

Sekundaarse mikroobse saastumise põhiallikad piimatööstuses

Priit Elias

Juhtivteadur BioCC OÜ

Piimatööstuses võivad mikroobselt saastuda:

kasutatav tooraine;

kasutatavad lisaained;

valmistatavad tooted.

Sekundaarseteks saasteallikateks erinevates tootmisloikudes ja toodete valmistamisel võivad olla:

seadmed;

tootmisruumide õhk;

töötajad.

Piimatööstuse sekundaarsed saasteallikad koos vastavate seadmetega ja keskkonnaga võib tööstusesiseselt või tootmise seisukohalt jaotada kolme ossa:

toorme vastuvõtt,

toorme eeltöötlus,

toodete valmistamine.

Toorme (piima, kooritud piima, peti, vadaku jne ning kasutatavate lisaainete) vastuvõtul võivad saasteallikateks kujuneda:

vastuvõtu keskkond (ruumi üldine olukord ja õhk);

vastuvõtu seadmed:

torustik,

pumbad,

kaaluvannid,

vooluhulga lugejad,

vastuvõtu töötajad jne.

Tooraine (piim, kooritud piim, pett jne.) tuleb vastuvõtu osakonda üldjuhul suhteliselt madalatel temperatuuridel (jahutatult) ja satub kontakti vastavate seadmetega:

torustik,

kaalud,

kaaluvannid,

vooluhulga lugejad,

vastuvõtu mahutid (tankid, vannid),

ning keskkonnas oleva õhuga.

Tooraine (toorpiim, kooritud piim jne.) sisaldab üldjuhul alati teatud arvu erinevaid mikroorganisme (bakterid, hallitus- ja pärmseened).

Toormega kokkupuutuvatel seadmete pindadelt võime samuti leida suuremal või vähemal määral erinevaid mikroorganisme, millede hulk sõltub seadme ettevalmistamisest (pesust, desinfitseerimisest).

Sellises olukorras võivad säilida teatud mikroorganismidel kõik eluks ja paljunemiseks vajalikud tingimused:

temperatuur,

niiskuse sisaldus,

toitained,

keskkonna pH.

Toorme eeltöötlus

- Enne toodete valmistamist võidakse töödelda kasutatavat toorainet (toorpiima, lõssi, petti jne.) vastavalt tehnoloogilistele vajadustele kas termiliselt:

termiseerimine (**57-68 °C, 15 sek.** (haril. 62-68 °C)), et vähendada piimas termolabiilsete psührotroofsete bakterite hulka ja pidurdada **termostabiilsete** proteaaside lipaaside ja fosfolipaaside produktsiooni;

pastöriseerimine (kestevpastöriseerimine 63-65 °C, 30 min; lühiajaline pastöriseerimine 72-75 °C, 15-20 sek.; kõrgpastöriseerimine 80-85 °C, 1-5 sek.).

- **Pastöriseerimise eesmärk:**

minimeerida piimas patogeensete mikroorganismide olemasolul, võimalikku ohtu tarbija tervisele ja säilitada võimalikult paremini piima füüsikalisi, keemilisi ja organoleptilisi omadusi.

- **UHT töötlemine** (piima kõrgkuumutamine temperatuuril 135-140 °C, 1 sekund:
 - **inaktiveeritakse** kuni 100% piimas leiduvast mikrofloorast,
 - **aktiivseks jäävad**: termoresistentsed mikroobid (*Bacillus* spp.) ja nende spoorid ning psührofiilsete poolt produtseeritud eksoensüümid

Steriliseerimine

Toimub temperatuuril 115-120 °C, 20-30 min.

Inaktiveerib 100% kogu piimas oleva mikrofloora ja kõik nende spoorid

Mõjub piima koostisele:

struktuursed muutused kaseiinis,

valkude denaturatsioon,

suhkrute karamelliseerumine,

piima värvuse muutumine pruunikaks,

vitamiinide teatud kadu,

muutub piima kaltsiumi ja fosfori sisaldus, kadu kuni 50%

Füüsikalis-mehaanilised meetodid eeltöötlusel:

Rõhk (*Ultra high pressure UHP*)

Külmpastöriseerimine; kasutatakse rõhku 100-1000 MPa temperatuuril 25 °C, 10 min.

Saavutatakse sama efekt, mis lühiajalisel pastöriseerimisel (72-75 °C, 15-20 sek. (*HTST*) patogeensete ja roisubakterite inaktivatsioonil).

Homogeniseerimine

Kasutusel on: kõrgsurve homogeniseerimine, 10-30 MPa, ja madalsurve homogeniseerimine, 0,5-3 MPa.

Optimaalne temperatuur 60-70 °C.

Tabel 1. Membraanfiltratsiooni liigid

Liik	Rõhk, bar	Filtraat	Kontsentraat	Pooride suurus, μm
Hüperfiltratsioon e. pöördosmoos	30-60	vesi	soolad, laktoos, valgud, rasv, bakterid	$10^{-4} - 10^{-3}$
Nanofiltratsioon	20-40	vesi soolad (osaliselt)	soolad, laktoos, valgud, rasv, bakterid	$10^{-3} - 10^{-2}$
Ultrafiltratsioon	1-10	vesi, soolad, laktoos	valgud rasv bakterid	$10^{-2} - 10^{-1}$
Mikrofiltratsioon	<1	vesi, soolad, laktoos, valgud (osal.)	valgud, rasv bakterid	$10^{-1} - 10^1$

Mikrofiltratsioon

Kasutatakse bakterite ja makromolekulide eemaldamiseks:

bakterite sisalduse vähendamiseks lõssis, vadakus ja soolvees,

rasva eemaldamiseks vadakust ja petist.

Bactotherm

Piim soojendatakse eelsoojendis 60-75 °C, baktofuugitakse, pastöriseeritakse ja jahutatakse edasise töötlemiseni

Baktofugaat pumbatakse läbi plaatsoojusvaheti ja vaakumdeaeraatori auruinzeektorisse, kus toimub baktofugaadi segamine auruga ja spooride ning bakterite inaktiveerimine (temperatuur 130-140°C, rõhk 3 bar, hoideaeg 3-4 sek).

Steriliseeritud baktofugaat jahutatakse

Ultraviolettkiirgus

Ultraviolettkiirgus on elektromagneetiline kiirgus, mille lainepikkus väiksem kui nähtaval valgusel (spektri violetne osa) ja suurem kui röntgenkiirgusel

Kasutatakse ruumide õhu desinfitseerimiseks

Ultraheli

Ultraheli on heli, mille sagedus on üle 20 000 Hz

Kui vedelikku kiiritada ultraheliga, tekib nähtus kavitatsioon ehk mullid, mis kasvavad ning seejärel lõhkevad. Toimib kõrge rõhk, temperatuur ja nihke jõud.

Kavitatsioonimullide temperatuur on umbes 1340 °C, rõhk umbes 1000 atm ning soojenemis ja jahtumise kiirused üle 10^{10} C/s. tekib lühiajaline lokaliseeritud kuum koht.

Kasutatakse mikroorganismide ja bakteriofaagide inaktiveerimiseks piimas, vadakus jne.

Toodete valmistamise sektor

Piimatööstuses võidakse valmistada järgmisi tooteid:

- täispiima tooted
- hapupiimatooted
- või
- juust
- pulbrid

Kõigi nende toodete valmistamisel kasutatakse vastavaid tehnoloogilisi seadmeid, mis koosnevad vastavatest aparaatidest, pumpadest, torustikust, membraanidest jne.

Mikroobide sekundaarseteks saasteallikateks saavad siin olema vastavad seadmed toodete valmistamisel:

täispiima toodete tootmisel,

fermenterid hapupiimatoodete valmistamisel,

võimasinad,

juustuvannid ja –tankid,

pulbri valmistamise seadmed ja kuivatid,

kõigi nende seadmetega seoses olevad tankid või vannid,

kõiki tehnoloogias kasutatavaid seadmeid ühendavad torud ning kraanid.

Mikroobse sekundaarse saaste allikateks või neid kujundavateks teguriteks võivad saada siin:

seadmetes kasutatav temperatuur,

seadme toormega kokkupuutuvatele pindadele tekkiv biokile,

seadmete puhastus ja desinfitseerimine,

seadme töökeskkonna olukord ja inimlik faktor.

- Tooraine oma jääk-mikroflooraga eeltöötlustest võib osutuda üheks toote mikroobidega saastumise allikaks.
- Tooraine, millest valmistatakse toode, läbib vastava seadmestiku (pumbad, torud, kraanid, mahutid jne.) ja saastab need ning moodustub kas varasemast tootmisest või pikemaajalises tootmisel pindadele tekkiv biokirme, mis kujuneb oma vastava mikroflooraga edaspidi üheks saasteallikaks.
- Ebapiisaval seadmete puhastamisel, pesemisel võib seadmesse jääda eelmisest tootmistsüklist jääke, kus soodsatel tingimustel on jäänud eluvõimelisi tehnoloogilistesse protsessidesse ebasobivaid või riknemist esilekutsuvaid erinevaid mikroorganisme ja nii kujuneb välja järgmine sekundaarne mikroobne saasteallikas.

- Kui meil on kasutusel õhule avatud seadmed võib tootmistsehhis olev hallitus- ja pärmseentega aga ka vähemal määral bakteritega saastunud õhk olla samuti üheks sekundaarseks mikroobseks saastumise allikaks.
- Sekundaarne saasteallikas võib kujuneda ka inimfaktor (töötajad, kui nad kasutavad tehnoloogias ebaõigeid võtteid (ebapuhas vesi, määrdunud käed jne.).

Sekundaarsest mikroobsest saastest (seadmete pindadelt, töödeldava toorme jääkidest, õhust) võime leida:

psührotroofseid -,

mesofiilseid - ja

termofiilseid baktereid ning

hallitus- ja pärmseeni.

Mis on selle eelduseks ?

Biokirme (katt /bakteriaalne saastelima)

- **Bakterid võivad kinnistuda piima (toorme) tootmise keskkonnas toormega kontaktis olevatele pindadele, kus nad on:**
 - võimelised paljunema,
 - kasutama toormest vajalikke toitaineid,
 - eralduma pindadelt ning
 - paljunema edasi töödeldavas toormes või toodetes.
- **Esineb nii ühtlaselt pinda katvaid pakse biokirmeid** (areng on kestnud päevi või nädalaid), **üksikult mikroobidest koosnevate laikudena** või **pesadena** (areng on kestnud ainult tunde).

Domineerivateks on harilikult kiirema kasvuga liigid nii nagu selleks on ka nende liikumisvõime

Biokile kui mikroobi ellujäämise strateegia

- Biokile moodustumist võib vaadelda stressireaktsioonina
- Erinevate bakteriliikide seondumisjärjestus mõjutab biokile koostist.
- Esmaselt seonduv populatsioon võib muuta pinna omadusi
- Hilisemad tulijad saavad kinnituda juba koos seondunutelega, so
agregeeruda

- **Biokirme** (limakihiga ümbritsetud mikroorganismide kooslus tekib piirpindadele (vesi vs tahke, õli vs tahke, õli vs vesi...) kusjuures 85...96% biokilest koosneb veest, kuivadel pindadel ca 2...5% veest
- **Biokirme moodustumise kiirus ja bakterite eraldumine sellest sõltub:**
 - toitainete varustatusest,
 - bakterite tüübist ja
 - voolu kiirusest seadmes või torustikus
- **Erinevate bakterite interaktsioon biokirmes võib olla:**
 - kooperatiivne so. üksteisele kasulik koosolemine või
 - konkurentsisis so. enamusele järgnevad teised.

Tabel 2. Seadmete pinna ja bakterite elukeskkonna omaduste mõju biokirme tekkele (Hinton, 2003).

Pinna omadus, bakterite keskkond	Mõju biokirme tekkele
Karedus	Soodustab bakterite kinnistumist ja sadestumist pinnale
Hüdrofoobsus	Kinnistumine sõltub bakterite liigist ja tüvest ning pinna ettevalmistusest
Temperatuur	Kinnistumine on kõige aktiivsem kasvu optimaalsel temperatuuril 20-55 °C
Pinna tüüp	Desinfitseerivate ainete mõju kummil arenevatele biokirmetele on väiksem kui roostevabal terasel

Tabel 2 järg 1

Toorme koostisosade sade pinnal	Toorme pinnale sadestunud koostisosad võivad inhibeerida kui ka suurendada kinnistumist sõltuvalt bakterite liigist, toorme koostisest ja piimavalkude olemusest
Toitained	Toitainete piiratud tingimustes suureneb bakterite kinnistumine pinnale
Bakterite arv	Suurem bakterite arv piimas või toormes põhjustab ka suurema kinnistunud bakterite arvu pinnal
Voolurežiim ehk nihkepinge	Kinnistumise efektiivsus on pöördvõrdeline nihkepingega

Tabel 2 järg 2

Toor- või pastöriseeritud piim	Bakterite kinnistumine toorpiimas on väiksem kui pastöriseeritud piimas, sest toorpiim sisaldab termolabiilseid inhibeerivaid immunoglobuliine
--------------------------------	--

Biokirmeks **kinnistunud bakterid on vastupidavamad** kuumutamisele, antibiootikumidele ja desoainetele, võrreldes vabalt keskkonnas olevatega.

Kui toorpiima termotolerantsete bakterite arv **ületab 500 pmü ml⁻¹**, tekib probleeme selle väärindamisel piimatoodeteks (White jt, 2001).

- Kui esmane kinnitumine kestab sekundeid, siis pöördumatu kinnitumine minuteid, küpsemine ja struktuuride moodustumine tunde ja päevi ning rakkude vabanemine päevi ja kuid:
- suureneb biokile stabiilsus
- kolonisatsioonis tekkivad soodsamad tingimused eluks
- enamik mikroorganisme võib elada biokilede koosseisus
- biokile võib koosneda erinevatest mikroobiliikidest
- biokilet moodustavad nii patogeened kui saprofüüdid

Biokirme (biokile):

liigiline mitmekesisus on suurem kui toorainest tuleneval saastatusel

aitab paremini taluda erinevaid stresse (nt. füüsiline ja keemiline)
suurendab bakterite vastupidavust järgnevale samale stressile

Biokile võib, sõltuvalt tingimustest, koosneda **90% spooridest** või on keskkonnaks spooride moodustumisel

Kui palju mikroobe võib biokiles olla?

„kohevas, heas toonuses olevas“ mitmekihilises biokiles:

10^8 pmü/cm²

keskmine: 10^1 - 10^5 PMÜ/cm²

Millised on enam levinud mikroobide liigid nii biokirmes kui ka teistes sekundaarsetes mikroobsetes allikates?

Psührotroofsed bakterid

Psührotroofsed bakterid on **erinevate bakterite liikide grupp, mis kasvavad temperatuuril 7 °C ja sellest allpool.**

Optimaalne temperatuur kasvuks on neil **20-30 °C.**

Neid esineb looduses nii **vees, mullas, taimedel** ja väikestes kogustes **õhus.**

- Saasteallikateks tootmises on:
 - piima vastuvõtuseadmete, transpordi ja säilitusseadmete ebapiisav puhastus ning
 - ebapiisav desinfitseerimine ja biokile

Enamus jahutatud toormest kui ka vastuvõtu ja tehnoloogilistelt seadmetelt isoleeritud bakterite tüvedest kuuluvad järgmistesse perekondadesse:

Bacillus,

Stenotrophomonas,

Acinetobacter,

Pseudomonas ja

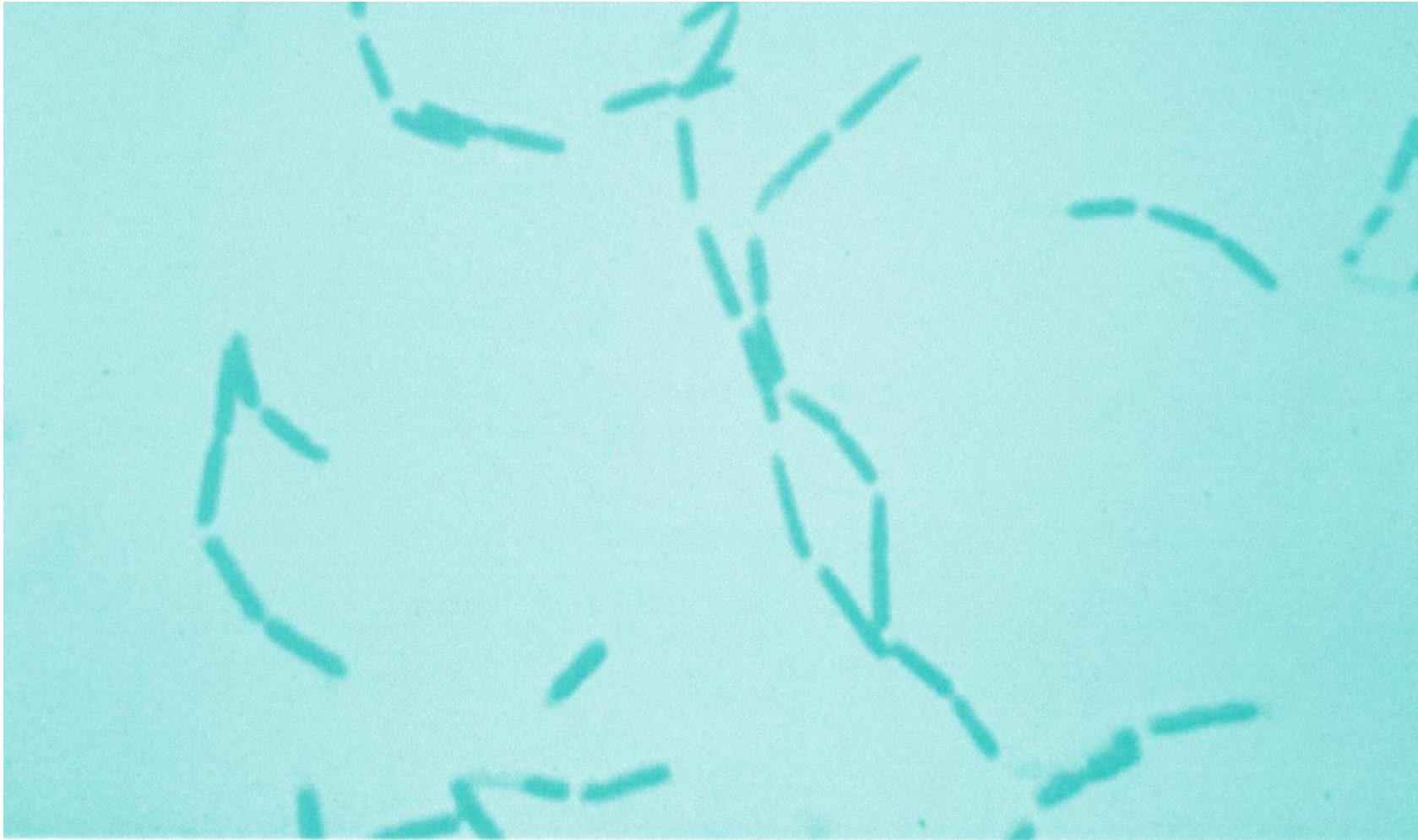
Burkholderia.

Piima ja piimatoodete **riknemist esile kutsuvatest *Pseudomonas* spp.** on olnud domineerivaks *P. fluorescens*.

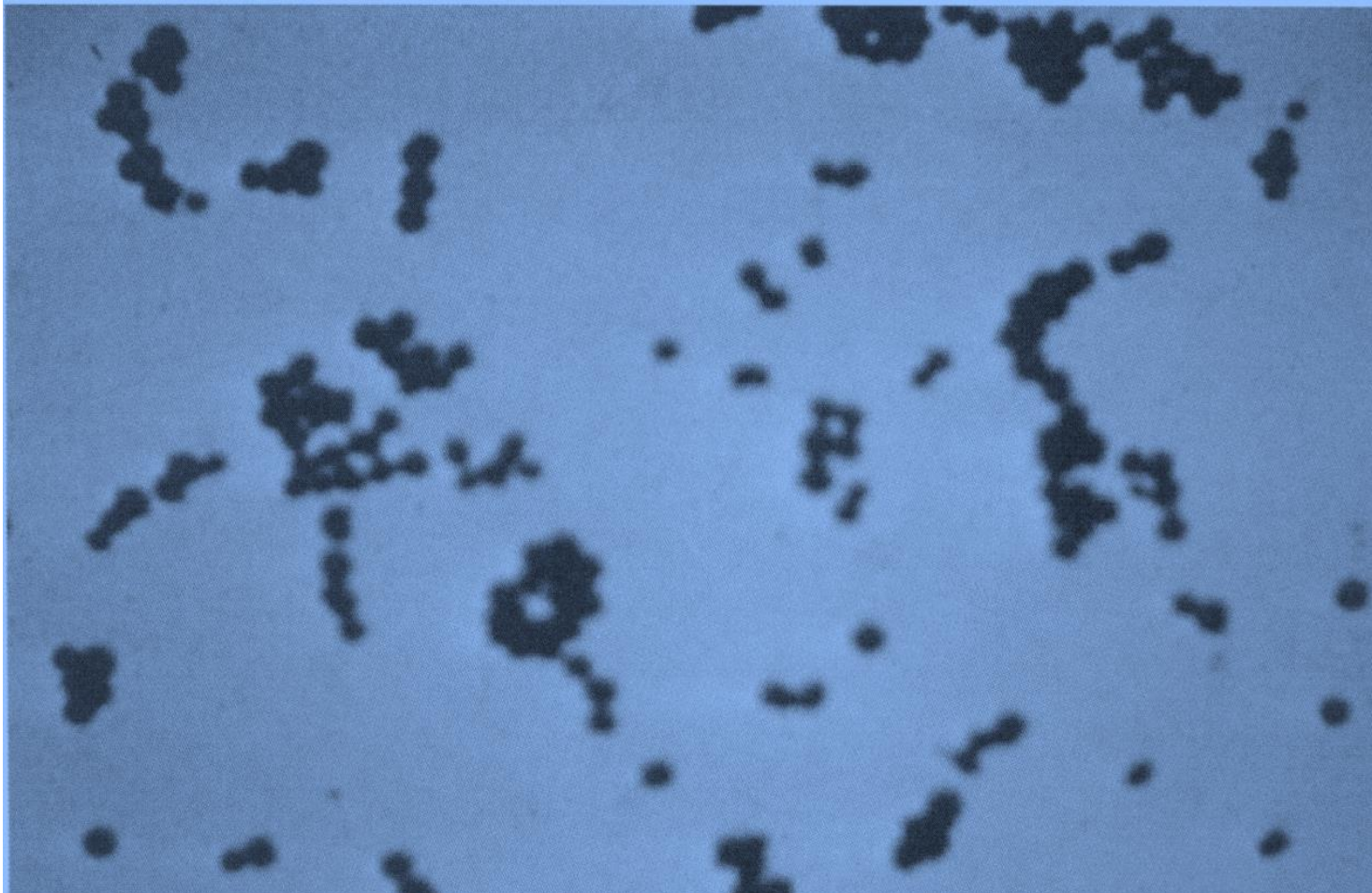
Gramnegatiivsed psührotroofsed bakterid



Grampositiivsed psührotroofsed bakterid (kepid)



Grampositiivsed psührotroofsed bakterid (kokid)



- *Pseudomonas* spp. on suhteliselt lühike generatsiooni aeg (<4 h), st. seda, et näiteks piima saastumisel ühe rakuga võib nende arvukus tõusta temperatuuril 4 °C peale 8 päevast säilitamist 10^6 pmü ml⁻¹.
- Suur osa neist on võimelised moodustama rakuväliseid proteolüütilisi, lipolüütilisi ja fosfolipolüütilisi ensüüme, mis on suhteliselt termostabiilsed ja mõned neist taluvad koguni 100 °C 30 min. *Pseudomonas* spp. ensüümide hüdrolüütiline aktiivsus on külmas piimas 100%.
- Mõned nende perekondade liikidest on ka potentsiaalsed patogeenid ja sageli antibiootikumide resistentsed
- Ohustatud on eelkõige immuunpuudulikkusega patsiendid

Enamus bakteritest, pärm- ja hallitusseentest pastöriseerimisel (kuumtöötlusel) hävib, osa jäävad aga eluvõimelisteks ja neid nimetatakse **termotolerantseteks**, mis jaotuvad:

- **termofiilsed termotolerandid** (kasv temperatuuril 40–60 °C; optimum 50–55 °C)
- **mesofiilsed termotolerandid** (kasv 5–50 °C, optimum ~30 °C)
- **psührofiilsed termotolerandid** võivad kasvada alates külmumistemperatuurist kuni temperatuurini 25 °C

- Piimatööstuses esinevatest termotolerantsetest moodustavad enamiku:
 - *Bacillus*'te,
 - *Microbacterium*'i,
 - *Micrococcus*'te,
 - *Enterococcus*'te,
 - *Lactobacillus*'te,
 - *Corynebacterium*'i,
 - *Clostridium*'i ja (pärmseente) perekondade liigid

- **Erilise tähelepanu all on:**
 - **sulfiteid redutseerivad klostriidid,**
 - **mesofiilsed ja psührofiilsed termotolerandid,**
 - *Bacillus cereus,*
 - *Bacillus licheniformis, pärmseened jt.*
- **Samas termotolerantsete arv peaks jääma (Reinemann jt, 2003):**
 - **toorpiimas alla 100–200 pmü ml⁻¹ ja**
 - **piima tootmise seadmetel alla 10 pmü/cm²**

Bacillus spp

- Neid iseloomustab keskkonna **hea osmoose rõhu taluvus** ja **võime kasvada** suhteliselt **laias temperatuuri ning pH vahemikus**.
- *Bacillus*'e perekonna liikidest on toor- ja pastöriseeritud piimas, piimatoodetes ning saasteallikates **kõige sagedamini on esindatud:**
 - B. stearothermophilus,*
 - B. licheniformis,*
 - B. coagulans,*
 - B. cereus,*
 - B. subtilis* ja *B. circulans.*

Mikroobide ensüümide optimaalne pH on ~7 või 7-9. Nad on suhteliselt termostabiilsed ja mõned neist taluvad koguni 100 °C 30 min.

Pseudomonas spp. ensüümide hüdrolüütiline aktiivsus on külmas piimas 100%. Pärast pastöriseerimist säilib mõnede aktiivsus 60-70% ja pärast steriliseerimist 30-40%.

Termotöötlusel hävib enamus mikroorganismide vegetatiivsetest vormidest. Spoorid säiluvad

Termoresistentsed bakterite spoorid aktiveeruvad pärast termotöötlust ja moodustuvad vegetatiivseid vorme, kes on kohe ka valmis produtseerima rakusiseseid ja rakuväliseid ensüüme.

40-84% neist bakteritest on aktiivsed proteolüüdid ja lipolüüdid ning ligikaudu 80% aktiivsed fosfolipolüüdid.

Bacillus spp. on mitmekesisema proteolüütilise aktiivsusega võrreldes *Pseudomonas* spp. ja on võimelised moodustama rohkem kui ühe rakuvälise ja rakusisese ensüümi

Kui intensiivseks need ensüümid saavad, sõltub batsilli liigist ja tüvest kui ka keskkonna temperatuurist

***Bacillus* spp. proteolüütiline ja lipolüütiline aktiivsus suureneb kui temperatuur tõuseb üle 4 °C**

***Bacillus* spp. lipaasid on tunduvalt termostabiilsemad võrreldes proteinaasidega.**

***Bacillus* spp. proteinaasid kui ka lipaasid säilitavad oma aktiivsuse kõikidel piima termotöötlustel ja jäävad aktiivseteks kõikides piimatoodetes** kaasaarvatud ka piimapulber

Lisaks termostabiilsetele hüdrolüütilistele ensüümidele on *Bacillus* spp. liigid nagu

B. cereus, *B. licheniformis* ja *B. subtilis*

võimelised moodustama ka mitmeid toksine, mis on seotud toidu kaudu levivate haigestumistega

Näiteks *Bacillus cereus* võib produtseerida erinevaid **toidu mürgistusi põhjustavaid rakuväliseid toksine**, milliseid seostatakse enamasti **seedetrakti haigestumistega**

B. cereuse poolt otse tootesse eritav toksiin tekitab pärast toote tarbimisel 1-6 tunni möödudes **iiveldust ja oksendamist**

***B. cereus*'t võib leida jäätisest, piimapulbrist, fermenteeritud piimast ja ka pastöriseeritud piimast.**

Spoore moodustavaid psührotroofseid baktereid on näiteks oluliselt vähem kui mittesporogeenseid

Nende väiksem arv saasteallikas temperatuuril 2-7 °C on tingitud

pikemast generatsioonist ajast (~8,5 tundi) ja lag faasi kestvusest.

Nad saavad domineerivateks kui töödeldavat toorainet säilitatakse näiteks pikemat aega temperatuuril 10 °C.

Seega:

Bakterid, hallitus- või pärmseened sattudes saasteallikatest toormesse (piima, lõssi, vadakusse jne), võivad läbida toodete valmistamisel vajaliku töötuse (termilise või füüsikalise) ja paljudes biokirmes või seadmetesse jäänud jääkides jõuavad valmistoodetesse mõjutades enamasti negatiivselt selle kvaliteeti kuni riknemiseni.

Kasutatud kirjandus

Hinton, A.R. 2003. Thermophiles and Fouling Deposits in Milk Powder Plants. Dissertation of PhD, New Zealand p. 195

Reinemann, D.J., Wolters, G.M., Billon, P., Lind, O., Rasmussen, M.D. 2003. Review of practices for cleaning of milking machines. International Dairy Federation Bulletin 381: 32-50

White, C., Marth, E., and Steele, J. 2001. Testing of milk and milk products. Applied dairy microbiology (Ed. 2):645-680

*TÄNNAN TÄHLEPPANU
EST!*