialliset reaktiot eivät anna luotettavaa tulosta. Tulos saadaan viikossa. Tunnistuskaavioita on kaksi: laaja kaavio käsittää kaikki 215 elintarvikeperäistä lajia, kun taas suppea kaavio sisältää 76 elintarvikkeista yleisimmin tavattavaa lajia. Tunnistus tulisi lopuksi varmistaa vertaamalla tuloksia ehdotetun lajin standardikuvaukseen.

Rohm & Lechnerin (1990) mukaan SIM-menetelmä on epäluotettava, koska sen tunnistuskaavioissa ei ole otettu huomioon lajien sisäistä ominaisuuksien vaihtelua. Teoriassa laajan kaavion 215 lajista vain 19 voidaan tunnistaa yksiselitteisesti. Hapanmaitovalmisteista eristetyistä 382 kannasta ja 12 vertailukannasta tunnistettiin vastaavasti 50 % ja 25 % oikein. Török & King (1991) käyttivät samaa menetelmää vihanneksista ja hedelmistä eristettyjen kantojen tunnistamiseen paremmalla menestyksellä. SIM:n havaittiin kuitenkin tunnistavan toistuvasti väärin tietyt tärkeät pilaajalajit. Déak & Beuchat käyttivät (1987 & 1993) SIM:n suppeaa versiota juomien ja elintarvikkeiden pilaajien identifiointiin. Juomaisolaateista 91 % (151/166) tunnistettiin oikein. Neljä lajia puuttui tietokannasta. Muista elintarvikkeista eristetyistä kannoista vain 57 %:lle (17/30) saatiin oikea tunnistus. Elintarvikeperäisille hiivoille on olemassa myös muita yksinkertaistettuja tunnistuskaavioita ja -menetelmiä (Barnett *et al.*, 2000; Déak, 1991; Fleet, 1992; Pitt & Hocking, 1997; Mitrakul *et al.*, 1999), mutta niitä ei ole arvioitu yhtä laajasti kuin SIM:ä.

Standarditunnistustestit voidaan tehdä myös pienoiskoossa kuoppalevyllä, mikä säästää materiaalia, aikaa ja työmäärää (Sheree Lin & Fung, 1987; Heard & Fleet, 1990). Yhdellä levyllä voidaan testata jopa 96 ominaisuutta tai kantaa. Kuoppalevy pohjaiset menetelmät antavat perinteistä menetelmää vastaavan tuloksen.

2.3.3 Kaupalliset tunnistusketit ja -systemit

Kliinisten hiivojen tunnistamiseen on markkinoilla useita kittejä (taulukko 5), jotka perustuvat pääasiassa hiiliyhdisteiden assimilaatioon tai entsyymireaktioihin tai molempiin. Näissä kiteissä testisubstraatit on yleensä kuivattu pieniin muovikuoppiin, jotka siirrostetaan tutkittavalla viljelmällä. Positiivinen reaktio ilmenee tavallisesti joko alustan värin tai sameuden muutoksena. Testitulokset kootaan numeeriseksi profiiliksi, jonka mukaan kanta tunnistetaan kitin mukana tulevasta lajilistasta tai tietokannasta. Jotkut kitit voidaan lukea automaattisesti. Kitit eroavat toisistaan lähinnä testien lukumäärän ja

tyypin, tietokannan koon sekä inkubointiajan suhteen. Tietokannat käsittävät vain 11–63 lajia, kun elintarvikkeista on eristetty yli 200 hiivalajia (Déak & Beuchat, 1987). Tulosaadaan entsyymitestillä 4 tunnissa ja assimilaatiotestillä 24–72 tunnissa.

Taulukko 5. Hiivojen tunnistamiseen käytettyjä kaupallisia kittejä.

Nimi	Assimilaatio- testejä	Entsyymi- testejä	Muita	Lajeja tietokannassa	Inkubointi	Valmistaja
ID32 C ^R	30	0	2	63	24–48 h, 30 °C	bioMérieux, Ranska
API 20 C ^R	19	0	1	43	24–72 h, 30 °C	"
API Yeast-Ident ^R	0	20	0		4 h 37 °C	"
API Candida ^R	5	7	0	15	24–48 h, 37 °C	"
API 50 CH ^R	49	0	1	bakteereita	7–28 d, 25 °C	"
Auxacolor ^R	13	1	2	26	24–48 h, 30 °C	Sanofi Diagnostics Pasteur, Ranska
Fungichrom ^R I	7	8	1	24	24–48 h, 30 °C	International Microbio, Ranska
Fungifast ^R I Twin	6	4		11	24–48 h, 37 °C	"

Useimmat kitit soveltuvat vähintään tyydyttävästi kliinisten hiivojen tunnistamiseen (Land *et al.*, 1991; Paugam *et al.*, 1999). Ne ovat helppoja käyttää ja säilyttää sekä antavat tuloksen standardimenetelmää nopeammin. Monia kittejä on testattu myös elintarvikeperäisten hiivojen tunnistamiseen, mutta ne on todettu sellaisenaan epäluotettaviksi tähän tarkoitukseen (Déak & Beuchat, 1988; Rohm & Lechner, 1990; Török & King, 1991). Esimerkiksi mehutiivisteistä ja virvoitusjuomista eristetyistä hiivakannoista API 20C ja ID 32C tunnistivat luotettavasti 45,7 % ja 59,8 % (Déak & Beuchat, 1993). Entsyymireaktioihin perustuvat kitit (API Yeast-Ident, API-Zym, MicroScan) on osoitettu assimilaatiokittejä epäluotettavimmiksi niin kliinisille kuin elintarvikeperäisille hiivoille (Déak & Beuchat, 1988, 1995a ja b; Török & King, 1991; Land *et al.*, 1991).

Assimilaatiotesteihin perustuvien kittien epäluotettavuus elintarvikeperäisillä hiivoilla johtuu lähinnä erilaisista puutteista niiden tietokannoissa. Useissa tutkimuksissa merkittävä osa tunnistetuista lajeista tai tuloksena saaduista numeerisista profiileista puuttui tietokannasta (Déak & Beuchat, 1988, 1993, 1995; Rohm & Lechner, 1990; Török & King, 1990; Déak, 1992). Lisäksi osa tietokantojen ominaisuuksista oli ristiriidassa standardilajikuvauksen kanssa (Déak & Beuchat, 1988, 1993). Myös virheelliset testitulokset voivat johtaa väärään tunnistukseen, vaikka yleensä assimilaatiotestien antamat tulokset korreloivat hyvin vastaavien perinteisten testien kanssa (Déak & Beuchat, 1988, 1993; Rohm & Lechner, 1990). Sen sijaan entsyymitestit ovat usein epäluotettavia ja huonosti toistettavia. Lisäksi kittien testivalikoima on liian suppea elintarvikeperäisten hiivojen yksiselitteiseen tunnistamiseen (Déak & Beuchat, 1988, 1993; Fleet, 1992). Kittejä voidaan käyttää elintarvikeperäisten hiivojen tunnistukseen, kun testivalikoimaa täydennetään muutamalla lisätestillä ja testien tuloksia verrataan kattavaan tie-

tokantaan. Esimerkiksi hiivojen identifiointiin kehitetyt tietokoneohjelmat ovat tähän tarkoitukseen käteviä.

Biolog (Biolog Inc., USA) on kliinisten ja ei-kliinisten hiivojen tunnistamiseen kehitetty puoliautomaattinen tietokonepohjainen systeemi, joka perustuu 96 hiiliyhdisteen oksidaatio- ja assimilaatiotestiin. Testeistä 26 on samoja kuin standardimenetelmässä. Järjestelmä koostuu testisubstraateista sisältävistä kuoppalevyistä, monikanavapipetoijasta, turbidometristä, automaattisesta kuoppalevyn lukijasta sekä MicroLog-ohjelmasta, jonka tietokannassa on 267 hiivalajin bioprofiilit. Biologia on testattu myös elintarvike- ja juomaperäisten hiivojen tunnistukseen. Praphailong *et al.*in (1997) tutkimuksessa systeemi tunnisti 21 lajista 52,4 % toistuvasti oikein. Kaikista kannoista oikein tunnistettuja oli 68 %. Mäntynen (1999) onnistui tunnistamaan mehutiivisteistä eristetyistä hiivoista 83 % (69/83) ja vertailukannoista 29 % (10/34). Biologin suurimpana heikkoutena pidettiin puutteellista tietokantaa. Myös testisubstraattivalikoimassa oli kehittämisen varaa.

2.3.4 Erottelevat ja valikoivat alustat

Erilaisten elintarvikeperäisten ja kliinisten hiivojen eristämiseen ja alustavaan tunnistukseen sekä hiivakantojen karakterisointiin on kehitetty muutamia valikoivia ja erottelevia alustoja. Ne perustuvat yleensä erilaisiin inhiboiviin yhdisteisiin (esim. värit, antibiootit), valikoiviin substraatteihin tai inkubointiolosuhteisiin (esim. lämpötila, hiilenlähde), orgaanisten värien absorptioon tai spesifisiin biokemiallisiin reaktioihin (esim. entsyymiaktiivisuus, hapon tuotto) tai näiden erilaisiin yhdistelmiin.

Kaupallisella CHROMagar™ Candida -alustalla voidaan pesäkkeen värin perusteella tunnistaa alustavasti *C. tropicalis*, *C. krusei* ja *C. albicans*. Värejä sisältäviä alustoja on käytetty myös *Pichia*- ja *Candida*-lajien eristämiseen elintarvikkeista (Sheree Lin & Fung, 1987), villihiivojen erottamiseen panimohiivasta (van der Aa Kühle & Jespersen, 1998) sekä hyötyhiivakantojen karakterisointiin (Simpson *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 2000). Erottelevia alustoja on lisäksi kehitetty ainakin seuraaville elintarvikkeiden pilaajahiivoille: *Yarrowia lipolytica* (ruskean pigmentin muodostus tyrosiinista), *Debaryomyces hansenii* (β -glukuronidaasin osoittaminen), *Kluyveromyces lactis* ja *K. marxianus* (β -galaktosidaasin osoittaminen), *Z. bailii* ja *Z. bisporus* (glukoosi ja muurahais-happo ainoana hiilen ja energianlähteenä), *Dekkera/Brettanomyces* (4-etyylifenolin tuotto *p*-kumariinihaposta) (Pitt & Hocking, 1997; Kurzman & Fell, 1998b; Loureiro & Querol, 1999).

2.3.5 FT-IR (Fourier Transform Infrared) -spektroskopia

FT-IR-spektroskopiassa mitataan infrapunasäteilyllä ($\lambda = 1 \mu\text{m} - 1 \text{mm}$) viritettyjen molekyylien värähtelyjä. Tuloksena saadaan näytteen kemiallista koostumusta esittävä infrapunaspektri, joka on eräänlainen näytteen kemiallinen sormenjälki. Mikrobin tunnistamiseksi luotettavasti tunnistettujen kantojen spektreistä on ensin luotava kattava kirjasto. Kümmerle *et al.* (1998) ovat kehittäneet standardoidun menetelmän elintarvikeperäisten hiivojen tunnistamiseksi FT-IR-spektroskopiolla. Hiivaa kasvatetaan YGC-agarilla 24 tuntia, minkä jälkeen viljelmä kuivataan näytepidikkeeseen (1 h) ja analysoidaan (2 min). Tunnistuskirjasto sisältää 332 hiivakannan spektrin. Kun menetelmää testattiin 722 uuden hiivakannan tunnistamiseen, oli oikeiden tunnistettujen kantojen osuus 97,5 %. Menetelmä on erittäin herkkä koe-olosuhteiden muutoksille ja laitteisto suhteellisen kallis.

2.3.6 Rasvahappoanalyysi

Mikrobeja voidaan tunnistaa ja karakterisoida myös niiden rasvahappokoostumuksen perusteella. Rasvahappoanalyysiä varten solut on kasvatettava tarkasti kontrolloiduissa standardiolosuhteissa, koska useat eri tekijät vaikuttavat mikrobin rasvahappokoostumukseen. Rasvahapot eristetään soluista saippuomalla ja analysoidaan metyyliestereinä kaasukromatografilla. Analyysin tulokset käsitellään yleensä tilastollisin menetelmin. Hiivojen rasvahapoista suurin osa on pitkäketjuisia (C14-C18) ja niissä esiintyy vähemmän vaihtelua kuin bakteerien rasvahapoissa.

Loureiron & Querolin (1999) mukaan elintarvikeperäiset hiivat voidaan jakaa niiden monitydyttämättömien C18-rasvahappojen koostumuksen perusteella kolmeen pääryhmään: 1) erittäin potentiaaliset pilaajalajit, 2) huonoa hygieniaa tai riittämätöntä säilöntäkäsittelyä indikoivat lajit ja 3) fermentatiiviset hiivat, jotka voivat olla pilaajia. Pitkäketjuisten rasvahappojen analyysillä voidaan erotella hiivoja myös laji-, alalaji- ja jopa kantatasolle asti. Menetelmän on useissa tutkimuksissa osoitettu soveltuvan viinissä esiintyvien hiivalajien tunnistukseen (Tredoux *et al.*, 1987; Augustyn *et al.*, 1990; Malfeito-Ferreira *et al.*, 1997). Rasvahappoanalyysillä on pystytty luokittelemaan panimoympäristöstä eristettyjä hiivoja eri ryhmiin (Oosthuizen *et al.*, 1987; Moreira da Silva *et al.*, 1994) sekä erottamaan toisistaan *S. cerevisiae* -lajin laboratorio-, panimo-, tislamo- ja viinikannat (Bendová *et al.*, 1991). Augustyn & Kockin (1989) tutkimuksessa kaikkien 13 *S. cerevisiae* -kannan rasvahappoprofiili oli erilainen. Menetelmän erottelukykyä arvioitaessa on kuitenkin tärkeää analysoida useita saman lajin kantoja, koska rasvahappokoostumus voi vaihdella lajin sisällä yhtä paljon kuin lajien välillä (Augustyn *et al.*, 1990).

Rasvahappoanalyysi on perinteistä menetelmää nopeampi ja antaa tuloksen 2–3 päivässä. Sen toistettavuus on standardiolosuhteissa hyvä. Standardikasvatusolosuhteet eivät kuitenkaan sovellu kaikille kannoille, mikä hankaloittaa menetelmän käyttöä tunnistustarkoituksiin. Markkinoilla on mikrobien tunnistamiseen rasvahappojen perusteella tietokonepohjainen ja puoliautomaattinen MIS (Microbial Identification System) -järjestelmä (MIDI Inc., USA), joka käsittää tarkkaan standardoidun näytteenvalmistusprotokollan, kaasukromatografian ja MIS-analyysiohjelman. Perustietokanta käsittää noin 200 hiivalajin rasvahappoprofiilit, mutta sitä voidaan laajentaa tarpeen mukaan. Puhtaaksiviljellyn hiivakannan tunnistus vie 2–3 päivää.

2.3.7 Proteiinianalyysi

Proteiinit ovat geeniekspression tuotteita ja toimivat soluissa sekä rakennekomponentteina että biokemiallisten reaktioiden katalysaattoreina (entsyymit). Useimpien proteiinien ilmeneminen riippuu ympäristöolosuhteista. Koko solun proteiinianalyysissä tutkitaan eroja organismien proteiinikoostumuksessa. Analyysin kohteena voivat olla myös solun eri entsyymit. Yleensä standardiolosuhteissa kasvatetuista soluista eristetyt proteiinit erotetaan toisistaan polyakryyliamidigeelielektroforeesissa koon ja varauksen perusteella, jonka jälkeen ne detektoidaan spesifisten värjäysten avulla. Solun proteiinit voidaan leimata myös *in vivo* kasvattamalla soluja radioisotooppeja sisältävällä alustalla, jolloin proteiinit voidaan osoittaa autoradiografisesti.

Koko solun proteiinianalyysiä on käytetty eniten *Saccharomyces*-suvun panimo-, leivintislaamo- ja viinihiivakantojen karakterisointiin. Menetelmällä on onnistuttu tyypittämään *Saccharomyces*-hiivoja niin laji-, alalaji- kuin kantatasolle asti (van Vuuren & van der Meer, 1987; Casey *et al.*, 1990; Querol *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 2000). Yleensä eri kantojen proteiinikoostumuksessa esiintyy kuitenkin enintään kvantitatiivisia eroja. Guillamón *et al.* (1993) samasta ekosysteemistä eristämien viinihiivakantojen proteiiniprofiilit olivat identtiset, mutta eri alkuperää olevien kantojen proteiinikoostumus erosi selvästi toisistaan. *Saccharomyces*-hiivojen lisäksi proteiinianalyysillä on pystytty erottelamaan toisistaan myös muiden hiivasukujen (mm. *Candida*, *Geotrichum*) lajeja (Bruneau & Guinet, 1989). Isoentsyymien analysointia on käytetty menestyksellisesti *Saccharomyces sensu stricto* -ryhmän hiivojen tunnistukseen (Duarte *et al.*, 1999).

Proteiinien analysointi on suhteellisen helppoa eikä siinä tarvita kalliita laitteita (elektroforeesilaitteisto ja virtalähde). Tuloksen saaminen vie kasvatusvaiheen jälkeen kaksi päivää. Koeolot on standardoitava tarkkaan, jotta tulokset olisivat toistettavia ja vertailukelpoisia keskenään. Luotettavasti tunnistettujen lajien proteiiniprofiileista täyttyy luoda tunnistuskirjasto identifiointitarkoituksia varten.

2.4 Genotyyppiin perustuvat tunnistus- ja tyyppitysmenetelmät

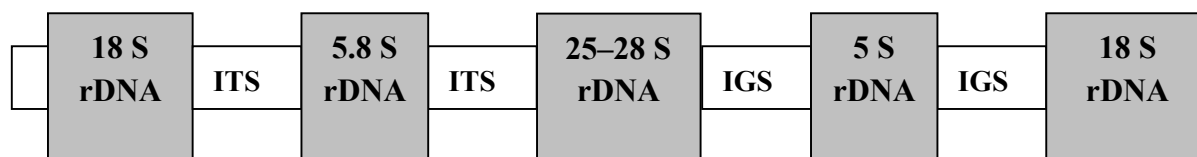
Evoluution aikana mikrobien geneettisessä materiaalissa (DNA) tapahtuneita muutoksia voidaan hyödyntää mikrobien erottelussa eri tasoilla. Genotyyppisissä menetelmissä tutkitaan eroja organismien DNA:ssa joko suoraan tai epäsuoraan. Genotyyppiset menetelmät eroavat fenotyyppisistä menetelmistä monessa suhteessa. Koska solun DNA-koostumus ei tavallisesti riipu solun fysiologisesta tilasta, soluja ei tarvitse kasvattaa standardiolosuhteissa. Genotyyppiset menetelmät mahdollistavat organismien erottelun toisistaan jopa yksilötasolla ja siten niitä voidaan käyttää esim. kontaminaatioreittien selvittämiseen, spesifisten teollisuus- ja patenttihilvakantojen tunnistamiseen sekä biodiversiteettitutkimuksiin. Lisäksi geneettiset analyysit ovat luotettavampia epätyypillisten kantojen (mm. Prillinger *et al.*, 1999) ja ilmiasultaan toisiaan muistuttavien lajien tunnistuksessa (mm. Kurzman, 1990; Baleiras Couto *et al.*, 1994) kuin fysiologiaan ja morfologiaan perustuvat menetelmät. Ne ovat myös standardimenetelmää nopeampia ja taloudellisempia. Osa tekniikoista soveltuu spesifisten organismien tunnistamiseen suoraan näytteestä ilman puhtaaksiviljelyä (van der Vossen & Hofstra, 1996). Genotyyppisillä menetelmillä ei voi erottaa toisistaan hiivan teleo- ja anamorfimuotoja (de Barros Lopes *et al.*, 1998).

2.4.1 Hiivasolun nukleiinihapot

Deoksiribonukleiinihappo (DNA) ja ribonukleiinihappo (RNA) vastaavat kaikissa soluissa geneettisen informaation talletuksesta ja välityksestä. DNA on kaksijuosteinen helikaalinen makro-molekyylä, jonka deksiriboosisokerista ja fosfaatista koostuvaan runkoon on kiinnittynyt neljä emästä: adeniini (A), tymiini (T), sytosiini (C) tai guaniini (G). Emästen väliset vetysidokset pitävät DNA:n vastinjuosteita yhdessä. Vastakkaisissa juosteissa adeniini on aina pariutunut tymiinin kanssa ja guaniini sytosiinin kanssa. DNA:n emäsjärjestys on joka organismilla ainutlaatuinen ja siihen on koodattu koko solun geneettinen informaatio. DNA-jaksoa, joka koodaa yhtä polypeptidiä (proteiinin rakenneosaa) tai RNA-molekyylä, kutsutaan geeniksi. Soluilla on kolmentyyppisiä RNA-molekyylejä, jotka kaikki osallistuvat tavalla tai toisella proteiinisynteesiin. RNA:ssa deksiriboosin tilalla on riboosi ja tymiinin tilalla urasiili. Geenien ilmetessä niiden emäsjärjestys kopioidaan viestinviejä RNA:han (mRNA), joka kuljettaa tiedon ribosomeihin. Ribosomit ovat proteiinisynteesiin erikoistuneita kahdesta alayksiköstä (40 S ja 60 S) muodostuneita partikkeleita, jotka koostuvat ribosomaalisesta RNA:sta (rRNA) ja proteiineista. Siirtäjä-RNA (tRNA) kuljettaa proteiinien rakennuspalikat, aminohapot, ribosomeille. Aktiivisesti kasvavassa solussa RNA-molekyyleistä tRNA:ta ja rRNA:ta on 80–90 % (Lewin, 1994).

Hiivan genomi on noin 3–5 kertaa suurempi kuin bakteerin. Esimerkiksi *S. cerevisiaen* genomissa on noin $1,3 \times 10^7$ emäsparia, kun *E. colin* genomissa on $4,2 \times 10^6$ emäsparia. Hiivasolun DNA koostuu lähinnä proteiineja ja RNA-molekyylejä koodaavista geeneistä. Osa geeneistä esiintyy kahtena tai useampana kopiona (Lewin, 1994; Yamagishi *et al.*, 1999). Joidenkin hiivageenien (< 5 %) sisällä on ei-koodaavia alueita, ns. introneita, joita ei käännetä transkriptiossa mRNA:ksi. Introneissa on konservoituneita sekvenssejä, joiden avulla DNA:ta prosessoivat entsyymit erottavat ne varsinaisista geeneistä. Geenien ja geeniryppäiden välissä esiintyy myös ei-koodaavia alueita tai jaksoja kuten geenien toimintaa ohjaavia signaalijaksoja ja repetitiivisiä elementtejä. Valtaosa hiivasolun (85 %) DNA:sta on tumassa (= nukleaarinen DNA). Jotta kaikki tämä DNA mahtuisi pieneen tumaan, se on pakattu proteiinien avulla kromosomeihin. Yksi kromosomi koostuu yhdestä lineaarisesta DNA-molekyylistä ja käsittää muun DNA:n ohella sen kahdentumisessa ja jakautumisessa tarvittavat sekvenssit. Lisäksi joka kromosomin päässä on sitä stabiloiva repetitiivinen DNA-sekvenssi eli telomeerinen elementti, jonka toistuva yksikkö on muotoa $C_{2-3}A(CA)_{1-3}$. Telomeerien pituus vaihtelee yksilökohtaisesti. Kaikissa eukaryoottisoluissa on useita kromosomeja (Lewin, 1994). Hiivoilla niiden lukumäärä ja koko vaihtelevat lajista ja jopa kannasta toiseen (Naumova *et al.*, 1993; Zolan, 1995). Kromosomit ovat erotettavissa toisistaan vain jakautuvassa solussa. Solunjakautumisten välillä DNA esiintyy tumassa väljempänä massana ns. kromatiinina (Lewin, 1994).

Hiivan nukleaarisessa DNA:ssa on useita identtisiä kopioita rRNA-geeneistä solun rRNA:n tarpeen tyydyttämiseksi. rDNA on järjestäytynyt peräkkäin toistuviksi yksiköiksi, jotka koostuvat 18 S, 5,8 S ja 25–28 S rRNA -geeneistä. Geenit erottaa toisistaan kaksi transkriptoitavaa aluetta (ITS; Internal Transcribed Spacer), joilla on spesifinen rooli ribosomisynteesissä (Musters *et al.*, 1990). rDNA-yksiköiden välillä on ei-transkriptoitava alue (IGS; Intergenic Spacer), jonka sisällä on eräillä hiivoilla 5 S rRNA -geeni (Kuva 8). ITS- ja IGS-alueiden pituudessa esiintyy lajikohtaista vaihtelua (Baleiras Couto *et al.*, 1996b; James *et al.*, 1996; Granchi *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 1999). rDNA sisältää evoluution aikana eri nopeudella muuttuvia alueita, mikä mahdollistaa sen käytön sekä läheisten että kaukaisten sukulaisuussuhteiden mittarina. 18 S ja 25–28 S rRNA -geeneissä esiintyy nukleotidieroja eri hiivalajien välillä. Erot saman lajin eri kantojen välillä ovat olemattomat (0–1 %). Pieniä 5 S (~120 bp) ja 5,8 S (~160 bp) rRNA-geenejä voidaan käyttää kaukaisempien sukulaisuussuhteiden selvittämiseen (Kurzman & Blanz, 1998). rDNA:n välialueet eivät ole yhtä hyvin konservoituneet kuin rRNA-geenit ja niiden sekvensseissä on osoitettu esiintyvän lajinsisäistä ja lajien välistä vaihtelua (Molina *et al.*, 1993; Baleiras Couto *et al.*, 1995; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).



Kuva 8. Hiivan rDNA-yksikkö, joka toistuu genomissa useita kertoja peräkkäin. ITS; Internal Transcribed Spacer, IGS; Intergenic Spacer.

Nukleaarisessa genomissa (nDNA) esiintyy myös erilaisia ja eriasteisesti itseään toistavia (repetitiivisiä) DNA-jaksoja, joilla ei ole tunnettua tehtävää solussa. Ne muuntuvat nopeammin kuin koodaava-DNA (geenit) ja edistävät geneettisen monimuotoisuuden syntymistä. Mikro- ja minisatelliitit koostuvat 5–50 kertaa peräkkäin toistuvista 1–5 bp ja 10–60 bp DNA-jaksoista. Satelliittijaksoja kutsutaan myös SSR (Simple Sequence Repeat) tai VNTR (Variable Tandem Number Length) -elementeiksi. Niiden koko, paikka ja lukumäärä genomissa vaihtelevat eri yksilöillä (Lieckfeldt *et al.*, 1993; Lewin, 1994). Eukaryoottien genomissa esiintyy paikallisina kerääntyminä myös pidempiä satelliittijaksoja. Eräiltä hiivoilta on löydetty lajispesifisiä toistojaksoja intergeenisiltä alueilta (Carlotti *et al.*, 1997). Transposonit ja retroposonit ovat liikkuvia DNA-elementtejä, jotka siirtyvät genomien sisällä suoraan paikasta toiseen aiheuttaen samalla DNA:ssa mutaatioita ja uudelleenjärjestäytymisiä. Transposonit liikkuvat koodaamiensa proteiinien avulla, kun taas retroposonit valmistavat DNA-kopioita omasta RNA:staan retrovirusten tavoin. Eukaryoottisolussa voi olla useita erilaisia liikkuvia elementtejä, joista useimmat ovat kuitenkin inaktiivisia. Ty (Transposable Yeast) -elementit ovat ryhmä hiivan retroposoneita. Näiden elementtien päissä on 330 bp -repetitiiviset δ -jaksot ja ne koodaavat kahta eri proteiinia. Genomissa on Ty1- ja Ty917-tyyppisiä jaksoja yhteensä noin 36 ja yksinäisiä δ -jaksoja noin 100. Yksittäisten Ty-elementtien ja δ -jaksojen sekvensseissä esiintyy huomattavaa heterogeenisuutta. Lisäksi niiden sijainti genomissa vaihtelee kantakohtaisesti (Lewin, 1994).

Hiivasolun mitokondriolla on oma rengasmainen, suhteellisen pieni (~20–80 kb) genominsa, josta on joka mitokondriassa useita identtisiä kopioita. Aerobisesti kasvavassa solussa on noin 50 kopiota mtDNA:sta, mikä vastaa 5–25 % kokonais-DNA:sta (Smole Možina & Raspor, 1997). MtDNA koostuu introneista, intergeenisistä alueista ja geneistä, jotka koodaavat kaikki mitokondrioiden omassa proteiinisynteesissä tarvittavat tRNA- ja rRNA-molekyylit sekä osan mitokondriaalisista proteiineista. Mitokondriaaliset 15 S ja 21 S rRNA -geenit eivät ole järjestäytyneet operoniksi kuten nukleaarinen rDNA. Intergeeniset alueet kattavat 2/3 genomista ja ne koostuvat lähinnä lyhyistä AT-rikkaista jaksoista (Piskur *et al.*, 1995), minkä vuoksi mtDNA on kevyempää kuin nDNA. MtDNA periytyy itsenäisesti riippumatta nDNA:sta.

Plasmidit ovat itsenäisiä kromosomin ulkopuolisia DNA-molekyylejä. Ne ovat kooltaan suhteellisen pieniä ja muodoltaan yleensä rengasmaisia. Usein plasmidit antavat solulle

jonkin erityisominaisuuden, jonka avulla ne selviytyvät paremmin. Esimerkiksi monet antibioottiresistenssigeenit ovat plasmideissa. Plasmidit menetetään, ellei niiden koodaamia ominaisuuksia tarvita. Plasmideja on löydetty useilta eri hiivalajeilta ja osan niistä tiedetään koodaavan mykosiineja, jotka ovat hiivojen toisia hiivoja vastaan tuottamia antibiootteja (Kurzman, 1998b).

2.4.2 Nukleiinihappojen eristäminen hiivasoluista

Ensimmäinen vaihe nukleiinihappoanalyyseissä on yleensä nukleiinihappojen (genominen DNA, nDNA, mtDNA, plasmidi-DNA tai RNA) eristäminen soluista. Eristysmenetelmiä on lukuisia (ks. Sambrook *et al.*, 1989), ja menetelmän valinta riippuu lähinnä analyysimenetelmästä sekä sen käyttösovelluksesta.

Genomisen DNA:n uuttomenetelmät voidaan jakaa karkeasti perinteisiin eristys- ja puhdistusmenetelmiin ja niiden yksinkertaistettuihin muunnoksiin sekä solunhajotusmenetelmiin. Perinteiset menetelmät käsittävät kolme vaihetta: 1) solujen hajotus, 2) DNA:n puhdistus ja 3) DNA:n saostus. Hiivasolut voidaan hajottaa käyttämällä esimerkiksi soluseinän komponentteja pilkkovia entsyymejä, kaotrooppisia ja emäksisiä yhdisteitä, lasihelmiä ja mekaanista jauhamista tai ravistelua, kuumennuskäsittelyjä, toistuvaa jäädytystä ja sulatusta ja näiden erilaisia yhdistelmiä (mm. Baleiras Couto *et al.*, 1994; de Barros Lopes *et al.*, 1996; Thanos *et al.*, 1996; Latouche *et al.*, 1997). Solulysaatit soveltuvat sellaisenaan useisiin PCR-pohjaisiin analyyseihin. PCR:ää varten hiivasoluja ei tarvitse välttämättä hajottaa lainkaan, koska ne hajoavat alkukuumennusvaiheessa (Ibeas *et al.*, 1996). Solulysaatit sisältävät DNA:n lisäksi proteiineja, hiilihydraatteja, RNA:ta ja muuta soluperäistä ainesta, eivätkä ne ole kaikkiin sovelluksiin riittävän puhtaita, konsentroituja tai tasalaatuisia. Tavallisesti nukleiinihappouutteista poistetaan epäpuhtaudet spesifisillä entsyymeillä ja kloroformi-fenoliuutoilla. Lopuksi DNA saostetaan ja pestään alkoholilla. RNA poistetaan näytteistä RNAasi-entsyymillä (Sambrook *et al.*, 1989). Perinteisissä menetelmissä DNA:n saanto ja puhtaus ovat hyviä. Ne ovat kuitenkin työläitä ja aikaavieviä (4–6 h) ja edellyttävät toksisten kemikaalien käyttöä. Hiivan genomisen DNA:n eristämiseksi on olemassa myös erilaisia pikamenetelmiä (mm. Steiner *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1998).

Kokonaisten kromosomien eristämiseksi soluseinää vailla olevat sferoplastisolut immobilisoidaan agarosiin, ettei kromosomaalinen DNA hajoaisi uuton aikana (Hayford & Jakobsen, 1999). Plasmidien puhdistuksessa hyödynnetään niiden pientä kokoa ja rengasmaista rakennetta. Plasmidit voidaan erottaa muista nukleiinihappofraktioista käyttämällä kesiumkloridi-etidumbromidi (CsCl-EtBr) -gradienttisentrifugointia tai kromatografisia menetelmiä tai ne voidaan saostaa selektiivisesti polyetyleeniglykolilla (Sambrook *et al.*, 1989). Myös mtDNA eristetään yleensä CsCl-gradientissa, jossa se on

muita DNA-fraktioita kevyempi (Aigle *et al.*, 1984). mtDNA:n puhdistukseen on esitetty myös yksinkertaistettuja menetelmiä (mm. Querol & Barrio, 1990).

RNA:ta pilkkovia entsyymejä on lähes kaikkialla, ja ne on inaktivoitava RNA:ta eristettäessä näytteistä nopeasti käyttämällä esimerkiksi RNAasia inhiboivia proteiineja tai denaturoivia yhdisteitä kuten β -merkaptotoetanolia tai guanidiniumtiosyanaattia. Myös liuokset ja laboratoriotarvikkeet on hyvä dekontaminoida ennen käyttöä. RNA voidaan erottaa DNA:sta tiheysgradienttisentrifugoinnilla tai selektiivisillä uutoilla. RNA voidaan eristää puhdistetuista nukleiinihappoista selektiivisellä saostuksella tai tuhoamalla näytteiden DNA DNAasilla. Eri RNA-fraktioiden eristykseen on olemassa erityiset menetelmät (Sambrook *et al.*, 1989).

Eri nukleiinihappofraktioiden eristämiseen on saatavilla myös runsas valikoima kaupallisia kittejä, jotka ovat yleensä nopeampia kuin perinteiset menetelmät eikä niissä käytetä terveydelle vaarallisia yhdisteitä. Monet kiteistä perustuvat nukleiinihappoja selektiivisesti sitoviin matriiseihin.

2.4.3 Hybridisaatio spesifisillä koettimilla

Hybridisaatiomenetelmissä käytetään yksijuosteisia nukleiinihappofragmentteja (= DNA- tai RNA-koetin) spesifisten nukleotidisekvenssien tai geenien tunnistamiseen kohdeorganismien DNA:sta tai RNA:sta. Määrätyissä olosuhteissa koetin emäspariutuu (= hybridisaatio) spesifisesti vain sille vastakkaisen nukleiinihappojakson kanssa. Hybridisaatioon on kehitetty monia eri tekniikoita, jotka kaikki käsittävät kuitenkin tietyt perusvaiheet. Mikrobin DNA tai RNA denaturoidaan, minkä jälkeen sen annetaan pariutua koettimen kanssa sopivissa olosuhteissa joko kalvon pinnalla tai liuoksessa. Lopuksi hybridit osoitetaan koettimeen liitetyn ei-radioaktiivisen tai radioaktiivisen leiman avulla. Lähtömateriaalina voi olla on pesäke, kokonainen solu tai puhdistettu nukleiinihappo (Grant & Kroll, 1993; van der Vossen & Hofstra, 1996). Hybridisaation spesifisyys riippuu koettimesta, joka voidaan suunnitella tunnistamaan esim. tietty laji tai tietyn ominaisuuden omaava mikrobi. Hiivoille on esitetty vain muutamia rDNA:n alueelle suunniteltuja koettimia. Kosse *et al.* (1997) julkaisivat 18 S rDNA -koettimet 11 jogurttia pilaaville hiivalajille. Lisäksi *Metchnikowia reukauffii* (Henriques *et al.*, 1991) sekä *C. tropicalis* ja *C. albicans* (Lischewski *et al.*, 1996) tunnistamiseen on saatavilla koettimet.

Hybridisaatiomenetelmiä käytetään lähinnä näytteistä eristettyjen tai rikastettujen mikrobien tunnistukseen tai monistustekniikoihin yhdistettynä (ks. 2.4.5), koska niiden herkkyys ($\sim 10^{5-6}$ solua/ml) ei yleensä riitä kohdemikrobien osoittamiseen suoraan näytteistä. Patogeenisille *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus*

immitis ja *Cryptococcus neoformans* -sienille on olemassa tätä tarkoitusta varten kaupallinen kitti (GenProbe, USA) (Hughes *et al.*, 1998).

Hiivojen spesifiseen osoitukseen kehitetyistä sovelluksista useimmat perustuvat fluoresenssi *in situ*-hybridisaatioon (FISH), jossa osoitetaan spesifisiä rRNA-jaksoja kokonaisuista soluista fluoresoivilla RNA-oligonukleotidikoettimilla (mm. Lischewski *et al.*, 1996; Kosse *et al.* (1997). Fluoresoivat solut analysoidaan virtausytometrillä tai fluoresenssimikroskoopilla. Kosse *et al.* (1997) pystyivät osoittamaan FISH:illä jogurtista aktiivisesti kasvavat *P. anomala* ja *S. cerevisiae* -solut niiden pitoisuuden ollessa $10^3/g$. Käytännössä jogurtti täytyy esirikastaa ennen määrittystä, koska ei-kasvavat solut eivät sisällä rRNA:ta riittäviä määriä. Teoriassa FISH:illä on mahdollista osoittaa suoraan näytteestä jopa yksi spesifinen solu. Menetelmä on teknisesti suhteellisen hankala ja edellyttää investointia mikroskooppiin tai virtausytometriin.

2.4.4 DNA/DNA-hybridisaatio (reassosiaatio)

DNA/DNA-hybridisaatiossa mitataan eri organismien koko nukleaarisen DNA:n samankaltaisuutta. Määrittäminen tehdään testipareittain ja se perustuu joko muodostuneiden hybridien reassosiaatioasteen tai stabiiliuden mittaamiseen. Menetelmästä riippuen reaktioissa käytetään joko leimattua tai leimaamatonta DNA:ta. DNA/DNA-reassosiaatio voidaan tehdä joko kalvon pinnalla tai liuoksessa kuten spesifinen hybridisaatio (ks. 2.4.3). Testiparin DNA-homologia ilmoitetaan prosentteina homologisen DNA:n mittaustuloksesta. nDNA-hybridisaatio soveltuu vain läheisten sukulaisuussuhteiden tutkimiseen, koska DNA-juosteiden pariutuminen edellyttää 75–80 %:n emäshomologiaa. Sitä käytetään lähinnä lajin määrittäminen hiivataksonomisissa tutkimuksissa. Yleensä saman lajin eri kantojen DNA-homologia on $\geq 70\%$, eri alalajien 40–70 % ja eri lajien $< 40\%$ (Kurzman, 1998b). nDNA-hybridisaatio on liian vaativa, aikaavievä ja työläs hiivojen tunnistusmenetelmäksi. Tuntemattoman hiivan tunnistus menetelmällä edellyttäisi sen nDNA:n vertaamista pareittain kaikkien eri hiivojen rDNA:n, kunnes homologinen DNA löytyisi.

2.4.5 PCR spesifisillä alukkeilla

Polymeraasiketjureaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) avulla voidaan valmistaa *in vitro* -olosuhteissa nopeasti suuria määriä kopioita mistä tahansa DNA- tai RNA-jaksosta. PCR on kolmivaiheinen termosyklinen prosessi, joka perustuu kahden lyhyen (15–25 bp) synteettisesti valmistetun oligonukleotidin (= alukkeet) ja lämmönkestävän DNA-polymeraasin käyttöön. Aluksi DNA-juosteet erotetaan toisistaan korkeassa lämpötilassa, minkä jälkeen alukkeiden annetaan kiinnittyä toisessa lämpötilassa niille vas-

takkaisiin kohtiin DNA:n vastinjuosteissa. Kolmannessa vaiheessa DNA-polymeraasi syntetisoi alukkeesta lähtien uuden DNA-juosteen käyttämällä mallina vanhaa juostetta. DNA:n määrä kasvaa joka sykliässä eksponentiaalisesti ja toistettaessa sykliä 30–40 kertaa kohdejakso monistuu miljardikertaisesti. Alukkeiden kiinnittymiskohtien välinen etäisyys vastinjuosteissa määrää rikastuvan jakson pituuden. PCR-tuotteet tunnistetaan yleensä joko niiden koon tai sekvenssin perusteella käyttämällä geielektroforeesia tai erilaisia hybridisaatiotekniikoita.

PCR:n avulla voidaan tunnistaa spesifisesti tietyn nukleotidisekvenssin omaava mikrobi kaikkien muiden mikrobien joukosta. PCR:n spesifisyys määräytyy lähinnä käytetyistä alukkeista. Ne voidaan suunnitella tunnistamaan jollekin taksonille (esim. laji, suku, luokka) spesifinen sekvenssi tai jonkin spesifisen ominaisuuden määräävä geeni (Hughes *et al.*, 1998; Yamauchi *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 1999). PCR:llä on mahdollista osoittaa jopa yksi kopio kohdesekvenssistä. Käytännössä pieni näytetilavuus (5–10 µl) sekä useimpien näytteiden sisältämät PCR-reaktiota inhiboivat yhdisteet nostavat detektorajan paljon korkeammaksi. PCR ja PCR-tuotteiden osoitus vie vain 1–5 tuntia, mutta PCR:n soveltuvan DNA-näytteen valmistus voi olla työlästä ja aikaavievää. PCR ei erota eläviä soluja kuolleista ja se antaa ainoastaan kyllä tai ei -vastauksen spesifisen mikrobin esiintymisestä näytteessä (Grant & Kroll, 1993; van der Vossen & Hofstra, 1996).

Patogeenisten hiivojen osoitukseen on kehitetty useita spesifisiä PCR-menetelmiä, joilla on yleensä pystytty toteamaan kliinisistä näytteistä noin 10 pmy/ml (Holmes *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1998). Elintarvikkeiden pilaajahiivoille on julkaistu vain muutamia sovelluksia. Yamauchi *et al.* (1998) ovat kehittäneet 2-vaiheisen menetelmän *S. cerevisiae* var. *diastaticus* -pilaajahiivan osoittamiseen oluesta. ATP-bioluminesenssi-menetelmällä selvitetään aluksi onko näytteessä eläviä soluja. Positiiviset näytteet analysoidaan PCR:llä käyttämällä kohdeorganismien glukoamylaasigeenille spesifisiä alukkeita. Analyysi vie yhteensä noin 30 tuntia, koska riittävän herkkyyden saavuttamiseksi solut on kasvatettava mikropesäkkeiksi. Esikasvatuksen sijasta herkkyyttä voidaan parantaa käyttämällä ns. kaksivaiheista PCR:ää, jossa toisessa vaiheessa käytetty alukepari monistaa fragmentin ensimmäisen vaiheen PCR-tuotteen sisältä. Ibeas *et al.* (1996) pystyivät osoittamaan 2-vaiheisella PCR:llä alle 10 *D. bruxellensis* -solun kontaminaation sherryviineistä alle 10 tunnissa. RNA:n monistamiseen perustuvaa RT-PCR -tekniikkaa on käytetty elävien mikrobien osoittamiseksi PCR:llä. RNA hajoaa yleensä kuolleista soluista nopeasti. Vaitilingom *et al.* (1998) esittivät lupaavan sovelluksen elävien hiivojen (*C. albicans*, *S. cerevisiae*), homeiden ja bakteerien osoittamiseen maidosta yhdessä PCR-reaktiossa. Sillä voitiin todeta kontaminoidusta maidosta neljässä tunnissa alle 10 solua/ml, ja se soveltui myös jogurtti- ja olutnäytteille.

PCR-pohjaisia menetelmiä voidaan käyttää myös nopeana ja helppona tunnistusmenetelmänä. PCR:n spesifisyyden vuoksi viljelmää ei tarvitse viljellä puhtaaksi ennen analyysiä. Tekniikka ei kuitenkaan sovellu yleiseksi hiivojen tunnistusmenetelmäksi, koska tuntemattoman isolaatin analysointi kaikilla mahdollisilla lajispesifisillä alukkeilla olisi liian työlästä. Pearson & McKee (1992) kehittivät *S. cerevisiae*-, *Z. rouxiin*-, ja *Z. bailii*-tunnistamiseksi yhdessä PCR-reaktiossa menetelmän, joka perustuu lajispesifisten plasmidien osoittamiseen. Nishikawa *et al.* (1999) ovat esittäneet *D. hansenii*/*C. famata*-spesifisen PCR:n.

Monissa sovelluksissa PCR:ää on käytetty vain DNA:n monistukseen spesifisen tunnistuksen perustessa esimerkiksi hybridisaatioon (Hughes *et al.*, 1998), ligaasiketju-reaktioon (Ligase Chain Reaction, LCR; Stubbs *et al.*, 1994), RFLP-analyysiin (ks. 2.4.7.1) tai erityisiin elektroforeesitekniikoihin (ks. 2.4.7.3).

PCR:ää varten tarvitaan laitteet DNA:n monistamiseen ja PCR-tuotteiden detektioon (esim. geelielektroforeesilaitte) sekä vähintään kaksi erillistä tilaa: yksi huone PCR:ää edeltäville vaiheille ja yksi sen jälkeisille vaiheille (ks. myös 2.4.7.5). Markkinoilla on myös nk. reaaliaikaisia PCR-laitteita (mm. Roche LightCyclerTM ja Applied Biosystems GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System), joissa PCR ja PCR-tuotteiden tunnistus tapahtuvat samanaikaisesti eikä erillistä PCR-tuotteiden analyysivaihetta tarvita. Reaaliaikaiset PCR-laitteet säästävät aikaa, työtä ja reagenssikustannuksia, mutta ovat perinteistä laitteistoa selvästi kalliimpia. Koko analyysi tapahtuu yhdessä suljetussa putkessa ja siksi monistuneesta DNA:sta aiheutuvien väärin positiivisten tulosten mahdollisuus on vähäinen.

2.4.6 DNA:n emäsjärjestyksen määrittäminen (sekvenointi)

DNA:n emäsjärjestyksen määrittystä eli sekvenointia voidaan käyttää mikrobien tunnistamiseen ja karakterisointiin eri tasoilla. Yleensä kohdesekvenssinä on rDNA, koska se soveltuu yleisesti eri taksonien tunnistamiseen. Tavallisesti sekvenoitava DNA-jakso monistetaan ensin PCR:llä, minkä jälkeen se liitetään sopivaan vektoriin ja kloonataan tai sekvenoidaan suoraan ilman kloonausvaihetta (Takamatsu, 1998). Eri rDNA-alueiden monistamiseksi sekvenointia varten on julkaistu useita alukkeita (mm. White *et al.*, 1990).

DNA-jakso sekvenoidaan käyttämällä kemialliseen hydrolyysiin perustuvaa Maxam-Gilbertin menetelmää tai entsyymaattisen DNA:n replikaation keskeyttämiseen perustuvaa Sangerin dideoksimenetelmää. Leimatut tuotteet erotetaan toisistaan elektroforeesissa ja detektoidaan autoradiografian tai fluoresenssin avulla. Nykyiset sekvenointilaitteistot ovat pitkälle automatisoituja. Mikrobien tunnistamiseksi sekvenssin perus-

teella on luotava sekvenssikirjasto, johon tuntematonta sekvenssiä voidaan verrata. Tunnistuksessa voidaan käyttää apuna myös sähköisiä tietokantoja (GenBank, EMBL, DDB), joihin on talletettu useiden eri mikrobien rDNA-sekvenssejä. Tulos puhtasvillemästä saadaan aikaisintaan 2–3 päivässä.

Standardoitujen analyysimenetelmien ja tunnistuskirjastojen kehittymisen ja halventumisen myötä on tulevaisuudessa mahdollista, että sekvenoinnista kehittyy mikrobien standarditunnistusmenetelmä. Bakteerien sekä hiivojen ja homeiden tunnistamiseen rDNA-sekvenssien perusteella on jo olemassa kaupallinen MicroSEQTM-systeemi (Applied Biosystems). Se sisältää kaikki sekvenointiin tarvittavat reagenssit, tulosten analyysiohjelman sekä valinnaisen rDNA-sekvenssitietokannan. Lisäksi tarvitaan PCR-laite (esim. GeneAmp^R PCR System 9600), sekvenointilaitteisto (esim. ABI PRISM^R 310 Genetic Analyzer) ja vakuumi- ja mikrosentrifuugi sekä muutamia muita pienlaitteita.

2.4.7 DNA-sormenjälkitekniikat

DNA-sormenjälkitekniikoilla voidaan tutkia epäsuorasti eroja organismien DNA-sekvensseissä eli DNA:n polymorfismia. Erot voivat johtua yksittäisten nukleotidien deleetioista, insertioista tai monistumisista tai lyhyiden DNA-jaksojen liikkumisesta genomien sisällä. Tekniikoita ja niiden muunnoksia on lukuisia, ja niiden nimeäminen on kirjavaa. Tekniikan mukaan kohteena on yleensä tietty geeni tai nukleinihappofraktio tai kokonaiset kromosomit. Mahdollisen polymorfismin osoittamiseen käytetään joko DNA:ta spesifisesti pilkkovia entsyymejä (RFLP), elektroforeettisia tekniikoita, monistustekniikoita (AFLP) tai näiden erilaisia yhdistelmiä. Sormenjälkitekniikat eroavat toisistaan myös mm. erottelukyvyltään, toistettavuudeltaan, nopeudeltaan, työmäärältään sekä materiaali- ja laitekustannuksiltaan. Tulokseksi saadaan viivakoodia muistuttava sormenjälkikuvio. Tekniikoita voidaan käyttää hiivojen tyyppitykseen, tunnistukseen ja karakterisointiin. Hiivojen tunnistus sormenjälkien perusteella edellyttää kirjaston luomista luotettavasti tunnistettujen lajien sormenjäljistä tai tuntemattoman kannan vertaamista samassa analyysissä tunnettuihin lajeihin. Tässä katsauksessa keskitytään lähinnä elintarvikeperäisten hiivojen karakterisoinnissa käytettyihin tekniikoihin ja ne on nimetty pääasiallisesti Vanechoutten (1996) mukaan.

2.4.7.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) -analyysi

Kaikki RFLP-pohjaiset menetelmät perustuvat spesifisiin restriktioendonukleasientsyymeihin, jotka tunnistavat ja sitten katkaisevat kaksijuosteisen DNA:n tietyn sekvenssin kohdalta. Sormenjälkikuvio syntyy, kun pilkkoutumistuotteet erotetaan toisistaan elektroforeettisesti koon perusteella. Erot tutkittavien DNA-näytteiden restriktiofrag-

menttien pituuksissa voivat johtua eroista restriktioentsyymien tunnistusekvensseissä tai niiden välisten alueiden pituudessa tai emäsjärjestyksessä tai molemmissa. Myös tätä vaihtelua kutsutaan RFLP:ksi.

RFLP

RFLP:ssä, jota kutsutaan myös restriktioentsyymianalyysiksi (REA), DNA pilkotaan yhdellä tai useammalla restriktioentsyymillä, minkä jälkeen fragmentit erotellaan geelielektroforeesilla ja visualisoidaan spesifisellä värjäyksellä. Hiivan genomisen DNA pilkkoutuu yhdellä entsyymillä noin miljoonaksi eri fragmentiksi. Geelissä näkyvät selvästi yleensä vain genomissa useana kopiona esiintyvät jaksot kuten rDNA. Mitokondriaalisen DNA:n RFLP-profiilit ovat yleensä informatiivisempia. RFLP:n erottelukyky riippuu pitkälti käytetystä restriktioentsyymistä (Meaden, 1990).

RFLP:tä on käytetty lähinnä kliinisten ja teollisten hiivakantojen tyypitykseen. Eri *Candida*-lajien tyypityksessä genomisen DNA:n RFLP-analyysi oli muita tekniikoita epäherkempi (Bostock *et al.*, 1993; Hayford & Jakobsen, 1999; Falconi di Fransesco *et al.*, 1999). RFLP-analyysi soveltui huonosti myös spesifisten leivin- ja panimohiivakantojen tunnistamiseen (Aigle *et al.*, 1984; Casey *et al.*, 1990; Meaden, 1990; Martínéz *et al.*, 1995). Sen sijaan viinihiivakantojen erottelussa on käytetty menestyksellisesti mtDNA:n RFLP-analyysiä (Querol *et al.*, 1992, 1994; Martínéz *et al.*, 1995; Sabate *et al.*, 1998). Juustoperäisiä *Candida zeylanoides* - ja *D. hansenii* -kantoja tyypitettäessä mtDNA:n RFLP osoittautui herkemmäksi kuin RAPD (Romano *et al.*, 1996). Tekniikkaa on sovellettu myös *Zygosaccharomyces*- (Guillamón *et al.*, 1997) ja *Kluyveromyces*-lajien (Belloch *et al.*, 1997) sekä *Saccharomyces sensu stricto* -ryhmän lajien (Guillamón *et al.*, 1994) karakterisointiin.

Genomisen DNA:n RFLP-analyysi on suhteellisen helppo menetelmä, joka antaa tuloksen 3–4 päivässä. Sen erottelukyky on kuitenkin huono useisiin muihin tyypitysmenetelmiin verrattuna. MtDNA:n RFLP-analyysi on mtDNA:n hankalan eristysvaiheen (ks. 2.4.2) vuoksi yleensä työläämpi ja hitaampi menetelmä. Querol *et al.* (1992) ovat kehittäneet mtDNA-restriktioanalyysiin rutiinilaadunvalvontaan soveltuvan seitsemän tunnin menetelmän, joka perustuu mtDNA:ta vain muutamista kohdista katkoviin entsyymeihin eikä edellytä mtDNA:n eristystä.

Makrorestriktioanalyysi

Makrorestriktioanalyysissä (low frequency RFLP analysis) käytetään DNA:ta vain harvoista kohdista pilkkovia restriktioendonukleaaseja (esim. *ApaI*, *NotI*, *SfiI*), jolloin pilkkoutumistuotteita muodostuu vähemmän ja ne ovat pitempiä kuin RFLP:ssä (van der Vossen & Hofstra, 1996). DNA-fragmentit erotetaan toisistaan käyttämällä pulssikent-

täelektroforeesia (PFGE), koska tasaiseen sähkökenttään perustuva elektroforeesi ei sovellu pitkille (> 50 kb) DNA-molekyyleille. PFGE:ssä sähkökentän suuntaa muutetaan määrääjoin, jolloin isot molekyylit tarvitsevat enemmän aikaa uudelleensuuntautumiseen kuin pienet molekyylit ja molekyylin liikkumisnopeus on suoraan verrannollinen niiden kokoon. PFGE soveltuu jopa kokonaisten hiivakromosomien kokoeroteluun. Tekniikoita on useita ja ne eroavat toisistaan lähinnä sähkökenttien orientaation suhteen (ks. Lai *et al.*, 1989). Laitteistoja on saatavana kaupallisesti.

Makrorestriktioanalyysillä voidaan erottaa hiivalajin eri kantoja toisistaan ja sen on todettu soveltuvan esimerkiksi *C. famata*, *K. apiculata* ja *Brettanomyces/Dekkera*-kantojen tunnistamiseen (Versavaud & Hallet, 1995; Mitrakul *et al.*, 1999). Menetelmän yleisin käyttösovellus on kuitenkin kromosomikartoitus (Zolan, 1995).

Restriktiofragmenttien selektiivinen hybridisaatio (SRFH)

SRFH (Selective Restriction Fragment Hybridisation) -menetelmissä restriktiofragmenttien joukosta osoitetaan vain määrätyn sekvenssin sisältävät fragmentit käyttämällä kyseiselle sekvenssille spesifistä DNA-koetinta. DNA pilkotaan yhdellä tai useammalla restriktioentsyymillä, minkä jälkeen pilkkoutumistuotteet erotetaan elektroforeettisesti, denaturoidaan ja immobilisoidaan kalvolle hybridisaatiota varten. Hybridisaatiossa yksijuosteisen DNA-koettimen annetaan pariutua vastakkaisen jakson omaavien restriktiofragmenttien kanssa. Hybridit osoitetaan esim. entsyymattisen väri- tai fluoresenssireaktion avulla tai autoradiografialla. SRFH-menetelmien erottelukykyyntä vaikuttavat lähinnä koetin, restriktioentsyymi ja hybridisaatio-olosuhteet (mm. Meaden, 1990; Lieckfeldt *et al.*, 1993; Lavallée *et al.*, 1994). Hiivojen karakterisoinnissa on käytetty lukuisia eri geeneille tai niiden osille (Meaden, 1990; Querol *et al.*, 1992), erilaisille toistojaksoille (Magee *et al.*, 1987; Meaden, 1990; Lieckfeldt *et al.*, 1992, 1993; Piskur *et al.*, 1995; Hayford & Jakobsen, 1999) sekä tuntemattomille sekvensseille (Paffetti *et al.*, 1995; Cavalieri *et al.*, 1998) vastakkaisia koettimia vaihtelevalla menestyksellä.

SRFH:hon perustuvia sovelluksia on kehitetty etenkin bioteknologisesti tärkeiden *S. cerevisiae* -kantojen tunnistamiseksi. Panimohiivakantojen tyypityksessä Ty-elementteihin perustuvat menetelmät ovat osoittautuneet useimmiten herkimmiksi (Meaden, 1990). Ty-elementtejä on käytetty menestyksellisesti myös viinihiivakantojen tunnistamisessa sekä geneettisen stabiiliuden seurannassa. Myös subtelomeerisille Ty-elementeille spesifisillä koettimilla on onnistuttu tyypittämään viinihiivoja kantatasolle asti (Lavallée *et al.*, 1994; Cavalieri *et al.*, 1998). Mikro- ja minisatelliittikoettimilla on pystytty erottamaan hiivoja (*Arxula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* ja *Candida* spp.) suku-, laji- ja kantatasolla (Lieckfeldt *et al.*, 1992, 1993). rRNA-operonin geenejä on käytetty hiivoille kehitetyissä SRFH-sovelluksissa koettimena hyvin harvoin (Magee *et al.*, 1987).

C. krusei ja *C. albicans* -kantojen tyypityksessä on hyödynnetty menestyksellisesti näiden lajien genomissa esiintyviä lajispesifisiä toistojaksoja (Carlotti *et al.*, 1997; Hayford & Jakobsen, 1999). *Saccharomyces sensu stricto* -lajien mtDNA:ssa on biologisesti aktiivisia *ori-rep-tra*-intergeenisia sekvenssejä, joiden perusteella ne voidaan erottaa lähisukuisista hiivoista (Piskur *et al.*, 1995).

SRFH-pohjaisten menetelmien toistettavuus on hyvä, ja ne ovat suhteellisen yksinkertaisia suorittaa. Menetelmät sisältävät kuitenkin useita pitkiä työvaiheita, joten ne ovat työläitä ja aikaavieviä ja niiden näytekapasiteetti on pieni. Kokonaisanalyysiaika on 2–5 päivää ja riippuu mm. DNA:n puhdistusmenetelmästä, restriktiofragmenttien siirtotekniikasta sekä hybridien detektioon käytetystä leimasta. Menetelmän investointi- ja käyttökustannukset ovat suhteellisen korkeat.

Restriktiofragmenttien selektiivinen monistaminen (SRFA)

SRFA (Selective Restriction Fragment Amplification) -tekniikoissa havaittavissa olevien restriktiofragmenttien määrää vähennetään monistamalla PCR:n avulla selektiivisesti vain osa fragmenteista. SRFA-tekniikoista on eniten käytetty vuonna 1993 patentoitu AFLPTM. Siinä genominen DNA pilkotaan kahdella eri restriktioentsyymillä, jonka jälkeen restriktiofragmenttien päihin liitetään kaksijuosteiset DNA-adapterit. Restriktiofragmentit monistetaan PCR:llä käyttämällä adapteri- ja restriktiosekvenssille vastakkaisia alukkeita, joiden 3'-päässä on 1–4 ylimääräistä selektiivistä emästä. Tällöin monistuvat vain ne fragmentit, joiden sekvenssi restriktiokohdan vieressä on vastakkainen alukkeen selektiivisen pään kanssa. Amplikonit erotetaan toisistaan polyakryyliamiditai agarosigeelissä ja visualisoidaan fluoresenssin tai autoradiografian avulla (Vanechouette, 1996; Sreenivasaprasad & Mills, 1998). Sienigenomi (5×10^7 bp) pilkkoutuu kahdella restriktioendonukleasilla 150 000 fragmentiksi, joista AFLP:llä voidaan erottaa noin 60–70 (Sreenivasaprasad & Mills, 1998). Tekniikan on osoitettu soveltuvan hiivakantojen tyypitykseen ja lajitason identifiointiin sekä geneettisten sukulaisuussuhteiden tutkimiseen (de Barros Lopes *et al.*, 1999)

AFLP ei edellytä aikaisempaa tietoa tutkittavasta DNA:sta ja soveltuu minkä tahansa DNA:n karakterisointiin. AFLP:n erottelukyky on hyvä ja sitä on helppo modifioida. Analyysi ovat myös erittäin toistettava (Vanechouette, 1996) ja helposti automatisoitavissa. Tulos on mahdollista saada kahdessa päivässä. AFLP-analyysin suorittamiseen on saatavilla kaupallisia kittejä (esim. Applied Biosystems, Life Technologies).

PCR-RFLP

PCR-RFLP-menetelmissä tutkitaan jonkin tietyn geenin tai geeniryhmän emäsjärjestyksen eroja. Kohdesekvenssi monistetaan PCR:llä ja pilkotaan spesifisellä restriktioent-

syymillä, minkä jälkeen restriktiofragmentit erotetaan toisistaan geelielektroforeesissa. Erot fragmenttien pituudessa ja lukumäärässä syntyvät eroista restriktiokohdissa tai niiden välisissä sekvensseissä tai molemmissa. Yleensä PCR-RFLP-analyysissä on tutkimuksen kohteena rDNA tai sen tietty osa. rDNA:n analysointiin perustuvia RFLP-menetelmiä kutsutaan usein myös PCR-ribotyypitykseksi tai ARDRA:ksi (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Vanechouette, 1996). Hiivojen rRNA-geenit ovat suhteellisen konservoituneita ja siksi lähisukuisten lajien karakterisointiin soveltuvat paremmin heterogeenisemmat ITS- ja IGS-alueet (James *et al.*, 1996; Bridge & Aro-ra, 1998; Kurzman & Fell, 1998). Kohdesekvenssin lisäksi vaikuttaa erottelukykyynt ratkaisevasti myös restriktioentsyymi (Baleiras Couto *et al.*, 1995 & 1996b; Smole Možina *et al.*, 1998).

ITS- ja IGS-alueiden RFLP:tä on käytetty *Saccharomyces*-kantojen tyypitykseen vaihtelevalla menestyksellä (Molina *et al.*, 1993; Baleiras Couto *et al.*, 1996b; Yamagishi *et al.*, 1999). ITS-alueen restriktioanalyysin on kuitenkin osoitettu soveltuvan erinomaisesti useimpien elintarvikkeissa ja juomissa esiintyvien hiivalajien tunnistamiseen. Granchi *et al.* (1999) kehittivät viiniperäisille hiivoille helpon 30 tunnin tunnistustestin, jonka avulla onnistuttiin tunnistamaan oikein kaikki 144 viinistä eristettyä kantaa. *Saccharomyces sensu stricto* -ryhmän hiivoilla ei päästy lajitason tunnistukseen. Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) osoittivat vastaavan menetelmän soveltuvan lähes 132 elintarvikkeperäisen lajin tunnistamiseen lukuun ottamatta *Cryptococcus albidus*/*C. bhutanensis*/*C. kuetzingii*, *Debaryomyces polymorphus*/*D. pseudopolymorphus*, *Pichia segobenis*/*P. stipitis*, *Saccharomyces bayanus*/*S. pastorianus* ja *Zygosaccharomyces cidri*/*Z. fermentati* -pareja.

Viiniperäisten *Hanseniaspora*/*Kloeckera*-lajien tunnistamiseen on käytetty koko rDNA-operonia ja eri *Torulaspora*- ja *Saccharomyces*-lajeja on tunnistettu 18S-ITS1-25/28 S rDNA:n RFLP-analyysillä (Smole Možina *et al.*, 1997 & 1998). 18S rDNA:n RFLP-analyysiä on sovellettu menestyksellisesti *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *S. cerevisiae*, *C. valida* ja *C. lipolytica* -lajien tunnistamiseen sekä mehutiivisteistä eristettyjen pilaajahiivojen ja leivinhiivakantojen karakterisointiin (Baleiras Couto *et al.*, 1995; Mäntynen, 1999).

PCR-RFLP-menetelmien toistettavuus on hyvä. Ne soveltuvat ensisijaisesti hiivalajien tunnistukseen, kun taas muut RFLP-menetelmät ovat ensisijaisesti tyypitysmenetelmiä. rDNA-pohjaisia menetelmiä voidaan käyttää myös taksonomisiin tarkoituksiin (Shen *et al.*, 1994; Montrocher *et al.*, 1998). PCR-RFLP-analyysit ovat helpompia, edullisempia ja nopeampia kuin SRFA- ja SRFH-analyysit, koska ne sisältävät vähemmän ja lyhyempiä työvaiheita.

2.4.7.2 AFLP (Arbitrarily Fragment Length Polymorphism) -analyysi

AFLP-menetelmissä tutkitaan eroja PCR-tekniikalla monistettujen tuntemattomien DNA-fragmenttien pituudessa, lukumäärässä ja intensiteetissä. Ne eivät edellytä aikaisempaa tietoa tutkittavan organismin genomista ja PCR:ään perustuvina menetelminä ne ovat yleensä nopeampia, yksinkertaisempia sekä edullisempia käyttää kuin muut DNA-sormenjälkitekniikat. Työpäivän aikana on mahdollista analysoida noin 50 DNA- uutetta (Lavallée *et al.*, 1994; Baleiras Couto, 1996b; Laidlaw *et al.*, 1996; Karp & Edwards, 1997). DNA:ta tarvitaan vähän eikä sen tarvitse olla välttämättä hyvälaatuista, mikä helpottaa näytteen käsittelyä (Lieckfeldt *et al.*, 1993; de Barros Lopes *et al.*, 1996).

AP-PCR

AP (Arbitrarily Primed) -PCR:ssä, jota kutsutaan myös RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) -PCR:ksi, käytetään yleensä yhtä lyhyttä (8–10 bp) aluketta, jonka emäsjärjestys ei vastaa mitään tunnettua DNA-sekvenssiä. PCR suoritetaan olosuhteissa (30–36 °C), joissa aluke voi sitoutua sekä vastakkaisiin että osittain vastakkaisiin DNA-jaksoihin. DNA:n vastinjuosteisiin sopivalle etäisyydelle toisistaan sitoutuneiden alukkeiden väliset sekvenssit rikastuvat PCR-reaktiossa. Elektroforeettisesti toisistaan erotetut fragmentit muodostavat näytteen sormenjälkikuvion. AP-PCR-alukkeita on saatavana kaupallisesti useilta eri valmistajilta (esim. Operon Technologies, USA).

AP-PCR:llä voidaan erotella hiivoja suku-, laji-, alalaji- ja kantatasolla. Erottelukyky riippuu pitkälti käytetyistä alukkeista ja PCR-olosuhteista (Baleiras Couto *et al.*, 1994, 1995, 1996b; Smole Možina *et al.*, 1998; Mitrakul *et al.*, 1999). Menetelmää on sovellettu mm. viiniperäisten *S. cerevisiae* - (Quesada & Cenis, 1995; Cavalieri *et al.*, 1998) ja *H. uvarum* -kantojen (Smole Možina *et al.*, 1998), panimo- ja tislaamohiivakantojen (Laidlaw *et al.*, 1996; Tompkins *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2000), kliinisten *Candida* -kantojen (Bostock *et al.*, 1993; Falconi di Francesco *et al.*, 1999) sekä viiniä ja olutta pilaavien *S. cerevisiae* - (Baleiras Couto *et al.*, 1996b) ja *D. bruxellensis* -kantojen (Mitrakul *et al.*, 1999) tyyppittämiseen. Useimmissa tutkimuksissa AP-PCR-profiileissa esiintyi vain rajoitetusti lajinsisäistä vaihtelua ja kannat pystyttiin luokittelemaan karkeasti eri tyyppeihin. Yleensä suurin osa kannoista saatiin erilleen toisistaan, kun useista eri AP-PCR-reaktioista saadut tulokset yhdistettiin.

AP-PCR:n on osoitettu soveltuvan useiden elintarvike- ja juomateollisuudelle merkittävien *Zygosaccharomyces*-, *Saccharomyces*-, *Candida*- ja *Kluyveromyces*- ja *Dekkera/Brettanomyces*-lajien sekä kliinisten hiivojen tunnistukseen (Baleiras Couto *et al.*, 1994, 1995; Paffetti *et al.*, 1995; Thanos *et al.*, 1996; Mitrakul *et al.*, 1999; Prillinger *et al.*, 1999). Vertailututkimuksissa AP-PCR oli fenotyypisiä menetelmiä luotettavampi

etenkin epätyypillisten kantojen ja samankaltaisten lajien tunnistamisessa. Menetelmää voidaan käyttää myös apuna hiivojen luokittelussa (Baleiras Couto *et al.*, 1995) sekä hiivapopulaatioiden heterogeenisuuden tutkimisessa (Quesada & Cenis, 1995; Cavalieri *et al.*, 1998; Smole Možina *et al.*, 1998).

AP-PCR on herkkä koeolosuhteiden muutoksille mm. siksi, että PCR-olosuhteet sallivat helposti alukkeiden kiinnittymisen eri kohtiin DNA:ssa. Etenkin juovien intensiteetissä voi esiintyä eroja eri määrittyskertojen välillä (Quesada & Cenis, 1995). Hyvän toistettavuuden saavuttamiseksi koeolosuhteet kannattaa standardoida huolellisesti.

IR-PCR

Erotuksena AP-PCR:stä IR(Inter Repeat)-PCR-menetelmissä käytetään genomissa hajanaisesti sijaitseville suhteellisen lyhyille toistojaksoille spesifisiä alukkeita. PCR-reaktiossa monistuu sopivan etäisyyden päässä toisistaan sijaitsevien toistojaksojen välinen alue. Koska toistojaksojen pituus, määrä tai sijainti tai molemmat hiivagenomissa vaihtelevat, niin myös monistuneiden fragmenttien pituus ja lukumäärä vaihtelevat. Alukkeet voivat sitoutua myös epäspesifisesti eri kohtiin genomia kuten AP-PCR:n alukkeet (de Barros Lopes *et al.*, 1996; Vogel & Scolnik, 1997). IR-PCR:ää on pidetty usein toistettavampana kuin AP-PCR:ää, koska alukkeiden pituus (15–20 bp) mahdollistaa korkeamman hybridisaatiolämpötilan käytön PCR:ssä (50–60 °C).

IR-PCR-menetelmissä on yleisimmin käytetty alukkeina erilaisia mini- ja mikrosatelliittijaksoja, jotka periaatteessa soveltuvat minkä tahansa hiivan karakterisointiin. Aluke vaikuttaa sormenjälkien informatiivisuuteen, ja paras aluke täytyy valita kokeellisesti. Mikro- ja minisatelliitti-PCR:n sekä AP-PCR:n erottelukyvyyt ovat verrattavissa toisiinsa, ja yleensä satelliittijaksoihin perustuvilla menetelmillä on pystytty erottelamaan hiivoja parhaiten laji- ja alalajitasolla. Menetelmän on todettu soveltuvan erilaisten *Candida*- (Thanos *et al.*, 1996; Latouche *et al.*, 1997), *Zygosaccharomyces*- (Baleiras Couto *et al.*, 1996a), *Kluyveromyces*- ja *Saccharomyces*-lajien (Lieckfeldt *et al.*, 1993) sekä juustoperäisten hiivojen (Prillinger *et al.*, 1999) tunnistamiseen. Prillinger *et al.* (1999) pystyivät tunnistamaan IR-PCR:llä useita fenotyypisiltä ominaisuuksiltaan epätyypillisiä juustoisolaatteja. Baleiras Couto *et al.* (1996a) onnistuivat jäljittämään mikrosatelliitti-PCR:llä majoneesia ja salaaattikastikkeita pilanneen *Z. bailii*n alkuperän.

Ness *et alii*n (1993) esittämällä delta (δ)-elementtien välisten DNA-alueiden monistamiseen perustuvalla PCR:llä on pystytty tunnistamaan jopa yksittäisiä panimo- ja viinihiivakantoja (Lavallée *et al.*, 1994; Pecar *et al.*, 1999). Menetelmä soveltuu vain *Saccharomyces*-suvun hiivoille. De Barros Lopes *et alii*n (1996) kehittämässä IR-PCR-sovelluksessa käytetään yhtä tai kahta 16 emäksen pituista aluketta, jotka koostuvat intronien konservoituneille silmukoitumisalueille vastakkaisista ja satunnaisista sekvens-

seistä. Alukkeet soveltuvat kaikille hiivoille. Intronit ovat hyvin heterogeenisiä konservoituneita alueita lukuun ottamatta. Menetelmällä on pystytty erottamaan kaupallisia ja luonnollisia viinihiivoja kantatasolle asti (de Barros Lopes *et al.*, 1996). Sitä on käytetty myös viiniperäisten hiivalajien tunnistamiseen (de Barros Lopes *et al.*, 1998). Menetelmä on helppo ja toistettava. Myös telomeerisiä toistojaksoja ja tRNA-geenien välisillä alueilla esiintyviä toistojaksoja on hyödynnetty kliinisten hiivojen karakterisoinnissa (Thanos *et al.*, 1996; Falconi di Francesco *et al.*, 1999).

Geeni-AFLP-menetelmät

Spesifisten geenien ja toistojaksojen kopioluku sekä geenien välisten alueiden pituus voivat vaihdella eri organismeilla. Näiden pituuserojen tutkimiseen käytettäviä sormenjälkitekniikoita kutsutaan kollektiivisesti geeni-AFLP-menetelmiksi. Geeni tai geenien välinen alue monistetaan PCR:llä ja monistunut tai monistuneet fragmentit erotellaan koon mukaan geelielektroforeesilla.

Yamagishi *et al.* (1999) tutkivat *FLO1*-flokku-laatiogeenin ja sen homologien polymorfismia *Saccharomyces*- ja ei-*Saccharomyces*-hiivoilla. *Saccharomyces*-kantojen *FLO*-geeneissä ei esiintynyt tyyppi- eikä lajispesifistä polymorfismia. Menetelmällä voitiin kuitenkin erottaa *Saccharomyces*-hiivat muista hiivoista. *C. krusei*lle on kehitetty spesifinen tyypitysmenetelmä, joka perustuu rIGS-alueella sijaitsevan lajispesifisen CKRS-1-toistojakson pituuden vaihteluun eri kannoilla. Hayford & Jakobsen (1999) pystyivät jakamaan menetelmällä 48 maissitaikinasta eristettyä *C. krusei* -kantaa kuuteen luokkaan.

Hiivojen tunnistamisessa on hyödynnetty myös ITS- ja IGS-alueiden koossa esiintyviä lajien välisiä eroja (Baleiras Couto *et al.*, 1996b; James *et al.*, 1996; Granchi *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 1999). Granchi *et al.* (1999) tutkimuksessa rITS oli kaikilla 30 viiniperäisellä hiivalajilla erikokoinen lukuun ottamatta *Saccharomyces sensu stricto* -lajeja. Kokoerot olivat joskus vain muutamia nukleotideja.

2.4.7.3 Elektroforeettiset tekniikat

Elektroforeesiin perustuvilla sormenjälkitekniikoilla voidaan erottaa toisistaan plasmideja, kromosomeja, geenejä tai muita nukleiinihappofragmentteja niiden koon, varauksen, konformaation ja/tai sekvenssin perusteella.

PFGE-karyotyypitys

PFGE-karyotyypityksellä tarkoitetaan eukaryoottisolun kromosomien lukumäärän ja koon määrittystä pulssikenttäelektroforeesilla (PFGE). Tulokseksi saatava kromosomi-profiili on kuin viivakoodi, jossa juovien määrä, paikka ja intensiteetti voivat vaihdella. Hiivakromosomeissa esiintyy luonnollista vaihtelua. Muutoksia kromosomien pituuteen aiheuttavat mm. pitkien DNA-fragmenttien (≥ 10 kb) deleetiot, kahdentumiset ja insertiot kromosomien sisällä sekä niiden siirtyminen eri kromosomien välillä. Hiivoilla on myös tarpeettomia kromosomeja, joiden esiintyvyys lajin sisällä vaihtelee. Yleensä vegetatiivisesti kasvavan hiivapopulaation karyotyyppi on suhteellisen stabiili. Suvullisesti lisääntyvillä hiivoilla meioottinen rekombinaatio lisää muuntelua (Zolan, 1995).

Kaikki PFGE-tekniikat eivät sovellu karyotyypitykseen yhtä hyvin. Eniten hiivojen tyyppityksessä on käytetty CHEF:iä ja TAFE:a (Casey *et al.*, 1990; Meaden, 1990; Boekhout *et al.*, 1993). Ensimmäinen hiivan elektroforeettinen karyotyyppi julkaistiin vuonna 1985 (Casey *et al.*, 1990). Sittenkin lukuisten eri asko- ja basidiomykeettihiivojen karyotyyppi on määritetty (taulukko 6).

Taulukko 6. Hiivojen elektroforeettisia karyotyyppejä.

Laji	Genomin koko (Mb)	Kromosomien koko (Mb)	Kromosomien lkm (haploidi)	Viite
<i>Candida albicans</i>	16–17	0,66–4,3	8–9	Zolan, 1995
<i>Candida famata</i>	11,5–14	0,5–3	7–8	Versavaud & Hallet, 1995
<i>Candida glabrata</i>	ei arvioitu	0,45 - >2,2	10–11	Falconi di Francesco <i>et al.</i> , 1999
<i>Candida utilis</i>	ei arvioitu	0,4 - > 3,5	≥ 8	Zolan, 1995
<i>Kloeckera apiculata</i>	9,9–10	0,7–2,2	6–7	Versavaud & Hallet, 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13,5–14,5	0,24–3	16	Zolan, 1995
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14	3,5–5,7	3	Zolan, 1995
<i>Yarrowia lipolytica</i>	12,7–22,1	1,4–6,2	3–6	Naumova <i>et al.</i> , 1993

Monien hiivalajien karyotyypissä esiintyy mittavaa vaihtelua ja useimmiten lajin sisäinen vaihtelu on yhtä runsasta kuin lajien välinen vaihtelu. Yleensä PFGE soveltuukin parhaiten hiivakantojen tyyppitykseen (Boekhout *et al.*, 1993; Naumova *et al.*, 1993; Zolan, 1995). Menetelmällä on pystytty erottelemaan toisistaan hyvinkin läheisiä *Saccharomyces*-suvun panimo- leivin- ja viinihiivakantoja (Casey *et al.*, 1990; Meaden *et al.*, 1990; Querol *et al.*, 1992; Pedersen, 1994; Sato *et al.*, 1994). Myös *Brettanomyces/Dekkera*-, *Candida*- ja *Zygosaccharomyces*-suvun lajien karyotypeissa esiintyy runsaasti vaihtelua (Boekhout *et al.*, 1993; Török *et al.*, 1993; Oda & Tonomura, 1995). Kuitenkin valikoivissa olosuhteissa elävän hiivapopulaation kannat voivat kehittyä karyotyypiltään samanlaisiksi (Martinez *et al.*, 1995). PFGE:tä voidaan käyttää esim. spesifisten tuottokantojen tunnistamiseen, spontaanien käymisprosessien etenemisen seurantaan sekä epidemiologisiin tutkimuksiin. Karyotyypitystä on ehdotettu myös teollisuushiivakantojen geneettisen stabiiliuden mittariksi.

Karyotyypitys ei yleensä sovellu lajin tunnistukseen eikä taksonomisiin tarkoituksiin (Boekhout *et al.*, 1993). Kuitenkin Cardinali & Martini (1994) onnistuivat jakamaan *Saccharomyces sensu stricto* -ryhmän kannat kromosomiprofiilien perusteella neljään ryhmään, jotka vastasivat nDNA-hybridisaation tuloksia. Myös *C. krusei* karyotyypityksessä on raportoitu esiintyvän vain vähän lajin sisäisiä eroja (Mitrakul *et al.*, 1999).

Karyotyypitys on herkkä ja melko toistettava, mutta suhteellisen aikaavievä tyypitysmenetelmä. Kromosomien eristäminen soluista on vaativaa ja vie yleensä 2–3 päivää. PFGE-geejiä on ajettava vähintään 16 tuntia, mutta yleensä ajoaika on 24–48 tuntia. Työlään näytteenkäsittelyvaiheen takia menetelmän näytekapasiteetti on alhainen. Karyotyypitys edellyttää investointia pulssikenttäelektroforeesilaitteistoon (Querol *et al.*, 1992).

DGG-, SSCP- ja Bisbentsimidi/PEG-elektroforeesi

Usein saman taksonin eri edustajien geenit ovat kooltaan samanlaisia, mutta sekvenssiltään erilaisia. DGG(Denaturing Gradient Gel)-, SSCP(Single-Strand Conformational Polymorphism)- ja bisbentsimidi/PEG-elektroforeesia käyttämällä samankokoiset DNA-fragmentit voidaan erottaa toisistaan niiden sekvenssin perusteella. Yleensä tutkittava DNA-fragmentti monistetaan PCR:llä ennen analyysiä. Sekaviljelmästä, esim. suoraan näytteestä, on mahdollista tunnistaa useita eri lajeja samanaikaisesti käyttämällä PCR:ssä kohdemikrobiryhmälle spesifistä aluketta.

DGGE perustuu DNA:n denaturoitumisen riippuvuuteen sen emäskoostumuksesta. DGGE-geelissä DNA-fragmentit etenevät denaturoivassa gradientissa nopeasti kunnes niiden denaturoituminen asteittain hidastuttaa kulkunopeutta. Yleensä yksi ajo kestää ainakin 12 tuntia. Sovellusten sisäänajo ja optimointi ovat yleensä aikaavieviä, ja tuloksen tulkitseminen voi olla hankalaa (Waver *et al.*, 1995).

Lyhyiden yksijuosteisten nukleiinihappojen avaruusrakenne riippuu niiden sekvenssistä. SSCP perustuu avaruusrakenteeltaan erilaisten DNA- tai RNA-molekyylien erottumiseen toisistaan ei-denaturoivassa polyakryyliamidigeelissä. (Vanechouette, 1996). SSCP:llä voidaan osoittaa jopa yhden nukleotidin ero tutkittavissa DNA-fragmenteissa. Analyysi voidaan tehdä päivässä. Walsh *et al.* (1995) ovat soveltaneet 18 S rDNA:n SSCP-analyysiä patogeenisten sienten tunnistamiseen. Menetelmällä pystyttiin erottamaan toisistaan *Aspergillus* spp., *Candida* spp. ja *Cr. neoformans*, *Pseudallescheria boydii* ja *Rhizopus arrhizus*, mutta eri *Candida*-lajien SSCP-profiilit olivat identtiset.

Bisbentsimidi/PEG-elektroforeesissa agarosigeeliin lisätään fluoresoiva bisbentsimidiväri, johon on kiinnitetty pitkäketjuisia polyetyleeniglykolimolekyylejä (PEG 6000). Bisbentsimidi sitoutuu A- ja T-emäksiä sisältäviin sekvensseihin, jolloin näiden frag-

menttien eteneminen geelissä hidastuu. Tekniikka ei vaadi erityislaitteistoja eikä opti-
mointia ja on siten helpompi kuin SSCP tai DGGE. Ajo kestää muutamia tunteja (Wa-
ver *et al.*, 1995).

Pienten stabiilien RNA-molekyylien erottelu SC (staircase) -elektroforeesilla

SCE on uusi elektoroforeesitekniikka, jolla voidaan erottaa toisistaan solun pienet sta-
biilit RNA-molekyylit. Hiivoilla tämä fraktio käsittää 5S ja 5.8S rRNA -molekyylit sekä
luokkien 1 ja 2 tRNA -molekyylit. Äskettäin tekniikan on osoitettu soveltuvan hiivojen
lajitason erotteluun (Vélazquez *et al.*, 2000).

2.4.7.4 Tekniikoiden yhdistelmäkäyttö

Eri tekniikoiden erottelukykyä voidaan parantaa yhdistämällä niitä toisiinsa. Esimerkik-
si AP-PCR:n herkkyyttä voitiin parantaa analysoimalla PCR-tuotteet DGGE:llä (Va-
neechouette, 1996). Yhdistämällä monella eri tyyppitysmenetelmällä saadut tulokset saa-
vutetaan yleensä parempi erottelukyky kuin yhdellä tekniikalla (Baleiras Couto *et al.*,
1996b; Falconi di Francesco *et al.* 1999; Mitrakul *et al.*, 1999).

2.4.7.5 Sormenjälkitekniikoiden vertailu

Eri sormenjälkitekniikoiden ominaisuuksia on verrattu taulukossa 7. Tekniikat eroavat
toisistaan monessa suhteessa eikä mikään yksittäinen tekniikka ole optimaalinen kaik-
kiin käyttötarkoituksiin. Tekniikan valinta riippuu pitkälti käyttösovelluksesta ja kohde-
organismista. Tunnistustarkoituksiin kannattaa valita tekniikka, jolla saadaan toistetta-
vat ja selkeät lajispesifiset sormenjäljet. Liian hyvä erottelukyky on tässä sovelluksessa
haitta, koska se vaikeuttaa lajispesifisten piirteiden tunnistamista. Hiivalajien tunnistuk-
seen soveltuvat yleensä hyvin esim. PCR-RFLP ja AP/IR-PCR, jotka PCR-pohjaisina
menetelminä ovat suhteellisen nopeita ja helppoja. PCR-RFLP on hitaampi, työläämpi
ja kalliimpi mutta toistettavampi kuin AP/IR-PCR-tekniikka. Kontaminaatioreittien
kartoituksessa, epidemiologisissa tutkimuksissa sekä spesifisten tuotto- ja patenttikan-
tojen tunnistamisessa tekniikalla on pystyttävä erottelemaan saman lajin eri kannat toi-
sistaan. Kontaminaatiolähteitä paikallistettaessa menetelmältä vaaditaan lisäksi suurta
kapasiteettia ja nopeutta. Hiivakantojen tyyppitykseen soveltuvat etenkin SRFA, SRFH
(etenkin mikrosatelliitti-SRFH), PFGE-karyotyyppitys (tietyt hiivalajit) ja IR/AP-PCR
(käytettäessä useita alukkeita). Näistä AP/IR-PCR-menetelmien erottelukyky on huo-
noin. Ne ovat kuitenkin muita tekniikoita helpompia ja nopeampia.

Taulukko 7. Sormenjälkitekniikoiden ominaisuuksia.

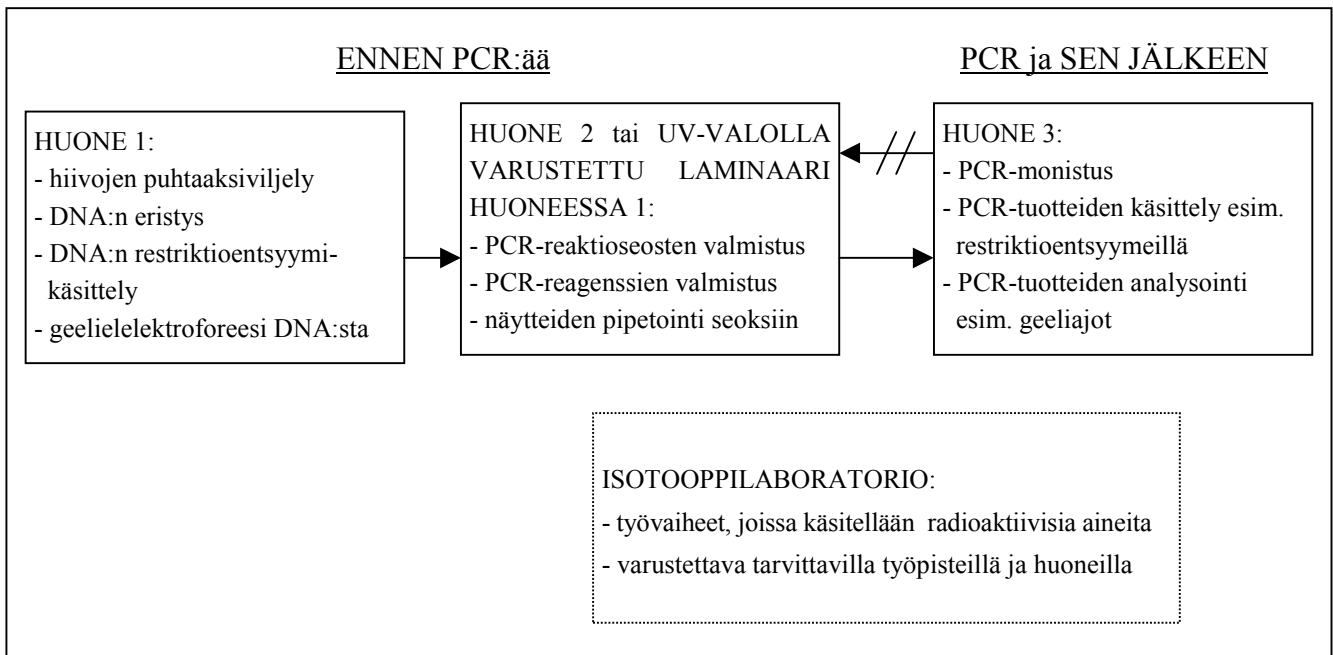
Piirre	SRFH	SRFA	PCR-RFLP	AP- ja IR-PCR	Karyotyypitys
Kohde	kokonais-DNA	kokonais-DNA	geeni	kokonais-DNA	kromosomit
DNA:n määrä ja puhtaus	Paljon, puhdasta	Melko paljon, puhdasta	Vähän, puhtausvaatimus vaihtelee	Vähän, puhtausvaatimus vaihtelee	Paljon, puhdasta
Kehityskustannukset	korkeat/kohtalaiset	kohtalaiset	alhaiset	alhaiset	kohtalaiset
Investointikustannukset	korkeat	korkeat	alhaiset	alhaiset	kohtalaiset
Käyttökustannukset	korkeat	kohtalaiset	kohtalaiset	alhaiset	kohtalaiset
Näytteitä/pvä (tutkimus)	20	50	50	50	20
Vaativuusaste	keskivaikea	keskivaikea	helppo	helppo	keskivaikea
Työmäärä	iso	kohtalainen	vähäinen	vähäinen	kohtalainen
Automaatiomahdollisuus	ei	kyllä	kyllä	kyllä	ei
Analyysiaika (d)	2–5	2–3	1–2	1	2–5
Erottelukyky	kanta, (laji)	kanta, (laji)	laji	laji, (kanta)	kanta, (laji)
Toistettavuus	hyvä	hyvä	hyvä	kohtalainen/huono	kohtalainen/hyvä
Ensisijainen käyttösovellus	tyypitys	tyypitys	tunnistus	tunnistus, alustava tyypitys	tyypitys

Eri tekniikoiden laite- ja tilavaatimukset ovat erilaiset (taulukko 8, kuva 9). PCR-pohjaisia menetelmiä käytettäessä PCR:ää edeltävät vaiheet (DNA:n eristys, PCR-reaktioseosten valmistus) on eristettävä PCR:n jälkeisistä (PCR, geelielektroforeesi) vaiheista täysin, jotta voitaisiin estää monistuneen DNA:n joutuminen näytteisiin. Tämä tarkoittaa erillisiä tiloja, laitteita, työtakkeja ja pipettisarjoja ja muita välineitä (Orrego, 1990). Onnistuneessa PCR:ssä syntyy ainakin 6×10^9 molekyyliä/ μ l haluttua tuotetta. Radioaktiivisten aineiden käyttö edellyttää isotooppilaboratoriota. Nykyään radioaktiiviset aineet voidaan useimmiten korvata ei-radioaktiivisilla aineilla. SRFA- ja SRFH-tekniikoissa tarvitaan enemmän erityislaitteita kuin muissa tekniikoissa (taulukko 8).

Taulukko 8. DNA-sormenjälkitekniikoiden laite- ja tilavaatimukset*.

Tekniikka	Laitteet	Tilat
RFLP		
- RFLP-analyysi	Agaroosigeelielektroforeesi- tai SDS-PAGE-laitteisto, valokuvaussysteemi esim. kamera ja UV-valopöytä	Ei erityistä
- makrorestriktioanalyysi	Pulssikenttägeelielektroforeesilaitteisto (esim. CHEF, TAFE), valokuvaussysteemi esim. kamera ja UV-valopöytä	Ei erityistä
SRFH	Agaroosigeelielektroforeesilaitteisto, kuivausuuni (80 °C), hybridisaatiouuni (60–65 °C), ravisteleva inkubaattori, ravistelija geelleille, röntgenfilmi	Isotooppilaboratorio (radioaktiiviset leimat)
SRFA	PCR-laite, automaattinen sekvenointilaitteisto tai agaroosigeelielektroforeesi- tai SDS-PAGE-laitteisto + röntgenfilmi tai valokuvaussysteemi, UV-valolla varustettu laminaarivirtauskaappi	2–3 erillistä huonetta, isotooppilaboratorio (radioaktiiviset leimat)
PCR-RFLP	PCR-laite, agaroosielektroforeesi- tai SDS-PAGE-laitteisto, valokuvaussysteemi, UV-valolla varustettu laminaarivirtauskaappi	2–3 erillistä huonetta
AFLP (AP-PCR, IR-PCR)	PCR-laite, agaroosigeelielektroforeesi- tai SDS-PAGE-laitteisto, valokuvaussysteemi, UV-valolla varustettu laminaarivirtauskaappi	2–3 erillistä huonetta
Elektroforeesi		
- plasmidikartointus	Agaroosigeelielektroforeesilaitteisto	Ei erityistä
- PFGE	Pulssikenttägeelielektroforeesilaitteisto (esim. CHEF, TAFE)	Ei erityistä
- DGGE	DGGE-geelielektroforeesilaitteisto	2–3 erillistä huonetta
- SSCP	SDS-PAGE-laitteisto	2–3 erillistä huonetta
- PEG/bisbentsimidi	Studier-tyyppinen elektroforeesilaitteisto	2–3 erillistä huonetta

*Monista tekniikoista on olemassa eri muunnoksia, joiden laite- ja tilavaatimukset voivat erota toisistaan. Laitelista ei kata useiden laboratorioiden normaalivarustukseen kuuluvia laitteita ja tarvikkeita kuten mikrosentrifuugia, pipettisarjoja, inkubaattoreita, koeputkisekoittimia ja -telineitä eikä DNA:n tarkkaan kvantitointiin tarvittavaa spektrofotometriä tai fluorometriä.



Kuva 9. Laboratorion tilajärjestelyt.

3. Hiivojen esiintyminen

3.1 Hiivat ympäristössä

Hiivoja esiintyy kaikkialla ympäristössä: makeassa vedessä ja merissä, maaperässä, ilmassa ja eliöissä. Maaperä on hiivojen kasvulle usein liian niukkaravinteinen ympäristö: siinä hiivat lähinnä säilyvät hengissä, mutta eivät lisäänty (Hagler & Ahearn, 1987). Hiivoja on vesistöissä noin 10^2 – 10^3 solua/ml. Saastuneiden vesien hiivapitoisuus on korkeampi kuin puhtaiden ja niukkaravinteisten vesien (Fleet, 1992).

Useimmat hiivat voivat elää 0–45 °C:n lämpötilassa. Osa psykrofiileistä hiivoista voi kasvaa alle 0 °C:ssa, kun taas eläinten ruuansulatuskanavassa elää 46–48 °C:ssa kasavia termofiilejä hiivoja. Monet hiivat sietävät hyvin auringonvaloa ja kuivuutta sekä veden aktiivisuuden (a_w) eli ympäröivän liuoksen väkevyyden muutoksia. Siksi hiivoja esiintyy yleisimmin kasvien pinnoilla kuten lehdillä, kukissa ja hedelmissä. Hiivoja voi olla runsaasti myös eliöiden ulko- ja sisäpinnoilla etenkin hyönteisissä ja nisäkkäissä (Carlile & Watkinson, 1996). Yleensä hiivat ovat isäntäeliölle haitattomia, mutta opportunistisesti patogeeniset lajit voivat aiheuttaa tauteja vastustuskyvyltään heikentyneessä eliössä. Ihmiselle tauteja aiheuttavat hiivat kuuluvat lähinnä *Candida*-sukuun. Yleisin taudinaiheuttaja on *C. albicans*, joka kuuluu ihmisen ihon normaaliflooraan. Patogeeniset hiivat voivat aiheuttaa iho-, limakalvo-, suolisto- ja hengitystieinfektioita, sekä systeemisiä infektioita, joissa hiiva leviää verenkierron välityksellä elimistössä ja voi johtaa vakavaan tulehdustilaan. Erityisen alttiita hiivainfektioille ovat immunitaetiaan vajavaiset henkilöt, joille hiivat voivat aiheuttaa em. hyvin vakavia infektioita. Taulukossa 9 on lueteltu kliinisesti tärkeimpiä, mahdollisesti tautia aiheuttavia hiivalajeja.

Taulukko 9. Kliinisistä näytteistä eristettyjä hiivoja. (Larone, 1995; Silvennoinen-Kassinen, 1996; Hannula et al., 1997; Gilfillan et al., 1998.)

Hiivasuku	Hiivalaji	Teleomorfimuoto (suvullinen)
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i> * <i>C. famata</i> <i>C. dupliniensis</i> <i>C. guilliermondii</i> * <i>C. kefyr</i> * <i>C. krusei</i> * <i>C. lipolytica</i> * <i>C. lusitaniae</i> * <i>C. parapsilosis</i> * <i>C. robusta</i> * <i>C. rugosa</i> <i>C. tropicalis</i> * <i>C. zeylanoides</i> *	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. albidus</i> <i>C. neoformans</i> *	<i>Filobasidiella neoformans</i>
<i>Hansenula</i> spp.*		
<i>Malassezia</i>	<i>M. furfur</i> * <i>M. pachydermatis</i> *	
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. minuta</i> <i>R. mucilaginosa</i> * <i>R. rubra</i>	
<i>Torulopsis</i>	<i>T. glabrata</i> *(<i>Candida glabrata</i>)	

* osoitettu taudinaiheuttajaksi

3.2 Elintarvikkeita pilaavat hiivat

Elintarvikkeita pilaavat hiivat voivat aiheuttaa suuria taloudellisia tappioita, mutta vain muutamasta lajista on potentiaalista haittaa ihmisen terveydelle (taulukko 9 yllä). Elintarvikkeen hiivakontaminaation lähteenä voivat olla raaka-aineet, prosessilaitteet ja -vesi sekä elintarvikkeen säilytys- ja pakkausastiat. Elintarvikkeita pilaavat hiivat kilpailevat ravinteista nopeakasvuisempien bakteerien kanssa, ja bakteereille suotuisissa olosuhteissa mahdollinen hiivakontaminaatio voi peittyä bakteerikasvun alle. Elintarvikkeen fysikaaliset, kemialliset ja rakenteelliset ominaisuudet vaikuttavat niiden pilaantumismahdollisuuteen. Merkittävimmät hiivan kasvuun vaikuttavat tekijät elintarvikkeissa ovat veden aktiivisuus, ravinteet ja happamuus. Elintarvikkeista on eristetty ja identifioitu yli 70 eri hiivalajia (Déak, 1991).

Tavallisimpia hiivojen kontaminoimia elintarvikkeita ovat erilaiset juomat, mehut, hillot ja soseet, makeiset, säilykkeet, salaattit, meijerituotteet, erikoislihatuotteet, kastikkeet ja majoneesit. Seuraavassa on esitelty kukin tuoteryhmä kerrallaan. Tuoteryhmät ja niiden tavallisimmat pilaajahiivat on koottu taulukkoon 10. Hiivojen eri elintarvikkeille aiheuttamia virheitä on esitelty taulukossa 11 (Loureiro ja Querol, 1999).

Taulukko 10. Eri elintarvikkeiden yleisimmät pilaajahiivat (Déak, 1991; Fleet, 1992; Westall & Filtenborg, 1998a ja 1998b; Welthagen & Viljoen, 1999; Sancho et al., 2000).

Elintarvikeryhmä	Kontaminoivia hiivasukuja	Tuotteita tyypillisesti kontaminoivia hiivalajeja
Lihatuotteet		
Tuore liha	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> <i>Rhodotorula</i>	<i>C. zeylanoides</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. famata</i> , <i>Cr. laurentii</i> var. <i>laurentii</i> , <i>D. hansenii</i>
Prosessoidut lihavalmisteet - kestromakkarat - suolaliha, pekoni ym.	<i>Candida</i> <i>Debaryomyces</i> , <i>Rhodotorula</i>	<i>C. famata</i> (<i>D. hansenii</i> n anamorfi), <i>D. hansenii</i>
Veden eliöstö - kalat - simpukat, äyriäiset	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> <i>Rhodotorula</i> , <i>Trichosporon</i>	<i>C. lipolytica</i> (<i>Yarrowia lipolytica</i> n anamorfi) <i>R. rubra</i>
Meijerituotteet		
Jogurtit	<i>Candida</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Pichia</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>C. famata</i> <i>D. hansenii</i> <i>P. anomala</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i>
Juustot	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulaspora</i> <i>Zygosaccharomyces</i>	<i>C. famata</i> , <i>C. parapsilosis</i> <i>Cr. albidus</i> <i>D. hansenii</i> <i>K. marxianus</i> <i>P. membranaefaciens</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. norvegensis</i> , <i>P. anomala</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>Z. rouxii</i>
Muut maitotuotteet, mm: - voi - jäätelö - kerma - maito	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i>	
Hedelmät		
Tuoreet hedelmät	<i>Candida</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Kloeckera</i> <i>Pichia</i>	<i>C. krusei</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. guilliermondii</i> <i>H. uvarum</i> <i>K. apiculata</i> <i>P. kluyveri</i>
Prosessoidut hedelmät - säilykkeet - hedelmämehut - mehutiivisteet - kuivatut hedelmät	<i>Candida</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Pichia</i> <i>Kloeckera</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulaspora</i> <i>Zygosaccharomyces</i>	<i>C. krusei</i> , <i>C. sake</i> <i>H. valbyensis</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>

Taulukko 10. jatkuu

Vihannekset		
Tuoreet vihannekset	<i>Cryptococcus</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Sporobolomyces</i>	<i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. laurentii</i> , <i>Cr. macerans</i> <i>K. marxianus</i> <i>R. glutinis</i> <i>S. roseus</i>
Prosessoidut vihannekset - hapankaali - oliivit - pikkelsi - majoneesipohjaiset salaatit	<i>Candida</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>C. lambica</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. sake</i> , <i>C. zeylanoides</i> <i>P. membranaefaciens</i> <i>S. dairensis</i> , <i>S. exiguus</i>
Sokeriset elintarvikkeet		
- mehut - hillot - konvehdit - makeiset - hunaja, siirapit, uutteen - kuivatut hedelmät	<i>Debaryomyces</i> <i>Pichia</i> <i>Schizosaccharomyces</i> <i>Torulaspora</i> <i>Zygosaccharomyces</i>	<i>D. hansenii</i> <i>P. anomala</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>
Suolaiset elintarvikkeet		
- fermentoidut vihannekset - juustot - soijakastike - margariini - majoneesi - tomaattisose	<i>Candida</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Pichia</i> <i>Torulaspora</i> <i>Zygosaccharomyces</i>	<i>C. famata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lipolytica</i> <i>D. hansenii</i> <i>P. subpelliculosa</i> , <i>P. membranaefaciens</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>
Leipomotuotteet		
- leipä - taikina - pizza - leivonnaiset	<i>Endomycopsis</i> <i>Pichia</i> <i>Hyphopichia</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>E. burtonii</i> <i>P. anomala</i> var. <i>anomala</i> <i>S. cerevisiae</i>
Virvoitusjuomat		
	<i>Brettanomyces/Dekkera</i> <i>Candida</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Zygosaccharomyces</i>	<i>C. intermedia</i> <i>P. anomala</i> <i>Z. bailii</i>
Alkoholijuomat		
Olut	<i>Brettanomyces/Dekkera</i> <i>Candida</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>B. intermedius</i> <i>P. anomala</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. membranaefaciens</i> <i>S. cerevisiae</i> (villihiiivat)
Viini	<i>Brettanomyces/Dekkera</i> <i>Candida</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Kloeckera</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomycodes</i>	<i>B. intermedius</i> <i>K. apiculata</i> <i>P. anomala</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. ludvigii</i>

Taulukko 11. Hiivojen aiheuttamat pääasialliset pilaantumismuodot elintarvikkeissa (Loureiro ja Querol, 1999).

Tuote	Pintakasvu	Värvirheet	Kaasunmuodostus	Sameus	Sakkaumat, sedimentit	Kalvot, filmit	Virhemaut/happamuus	Rakennemuutokset
Tuoreet kasvikset	x	x					x	x
Suolatut kasvikset	x	x	x			x	x	x
Kasvisvalmisteet (ready-to-eat)	x		x				x	
Tuoreet hedelmät		x	x				x	x
Hedelmämehut			x	x	x	x	x	
Hedelmävalmisteet (ready-to-eat)	x		x				x	
Majoneesit, salaatin kastikkeet		x	x			x	x	x
Viini, olut			x	x	x	x	x	
Virvoitusjuomat			x	x	x		x	
Makeiset, hillot, hyytelöt	x	x	x	x		x	x	x
Siirappi, hunaja, hedelmätiivisteet			x	x		x	x	
Voi, kerma		x					x	
Juustot		x	x				x	
Jogurtit			x			x	x	
Viipaloitu leipä	x	x					x	
Taikina	x	x					x	
Makkarat, lihatuotteet	x	x	x				x	

3.2.1 Tuoreet ja prosessoidut hedelmät ja marjat

Tuoreiden hedelmien pinnalla elää paljon hiivoja, noin 10^3 – 10^5 solua/cm². Olosuhteet ovat hiivoille suotuisat, sillä hedelmän pinnan pH on alhainen ja mehu sokeripitoista. Lisäksi a_w on alhainen, jos hedelmän pinta on kuiva. Hedelmän pinnan rikkoutuessa voi hiivojen määrä kohota 10^6 – 10^8 soluun/cm² (Fleet, 1992).

Hedelmävalmisteita kontaminoivat hiivat ovat peräisin joko raaka-aineista tai prosessilaitteistosta (Déak, 1991). Hiivojen määrä hedelmämeuhujen raaka-aineina käytettävissä mehutiivisteissä voi vaihdella <1 – $2,9 \times 10^3$ pmy /g (Sancho *et al.*, 2000). Olosuhteet hedelmävalmisteissa suosivat hiivojen kasvua, koska useimmille bakteereille ympäristö on liian hapan ja a_w liian alhainen korkean sokeripitoisuuden (40–70 %) vuoksi. Kuumennuskäsittely inaktivoi yleensä hiivojen vegetatiivisolut tehokkaasti, mutta ei välttämättä niiden kotoititöitä. Lisäksi valmisteiden korkea sokeripitoisuus voi lisätä hiivojen lämmönkestävyyttä. Hedelmämeuhujen sokeripitoisuus on noin 10 %, rypälemehujen ≤ 25 %, ja hedelmämehtiivisteiden ≤ 67 % (Steels *et al.*, 1999). Tuotteen a_w :n ollessa alle 0,85 on pilaajalajina yleensä *Z. rouxii*.

Säilöntäaineiden käyttö kaventaa entisestään pilaajahiivojen kirjoa. Valtalajeina esiintyvät yleensä *Z. bailii*, *Z. rouxii* ja *C. krusei*. Jotkut pilaajahiivat, kuten *C. krusei* ja *S. cerevisiae*, sietävät hyvin etanolia ja voivat siten muodostua käyneissä tuotteissa valtalajeiksi. Jäähdytetyissä mehuissa, joissa on muodostunut etanolia, viihtyvät parhaiten *Candida*- ja *Kloeckera*-suvun kannat. Pilaajahiivat eivät kasva jäädetyissä hedelmä-mehutiivisteissä, mutta lämpötilan noustessa $\geq 5^{\circ}\text{C}$ voivat osmotolerantit hiivat lisääntyä tuotteessa (Fleet, 1992).

Runsas hiivakasvu voi aiheuttaa sakanmuodostusta sekä maku- ja hajuvirheitä. *S. cerevisiae*n etikkahapon tuotto lisääntyy matalassa lämpötilassa ja korkeassa sokeripitoisuudessa, joten etenkin hedelmämehuissa tämän tyyppinen pilaantuminen on yleistä. Hiivakäymisen tuotteena syntyvä CO_2 -kaasu voi aiheuttaa pakkausten pullistumista ja jopa räjähtämistä.

3.2.2 Tuoreet ja prosessoidut vihannekset

Hiivoja esiintyy tuoreitten vihannesten pinnalla, mutta yleensä vähemmän kuin hedelmissä. Bakteerit ja homeet ovat tavallisimpia tuoreitten vihannesten pilaajia, mutta tuoreita, pilkottuja vihanneksia säilytettäessä saattaa hiivojen määrä nousta 10^8 g^{-1} (Fleet, 1992). Hiivojen on havaittu pilaavan säilytyksen aikana mm. kaaleja, porkkanoita, sipuleita sekä herneitä.

Fermentoitujen vihannestuotteiden pilaajahiivat kestävät heikkojen orgaanisten happojen antimikrobisia vaikutuksia ja tuottavat usein pektinolyttisiä entsyymejä kasvisoluseinän hajottamiseksi. Tavallisimmat pilaajahiivat näissä tuotteissa kuuluvat *Candida*-, *Debaryomyces*-, *Pichia*-, *Rhodotorula*- ja *Saccharomyces*-sukuihin (Fleet, 1992). Tomaattisoseen ym. sen kaltaisten tuotteiden tyypillisiä pilaajia ovat *Z. bailii*, *P. membranifaciens* ja *C. krusei*, jotka kestävät korkean sokeri- ja suolapitoisuuden lisäksi myös korkeaa etikkahappopitoisuutta (Fleet, 1992).

3.2.3 Meijerituotteet

Hiivoja on raakamaidossa ja pastöroidussa maidossa yleensä vain alle 10^3 solua/ml. Hiivat kasvavat heikosti kylmässä säilytetyssä maidossa, jolloin pilaajana on useammin hiivaa nopeammin kasvava psykrofiili bakteeri. Sen sijaan joidenkin erikoistuotteiden, kuten makeutettujen maitotiivisteiden sekä probioottisia bakteereja sisältävien maitotuotteiden, on havaittu olevan herkempiä hiivakontaminaatiolle (Fleet, 1992).

Jogurtit ovat hyvin herkkiä hiivojen aiheuttamalle pilaantumiselle, sillä pilaajahiivat voivat kasvaa alhaisessa lämpötilassa säilytyksen aikana ja käyttää hiilenlähteenään mm. maitohappoa, laktoosia, sakkaroosia sekä tuottaa proteolyttisiä ja lipolyttisiä entsyymejä jogurtin proteiinien ja rasvojen pilkkomiseen. Jogurteissa on yleensä kyse pastöroinnin jälkeisistä kontaminaatioista. Hedelmäjogurteissa kontaminaatiolähteinä ovat usein hillot tai muut hedelmätuotteet. Jogurteihin lisättävistä hedelmätuotteista eristettyjä yleisiä lajeja ovat *S. cerevisiae*, *D. hansenii*, *Pichia anomala* ja *T. delbrueckii* (Scholte 1996). Hiivojen kontaminaatioreittejä jogurtinvalmistuksessa on jäljitetty myös pesuihin ja desinfektioihin, hedelmä- tai meijeriraaka-aineiden pastörointiin, kypsytys-, jäähdytys- ja varastointitankkeihin, pumppuihin, venttiileihin, lämmönvaihtimiin ja täyttö- tai pakkausvaiheeseen (Scholte, 1996). Pilaantuminen ilmenee pakkauksen pullistumisena, tuotteen rakenteen muuttumisena sekä haju- ja makuhaittoina.

Monissa juustoissa käytetään hiivoja hyväksi prosessoinnin eri vaiheissa. Juuston ominaisuudet, kuten happamuus, alhainen kosteus ja korkea suolapitoisuus, suosivat myös pilaajahiivojen kasvua, jolloin juuston rakenne, maku ja haju saattavat muuttua ja myyntipakkaus pullistua (Fleet, 1992; Westall & Filtenborg, 1998a ja b). Kontaminaation lähteinä voivat olla raaka-aineet ja tuotteen valmistus- ja pakkaustilat sekä laitteet. Goudan valmistuksessa yleisimpiä kontaminaatiolähteitä olivat laitteisto ja suolaliuos, mutta myös ilmasta, lattioilta ja seiniltä eristettiin kontaminoivia hiivalajeja. Eniten Goudassa oli *D. hansenii* -hiivaa, mutta myös *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *T. delbrueckii*, *R. glutinis*, *Cr. albidus* ja *C. catenulata* -hiivoja esiintyi. Nämä lajit ovat enimmäkseen samoja kuin raaka-maidossa, vaikka kypsytyksen aikana esiintyvät hiivat ovat pastöroinnin jälkeisiä kontaminantteja (Welthagen & Viljoen, 1998).

3.2.4 Lihatuotteet

Tuoreissa lihaleikkeissä voi olla hiivoja 10^1 – 10^3 solua/g tai cm^2 . Hiivojen osuus tuorelihatuotteiden kokonaismikrobimäärästä on kuitenkin vain 5–10 %. Meren eliöistä pilaajahiivojen on raportoitu kontaminoineen lähinnä kaloja ja ostereita (Fleet, 1992). Kylmäsäilytys sekä vakuumiin ja CO_2 -ilmakehään pakkaaminen hidastavat hiivojen kasvua näissä tuotteissa.

Prosessoiduissa lihatuotteissa, kuten kestromakkaroissa, olosuhteet voivat olla epäsuotuisat bakteereille, jolloin etenkin ksero- ja happotolerantit hiivakannat pääsevät kasvaan. Pilaajahiivat voivat lisääntyä kylmäsäilytyksestä tai vakuumpakkauksesta huolimatta. CO_2 - tai N_2 -ilmakehään pakkaamisen on todettu estävän hiivojen kasvua (Fleet, 1992). Pilaajahiivat voivat aiheuttaa tuotteisiin värinmuutoksia, limaisuutta, makuvirheitä sekä kaasun muodostuksesta johtuvaa pakkauksen pullistumista.

3.2.5 Kastikkeet ja majoneesit

Majoneesit ja kastikkeet ovat usein hyvin suolaisia (5–20 %) ja siksi niitä pilaavat lähinnä osmotolerantit hiivalajit. Yleisimmät lajit ovat samoja kuin muissa alhaisen a_w :n tuotteissa. Lipolyttiset, korkeaa suolapitoisuutta sietävät hiivat, kuten *C. lipolytica*, voivat aiheuttaa majoneesin ja margariinin pilaantumista. Salaattikastikkeiden ja majoneesien pH on usein hyvin alhainen (pH 3-4). *Z. bailii* on tyypillinen pilaajahiiva näissä tuotteissa, koska se kestää korkean sokeri- ja suolapitoisuuden lisäksi myös etikkahappoa (Wind & Restaino, 1995).

3.2.6 Makeiset

Makeisista suklaan ja toffeen veden aktiivisuus (a_w) on noin 0,6, joka yleensä estää mikrobikasvun. Tavallisimpia hiivoilla kontaminoituneita makeisia ovat marsipaanit ja suklaakonvehdit, joissa hiivat kasvavat lähinnä täytteessä. Marsipaanin, marmeladin, hunajan ja erilaisten makeisissa käytettyjen hillojen ja täytteiden a_w on 0,6–0,8, mikä mahdollistaa kestävimpien pilaajalajien kasvun. Makeisia pilaavat hiivat sietävät korkeaa sokeripitoisuutta ja kuumennusta ja ovat siten samantyyppisiä kuin hedelmä- ja marjavalmisteen pilaajat. Yleisin makeisten kontaminantti on *Z. rouxii*, joka voi kasvaa alle 0,85 veden aktiivisuudessa.

3.2.7 Virvoitusjuomat

Virvoitusjuomia kontaminoivat hiivat sietävät CO_2 :a, painetta, säilöntäaineita, lämpökäsittelyä, korkeaa sokeripitoisuutta ja alhaista pH:ta. Jotkut fermentatiiviset hiivat, etenkin *Brettanomyces/Dekkera*-lajit, sietävät korkeita CO_2 -pitoisuuksia (0,5 MPa liuennta CO_2 :a) ja ovat yleisimpiä virvoitusjuomien pilaajia (Déak, 1991). Hiivakontaminaatio on tavallisesti peräisin prosessilinjalta, jossa kontaminaatiolähteinä ovat pumpput, tankit ja pullojen pesulaitteet. Pilaajahiivat voivat muodostaa sakkaa ja aiheuttaa makuvirheitä. Käymisessä muodostunut kaasu voi aiheuttaa pullon räjähtämisen.

3.2.8 Alkoholipitoiset juomat

Hiivat eivät ole merkittävä ongelma pulloitetuissa oluissa oluen pastöroinnin ja aseptisen pakkaamisen vuoksi. Prosessin kontaminoituessa pilaajahiivana on yleensä "villi" *S. cerevisiae* -kanta tai muu *Saccharomyces*-suvun laji, kuten *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. Oluen kypsyydessä tankeissa alhaisessa lämpötilassa pilaajahiivojen (esim. *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida* spp.) kasvu voi kuitenkin aiheuttaa

tuotteeseen haju- ja makuvirheitä. Tynnyriolut pilaantuu herkemmin kuin pulloitettu olut, etenkin jos astiaan pääsee happea, jolloin *Pichia*- ja *Candida*-sukujen hiivat voivat kasvaa aerobisesti oluen pinnalla.

Kuten oluen, myös viinin valmistuksessa hiivan kontrolloimaton kasvu voi johtaa tuotteen pilaantumiseen. Kontaminantti voi olla lähtöisin rypäleen pinnalta tai maasta tai tuotteen valmistuksessa käytetyistä astioista tai laitteista. *Z. bailii* on todettu useimmiten olevan peräisin viinin valmistuksessa käytetystä mehutiivisteestä ja se on tavallisin viinin pilaajahiiva (Déak, 1991). Tuotteen steriilisuodatus pullotusvaiheessa tai kuumennuskäsittely vähentää kontaminaatoriskiä pulloissa. Kuitenkin jo 5–100 etanolia ja rikkidioksidia sietävää *Z. bailii* tai *S. cerevisiae* -solua pullossa voi aiheuttaa viinin pilaantumisen (Fleet, 1992).

4. Pilaajahiivojen kasvun hallintaan vaikuttavat tekijät

4.1 Tuotantohygienia

Tuotantohygienialla tarkoitetaan kaikkia niitä toimenpiteitä, joilla pyritään estämään tuotteen kontaminoituminen valmistuksen aikana. Kontaminaation lähteitä voivat olla raaka-aineet, laitteet ja astiat, ilma sekä työntekijät. Hyvän tuotantohygienian lähtökohdiana on, että tilojen ja laitteistojen puhdistettavuus on huomioitu jo suunnitteluvaiheessa (Mattila-Sandholm & Wirtanen 1992; EHEDG, 1993a, b, c; EHEDG, 1994). Pesuissa oikeat olosuhteet (lämpötila, aika ja virtausnopeus) sekä oikein valittu pesuaine ja väkevyyks ovat olennaisia tuloksen kannalta. Laitteistojen ja tilojen puhdistumiseen vaikuttavat lisäksi liian laatu (rasva, proteiini, sokeri), ikä, kiinnittymisaste ja pesutiheys.

Elintarvikkeiden hiivakontaminaatiot voivat olla peräisin prosessilaitteistosta, raaka-aineista, pakkausmateriaaleista tai ilmasta. Siirtolaitteistot, täyttökoneet, epähygieeniset venttiilit, pumput ja putkiyhteet ovat usein esiintyviä kontaminaatiolähteitä (Mattila-Sandholm & Wirtanen, 1992; Scholte, 1996). Prosessin sisältäessä kuumennusvaiheen, kuten meijerituotteiden pastöroinnin tai leipomotuotteiden paiston, kyseessä on useimmiten jälkikontaminaatio.

Ilmassa hiivat kestävät gram-negatiivisia bakteereita paremmin säteilyä ja kosteuden muutoksia. Ilmassa esiintyvien hiivahiukkasten läpimitan oletetaan olevan noin 2–20 µm. Tällaisten hiukkasten laskeutuminen (gravitaatio) on riippuvainen Stokesin laista, jolloin 2 µm:n hiukkanen laskeutuu metrin matkan 130 minuutissa ja 16 µm hiukkanen 2 minuutissa. Tämän seurauksena hiivojen määrä pintojen lähellä on yleensä suurempi kuin kauempana pinnoista. Ihmisen toiminta ja ilmavirtaukset vaikuttavat kuitenkin voimakkaasti hiivojen jakautumiseen ilmassa (Scholte, 1996). Lisäksi ilman mikrobipitoisuudet riippuvat ilman kosteudesta ja lämpötilasta. Korkea kosteuspitoisuus ja lämpötila ovat edullisia mikrobien selviytymiselle hengissä ilmassa (Henriksson & Haikara, 1991; Oriet & Pfenniger, 1998).

Ilman mikrobiologinen laatu on erityisen tärkeä pakkaus- ja täyttöosastoilla. Hiivojen on todettu olevan yleisempiä ilmassa virvoitusjuomien pullotusratojen luona kuin oluen tai kivennäisvesien pullotuslinjojen luona. Sen sijaan vuodenajalla ei ollut vaikutusta hiivojen määrään ilmassa toisin kuin homeiden määrään (Henriksson & Haikara, 1991). Puhtaan pakkauksen kontaminoituminen riippuu pakkauksen aukon koosta, ilman mikrobimäärästä ja ajasta, jonka pakkaus on alttiina ilmalle. Ilmasta määritetyt hiiva- ja homepitoisuudet ovat voimakkaasti riippuvaisia määrittämenetelmästä ja siksi myös raja-arvoja on vaikea asettaa.

Pakkausten hiiva- ja homepitoisuudet riippuvat käytetystä materiaalista ja staattisesta sähköisyydestä. Pakkausmateriaaleissa (paperi, PVC jne.) hiiva- ja homepitoisuudet ovat tyypillisesti 10 pmy / 100 cm² (Jesenka, 1993), kun taas kierrätyskuidusta valmistetuissa pakkauksissa määrät voivat nousta yli 100 pmy / 100 cm² (Scholte, 1996). Alhainen ilmankosteus lisää staattisen sähkön määrää ja pölyhiukkasten kerääntymistä pinnoille.

4.1.1 Biofilmit elintarviketeollisuudessa

Mikrobien kiinnittyminen pinnoille on yleinen ilmiö luonnossa. Kiinnittyminen kiinteälle pinnalle on mikrobien enemmistölle normaalin elämän ja lisääntymisen edellytys. Kiinnittymistä edistää orgaanisen aineksen kasautuminen pinnalle. Kiinnittyneet mikrobisolot kasvavat ja lisääntyvät muodostaen mikropesäkkeitä. Ne erittävät myös ympärilleen polymeereja, jotka stabiloivat kasvustoa. Biofilmi koostuu kiinnittyneistä mikrobisoluista ja niiden solun ulkopuolelle erittämistä tuotteista. Koostumus elää jatkuvasti vanhan biofilmin irrotessa ja uuden muodostuessa. Biofilmin sisälle muodostuvat paksuuden kasvaessa mikroaerofiiliset tai anaerobiset olosuhteet. Soluilla on eri puolilla biofilmiä erilaiset olosuhteet ravinteiden ja fysikaalis-kemiallisten tekijöiden suhteen. Mikrobisolot kiinnittyvät pinnoille muutamassa minuutissa, mutta aidon biofilmin muodostumisen on arvioitu vievän tunteja tai päiviä (Costerton *et al.*, 1987; Noterman *et al.*, 1991; Carpentier & Cerf, 1993; Hood & Zottola, 1995).

Useimmat luonnon tai teollisen ympäristön biofilmit muodostavat monimutkaisen yhteisön, joka koostuu monesta eri lajista. Tällaisen mikrobiyhteisön toiminta on huomattavasti tehokkaampaa kuin sen yksittäisten jäsenten (James *et al.*, 1995).

Biofilmin polymeerikerrostuma on keskeinen mikrobien henkiinjäämiselle ja lisääntymiselle, koska se toimii ravinnepyydyksenä ja suojaa mikrobisoluja antimikrobisten aineiden vaikutuksilta. Pääasiassa polysakkarideista ja glykoproteiineista koostuvan suojakerroksen ansiosta antimikrobiset aineet, kuten pesu- ja desinfektioaineet, eivät pääse tunkeutumaan mikrobisoluihin (Mattila-Sandholm & Wirtanen, 1992). Lisäksi antimikrobisten aineiden reaktiot polymeerikerrostuman kanssa vähentävät niiden tehoa. Ravinteiden rajallinen saatavuus ja biofilmin heterogeenisuus lisäävät lepotilassa olevien solujen määrää biofilmissä. Tämä vähentää edelleen antimikrobisten aineiden tehoa, joiden vaikutus kohdistuu yleensä aktiivisesti kasvaviin soluihin (Brown & Gilbert, 1993). Biofilmissä mikrobisolot ovat suojassa myös muilta ympäristön rasituksilta kuten säteilyltä, lämmöltä ja bakteriofaageilta (Carpentier & Cerf, 1993).

Elintarviketeollisuudessa biofilmiksi voidaan kutsua mikrobien yhteisöä, joka kehittyy määrättyssä ajassa pesu- ja desinfektio-ohjelmista riippuen, tai sitä mikrobien pientä

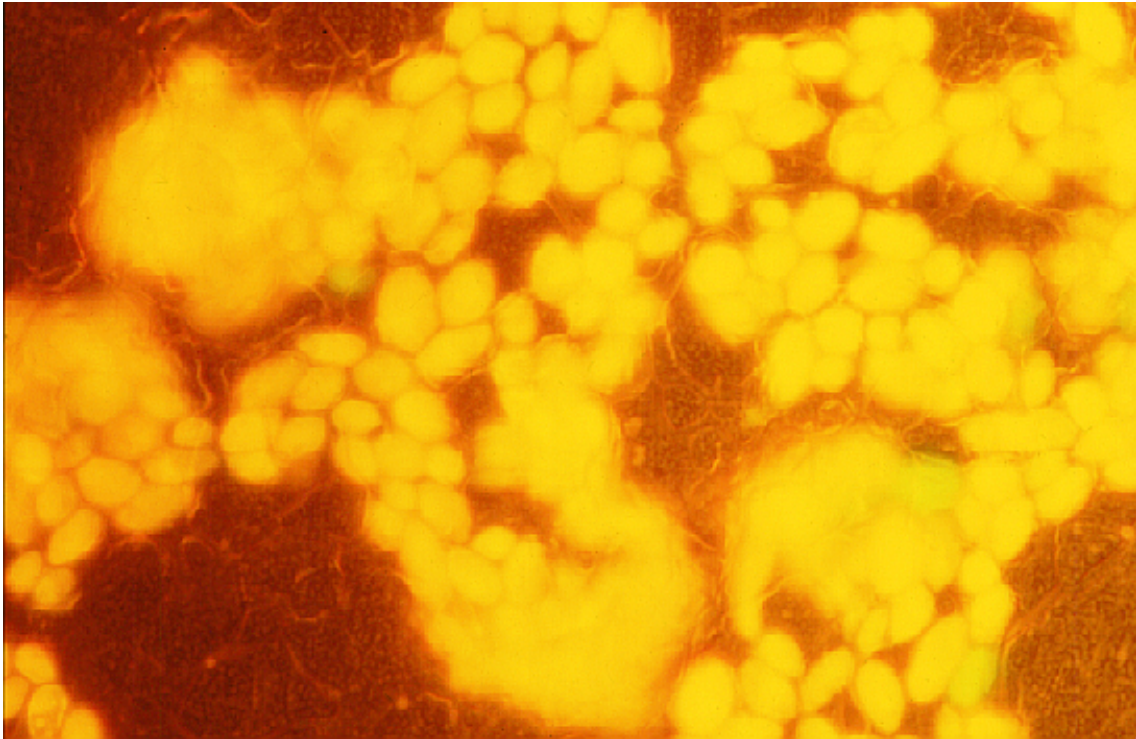
joukkoa, joka säilyy hengissä pesuohjelmista riippumatta (Holah & Gibson, 1999). Biofilmiä on todettu esiintyvän meijereissä, myllyissä ja mallastamoissa, panimoissa, siipikarjateurastamoissa, sokeriteollisuudessa ja vihannessäilyketehtaissa (Holah *et al.* 1989; Mafu *et al.* 1990; Czechowski & Banner, 1992; Mattila-Sandholm & Wirtanen, 1992; Carpentier & Cerf, 1993). Biofilmiä muodostuu paikkoihin, joissa tehokkaat puhdistustoimet ovat hankalia. Biofilmiä on havaittu putkistojen mutkissa ja kuolleissa kulumissa, tiivisteissä, kuljetusradoilla, ruostumattomilla teräspinoilla, lattioilla ja viemäreissä. Biofilmit voivat elintarviketeollisuudessa aiheuttaa ongelmia, koska ne voivat toimia kontaminaatiolähteenä. Lisäksi ne korrodoivat tai hajottavat materiaaleja kuten ruostumatonta terästä tai tiivistekumeja. Biofilmikerrostumat heikentävät myös prosessien suorituskykyä esimerkiksi suodatuslaitteistoissa tai lämmönvaihtimissa.

4.1.2 Hiivojen muodostamat biofilmit

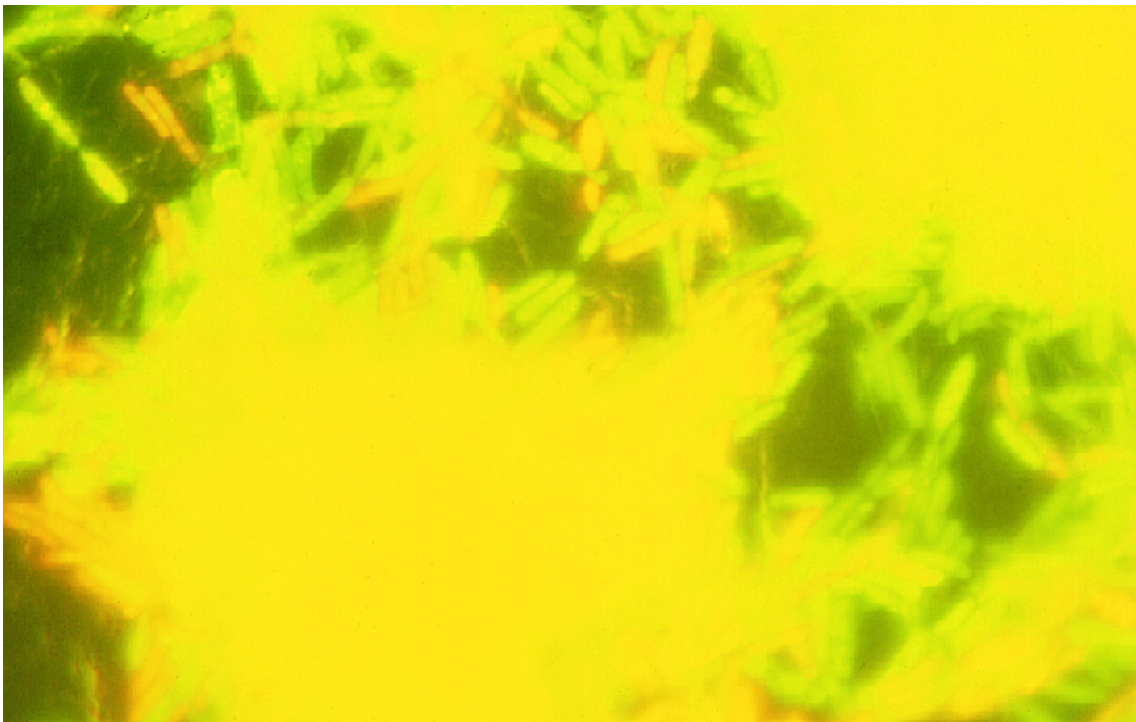
Hiivojen muodostamista biofilmeistä (kuva 10 ja 11) elintarviketeollisuudessa on hyvin niukasti julkaistua tietoa. Lähes kaikki elintarviketuotannon biofilmeistä julkaistu kirjallisuus käsittelee bakteeribiofilmejä (Mattila-Sandholm & Wirtanen, 1992; Carpentier & Cerf, 1993; Zottola & Sasahara, 1994; Kumar & Anand, 1998; Holah & Gibson, 1999).

Saccharomyces-, *Candida*- ja *Rhodotorula*-sukuihin kuuluvia hiivoja on eristetty biofilmeistä juomateollisuuden pakkausosastojen liukuhihnoilta ja pullolämmittimistä (Banner, 1994). Hiivojen on myös havaittu muodostavan biofilmiä oluen annostelulaitteistoissa (Harper, 1981; Casson, 1985; Thomas & Whitham, 1997). Edellä mainituissa esimerkeissä hiivat muodostivat seosbiofilmejä bakteerien kanssa (Harper, 1981; Casson, 1985; Thomas & Whitham, 1997) tai sekä bakteereiden että homeiden kanssa (Banner, 1994).

Oluesta tai panimonäytteistä eristettyjen hiivojen *D. anomala*, *Issatchenkia orientalis* (anam. *C. krusei* var. *krusei*), *Pichia anomala*, *P. membranaefaciens*, *R. mucilaginosa* ja *S. cerevisiae* taipumusta muodostaa biofilmiä ruostumattomalle teräkselle on tutkittu (Storgårds *et al.*, 1997). Kaikki tutkitut hiivakannat kiinnittyivät teräkseen muodostaen biofilmiä semistaattisissa olosuhteissa. Biofilmin määrä oli riippuvainen hiivakannasta, inkubointiajasta ja kasvatusalustasta. Vähiten biofilmiä muodostavat kannat peittivät tutkitusta pinta-alasta 2–4 % 10 päivässä, kun taas voimakkaasti biofilmiä muodostavat kannat peittivät 100 % tutkitusta pinta-alasta jo 2 päivässä. Saman hiivalajin eri kannat poikkesivat merkittävästi toisistaan biofilmin muodostajina. Kasvatusalustan sisältämät sokerit lisäsivät biofilmin muodostumista. Myöhemmin maitohappobakteerien, enterobakteerien ja hiivan (*Lactobacillus lindneri*, *Enterobacter* sp. ja *D. anomala*) seosbiofilmejä on käytetty puhdistuvuustutkimuksissa (Yli-Juuti, 1999; Storgårds *et al.*, 1999c).

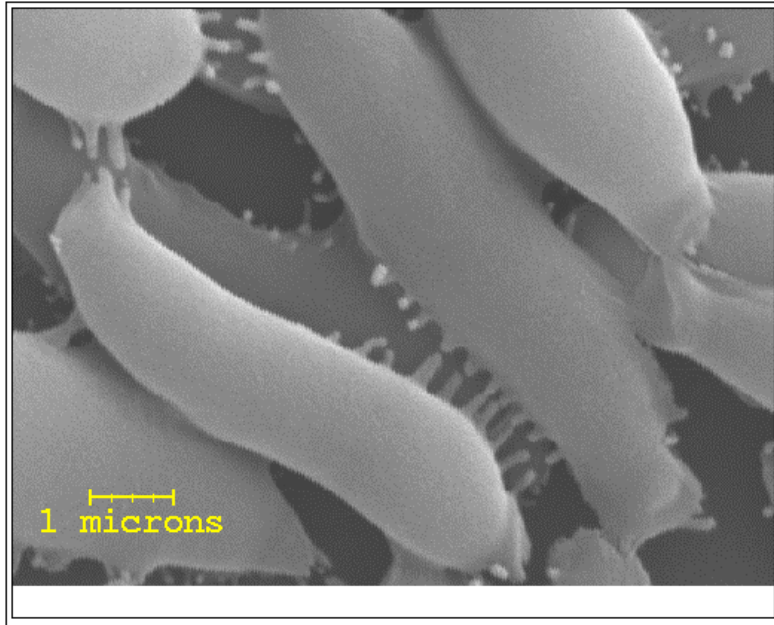


a) *Saccharomyces cerevisiae* VTT C-68059.



b) *Dekkera anomala* (anam. *Brettanomyces anomalus*) VTT C-91183.

Kuvat 10a ja b. Epifluoresenssimikroskooppikuvia hiivojen muodostamasta biofilmistä ruostumattomalla teräksellä. Suurennos 1000x.



Kuva 11. Elektronimikroskooppikuva hiivojen muodostamasta biofilmistä muovipinnalla. Kuvassa näkyvät selvästi fimbriot, jolla solut tarttuvat pintaan ja toisiinsa.

4.1.3 Hiivojen kiinnittymiseen vaikuttavat tekijät

Kliinisessä mikrobiologiassa hiivojen kiinnittymistä pintoihin ja biofilmin muodostamistaipumusta on tutkittu jonkin verran. Tällöin mielenkiinnon kohteena ovat olleet lähinnä *Candida*-suvun hiivat, erityisesti *C. albicans*. Sokereiden on havaittu olevan tärkeitä *Candida*-hiivojen kiinnittymisessä muovipintoihin (El-Azizi & Khardori, 1999). Toiset sokerit edistävät hiivojen kiinnittymistä pintoihin, koska ne ovat oleellisia komponentteja solunulkoisissa polymeereissa, jotka helpottavat hiivasolun kiinnittymistä. Galaktoosilla kasvaneiden *C. albicans*-solujen on todettu kiinnittyvän akryyliin ja polystyreeniin helpoimmin. Seuraavaksi helpoimmin kiinnittyivät sakkaroosilla kasvaneet solut ja näiden jälkeen glukoosilla kasvaneet solut. Samaan järjestykseen asettui myös solunulkoisten polymeerien tuotto (galaktoosi → sakkaroosi → glukoosi). Galaktoosilla kasvaneiden solujen suurempi kiinnittymistaipumus voi olla seurausta voimakkaammasta solunulkoisten polymeerien tuotosta, voimistuneesta sferoplastien muodostumisesta tai solun hydrofobisuuden kasvusta (El-Azizi & Khardori, 1999).

C. albicans-hiivan kiinnittymisen akryylipintaan on todettu riippuvan myös sokeripitoisuudesta, jossa hiivaa oli esikasvatettu. Kiinnittyminen oli voimakkainta, kun solut oli kasvatettu 50 mM glukoosia sisältävällä alustalla. Sitä suuremmat sokeripitoisuudet inhiboivat hiivan kiinnittymistä (El-Azizi & Khardori, 1999).

Divalentit kationit kuten Ca^{2+} ja Mg^{2+} edistävät *Candida*-hiivojen kiinnittymistä muovipintoihin. Kaikissa elävissä soluissa on negatiivinen pintavaraus, joka estää sen kiinnittymisen negatiivisesti varautuneisiin pintoihin. Divalentit kationit vähentävät elektrostaattista potentiaalia solun ja pinnan välillä ja siten edesauttavat kiinnittymistä. Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -kationien läsnäolo lisäsi *C. albicans* -hiivan kiinnittymistä akryylipintaan ja polystyreenin (El-Azizi & Khardori, 1999). Monovalentit kationit vähensivät kiinnittymistä akryylipintaan ja Fe^{3+} kiinnittymistä polystyreeniin.

Hiivojen kiinnittymiseen vaikuttaa myös pH, mutta sen vaikutusta on tutkittu lähinnä soluviljelmissä. pH:n alentaminen on yleensä lisännyt hiivasolujen kiinnittymistä eläviin soluihin (El-Azizi & Khardori, 1999).

Hiivojen kiinnittymiseen vaikuttaa myös lämpötila. *C. albicans* -hiivan kiinnittyminen polystyreeniin oli voimakkainta 40 °C:ssa ja selvästi voimakkampaa 35 °C:ssa kuin 25 °C:ssa tai 30 °C:ssa (El-Azizi & Khardori 1999). Oluen annostelujärjestelmien letkuissa panimohiivan kiinnittyminen oli voimakkaampaa 35 °C:ssa kuin 25, 13 tai 5 °C:ssa (Thomas & Whitham, 1997).

Hiivasolujen kiinnittymistäipumus vaihtelee eri hiivalajeilla ja jopa saman lajin sisällä (Branchini *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 1995; El-Azizi & Khardori, 1999). *C. albicans*in on yleisesti todettu kiinnittyvän voimakkaammin kuin muiden *Candida*-lajien. Toisaalta *C. krusei*in on todettu kiinnittyvän voimakkaammin muoviin kuin *C. albicans*in (El-Azizi & Khardori, 1999).

Kasvatusolosuhteet vaikuttavat hiivasolujen kiinnittymiseen. Staattisessa viljelmässä kasvatettu *C. albicans* kiinnittyi akryylipintaan voimakkaammin kuin ravistelussa kasvatetut solut (El-Azizi & Khardori, 1999). Myös kasvatusalusta vaikutti kiinnittymiseen (El-Azizi & Khardori, 1999). Natriumhypokloriitin on todettu inhiboivan *C. albicans* ja muiden *Candida*-hiivojen kiinnittymistä polystyreeniin, mutta lisäävän koaggregaatiota streptokokkien kanssa (Webb *et al.*, 1995).

Solujen morfologia ja kasvuvaihe ovat oleellisia tutkittaessa hiivojen kiinnittymistä pinnoille. Stationaarivaiheen solut kiinnittyvät voimakkaammin kuin eksponentiaalisen kasvuvaiheen solut. Limanmuodostumisen on todettu indikoivan hiivojen taipumusta kiinnittyä pinnoille (Branchini *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 1995; Sen *et al.*, 1997). Lisäksi myseelinmuodostuksella on vaikutusta kiinnittymistäipumukseen (Webb *et al.*, 1995; Sen *et al.*, 1997; El-Azizi & Khardori, 1999).

Hiivojen on todettu kiinnittyvän yhdessä bakteereiden kanssa. Kliinisten hiivojen on todettu koagregoituvan *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Porphyromonas gingivalis* -bakteereiden kanssa. Vähäisen ravinnon on havaittu lisää-

vän koagregoitumista streptokokkien kanssa jopa kymmenkertaisesti (El-Azizi & Khardori, 1999).

4.2 Elintarviketuotannossa käytetyt desinfiointiaineet

4.2.1 Yleistä desinfiointiaineista

Desinfiointiaineiden tarkoituksena on tuhota mikrobeja käyttökohteessa. Niillä ei ole välttämättä itiöitä tuhoavaa vaikutusta. Desinfiointiaineina käytetään yleisesti klooriyhdisteitä, alkoholeja, hapettavia yhdisteitä, jodofooreja, fenoleja tai halogenoituja fenoleja sekä kationisia tensidejä (taulukko 12; Wirtanen, 1995; Skogman, 1997). Desinfiointiaineen valintaan vaikuttaa moni tekijä. Desinfiointiaineen tulisi sopia yhteen itse prosessin ja siinä käytettyjen pintamateriaalien kanssa. Se ei saisi aiheuttaa käyttökohteiden korroosiota eikä tuottaa käyttäjille ylimääräisiä riskejä kuten ihon ja limakalvojen ärsytystä. Lisäksi valintaan vaikuttavat desinfiointiaineen omat ominaisuudet kuten mikrobisidinen teho, pinta-aktiivisuus, vesiliukoisuus, käyttöturvallisuus, herkkyys orgaaniselle lialle, tehon kesto, huuhtoutuvuus ja helppokäyttöisyys (Mattila-Sandholm & Wirtanen, 1992; Ojajarvi, 1996).

4.2.1.1 Alkoholipohjaiset desinfiointiaineet

Alkoholeilla on monia hyviä puolia kemiallisena desinfiointiaineena. Ne ovat halpoja, värittömiä, helppokäyttöisiä, myrkyttömiä, helposti haihtuvia ja hajoavia eivätkä ärsytä ihoa (Flemming, 1991; Troller, 1993). Alkoholit tehoavat vegetatiivisiin bakteerisoluihin, mutta eivät itiöihin. Niiden vaikutus on enemmänkin mikrobien kasvua estävä kuin tuhoava (Morton, 1957). Alkoholipohjaisten desinfiointiaineiden ominaisuudet perustuvat niiden kykyyn denaturoida proteiineja. Proteiinit, kuten entsyymit, ovat välttämättömiä solun kasvulle ja lisääntymiselle. Itiöitä muodostavat bakteerit voivat itiöidä desinfiointin jälkeenkin, koska alkoholi ei denaturoi itiönmuodostuksessa tarvittavia entsyymejä (Larson & Morton, 1991).

Etanolia käytetään pääasiallisesti lääketieteessä ihon ja välineiden desinfiointiin. Metanolin mikrobisidinen teho on heikoin eikä sen katsota kuuluvan desinfiointiaineisiin (Larson ja Morton, 1991). Desinfiointiaineina käytetyistä alkoholeista propanolilla on korkein molekyylipaino ja se on voimakkain desinfiointiaine. Etanolia toksisempaa isopropanolia käytetään useammin kuin propanolia, koska se ei ärsytä ihoa. Teollisissa desinfiointiaineissa alkoholeja käytetään useimmiten laimennettuina tai seoksina muiden yhdisteiden esim. aldehydien kanssa, jolloin ne ovat tehokkaimpia (Morton, 1957).

Taulukko 12. Elintarviketeollisuudessa käytettyjen desinfiointiaineiden ominaisuudet (Wirtanen, 1995).

Desinfiointiaine	Käytön hyödyt ja haitat
Alkoholit	hyödyt: myrkytön, helppokäyttöinen, väritön, tehokas vegetatiivisoluja vastaan, vaaraton iholle, hajoaa helposti, useimmat vesiliukoisia, haihtuvia haitat: mikrobistaattisia, suhteellisen tehon itiöitä vastaan
Vetyperoksidi	hyödyt: hajoaa vedeksi ja hapeksi, suhteellisen myrkytön, helppo käyttää <i>in situ</i> ; heikentää biofilmiä, avustaa biofilmin rrottamisessa haitat: tarvitaan korkeat konsentraatiot (> 3 %), resistentti, syövyttävä
Peretikkahappo	hyödyt: erittäin tehokas pienissä konsentraatioissa, laaja käyttöalue, tappaa itiöitä, hajoaa etikkahapoksi ja vedeksi, myrkytön, tunkeutuu biofilmeihin haitat: syövyttävä, epästabiili
Kloori	hyödyt: toimii laajalla käyttöalueella, aktiivinen alhaisissa pitoisuuksissa, tuhoaa biofilmimatriisia, edesauttaa lian irtoamista haitat: myrkyllisiä sivutuotteita, resistenssin kehittyminen, jäämät, syövyttävä, reagoi solunulkoisten polymeerien kanssa, huono tunkeutuvuus biofilmeihin
Hypokloriitti	hyödyt: halpa, tehokas, helppo käyttää, irrottaa biofilmimatriisia, toimii laajalla käyttöalueella haitat: epästabiili, myrkyllinen, hapettava, syövyttävä, nopea jälkikasvu, ei kykyä kontrolloida alkukiinnittymisiä, tuotteen väri voi muuttua
Kloramiini	hyödyt: tunkeutuu hyvin biofilmeihin, reagoi mikrobien kanssa haitat: tehokkuus nesteessä olevia bakteereja kohtaan heikompi kuin kloorilla, havaittu resistenssin kehittymistä, jälkivaikutuksia
Klooridioksidi	hyödyt: tehokas alhaisissa pitoisuuksissa, voidaan valmistaa paikan päällä, vähemmän pH-riippuvainen kuin muut klooriyhdisteet haitat: myrkyllisiä sivutuotteita, räjähtävä kaasu
Kvatit	hyödyt: tehokkaita, myrkyttömiä, edesauttavat biofilmin irrotusta ja estävät sen kasvua, ei-syövyttäviä, ei-ärsyttäviä, ei pahoja hajuja eikä makuja haitat: inaktivoituvat alhaisessa pH:ssa, Ca- ja Mg-suolat, resistenssin kehittyminen, tehottomia gram-negatiivisille bakteereille
Otsoni	hyödyt: samanlainen tehokkuus kuin kloorilla, hajoaa hapeksi, ei jäämiä, heikentää biofilmimatriisia haitat: reagoi orgaanisten aineiden kanssa muodostaen epoksiedeja, syövyttävä, lyhyt puoliintumisaika, herkkä veden komponenteille
Jodoforit	hyödyt: ei-syövyttäviä, myrkyttömiä, helppo käyttää, ei-ärsyttäviä, toimivat laajalla käyttöalueella haitat: pahoja hajuja ja makuja, muodostavat punaisia yhdisteitä tärkkelyksen kanssa, kallis
Glutaraldehydi	hyödyt: tehokas alhaisissa pitoisuuksissa, halpa, ei hapeta, ei syövytä haitat: ei tunkeudu biofilmeihin hyvin, hajoaa muurahaishapoksi, nostaa DOC-lukua

4.2.1.2 Peroksipohjaiset desinfiointiaineet

Peroksiyhdisteiden eli pääasiassa vetyperoksidin ja peretikkahapon käyttö desinfiointiaineina on lisääntynyt niiden hajoavuuden vuoksi. Peroksiyhdisteiden desinfiointiominaisuudet perustuvat niiden kykyyn hapettaa proteiineja ja lipidejä.

Vetyperoksidi on vesiliuokoinen, kirkas ja pistävänhajuinen liuos (Baldry & Fraser, 1988). Se tehoaa bakteereihin, hiivoihin, homeisiin, viruksiin ja itiöihin. Se on tehokkaampi happamissa kuin emäksisissä olosuhteissa. Itiöiden tuhoamiseen voidaan käyttää tarvittaessa korkeaa lämpötilaa (50–80 °C) ja vetyperoksidipitoisuutta (20 %), mutta tämä voi aiheuttaa korroosiota ajan kuluessa. Vetyperoksidi hapettaa myös orgaanista likaa ja vapauttaa happea sekä auttaa lian irrottamisessa (Block, 1991). Elintarviketeollisuudessa pakkaukset ja laitteet desinfioidaan vetyperoksidilla sumuttamalla tai uittamalla (Baldry & Fraser, 1988).

Peretikkahappo on kirkas, väritön ja hapettava biosidi, jolla on pistävä hajua. Se toimii happamissa ja emäksisissä olosuhteissa, alhaisissa lämpötiloissa (2–10 °C) sekä orgaanisen lian läsnäollessa. Peretikkahappo on tehokas jo alhaisina pitoisuuksina ja tappaa itiöt. Sen teho perustuu mikrobien membraaniproteiinien rikkisidosten hapettamiseen. Desinfiointiaineissa peretikkahappoon on sekoitettu vettä, etikkahappoa ja vetyperoksidia (Flemming, 1991; Troller, 1993). Meyer ja Thyborski (1999) osoittivat tutkimuksissaan peretikkahappopohjaisen desinfiointiaineen tehoavan *C. albicans* -hiivaan.

Elintarviketeollisuudessa peretikkahappoa on hyödynnetty paljon, koska se on myrkytöntä (laimennettuna) ja tehokasta alhaisissa lämpötiloissa (Wirtanen, 1995). Peretikkahappo ei kuormita luontoa oikeina pitoisuuksina käytettäessä, koska se hajoaa täydellisesti etikkahapoksi ja vetyperoksidiksi ja edelleen hiilidioksidiksi, vedeksi ja hapeksi (Maunuksela, 1995). Haittapuolia on, että se korrodoi pintamateriaaleja ja on epästabiili.

4.2.1.3 Klooripohjaiset desinfiointiaineet

Klooriyhdisteitä on käytetty jo 1850-luvulla sairaaloiden ja jätevesien desinfiointiin (Block, 1991). Kloori ei esiinny puhtaana aineena luonnossa vaan se muodostaa yhdisteitä natriumin, kaliumin, kalsiumin ja magnesiumin kanssa. Kloorilla on voimakas taipumus sitoa elektroneja, minkä vuoksi se on hyvin voimakas hapetin. Vesiliuoksessa kloori on vapaana tai sidotussa muodossa. Kloori esiintyy vapaana esimerkiksi hypokloriittihappona (HOCl), hypokloriitti-ionina (OCl⁻) tai kloorimolekyylinä (Cl₂) (Dychdala, 1991).

Kloorin desinfioivat ominaisuudet johtuvat hypokloriittihappomolekyyleistä, joilla on mikrobisidisiä ominaisuuksia (Mattila-Sandholm & Wirtanen, 1992). Kloorin tehoon vaikuttavia tekijöitä ovat mm. happamuus, lämpötila, orgaanisen lian määrä ja veden kovuus. Näistä tekijöistä tehoon vaikuttaa eniten happamuus. Mitä alhaisempi pH sitä enemmän liuoksessa on hypokloriittia ja sitä parempi sen desinfiointiteho on (Hadfield, 1957). Epäorgaaninen materiaali (ammonium- ja aminoyhdisteet) alentaa kloorin tehoa, kun taas pieni määrä jodia tai bromia nostaa sen tehoa. Klooridesinfioinnille optimaaliset olosuhteet ovat alhainen klooripitoisuus, korkea pH, alhainen lämpötila ja orgaanisen lian sekä katalyyttien poissaolo (Dychdala, 1991).

Hypokloriitti on väritön ja myrkytön aine, jonka vaikutusspektri on laaja. Mikrobieen kuolleisuussuhde on suoraan verrannollinen hypokloriittihapon dissosioitumisasteeseen. Sen teho on parempi happamissa kuin emäksisissä liuoksissa. Hypokloriittihapon stabiilisuus happamissa olosuhteissa on kuitenkin huono. Esimerkiksi pH 5:ssä 25 °C lämpötilassa 100 mg/l hypokloriittia menettää tehonsa 10 minuutissa (Granum & Magnussen, 1987). Emäksisissä liuoksissa hypokloriitti on ionimuodossa. Hypokloriitti-ionit eivät ole yhtä mikrobisidisiä kuin hypokloriittihappo (Dychdala, 1991). Hypokloriitin mikrobisidiseen tehoon vaikuttavat mm. vaikutusaika, lämpötila, mikrobityyppi, dissosioitumisaste, stabiilisuus, happamuus ja orgaanisen lian läsnäolo (Granum ja Magnussen, 1987). Mosley *et al.* (1976) tutkimuksessa jodipohjainen hypokloriitti tehosi *Candida*-hiivaan. Cantoni & Comi (1988) havaitsivat hypokloriitin tehoavan prosessilaitteiden pinnalla kasvavaan *P. farinosa* -hiivaan. Klooriyhdisteet ovat taloudellisia, turvallisia ja helpokäyttöisiä desinfiointiaineita (Dyschdala, 1991).

4.2.1.4 Jodofoorit

Jodofoorit ovat jodipohjaisia desinfiointiaineita, joilla on hyvin laaja mikrobisidinen teho. Jodofoorit eivät aiheuta korroosiota ja niitä on helppo käyttää. Jodofoorit ovat osoittautuneet tehokkaiksi *S. cerevisiae* ja *Candida*-hiivoja sekä tuoremehussa esiintyviä villihiivoja vastaan (Winniczuk & Parish, 1997; Mosley *et al.*, 1976). Mosley *et al.* (1976) mukaan jodofoorit tuhosivat jopa laimennettuina enemmän hiivasoluja kuin hypokloriitti. (Cantoni & Comi (1988) osoittivat, että *P. farinosa* -hiiva inaktivoitui jodofoorikäsitelystä puhdistettaessa prosessitankkeja.

Jodofoorien haittapuolena on niiden kyky muodostaa tärkkelyksen läsnäollessa oranssinpunaista väriä, ja ne voivat myös aiheuttaa maku- ja hajuhaittoja tuotteeseen ja pinnoille (Flemming, 1991; Troller, 1993).

4.2.1.5 Kvaternäärisiä ammoniumyhdisteitä sisältävät desinfiointiaineet

Kvaternääriset ammoniumyhdisteet (kvatit) ovat sekä desinfiointiaineita että pintaaktiivisia aineita, jotka alentavat veden pintajännitystä. Ne ovat värittömiä, hajuttomia, stabiileja ja oikeaa pitoisuutta käytettäessä myrkyttömiä. Niiden teho on paras yli pH 9,5:ssa. Kvatit auttavat biofilmin irrottamisessa ja estävät biofilmin kiinnittymistä. Kvatitipohjainen desinfiointiaine tehosi *Candida*-hiivaan suspensiossa hyvin. Pinnoille kiinnittyneisiin hiivasoluihin jodofoorit ja hypokloriitit olivat kvatteja tehokkaampia (Mosley *et al.*, 1976). Ne eivät aiheuta korroosiota, maku- tai hajuhaittoja (Flemming, 1991; Troller, 1993; Skogman, 1997). Eniten käytetty kvatti on bentsalkoniumkloridi, joka kuuluu monoalkyyliidimetyyli-bentsyyliammonium-ryhmään. Muita tunnettuja ryhmiä ovat monoalkyyli-trimetyyli-, dialkyyliidimetyyli-, heteroaromaattiset, polysubstituoidut, bis- ja polymeroidut kvaternääriset ammoniumyhdisteet (Merianos, 1991). Kvattien huonoja puolia ovat tehottomuus gram-negatiivisia bakteereja vastaan, suolojen muodostus kalsium- ja magnesium-ionien kanssa ja inaktivoituminen alhaisessa pH:ssa. Mikrobit voivat myös kehittyä kvateille resintenteiksi (Flemming, 1991; Troller, 1993; Skogman, 1997).

4.2.1.6 Otsoni

Otsoni on kaasu alhaisissa lämpötiloissa. Se on voimakas mikrobisidi ja osittain veteen liukeneva. Otsonin liukenevuus veteen lisääntyy veden lämpötilan laskiessa. Otsonilla on ainutlaatuinen kyky hajota itsestään erilaisiksi vapaiksi radikaaleiksi, joista merkittävimpin on hydroksyyli-ioni (OH^\cdot) (Graham, 1997). Liuoksen pH:n noustessa liunneen otsonin pitoisuus kasvaa ja molekulaarisen otsonin (O_3) hajoaminen lisää vapaiden radikaalien tuottoa. Kuitenkin jos pH nousee 10:een, otsoni hajoaa välittömästi. Otsoni on luokiteltu turvalliseksi (GRAS = generally recognised as safe) desinfiointiaineeksi Yhdysvalloissa (Kim *et al.*, 1999).

Otsonilla on monia hyviä puolia. Se hajottaa biofilmejä eikä aiheuta jäämiä pinnoille (hajoaa hapeksi) ja sen desinfiointiteho on vastaava kuin kloorilla. Otsonin heikkouksia ovat mm. lyhyt puoliintumisaika, herkkyys veden komponenteille ja reagointi orgaanisen lian kanssa, jolloin muodostuu korrodoivia epoksiedeja (Flemming, 1991; Troller, 1993). Lisäksi ylimääräinen otsoni voi aiheuttaa tuotteiden hapettumista, esim. värimuutoksia (Kim *et al.*, 1999). Otsonia voidaan käyttää elintarviketeollisuudessa tuotepintojen kuten liha-, kana-, muna-, kala-, hedelmä ja vihannespintojen puhdistukseen (Kim *et al.*, 1999). Muita käyttösovelluksia ovat kasvien ja hedelmien säilyvyyden parantaminen varastoinnin ja kuljetuksen aikana sekä elintarviketeollisuudessa käytetyn veden puhdistus (Graham, 1997). Otsonointia on käytetty noin sadan vuoden ajan juomaveden puhdistuksessa. Otsonoinnin on todettu alentavan merkittävästi *C. albicans* ja *Z. bailii* -hiivojen pitoisuutta vedessä (Restaino *et al.*, 1995).

4.2.2 Desinfiointiaineiden tehon testaus

Desinfiointiaineiden ja antiseptisten aineiden mikrobisidisen tehon varmentamiseksi on kehitetty standardoituja määritysmenetelmiä (Bloomfield *et al.*, 1991). Tuotanto-olosuhteissa suoritettavat testit ovat kalliita ja vaikeita, minkä vuoksi useimmat testit perustuvat laboratorio-olosuhteisiin (Bloomfield *et al.*, 1994). Euroopassa on useita kansallisia standardimenetelmiä (AFNOR, DIN, BSI). Vastaavia menetelmiä on kehitetty myös Yhdysvalloissa AOAC:n (Association of Official Analytical Chemists) johdolla (Anon., 1980). Eurooppalainen komitea CEN työstää elintarvikehygienian, lääketieteen, eläinlääketieteen ja maatalouden sektoreille EU:n jäsenmaille yhtenäisiä standardoituja testimenetelmiä (Bloomfield *et al.*, 1991). CEN:n testimenetelmien perustana on käytetty Ranskan AFNOR-standardisuspensiotestiä (Anon., 1989a, b). Standardimenetelmät käsittävät desinfiointiaineiden mikrobisidisen tehon määrittämisen suspensio-, kapasiteetti- ja kantajatestillä (esim. pintatesti) (Reybrouck, 1986). Taulukossa 13 on esitetty eri suspensiotesteissä käytettäviä parametrejä ja taulukossa 14 vastaavasti eri pintatestien parametrejä (Skogman, 1997).

Taulukko 13. Eroja Euroopan kansallisten suspensiotestien ja kansainvälisen suspensiotestin välillä (Skogman, 1997).

Menetelmä/ Parameteri	VTT-4278 (Suomi)	CEN/TC 216 (Eurooppa)	BSI (Iso-Britannia)	AFNOR (Ranska)	QCT (Hollanti)
Mikrobi- suspensio	suolaliuos	peptoni- suolaliuos	peptonisuolaliuos	vesi	suolaliuos
Lika	1,5 % naudan albumiinia	-	0,03% tai 1% naudan albumiinia	-	1,5 % naudan al- bumiinia
Esikäsitteily	2 ml likaa ja 2 ml mikrobi- suspensiota, ravistellaan 2 min	-	4 ml likaa ja 1 ml mikrobisuspensiota ravistellaan 2 min	4 ml likaa ja 1 ml mikrobi- suspensiota ravistellaan 5 min	2 ml likaa ja 2 ml mikrobisuspensiota ravistellaan 2 min
Desinfiointi- käsitteily	24 ml ainetta ja 1 ml mikrobi/ likasuspensiota	8 ml ainetta, 1 ml vettä ja 1 ml mikrobi- suspensiota	5 ml ainetta ja 5 ml mikrobi/ likasuspensiota	5 ml ainetta ja 5 ml mikrobi/ likasuspensiota	24 ml ainetta ja 1 ml mikrobi/ likasuspensiota
Vaikutusaika	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
Inaktivointi	inaktivointiliuos 5 min	inaktivointiliuos tai membraani- suodatus	inaktivointiliuos 5 min	inaktivointi- liuos 10 min tai membraani- suodatus	inaktivointiliuos 5 min
Logaritminen teho	>5	>5	>5	>5	>5

Taulukko 14. Eroja Euroopan kansallisten pintatestien ja kansainvälisen pintatestin välillä (Skogman, 1997).

Menetelmä/ Parametri	VTT:n testi (Suomi)	DIN (Saksa)	CEN/TC 216 (Eurooppalainen ehdotus)	AFNOR (Ranska)	QCT (Hollanti)
Pinta	ruostumaton teräs, Ø12mm (AISI304 2B)	keraaminen pinta, PVC	ruostumaton teräs, Ø2cm (AISI304 2B)	kellolasi, teräs	teräs, formica
Mikrobi-suspensio	peptonisuola-liuos	tryptonisojialiemi	peptonisuola-liuos	vesi	kova vesi
Lika	maitokerma, rasva, varastoolut yms	tryptonisojialiemi	-	0,1% tryptonia, 0,5% rasvatonta maitoa	0,03% naudan albumiinia
Tilavuus/pinta	70 µl	100 µl	50 µl	50 µl	100 µl
Kuivaus	yön yli, 30°C	90 min, 25°C	60 min, 37°C	45 min, 37°C	kuiviin, 25°C
Desinfiointiaine	2 ml	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl
Vaikutusaika	2, 5, 10, 30 min	15, 30, 60 min	1...60 min	1, 5, 15, 60 min	15, 30, 60 min
Mikrobien irrottaminen pinnasta	hankaus tupolla, ravistelu inaktivointiliuoksessa	ravistelu inaktivointiliuoksessa lasihelmillä 2 min	ravistelu inaktivointiliuoksessa lasihelmillä	huuhtelu 1 min ja hankaus huuhteluaineessa	ravistelu inaktivointiliuoksessa lasihelmillä 2 min
Logaritminen teho	>3	>5	>5	>5	>3

4.2.2.1 "555"-suspensiotesti

Suspensiotestiä käytetään desinfiointiaineiden tehon seulontaan. "555"-suspensiotesti on VTT:n menetelmä (VTT-4278-96) liuoksina käytettävien pesu- ja desinfiointiaineiden mikrobisidisen tehon testaamiseen. Testissä käytetään viittä mikrobikantaa (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*), joihin tutkittavan aineen annetaan vaikuttaa nesteviljelmässä viiden minuutin ajan. Pesu- tai desinfiointiaineen vaikutus pysäytetään inaktivointiliuoksella ja elävien solujen lukumäärä määritetään viljelemällä näytteet kiinteille kasvualustoille. Mikrobisidistä tehoa verrataan mikrobikantojen käsittelemättömiin kontrolliviljelmiin (VTT-4278-96, Menetelmäohje). Tutkittavasta pesu- ja desinfiointiaineesta käytetään yleensä alhaisinta valmistajan suosittelemaa pitoisuutta. Pesu- ja desinfiointiainetta voidaan pitää tehokkaana, mikäli mikrobipopulaatio pienenee käytön jälkeen viidellä logaritmiyksiköllä (Skogman, 1997).

4.2.2.2 Eurooppalainen suspensiotesti

Eurooppalaisissa standardeissa (EN 1276 ja EN 1650) on esitetty testausmenetelmät kemiallisten desinfiointiaineiden ja antiseptisten aineiden bakteri- ja fungisidisen tehon määrittämiseksi sekä vähimmäisvaatimukset näiden aineiden teholle. Näissä menetelmissä käytetään rasisuskeinona kovaa vettä. Standardia sovelletaan maataloudessa (pait-si kasvinsuojelussa), kotitalouksissa, elintarviketeollisuudessa ja muilla teollisuuden aloilla, julkisella sektorilla sekä lääke- ja eläinlääketieteessä käytettäviin aineisiin (Anon., 1997, 1994).

Bakteerisidisen tehon määrittämisessä käytetään testiorganismeina *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *E. coli* (ATCC 10536), *S. aureus* (ATCC 6538) ja *E. hirae* (ATCC 8043) -kantoja. Fungisidinen teho määritetään *C. albicans* (ATCC 10231) ja *A. niger* (ATCC 16404) -kannoilla. Testattavan desinfiointiaineen (1,25 x lopullinen pitoisuus) annetaan vaikuttaa 20 °C:ssa bakteereihin 5 min ja sieniin 15 min. Desinfiointiaine voidaan testata joko puhtaissa (0,03 % naudan albumiinia) tai likaisissa (0,3 % naudan albumiinia) olosuhteissa. Testi voidaan suorittaa joko laimennus- ja inaktiivointimenetelmällä tai membraanisuodatusmenetelmällä. Inaktiivointiaineena suositellaan käytettäväksi mm. natriumsulfaattia ja L-kysteiiniä sisältäviä liuoksia. Eurooppalaiset normit sisältävät myös menetelmiä suspensiotestin validoimiseksi. Normeissa validoidaan testiolosuhteet, inaktiivointi, suodatus sekä inaktiivointiliuoksen myrkyttömyys. Lisäksi niissä annetaan malli testitulosten raportoinnista (Anon., 1997, 1994).

4.2.2.3 Pintatestit

Pintatestejä on olemassa useita erilaisia (taulukko 14). Ne eroavat toisistaan mm. käytettyjen pintamateriaalien, mikrobisuspension valmistuksen, pintojen likaamisen, pinnalle pipetoidun mikrobisuspension ja desinfiointiaineen määrään, pinnan kuivauksen ja desinfiointiaineen vaikutusajan suhteen. Lisäksi kontrolliliuosten koostumuksessa, mikrobien irroitusmenetelmissä, inaktiivointivaiheen pituudessa, laimennosliuoksissa ja viljelytekniikoissa esiintyy eroja (Bloomfield *et al.*, 1994; Wirtanen, 1995; Skogman, 1997).

VTT:n pintatestissä pesu- ja desinfiointiaineiden mikrobisidistä tehoa testataan puhtailla tai likaisilla metallipinnoilla. Orgaanisena likana voidaan käyttää esim. maitokermaa, rasvaa tai varasto-olutta. Pinnoille pipetoidaan testattavaa pesu- tai desinfiointiainetta ja kontrolliviljelmien päälle pipetoidaan fysiologista suolaliuosta. Pesu- ja desinfiointiaineiden annetaan vaikuttaa esim. kolmessa eri ajanjaksossa. Käsittelyn jälkeen desinfiointiaineen teho pysäytetään inaktiivointiliuoksella. Mikrobisidinen teho määritetään vertaamalla käsiteltyjen ja käsittelettömien (kontrolli) näytteiden pesäkemääriä (Skog-

man, 1997). Pesu- ja desinfiointiaineita pidetään tehokkaina, mikäli niillä saavutetaan kolmen logaritmiyksikön alenema mikrobipitoisuudessa (Mosteller & Bishop, 1993).

4.2.2.4 Biofilmitesti

Biofilmitesteissä tutkitaan desinfiointiaineiden mikrobisidistä tehoa pinnoilla biofilminä kasvaviin mikrobeihin. Biofilmi muodostuu, kun pinnoille kiinnittyneet mikrobisolut lisääntyvät pinnoilla ja muodostavat ympärilleen suojaavan polysakkaridi- ja glykoproteiiniverkoston (Wirtanen, 1995; Yli-Juuti, 1999; Storgårds, 2000). Testeissä voidaan käyttää puhtaita tai prosessialialla liattuja pintoja. Tavallisesti pintamateriaalina on käytetty valssattua ruostumatonta (AISI 304 tai AISI 316, 2B) terästä (Wirtanen, 1995). Ruostumattomat teräspinnat voidaan myös pintakäsitellä esim. narulaikkaräpytyksellä, hiekka- tai keraamisella puhalluksella, elektrolyyttisellä tai mekaanisella kiillotuksella. Tutkittavan prosessiosuuden mukaan voidaan käyttää myös erityyppisiä muovi- ja kumipintoja esim. EPDM, NBR, silikon, teflon ja Viton (Storgårds *et al.*, 1999 a & b).

Esiliatuille ja likaamattomille levyille kasvatetaan biofilmiä valituista pudas- tai seosviljelmistä käyttämällä sopivaa alustaa kuten lima- tai vierresokerilientä. Kasvatus suoritetaan ravistelussa (60–75 rpm) joko kylmässä (4–5 °C) tai huoneenlämmössä (25 °C). Kasvatusaika vaihtelee kahdesta kymmeneen vuorokauteen. Kasvatusalusta vaihdetaan tuoreeseen joka toinen päivä. Kasvatuksen päättyessä levyt huuhdellaan steriilillä vedellä, jolloin vain kiinnittyneet solut jäävät levyihin (Wirtanen, 1995; Yli-Juuti & Storgårds, 1999).

Eri desinfiointiaineen tehoa pinnalle kasvatettuun biofilmiin tutkitaan upottamalla testi-levyt viideksi minuutiksi temperoituun (20 °C), sopivasti laimennettuun desinfiointiaineeseen tai tislattuun veteen (kontrolli). Käsittelyn jälkeen desinfiointiaine inaktivoidaan neutralointiliuoksessa. Desinfiointiteho määritetään sively- ja viljelymenetelmällä. Vaihtoehtoisia määritysmenetelmiä viljelylle ovat impedimetria, elävyysvärjäys ja ATP-menetelmä (Wirtanen *et al.*, 1997; Yli-Juuti & Storgårds, 1999).

4.2.2.5 Alginaattigeelitesti

Alginaattigeelitesti on uusi sovellus desinfiointiaineiden tehon testauksessa. Testissä tutkitaan desinfiointiaineiden kykyä läpäistä alginaattigeelijyväsistä muodostuva keino-tekoinen biofilmi. Desinfiointiaineen tehoon vaikuttavat sen omien ominaisuuksien lisäksi alginaattijyvästen koko ja siirrosten solupitoisuus. Desinfiointiaineen teho laskee, kun geelijyväsen sädettä tai solupitoisuutta kasvatetaan (Stewart *et al.*, 1998).

Alginaattiliuos valmistetaan veteen ja siirrostetaan tutkittavalla mikrobikannalla. Liuoksen lopullinen alginaattipitoisuus on 2 p-%. Alginaattigeelijyväset valmistetaan tiputtamalla alginaatti-mikrobiseos pisarointain kalsiumkloridiliuokseen (Stewart *et al.*, 1998). Alginaattigeelijyvästen desinfiointiainetestaus suoritetaan seuraavasti: geelijyväset sekoitetaan kalsiumkloridiliuokseen ja tietty määrä biosidiä lisätään joukkoon. Eri vaikutusaikojen jälkeen jyväset kerätään ja liuotetaan natriumsitraattiliuokseen, jonka jälkeen niiden mikrobipitoisuus määritetään maljavalutekniikalla. Mikrobipitoisuus saadaan jakamalla pesäkemäärä lasketulla pallomaisen geelijyvän tilavuudella. Kontrollina käytetään biosidillä käsittelemättömiä alginaattigeelijyväsiä. Yhden log-yksikön alenema lasketaan vertaamalla käsiteltyjen ja käsittelemättömien jyvästen pesäkemääriä (Stewart *et al.*, 1998).

4.2.2.6 Hydrogeelitestit

Hydrogeelitestissä tutkitaan desinfiointiaineen tehoa biofilmiä simuloivassa hydrogeelissä (esim. Poloxamer F127) kasvaviin soluihin, jotta voitaisiin päätellä kuinka hyvin se tunkeutuu biofilmiin ja vaikuttaa pinnoilla esiintyviin mikrobeihin. Poloxamer F127 on polyoksietyleenin ja polyoksipropyleenin hydrogeelikopolymeeri, joka on nesteinä alle 15 °C:ssa ja geelinä yli 15 °C:ssa. Hydrogeelin valmistamiseksi Poloxamer-hiutaleet liuotetaan jääkaapissa kasvatusliuokseen, jonka jälkeen geeli autoklavoidaan ja siirrostetaan testiorganismilla. Siirrostettu geeli pipetoidaan pisaroina autoklavoiduille metallinapeille ja geeliä inkuboidaan pesäkkeiden kasvattamiseksi muutamia tunteja. Tutkittava desinfiointiaine laimennetaan käyttöliuokseksi veteen. Kontrollina käytetään steriiliä vettä. Inkuboitumisen jälkeen hydrogeelinapit siirretään temperoituun (20 ± 1 °C) desinfiointiaineliuokseen viideksi minuutiksi. Desinfiointiaine inaktivoidaan jääkaappikylmässä inaktiivintiliuoksessa ja sen teho määritetään ravintoagarilla pintaviljelymenetelmää käyttämällä (Wirtanen *et al.*, 1998; Härkönen *et al.*, 1999). Desinfiointiaineen mikrobisidinen teho tulisi hydrogeelitestissä olla vähintään 0,3 log-yksikköä pisaraa kohti, jotta sen teho biofilmimikrobeihin olisi riittävä.

4.2.3 Desinfiointiaineiden vaikutukset hiivoihin

Winniczuk & Parish (1997) määrittivät eri pesu- ja desinfiointiaineiden alimman inhiboivan pitoisuuden (MIC) *S. cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ja *Gluconobacter oxydans* -mikrobeille sekä kahdeksalle tuoremehu- ja sitrushedelmäisolaatille, joista kaksi oli hiivoja. Tutkimuksessa klooridioksidi, jodofoori ja kvatti olivat tehokkaita alhaisissa pitoisuuksissa, kun taas dimetyylidikarbonaattia, hypokloriittia, peretikkahappoa ja fosforihappoa sisältävät aineet olivat merkittävästi tehottomampia. Sitruuna- ja maitohappoa sisältävät aineet eivät tehonneet testattuihin

organismeihin lainkaan. Mosley *et al.* (1976) tutkivat jodofoorien ja jodipohjaisia hypokloriitteja ja kvatteja sisältävien desinfiointiaineiden tehoa *Candida* sp. -hiivaan suspensiossa. He kehittivät myös pintatestin kiillotetuille metallipinnoille, jotta testit vastaisivat lähemmin desinfiointiaineiden käyttöä elintarviketeollisuudessa. Tulokset osoittivat, että jodofoori ja hypokloriitti olivat kvatteja tehokkaampia. Laimennettuina jodofoorit tuhosivat enemmän hiivasoluja kuin hypokloriitti (Mosley *et al.*, 1976). *P. farinosa* voidaan inaktivoida jodofooreilla ja hypokloriitilla sorbitoliliuostankeista puhdistuksen yhteydessä (Cantoni & Comi, 1988). Remus (1992) osoitti, että klooria sisältävä alkaalinen pesuaine oli paljon tehokkaampi poistamaan bakteeri- ja sienibiofilmejä prosessipinnoilta kuin käytössä ollut kuumavesikäsitteily. Webb *et al.* (1995) käyttivät hyvin laimeita hypokloriittiliuoksia (pitoisuudet alle MIC-arvojen) ja tulivat siihen tulokseen, että hypokloriitti voi estää *Candida* sp:n kiinnittymisen pinnoille.

Viidentoista kaupallisen desinfiointiaineen tehoa 25 sienikantaan, joista kuusi oli hiivoja, on tutkittu suspensiotestillä. 0,5 % dodekyylidietyleenitriamiinietikkahappoa, 10 g kloramiini-T:tä, 2,0 % formaldehydiä, 0,1 % kaliumhydroksidia, 3,0% vetyperoksia tai 0,3 % peretikkahappoa sisältäneet desinfiointiaineet eivät olleet fungisidisia. Konidiat ja vegetatiivisolut kuolivat alkoholikäsitteilyssä, koteloitiöt sen sijaan kestivät alkoholikäsitteilyn hyvin. Koteloitiöiden resistenssi 70 %:n etanolilla kasvoi itiöiden vanhetessa (Bundgaard-Nielsen & Nielsen, 1996). Myös Blessmann (1992) on tutkinut suspensiotestillä eri desinfiointiaineiden tehoa erilaisiin elintarvikkeiden pilaajahiivoihin ja -homeisiin (esim. *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *Absidia corymbifera* ja *Penicillium verrucosum*). Desinfiointiaineet sisälsivät orgaanisia happoja, vetyperoksidia, hypokloriittia, amfotensideja, alkoholia ja kvatteja aldehydi- tai biguanidilisällä tai ilman lisäystä. *C. albicans* oli hyvin vastustuskykyinen kaikille testatuille desinfiointiaineille. Blessmannin (1992) mukaan *A. niger* -homeen (ATCC 16404) itiöt olivat kuitenkin sopivin materiaali desinfiointitesteihin.

McGrath *et al.* (1991) ovat tutkineet suspensiotestein leipomoympäristöstä eristettyjen *S. cerevisiae* ja *P. anomala* -hiivojen vegetatiivisolujen ja koteloitiöiden herkkyyttä kvatteja, amfoteereja ja hypokloriittia sisältäville desinfiointiaineille. Tulokset osoittivat, että *S. cerevisiae* vegetatiivisolut olivat *P. anomalan* vegetatiivisoluja herkempiä. Koteloitiöt kestivät desinfiointiainekäsitteilyt paremmin kuin vegetatiivisolut (McGrath *et al.*, 1991). Kun peretikkahappoa ja kvatteja sisältäviä desinfiointiaineiden tehoa tutkittiin *Saccharomyces*-vegetatiivisoluihin ja koteloitiöihin, osoittautuivat koteloitiöt vegetatiivisoluja vastustuskykyisemmiksi. Tulos oli päinvastainen käytettäessä biguanideja sisältäviä desinfiointiaineita (Neumayr *et al.*, 1988). Tutkimusten tulokset viittavat siihen, että elintarvikeollisuudessa käytössä olevat desinfiointiaineet kannattaisi testata myös pilaajahiivojen koteloitiöillä.

Ei-vaahtoavaa, vetyperoksidia ja peretikkahappoa sisältävää stabiloitua Klenade Oxonia Active -desinfiointiainetta on suositeltu esipuhdistettujen laitepintojen (esim. putket, tankkien, täyttökoneet, haihduttimet, pastöörit, aseptiset laitteet) desinfiointiin, koska aineen pitäisi tehot bakteereihin, hiivoihin, homeisiin ja viruksiin (Anon., 1992). Meyerin & Thyborskin (1999) tutkimuksessa peretikkahappopohjainen P3-topactive DES -desinfiointiaine osoittautui tehokkaaksi sekä bakteereille että *C. albicans*ille. Muut testatut peretikkahappopohjaiset, kvattipohjaiset ja klooripohjaiset aineet eivät olleet yhtä tehokkaita. Sapersin (1996) suorittamissa säilyvyyskokeissa huuhteluveteen lisätty vetyperoksidi ei vaikuttanut pinnoilla oleviin hiivoihin eikä homeisiin.

C. albicans -hiivan kasvunestokokeissa on käytetty muurahaishappoa, sitruunahappoa, etikkahappoa, propionihappoa, 5 % etikkaa ja Sabona D:tä. Aineiden tehokkuus oli järjestyksessä: muurahaishappo, Sabona D > etikkahappo > sitruunahappo > propionihappo (Böhm, 1987). Wilcocks & Smart (1995) osoittivat, että happopesu vaikuttaa hiivasolujen hydrofobisuuteen ja täten niiden kiinnittymiseen. Eräissä panimoiden puhdistusprosesseissa bakteerit ja hiivat voivat säilyä elossa emäksisissä liuoksissa ja tämän kautta saastuttaa pesuliuokset ja mahdollisesti kiinnittyä myös laitepintoihin. Lisäämällä suolaliuokseen 0,05–0,10 % Imunell A55:sta mikrobit kuolivat 2–5 minuutissa (Grajecki & Schmalz, 1995).

Otsoni on tehokas myrkkujen (esim. mykotoksiinit, pestisidit) poistaja maataloustuotteista. Suhteellisen matala pitoisuus ja lyhyt vaikutusaika riittävät bakteerien, homeiden, hiivojen, virusten ja alkueläinten inaktivointiin. Mikrobin herkkyys otsonille riippuu kasvuvaiheesta, pH:sta, lämpötilasta, kosteudesta ja käytetyistä lisäaineista (Kim, *et al.*, 1999). Otsonoidun veden tehoon vaikuttavia tekijöitä on tutkittu kiertoreaktoreissa käyttämällä bakteereita, hiivoja ja homeitiöitä testiorganismeina. Liunneen tärkkelyksen lisäys veteen ei vaikuttanut otsonin tehoon, sen sijaan 20 ppm naudan albumiinia vähensi tehoa merkittävästi. *C. albicans* ja *Z. bailii* -hiivojen pitoisuudet alenivat otsonoidussa vedessä heti yli 4,5 log-yksikköä, kun tas homeitiöistä tuhoutui alle 1 log-yksikkö 5 min käsittelyn jälkeen (Restaino *et al.*, 1995).

Klooridioksidikaasun (ClO_2) soveltuvuutta epoksipäällystettyjen tuoremehusäiliöiden desinfiointiin on tutkittu aseptisessä pilot-tankkisysteemissä. Pilaantuneista mehuista eristetyt mikrobit mukaanlukien *Candida* spp. ja *S. cerevisiae* siirrostettiin epoksipäällystetyille ruostumattomille teräslevyille, teräslevyt laitettiin pilot-tankkiin ja altistettiin erityyppisille ClO_2 -kaasukäsittelyille. ClO_2 -kaasun pitoisuus vaihteli 2–14 mg l⁻¹, suhteellinen kosteus 50–98 %, vaikutusaika 5–120 min ja lämpötila 9–31 °C. *L. buchneri* osoittautui kestävimmäksi mikrobiksi näissä kokeissa. Hiivat ja homeet olivat yleensä herkempiä ClO_2 -kaasulle kuin bakteerit (Han *et al.*, 1999).

4.3 Tuoteominaisuuksien vaikutus hiivoihin

4.3.1 Veden aktiivisuus

Elintarvikemikrobiologiassa mikrobien käytettävissä oleva vesi ilmaistaan veden aktiivisuutena (a_w) eli elintarvikkeen vapaan veden määränä. Veden aktiivisuus voidaan määrittää liuosta ympäröivän ilman suhteellisesta kosteudesta (*relative humidity*; RH), koska liuoksen $a_w = RH / 100$. Taulukossa 15 on lueteltu eräiden aineiden a_w -arvoja.

Taulukko 15. Joidenkin aineiden ja elintarvikkeiden veden aktiivisuus -arvoja.

Veden aktiivisuus (a_w)	Aine (g / 100 ml)	Esimerkkiaine, -tuote tai -ilmiö
1,0	puhdas vesi	
0,99		tuore liha
0,98	NaCl 3,5 g	merivesi
0,96	NaCl 7 g, sakkaroosi 65 g	
0,95		leipä, juusto
0,90	NaCl 16 g, sakkaroosi 140 g	kinkku, siirappi
0,85		salami, hillo
0,80	NaCl 30 g (kyllästetty liuos)	
0,70		kuivakakku, keksi
0,60		kasvun raja mikrobisoluille
0,55	kyllästetty glukoosiliuos	DNA denaturoituu

Yleinen menetelmä elintarvikkeen säilyvyyden parantamiseksi on nostaa sen osmootista painetta eli alentaa sen veden aktiivisuutta kuivaamalla elintarviketta tai lisäämällä siihen sokeria tai suolaa. Hiivat sietävät alhaista veden aktiivisuutta paremmin kuin bakteerit ja kasvavat yleensä a_w :n ollessa 0,90–0,95 (Déak 1991). Monet elintarvikkeiden pilajahiivoista ovat kuivuutta sietäviä eli kserotoleranteja ja kasvavat tuotteissa, joiden a_w korkean suola- tai sokeripitoisuuden vuoksi on hyvin alhainen (a_w 0,7–0,9). Kserotolerantit hiivat kuuluvat usein *Zygosaccharomyces*-sukuun, jonka yleisin laji on *Z. rouxii*. Kselotoleranteja hiivakantoja on tavattu myös mm. *Z. bisporus*, *C. lactis condensis*, *C. krusei*, *Debaryomyces hansenii*, *P. anomala*, *Sc. pombe* ja *T. delbrueckii* -lajeissa. *D. hansenii* ja *C. krusei* sietävät hyvin korkeaa suolapitoisuutta, kun taas *Z. rouxii* kasvaa paremmin korkeassa sokeripitoisuudessa. *Z. bailii* kasvu estyy täysin alustan sokeripitoisuuden ollessa 2,5 M (Jenkins *et al.*, 2000).

Kserotoleranttien hiivojen on havaittu korkeassa sokeri- tai suolapitoisuudessa syntetisoivan ja keräävän solun sisälle glyserolia tai muita polyoleja, kuten ksylitolia, arabitolia ja mannitolia, joiden avulla ne tasapainottavat korkean solunulkoisen osmoottisen paineen vaikutuksia (Fleet, 1992). Nämä pienet orgaaniset molekyylit voivat esiintyä solun sisällä korkeina tai matalina pitoisuuksina säädellen siten solunsisäistä osmoottista painetta (Abee & Wouters, 1999). *S. cerevisiae* on osoitettu keräävän solun sisälle

trehaloosia solunulkoisen osmoottisen paineen ollessa korkea (a_w 0,866), kun taas matalammassa paineessa (a_w 0,97) solu varastoi glyserolia (Hounsa *et al.*, 1998). Myös Carvalheiro *et al.* (1999) ovat tutkineet *S. cerevisiae*n kykyä syntetisoida ja kerätä trehaloosia ja glyserolia eri lämpötiloissa ja eri suolapitoisuuksissa. He havaitsivat, että osmoottisen paineen nousulla oli huomattavasti suurempi vaikutus trehaloosin ja glyserolin kerääntymiseen soluun kuin kohonneella lämpötilalla. Trehaloosi kerääntyy soluihin stationaarivaiheessa ja se voi toimia solun varastoaineena. Yhdiste otetaan käyttöön kasvun alkaessa. Lisäksi trehaloosi suojaa solua kuivuuden ja kuumuuden vaikutuksilta suojaamalla solukalvoa kuivumiselta tai lisäämällä proteiinien lämpöstabiliittia (referoitu Hounsa *et al.*, 1998).

Ympäristön liuenneet aineet sekä lämpötila vaikuttavat hiivan kykyyn sietää alhaista veden aktiivisuutta. *S. cerevisiae* -soluista säilyi 85–90 % elävinä, kun näytettä inkuboitiin matalassa lämpötilassa (5 ja 11°C) glyserolilla aiheutetun osmoottisen paineen ollessa jopa 100 MPa. Korkeammassa lämpötilassa (15 ja 22°C) kuolleisuus kasvoi nopeasti osmoottisen paineen ylittäessä 50 MPa (Beney *et al.*, 2000).

4.3.2 Happamuus

Monet hiivat kykenevät kasvamaan pH 3–8:ssa, vaikka niiden optimikasvuarvo on yleensä lievästi happamalla alueella. Hiivat ovatkin usein ongelmana happamissa tuotteissa. Erittäin happotolerantti *Z. bailii* voi kasvaa etikkahapolla säädetyllä alustalla pH 2,9:ssä ja sitruunahapolla säädetyllä alustalla jopa pH 2,2:ssa (referoitu Jenkins *et al.*, 2000).

Orgaaniset hapot inhiboivat hiivojen kasvua voimakkaammin kuin epäorgaaniset hapot ja niitä on käytetty hyvin paljon elintarvikkeissa säilöntäaineina mikrobikasvun estämiseksi (Fleet, 1992; Lambert & Stratford, 1999). Taulukossa 16 on esitetty säilöntäaineina käytettyjen bentsoe-, sorbiini- ja etikkahapon vaikutus joidenkin pilaaajahiivojen kasvuun. Heikkojen orgaanisten happojen antimikrobinen teho on paras alhaisessa pH:ssa, jolloin hapot ovat liuoksessa varauksettomina (dissosioitumattomina) ja pystyvät siirtymään vapaasti solukalvon läpi sisälle hiivasoluun. Solunsisäinen pH (pH_i) on lähellä neutraalia, jolloin happomolekyylit dissosioituvat varauksellisiksi ja konsentroituvat soluun. Happomolekyylien dissosioituminen vapauttaa protoneja sytoplasmaan, jolloin sytoplasman pH_i laskee ja solun metabolia sekä kasvu häiriintyvät (Lambert & Stratford, 1999).

Taulukko 16. Säilöntäaineena käytetyn orgaanisen hapon pitoisuuden vaikutus hiivan kasvunestoon (Fleet, 1992).

Hiivalaji	Alin hapon pitoisuus hiivan kasvunestoon pH 3,5:ssä		
	Bentsoehappo mg/l	sorbiinihappo mg/l	etikkahappo g/l
<i>Candida krusei</i>	300 (440)*	300	15
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	125	150	6
<i>Pichia membranifaciens</i>	200	200	20
<i>Rhodotorula sp.</i>	100	<100	<1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100 (175)	200	10
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	600 (1300)	600 (1200)	25
<i>Z. rouxii</i>	200 (330)	500 (1200)	3

*suluissa pitoisuudet, jotka määritetty säilöntäaineeseen sopeutuneilla hiivasoluilla

Pilaajahiivojen kasvun estämiseksi elintarvikkeissa on tutkittu niiden mekanismeja sietää happamia olosuhteita ja heikkoja happoja (Holyoak *et al.*, 1996; Sousa *et al.*, 1996; Piper *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 1998; Chambel *et al.*, 1999; Lambert ja Stratford, 1999; Gerós *et al.*, 2000). *S. cerevisiae*en heikkojen orgaanisten happojen sietokyky perustuu sen kykyyn pumpata protoneja ja dissosioituneita happoja ulos solusta kahden erilaisen solukalvossa sijaitsevan proteiinin (H⁺-ATPaasi, Pdr12 ABC) avulla, jolloin pH_i ei muutu (Holyoak *et al.*, 1996; Piper *et al.*, 1998; Chambel *et al.*, 1999; Lambert ja Stratford, 1999). Reaktio toimii solun ATP-energian avulla. Solu säätelee ATP:n tuottoa siten, että se voi myös kasvaa tässä stressitilanteessa (Holyoak *et al.*, 1996). Piper *et al.* (1998) ovat ehdottaneet bioteknologisen sovelluksen kehittämistä Pdr12 ABC-pumppuproteiinin inhiboimiseksi pilaajahiivoissa, jolloin ne herkistyisivät orgaanisille hapoille. Gerós *et al.* (2000) ovat oletaneet, että *D. anomalalla* olisi mekanismi liian etikkahapon pumppaamiseksi solusta ulos, mutta mekanismeja ei ole vielä tutkittu tarkemmin.

Hiivojen happamuudensietokyky ja siihen liittyvät mekanismit voivat vaihdella eri lajeilla. Eräät yleiset alhaista pH:ta sietävät pilaajahiivat, kuten *S. cerevisiae*, *Z. bailii* ja *D. anomala*, voivat käyttää etikkahappoa ainoana energian- ja hiilenlähteenään. *S. cerevisiaella* 1,5 % (v/v) etikkahappo aiheutti solukalvon vaurioitumisen, kun taas *Z. bailii* sietäi < 2,65 % pitoisuuksia (Prudêncio *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2000). *Z. bailii* ja *D. anomala* ovat yleisiä viinin kontaminantteja, koska ne kykenevät kasvamaan happamissa olosuhteissa (pH 3,5) ja sietävät etanolia paremmin kuin *S. cerevisiae*. Nämä hiivat voivat siirtää aktiivisesti etikkahappoa soluun sitä ympäröivästä liuoksesta (Sousa *et al.*, 1996; Gerós *et al.* 2000). Lisäksi ne voivat käyttää samaa mekanismia propioni-, muurahais- ja/tai sorbiinihapon kuljetukseen (Sousa *et al.*, 1996; Gerós *et al.* 2000). Etanolin on havaittu inhiboivan etikkahapon kuljetusta soluun *Z. bailiilla*, mikä suojaaa hiivaa liialta etikkahapon akkumuloitumiselta ja solun toimintojen häiriintymiseltä (Sousa *et al.*, 1996). *D. anomalalla* on indusoituva etikkahapon kuljetusmekanismi. Sitä inhiboi kohonnut solunsisäinen glukoosipitoisuus sekä ympäröivässä liuoksessa olevat disso-

sioitumattomat etikkahappomolekyylit (Gerós *et al.*, 2000). Sorbiinihappo indusoi *S. cerevisiaen* trehaloosisynteesiä alhaisessa pH:ssa (3,5), kun taas *Z. bailii* sietää vastavia oloja ilman tätä suojautumismekanismia (Cheng *et al.*, 1999). pH:lla ei ole myöskään vaikutusta *Z. bailiin* lämmönkestävyyteen, kun taas *S. cerevisiaen* lämmönkestävyys heikkenee huomattavasti pH:n laskiessa (Cheng *et al.*, 1999).

Usean eri stressitekijän, kuten esimerkiksi happamuuden ja osmoottisen paineen, vai- kuttaessa samaan aikaan, niiden inhiboiva vaikutus saattaa tehostua. Jenkins *et al.* (2000) havaitsivat, että mitä suurempi oli dissosioitumattomien etikkahappomolekyyl- ien määrä *Z. bailii* -hiivan kasvatusalustassa, sitä heikommin tämä hiiva sietää korkeaa sokeri- ja suolapitoisuutta. Heidän kehittämiensä mallien avulla on mahdollista arvioida pH:n, etikkahappo-, suola- ja sokeripitoisuuksien vaikutusta yhdessä ja erikseen pilaaja- hiivan kasvuun tuotteessa. Yhteisvaikutusta tutkittaessa dissosioitumattoman etikkaha- pon pitoisuuden lisäys rajoitti nopeammin pilaajahiivan kasvua kuin sokerin ja suolan määrän lisäys.

4.4 Tuotteeseen lisättävien aineiden vaikutus hiivoihin

4.4.1 Säilöntäaineet

Yleisimpiä elintarvikkeissa käytettyjä säilöntäaineita ovat erilaiset heikot orgaaniset hapot kuten bentsoehappo ja sen johdannaiset, etikkahappo, sorbiinihappo, propioni- happo ja sulfiitti sekä rikkidioksidi. Nämä yhdisteet tehoavat hiivoihin parhaiten alhai- sessa pH:ssa, mutta happotoleranteimmilla pilaajahiivoilla on todettu mekanismeja, joilla ne kykenevät suojautumaan näiden yhdisteiden vaikutuksilta (ks. tarkemmin 4.3.2).

Rikkiyhdisteitä käytetään hiivojen kasvunestoon lähinnä happamissa ja kuivissa tuot- teissa, kuten kuivatuissa hedelmissä sekä alkoholijuomissa. Rikkidioksidin vaikutuksen on osoitettu perustuvan yhdisteen kykyyn dissosioitua nesteessä molekulaariseksi rikki- dioksidiksi (SO_2), sulfiitiksi (SO_3^{2-}) ja bisulfiitiksi, joiden suhde määräytyy vallitsevan pH:n mukaan. Sulfiitti ja bisulfiitti voivat sitoutua irreversiibelisti elintarvikkeessa mm. sokereihin ja asetaldehydeihin ja siksi käytetyn pitoisuuden tulisi olla melko korkea (> 200 mg/l). Vain molekulaarisella rikkidioksidilla on antimikrobinen vaikutus alhaisessa pH:ssa (< 4), koska tällöin dissosioitumattomat happomolekyylit pääsevät soluun. Rik- kidioksidille vastustuskykyisten hiivakantojen on todettu erittävän solusta paljon aset- aldehydiä rikkidioksidin kanssa kasvatettaessa. Asetaldehydi sitoutuu anioniseen sulfiit- tiin vähentäen näin rikkiyhdisteiden pitoisuutta kasvatusalustassa (Fleet, 1992). Rikki- dioksidille resistenttejä hiivakantoja on mm. *Saccharomycoides ludwigii*, *Z. bailii*, *S. cerevisiae*, *P. anomala* ja *C. krusei* -lajeissa (Fleet, 1992).

Etanolia on käytetty joidenkin elintarvikkeiden suojaamiseen mikrobikasvulta, koska se alentaa tehokkaasti tuotteen veden aktiivisuutta. Etanoli tehoaa bakteereihin ja homeisiin (8–11 vol-%) paremmin kuin hiivoihin (15–18 vol-%). Monet mm. alkoholijuomia pilaavat hiivat, kuten *Z. bailii*, voivat kasvaa 18 vol-% etanolipitoisuudessa.

Natriumbentsoaatin ja kaliumsorbaatin vaikutusta on testattu erikseen ja yhdessä *Z. bailiin* kasvuun salsa-majoneesissa huoneenlämpötilassa. Vaikka kaliumsorbaatti hidasti *Z. bailiin* kasvua, ei tutkituilla pitoisuuksilla ($\leq 0,30$ p-%) voitu estää pilaantumista (Wind & Restaino, 1995). Steels *et al.* (1999) raportoivat uudesta *Z. lentus*-pilaajahiivasta, joka oli hyvin resistentti tutkituille säilöntäaineille (etikka-, sorbiini-, bentsoehappo, etanoli, dimetyylikarbonaatti eli DMDC, Velcorin™). Sen säilöntäaineiden sietokyky oli verrattavissa säilöntäaineita hyvin sietävien vertailukantojen sietokykyyn (*S. cerevisiae*, *Z. bailii*). Lisäksi sekä *Z. lentus* että vertailukannat sopeutuivat sietämään korkeita bentsoehappopitoisuuksia (600–1400 mg/l; vaihdellen eri hiivakannoilla). *Z. lentus* osoittautui tutkituissa olosuhteissa resistentiksi myös DMDC:lle, kun taas *Z. bailii* ja *S. cerevisiae* olivat herkempiä sen vaikutukselle. DMDC:tä käytetään mikrobikasvun estämiseen viineissä, virvoitusjuomissa ja oluessa. Se hydrolysoituu vedessä hitaasti tuottaen pieniä määriä CO₂:ia ja metanolia. Vaikutus on siis pitkäaikainen.

4.4.2 Biologiset tekijät

Kitiini on veteen liukenematon polysakkaridi (poly- β -1,4-asetyyli-glukosamiini), jota syntetisoidaan eliökunnassa vuosittain 10⁹–10¹⁰ tonnia. Sitä on runsaasti etenkin äyriäisten ja simpukoiden kuorissa sekä homeiden (noin 20–30 %) soluseinässä. Hiivasoluilla on kitiiniä kuivapainosta 1–3 %. Kitosaania voidaan valmistaa kitiinistä emäksisellä deasetylaatiolla ja siitä on olemassa runsaasti erilaisia kemiallisia muunnoksia (Shahidi *et al.*, 1999). Toisin kuin kitiini, kitosaani on polykationinen ja liukoinen happamissa olosuhteissa ja reagoi herkästi negatiivisesti varautuneiden komponenttien kuten proteiinien, anionisten polysakkaridien, rasvahappojen ja fosfolipidien kanssa. Kitosaania käytetään hyvin monissa eri sovelluksissa esimerkiksi elintarviketeollisuudessa mehujen kirkastajana, pH:n säätelijänä, ravintolisänä ja pilaajaorganismien kasvun estäjänä (Shahidi *et al.*, 1999).

Roller & Covill (1999) raportoivat kitosaani-glutamaatin antimikrobisista vaikutuksista erilaisiin pilaajahiivoihin omenamehussa (pH 3,5, 25°C). Kitosaani inhiboi kaikkien tutkittujen pilaajahiivojen kasvua. Etenkin *Z. bailii* oli hyvin herkkä kitosaanille. Useimpien pilaajahiivojen inaktivoimiseen omenamehusta kahdeksi viikoksi riitti hyvin matala kitosaanipitoisuus (0,1 g/l). Jotkut hiivat (mm. *S. cerevisiae*) pystyivät kasvaamaan, kun juomaa säilytetään yli 14 vrk, jolloin kasvu estettiin 0,4 g/l kitosaanipitoisuudella. Kontaminoituneesta siideristä eristetty *S. ludwigii* oli tutkituista pilaajahiivo-

voista kestävin, sillä vasta 5 g/l pitoisuus kitosaania esti hiivan kasvun täysin 14 vrk aikana. Rhoades & Roller (2000) osoittivat kitosaanin estävän pilaajahiivojen kasvua hedelmämehussa. Kitosaanin antimikrobinen aktiivisuus eri elintarvikematriiseissa vaihteli.

Kitinaasi on *Penicillium janthinellium* -homeen tuottama entsyymi, jonka tehoa elintarvikkeita pilaaviin mikrobeihin on tutkittu jonkin verran (Fenice *et al.*, 1999). Fenice *et al.* (1999) osoittivat kitinaasin ja suurpaineen käytön yhdessä olevan tehokas menetelmä *Mucor plumbeus* -homeen inaktivointiin (ks. tarkemmin kohta 4.7).

Haihtuvien kasviöljyjen antimikrobisista vaikutuksista hiivoihin on vähän tietoa. Manguena & Muyima (1999) tutkivat muutamien eteläafrikkalaisten kasvien haihtuvien öljyjen tehoa elintarvikkeita pilaaviin hiivoihin. Tutkituista kasveista *Artemisia afran* haihtuvat öljyt estivät tutkittujen hiivojen kasvua. Inhibition voimakkuuteen vaikutti antimikrobisen aineen pitoisuus.

Nisiini on *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* -maitohappobakteerin tuottama noin 34 aminohaposta muodostuva proteiini, joka kestää autoklavointia ja on tehokas etenkin grampositiivisten bakteerien inhibiittori (Montville & Chen, 1998). Dielbandhoesing *et al.* (1998) osoittivat, että nisiini ei vaikuta ehjiin *S. cerevisiae* -soluihin. Kuitenkin *S.* kasvuvaiheen solut olivat herkkiä, koska tällöin solujen permeabiliteetti oli suurimmillaan. Tiettyjen hiivan soluseinän proteiinien (Cwp1p, Cwp2p) osoitettiin olevan keskeisiä solun nisiiniresistenssissä. Vastaavasti ter Steeg *et al.* (1999) totesivat nisiinin olevan *S. cerevisiae*en kasvun inhibiittori vain, jos soluseinää oli ensin heikennetty tai jos esim. Cwp2-proteiini puuttuu. Tällöinkin antimikrobisen tehon saavuttaminen edellytti korkeaa nisiinipitoisuutta (> 50 µg/ml). Toinen maitohappobakteeriperäinen, hiivoille mahdollisesti antimikrobinen peptidi on pediosiini, jota tuottaa *Lactobacillus pentosus*. Sen on havaittu estävän useiden bakteerien kasvua ja inhihoivan hieman myös *C. albicansin* kasvua (Okkers *et al.*, 1999).

Lowes *et al.* (2000) osoittivat *Williopsis mrakii* -hiivan tuottamalla mykosiinitoksiinilla (HMK) olevan antimikrobista vaikutusta rehujen ja jogurtin pilaajahiivoihin. Toksiini on lämpöstabiiili, happostabiili ja vaikuttaa moniin eri hiivalajeihin. Toksiini esti *C. krusein* ja *S. cerevisiae*en kasvun täysin eri lämpötiloissa (4, 10, 20 °C) inkuboidussa jogurtissa. Toksiini inaktivoi hiivasolut sitä nopeammin mitä nopeammin viljelmä kasvaa.

4.5 Prosessimenetelmien vaikutus hiivoihin

4.5.1 Lämpökäsittely

Erilaiset lämpökäsittelyt ovat tavallisin menetelmä mikrobien inaktivoimiseksi elintarvikkeiden raaka-aineista tai valmiista tuotteesta. Elintarvikkeen rakenne ja kemiallinen koostumus määräävät tuotteelle soveltuvan kuumennuskäsittelyn ja toisaalta myös kuumennuskäsittelyn antimikrobisen tehon. Pastöroitaessa tuote kuumennetaan lyhyeksi ajaksi yli 62 °C:een. Mitä korkeampaa lämpötilaa käytetään, sitä lyhyempi käsittelyaika yleensä on. Lämpötila-aika yhdistelmä riippuu tuotteen ominaisuuksista. D-arvoa (*decimal reduction time*) käytetään usein ilmaisemaan kuumennuskäsittelyn antimikrobista vaikutusta tutkittavaan mikrobiin. Se on aika, jonka kuluessa mikrobien lukumäärä näytteessä laskee tietyssä lämpötilassa yhden log-yksikön. Taulukossa 17 on esitelty joidenkin hiivojen lämmönkestävyyttä + 60 °C:ssa. Lämpökäsittely voi tuhota solun tai vahingoittaa sitä, jolloin solun elpymiskykyyn vaikuttavat vaurioitumisasteen lisäksi ympäristötekijät (mm. pH, säilöntäaineet). Elintarvikkeita voidaan kuumentaa veden, höyryn, ilman, ultraäänen, valon, sähköön sekä mikroaaltojen avulla.

Lämpökäsittely vaikuttaa etenkin ribosomeihin, mutta myös nukleiinihappoihin sekä solujen ja solumembraanien proteiineihin kuten entsyymeihin (Abee & Wouters, 1999). Suurin osa hiivasoluista kuolee 50 °C:ssa 30 minuutissa tai 60 °C:ssa 10 minuutissa. Lämpöresistentit *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Z. bailii* ja *Z. rouxii* -kannat saattavat selvitä 20 minuutin kuumennuksesta 62 °C:ssa, mutta eivät 65 °C:ssa (Déak, 1991). Korkea sokeri- tai suolapitoisuus suojaa näitä aineita sietäviä hiivoja kuumennuskäsittelyssä, kun taas suolalle herkän hiivan (esim. *Rhodotorula rubra*) tuhoamiseen korkea suolapitoisuus yhdistettynä kuumennuskäsittelyyn tehoaa hyvin (Déak, 1991; Fleet, 1992). Hiivojen itiöt ovat vegetatiivisoluja kestävämpiä kuumennukselle. Esimerkiksi *S. cerevisiae*en koteloitiöiden D-arvo oli 55 °C:ssa 106 minuuttia ja vegetatiivisolujen 0,9 minuuttia.

Taulukko 17. Lämpökäsittelyn vaikutus pilaajahiivojen elävyyteen. (Fleet, 1992).

Hiivalaji	D60 °C (min)		
	kasvulliset solut	itiöt	alustassa 60 % glukoosi
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,1–0,4	4–13	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	0,1–0,4	0,5–4	2,5–10
<i>Z. rouxii</i>		2–5	2,5–10

D60 °C = aika, jossa inkubointi +60 °C:ssa laskee näytteen hiivasolujen määrää yhdellä logaritmisella yksiköllä.

pH:n alentaminen ja säilöntäaineiden (kaliumsorbaatti tai natriumbentsoaatti; 0,1–1,0 %) tai orgaanisten happojen, etenkin asetaatin, lisäys heikentävät hiivojen lämmönkestävyyttä (Déak, 1991). Toisaalta alhainen veden aktiivisuus kompensoi mainittujen te-

kijöiden antimikrobista tehoa kuumennuskäsittelyssä. Etanolin on havaittu herkistävän hiivaa lämpökäsittelylle, mistä on ollut hyötyä esimerkiksi pulloitettaessa viinejä kuumennettuina.

Lämpökäsittelyjen vaikutusta hiivoihin solu- ja molekyyllitasolla on tutkittu paljon ja erilaisia mekanismeja on kuvattu (Gustin *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2000). Lämpökäsittelyn on osoitettu aktivoivan hiivasoluissa hsp104-proteiiniryhmän (hsp; *heat shock protein*), joka käynnistää solun suojautumismekanismeja sekä auttaa hiivaa sopeutumaan lämpöstressiin (Tamura *et al.*, 1998). Gustin *et al.* (1998) raportoivat lämpökäsittelyn aktivoivan *S. cerevisiaella* nk. mitogeneeni-aktivoitu proteiinikinaasi -reiteistä *cell integrity* -reitit. Reitin aktivoitumisen on havaittu vaikuttavan mm. hiivasolun sopeutumiseen kohonneisiin lämpötiloihin sekä soluseinäkomponenttien synteesiin ja solunsisäiseen glyserolipitoisuuteen (Gustin *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2000). Lämpökäsitteltyt *S. cerevisiae* -solut syntetisoivat trehaloosia ja glyserolia, joiden on oletettu suojaavan hiivasolua kohonneelta lämpötilalta (Carvalho *et al.*, 1999).

4.5.2 Kylmäsäilytys

Hyvin monet pilaajahiivat kasvavat jääkaappilämpötiloissa ja muutamien lajien kuten *C. zeylanoideksen*, *C. laurentiin* ja *D. hanseniin* on raportoitu kasvavan alle 0 °C:ssa (Fleet, 1992; Steels *et al.*, 1999). Hiivojen minimikasvulämpötila voi nousta, jos tuotteen sokeripitoisuutta nostetaan tai tuotteeseen lisätään antioksidantteja, etanolia tai natriumbikarbonaattia (Fleet, 1992). Lisäksi antimikrobisten aineiden, kuten etanolin, teho on havaittu olevan voimakkaampi alle 5 °C:ssa. Toisaalta Beney *et al.* (2000) raportoivat päinvastaista. He osoittivat *S. cerevisiae* -solujen kestävän korkeaa osmoottista painetta (≤ 100 MPa) paremmin matalassa lämpötilassa (5 ja 11 °C). Korkeammasa lämpötilassa (15 ja 22 °C) kuolleisuus kasvoi nopeasti ≥ 50 MPa osmoottisessa paineessa.

Hiivojen pakastaminen hitaasti -15–-25 °C:seen ja säilytys tässä lämpötilassa on niille vahingollisempaa kuin nopea jäädyttäminen -80–-196 °C:seen. Elintarvikkeissa olevien sokerien, aminohappojen, tärkkelyksen ja proteiinien on havaittu suojaavan hiivaa pakastettaessa, kun taas säilöntäaineet ja orgaaniset hapot heikentävät hiivojen elinkykyisyyttä. Osmotoleranttien hiivojen, kuten *Z. rouxiin*, on osoitettu vahingoittuvan pakastettaessa herkemmin kuin muiden hiivojen. Tämän on oletettu johtuvan osmotoleranttien hiivojen membraanin rakenteesta sekä solun erilaisesta metabolisesta aktiivisuudesta (Déak, 1991).

Kun Betts *et al.* (2000) tutkivat lämpötilan (1–22 °C), suolapitoisuuden (0,5–10 %, w/v) ja pH:n (2,6–6,3) yhteisvaikutusta tavallisimpiin elintarvikkeiden pilaajahiivoihin, vaikutti lämpötila eniten lag-vaiheen pituuteen. Säilytyslämpötilan laskiessa 15 °C:sta 1 °C:seen pidentyi lag-vaihe 15 tunnista 875 tuntiin (= noin 36 vrk). Muiden stressitekijöihin, kuten osmoottisen paineen ja alhaisen pH:n, vaikuttaessa saattoi lag-vaihe olla 1 °C:ssa vielä pidempi. Tutkimuksessa havaittiin, että pilaajahiivat voivat kasvaa pitkänkin lag-vaiheen jälkeen eksponentiaalisesti ja pilata tuotteen nopeasti, mikä on tärkeää ottaa huomioon määrittettäessä elintarvikkeelle varastointilämpötilaa ja -aikaa.

4.5.3 Paine

Suurpainekäsittelyn taustalla on kaksi pääperiaatetta: isostaattisuuden periaate ja le Chatelierin periaate. Isostaattisuuden takia paine kohdistuu tuotteeseen heti ja tasaisesti riippumatta tuotteen koosta ja muodosta. Tämä on suuri etu verrattuna perinteiseen lämpökäsittelyyn, sillä mm. käsittelyajat lyhenevät. Le Chatelierin periaatteen mukaan korkea paine suosii reaktioita, jotka johtavat tilavuuden pienenemiseen. Tilavuutta pienentävät reaktiot nopeutuvat ja tilavuutta suurentavat reaktiot estyvät. Paineen lisäys suosii vetysidoksia, kun taas ionisidokset rikkoutuvat. Pienimolekyyliset yhdisteet, kuten monet aistittavaan ja ravitsemukselliseen laatuun vaikuttavat aineet, säilyvät painekäsittelyssä muuttumattomina. Sen sijaan isojen molekyylien, kuten hiilihydraattien ja proteiinien, rakenne ja toiminta muuttuvat painekäsittelyn vaikutuksesta. Suurpainetekniikka voidaan käyttää mm. elintarvikkeiden säilyvyyden parantamiseen ja rakenteen muokkaamiseen.

Painekäsittely voidaan tehdä alhaisessa lämpötilassa, jolloin raaka-aineen monet tärkeät laatutekijät saadaan pysymään muuttumattomina. Suurpainetekniikka on lisäys elintarvikkeiden prosessointiin käytettävissä oleviin yksikköoperaatioihin, ja se voi mahdollistaa uusien tuotteiden ja prosessien kehittämisen (Knorr, 1995). Suurpainekäsittelyn tärkeimmät prosessimuuttujat ovat paine, käsittelyaika ja käsittelylämpötila, joita muuttelamalla saadaan käsittelyn tehoa säädeltyä.

Paine tuhoaa mikrobeja vaikuttamalla samanaikaisesti useisiin kohtiin mikrobissa, mm. vaurioittamalla solukalvoa ja inaktivoimalla tärkeitä entsyymejä. Suurpainekäsittelyssä solukalvon läpäisevyys muuttuu, jolloin soluista poistuu vettä ja liuoksia ja solun tilavuus pienenee huomattavasti (Hayert *et al.*, 1997). Painekäsittely 300–600 MPa:ssa inaktivoi hiivat, homeet ja suurimman osan vegetatiivisista bakteereista mukaan lukien monet patogeeniset bakteerit. Painekäsittely on täten varteenotettava vaihtoehto lämpöpastöroinnille, koska paine ei vaikuta pieniin molekyyliin kuten moniin aromiaineisiin ja vitamiineihin. Vasta erittäin korkea paine (>1000 MPa) tuhoaa bakteerien itiöt. Bakteeri-itiöt voidaan kuitenkin ärsyttää itämään 50–300 MPa:n paineella, jonka jälkeen

ne voidaan tuhota varsin miedoilla lämpö- tai painekäsittelyillä. Pieni osa itiöistä voi kuitenkin säilyä hengissä tästä käsittelystä, joten suurpainekäsittelyä ei voi pitää täysin toimivana sterilointimenetelmänä (Smelt, 1998). Hiivat ovat varsin herkkiä painekäsittelylle, sillä 300–400 MPa käsittely muutaman minuutin ajan 20 °C:ssa voi vähentää hiivojen määrää yli 6 log-yksikköä (Patterson, 1999).

Yleensä kuumuutta kestävät mikrobit kestävätkin myös painetta hyvin, mutta säännöstä on useita poikkeuksia. Hiivojen ja homeiden vegetatiivimuodot inaktivoituvat 200–300 MPa:n paineessa ja niiden itiöt noin 400 MPa:n paineessa. Gram-positiiviset bakteerit kestävätkin kuumuutta ja painetta paremmin kuin Gram-negatiiviset. Virukset ovat heterogeenisiä ja niiden paineenkesto vaihtelee suuresti (Smelt, 1998).

Mikrobien kestävyys suurpainekäsittelyssä vaikuttavat monet tekijät, kuten mikrobien määrä ja ominaisuudet, lämpötila, käsiteltävä materiaali, paineen voimakkuus ja käsittelyaika (Palou *et al.*, 1998b, Abee & Wouters, 1999). Jopa mikrobikantojen välillä voi olla eroja herkkyydessä suurpainekäsittelylle, samoin kuin mikrobin kasvuvaiheella. Hiivojen on todettu olevan eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa herkempiä painekäsittelylle kuin stationäärivaiheessa, jossa solujen metabolinen aktiivisuus on hidastunut ja soluihin saattaa olla akkumuloitunut varastoaineita, jotka voivat lieventää paineen vaikutusta soluihin (Palou *et al.*, 1998b).

Elintarvikkeen koostumus ja mikrobisto vaikuttavat merkittävästi suurpaineen mikrobisidiseen tehoon. Hiivasolut olivat herkempiä suurpainekäsittelylle korkeammassa veden aktiivisuudessa (0,98) kuin a_w arvon ollessa 0,95 (Palou *et al.*, 1998b). Havainto on merkittävä kehitettäessä suurpainetekniikkaan perustuvia yhdistelmätekniisiä menetelmiä mikrobien inaktivoimiseksi elintarvikkeista. 340 MPa:n paine 90 minuutin ajan ei riittänyt kokonaan tuhoamaan *Salmonella*-bakteeria (alkupitoisuus 10^7 pmy/ml) kanaliemestä tai puskurista, kun taas erilaisiin hedelmämehuihin siirrostettu *S. cerevisiae* (alkupitoisuus 10^6 pmy/ml) inaktivoitui kokonaan kolmessa minuutissa 280 MPa:n paineessa. Hiivat tuhoutuvat bakteereja herkemmin ja toisaalta mehut ovat happamampia kuin kanaliemi tai puskuriliuos (Hoover *et al.*, 1989). Tuotteen pH voi vaikuttaa painekäsittelyn tehoon, tosin tutkimustulosten perusteella vaikutus vaihtelee tuotteen ja mikrobin mukaan. Puskuriliuoksissa tehdyissä tutkimuksissa mikrobit yleensä tuhoutuvat helpommin kuin vastaavissa olosuhteissa oikeissa elintarvikkeissa (Patterson, 1999). Taulukkoon 18 on koottu muutamia esimerkkejä suurpainekäsittelyn vaikutuksesta hiivojen määrään eri tuotteissa.

Taulukko 18. Esimerkkejä suurpaine käsittelyn vaikutuksesta hiivojen määrään eräissä tutkimuksissa.

Tuote	Paine (MPa)	Aika (min)	Lämpötila (°C)	Mikrobilaji/ryhmä	Vaikutus ¹	Viite
ananaspalat	200	5–60	4, 21 ja 38	hiivat ja homeet	0,3–1,2 log-yks. väh.	Alemán <i>et al.</i> , 1994
	270	5–60	4, 21 ja 38		0,3–2,3 log-yks. väh.	
	340	5–60	4, 21 ja 38		1,4–4,0 log-yks. väh.	
ananasmehu	270	0,7 6,7	n. 23	<i>S. cerevisiae</i>	0,7 log-yks. väh. 5,1 log-yks. väh.	Alemán <i>et al.</i> , 1996
malliaine	345	5	21	<i>Z. bailii</i>	6 log-yks. väh.	Palou <i>et al.</i> , 1998b
banaanisose	517	10	21	hiivat ja homeet	määrä < 10 log (pmy/g) 15 vrk 25 °C:ssa	Palou <i>et al.</i> , 1999
	689	10				
avokadosose	345, 517 ja 689	10, 20 ja 30	21	hiivat ja homeet	määrä < 10 log (pmy/g) 100 vrk 5, 15 ja 25 °C:ssa	López-Malo <i>et al.</i> , 1998
mansikkapalat nektarissa	500– 600	3	ei tiedossa	hiivat	5 log-yks. väh.	Carpi <i>et al.</i> , 1996

¹ log-yks. väh. = logaritmiyksikön väheneminen mikrobimäärässä

Pastöroituun appelsiinimehuun siirrostettujen *S. cerevisiae*en koteloititöiden D-arvo (decimal reduction time) 350–500 MPa:n (25 °C) painekäsittelyssä oli 4–76 s ja vegetatiivisolujen 1–38 s. Pastöroimattoman appelsiinimehun luontaisen mikrobiflooran D-arvo oli 3–74 s. Paineen nostaminen noin 100 MPa:lla kasvattaa *S. cerevisiae*en inaktivoitumisnopeuden kymmenkertaiseksi (Parish, 1998).

Oskilloiva painekäsittely lyhensi *Z. bailiin* määrän vähentämiseen 6 log-yksikköä tarvittua aikaa verrattuna tasaisessa paineessa tehtyyn käsittelyyn (Palou *et al.*, 1998a). Pulssitettu painekäsittely on myös osoittautunut tehokkaammaksi kuin vastaava yhtäjaksoinen käsittely (Alemán *et al.*, 1996, 1998).

Suurpaine prosessia suunniteltaessa pitää ottaa huomioon hiivojen tuhoutumisen lisäksi myös muiden mikrobien, erityisesti pilaajamikrobien ja patogeenien, tuhoutuminen sekä tuotteen aistittavan ja muun laadun säilyminen. Tuotteen aistittavat ominaisuudet voivat muuttua suurpaine käsittelyssä erilaisiksi kuin perinteisessä lämpökäsittelyssä ja tuotteen mukaan muutos voi olla haitallinen tai myönteinen.

Suurpaine tekniikasta on EU:ssa vielä suhteellisen vähän kokemusta, joten se on EU-asetuksen (EY 258/97) mukainen uusi elintarvikkeiden valmistusprosessi. Ennen kuin suurpaine käsitellyt tuotteet hyväksytään markkinoille, niille on haettava hyväksyntä uusielintarvikelautakunnalta. Valmistajan tulee hakemuksessaan osoittaa elintarvikkeen

turvallisuus. Parhailaan arvioitavana on mm. uuselintarvikehakemus suurpainepastöroiduista hedelmistä elintarvikkeiden ainesosina (Elintarvikevirasto, 1999).

4.5.4 Ultraääni

Elintarviketeollisuudessa ultraääntä käytetään mm. sekoittamisessa, rasvojen ja öljyjen emulgoinnissa ja lihan mureuttamisessa. Suuritehoista ultraääntä (taajuudet 20–100 kHz) käytetään laajasti myös puhdistamisessa (Kinnunen *et al.*, 1998). Ultraäänen vaikutuksesta käsiteltävään aineeseen muodostuu kuplia, joiden hajotessa syntyy paikallisesti hyvin korkeita paineita ja lämpötiloja. Käsittely hajottaa biologisia rakenteita ja riittävän suuria taajuuksia käytettäessä se voi aiheuttaa solujen kuoleman. Ultraääntä voidaan käyttää tehostamaan lämpökäsittelyn, kuten pastöroinnin, mikrobeja inaktivoivaa vaikutusta. Käsiteltäessä *S. cerevisiae* -viljelmää etenkin alle 50 °C:ssa ultraäänen käyttö (taajuus 20 kHz) lisäsi lämpökäsittelyn tehoa verrattuna lämpökäsittelyihin yli 50 °C:ssa (López-Malo *et al.*, 1999). Ultraäänen käyttöä elintarvikkeiden prosessoinnissa on esitelty laajemmin Tekesin teknologiakatsauksessa Elintarvikkeiden uudet prosessointi- ja kypsennysmenetelmät (Kinnunen *et al.*, 1998).

4.5.5 Valopulssit

Valopulsseja voidaan käyttää kirkkaiden nesteiden, läpinäkyvien pakkausmateriaalien sekä tuotteiden pintojen mikrobipitoisuuksien alentamiseen. Valopulssikäsittelyllä tuotteelle saadaan tuoreenkaltaiset ominaisuudet, koska tuote ei lämpene. Mikrobiologinen vaikutus perustuu perättäisten hiili-hiili-kaksoissidosten absorptioon 200–500 nm:n alueella. Tällaisia sidossysteemejä on valkuaisaineissa ja aminohapoissa. Absorptio ja sitä kautta paikallinen lämpeneminen aiheuttaa vaurioita mikrobien DNA:ssa, mikä johtaa mikrobien kuolemaan. Läpinäkyvillä pakkauksilla ja kirkailla nesteillä saavutetaan jopa 7–9 log-yksikön alenemia mikrobipitoisuuksissa. Menetelmä ei tehoa itiöihin. Käsittelemällä pulssitetulla valolla (200 pulssia), jonka UV-valopitoisuus oli korkea, saatiin *S. cerevisiae* -hiivan pitoisuutta agarin pinnalla vähennettyä noin 5 log-yksikköä (Rowan *et al.*, 1999).

Valopulssien käyttöä elintarvikkeiden prosessoinnissa sekä muita uusia prosessimenetelmiä on esitelty Tekesin teknologiakatsauksessa Elintarvikkeiden uudet prosessointi- ja kypsennysmenetelmät (Kinnunen *et al.*, 1998).

4.6 Pakkaustekniset menetelmät

Elintarvikkeiden säilyvyyttä lisääviä pakkausteknisiä menetelmiä ovat muunnetun ilma-kehän pakkaaminen (MAP, modified atmosphere packaging), johon kuuluvat mm. suojakaasupakkaaminen sekä erilaisia aktiivisen pakkaamisen muotoja kuten esim. hapenpoistajat, hiilidioksidin ja etanolinerittäjät, kosteudenpoistajat ja antimikrobiset pakkauskalvot. Aktiivisia ja älykkäitä pakkaustekniikoita on esitelty tarkemmin julkaisuissa ”Aktiiviset ja älykkäät pakkaukset elintarvikkeiden laadun varmistajina” (Vaari *et al.*, 1994), ”Technical report: Active and smart packaging of food” (Hurme *et al.*, 1998) ja ”Active and smart packaging for food products” (Ahvenainen *et al.*, 1999).

4.6.1 Suojakaasupakkaaminen

Suojakaasupakkaamisessa tuotetta ympäröivän kaasukehän koostumus muutetaan normaalin ilman kaasukoostumuksesta poikkeavaksi. Suojakaasupakkaamisessa käytetään yleensä joko yksinään tai erilaisina seoksina hiilidioksidia, typpeä ja happea. Hiilidioksidi on tehokas gram-negatiivisten aerobisten pilaajabakteerien ja homeiden kasvun estäjä, mutta voi hidastaa myös joidenkin hiivojen kasvua. Suurina pitoisuuksina hiilidioksidi saattaa aiheuttaa elintarvikkeisiin hapanta hajua ja makua. Lisäksi hiilidioksidi liukenee hyvin nesteeseen eli kosteisiin ja rasvaisiin elintarvikkeisiin, mikä johtaa pakkauksen painumiseen kasaan.

Happi estää anaerobisten bakteerien kasvua, mutta edistää aerobisten pilaajabakteerien kasvua ja aiheuttaa rasvojen hapettumista sekä vitamiinien ja aromiaineiden hajoamista. Hiivojen kasvua happi ei ehkäise, koska hiivat ovat useimmiten fakultatiivisesti anaerobeja eli ne voivat kasvaa sekä hapen läsnä ollessa että ilman sitä. Lisäksi hiivat voivat vaihtaa energian tuottonsa hengityksestä käymiseen olosuhteiden mukaan (Stanier *et al.*, 1980).

Typpi on inertti kaasu, joka ei vaikuta mikrobien kasvuun eikä reagoi elintarvikkeen kanssa. Typpeä käytetään hapen korvaamisessa eli täytekaasuna pakkauksissa. Se estää pakkauksen kokoon painumista, koska se liukenee huonosti sekä veteen että rasvaan ja täten myös pakattuun tuotteeseen.

4.6.2 Hapenpoistajat

Hapen poistaminen pakkauksen sisältä voidaan tehdä suojakaasupakkaamisen ja vakuumpakkaamisen lisäksi myös hapenpoistajalla. Hapenpoistajien käytön etuna on, että oikein mitoitettu hapenpoistaja laskee happipitoisuuden pakkauksessa jopa alle

0,0001 %, mikä ei olisi edes taloudellista fysikaalisia menetelmiä käyttämällä (Abe & Kondoh, 1989). Lisäksi hapenpoistaja poistaa pakkausmateriaalin ja saumojen läpi tulevan hapen sekä esim. huokoisten elintarvikkeiden (leipomotuotteet) sisälle jäävää hapeta. Käyttämällä hapenpoistajia elintarvikepakkauksissa voidaan estää hapen aiheuttamia virheitä eli estää pilaajabakteerien, homeiden ja myös joidenkin hiivojen kasvua, öljyjen ja rasvojen hapettumista ja värimuutoksia.

Hapenpoistajien toiminta perustuu yleensä yhteen tai useaan seuraavista reaktioista tai reagensseista: rautajauheen hapettuminen, askorbiinihapon hapettuminen, valoherkän väriaineen hapettuminen, entsyymaattinen hapettumisreaktio (esim. glukoosi- tai etanolioksidaasi), metallisuolat, tyydyttämättömät rasvahapot (esim. öljyhappo tai linoleeni-happo), kiinteään aineeseen immobilisoitu hiiva ja näiden erilaiset yhdistelmät (Floros *et al.*, 1997).

Hapenpoistajien toimintaan vaikuttavia tekijöitä pakkauksessa ovat lämpötila, aika, tuotteen veden aktiivisuus ja hapenpoistajan sijainti pakkauksessa. Hapenpoistaja voi olla esimerkiksi

- erillisenä pussina tai tarrana, joka laitetaan pakkauksen sisälle
- liitettynä pakkauskalvoon
- liitettynä pullon korkkiin (nestemäiset elintarvikkeet)
- hapettumisen estoaineena, jolloin se on sekoitettu suoraan elintarvikkeeseen.

Hapenpoistajista on olemassa useita kaupallisia ratkaisuja (taulukko 19) sekä monia patenteja. Hapenpoistajien sekä hiilidioksidin erittäjien käyttöä ja käytön kustannuksia on esitelty Pakkausteknologiaryhmä r.y:n raportissa ”Hapenpoistajien ja kaasunerittäjien sovellettavuus elintarvikkeiden pakkaamisessa” (Hurme & Ahvenainen, 1997).

Taulukko 19. Kaupallisia hapenpoistajia ja niiden valmistajia.

Toimintamuoto	Kauppanimi	Valmistaja/myyjä	Maa
- Reagenssipussi tai tarra:	Ageless [®]	Mitsubishi Gas Chemical Co.	Japani
	ATCO [®]	Standa Industrie	Ranska
	Bioka	Bioka Oy	Suomi
	Freshilizer [®]	Toppa Printing CO.	Japani
	Freshpax [®] Freshmax [®]	Multisorb Technologies Inc.	USA
	Sanso-Cut	Finetec Co.	Japani
	Vitalon [®]	Toagosei Chem. Industry Co.	Japani
- Valmis pakkauskalvo tai liitettävissä pakkausmateriaaleihin:	Oxyguard	Toyo Seikan Kaisha	Japani
	Oxbar [™]	Carnaud-Metal Box	UK
	Amosorb [®]	Amoco Chemicals	USA

Leskinen (1988) vertaili jauhelihapin säilyvyyttä käytettäessä pakkauksissa erilaisia hapenpoistomenetelmiä (suojakaasupakkaaminen ja erilaiset hapenpoistajat) tai normaalia ilmaa. Tulosten mukaan kaikilla tavoilla tapahtunut hapenpoisto esti homeiden ja hiivojen kasvun jauhelihapinveissä. Hapenpoistajien ja kaasunerittäjän (hiilidioksidin erittäjä) käyttö kaasupakatuissa tuotteissa, kuten kinkkumakkaroissa, kinkkupizzassa ja raa'assa broilerissa, pidensi näiden tuotteiden aistinvaraisen laadun säilymistä ja hidasti jonkin verran homeiden ja hiivojen kasvua (Hurme & Ahvenainen, 1997). Taulukossa 20 on esitetty muutamia esimerkkejä VTT Biotekniikassa tehdyistä elintarvikkeiden säilyvyys- ja pakkaustutkimuksista, joissa suojakaasupakkaaminen tai hapenpoistaja hidastivat hiivojen kasvua. Ooraikul (1991) on todennut, etteivät anaerobiset olosuhteet (esim. suojakaasu) tai hapenpoistajat vaikuta hiivojen kasvuun leipomotuotteissa. Menetelmät, joilla voitaisiin rajoittaa hiivojen kasvu ovat a) säilöntäaineiden käyttö sekä b) pakkauksen kaasutilassa käytettävät desinfioivat kaasut, kuten esim. etanoli.

Taulukko 20. Esimerkkejä elintarvikkeiden suojakaasupakkaamisen ja hapenpoistajan käytön vaikutuksesta hiivojen kasvuun verrattuna normaaliin ilmaan pakattuun näytteeseen. Vaikutus: – hiivojen kasvu hitaampaa kuin ilmapakkauksessa.

Elintarvike	Suojakaasupakkaaminen (kaasuseos CO ₂ + N ₂)	Hapenpoistaja	Kirjallisuuslähde
Sillisalaatti	–	(ei tutkittu)	Ahvenainen, R. 1989. Gas packaging of chilled meat products and ready-to-eat foods. VTT Publications 58, Espoo. 68 p. + app. 80 p.
Jauhelihapihvi	–	(ei tutkittu)	Ahvenainen, R. 1989. Gas packaging of chilled meat products and ready-to-eat foods. VTT Publications 58, Espoo. 68 p. + app. 80 p.
Viipaloitu kinkku ⁽¹⁾	–	(ei tutkittu)	Ahvenainen, R. 1989. Gas packaging of chilled meat products and ready-to-eat foods. VTT Publications 58, Espoo. 68 p. + app. 80 p.
Kinkkupizza	–	–	Julkaisematonta tietoa (Hurme, E. ja Ahvenainen, R. 1994)
Broilerpyörykkä	(ei tutkittu)	–	Heiska, K. 1998. Broilerpyöryköiden säilyvyyden mallitus ja pakkauksen optimointi. EKT-sarja 1142, Helsingin yliopisto. 118 s.
Raa'at kalafileet	–	–	Lyijynen, T. 1996. Ahven- ja kuhafileiden säilyvyys erilaisissa vähittäispakkauksissa. Diplomityö, TKK. 139 s. + liitt.
Lämminsavustetut kalafileet ⁽²⁾	(–)	–	Julkaisematonta tietoa (Lyijynen, T., Luoma, T., Skyttä, E. ja Myllärinen, P. 1999)

⁽¹⁾ = Verrattu näytteeseen, joka on pakattu vakuumiin, mutta viipalepinojen välille jäänyt suuri ilmatila.

⁽²⁾ = Verrattu näytteeseen, joka on pakattu vakuumiin.

4.6.3 Hiilidioksidin erittäjät

Pakkauksen kaasutilan kaasukoostumusta voidaan muuttaa myös hiilidioksidin erittäjien avulla. Hiilidioksidin erityis on kaupallisissa valmisteissa yhdistetty yleensä hapenpoistoon, joten myös tuotenimet ja valmistajat ovat samoja kuin hapenpoistajilla, esim. Ageless G (Mitsubishi Gas Chemical, Japani), Freshlizer C ja CW (Toppan Printing Co, Japani), Freshpax M (Multisorb technologies, USA) ja Vitalon G (Toagosei Chem. Ind. Co., Japani) (Vermeiren *et al.*, 1999). Hiilidioksidin erityis voi perustua mm. hapen ja rautakarbonaatin tai askorbiinihapon reaktioon. Myös pelkkiä hiilidioksidin erittäjiä on olemassa, kuten esim. Verifrais (S.A.R.L. Codimer, Ranska).

4.6.4 Etanolinerittäjät

Etanolin mikrobien kasvua estävä vaikutus perustuu etanolin veden aktiivisuutta alentavaan vaikutukseen ja toimimiseen mikrobisidisenä aineena (Shapero *et al.*, 1978). Etanolia voidaan joko sumuttaa elintarvikkeen päälle ennen pakkaamista tai pakkauksen sisälle voidaan laittaa etanolia erittäviä reagenssipusseja (etanolinerittäjä).

Kaupallisia etanolinerittäjiä ovat mm. (Vermeiren *et al.* 1999)

- Ethicap[®], Antimold[®] ja Negamold[®] (Freund Industrial Co., Japani)
- Oitech[™] (Nippon Kayaku, Japani)
- Ageless[®] type SE (Mitsubishi Gas Chemical Co., Japani)
- ET Pack (Ueno Seiyaku, Japani).

Smith *et al.* (1987) käyttivät Ethicap[®]-etanolinerittäjää omenakakulle, jota säilytettiin 25 °C:n lämpötilassa. Suojakaasuun tai ilmaan pakattuna omenakakun säilyvyys oli vain 14 vuorokautta, ja säilyvyyttä rajoittivat *S. cerevisiaen* kasvu ja hiilidioksidin tuotto. Käyttämällä etanolinerittäjää omenakakun pakkauksessa säilyvyysaika saatiin pidentettyä 21 vuorokauteen. Tokuoka *et al.* (1992) ja Naito *et al.* (1991) ovat todenneet hiivan kasvun estyvän tehokkaimmin hapenpoistaja-etanolinerittäjäyhdistelmällä. Pelkkiä etanolin erittäjiä käytettäessä hiivan kasvun on todettu estyvän PDA (Potato dextrose agar) -alustalla, kun kaasutilan etanolipitoisuus on 1,54 % (v/v) a_w :ssä 0,90 ja 0,56 % (v/v) a_w :ssä 0,85 (Smith *et al.*, 1987). Ooraikul (1991) suosittelee Ethicap:in käyttöä yhdessä tai erikseen suojakaasupakkaamisen kanssa, tuotteen a_w :n ja muiden ominaisuuksien mukaan.

4.6.5 Kosteudenpoistajat

Elintarvikkeiden pakkauksiin jäävä tai esim. kuljetuksen aikana muodostuva kosteus voi imeytyä elintarvikkeisiin, jolloin mm. mikrobien kasvuolot parantuvat, kuivien tuotteiden rakenne pehmentyy ja jauhemaiset aineet paakkuuntuvat. Elintarvikkeiden säilyvyyden parantamiseksi onkin kehitetty erilaisia kosteudenpoistajia. Kosteudenpoistajien päätarkoituksena on alentaa elintarvikkeen veden aktiivisuutta (a_w), jolloin saadaan hidastetuksi homeiden, hiivojen ja pilaajabakteerien kasvua. Kosteudenpoistaja voi olla pakkauskalvo, joka kuivattaa tai läpäisee sopivasti vesihöyryä. Kosteudenpoistajana voidaan käyttää myös pakkauksen sisälle pantavia kosteutta imeviä pusseja tai tyynyjä (Vermeiren *et al.*, 1999).

Muun muassa seuraavanlaisia kaupallisia kosteudenpoistajia on olemassa (Vermeiren *et al.*, 1999):

- nesteen absorbointityyny tai materiaali (perustuvat kosteutta absorboivaan polymeeriin): Thermarite[®] (Australia), Toppan[™] (Japani) tai Peaksorb[®] (Peakfresh Products, Australia)

- pussi tai tarra (perustuvat silikageeliin, kalsiumoksiidiin, saveen, tms.): MiniPax[®], DesiMax[®], StripPax[®] (Multisorb technologies, USA), Desi Pak[®], Sorb-It[®], Tri-Sorb[®], 2-in-1[™] (United Desiccants, USA)
- kalvo (polyvinyylialkoholi(PVA)-kerroksen välissä kosteutta imevä propyleeniglykolikerros): Pichit[™] (Showa Denko, Japani).

4.6.6 Antimikrobiset kalvot

Pakkausmateriaalien sisältämien mikrobien kasvua estävien tai hidastavien aineiden käyttö on yksi aktiivisen pakkaamisen osa-alue. Toimintaperiaatteita on yleensä kaksi: joko pakkauksen kaasutilaan erittyy mikrobien kasvua estävää ainetta tai elintarvikkeen kanssa kosketuksessa oleva pakkausmateriaali sisältää kasvua estäviä aineita (Labuza & Breene, 1989).

Kirjallisuudesta löytyy esimerkkejä antimikrobisiin kalvoihin soveltuvista tai niissä testatuista aineista, jotka estävät hiivojen kasvua:

- natamysiini (Davitson & Doan, 1993)
- natriumsorbaatti (Han & Floros, 1997)
- kitiini, kitosaani ja niiden johdannaiset (Shahidi *et al.*, 1999)
- hopea-zeoliitti (Vermeiren *et al.*, 1999).

4.7 Yhdistelmätekniisten menetelmien vaikutus hiivoihin

Yhdistelmätekniikoissa käytetään samanaikaisesti useaa erilaista mikrobien kasvua estävää tekijää tai tekniikkaa elintarvikkeen suojaamisessa, jotta raaka-aineista tai prosessista tuotteeseen joutuneet kontaminantit eivät aiheuttaisi tuotteen pilaantumista. Eri tavoilla yhdisteltäviä käsittelyitä ovat mm. kuumennus, jäähdytys tai jäädytys, happamuuden säätö heikoilla hapoilla, säilöntäaineiden käyttö, suurpaine, ultraääni, erilaiset pakkaustekniset menetelmät (esim. CO₂ ja aktiivinen pakkaaminen), veden aktiivisuuden alentaminen sekä erilaisten antimikrobisten biologisten yhdisteiden kuten nisiinin tai kitosaanin käyttö.

Esimerkkejä yhdistelmätekniikoiden soveltamisesta hiivan kasvunestoon on tullut esille jo aiemmin tässä katsauksessa tarkasteltaessa yksittäisten tekijöiden antimikrobista vaikutusta hiivoihin. Seuraavaksi esitellään vielä muutamia esimerkkejä antimikrobisten

aineiden ja tekniikoiden yhdistämisestä hiivan tai joidenkin muiden elintarvikepilaaja-mikrobien kasvun hallitsemiseksi.

Yhdistämällä painekäsittelyyn kohtuullinen lämpökäsittely tai muita tekniikoita (esim. ultraäänikäsittely tai tuotteen käsittely erilaisilla aineilla) tehostetaan paineen vaikutusta mikrobeihin. Tällöin voidaan käyttää alhaisempaa painetta vastaavan vaikutuksen saamiseksi (Knorr, 1995). Ter Steeg *et al.* (1999) raportoivat nisiinin (5 µg/ml) käytöllä yhdessä suurpainekäsittelyn (200 MPa) kanssa olevan synergistisesti inhiboiva vaikutus *S. cerevisiaen* kasvuun, vaikka vastaava suurpainekäsittely yksinäänkin inhiboi hiivan kasvua. Fenice *et al.* (1999) osoittivat kitinaasin (10 U/ml) olevan yhdessä suurpaineen (400 MPa) kanssa tehokas elintarvikkeita pilaavan *Mucor plumbeus* -homeen kasvunestäjä. Kasvunesto saavutettiin pienemmällä paineella (300 MPa) esikäsiteltäessä sieniviljelmä kitinaasilla (1 U/ml). Myös kasviperäisten eteeristen öljyjen lisääminen painekäsiteltävään tuotteeseen on osoittautunut lupaavaksi menetelmäksi. Esimerkiksi 75 µg/ml α -terpineeniä ja tunnin käsittely 180 MPa:n paineessa vähensi *S. cerevisiaen* määrää 5 log-yksiköllä, kun pelkkä painekäsittely vähensi määrää vain 2 log-yksiköllä ja pelkkä α -terpineeni ei vaikuttanut hiivan määrään lainkaan (Adegoke *et al.*, 1997). Paine käsittely alle 0 °C:n lämpötilassa (-10 ja -20 °C) tehosti huomattavasti *S. cerevisiaen* inaktivoitumista verrattuna huoneenlämmössä tehtyyn painekäsittelyyn. 190 MPa:n käsittelyllä -20 °C:ssa oli sama vaikutus kuin 320 MPa:n käsittelyllä huoneenlämmössä (Hashizume *et al.*, 1995).

Betts *et al.* (2000) tutkivat suolapitoisuuden (0,5–10 %, w/v), pH:n (2,6–6,3) ja lämpötilan (1–22 °C) yhteisvaikutusta elintarvikkeiden tavallisimpiin pilaajahiivoihin. Lämpötila osoittautui kriittisimmäksi arvioitaessa eri tekijöiden vaikutusta lag-vaiheen pituuteen. Lag-vaihe saattoi epäsuotuisissa kasvuolosuhteissa kestää jopa 40 vrk:ta. Lag-vaiheen pituus ja siihen vaikuttavat tekijät olivat merkittäviä arvioitaessa hiivojen kykyä pilata erilaisia tuotteita, sillä lag-vaiheen aikana hiivat voivat sopeutua ääriolosuhteisiin ja kasvaa sen jälkeen eksponentiaalisesti pilaten tuotteen nopeasti.

Steels *et al.* (1999) esittelivät uuden elintarvikkeita pilaavan *Z. lentus* -hiivan, joka on osmofiili, useille säilöntäaineille resistentti ja kasvaa hyvin 4–25 °C:ssa ja pH 2,2–7,0:ssä. Lajia on eristetty mm. hedelmämehuista, viineistä ja tomaattisoseesta. Tämänkaltaiset kontaminantit voidaan torjua parhaiten elintarvikkeista yhdistelmätekniisin keinoin.

4.8 Mikrobin kasvun ja tuhoutumisen ennustaminen matemaattisilla malleilla

Elintarvikkeissa esiintyvien mikrobin kasvua ja lämpökuolemista ennustavia matemaattisia malleja, joissa huomioidaan eri tekijöiden (esim. lämpötila, pH, a_w) vaikutuk-

set samanaikaisesti, on viimeisen 5–10 vuoden aikana kehitetty runsaasti. Suurin osa malleista käsittelee elintarvikepatogeenien kasvun ennustamista, mutta myös pilaajamikrobien kasvua sekä patogeenien ja pilaajamikrobien lämpökuolemista ennustavia malleja on kehitetty. Malleja voidaan soveltaa tutkittaessa yhdistelmätekniikoiden mahdollisuuksia elintarvikkeita pilaavien hiivojen kasvunestossa sekä arvioitaessa hiivojen lämmönkestoa ja erilaisten antimikrobisten menetelmien tehoa elintarvikematriiseissa.

Hiivojen kasvun mallittamista ovat tutkineet mm. Lambert ja Stratford (1999), Membré *et al.* (1999), Jenkins *et al.* (2000), López-Malo *et al.* (2000) ja Reyns *et al.* (2000). López-Malo *et al.* (2000) käyttivät matemaattista mallia (logistinen regressiomalli) arvioidakseen veden aktiivisuuden (a_w), pH:n ja kaliumsorbaattipitoisuuden merkitystä *S. cerevisiae* kasvunestossa. Mallin avulla voitiin esimerkiksi osoittaa, että hiivan kasvu estyi korkeassakin pH:ssa veden aktiivisuuden ollessa alhainen ja kaliumsorbaattipitoisuuden korkea.

McDonaldin ja Sunin (1999) katsausartikkelin mukaan saatavilla on kolme tietokonepohjaista ennustavan mikrobiologian ohjelmistoa: Pathogen Modeling Program (USDA/ARS Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit, <http://www.arserrc.gov/mfs/>), Food MicroModel (valmistaja Food MicroModel Ltd, UK) ja The Pseudomonas Predictor (Tasmanian yliopisto, Australiassa), joista kaksi ensiksi mainittua ovat käytössä VTT Biotekniikassa. Food MicroModel(FMM)-ohjelmistossa on patogeenien kasvu- ja lämpökuolemismallien lisäksi kasvumalli ja lämpökuolemismalli *S. cerevisiae* -hiivalle sekä kasvumalli *Z. bailii* -hiivalle. FMM:n hiivojen kasvumallien suuri puute on siinä, että niissä lämpötilaa ei voi syöttää lähtötietona, kuten useimmissa muissa malleissa. *S. cerevisiae* -kasvumalli kehitettiin alun perin ennustamaan *S. cerevisiae* aiheuttamaa pilaantumista viineissä. Validoinnissa on käytetty viinien lisäksi hedelmä- ja vihannesmehuja. *Z. bailii* -kasvumallin validoinnissa on käytetty hedelmämehejuja, -hilloja ja -soseita.

Kasvumalleista (taulukko 21) saadaan ennusteena kasvuunlähtöviiveaika (lag-aika), populaation kaksinkertaistumisaika, kasvunopeus (eksponentiaalisen kasvun vaiheessa), aika tietyn mikrobimäärän saavuttamiseen ja määrä tietyn ajan jälkeen sekä kaksi- ja kolmiulotteisia kuvia halutuilta olosuhdetekijöiden vaihteluväleiltä.

Taulukko 21. Food MicroModel -ohjelmiston *S. cerevisiae* ja *Z. bailii* -hiivojen kasvumallien kontrolloivat tekijät.

Tekijä	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. bailii</i>
Lämpötila	25 °C, vakio	23 °C, vakio
Etanolipitoisuus	0–12 % (tilavuus-% nestefaasissa)	
Fruktoosipitoisuus	0–50 % (paino-% nestefaasissa)	20–55 % (paino-% nestefaasissa)
a_w		0,891–0,976 *
pH	2,5–8,0	2,5–4

* vaihtoehtoinen tieto fruktoosipitoisuudelle

S. cerevisiae -kasvumallin mukaan pH:lla on vain vähäinen vaikutus *S. cerevisiae*en kasvuun. Kasvua voidaan estää lisäämällä etanoli- ja fruktoosipitoisuutta. Vedenaktiivisuutta alentavan vaikutuksen lisäksi etanolilla on myös pitoisuudesta riippuva antimikrobinen vaikutus *S. cerevisiae*en. *Z. bailii* -kasvumallin mukaan pH:lla on vähäisempi vaikutus *Z. bailii*in kasvuun kuin vedenaktiivisuudella.

Lämpökuolemismallista (taulukko 22) ennusteena saadaan aika tietyn mikrobipitoisuuden saavuttamiseksi, jäännöspitoisuus tietyn ajan jälkeen ja kaksi- tai kolmidimensioisia kuvaajia olosuhdetekijöiden vaikutuksesta.

Taulukko 22. Food MicroModel -ohjelmiston *S. cerevisiae* -hiivan lämpökuolemismallin kontrolloivat tekijät.

Tekijä	Vaihtelualue
Lämpötila	58–70 °C
Fruktoosipitoisuus	0–60 % (paino-% nestefaasissa)
pH	2,4–5,5

Mallin mukaan lämpötila vaikuttaa eniten *S. cerevisiae*en tuhoutumiseen. Alhainen vedenaktiivisuus suojaa *S. cerevisiae*eta lämpökäsittelyssä. Kun vedenaktiivisuus on alhainen, myös matala pH tuo lisää suojavaikutusta. Vedenaktiivisuusarvojen kohotessa pH:n vaikutus vähenee ja muuttuu päinvastaiseksi kuin matalilla vedenaktiivisuusarvoilla.

5. Hiivojen osoittaminen elintarvikkeista

Hiivojen määrittämiseen ja osoittamiseen elintarvikkeista käytetään perinteisesti viljelymenetelmiä, jotka perustuvat näkyvän pesäkkeen muodostumiseen yksittäisestä solusta sen kasvaessa kiinteällä alustalla tai nestemäisen viljelmän samentumiseen. Elintarvikkeiden hiivakontaminaation osoittamiseen on kehitetty myös viljelyä nopeampia, nk. pikamenetelmiä, jotka perustuvat suoraan solulaskentaan (mikroskooppiset tekniikat) tai solun metaboliseen aktiivisuuteen (impedimetria) tai sen jonkun komponentin (ATP) määrittämiseen (taulukko 23). Pikamenetelmien kehittäminen hiivoille on ollut vähäistä bakteereihin verrattuna. Eniten on sovellettu fluoresenssimikroskooppisia tekniikoita. Immunologisia ja etenkin molekyylibiologisia menetelmiä on alettu käyttää vasta viime aikoina spesifisten hiivakontaminanttien osoittamiseen (ks. PCR, spesifinen hybridisaatio). Erilaisia mikrobien määrittämiseen kehitettyjä pikamenetelmiä ovat tarkemmin kuvanneet mm. Jalava & Skurnik (1994), Pitt & Hocking (1994), Vanne *et al.* (1996) ja de Boer & Beumer (1999).

Taulukko 23. Erilaisten mikrobien määrittämenetelmien ominaisuuksia (de Boer & Beumer, 1999).

Menetelmä	Herkkyys (pmy/ml tai g)	Tulos ^a	Spesifisyys
Maljaviljely	1–10	1–5 vrk	Hyvä
ATP-bioluminesenssi	10 ¹⁻⁴	30 min	Huono
Virtausytometria	10 ²⁻³	30–60 min	Huono/Hyvä ^b
DEFT	10 ³⁻⁴	30 min	Huono
Impedimetria	1	1–3 vrk	Hyvä
Nukleiinihappopohjaiset menetelmät	10 ¹⁻³	1–12 h	Erinomainen

^a esirikastusaikaa ei ole otettu huomioon

^b riippuu värjäysmenetelmästä

5.1 Viljelymenetelmät

Hiivojen eristämiseen ja osoittamiseen elintarvikenäytteistä käytetään tavallisesti kiinteitä kasvatusalustoja, jotka voivat olla selektiivisiä ja haittaavat tai estävät muiden mikrobien kasvua. Tavallisesti alustat ovat ravinteikkaita ja sisältävät energian lähteen (esim. glukoosi, fruktoosi, sakkaroosi), hydrolysoituja proteiineja (esim. peptoni, tryptoni, kasitoni), vitamiinilisän (esim. hiivauute, mallasuute) ja mahdollisesti myös pH-indikaattorin (esim. bromokresolivihreä). Matala pH estää useiden bakteerien kasvua, samoin kuin tiettyjen antibioottien (esim. kloramfenikoli, oksitetrasykliini) lisäys. Antibiootit estävät bakteerikasvun alhaista pH:ta varmemmin eikä niillä ole mahdollisesti hiivoja inhiboivaa vaikutusta (Pitt & Hocking, 1997; Loureiro & Querol, 1999). Yleensä homeet kasvavat samoilla alustoilla kuin hiivat. Homepesäkkeiden leviämisen estämiseksi alustoihin voidaan lisätä esimerkiksi pinta-aktiivisia aineita (esim. Triton X-

100), dikloraania tai rose bengalia tai molempia (Pitt & Hocking, 1997). Tavallisimmat hiivojen viljelyyn käytetyt kasvatusalustat on koottu taulukkoon 24.

Määritettäessä elintarvikkeen hiivapitoisuutta tutkittava näyte homogenisoidaan esimerkiksi 0,1 %:n peptoniveteen, näyte laimennetaan (esim. 10^{-1} – 10^{-5}) ja laimennokset levitetään agarmaljoille. Viljelyyn suositellaan pintalevitystekniikkaa. Alhaisen hiivakontaminaation havaitsemiseksi voidaan käyttää membraanisuodatustekniikkaa tai rikastusviljelyä vedellä (1:1) tai kasvatusalustalla laimennetussa näytteessä. Hiivojen optimikasvulämpötila on tavallisesti 20–25 °C, ja elintarvikenäytteistä viljeltyjä maljoja inkuboidaan yleensä 25 °C:ssa. Hiivojen kasvunopeus vaihtelee eri kannoilla sekä eri kasvatusolosuhteissa, joten hiivaviljelmiä voidaan inkuboida muutamasta vuorokaudesta kuukauteen, mutta tavallisesti inkubointiaika on 5 vrk (Pitt & Hocking, 1997). Kasvatusalustoille muodostuneita pesäkkeitä tarkastellaan mikroskooppisesti. Pesäkkeistä tehdään jatkoviljelyt kiinteällä yleisalustalla sekä mahdollisesti myös selektiivisellä alustalla eristettävän hiivakannan puhtauden varmistamiseksi.

Taulukko 24. Tavallisimpia elintarvikeperäisten hiivojen määrittämiseen käytettyjä kasvatusalustoja.

Alusta		Selektiivinen tekijä	Käyttötarkoitus	Valmistaja (mm.) tai viite
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol	Bakteerien kasvun esto antibiootilla; Homepesäkkeiden leviämisen esto dikloraanilla ja rose bengalilla; pH 5,6	Yleisalusta hiivoille ja homeille; tuoreet ja korkean a_w :n omaavat elintarvikkeet	Oxoid
RBC	Rose Bengal Chloramphenicol	Bakteerien kasvun esto antibiootilla; Homepesäkkeiden leviämisen esto rose bengalilla; pH 7,0	Yleisalusta hiivoille ja homeille; tuoreet ja korkean a_w :n omaavat elintarvikkeet	Difco, Oxoid
OGY / OGYE	Oxytetracycline Glucose Yeast Extract	Bakteerien kasvun esto antibiootilla; pH 7,0	Yleisalusta hiivoille	Oxoid
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol	Bakteerien kasvun esto antibiootilla	Yleisalusta hiivoille	Merck
TGY*	Tryptone Glucose Yeast Extract agar	Yleisalusta; 10 % glukoosia; pH 5,5–6,0	Yleisalusta hiivoille	Difco
MEA*	Malt Extract Agar	pH n. 5	Yleisalusta hiivoille	Difco
PD*	Potato Dextrose	Yleisalusta; vähän ravinteita; pH 5,6	Yleisalusta hiivoille ja homeille	Difco
YM*	Yeast Malt Extract	Yleisalusta, pH 6,2	Yleisalusta hiivoille	Difco
WA*	Wort agar	Happamuus inhiboi joitakin bakteereita; pH 4,8	Yleisalusta hiivoille	Difco, Oxoid
WLNA	Wallerstein Laboratory Nutrient Agar	pH 5,5	Teollisuuden fermentaatiot, etenkin panimo-prosessin hiivat	Difco, Oxoid ym.
DG18	Dichloran Glycerol	Bakteerien kasvun esto antibiootilla; matala a_w ; pH 5,6	Kserofiilit hiivat ja homeet, kuivat tuotteet	Oxoid
Scarr	Scarr	Korkea glukoosi- ja sakkaroosipitoisuus	Osmotolerantit hiivat, sokeriset tuotteet	Beuchat & Hocking, 1990
TGYA	TGY + 0,5 % etikkahappoa	Etikkahappo	Säilöntäaineresistentit hiivat	Pitt & Hocking, 1997

* näitä alustoja voi modifioida seuraavasti:

- bakteerikasvun estämiseksi lisäämällä antibiootteja (kloramfenikoli, kloro- ja oksitetrasykliini)
- bakteerikasvun estämiseksi laskemalla alustan pH matalaksi (pH 3,5–pH 5,0, suola- tai fosforihapolla)
- osmotoleranteille selektiiviseksi alentamalla veden aktiivisuutta lisäämällä esim. glukoosia tai sakkaroosia

Yleisalustoilla ei voida erottaa pilaajahiivoja haitattomista hiivoista, ja tiettyjä yhdisteitä (esim. säilöntäaineet) tai erityisiä olosuhteita sietäville hiivoille onkin kehitetty joitakin valikoivia tai erottelevia alustoja (ks. taulukko 24 sekä 2.4.3, 2.4.5). Ne ovat yleensä yleisalustoja, joihin on lisätty kyseinen yhdiste tai joita inkuboidaan valikoivissa olosuhteissa (esim. kylmässä).

Osmotoleranttien hiivojen valikoivaan määrittämiseen elintarvikkeista voidaan käyttää alustoja, joiden a_w on säädetty alhaiseksi esim. sokerilla, sokerialkoholilla, suolalla tai näiden yhdistelmillä (Beuchat & Hocking, 1990). Näillä alustoilla myös solusaanto sokerisista tai suolaisista tuotteista on parempi kuin yleisalustoilla ($a_w > 0,99$) (Jermini & Schmidt-Lorenz, 1987a). Osmoottisen shokin välttämiseksi myös laimennosvesiliuosten

a_w tulisi säätää analysoitavan elintarvikkeen tasolle (Pitt & Hocking, 1997). Alustat inkuboidaan tavallisesti 25–30 °C:ssa, mutta myös korkeampaa inkubointilämpötilaa on suositeltu. Inkubointiaika on yleensä 5–10 vuorokautta (Beuchat & Hocking, 1990). Myös osmotolerantit hiivat voidaan rikastaa helposti itse tuotteessa korvaamalla sen sisällöstä 30–50 % vedellä (Pitt & Hocking, 1994). Jerminin & Schmidt-Lorenzin (1987a) kehittämässä rikastusmenetelmässä näytteet homogenoidaan suoraan 50 % glukoosia sisältävään hiivauuteliemeen. Hiivat osoitetaan liemestä joko mikroskooppisesti tai viljelemällä. Alhainen hiivakontaminaatio (10 pmy/g tai ml) voidaan todeta 3–4 vuorokaudessa. Zimmerlin (1980) menetelmässä näytteet rikastetaan 60 %:n glukoosiliemessä. Kaasukuplat kasvatuspullojen kaasulukon bariumhydroksidiliuoksessa osoittavat näytteen sisältävän hiivoja. Hiivapitoisuus arvioidaan MPN-tekniikalla.

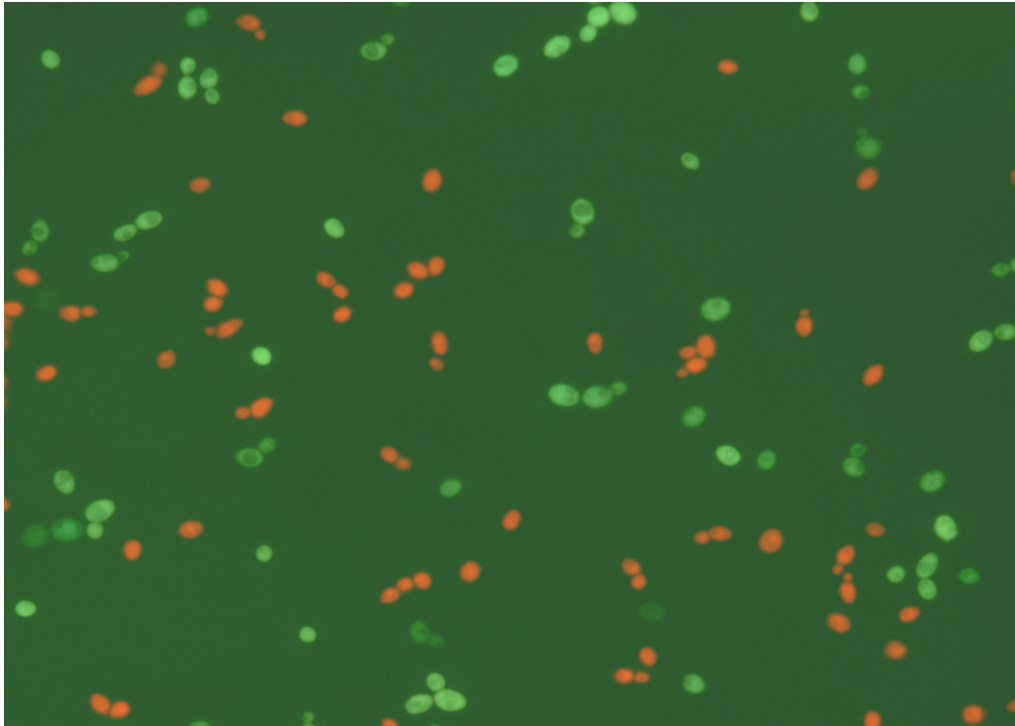
Hiivoille on kehitetty myös yksinkertaistettuja viljelymenetelmiä kuten Petrifilm™ YM (3M, USA), Hygicult Y & F (Orion Diagnostica, Suomi) ja Hycheck™ (Becton & Dickinson, USA), joista kaksi jälkimmäistä soveltuvat etenkin pintanäytteiden viljelyyn. Petrifilmeissä kasvatusalusta kostutetaan tutkittavalla näytteellä ja peitetään suojakalvolla. Filmejä inkuboidaan 4–5 vrk 25 °C:ssa. Menetelmä eliminoi petrimaljojen tarpeen ja se antaa yleensä saman tuloksen kuin tavallinen viljely (Pitt & Hocking, 1997).

5.2 Mikroskopiaan perustuvat menetelmät

Mikroskopiaan perustuvia menetelmiä sovellettiin elintarvikemikrobiologiassa etenkin 1980-luvulla ja 1990-luvun alkupuolella, mutta nykyään uusia sovelluksia julkaistaan harvoin.

5.2.1 DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique)

DEFT-tekniikassa solut kerätään näytteestä imusuodatuksella polykarbonaattimembraanille, värjätään fluoresoivalla värillä ja lasketaan fluoresenssimikroskoopin avulla. Membraanisuodatus parantaa herkkyyttä ja fluoresoivilla väreillä elävät solut erotetaan kuolleista soluista ja taustasta. Periaatteessa DEFT:llä voidaan todeta 1 solu/membraani, mutta käytännössä detektioraja on 10^3 – 10^4 solua/ml. Perinteisessä DEFT-testissä solut värjätään nukeliinihappoihin kompleksoituvalla akridiinioranssilla. Akridiinioranssin on kuitenkin todettu olevan epäluotettava elävyysindikaattori (Karwoski, 1994; Russell & Dowhanick, 1996) ja sen asemesta hiivoille on käytetty myös muita väriaineita (mm. Cootes & Johnson, 1980; Koch *et al.*, 1986; Rowe & McCann, 1990; Russell & Dowhanick, 1996, kuva 12).



Kuva 12. Fluoreskeiinidiasetaatilla (FDA) ja propidiumjodidilla (PI) värjätty hiivasuspensio. FDA värjää elävät solut vihreiksi ja PI kuolleet solut oranssin punaisiksi.

DEFT:ä on sovellettu hiivojen osoittamiseen mm. jogurtista, leipomotuotteista, oluesta, viinistä ja virvoitusjuomista. Hiivat erotetaan bakteereista solumuodon perusteella. Jogurtista voidaan havaita noin $9 \cdot 10^3$ hiivaa/g ja kermatäytteistä noin $5 \cdot 10^2$ hiivaa/g. Vuorokauden esirikastuksen jälkeen näistä tuotteista voidaan todeta alle 10 hiivaa/g (Pettipher, 1987; Rowe & McCann, 1990). Menetelmällä ei ole mahdollista erottaa osmotolerantteja hiivoja ei-osmotoleranteista ilman esirikastusta (Pettipher, 1987). Suodattuvista virvoitusjuomista voidaan todeta $5,0 \cdot 10^2$ – $6 \cdot 10^5$ hiivaa/ml (Koch *et al.*, 1986). DEFT ei ole ilman esirikastusta riittävän herkkä (30–40 hiivasolua/100 ml) oluen hiiva-kontaminaation osoittamiseen (Jakobsen & Lillie, 1984).

DEFT-analyysi näytteenvalmistuksineen vie yleensä noin 30 minuuttia. Preparaattien mikroskopointi on kuitenkin työlästä, aikaavievää ja väsyttävää, minkä vuoksi yksi henkilö pystyy päivässä käsittelemään enintään 30–40 näytettä. Solujen laskenta voidaan automatisoida liittämällä videokameraan kytketty fluoresenssimikroskooppi kuva-analysaattorisysteemiin (Vanne *et al.*, 1996).

5.2.2 Mikropesäketekniikka

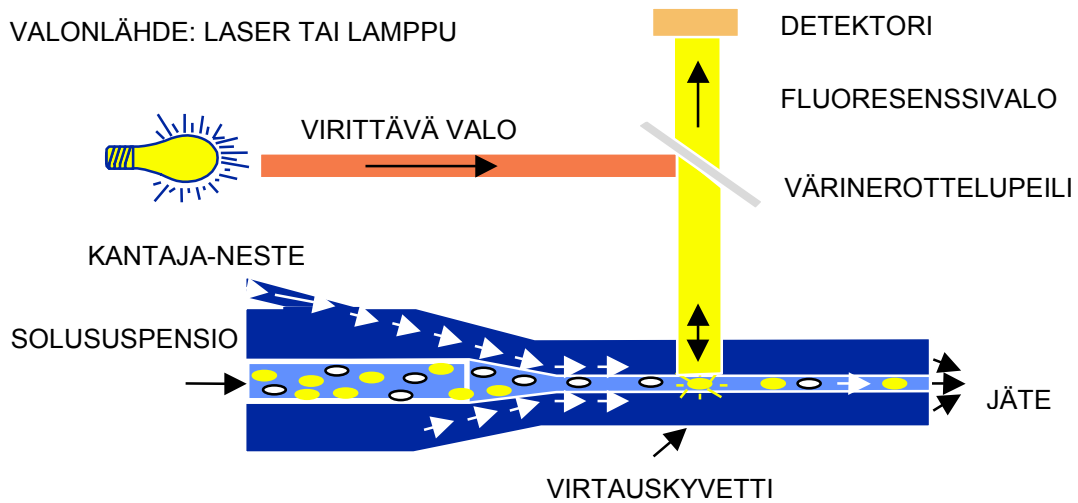
Mikropesäketekniikka on perinteisen viljelymenetelmän muunnos, jossa käytetään mikroskopiaa pesäkkeiden havaitsemisen aikaistamiseksi. Membraanisuodatettu näyte in-

kuboidaan kiinteällä kasvatusalustalla tai näyte viljellään objektilasille valetun agarin pinnalle. Pesäkkeiden erottumisen parantamiseksi membraani voidaan värjätä inkuboinnin jälkeen tai se voidaan inkuboida fluorokromeja sisältävällä alustalla, jolloin solut värjäytyvät jo kasvatuksen aikana (Russell & Dowhanick, 1996).

Mikropesäketekniikalla on voitu osoittaa oluen hiivakontaminaatio vuorokaudessa (Jakobsen & Lillie, 1984). Viinin pilaajahiivojen mikropesäkkeet voitiin detektoida 20–36 tunnin inkuboinnin jälkeen (Andrews, 1982). Nestesokereista hiivakontaminaatio havaittiin 14 tunnissa ja siirapeista 24 tunnissa (Posti, 1991). Mikropesäketekniikalla voidaan osoittaa jopa 1 pmy/membraani (Jakobsen & Lillie, 1984). Käyttämällä sopivia kasvatusalustoja voidaan määrittää valikoivasti eri mikrobeja tai mikrobiryhmiä. Mikroskooppisena tekniikkana menetelmä on kuitenkin työläs. Kuten DEFT-preparaattien on mikropesäkkeidenkin automaattiseen laskentaan kehitetty kuva-analyysiin perustuvia laitteistoja (mm. Niwa, 1993).

5.3 Virtaussytometria

Virtaussytometria on suora optinen tekniikka, jolla voidaan laskea soluja ja muita partikkeleita nesteestä automaattisesti. Solut pakotetaan virtaamaan tasaisessa nestevirtauksessa yksitellen voimakkaan valonlähteen (laser, lamppu) läpi ja niiden taittama ja fluoresoima valo rekisteröidään sopivilla detektoreilla (kuva 13). Yhden näytteen (0,1–0,2 ml) mittaus vie enintään muutaman minuutin, sillä laitteet analysoivat noin 100–1000 solua sekunnissa. Primaarituloksena saadaan histogrammi, joka esittää solumäärän jakautumista mitatun parametrin intensiteetin funktiona. Elävien solujen määrittämiseksi näyte on värjättävä ennen analyysiä. Tähän tarkoitukseen käytetään useimmiten entsyymisubstraatteja, solukalvon kuntoa tai sen sähköistä potentiaalia osoittavia värejä tai näiden yhdistelmiä (Davey & Kell, 1996).

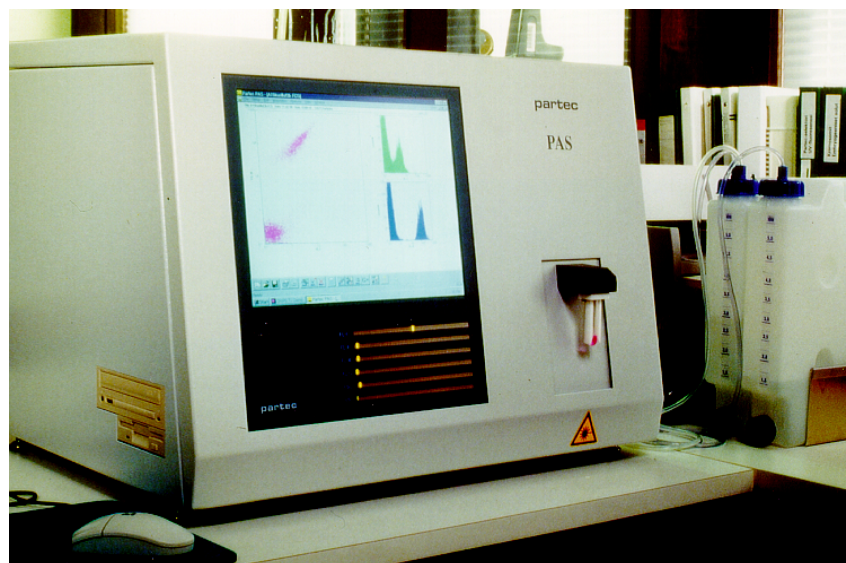


Kuva 13. Virtaussytometrian periaate.

Chemunex S.A (Ranska) markkinoi elintarvike- ja juomateollisuuden mikrobiologiseen laadunvalvontaan Chemflow-systeemiä, joka käsittää virtaussytometrin, tulostimen, tietokoneen ja värjäysreagenssit. Siihen voidaan kytkeä myös automaattinen näytteenvalmistusautomaatti. Elävien solujen värjäykseen käytetään esteraasisubstraattia, jonka solunsisäiset esteraasit muuttavat fluoresoivaksi yhdisteeksi (Mulard, 1995; Roy & Mulard, 1996). Analyysi vie 30–45 minuuttia. Chemflowta on käytetty hiivojen osoittamiseen erityyppisistä elintarvikkeista ja sillä on voitu osoittaa

- eri virvoitusjuomista $5,0 \cdot 10^1$ – $3,0 \cdot 10^4$ solua/ml (Pettipher, 1991),
- jogurtista 10^2 pmy/g (Karwoski, 1994),
- valmissalaateista 10^2 pmy/g (Roy & Mulard, 1996),
- UHT-mehuista 3 pmy/l 48 tunnin rikastuksen jälkeen,
- prosessoiduista hedelmävalmisteista 1 pmy/20 g 48 tunnin rikastuksen jälkeen (Mulard, 1995; Roy & Mulard, 1996).

Chemflowta on käytetty myös hapanmaitovalmisteiden säilyvyysajan arviointiin (Mulard, 1995) ja sen antamien tulosten on todettu vastaavan hyvin maljaviljelytuloksia (Bruetschy *et al.*, 1994).



Kuva 14. PAS-virtaussytometri (Partec GmbH, Saksa).

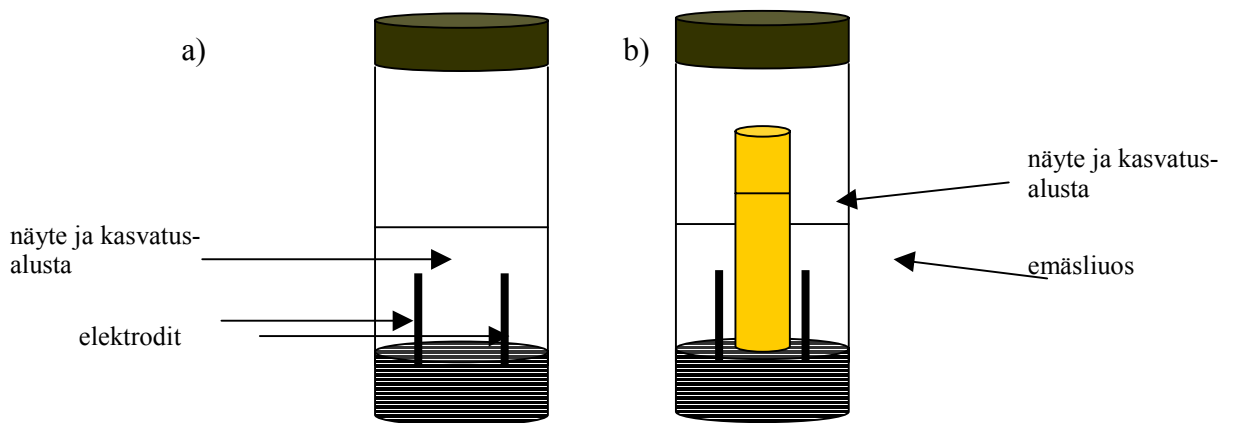
Virtaussytometrialla voidaan määrittää myös spesifisiä mikro-organismeja käyttämällä fluoresoivia vasta-aineita tai DNA-koettimia tai valikoivaa esirikastusta. Fluoresoivia vasta-aineita on sovellettu *S. cerevisiae* -pintahiivan ja *S. pastorianus* -pohjahiivan erotteluun toisistaan (Hutter, 1991) sekä eri pilaajamikrobien osoittamiseen oluesta samanaikaisesti (Hutter, 1994). Myös rRNA-koettimia on käytetty hiivojen spesifiseen osoittamiseen virtaussytometrialla (Bertin *et al.*, 1994). Selektiivistä esirikastusta käyttämällä 10^6 panimohiivasolun joukosta on voitu havaita 1 villihiivasolu 48–72 tunnissa (Jespersen *et al.*, 1993)

Virtaussytometria on nopea, pitkälle automatisoitu ja objektiivinen solulaskentamenetelmä, jolla voidaan havaita puhdasviljelmästä noin 10^{2-3} solu/ml. Elintarvikkeiden esikäsittely analyysiä varten voi kuitenkin olla työlästä ja aikaavievää, sillä niiden sisältämät ei-biologiset partikkelit ja kaasukuplat häiritsevät yleensä analyysiä ja alentavat sen herkkyyttä. Menetelmä edellyttää investointia virtaussytometriin ($\geq 200\ 000$ mk, kuva 14). Tällä hetkellä markkinoilla on useita eritasoisia laitteita (valmistajia mm. Becton Dickinson, Coulter, Partec), joista osa on kannettavia. Yhden näytteen reagenssi- ja tarvikkekustannukset (värjäys esteraasisubstraatilla) ovat ≤ 30 mk.

5.4 Impedimetria

Impedanssimittausmenetelmissä seurataan mikrobien aineenvaihdunnan aiheuttamia sähköisiä muutoksia vaihtovirtapiiriin impedanssissa (Z), konduktanssissa (G) tai kapasitanssissa (C). Impedanssi on vaihtovirran kulkua vastustava komponentti, joka riippuu systeemin konduktanssista ja kapasitanssista. Suorassa menetelmässä näyte ja kasvatusalusta sijoitetaan kennoon, jossa on metallielektrodipari, ja systeemin läpi johdetaan

pienitaajuinen vaihtovirta (kuva 15). Menetelmässä mitataan kasvatusalustan tai elektrodien pintojen sähköisissä ominaisuuksissa tapahtuvia muutoksia, kun mikrobit käyttävät alustan komponentteja ravinnokseen (Firstenberg-Eden & Eden, 1984). Epäsuorassa menetelmässä mitataan konduktometrisesti mikrobin aineenvaihdunnassa syntyvää hiilidioksidia. Mittauselektrodit upotetaan emäsluokseen ja näyte sijoitetaan kennon sisään niin, ettei se ole kosketuksissa elektrodien kanssa (kuva 15). Näytteessä muodostuva hiilidioksidi reagoi emäsluoksen hydroksidi-ionien kanssa muodostaen karbonaatti-ioneja, ja liuoksen konduktanssi laskee (Owens *et al.*, 1989).



Kuva 15. Esimerkki a) suoran ja b) epäsuoran impedanssimittausmenetelmän mittauskennosta.

Sähköisissä ominaisuuksissa voidaan havaita muutoksia vasta, kun näytteessä on 10^{4-5} hiivasolua/ml tai 10^{6-7} bakteerisolua/ml. Tätä muutoshetkeä kutsutaan detektioajaksi ja se on kääntäen verrannollinen näytteen alkuperäiseen mikrobipitoisuuteen. Mitä enemmän näytteessä on mikrobeja, sitä nopeammin ne havaitaan. Kun mittaus jatketaan detektiohetken jälkeen, saadaan mikrobin kasvukäyrää muistuttava, mitatun parametrin muutosta ajan funktiona kuvaava käyrä (signaali). Se ei ole kuitenkaan päällekkäinen kasvukäyrän kanssa (Firstenberg-Eden & Eden, 1984; Bolton & Gibson, 1994).

Epäsuora impedimetria on suoraa impedimetriaa herkempi, nopeampi ja yksinkertaisempi menetelmä hiivojen määrittämiseen elintarvikkeista. Lisäksi hiivat tuottavat epäsuorassa menetelmässä huomattavasti suuremman sähköisen vasteen kuin suorassa menetelmässä (Betts, 1993; Déak & Beuchat, 1993 a, b). Hiivojen osoittaminen suoralla menetelmällä edellyttää yleensä tähän tarkoitukseen kehitettyjen alustojen käyttöä, koska hiivojen päämetaboliatuotteet johtavat huonosti sähköä. Osa näistä erityisalustoista on herkkiä elintarvikeperäiselle materiaalille (Schaertel *et al.*, 1987). Epäsuorassa menetelmässä voidaan käyttää mitä tahansa alustaa tai näytteet voidaan analysoida sellaisenaan (Betts, 1993). Suoran ja epäsuoran impedimetrian elintarvikesovelluksia hiivoille on esitetty taulukossa 25.

Impedanssimenetelmillä on useita etuja viljelymenetelmiin verrattuna:

- lyhyempi analyysiaika,
- alhaisemmat reagenssikustannukset,
- vähemmän työvaiheita,
- parempi toistettavuus.

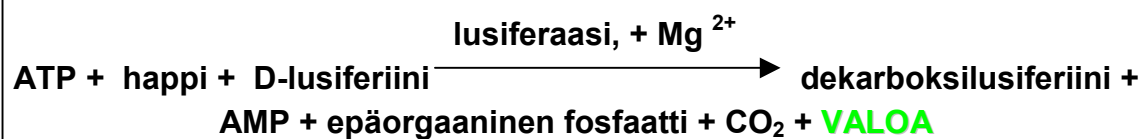
Lisäksi laitteistojen kapasiteetti on suuri. Impedanssimenetelmien käyttömahdollisuudet ovat laajat. Sovelluksia on kehitetty lähes kaikkiin mikrobiologisiin rutiinimäärittäisiin (Bolton & Gibson, 1994; Silley & Forsythe, 1996). Impedanssimenetelmän detektioraja on kuitenkin moniin muihin pikamenetelmiin verrattuna melko korkea. Jos näyte sisältää vähän hitaasti kasvavia organismeja ajansäästö viljelyyn verrattuna on vähäinen. Lisäksi jokainen tuote tai tuoteryhmä on kalibroitava erikseen, koska eri tuotteiden mikrobifloora tai mikrobien metabolinen tila on erilainen. Viljelymenetelmässä voidaan käyttää samaa alustaa useille eri tuotteille, mutta impedimetriassa pienetkin näytteenkäsittelytavan muutokset voivat vaikuttaa detektioaikaan. Usein mainittuna menetelmän haittapuolena on lisäksi laitteistojen hinnakkuus. Impedanssimenetelmä on rutiinikäytössä useilla eri teollisuudenaloilla ympäri maailmaa (Firstenberg-Eden & Eden, 1984; Bolton & Gibson, 1994).

Taulukko 25. Suoran ja epäsuoran impedanssimittausmenetelmän sovelluksia hiivoille.

Mittausmenetelmä	Tuote	Hiivoja pmy/ml	Detektioaika, h	r	Viite
Suora	viini (<i>S. cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. anomala</i>)	10 ³	48–72 (sameita)	-	Henschke & Thomas, 1988
	sameat alkoholijuomat	1	72	-	"
	olut (panimohiiva)	≥ 1	48	-0,99 (n=50)	Adams & Bryan, 1989
	jogurtti (<i>S. cerevisiae</i> , <i>Y. lipolytica</i>)	<10 ³	42 (1 d esirikastus)	-	Shapton & Cooper, 1984
	hedelmä, hedelmäseokset	1/20 ml	40 (1 d esirikastus)	-	Fleischer <i>et al.</i> , 1984
	appelsiinimehu	10 ²	26	-	Zindulis, 1984
	mehutiiviste (kontaminoitu)	10 ⁴	15,8	-	Weihe <i>et al.</i> , 1984
	mehutiiviste (luonnollisesti kontaminoitunut)	10 ¹⁻² 10 ³	< 72 < 48	-	Betts, 1993
	"	3,7x10 ¹	60–70 50–60 (esirikastus)	-0,69	Déak & Beuchat, 1993a
Epäsuora	"	3,7x10 ¹	48,9 38,9 (esirikastus)	-0,73	"
	kuusi hiivapuhdasviljelmää	10 ¹	< 48	-0,952– 0,979	Déak & Beuchat, 1993b
	hedelmämehu (<i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. delbrueckii</i>)	10 ¹	< 30	-	Betts, 1993
	hedelmämehu (<i>Rhodotorula</i>)	10 ⁴ 10 ⁵	16,7–24,6 13,1–21,3	-	Druggan <i>et al.</i> , 1993
	hedelmämehu (<i>Z. bailii</i>)	10 ²	46,5	-	Druggan <i>et al.</i> , 1993
	säilöntäaineita sisältävät juomatiivisteet (<i>Z. rouxii</i> , <i>Z. bailii</i>)	10 ⁻¹ –10 ⁰	72–144	-	Déak & Beuchat, 1995
	hiilihapotetut virvoitusjuomat (<i>Z. rouxii</i> , <i>Z. bailii</i>)	10 ⁻¹ –10 ¹	84–120,8	-	"
	jogurtti (kahdeksan eri hiivalajia)	10 ¹	< 35 85 (<i>Z. rouxii</i>)	>-0,96	Betts, 1993

5.5 ATP-bioluminesenssimenetelmä

ATP-bioluminesenssimenetelmä on epäsuora biomassan määrittäminen. Siinä mitataan kaikkien elävien solujen sisältämää energiatalouden avainyhdistettä, adensiini-5'-trifosfaattia (ATP), tulikärpäsen herkän ja ATP:lle spesifisen bioluminesenssireaktion avulla (kuva 16). Reaktiossa ATP:n sisältämä energia muuttuu keltavihreäksi valoksi lusiferaasientsyymien katalysoimissa D-lusiferiinin oksidatiivista dekarboksylaatiota hapen ja magnesiumionien läsnäollessa. Reaktiossa yhtä moolia ATP:a kohden syntyy lähes yksi kvantti valoa. Syntyvä valo mitataan luminometrillä. (Kyriakides & Patel, 1994)



Kuva 16. Tulikärpäsen bioluminesenssireaktio.

ATP:n käyttö biomassan mittana perustuu siihen oletukseen, että solun ATP-sisältö on suhteellisen vakio. Solun metabolinen aktiivisuus vaikuttaa kuitenkin jossain määrin sen sisältämän ATP:n määrään. Myös ympäristön äkilliset muutokset voivat nopeasti laskea solun ATP-sisältöä (Chapman & Atkinson, 1977; Karl, 1980). Lisäksi solun ATP-määrä on sidoksissa solun massaan. Esimerkiksi hiivasolussa on noin 100 kertaa enemmän ATP:ta kuin bakteerisolussa.

ATP-määritys sisältää yleensä seuraavat vaiheet: näyteperäisen ATP:n poisto, ATP:n uutto mikrobisoluista, lusiferaasireagenssin lisäys ja valon mittaus. Useimmissa elintarvikkeissa ja juomissa on itsessään ATP:a, joka on poistettava näytteistä ennen mikrobi-ATP:n uuttamista (Kyriakides & Patel, 1994).

ATP-bioluminesenssimenetelmää on sovellettu hiivojen määrittämiseen hiivakontaminaatioille alttiista tuotteista. Mehutiivistneiden hiivapitoisuus voidaan arvioida ATP-mittauksen perusteella niiden sisältäessä yli 10^3 pmy/ml aktiivisesti kasvavaa hiivaa (Graumlich, 1985). Hedelmärehun steriiliyden testaus vie 24–30 tuntia (Vossen & Vanstaen, 1981). Oluen hiivakontaminaatio (~1 pmy/250 ml) voidaan osoittaa yleensä 16–24 tunnin esirikastuksen jälkeen (mm. Avis & Smith, 1989; Miller & Galston, 1989; Harrison *et al.*, 1990). Ilman esirikastusta oluesta voidaan yleensä todeta $\sim 2 \cdot 10^1$ hiivaa/suodatettu näyte (Miller & Galston, 1989), mutta herkimmillä sovelluksilla on päästy alle 10 pmy hiivaa/250 ml (Simpson *et al.*, 1989). Erityisreagensseihin ja automaattiseen kuvankäsittelyyn perustuvalla RMD-menetelmällä voidaan määrittää oluesta 1–200 hiivasolua/membraani 10 minuutissa (Dowhanick *et al.*, 1995). ATP-menetelmän on osoitettu soveltuvan myös virvoitusjuomien hiivapitoisuuden arviointiin. Menetelmällä havaittiin 1–10 pmy hiivaa/ml, ja tunnissa voitiin analysoida 30 näytettä (LaRocco *et al.*, 1985). Hiivalla kontaminoitujen virvoitusjuomien seulontaan on esitetty myös yksinkertainen sovellus (Littel & LaRocco, 1986). Kun menetelmää testattiin 182 kola-juomalla, se antoi väärä positiivisia tuloksia vain 3 %. Nestesokerista on voitu todeta kvantitatiivisesti aina 3 pmy/g kahdessa tunnissa. Yhden hiivan osoittamiseksi 100 ml:sta nestesokeria tarvitaan 24 tunnin esirikastus (Tesch, 1993).

ATP-bioluminesenssimenetelmän merkittävin etu on sen nopeus. Harvalla muulla pikamenetelmällä on mahdollista saada tulos heti. ATP-menetelmän huonoimpina puolina elintarvikesovelluksissa ovat epäspesifisyys ja epäherkkyys. Mikrobi-peräisen ATP:n

erottaminen tuoteperäisestä ATP:sta on työlästä ja aikaavievää ja onnistuu harvoin täydellisesti. Lisäksi epäspesifisyys rajoittaa menetelmän sovellusmahdollisuuksia ja vaikeuttaa kvantitointia. Herkkyyttä tarvittaisiin lisää prosessoitujen elintarvikkeiden kontaminanttien osoittamiseksi ilman esirikastusta. Tällä hetkellä ATP-menetelmän vahvimpia sovelluksia elintarviketeollisuudessa ovat yksinkertaiset sovellukset, joissa tuoteperäistä ja mikrobiperäistä ATP:a ei tarvitse erotella. Tällaisia ovat hygieniamääritys ja biomassan arviointi heräteviljelmistä, käymisnäytteistä ja prosessivesistä.

Markkinoilla on nykyään laaja valikoima eritasoisia ja -hintaisia laitteita. Lisäksi kittejä on saatavilla ainakin oluen ja hedelmämehun mikrobikontaminaatioiden osoitukseen sekä hygieniamäärityksiin.

Kirjallisuus

- Abe, Y. & Kondoh, Y. 1989. Oxygen absorbers. Teoksessa: Controlled/modified Atmosphere/Vacuum Packaging of Foods. Brody, A.L. (toim.), Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, Connecticut. S. 149–174.
- Abee, T. & Wouters, J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50:65–91.
- Adams, M.R. & Bryan, J.J. 1989. A medium designed for monitoring pitching yeast contamination in beer using a conductimetric method. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:55–58.
- Adegoke, G.O., Iwahashi, H. & Komatsu, Y. 1997. Combination of effect of high hydrostatic pressure and essential oil monoterpenes on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Teoksessa: High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, Heremans, K., (toim.), Leuven University Press, Belgium. S. 237–240.
- Ahvenainen, R. 1989. Gas packaging of chilled meat products and ready-to-eat products. VTT Publications 58. Espoo: Technical Research Centre of Finland. 68 s. + liitt. 80 s.
- Ahvenainen, R., Hurme, E. & Smolander, M. 1999. Active and smart packaging for food products. *Verpackungs Rundschau*, Vol. 50, No. 1, s. 36–40.
- Aigle, M., Erbs., D. & Moll., M. 1984. Some molecular structures in the genome of lager brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 42: 1–7.
- Alemán, G., Farkas, D.F., Torres, J.A., Wilhelmssen, E. & McIntyre, S. 1994. Ultra-high pressure pasteurization of fresh cut pineapple. *J. Food Prot.* 57:931–934.
- Alemán, G.D., Ting, E.Y., Mordre, S.C., Hawes, A.C.O., Walker, M., Farkas, D.F. & Torres, J.A. 1996. Pulsed ultra high pressure treatments for pasteurization of pineapple juice. *J. Food Sci.* 61:388–390.
- Alemán, G.D., Ting, E.Y., Farkas, D.F., Mordre, S.C., Hawes, A.C.O. & Torres, J.A. 1998. Comparison of static and step-pulsed ultra-high pressure on the microbial stability of fresh cut pineapple. *J. Sci. Food Agric.* 76:383–388.
- Andrews, D.W. 1982. A note on a microcolony method for the rapid detection of yeasts using Euchrysin 2GNX. *J. Appl. Bacteriol.* 52:117–118.

Anon. 1980. Official method of analysis, Washington D.C: Association of Official Analytical Chemists. 23 s.

Anon. 1989a. Suspension test using the dilution-neutralisation method AFNOR T 72-300, Paris: AFNOR Association française de normalisation.

Anon. 1989b. Suspension test using the membran filter method AFNOR T 72-301, Paris: AFNOR Association française de normalisation.

Anon. 1992. Sanitizer takes an active role. Dairy Foods 93:6, 68–70.

Anon. 1994. Chemical antiseptics and disinfections, Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas – Test methods and requirement, Provisional European standard EN 1650.

Anon. 1997. Chemical antiseptics and disinfections, Quantitative suspension test for the evaluation of bacterial activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas – Test methods and requirement, Provisional European standard EN 1276.

Augustyn, O.P.H. & Kock, J.L.F. 1989. Differentiation of yeast species, and strains within a species, by cellular fatty acid analysis. 1. Application of an adapted technique to differentiate between strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Methods 10:9–23.

Augustyn, O.P.H., Kock, J.L.F. & Ferreira, D. 1990. Differentiation between yeast species, and strains within a species, by cellular fatty acid analysis. 3. *Saccharomyces sensu lato*, *Arxiozyma* and *Pachytichospora*. System. Appl. Microbiol. 13:44–55.

Avis, J.W. & Smith, P. 1989. The use of ATP bioluminescence for the analysis of beer in polyethylene terephthalate (PET) bottles and associated plant. Teoksessa: Stannard, C. J., Pettitt, S.B. & Skinner, F. A. (toim.). Rapid Microbiological Methods for Foods, Beverages and Pharmaceuticals. Blackwell Sci. Publ., Oxford. S. 1–11.

Baldry, M.G.C. & Fraser, J.A.L. 1988. Disinfection with peroxygens. Teoksessa: Industrial biocides: critical report on applied chemistry. Vol. 23. Payne, K.R. (toim.). Chichester: John Wiley & Sons. S. 91–116.

- Baleiras Couto, M.M., van der Vossen, J.M.B.M., Hofstra, H. & Huis in't Veld, J.H.J. 1994. RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 24:249–260.
- Baleiras Couto, M.M., Vogels, J.T.W.E., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. van der Vossen J.M.B.M. 1995. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 79:525–535.
- Baleiras Couto, M.M., Hartog, B.J., Huis in't Veld, J.H.J., Hofstra, H. & van der Vossen, J.M.B.M. 1996a. Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiol.* 13:59–67.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. & van der Vossen, J.M.B.M. 1996b. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:41–46.
- Banner, M.J. 1994. Perspectives on conveyor track treatment. *Mast. Brew. Ass. Amer. Tech. Quart.* 31:142–148.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (toim.). 2000. *Yeasts: characteristics and identification*. 2. painos. Cambridge University Press, Avon. 1002 s.
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., Garcia, M.D. and Querol, A. 1997. Characterisation of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *System. Appl. Microbiol.* 20:397–408.
- Bendova, O., Richter, V., Janderova, B. & Häusler, J. 1991. Identification of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:810–812.
- Beney, L., de Marañón, M., Marechal, P.-A. & Gervais, P. 2000. Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J. Food Microbiol.* 55:275–279.
- Bertin, B., Broux, O. & van Hoegaerden., M. 1990. Flow cytometric detection of yeasts by *in situ* hybridization with a fluorescent ribosomal RNA probe. *J. Microbiol. Meth.* 12:1–12.
- Betts, R.P. 1993. Rapid electrical methods for the detection and enumeration of food spoilage yeasts. *Int. Biodeterior. Biodegradat.* 32:19–32.

Betts, G.D., Lindon, P. & Betteridge, R.J. 2000. Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note. *Food Microbiol.* 17:47–52.

Beuchat, L.R. & Hocking, A.D. 1990. Some considerations when analyzing foods for the presence of xerophilic fungi. *J. Food. Prot.* 53:9894–989.

Blessmann, G. 1992. Testing the fungicidal activity of disinfectants used in the food industry against mould fungi. Berlin: Freien Universität. 153 s.(Tiivistelmä).

Block, S.S. 1991. Peroxygen compounds. Teoksessa: Disinfection, sterilization and preservation. 4. painos. Block, S.S. (toim.). Lea & Febiger, Philadelphia. S. 167–181.

Bloomfield, S.F., Arthur, M., Looney, E., Begun, K. & Patel, H. 1991. Comparative testing of disinfectants and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:230–237.

Bloomfield, S.F., Arthur, M., Klinger, B. van, Pullen, W., Holah, J.T. & Elton, R. 1994. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 86–94.

Boekhout, T., Renting, M., Scheffers, W.A. & Bosboom, R. 1993. The use of karyotyping in the systematic of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 63:157–163.

Boekhout, T., Bandoni, R.J., Fell, J.W. & Kwon-Chung, K.J. 1998. Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 609–625.

Bolton, F.J. & Gibson, D.M. 1994. Automated electrical techniques in microbiological analysis. Teoksessa: Patel, P. (toim.). Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology. Blackie Academic & Professional. London. S. 131–169.

Bostock, A., Khattak, M.N., Matthews, R. & Burne, J. 1993. Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 139:2179–2184.

Branchini, M.L., Pfaller, M.A., Rhine-Chalberg, J., Frempong, T. & Isenberg, H.D. 1994. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilopsis*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 452–456.

- Bridge, P.D. & Arora, D.K. 1998. Interpretation of PCR methods for species definition. Teoksessa: Applications of PCR in mycology. Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. & Elander, R.P. (toim.). CAB International, University Press, Cambridge. S. 63–84.
- Brown, M.R.W. & Gilbert, P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement 74: 87S–97S.
- Bruetschy, A., Laurent, M. & Jacquet, R. 1994. Use of flow cytometry in oenology to analyse yeasts. Lett. Appl. Microbiol. 18:343–345.
- Brul, S. & Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms (review). Int. J. Food Microbiol. 50:1–7.
- Bruneau, S. & Guinet, R. 1989. Rapid identification of medically important yeasts by electrophoretic protein patterns. FEMS Microbiol. Lett. 58:329–334.
- Bundgaard-Nielsen, K. & Nielsen, P.V. 1996. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. J. Food Prot. 59:268–275.
- Böhm, R. 1987. Organic acids as disinfectants. Fleischwirtschaft, 67:705–706.
- Cantoni, C. & Comi, G. 1988. Yeast contamination of liquid sorbitol. Ind. Bevande 17:123–124.
- Cardinali, G. & Martini, A. 1994. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:791–797.
- Carlile, M. & Watkinson, S. 1996. The yeasts. Teoksessa: The Fungi. Academic Press, London. S. 64–69.
- Carlotti, A., Srikantha, T., Schröppel, K., Kvaal, C., Villard, J. & Soll, D.S. 1997. A novel repeat sequence (CKRS-1) containing a tandemly repeated sub-element (kre) accounts for differences between *Candida krusei* strains fingerprinted with the probe CkF1,2. Curr. Genet. 31:255–263.
- Carpentier, B. & Cerf, O. 1993. A review: biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol. 75:499–511.
- Carpi, G., Gola, S., Bazzarini, R., Barbieri, G., Maggi, A. & Rovere, P. 1996. Fragole in pezzi trattate con le alte pressioni. Industria Conserve 71:177–183.

- Carvalho, F., Roseiro, J.C. & Gírio, F.M. 1999. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 16:543–550.
- Casey, G.P., Pringle, A.T. & Erdmann, P.A. 1990. Evaluation of recent techniques used to identify individual strains of *Saccharomyces* yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48:100–106.
- Casson, D. 1985. Microbiological problems of beer dispense. *The Brewer* 71:417–421.
- Cavaliere, D., Barberio, C., Casalone, E., Pinzauti, F., Sebastiani, F., Mortimer, R. & Polsinelli, M. 1998. Genetic and molecular diversity in *Saccharomyces cerevisiae* natural populations. *Food Technol. Biotechnol.* 36:45–50.
- Chambel, A., Viegas, C.A. & Sá-Correia, I. 1999. Effect of cinnamic acid on the growth and on plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J. Food Microbiol.* 50:173–179.
- Chapman, A. G. & Atkinson, D. E. 1977. Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity of bacteria and yeast. *Adv. Microbiol. Physiol.* 15:253–306.
- Cheng, L., Moghraby, J. & Piper, P.W. 1999. Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:89–95.
- Cootes, R.L. & Johnson, R. 1980. A fluorescent staining technique for determination of viable and non-viable yeasts and bacteria in wineries. *Food Technol.* 32:522–524.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.C., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. & Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:435–464.
- Czechowski, M.H. & Banner, M. 1992. Control of biofilms in breweries through cleaning and sanitizing. *Mast. Brew. Ass. Amer. Tech. Quart.* 29:86–88.
- Davey, H. M. & Kell, D. B. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60: 641–696.

- Davitson, P.M. & Doan, C.H. 1993. Natamycin. Teoksessa: Antimicrobials in Foods. Davitson, P.M. & Branen, A.L. (toim.). Marcel Dekker, Inc., New York. S. 395–407.
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A. & Langridge, P. 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4514–4520.
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A. & Langridge, P. 1998. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. System. Bacteriol.* 48:279–286.
- de Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P.A. & Langridge, P. 1999. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. System. Bacteriol.* 49:915–924.
- de Boer, E. & Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 50:119–130.
- Déak, T. 1991. Foodborne yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* 36:179–278.
- Déak, T. 1992. Experiences with and further improvement to the Déak and Beuchat simplified identification scheme for foodborne yeasts. Teoksessa: Modern methods in food mycology. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. & King, A.D. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 47–54.
- Déak, T. & Beuchat, L.R. 1987. Identification of foodborne yeasts. *J. Food Protect.* 50:243–264.
- Déak, T. & Beuchat, L.R. 1988. Evaluation of simplified and commercial systems for identification of foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 7:135–145.
- Déak, T. & Beuchat, L.R. 1993. Comparison of the SIM, API 20C, and ID 32C systems for identification of yeasts isolated from fruit juice concentrates and beverages. *J. Food Protect.* 56:585–592.
- Déak, T. & Beuchat, L.R. 1993a. Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices. *J. Appl. Bacteriol.* 75:546–550.
- Déak, T. & Beuchat, L.R. 1993b. Evaluation of the indirect conductance method for the detection of yeasts in laboratory media and apple juice. *Food Microbiol.* 10:255–262.

- Déak, T. & Beuchat, L.R. 1995a. Evaluation of the MicroScan enzyme-based system for the identification of foodborne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 79:439–446.
- Déak, T. & Beuchat, L.R. 1995b. Modified indirect conductimetric technique for detecting low populations of yeasts in beverage concentrates and carbonated beverages. *Food Microbiol.* 12: 165–172.
- De Boer, E. & Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50:119–130.
- Dielbandhoesing, S.K., Zhang, H., Caro, L.H.P., van der Vaart, J.M., Klis, F.M., Verrips, C.T. & Brul, S. 1998. Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4047–4052.
- Dowhanick, T.M., Sobczak, J., Presente, E. & Russell, I. 1995. Trial studies on the rapid quantitative detection of brewery microorganisms using a prototype ATP bioluminescence system. *Proc. 25th Eur. Brew. Conv. Brussels.* 1995. IRL Press. Oxford. S. 645–651.
- Druggan, P., Forsythe, S.J. & Silley, P. 1993. Indirect impedance for microbial screening in the food and beverage industries. *Teoksessa: Kroll, R.G., Gilmour, A. & Sussman, M. (toim.). New Techniques in Food and Beverage Microbiology, Blackwell. London.* S. 115–130.
- Duarte, F., Pais, C., Spencer-Martins, I. & Leão, C. 1999. Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1907–1913.
- Dychdala, G.R. 1991. Chlorine and chlorine compounds. *Teoksessa: Disinfection, sterilization and preservation. 4. painos, Block, S.S. (toim.). Lea & Febiger, Philadelphia.* S. 131–151.
- El-Azizi, M. & Khardori, N. 1999. Factors influencing adherence of *Candida* spp. to host tissues and plastic surfaces. *Indian J. Experiment. Biol.* 37:941–951.
- Elintarvikevirasto. 1999. *Uuselintarvikkeet.* Helsinki. 2 s.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:329–337.

European Hygienic Equipment Design Group (EHEDG). 1993a. Hygienic equipment design criteria. *Trends Food Sci. Technol.* 4:225–229.

European Hygienic Equipment Design Group (EHEDG). 1993b. Welding stainless steel to meet hygienic requirements. *Trends Food Sci. Technol.* 4:306–310.

European Hygienic Equipment Design Group (EHEDG). 1993c. Hygienic design of closed equipment for the processing of liquid food. *Trends Food Sci. Technol.* 4:375–379.

European Hygienic Equipment Design Group (EHEDG). 1994. Hygienic design of valves for food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 5:169–171.

Falconi di Francesco, L. Barchiesi, F., Caselli, F., Cirioni, O. & Scalise, G. 1999. Comparison of four methods for DNA typing of clinical isolates of *Candida glabrata*. *J. Med. Microbiol.* 48:955–963.

Fenice, M., Giambattista, R.D., Leuba, J.L. & Federici, F. 1999. Inactivation of *Mucor plumbeus* by the combined actions of chitinase and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 52:109–113.

Firstenberg-Eden, R. & Eden, G. 1984. *Impedance microbiology*. Research Studies Press Ltd., Letchworth. 169 s. + liitteet.

Fleet, G. 1992. Spoilage yeasts. *Critic. Rev. Biotechnol.* 12:1–44.

Fleischer, M., Shapton, N. & Cooper, P.J. 1984. Estimation of yeast numbers in fruit mix for yogurt. *J. Soc. Dair. Technol.* 37:63–65.

Flemming, H.-C. 1991. *Biofouling in water treatment*. Teoksessa: *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Flemming, H.-C. & Geesey, G.G. (toim.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. S. 47–80.

Floros, J.D., Dock, L.L. & Han, J.H. 1997. Active packaging technologies & applications. *Food cosmetics and Drug Packaging* 20:10–17.

Gams, W., Hoekstra, E.S. & Aptroot, A. (toim.). 1998. *CBS Course of mycology*. 4. painos. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Ponsen & Looyen BV, Wageningen. 165 s.

García-Rodríguez, L.J., Durán, A. & Roncero, C. 2000. Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J. Bacteriol.* 182:2428–2437.

Gerós, H., Cássio, F. & Leão, C. 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J. Food Protect.*, 63:96–101.

Gilfillan, G.D., Sullivan, D.J., Haynes, K., Parkinson, T., Coleman, D.C. & Gow, N.A.R. 1998. *Candida dupliensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* 144:829–838.

Golubev, W.I. 1998. Mycocins (Killer Toxins). *Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 55–62.

Gomes, L.H., Duarte, K.M.R., Argueso, J.L., Echeverrigaray, S. & Tavares, F.C.A. 2000. Methods for yeast characterization from industrial products. *Food Microbiol.* 17:217–223.

Graham, Dee M. 1997. Use of ozone for food processing. *Food Technol.* 51:72–75.

Grajecki, C. & Schmalz, D. 1995. Disinfection additives for hot brine. *Brauwelt* 135:1553–1554.

Granchi, L., Bosco, M., Messini, A. & Vincenzini, M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* 87:949–956.

Grant, K.A. & Kroll, R.G. 1993. Molecular biology techniques for the rapid detection and characterisation of foodborne bacteria. *Food Science and Technology Today* 7:80–88.

Granum, P.E. & Magnussen, J. 1987. The effect of pH on hypochlorite as disinfectant. *Int. J. Food Microbiol.* 4:183–138.

Graumlich, T. R. 1985. Estimation of microbial populations in orange juice by bioluminescence. *J. Food. Sci.* 50: 116-118.

- Guillamón, J.M., Querol, A., Jiménez, M. & Huerta, T. 1993. Phylogenetic relationships among wine yeast strains based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 115–125.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T. & Querol, A. 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:708–714.
- Guillamón, J.M., Sánchez, I., Huerta, T. 1997. Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiology Letters* 147:267–272.
- Gustin, M.C., Albertyn J., Alexander, M. & Davenport, K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264–1300.
- Hadfield, W.A. 1957. Chlorine and chlorine compounds. Teoksessa: Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization. 2. painos. Reddish, G.F. (toim.). Lea & Febiger, Philadelphia. S. 558–580.
- Hagler, A.N. & Ahearn, D.G. 1987. Ecology of aquatic yeasts. Teoksessa: The yeasts. Rose, A.H. & Harrison, J.S. (toim.). Academic Press Inc., London. S. 1:181–205.
- Han, J.H. & Floros, J.D. 1997. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 13:287–298.
- Han, Y., Guentert, A.M., Smith, R.S., Linton, R.H. & Nelson, P.E. 1999. Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer for tanks used for aseptic juice storage. *Food Microbiol.* 16:53–61.
- Hannula, J., Saarela, M., Alaluusua, S., Slots, J. & Asikainen, S. 1997. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. *Oral Microbiol. Immunol.* 12:358–365.
- Harper, D.R. 1981. Microbial contamination of draught beer in public houses. *Process Biochem.* 16:2–7, 21.
- Harrison, M., Theaker, P.D. & Archibald, H.W. 1990. Experience with ATP-bioluminescence for rapid microbial assessment in the brewery. *Proc. 21th Inst. Brew. Conv.* 1990. Auckland. Australian Ind. Publ., Adelaide. S. 168–173.

- Hashizume, C., Kimura, K. & Hayashi, R. 1995. Kinetic analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperatures. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1455–1458.
- Hayert, M., Perrier-Cornet, J.M. & Gervais, P. 1997. Why do yeast die under pressure? *Teoksessa: High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology.* Heremans, K. (toim.). Leuven University Press, Belgium. S. 205–208.
- Hayford, A.E. & Jakobsen, M. 1999. Characterization of *Candida krusei* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome profile, polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *J. Appl. Microbiol.* 87:29–40.
- Heard, G.M. & Fleet, G.H. 1990. A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. *J. Appl. Bacteriol.* 68:447–451.
- Heiska, K. 1998. Broilerpyöryköiden säilyvyyden mallitus ja pakkauksen optimointi. EKT-sarja 1142.
- Henriksson, E. & Haikara, A. 1991. Airborne microorganisms in the brewery filling area and their effect on microbiological stability of beer. *Monatsschr. Brauwiss.* 44:4–8.
- Henriques, M., Sá-Nogueira, I., Giménez-Jurado, G. & van Uden, N. 1991. Ribosomal DNA spacer probes for yeast identification: studies in the genus *Metschnikowia*. *Yeast* 7:167–172.
- Henschke, P.A. & Thomas, D.S. 1988. Detection of wine-spoiling yeasts by electronic methods. *J. Appl. Bacteriol.* 64:123–133.
- Holah, J.T., Betts, R.P. & Thorpe, R.H. 1989. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene. *Int. Biodeterior.* 25: 147–153.
- Holah, J. & Gibson, H. 1999. Biofouling: cleanability problems in food processing? *Proc. 30th R³-Nordic Contamination Control Symposium, Helsinki, Finland, May 20 – June 2, 1999.* VTT Symposium 193. Espoo: Technical Research Centre of Finland. S. 177–186.
- Holmes, A.R., Cannon, R.D., Shepherd, M.G. & Jenkinson, H.F. 1994. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:228–231.

Holyoak, C.D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimmins, K., Brown, A.J.P. & Coote, P.J. 1996. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3158–3164.

Hood, S.K. & Zottola, E.A. 1995. Biofilms in food processing: review. *Food Contr.* 6: 9–18.

Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. & Knorr, D. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* 43:99–107.

Hounsa, C.-G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S. & Prior, B.A. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol.* 144:671–680.

Hughes, T., Rogers, T.R. & Haynes, K. 1998. PCR diagnostics in medical mycology. *Teoksessa: Applications of PCR in mycology.* Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. & Elander, R.P. (toim.). CAB International, University Press, Cambridge. S. 267–287.

Hurme, E. & Ahvenainen, R. 1997. Hapenpoistajien ja kaasunerittäjien sovellettavuus elintarvikkeiden pakkaamisessa. Pakkausteknologiaryhmä r.y. Raportti No 44, Helsinki, 15 s.

Hurme, E., Ahvenainen, R. & Nielsen, T. 1998. Technical report: Active and smart packaging of food. Nordic Network on Minimal Processing. VTT Biotechnology and Food Research & SIK. 31 s.

Hutter, 1991. Einsatz der Fluoreszenzserologie und der Durchflußzytometrie zum Nachweis von Infektionskeimen bei biotechnologischen Prozessen. *Monatssch. Brauwiss.* 6:216–220.

Hutter, 1994. Multi-colour flow cytometric analysis. *Brauwelt Int.* 4:334–346.

Härkönen P., Salo, S., Mattila-Sandholm, T., Wirtanen, G., Allison, D.G. & Gilbert, P. 1999. Development of a simple in-vitro test system for the disinfection of bacterial biofilms. *Water Sci. Technol.* 39:219–225.

Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F. & Jimenez, J. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:998–1003.

- Jakobsen, M. & Lillie, A. 1984. Rapid methods in microbiological quality control: Practical experience with epifluorescent techniques. Proc. 18th Inst. Brew. Conv., Adelaide, 1984. Peacock. Publ. Kent Town. S. 545–552.
- Jalava, T. & Skurnik M. 1994. Pikadiagnostisten menetelmien soveltaminen elintarviketeollisuuden mikrobiologiseen laadunvalvontaan. Teknologian kehittämiskeskus, julkaisu nro 42/94, Helsinki. 42 s.
- James, G.A., Beaudette, L. & Costerton, J.W. 1995. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15:257–262.
- James, S.A., Collins, M.D. & Roberts, I.N. 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 46:189–194.
- Jenkins, P., Poulos, P.G., Cole, M.B., Vandeven, M.H. & Legan, J.D. 2000. The boundary for growth of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified products described by models for time to growth and probability of growth. *J. Food Protect.* 63:222–230.
- Jesenka, Z. 1993. Micromycetes in food stuffs and feedstuffs. *Progress in Industrial Microbiology*, 28. Elsevier, London. 256 s.
- Jermini, M.F.G., Geiges, O. & Schmidt-Lorenz, W. 1987. Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J. Food Protect.* 50:468–472.
- Jermini, M.F.M. & Schmidt-Lorenz, W. 1987a. Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J. Food. Prot.* 50:468–472.
- Jespersen, L., Lassen, S. & Jakobsen, M. 1993. Flow cytometric detection of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* 17:321–328.
- Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Müller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H. & Klis, F.M. 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molecul. Microbiol.* 35:601–611.
- Karl, D.M. 1980 Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44:739–796.

- Karp, A. & Edwards, K.J. 1997. DNA markers: a global overview. Teoksessa: DNA markers, protocols, applications, and overviews. Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.M. (toim.). Wiley-Liss, Inc., New York. S. 1–13.
- Karwoski, M. 1994. Applications of automated direct and indirect methods for food microbiology. Väitöskirja. VTT Publication 194. Espoo: Technical Research Centre of Finland. 121 s. + liitt. 69 s.
- Kim, J.-G., Yousef, A.E. & Dave, S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J. Food Prot.* 62:1071–1087.
- Kinnunen, A., Morkkila, M. & Ahvenainen, R. 1998. Elintarvikkeiden uudet prosessointi- ja kypsennysmenetelmät. Teknologia katsaus 63/98, Tekes, Helsinki.
- Knorr, D. 1995. Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology. Teoksessa: *New Methods of Food Preservation*. Gould, G.W. (toim.). Blackie Academic & Professional, Glasgow. S. 159–175.
- Koch, H.A., Bandler, R. & Gibson, R.R. 1986. Fluorescence microscopy procedure for quantitation of yeast in beverages. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 599–601.
- Kosse, D., Seiler, H., Amann, R., Ludwig, W. & Scherer, S. 1997. Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *System. Appl. Microbiol.* 20:468–480.
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1987. Classification of yeasts. Teoksessa: *The yeasts. Volume I. Biology of yeasts*. 2. painos. Rose, A.H. & Harrison, J.S. (toim.). Academic Press Limited, Alden Press, Oxford. S. 5–61.
- Kumar, C.G. & Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42:9-27.
- Kurtzman, C.P. 1990. DNA relatedness among species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Yeast* 6:213–219.
- Kurtzman, C.P. 1998a. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. Teoksessa: *The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 111–121.

- Kurtzman, C.P. 1998b. Nuclear DNA hybridization: Quantitation of close genetic relationships. *Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 63–68.
- Kurtzman, C.P. & Phaff, H.J. 1987. Molecular taxonomy. *Teoksessa: The yeasts*. Volume I. Biology of yeasts. 2. painos. Rose, A.H. & Harrison, J.S. (toim.). Academic Press Limited, Alden Press, Oxford. S. 63–94.
- Kurtzman, C.P. & Blanz, P.A. 1998. Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships. *Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 69–74.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. 1998a. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. *Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 3–5.
- Kurtzman, C.P. & Fell J.W. (toim.). 1998b. *The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos, Elsevier, Amsterdam. 1055 s.
- Kümmerle, M., Scherer, S. & Seiler, H. 1998. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2207–2214.
- Kyriakides, A.L. & Patel, P.D. 1994. Luminescent techniques for microbiological analysis of foods. *Teoksessa: Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Patel, P. (toim.). Blackie Academic & Professional. London. S. 196–231.
- Labuza, T.P. & Breene, W. M. 1989. Applications of ‘Active Packaging’ for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing & Preservation* 13:1–69.
- Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M., Simon, M.I. & Hood, L. 1989. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques* 7:34–42.
- Laidlaw, L., Tompkins, T.A., Savard, L. & Dowhanick, T.M. 1996. Identification and differentiation of brewing yeasts using specific and RAPD polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54:97–102.
- Lambert, R.J. & Stratford, M. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.* 86:157–164.

- Land, G.A., McGinnis, M.R. & Salkin, I.F. 1991. Evaluation of commercial kits and systems for the rapid identification and biotyping of yeasts. Teoksessa: Rapid methods and automation in microbiology and immunology. Vaheiri, A., Tilton, R.C. & Balows, A. (toim.). Springer-Verlag, Heidelberg. S. 353–366.
- La Rocco, K.A., Galligan, P., Littel, K.J. & Spurgash, A. 1985. A rapid bioluminescent ATP method for determining yeast contamination in a carbonated beverage. Food Technol. 39:49–52.
- Larone, D. H. (toim.) 1995. Yeasts and yeastlike organisms. Teoksessa: Medically important fungi. 3. painos. ASM Press Washington D.C. S. 61–89.
- Larson, E. L. & Morton, H. E. 1991. Alcohols. Teoksessa: Disinfection, sterilization and preservation. 4. painos. Block, S.S. (toim.). Lea & Febiger, Philadelphia. S. 204–224.
- Latouche, G.N., Daniel, H.-M., Lee, O.C., Mitchell, T.G., Sorrell, T.C. & Meyer, W. 1997. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. J. Clin. Microbiol. 35:3171–3180.
- Lavallée, F., Salvas, Y., Lamy, S., Thomas, D.Y., Degré, R. & Dulau, L. 1994. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. Am. J. Enol. Vitic. 45:86–91.
- Leskinen, M. 1988. Happiabsorbenttien käyttö pakattujen elintarvikkeiden laadun säilyttämisessä. Maa- ja metsätalousministeriö. 82 s. + liitt. 5 s. (Elintarviketutkimusprojekti 4.5.2.7/1).
- Lewin B. 1994. Genes V. 1. painos. Lewin, B. (toim.). Oxford University Press, New York. 1272 s.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., Kuhls, K. & Börner, T. 1992. Characterization of filamentous fungi and yeasts by DNA fingerprinting and random amplified polymorphic DNA. Belg. Journ. Bot. 125:226–233.
- Lieckfeldt, E., Wieland, M. & Börner, T. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. J. Basic Microbiol. 33:413–426.
- Lipke, P.N. & Ovalle, R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. J. Bacteriol. 180:3735–3740.

- Lischewski, A., Amann, R.I., Harmsen, D., Merkert, H., Hacker, J. & Morschhäuser, J. 1996. Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent *in situ* hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Microbiology* 142:2731–2740.
- Littel, K.J. & LaRocco, K.A. 1986. ATP screening method for presumptive detection of microbiologically contaminated carbonated beverages. *J. Food Sci.* 51:474–476.
- López-Malo, A., Palou, E., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J. & Swanson, B.G. 1998. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Res. Int.* 31:549–556.
- López-Malo, A., Guerrero, S. & Alzamora, S.M. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* thermal inactivation kinetics combined with ultrasound. *J. Food Protect.* 62:1215–1217.
- López-Malo, A., Guerrero, S. & Alzamora, S.M. 2000. Probabilistic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inhibition under the effects of water activity, pH, and potassium sorbate concentration. *J. Food Protect.* 63:91–95.
- Loureiro, V. ja Querol, A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 356–365.
- Lowes, K.F., Shearman, C.A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D.B., Merry, R.J. & Gasson, M.J. 2000. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1066–1076.
- Lyijynen, T. 1996. Ahven- ja kuhafileiden säilyvyys erilaisissa vähittäispakkauksissa. Diplomityö, TKK.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. & Hagny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53: 742–746.
- Magee, B.B., D'Souza, T.M. & Magee, P.T. 1987. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J. Bacteriol.* 169:1639–1643.
- Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M. & Loureiro, V. 1997. Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *Int. J. Food Microbiol.* 38:143–155.

- Mangena, T. & Muyima, N.Y.O. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:291–296.
- Martinez, P., Codón, A.C., Pérez, L. & Benitez, T. 1995. Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast* 11:1399–1411.
- Mattila-Sandholm, T. & Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: a review. *Food Rev. Int.* 8: 573–603.
- Maunuksela, J. 1995. Mikrobien torjunta peretikkahapolla, *Kemia-Kemi* 22:242–244.
- McDonald, K. & Sun, D-W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 52:1–27.
- McGrath, K., Odell, D.E. & Davenport, R.R. 1991. The sensitivity of vegetative cells and ascospore of some food spoilage yeasts to sanitisers. *Int. Biodeterior.* 27:313–326.
- Meaden, P. 1990. DNA fingerprinting of brewer's yeast: current perspectives. *J. Inst. Brew.* 96:195–200.
- Membré, J.M., Kubaczka, M. & Chéné, C. 1999. Combined effects of pH and sugar on growth rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a bakery product spoilage yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4921–4925.
- Merianos, J.J. 1991. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. *Teoksessa Disinfection, sterilization and preservation.* 4. painos. Block S.S. (toim.). Lea & Febiger, Philadelphia. S. 225–255.
- Meyer, B. & Thyborski, T. 1999. New disinfection materials for use in the food industry. *Deutsche Milchwirtschaft* 50:968–970.
- Miller, R. & Galston, G. 1989. Bioluminescent methods for the detection of potential spoilage organisms in packaged beers. *Teoksessa: Stanley, P.E., McCarthy, B.J. & Smither, R. (toim.). ATP Luminescence Rapid Methods in Microbiology.* Blackwell Sci. Publ. Oxford. S. 153–160.
- Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T. & Egli, M. 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiol.* 16:3–14.

- Molina, F.I., Jong, S.-C. & Huffman, J.L. 1993. PCR amplification of the 3' external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces*. FEMS Microbiol. Lett. 108:259–264.
- Montrocher, R., Verner, M.-C., Briolay, J., Gautier, C. & Marmeisse, R. 1998. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:295–303.
- Montville, T.J. & Chen, Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:511–519.
- Moore, R.T. 1998. Cytology and ultrastructure of yeasts and yeastlike fungi. Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 33–44.
- Moreira Da Silva, M., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. 1994. Long-Chain fatty acid composition as a criterion for yeast distinction in the brewing industry. J. Inst. Brew. 100:17–22.
- Morton, H.E. 1957. Alcohols. Teoksessa Antiseptics, disinfectants, fungicides, and chemical and physical sterilization. 2. painos. Reddish, G.D. (toim.). Lea & Febiger, Philadelphia. S. 377–395.
- Mosley, E.B., Elliker, P.R. & Hays, H. 1976. Destruction of food spoilage indicator and pathogenic organisms by various germicides in solution and on a stainless steel surface. J. Milk Food Technol. 39:830–836.
- Mosteller, T.M. & Bishop, J.R. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. J. Food Prot. 56, 34–41.
- Mulard, Y. 1995. Flow cytometry: Real time microbiology testing. Food Tech. Europe. 3/4: 72–76.
- Musters, W., Planta, R.J., van Heerikhuizen, H. & Raué, H.A. 1990. Functional analysis of the transcribed spacers of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA: It takes a precursor to form a ribosome. Teoksessa: The ribosome: Structure, function and evolution. Hill, W.E., Dahlberg, A., Garret, R.A., Moore, P.B., Schlessinger, D. & Warner, J.R. (toim.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. S. 435–442.

Müller, F.-M.C., Werner, K.E., Kasai, M., Francesconi, A., Chanock, S.J., & Walsh, T.J. 1998. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J. Clin. Microbiol.* 36:1625–1629.

Mäntynen, V. 1999. Detection, quantification and characterization of food related microorganisms using molecular and physiological methods. Helsinki: Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki (väitöskirja). 66 s. + liitt. 27 s.

Naito, S., Okada, Y. & Yamaguchi, N. 1991. Studies on the behavior of microorganisms in sponge cake during anaerobic storage. *Packaging technology Science* 4:333–344.

Naumova, E., Naumov, G., Fournier, P., Nguyen, H.-V. & Gaillardin, C. 1993. Chromosomal polymorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica* and related species: electrophoretic karyotyping and hybridization with cloned genes. *Curr. Genet.* 23:450–454.

Ness, F., Lavalley, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. & Dulau, L. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62:89–94.

Neumayr, L., Heyderhoff, G. & Krämer, J. 1988. Differences of resistance between vegetative cells and ascospores of *Saccharomyces* spp. against disinfectants based on peracetic acid, biguanides, and quaternary ammonium compounds. *Monatsschr. Brauwiss.* 41:28–434.

Nishikawa, A., Sugita, T. & Shinoda, T. 1999. Rapid identification of *Debaryomyces hansenii/Candida famata* by polymerase chain reaction. *Medical Mycology* 37:101–104.

Niwa, M. 1993. Rapid determination of trace amounts of microorganisms. *Brauwelt Int.* 2:149–153.

Notermans, S., Dormans, J.A.M.A. & Mead, G.C. 1991. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants. A review. *Biofouling* 5:1–16.

Oda, Y. & Tonomura, K. 1995. Electrophoretic karyotyping of the yeast genus *Torulopsispora*. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:190–193.

Ojajärvi, J. 1996. Desinfektioaineet ja niiden käyttö. Teoksessa: Farmaseuttinen mikrobiologia. Vuorela, P. (toim.). Helsinki: Suomen Farmaseuttinen Yhdistys ry. S. 239–260.

- Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J. & Odendaal, H.J. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 87:726–734.
- Ooraikul, B. 1991. Modified atmosphere packaging of bakery products. Teoksessa: Modified atmosphere packaging of food. Ooraikul, B. & Stiles, M. E. (toim.). Ellis Horwood Limited, Englanti. S. 49–117.
- Oosthuizen, A., Kock, J.L.F., Viljoen, B.C., Muller, H.B. & Lategan, P.M. 1987. The value of long-chain fatty acid composition in the identification of some brewery yeasts. *J. Inst. Brew.* 93:174–176.
- Oriet, P. & Pfenninger, H. 1998. Keimgehaltsbestimmungen von Umgebungsluft mittels Air Sampler in mikrobiologisch sensiblen Bereichen der Bierproduktion in Schweizer Brauereien. *Monatsschr. Brauwiss.* 51:161–164.
- Orrego, C. 1990. Organizing a laboratory for PCR work, pp. 447–454. Teoksessa: PCR Protocols. A guide to methods and applications. Toim. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky ja T.J. White. Academic Press, Inc., USA. S. 447–454.
- Owens, J.D., Thomas, D.S., Thompson, P.S. & Timmerman, J.W. 1989. Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric evaluation of microbial populations. *Lett. Appl. Microbiol.* 9:245–249.
- Palou, E., Aurelio, L.-M., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J. & Swanson, B.G. 1998a. Oscillatory high hydrostatic pressure inactivation of *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Food Prot.* 61:1213–1215.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Davidson, P.M. & Swanson, B.G. 1998b. High hydrostatic pressure come-up time and yeast viability. *J. Food Prot.* 61:1213–1215.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J. & Swanson, B.G. 1999. Polyphenoloxidase activity and color of planched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *J. Food Sci.* 64:42–45.
- Parish, M.E. 1998. High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. *J. Food Safety* 18:57–65.
- Paffetti, D., Barberio, C., Casalone, E., Cavalieri, D., Fani, R., Fia, G., Mori, E. & Pol-sinelli, M. 1995. DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and rest-

riktion fragment length polymorphism is useful for yeast typing. *Res. Microbiol.* 146:587–594.

Patterson, M. 1999. High pressure treatment of foods. *Teoksessa: Encyclopedia of Food Microbiology*. Volume 2. Robinson, R.K., Batt, C.A. & Patel, P.D. (toim.). Academic Press, London, UK. S. 1059–1065.

Paugam, A., Benchetrit, M., Fiacre, A., Tourte-Schaefer, C. & Dupouy-Camet, J. 1999. Comparison of four commercialized biochemical systems for clinical yeast identification by colour-producing reactions. *Medical Mycology* 37:11–17.

Pearson, B.M. & McKee, R.A. 1992. Rapid identification of *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int. J. Food Microbiol.* 16:63–67.

Pecar, M., Tonissen, K. & Rogers, P. 1999. Novel preliminary washing procedure for industrial yeast samples, used to hasten the differentiation of closely related lager strains using polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57:94–98.

Pedersen, M.B. 1994. Molecular analyses of yeast DNA - tools for pure yeast maintenance in the brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52:23–27.

Pettipher, G.L. 1987. Detection of low numbers of osmophilic yeasts in creme fondant within 25 h using a pre-incubated DEFT count. *Lett. Appl. Microbiol.* 4:95–98.

Pettipher, G.L. 1991. Preliminary evaluation of flow cytometry for the detection of yeasts in soft drinks. *Lett. Appl. Microbiol.* 12:109–112.

Phaff, H.J. 1998. Chemotaxonomy based on the polysaccharide composition of cell walls and capsules. *Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 45–47.

Piper, P., Mahé, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P. & Kuchler, K. 1998. The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO Journal* 17:4257–4265.

Piškur, J., Možina, S.S., Stenderup, J. & Pedersen, M.B. 1995. A mitochondrial molecular marker, *ori-rep-tra*, for differentiation of yeast species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2780–2782.

- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 1994. Modern methods for detecting and enumerating food-borne fungi. Teoksessa: Rapid analysis techniques in food microbiology. Toim. P.D. Patel. 1. painos. Blackie Academic & Professional, Glasgow. S. 232–254.
- Pitt, J.J. & Hocking, A.D. (toim.). 1997. Fungi and food spoilage, 2. painos, Blackie Academic & Professional, London. 593 s.
- Posti, S. 1991. Nopeat mikrobiologiset määrittämenetelmät hiivan osoittamiseksi nestemäisistä sokerituotteista. Pro gradu -tutkielma. Helsingin yliopisto. Elintarvikealan koulutusohjelma. Helsinki. 64 s. + liitt. 4 s.
- Praphailong, W., Van Gestel, M., Fleet, G.H. & Heard, G.M. 1997. Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts Lett. Appl. Microbiol. 24:455–459.
- Prillinger, H., Molnar, O., Eliskases-Lechner, F. & Lopandic, K. 1999. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. Antonie van Leeuwenhoek 75:267–283.
- Prudêncio, C., Sansonetty, F. & Côrte-Real, M. 1998. Flow cytometric assessment of cell structural and functional changes induced by acetic acid in the yeast *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Cytometry 31:307–313.
- Querol, A. & Barrio, E. 1990. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res. 18:1657.
- Querol, A., Barrio, E. & Ramón, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. System. Appl. Microbiol. 15:439–446.
- Querol, A., Barrio, E. & Ramón, D. 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. Int. J. Food Microbiol. 21:315–323.
- Quesada, M.P. & Cenis, J.L. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 46:204–208.
- Remus, C.A. 1992. Beware of biofilms. Beverage World 111, 74.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B. & Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 61:3471–3475.

- Reybrouck, G. 1986. Uniformierung der Prüfung von Desinfektionsmitteln in Europa. Zbl. Bakt. Hyg. B. 182:485–498.
- Reyns, K.M.F.A., Soontjens, C.C.F., Cornelis, K., Weemaes, C.A., Hendrickx, M.E. & Michiels, C.W. 2000. Kinetic analysis and modelling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. Int. J. Food Microbiol. 56:199–210.
- Rhoades, J. & Roller, S. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. Appl. Environ. Microbiol. 66:80–86.
- Rohm, H. & Lechner, F. 1990. Evaluation and reliability of a simplified method for identification of food-borne yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 56:1290–1295.
- Roller, S. & Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. Int. J. Food Microbiol. 47:67–77.
- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P. & Gaillardin, C. 1996. Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. System. Appl. Microbiol. 19: 255–264.
- Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Fouracre, R.A., McIlvaney, L. & Farish, O. 1999. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1312–1315.
- Rowe, M.T. & McCann, G.J. 1990. A modified direct epifluorescent filter technique for the detection and enumeration of yeasts in yoghurt. Lett. Appl. Microbiol. 11: 282–285.
- Roy, M & Mulard, Y. 1996. Rapid microbiology using a laser flow cytometer. Food Tech. Europe 4/5:36–40.
- Russell, I. & Dowhanick, T.M. 1996. Rapid detection of microbial spoilage. Teoksessa: Priest, F.G. & Campbell, I. (toim.). Brewing Microbiology. 2. painos. Chapman & Hall. Lontoo. S. 209–236.
- Sabate, J., Cano, J., Querol, A. & Guillamón, J.M. 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. Lett. Appl. Microbiol. 26:452–455.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (toim.). 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2. painos. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sancho, T., Giménez-Jurado, Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. 2000. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. *Food Microbiol.* 17:613–624.
- Sapers, G.M. 1996. Hydrogen peroxide as an alternative to chlorine. Proc. 1996 IFT Annual Meeting. S. 140.
- Sato, M., Watari, J., Sahara, H. & Koshino, S. 1994. Instability in electrophoretic karyotype of brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52: 148–151.
- Schaertel, B.J., Tsang, N. & Firstenberg-Eden, R. 1987. Impedimetric detection of yeast and mold. *Food Microbiol.* 4:155–163.
- Scholte, R.P.M. 1996. Spoilage fungi in the industrial processing of food. Teoksessa: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. ja Filtenborg, O. (eds). Introduction to foodborne fungi. 5th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands. S. 275–288.
- Sen, B.H., Safavi, K.E. & Spångberg L.S.W. 1997. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Archs. Oral Biol.* 42:513–520.
- Shahadi, F., Arachchi, J.K.V. & Jeon, Y.-J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* 10:37–51.
- Shapero, M., Nelson, D. A. & Labuza, T. P. 1978. Ethanol inhibition of *Staphylococcus aureus* at limited water activity. *J. Food Sci.* 43:1467–1469.
- Shapton, N. & Cooper, P.J. 1984. Rapid determination of yeast numbers by impedance measurement using a Bactometer 32. *J. Soc. Dairy Technol.* 37:60–62.
- Shen, P., Jong, S.-C. & Molina, F.I. 1994. Analysis of ribosomal DNA restriction patterns in the genus *Kluyveromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 65:99–105.
- Sheree Lin, C.C. & Fung, D.Y.C. 1987. Comparative biochemical reactions and identification of food yeasts by the conventional method, fung's minimethod, minitek, and the automicrobic system. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 7:1–16.

- Silley, P. & Forsythe, S. 1996. Impedance microbiology – a rapid change for microbiologists. *J. Appl. Bact.* 80:233–243.
- Silvennoinen-Kassinen, S. 1996. Sienet, mycota (fungi). Teoksessa: Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. uudistettu painos. Tiilikainen, A.S, Vaara, M. & Vaheri, A. (toim.). Kustannus Oy Duodecim. S. 440–449.
- Simpson, W.J., Hammond, J.R.M., Thurston, P.A. & Kyriakides, A.L. 1989. Brewery process control and the role of “instant” microbiological techniques. *Proc. 22nd Eur. Brew. Conv. Congr. Brüssels.* IRL Press. Oxford. S. 663–674.
- Simpson, W. J., Fernandez, J.L. & Hammond, J.R.M. 1992. Differentiation of brewery yeasts using a disc-diffusion test. *J.Inst. Brew.* 98:33–36.
- Skogman, L. 1997. Rengörings- och desinfektionsmedels mikrobisida effekt samt deras tensidrester på ytor. Diplomityö. Espoo: Teknillinen korkeakoulu. 114 s.
- Smelt, J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 9:152–158.
- Smith, J. P., Oraikul, B., Koersen, W.J., van der Voort, F. R., Jackson, E. D. & Lawrence, R. A. 1987. Shelf life extension of bakery product using ethanol vapor. *Food Microbiol.* 4:329–337.
- Smole Možina, S. & Raspor, P. 1997. Molecular techniques for yeast identification in food processing. *Food Technol. Biotechnol.* 35:55–61.
- Smole Možina, S., Dlačny, D., Déak, T. & Raspor, P. 1997. Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulaspota* yeasts by PCR ribotyping. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:311–315.
- Smole Možina, S., Čadež, N. & Raspor, P. 1998. rDNA RFLPs and AP-PCR fingerprinting of type strains and grape-must isolates of *Hanseniaspora (Kloeckera)* yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 36:37–43.
- Sousa, M.J., Miranda, L., Côrte-Real, M. & Leão, C. 1996. Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: Effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3152–3157.

Sousa, M.J., Rodrigues, F., Côrte-Real, M. & Leão, C. 1998. Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiol.* 144:665–670.

Sreenivasaprasad, S. & Mills, P.R. 1998. Future directions for PCR in mycology. *Teok-sessa: Applications of PCR in mycology*. Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. & Elander, R.P. (toim.). CAB International, University Press, Cambridge. S. 325–345.

Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. & Ingraham, J.L. (toim.). 1980. *General Microbiology*. 4. painos. The Macmillan Press Ltd., London. 871 s.

Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N. & Stratford, M. 1999. *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature. *J. Appl. Microbiol.* 87:520–527.

Steiner, J.J., Poklemba, C.J., Fjellstrom, R.G. & Elliott, L.F. 1995. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research* 23:2569–2570.

Stewart, P. S., Grab, L. & Diemer, J. A., 1998. Analysis of bioside transport limitation in an artificial biofilm system, *J. Appl. Microbiol.* 85:495–500.

Storgårds, E. 2000. Process hygiene control in beer production and dispensing. VTT Publications 410, Espoo: Technical Research Centre of Finland. 105 s. + liitt. 66 s.

Storgårds, E., Pihlajamäki, O. & Haikara, A. 1997. Biofilms in the brewing process - a new approach to hygiene management. *Proc. 26th Congr. Eur. Brew. Conv.*, Maastricht, 24–29 May. S. 717–724.

Storgårds, E., Simola, H., Sjöberg, A.-M. & Wirtanen G. 1999a. Hygiene of gasket materials used in food processing equipment. Part 1: New materials. *TransIChemE*, 77, C:137–145.

Storgårds, E., Simola, H., Sjöberg, A.-M. & Wirtanen G. 1999b. Hygiene of gasket materials used in food processing equipment. Part 2: Aged materials. *TransIChemE*, 77, C:146–155.

Storgårds, E., Yli-Juuti, P., Salo, S., Wirtanen, G. & Haikara, A. 1999c. Modern methods in process hygiene control - benefits and limitations. *Proc. 27th Eur. Brew. Conv. Congress*, Cannes, 29 May - 3 June. S. 249–258.

- Stubbs, S., Hutson, R., James, S. & Collins, M.D. 1994. Differentiation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* from other *Zygosaccharomyces* species using 18S rDNA as target for a non-radioactive ligase detection reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:268–272.
- Takamatsu, S. 1998. PCR applications in fungal phylogeny. *Teoksessa: Applications of PCR in mycology.* Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. & Elander, R.P. (toim.). CAB International, University Press, Cambridge. S. 125–152.
- Tamura, K., Miyashita, M. & Iwahashi, H. 1998. Stress tolerance of pressure-shocked *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 20:1167–1169.
- ter Steeg, P.F., Hellemons, J.C. & Kok, A.E. 1999. Synergist actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure, and reduced temperature on bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4148–4154.
- Tesch, A. 1993. Schnelle Bestimmung von Hefekontaminationen in Flüssigzuckern. *GIT Fachz. Lab.* 8:672–673.
- Thanos, M., Schönian, G., Meyer, W., Schweynoch, C., Gräser, Y., Mitchell, T.G., Presber, W. & Tietz, H.-J. 1996. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34:615–621.
- Thomas, K. & Whitham, H. 1997. Improvement in beer line technology. *Eur. Brew. Conv. Symp. Draught beer, packaging & dispense*, Edinburgh, September 1996. Verlag Hans Carl, Nürnberg, EBC Monograph XXV. S. 124–137.
- Tokuoka, K., Mihara, Y., Kamoda, J. & Ishitani, T. 1992. Effects of ethanol vapor – low oxygen combination method on the growth of yeasts. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38:1111–1116.
- Tompkins, T.A., Stewart, R., Savard, L., Russell, I. & Dowhanick, T.M. 1996. RAPD-PCR characterization of brewery yeast and beer spoilage bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54:91–96.
- Tredoux, H.G., Kock, J.L.F. & Lategan, P.M. 1987. The use of cellular long-chain fatty acid composition in the identification of some yeasts association with the wine industry. *System. Appl. Microbiol.* 9:299–306.
- Troller, J. A., 1993. Sanitation in food processing. Academic Press Inc, San Diego. S. 30–70, 263–286.

- Török, T. & King, A.D. jr. 1991. Comparative study on the identification of food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1207–1212.
- Török, T., Rockhold, D. & King, A.D. jr. 1993. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *Int. J. Food Microbiol.* 19:63–80.
- Vaari, A., Ahvenainen, R. & Hurme, E. 1994. Aktiiviset ja älykkäät pakkaukset elintarvikkeiden laadun varmistajina. Kirjallisuuskatsaus. VTT Tiedotteita 1581, Espoo: Valtion teknillinen tutkimuskeskus. 83 s.
- Vaitilingom, M., Gendre, F. & Brignon, P. 1998. Direct detection of viable bacteria, molds, and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1157–1160.
- van der Aa Kühle, A. & Jespersen, L. 1998. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* 43:205–213.
- van der Walt, J.P. 1987. The typological yeast species, and its delimitation. Teoksessa: *The yeasts. Volume I. Biology of yeasts. 2. painos.* Rose, A.H. & Harrison, J.S. (toim.). Academic Press Limited, Alden Press, Oxford. S. 95–121.
- van der Vossen, J.M.B.M. & Hofstra, H. 1996. DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.* 33:35–49.
- van Vuuren, H.J.J. & van der Meer, L. 1987. Fingerprinting of yeasts by protein electrophoresis. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:49–53.
- Vanechoutte, M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnology* 6:115–142.
- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S. & Sjöberg, A.-M. 1996. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control* 7:263–276.
- Velázquez, E., Calvo, O., Cervantes, E., Mateos, P.F., Tamame, M. and Martínez-Molina, E. 2000. Staircase electrophoresis profiles of stable low-molecular-weight RNA – a new technique for yeast fingerprinting. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:917–923.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N. & Debevere, J. 1999. developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 10:77–86.

Versavaud, A. & Hallet, J.N. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis combined with rare-cutting endonucleases for strain differentiation of *Candida famata*, *Kloeckera apiculata*, and *Schizosaccharomyces pompe* with chromosome number and size estimation of the two former. *System. Appl. Microbiol.* 18:303–309.

Vogel, J.M. & Scolnik, P.A. 1997. Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat-based polymorphisms without cloning. *Teoksessa: DNA markers, protocols, applications, and overviews.* Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.M. (toim.). Wiley-Liss, Inc., New York. S. 133–150.

Vossen, G.H.M. & Vanstaen, H.D.K.J. 1981. Eine neue Methode für den Schnellnachweis einer mikrobiellen Kontamination von Fruchtsäften durch ATP Biolumineszenz. *Forum Mikrobiologie* 5:280–281.

Walsh, T.J., Francesconi, A., Kasai, M. & Chanock, S.J. 1995. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J. Clin. Morphol.* 33:3216–3220.

Wawer, C., Rüggeberg, H., Meyer, G. & Muyzer, G. 1995. A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Research*, 23:4928–4929.

Webb, B.C., Willcox, M.D.P., Thomas, C.J., Harty, D.W.S. & Knox, K.W. 1995. The effect of sodium hypochlorite on potential pathogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida* species. *Oral Microbiol. Immunol.* 10: 334–341.

Weihe, J.L, Seibt, S.L. & Hatcher JR., W.S. 1984. Estimation of microbial populations in frozen concentrated orange juice using automated impedance measurements. *J. Food Sci.* 49: 243–245.

Welthagen, J.J. & Viljoen, B.C. 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 41:185–194.

Welthagen, J.J. & Viljoen, B.C. 1999. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiol.* 16:63–73.

- Westall, S. & Filtenborg, O. 1998a. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiol.* 15:215–222.
- Westall, S. & Filtenborg, O. 1998b. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiol.* 15:243–249.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Teoksessa: PCR protocols, a guide to methods and applications.* Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (toim.). Academic Press, Inc., San Diego. S. 315–322.
- Wilcocks, K.L. & Smart, K.A. 1995. The importance of surface charge and hydrophobicity for the flocculation of chain-forming brewing yeast strains and resistance of these parameters to acid washing. *FEMS Microbiol. Lett.* 134:293–297.
- Wind, C.E. & Restaino, L. 1995. Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *J. Food Protect.* 58:1257–1259.
- Winniczuk, P.P. & Parish, M.E. 1997. Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against micro-organisms related to citrus juice. *Food Microbiol.* 14:373–381.
- Wirtanen, G. 1995. Biofilm formation and its elimination from food processing equipment. VTT Publications 251. Espoo: Technical Research Centre of Finland. 106 s. + liitt. 48 s.
- Wirtanen, G., Salo, S., Maukonen, J., Bredholt, S. & Mattila-Sandholm, T. 1997. Sanitation in dairies. VTT Publications 309. Espoo: Technical Research Centre of Finland. 47 s. + liitt. 22 s.
- Wirtanen, G., Salo, S., Allison, D.G., Mattila-Sandholm, T. & Gilbert, P., 1998. Performance-evaluation of disinfectant formulations using poloxamer-hydrogel biofilm-constructs, *J. Appl. Microbiol.* 85:965–971.
- Yamada, Y. 1998. Identification of coenzyme Q (ubiquinone) homologs. *Teoksessa: The yeasts, a taxonomic study.* 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 101–102.
- Yamagishi, H., Otsuta, Y., Funahashi, W., Ogata, T. & Sakai, K. 1999. Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. *J. Appl. Microbiol.* 86:505–513.

- Yamauchi, H., Yamamoto, H., Shibano, Y., Amaya, N. & Saeki, T. 1998. Rapid methods for detecting *Saccharomyces diastaticus*, a beer spoilage yeast, using the polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56:58–63.
- Yamazaki, M., Kutzman, C.P. & Sugiyama, J. 1998. Electrophoretic comparisons of enzymes. Teoksessa: *The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 49–54.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Teoksessa: *The yeasts, a taxonomic study*. 4. painos. Kurtzman, C.P. & Fell J.W. (toim.). Elsevier, Amsterdam. S. 77–100.
- Yli-Juuti, P. 1999. Avoimien pintojen pesut ja prosessihygienian seuranta panimoissa. Diplomityö Teknillisessä korkeakoulussa. 108 s.
- Yli-Juuti, P. & Storgårds, E. 1999. Avoimien pintojen pesut ja prosessihygienian seuranta. *Mallas ja Olut*, 1:4–13.
- Zimmerli, A. 1980. Quantitative Bestimmung von wenigen osmotoleranten Hefen in Lebensmitteln. *Alimenta* 19:67–71.
- Zindulis, J. 1984. A medium for the impedimetric detection of yeasts in foods. *Food Microbiol.* 1:159–167.
- Zolan, M.E. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews* 59:686–698.
- Zottola, E.A. & Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry – should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.* 23: 125–148.



Tekijä(t) Juvonen, Riikka, Nohynek, Liisa, Storgårds, Erna, Wirtanen, Gun, Honkapää, Kaisu, Lyijynen, Tuija, Morkila, Mirja & Haikara, Auli			
Nimeke Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa Kirjallisuusselvitys			
Tiivistelmä <p>Hiivat tunnetaan lähinnä hyötyorganismeina niiden käytöstä oluen, viinin ja leivän valmistuksessa. Hiivoilla voi olla myös epäedullisia vaikutuksia elintarvikkeissa. Hallitsematon hiivakasvu tuotantoketjun eri vaiheissa voi johtaa tuotanto-ongelmiin ja tuotteiden aistittavan laadun heikkenemiseen sekä näistä seuraten taloudellisiin tappioihin. Elintarvikkeen mikrobiologisen laadun takaaminen edellyttääkin yleensä koko tuotantoketjun mikrobiologian hallintaa.</p> <p>Tämä katsaus on laaja tietopaketti elintarvikkeiden pilaajahiivoista sekä niiden hallinta-, tunnistus- ja jäljityskeinoista. Alussa tarkastellaan lyhyesti hiivojen yleisiä ominaisuuksia ja luokittelua sekä hiivojen esiintymistä ja vaikutuksia erityyppisissä elintarvikkeissa. Katsauksen painopiste on pilaajahiivojen kasvun hallintaan vaikuttavien tekijöiden esittelyssä. Mikrobikontaminaatioiden ennaltaehkäisyssä tuotantohygienialla on avainasema. Katsaukseen on koottu se vähäinen kirjallisuudessa saatavilla oleva tieto elintarvikeperäisten hiivojen kyvystä muodostaa prosessipinnoille biofilmiä sekä prosessiin pesiäytyneiden hiivojen tuhoamiseen tutkituista pesu- ja puhdistusaineista. Katsaukseen on kerätty myös uusin tutkimusaineisto elintarvikkeiden sisäisten ja ulkoisten ominaisuuksien sekä eri prosessointi- ja säilöntämenetelmien vaikutuksista pilaajahiivoihin. Uusista menetelmistä esitellään suurpaine, ultraääni, valopulssit ja erilaiset pakkaus- ja yhdistelmätekniiset menetelmät. Perinteisten prosessointi- ja säilöntäkäsittelyjen teho pilaajakan-toihin on usein huono eivätkä uudet kevennetyt tekniikat yleensä ole yksinään riittävän tehokkaita pilaantumisen estämiseksi. Kevennetyt tekniikoiden yhdistelmäkäyttö voisi kuitenkin tarjota varteenotettavan vaihtoehdon pilaajahiivojen kasvun rajoituksessa. Tutkimus- ja kehitystyötä tarvitaan vielä runsaasti. Teollisuuden prosesseihin pesiäytyneiden pilaajahiivojen nopea paikallistaminen ja tunnistaminen on kontaminaation sattuessa tärkeää tehokkaiden puhdistustoimenpiteiden valitsemiseksi ja kohdistamiseksi kriittisiin kohtiin. Katsauksessa käydään läpi yksityiskohtaisesti hiivojen tunnistamiseen ja tyypittämiseen kehitetyt tekniikat sekä näiden tekniikoiden edut, haitat ja sovellukset sekä niiden käyttöön liittyviä näkökohtia. Painotus on perimän analysointiin perustuvissa DNA-sormenjälkitekniikoissa. Lopuksi esitellään hiivojen osoittamiseen ja määrittämiseen elintarvikkeista käytettyjä perinteisiä ja nopeita menetelmiä.</p>			
Avainsanat food industry, contamination, yeasts, food processing, identification, phenotype, genotype, biofilms, disinfection, packaging, yeast spoilage, control			
Toimintayksikkö VTT Biotekniikka, Mikrobiologia, Tietotie 2, PL 1500, 02044 VTT			
ISBN 951-38- 5905-3 (nid.) 951-38- 5906-1 (URL: http://www.inf.vtt.fi/pdf/)		Projektinumero B0SU00043	
Julkaisu-aika Syyskuu 2001	Kieli Suomi, engl. abstr.	Sivuja 144 s.	Hinta C
Avainnimeke ja ISSN VTT Tiedotteita – Meddelanden – Research Notes 1235-0605 (nid.) 1455-0865 (URL: http://www.inf.vtt.fi/pdf/)		Myynti: VTT Tietopalvelu PL 2000, 02044 VTT Puh. (09) 456 4404 Faksi (09) 456 4374	

Published by



Vuorimiehentie 5, P.O.Box 2000, FIN-02044 VTT, Finland
Phone internat. +358 9 4561
Fax +358 9 456 4374

Series title, number and
report code of publication

VTT Research Notes 2107
VTT-TIED-2107

Author(s) Juvonen, Riikka, Nohynek, Liisa, Storgårds, Erna, Wirtanen, Gun, Honkapää, Kaisu, Lyijynen, Tuija, Mokka, Mirja & Haikara, Auli			
Title Control of yeast contaminations in food industry Literature study			
Abstract <p>Yeast are usually known for their beneficial role in the production of fermented foods. However, yeast can also act as food spoilage agents. Abundant growth of unwanted yeasts during various stages of production can lead to production problems and quality defects in the final product. Hence, the production of microbiologically wholesome food is usually best achieved by controlling microbial contaminations throughout the whole production chain.</p> <p>This literature review is an extensive information package about foodborne yeasts and their control and identification methods. First, general properties and the classification system of yeasts are summarised alongside with the occurrence and effects of yeast in various types of food. The review focuses on the presentation of different factors controlling the contamination and growth of yeasts in food. Good production hygiene has a key role in the prevention of contaminations. The few published articles about the biofilms formed by foodborne yeasts and about the effects of different cleaning and disinfecting agents on yeasts are summarised, and the latest information about the effects of different physical, chemical and biological factors on yeasts is presented. Traditional and state-of-the-art food preservation methods and their effectiveness against yeast are summarised. Traditional methods, such as chemical preservatives, are often ineffective against food spoilage strains and there is a tendency to avoid their use. Recently, promising results have been obtained with the combined use of different minimal processing methods. However, much research work is still needed in this field. The solving of contamination problems and the selection of appropriate intervention measures often necessitates rapid tracing and identification of the contaminating organisms. In this publication, phenotypic and genotypic methods for the identification, typing and detection of foodborne yeasts are reviewed in detail and their practicality in routine food control is discussed.</p>			
Keywords food industry, contamination, yeasts, food processing, identification, phenotype, genotype, biofilms, disinfection, packaging, yeast spoilage, control			
Activity unit VTT Biotechnology, Microbiology, Tietotie 2, P.O.Box 1500, FIN-02044 VTT, Finland			
ISBN 951-38-5905-3 (soft back ed.) 951-38-5906-1 (URL: http://www.inf.vtt.fi/pdf/)		Project number B0SU00043	
Date September 2001	Language Finnish, Engl. abstr.	Pages 144 p.	Price C
Series title and ISSN VTT Tiedotteita – Meddelanden – Research Notes 1235-0605 (soft back edition) 1455-0865 (URL: http://www.inf.vtt.fi/pdf/)		Sold by VTT Information Service P.O.Box 2000, FIN-02044 VTT, Finland Phone internat. +358 9 456 4404 Fax +358 9 456 4374	