

Piimhapebakterid

1. Üldine info

Piimhapebaktereid ja vastavat käärimist kirjeldas juba Louis Pasteur. Pasteur märkis, et need mikroobid on ebasoovitavad õlle ja veini valmimisel, kuna rikuvad selle maitset ja tekitavad lima.

Piimhapebakterid on kääritajad. Nad ei vaja elutegevuseks hapnikku ja kääritavad suhkruid (näiteks piimasuhkrut ehk laktoosi, aga ka teisi suhkruid) piimhappeks. Piimhape eritatakse rakust välja ja bakteri elukeskkond hapestub. Ise nad taluvad pH langust suhteliselt hästi. Kõige suurema happetaluvusega on laktobatsillid, leukonostokite ja laktokokkide happetaluvus on väiksem. pH langust alla 4.5 ei talu ka laktobatsillid.



Mõned piimhapebakterid moodustavad käärimisproduktidena piimhappele lisaks ka etanooli, äädikhapet ja süsihappegaasi. Paljud piimhapebakterid sünteesivad ka limaseid polüsahhariide. Piimhapebaktereid leidub piimas, taimedel, inimese ja loomade limaskestadel. Lehmapiima satuvad ilmselt looma udaralt, kuhu omakorda loomasöödalt, silolt ja heinalt.

Piimhapebakterite hulgas (perekonnas *Streptococcus*) on ka haigusetkitajaid. Näiteks *Streptococcus pneumoniae* on üks kopsupõletiku tekitajatest.

Hambaauke tekitab suuõõnes hammaste pinnal elav *Streptococcus mutans* (pildil). Strepto – ahel; coccus- kera, terake.

1.1. Piimhapebakterite isoleerimine looduslikust materjalist

Kõige parem on sileerida taimset materjali, milles alati leidub elusaid piimhapebaktereid. Sileerimisel luuakse tingimused piimhapebakterite kiireks paljunemiseks. Taimne materjal hakitakse peeneks, surutakse kokku ja korgitakse nii, et hapnik sisse ei saa, kuid käärimisel moodustuv CO₂ saab välja. Hoitakse soojas, et bakterid paljuneksid taimemahla suhkrute arvel ja 24-48 tunni möödudes avatakse. Sileerimine on väga sarnane hapukapsa tegemisele. Pärast sileerimist tehakse väljakülv söötmele (vaja on spetsiaalseid „rikkaid“ söötmeid) ja silomahla preparaati vaadeldakse mikroskoobis. Piimhapebaktereid saab eraldada ka pastöriseerimata piimatoodetest: hapupiimast, jogurtijookidest, jogurtist, keefirist, kodujuustust, hapukoorest jne.

1.2. Toiduainete kääritamisel kasutatavad piimhapebakterid

- Laktokokid (hapupiim, hapukoor, juust, jogurt),
- Laktobatsillid (haputaigaleib nt. rukkileib, jogurt, hapukapsas, hapukurgid, silo),
- Bifidobakterid (jogurt, keefir, hapupiim),
- Pediokokid (toorsuitsuvorstid, sojakastmed),
- Oenokokid (*Oenococcus*) osalevad mõnede veinide valmimisel - muudavad tugevalt hapu õunhappe vähem hapuks piimhappeks, vähendades sellega veinide happesust ja tugevdades magusat maitset.

1.3. Haputaigna(rukki)leiva juuretis: leivataigna käärimises osalevad laktobatsillid, aga ka mõned teised piimhapebakterid

Leiva haputaignas kõige olulisemad liigid on laktobatsillid: *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. pontis*. Aga sealt on isoleeritud ka mõningaid teisi piimhapebaktereid, näiteks pediokoke. Leivataigna käärimisel moodustub jahus leiduvate liisuhkrute (tärklis) ja liisuhkrute käärimisel piimhape, etanool ja süsihappegaas. Juuretisebakterid sünteesivad ka polüsahhariide, mis mõjutavad leiva omadusi, näiteks kerkimist, niiskuse säilitamist ja struktuuri.

1.4. Probiotikumid - inimese soolest isoleeritud kasulikud bakterid

Kuna inimese seedetraktis on piimhapebaktereid (laktobatsillid ja bifidobakterid) väga kasulikud, siis soovitatakse tarvitada toiduks nende abil kääritatud piimatooteid (näiteks Helluse sarja tooted, Gefilus-tooted, Activia, Actimel jne) probiootilise toiduna. Neis toodetes sisalduvad elusad piimhapebakterid, mis vähemalt mingi aja inimese soolestikus püsivad ja avaldavad seal kasulikku toimet. Actimel sisaldab näiteks *Lactobaillus casei* baktereid, Activia sisaldab aga bifidobaktereid. Gefilusetooteid sisaldavad bakterit *Lactobacillus rhamnosus* GG. Need bakterid pärsivad kahjulike bakterite paljunemist sooles, aitavad kaasa kaltsiumi omastamisele toidust, sünteesivad vitamiine jne.



Probiootiline hapupiimatoode Activia sisaldab bifidobaktereid. Bifidobakterite rakud on ebakorrapärase kujuga pulgakesed, mis võivad olla hargnenud ja meenutada hieroglüüfe. Vaata skaneeriva elektronmikroskoobiga tehtud pilti bifidobakteritest.

Bifidobakterid on probiootilised bakterid, kes käärivad rinnapiima liitsuhkruid ning ka taimseid kiudaineid, mis ei seedu seedekulga ülemises osas ja liiguvad seedumatult jämesoolde. Neid baktereid on eriti arvukalt rinnalaste jämesooles, täiskasvanud inimestel nende arvukus sooles väheneb. Nende bakterite hulka jämesooles saab tõsta taimsete kiudainete (täisteratooted, kliid) kasutamisega. Bifidobakterite kasvu sooles stimuleerib ka inuliin, mida sisaldavad näiteks sigur, sibul, küüslauk, sojatooted ja banaanid. Inuliini on võimalik osta toidulisandina ka apteegist.

Probiootiliste bakterite preparaate (kapslid, mis sisaldavad lüofiliseeritud baktereid) on saadaval ka apteegis müüdavate toidulisandite hulgas. Neid preparaate soovitatakse nii inimestele kui ka koduloomadele, näiteks koertele ja kassidele. Preparaate (tooteid), mis sisaldavad nii probiootilisi baktereid kui ka nende kasvu soodustavaid kiudaineid, nimetatakse sünbiootikumideks. Selline preparaat on näiteks LactoSeven, mis sisaldab kiudainet inuliini ja seitset liiki piimhapebaktereid, nii laktobatsille kui ka bifidobaktereid. Valmistatakse ka sünbiootilisi piimatooteid, näiteks biojogurtit, millele on lisaks juuretisebakteritele lisatud ka inuliini.

2. Piimhapebakterid: mõned praktilised tööd

- 1) *Piima hapendamine erinevate juuretistega ja ilma,*
- 2) *Jogurti valmistamine,*
- 3) *Kapsa hapendamine.*

Õpilased panevad katse üles, teevad vaatlusi ja hindavad tulemusi. Tulemustest lähtuvalt tehakse järeldused.

2.1. Piima hapendamine: temperatuuri mõju ja juuretise vajalikkus

Vajaminevad vahendid:

- 1) Pastöriseeritud piim,
- 2) Steriliseeritud piim (otsi poest väga pika säilivusajaga nn kõrgpastöriseeritud piima),
- 3) Pastöriseerimata piim (nn maapiim vanaema juurest, Nopri pastöriseerimata piim vm),
- 4) pH-paberid,

- 5) Mikroskoop ja muud vahendid mikroskoopiaks,
- 6) Läbipaistavad plastiktopsid hapendamiseks. Hea oleks, kui kaanega. Sobivad ka väikesed kaanega klaasist majoneesipurgid. Kui kaasi ei ole, kasuta fooliumi,
- 7) Piimhapestereid sisaldavaks juuretiseks saab kasutada järgmisi tooteid:
 - Jogurt: lakto(strepto)kokid, laktobatsillid
 - Hapukoor: laktokokid
 - Keefir: laktokid, laktobatsillid, pärmseened
 - Hapupiim: laktokokid ja laktobatsillid
 - võib proovida ka probiootilisi baktereid apteegipreparaatidest

2.1.1. Temperatuuri mõju pastöriseeritud ja pastöriseerimata piima hapnemisele

Selles katses jälgime:

1) Kuidas hapneb pastöriseerimata piim, mis sisaldab elusaid piimhapestereid.

Vaatleme hapnemist kahel erineval temperatuuril: soojas toas või ka radiaatori lähedal ning külmkapis või mõnes jahedas ruumis. Soojas toimub hapnemine kiiresti, sest bakterid vajavad paljunemiseks sooja. Hapnemise käigu jälgimiseks mõõda pH -paberiga happesuse (piimhappe moodustumine) tõusu, jälgi kalgendi teket ja omadusi. Vaata, kas gaasimulle tekib. Õigel hapnemisel on kalgend paks ja ühtlane ja gaase ei moodustu. Kalgend moodustub piimavalkude kalgendumisel piimhapestereite ensüümide ja käärimisel moodustuva piimhappe koostoimel. Maitse ka!

2) Kuidas käituvad pastöriseeritud ja steriliseeritud piim, kui neid hoida kas soojas või külmas. Jälgi, mis juhtub piimaga: kas tekib halba lõhna, gaasimulle, kalgendit, kas eraldub vesist vadakut. Piima riknemist põhjustavad piima sattunud roisubakterid (soolekepikese sugulased). Kui piimal on halb lõhn ja ilmsed riknemistunnused, siis ära seda kindlasti maitse!

Katse algatamine

Pane valmis vajalik arv piimaga täidetud topse või purke (tähistada kindlasti!), kata kaantega peale, pane vastavalt kas sooja või külma ruumi ja hinda neid katse alguses ja erinevatel ajapunktidel (näiteks 24 tundi, 48 tundi jne). Kanna vaatluse tulemused katsepäevikusse.

Vasta järgmistele küsimustele:

- 1) Mille poolest erinevad pastöriseeritud ja steriliseeritud piim pastöriseerimata piimast?
- 2) Kuidas temperatuur mõjutab käärimist ehk piima hapnemist

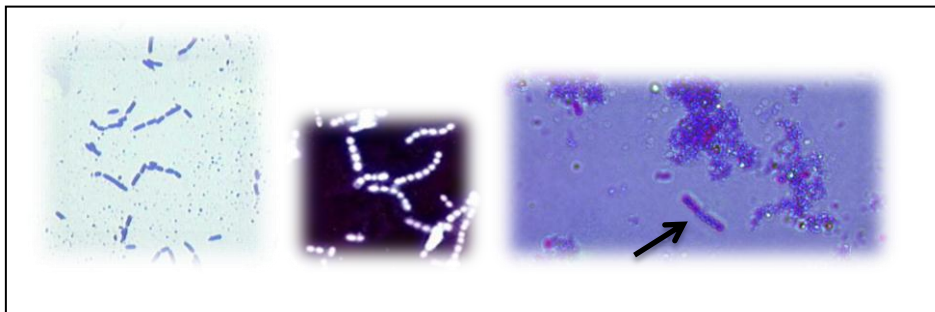
2.1.2. Juuretise lisamise mõju pastöriseeritud piima hapnemisele

Selles katses püüame tõestada, et juuretise (piimhapebakterite) lisamine pastöriseeritud piimale on vajalik kvaliteetse hapupiima saamiseks

Lisame toasoojale pastöriseeritud piimale erinevaid juuretisi - elusaid piimhapebaktereid sisaldavaid preparaate. Kindlasti tuleks teha ka selline kontrollkatse, milles juuretist ei lisata.

Juuretistena võib kasutada hapupiima, hapukoort, jogurtit, keefiri, probiootilisi piimhapebaktereid (laktobatsillid või segupreparaadid) apteegist. Vaatle jällegi hapnemist kahel erineval temperatuuril: soojas ja külmas ja erinevatel aegadel. Mõõda pH-paberiga happesuse tõusu, jälgi kalgendi teket ja omadusi, gaasimulle jne. Kui kalgend on moodustunud ja lõhn on hea, siis maitse ka!

Võrdle hapnemise kulgu erinevate juuretistega. Kui võimalik, tee hapendatud piimast mikroskoopiaks preparaat ja otsi sealt piimhapebaktereid: pulgakesi ja aheldunud pulgakesi (laktobatsillid) ja kaelakeetaolisi ahelkoke (laktokokid). Kokkideks nimetatakse kerakujulisi baktereid.



Vasakpoolsel joonisel laktobatsillid, keskmisel ja parempoolsel laktokokid. Parempoolne foto on tehtud Farmi keefiri märgpreparaadist, kus kontrasti tõstmiseks on kasutatud 1% kristallvioleti vesilahust. Vaata noolega märgitud laktokokkide ahelat.

Katse algatamine

Pane valmis vajalik arv topse. Tähistage! Lisa igasse topsi 100 ml toasooja pastöriseeritud piima. Lisa erinevaid juuretisi ca 1 supilusikatäis 100 ml piima kohta, sega puhta lusikaga ja valmista ette ka juuretiseta kontrolltopsid. Kindlasti kasuta iga juuretise jaoks uut puhast lusikat. Kui soovite proovida juuretisena apteegist ostetud probiootiliste laktobatsillide preparaate, siis tee 1-2 kapslit lahti, sega nende sisu vähesese koguse keedetud ja jahutatud veega või pastöriseeritud piimaga ning lisa 100 ml-le pastöriseeritud piimale. Pane topsidele kaaned või fooliumkate peale, asetage vastavalt kas sooja või külmkappi. Hinda topside sisu katse alguses ja erinevatel ajapunktidel (näiteks 24 tundi, 48 tundi jne). Mõõda pH-d, hinda kalgendi omadusi ja võimalusel mikroskopeeri. Healõhnalist ja hästi kalgendunud produkti maitse ka! Kanna vaatluse tulemused katsepäevikusse.

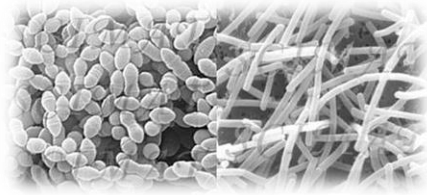
Jogurtite ja hapupiimade hindamiseks võib korraldada ka pimehindamist. Õpilased hindavad erinevaid tooteid ja annavad oma hinnangu näiteks skaalal 1-5.

Vasta järgmistele küsimustele:

- 1) Kas juuretise lisamine on vajalik ja miks?
- 2) Võrdle hapnemise kulgu erinevate juuretistega. Kas mõni juuretis andis parema kvaliteediga produkti kui teine?
- 3) Kuidas temperatuur mõjutas käärimist?

2.2. Jogurti valmistamine

Jogurtile annab paksuse nii kalgendunud piimavalk kui ka juuretisebakterite poolt sünteesitud polüsahhariidid. Parim hapendamistemperatuur jogurti tegemisel on 38 - 43°C, sest see on jogurti juuretisebakterite meelistemperatuur. Juuretist (maitsestatamata jogurtit) lisatakse piimale kuni 5% mahust. Kui soovid, proovi ka apteegist saadavate probiootiliste bakterite lisamist lisaks maitsestama jogurtile. Peale hapendamist võib jogurtile lisada moosi, sügavkülmutatud marju, puuvilja jt. lisandeid. Topsijogurtite puhul lisatakse need enne hapendamist topsi põhja. Lisandite kogus võib olla kuni 20-25% mahust



Jogurtijuuretisena kasutatakse piimhapest baktereid *Streptococcus thermophilus* („pärlikeed“ vasakpoolsel joonisel ja *Lactobacillus bulgaricus* (pulgad ketis parempoolsel joonisel). Skaneeriv elektronmikrofoto.

Jogurti valmistamiseks võta :

100-150 ml piima

1 spl maitsestatamata jogurtit. Võiks valida erinevaid jogurteid, sh ka neid, mis sisaldavad bifidobaktereid. Soovitan proovida ka Eestimaiseid jogurteid, näiteks Helluse sarja omi.

Piima ettevalmistamine, juuretise lisamine ja vaatlused:

Kuumuta piim 90 kraadini ja jahuta kiiresti külmases vees 40 kraadini. Sega juurde juuretis - maitsestatamata jogurt. Sulge kaanega. Hoia toasoojas (radiaatori lähedal) 10-12 tundi kaant vahepeal avamata. Valmis jogurt on joogijogurti paksune. Paksema jogurti saamiseks lase tal täiendavalt toatemperatuuril seista. Kui saad kuskilt piima- või lõssipulbrit, siis võid proovida ka jogurti tegemiseks vajaliku piima „tugevdamist“ piimapulbriga. See tõstab piima valgu- ja suhkruisaldust ja on võimalik saada paksem jogurt. Valmis jogurtile lisa marju (näiteks sügavkülmutatud) või moosi. Enne jogurtile marjade jm lisamist võta järgmise jogurti valmistamiseks topsitais juuretist. Mõõda ka valmisprodukti pH-d.

Vasta järgmistele küsimustele:

- 1) Miks peaks jogurtit käärutama suhteliselt kõrgel temperatuuril?

- 2) Mis annab jogurtile paksuse?

2.3. Kapsa hapendamine

Hapukapsas on väärtuslik toiduaine, mis säilib hästi ning on vitamiinirikas - sisaldab palju C-vitamiini. Taimede, ka kapsataimede pinnal on elusad piimhapestbakterid, mis algatavad käärimist, kui nad puutuvad kokku suhkrurikka taimemahlaga. Selleks, et kapsarakkudest mahl välja tuleks, on vaja kapsas riivida kapsariiviga, kapsahöövliga või köögikombainiga peenteks ribadeks. Võib kasutada ka nuga. Parim tulemus saadakse kindlasti riivides! Väikest kogust kapsast saab riivida ka juustunoaga. Riivitud kapsas segatakse soolaga (kasuta jämedat soola) ning surutakse käega kinni või tambitakse nuiaga, kuni mahl kapsale peale tuleb. Kindlasti on vajalik hapnevale kapsale panna peale raskus (vajutis), mis hoiab ära õhu (hapniku) juurdepääsu kapsale. See on vajalik korralikuks käärimiseks. Juba L. Pasteur ütles, et käärimine on elu ilma hapnikuta. Hapnemiseks on vaja ka sooja.

Hapendada võib nii tavalist „valget“ kui ka punast kapsast.

Esiolgu hakkavad kapsamahlal paljunema taimedel leidunud soolekepikese sugulased (kolilaadsed bakterid *Klebsiella* ja *Enterobacter*), kes moodustavad käärimisel erinevaid happeid, aga ka gaase. Happesus tõuseb ja keskkond muutub kolilaadsetele bakteritele ebasoodsaks ning leukonostokitele sobivaks. Leukonostokid moodustavad käärimisproduktina lisaks piimhappele ka süsihappegaasi. Seega jätkub gaaside (vahu) teke kapsa pinnale. Kui piimhappe sisaldus tõuseb 0.7-1% ni, siis leukonostoki paljunemine aeglustub ja paljunema hakkavad hapet paremini taluvad laktobatsillid (näiteks *L. plantarum*). Nende toimel hakkab piimhappe sisaldus hapnevas kapsas suurenema ja tõuseb 1.5-2.0%-ni. Selles käärimisfaasis gaase enam ei teki, moodustub ainult piimhape. Valminud hapukapsa pH on ca 3.5 – 4.0.

Vaja läheb:

- 1) 10 kg kapsast, 100-200 g soola. Võid kasutada ka väiksemaid koguseid, aga soola ja kapsa vahekord jäägu samaks. Osa õpilasi võiks hapendada valget ja osa punast kapsast;
- 2) Kapsariivi, –höövli või köögikombaini (nuga) ning pudrunuia. Hakkama saab ka käega tampides;
- 3) emaileeritud või klaasist hapendamisnõud. Võid kasutada ka plastmassämbrit. Nõud olgu väga puhtad;
- 4) Sobiva suurusega taldrikut, millega katta riivitud ja mahla välja ajanud kapsas;
- 5) Veega täidetud purki või puhtasse kilekotti pandud kivi vajutuseks. Võid ise mõelda välja muid vajutise variante;
- 6) pH-pabereid ja mikroskopeerimise soovi korral mikroskoopi.

Katse algatamine:

- 1) Kaalu kapsas ja vajalik kogus soola.
- 2) Eemalda kapsapealt välimised määrdunud lehed, lõika kapsapea näiteks poolesks või neljaks ja eemalda juureosa. Riivi kapsas ja sega soolaga. Kapsahöövliga ole väga ettevaatlik, hoiä käsi!

- 3) Tambi riivitud ja soolaga segatud või suru käega kuni kapsamahl välja tuleb. Kapsa ühtlane ja põhjalik soolaga segamine on väga oluline!
- 4) Kata pealt puhta sobiva suurusega taldrikuga ja pane taldrikule peale raskus (näiteks veega täidetud purk). Kapsas ei tohi jääda „kuivale“.
- 5) Pane nõu sooja kohta ja jälgi seda ca ühe nädala jooksul iga päev. Kui peale koguneb algul palju vahtu (käärimisel moodustuvad gaasid), siis võid selle eemaldada.

Kui soovid, võid jällegi testida temperatuuri toimet kapsa hapnemisele. Pane üks kapsanõu käärima jahedasse ja teine sooja kohta.

Mida vaadelda?

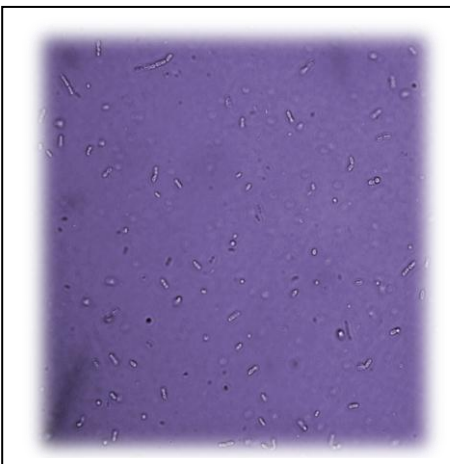
- 1) Mõõta pH-d katse alguses ja käigus;
- 2) Jälgida gaasimullide (vahu) teket;
- 3) Maitsta;
- 4) Võimalusel teha käärivast kapsamahlast preparaat mikroskoopimiseks.

Kanda vaatluse tulemused katsepäevikusse. Soovi korral võid teha katse kahes korduses: üks nõu panna käärima sooja kohta ja teine jahedasse. Võib teha ka erinevate lisanditega hapukapsa variante: segada riivitud kapsale enne käärimisele panekut juurde näiteks jõhvikaid, köömneid või riivitud porgandit ja võrrelda saadavaidprodukte.

Soovi korral võiks käia ka turul ka küsida erinevatelt turumüüjatelt väike kogus hapukapsast koos kapsamahlaga. Kapsast saaks maitsta, kapsamahla pH-d saaks mõõta ning teha mahlast ka mikroskoopimise jaoks preparaadid, et tuvastada seal piimhapestbaktereid.

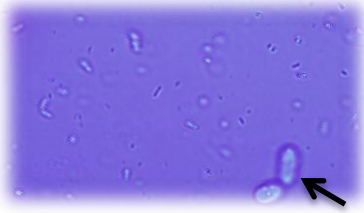
2.4. Mikroskopeerimine

Soovitan teha märgpreparaate. Hapukapsa vedelikus on 400-600x suurendusega ilusti näha lühikesi ja pikemaid pulkbakterid, mis paiknevad üksikult ja ketina. Lühemad bakterid võivad olla leukonostokid, pikemad laktobatsillid.



See preparaat on tehtud nii: alusklaasi alumine pool värviti veekindla sinise markeriga ja lasti värvil kuivada. Alusklaasi värvimata pinnale pandi tilk hapukapsa vedelikku ja kaeti katteklasega. Vaadeldi mikroskoobis 400 x suurendusega (objektiiv 40x, okulaar 10x). Sinisel taustal on rakud kenasti näha. Vaata ka hapukapsamahla mikroskoopimise kohta videot YouTube'ist. Selles videos on näha leukonostokid – ovaalsed pulgakesed ketis.

<http://www.youtube.com/watch?v=Kedj9SM7q4c>

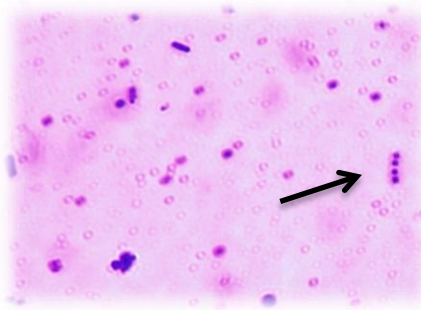
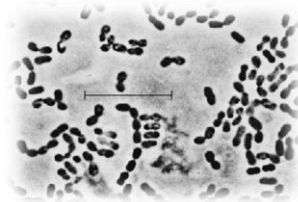


See preparaat on samamoodi. Vaata noolega näidatud suuri pärmirakke, mis on ca 10x suuremad kui bakterirakud.



Lactobacillus plantarum on hapukapsa käärimises osalev bakter (skaneeriv elektronmikrofoto). Vaata siit tema raku kuju.

Ka leukonostokid on hapukapsa käärimises osalised. Vaata siit rakkude kuju – lühikesed ovaalsed pulgakessed, moodustavad kette ka.



Määrgpreparaadi tegemisel võib kasutada ka näiteks kristallvioleti vesilahust. Segi alusklaasil mikroskopeeritav materjal (tilk kapsamahla või veidi näiteks veidi hapupiima) tilga kristallvioleti 1% vesilahusega. Kata katteklaasiga ja mikroskopeeri 40x suurendusega objektiiviga. See preparaat on tehtud kristallvioletiga värvitud Farni keefiri määrgpreparaadist. Vaata noolega näidatud ümarate laktokokkide ahelat. Kristallviolett tungib raku ja need on sinakasvioletsetena hästi nähtavad.

<http://www.youtube.com/watch?v=Kedj9SM7q4c>

Selles videos näidatakse, kuidas saaks kurke hapendada vesilukuga suletavas purgis. Ka kurgid hapnevad piimhapest bakterite abil (leukonostokid ja laktobatsillid). Näidatakse ka seda, kui ohtralt gaase hapnemisel moodustub.