



Klostriidid, nende mõju piima- ja piimatoodete kvaliteedile ning ohutusele

DSc., Priit Elias
BioCC, juhtiv teadur

2018

Klostriidid ?

Tüüpilised klostriidid on endospore (rakusiseseid spore) moodustavad kepikujulised grampositiivsed, karbohüdraate fermenteerivad anaeroobsed bakterid.

Nende optimaalne kasvutemperatuur on 37 °C ja nad inhibeeruvad pH väärtusel 4,5.

Mõned neist produtseerivad toksiine nagu *C. botulinum*, *C. perfringens* ja *C. butyricum*

Nad tekitavad võihappelist käärimist, millest tulenevalt nimetatakse neid vahel ka võihappebakteriteks

Võihappebakterid kuuluvad *Clostridium*'i perekonda, ja neid on seal üle 100 erineva liigi.

. Eraldi kirjeldatakse nn tuumikgruppi ja märgitakse neid kui "tõelisi" *Clostridium* spp.

Clostridium butyricum'i peetakse selle grupi nurgakiviks, sest ta avastati nendest esimesena.

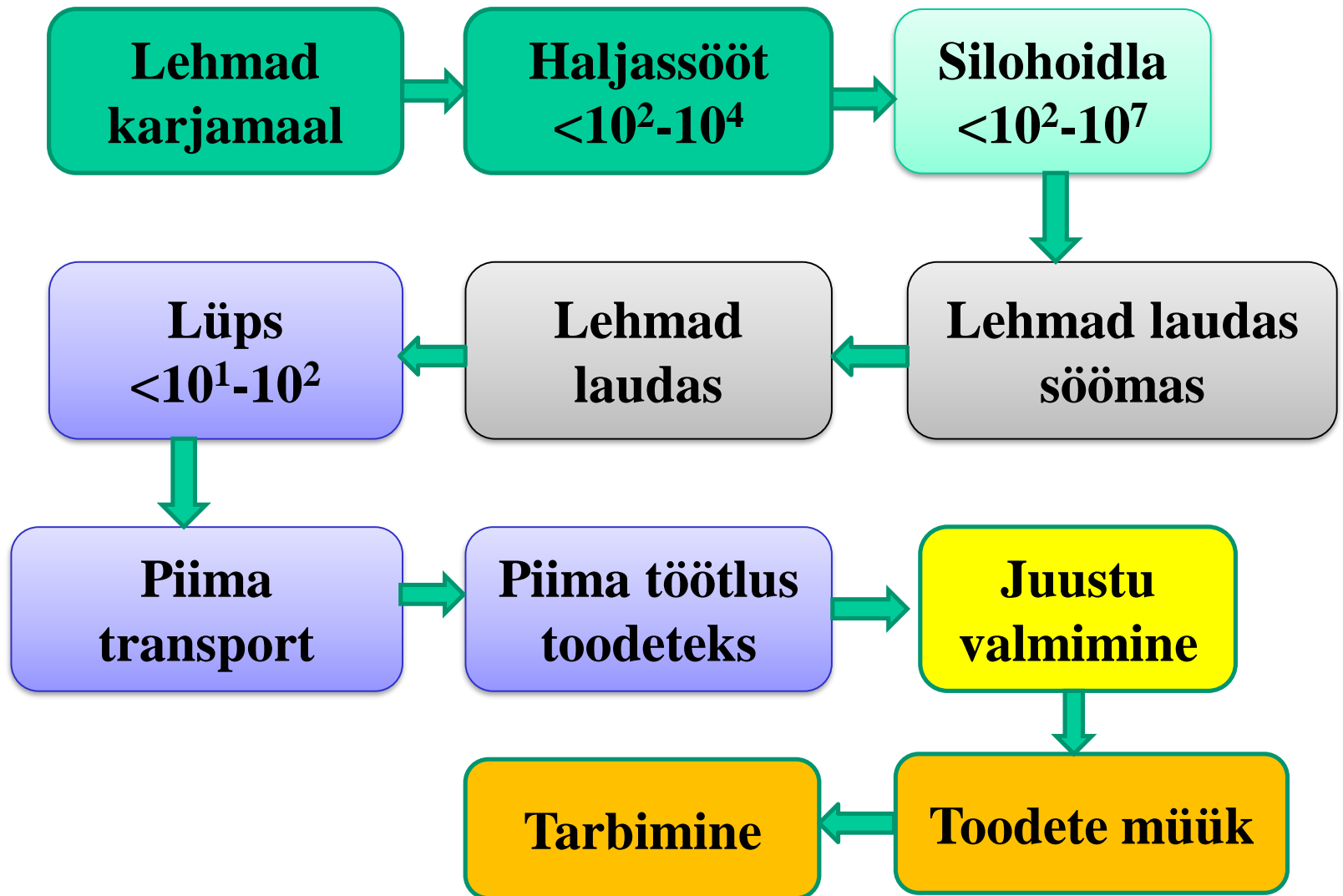
See grupp hõlmab enamiku toiduga seoses olevaid liike kaasaarvatud neurotoksigeensed liigid: *C. botulinum* ja *C. tetani* kui ka toidumürgistusi tekitavad nagu *C. perfringens* ja sulfiide redutseerivad klostriidid.

Piimanduses seostuvad nad piimatoodete riknemisega, kus osalevad põhiliselt *Clostridium butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* ja *C. sporogenes*

Riknemisel tekib laktaatide fermentatsioonil võihape, atsetaat, CO₂ ja H₂.

Gaasi tekitab ka *Clostridium sporogenes*, kuid läbi proteolüüsi ja võihapet ei teki.

Kuidas sattuvad klostriidid piima ja piimatoodetesse?



Joonis 1 Mikroobid koos tootega laudast lauale

Seega **toorpiima bakteriaalse saastumise allikad on:**

muld, taimed, söödad, õhk, allapanu, sõnnik, lüpsiseadmed jne.

Eosbakterite arv ja mitmekesisus piimas pärast lüpsi sõltub **loomade ja seadmete puhtusest ning loomade tervisest.**

Spoore moodustavad bakterid satuvad piima enamasti mullast, sõnnikust ja allapanust saastunud udaralt.

Õlgedest allapanu, silo ja mastiit suurendavad ohtu piima saastes spooridega.

Seadmete (lüpsi- jahutus-, hoiu- ja transpordi-) **ebapiisav pesu ning loputusvee jäägid** on olulisteks toorpiima bakterite kaasaarvatud patogeensete allikateks.

Ebakvaliteetne **silo** on peamiseks toorpiima termoresistentsete *Clostridium* spp. spooridega saastumise allikaks

Silo kvaliteeti mõjutavad tegurid: algmaterjal, fermentatsiooni tingimused, pH, kuivainesisaldus ja saastumise aste.

Ebakvaliteetse silo söötmine, spooride elulevus seedetraktis, sõnnikuga saastunud allapanu, udara ja nisade saastumine ning piima saastumine.

Karjamaal saastub udar ja nidad mulla mikroflooraga. ja spooride arv piimas võib siis tõusta ka üle 1000 ml-s.

Juustud koosnevad suhteliselt vähestest koostisosadest, milledeks on enamasti piim, lisatavad juuretiste kultuurid, laap ja/või hape, ning sool.

Seega **juustu omadused tekivad valmistamisel**, kuna juustudes on muutuv mikrofloora

Juustude **omadused sõltuvad** suurel määral lisatavate kultuuride valikust, piima tüübist, piima kvaliteedist, laapumise ja valmimise ajast.

Juustude valmimisel toimuvad nendes **vastavad füüsikalised, keemilised ja biokeemilised protsessid.**

Valmimisel väheneb veesisaldus, suureneb tugevus ja muutuvad rasva ning valgu omadused.

Pärmseente, hallitusseente ja proteolüütiliste bakterite ainevahetusel kasutatakse lakatate ja tõuseb juustude pH väärtus.

Valmimise aeg sõltub juustu liigist ja selle tekstuuri ning maitseomadustest.

Näiteks Parmigiano Reggiano juustul on see 20-24 kuud, Grana Padanol 14-16 kuud, Šveitsi ja Cheddaril 3-12 kuud ning hollandi tüüpi juustudel 4 nädalat.

Juustusid nagu Permigiano Reggiano ja Emmental üldjuhul ei valmistata siloga söödetud lehmade piimast, et vähendada spooridega saastumise riski.

On leitud, et piima spooride arv ja esinemine on korrelatsioonis farmi sõnniku, õlletehase praaga ja söödetava kõrge pH väärtuse ning madala kvaliteedilise silo spooride arvuga.

Klostriidide liikidest võib piimast ja riknenud juustudest kõige sagedamini leida :

Clostridium perfringens'it,

Clostridium tyrobutyricum'i,

Clostridium butyricum'i,

Clostridium sporogenes't ja

Clostridium beijerinckii

Klostriidid taluvad pastöriseerimist ja nende spoorid võivad säilida väga kaua erinevates tingimustes.

Eluvõimelisi spoore on leitud näiteks piimapulbrist või 25-40 miljonit aastat vanadest materjalidest.

Hilise paisumisega võivad olla kaasatud järgmised
võihappebakterid:

Clostridium tyrobutyricum

Clostridium butyricum

Clostridium sporogenes

Domineerivaks juustudes sellest perekonnast **on enamasti *C. tyrobutyricum***, mis juustus oleva piimhappe kasutamisel produtseerib sinna võihapet, atsetaati, CO₂ ja H₂.

Gaasidest tekib juustude paisumine

Seega *C. tyrobutyricum* poolt tekitatud juustude riknemine on sagedane juustude valmimise hilisemas faasis kui nende pH väärtus on piisavalt tõusnud.

Riknemine *C. butyricum*i poolt tekib samuti valmimise hilises faasis, kuid tema vajab selleks laktoosi.

C. sporogenes põhjustab riknemist alles pärast ühte aastat, sest ta kasutab vabu aminohappeid

Hiline paisumine võib ilmned 7-60 päeva peale valmistamist sõltuvalt osalevast tüvest

Gaasid põhjustavad juustu tekstuuris auke, lõhesid ja murenemist, millega kaasnev ebameeldiv maitse ja võihappe lõhn

Paisumisvigadega juustude hulka kuuluvad paljud soolvees soolatavad juustud, soojas valmivad juustud ja kaua valmivad juustud.

Klostriidide kasvu juustus mõjutab valmimis-temperatuur, kõrge niiskusesisaldus, vee aktiivsus, piima algne spooride arv, pH, soola sisaldus, soola penetratsiooni kiirus soolveest juustu, lisatavad juuretise kultuurid ja piima somaatiliste rakkude arv.



Gomez-Torres, et al., 2015

Enim ohustatud on Šveitsi tüüpi (Emmental ja Šveitsi), Hollandi tüüpi (gouda ja edam) ning Itaalia tüüpi kõvad juustud.

Nad valmivad suhtelisel kõrgetel temperatuuridel ja soolatakse soolvees.

Clostridium tyrobutyrium'i kasvu kiirus sõltub soola difusiooni kiirusest juustu sisemusse.

Väga tugevad Itaalia juustud nagu Grana Padano ja Parmigiano Reggiano on samuti hilisele paisumisele tundlikud tulenevalt nende pikast valmimisajast.

Meetodeid juustude paisumise vältimiseks

Pastöriseerimine

Pastöriseerimine hävitab enamuse piima patogeenidest, hallitus- ja pärmseentest, kuid ei hävita endospore.

Juustupiima pastöriseerimine vähendab sporogeensete ja spore mittetekitavate ja vegetatiivseid vorme

Puhtad seadmed ja kinnised tootmisliinid aitavad vähendada pastöriseerimisejärgset saastumist

Lisandid

Keedusool

Valmivates juustudes sool niiskuses $\geq 3\%$ inhibeerib klostriidide kasvu ja hilise paisumise teket.

Soola difusioon pinnalt sisemusse soolvees soolamisel võib kesta mitmeid nädalaid, ja see võib pidurdumisel jääda hiljaks

Nitraadid

Kasutatakse nii varase kui ka hilise paisumise vältimiseks.

Võidakse kasutada NaNO_3 ja KNO_3 . Nad muutuvad aktiivseks redutseerituna nitrititeks.

Lisatakse harilikult soolvees soolatatavatele juustudele, et inhibeerida klostriide.

Sveitsi tüüpi juustudele ei lisata, sest inhibeerivad ka propioonhappebakterite kasvu.

Bakteriotsiinid.

Nad on laktobatsillide poolt produtseeritavad antimikroobsed ained.

Neid lisatakse mittekultuuridena olevate mikroobide inhibeerimiseks

Näiteks lisatava *Lactobacillus reuteri*'i poolt produtseeritav reuteriin on efektiivne hilise paisumise vastu nagu ka nisiin ja laktitsiin (produtseeritud *L. lactise* poolt).

Neil on toime nii hilise paisumise kui ka teiste riknemisel osalevate mikroobide vastu.

Lisatavad kultuurid

Neid võidakse lisada toorpiimale, et inhibeerida mikroorganisme eriti psührotroofseid, sest nad kasvavad edukalt ka külmas piimas.

Mõningaid laktobaktereid lisatakse ka silole, et kaitsta silo pärmide vastu

Lüsoosüüm

Seda ekstraheeritakse munavalgest ja on lisandina kasutatav grampositiivsete bakterite aga ka klostriidide vastu.

Lüsootsüümi kasutatakse Grana Padano valmistamisel, kuid näiteks Permigiano Reggiano valmistamisel lisandeid ei kasutata ja fermenteeritud sööta loomadele ei anta .

Ta on vähem efektiivne kui nitraadid

Baktofugeerimine

Tsentrifugaaljõu toimele eraldatakse nii baktereid kui ka spoore.

Piimast eraldatakse ligi 95% bakterite üldarvust ja 60% spooridest.

Mikrofiltratsioon

On võetud kasutusele koos kuumtöötusega ka juustude valmistamisel ning toodete säileaja pikendamisel.

Membraan pooride mõõtmetega 1-10 μm eraldab baktereid ja spoorid.

Teda kasutatakse ka vahendina suurendada juustude väljatulekut, parandada kalgendi omadusi ja saada ühtlasema koostisega piima.

Seda saaks kasutada näiteks lõssi juures, sest rasvagloobulite mõõtmed on ligilähedased spooride mõõtmetega ja eralduvad koos rasvaga.

Hügieen

Hea sanitaarhügieeniline olukord nii piima tootmisel kui töötlemisel

Udara puhastamine, desinfitseerimine, kuivatamine, seadmete pesemine, desinfitseerimine ja vee temperatuur

Lisaks veel ümbritsev õhk, vesi ja kontaktid töötajatega.

Toorpiima kiire jahutus.

Jahutamine alla 4 °C poole tunni jooksul pärast lüpsi

Temperatuuri tõus iga 2 °C võrra vähendab piima säilivust ligi 50%.

Talvel on risk juustude paisumiseks suurem, sest piima võimalik saastumine on suurem.

Toidumürgistused ja klostriidid

Clostridium perfringens on toidumürgistust tekitav sulfiide redutseeriv klostriid, mida on leitud ka toorpiimast

Ta on looduses laialt levinud patogeenne organism, sisaldades geene, mis kodeerivad 17 erinevat toksiini.

Tal on 5 alamliiki nimetustega A-st kuni E-ni.

C. perfringens tüüp A on üks toidumürgistusi tekitav liik, mis põhjustas USA-s aastas miljon haigestumist.

C. perfringens'i mürgistust põhjustab **enterotoksiin tekitab tõsiseid kõhukrampe ja kõhulahtisust.**

Haigestumist põhjustavad ka alamliikide B, D ja E poolt produtseeritud toksiinid

Clostridium botulinum

Ta on üks neurotoksigeenne *Clostridium*'i liikidest ja võib leiduda farmis. Piimatoodetest võib teda leida kuivatatud toodetes näit. piimapulbris.

C. botulinum **produtseerib** väga toksilist **neurotoksiini**, ühte tugevaimat, mida inimkond tunneb

Tuntakse 7 alamliiki märgituna A-G-ni. Mõned neist alamliikidest võivad produtseerida ka mitmeid toksiine

A- alamliigist on ohustatud imikud vanuses 2-32 nädalat ja immuunpuudulikkusega ning ebaterve seede- mikroflooraga isikud.

Imikusse sisenenud *C. botulinum*'i spoorid hakkava veel väljakujunemata seede mikroflooras ning kõrge pH väärtusega keskkonnas paljunema ja produtseerima toksiini.

C. botulinum'i annus pole täpselt teada, kuid arvatakse, et see võiks olla 10-100 spoori.

Ülekande keskkonnaks võivad olla pulbrilised piimatooted.

Haiguspuhanguid on olnud Brie tüüpi juustude tarbimisel, kus juustud puutusid valmimisel kokku sõnnikuga saastunud õlgedega.

Haigestumine botulismi on toimunud ka *Clostridium botulinum*‘i B-ga saastunud **jogurti tarbimisel**.

Juhuseid on olnud ka sarapuupähkleid (lisati maitse ja lõhna parandamiseks) sisaldava jogurti tarbimisel, mis ei olnud piisavalt steriliseeritud.

USA-s on sulfiide redutseerivate klostriidide piirmääraks 10-25 pmü g⁻¹

EL-s klostriidide spooridele piimas ja piimatoodetes piirmäär pole, kuid töötledjad seda siiski kasutavad oma saadava piima hindamisel

Ligikaudu 100 spoorist liitris piimas kõvade juustude valmistamisel ja

1000 spoorist liitris poolkõvade juustude valmistamisel on küll, et käivituks võihappeline käärimine; võihappe, CO₂ ja H₂ teke ning juustude riknemine.

Kasutatud materjalid:

Feligini, M., Brambati, E., Panelli, S., Ghitti, M., Sacchi, R., Capelli, E. and Bonacina C. 2014. One-year investigation of *Clostridium* spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Food Control*; 42: 71-77).

Brüggemann, H. & Gottschalk, G. (Eds 2009. *Clostridia: Molecular Biology in the Post-genomic Era*. Göttingen: Caister Academic Press, pp 1, 29, 216).

Dasgupta, A.P., Hull, R.R. 1989. Late blowing of swiss cheese incidence of clostridium tyrobutyricum in manufacturing milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 44(2): 82-87

Wiegel, J., R. Tanner and F. A. Rainey 2006. An introduction to the family *Clostridiaceae*. *The prokaryotes*, Springer: 654-678

Dhaked, R. K., M. K. Singh, P. Singh and P. Gupta 2010. "Botulinum toxin: Bioweapon & magic drug." *The Indian journal of medical research* **132**(5): 489

Gomez-Torres, N. Peiroten, A., Garde, S., Avila, M. 2015. Impact of *Clostridium* spp. on cheese Characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control* 56:186-194.

Täna tähelepanu eest!