

TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

Taimefüsioloogia ja – biokeemia kateeder



V. Tohver ja L. Viileberg

# TÖÖSTUSMIKROBIOLOOGIA

В.Тохвер и Л.Виילהберг

ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

На эстонском языке

Тартуский государственный университет  
ЭССР, г. Тарту, ул.Мликооли, 18

Vastutav toimetaja L.Viileberg  
Korrektor V. Lang

TRÜ rotaprint 1971. Paljundamisele antud 12.IV 1971  
Trükipoognaid 15,75. Tingtrükipoognaid 14,66. Arves-  
tuspoognaid 11,46. Trükiarv 600. Paber 30 x 42. 1/4.  
MB 03596. Tell. nr. 304.

Hind 55 kop.

## EESSÕNA

Käesolev õpik on mõeldud abivahendiks Tartu Riikliku Ülikooli bioloogiaosakonna mikrobioloogiaeriala üliõpilastele, kellel 6. semestril on ette nähtud piiratud mahuga (12 loengu- ja 12 seminaritundi) tööstusmikrobioloogia kursus. Sellel kursusel on üldhariduslik eesmärk, mitte tehnoloogia konkreetsete võtete kätteõpetamine. Seepärast on käesolevas õpikus rõhutatud protsesside bioloogiline käsitlus. Tehnoloogiast tuuakse esile selle põhimõtted, laskumata tehniliste detailide kirjeldusse.

Tööstusmikrobioloogia kursus toetub 4. semestril kuulatavale üldise mikrobioloogia ja 5. semestril kuulatavale üldise biokeemia kursusele. Neis esitatud materjale käesolevas õpikus, nagu ka tööstusmikrobioloogia kursuses ei korrata.

Pärmseeni käsitletakse õpikus mitmeti detailsemalt kui muid arvesse tulevaid mikroobirühmi. See on tingitud asjaolust, et mikrobioloogiaeriala üliõpilastel ei ole edasises stuudiumis pärmseeni käsitlevaid kursusi.

Õpikust, nagu ka tööstusmikrobioloogia 6. semestril kuulatavast kursusest on välja jäetud antibiootikumide tootmisega seotud küsimused. Nimelt on 10. semestril tulevastel mikrobioloogidel õppeplaanis antibiootikumide erikursus, milles käsitletakse ka tootmisküsimusi.

Käesoleva õpiku üldplaani koostas ja suurema osa tekstist kirjutas V. Tohver. L. Viilebergilt on III peatüki ("Toiduainete ja neid täiendavate faktorite tööstus") 2., 3., 4.5. ja 6. alapeatükk.

Autorid

## SISUKORD.

<b>KESSONA</b> . . . . .	3
<b>SISSEJUHATUS. TÖÖSTUSMIKROBIOLOOGIA AINE</b> .	5
<b>I. MIKROBIOLOOGILISE TÖÖSTUSTEHNOLGOOGIA ÜLD- ALUSED</b> . . . . .	11
1. Mikroobikultuurid . . . . .	11
2. Söötmed ja tooraine . . . . .	16
3. Kultiveerimistingimused . . . . .	17
4. Produktide ja jääkainete eemaldamine . .	24
5. Läbivoolu- ehk pidevkultuurid . . . . .	25
<b>II. ALKOHOLITÖÖSTUS</b> . . . . .	33
1. Üldalused . . . . .	33
2. Pärmseened . . . . .	39
3. Veinitööstus . . . . .	68
4. Destilleeritud alkoholitooted . . . . .	77
5. Õlletööstus . . . . .	79
<b>III. TOIDUAINETE- JA NEID TÄIKENDAVATE FAKTORITE TÖÖSTUS</b> . . . . .	90
1. Pärmitööstus . . . . .	90
2. Piimatööstus . . . . .	95
3. Lihatööstus . . . . .	125
4. Kalatööstus . . . . .	139
5. Munade ja munaproduktide mikrobioloogia.	152
6. Söötade mikrobioloogia . . . . .	156
7. Kasvuainete mikrobioloogiline tootmine .	165
<b>IV. MIKROBIOLOOGILINE KERMIATÖÖSTUS</b> . . . . .	171
1. Tööstusalkoholi tootmine . . . . .	171
2. Glütserooli tootmine . . . . .	177
3. Atsetooni ja butanooli tootmine . . . . .	179
4. Orgaaniliste hapete mikrobioloogiline tootmine . . . . .	192

4.1	Äädikhappe tootmine . . . . .	192
4.2	Piimhappe tootmine . . . . .	199
4.3	Sidrunhappe tootmine . . . . .	205
<i>Kalme<sup>05</sup> 12.78</i> 4.4	Propioonhappe tootmine . . . . .	209
4.5	Glükoonhappe tootmine . . . . .	213
4.6	Fumaarhappe tootmine . . . . .	215
4.7	Itakoonhappe tootmine . . . . .	216
4.8	Koji-happe tootmine . . . . .	217
4.9	Võihappe tootmine . . . . .	218
4.10	Aminohapete mikrobioloogiline tootmine.	221
5.	Ensüümpreparaatide mikrobioloogiline tootmine . . . . .	224
6.	Mikroobid kui keemiatööstuse reagentid . . .	234
7	Joonised . . . . .	238
	Kirjandus . . . . .	250

## SISSEJUHATUS. TÖÖSTUSMIKROBIOLOOGIA AINE.

Aastasadu on inimkond kasutanud mikroobide ensümaatilist aktiivsust toiduainete tootmisel (juust, või, hapupiim, hapukapsad, leib), alkohoolsete jookide saamisel (vein, õlu, mõdu), kiudainete töötlemisel (lina, kanep), aga ka mitmesuguste ravimpreparaatide valmistamisel. Asjaomaste protsesside täpsem uurimine algas aga kõigest mõnikümmend aastat tagasi seoses üldise mikrobioloogia ja biokeemia edusammudega. Taolised uuringud on algusest peale evinud praktilist suunitlust - nende eesmärgiks on mikroobide elutegevuse efektiivsem ärakasutamine ning võitlus lõpp-produkte kahjustavate kõrvaliste mikroobidega. Siit kerkivate probleemidega tegelevat rakendusliku iseloomuga teadust nimetatakse tööstusmikrobioloogiaks, mõnikord ka tehniliseks mikrobioloogiaks.

Definitsioon: tööstusmikrobioloogia on rakendusliku iseloomuga teadus, mis uurib tööstuslikus tootmises kasutatavate mikroobide omadusi ning nende poolt esilekutsutavate protsesside iseloomu ja kulgemistingimusi eesmärgiga leida teid uuritavate mikroobide efektiivsemaks kasutamiseks ja kahjustavate agensitega võitlemiseks.

Tihedas seoses tööstusmikrobioloogiaga areneb vastavate tööstusprotsesside tehnoloogia ja seadmete õpetus. Mõnikord käsitletakse neid koguni tööstusmikrobioloogia osadena,

---

Terminit "tehniline mikrobioloogia" ei saa pidada õnnestunuks, sest see ei erista küllaldaselt antud mikrobioloogiaharu teistest rakenduslikest mikrobioloogiaharudest ega peegelda selle olemust. "Tehniline", s.o. tehnikat kasutav on kohati näiteks ka põllumajandusmikrobioloogia. Küsimuses on aga mikrobioloogilistel protsessidel põhjeline tööstus-tegevus.

kuigi need puudutavad ainet ka mittebioloogilistest aspektidest ning on vaadeldavad füüsika, keemia või inseneriteaduse rakendustena. Käesolevas õpikus käsitletakse ainet mahus, mis on piiritletud ülalesitatud definitsiooniga, s.o. bioloogilisest vaatepunktist, andes siiski vajalikke tehnoloogilisi viiteid.

Tööstusmikrobioloogiat puudutaval uurimistööl on üks iseärasus: laboratooriumis võib sageli saada paljutõotavaid tulemusi, avastada väärtuslikke protsesse, kui aga samu tulemusi püütakse saada tööstuses, suures mastaabis, efekti mõnikord ei saada. Protsessi mõõtmete suurenemine ja tingimuste erinevused loovad teatud astmest alates kvalitatiivseid erinevusi, mida uurija oma tegevuses peab alati arvestama. Näiteks soovitati laboratoorse katsete põhjal pärmitööstuses kasutada kasvustimulaatorina maisiõli, mille efekti võis hinnata paarikümnele protsendile. Tegelikult osutus see võtte tööstusele kõlbmatuks, sest asteriilsetes tööstustingimustes tõi maisiõli kaasa pärmimassi saastumise bakteritega, langesid produkti aktiivsus ja säilivus. Seepärast tuleb kõiki laboratoorseid tulemusi enne laiaulatuslikku tööstuslikku rakendust hoolikalt kontrollida pooltööstuslikes katseseadmetes. Tootmine ise kujutab endast alati probleemide kompleksi, milles peale mikrobioloogilise aspekti tuleb arvestada veel keemilist, tehnilist ja majanduslikku külge. Käesolevas õpikus vaadeldakse põhiliselt mikrobioloogilise iseloomuga probleeme:

Mikroobid ja nende ensüümid on kaasajal terve rea tööstusharude aluseks. Mõninga ülevaate annab neist tabel 1. Sellest võib järeldada, et mikrobioloogilise tootmistegevuse aluseks on rida ensümaatilisi protsesse, mille esilekutsujaks on kindlad mikroobid. Tabelis on nimetatud oksüdeerimist, redutseerimist, hüdrolüüsi, dehüdrogeenimist, fosforüülimist. Nimetatata, kuid tööstuses tegelikult kohatavad on veel aminimine, transaminimine, dekarboksüülimine, esterifitseerimine, kondenseerimine, polümeriseerimine, dismuteerumine, dehüdrateerimine, hüdroksüülimine ja mõned muud.

Mikrobioloogilistes tööstusharudes kasutatavaid  
mikroobe ja nende poolt esilekutsutavaid  
protsesse

Mikroob	Tooraine või kasvusubstraat	Produkt	Protsessi loomus
1	2	3	4
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Virded	butanool atsetoon	käärimine
<i>Clostridium saccharoacetoperbutylicum</i>		etanool ribofla- viin	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	jäätmed, mil- les on glü- koosi või lak- toosi	piimhape	käärimine
<i>Bacillus subtilis</i>	piima- ja kon- servitööstuse orgaanilised jäätmed	amülaas prote- aasid	aeroobne süntees
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	virdejäätmed, milles veel on sahhariide	dek- straan	käärimine
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	jäätmed, mil- les on sidrun- hapet	diatse- tüül	käärimine
<i>Acetobacter</i> sp.	vedelikud, mil- les on etanooli	äädikha- pe	aeroobne oksüdeerim- ine
<i>Streptomyces</i> sp.	maisi vesilec- tis	antibi- ootiku- mid (strep- tomüt- siin)	aeroobne süntees



1	2	3	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	virded teraviljadest ja kartulist, melassid	tööstuspiiritus, alkohoolsed joogid	käärimine
<i>Aspergillus niger</i>	virded, milles on sahhariide	sidrunhape	aeroobne dissimilatsioon
<i>Penicillium chrysogenum</i>	maisi vesileotis	antibiootikumid (penitsilliinid)	aeroobne süntees
<i>Rhizopus nigricans</i>	maisi vesileotis + progesteroon	11- $\alpha$ -ok-süprogesteroon	aeroobne hüdroksüülimine
<i>Curvularia lunata</i>	- " -	kortikosteron	- " -
<i>Fusarium moniliforme</i>	maisi vesileotis	gibberelliin	aeroobne süntees

Igatahes on biokeemiliste reaktsioonitüüpide hulk, mida tööstusmikrobioloogias tuleb arvestada, üsna esindav. See seob käsitletava teaduse tihedalt üldise ja tootmisharule vastava spetsiaalbiokeemiaga.

Kõik tööstuslikud protsessid, milles mikroobe kasutatakse, on jaotatavad kahekseks tüübiks.

1. Mikroobide kultiveerimine toiduproduktides, et viimastele anda teatavat maitset, konsistentsi või toiteväärtust. Siia kuuluvad mitmesuguste taimsete toiduproduktide, aga ka piima ja selle saaduste kääritamised.

2. Mikroobide kultiveerimine mitmesuguste substraatide, peamiselt sahhariidide biokeemiliseks lagundamiseks ja dissimilatsiooniproduktide akumulatsiooniks. Sel teel saadakse mitmesuguseid alkohole, orgaanilisi lahusteid, piim-, äädik- ja sidrunhapet.

3. Mikroobide, peamiselt pärmseente kultiveerimine meel-

divamaitselistes lahustes (puuviljamahlad, teraviljaekstraktid), mida kääritatakse. Kultuurivedelik pärast kääritamist selgitatakse, töödeldakse ja kasutatakse joogiks (vein, õlu).

4. Mikroobide, peamiselt pärmide, aga ka mõnede vetikate kultiveerimine eesmärgiga kasutada neid toiduks või (peamiselt) söödaks kodulindudele-loomadele.

5. Mikroobide kultiveerimine kontaktis eriliste ainete-ga (näiteks seksuaalhormoonide - steroididega), et neis esile kutsuda soovitavaid biokeemilisi muundumisi ja saada ravimpreparaate.

6. Mikroobide kultiveerimine teatavate sünteesiproduktide, peamiselt ensüümide ja antibiootikumide saamiseks. Produkte kasutatakse tööstuses või meditsiinis.

7. Mikroobide kasvatamine kitsalt spetsiaalseteks eesmärkideks, näiteks väävliühendite eemaldamiseks naftast, vitamiinide analüüsiks jae.

8. Mikroobide juhuslike assotsiatsioonide kasutamine sellistes protsessides nagu linaligu, nahaparkimine, kohvitöötlus jt. Tänapäeval püütakse neis tootmisharudes juhuslike assotsiatsioonide asendada kontrollitavate puhaskultuuridega või koguni ensüümpreparaatidega.

Peab märkima, et protsesside klassifikatsioon ei lange täielikult kokku mikrobioloogilise tööstuse klassifikatsiooniga, mis peab arvestama peale mikrobioloogilise tunnuse veel muid asjaolusid. Tavaliselt võetakse vastava tööstuse klassifitseerimisel aluseks toodetavate produktide iseloom. Sel alusel on võimalik kogu mikrobioloogilist tööstust jaotada neljaks põhirühmaks.

1. Alkoholitööstus. Siia kuuluvad õllepruulimine, veinivalmistamine ja destilleerimistööstus, mis kujutavad endast vanimat, kõige laiemat ja püsivamat mikrobioloogilise tööstuse rühma. Antud rühm erineb muust mikrobioloogilisest tööstusest printsiipsaalselt selle poolest, et sinseid produkte kasutatakse organoleptiliste (meeleorganitega tajuta-

vate) omaduste alusel, mitte nende toiteväärtuse või tehnilise omadnakompleksi tõttu, s.o. mitte objektiivsete väärtuste tõttu. Seetõttu võib alkohoolseid jooke vaadelda luksuskapadena. Märkigen, et maailmamajanduses nende osatähtsus, eriti kallimate jookide osas, pidevalt tõuseb.

2. Farmatseutiliste preparaatide tööstus. Käesoleval ajal on see laialdane tööstusharu, mille side mikrobioloogilise tööstusega on kujunenud väga kindlaks viinase paarikümne aasta jooksul seoses antibiootikumide avastamise ja massilise kasutuselevõttuga. Kaasajal on tugevasti arenenud veel mikrobioloogiline steroidpreparaatide tootmine, perspektiive tööstusharu laienemiseks on ka mitmete muude preparaatide osas.

3. Toiduainete- ja toiduaineid täiendavate faktorite, peamiselt vitamiinide tööstus. Siia kuulub leiva-, liha- ja piimatööstus, hapendatud produktide ja marinaadide valmistamine, terve rea vitamiinide tootmine, defitsiitsete asendamatute aminohapete, eriti lüsiini tootmine jmt. Sellesse rühma kuuluvaks loeme ka pagaripärmi ja söödapärmi tootmise (viimane on arusaadavalt kaudes seoses inimese toitumisega nagu ka gibberelliini tootmine, mida kasutatakse taimekasvu intensiivistajana). Kaasaegses maailmas on väga levinud puudused toitumises. Rahvastik kasvab plahvatuslikult, senine toiduainete tootmine ei jõua järele kasvavatele vajadustele (nii looduslik-objektiivsetel kui ka sotsiaalsetel põhjustel), mille tagajärjel 2/3 inimkonnast viibib kroonilise alatoitluse seisundis. Teisest küljest esineb reas arenenud maades varjatud alatoitus - rafineeritud toiduainete (püülijahud, puhastatud õlid ja rasvad, suhkur jne.) ülemäärane tarbimine ja sellest sugenev sisuline alatoitus elutähtsate toitainete osas üldise ületoitumise foonil. Ilmneb, et maailma rahvastiku toitlustamine nõuab mitte ainult uusi allikaid, vaid eeskätt täisväärtuslikke, vitamiini- ja mineraalainete- ning valgurikkaid toiduaineid. Selles osas on mikrobioloogilisel tööstusel suur tähtsus - siinsed produktid on enamikus füsioloogili-

selt väga väärtuslikud. Arvesse tuleb aga ka edasine uute võimaluste avastamine. Teatavaid eeldusi selles suhtes on: vetikate, aga eriti pärmseente massiline kasvatamine laieneb lähemas tulevikus tõenäoliselt tunduvalt.

4. Mitmesuguseid keemilisi aineid tootev tööstus. Esikätt nimetame tööstuspiirituse tootmist pärmide abil, edasi loendame selliseid aineid nagu atsetoon, butanool, isopropanool, piimhape, propioonhape, sidrunhape, glükoonhape, fumarhape, gallushape, äädikhape, rida aminohappeid, glütserool, ensüümpreparaadid jne.

Järgnevalt käsitletakse õpikus kõige olulisemaid mikrobioloogilise tööstuse harusid, lähtudes üldiselt ülaltoodud klassifikatsioonist. Käesolevas õpikus jääb käsitlemata mikrobioloogiline farmatseutikatööstus, mis olulises osas on antibiootikumide tootmine. Antibiootikume õpitakse TRÜ-s aga iseseisvas erikursuses (õppeplaani järgi mikrobioloogiaeriala V kursusel).

## I. MIKROBIOLOOGILISE TÖÖSTUSTEHNOLOGIA

### ÜLDALUSED

#### 1. Mikroobikultuurid

Põhiülesandeks on leida mikroobe, kes sobivas keskkonnas kõrge efektiivsusega akumulierivad inimest huvitavaid lõpp-produkte või kes intensiivselt teostavad mingit tootmise seisukohalt vajalikku keemilist transformatsiooni. Tööstuses kasutatavate mikroobide selektsioonitöö on lõppematu protsess: vaevalt on leitud ja isoleeritud aktiivne tüvi või loodud efektiivne rass, kui juba paratamatult algab uute, veelgi kohasemate tüvede, resp. rasside otsimine. Ühest küljest on see tingitud tootmise kasvu vajadustest, teisest kül-

jest tuleb arvestada, et vaevalt leidub "igavest" tüve, mis tööstuses lõpmatult säilitaks oma väärtuslikke omadusi.

Mikroobikultuuride parendamine on võimalik kas massilise otsimis- ja proovimistööga looduslikest substraatidest või siis selektsioonitööga looduslike ja kunstlikult indutseeritud mutantide seast. Et esimesed on küllalt harvad (sagedus  $10^{-9}$  ...  $10^{-10}$ ), siis on põhiohk kunstlikult saadud mutantide katsetamisel. Saadud hálbevormide hindamisel on kriteeriumiks ülalmärgitud tunnused: uus vorm peab kas andma soovitud lõpp-produkte eriti suures koguses või siis kvantitatiivselt küllaldaselt määral esile kutsuma keskkonnamutusi. Bioloogiline elulisus on seejuures enamasti kõrvaline küsimus, igatahes on ta seda kõigil neil juhtudel, kui õnnestub antud uut tüve paljundada kunstlikult loodud tingimustes.

Tootmisele kasulikke mutante on saadud eriti ultraviolettkiirte kasutamiseiga. Mutageenseimad on seejuures UV-kiired lainepikkusega 260 nm, s.o. lainepikkusega, mida intensiivseimalt neelab pärilikkusaine desoksüribonukleinhape (DNA). Teiseks on samal eesmärgil laialdaselt kasutamisel X-kiired. Kasutatakse vähemalt poolletaalseid doose ( $LD_{50}$ ), mille puhul kiiritamise tagajärjel hävib 50...80 % kiiritatud rakkudest. Ülejäänute seas esineb enamasti nn. letaalseid mutante, mis on kaotanud mõne olulise elutegevusvõime. Kui tekkinud füsioloogiline või biokeemiline defitsiitsus (näiteks mõne aminohappe või kasvufaktori sünteesivõimetus) on korvataav väljast antava faktori näol, sama mutant aga evib - kas või nimelt biokeemilise puudulikkuse tõttu - võimet koguda meid huvitavat produkti, läheb see edasisele katsetamisele. Küllaldase arvu kasulike mutantide kui edasise valiku aluse saamine nõuab tavaliselt niisama palju tööd kui lõppematu otsimine looduslikest substraatidest.

Esitatud füüsikaliste mutageenide kõrval kasutatakse kaasajal rohkesti nn. keemilisi mutageene (nitritid, hüdroksüülamiin, etüleeniimiin jt.), mille kasutamise pioneeriks

võib pidada NSVL Teaduste Akadeemia Keemilise Füüsika Instituudi Isaak Rappoport'i juhtimisel töötavat laboratooriumi. Keemilisi mutageene on edukalt kasutatud hallituste ja streptomütseetide juures, eriti kombinatsioonis ioniseerivate kiirgustega. Sel teel on saadud näiteks kaasaja edukaimad penitsilliini produtsendid - *Penicillium chrysogenum*'i nn. Wisconsin-perekonna tüved.

Ülesanded ja probleemid ei piirdu uute vormide otsingutega. Oluliseks probleemiks on järgnevalt kultuuri puhutus ja iseloom. Küsimus seisneb selles, kas edukaks tootmiseks peab olema absoluutne puhaskultuur või piisab lihtsalt ühe, nimelt meid huvitava vormi domineerimisest? Praktika jaoks võib sellele küsimusele antaval vastusel olla otsustav tähtsus, sest tootmisel peab arvestama puhaskultuuride saamist ja säilitamist ning aparatuuri steriilsuse kindlustamisega seotud väga suuri kulutusi, mis mõnikord võivad muuta kaheldavaks protsessi kui terviku tasuvuse.

Kõrge tootlikkusega kultuuride säilitamine on endastmõistetav vajadus. Seejuures on ülesandeks mitte ainult säilitamine kui seesugune, vaid just säilitamine koos kõigi kasulike omadustega, mis iseloomustavad antud tüve. On üsna tavaline, et tootmisse antud kultuurid degenerereeruvad järjestikustes vegetatiivse ülekande protsessides. Sellega kaasneb ka tootmist huvitava omaduse või tunnuse kadu. Tuleb uuesti pöörduda muuseumkultuuri poole, seda paljundada ja paljundusmaterjaliga asendada efektiivsuse kaotanud kultuur. Eksisteerib terve rida võtteid, mis lubavad muuseumkultuure pikaajakselt säilitada muutumatus efektiivsuses. Kõik need võtted on välisest mitnepalgelisusest sõltumata taandataavad ühele põhimõttele: alla suruda muuseumkultuuri bioloogiline aktiivsus (viia see mõeldava miinimumini), seades aga kindlaks tingimuseks rakkude potentsiaalse eluvõime kahjustamatuse.

Tavalises laboratoorses käibes säilitatakse mikroobe enamasti nn. avali-põhikultuuridena (open stock cultures)

tardsõttmetel. Kasutatakse sobivat toiteagarit, kusjuures aeroobe säilitatakse katseklaasides längagaril joonkülviga, anaeroobe - püstagaril pistkülviga. Inglismaal ja USA-s kasutatakse ka spetsiaalseid vintkorgiga pudelid (McCartney pudelid). Normis hoitakse põhikultuure madalatel temperatuuridel, mis viibki rakkude elutegevuse miinimumi, samal ajal aga tunduvalt väldib ka söötme kuivamist. Kultuure külvatakse ümber regulaarsete ajavahemike järel, kõige vähemalt aga kord kuue kuu kohta. Arvestatakse tööjõu ökonoomiat; veel on mikroobide kohta teada, et sagedased passaažid viivad iseloomustavate morfoloogiliste tunnuste ja hinnatavate füsioloogiliste omaduste kaole.

Mõnikord tekib muuseumis raskusi kõrvalise infektsiooni tagajärjel. Eriti ohtlikud on ses mõttes mikroseened, mis kergesti hakkavad kasvama katseklaase sulgevais vattkorvides. Seeninfektsiooni vastu võib edukalt kasutada korkide immutamist mõne tilga 1 %-lise sublumaadilahusega (lahus valmistatakse etanooli ja glütserooli 1:1 segus). Õhukindlate lakkide kasutamine seevastu ei ole soovitatav - takistatud gaasivahetuse tõttu võivad katseklaasis akumulieruda kultuuri elutegevuses tekkivad ja teda ennast kahjustavad gaasilised produktid. Ometi ei saa sedagi meetodit arvestamata jätta. Goldie ja Smithi 1956.a. avaldatud andmete järgi on pitseerimine parim võte, mis soodustab mitmete seenekultuuride, eriti asporogeensete hallitussente säilitamist.

Avali-põhikultuuride modifikatsiooniks võib pidada säilitamist mineraalõlide kihi all (kasutatakse steriliseeritud neutraalset parafiinõli). See võimaldab enamikku töösutusliku tähtsusega mikroobikultuure pikaajaliselt säilitada muutumatute omadustega. Negatiivseks küljeks on vajadus katseklaase alati püstasendis hoida.

Sporogeensete mikroseenete säilitamisel kasutatakse edukalt mulda ja liiva (steriilne muld + liiv +  $\text{CaCO}_3$ ). Keskkond kuivatatakse otsekohe pärast vastava seene spooridega inokuleerimist, kui eesmärgiks on ainult säilitamine, mitte paljundamine. Vastasel juhul (kui soovitakse vegetatiivset

kasvu) rikastatakse keskkonda toitelahusega ja inkubeeritakse enne muuseumi paigutamist sobival temperatuuril.

Kaasajal on laialdaselt tarvitusel lüofiliseerimistehnika. Lüofiliseeritud kultuurid võivad paljudel juhtudel säilida muutumatute potentsiaalsete aktiivsustega praktiliselt piiramatul aja kestel, vajamata seejuures mingit passeerimist. Põhimõtteliselt seisab lüofiliseerimine väikese hulga mikroobirakkude suspendeerimises sobivas vedelikus (seerum, piim, suhkrulahus) ja järgnevas kiires sügavkülmutamises ning kuivatamises kõrgvaakuumis (kultuurid külmutatakse tavaliselt tahke CO<sub>2</sub> temperatuuril, s.o. - 69° juures). Kultuur pitseeritakse ja säilitatakse vaakuumis. Lüofiliseerimine on eriti kasulik suurte muuseumide puhul - tohutult hoitakse kokku tööjõudu (puudub vajadus ümberkülvi-deks), muuseumi pinda (kultuur võtab väga vähe ruumi, on paigutatav mistahes asendis) ja välistatakse täielikult iga-suguse kontaminatsiooni võimalused. USA-s säilitatakse kogu põhiline bakteriaalsete tööstuskultuuride varu lüofili-seeritud seisus tsentraalmuuseumides. Mõningaid takistusi on meetodi kasutamisel pärmeente juures. Ilmseid ebaõnnes-tumisi on esinenud perekondades Cryptococcus, Schizosaccharo-mycetes ja Saccharomycetes (kasulike potentside kadu lüofili-seerimisel). See sunnib ettevaatusele ka muude pärmidega. Meetodit ei soovitata nende tööstuses kasutatavate seente säilitamisel, kus liiv- ja muldkultuurid annavad tunduvalt paremaid tulemusi. Esineb siiski positiivseid hinnanguid meetodile nendegi mikroobide juures. Võib-olla kõige kaalu-vam vastuväide lüofiliseerimisele, eriti väikestes muuseumi-des, on meetodi nõudlikkus: tulemused sõltuvad mitte üksnes hästi väljatöötatud lüofiliseerimistehnika standardsuse sei-ramisest, vaid ka sellistest asjaoludest nagu keskkonna ise-loom, kuivatustemperatuur, jääkvedelike hulk, rakkude kont-sentratsioon ning vanus jne. Kokkuvõttes tuleb ühineda A.H. Rose'i seisukohaga (1961), et lüofiliseerimises tuleb näha valikuliselt rakendatavat meetodit, mis on eriti kasu-lik suurte kollektsioonide puhul.



## 2. Söötmed ja tooraine

Laboratooriumitingimustes ja muuseumides töötatakse tavaliselt keskkondadega (meediumidega), mille kasutamine ei tule arvesse laiaulatusliku tööstusliku tootmise korral. Siit sugeneb rida probleeme. On selge, et tööstuses kasutatav sööde peab põhitunnuste poolest vastama laboratooriumis kasutatavale, mis koostati või valiti optimaalsena, rahuldamaks kultiveeritava mikroobi nõudeid. Siit omakorda kerkib praktiline küsimus kasutuskõlblikest toorainetest. Lühidalt väljendatuna peavad tööstuslikud söötmed andma mikroobile optimaalsed kasvutingimused, samal ajal peavad aga söötme valmistamiseks vajalikud toorained olema hõlpsasti kättesaadavad vähe või üldse mitte varieeruvate omadustega ja hõlpsad. Mõnikord tuleb substraadina kasutatav tooraine enne mikroobide kultiveerimist siiski kallile töötlemisele allutada. Küllalt kallis on juba liighappelistes keskkondadesse (veinitööstuse jäätmed, piimaseerum - vadak, must siirup) lisatav lubi. Veelgi kulukam on näiteks saepuru töötlemine hapete või alustega, et puidu orgaanilisi aineid (peamiselt tselluloosi) hüdrolüüsida kääritamiseks kõlblike aineteni. Loomulikult tõstab see ka mikroobse produkti omahinda. Seepärast on mikrobioloogilises tööstuses hinnatavamad sellised toorained, mis on lihtsas ja vähekulukas tehnoloogilises protsessis kohandatavad mikroobide tarbeks. Selliste ainete näitena võiks esitada pärmitööstuse toorainet - suhkrutööstuse jääkainet melassi. Üldse tuleb toonitada, et mikrobioloogilise tööstuse kasulikkus seisneb peale vajalike toodete andmise veel selles, et see võimaldab ära kasutada mitmesuguseid teiste tööstuste jääkprodukte, mis kasutamata kujutaksid mitte üksnes kaotsi läinud väärtusi, vaid põhjustaksid ka looduse reostamist.

Mikrobioloogilise tööstuse produkti hinda mõjutab, nagu märgitud, eelkõige kasutatav tooraine. Teiseks tuleb

arvestada mikrobioloogilist protsessi kui seesugust. Mida keerulisem see on, mida täpsemat tehnoloogiast kinnipidamist see nõuab, mida keerulisem on kasutatav aparatuur, seda kallim on ka saadav produkt. Kalliks (mõnigi kord ebatasuvalt kalliks) osutub ka produkt, mille valmimine või küpsemine nõuab väga pikka aega. Mõnikord on produkti hinna (täpsemini: väärtuse) kujunemisel otsustav see töökulu, mis on seotud produkti isoleerimisega meediumist (nii on lugu mõne käärimisprotsessi hinnaliste kõrvalproduktidega).

Tuleks veel märkida seda asjaolu, et mitmesuguseid naturaalseid jääkprodukte kasutatakse mikrobioloogilise tööstuse toorainena mitte ainult nende madala hinna pärast. Osutub, et väga paljudel juhtudel on sellistes määratlemata koosseisuga söötmetes produkti saagis tunduvalt kõrgem kui keemiliselt täiesti defineeritud koosseisuga keskkondades.

### 3. K u l t i v e e r i m i s t i n g i - m u s e d

Tööstuses kasutatav mikroob peab intensiivselt paljunema mitte üksnes laboratoorses, vaid ka tööstusprotsessi tingimustes. Selleks tuleb produtsentmikroobile luua optimaalsed tingimused. Tavaliselt seiratakse optimaalsete tingimuste loomisel tööstuses söötme koostise kõrval järgmisi faktoreid: 1) steriilsus, 2) aeratsioon, 4) segamine ja loksutamine (agitatsioon), 3) vahustumine, 6) temperatuur, 7) keskkonnareaktsioon (pH), 5) põhi- ja jääkproduktide eemaldamine. Viimasel ajal seostuvad nendega läbivoolu- ehk pidevkultiveerimise probleemid.

S t e r i l i s e e r i m i n e seostub tööstustingimustes kasutatavate kultuurianumatega (fermenterid, reaktorid, kultiveerimistankid, vannid) ning täiendava varustamisega värske söötme ja õhu osas. Mõned tööstusharud tu-

levad toime peaaegu steriilsetes tingimustes. Selliste hulka kuulub sööda- ja pagaripärmi tootmine, kus spetsiaalsed tingimused, eriti keskkonna kõrge happesus, ei võimalda vähemalt tootmistsükli jooksul kuigivõrd areneda kõrvalistel, saastavatel ehk kontamineerivatel mikroobidel. Seevastu praktiliselt kõik baktereid kasutavad tööstusharud nõuavad steriliseerimist. Kontaminandid ei tarvitsegi seejuures tingimata põhjustada põhiprodukti toodangu langust. Sama häiriv on näiteks mürgiste või põhiprodukti inaktiveerivate ainete kogunemine.

Omaette probleemi moodustab tööstuses kasutatavate mahutite ja söötmete steriliseerimiseks vajalike võtete valik. Laboratooriumis kasutatavad võtted on tööstuses kasutamiseks enamasti liiga kallid. Just seepärast arvestatakse igas konkreetses tööstuses, millist steriilsusastet tegelikult tuleb rakendada. Nagu märgitud, väga happelistes keskkondades kiiresti kulgevate protsesside puhul on steriilsus väheoluline. Mujal kohtame steriilsusnõude suhtes tervet üleminekute skaalat kuni maksimaalse steriilsuse vajaduseni protsessi kogu kulgemisaja kestel. Sellest johtuvalt kasutatakse mõistet tootmissteriilsus, mis märgib antud mikrobioloogilise protsessi steriilsuse astet, et vältida kõrvalisest infektsioonist tekkida võivaid praktilisi raskusi.

Mahutid ja keskkonnad steriliseeritakse (kui steriilsus on vajalik) peaaegu eranditult kõrgete temperatuuride toimel (kas koos või eraldi). Mahuti steriliseerimisel koos keskkonnaga kasutatakse vastavalt pakitud anumate alutamist ülekuumendatud veeauru toimela, s.o. steriliseerimist kõrgendatud rõhu all (tavaliselt 120° 20 min. jooksul). Kultiveerimisanumate eraldi steriliseerimisel tehakse seda tavaliselt voolava veeauruga. Sööde steriliseeritakse kas suurte kogustena (kuni 45 000 l) või nn. pidevsteriliseerimise meetodil. Esimesel juhul varustatakse vastavad mahutid (batch cookers) temperatuuri toime ühtlustamiseks segajatega. Ülekuumutatud veeaur juhitakse läbi keskkonna vastavate avade kaudu, samal ajal pumbatakse välja õhk.

Pärast steriliseerimisprotseduuri lõppu pumbatakse veel kuum sööde steriilset torustikku mööda kultiveerimisanumasse. Sellel teekonnal sööde ühtlasi jahutatakse nõutava tasemeni.

Steriliseerimise bätš-meetod on võrdlemisi kohmakas ja raskepärane. Peale muu ei võimalda see steriliseerimiskestuse varieerimist protsessi kestel. Seetõttu kasutatakse arenenud tööstusmaades ikka enam pidevsteriliseerimist, mis annab võimaluse soojusenergia tunduvalt ökonoomsemaks kasutamiseks. Steriliseerimisaja ja temperatuuritaseme peenem regulatsioon väldib mikroobidele oluliste aminohapete ja vitamiinide lagunemist, samuti toksiliste ainete teket (see on tavaline kuumsteriliseerimise käigus). Pidevsteriliseerimiseks kasutatakse küllalt keerulise erikonstruktsiooniga seadmeid, mida steriliseeritav keskkond läbib pideva, sealjuures reguleeritava voolusena.

Lisaks kirjeldatud füüsikalise toimega steriliseerimismeetoditele kasutatakse mõnedel juhtudel ka keemilisi steriliseerimisvahendeid, s.o. desinfitseerivaid aineid, mis peavad põhikultuuri kaitsema kontaminantide eest. Nii kasutatakse pentakloorfenooli Aspergillus niger'i kaitsemiseks kõrvalise bakteriaalse infektsiooni eest amülaasi tootmisel süviskultuurides. Samal eesmärgil kasutatakse penitsilliini riboflaviini (vitamiin B<sub>2</sub>) tootmisel pärvide abil.

Üksikuid andmeid on ka radioaktiivsete kiirguste kasutamisest söötmete steriliseerimiseks piimhappe mikrobioloogilisel tootmisel. Seni ei ole need katsed positiivseid tulemusi andnud - koos steriliseerimisega on kasutatav faktor (koobalt-60 kiirgus) viinud keskkonnas selliste muutusteni, millega kaasnes saagise langus.

Eri probleemi moodustab õhu steriliseerimine keskkondade aereerimisel (õhuga läbipuhumisel). Kasutatakse mitmesuguseid meetodeid (kuumutus kuni 300°, kompressioon kõrgete rõhkudeni jm.). Kõige odavamaks, samal ajal küllaldaselt töökindlaks on osutunud aga filtreerimine läbi ketaste, mis tavaliselt valmistatakse šlakiräbust ning raa-

mistatakse. Filtrite sobiv tihedus on 270...300 g/dm<sup>3</sup>, mille puhul piisab 6...8 cm paksusest kihist ka kõige võimsama kasutatava õhuvooluse jaoks. Edukalt tarvitataavad on ka klaasvatt, puuvill (eriti efektiivne), süsi jm. materjalid, millel on adsorbeerivad omadused. Tehniliselt keerulisem on elektrostaatilise sadestamise kasutamine. Sykesi (1958) andmeil ei allu pealegi kõik mikroobid sellele menetlusele.

Kasvukeskkonna a e r e e r i m i n e on oluline kõigi aeroobsete mikroobide kultiveerimisel. Et hapnik on väikese lahustuvusega, on tööstuses aeroobsete mikroobide kasvatamisel praktiliselt tarvilik pidev pihustatud õhu läbipuhumine kogu kultuuritsükli kestel. Seejuures tuleb arvestada hapnikutarviduse muutusi sõltuvalt kultuuri arengu faasist ja eest. Sageli esineb veel mittevastavus hapnikunõudluse osas kultuuri kui sellise kasvuks ja tootjat huvitava produkti akumulatsiooniks: produkti maksimaalne väljatulek nõuab tunduvalt tugevamat hapnikuga varustatust kui lihtsalt mikroobide kasv. Shu (1953) jaotab tööstuslikud mikrobioloogilised protsessid hapnikutarbe järgi kolme rühma. Esimesse kuuluvad protsessid, milles mikroobide maksimaalne kasv ja produkti maksimaalne akumulatsioon nõuavad enam-vähem võrdselt hapnikku (näiteks ustilagiinhappe tootmine Ustilago zea abil). Teises rühmas on mikroobide kasv hapnikunõudlikum kui produkti süntees ( $\alpha$ -amülaasi tootmine Aspergillus niger'i abil). Kolmandas rühmas on asi vastupidi - produkti tootmise huvid nõuavad keskkonna sellise intensiivsusega aereerimist, mis enam ei luba produktimikroobi maksimaalset kasvu (sidrunhappe tootmine Aspergillus niger'i abil).

Ilmselt sõltub mikroobide hapnikutarve ka muudest kultiveerimistingimustest, eriti keskkonna koostisest. Kahjuks ei ole nimetatud sõltuvuse mehhanismid veel kuigivõrd tuntud, mistõttu ei ole teoreetiliselt ennustatav ka optimaalne aeratsioonimäär mingi konkreetse tingimustekompleksi jaoks. Küsimus tuleb lahendada empiiriliselte. 1959.a. an-

dis Johnson siiski valem, mis lubab mõnevõrra orienteeruda aeroobsete mikroobide hapnikutarviduses, kui süsinikuallikaks on sahhariidide tüüpi ained ja kui protsess annab vaid rakumassi, vett ja süsihappegaasi (s.o., kui ei ole eesmärgiks mingi ühendi kogunemine):

$$\text{vajalik } O_2 \text{ X} = \left( \frac{3333}{y} - 41,8 \right) \cdot G \cdot \frac{\text{juurdekasv/minutis}}{\text{biomassi produktis}}$$

Valemis X - vajalik  $O_2$  hulk millimoolides minutis, y - kuiva biomassi produktsioon 100 g kasutatud glükoosi kohta grammides ja G - kasvumäär, väljendatuna biomassi juurdekasvuga minuti kohta (s.o. valem on rakendatav teatavates statsionaarsetes tingimustes, kui biomassi juurdekasv pidevalt eemaldatakse). Valemi kasutamisel tuleb arvestada rida piiravaid tingimusi, mispärast see jääb siiski vaid ligikaudse orientatsiooni saavutamiseks. Empiirilisele katsetamisele jääb seni siiski otsustav osa. Muidugi tuleb erinevate tulemuste võrdlemiseks rakendada aeratsiooni efektiivsuse hindamise standardseid meetodeid. Põhiliselt tunnustataksegi kahte meetodit. Esimene on nn. sulfitmeetod ja pärineb 1944. aastast (autorid Cooper, Fernström, Miller). See põhjeneb asjaolul, et sulfit on hõlpsasti oksüdeeritav molekulaarse hapnikuga. Sulfitilisandiga keskkonnas hoitakse seetõttu hapniku kontsentratsioon nullilähedases seisus, välja arvatud gaas-vedeliku piirpinna lähedane piirkond, kus hapniku rõhk on kõrge. Määramisel kasutatakse Na-sulfiti nõrgalt leeliselisest lahust kontsentratsiooniga 0,1...1,0 M, millesse katalüsaatoriks on lisatud vaskioone (dissotsieeruva soola näol) kontsentratsioonis  $10^{-5}$ ... $10^{-3}$  M. Mõõtmised viiakse läbi proovides, mis võetakse lämmastikus hoitud pipettidega ja milles jood-titrimisega määratakse jääk-sulfiti hulk. Meetod ei ole rakendatav vahetult kultuurides.

Teine meetod on polarograafiline hapniku määramine,

mis on läbiviidav otse mikroobikultuurides. Meetod on täpne, kuid küllaltki tülikas. Uus väljapääs hõlpsasti kasutatava ja samal ajal täpse meetodi näol näib kujunevat TRÜ elektrokeemia problemlaboratooriumis konstrueeritud elektrokeemilise hapnikumõõturi näol, kui see mõõtur kord läheb tööstuslikku seeriatootmisse.

On kindlaks tehtud, et aereerimisefektiivsus, mõõdetuna  $O_2$  lahustumise alusel, sõltub paljudest faktoritest. Peale üldiste füüsikaliste ja keemiliste faktorite (anuma kuju ja mõõtmed, keskkonna viskoossus, koosseis, happesus jne.) tuleb eriti märkida mikroobikultuuri kasvuiseloomu tähtsust. Aeratsioonile töötab vastu mikroobide kasv mütselikogumikena (mikroseened).

Olulise, kui seda tavaliselt arvatakse, on aeratsiooniefektiivsuse suhtes kultuurianuma kuju. Cormani uurinised (1957) näitavad, et parima efekti saab koonilise anumaga, mille põhi on ühtlaselt sälgatud õhu läbipuhumiseks (s.o. koonuse tipp on suunatud üles). Enamasti kasutatakse aga anumasse viidud pihusteid. Üheks põhitudüübiks on siin kultuurianuma põhjale asetatud spiraalne või ristikujuline "piip", milles on avad (pisikesed augud) õhu läbijuhtimiseks. "Piibu" kohal on sageli veel segaja, mis kindlustab kogu mahuti ruumala ühtlase ja peendisperse õhustuse.

Teist tüüpi esindavad poorsest klaasist või portaalainist valmistatud pihustid. Tööstuses kasutatakse neid harvem.

Põhjalikult on uuritud õhumullide teket läbipuhumisavadel. Küsimus on jällegi hapniku halvas lahustuvuses veekeskkonnades. Seepärast on ülesandeks läbipuhutav õhk sõõtmest läbi lasta võimalikult peendisperse, mis tõstab õhu ja vee kokkupuutepinda ja loob paremad šansid sõõtme küllastamiseks hapnikuga. Selgub (Davidson ja Amick, 1956), et õhuvooluse madala intensiivsuse korral moodustuvad üksikmullid, mille maht on võrdeline keskkonnavedeliku pindpinevusega ning ava raadiusega. Kõrge intensiivsusega õhuvooluse korral on mullide maht proportsionaalne tugevuse-

ga ega sõltu enam keskkonna pindpinevusest. Mullide sagedus osutub avade raadiuse funktsiooniks. Avade vähendamine tavaliselt ei anna loodatavat efekti, sest need kipuvad siis ummistuma.

Õhustamistagevust väljendatakse sageli minutis läbipuhutava õhu mahu suhtega aereeritava söötme mahusse. Tuleb märkida, et sellist näitajat võib vaid tinglikult pidada aereeritustaseme näitajaks.

Õhustamisega kaasneb ka söötme segamine õhumullide toimel. Lisa-segajate rakendamine parendab õhustamist nii mullide pihustamise kui ka õhustuse ühtlase jaotamise tõttu kultuuris. Selle tagajärjel tõuseb õhustamise efektiivsus. On konstrueeritud koguni kultuurianumaid, mille rahuldav õhustamine saavutatakse ainult intensiivse segamise abil (segaja pöörleb kiirusega 700...1500 pöört minutis).

On avaldatud arvamust, nagu võiks segamine, resp. loksutamine soodustada mikroobide kasvu ka õhustustingimustest sõltumata. Ometi ei ole selles küsimuses seni täit selgust. Efekt on seoses ka mikroobide kasvuiseloomuga - menetlus on kasulik seal, kus selleta tekivad mikroobikogumikud, mis vähendavad vahetus-intensiivsust keskkonnaga. Samuti nõuavad loksutamist või intensiivset segamist need keskkonnad, milles on vaja ühtlaselt jaotada pihustunud halvasti lahustuvaid komponente.

Keskkonna vahustumine on sageli ebasoovitav nähtus (kuigi osa tootmisharusid kasvatab aeroobseid mikroobe kavatsuslikult vahus), mis võib viia infektsioonile ning materjalikadudele. Efektiivseimaks võitlusmeetodiks on vahustusvastaste-ainete lisamine kultuurikeskkonnale. Need madaldavad vedeliku pindelastanust, mistõttu tähtsaimaks nõudeks on nende lahustumatus vees (pindade juures peab esinema agensi kõrge kontsentratsioon). Kasutatakse mitmesuguseid lahustumatuid õlisid (linaseemne- ja sojaõli), õlijaid orgaanilisi happeid (oleiinhape), rasyhapetest deriveeritud alkohole jne. Teatavat ettevaatust nõuab siin asjaolu, et taolised õlid madaldavad hapniku absorptsioonimäära. Õlide



lisamisega kerkib ka rida täiendavaid tehnilisi probleeme, eriti seoses õlide raske steriliseeritavusega (keskmised steriliseerimistemperatuurid (115...120°) nõuavad väga pikka toiminisaega (Bungay andmetel nõuab isegi 127° temperatuur veel 2...3-tunnist menetlemist), kõrgematel temperatuuridel aga toimuvad õlides muutused ning tekib sade, mis võib ummistada seadmed lukkudes ja mõõtriistades. Torustikes voolavad õlisegused söötmed kõrgeenenud viskoossuse tõttu aeglaselt ja mõnikord nõuavad torude spetsiaalsoojendust voolavuse tõstmiseks. Et vältida õlide degradatsioonil tekkivate orgaaniliste hapete mõju anumatesse, tuleb need valmistada kallist roostevabast terasest. Selle kõige tõttu on katsetatud mehaanilisi vahustusvastaseid vahendeid, kuid nende toime-efektiivsus jääb seni maha õlide omast.

#### 4. Produktide ja jääkainete eemaldamine

Nagu eespool märkisime, on mikrobioloogilise tööstuse produktiks mõnel juhul mikroobid ise (pagari- ja söödapärmi tootmine), enamasti aga mikroobide elutegevuses tekkivad ained (piimhape, tööstuspiiritus, antibiootikumid jne.). Nii sel kui teisel juhul tuleb tööstusprodukt eraldada sööt-  
mest, milleks kasutatakse kas tsentrifugimist (pärmid, bakterid) või rotaatorfiltreid (filamentse kasvuga mikroobid, eelkõige mikroseened, mis taolistel rotaatoritel moodustavad viltja filtreerimiskihi).

Mikroobide elutegevusproduktide isoleerimismeetodeid käsitleme vastavates eripeatükkides tagapool. Need on nii mitmekesised ja sisaldavad palju keemiatööstuse arsenalist võetud võtteid, alates sadestamisoperatsioonidest ja lõpetades kolorimeetrimetoditega, et nendest vähegi asjakohase ülevaate andmine pole siinkohal mõeldav.

Eri probleemi moodustavad jääkproduktid. Kuhu panna

kasutatud meediumi suured kogused? Mis teha tohutute mikroobirakumassidega, kui need pole tootmise eesmärk? Tavaliselt lähevad need looduslikesse veekogudesse, ilma et alati rakendataks puhastusseadmeid, mis väldiksid veekogude reostamist. Ühtlasi läheb sageli kaduma hulk biokeemilisi ühendeid. Nii saadab näiteks Tartu pärmitehas, tavaline väikeettevõtte, päevas Enajõkke umbes  $160 \text{ m}^3$  pärmipraaka, mis sisaldab veel umbes 1100 kg suhkruid, peamiselt monosahhariide. Tuleb ütelda, et seni ei ole jääkide probleemile rahuldavat lahendust leitud ja seda maailma mastaabis. Parim, mida praegu teha võidakse, on jäätvete korralik puhastamine (peamiselt bioloogiline) enne veekogudesse juhtimist.

## 5. L ä b i v o o l u - e h k p i d e v - k u l t u u r i d

(er ole)

Mikroobikultuuri arengus on võimalikud kaks tüüpi.

1) Tavalised "suletud" kultuurid, s.o. kultuurid, mis realiseeruvad kindlais söötmekogustes piiratud ruumalaga mahuteis; olgu nendeks mahuteiks siis laboratooriumis kasutatavad katseklaasid ja kolvid või tööstuses kasutatavad kultivaatorid, mille ruumala mõnikord küünib mitmekümne tuhande liitrini. Sellises kindlakoguselises söötmehulgas toimuvad mikroobikultuuri arenedes kindlasuunalised muutused. Ühest küljest kasutavad intensiivselt kasvavad ja paljunevad rakud keskkonnas leiduvaid toitaineid samuti intensiivselt (mõned neist võidakse praktiliselt täielikult ammendada). Samal ajal kogunevad keskkonnas mikroobide elutegevusproduktid. Need võivad olla ka otseselt toksilised, kuid selletagi on teada, et mistahes organismi elutegevuse lõppproduktid on neid tekitanud organismile põhimõtteliselt kahjulikud. Nii toitaainete ammendamine kui ka jääkproduktide kogunemine tähendavad mikroobikultuuri elukeskkonna halvenemist. Ebasoodsas suunas muutuvad ka keskkonna füüsika-

lis-keemiliste omaduste näitajad (pH, redokspotentsiaal jt.). Seoses sellega muutuvad rakkude morfo-füsioloogilised omadused, nende paljunemisintensiivsus langeb, kuni kultuur jõuab nn. statsionaarsesse faasi (hävivate rakkude arv ajaühikus võrdub tekkivate rakkude arvuga), seejärel aga degeneratsioonifaasi. Kahjustuslikud muutused akumuleeruvad, jätkuvad tütarrakkudes. Nii on suletud või mitte küllalt ruttu uue nevas keskkonnas süsteem kui tervik tasakaalustamata. Rakkude adaptatiivsed muutused ei jõua järele keskkonna muutustele. Raku struktuur-füsioloogilise aparatuuri ümberkorraldamine on küllalt aeglane; kuni see teostub, on keskkond juba jällegi muutunud jne.

2) Kultuurid, milles keskkonnatingimused on niivõrd stabiliseeritud, et rakkude füsioloogiline seisund püsib. Selleks on vajalik pidevalt taastuv süsteem nn. läbivoolu- ehk pidevkultuuri näol. Siin säilitavad rakud võime täielikuks eneseuundamiseks, kui palju ka ei korduks paljunemisega seotud struktuurilis-biokeemiliste muutuste tsükkel. Keskkonna püsivus saavutatakse läbivoolukultuurides tarvitatud toitainete samamõdulise asendamisega ja ainevahetuse lõpp-produktide samaaegse eemaldamisega sel teel, et kogu protsessi kestel voolab kultivaatorisse pidevalt juurde värsket keskkonda ning eemaldub olemasolevat. Eemaldatakse mitte ainult metabolismiproduktid, vaid ka biomassi juurdekasv, nii et rakkude kontsentratsioon kultuurimahutis jääb püsivaks. Sellised rakud kujutavad endast vastastikusel toimes meediumiga tasakaalustatud avatud süsteemi. Muidugi toimub kultuuri algul teatav nihe keskkonnaomadustes (ilmuvad mikroobirakud, registreeritavad on ka mõningad keemilised muutused), kuid heas pidevkultuuris saabub stabiilsus õige ruttu.

Tuleb rõhutada, et rakkude ja keskkonna stabiilne seisund saavutatakse pidevkultuurides ainult homogeense läbivoolu puhul. Muidugi tuleb pidevkultuur arvesse ainult vedelas, hoolega segatavas söötmes.

Pidevkultuuride teooria arendasid välja Monod (1950) ning Novick ja Szilard (1950). Küsimuse kohta on ilmunud

hiljemgi rikkalikult kirjandust. Huvi asja vastu seletub sellega, et peale mikrobioloogilise tööstuse on pidevkultuuridest huvitatud ka mikroobifüsioloogia ning -geneetika.

Nagu märgitud, antakse kultivaatorisse pidevkultuuridele püsiva kiirusega värsket söödet. Selle liig koos teatava hulga rakkudega aga samaaegselt eemaldatakse. Kui rakkude paljunemiskiirus võrdub äravooluga, jäävad nende üldhulk ja kontsentratsioon kultivaatoris püsivale tasemele. Pidevkultuuri sellealaseid suhteid väljendab võrrand

$$\frac{dx}{dt} = (c - r) x \quad , \quad (1)$$

milles  $x$  - rakkude hulk ruumalaühikus,  $\frac{dx}{dt}$  - rakkude hulga tõus ajaühikus (näiteks tunnis),  $c$  - juurdekasvu erikiirus (biomassi ühiku kohta arvatud juurdekasv ajaühikus),  $r$  - nn. lahjenduskoeffitsient, mis on arvatav valemist

$$r = -\frac{F}{V} \quad , \quad (2)$$

milles  $F$  - meediumi juurdevool ruumalaühikus, milles väljendati  $x$ ,  $V$  - meediumi maht kultivaatoris (samades ühikutes).

Kui  $c = r$ , see tähendab, kui rakkude juurdekasv võrdub äravooluga, muutub võrrand nulliks. See tähendab, et antud tingimuses jääb rakkude arv kultivaatoris püsivaks. Sellise statsionaarse seisundi saavutab pidevkultuur automaatselt. Sõltuvalt läbivoolu kiirusest erinevad ainult selle seisundi tasemed. Automatism johtub faktist, et mikroobide kasvukiirus ( $c$ ) sõltub keskkonnatingimustest. Rakkude arvu suurenemine ühes ja samas kultivaatori mahus viib mikroobi elutingimuste halvenemisele meediumi koosseisu ja omaduste muutumise teel. Seepärast on kasvukiirus -  $c$  väärtus - pöördvõrdeline mikroobirakkude arvuga kultivaatoris

$$c = k \cdot \frac{1}{N} ,$$

(3)

kus  $k$  väärtus sõltub mikroobiliigist.

Oletame, et mingil ajamomendil aeglustame läbivoolu (see on  $F$  väärtust) statsionaarse seisundi saavutanud pidevkuultuuris. Siis väheneb  $r$  väärtus ja  $c > r$ . See tähendab, et rakkude arv kultivaatoris hakkab suurenema (sest  $\frac{dx}{dt} > 0$ ). Selle tulemusena hakkab  $c$  väärtus, s.o. rakkude paljunemisintensiivsus langema, kuni jällegi  $c = r$  (kuni saabub uus statsionaarne seis  $x$  kõrgema väärtuse tasemel, s.o. rakkude kõrgema tiitri ja suurema üldarvu tasemel). Paljunemisintensiivsus ei saa langeda allapoole toodud taset (nii et oleks  $c < r$ ), sest siis muutuks  $\frac{dx}{dt}$  negatiivseks ( $\frac{dx}{dt} < 0$ ) ja rakkude arv kultivaatoris hakkaks langema, mille tagajärjel tõuseks  $c$  väärtus tasemele, kus jällegi  $c = r$ . Selline muutuste suund esineks ka siis, kui mingil ajamomendil tõstaksime läbivoolu intensiivsust. Järelikult: muutes läbivoolu kiirust muudame ka mikroobirakkude paljunemiskiirust ja süsteem rakud-meedium saavutab kiiresti uue tasakaalu. Läbivoolumuutused kujutavad endast seega automaatse eneseregulatsiooniga süsteemi. Kasutades võimalust muuta läbivoolu kiirust, võime rakke sundida paljunema mistahes ettearvutatava kiirusega füsioloogilistes piirides. Samuti saame sellesamaga viia rakud soovitatavasse füsioloogilisse vanusesse ja selles neid säilitada praktiliselt piiramatult aja kestel. See tähendab ühtlasi võimalust rakkude füsioloogilise aktiivsuse püstitamiseks, mis tööstuslikult on ülisuure tähtsusega.

Kui kultivaator inokuleerida, algab peagi logaritmilise paljunemine, kuni  $c = r$ . Logaritmilises faasis väljendab mikroobide paljunemist teatavasti võrrand

$$K = \frac{2,3}{t} \cdot \log \frac{B}{B_0} , \quad (4)$$

milles  $K$  - kasvukonstant,  $t$  - vaatluseks võetud ajavahemik sobivais ühikuis,  $B_0$  - rakkude arv ajal  $t_0$ ,  $B$  - rakkude arv mingil järgneval ajamomendil  $t_1$ . Tingimustes, kui on saabunud võrdsus  $c = r$ , väljendub kasvumäär, kui

$$KB_c = \frac{dB}{dt} \quad , \quad (5)$$

milles  $B_c$  -  $B$  väärtus kultivaatoris läbivoolutingimustega ettemääratud tasemel.

(5) integreerimisel saame

$$K = \frac{B - B_c}{B_c (t - t_c)} \quad , \quad (6)$$

milles  $t_c$  on moment, millal saabub  $B = B_c$ .

Võrrandiga (6) kirjeldatud olukorras on eneseregulatsiooni automaatika tõttu

$$\frac{B}{V} = \frac{B_c}{V_c} \quad ,$$

kus  $V_c$  - kultivaatori üldmaht,  $V$  - kultivaatorisse sisenevad söötme totaalmaht. Sellest saame

$$B = B_c \frac{V}{V_c} \quad .$$

Järgnevalt viime  $B$  leitud väärtuse võrrandisse (6):

$$K = \frac{V - V_c}{V_c (t - t_c)} \quad , \quad (7)$$

milles  $V - V_c$  - ülevoolanud söötme maht. Võrrandiga (7) määratud suhe säilib, kui rakkude kontsentratsioon kultivaatoris on sama mis ülevoolus. Siit järeldub, et tuleb vältida märgatavat sadenemist seintele, põhja ja kultivaa-

tori mundele siseosadele, kui tahetakse valem (7) alusel söötme vooluse järgi määrata mikroobide kasvukiirust. Seepärast on kultivaatorid varustatud mitmesuguste mehaaniliste seadmetega sadestumise vältimiseks. Siis annavad läbivoolukultuurid peaaegu ideaalseid võimalusi erinevate mikroobiliikide ja -tüvede potentsiaalse kasvukiiruse võrdlemiseks ja hindamiseks.

Läbivoolukultuurid reguleerivad laboratooriumitingimustes ennast mitte ainult kvantitatiivsest küljest. Vaatleme veidi lihtsustatult olukorda, mis tekib siis, kui koos põhikultuuriga P satub kultivaatorisse saastaja S rakke. On kerge näidata, et siis, kui P paljuneb antud tingimustes kiiremini kui S (s.t., kui  $K_P > K_S$ ), puhastub piidevkultuur teatava aja jooksul iseeneslikult. Muidugi on teoreetiliselt mõeldav ka vastupidine olukord (kui  $K_P < K_S$ ), milles välja pestakse põhikultuur. Põhimõtteliselt ei erine need olukorrad teineteisest, seepärast vaatleme asja üldistatult tingimustes, kus teatud ajamomendil leidub kultivaatoris kaks erinevat mikroobi A ja B, kusjuures olgu  $K_A > K_B$  ja kummagi alghulgad  $A_0$  ning  $B_0$ . Mingil järgmisel ajamomendil olgu vastavad hulgad A ja B. Siis sellel ajamomendil

$$\begin{aligned}
 A &= A_0 e^{K_A t} && \text{ja} \\
 B &= B_0 e^{K_B t} && \text{, millest} \\
 A/B &= A_0/B_0 \cdot e^{t(K_A - K_B)}. && (8)
 \end{aligned}$$

Arvestades, et  $K_A > K_B$ , peab suhe  $A/B$  ajaga vähenema. Tegelikult pestaksegi madalama paljunemisintensivsusega mikroob kultivaatorist varsti välja. Asja ei muuda läbivoolukiiruse muutmine, sest suhe  $A/B$  sellest ei sõltu. Tõsi, matemaatiliselt korrektne oleks ütelda, et  $A/B$  läheneb

nullile, kui t läheneb lõpmatusele. Et aga ei saa eksisteerida antud liigist mingit raku osaväärtust, siis B muutub nulliks tegelikult samal hetkel, kui kultivaatorist pestakse välja viimane diskreetne ühik - rakk.

Ainus võimalus, samal ajal vältimatu tingimus, kahe või enama mikroobiliigi (-tüve) kooseksisteerimiseks pidevkultuuris on nende kasvukiiruste täielik ja täpne võrdsus. Tegelikult sellist olukorda vaevalt kunagi kohtame. Erinevate kasvukiiruste jaoks on aga kerge arvutada aega, mis on vajalik aeglasemalt paljuneva mikroobi väljapesemiseks:

$$t = \frac{2,3 (\lg A/B - \lg A_0/B_0)}{K_A - K_B} \quad (9)$$

See aeg on pöördvõrdeline kasvukonstantide vahega ning võrdeline rakkude arvu alg- ja lõppsuhega logaritmidena vahel.

Pidevkultuuride aparatuure on ehitatud-kirjeldatud kümneid tüüpe. Aparatuuri põhimõttelised osad on näha joonisel 1. Sellelt selgub ka seadme töökäik. Uurimislaboratooriumides rakendatakse läbivoolu- ehk pidevkultuure n.-ö. puhtal kujul suhteliselt sageli. Tööstuses rakendatakse seevastu sageli ka pool-pidevkultuure, mida iseloomustab keskkonna perioodiline uuendamine, kusjuures perioodi pikkus sõltub tootmiseesmärkidest ja mikroobi omadustest (kultivaatoris lastakse protsessil kulgeda mikroobirakkude teatava kindla tiitrini, siis protsess peatatakse ja viiakse läbi osa keskkonna "väljavahetamine" värske vastu).

Kõige sagedamini kohtame tööstuses siiski gradient-pidevat protsessi. Siin tuleb kolonnitaolisse kultivaatorisse ühest otsast (tavaliselt alt) sisse värske sööde (selleks kasutatakse kas sektsioneeritud kolonni või kõrval asuvat inokuleerimata kolonni), teisest otsast (tavaliselt ülemisselt) aga väljub arengu lõpetanud kultuur koos elutegevusproduktidega. On kergesti arusaadav, et sellise korralduse juures ei saa rääkida tõelisest pidevkultuurist, kus meediu-



ni omadusi ja rakkude tiitrit säilitatakse kogu kultivaatori mahus. Gradient-pideva protsessi puhul muutuvad keskkonnas koosseis ja omadused - koos sellega ka rakkude tiiter ja omadused - pidevalt kogu aparatuuri pikkuses. Pidevkultuurist saab siin rääkida tehnoloogilises, mitte füsioloogilises mõttes.

Pidevkultuuride kasutamine mikrobioloogilises tööstuses on viimase aastakümne kestel olnud väga elava diskussiooni objektiks. Sellealase uurimistöö üheks peamiseks keskuseks on Tšehhoslovakkia SV, kus üldse tööstusmikrobioloogiat puudutav uurimistöö on arvukas ja kõrgetasemeline.

Põhimõtteliselt on pidevkultuuride eelised selged. Ometi osutub, et on väga vajalik asja uurida ja kaaluda igas üksikus tööstusharus üsna konkreetset, enne kui võib otsustada ülemineku kasuks bätš-protsessilt pidevale.

Pidevprotsessi üks olulisi eeliseid tööstuses on kokkuvõtteid produkti ühiku kohta, mis saavutatakse seadmete (järelkult ka tootmispinna) mõõdete olulise vähenemisega, samamastaabilise bätš-protsessiga võrreldes. Teiseks, kui võrrelda sama tootlikkuse astmega aparatuure, ilmneb ka kokkuvõtteid töötajate ning -ajade: kui protsess on kord käimas, pole vaja tööd kulutada inokulumi ettevalmistamiseks (ära jääb ka inokuleerimine) ja aparatuuri sagedaseks pesemiseks. Ära jääb kulukas aurutamine, millega bätš-protsessi puhul iga uue tsükli algul viiakse läbi steriliseerimist. Kokkuvõtteid annab ka gradient-pidevas protsessis nn. agitatsiooni (segamine, loksutamine) puudumine. Ökonoomia avaldub nii elektrienergia kui ajamite osas. Lõpuks märkigem, et kokkuvõtteid annab ka võimalus põhiliste kontrollitavate näitajate regulatsiooni automatiseerimiseks (juurdevoolutase, temperatuur, pH).

Produkti osas, olgu selleks mikroob ise või ta elutegevusproduktid, on eeliseks hõlpsamini saavutatav omaduste standardiseerimine.

Samal ajal ei tule unustada, et mõneski tööstusharus on ka bätš-protsessil eeliseid pidevprotsessiga võrreldes.

Elkõige tuleb arvestada bätš-sisseseade oluliselt kergemat kohandatavust tootmisprogrammi muutustega. Järelikult on pidevprotsess soodus vaid siis, kui võib ette näha pikaajalist tehnoloogia muutumatust, kui pole karta nõudeid produktsiooni sortimendi muutmiseks või laiendamiseks.

Bätš-protsessi eeliseks tuleb pidada veel fakti, et see võimaldab kergemini (väiksema kahjuga) remonditõid, kui protsessis tekib vigu (tavaliselt toimub kontroll ja remont tsüklite vaheaegadel). Kui kogu tsükkel koosneb bätš-protsessidest, ei vii ühe lüli ebaõnnestumine tsükli kui terviku kaotsiminekuks.

Pidevkultuurides muutub sageli tõsiseks probleemiks mikroobipopulatsiooni geneetilise stabiilsuse küsimus.

Lõpuks märgime, et mistahes tingimustes õigustab pidevprotsessend täielikult vaid siis, kui ka ettevalmistavad astmed ja järeltöötlus on viidud pidevusele. Kui need koosnevad reast bätš-protsessidest, annab põhiprotsessi pidevustamine vähest efekti.

## II. ALKOHOLITÖÖSTUS

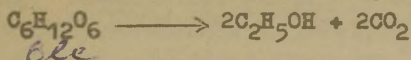
### 1. Üldalused

Alkoholitööstus on kaheldamatult üks vanima algupäraga tööstusi üldse. Juba Vana-Ida ja antiikaja rahvad oskasid valmistada pehmeid alkohoolseid jooke: mõdu, õlut ja veini. Nende jookide valmistamine on katkematult ja järjest laienevalt läbi aegade ulatunud meie ajani, lisandunud on veel kangete piiritusejookide tootmine seoses destilleerimistööstuse arenguga. Kaasajal toodetakse maailmas alkohoolseid jooke mitte alla 20 miljardi liitri aastas.

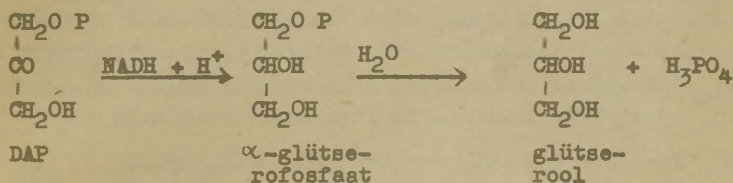
Alkoholsete jookide tööstust iseloomustab kaks erisust, mis selle tööstusharu asetavad eri seisukohale kõigi muude mikrobioloogiliste tööstusharudega võrreldes. Esiteks on siin tegu kõige laiem ja stabiilsema tööstusharuga. Alkoholsete jookide kasutamine, vastupidi enamiku muude mikrobioloogiliste produktide juures täheldatavale, ei kõigu kuigi oluliselt, vaid kasvab üsna pidevalt koos rahvastiku kasvuga. Samal ajal puudub sellel tööstusharul igasugune konkurents keemilisel sünteetil põhjeneva tööstuse poolt. Teiseks iseärasuseks on asjaolu, et alkoholsete jooke hinnatakse eranditult nende maitse ja muude organoleptiliste omaduste järgi, s.o. väga raskesti objektiivselt kirjeldatavate ja vaevalt täpselt analüüsitavate omaduste järgi. Nende kahe iseärasuse olemasolu (võistluse puudus, produkti allutamatus jäigale keemilisele analüüsile) on alkoholsete jookide tootmise mõnevõrra isoleerinud mikrobioloogilise tööstuse üldisest arengust. Sage li eelistatakse siin spontaanseid protsesse, põhjendusega, et ainult need annavad produktile vajaliku buketi ja individuaalse kordumatuse. Kõige selle tulemusena kasutab see tööstusharu suhteliselt vähe moodsaid meetodeid ja uut tehnikat.

Tunduvalt erineb alkoholitööstuse teine poolus - tööstuspiirituse tootmine, millel puuduvad eespool loetletud ja jookide valmistamist iseloomustavad iseärasused. Võiks ütelda, et tööstuspiirituse tootmine on seetõttu ka "asjalikumal" alusel.

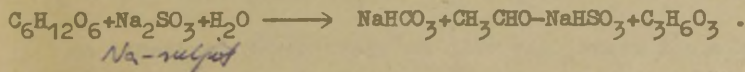
Etüülalkoholi (etanooli) moodustavad oma elutegevuses paljud mikroobid. Tegu on ühe tavalisima lõpp-produktiga suhkrute anaeroobsel kääritamisel. Bakterite juures tekib etanool seejuures aga vaid ühena paljudest produktidest, ilma et see domineeriks ühegi tuntud bakteriaalse käärimisprotsessi juures. Seevastu paljud pärmseened, eriti perekonna Saccharomyces liigid, produtseerivad anaerobioosis etanooli kui põhilist käärimisprodukti. Glükoosist lähtuva käärimisvõrrandi



järgi on näha, et koos etanooliga tekib pärmide käärimisprotsessis teoreetiliselt ekvimolekulaarne hulk süsihappegaasi. Muid produkte võrrand ei kajasta. Tegelikult see päris nii ei ole: koos etanooliga tekib mõnevõrra siiski ka kõrvalprodukte, mis kujunevad pärast püroviinamarihappe dekarboksüülimist tekkinud atseetaldehüüdist koos etanooliga. Peamiseks kõrvalproduktiks on saejunres glütserool, mis kaaluliselt moodustab Konovalovi (1967) andmeil kuni 2,65 % kääritatud suhkrust. Glütserooli tekke aluseks on asjaolu, et koos atseetaldehüüdiga võib NADH regenererimisel oksüdeerunud vormi vesiniku lõppaktseptorina toimida ka dihidroksüütsetoonfosfaat (DAP) - vt. glükolüüsi skeemi joonisel 2 ja tuletage meelde biokeemiakursuses õpitut, mida me siin kohal kordama ei hakka. Vesiniku aktsepteerimisel DAP-s toimuvad järgmised üleminekud:



Sel teel saadud glütserooli hulk on, nagu märkisime, üsna väike. Et pärmide käärimisprotsessis protsessi suunata glütserooli tekkele, tuleb normaalne vesinikuaktseptor - atseetaldehüüd - siduda. Glütserooli tootmisel tehakse seda Na-sulfiti lisamisega käärimiskeskonda. Käärimisvõrrand on nüüd väljendatav kujul:



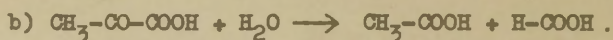
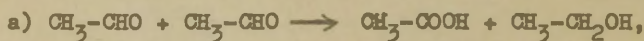
Nii võidakse saada glütserooli kuni 30 (35) % kääritatud suhkrust. Normis tekib glütserooli, nagu ülal märgitud, 2,5 % ümber, ainult keskkonna pH tõustes neutraalsuulähedastesse piiridesse tõuseb see näitaja 3,5 %-ni.

Osa kääritatava suhkrusüsinikust kulub ka paljunevate pärmirakkude kehaainese ehitamiseks. Mitmetel andmetel kulub selleks 1,5...1,7 % kääritatud suhkrust.

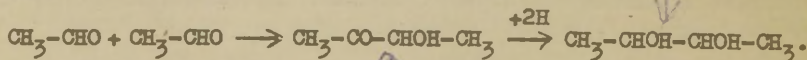
Muid lisaprojekte tekib arvukalt, kuid tühistes hulka-des - normis kokku mitte üle 0,5 %. Nende hulgast tuleb nimetada sipelghapet, äädikhapet, piimhapet, merevaikhapet, võihapet, krootonaldehüüdi, orgaaniliste hapete (propioon-, või- ja palderjanhappe) etüülestreid, mitmeid lahustuvaid lämmastikühendeid, kõrgemaid alkohole (puskariõlisisid) jt. Kõiki neid on vähe, kuid nad on eriti olulised alkoholkäärimisega toodetavate jookide maitse ja buketi kujunemisel. Eri pärmitüved, rääkimata juba liikidest, annavad kõrvalproduktide erineva kompositsiooni, sellega ka individuaalsete maitseomadustega joogi (veini- või õllemargi).

Kõigi kõrvalproduktide tekkereaktsioonid ei ole veel eksperimentaalselt tõestatud. Vaatleme järgnevalt mõningaid olulisi.

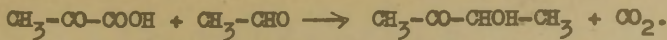
Äädikhape tekib kas atsetaldehyüdi dismutatsioonil (Cannizzaro reaktsioonis), milles üks aldehüüdimolekul oksüdeeritakse äädikhappeks teise aldehüüdimolekuli redutseerimise arvel etanooliks, või siis püroviinamarihappest selle hüdrolyüsil (siin tekib koos äädikhappega veel sipelghape). Vastavad võrrandid on ligikaudu järgmised:



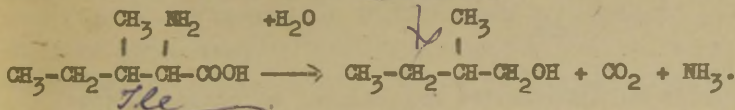
Atsetaldehyüüd võib läbi teha ka kahemolekulilise kondensatsiooni, mille tulemusena tekib 2,3-butüleenglükool:



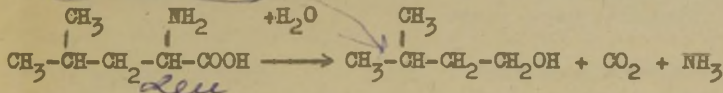
Vaheproduktiks, mis võib ka iseseisvalt koguneda, on seejuures atsetüülmetüülkarbinool. See võib tekkida ka n.-õ iseseisvalt:



Puskariõlide tekke kohta pärmiide etanoolkäärimisel on suhteliselt vähe andmeid. Mõnede osas on selgitatud teke aminohappeist. Nii tekib amüülalkohol isoleutsiinist:

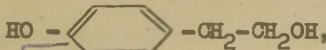


Isoamüülalkohol tekib vastavalt leutsiinist:



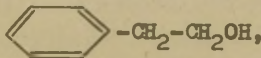
Mõlema tekkel toimub aminohappe dekarboksüülimine ja desamiinimine. Vabaneva  $\text{NH}_3$  kasutavad pärmid ise. Millises hulgas ja vahekorras puskariõlid tekivad, sõltub nii pärmitüvest kui söötme koostisest, eriti aminohapete suhtelisest kogusest, ammooniumisoolade manulusest, suhkru loomusest, pärmiliigist jne.

Arvatavasti kujunevad muudki puskariõlid (kõrgemad alkoholid peale amüül- ja isoamüülalkoholi) vastavatest  $\alpha$ -aminohapetest. Arvatakse, et need on peamised agensid, mis annavad aroomi õllele, veinile, rummile jt. jookidele. Eriti tuleks nimetada türosiinist kujunevat türosooli

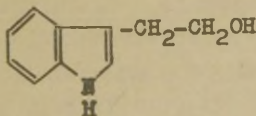


mis oma kibe-a maitsega annab spetsiifilise maitse õllele.

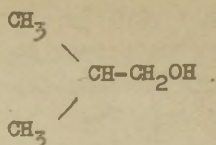
Analoogilised on fenüületanool



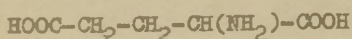
trüptofool



ja isobutanool (kujuneb valiinist)

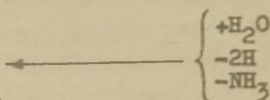


Jookide maitseomaduste kujunemisel on olulisel kohal ka merevaikhape. Põhiliselt tekib see glutamiinhapest järgmises üleminekuastmete reas:

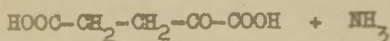


glutamiinhape

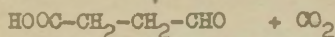
*glu*



oksüdatiivne  
desamiinimine



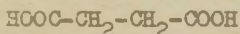
α-ketoglutaarhape



suktsinaat-hemialde-  
hüüd



oksüdeerimine



merevaikhape

Tööstuslikul etanoolikäärimisel arvestatakse normaalse-  
te tingimuste (eriti suhteliselt madala pH) olemasolul kõr-  
valproduktide moodustumist 5 % ulatuses teoreetiliselt  
oodatavast etanoolihulgast, millega etanooli saagis moodus-  
tab keskmiselt 95 % võrrandist tulenevast teoreetilisest  
hulgast. See tähendab, et etanool ja  $\text{CO}_2$  ei moodustu tege-  
likult täiesti ekvimolekulaarselt. Kaaluliselt moodustub  
100 g kääritatud suhkru arvel käärimiskeskkonnas keskmiselt  
45...46 g etanooli (oodatava 51 g asemel) ja 49 g  $\text{CO}_2$ .

Etanooli tootmisel on otsustav tähtsus pärmseentel.  
Neid käsitlemegi järgnevas peatükis.

## 2. Pärmsened

Pärmid ja pärmisarnased organismid on üherakulised seened, mis on levinud universaalselt kogu Maal. Neid leidub puuviljadel, õienektaris, taimemahlades, kõrgemate seente viljakehadel, taimede kuivavatel osadel, mullas, vees, tolmuühemetal, toiduainetes, inimese ja loomade nahal, limaskestadel, kopsudes, piimas jne.

Terminid "pärm" ja "pärmseen" ei ole taksonoomilis-botaanilised. Antud organismide piiritlemine-määratlemine ei ole sugugi kerge. Kui pärme defineerida unitsellulaarsete, pungumise teel paljunevate seentena, siis kehtiks see vaid osa pärmide kohta ja sedagi vaid kindlais tingimustes. Mõned kindlasti pärmide hulka paigutatavad seened ei pungu, suur osa pärme moodustab mütseeli. Ka paljud tüüpiliselt üherakulised pärmid võivad mütseeli moodustada, kui neid kestvalt kultiveerida gigantkooniate vormis. Mõningaid tüüpilisi suhteid erineva bioloogiga ja süstemaatilise kuuluvusega pärmide vahel kujutab joonis 3.

Sobivam on pärme määratleda Henrici (1941) järgi siiski kui tõelisi seeni, mida iseloomustab domineerivana (mitte aga alati) unitsellulaarne kasvuvorm. Samal ajal tuleb meeles pidada, et esineb unitsellulaarseid seeni, mis pole pärmid, nagu on ka pärme, millel mütseeli esinemine on tavaline.

Samal ajal ei ole huvi pärmide vastu lihtsalt akadeemiline - sajandeid on neid kasutatud alkoholsete jookide valmistamisel ning toiduainete töötlemisel. Pärmid on mitmeti ideaalsed tööstusobjektid. Nad on suhteliselt vastupidavad, lihtsate keskkonnanõuetega, kiire kasvu ja paljunemisega, kergesti meediumist eraldatavad, ei allu faagilisele infektsioonile.

Mõnel pool on püütud anda terminitele "pärm" ja "pärmseen" erinevaid tähendusi ("pärm" kui kaubandusartikkel, "pärmseen" kui organism). Käesolevas õpikus seda ei tehta ja käsitatakse mõlemaid võrdsena.



Bioloogilisele mitmekesisusele vastab pärmide mitmekesine süstemaatiline kuuluvus. Fülogeneetiliselt on see üsna heterogeenne rühm. Osa on vaadeldav klassi Basidiomycetes degeneratiivsete derivaatidena, mis on kaotanud enamiku klassi iseloomustavaid tunnuseid, säilitanud aga eksogeensete spooride moodustamise võime. Viimased on vaadeldavad basidiospoorida. Mõned selle rühma pärmid on edasi degeneraerunud ja kaotanud sellegi tunnuse. Teine osa pärme on vaadeldavad klassi Ascomycetes primitiivsete või degeneraerunud tuletistena. Sporoogeensed pärmid annavad seejuures askospoore konjugatsioonile tulemusena, aga ka partenogeneetiliselt. Kolmandal osal ei ole otseid tunnuseid, mis lubaksid neid kummasegi klassi arvata - need tuleb paigutada Fungi imperfecti hulka.

#### a. Klassifikatsiooniküsimused

Pärmide klassifikatsioon pakub rea iseloomulikke raskusi, sest tegu on ebaühtse, suurel määral utilitaarsetel kaalutlustel ühendatud, halvasti defineeritava rühmaga. Pealegi on sageli tegu äärmuseni lihtsustunud organismidega, mille suhtes tekib mõnigi kord raskusi juba klassi paigutamisel, rääkimata madalamatesse taksonoomilistesse ühikutesse kuuluvuse määramisest. Täpsemini öeldes - raskused tekivad ühikute eneste defineerimisega, selle otsustamisega, kustsaadik on tegu sugukonna, alamsugukonna, perekonna või triibusega ja kustsaadik on otstarbekohane nende mõistete rakendamine.

Kõige selle tõttu puudub süstemaatikute seas tänaseni üksmeel pärmide klassifitseerimisel. Süsteeme on antud mitmesuguseid, kõik nad on teatavate puudustega. Käesolevas õpikus toetume hollandi uurijate Lodderi ja Kreger van Rij (1952) tööle antud küsimuses, seirates Kreger van Rij hilisemaid seisukohti, mis ta on esile toonud 1958.a. ilmunud Cook'i poolt toimetatud põhjaliku monograafia "The Chemistry and Biology of Yeasts" süstemaatika-alastes peatükkides. Selle alusel anname ülevaate eeskätt tööstuslikku tähtsust evivatest pärmidest.

Pärmide süstemaatika arvestab eelkõige vegetatiivse ja generatiivse reproduktsiooni laadi. Esimene võib toimuda kas pungumise või läbinõõrdumise (fissiooni) teel. Pungumine võib olla multilateraalne (toimuda üle kogu raku pinna) või bipolaarne. Multilateraalne pungumine on kaugelt valdavam pungumisviis, bilateraalset pungumist kohtame vaid triibuses Nadsoniaae, samuti perekondades Kloeckera ja Pityrosporum.

Fissioon on ainsaks vegetatiivse paljunemise viisiks perekonnas Schizosaccharomyces. Kõrvuti pungumisega võib fissioon esineda perekondades Trichosporon, Endomycopsis, Candida.

Vegetatiivse paljunemise laadiga on lähedalt seotud pärmirakkude kuju. Multilateraalselt punguvad pärmid evivad ümmargusi, ovaalseid või ka väljavenitatud rakke, mitte aga sidrunikujulisi nagu bipolaarselt punguvad pärmid. Väga huvitavad kolmnurksed on perekonna Trigonopsis liikide rakud (pungumine toimub neil kolmes tipus).

Klassi Ascomycetes kuuluva sugukonna Saccharomycetaceae esindajad moodustavad generatiivse paljunemise käigus askusi. Askuseks on rakk, mis sisaldab askospoore. Askosporid tekivad kas vahetult pärast haploidsete vegetatiivsete rakkude konjugatsiooni sügoodist või siis diploidse generatsiooni rakust (konjugatsioon on siis toimunud varem, mõnikord juba spooride idanemisstaadiumis). Tuntakse iso- ja heterogaamset konjugatsiooni, aga ka partenogeneetilist sporulatsiooni. (Vt. skeeme joon. 4 ja 5.)

Askosporide kuju on üsna mitmesugune ja evib taksonoomilist tähtsust. Tuntakse sfäärilisi, ovaalseid, oa-, sirbi- ja neerukujulisi askospoore, aga ka saturnjaid, hemisfäärilisi (kübarakujulisi), angulaarseid, nõeljaid ja muukujulisi spore. Esineb sileda- ja nääpinnalisi spore. Värvus on spooridel tavaliselt sinine või violetjas, harvem pruun. Spooride hulk ühes askuses on liigiomane tunnus ning kõigub 1...16 vahel. Väga sageli esineb 4-spoorilisi askusi (nagu pagaripärmil).

Tuleb märkida, et sporulatsioonid indutseerimine ei ole alati kerge - esineb liike, millel sporulatsioon on vaevalt tabatav. Muuseas kuulub selliste hulka ka *Saccharomyces cerevisiae*. Sporulatsioonid temperatuurioptimum erineb mõnevõrra kasvuoptimumist. Hapniku vaba juurdepääs näib sporulatsioonid stimuleerivat (Adams, Miller, 1954),  $CO_2$  ja etanool aga takistavad seda. Igatahes ei saa sporulatsioonid vaadelda ka funktsioonina, s.o. normaalse kasvutsükli normaalse protsessina. Selle saamiseks on vaja spetsiaaltingimusi. Kui pärmi tahetakse sundida sporulatsioonile, viiakse pärmirakud pärast kasvatamist rikkaliku koostisega presporulatsioonimeediumis kõrgaktiivses füsioloogilises seisundis spetsiaalsesse sporulatsioonidõõtmesse (erineb eri liikidel, selle kohta lähemalt Cook'i koostatud monograafias, samuti Adamsi, Powelli, Kleyni, Harteliuse, Ditlevseni jt. töödes). Paljud pärmid kaotavad sporegeensuse pikaajalisel kultiveerimisel.

Vastupidiselt askosporidele on ballistosporid suurel määral diskuteeritava loomusega. Küsimus on selles, kas need on käsitatavad seksuaalsporidena või mitte. Kui ei, siis peaksid vastavad pärmid kuuluma Fungi imperfecti hulka, kui need sterigmade otstes tekkivad ja eri mehhanismiga ejakuleeruvad spoorid (ballistosporid) on aga seksuaalsed, siis on sugukond Sporobolomycetaceae üks klassi Basidiomycetes sugukondi, spoorid aga on neil samastatavad basidiosporidega. Viimati nimetatud seisukoha kasuks on kaalukaid argumente esitanud näiteks Saincliver (1952). Enamik süstemaatikuid toetab seda seisukohta. Ballistosporid on asümmeetrilised, neeru- või sirbikujulised (Sporobolomyces), ümmargused või ovaalsed (Bullera).

Taksonoomilise tähtsusega füsioloogilistest ning kultuuritunnustest tuleb nimetada kiledede moodustamist vedel-sõõtmel, sahhariidide kääritamise ehk fermenteerimise ja assimileerimise võimet, nitraatide kasutamist ning karotenoidpigmentide esinemist. Lisaks neile pööravad süstemaatikud tähelepanu veel hapete moodustumisele eri sõõtmel,

vitamiinirõudlusele, rasvade degradeerimisele. Eriti tahaksime neist tunnustest esile tõsta siiski sahhariidide fermenteerimise võimet.

Pärmide suhtumine erinevatesse sahhariididesse on eril liikidel järsult erinev. Fermenteerimis- ehk kääritamise võime võib mõnede suhkru suhtes täielikult puududa, kunagi ei ole nende hulgas aga glükoosi (kui mingi pärm üldse avaldab kääritamise võimet, siis tingimata ka glükoosi suhtes). Tavaliselt fermenteerivad erinevad pärmid koos glükoosiga ka fruktoosi ning mannoosi (nn. Kluyveri reegel). Fermentatsioonitestides kasutatakse seepärast antud kolmikust enamasti ainult glükoosi, peale selle galaktoosi, sahharoosi, maltoosi ja laktoosi, mõnikord ka rafinoosi, melibioosi ning inuliini. Kääritamise võime üle otsustatakse eeskätt CO<sub>2</sub> evolutsiooni järgi pärast 1...2 päeva kestnud kultiveerimist. Seejuures arvestatakse, et galaktoosi, mõnikord ka maltoosi ning rafinoosi testeerimisel on vajalik kääritamise alguseks pikem aeg.

Kõrvuti fermenteerimisvõimega testeeritakse pärme ka sahhariidide ja muude süsinikühendite assimileerimise võime poolest. Kuigi tavaliselt kääritamise võimega kaasneb assimileerimisvõime, ei tohi neid kahte mõistet siiski ära segada, eriti on võimalikud juhtumid, et teatavat sahhariidid, alkoholi, orgaanilist hapet küll assimileeritakse (aerobioosis), kuid ei kääritata. Testühenditeks on peale eespool loetletud mono-, di- ja trisahhariidide veel alkoholidest etanool, glütserool, adonitool, pentoosidest ramnoos, ksüloos, disahhariididest tsellobioos jne. Täieliku pildi saamiseks soovivad Wickerham ja Burton kasutada kuni 38 erinevat ühendit.

Arvestades kõiki loetletud ja mõningaid muid tunnuseid, kujuneb pärmide süstemaatika Kreger-van Rij järgi järgmiseks.

## 1. Askosporogaensed pärmid (Cl. Ascomycetes)

### 1.1. Sugukond Saccharomycetaceae

Mütseel, artrospoorid, punguvad rakud ja pseu-

domütseel esinevad koos või eraldi. Konjugatsioon isogaamne või heterogaamne. Sage li esineb diploidne generatsioon. Dissimilatsiooniprotsessid üldiselt oksüdatiivsed, sageli aga ka fermentatsioonilised (käärimislikud).

#### 1.1.1. Alamsugukond Eremascoideae

Esineb ainult mütseel. Käärimine puudub. Esindav perekond - *Eremascus*.

#### 1.1.2. Alamsugukond Endomycetoideae

Mütseel ja (või) artrospoorid. Spoorid ümmargused, ovaalsed, neerukujulised, kübarataolised. Dissimilatsioon oksüdatiivne (aerobne CO<sub>2</sub> teke) ja käärimislik (anaerobne CO<sub>2</sub> ja etanooli teke).

Perekondi: *Endomyces* - esinevad mütseel ja artrospoorid. Spoorid tekivad heterogaamisel konjugatsioonil või partenogeneetiliselt, neli spoori askuses, sfäärilised kuni kübarakujulised.

Schizosaccharomyces - pole mütseeli ega gametangiume. Domineerivad artrospoorid. Konjugatsioon on isogaamne, Askuses 4...8 sfäärilist, ovaalset või neerukujulist spoori. Domineerivalt kääritajad.

#### 1.1.3. Alamsugukond Saccharomycetoideae

Punguvad rakud, juhuslikult pseudomütseel või mütseel. Spore askuses 1...4. Konjugatsioon hetero- või isogaamne või tekivad spoorid partenogeneetiliselt. Ainevahetus puhtoksüdatiivsest kuni puhtfermentatsiooniliseni.

##### 1.1.3.1. Triibus Endomycopseae

Mütseel ja punguvad rakud. Pungumine multilateraalne. Fermentatsioon puudub või on

nõrk. Ümmargused, ovaalsed või kübarakujulised spoorid tekivad 1...4 kaupa askustes partenogeneetiliselt või isogaamsel konjugatsioonil. Ainus perekond - Endomycopsis.

### 1.1.3.2. Triibus Saccharomyceteae

Punguvad rakud (multilateraalne pungumine), harva pseudomütseel (= mitmekordsel pungumisel tekkinud mütseelisarnane moodustis), mütseel puudub. Fermentatsioon esineb või puudub. Spoorid tekivad partenogeneesis, isogaamsel või heterogaamsel konjugatsioonil.

#### Perekond Saccharomyces

Punguvad ovaalsed, ümmargused ja silindrilised rakud, harva pseudomütseel. Spoorid tavaliselt ümmargused või ovaalsed, aga ka neerukujulised, oa- ja sirbitaalised, 1...4 askuses. Fermentatsioon peaaegu kõigil liikidel. Nitraate ei assimileeri.

#### Perekond Pichia

Punguvad rakud. Pseudomütseel on tavaline. Spoorid hemisfäärilised, kübarakujulised, angulaarsed või ümmargused, 1...4 askuses, tekivad nii partenogeneetiliselt kui ka iso- ja heterogaamsel konjugatsioonil. Sageli kujundavad kilesid. Oksüdatiivne dissimilatsioon, harva fermentatsiooniline. Nitraate ei assimileeri.

#### Perekond Hansenula

Punguvad rakud. Pseudomütseel on tavaline. Spoorid partenogeneetiliselt (või isogaamsel konjugatsioonist), kübarakujulised või saturnjad, 1...4 askuses. Kilede moodustumine on sage. Dissimilatsioon oksüdatiivne ja käärimislik. Nitraate assimileeritakse.

### Perekond Schwanniomyces

Punguvad ovaalsed rakud. Spoorid ümmargused, partenogeneetilised, näsaja pinnaga, võõrutud, 1...2 askuses. Esineb vaid käärimine. Nitraate ei assimileeri.

### Perekond Debaryomyces

Punguvad, ovaalsed kuni ümmargused rakud. Heterogaamne konjugatsioon. Spoorid ümmargused, enam-vähem näsajad, 1...2 askuses. Käärimine puudub või on nõrk. Nitraate ei assimileeri.

### Perekond Saccharomycopsis

Punguvad piklik-ovaalsed kuni silinderjad rakud. Spoorid ovaalsed, 1...3 askuses.

#### 1.1.3.3. Triibus Nadsoniæ

Bipolaarselt punguvad rakud, juhuslikult pseudomütseel. Fermentatsioon. Spoorid partenogeneetilised või heterogaamse konjugatsiooni tulemus.

### Perekond Saccharomycodes

Rakud sidrunikujulised. Vegetatiivne paljunemine - pungumise ja fissiooni kombinatsioon. Spoorid partenogeneetilised, ümmargused, 4 spoori askuses. Idanemisel spoorid konjugeeruvad. Dissimilatsioon nii oksüdatiivne kui ka käärimislik.

### Perekond Hanseniospora

Rakud sidrunikujulised, partenogeneetiliselt tekkivad spoorid kübarakujulised, saturday või ümmargused, 1...4 askuses.

### Perekond Nadsonia

Rakud muna- kuni sidrunikujulised, mille vegetatiivne paljunemine kujutab pungumise ja fissiooni kombinatsiooni. Heterogaamne

konjugatsioon. Spoorid ümmargused, näsaja pinnaga, pruunikad, 1...2 askuses.

## 2. Ballistosporogeensed pärmid (Cl. Basidiomycetes?)

### 2.1. Sugukond Sporobolomycetaceae

Mütseel, punguvad rakud ja pseudomütseel. Ballistosporid. Dissimilatsioon rangelt oksüdatiivne. Majanduslik-praktiline tähtsus väike. Perekonnad: Sporobolomyces, Bullera, Tilletiopsis, Itersonilia.

## 3. Asporogeensed pärmid (Cl. Fungi imperfecti)

### 3.1. Sugukond Cryptococcaceae

Punguvad rakud. Esineb pseudomütseel, aga ka mütseel. Võivad moodustuda artrospoorid (mütseeli lagunemisel tekivad üherakulised moodustised). Rakud on hüaliinsed, kunagi pole tumedad või pruunid, kuigi karotinoid-pigmendid esinevad. Dissimilatsioon kas rangelt oksüdatiivne või ka käärimislik.

#### 3.1.1. Alamsugukond Cryptococcoideae

Punguvad rakud, juhuslikult pseudomütseel ja mütseel. Käärimine mitmesugustes tugevusastmetes kuni täieliku kadumiseni.

#### Perekond Cryptococcus

Multilateraalne pungumine. Ei kohata pseudomütseeli ega mütseeli. Esineb kapsulaarseid rakke. Moodustuvad tärgklisesarnased ained. Käärimine puudub.

#### Perekond Torulopsis

Multilateraalne pungumine. Ei ole pseudomütseeli, mütseeli ega kapsulaarseid rakke. Tärgklisesarnaseid aineid ei moodustu. Tävaliselt esineb käärimine.



Perekond Pityrosporum

Polaarne pungumine. Ovaalsed või pudelikujulised rakud. Käärimist ei ole.

Perekond Brettanomyces

Multilateraalne pungumine. Primitiivne pseudomütseel. Ümmargused, ovaalsed või teravakaareliselt võlvunud rakud. Tugev hapete moodustumine. Käärimine.

Perekond Candida

Multilateraalne pungumine, pseudomütseel, harva ka mütseel. Käärimine esineb või puudub.

Perekond Kloeckera

Bipolaarne pungumine. Sidrunikujulised rakud. Fermentatsioon.

Perekond Trigonopsis

Multilateraalne või triangulaarne pungumine. Ovaalsed või triangulaarsed rakud. Käärimine puudub.

3.1.2. Alamsugukond Trichosporoideae

Punguvad rakud, pseudomütseel, mütseel ja artrospoorid. Juhuslik kääritaja. Perekond - Trichosporon.

3.1.3. Alamsugukond Rhodotoruloideae

Punguvad rakud, harva pseudomütseel. Karotenoidpigmentidest johtuv selgelt kollane kuni punane värvus. Käärimine puudub. Perekond - Rhodotorula.

b. Pärmide tsütoloogiast

Nagu pärmide klassifikatsioonis, nii ka tsütoloogias on arvamuste ja vaadete lahkuminekuid uurijate vahel. Eriti tugevasti erinevad arvamused tuuma ja kromosoomide küsimuses.

Pärmiraku tuum on väga väike (läbimõõt 0,5...1,5  $\mu$  m), samal ajal kui näit. *S. cerevisiae*' rakkude läbimõõt võib olla kuni 10  $\mu$  m. Peale selle on väga raske kindlaks teha pärmiraku tuuma struktuuri. Pärmide tsütoloogia edusammud on olnud väga aeglased esimestest põhilistest, sajandivahe- tusel toimunud uurijate (Janssen, Leblanc) töödest alates. Seepärast on üldpilt tänaseni üsna skemaatiline, kuigi tun- neme kõiki põhilisi pärmiraku struktuuri elemente.

Joon. 6 on toodud pärmiraku ehituse skeem Lindegreni (1952) järgi.

Pärmirakkudel on hästi välja kujunenud rakukest, mille siseküljele liibub õhuke tsütoplasma membraan ehk plasmolemm. Kest ise koosneb kahest molekulaarsest kihist, mis erinevad eelkõige glükaani või mannaani sisalduselt. Rakukesta koos- tises on valdaval kohal valgulised ja polüsahhariidsed (ka tselluloos) ained, nende kõrval ka lipiidid. Valk on see- juures tugevasti seotud arvukate disulfiidsildade abil po- lüsahhariidiga, eriti mannaaniga. Rakukesta keemiline koos- tis sõltub mõnevõrra ka rakkude kasvutingimustest.

Rakukesta ülesandeks on rakusisese osmootse rõhu säili- tamine, rakkude kaitsemine kahjustavate välistoimete eest, ainete neelamise ja eritamise regulatsioon ja kindla raku- kuju säilitamine.

Tsütoplasma membraan on eeskätt ainete valikulise nee- lamise ja osmootse barjääri ülesannetega. Keemiliselt on tegu väga kindla organisatsiooniga lipoproteiidse moodusti- sega, mille paksus on ligikaudu 8 nm. Küsimus ainete vali- kulisest neelamisest, eriti seoses aktiivse sissetungi meh- hanismidega, on kaasajal väga intensiivselt uuritav probleem. On selgunud, et tsütoplasma membraanil on otsustav osa aine- te sissetungi mehhanismides, milles esineb peale aktiivse, ensümaatilise ja energiat tarbiva neelamise veel difusiooni ja adsorptsiooniga seotud sisenemine.

Tsütoplasma ehk protoplasma on veekeskkonnas püsiv kol- loidsüsteem, mis noortes rakkudes on suhteliselt homogeenne. Rakkude vananedes ja kestade paksenedes ilmub protoplasmasse

mitmesuguseid varuainete terakesi ja õlitilku, ühtlasi ilmuvad vakuolid. Sellises seisus, eriti ebasoodsate elutingimuste puhul, võib rakk omandada erakordselt paksu ketta ja sömerja protoplasma - kujunevad nn. "Dauerzellen", mida võib resistentsuse mõttes võrrelda bakterisporidega (selliseid rakke nimetataksegi klamüdosporideks, s.o. tugevakattelisteks spoorideks).

Protoplasmas on lahustunult sahhariide, mineraalsooli, aminohappeid, ensüüme jm. aineid. Vakuoolidesse eritatakse tunduvald koguseid ainevahetuse jääkprodukte. Nagu taime-rakkudes on ka põrmides vakuoolidel vastavate reservuaaride ülesanne.

Protoplasma graanulitest tuleb eelkõige nimetada glükogeeni ja albuminoosgraanuleid ning rasva- (õli-) tilku, mis kõik on varuained. Eriti märkimisväärne on volutiini, s.o. metakromaatilise aine esinemine, mis iseloomustab ka seeni ning mõningaid bakterirakke. Tavaliselt paigutub volutiin tuumalähedases vakuoolis. Volutiin on organiseeritud nn. Babesch-Ernsti terakesteks, mis metüleensinisega värvuvad väga iseloomulikult punaseks. Tugeva värvumisvõime tõttu nimetatakse neid ka metakromaatilisteks terakesteks. Nende tõenäolist struktuuri kujutame joonisel 7. Nagu sellelt näeme, on tegu kompleksiga, mis koosneb RNA-st, valgust, lipoidist, polüfosfaadist ja milles olulisel kohal on magneesiumioonid, mis tõenäoliselt annavad helaatse seose.

Volutiin on nii vakuoolne reservaine kui ka tõenäoliselt kompleks, mis reguleerib pärmirakkude kasvu ja paljune-mist. Volutiini polüfosfaatkomponent võtab ATP kaudu nähtavasti osa raku energiahetusprotsessidest, nukleinkomponent on aga reserviks nukleinhapete ainevahetuses. Polüfosfaadid võivad kombineeruda ensüümvalkudega ja niiviisi muuta viimaste aktiivsust.

Muudest pärmiraku organellidest tuleb esile tõsta tuuma, millel on sfäärilise või lapiku põiekese kuju ja mida ümbritseb õrn tuumamembraan. Tuumas nähakse poolvedelat

massi, tuumakesta (koosneb RNP-st), tiheda koeksistentsiga karüosoomi (koosneb DNP-st). Tuumas leidub tuumaprotsessideks vajalikke ensüüme. Tuum pooldub domineerivalt mitootiliselt (näiteks *Sacch. cerevisiae*' rakutuumas on neli kromosoomi).

Valgusüntees toimub pärmirakkudes nagu muudeski elusrakkudes ribosoomides, energiavahetuse (eriti hingamise) põhilised protsessid kulgevad mitokondrites.

### c. Pärmide keemiline koostis

Pärmide keemiline koostis varieerub muidugi sõltuvas liigist, kasvutingimustest, kultuuri vanusest, kuid normis jääb see varieerumine siiski teatavatesse iseloomulikesse piiridesse. kui aluseks võtta tööstuses kasutatavate pärmide kompositsiooni keskmised näitajad, võiksime saada järgmise pildi: vett 68...83 % (vrđl. - baktereis 74...98 %, hallitusseentes 84...89 %), tuhaaineid 4...9 %. Keskmiseks kuivainesisalduseks võib pidada 30 % üldmassist. Sellest moodustab valk koos nukleinhapetega 52...60 %, lipiide on nullist kuni 1,5...1,7 %-ni, glükogeeni ligikaudu 30 %, mitmesuguseid muid varuaineid kuni 7 %. Märkimisväärne on pärmide suhteliselt kõrge RNA ja väike DNA sisaldus. Aminohapetest domineerivad pärmides monoaminomonokarboonhapped. TRÜ taimefüsioloogia ja -biokeemia kateedri uurimised näitavad, et nende aminohapete molaarne osa pärmivalgus tõuseb nii pagari- kui ka söödapärmis 45...55 %-ni, vabade aminohapete seas isegi 60...65 %-ni. Küllalt rohkesti on pärmi-valgus ka diaminohappeid (17...20 %). Eriti märkimisväärne on paljudes toiduainetes, resp. söötades defitsiitse lüsiini kindel esindatus (keskmiselt 5 % valgust). Üldse tuleb märkida, et pärmid sisaldavad vägagi heas proportsioonis kõiki asendamatuaid aminohappeid, mistõttu nad on väga väärtuslikuks toidu- või söödaliseks.

Pärmide toite- (sööda-) väärtust tõstab veel bioloogiliselt aktiivsete ainete, eriti paljude vitamiinide üsna

rikkalik sisaldus. Eriti märkimisväärne on nn. B-kompleksi vitamiinide (tiamiin, riboflaviin, nikotiinhape, püridoksiin, kobalamiin) sisaldus. Sellele lisandub ergosterooli (provitamiin-D) rikkalik sisaldus.

Pärmide vitamiinisaldust iseloomustab tabel 2, mille andmed on võetud A.A. Eddy (1959) tööst.

T a b e l 2

Vitamiinide sisaldus mõnedes pärmides ( $\mu\text{g/g}$ )

Pärme Vitamiin	Söödapärm Candida utilis	Pagaripärm Sacch.cere- visiae	Õllepärm Sacch.carlsber- gensis
Foolhape	4...31	15...80	3
Tiamiin	6...53	9...40	50...360
Riboflaviin	26...62	15...20	36...42
Pantoteenhape	86...180	180...330	100
Nikotiinhape	210...535	200...700	310...1000
Biotiin	1,1...1,9		
p-Aminoben- soaat	17...21	22...175	9...102
Püridoksiin	35	16...65	25...100
Inositol	3500		2700...5000
Koliin		2100	4800

Tuleb lisada, et pagaripärm on inimtoidus rikkaim tiamiini ja riboflaviini allikas üldse. Värskes (elusas) pärmis on need vitamiinid suurel määral valguga seotud. Pärmil kuivatamisel vitamiin vabaneb ja selle sisaldus tõuseb tabelis näidatuga võrreldes veel 2...3 korda.

Üsna palju on pärmides ka mineraalsooli. Mineraalelementide sisaldust iseloomustab Sacch. cerevisiae' tuhaanalüüs (tuhaaineid kuni 8,7 % kuivkaalust). Selle pärmil tuhas on 54,5 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 36,5 %  $\text{K}_2\text{O}$ , 5,2 %  $\text{MgO}$ , 1,4 %  $\text{CaO}$ , 1,2 %  $\text{SiO}_2$ , 0,7 %  $\text{Na}_2\text{O}$ , 0,5 %  $\text{SO}_3$ , jälgedena Cl, Fe ja paljusid mikroelemente.

Pärmid on ka mitmete ensüümide tööstusliku tootmise allikaks. Eriti mainigem sahharaasi ehk invertaasi ( $\beta$  - fruktofuranosidaasi), mida kasutatakse kompekki-, pagari- ja siirupitööstuses.

Normaalselt moodustavad pärmid ka lipiide, see produktioon pole aga küllalt püsiva loomusega tööstusliku tootmise tarbeks. Kasutatavaks on ses suhtes siiski osutunud *Endomycopsis vernalis* ja *Geotrichum* sp.

#### d. Pärmide ökoloogiast

Käesoleva peatüki algul märkisime juba pärmide väga laia levikut. Üldiselt leidub looduses pärme kõikjal, kus on suhkrut. Nii leidub pärme inimesele määratud toiduaineis, lilleõite nektaris, puudest väljunud mahlas, mullas, taimelahudedel, sümbiontide ja parasitidena loomades, eriti putukais. Eelkõige esinevad pärmid aga puuviljadel ja marjadel.

Kerkib küsimus pärmide päritolust. Miks nad esinevad alati puuviljadel? Kus on nende põhiline reservuaar? Puuviljad selleks ei ole. Juba Pasteur tõestas, et küpsemata puuviljadel pärme veel ei leidu. Kui sellised puuviljad enne küpsemist katta pärmide ligipääsu takistava kattega, siis puuviljad jäävadki pärmivabaks.

Hansen, möödunud sajandi lõpukümnendi suur autoriteet pärmseente alal, arvas, et pärmide nagu bakteritegi põhireservuaariks on muld. Tema arvates esinevad pärmid talvel ja kevadel mullas peamiselt spooridena, mida suvel tuul koos tolmuga laiali kannab. Hansen osutas, et viinamägede mullas leidub pärme palju rohkem kui mujal.

Käesoleva sajandi 30-ndail aastail läbiviidud täpsed uurimised (Starkey, Henrici) näitasid, et mullas on siiski pärme vähe. 87-st uuritud mullanäidisest leiti pärme ainult 38-s. Leitud pärmidest ei kuulunud aga ükski nende hulka, mis kutsuvad esile puuvilja- ja marjamahlade spontaanset käärimist.

Henrici juhib tähelepanu faktile, et väga sageli esineb pärme putukatel ja putukate seedetraktis. Henrici oletab, et putukad ehk ongi peamised pärmi kandjad puuviljadele. Eriti Diptera-liikide seedetrakt osutub normaalseks elupaigaks paljudele pärmidele, kaasa arvatud Sacch. ellipsoideus.

Kindlaks on tehtud ka see fakt, et pärmid moodustavad olulise osa puuviljakärbse *Drosophila* dieedis. Mõnes putukas tungivad pärmid seedetraktist kehaõnde, kus elavad sümbiotidena, mida antakse putuka munade kaudu edasi ka järglas põlvkonnale. Mõnedes tsikaadides esinevad pärmid koguni spetsiaalse koemassina, mis morfoloogiliselt tuletab meelde näärme kudet (pseudovitellus). Enamasti on siin tegu perekonna *Schizosaccharomyces* liikidega.

Lillede nektaris esineb perekonna *Nectaromyces* jt. liike. Vähemalt 15 pärmiliiki on kirjeldatud lilleõite alatiste asukatena. Nendest tuleneb ka mee käärimine, eriti liikidest *Zygosaccharomyces*, mis paistavad silma osmofiilsusega (kannatavad eriti kõrgeid suhkrukohtsentratsioone).

Inimese ja loomade seedetraktis esineb samuti alatist pärme. Enamik on aga transitoorsed ega paljune loomorganismis. Samal ajal ei allu neist enamik ka seedemahla de toimele (pagaripärmi aga inimene seedib).

#### e. Pärmide toitevajadused

Nagu muudki organismid, vajavad ka pärmid kohaseid toiteaineid varustumiseks C, N, H, O, P, S, Mg jt. elementidega.

Suhkrud, orgaanilised happed, aldehüüdid ja glütserool on üldiselt ~~C-allikatena~~ kasutatavad, kuid seejuures esineb tunduvalt erinevusi eri pärml liikide (ja ka -tüvede) võimes kasutada seda või teist süsinikuallikat. Eristada tuleb ka võimet kasutada teatavat ühendit energia-allikana ja konstitutiivse süsiniku allikana. Ülevaate mõnede olu-

lisemate ühendite ja pärvide osas annavad selles küsimuses tabelid 3 ja 4, mis on laenatud E.O. Morriselt (1964) ja A.E. Wiles'ilt (1953).

Proteiinide degradatsiooniproduktid (proteosid, peptoonid, peptiidid, aminohapped, urea, amiidid) on enamasti hästi kasutatavad N-allikatena. Enamik pärme kasutab edukalt ka ammoniaaki ja ammooniumsooli (sulfaati, fosfaati, kloriidi), mida sageli antakse kunstlikes söötmetes ja mida tavaliselt kasutatakse ka pagaripärmi tootmisel. Nitraatlämmastikku pärmid üldiselt kas ei omasta üldse või omastavad raskesti. Parimaks lämmastikuallikaks on üldjuhul ikkagi orgaaniline lämmastik, eriti aminohapete lämmastik.

Nagu teada, on lämmastik oluline protoplasma konstituent (kuulub valkudesse, nukleinhapetesse, mõnedesse lipoididesse jm.). Hapnik ja vesinik on vajalikud nii protoplasma ehitamisel kui ka mitmesuguste muude elufunktsioonide

T a b e l 3

Mõnede pärvide voime fermenteerida ja assimileerida eri sahhariide

P ä r m	S a h h a r i i d i d									
	Glükoos		Galaktoos		Sahharoos		Maltoos		Laktoos	
	Ferm.	Ass.	Ferm.	Ass.	Ferm.	Ass.	Ferm.	Ass.	Ferm.	Ass.
Debarom.vini	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Cand.lipolytica	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cand.pulcherrima	+	+	±	±	-	+	-	+	-	-
Crypt.laurentii	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Hans.anomala	+	+	±	±	±	+	+	+	-	-
Kloeck.africana	+	+	-	-	-	±	-	+	-	-
Sacch.cerevisiae	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Torul.ernobii	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Torul.sphaerica	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+



täitmisel. Fosfor, mida pärmid nagu kõik teisedki organis-  
mid omastavad fosfaatidena, täidab väga olulist osa aineva-  
hetuses. Fosfor esineb paljude elutähtsate ainete ja ühen-  
dite koosseisus (fosfatidid, nukleinhapped, nukleosiid-  
polüfosfaadid, nukleotiidkoensüümid jt.), mineraalsel fos-  
foril on suur osa täita raku reaktiivsuse üldises tõusus,  
energiavahetuses ja metaboliitide aktiveerimises. Nagu muu-  
deski organismides, esineb fosfor ka pärmirakkudes ainult  
ortofosfaatvormis (ka pürofosfaat, mis esineb näiteks ATP-s,  
on vaadeldav kahe ortofosfaadi liitena).

Väävel esineb enamiku valkude koosseisus. Oluline on  
selle elemendi osa veel glutatiooni sisaldavates redoks-en-  
süümsüsteemides. Obligatoorse komponendina kuulub väävel  
ka sellistesse koensüümidesse nagu tiamiinpürofosfaat ja  
koensüüm - A.

Magneesium võtab osa tervest reast katalüütilistest  
protsessidest. Selle elemendi ioonidel on oluline osa pal-  
jude ensüümvalkude seostamisel koensüümidega, mistõttu  $Mg^{++}$   
manulus on vältimatu näiteks glükoosi fosforüülimisel.

Raud kuulub paljude oksüdüreduktaaside, eeskätt tsüto-  
kroomide koosseisu. Tööstuslikus tootmises tuntakse rauda  
kui pärmimassi säilivusfaktorit, millises funktsioonis näh-  
tuse mehhanism on seni ebaselge. Ebaselge on paljude muu-  
degi elementide täpne funktsioon, mida pärmid siiski nõua-  
vad toitekeskkonnas edukaks kasvuks.

Juba 1901.a. tegi Wildiers kindlaks, et pärmid ei kasva  
edukalt sünteetilises söötmes, mis näiliselt sisaldab kõiki  
vajalikke toiteelemente kättesaadavas vormis. Kasv osutus  
võimalikuks, kui sünteetilisse söötmesse lisati pärmiekstrak-  
ti või vana pärmikultuuri supernatanti. Wildiers oletas,  
et sellega viidi söötmesse ainet, mis on kasvuks hädavajalik,  
mille loomust ta aga ei tundnud ja millele ta seepärast an-  
dis summaarse nimetuse "bios". Alles paari aastakümne pä-  
rast selgus, et bios on ainete kompleks, millest osa on va-  
jalik mitte ainult pärmidele, vaid ka kõrgematele loomadele.  
Vähemalt kuus faktorit biose faktorite üldarvust on tuvasta-

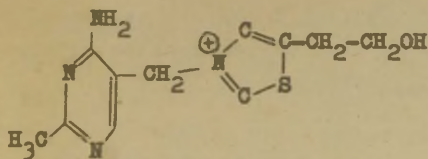
Pärmide võime assimileerida süsinikku erinevatest  
ühenditest

Pärm	Candida guillier- mondii	Hansenula anomala	Rhodoto- rula mu- cilagi- nosa	Saccha- romyces carls- bergen- sis	Saccha- romyces cerevi- siae	Torulop- sis fa- mata	Torulop- sis stel- lata	
Ühend	1	2	3	4	5	6	7	8
Arabinoos	+	-	+	-	-	+	+	
Tsellobioos	+	+	+	-	-	+	-	
Sidrunhape	+	+	+	-	-	+	-	
Dekstriin	V	+	-	-	-	+	-	
Etanool	+	+	+	+	+	+	-	
Galaktoos	+	+	+	+	+	+	-	
Glütserool	+	+	+	+	+	+	+	
Inuliin	+	+	+	+	+	+	+	
Piimhape	+	+	+	+	+	+	+	
Laktoos	-	-	-	-	-	-	-	
Maltoos	+	+	+	+	+	+	-	
Mannitool	+	+	+	V	V	+	+	
Rafinoos	+	V	+	+	+	+	-	
Ramnoos	-	-	+	+	-	-	-	

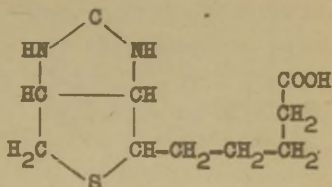
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sorbitool		V	+	+	V	V	+	-
Sorboos		+	-	+	-	-	+	+
Merevaikhape		+	+	+	V	V	+	-
Sahharoos		+	+	+	+	+	+	+
Tärklis		-	+	-	-	-	-	-
Trehaloos		+	+	+	+	+	+	+
Ksüloos		+	+	+	V	-	+	-
$\alpha$ -metüül-glükosiid		+	+	-	+	+	+	-
K-glükonaat		+	+	+	V	-	-	-
5-ketoglükoonhape		+	-	-	-	-	+	-

- = ei assimileeri, + = assimileerib, V = varieeruv assimileerimisvõime tüvede järgi.

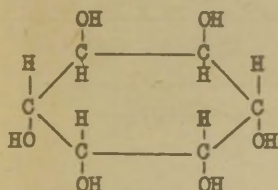
tud kui vitamiinid. Need on tiamiin, biotiin, inositol, nikotiinhape või selle amiid, pantoteenhape ja püridoksiin.



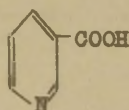
Tiamiin



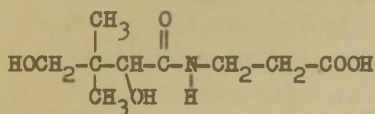
Biotiin



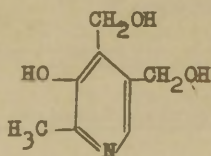
i-Inositol



Nikotiinhape



Pantoteenhape



Püridoksiin

Tegelikult on pärmide vajadus "bioses" esindatud vitamiinide järele erinev, nagu selgub ka tabelis 5 toodud andmetest. Eriti tuleb märkida, et vajadus tiamiini järele piirdub nn. stardikogustega - kord kasvama hakanud pärmikultuur sünteesib seda ise niivõrd intensiivselt, et pärmid, nagu märgitud, on rikkalikemaks tiamiini allikaks inimesele (pärmikultuure kasutatakse ka tiamiini-preparaatide tootmiseks). Praktikas katavad suured inokulumid (nendega viiak-

se kaasa tunduvad kogused vitamiine) kultuuri stardivajadused vitamiinide suhtes.

Lähtudes vajadusest selle või teise vitamiini osas, rikastatakse pärmimassi tööstuslikul tootmisel melass-söötmeid obligatoorselt biotiiniga (kaalulises kontsentratsioonis  $29 \cdot 10^{-8}$ ), sageli ka pantoteenhappega ( $50 \cdot 10^{-6}$ ) ja mõnikord inositoliga ( $115 \cdot 10^{-5}$ ).

T a b e l 5

Sacch. cerevisiae' vitamiinivajadused  
sünteesilisel söötmel

Vitamiin, mille poolest meedium on defitsiitne	Vajaduse tüüp
Inositol	Adaptiivne
Pantotenaat	Adaptiivne
<u>Biotiin</u>	Absoluutne
Tiamiin	Osaline
Püridoksiin	Puudub
Nikotiinhape	Puudub
p-Aminobensoehape	Puudub

f. Pasteuri efekt. Crabtree efekt

Urides Sacch. cerevisiae' elutegevust, avastas L. Pasteur (1876) a., et aeroobsed tingimused, s.o. õhuhapniku vaba ligipääs kultuurile, pidurdavad käärimisprotsessi ja vähendavad paljukordselt etanooli teket. Seda õhuhapniku juurdepääsust johtuvat pidurdust tuntakse kaasajal Pasteuri efekti nime all. Aerobioosis lähevad pärmid teatava mõõdetava ajavahemiku kestel käärimiselt üle hingamisele. Viimane on energeetiliselt palju kasulikum protsess kui käärimine.

Teatavasti mõistame käärimise all suhkru- ja mõnede lämmastikühendite anaeroobset lagundamist produktideni, mida

ei saa edasi lagundada molekulaarse hapniku osavõtuta. Käärimine on seda esilekutsuvatele organismidele energiaallikaks keskkondades, kus puudub vaba õhuhapnik, ja on seega anaerobioosi eelduseks. Nimelt võime läbi viia käärimist annabki pärmidele võimaluse elada ka anaerobioosis - tegu on fakultatiivselt aerobsete mikroobidega, kes võivad toimida nii õhuhapniku manulusel kui ka selleta.

Et käärimine kulgeb ainult küllalt liitsete, suhteliselt suure vaba energia sisaldusega produktideni (pärmide puhul peamiselt etanool ja  $\text{CO}_2$ , selle kõrval aga ka vähe- mais hulkades rida muid produkte, (vaata joonist 2 lk. 239), siis on käärimise energeetiline efektiivsus palju ma-  
dalam kui hingamisel, mille käigus lagundamine kulgeb ener-  
giavaeste lõpp-produktideni ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Ühe mooli glükoosi  
(180 g) lagundamise arvel vabaneb hingamisel energiat  
686,5 kcal. Sellest 226 kcal ehk 39 % salvestatakse kasu-  
liku (elutegevuses kasutatava) keemilise energiana. Sama  
koguse glükoosi käärimisel vabaneb ainult 56 kcal, millest  
kasulikult salvestatakse 14 kcal ehk ümmarguselt vaid 2 %  
glükoosi vaba energia üldisest varust. Nii pole lugu ai-  
nult pärmide käärimisprotsessides, vaid mistahes käärimis-  
tes, sest käärimise energeetiline efektiivsus sõltub üsna  
vähe käärimistüübist, s.o. sellest, millised produktid  
protsessis tekivad (tuletage meelde käärimise käsitlust  
biokeemiakursuses).

Vastavalt pärmirakkudel kasutada olevatele energiako-  
gustele kujuneb ka üldine elutegevuse - intensiivsuste suhe  
aerobioosis ja anaerobioosis. Intensiivselt õhustatavates  
(läbipuhutatavates) kultuurides on pärmide kasv ja paljunemi-  
ne mitukümmed korda intensiivsemad kui anaerobioosis.  
Käärimisprotsesside pidurdumine hapniku toimel kindlustab  
seejuures energeetilise materjali (suhkru) võimalikult öko-  
noomse ja samal ajal efektiivse kulutamise.

Arvestades ülalöeldut on selge, et Pasteuri efekti ni-  
me all tuntud nähtus on sisuliselt bioloogilise eneseregu-  
latsiooni väljenduseks. See nähtus on organismile kasulik-

energiat saab seetõttu paremini ja suhkrut kulutatakse suhteliselt vähem. Inimese tootmispraktika seisukohalt tähendab see, et mingi võetud suhkruhulga arvel saab aeroobioosis sama aja jooksul suurema rakumassi hulga kui anaerobioosis. Seepärast õhustatakse pärmikultuure intensiivselt kõigil neil juhtudel, kus eesmärgiks on rakumassi tootmine (pagari- ja söödapärm). Vastupidi, käärimistööstuses, kus eesmärgiks on etanooli kogunemine käärimiskeskkonda, loetakse anaeroobsed tingimused.

Õhuhapniku toimele töötavad vastu kõrged suhkrud (eriti glükoosi) kontsentratsioonid toitekeskkonnas, mis viivad pärmisuhkrute kääritamisele, vähendavad hingamisintensiivsust ja madaldavad biomassi tootmist. Seda nähtust tuntakse Crabtree efekti nimega, millest sõltuvalt antakse pagari- ja söödapärmistööstuses keskkonda suhkruid vaid kontsentratsiooniga 1...1,5 %, tavaliselt 1,2 %, tööstusetanooli tootmisel on aga suhkrute kontsentratsioon toitekeskkonnas 10...12,5 %.

Crabtree efekti on suhteliselt lihtsam mõista - enamik suhkruid loob keskkonnas redutseerivad tingimused, mis takistavad oksüdatsiooniprotsesside intensiivset kulgu - Pasteuri efekti suhtes aga puudub senini täiesti rahuldav mehhanismi seletus. Püstitatud hüpoteese vaatleme lähemalt energiavahetuse kursuses. Olulisimad neist on järgmised.

1. Pasteuri efekt on pigem näivus kui tõsiasi - asi seisab käärimisproduktide edasises lõplikus oksüdeerimises, neid jääb keskkonda seetõttu vähem, millest tekibki mulje nõrgenenud käärimisprotsessist.

2. Konkurents ortofosfaadi ja ADP pärast glükolüüsi ja terminaalset oksüdeerimist tsükli (eriti Krebsi tsükli) vahel, millega kaasneb konkurents NAD-i pärast. Seda hüpoteesi toetab tugevasti fakt, et "lahutajad" (näiteks DNF), mis takistavad ATP sünteesi oksüdatiivsel teel ja jätavad vabaks ADP ning P<sub>i</sub>, kustutavad tunduvalt Pasteuri efekti.

3. Aeroobioosis kasutatakse 3-fosfoglutseeraldehüüdi oksüdeerimisel saadud NADH ära elektronide doonorina hingamishela tarvis, seda ei piisa enam metaboliitide taandamiseks käärimisel.

Eksisteerib veel rida hüpoteese, ükski ei suuda aga kõigekülgselt seletada Pasteuri efekti mehhanismi.

### Käärimistööstuses kasutatavad pärmid

Enamik tööstusliku tähtsusega pärme kuulub perekonda Saccharomyces. Selle perekonna piirides eristatakse tööstuses veini-, õlle- ja pagari pärme, kuigi süstemaatikud pole üksmeel selles jaotuse suhtes.

Mis puutub veinipärmidesse, siis möödunud sajandi lõpul eraldati need omaette liigiks nimega Sacch. ellipsoideus (Hansen) või Sacch. vini muntz (Kayser). Kaasajal kaldutakse veinipärmis nägema siiski vaid Sacch. cerevisiae' teisendit ja süstemaatilistes nimestikes ning kataloogides näidatakse põhilisel kohal nimetus Sacch. cerevisiae' var. ellipsoideus (Mráz, Tesarčik, Vařejka, 1963).

Taani botaanik E. Chr. Hansen oli esimene, kes uuris käärimistööstuses kasutatavaid pärme. Temalt pärineb vastavate pärmide jaotus pinna- ja põhjapärmideks. Põhjapärmid on mõnevõrra aeglasema kääritamisenenergiaga kui pinna-pärmid. Sellega seoses moodustub nende pärmide tegevuses vähema intensiivsusega süsihappegaasi ja pärmirakud kalduvad käärivast vedelikust anuma põhja sadestuma. Põhjapärmide poolt esilekutsutava käärimisprotsessi optimaaltemperatuur on piirides +5...+10° (kasvu optimaaltemperatuur on mõnevõrra kõrgem ja asub +25° piirkonnas). Biokeemiliselt on põhjapärmid kergesti eristatavad võime järgi täielikult fermenteerida trisahhariid rafinoosi.

#### Melibioos

Rafinoos = Galaktoos - Glükoos - Fruktoos  
Sahharoos

See tähendab, et põhjapärmid evivad nii melibiaasi kui ka saharaasi ( $\beta$ -fruktofuranosidaasi), s.o. mõlemat ensüümi, mis on vajalikud rafinoosi molekuli täielikuks hüdrolüüsiks.



Pinnapärmid on väga energilised kääritajad. Käärimise intensiivseimas faasis tekib seetõttu nii palju CO<sub>2</sub>, et see tekitab yahu ja toob pärmirakud kaasa vedeliku pinnale. Need pärmid kalduvad ka varastel perioodidel mitte sadenema (jaotuvad vedelikus suhteliselt ühtlaselt). Gaasiteke on varajane. Kääritamise optimaaltemperatuur on piirides +15...+20°. Pinnapärmid ei evi melibtaasi (sahharaasi nad moodustavad), mispärast suudavad kääritada vaid 1/3 rafinoosi, nimelt vabastavad fruktoosi, mis vabaneb hüdroolüüsil sahharaasi toimel.

Hansen nimetas pinnapärmid praegu üldtuntud nimega Saccharomyces cerevisiae. Põhjapärme ta kindla liigina ei käsitanud - koondas vastavad pärmid rühma Saccharomyces Carlsberg N<sup>o</sup> 1. Alles hiljem omistati rühmale liigi staatus nimega Saccharomyces carlsbergensis. Peab aga märkima, et pinna- ja põhjapärmide eristamine eraldi liikidena ei ole absoluutne, sest tuntakse ka Sacch. cerevisiae' põhjakäärimisega tüvesid, mida kasutatakse näiteks Ameerika Ühendriikides üsna laialdaselt. Mõnedki süstemaatikud ei tunnusta Sacch. carlsbergensis't iseseisva liigina.

Eri tööstusharud kasutavad tootmiseesmärkidest sõltuvalt kas pinna- või põhjapärme. Pagaripärmid, destillatsiooni ja veinipärmid on pinnapärmid, sest kõigil neil juhtudel on nõutav kõrge kääritamisenenergia (leiva-saiaküpsetus nõuab näiteks eriti intensiivset CO<sub>2</sub> ja etanooli teket, et toode kerkiks hästi, saaks kvaliteetne). Maksimaalset etanooli kogumisvõimet nõuab muidugi tööstuspiirituse tootmine pärmide abil ja ka veinitööstus vajab tavaliselt etanoolitekke aktiivset protsessi. Arenenud tööstuses kasutatakse kindlate omadustega produktide saamiseks nn. kultuurpärmide puhastüvesid (s.o. valiku ja aretamise teel saadud stabiilsete omadustega pärme).

Põhjapärme kasutab peamiselt õlletööstus - enamik ameerika, tšehhi, saksa ja vene õllesid saadakse põhjapärmide abil. Erandiks on Inglismaal ja Ameerikas levinud eriline õlu - eil (ale), mis saadakse pinnakäärimisega.

Tööstuses kasutatakse sageli terminit Sacch. cerevisiae kõigi pruulimispärmide kohta, sõltumata sellest, kas tegu on pinna- või põhjapärmidega.

Alkoholitööstuses kasutatavatele pärmidele esitatakse terve rida kindlaid nõudeid. Nagu märkisime, kasutatakse kindlateks eesmärkideks kindlaid tüvesid.

Kõrge küpsetuskvaliteet, kõrge saagikus odava tooraine arvel, kõrge vitamiinisisaldus - need on nõuded, mida esitame pagaripärmile. Kerge selgitumine, meeldiv lõhn - need on nõutavad omadused veinitööstuses. Veinipärmide valitud tüved on niivõrd olulised veini kvaliteedi määramisel, et vanadel kuulsatel rassidel on oma tööstuslikud nimed, mis antakse enamasti päritolukohtade järgi (Bordeaux, Champagne, Mosel jt.). Kaasajal peetakse tööstuses kõikjal obligatoorseks puhaskultuuride tarvitamist.

Õlletööstuses on olulisim pärmi võime läbi viia käärimist linnasevirdes. Kääritamisaktiivsust mõõdetakse 00, millilitrites, mida 1 g pärmi eraldab tunni aja jooksul teatavast standardsest sünteetilisest meediumist 20° juures. Kui määramist tehakse eluspärmi lõmmastiku peale arvutatuna, nimetatakse saadavat näitajat kääritamisefektiivsuseks. Thorne (1958) mõõtis seda rohkem kui 400 pärmitüve juures ja tuli mõnevõrra ootamatule tulemusele: summaarselt on põhjapärmide kääritamisvõime palju kõrgem kui pinnapärmide oma, vaatamata sellele et viimased kutsuvad teatava lühikese perioodi kestel esile väga tormilise protsessi. Selgus ka see, et põhjapärmide rühm on palju homogeensemate omadustega.

Õlletööstuses täheldatakse mõnikord siiski pärmi kääritamisvõime langust ("pärmi nõrgenemist"). Sageli on see tingitud esialgse puhaskultuuri saastumisest, harvem muteerumisest. 1958.a. näitas Lindgren, et seda ebasoovitavat langust võib põhjustada ka pärmi nakatumine viirusega ("sümofaagiga").

Õllepruulijatele on oluline ka see, et pärm protsessi lõppedes eralduks õllest - sadestuks või tõuseks pinnale. Sellist eraldumist nimetatakse flokulatsiooniks. Esineb

pärme, mis flokuleeruvad varakult (saksa keeles Bruchhefen) - need annavad kerge õlle. Vastupidi, raskesti flokuleeruvad pärmid (saksa keeles Staubhefen) annavad erakordselt kõrge alkoholisisalduse. Mõnedes riikides (näiteks Austraalias) toodetakse nende abil kuni 12 %-lise etanoolisisaldusega õlut.

Tuleb märkida, et flokuleeruvad pärmid kalduvad kergesti muteeruma.

Muudel kõnealusesse perekonda kuuluvatel liikidel peale Sacch. cerevisiae' ja Sacch. carlsbergensis'e on väiksem praktiline tähtsus. Sageli on need soovimatud kontaminandid (saastajad) esimeste juures ja annavad alkoholitööstuse produktidele halva lõhna ning rikuvad maitset. Nii toimib õlles näiteks Sacch. pastorianus.

Fermenteerimis- ehk kääritamissaadused on peale veini ja õlle ka keefir ning kumõss. Siin on kummalgi juhul tegu kompleksse protsessiga, mis kulgeb vastavalt kas lehma- või määripiimas. Tavaliselt siin puhaskultuure ei kasutata, "juuretises" esinevad nii bakterid kui pärmid. Esimesed annavad happe, teised alkoholi. Enamik pärme laktoosi ei fermenteeri, seepärast sõltub nende tegevus piimas baktereid, kes lagundavad laktoosi glükoosi ja galaktoosini. Sacch. fragilis aga evib laktaasi koos sümaasikompleksiga ja võib alkoholikäärimist esile kutsuda ka laktoosi baasil. See pärm kuulub põhjapärmide hulka, kuid melibioosi ei fermenteeri. Käärinud piimast valmistatud preparaadis leitakse mikroobis veel asporogeenseid pärme Cryptococcus kefir ja C. sphaerica.

1930-ndate aastate algul väljatöötatud pärmide klassifikatsioonis eristas Stelling-Dekker perekonnas Saccharomyces alam perekonna Zygosaccharomyces. Kaasajal sellist taksonoomilist eristamist ei tunnustata (tegu on lihtsalt erinevusega pärmide diploidse ja haploidse kasvuvormi vahel), ometi tuleb märkida, et regulaarse konjugatsiooniga haploidsete tüvede seas on majanduslikult olulisi tüvesid (üldiselt moodustuvad Sacch. spoorid pärast viljastust saadud diploid-

rakkudest, "Zygosach!" moodustavad spoore vahetult pärast haploidrakkude konjugatsiooni). Terve rida "Zygosacch." tüvesid peab vastu väga kõrgele suhkrukontsentratsioonile. Siit nende võime esile kutsuda mee riknemist. Need tüved vajavad keskkonnas aktiivseks elutegevuseks vähemalt 32% list suhkrusisaldust - tegu on tõeliste osmofiilsete vormidega. Koos sellega võivad taolised tüved esile kutsuda etanoolkäärimist veinivirdes, mis on valmistatud väga kõrge suhkrusisaldusega ülevalminud viinamarjadest. Sellist käärimist kasutatakse Reini-äärsetel viinamägedel, kus kuivadel soojadel sügistel saadakse ülevalminud (edelreif) viinamarju suhkrusisaldusega 30-60%. Saadakse erilised "rasked" valikreinveinid - "rheinische Ausleseweine".

Alkoholitööstuse praktika kohtab - kuigi küll pigem negatiivses mõttes - ka Pichia' liike. Need moodustavad käärivate vedelikkude pinnal kilesid (Pichia' liikidel ja tüvedel on tendents jääda pärast pungumist üksteise külge kinnitunuks). Nende ainevahetust iseloomustab pigem oksüdatiivsus - moodustavad vähe alkohole, rohkem estreid, happed jt. aineid, mille kogunemine kutsub normaalse käärimise hilisstaadiumides esile jookide riknemist. Mõningaid Pichia' tüvesid kasutatakse siiski teadlikult teatud veinidele (šerri) karakterse lõhna andmiseks. Antud pärmid on tavalised marinaadide soolvees ning muudes toidu- ja söödamat-  
jalides (näiteks silos), mille happesus on pärit bakteritelt.

### 3. Veinitööstus

Veini "ametlik" definitsioon on järgmine: vein on ter-  
vete küpsete viinamarjade mahla alkoholkäärimise (etanool-  
käärimise) produkt. Siiski, nagu teame, nimetatakse tava-  
kohaselt veinideks ka muudest marjadest või puuviljadest  
saadud alkoholseid jooke, kuigi nad rangelt võttes ei ole  
veinid. Inglismaal ja USA-s ei nimetatagi õunamahla kääri-  
misel saadavat alkoholset jooki veiniks (wine), vaid eri  
nimega cider. Käesolevas tehnoloogia-ülevaates käsitleme  
veine selle nimetuse ranges tähenduses. Viinamarjaveine  
toodetakse kaasajal aastas maailma ulatuses kokku umbes  
18...20 miljonit liitrit. Umbes kolmandiku sellest anna-  
vad Prantsusmaa ja Alžeeria, teise kolmandiku Itaalia, His-  
paania ja USA, kolmanda kolmandiku kõik ülejäänud veini  
tootvad maad kokku.

#### a. Veinitootmise tehnoloogia

Hea veini saab vaid täiesti kvaliteetsetest viinamar-  
jadest ja ka siis ainult kindlate valmistamisvõtete ja  
-meetodite kasutamisel. Vein on väga õrn jook ja nõuab al-  
gusest peale hoolikat kohtlemist. Teatavate veinisortide  
iseloomulik lõhn sõltub sageli kindlast kasvukohast, nagu  
sõltub kasvukoha määratlematuist mikrokliimatilistest,  
mullastikulistest jm. tingimustest teatud maakohtades toode-  
tava veini spetsiifika üldse. Seda kasvukoha mõju ei saa  
asendada mingite muude võtetega ja see tingibki, et Euroopa  
parimad veinid saadakse Reinimaadel, mõnes Prantsusmaa  
paikkonnas ja Ungaris. Veini kvaliteet sõltub suuresti ka  
viinamarjade lõikusaastast, selle ilmastiku spetsiifikast,  
päikese aktiivsusest jm. teguritest. Üldiselt on levinud  
eksiarvamus, nagu oleksid vanad veinid head sellepärast, et

nad on vanad. Tegelikult ei tarvitse vanad veinid paremad olla kui hilisemad - kogu asi sõltub veinitootmiseks kasutatud viinamarjade lõikusaastast. Head veiniaastad on kaua kuulsad, heade aastate veini säilitatakse suure lugupidamisega, tootjad märgivad pudelitele tingimata lõikusaasta (asjatundjad oskavad üksnes aasta järgi ütelda, millise kvaliteediga vein on) - siit ka arvamus vanade veinide kui selliste erilisest headusest. Faktiliselt vajab vein valmimiseks kindla aja, mis koos järelvalmimisega võib tõepoolest nõuda mõnegi aasta, kuid liiga kaua säilitatava veini kvaliteet paratamatult langeb.

Margiveinide valmistamiseks kasutatakse ainult valitud viinamarju. Need purustatakse ilma marjavarsi eemaldamata ning töödeldakse metsikute pärmide hävitamiseks või vähemalt pärssimiseks kaalium-metadisulfitiga ( $K_2S_2O_5$ ), naatriumvesiniksulfitiga ( $NaHSO_3$ ) või vääveldioksiidiga ( $SO_2$ ). Selle menetlusega vabanetakse ühtlasi bakteritest ja hallitusseentest.

Mitu tundi pärast metsikute pärmide hävitamist lisatakse purustatud marjamassile juuretist ehk starterit, milleks on Sacch. cerevisiae' var. ellipsoideus' valitud tüvede ettekasvatatud kultuurid. Starterit antakse 2...5 % purustatud viinamarjade mahust. Lähtekultuuri söötteks on sageli samadest marjadest saadud käärimata mahl, muidugi steriliiserituna. Inokuleerimist alustatakse väikesest mahlakogusest, selles kultuuri arenemisel viiakse see edasi suuremasse kogusesse jne., kuni on käes vajalik juuretisekogus.

Küpsetes viinamarjades on üldreeglina kõiki pärmidele vajalikke toitaineid. Need sisaldavad 15...25 % suhkruid (peamiselt glükoosi), aminohapete lämmastikku (üldiselt vähe, kuid pärmidele piisavalt), mineraalaineid, vitamiine. Viinamarjamahla happesus tuleneb peamiselt õunhapest, mõnevõrra ka viin- ja sidrunhapest, mis kindlustavad pH piirides 3,0...3,6, s.o. sellise happesuse, mis lubab areneda happetolerantsetel pärmidel, mitte aga bakteritel. Optimaalseks suhkruisisalduseks loetakse veinivirdes 22° Ballingu

järgi. Kõrgem suhkrusisaldus võimaldab käärimisel saada küll isegi üle 13 % ulatuvat etanooli kontsentratsiooni (etanooli konts. väljendatakse tavakohaselt mahuprotsentides), kuid samal ajal see inhibeerib käärimist ja suur osa suhkrut jääbki kääritamata. Mis puutub pärmide tundlikkusesse alkoholi suhtes, siis sõltub see temperatuurist. Mida kõrgem on keskkonna temperatuur, seda tundlikumad on pärmid etanooli suhtes. Teisalt sõltub resistentsus ka tüve? füsioloogilis-kultuurilistest omadustest. Veini tootmisel reguleeritakse mahla suhkrusisaldust kas vee või suhkrul lisamisega. Kasutatakse ka erineva suhkrusisaldusega mahlakoguste segamist.

Algul aereeritakse inokuleeritud purustatud viinamarjamassi segamisega - hapnik on vajalik käärimist toimetavate pärmseente esialgseks kiireks kasvuka.

Käärimise käigus moodustub segu pinnale marjakestadest, seemnetest jmt. küllaltki paks "kübar" (inglise keeles cap). Sellesse on gaasivahetuse võimaldamiseks vaja teha auke või siis pumbata käärimismahuti (vannid, tankid, aamid) põhjast mahla üle selle gaasivahetust takistava kihi.

Peakäärimise kestel hoitakse temperatuur  $+20...+24^{\circ}$  piires. Kui temperatuuril lasta tõusta üle selle, saab ebakvaliteetse veini, sest kõrge temperatuuri tingimuses etanool pärssib pärmi elutegevuse ja veinis algab soovimatu bakteriaalne tegevus.

3...5 päeva kestnud peakäärimise järel on tegu juba noore veiniga. See viiakse nüüd suletavasse tankidesse ja lastakse vedelikul edasi käärida, hoolitsedes tekkiva CO<sub>2</sub> väljapääsuvõimaluse eest. Vähene hapniku juurdepääs on vajalik orgaaniliste hapete tekkeks - need annavad alkoholidega estreid, mis on komponentideks veinibuketis. Siin lastakse käärimisel kulgeda, kuni vedelikku jääb ettenähtud suhkrukontsentratsioon (selle määr sõltub veinisordist, s.o. tootja kavatsustest). Tavaliselt kulub selleks 7...11 päeva temperatuuril  $+21...+29^{\circ}$ , kuid sõltuvalt sordist võib peakäärimine selles astmes nõuda ka nädalaid.

Järgnevalt viiakse värske vein säilitussamidesse, mis eelistatavalt on tammepuust, vähemväärtuslike sortide puhul uemal ajal ka metallist, kusjuures metallaamide sisepind pigistatakse. Eriti väärtuslike veinisortide puhul kasutatakse punasest puust aame. Aamid asuvad keldris suhteliselt madalal temperatuuril ( $+10^{\circ}$ ). Seal toimub veini laagerdumine ehk järeلكäärimine. Selle protsessi korralikuks toimumiseks täidetakse aamid ääreni ja suletakse hermeetiliselt, et vältida õhuhapniku juurdepääsu ja et hoida veinis pidevalt  $\text{CO}_2$  teatavat ülerõhku, mis annab protsessidele soovitava aeglase tempo ega võimalda produkti riknemist. Perioodiliselt villitakse laagerdatavat veini pärmi pealt ära, et ühtlasi vein eraldada sadestuvast tahkest materjalist, samuti põhjapärmist. Veini laagerdumine, s.o. järeلكäärimine võib nõuda aastaid, enne kui veini hakatakse pudelitesse villima ja turule saatma. Uemal ajal kasutatakse mõnel puhul (näiteks NSVL-i veinitööstuses) mitmesuguseid valmistamiseks kiirendavaid võtteid ja saadakse vein kätte isegi mõne kuuga, kuid need sordid ei saa võistelda aeglase tehnoloogiaga saadud kallite sortidega. Aeglane protsess madalas temperatuuris väldib ka ainete lendumist, mis peavad veinile andma iseloomuliku aroomi. Sellisteks aineteks on juba lähtematerjalist veinisse sattuvad eeterlikud õlid, samuti hiljem tekkivad estrid, lenduvad happed ja muud ained, mis annavad sordile omase ainulaadse lõhna, nn. veinibuketi, ja maitse.

Järeلكäärimise ajal vein selgineb - vedelikus olnud hõljum sadestub aamide seintele. Aamide seintele sadestuvad ka viinhappe soolad nn. viinakivina. Viinamarjadest pärit parkhapped ühinevad valkudega ja annavad lahustumatu sadeneva ühendi. Sadestumise kiirendamiseks lisatakse veinivedelikku mõnikord želatiini, veiseverd, munavalget või muid sadestajaid. Valgete veinide puhul eelistatakse bentoniiti või kalaliimi. Harva kasutatakse filtreerimist. Nagu öeldud, sadestub ka viinhape (dihüdrosüümerevaikhape,  $\text{HOOC-CHOH-CHOH-COOH}$  enamasti kaalium- või kaltsiumsoolana). Seda soodus-



tab etanooli leidumine keskkonnas. Viinamarjades leidub viinhapet 0,7...0,8 %. Viinhappesooladest tuleb veinitööstuse aame aeg-ajalt puhastada. Sellest sademest toodetakse kondiitritööstuses tarvitatavat viinhapet. (Toimides viinakivisse mineraalhapetega, eraldub vaba viinhape). Viinhappesoolad ehk tartraadid on kasutusel ka laboratooriumis. Eriti tuntud on selles mõttes kaksiksool K-Na-tartraat ehk Seignette'i sool.

Värvilt eristatakse valgeid ja punaseid veine. Valged veinid valmistatakse valgetest või kollastest viinamarjadest, kusjuures käärimise ajal mahl eraldatakse marjajääkidest. Punaste veinide valmistamisel (nn. mustadest viinamarjadest, s.o. tegelikult punastest ja sinistest viinamarjadest) jäetakse marjakestad ja varrekesed käärivasse massi. Käärimise keskkonnatingimustes (puudulik aeratsioon, etanool) kestarakud surevad ja kaotavad võime kinni hoida rakusiseseid pigmente. Need väljuvad vedelikku.

Käärimisel tõusevad kestad jm. tahke materjal virde pinnale, kus moodustub "kübar". Punaste veinide valmistamisel seda, nagu öeldud, ei eemaldata, vaid surutakse korduvalt alla käärivasse vedelikku. "Kübara" hooldamine on veinivalmistamisel küllaltki tähtis toiming. Kui sellel lasta kuivada, siis saastub vein väga kergesti atsetifitseerivate organismidega ja rikneb.

Väärrib märkimist, et valgeid veine saab ka "mustadest" viinamarjadest, kui "kübar" eemaldada.

Kirjeldatud menetlust kasutatakse enamiku lauaveinide ehk vins ordinaires tootmiseks. Need valmivad umbes aastaga. Teatavad veinisordid nõuavad aga lõpliku kvaliteedi saamiseks pikemaegset säilitamist. See kehtib nimelt punaste veinide kohta, mis võivad mitme aasta jooksul omadustelt paremaks muutuda. Nende muutuste biokeemiast teame väga vähe. Valged veinid vaevalt parenevad pikemaajasel säilitamisel.

Veinisordid erinevad alkoholisalduse poolest. Toodetakse mõneprotsendilisi kergeid veine ja ka veine, mis

sisaldavad maksimaalse võimaliku hulga alkoholi. Kõrgeim etanooli kontsentratsioon, mida võidakse saada pärmseente kasutamisel, on 14...15 %.

## b. Veinidefektid ehk veinivead

Üldiselt takistab soovimatute mikroobide arengut veinis esialgne töötlemine SO<sub>2</sub>-ga (viinamarjadel leidub looduslikult pärme, hallitusseeni ja baktereid). Hiljem on pärssivaks faktoriks juba akumulatuuriv etanool, bakteritele ebasobiv madal pH jne. Kuivades veinides takistab mikroobide kasvu ka liiga madal suhkrusisaldus. Ometi võib mõnikord tekkida mikroobseid veinivigu. Vead ise on tuntud niisama kaua, kui vana on veinitegemine, kuid alles 1877.a. avastas Pasteur nende mikroobse päritolu.

Anaeroobsetest saastajatest on olulisimad Propionibacterium sp., Lactobacillus hilgardii ja teised liigid, samuti perekonna Leuconostoc esindajad. Need põhjustavad piimhappe ja mõne muu orgaanilise happe teket, kutsuvad esile halva lõhna, mannitooli ja limade tekke, veini hägustumise. Mõnikord muudavad need mikroobid ka veini värvi.

Aeroobsetest mikroobidest, kes kutsuvad veinirikkeid esile õhu juurdepääsul, on olulisimad Acetobacter'i liigid ja Mycoderma vini (tekitab kilesid, nn. veini õitsemist). Need lagundavad ekstraktiivaineid, etanooli, A. aceti ja A. oxydans aga kutsuvad esile atsetifikatsiooni, s.o. veiniäädikhappe tekke.

Veinivigu võivad esile kutsuda ka metsikud pärmid, mis annavad ebastabiilse karakteriga ja rikunud buketiga veini. Infektsioossed pärmid võivad ilmuda ka veel pudelitesse villitud veinis. Eriti ohtlik on kõrgelt alkoholitolerantne Sacch. oviformis, selle kõrval on ohtlikud aga ka Brettanomyces sp. sp., anaerobioosis Pichia sp. sp.. Pudeleisese villitud veini kahjustab Sacch. acidifaciens (Zygosacch. acidifaciens).

Veinidefekte võib tekkida ka metallide, soolade, ensüü-

mide ja selitusvahendite ebaõige kasutamise tagajärjel.

### c. Veinide klassifikatsioon ja põhisortide iseloomustus

Veine võib klassifitseerida mitmesugustelt alustelt lähtudes. Jaotusega valgeteks ja punasteks veinideks oleme juba tutvunud.

Teine põhiline jaotus lähtub alkoholisisaldusest. Kuni 14 % etanoolisisaldusega veine nimetatakse kergeteks veinideks. Neid võib nimetada ka naturaalveinideks, sest kogu etanool neis on pärit veini käärimisprotsessist. Üle osutatud kontsentratsiooni võib etanoolisisaldust tõsta vaid piirituse, brändi v.m. kangete alkoholilahuste lisamise teel. Siis saadakse kanged ehk tugevdatud veinid.

Toodud jaotus naturaalseks ja tugevdatud veinideks langeb osalt kokku jaotusega, mis lähtub veini suhkrusisaldusest, s.o. kääritamismäärast ja jääksuhkru hulgast. Kui veinis on lastud praktiliselt kogu suhkur ära käärida, saadakse kuiv vein ehk lauavein. Need on kerged veinid, milles veidi suhkrut on säilinud, kuigi nii vähe, et maitsest seda ei tunne. Esineb ka kanget kuiva veini - see on tugevdatud tavaliselt konjakiga. Kui veinis käärimine peatatakse enne suhkru täielikku kääritamist, saadakse magus vein, milles suhkur on maitsest tabatav. Toodetakse ka kuiva ja magusa veini vaheastmetele vastavaid veine (poolkuivad või poolmagusad veinid). Naturaalse magusa veini tootmine, eriti aga riknemiseta säilitamine on veinitööstuse suurimaid kunste. Veinivalmistamine vajab üldse piinlikku puhtust ja hoolikust, naturaalse magusa veini tootmine nõuab seda aga kahekordselt. Magusaid reinveine näiteks villitakse ainult vabrikust tulnud steriliseeritud pudelitesse. Teistkordselt neid pudeleid enam ei kasutata. Enamasti kaubastatakse tugevdatud magusaid veine, mida on palju kergem hoida ja säilitada. Nende tugevdamine toimub peamiselt etüülpiiritusega. Etanoolisisaldus viiakse 18...20 %-ni.

Vahuveinid ehk ligrisveinid on veinid, milles käärimine

toimub hermeetiliselt suletud pudelais. Saadakse erakordselt selge ja süsihappegaasiga küllastatud värskendav vein. Inglise keeles nimetataksegi iigrisveine väga tabavalt "sparkling wines" - sädelevad ehk kobrutavad veinid. Olemasolevail andmeil lelutati iigrisveihide tootmine XVII sajandi lõpul benediktiinlaste kloostri Hautvillers'is Reimsi lähedal. Kaasajal on parimini tuntud iigrisvein šampanja, mis on nime saanud Prantsuse maakonna Champagne'i nime järgi (meil ka šampuseks nimetatud).

Iigrisveini valmistamisel lisatakse enne pudelisse villimist lõpuni käärimata veinile veidi valmisveini või siirupit. Algab nn. sekundaarne käärimine, mis kulgeb spetsiaalse pärmitüve toimel. Originaalse meetodi järgi (tänapäevalgi laialdaselt tarvitatav) viiakse sekundaarne käärimine läbi erilise kujuga paksuseinalistes pudelites, mis võivad taluda rõhku kuni 6,5 atm. Uuemal ajal on püütud kallist pudelise-käärimist asendada protsessiga erilistes suletud tankides.

Tugevdatud veinid on tuntud põhiliselt hõrgutuseks sobivate dessertveinidena. Võib arvata, et tugevdamine kui võte tekkis eeskätt mikroobse kontaminatsiooniga ja veiniviigadega võitlemiseks, kaasajal on tugevdatud veinid omandanud lõunalaul aga iseseisva koha kui söögiisu tõstjad.

Mikrobioloogiliselt huvitavaim tugevdatud vein on šerri. Seda toodetakse Hispaanias ühes Çadiz'i provintsi maakonnas. Veini nimi tuleb maakonnalinnast Jerez'ist. Šerri valmistatakse erilise väikesest magusast palomino-viinamarjast. Enne purustamist marjad kuivatatakse päikeses. Saadavat mahla töödeldakse happesuse tõstmiseks kipsiga ("plaasterdusprotsess"). Järgneb spontaanse algupäraga käärimine, mis kestab kuni 3 kuud. Selle järel villitakse vein pärmilt ära vaatidesse, mis erilistes veinihoidlates (solera'tes) on paigutatud astanguliselt üksteise otsa ja on omavahel niivisi ühendatud, et vein pääseb ülemisest valguma alumisse. Kõige alumisse vaati jõudmine võtab 5...6 aastat aega. Kaks korda aastas võetakse kõige alumisest vaadist veini välja.

Kogu aeg on vaadid täidetud umbes 3/4 mahu ulatuses. Veini vabal pinnal on vaadides kile erelistest pinnakasvuga pärmi-dest, mis annavadki šerrile selle erilise kvaliteedi. Veini lisamisel ja võtmisel välditakse kile vigastamist. Pudeleisse villimisel vein selitatakse munavalgega ja filtreeritakse. Lõpuks lisatakse teatavas koguses magusat veini, mis on valmistatud viinamarjadest "Pedro Ximenes", ning värvimiseks viinamarjamahlast aurutatud siirupit. Vein tugevdatakse brändiga, segatakse ja villitakse pudelisse.

Pindprotsessi, mis annab šerrile iseloomulikud omadused, nimetatakse flor-protsessiks. Vastavat pärmi tuntakse Saccharomyces beticus'e nime all (beticus tuleneb ladinakeelsest Andalusia nimest Baetica). See pärm tekitab suhteliselt palju atseetaldehüüdi ja atsetaali, šerri iseloomu määravad aga ka selle pärmi autolüüsiproduktid.

Portvein pärineb Põhja-Portugalist Ülem-Douro orust. Seda tüüpi veini valmistatakse tänapäeval kõigis veini tootvais mais. Õige portvein on tugevdatud brändiga ja magustatud jerepiga-nimelise ekstraktiga. Portveine kaubastatakse nii segatuna kui ka aastakäik-veinina.

Madeira pärineb samanimeliselt saarelt. Seda iseloomustab nn. estufado-süsteem laagerdamisel (astmeline protsess, umbes nagu šerri puhul). Veini tugevdatakse suhkruroo-piiritusega käärimise ajal ja pärast seda. Madeirat laagerdatakse mitmeid kuid kuumas ruumis. Selles protsessis vein tumeneb ja omandab kerge karamelli-lõhna.

Vermut on seguvein, milles on üle 15 % etanooli. Iseloomulik lõhn ja maitse saadakse taimse päritoluga aroomaatsete ainete, puhta viinamarjaveini, vodka või etüülpiirituse lisamisega. Tuntakse magusat itaalia ja kuiva prantsuse tüüpi vermutit.

Peale loetletute tuntakse tugevdatud veinide sorte (andželika, marsala, malaaga jt.), mida meil pole põhjust käsitleda, sest mikrobioloogiliselt ei paku need midagi uut.

#### 4. Destilleeritud alkoholitooted

Kui käärinud jooke destilleerida, siis destillaati läheb mitte ainult etanool, vaid suurelt osalt destilleeruvad üle ka maitset ja lõhna andvad lenduvad ained (alkoholid, happed, aldehüüdid jne.). Paljud sellistest destillaatidest on üldlevinud alkohoolseid joogid, millel on kõrge (30...70 %, isegi kuni 80 %) alkoholisisaldus, iseloomulik maitse ja mis on praktiliselt täiesti kindlad mikrobioloogilise riknemise suhtes. Selliste jookide tootmine on tõenäoliselt Aafrika algupäraga ja toodi Euroopasse ristisõdijate poolt XII-XIII sajandil. Neid kangeid jooke hakati kohati nimetama "eluveeks" (aqua vitae), milline nimetus on tänapäevani säilinud selliste jookide nimedes nagu viski ja akvaviit.

Vanimaid ja kuulsamaid destillaate on šoti viski, mille sünnimaaks on õigupoolest Iiri saar. Esimene ametlik teade viskitootmisest on pärit aastast 1494. Tüüpiline šoti viski on kahe destillaadi - linnaseviski ja teriseviski (malt whisky, grain whisky) segu. Seega on viski käärinud linnase- või terisemeski alkoholdestillaat. Kumbagi viskit toodetakse ka eraldi. Linnaseviskit toodetakse eranditult odralinnastest, teriseviskit aga peale odra ka maisist. Peale algupärase šoti viski tuntakse tänapäeval ka nn. burboonviskit. Seda valmistatakse peale odra ka rukkist ja rukkilinnastest. Viski meski käärimisel on otsustaval kohal Sacch. cerevisiae' mitmesugused tüved, meskit inokuleeritakse aga ka piimhappebakteritega. Viski tehnoloogia, alates juba meski valmistamisest ja käärimisest, on üsna keeruline protsess. Valmis viski sisaldab umbes 50 % etanooli. Iseloomulik lõhn ja maitse on pärit kõrvalaineist, mis teki-

vad produkti hoidmisel spetsiaalsetes vaatides - eelistatakse vanu šerrivaate või seest söestatud tammevaate. Viski valmistamine nõuab 7...8 aastat. Peale etanooli sisaldab jook mitmesuguseid happeid, estreid, aldehüüde, furfurooli, ölisid, ekstraktiivaineid. Põhilised happed viskis on äädik- ja palderjanhape, mis annavadki estreid.

2 Vodka on destillaat, mis on Ida-Euroopast hakanud üle maailma levima. Valmistatakse nii käärinud teravilja- kui ka kartulimeskist. Maitse annavad destilleerunud lisaained. Erilist valmimis- või säilitusrežiimi ei ole. Kangu- 30...60 %.

1 Rumm on etanooli sisaldav destillaat suhkruroo käärinud mahlast, suhkruroo siirupist, melassist jm. suhkruroo poolfabrikaatidest. Värvitu destillaat paigutatakse kolmeks või enamaks aastaks spetsiaalsetesse vaatidesse, millest jook omandab värvuse, osalt ka lõhna. Laagerdumisel lisatakse vaati söestatud tammeputükke. Rummi etanooli- sisaldus on 60 % või kõrgem. Talle on omane karakteenne maitse ja meeldiv aroom.

u Brändi on destillaat või destillaatide segu käärinud puuvilja- ja marjameskidest. Mõnikord käsitatakse "tõelise" brändina ainult viinamarjabrändit. Viinamarjabrändidest kuulsaim on konjak, mille nimi tuleb Prantsuse maa- konna Cognac nimest (rahvusvaheliste reeglite kohaselt tohib konjakiks nimetada ainult Cognac'ist pärit jooki). Nagu viski puhul on ka konjaki tehnoloogia peen ja keeruline protsess, mida me siinkohal lähemalt ei vaatle. Konjaki omadused kujunevad laagerdumisel tammevaatides. Etiketil näidatud tärnid tähistavad laagerdumisaastaid. Kõrgeima sordi konjakil tärne pole - laagerdumine kestab vähemalt 15 aastat. Produkt kaubastatakse 40...60 % kangu-

ses.  
*brandy*  
Peale konjaki on laialt tuntud brändid ka kirsch (cherry brandy) ning slivovitš (ploomi brändi).

5 Džinni valmistatakse käärinud maisi- või rukkimeskist, mida destilleeritakse üle kadakamarjade (kahekordne destil-

leerimine, esimesse destillaati lisatakse kadakamarju ja muid "botanikaale", millele järgneb teatava aja järel teistkordne destilleerimine). Džinn on algupäraselt hollandi jook, kuid nimi tuleb itaaliakeelsest kadaka nimest ginevra. Kaubastatakse 40 %-lisena.

Lõpuks nimetame selliseid alkoholi jooke nagu nastoidkad ja liköörid. Esimesed valmivad sel teel, et puhaatatud piiritusel, brändil, džinnil või mõnel muul alkoholisel destillaadil lastakse seista puuviljadel, õitel, taimedel, mis annavad joogile maitse ja lõhna. Liköörid on piiritusejoogid, millele on lisatud puuviljamahla, siirupit, looduslikke aromaatsaid aineid jne. koos vähemalt 2,5 % suhkru- või dekstroosilisandiga.

## 5. Õ l l e t ö ö s t u s

Õllepruulimiseks nimetatakse keerulist jookide valmistamise protsessi, mis lähtub idanenud teraviljaseemnetest ehk linnastest saadud ekstraktist ja kasutab pärmide kääritamisenergiat. Õllepruulimisel konverteeritakse osa linnasesuhkrut süsihappegaasiks ja etanooliks.

Olemasolevad andmed lubavad arvata, et õlu leiutati Vana-Egiptuses. Õlletootmise tehnoloogia on mitmeti keerulisem kui veinootmise oma. Protsessi lõpp-produkt õlu on nõrk alkohoolne jook, milles tavaliselt on 4...5 mahuprotsenti etanooli. Ometi valmistatakse ka 7...8 % etanoolisisaldusega kangeid õllesorte, Austraalias ka 11...12 % kangusega õlut. Õlletel on spetsiifiline maitse ja lõhn. Valmistamise lähtematerjaliks on enamasti oder, harvem nisu. Üldiselt peetakse paremateks õlletradeks väiksema valgusisaldusega (9...12 %) odrasorte, kuid tõe- näoliselt ei saa seda reeglit pidada absoluutseks.



## a. Öllepruulimise tehnoloogia

Kogu öllepruulimise protsessi võib jaotada neljaks astmeks: 1 - linnaste valmistamine, 2 - meski valmistamine, 3 - kääritamine ja 4 - lõppmenetlused.

*nafta* linnaste valmistamine algab ölleodra valikuga. Et saada head õlut, tuleb kasutada ainult hästi kasvanud, terveid odrateriseid, (seemneid), millel on kõrge idanemisenergia, kusjuures idanemine peab olema mitte ainult kiire, vaid ka ühtlane.

Sorteeritud ja lisandeist puhastatud odraseemned leotatakse suurtes anumates, tingimata hea õhustatuse juures. Leotamine tõstab seemnetes veesisalduse idanemiseks vajalikule tasemele. Kui õhukivades odrateristes niiskus on umbes 13 % piires, siis leotamisega viiakse see näitaja kuni 44...48 %-ni. Tavaliselt kulub selleks 45...60 tundi, sõltuvalt leotamistemperatuurist (normiks peetakse 10...15°). Järgnevalt asetatakse leotatud seemned hästi õhustatava ruumi põrandale suhteliselt õhukese kihina idanema. (Uuemal ajal idandatakse ka pöörlevais horisontaaltrumlis, mida õhustatakse läbipuhumisega.) Idanemise ajal ei tohi odraseemnete veesisaldus oluliselt muutuda. Kuivamise vältimiseks tuleb idanevaid seemneid regulaarselt kasta. Seemneid lastakse idaneda kuni kindla faasini. Sobiva faasi tunnuseks on see, et idand ja idujuur on pikkuselt võrdsed seemne pikkusega. Selleks kulub mõni päev 20...25° juures.

Idandamise primaarne ülesanne on ensüümide-amülaaside produktsioon (amülaase on vaja teriste tärglise vedeldamiseks ja saharifitseerimiseks s.o. tärglise hüdrolüüsiks).

Mõutud faasini jõudnud linnased kuivatatakse. Kuivatamistemperatuurist sõltub hilisem ekstraktiivainete koostis ja hulk, seepärast varieeritakse seda vastavuses sordiga. Idandid ja idujuured eraldatakse seemnetest. Sellisel puhastatud linnased purustatakse jämeda jahvatusega.

See loob edasiselt paremad tingimused tärglisse hüdrolii-  
siks.

Meski ehk virde valmistamisel on eesmärgiks 2...3  
nädalat laagerdatud, siia purustatud linnaste ja lisandi-  
te lahustamine ning digestioon. Solvatsioonikeskkonnaks  
on vesi. Mitte igasugune vesi ei anna hiljem head õlut.  
Kasutatav on vesi, milles esineb  $MgSO_4$ ,  $CaSO_4$  ja mille  
püsiv karedus on 200...3000 osa/miljonile, arvutades ka-  
redust  $CaCO_3$ -ühikuis. Pehme vesi on kasutatav siiski mõ-  
nede heledate laagriõlledede valmistamisel. Virde valmista-  
miseks võetud vesi mõjutab hiljem õlle filtreeruvust, sel-  
ginemist ja säilivust. Tuntakse kunstlikku vee kareduse  
tõstmist ehk bõrtoniseerimist (Inglise asula Burton-on-  
Trent nime järgi).

Et vähendada valgusisaldust valmistatavas õlles, li-  
satakse virdesse mitmesuguseid sadestuvaid aineid, aga ka  
teravilju (riisi, nisu), milles esineb proteolüütilisi  
ensüüme.

Meski temperatuur reguleeritakse algul umbes  $+40^\circ$   
juurde. Edasiselt seda järk-järgult tõstetakse meetodist  
ja valmistatavast õllesordist sõltuvalt kuni  $+60^\circ$  või  $+70^\circ$   
(Eesti NSV-s ka  $65...75^\circ$ ). Kõrgem temperatuur soodustab  
tärglisse dekstriniseerumist, madalamal temperatuuril toi-  
mub aga intensiivsemalt sahharifitseerimine ja valkude la-  
gundamine. Temperatuuri mõju suhkrute ja dekstriinide  
suhtelisse sisaldusse iseloomustab alltoodud tabel 6.

T a b e l 6

Temperatuuri mõju suhkrute ja dekstriinide  
suhtelisse sisaldusse virdes

Temperatuur	Suhe suhkrud/dekstriinid
64	1 / 0,37
66	1 / 0,40
68	1 / 0,48
70	1 / 0,52
72	1 / 0,57

Nn. tärglisse vedeldamine toimuks kõige kiiremini temperatuuril 70...75°, suhkrustamine aga 65° juures. Millist temperatuuri pidada optimaalseks? See sõltub virde pH-st, kontsentratsioonist ja muudest faktoritest. Paljud andmed osutavad, et virde optimaalne pH asub 5,0...5,2 vahel, mis on parim tegevustsoon  $\beta$ -amülaasile ja proteaasidele. Maltoos kujuneb mõnede teiste andmete järgi parimini siiski pH 5,5 juures, mis on ühtlasi soodsaim ka filtreeruvuse mõttes. Silmas tuleb pidada seda, et humalaist ekstraheeruvad nõrkade hapete loomusega mõrumaitselised ained (tanniinid jt.) edukamalt veelgi kõrgema pH (5,8) juures. Tihhti algul reguleeritaksegi virde happesus sellele tasemele ja lastakse järk-järgult protsessi kestel langeda.

Hilisesmas käärimisprotsessis alluvad pärmseente toimeme ainult suhkrud, eelkõige maltoos. Dekstriine pärmseened ei lagunda. Need on aga vajalikud ölle maitseomaduste ja värvuse kujundamisel.

Saadud virre eelkõige filtreeritakse spetsiaalsetes sõelpõhjaga anumates. Filtreerima asutakse siis, kui teraviljajääk ja valgud on sadenenud ning sademe kohale jääb selge, läbipaistev "merevaik-meski". Filtriiks ongi seejuures purustatud linnasejääkidest kiht, mis langeb põhja. Mida peenemalt linnased purustati, seda täielikum on virdes tärglisse hüdrolüüs ja seda aeglasem on filtreerumine. Väga jämedal purustamisel saadakse küll suhteliselt kiire filtreerumine, kuid tärglisse hüdrolüüs aeglustub. Järelikult tuleb oskuslikult valida sobiv purustusaste, mis lubaks küllaldase intensiivsusega kulgeda nii hüdrolüüsil kui ka filtratsioonil. Meie õlletööstustes peetakse üldiselt optimaalseks sellist linnaste jahvatamist, et saadud massis jää fraktsioon moodustaks 25...30 %, keskmist oleks üle 50 % ja peenfraktsiooni (jahu) oleks umbes 20...25 %.

Virdefiltraadi suhkrusisaldus saadakse keskmiselt 12 %. Sadestunud jäägid (õlleraba) ekstraheeritakse (leotatakse) mitu korda kuuma veega (tavaliselt 75° juures). Seda protsessi nimetatakse spaarginguks. Järelejäänud rabamass an-

takse loomasöödaks. Filtraati ennast ja spaarging-vedelike keedetakse järgnevalt koos vaskkatlais (sinna pumbatakse need suurtööstuses torustike kaudu) juba humalalisandiga. Humalaid viiakse virdefiltraati 0,2...0,34 kg iga 100 liitri kohta. Keetmisel ekstraheeruvad tanniinid (keetmine kestab kuni kaks tundi) reageerivad valkudega, millega moodustuvad sadestuva kompleksi. Valkudest vabanemine on oluline nii õlle maitse kui ka säilivuse seisukohalt. Humalate ekstraktiivainad, mille seas märgataval kohal on eeterlikud õlid (0,3...1,0 % toorkaalust), annavad peale selle õllele iseloomuliku mörkja maitse ja toimivad antibakteriaalselt, s.o. evivad konserveerivat toimet. Eriti märkimisväärne on ses suhtes iseloomulik eeterlik õli - lupuliin. Virde keetmine omakorda koaguleerib valkusiid, hävitab ensüümid ja karamelliseerib osa suhkrut. Nüüd meski ehk virre jahutatakse ja filtreeritakse uuesti. Seega on ta valmis inokuleerimiseks pärmiga ja astumiseks kääritamisfaasi.

Õlle kääritamisel kasutatakse tavaliselt põhjapärmide valitud tüvesid. Siis saadakse õlu sõna otseses mõttes. Selle kõrval pruulitakse anglo-ameerika maades ka erilist heledat õlut - eili (ale), mille kääritamisel kasutatakse pinnapäarme.

Käärimine toimub suurtes aamides. Vajalik on seejuures konstantne temperatuur. Et käärimine on eksotermiline protsess, siis on käärimise kestel vajalik nimetatud aamide (fermenterite ehk reaktorite) jahutamine, mis toimub mitmesuguste seadmete abil. Õlle (beer) käärimisel hoitakse vedeliku temperatuur 5...14° piires, eili käärimis-  
sel 13...22° piires.

Õöpäeva jooksul kääritavad pärmid ära keskmiselt 1,5 % suhkrut. Peakäärimine, mis ei või kesta üle 10 päeva, viib vedeliku suhkrusisalduse 10...12 %-lt 0,15... 0,2 %-ni. Sellel tasemel peakäärimine lõpeb iseseisvalt. Saadakse nn. toorõlu. Põhikäärimisel suureneb käärimisvedeliku happesus märgatavalt - protsessi lõpul on vedeli-

ku pH tavaliselt 4,4...4,5 piires. Nüüd jäetakse toorõlu rahulikult seisama, et sadeneks pärmid ja igasugune muu heljum. Järgnev järelkäärimine toimub kinnistes vaatides. See on suhteliselt aeglane protsess - olenevalt õllesordist nõuab aega 2 nädalast mitme kuuni.

Tõppomenetlused (finishing) seisnevad küpse õlle rikastamises süsihappegaasiga ehk karboniseerimises. Õlu küllastub  $CO_2$ -ga järelkäärimisel, vahel juhitakse õllesse rõhu all süsihappegaasi ka väljast. Tuntud on ka krauseniseerimine (krausening), mis seisneb selles, et järelkääri-vasse õllesse lisatakse enne hermeetilistesse tankidesse viimist mahult 15 % värsket, intensiivselt käärivat õlut. Krauseniseerimiseks kulub 3...4 nädalat, mille järel õlut lastakse veel 3...8 nädalat seista.  $CO_2$  annab õllevahu ja õllele endale värskendava maitse. Nüüd filtreeritakse õlut veel kord (seadmetes, mis ei lase  $CO_2$ -l kaduda). Lõpp-produkt kaubastatakse sobivates vaatides või pudelites. Pudeleis õlut tavaliselt pastöriseeritakse 20 minutit 63° juures

Kokkuvõetult kujutame õlletootmise tööstuslikku käiku skemaatilisel joonisel 8.

Nagu eespool märkisime, on õllevalmistamise pärmeenid põhjapärnid. Kaasaegses õlletööstuses kasutatakse ainult kultuurpärmes. Looduslikes tingimustes on need eluvõimetus. Tähelepanuväärne on nende pärmide teatav "psührofiilsus" - nad on kohastunud eluks mõnevõrra madalatemperatuuridel kui muud mesofiilsed mikroobid. Tööstuse seisukohalt on sellel asjaolul küllaltki suur tähtsus - peakäärimist saab läbi viia sellisel suhteliselt madalal temperatuuril, mis oluliselt vähendab kontaminatsioonivõimalusi ebasoovitavate bakteritega.

#### b. Õlle koosseis

Õlle koosseisu kuulub rida sahhariide - glükoos, maltoos, dekstriin, muid vähemal määral. Reeglipäraselt esineb õlles ka selliseid valgu derivaate nagu peptoonid,

aminohapped, amiidid. Osa suhkruid muutub käärimise käigus etanooliks ja süsihappegaasiks, vähemal määral glütserooliks, äädikhappeks, merevaikhappeks. Osa aminohappeid muutub kõrgemaiks alkoholideks. Õlles esineb mineraaloolasid ja jälgi lipiididest. Humalatest lisandub eeterlikke õlisid, tanniine, vaigutaolisi kibedaid aineid (osa neist protsessi kestel eemaldub). 85...92 % on õlles vett.

Õlle koostis kõigub mitte ainult eri maades, vaid ka sama maa, isegi sama tehase piirides sõltuvalt toorainest, antud aasta saagitingimustest, vee koosseisu muutustest jne. Sellist kõikumist ei saa tasandada ka hoolikaim regulatsioon. Seepärast osutavad tabeli 7 andmed teatavaid tüüpilisi keskmisi näitajaid.

T a b e l 7

Õlle keemiline koostis %

Õlu Komponent	Värske	Laagri	Märtsi	Porter	Õil (ale)
Erikaal	1,0114	1,0162	1,0213	1,0191	1,0141
Vesi	91,11	90,08	87,87	88,49	89,42
Süsihape	0,197	0,196	0,234	0,215	0,201
Etanool	3,36	3,93	4,69	4,70	4,75
Ekstraktiiv- ained	5,34	5,79	7,21	6,59	5,65
Lämmastikained	0,74	0,71	0,73	0,65	0,61
Suhkur (arvuta- tuna maltoosi järgi)	0,95	0,88	1,81	2,62	1,07
Vaigud ja deks- triin	3,11	3,73	3,97	3,08	1.81
Happed (arvuta- tuna piimhappe järgi)	0,156	0,151	0,165	0,281	0,278
Glütserool	0,120	0,165	0,176	0,009	-
Tuhaained	0,204	0,228	0,263	0,363	0,310
Fosforhape	0,055	0,077	0,089	0,093	0,086

### c. Ölledefektid ehk õllevead

Ölledefekte võib esile kutsuda terve rida faktoreid, nagu vead isegi on mitmesugused.

Üheks olulisemaks õlledefektiks on hägustumine. See võib tekkida ebapüsivate valkude lahusest väljalangemisel, valgu-tanniini komplekside tekkel, tärglise üleminekul lahustumatusse seisundisse, peamiselt aga soovimatute mikroobide tegevuse tagajärjel.

Albumiin hägustab õlut madalal temperatuuril. See ähvardab siis, kui õlu on valmistatud halvasti kuivatatud linnastest või linnased valgurikkast odrast. Nimetatud hägu kaob tavaliselt õlle kuumutamisel.

Et õlu hästi säiliks ka madalal temperatuuril, kasutatakse kaasajal proteolüütiliste ensüümide lisamist õllesse pärast põhikäärimist.

Õlle hägustumisele võib viia hapniku juurdepääs, raputamine-loksutamine transpordil, õllevaatide pekslemine üksteise vastu, õlle jätmine päikese kätte. Mõningal määral töötab nende faktorite toimele vastu õlles leiduv  $CO_2$ .

Tärglisest tulenevad vead on tingitud ebakvaliteetsetest linnastest, milles amülaas on hävitatud kuivatamisel või siis liiga kuuma veega menetlemisel. Tuleb veel kord rõhutada, et hea õlle saamiseks peavad kõik toorained olema kõrgekvaliteedilised.

Levinuim mikroobne infitseerija on metsik pärm Saccharomyces pasteurianus, mis hakkab arenema siis, kui tegu on ebaküllaldase järelkäärimisega. See pärm toob kaasa halva maitse ja eemaletõukava lõhna. Vanades kultuurides tekib neist käärimisvedelikule kile. See koosneb suhteliselt pikkadest rakkudest, mis on ühendatud tugevasti hargnevaiks ahelaiks. Sacch. pasteurianum ei arene, kui õlles on madal suhkrukontsentratsioon ja vähe hapnikku.

Püsivat õlle hägustamist võib esile kutsuda veel terve rea bakterite areng, kes kuuluvad mitmesse eri sugukonda (Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Micrococcaceae, Lac-

tobacteriaceae). Enamlevinud infektsioossed perekonnad on Acetobacter, Lactobacillus, Streptococcus, Flavobacterium, Achromobacter.

Tuleb küll märkida, et õlu ei ole soodsaim keskkond mikroobide arenguks. Käärimise kestel vaesestub linnase-ekstrakt paljudest ainetest, mis võiksid mikroobidele olla toiduaineteks. Eriti kehtib see suhkrute, aminohapete ja vitamiinide kohta. Samal ajal rikastub õllevedelik humalatest väljuvate antimikroobsete ainetega. Tugev antimikroobne agens on muidugi ka etanool. Samuti toimivad etanoolkäärimise kaaslased - puskarõlid. Lõpuks takistab enamiku mikroobide arengut õlle madal hapnikusisaldus ja suhteliselt kõrge happesus (pH 4...5). Üldiselt tuleb õlu mikroobide jaoks tunnistada vaeseks söötmeks, kuigi, nagu nägime, ka taolises vaeses keskkonnas võib rida mikroobe areneda.

Ohtlikemad õlle rikkujad on kahtlemata perekondade Acetobacter, Lactobacillus ja Streptococcus liigid, s.t. äädikhape ja piimhappebakterid. Esimesed on eluks õlles suhteliselt hästi kohanenud, kuivõrd nad on spetsialiseerunud nimelt etanooli oksübiontilisele transformeerimisele äädikhappeks (taluvad õlle etanoolikontsentratsioon kergesti) ja on samal ajal tolerantsed ka happesuse suhtes. Humala antiseptikumidel on äädikhappebaktereisse väike mõju. Takistuseks on nende aeroobsete bakterite arengule õlle väike hapnikusisaldus ja madal redokspotentsiaal. Redutseerivate agensite täiendav lisamine on seepärast üsna kindel võte võitlemiseks Acetobacter-liikidega (eriti levinud on askorbaadi lisamine).

Kõike öeldut arvesse võttes tuleb õlle kõige halvemaks rikkumiseks pidada piimhappekäärimist. Siit tekivad halb lõhn, hägusus ja hapu maitse. Mõned Streptococcus'e tüved lisavad veel venivuse. Toitumuslikult on piimhappebakterid nõudlikumad kui atsetifitseerijad, kuid leiavad siiski veel õlles toiduaineid. Humala antiseptikumide suhtes on Lactobacillus ja Streptococcus originaalselt



tundlikud, kuid omandavad kiiresti vajaliku tolerantsuse-astme nende ainete kui induktorite manulusel kasvades. Õlu muutub piimhappebakterite suhtes mittevastuvõtlikuks ("immuunseks"), kui käärimisprotsessi käigus keskkond täielikult tühjeneb mõnest aminohapest, sest piimhappebakterid on aminohapete suhtes auksotroofid. Siit selgub veelkord, kui oluline on õlleotradeks valida valguvaesed sordid. Ei tule aga siit johtuvat immuunsust absoluutseks pidada: ka pärmid ise võivad käärimisprotsessis ekskriteerida või autoliüüsil vabastada aminohappeid.

Huvitav õlle saastaja on ka pediokokkide perekond (eriti liik Pediococcus viscosus), keda mõnikord ekslikult peetakse sartsiiniks ja sellega seoses räägitakse õlle sartsiinhaigusest. Selle bakteri tegevuse tagajärjel omandab õlu iseloomuliku lõhna ja maitse, mida mõnede autorite arvates võiks isegi soodsalt hinnata, kui sellega ei kaasneks õlle väga vastumeelne limastumine.

Võitluseks õllevigade esilekutsujatega kasutatakse virde komponentide keetmist, kääritamist madalal temperatuuril, antiseptikumide ja antibiootikumide (eriti polümüksiini) lisamist ning õlle pastöörimist. Eriti efektiivne on anaeroobsete tingimuste loomine nii õlle valmistamisel kui ka säilitamisel. Elkõige tuleb aga rõhutada puhuse tähtsust kogu tehnoloogilise protsessi kestel.

#### d. Õllesordid

Lõpuks anname lühikese ülevaate olulisematest õllesortidest.

Laagriõlu tähendab keldris hoitavat õlut (saksa keeles lagern = laos hoidma). Sõna otseses mõttes peaks seepärast termin "laagriõlu" käima kõigi õllesortide kohta, ometi tähistab see "tavalist" põhjakäärimisega saadavat õlut, milles on suhteliselt madal etanooli- ja humalaist saadavate ekstraktiivainete sisaldus. Enamik NSV Liidus, sealhulgas ka Eesti NSV-s valmistatavaid õllemarke ("Žiguli", "Moskva", "Ukraina" jt.) kuulub siia, pisierinevustega tehnoloogias.

Wärtsiõlut iseloomustab tume värvus ning kõrge eta-  
noolisisaldus. Seda õlut saab valmistada vaid varakevadel  
(seni pole selge, kuidas aastaaeg mõjutab käärimisprotses-  
si, s.o. pärmi aktiivsust). Eriti armastatud Kesk-Euroo-  
pas.

Eil (ale) on kahvatu, terava maitsega õlu, mis saadak-  
se pinnakäärimisega ja milles on kõrge etanooli- ning eks-  
traktiivainete sisaldus (lisatakse palju humalaid). Levi-  
nud anglo-ameerika maades.

Porter on tume eil, kuid sellest mõnevõrra magusam.  
Sisaldab palju ekstraktiivaineid. Valmistamiseks kasuta-  
takse musti linnaseid (kuivatus kõrgel temperatuuril).  
Selles õlles ei tungi kunagi esile humalalõhn. Valmista-  
takse ka NSV Liidus.

Kange porter sisaldab eriti palju etanooli (8...12 %).  
Tegu on tumeda, magusa õllega, mida iseloomustab tugev lin-  
nasearoom. Humalamaitse on tuntavam kui porteril. NSV Lii-  
dus üldiselt ei valmistata, levinud on anglo-ameerika maa-  
des.

Valget õlut valmistatakse nisust pinnakäärimisega.  
Produkti iseloomustavad tugev linnaselõhn, humalate küllus,  
terav maitse ja rikkalik gaasisaldus. Produkt näib ta-  
valiselt hägusena.

### III. TOIDUAINETE- JA TOIDUAINEID TÄIENDA- VATE FAKTORITE TÖÖSTUS

#### 1. P ä r m i t ö ö s t u s

Eelnevas osas vaatlesime pärmide elutegevuse raken-  
dusi peamiselt alkoholitööstuses. Sellega pärmide kasutus-  
alad ei piirdu. Üheks oluliseks tööstusproduktiks on ka  
pärmid ise - s.o. kultiveerimisel saadav biomass. Sellist  
massi koguneb küllalt suurtes hulkades ka tööstuspiirituse  
tootmisel. Ajalooliselt olidki mõlemad tööstusharud esi-  
algu ühised. Pagaripärm oli piiritusetööstuse kõrvalpro-  
dukt. Kaasajal on mõlemad tööstusharud iseseisvad. Pär-  
mitööstuse iseseisvumine toimus lõplikult käesoleva sajan-  
di teise aastakümne lõpuks, tänu taanlase Saki ja sakslase  
Heyducki uurimistöödele tehnoloogia valdkonnas, mis lubasid  
täielikult üle minna melasside kasutamisele.

Pärmitööstuse põhitoodang läheb pagaritööstuse tarbeks.  
Kasvatatavaks organismiks on seejuures Saccharomyces cere-  
visiae' pinnakäärimestüüpi tüved. Nende mass moodustabki  
antud tööstusharu produkti - pagari- ehk presspärm. Käes-  
olevas lõigus vaatlemegi pagaripärmi tootmise tehnoloogiat.  
Loomade (kodulinnud, sead) täiendavaks söötmiseks kasuta-  
tav valgurikas söödapärm toodetakse põhimõtteliselt sarna-  
se tootmistehnoloogia alusel. Vajalikud lisamärkused esi-  
tame pärast pagaripärmi tootmise kirjeldust.

#### Pagaripärmi tootmine

##### Lähteained

Kaasajal toodetakse valdav enamik pagaripärmi S. cere-  
visiae' kasvatamisel melasskeskkondades. Kasutatakse nii  
peedi- kui ka roosuhkru melassi. Oluline erinevus nende  
vahel seisneb selles, et roosuhkru melass sisaldab pärmide

edukaks kasvuks küllaldaselt biotiini, kuna peedimelass on selle vitamiini (kasvufaktori) poolest nii vaene, et seda tuleb nimetatud agensiga rikastada. Biotiini lisatakse kuuni 0,3 osa miljonisse (soodustavalt toimib veel Ca-pantoteenaadi ja myo-inositolli lisamine). Suhkrutööstusest väljuvad melassid tavaliselt 50...52 % suhkrusisaldusega, arvatuna "totaalsele invertsuhkrule". Maksimaalse kasvuefekti saamiseks lahjendatakse melassi 1,0...1,2 % suhkrusisalduseni ning tugevdatakse mineraalsooladega. Normaalseks peetakse lämmastiku andmist ammooniumsulfaadina või ammoniaakveena (0,1...0,2 % meediumi kaalust), fosforiga varustamine toimub superfosfaadi abil. Oluliste toitainetena lisatakse veel magneesiumsulfaati, mõnikord ka kaaliumkloriidi.

Pärmi kasvatamiseks tuleb keskkond hapustada. NSV Liidus reguleeritakse söötme pH väävelhappe lisamisega 5,0...5,5 piiridesse, mõnedes teistes maades (USA, Inglismaa) mõnevõrra madalamale - pH 4,0...4,5 vahemikku. Konkreetset valitav happesus sõltub pärmitüvest. Madal pH soodustab pärmi kasvu, ühtlasi aga väldib vähemalt ööpäeva jooksul kontaminantide kasvu.

Ebasoovitavad lisandid kõrvaldatakse pärast spetsiaalset sadestamist tsentrifuugimisega. Ühtlasi paraneb keskkonna filtreeritavus.

Melasskeskkonna valmistamiseks tuleb kasutada pehmet, kaltsiumivaba vett.

Tuleb arvestada, et melassid on väga ebastabilsel koosseisuga mitmesuguste lisandite sisalduse poolest (ka lämmastikuühendite sisalduse poolest). Koosseis varieerub sõltuvuses suhkruroo või suhkrupeedi kasvuaasta tingimustest, maakohast ja ka konkreetsetes suhkrutööstuses rakendatava tehnoloogia pisi-iseärasustest. Seepärast on otstarbekohase pärmitootmise tehnoloogia väljatöötamiseks selles või teises konkreetsetes ettevõttes tingimata vaja melassiga varustamist püsivalt samade suhkrutööstusettevõtete poolt.

## Kultiveerimine. produkti isoleerimine

Pärmimassi kasvatamine toimub suletud või avatud kultivaatorites, mille maht ulatub kümnete tuhandete liitriteni. Kultivaatorit ei täideta korraga, vaid järk-järgult, vastavalt pärmihulga suurenemisele. Inokulum on pagaripärmi tootmisel suur - ulatub kuni viiendikuni lõpp-produkti hulga. Sellise hulga ni jõutakse inokulumi järk-järgult suuremates inkubaatorites ettekaavatamise teel, alates tavalistest laboratooriumikultuuridest. Et tegu on aktiivselt kasvavate rakkudega, puudub inokulumist saadud kultuuris lag-faas, mispärast lõplik biomassi hulk saadakse kätte juba 8...15 tunniga.

Inokulumi kasvatamine toimub steriilsetes tingimustes, tootmiskultuuri steriilsus on vaid suhteline - kultivaatooreid steriliseeritakse aurutamise ega enne söötme ega täitmist. Lähipuhutatavat õhku ei steriliseerita (piirdutakse filtreerimisega), nagu ei steriliseerita ka söödet ega selle komponente. Steriliseerimine muudaks tootmise väga kalliks (aereerimine annab niigi umbes 20 % kogukuludest), teisest küljest väldivad lühike töötsükkel (pärmide kiire kasv) ja keskkonna madal pH kõrvaliste mikroobide kasvu (peamist ohu kujutavad bakterid, kelle invasioon viib alla presspärmis säilivuse).

Aeratsioonitingimusi muudetakse kultuuritsükli kestel. Esimastel tundidel inokulumi kasvatamisel hoitakse kultivaatooris anaeroobsusele lähenevaid tingimusi, hiljem viiakse järk-järgult sisse õhustamine. Tarbejuuretisi, s.o. kultuure tootmisfaasis puhutakse intensiivselt läbi perforreeritud torufiltrites ehk pihustusfiltrites pihustatud õhuga (mäletatavasti kindlustab kõrge aeratsioonitase mitu korda intensiivsema pärmide kasvu ja paljunemise). Sobivaimaks aereerimisintensiivsuseks protsessi lõppstaadiumis peetakse  $20 \text{ m}^3$  õhku iga kilogrammi 50 %-lise melassi kohta.

Kultuurianumad varustatakse tavaliselt vesijahutus-seadmetega vabaneva liigse soojuse ärajuhtimiseks. Inokul-

leeritud keskkonna esialgne temperatuur reguleeritakse 27...29° juurde, hiljem lastakse sel tõusta 30°-ni, mõnel juhul veidi kõrgemalegi. Üldiselt saadakse sellisel temperatuuril küll mõnevõrra kõrgem paljunemisintensiivsus, kuid pärmil, s.o. valmisprodukti säilivus langeb.

Aereerimise tõttu ähvardab keskkonda vahustumine. Priimitiivsemates ettevõtetes välditakse seda rasvhapete lisamisega (eriti leiab kasutamist oleiinhape). Kaasajal kasutatakse siiski spetsiaalseid vahustusvastaseid vahendeid, mida lisatakse automaatselt.

Kui pärmil hulk kultivaatoris on tõusnud viiekordseks, eraldatakse pärmimass kaheastmelises protsessis. Esimeses astmes tsentrifuugitakse keskkonnast välja rakud, pestakse veega ja tseentrifuugitakse uuesti. Teises staadiumis läbib mass filterpressi ja lõpuks pöörleva vaakum-filtri. Produkt väljastatakse 24...27 % kuivainesisaldusega, pakituna sobiva suurusega "pulkadeks" (meil 50 ja 100 g).

Pidevkultuuride rakendamine ei ole pärmitööstuses seni andnud positiivseid tulemusi. Põhjuseks on bioloogilise kontaminatsiooni võimaluste tunduv tõus, aga ehk veelgi kaalukamalt vajadus anda ühtlast ja biokeemiliselt rahuldava stabiilsusega produktsiooni. Senistes katsetes ei ole tööstuslikud pidevkultuurid pagaripärmide juures neid nõudeid rahuldada suutnud.

Pagaripärmi väljatulek on üsna kõrge. Maailmarekord küünib 230 kilogrammini iga 100 kg söötmesuhkru kohta, s.o. 50 % suhkrusisaldusega melassi suhtes on saagikus 115 %. Tartu Leivakombinaadi pärmitsehhis saadakse ca 156 kg pärmil 100 kg suhkru kohta, s.o. 50 %-lise suhkrusisaldusega melassist moodustab saagikus 78 %.

Söödapärmil toodetakse põhimõtteliselt analoogiliselt. Kasvatatakse enamasti kõrge valgusisaldusega Candida' liike (eriti C. utilis't). Tooraineks on mitmesugused substraadid, milles leidub sahhariide. Eriti märkimisväärne on söödapärmi kasvatamine puidu hüdrolüüsiproduktidel (näiteks tselluloosi tootmise jääkproduktidel - sulfitlahuses), millele

mõnikord lisatakse ka vähesel määral melassi. Saadav biomass eraldatakse ning kuivatatakse 130° õhuga, mis kuivatustsoonis annab temperatuuri ca 60°. Produkti lisatakse loomasöödale põhiliselt lisa-valguallika ülesannetes. Kui söödapärmi kiiritada ultraviolettkiirtega, saadakse kõrge-nenud D-vitamiini sisaldus.

### Pagaripärmi kasutamine

Pagaripärm on kergitav agens leivatööstuses leiva-saia küpsetamisel. Selleks vajalik gaasiproduktioon on proportsionaalne pärmihulgaga (vähemalt käärimise esimestel tundidel). Seejuures sõltub gaasiteke pärmitüübist. Pagaritööstuses on seepärast resultaadi ettenägemiseks vaja kasutada kindlat pärmirassi.

Taignas tärklis hüdrolüüsib maltoosiks amülaaside toimet, mis normaalselt esinevad jahus. Kui jahu on mõnel aastal (või sordist sõltuvalt) amülaasivaene, võib lisandina kasutada linnaseid või mikroobset amülaasipreparaati (vt. lk. 226).

Taignas peab pärmi tarbeks küllaldaselt esinema Ca ja P. Neid lisatakse nn. leivaparendajate ehk taigna konditsioneerijate koosseisus. Lämmastikuga varustuvad pärmid, mis orgaanilistes ühendites seotud lämmastikku halvasti kasutavad, jahu enda proteolüütiliste ensüümide tegevuse abil. Siiski põhjustab ammooniumsoolade lisamine taignasse gaasiproduktiooni ja seega ka kerkimisenergia järsku tõusu. Et vältida valmis leiva hallitamist, lisatakse näiteks USA-s juba jahusse Na-propionaati.

Taignas tekkivat maltoosi lagundab juba pärm enda maltaas ( $\alpha$ -glükosidaas). Tekkiva glükoosi arvel algab etanoolkäärimine. Selle produktidest  $\text{CO}_2$  osutubki kergitavaks agensiks. Etanool aga kas kaob küpsetamisel või annab vähesel määral estreid, mis määravad leivale iseloomuliku meeldiva lõhna.

## 2. Piimatööstus

### a. Piima keemiline koostis

Piim sisaldab kõiki organismile vajalikke aineid kergesti omastataval kujul. Seetõttu on piim sobivaks kasvukeskkonnaks ka kõikidele mikroobidele. Lehmapiimas on keskmiselt 87...88 % vett, milles on lahustunud kõik teised piima koostisse kuuluvad ained. Lehmapiima koostisse kuulub keskmiselt 4,7 % sahhariide (piimasuhkur), 3,8 % piimarasva, 0,06 % fosfatiide (kefaliin, letsitiin, sfingomüeliin) ja steroole (ergosterool, kolesterool), 3,3...3,5 % valke (kaseiin, albumiinid, globuliinid), mõnevõrra mittevalgulisi lämmastikuühendeid (peptoonid, karbamiid, kreatiin, puriinalused, klorofüll, ammoniaak), 0,7 % mineraalaineid (raud, kaalium, magneesium, kloor, kaltsium, koobalt, mangaan, vask, naatrium, tsink jt. metallid peamiselt fosfaatide ja sulfaatidena). Piim sisaldab palju vitamiine (A, D, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, PP, C) ja ensüüme (lipaas, fosfataas, laktaas, proteaas, peptidaas, peroksüdaas, katalaas jt.). Ensüüme produtseerivad piimanäärmed ja piimas leiduvad mikroobid. Piim on bakteritsiidsete omadustega, piimas leiduvaid bakteritsiidseid aineid nimetatakse lakteiinideks. Gaase leidub piimas (mahult) ligikaudu 7 %, peamise osa sellest moodustab CO<sub>2</sub> (55...70 %), ülejäänus O<sub>2</sub> (5...10 %) ja N<sub>2</sub> (20...30 %). Piimas leidub ka pigmente (ksantofüll, karotiin ja laktoflaviin). Normaalne piim on varvuselt valge või kergelt kollaka varjundiga, veest viskoossem, külmub - 0,55...0,57° juures ja keeb + 100,2° juures. Piima tihedus on keskmiselt 1,030 (piimanduses mõistetakse tiheduse all piima kaalu suhet temperatuuril +20° sama mahu destilleeritud vee kaalusse temperatuuril +4°).



## b. Piima mikrofloora

Piimas ja piimasaadustes kohtame mikroobidest nii baktereid, pärme kui ka hallitusseeni. Piima mikrofloora pärineb osaliselt udarast, enamik aga satub piimasse kas lüpsi ajal või piima edasisel käsitsemisel. Ka täiesti terve udar sisaldab vähesel määral mikroobe, peamiselt mikrokokke. Mikroobid võivad udarasse pääseda vere ja nisa-ava kaudu. Vere kaudu tungivad udarasse ka tõvestavad mikroobid. Lüpsi esimesed piimatilgad on mikroobirikkad, lõpuks tuleb tervest nisast aga praktiliselt steriilne piim. Puhtalt lüpstud piim sisaldab 10...50 tuhat mikroobi milliliitris. Lehma organism hävitab enamiku udaras olevaid mikroobe piimasse minevate lakteinide abil, alles jäävad ainult kõige püsivamad vormid - mikrokokid ja streptokokid. Tavaline udara mikrofloora ei avalda piimale ebasoovitavat toimet.

Piima mikrofloora võib koosneda ainult tüüpilistest ehk homofermentatiivsetest piimhappebakteritest, atüüpilistest ehk heterofermentatiivsetest piimhappebakteritest ja mitmesugustest valku ning rasva lagundavatest mikroobidest. Puhtalt toodetud piimas leidub peaaegu ainult tüüpilisi piimhappebaktereid. Kui piima tootmise hügieenis on puudujääke, siis leidub tüüpiliste piimhappebakterite kõrval ka atüüpilisi piimhappebaktereid. Antisanitaarsetes tingimustes toodetud piimas leidub piimhappebakterite kõrval ka mitmesuguseid roisubaktereid.

Tüüpilised piimhappebakterid on homofermentatiivsed, nad moodustavad piimasuhkrust peamiselt piimhapet, vahel ka vähesel määral mõnda teist orgaanilist hapet või  $\text{CO}_2$ .

Atüüpilised piimhappebakterid on heterofermentatiivsed, nad produtseerivad piimhappe kõrval suurel hulgal gaase ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ), etanooli, glütserooli, diatsetüüli ja teisi orgaanilisi happeid.

Tüüpilised piimhappebakterid jagunevad kahte morfo-

loogilisse rühma kokid ja pulkpisikud. Kokikujulisi piimhappebaktereid nimetatakse laktokokkideks. Kokkide tüüpilisemaks esindajaks on piimhapestreptokokk - Streptococcus lactis, kelle kuju ja suurus oleneb suuresti keskkonningimustest. Enamasti kohtame piimas diplokokke ja lühikesi ahelaid, vahel tuleb ette ka pikemaid ahelaid. Agarsöötmetel moodustuvad väikesed ümarad või ovaalsed halli värvusega terveservalised kolooniad.

Str. lactis kääritab laktoosi, maltoosi, trehaloosi, galaktoosi, fruktoosi, glükoosi, arabinoosi, ksüloosi ja mannitooli. See mikroob ei käärita rafinoosi, sorbitooli ja glütserooli; kalgendab lakmuspiima kiiresti, gaasi ei tekita, indooli ei produtseeri, nitraate ei redutseeri ja želatiini ei vedelda. Mineraalsed lämmastikku ei kasuta. Areneb hästi anaeroobsetes tingimustes. Piimas moodustab ligikaudu 0,7 % piimhapet. Optimaalne kasvutemperatuur on 30...35°, maksimaalne 45°. Happe tekitamine katkeb juba +10° juures. Pastöörimisel Str. lactis hävib.

Str. lactis'e tähtsamad variandid on järgmised:

1) Str. lactis var. maltigenes - sarnaneb morfoloogiliselt ja kultuuritunnustelt piimhapestreptokokile. Muutunud koostisega piimas tekitab linnaste maitset ja lõhna.

2) Str. lactis var. anoxyphilus - kalgendab lakmuspiima, kusjuures selle värvus ei kao. Produtseerib hulgaliselt hapet ja CO<sub>2</sub>.

3) Str. lactis var. tardus - produtseerib hulgaliselt CO<sub>2</sub>, happelise keskkonnareaktsiooni juures happe produktsioon pidurdub. Suurus väga varieeruv.

Streptococcus termophilus ei hävi piima pastöörimisel 62° juures poole tunni jooksul, temperatuuri optimum on sel mikroobil 40...50° juures, talub temperatuuri 72...74°. Koki läbimõõt on 0,7...0,9 μm, esineb üksikuna ja lühikes-te ahelatena. Str. termophilus moodustab agarsöötmetel halli värvusega ümmargusi kolooniaid. Kääritab laktoosi, sahharoosi, galaktoosi, fruktoosi, glükoosi ja mannitooli, mõned tüved kääritavad ka maltoosi. Indooli, NH<sub>3</sub> ja H<sub>2</sub>S ei

produtseeri. Lakmuspiima kalgendab ja osaliselt redutseerib.

Streptococcus cremoris on graampositiivne fakultatiivne aerob, kokkide diameeter on 0,6...0,8  $\mu$ m, moodustab pikki kette, temperatuuri optimum 20°. Lagundab vähesel määral kaseiini, produtseerib CO<sub>2</sub>, muudab piima sageli limaseks, käärkitab laktoosi, galaktoosi, fruktoosi, glükoosi, mannitooli ja vahel ka maltoosi.

Leuconostoc citrovorum on fakultatiivne aerob, esineb diplokokina või ahelatena, temperatuuri optimum 20°. Agarsöötmele moodustab väikesi lainelise äärega halle kolooniaid. Käärkitab laktoosi, maltoosi, galaktoosi, fruktoosi ja glükoosi ning sidrunhapet. Selle mikroobi elutegevusproduktid annavad võile aroomi.

Leuconostoc dextranicum on fakultatiivne aerob, esineb diplokokina või lühikeste ahelatena, temperatuuri optimum 20°. Agarsöötmele moodustab teravalt piiritletud väikesi halle kolooniaid. Produtseerib CO<sub>2</sub>. Käärkitab laktoosi, maltoosi, fruktoosi, galaktoosi, glükoosi ja harva ka sahharoosi. Leuconostoc dextranicum käärkitab ka piimas leiduvat sidrunhapet, olles seega samuti võile aroomi andja.

Piimhappebakterite teise rühmana on tuntud piima pulk-pisikud ehk laktobatsillid. Need on graampositiivsed, liikumisvõimetud fakultatiivsed anaeroobid, kes indooli ei produtseeri ega nitraate ei redutseeri, Laktobatsillid on söötme suhtes nõudlikud, arenevad hästi piimas ja linnasekstrakte sisaldavas leeliselises lihapuljongis. Taluvad keskkonnas happeid kontsentratsioonini 1,5...2,2 %. Lactobacillus bulgaricus talub ka kõrgemat happekontsentratsiooni. Kui piimhappebaktereid soovetakse kasvatada vedelsöötmetes, siis tuleb söötmele lisada kriiti, mis neutraliseerib happe ja võimaldab piimhappebakteritel pikemat aega eksisteerida. Kui piimhappebaktereid kasvatatakse tardsöötmele, mis sisaldab 3 % kriiti ja 2 % piima- või roosuhkrut, siis tekivad kolooniate ümber läbipaistvad rõngad hapete mõjul lahustuva CaCO<sub>3</sub> tõttu.

Laktobatsillid on looduses laialt levinud, neid tun-  
takse 15 liigi ümber. Kõigepealt väärrib nimetamist Lacto-  
bacillus bulgaricus, noortes kultuurides graampositiivne,  
vanades kultuurides muutub värvuselt ebakindlaks. Söötme  
suhtes nõudlik, kasvab vaid piimas ja vadakut ning linna-  
seid sisaldavais söötmeis. Agarsöötmel moodustab halli-  
kasvalgeid ümmargusi või niitja servaga kolooniaid. Kääritab  
laktoosi, galaktoosi, fruktoosi, glükoosi ja mannitooli.  
Temperatuuri optimum 40...45°.

Lactobacillus acidophilus on noortes kultuurides  
graampositiivne, vanades kultuurides muutub värvuselt sa-  
muti ebakindlaks. 4...5 $\mu$ m pikkune pulkpisik, otstest  
veidi peenenenud. Agarsöötmel moodustab ebakorrapäraste  
äärtega poolläbipaistvaid kolooniaid. Ta on fakultatiivne  
anaeroob, optimaalne temp. 37°. Kääritab rafinoosi, sah-  
haroosi, laktoosi, maltoosi, galaktoosi, fruktoosi, glü-  
koosi ja mannitooli. Mikroobi kasutatakse atsidofiliini  
valmistamiseks, päritolult kuulub seelte mikrofloora hul-  
ka.

Lactobacillus bifidus on anaeroob, esineb imikute  
soolestikus. Võib esineda pikkade pulgakujuliste raku-  
dena - 2...8 $\mu$ m, sagedasti on pulgake seejuures kõverdu-  
nud, vahel tuleb ette ka hargnevaid rakke ja otstes kiilu-  
kujuliselt laienenud vorme. Optimaalseks kasvutemperatuu-  
riks on 37°.

Lactobacillus casei, pulgakujulised rakud on mitme-  
suguse pikkusega, sageli moodustuvad ahelad. Kasvuopti-  
mum asub madalamal kui eelmisel liigil (30°). L. casei  
lagundab glükoosi, laktoosi, maltoosi, mannitooli, mõned  
tüved ka sahharoosi.

Lactobacillus caucasicus on fakultatiivne anaeroob,  
rakud on suured (5...6 $\mu$ m x 0,3...1,0 $\mu$ m), moodustab pik-  
ki ahelaid, kuulub keefiri mikrofloora hulka, temperatuuri  
optimum 37...40°, tegutseb hästi ka 20° temperatuuril,  
produtseerib rohkesti gaasi. Agarsöötmel moodustab halli-  
värvilisi, lainelise äärega kolooniaid. Kääritab laktoosi  
ja glükoosi.

Lactobacillus helveticus'e pulgakujulised rakud (2... 6 x 0,7...0,9 μm), esinevad üksikult või ahelatena. Fakultatiivne anaeroob, kasvu optimum 40...42°. Kääratab laktoosi, maltoosi, glükoosi, fruktoosi, galaktoosi ja mannitooli.

Atüüpilised piimhappebakterid produtseerivad piimhappe kõrval mitmesuguseid muid produkte. Peamiselt toodavad nad gaase ja orgaanilisi happeid, kusjuures eelistavad aerobioosi. Atüüpilistest piimhappebakteritest võib nimetada perekonna Leuconostoc esindajaid ja liike Alcaligenes viscolactis, Escherichia coli var. acidilactici, Streptococcus faecalis var. liquefaciens jt. Str. faecalis var. liquefaciens moodustab laapensüümi ja muudab piima mõruks. Atüüpilised piimhappebakterid satuvad piimasse selle antisanitaarsel käsitlemisel. Kolibakterite esinemine näitab piima saastumist väljaheidetega ja on puhuse kriteeriumiks piima tootmisel ning käsitlemisel. Kolibakterid põhjustavad piima maitse ja lõhna halvenemist ja muudavad piima konsistentsilt venivaks.

Piimas võib leiduda veel mitmesuguseid saprofüütseid mikroobe, nagu Aerobacter aerogenes, A. cloacae, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis (lagundavad valku) propioonhappebakterid Pseudomonas synxanthay, Pseudomonas herbicola (annavad piimale sööda lõhna), Ps. fluorescens mada la temperatuuri juures (annab piimale roheka värvuse ja lagundab piimavalgu), Ps. fragariae (annab piimale ananasi ja karusmarja lõhna), Ps. aeruginosa (põhjustab kaua seisnud piima pinnal siniseid laike). Serratia marcescens (põhjustab kaua seisnud piima pinnal punaseid laike), võihappebakterid (perek. Clostridium liigid).

Pärmseentest on piimas ja piimasaadustes enamasti eosteta pärmid, nagu perekondade Torula ja Candida liigid, mille rakkude kuju ja suurus olenevad keskkonnatingimustest. Enamlevinud liigiks on Sacch. lactis. Mõned pärmseente liigid elavad sümbioosis piimhappebakteritega, kää-

ritades laktoosi. Sageli lagundavad pärmid ka valku ja rasva ning produtseerivad rohkesti gaasi, andes piimale ja piimaproductidele pärmi lõhna ning kibeda maitse.

Mikrooseentest esineb piimas ja piimaproductides kõige sagedamini Geotrichum candidum (Oidium lactis) ehk piimahallitus. Piimahallituse ühed variandid lagundavad valku ja rasvu. Mitmed variandid produtseerivad mõningal määral hapet, teised muudavad piima limaseks. Piimahallitus moodustab piima pinnal pehme valge sametise kihi, mis mõnikord võib ka värviline olla, kui mütseelis akumulatsioonid teiste mikroobide eksopigmendid. Geotrichum candidum on tuntud kui piima ja piimaproductide riknemise põhjustaja, ühtlasi on see mikroob tuntud piimhappebakterite antagonistina ja keskkonna leelistajana.

Piimas on levinud ka perekonna Penicillium liigid, nagu P. crustaceum, mis põhjustab kopitanud lõhna ja maitset ning lagundab piimarasva. Nimetamata ei saa jätta ka ligikaudu sama toimega perekondi Cladosporium, Mucor, Aspergillus jt.

Aktinomütseetidest leidub piimas kõige sagedamini kopitanud õlgedest pärinevaid liike - Actinomyces griseus ja A. albus, mis annavad piimale mõru maitse ja ebameeldiva kopitanud mulla lõhna. Need lagundavad valku ja rasva.

Piim võib sisaldada ka toovestavaid mikroobe. Piimaga edasikantavatest haigustest tuleb esmajoones märkida tuberkuloosi (perek. Mycobacterium liigid). Piimaga edasikantav haigus on ka brutselloos (Brucella abortus), samuti mastiit ehk udarapõletik (Str. agalactiae).

Piima kaudu võivad levida ka sellised haigused nagu tüüfus, paratüüfus, düsenteeria, difteeria, sarlakid, gastroenteriit, suu- ja sõrataud, siberi katk, marutaud ja rõuged.

### c. Piima mikrofloora muutused säilitamisel

Värske piima mikrofloora liigiline koostis oleneb piima tootmisel rakendatavate hügieeninõuete täitmisest. Hü-

gieeninõuete kohaselt toodetud piimas on peamiselt mikrookid, nende hulgas leidub vähesel määral ka piimhapestreptokokke. Peale mikrokokkide leidub piimas ka sartsiiine ja teisi mikroobe. Ebasanitaarselt toodetud piimas leidub rohkesti kolikepikese rühma baktereid, võihappebaktereid ja roisubaktereid.

Piima säilitamisel mikroobide hulk ja üksikute liikide vaheline suhe muutub. Muutusi põhjustab eeskätt säilitamise kestus ja temperatuur.

Piima mikrofloora muutumises eristatakse 4 faasi:

1) bakteritsiidne faas, 2) segamikrofloora arenemise faas, 3) piimhappebakterite arenemise faas ja 4) pärmseente ning mikroseen-  
te arenemise faas.

Äsja lüpsitud piimas esialgu mikroobide hulk ei suurene, vaid isegi väheneb mõne tuhande võrra. Värskel piimal on bakteritsiidne, s.o. baktereid hävitav toime (lüpsõuimi esinemise tõttu). Bakteritsiidse faasi kestus oleneb piima jahutamise kiirusest ja astmest. Bakteritsiidne faas kestab näiteks  $+30^{\circ}$  juures säilitamisel 3 tundi,  $+5^{\circ}$  juures 36 tundi ja  $-25^{\circ}$  juures 720 tundi.

1) Piima bakteritsiidne faas sõltub kiire allajahutamise ja madala säilitustemperatuuri kõrval veel esialgsest mikroobide sisaldusest. Mida suurem on mikroobide esialgne arv, seda kiiremini kaovad piima bakteritsiidsed omadused.

Pärast bakteritsiidse faasi lõppu algab piimasse satunud mikroobide paljunemine. Seda perioodi tuntakse segamikrofloora arenemise faasina. Sellel ajal paljunevad jõudsasti kõigi teiste mikroobide kõrval ka piimhappebakterid, mille tulemusena tõuseb piima happesus, mis hakkab pidurdama teiste bakterite (roisubakterid) arenemist.

Segamikrofloora arenemise faasile järgneb piimhappebakterite arenemise faas. Sellel ajal on arvuliselt märgatavalt ülekaalus piimhappebakterid, kelle tegevuse tulemusena muutub piim hapuks. Piima edasisel säilitamisel hakkavad piimhappebakterid välja surema nende elutegevusproduktide kuhjumise tõttu. Piimhappebakterite hävimise

kiirus oleneb piima säilitamise temperatuurist. Kõigepealt hävivad piimhappestrepokokid.

Piimhapp**e**bakterite arenemise faasile järgneb pärmide ja mikrosete arenemise faas. Piimhapp**e**bakterid muudavad keskkonna nii happeliseks, et nad ka ise ei saa seal enam eksisteerida. Happeline keskkond osutub sobivaks pärmidele ja hallitumist põhjustavatele mikrosetele. Mikrosete elutegevuse tagajärjel keskkonnas olev hape kasutatakse ära, mis võimaldab roisubakterite arenemist. Roisubakterid aga hakkavad lagundama piimavalku, põhjustades piima roiskumist.

Kui näiteks värskes piimas on milliliitri kohta 11 tuhat bakterirakku, mis bakteritsiidse faasi ajal langeb 8000-le, siis ööpäeva jooksul säilitatud (12°) piimas tõuseb mikroobide arv 60 tuhandele milliliitris.

Kui piima säilitatakse ööpäeva jooksul 10...12° temperatuuris, siis bakterite arv suureneb selle aja jooksul kuni 10 korda, 18...20° juures säilitamisel kuni 100 korda ja 30...35° juures säilitamisel kümme kuni sada tuhat korda.

#### d. Pastöörimine

Piimas leiduvate mikroobide hävitamine toimub peamiselt pastöörimise teel. Pastöörimist rakendas piimatööstuses praktiliselt esimesena F. Soxhlet 1886.a. Pastöörimise all mõistetakse piima ja muude vedelike (vein, õlu jt.) kuumutamist 63° temperatuurist kuni keemispunktini. Piima steriliseeritakse peamiselt üle 100° kuumutamisel. Pastöörimisel hävib valdav osa mikrofloora vegetatiivvormidest, steriliseerimisel hävivad aga ka mikroobide spoorid.

Kõrge temperatuur põhjustab muutusi piima füüsikaliskemilistes omadustes, mis madaldavad piima toiteväärtust. Kuumutamisel kaob osa joodist, samuti lõhustuvad mõned vitamiinid ja koaguleeruvad vees lahustuvad valgud.

Kasutusel on kolm pastöörimisrežiimi.

1) Pikaajaline pastöörimine. Piima mõjustatakse 62...65°



temperatuuriga 30 minuti kestel.

2) Lühiajalisel pastöörimisel mõjutatakse 71...74°-ni kuumutatud piima selle temperatuuriga 15...40 sekundi kestel.

3) Kiirpastöörimine e. kõrgpastöörimine. Rakendatakse temperatuuri 85...90° mõne sekundi kestel. Piima temperatuur peab selle tasemeni tõusma väga kiiresti. Järgneb kiire jahutamine.

Pikaajalisel pastöörimisel piima füüsikalised ja keemilised omadused peaaegu ei muutu, suurem osa vitamiinidest säilib, ensüümid lõhustuvad vaid osaliselt, mineraalained ja valgud jäävad praktiliselt muutumatuks. Selle pastöörimisviisi efektiivsus bakterite arvukuse vähendamisel rahuldab.

Lühiajalisel pastöörimisel muutuvad piima füüsikalised ja keemilised omadused rohkem kui kestval pastöörimisel. Selle pastöörimisviisi efektiivsus on aga märgatavalt kõrgem kui eelmise viisi puhul.

Kiirpastöörimine muudab piima omadusi märgatavalt, tekib iseloomulik maitse, valgud ja mineraalained muutuvad, ensüümid lagunevad ja vitamiinisaldus väheneb.

Pastöörimisel häviavad eeskätt piimhappebakterid ja tõvestajad, ei hävi siiski kõik mikroobirakud ega ka batsillide spoorid. Seega ei muuda pastöörimine mikroobiderikast piima veel mikroobivabaks.

Et kolibakterid ei moodusta spore, siis häviavad nad pastöörimisel. Pastööritud A-klassi joogipiima kolitiiter ei tohi olla väiksem kui 3,0 ml, B-klassi joogipiimal, keefiril ning teistel hapupiimajookidel mitte alla 0,3 ml.

#### e. Juuretised piimasaaduste valmistamiseks

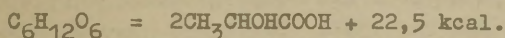
Et piimaproduktide valmistamiseks kasutatakse pastööritud piima, siis tuleb pastöörimisel hävinud piimhappebakterid asendada puhaskultuuriga (juuretisega), sest piimaproduktide valmistamisel on oluline osa piimhappeäärimisel.

Piimaproduktide (hapupiim, keefir, kohupiim, juust,

hapukoor jne.) tootmiseks kasutatavate juuretiste all mõistetakse piimhappebakterite ning mõnikord ka pärmseente ja piimhappebakterite puhaskultuure, mida paljundatakse pastööritud piimas, lõssis või vadakus.

Mitmesuguste piimaproduktide valmistamiseks kasutatakse erineva koostisega juuretisi. Juuretise koostisse valitakse tavaliselt aktiivsed piimhappebakterid ja aroomi produtseerijad. Aroomi produtseerivad bakterid tekitavad piimhappe kõrval lenduvaid happeid, atsetooni, alkoholi, estreid, süsihappegaasi ja muid produkte, mis annavad piimaproduktidele hea maitse ja tekstuuri. Aktiivseteks piimhappebakteriteks on Str. lactis ja Str. cremoris.

Tüüpiliste piimhappebakterite mõjul moodustub piimasuhkrust peamiselt piimhape, kõrvalprodukte tekib vähe.



Piimaproduktide tööstused saavad juuretise kultuurid laboratooriumist kas vedel- või kuivkultuurina. 1) Vedelad juuretised sisaldavad piimhappebaktereid aktiivses olekus, 2) kuivad juuretised aga inaktiivses olekus, need tuleb enne tööstuses kasutamist viia aktiivsesse olekusse. Vedel juuretis säilib umbes 20 päeva, kuivjuuretis aga 2...3 kuud.

Vedela juuretise valmistamiseks laboratooriumis kasutatakse värsket puhast kõrgekvaliteedilist kooritud piima, mis steriliseeritakse autoklaavimisega 1 atm. juures 10 minuti kestel. Jahutatud steriilsele piimale lisatakse 1...2 % piimhappebakterite puhaskultuuri. Aktiivsete happemoodustajate (Str. lactis ja Str. cremoris) kultuuri lisatakse 2 korda vähem kui aroomitekitajaid.

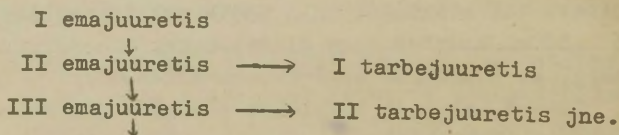
Pärast hapnemist võetud piimakogus jaotatakse kas steriilse pipeti või automaadi abil spetsiaalsetesse steriilsetesse 25...30 ml mahutavusega klaasidesse, mis paigutatakse termostaati, et juuretise mikrofloora võiks hästi välja areneda. Pärast kalgendi tekkimist võetakse juuretise klaasid termostaadist välja ja jahutatakse maha vähemalt 10 kraadini.

Kuiva juuretise valmistamisel tuleb piimhappebaktereid sisaldav kalgend kuivatada, pressida ja purustada. Kuivatamist võib läbi viia kas kuivatuskapis  $40^{\circ}$  juures või külmutatult vaakuumis (sublimatsioon). Piimhappebakterite säilivus kuivas juuretises oleneb selle happesusest ja niiskusest ning kuivkultuuri hoitustingimustest.

Laboratooriumis valmistatud juuretis saadetakse tööstustesse, kus sellest valmistatakse emajuuretis, mille jaoks kasutatakse kvaliteetset piima. Emajuuretise valmistamiseks võetakse harilikult 3...4 liitrit pastööritud piima ( $92...95^{\circ}$  juures 30 min.), millele lisatakse vedelat või kuiva laboratoorset juuretist ja asetatakse kas termostaati või veevannile.

Emajuuretise valmistamisel on termofiilsete piimhappebakterite puhul sobivaks temperatuuriks  $40...45^{\circ}$ , mesofiilsete puhul aga  $25...30^{\circ}$ . Tallinnas asuvast kesklaboratooriumist väljastatavast juuretisest (*Str. lactis*, *Str. cremoris*) on sobiv emajuuretist valmistada  $18...22^{\circ}$  juures. Esimest emajuuretist hoitakse ettenähtud temperatuuri juures, kuni tekib kalgend ja ettenähtud happesus, mis mitmesuguseks otstarbeks valmistatud juuretistel on erinev, kuides  $80...130^{\circ}$  Th. Harilikult ei ole esimesel emajuuretisel vajalikku aktiivsust ja ka maitse pole veel täielikult välja kujunenud, mistõttu valmistatakse sellest teine emajuuretis ja alles siis tarbejuuretis. Teise emajuuretise valmistamiseks võetakse 2...3 % esimest emajuuretist.

Selleks et tootmises vältida juuretise saastumist, ei kasutata emajuuretist piimasaaduste tootmiseks, vaid neist tehakse väljakülv iga järgneva ema- ja tarbejuuretise kasvatamiseks.



Emaja tarbejuuretiste kvaliteeti kontrollitakse organoleptiliselt maitse, lõhna ja kalgendi alusel. Kalgend

peab olema ühtlane, gaasimullideta ja vadaku eraldumiseta, värsked piimhappe maitse ja lõhnaga.

Juuretises valmistatakse preparaat ja seda uuritakse mikroskoobis. Juuretises ei tohi olla kõrvalist mikrofloorat.

Demeter (1960) soovib juuretise kiireks bakterioloogiliseks kontrolliks kasutada külvi laktooskresoolpurpuragarile, mida hoitakse 1...2 ööpäeva 37° juures. Puhta juuretise puhul muutub indikaatori värvus aeglaselt, kolibakterite rühma esinemisel aga juba 24 tunni jooksul kollaseks.

Mikroosente määramiseks kasutatakse öllevirreagarit ja valgulagundajate kindlakstegemiseks piimagarit või kaseiinagarit.

Juuretise kvaliteeti võib hinnata ka lakmuspiimale tehtud külvide alusel. Nimelt 7 ml lakmuspiima (7 %) kohta külvatakse 0,1 ml juuretist. Hea juuretis kalgendab ja va-  
lastab 20...25° juures lakmuspiima ühe ööpäeva jooksul. Str. lactis'e ja Str. cremoris'e puhul jääb pinnale kitsas punane värvirõngas. Kui lakmuspiima värvus muutub siniseks ja jääb valastamatuks, siis on tegemist saastunud juuretise-  
ga.

Piimhappebakterite poolt produtseeritud aromaatsete ainete määramiseks kasutatakse praktikas spetsiaalset kiirmeetodit, mis puhul valgele alusele pannakse paar-kolm tilka juuretise filtraati ja lisatakse sellele sama palju 40 % KOH vesilahusena. Aromaatsete ainete küllaldase esinemise puhul tekib selge roosa värvus 10...15 minuti jooksul. Roosa värvuse hilisem ilmumine (30 minuti pärast) annab tunnistust ebakvaliteetsest juuretisest.

## f. Hapupiima liigid

Hapupiimad jaotatakse käärimisviisi järgi

1) piimhapekäärimise saadusteks ning 2) piimhape- ja alkoholkäärimise saadusteks.

Piimhapekäärimise puhul lagundavad piimhappebakterid laktoosi ja moodustavad peamiselt piimhapet. Piimhape- ja

alkoholkäärmise puhul tekib laktoosist peale piimhappe veel etüülalkoholi, süsihappegaasi ja lenduvaid happeid. Kaseiin kalgendub kummagi käärimisviisi puhul.

Mitmesuguseid hapupiimalike kasutatakse juba paljude sajandite jooksul. Hapupiimaliikide tähtsust inimese toitlustamises uuris ühe esimesena põhjalikumalt vene õpetlane I. Metšnikov, kes soovitas toiduks tarvitada piima hapendus-  
saadusi, mis soodustavad roisubakterite elutegevuse mahasurumist soolestikus. Kõik hapupiimaproduktid on hästi omastatavad ja kergesti seeduvad, nad sisaldavad ka piimhappebakterite poolt produtseeritud antibiootikume (nikosiin, niisiin), mis takistavad mõnede tõvestajate paljunemist. Mõned piimhappebakterid sünteesivad ka vitamiine.

Piima hapendussaadusi valmistatakse täispiimast, lõsist ja võipiimast. Peale lehmapiima kasutatakse laialdaselt ka teiste loomaliikide piima. Piima hapendussaadused kuuluvad dieettoitude hulka.

Hapupiima võib saada ka spontaanse piimhapperise käärimise tulemusena. Spontaanselt kalgendunud hapupiima kvaliteet oleneb selle mikrofloorast. Puhtalt toodetud kvaliteetse piima kalgend on ühtlane, gaasimullideta, meeldiva hapu maitsega. Kui piimas on ülekaalus valku lagundavad bakterid ja kolibakterid, siis tekib gaasimullidest lõhutud kalgend, mis on kas osaliselt või täielikult veeldunud.

Piima pastöörimisel hävivad piimhappebakterid, alles jäävad aga valgulagundajate spoorid. Et spontaansel hapnemisel ei saaks ülekaalu ebasoovitavad mikroobid, tuleb pastööritud piimale lisada juuretist.

Harilik hapupiim valmistatakse pastööritud piimast, mil-  
lele lisatakse 5...7,5 % Str. lactis'e, Str. cremoris'e ja 0,5...1,0 % L. bulgaricus'e juuretist. Piima kalgendumine kestab 5...7 tundi 38° juures.

Atsidofiilpiim valmistatakse pastööritud piimast, mil-  
lele lisatakse 5...8 % L. acidophilus'e juuretist ja hoitakse 6 tundi 40...42° juures. Atsidofiilpiima valmistamiseks tuleb kasutada pastööritud piima (87...96°), et vältida

piimhapestreptokokkide vohamist. Et saada sobiva konsistentsiga piima, sisaldab juuretis ka lima produtseerivaid atsidofiilbaktereid. Atsidofiilpiimal on mõningaid mao- ja soolehaigusi raviv toime.

Lõunamaine hapupiim valmistatakse pastööritud piimast, mille valmistamiseks kasutatakse neidsamu kultuure, mille abil valmistatakse harilikku hapupiima, kuid teises vahekorras. Nii lisatakse hapendatavale piimale 0,5...1,0 % Str. lactis'e juuretist ja 5...7 % L. bulgaricus'e juuretist.

Dessertpiima valmistamiseks kasutatakse pastööritud piima, millele lisatakse pastööritud puuvilja- ja marjamahla, mett, suhkrut, vanilliini ja kaneeli.

Keefirit valmistatakse pastööritud piimast. Keefir on terava hapu maitsega piimaprodukt, mille valmistamiseks kasutatakse looduslikku juuretist, nn. keefiriseent, mis koosneb pärmseentest Candida pseudotropicalis var. lactosa (Saccharomyces kefir), S. lactis ja piimhappebakteritest (Str. lactis, Str. cremoris, L. casei, L. caucasicus). Kõik need mikroobid kasvavad sümbioosis. Sümbioosist võtab osa ka valku lagundav Candida kefir. Keefiris võib etanoolisisaldus kõikuda 0,2...1,0 % vahel, rasvasisaldus on 3,2 % ja happesus 75...120° Th. Piimhappebakterite toimel kääratakse piimasuhkur piimhappeks, Candida pseudotropicalis var. lactosa toimel muudetakse piimasuhkur etüülalkoholiks ja süsihappegaasiks. Keefiriseent lisatakse 25°-ni jahutatud piimale tavaliselt 5 %. Esialgse juuretise valmistamiseks võetakse 100 g keefiriseent 2 liitri piima kohta.

Keefirit on võimalik valmistada ka kodusel teel. Selleks võetakse 1 liiter keedetud ja 20°-ni jahutatud piima kohta üks supilusikatäis keefiriseent ja hoitakse infitseeritud piima toatemperatuuris 12...24 tundi. Pärast seda kurnatakse keefir läbi sõela, et kätte saada keefiriseent. Keefiriseent võib kergesti saastuda hallitusseente, kolibakterite rühma jt. mikroobidega. Siis muutub keefir limaseks.

Keefirik peetakse raviva toimega piimaproduktiks.

Keefiriseen jõuab tööstusse tavaliselt kuivatatult ja tuleb kohapeal viia aktiivsesse seisundisse. Selleks asetatakse keefiriseened 12 tunniks keemiseni kuumutatud ja 30°-ni jahutatud vette. Selle aja jooksul keefiriseen pundub, seda pestakse keemiseni kuumutatud ja 30°-ni jahutatud veega ning viiakse uuesti 2 päevaks vette. Selle aja jooksul vahetatakse vett 4...6 korda. Kvaliteetne keefiriseen pundub selle aja jooksul edukalt.

Jogurdi valmistamiseks kasutatakse kas lamba- või lehmapiima. Jogurt on toitev ja värskendav, eriti sobiv kasutamiseks seedehäirete korral. Mida hapum on jogurt, seda tugevam on tema lahtistav toime. Jogurdi valmistamiseks kasutatakse L. bulgaricus'e, L. jogurt'i ja Str. thermophilus'e sümbioosi. Jogurdi valmistamiseks aurutatakse piima veevannil keetmisega 1/2-ni või 3/4-ni algmahust. kasutada võib ka keedetud või kõrgpastööritud täispiima. Piim jahutatakse 45°-ni ja lisatakse kas kuivatatud või vedelat jogurdijuuretist 2 supilusikatäit ühe liitri piima kohta. Inokuleeritud piim jäetakse 4...5 tunniks 40...45° juurde. Valmis jogurdi kalgend on ühtlaselt paks ja meeldiva hapu maitsega.

Kumõss ehk piimavein on kõrgema alkoholisisaldusega kui keefir. Kumõssi võib valmistada hobuse-, eesli-, kaamel- või kitsepiimast. Besti NSV-s valmistatakse kumõssi ka lehmapiima lõssist. Kumõssi juuretisse kuuluvad L. bulgaricus ja Torula kunys. Pärmseente abil kääritatakse laktoos alkoholiks, piimhappebakterite toimele aga piimhappeks. Selle joogi valmimise käigus lõhustatakse proteolüütiliste ensüümide abil osaliselt ka piimavalk. Kumõssi valmimiseks kulub 1...7 päeva.

Hapupiimajook "Lumehelbeke" valmistatakse pastööritud piimast L. bulgaricus'e juuretise abil. Sellele joogile lisatakse veel suhkrut ja puuvilja- või marjamahla.

Hapupiimaliikidest tuleks mainida veel Skandinaavia, maades kasutatavat tättepiima ehk pikkpiima, Kaug-Idas ka-

utatakse gaseeritud hapupiimajooki kurgungat, Kesk-Aasias tsali-nimelist hapupiimajooki, mis on raviva toimega. Välismaal on laialdast kasutamist leidnud hapendatud võipiim ehk pahta, mida valmistatakse rasvastatud piimast piimhappebakterite juuretise abil. Mõnedes riikides tuntakse pahta nime all hapukoorevõid.

Maitsva pahta saamiseks lisatakse piimale 1...2 % piimarasva enne juuretise lisamist, vahel lisatakse ka puuviljamahla ja natuke soola. Pahta valmistamiseks kasutatakse piim pastööratakse 82...88° juures pool tundi, jahutatakse 21°-ni ja lisatakse 0,5...2 % juuretist.

Üheks hapupiimaliigiks on ka imer, mis sisaldab 14...15 % kuivainet, sellest 4 % rasva. Algul piim hapendatakse piimhapestreptokokkide abil ja pärast seda lisatakse koort.

#### g. Kohupiim

Kohupiima valmistatakse kas kooritud või koorimata pastööritud piimast, millele lisatakse 5 % koorehapendamise juuretist. Põhiliselt toodetakse kolme kategooriasse kuuluvat kohupiima.

N ä i t a j a	Kohupiima kategooriad		
	18 % rasva	9 % rasva	rasvata
Rasvasisaldus %	18	9	-
Veesisaldus %	65	73	80
Happesus °Th	210	225	250

Kohupiima valmistamiseks kasutatava piima happesus ei tohi olla üle 21° Th järgi. Kohupiima valmistamiseks kasutatav piim pastööratakse ja normaliseeritakse selle rasvasisaldus vastavalt sordile 1,6...3,5 %-le. Normaliseeritud piim pastööratakse 20...30 sekundi vältel 80° juures ja pärast seda jahutatakse suvel 28...30°-ni, talvel aga 32...24°-ni. Pärast seda lisatakse 4...5 % piimhappebakterite



juuretist ja segatakse piimasse. Segamist korratakse 2...3 korda tunnis. Kui piima happesus on tõusnud  $32...35^{\circ}$  Th-ni, lisatakse  $\text{CaCl}_2$  30...40 %-list lahust sellise arvestusega, et ühe tonni piima kohta tuleks 500 g kristalset  $\text{CaCl}_2$ . Peale selle lisatakse veel 1 g laapi iga 1 tonni piima kohta. Laabi aktiivsus peab olema 100000 ühikut.

Kuidas leitakse erineva aktiivsusega ensüümi puhul lisatav kogus?

Olgu näiteks tarvis hapendada 0,5 t piima, millele lisatava ensüümi aktiivsus on 75000 ühikut. Kui palju tuleb nimetatud ensüümi lisada?

$$K_E = \frac{100\ 000}{75\ 000} \times 0,5 = 0,68\ \text{g}.$$

Laap lahustatakse vees ( $35^{\circ}$ ) 10...15 minuti jooksul. Laabi kõrval võib kasutada ka pepsini. Pepsini lahustatakse pastööritud piimas ( $60...70^{\circ}$  Th). Kohupiima kalgendamiseks kulub 6...7 tundi, mida järelsoojendatakse  $36 - 40^{\circ}$ , selle aja jooksul kerkib pinnale paks mass ja selle alla jääb rohekas vadak, mille happesus peab olema  $58...62^{\circ}$  Th. Järgnevalt eraldatakse vadak, kohupiimamass tösetatakse nõrguma, selle aja jooksul happesus tõuseb kuni  $77...79^{\circ}$  Th. Kohupiima nõrutamist võib läbi viia ka kotides. Seega valmib kohupiim 5...7 tunni jooksul. Kui kohupiima valmistamiseks kasutatakse termofiilseid piimhappebaktereid, siis kulub ainult 3,5...4,5 tundi.

#### h. Kaseiin

Kaseiini valmistamiseks kasutatakse kooritud piima. Kaseiin sadestatakse kas laabi, pepsiini või happe lisamisega või piimhapekäärimise tulemusena. Happega ja laabiga saadud kaseiini omadused on mitmeti erinevad. Näiteks sisaldab hapu kaseiin ainult 4 % soolaid, sest piimhappe osa Ca. Laabiga saadud kaseiinis on 7...8,5 % soolaid. Hapekaseiin lahustub hästi leelistes. Kvaliteetse

kaseiini tootmiseks kasutatavas piimas ei tohi olla üle 0,05 % rasva. Kalgendist moodustub "tera", mida soojendatakse 60...65° , kusjuures vadakust eraldatakse ta filtreerimise teel. Eraldatud kaseiin pestakse ja kuivatatakse ning paigutatakse kuiva kohta. Niiskes kohas säilitamise puhul hakkavad arenema roisubakterid või hallitusseened.

Tehnilist kaseiini toodetakse nelja sorti: kõrgem, I, II ja III sort. Veesisaldus võib olla kõikides sortides 12 %, rasvasisaldus võib kõikuda 1,5 ja 3,0 % vahel, soolasisaldus ulatub 2,5...8,5 %-ni, happesus 50...200° Th-ni. Mida kõrgemasse sorti kaseiin kuulub, seda madalam peab olema selle rasvasisaldus ja happesus ning seda kõrgem võib olla selle soolade sisaldus.

#### i. Hapukoor

Hapukoor valmistatakse kvaliteetsest pastööritud koorest, mida hapendatakse vastava juuretise abil. Meil toodetakse 30 % rasvasisaldusega hapukoort. Algkoore happesus ei või ületada 22° Th. Streptokokkide juuretist tuleb lisada 5 % koore hulgast. Valmis hapukoore happesus ei tohi olla üle 80...90° Th. Hapnemisruumi temperatuur olgu vähemalt 16...18°, kiirendatud hapendamise puhul võib see ulatuda ka 20...25°-ni. Hapendatud koor paigutatakse valmimiseks 5...8° temperatuuriga ruumi. Valmimine võib kesta 1...2 ööpäeva, mille jooksul koort mõned korrad energiliselt segatakse. Valmiva hapukoore konsistents muutub paksuks valkude tursumise tulemusena. Valmis hapukoort säilitatakse temperatuuril 2°.

#### j. Või

Või on piimarasva kontsentraat, mida toodetakse koorest. Tavalise või rasvasisaldus kõigub sordist olenevalt 82,5...83,5 %. Toodetakse peamiselt magedat röösa- ja hapukoorevõid, selle kõrval ka soolatud röösa- ja hapukoore-

võid. Lisaks neile toodetakse mõnel pool ka vologda võid, "lemmikvõid", sulatatud võid ja lisanditega võid.

Mage või valmistatakse pastööritud koorest kas piimhappebakterite kultuuri abil või ilma, vastavalt sellele saadakse kas rõösa- või hapukoorevõi.

Soolatud või valmistatakse samuti pastööritud koorest kas piimhappebakterite kultuuri kaasabil või ilma. Kuid massile lisatakse kuni 1,5% keedusoola.

Mage vologda või valmistatakse kõrgel (95...96°) temperatuuril pastööritud rõösast koorest ning sellel on pähkli maitse ja lõhn.

Mage lemmikvõi valmistatakse pastööritud rõösast koorest vooluliinil.

Sulatatud või on võimassist väljasulatatud piimarasv.

Lisanditega või saamiseks lisatakse võimassile kas kakaod, vanilliini, mett, suhkrut, puuvilja- või marjamahla. Lisanditega või valmistamiseks kasutatakse tavaliselt mage-dat võid.

Või valmistamiseks võib kasutada ainult esimese ja teise sordi piima, mille happesus ei tohi olla üle 20° Th järgi, maitse peab olema puhas ja värske (lubatud on kasutada ka söötadest pärineva nõrga kõrvalmaitsega piima), mehaanilisi lisandeid ei tohi olla. Sellisest piimast valmistatakse koor, mis võib kuuluda kas I või II sorti. Ainult I ja II sordi koorest võib valmistada võid. Või valmistamiseks kasutatav koor peab olema ühtlane, puhta maitsega, tükkideta või väheste võitükikestega ja külmutamata.

Koor normaliseeritakse ja pastööratakse. Normaliseerimise all mõistetakse rasvasisalduse reguleerimist, pastööritud koorele lastakse jahtuda (füüsikaline valmimine). Jahtumise ajal koore konsistents muutub paksaiks. Hapukoorevõi tootmisel peab koore füüsikalisele valmimisele järgnema bioloogiline valmimine (piimhapekäärimine).

Või tootmiseks kasutatakse perioodiliselt või pidevalt töötavaid võimasinaid. Pidevalt töötavasse võimasi-

nasse läheb koor katkematu vooluna, valmis või väljub samuti pidevalt.

Valmistatakse kõrgema ja I sordi võid. Või hindamine toimub organoleptiliste omaduste järgi. Ekspertiisi puhul võetakse metallist võipuuri abil massist välja tuldake-keakmine proov - ja määratakse kõigepealt aroom, maitseomadused ning soolamisaste. Konsistentsi ja struktuuri hinnatakse veepisarate suuruse ja sageduse järgi.

Ebaõnnestunud võil võib olla kas sõõda maitse, defineerimata hapu või kibe maitse, õli, metalli, räästumise, hallituse või mõni muu määratlemata maitse. Konsistents võib olla kas nõrk, pehme, rasvane või rabe. Esineda võib ka värvuse nõrgenemist võimassi pinnal, mida tuntakse staafi nime all.

Või mikrofloora. Et või sisaldab kõiki mikroobidele vajalikke toitaineid ja küllaldaselt niiskust, siis onoleb või omaduste muutumine säilitamisel eeskätt mikrobioloogilistest protsessidest.

Võis esinevate mikroobide kvantitatiivne ja kvalitatiivne koostis olenevad piima tootmisel valitsenud puhtusest, pastöörimise täielikkusest, või valmistamise viisist ja säilitamistingimustest. Pastöörimisel jääb osa mikroobispoore kahjustamata, samuti jäävad osaliselt kahjustamata mikroobide poolt produtseeritud ensüümid. Need põhjustavadki või riknemist.

Või mikrofloora iseloomustamiseks määratakse proteolüütiliste, lipolüütiliste ja kolirühma bakterite ning mikrosete ja pärmsete arvukus. Kõiki neid mikroobe käsitatakse kui lipolüüte ja proteolüüte.

Võimikroobide üldine arvukus onoleb ka säilitustemperatuurist, säilitamise kestusest ja aastaajast, millal või valmistati. Sobivaks või säilitamise temperatuuriks on maksimaalselt 5°, mis vähendab oluliselt saastajate arvukust. Tuleb siiski arvestada, et või säilitamisel väheneb küll tunduvalt mikroobide arvukus, kuid alles jäävad nende poolt produtseeritud ensüümid, mis on aluseks biokeemilise-

le riknemisele. Eespool toodust järeldeb, et veel õigem on või kiiresti alla jahutada ja hoida seda 0...2° juures. Selline temperatuur takistab nii mikrofloora arengut kui ka ensüümide teket.

Võis esinevate üldista valgulagundajate mikroobide määramiseks sobib hästi glükoos-laktoosagar (mõlemaid sah-hariide lisada 0,5 %). Sobivaks kultiveerimistemperatuuriks on 37°, mille juures inkubeeritakse 48 tundi. Kasu-tada võib ka kaseiinagarit, kuid siis saadakse madalam ar-vukus.

Proteolüütiliste (kaseolüütiliste) bakterite arvukuse määramiseks kasutatakse pärmagarit. Proteolüütiliste bak-terite hulka kuuluvad ka koli- ja Proteus'e rühma mikroo-bid, nagu Ps. fluorescens, Ps. aeruginosa, Ps. putida jt.

Lipolüüte määratakse pärmagaril hiinasinise juures-olekul. Kahjuks ei rahulda see meetod aga uurijat, kuna tulemused on väga ebaühtlased. Enne söötme valmistamist kääratakse pärmiekstraktis olev suhkur kolibakterite abil, kusjuures 9 ml-le söötmele lisatakse juurde 1 ml ste-riilset võirasva ja 1 tilk hiinasinise 5 %-list vesilahust. Hiinasinisega varustatud söötmel kasvavad hästi kõik rasyu lagundavad mikroobid ja mikroseened, eriti aga pärmseened, mikrokokid ja sartsiinid. Nende kolooniate ümber tekib intensiivne sinine rõngas. Niilussinise kasutamisel arene-vad hästi mikroseened ja fluorestsendid. Teiste mikroobide kasv on eespool nimetatud värvainete tõttu nende toksilisus-se tõttu takistatud.

Lipolüütide poolt produtseeritud ensüüm - lipaas - hüdrolüüsib rasva glütserooliks ja vahadeks rasvhapeteks. Järgneval oksüdeerimisel vabadest rasvhapetest tekkivad ühendid annavad võile rasuja maitse.

Escherichia-Klebsiella' rühma mikroobid põhjustavad võis nn. landa- ja söödamaitse teket.

## k. Juustu tootmine

Juust on üks väärtuslikumaid toiduaineid, sest selles on säilinud piima hinnatavaim komponent - valk, koos piimarasvaga, mineraalaineid ja vitamiine. Juustu valmistamisel allub valk mitmesugustele biokeemilistele protsessidele, mille tulemusena tekivad juustu spetsiifiline maitse ja aroom ning ühtlasi muutub juust hästi omastatavaks.

Juustu valmistamiseks kasutatav piim peab olema kõrge-kvaliteediline. Juustupiima kvaliteedile esitatakse suuremaid nõudeid kui tavalisele piimale, mistõttu piima kvaliteedi üldmenetlusele lisaks tehakse veel analüüse juustu valmistamisel kahjulike mikroobirühmade esinemise tuvastamiseks. Juustupiima kvaliteeti hinnatakse seega peale happesus-, reduktaas- ning puhtusproovi veel käärimis-, laabikäärimis- ja võihappebakterite proovide järgi.

Järgnevalt peatume kahjulike mikroobide tuvastamiseks tehtavatel proovidel.

Käärimisproovi läbiviimiseks paigutatakse katseklaas piimaga termostaati 37...38° juures. Vaatlused tehakse 10 ja 20 tunni järel, kusjuures hinnatakse kalgendi struktuuri. Kalgend võib olla kas normaalne, vedel, kilejas, juustjas või paisunud. Kõige ohtlikum mikrofloora esineb piimas siis, kui saadakse paisunud kalgend. Paisunud kalgendi teket põhjustavad võihappebakterid, mille spoorid ei hävi juustupiima pastöörimisel. Võihapekäärimisel tekib vesinikku ja süsihappegaasi, mille toimel juustus kujuneb eba-reegliparane augustus.

Käärimisproovis (37...38°) arenevad hästi ka veel sellised gaasitekitajad nagu E. coli ja Aerobacter aerogenes.

Laabikäärimisproov võetakse juustupiimast pärast juuretise, kemikaalide ja laabi lisamist. Proov (katseklaas) paigutatakse 20 tunniks termostaati 37° juures. Selle aja jooksul tekkinud kalgendi järgi võib otsustada, kas juustupiimas on Escherichia-Klebsiella rühma esindajaid ja võihappebaktereid. See proov annab ettekujutuse valmistatava

Juustu kvaliteedist. Kui õigeaegselt tehakse kindlaks, et juustupiimas on palju gaasitekitajaid, siis on võimalik tehnoloogias rakendada käärimisprotsessi aeglustavaid võtteid. Selleks tuleb rakendada tugevamat soolamist ja kääritamine viia läbi tavalisest madalamas temperatuuris, mis puhul kahjulike mikroobide toime avaldub nõrgemalt.

Võihappebakterite proov toimub juustupiimas, mis valamatakse katseklaasi ja mida pastööritakse 80° temperatuuri juures 10 minutit. Pastöörimisel hävivad mikroobide vegetatiivsed rakud, säilivad aga bakterite spoorid. Kuumutamisel sulab katseklaasi pandud parafiin, mis hangumisel moodustab piima pinnale gaase mitteläbilaskva katte. Proove hoitakse 37° juures üks ööpäev ja jälgitakse gaasi moodustumist.

## 1. Juustu valmistamise tehnoloogiast

Juuretiste kasutamisest. Juustu valmistamiseks kasutatakse enamasti pastööritud piima, piimhappebakterite juuretist ja pulberlaapi. Ainult emmental (šveitsi) ja altai juustu valmistamiseks kasutatakse pastöörimata piima. Pastöörimisel (72...74°) hävivad piimas bakterid, pärmi- ja mikroseened. Säilivad batsillide spoorid ja mõnel määral ka piimhappebakterid, nagu Str. bovis, Str. faecalis ja Str. thermophilus.

Laapi toodab mäletsejate noorloomade libedik, eriti palju on seda piimaga joodetavate noorloomade libedikus. Täiskasvanud loomade maost saadakse pepsiini, mille kalgendamisvõime on väiksem. Laabi aktiivsust väljendatakse piima hulgaga, mis kalgendub ühe osa fermenti toimel 45 minuti jooksul 35° juures. Pulberlaabi aktiivsus on 1 : 100 000, pepsiinil 1 : 50 000.

Juustupiima kvaliteedi tõstmiseks kasutatakse ka tsentrifugimist, mille abil kõrvaldatakse piimast musta-geosakesed, mis ongi mikroobide kandjateks.

Juustu valmistamisel kasutatakse mitmesuguseid juure-

tisi. Juuretise valik oleneb juustu valmistamisel rakendata-  
vast järeldusoojendustemperatuurist. Kui juustu valmistami-  
sel kasutatakse madalat järeldusoojendust ( $38...43^{\circ}$ ), siis  
rakendatakse mesofiilsete piimhappebakterite juuretist.

Poolkõvade lõikejuustude (hollandi, volga, jaroslavli  
juust) ja pehmete juustude (dorogobuši, kamambeeri, rok-  
foori juust) valmistamisel rakendatakse madalat järeldusoo-  
jendust. Sel puhul kasutatakse juuretist, mis koosneb järg-  
mistest kultuuridest: Str. lactis, Str. cremoris, Leuconos-  
toç citrovorum ja L. casei. Peamist osa etendab Str. lac-  
tis, kes tekitab hapet, hüdrolüüsib juustumassi kaltsium-  
parakaseinaati ning annab juustule puhta lõhna ja maitse.  
L. casei aitab kaasa kõrgema happesuse tekkele ning aitab  
läbi viia valgu põhjalikumalt hüdrolüüsi. Juuretist lisa-  
takse  $0,6...1,0\%$ .

Kõvade lõikejuustude (vene-šveitsi, altai, nõukogude  
ja Moskva juust) valmistamisel rakendatakse kõrget järeldusoo-  
jendustemperatuuri ( $52...56^{\circ}$ ). Nende juustude valmis-  
tamisel kasutatakse streptokokkide ja L. helveticus'e kul-  
tuure, mida lisatakse juustupiimale  $0,1...0,2\%$ .

Juuretiste kasvatamine toimub kooritud piimas.

Piima kalgendamine ja juustu valmistamine. Juustu-  
piim kalgendatakse laabi ja piimhappe koosmõjul. Mida  
aeglasemalt toimub piima kalgendamine, seda pehmem konsis-  
tentsiga juust saadakse, ja vastupidi, mida kiiremini toi-  
mub kalgendamine, seda kõvema konsistentsiga saadakse  
juust. Hiljem kalgend peenendatakse, peenendatud kalgendis  
piimhapekäärimine jätkub, kalgendi tükikesed tõmbuvad kokku  
ja nii tekivadki juustuterad, millest järk-järgult eraldub  
vadak. Laabiga saavutatud kalgend peab olema tihe, sitke,  
homogeenne ja hästi töödeldav.

Laabihappekalgend erineb laabikalgendist. Pehmele  
juustude valmistamisel kasutatakse just laabihappekalgen-  
dit, mille konsistents sarnaneb kohupiimamassi omaga. Juus-  
tutera saadakse seejuures nõrgema kokkutõmbumisevõimega,  
mistõttu sellesse jääb vadakut rohkem, seega ka rohkem pii-



masuhkrut. See võimaldab intensiivsemat piimhapekäärimist kui laabijuustudes. Olenevalt kalgendi struktuuri tihedusest jääb juustuterasse kuni 75 % piimhappebakteritest (ainult 25 % bakteritest jääb vadakusse). Juustuteras toimub piimhappebakterite paljunemine kolm korda kiiremini kui piimas.

Väikejuustude valmistamisel kestab madal järelsoojendus ( $38...43^{\circ}$ ) 10...15 minutit, kõvadel suuritel löikejuustudel kestab kõrge järelsoojendus ( $52...56^{\circ}$ ) 25...30 minutit. Järelsoojendus kiirendab juustutera kokkutõmbumist ja aitab kaasa mikrofloora selekteerumisele. Suurjuustude valmistamisel rakendatakse ka veel 40...80-minutilist järelsoojendust. Kõrge järelsoojendus pidurdab mesofiilide paljunemist.

Järgnevalt toimub juustu pressimine ehk nõrutamine.

Juustumassi vormi viimisel on juustumassi temperatuur sordist sõltuvalt  $35...50^{\circ}$ . See tingib erinevuse piimhappebakterite arenemise dünaamikas ja liigilises koostises.

Kõvadel juustudel jääb domineerima L. helveticus (pH 4,7...4,8), pehmetel ja poolkõvadel Str. lactis (pH 5,3...5,4).

Pressimisele järgneb juustu soolamine, kus juustule antakse vajalik keedusoolasisaldus. Soolamisel muutub juustumass nõtkemaks, ühtlasi pidurdab soolamine ka kahjuliku mikrofloora paljunemist juustus. Soolamine toimub 2...5 päeva jooksul küllastatud soolalahuses  $10...12^{\circ}$  juures. Soolamiskadu on 3...5%. Soolamisel eraldub koos vadakuga ka piimasuhkrut ja mineraalaineid. Soolvesi tungib aeglaselt difusiooni teel juustu sisemusse. Näiteks on 3 nädala pärast pindmises juustu osas keedusoola kontsentratsioon kaks korda kõrgem kui sügavamas osas. Seetõttu toimuvad juustu sisemuses protsessid intensiivsemalt kui pindmises osas. Sisemuses on ka auke rohkem.

Peatselt hakkavad juustu pinnal paljunema pärmid ja mikroseened. Kõvade juustude pinnal hakkavad kõigepealt arenema perekonna Torula pärmsened, hiljem lisanduvad neile mikroseened - perekondade Penicillium ja Aspergillus liigid. Pehmete juustude pinnal hakkavad kõigepealt arenema Candida, Mycoderma casei ja Geotrichum candidum. Nende arenemist piiratakse pesemise abil.

Kuigi juustu organoleptilised omadused hakkavad kujunema juuretise ja laabi lisamise ning soolamise momendist, toimub omaduste põhiline arenemine ikkagi valmimisperiodil, mis kestab juustu liigist sõltuvalt ühest kuni kuue kuuni (mõnel sordil mitu aastat).

Juustu valmimine on nii ensümaatiline kui ka mikrobioloogiline protsess. Selle protsessi käigus teevad kõik piima koostisosad läbi olulisi biokeemilisi muutusi. Valmimise algul arenevad juustus tormiliselt mikroobid. Nende maksimum saabub 6...8. päeval, seejärel toimub langus ning mikroobide arvukus jõuab miinimumini 2 kuu jooksul. Selle aja vältel kääritatakse kogu piimasuhkur ning tekib piim-, äädik-, propioonhapet jt. Juustu vananedes enamik baktereid autolüüsib, mille tõttu vabanevad endoensüümid. Endoensüümide ja laabi koosmõjul hüdrolüüsitakse ligikaudu 60 % valkudest.

Kõigepealt hüdrolüüsitakse valgud (parakaseiin) albumosideks ja peptoonideks, hiljem tekivad nendest polipeptiidid ja peptiidid, mis omakorda lagundatakse aminohapeteks. Peptiidide lagunemisel võivad tekkida ka amiinid, rasvhapped,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  jt. Valgumolekuli hüdrolüüsimise esimesed staadiumid toimuvad kiiresti, lõppstaadiumid aga väga aeglaselt.

Piimarasv muutub juustu valmimisel väga vähe.

Pehmetes juustudes toimub kaltsiumparakaseinaadi hüdrolüüs sügavamalt kui kõvades juustudes. Kõvades juustudes läheb ainult 1/3 kaltsiumparakaseinaadist lahustuvasse olekusse, pehmetes juustudes aga kuni 85%.

Juustu kvaliteedi tähtsamaiks organoleptilisteks näi-

tajateks on maitse, lõhn ja augustus ehk tekstuur. Augustus tekib kas piimhappebakterite või propioonhappebakterite poolt tekitatud  $\text{CO}_2$  toimel. Pastöörimata piima kasutamisel tulevad tekstuuri tekitajatena arvesse ka Escherichia-Klebsiella' rühma bakterid. Näiteks 80 kg-s vene ja šveitsi juustus moodustub käärimisprotsessis kuni 100 l  $\text{CO}_2$ .

Järgnevalt käsitleme veel eesti juustu valmistamist.

Eesti juust kuulub kõvade laabi juustude hulka, mille järevalmimine toimub madalas temperatuuris. Eesti juust valmib kaks korda kiiremini kui jaroslavli juust, vaatamata sellele, et neid toodetakse põhiliselt ühesugust tehnoloogiat rakendades. Eesti juust valmib kiiremini seepärast, et kasutatakse märgatavalt suuremas hulgas bakteriaalset juuretist (1,2 kuni 3 %). Enne piimasse viimist aktiveeritakse juuretist. Selle võttega saavutatakse juustus piimhappebakterite kõrge füsioloogiline aktiivsus, mille tõttu tekib intensiivne piimhapekäärimine juba juustu valmimise algperioodil, ühtlasi tekib suurel hulgal ka bakteriiaalset ensüümi. Kõige selle tõttu lüheneb juustumassi töötlemise aeg vannis ning ka juustu valmimine.

Aktiveeritud bakteriaalse juuretise ja eriti biopreparaadi mõjul parakaseiin lõhustub lihtsamateks lämmastikühenditeks. Eesti juustus vabade aminohapete hulk koos ammoniaagi ja amiididega moodustab esimese kuu lõpuks 8, teise kuu lõpuks 12 % üldlämmastiku hulgast. Jaroslavli juust sisaldab neid lämmastikuvorme esimese kuu lõpuks 4 ja teise kuu lõpuks ainult 6 % üldlämmastiku hulgast.

Kiirendatud valmimisega eesti juustu tootmistehnoloogia töötati välja Vändra võitööstuses 1957.a. Selle meetodi rakendamine võimaldab juustu toota märgatavalt odavamini, sest tootmispind vabaneb kiiresti. Et laos säilitamise periood on lühike, siis kulub hallituste vastu võitlemiseks vähem tööjõudu ja niiskuskao on väiksemad kui pika valmimisperioodiga juustu tootmisel.

Järgnevalt tutvume eesti juustu tootmiseks kasutatava biopreparaadi valmistamisega.

Kooritud piim pastööratakse  $72...75^{\circ}$  juures mõne sekundi või  $65^{\circ}$  juures 20 minuti vältel. Pärast seda piim jahutatakse  $40^{\circ}$ -ni ja sellesse viiakse bakteriaalsed juuretist (100 kg kooritud piima kohta 2,5 kg *L. helveticus*'t, 1 kg termofiilseid streptokokke, 0,8 kg mitmesuguseid piimhappebaktereid segus äädikhappebakteritega ja 5...10 katseklaasitäit propioonhappebaktereid). Seda juuretist toodab tsentraalne piimajuuretiste laboratoorium. Tööstusse saabunud juuretist jäetakse  $40^{\circ}$  juures seisma seniks, kuni selle happesus tõuseb  $32...40^{\circ}$  Th, milleks kulub tavaliselt 1,5...2 tundi. Pärast seda lisatakse juuretisse mahult  $1/5$  osa pastööritud ja  $25...30^{\circ}$ -ni jahutatud vett ja tõstetakse temperatuur jälle  $30...32^{\circ}$ -ni. Järgnevalt lisatakse pepsiini (5...10 g 100 kg piima kohta). Vee lisamise tõttu väheneb piimasuhkru kontsentratsioon, pepsiini lisamine põhjustab kiiresti kalgendi tekke.

Kui kalgendist on eraldunud kuni 50 % vadakut, lisatakse massile värsket kalgendit. 10...12 tundi pärast värsket kalgendi lisamist segatakse juurde hüdrolüsaati ja teostatakse esimene neutraliseerimine. Sellel ajal on happesus  $180...210^{\circ}$  Th. Neutraliseerimiseks kasutatakse soodat (300 g hüdrolüsaati 100 kg kohta). Kolm kuni viis tundi pärast esimest neutraliseerimist lisatakse pepsiini (5...10 g pepsiini 100 kg kohta). Kaheksa kuni kümme tundi pärast pepsiini lisamist viiakse läbi teine neutraliseerimine. Seejärel jäetakse hüdrolüsaat veel 6 kuni 8 tunniks seisma, mille järel see loetakse valminuks (happesus  $240...260^{\circ}$  Th). Hüdrolüsaadi valmistamine kestab 3 kuni 3,5 ööpäeva. Hüdrolüsaat säilib 3...5 juures kuni kuu aega. Hüdrolüsaat on heaks toitekeskkonnaks paljudele mikroobidele, eriti aga mikrosetele ja pärmidele ning piimhappebakteritele.

1 kg eesti juustu valmistamiseks kulub 9 kg 3,7 %-lise rasvasisaldusega piima. Eesti juust vormitakse silindrikujuliseks, ühe kangi kaaluga 2...3 kg. Eesti juust sisaldab kuivaine kohta 45 % rasva, veesisaldus on  $39...42$  % ,

soolade sisaldus 1,8...2,5% ja pH 5,4...5,25. Eesti juust valmib ühe kuu jooksul.

Juustu hindamine. Juustu hindamisel arvestatakse maitset, lõhna, konsistentsi, tekstuuri ehk augustust, sissu värvust, välimust, pakkimist ja markeerimist.

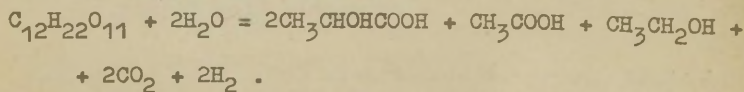
Juust peab olema liigile omase puhta maitse ja lõhnaga. Kogu juustumassi konsistents peab olema elastne ja ühtlane. Tekstuur peab koosnema enam-vähem ümmargustest või ovaalsetest aukudest. Koor peab olema õhuke, sile, elastne, kortside ja riketeta.

Maitselt võib juust olla kibekas, mis on tingitud valgu hüdrolüüsiproduktidest. Pastööritud piimast valmistatud juustudel tuleb kibedat maitset harvem ette, sest pastöörimisel hävivad kibeda maitse põhjustajad - mikrokokid ja pärmseened.

Talvel võib juustu kibedat maitset põhjustada pikemat aega säilitatud, antisanitaarselt toodetud piim. Sellises piimas hüdrolüüsivad Bac. subtilis, Ps. fluorescens ja Proteus vulgaris piima kaseiini peptonideks, mis annavadki kibeda maitse.

Juustu üheks sagedamini esinevaks veaks on paisumine. Varajase paisumise põhjustajaks on E. coli ja Aerobacter aerogenes. Nende hulgas on tüvesid, mis taluvad pastöörimistemperatuuri. Kolibakterite arengut saab pidurdada juustumassile  $\text{KNO}_3$  (300 g 1 tonni juustu kohta) lisamisega. Juustu paisumist põhjustab kolibakterite poolt eraldatud gaas. Kolibakterite gaasiteket on võimalik pidurdada juustu hoidmisel alla  $+10^\circ$  temperatuuril.

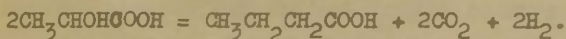
Escherichia-Klebsiella' rühma bakterid põhjustavad atüüpilist piimhapekäärimist, mispuhul eraldub palju  $\text{CO}_2$  ja  $\text{H}_2$ .



Selle käärimistüübi ilmumise ajaks on aga juustu pind-

mine kiht tihenened, mistõttu gaasid ei pääse juustust välja.  $\text{CO}_2$  lahustub juustuvees, vesinik aga mitte, põhjustades paisumist.

Juustu hilisemat paisumist põhjustavad võihappebakterid, mis võivad piimasse sattuda loomade söötmisel külmunud kartulite ja riknenud siloga. Võihapekäärimine avaldub juustus 3. kuni 5. nädalal, selleks ajaks on aga piimasuhkur juba kääritatud, võihape tekib piimhapest:



Võihapekäärimisel kogunevad juustusse gaasid, mis põhjustavad kärgja ja lõhelise tekstuuri teket. Võihapekäärimist on võimalik pidurdada piimhappebakterite poolt produtseeritava antibiootikumi nisiiniga.

Juustu pinnavead on tingitud ettenähtud keldrirezüümist kõrvalekaldumistest ja sanitaarnõuete mittetäitmisest. Juustudel esineb sageli pinna rõugearmilisust, mida põhjustavad Geotrichum candidum'i rassid, kes on keedusoola suhtes kõrge resistentsusega, taludes isegi 14...18 %-list NaCl-sisaldust. Heaks võitlusvahendiks selle mikroobi vastu on juustu kastmine 70...75° leelisesse vette.

Liiga paks koor tekib juustul siis, kui valmimine toimub kõrge temperatuuri ja õhu madala niiskuse (alla 80... 85 %) juures.

### 3. L i h a t ö ö s t u s

#### a. Liha keemiline koostis

Liha on väärtuslik toiduaine, milles leidub suurel hulgal valke, rasvu, sahhariide, vett, mineraalaineid ja vitamiine. Liha keemiline koostis oleneb looma liigist, vanusest, toitumusastmest ja mõnedest teistest teguritest.

Olenevalt looma liigist ja toitumusastmest võib liha sisaldada vett 47...77 %, valke ja muid lämmastikaineid 14...23 %, rasva 1...37 % ja mineraalsoolaid 0,7...1,2 %. Loomade liha koosneb lihas-, side-, rasv- ja luukoest. Sahhariididest esineb lihas peamiselt loomset tähtsust ehk glükogeeni, mida sarvloomade lihas on ligikaudu 0,5 %.

Oma keemilise koostise poolest on liha soodsaks arenemiskeskkonnaks ka mikroobidele. Eriti hästi arenevad lihas proteolüütilised mikroobid.

Liha säilivus oleneb suurel määral loomade tapaeel-  
sest seisundist. Kui tapmisele kuulus terve, heas toitu-  
muses olev, puhanud loom, siis toimuvad selle looma lihas  
niisugused ensümaatilised protsessid, mis tagavad mõnda  
aega mikroobide arengu pidurdamist, tõstes seega liha säi-  
livust. Kui aga tapmisele kuulus haige, kurnatud ja väsi-  
nud loom, siis selle lihas arenevad mikroobid jõudsasti,  
mistõttu niisugune liha kiiresti rikneb.

Olenevalt temperatuurist jaotatakse liha jahtunud,  
jahutatud ja külmutatud lihaks. Jahtunud lihaks peetakse  
niisugust liha, mis loomlikes tingimustes on seisnud vä-  
hemalt 6 tundi. Selle aja jooksul kattub lihakeha pind  
kuivanud kirmega, mis pidurdab mikroobide arengut, ühtlasi  
toimub liha järeivalmimisprotsess (lihas tekib piimhape,  
mis pehmedab lihaskudesid).

Jahutatud lihaks peetakse pärast lihakeha tükelda-  
mist kas loomlikes või kunstlikes temperatuuritingimus-  
tes 0...4° -ni jahutatud liha. Külmutatud lihaks loetakse  
seda liha, mis pärast jahutamist on külmutatud kuni -6° -ni.

Parimaks lihaks toiduaine seisukohalt on jahtunud ja  
jahutatud liha. Külmutatud liha kvaliteet on madalam kui  
jahutatud lihal, sest liha ülessulatamisel läheb kaduma  
hulgaliselt rakumahla. Asja tapetud loomade liha on toi-  
duks kõlbmatu ja võib tekitada seedehäireid.

Kõige olulisemaks tapajärgseks muutuseks lihaskoes on  
reaktsiooni muutus. Nimelt muudetakse lihastes esinev  
glükogeen piimhappebakterite toimel piimhappeks, mille ta-

gajärjel liha reaktsioon muutub happelisemaks. Kui elusa looma lihaste pH on 7,1...7,2, siis heas seisundis tapetud looma õöpäev seisnud lihas on see näitaja juba 5,6...5,4, mis pidurdab lihas leiduvate mikroobide arengut. Haige ja kurnatud looma lihas jääb aga pH 7,0...6,6 piiridesse, mis soodustab mikroobide paljunemist.

Tervete ja puhanud loomade lihased tavaliselt mikroobe ei sisalda, küll aga sisaldavad mikroobe mõned siseelundid, mandlid ja lümfisõlmed. Liha töötlemisel saastub liha mikroobidega kas suuremal või vähemal määral. Kergesti võib liha saastuda seedekanaliga saprofüütse mikroflooraga, aga ka inimestele patogeensete mikroobidega, mida võib leiduda ka tervete loomade seedetraktis. Liha tuleb kaitsta nii näriliste kui ka kärbestest, kes sageli osutuvad infektsioonihaguste levitajateks.

Haige ja väsinud looma lihastes leidub mikroobe juba looma eluajal organismi kaitsefunktsiooni nõrgenemise tõttu. Haige looma lihas võime kohata saprofüütide kõrval ka patogeenseid mikroobe. Haigete loomade liha toidukõlblikkus tehakse kindlaks bakterioloogilise uurimise ja organoleptilise hindamise varal.

Haigete ja väsinud loomade lihas kohtame rakke liikidest E. coli, A. aerogenes, Str. lactis, Bac. pumilus, Ps. fluorescens, Proteus sp. Agoonias tapetud loomade lihas võib leiduda ka anaeroobe - Cl. perfringens, Cl. septicum, Cl. sporogenes.

Liha kvaliteedi kõige olulisemaks näitajaks on tema värskus, mis määratakse kindlaks välimuse, konsistentsi, lõhna, kondiüdi ja kõõluste seisundi järgi.

Jahutatud värske liha puhul on tapakere pealispinnal kas kahvatu-roosa või helepunase värvusega kuiv kelme. Lõikekohal on liha niiske ja lihamahl läbipaistev. Konsistentsilt on liha elastne, ühtlasi lõhnata. Luuüdi on kõva, täidab kogu toruluu õõnsuse ja murrukoht on läikiv. Külmutatud lihal on palju heledam tapakere pinnavärvus kui jahutatud lihal. Lõikepind on roosakashall. Konsistentsilt on selline liha kõva.



Mitte-värske liha tapakere pealispind on kas ära kuivanud või niiske, kleepuv, pealispinna värvus hall või rohekas. Lõikekohal on selline liha kleepuv ja märg, tumepunase värvusega, konsistentsilt ei ole see enam elastne (sõrmega vajutamisel jääb lohk), lõhn on läppunud, luuüdi ei täida kogu toruluu õõnsust ja on värvuselt hall.

## b. Liha bakterioloogiline uurimine

Liha bakterioloogilise uurimise eesmärgiks on kindlaks teha inimestele ja loomadele ohtlikke tõvestavaid mikroobe. Mõnede nakkushaiguste (brutselloos, tuberkuloos, teetanus jt.) tekitajad tehakse kindlaks seroloogiliste uurimistega või kliinilise järelevaatuse põhjal, sel juhul ei ole vaja spetsiaalseid bakterioloogilisi uurimisi. Liha bakterioloogiline kontroll on vajalik siberi katku tekitaja (Bac. anthracis), perekonda Salmonella kuuluvate tõvestavate bakterite ning toidumürgistuste põhjustajate kindlakstegemiseks.

Liha tuleb bakterioloogilisele uurimisele saata vastavalt kindlaksmääratud eeskirjadele. Proovid võetakse uurimisele saatmiseks tapakere kindlatest osadest: ees- ja tagajäseme painutaja- või sirutajalihasest. Iga proov peab kaaluma ligikaudu 200 g. Soovitav on, et proov oleks kaetud sidekoega. Proov tuleb saata laboratooriumi ka lümfisõlmedest (kubeme lümfisõlm, kaela kaudaalne pindmine lümfisõlm ja alalõua lümfisõlm).

Siseelunditest saadetakse uurimisele põrn, neer, kopsusagar ja tükk maksa lümfisõlmedega. Peale eespool nimetatute saadetakse uurimisele ka tükk toruluud.

Proovid võetakse võimalikult steriilselt, pakitakse eraldi pärgamentpaberisse, nummerdatakse ja paigutatakse suletavatesse metall- või klaasanumatesse ning saadetakse plommitult koos saatekirjaga laboratooriumi. Aktis on tähendatud näidise võtmise koht ja aeg, looma liik, tapakere number, uurimise põhjused ja otstarve.

Bakterioloogilisel uurimisel isoleeritakse aeroobsed ja anaeroobsed mikroobid.

Laboratooriumis valmistatakse uurimisele saadetud kudedest äigeppreparaadid, mida värvitakse Grami järgi ja safraniini või metüleensinise 1...2 % vesilahusega. Kui preparaadis leidub graampositiivseid kandiliste otstega pulkpisiku-rakke või neist koosnevaid lühemaid või pikemaid ahelaid, siis on siberi katku tekitaja suhtes kahtlusi. Kahtlus tugevneb, kui safraniini või metüleensinisega värvitud preparaadis kohtame batsillide kapsleid. Sel juhul teatatakse kohe asutusse, et uurimisele saadetud liha-proov sisaldas siberi katku tekitajale sarnanevaid mikroobe.

Pärast seda tehakse külv lihadeptoonagarile (LPA), uuritakse materjali seroloogiliselt (pretsipitatsiooni-reaktsioon) ja tehakse bioloogiline proov (injektsioon testloomadesse).

Uurimisel leitud mikroobe võib pidada siberi katku tekitajateks siis, kui äigeppreparaadis on kindlaks tehtud graampositiivsed kapsliga batsillid, kui LPA-1 arenesid tüüpilised kolooniad, kui lahjenduses vähem kui 1:50 osutus pretsipitatsioonireaktsioon positiivseks ja kui bioloogiline katse oli tagajärjekas.

Juhul, kui äigeppreparaadis ei leita kahtlasi rakke, tehakse kohe külvid LPA-le, Endo ja Levini selektiivsöötmetele ning Kaufmanni ja Mülleri rikastussöötmetele.

LPA-1 kasvanud kultuurid võimaldavad selgitada veel punataudi, pasteurelloosi ja listerioosi tekitajate esinemist ning saprofüütse mikrofloora rohkust, mida tinglikult hinnatakse alljärgnevalt:

<u>Kolooniate arv</u>	<u>Leppemärk</u>
Kasvu ei esinenud	-
Kuni 20 kolooniat	+
20...50 kolooniat	++
Üle 50 koloonia	+++

Perekonna Salmonella mikroobide leidumise korral märgitakse kolooniate esinemine leppemärkidega kollase pliiasiga, kolibakterite esinemine aga punaste ristikestega. Salmonellideks osutuvad need morfoloogiliselt vastavad mikroobid, mis kääritavad glükoosi ja mannitooli, ei käärita aga laktoosi ega sahharoosi ning ei moodusta indooli.

Anaeroobsete tõvestajate avastamine toimub mikroskoopilisel uurimisel ja bakterioloogiliste külvide abil. Tööstusest saadetakse lihaproovid laboratooriumi anaeroobsete mikroobide uurimiseks siis, kui loomakatsu tulemusena on tekkinud kahtlusi kas muhutaudi, pahaloomulise turse, lammaste bradsoti, tallede düsenteeria, lammaste enterotokseemia, neurobatsilloosi või botulismi suhtes.

Lihakonservide steriilsuse kindlakstegemiseks paigutatakse konservikarbid termostaati ja säilitatakse 5 ööpäeva jooksul 37° temperatuuris. Konservikarpide mõhnumise korral võetakse proov bakterioloogiliseks uurimiseks. Selleks avatakse karp steriilse läbisti abil ja sealt võetakse pipeti abil 1...5 ml proov. Külvid tehakse aeroobsete ja anaeroobsete mikroobide isoleerimiseks.

Vorstide bakterioloogilisel uurimisel tehakse kindlaks vorstis leiduvate mikroobide üldhulk ja E. coli hulk. Mikroobide üldhulk ( roisubakterite hulk ) tehakse kindlaks süviskülviga Petri tassi IPA-sse. E. coli avastatakse Endo söötmes. Sageli pakub huvi ka Proteus'e rühma, siberi katku tekitaja ja botulismi põhjustaja kindlakstegemine.

### c. Liha ja lihasaaduste riknemine

Liha riknemine sõltub liha reaktsioonist, lihas leiduvate mikroobide liigist ja nende hulgast, samuti säilitusruumi temperatuuri- ja niiskusrežiimist.

Liha riknemine seisneb eeskätt valkude lagunemises. Valgud kui kõrgmolekulaarsed ühendid lagunevad mikroobien-süümide toimel madalmolekulaarseteks ühenditeks. Kõigepealt hüdrolyüsuvad lihavalgud albumoosideks ja peptooni-

deks, nendest tekivad polüpeptiidid, di- ja tripeptiidid, amino- ja rasvhapped ning lõpuks mitmesugused lagunemise lõpp-produktid, nagu  $CO_2$ ,  $H_2S$ ,  $NH_3$  ja  $CH_4$ .

Liha riknemist põhjustavad mitmesugused bakterid ja mikroseened. Liha riknemine algab esialgu pinnalt. Liha pinneriknemist põhjustavad mitmesugused kokid, nagu Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes jt. Mikroseenetest arenevad niisketes ja halvasti õhustatud ruumides jahutatud lihakehade pinnal kõige sagedamini perekondade Penicillium, Mucor, Aspergillus, Cladosporium ja Thamnidium liigid. Lihal asuvad mikroseened põhjustavad hallitusi, mis tungivad seennitidega 2...5 mm sügavusse. Külmutatud lihal arenevad eeskätt Th. elegans, M. mucedo, M. racemosus, Rhizopus nigricans, P. crustaceum ja teised.

E. coli ja perekonda Proteus kuuluvad liigid põhjustavad liha riknemist juba sügavamates kihtides. Perekonna Proteus liike peetakse peamisteks liha riknemise põhjustajateks, nad lagundavad valke alates polüpeptiididest. Nende proteolüütilise tegevuse tagajärjel eralduvad  $NH_3$  ja  $H_2S$ . Proteus'e liikide tegevusel tekib lihal hallikasroheline värvus ja roiskunud lõhn- ning maitse.

Liha riknemist põhjustavad ka sporgeensed aeroobid: Bac. subtilis, Bac. mycoides, Bac. pumilus, Bac. megaterium jt.

Obligaatsed anaeroobid saavad arenema ja tegutseda hakata lihas alles pärast eespool loetletud bakteriliikide arenemist. Anaeroobidest tuleb kõigepealt mainida Cl. sporogenes't ja Cl. perfringens'it. Neile lisanduvad liha sügavamates kihtides veel Cl. putrefaciens, Cl. lentoputrescens, Cl. butyricum ja Cl. septicum. Sügavroiskumise korral lõhnab liha vastikult ja on hallroheka värvusega.

Hakkliha saastub sagedasti E. coli ja Proteus'e liikidega, mistõttu seda võib üldreeglina säilitada vaid kuni 12 tundi.

Vorstide riknemine sõltub vorstide tootmise viisist, toormaterjali kvaliteedist ja säilitamistingimustest.

Eristatakse keedu-, poolsuitsu- ja toorsuitsuvorste, kusjuures keeduvorstid sisaldavad 1,5...4,5 % keedusoola ja 50...72 % vett. Poolsuitsuvorstides on keedusoola 3...5 % ja vett 40...52 %, toorsuitsuvorstides on aga keedusoola 3...8 % ja vett mitte üle 30 %. Naatriumnitriti sisaldus ei tohi ületada 20 mg 100 g toote kohta. Keeduvorstides, mida suitsetatakse ainult enne keetmist, säilivad praktiliselt ainult mikroobide spoorid. Poolsuitsuvorste suitsetatakse enne ja pärast keetmist. Toorsuitsuvorste suitsetatakse mitu päeva suhteliselt madalas temperatuuris. Suitsus esinevad antiseptilised ained tungivad vorsti sisse-musse ja mõjuvad konserveerivalt. Eriti hästi säilivad toorsuitsuvorstid, sest neis on küllalt kõrge keedusoolasisaldus ja madal veesisaldus, ning lisaks sellele veel pikaaegse suitsu mõju.

Viini vorstid-säilivad kvaliteetsetena üks päev, keeduvorstid 2 päeva, poolsuitsuvorstid kuni 30 päeva ja toorsuitsuvorstid kuni aasta.

Vorstide riknemist põhjustavad roisubakterid, eriti perekond Proteus'e liigid ning mikrooseentest A. glaucus ja P. glaucum.

Liha ja lihasaaduste hallitamist on võimalik vältida laoruumide kliimarežiimi reguleerimisega. Mikrooseente vastu võitlemiseks on otstarbekas kiiritada liha ja lihasaadusi ultraviolettkiirtega ( $\lambda = 240...280$  nm).

Soolaliha riknemist põhjustab Micrococcus lipolyticus, moodustades liha pinnal lima, ka Ps. fluorescens tuleb arvesse lima moodustajana. Paljud inimesele patogeensed mikroobid ei hävi liha soolamisel ja suitsetamisel. Soolatud ja suitsetatud lihast võib leida perekonda Salmonella kuuluvaid mikroobe, Cl. botulinum'it, Staphylococcus aureus't, Proteus vulgaris't jt.

Üheks olulisemaks lihaliigiks on peekon, mis madala keedusoola-sisalduse tõttu rikneb kiiresti. Lima tekkimist peekoni pinnal põhjustavad Micrococcus lipolyticus, Ps. fluorescens jt.

Lihakonservide valmistamiseks kasutatakse mitme looma-  
liigi liha, lisaks sellele veel maksa, ajusid jm. Vahel  
konserveeritakse liha koos juur- ja aedviljaga. Lihakon-  
servid võivad säilida piiramatult, kui nende tootmine ja  
säilitamine toimub nõuetekohaselt. Lihakonservide rikne-  
mist tuleb suhteliselt harva ette. Et lihakonservide steri-  
liseerimine toimub 115...120° juures, siis on kindlus-  
tatud mikroobide vegetatiivsete vormide ja ka spooride hä-  
vimine, säilida võivad ainult üksikud eriti termoresistent-  
sed spoorid. Ses suhtes tuleb eriti märkida Cl. sporoge-  
nes'e, Cl. putrificum'i, Cl. botulinum'i spoores. Spoori-  
de hävimist steriliseerimisel pidurdab konservi keskkonna-  
reaktsioon 6,3...6,9 piires ja 1...2 % keedusoolasisaldus,  
millel on teatav kaitsetoime temperatuuri mõju vastu. Rasv  
on halb soojuse edasiandja, mistõttu näiteks Bac. subtili-  
s e spoorid hävivad rasvarikas lihakonservis alles 150°  
juures (puljongis juba 105° juures).

Konservide riknemise väliseks tunnuseks on karbi mõh-  
numine, mida põhjustavad mikroobide toimel tekkinud gaasid.  
Teiseks konservi riknemise tunnuseks on konservikarbi sisu  
vedeldumine. Konservikarbi avamisel on võimalik mõni-  
kord konservi riknemist kindlaks teha organoleptili-  
selt tuvastatavate muutuste varal. Näiteks põhjustab Cl.  
botulinum haput ja räästunud lõhna, Cl. lentoputrescens  
ja Cl. sporogenes aga liha pudedaks muutumist, tarrendi  
vedeldumist, karbi sisu gaasimullikestega segunemist ja  
erilist vastikut lõhna. Proteus'e liigid põhjustavad  
konservi tugevat vedeldumist ja roiskumislõhna. E. coli  
ja stafülokokid seevastu toovad kaasa ainult vähemärgata-  
vaid muutusi maitstes ja lõhnas. Segakonservides muutub  
liha suhteliselt vähe, taimsed osad aga lagunevad tublis-  
ti. Roiskunud segakonservil on hapu lõhn ja palju gaasi-  
mulle.

Lihakonservide võidakse tööstusest väljastada ainult  
pärast nende kvaliteedi kontrolli (iga partii tuleb kont-  
rollida). Samuti tuleb läbi viia ka bakterioloogiline uuri-  
mine.

Loomsete toidurasvade riknemist põhjustavad *Ps. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *A. niger*, *M. mucedo*, *Cladosp. herbarum*, *P. crustaceum* jt.

#### d. Toidumürgistused ja nakkused

Valdav osa toidumürgistusi tekib riknenud liha ja lihasaaduste tarbimisest. Toidumürgistuse põhjustajateks võivad olla nii toiduga seedetrakti sattunud alusad mikroobid (toksikoinfektsioon) kui ka toiduga organismi viidud mikroobitoksiinid (toksikoos).

Toksikoinfektsioonid võivad inimestel põhjustada perekonda Salmonella kuuluvad liigid: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*.

Salmonellid on looduses laialdaselt levinud. Väliskeskonna tingimuste suhtes on nad võrdlemisi resistentsed. Lihlas hävivad nad alles pärast pikaajalist keetmist. Üheks sagedamini toidumürgistusi põhjustavaks liigiks inimesel on *S. typhimurium*, mida võib saada nii vasika-, sea-, lamba-, hobuse- kui ka linnuliha söömisel. Suhteliselt harvem põhjustab inimesel toidumürgistust *S. enteritidis*, mida tuleb ette vasika- ja veiseliha tarvitamisel. *S. choleraesuis* esineb sageli sealihlas.

Oluline on siinjuures märkida, et salmonellidega saastunud liha säilitab täiesti normaalse ilme ja lõhna, sest salmonellid valke ei lagunda.

Salmonellide poolt moodustatav toksiin inaktiveerub keetmisel poole tunni jooksul.

E. coli ja mõned perekonna Proteus tüved, s.o. suhteliselt apatogeensed vormid, tekitavad massilise esinemise korral samuti toidumürgistusi, seda eriti siis, kui nad arenevad koos. Looduses on need mikroobid laialt levinud. Sageli esinevad nad väliskeskkonnas ja inimeste ning loomade seedetraktis.

Toksikoosid põhjustavad mikroobide toksiinid sisaldavad toiduained. Lihlas ja lihasaadustes võivad toksiinid moodus-

tada mõned stafülokokkide ja streptokokkide liigid ning Cl. botulinum. Stafülokokkidest on toidumürgistuse põhjustajaks sagedasti Staph. aureus, kes eritab toiduainetes enterotoksiini. Kui enterotoksiin satub inimese seedetrakti, siis haigestumine toimub 1...5 tunni jooksul. Haiguse esimeseks tunnuseks on oksendamine, sellele järgneb kõhulahtisus ja südametegevuse nõrgenemine. Staph. aureus'e enterotoksiini suhtes on eriti tundlikud lapsed.

Streptokokkidest võib mõnikord toidumürgistust põhjustada ka Str. salivarius.

Botulismi põhjustab Cl. botulinum. See anaeroobne mikroob eritab toksini, mis kahjustab närvisüsteemi, eeskätt sümpaatilisi ja motoorseid närvilõpmeid. Botulismi puhul esineb harva seedehäireid. Haigusnähud ilmuvad 2...24 tunni jooksul pärast toksini sattumist organismi, mõnikord aga ka kuni 10 päeva hiljem. Botulismi iseloomustavad nägemishäired, suu kuivamine, nõrkus ja tugev väsimus. Rasketel juhtudel võib tekkida neelamishäireid, südametegevuse nõrgenemist, vererõhu langust ja hingamistakistusi. Kehatemperatuur on seejuures kas normaalne või alla selle. Haiguse kulg oleneb organismi sattunud toksini hulgast ja tüübist (tuntakse kuut tüüpi). Statistika andmeil on suremus botuliinitoksikoosi korral 30...67 % (kui seerumravi hilineb). Sõltuvalt toiduainete konserveerimise viisidest ja eri konservide tarvitamise massilisusest võib eri maades ülekaalus olla erinev botulismiallikas. Nii on USA-s botulismi peamisteks põhjustajateks taimekonservid, Saksamaal keeduvorst ja sink, NSV Liidus aga soola- ja suitsukala.

Cl. botulinum on pulkpisik, mõõtmetega 4...6 x 0,5...1,2  $\mu$  m. Spoorid moodustuvad terminiaalselt, mistõttu rakkudel on trummipulga kuju. Cl. botulinum on anaeroob, graampositiivne, looduses laialt levinud, teda leidub nii mullas, vees kui ka loomade seedetraktis. Cl. botulinum areneb hästi ka õhukindlalt suletud konservides, kuid konservide säilitamisel madalamas temperatuuris kui 4° lakkab toksini moodustumine.



Loomade tapmine lihaks on keelatud, kui diagnoositakse selliseid ohtlikke nakkushaigusi nagu siberi katk, maru-  
taud, kohisev muhutaud, tatitaud, veiste katk, pahaloomu-  
line turse, lammaste nakkav enterotokseemia, tulareemia,  
melioidoos ja lindude ornitoos.

Siberi katku ehk antraksi põhjustab Bac. anthracis,  
mille mõõtmed on  $3...6 \times 1,0...1,5 \mu\text{m}$ . See on graamposi-  
tiivne sporogeenne aeroobne pulkpisik, kes esineb kas üksi-  
kult või ahelatena. Loomorganismis esineb kapsulaarne S-  
vorm. Bac. anthracis kasvab hästi harilikel puljongsööt-  
metel, kusjuures optimaalseks kasvutemperatuuriks on  $30...37^\circ$ .  
Puljongis areneb ööpäeva jooksul vatisarnane põimik,  
mis langeb peagi katseklaasi põhja. Lakmusvadaksööde vär-  
vub Bac. anthracis'e arengus punaseks. Hemolüüsi antud  
mikroob ei põhjusta. Morfoloogiliselt sarnaneb siberi kat-  
ku tekitaja apatogeensete batsillidega, nagu Bac. cereus,  
Bac. megaterium, Bac. subtilis ja Bac. mycoides. Nimeta-  
tud batsillidest erineb Bac. anthracis biokeemiliste ja  
kulturaalsete omaduste poolest. Bac. anthracis esineb  
loomorganismis, välja arvatud kopsud, ainult vegetatiivse  
vormina. Spoorid moodustuvad ainult aeroobsetes tingimus-  
tes,  $18...34^\circ$  temperatuuris küllaldase niiskuse ja kesk-  
konna neutraalse reaktsiooni korral. Siberi katku tekita-  
ja on väga resistentne temperatuuri ja desinfitseerivate  
agensite suhtes.

Siberi katku haigestuvad eriti veised, lambad ja ho-  
bused aga ka ulukid.

Siberi katku tekitaja diagnoosimisel tuleb peale vi-  
suaalsete vaatluste alati läbi viia ka mikroskoopiline  
uurimine.

Tuberkuloosi tekitajaks veisel ja seal on Mycobacte-  
rium tuberculosis bovis, kodulindudel M. tuberculosis  
avium. Veisel võib tuberkuloosi põhjustada ka inimese va-  
riant M. tuberculosis hominis.

Tuberkuloositekitaja (M. tub. hominis) on peenike, sa-  
geli kõverdunud pulkpisik, mõõtmetega  $1,5...4 \times 0,3...0,4 \mu\text{m}$ .

Kalduvad sageli polümorfismile, liikumisvõimetud, spoore ja kapsleid ei moodusta, graampositiivsed. Aeroobid, optim. temperatuur 37°, kasv kunstlikel söötmetel väga aeglane, kolooniad tekivad 3...4 nädala pärast.

M. tub. bovis'e rakud on kõverdunud pulgakased, mõõtmatega 2,5...3,0 x 0,5...0,7 $\mu$ m, kolooniad on valged ja kuivad, substraadi pinnal moodustab kile. Želatiini ja sahhariide ei lagunda. Aeroob.

Tuberkuloositekitajad on eriti resistentsed kuivamise, keedusoola ja madalate temperatuuride suhtes.

Brutselloosi põhjustajaks on Brutsella abortus, Br. suis ja Br. melitensis. Kõige sagedamini haigestuvad brutselloosi veised, sead, hobused, lambad ja kitsed. Brutselloositekitajad on resistentsed madalate temperatuuride ja keedusoola suhtes.

Brutsellid on kas väikesed kokid või väikesed pulgakased mõõtmatega 0,5...2,0 x 0,3...0,5 $\mu$ m, liikumatud, ei moodusta spoore ega kapsleid, värvuvad graampositiivselt. Brutselloositekitaja kasvab hästi tavalistel söötmetel aeroobsetes tingimustes. Veiste aborditekitaja on mikroaerofiil, selle esimesed kolooniad kasvavad laboratooriumis ainult atmosfääris, mille süsihappegaasisaldus on 5...10 %. Järgnevad generatsioonid kasvavad hästi tavalises atmosfääris. Agarsöötmetel moodustavad väikesi ümmargusi kolooniaid (S-vormi). Želatiini ei veelda, piima ei kalgenda, sahhariide ei lagunda.

Leptospiroosi olulisemaks tekitajaks Eestis on Leptospira pomona. Peale selle on mujal kirjeldatud veel liike L. icterohaemorrhagiae ja L. grippotyphosa. Kõik need kolm liiki on morfoloogiliselt identsed, kuid erinevad antigeense struktuuri ja patogeensete omaduste poolest. Leptospiroosi tekitaja on aeroob, spiraalse kujuga niitjas, intensiivselt liikuv mikroob, mõõtmatega 5...20 x 0,14...0,22 $\mu$ m. Leptospiirid on väga tundlikud keskkonna reaktsiooni suhtes, nad kasvavad kunstlikel söötmetel ainult 24 intervallis 7,2...7,4. Väliskeskkonna tingimuste (kuivamine, kõrge temperatuur, keedusool) suhtes on nad tundlikud.

Leptospiroosi suhtes on vastuvõtlikud kõik põllumajandusloomad ja ka inimene. Leptospiroosi kandjateks osutuvad sageli rotid ja hiired.

Tulareemia tekitajaks on Pasteurella tularensis, mõõtmetega  $0,7 \times 0,1 \dots 0,3 \mu\text{m}$ , asporogeenne liikumatu graamnegatiivne aeroobne mikroob. Kasvuks optimaalne pH on piirides  $7,0 \dots 7,3$ . Temperatuuri optimum  $37^\circ$ . Kasvuks sobivad hästi munakollast sisaldavad söötmed. P. tularensis on välistingimuste suhtes üsna resistentne. Tulareemia on levinud peamiselt ulukite hulgas. Põllumajandusloomadest haigestuvad sagedamini lambad, veised, sead ja hobused. Ka inimene on tulareemia suhtes vastuvõtlik.

Sigade punataudi tekitajaks on Erysipelothrix insidiosa, mõõtmetega  $1,0 \dots 1,5 \times 0,2 \mu\text{m}$ , graampositiivne liikumatu pulkpisik. Looduses on punataudi tekitaja laialdaselt levinud, välistingimuste suhtes on ta resistentne, näiteks mullas ja soolatud lihas püsib ta eluvõimelisena kuude vältel. Liha suitsetamine punataudi tekitajat ei hävita.

Kohiseva muhutaudi tekitajaks on Clostridium chauvoei, mõõtmetega  $2 \dots 8 \times 0,6 \mu\text{m}$ , sporoogen, anaeroob, graampositiivne pulkpisik. Cl. chauvoei on välistingimuste suhtes väga resistentne, mullas säilitavad tema spoorid eluvõime piiramatult, spoorid taluvad isegi 40-minutilist keetmist, samuti kuivatamist, keedusoolast tingitud kõrget osmootset rõhku ning ka madalaid temperatuure.

Kohisevasse muhutaudi haigestuvad esmajoones veised, vahel ka lambad. Inimene kohisevasse muhutaudi ei haigestu. Et kohisev muhutaud on väga ohtlik veistele, siis on seda haigust põdevate loomade tapmine lihaks keelatud.

## 4. Kalatööstus

### a. Kalaliha keemiline koostis

Nõukogude Liidu veekogudest püütakse üle 250 liigi mitmesuguseid kalu. Kalu kasutatakse toiduks värskelt, soolatult, suitsutatult, konserveeritult. Konservide valmistamiseks kasutatakse peamiselt heeringlasi, lõhilasi, siiglasi, karplasi, meretintlasi, tuurlasi, tursklasi, lestlasi, ahvenlasi, mudilasi, sägalasi, makrelllasi, tuunlasi ja makrellhauglasi.

Kala on väärtuslik toidutooraine. Mitmesuguste kalade liha sisaldab toorkaalust 13...20 % valkusid, 0,2...30 % rasva, vitamiine ja mineraalaineid. Kalavalkudel on kõrge toiteväärtus, sest nad sisaldavad kõiki inimesele vajalikke aminohappeid. Kalas sisalduvad aminohapped säilivad pärast steriliseerimist 80...90 % ulatuses. Näiteks suursoomkala 1 kg lihas sisaldub keskmiselt 11,4 g arginiini, 4,0 g histidiini, 14,4 g lüsiini, 5,6 g metioniini, 2,7 g tsüsteiini, 7,0 g türosiini ja 1,8 g trüptofaani.

Kalalihas sisalduvad valkained jagatakse kolme rühma: albumiinid, globuliinid ja müostromiinid (ei lahustu vees ega soolalahustes). Valkude ülikogusest moodustavad albumiinid värskes kalalihas 17...21 %, globuliinid 78...80 % ja müostromiinid ligikaudu 3 %. Peale valkude on kalalihas veel mittevalgulisi ehk lämmastikku sisaldavaid ekstraktiivaineid, mis lahustuvad vees, nende sisaldus võib ulatuda 9...18 % kõigist lämmastikku sisaldavatest ainetest.

Kalalihas leidub ka ensüüme, millest kala säilitamisel ja töötlemisel etendavad suurimat tähtsust hüdrolaasid ja oksüdoreduktaasid. Hüdrolüütilistest ensüümidest on kalalihas tugevasti esindatud proteaasid, lipaasid ja amülaasid.

Kalarasv on kõrge toiteväärtusega, see on füsioloogiliselt kasulikum kui imetajate rasv, sest selles on rohkem küllastamata rasvhappeid ning A- ja D-vitamiine.

Et kalarasvas on palju küllastamata rasvhappeid, siis

on see ebapüsiv, oksüdeerub kergesti ja muutub kibedaks. Küllastamata rasvhapetest kuuluvad kalarasva koostisse klupanodoonhape (5 kaksiksidet), arahhidoonhape, linoleenhape jt.

Mineraalelementidest on ülekaalus fosfor. Oluline on märkida, et fosfor esineb orgaanilistes ühendites. Fosfori kõrval leidub väävlit, magneesiumi, kaaliumi, naatriumi, kaltsiumi, rauda jt. elemente.

Kalas leidub eeskätt A-, B- ja D-rühma vitamiine. A- ja D-rühma vitamiine leidub peamiselt rasvas ja sisikonnas, B-rühma vitamiinid on koondunud maksa ja silmadesse, sisikonda, marja ja niiska. Lihaskoes on vitamiine vähe.

Sahhariide on kalalihas kuni 1 %. Sahhariidide tähtsaimaks esindajaks on glükogeen.

Kalaliha keemiline koostis ja seega ka toiteväärtus olenevad kala vanusest, soost, aastaajast, toitumistingimustest ja muudest teguritest.

#### b. Kala ja kalaproduktide mikrofloora

Elusa kala mikrofloora liigiline koostis ja arvukus sõltuvad tema elukeskkonna tingimustest, sellest, missugused mikroobiliigid esinevad vees ja põhjamudas. Kala pind on peaaegu alati kaetud limaskihiga, mis sisaldab rohkesti valke. Lima on heaks toitekeskonnaks kala pinnale sattunud mikroobidele. Asja väljapüütud kala keha pinna 1 cm<sup>2</sup>-l võib esineda 1...10 miljonit bakterit. Kalade välispinnal kohtame perekondade Bacillus, Pseudomonas, Flavobacterium, Micrococcus, Achromobacter, Corynebacterium liike, pärme ja muid mikroobe. Kalade pinnal võib leiduda sporoogeenseid ja asporogeenseid pulkpisikuid, mikrokokke, sartsiiine, mikroseeni jt. Bakteritest sagedamini Ps. fluorescens liguefaciens, Ps. vulgaris, Micrococcus roseus, E. coli. Põhja-piirkondade vetes, kus veetemperatuur on 4...8°, kohtame peamiselt psührofiilseid pulkpisikuid, mis moodustavad kala pinna mikrofloorast 50...76 %. Lõunapiirkondades, kus vee temperatuur on 14...25°, leidub peamiselt mikrokokke.

Elusa kala seedetraktis leidub mitmesuguseid mikroobe, mis sinna satuvad koos toiduga veest ja põhjamudast. Siin võib leiduda ka anaeroobseid sporogenseid vorme. Nii on kalade seedetraktist leitud *Cl. sporogenes*'e, *Cl. lentoputrescens*'i ja koligrupi mikroobe. Esineda võivad ka *Salmonella*' liigid ja *Cl. botulinum*. Kala seedetrakti iga gramm sisaldas võib akumuleerida kuni mitukümmend miljonit mikroobi.

Elusa terve kala siseorganid on praktiliselt mikroobivabad.

Veest püütud kala hukkub kiiresti lämbuse tagajärjel. Pärast surma toimuvad kalas mitmesugused füüsikalised ja keemilised muutused. Tavaliselt eristatakse järgmisi kala surmajärgse muutumise põhistaadiume: 1) limaeritumine, 2) surmakangestus, 3) autolüüs ja 4) bakteriaalne lagunemine.

1) Pärast kala surma jätkavad epidermise limanäärmed veel teatud aja funktsioneerimist, mistõttu kala pinnal lima kogus suureneb. Lima on aga heaks arenemiskeskonnaks sinna sattunud mikroobidele. Väljapüütud kalade keha pinnal mikrofloora sisaldab lisaks veel kalapüüdmissvahenditest, soolekanalist, püüdjaja puhastaja kätelt, pesuveest ja mujalt sinna sattunud mikroobe. Surnud värske kala kudedes ja organites leidub kõige sagedamini järgmisi mikroobe: *Sarcina lutea*, *S. flava*, *S. alba*, *Micrococcus flavus*, *M. cereus*, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Ps. fluorescens*, *Bac. megatherium*, *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Cl. lentoputrescens*, *Cl. sporogenes*, mikrooseentest *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger* ja *Mucor sp. sp.*

Mikroobid tungivad pindmisest limast järk-järgult kala nahasse ja seejärel lihasse. Äsja surnud kala läbi paistev lima tuhmub aegamööda mikroobide toimel ja omandab ebameeldiva, esialgu napuka, siis aga roiskumislõhna. Lima ebameeldiv lõhn ei ole veel riknemise tunnuseks, sest kala pesemisel eraldub lima kergesti.

2) Surmakangestuse staadiumis on kalaliha täiesti värske.

Surmakengestus on tingitud kala lihastes ATP ja glükogeeni lagunemisest, mille tagajärjel koguneb vaba fosfor- ja piimhapet. Tõusva happelise reaktsiooni toimel lihaste valgud paisuvad, mille tagajärjel need jäigastuvad.

Pärast kangestuse lõppu algab üleminekufaas, kus autolüütilised protsessid põimuvad bakteriaalsetega ja järk-järgult kuhjuvad mikroobide elutegevusproduktid. Nende produktide iseloom võib olla mitmesugune, sõltuvalt domineeriva mikrofloora biokeemilistest omadustest. Autolüütiliste ja bakteriaalsete protsesside tagajärjel muutub kalaliha pehmeks.

Mikroobide elutegevuse tagajärjel tekivad valkudest ebameeldiva lõhnaga lõpp-produktid: ammoniak, amiinid, vesiniksulfiid, merkaptaanid, võihape koos muude lenduvate hapetega ning indool ja skatool. Valkude lagunemise lõpp-produktid kuhjuvad ja kala muutub toiduks kõlbmatuks. Kala värskuse üle otsustatakse sageli ammoniaagi ja trimetüülamiini kontsentratsiooni määramise alusel.

Vees leidub mikroobe, mis võivad põhjustada kalade nakkushaigusi. Nii on kaladel tuntud bakteriaalne furunkuloos, mida põhjustab Aeromonas salmonicida, kalade tuberkuloos (Mycobacterium piscium). Kaladel võivad haigusi põhjustada ka mõned roisubakterid (Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens jt.) ja viirused. Kalalihas olevad patogeensed bakterid moodustavad toksine. Niisuguse kalaliha tarbimine põhjustab toksikoinfektsioone.

Salmonellid on temperatuuri suhtes tundlikud. Juba 5° juures lõpetavad nad paljunemise, 75° juures aga hävivad 5 minuti jooksul. Ka NaCl suhtes on nad tundlikud (areng pidurdub 8...10 % soolasisalduse juures). Salmonellide poolt eraldatud toksiin on aga termostabiilne ja ka NaCl tavaliste kontsentratsioonide suhtes vastupidav. Et salmonellide toksiinid ei hävi keetmisel ega küpsetamisel ja et toksine sisaldaval kalalihal puuduvad ka hoiatavad välistunnused, siis põhjustab selline liha toidumürgistusi.

Ka Pr. vulgaris eritab toksiini, mis laguneb alles kõrgemal kui 100° juures. Temperatuuri langedes lõpeb selle mikroobi paljunemine tavaliselt 5° juures, kuid on ka liike, mis paljunevad veel 0° juures.

Toksikoosse põhjustab ka (Staph. aureus'ega saastunud kalaliha. Kõige intensiivsemalt toimub endotoksiini moodustumine 30...35° juures. 5...6° juures toksiini teke aeglustub, 0° juures aga katkeb. 12 %-line keedusoolasisaldus pärsib toksiinimoodustumise ja stafülokokkide arengu.

Kõige mürgisemalt mõjub (Cl. botulinum'i) poolt produtseeritud eksetoksiini botuliini sisaldav kalaliha. Inimesele mõjub surmavalt juba 0,0001 mg seda toksiini. Botulismi tekitajaga saastunud kalalihhal ei ole väliselt hoitavaid iseloomulikke tunnuseid. Botulismi tekitaja areng ei saa toimuda pH 4,5-st madalamal väärtusel ega ka madalamal temperatuuril kui 10°. Kõrgete temperatuuride suhtes on ta aga vastupidav. 120° temperatuuri taluvad Cl. botulinum'i spoorid 4 minutit, 100° temperatuuri aga kuni 6,5 tundi. Toksiin laguneb küll juba 90° juures 10 minuti jooksul, kuid spoorid säilitavad eluvõime, mis anaeroobsetes tingimustes arenevad vegetatiivseteks rakkudeks ja moodustavad toksiini. 6...8 % keedusoolasisaldus pärsib Cl. botulinum'i arengut, kuid ei lagunda juba olemasolevat toksiini.

### c. Kalakonservide valmistamine

Kalakonservide klassifikatsioon. NSV Liidus valmistatakse kaladest, koorikloomadest, köht- ja peajalgsetest molluskitest ja muudest meresaadustest üle 200 liigi steriliseeritud konserve. Käesoleval ajal toodetakse naturaalseid kalakonserve ja kalakonserve puljongis, tomatikastmes ning ölis. Peale selle valmistatakse veel kalapasteete, kala-aedviljakonserve ning koorikloomade, karpide ja muude mereloomade konserve.



Lisaks sellele valmistatakse heeringlastest ligikaudu 40 liiki preserve.

Konservide valmistamiseks kasutatakse väraket (suri-sooja), jahutatud ja külmutatud kala. (Kala nahk peab olema vigastamata ja verevalumiteta. Kala keha pind peab olema puhas, loomuliku värvuse ja tihedalt vastu nahka liibuvate soomustega (soomusteta kala nahk peab olema sile ja läikiv); lõpused helepunased, hapu või muu riknemislõhnata ja limata; kõht ei tohi olla tursunud; liha konsistents peab olema elastne ja tihe.

Tehasesse saabunud kala pestakse vastavate mehhanismide abil ja säilitatakse enne töötlemist madalas temperatuuris. Lühiajalisel säilitamisel hoitakse kala jahutatult, pikaajalisel säilitamisel aga külmutatult.

Kalakonservitööstustes kasutatakse kala jahutamist ja jahutatult säilitamist peenestatud jää tükkides, soomus- või lumejääs, peenestatud jääga merevees, jahutatud merevees, samuti hoidmist külma õhuga jäähoones või muudes spetsiaalsetes ladudes.

Mõnedes konservitehastes säilitatakse preservative valmistamiseks kasutatavat räime ja kilu lühikest aega jahe-das soolalahuses. Kui kala on vaja säilitada üks ööpäev, siis kasutatakse 18 %-lise soolakontsentratsiooniga sool-vett; kaheööpäevasel säilitamisel alandatakse soolakontsentratsiooni 10 %-ni, et vältida kala liigset sooldumist.

Ka jäähoidlaid kasutatakse kalade säilitamiseks. Värske kala säilitamise aja pikendamiseks on mõnedes välis-riikides hakatud viimastel aastatel kasutama jääd, mis sisaldab antibiootikumi - kloortetratsükliini. Niisugusel jääal on bakteriotsiidne toime paljude bakteriliikide suhtes. Arvatakse, et kalasse tunginud antibiootikum languneb konservide steriliseerimisel.

Kuigi külmutamine võimaldab tunduvalt pikendada kala säilivust enne konservimist, mõjub see siiski kala kvaliteedile negatiivselt. Külmutamisel kala lihaskoe hüdrofiilsed omadused muutuvad, mistõttu külmutatud kala üles-

sulatamisel sellest mahl tavaliselt eraldub. Eralduva mahla kogus oleneb kala külmutamise kiirusest ja säilitamise kestusest enne külmutamist. Mida aeglasemalt toimus kala külmutamine ja mida suuremad on kudedes moodustunud jääkristallid, seda suurem on mahla kadu külmutatud kala ülessulatamisel.

Pikaajalisel säilitamisel külmutushoones külmutatud kala kuivab järk-järgult, tema rasv oksüdeerub ja lämmastikku sisaldavad ained denatureeruvad, mistõttu lihal on vintske, kuiv konsistent, kibekas maitse ja ebameeldiv lõhn. Et vältida säilitamisel kala kuivamist ja rasva oksüdeerumist, külmutatud kala glasuuritakse. Selleks kastetakse kala paar-kolm korda mõneks sekundiks külma vette (kuni 5°). Glasuuritud kala glasuur aegamööda sublimeerub ja kaob, mistõttu glasuurimist perioodiliselt korratakse. Oksüdeerimist takistavate ainete lisamine glasuurile võimaldab külmutatud kala säilimise aega pikendada 2...3 kuu võrra, võrreldes ainult veega glasuuritud kala säilimise ajaga.

Hästi on õnnestunud kala hoidmine alginaadiželees. Selle meetodi rakendamisel toimub kala külmutamine kartongkarpides. Želee koostisse kuulub peale naatriumalginaadi ja piimhappe ka kaltsiumkloriidi. On andmeid, et külmutatud räim säilib alginaadiželees -25° juures hästi kuni 5 kuud.

Konservide valmistamisel pestakse kala enne ja pärast lahkamist ning vahel ka pärast tükeldamist. Mõnikord pestakse ka pärast külmutamist ülessulatatud kala.

Pärast lahkamist ja tükeldamist kala soolatakse, kuni soolasisaldus ulatub 2...3 protsendini. Kasutatakse kas märgsoolamist või kuivsoolamist. Märgsoolamise puhul hoitakse kala lühikest aega soolalahuses, mille erikaal on 1,18...1,20. Kuivsoolamise puhul lisatakse soola enne steriliseerimist otse karpi. Suurema osa konserviliikide valmistamisel töödeldakse kala enne karpi panemist termiliselt. Kala lühiajalist termilist töötlemist kuumas vees,

soolvees, aurus või kuumendatud õlis nimetatakse blanšeerimiseks. Blanšeerimisel koaguleeruvad kalalihas olevad valgud, mille tagajärjel kalaliha tiheneb osalise niiskuse eraldumise tõttu. Samal ajal hävib osaliselt kala mikrofloora ja lagunevad ensüümid. Osalise vee eraldumise tõttu kala toiteväärtus tõuseb. Kala pindmisi kihte on võimalik osaliselt veetustada kas kuuma õhu või infrapunaste kiirtega.

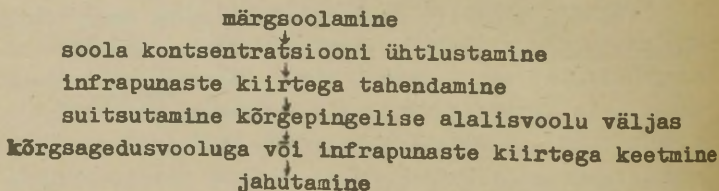
Kalakonservide valmistamiseks kasutatakse vahel ka kuumsuitsutatud kalaliha.

Kala kuumsuitsutamine toimub 90...110° temperatuuris puidu mittetäielikul põlemisel tekkiva suitsuga. Suitsutamisel toimub kalavalkude koaguleerumine, ensüümide osaline inaktiveerumine, vee aurumine, rasva ülessulamine ja lämmastikku sisaldavate ekstraktiivainete eraldumine koos kalast väljavalguva puljongiga. Suitsutamise suhteliselt kõrge temperatuur avaldab kalale mõningat steriliseerivat toimet, mida tugevdavad suitsu bakteritsiidsed omadused, sest suits sisaldab mitmeid antiseptiliste omadustega aineid.

Viimasel ajal on hakatud rakendama elektrisuitsutamist, mille olemus seisneb selles, et suitsutamiskambris luuakse kõrgepingeväli, milles suitsuosakesed liiguvad kindlaksmääratud suunas, selle tulemusena kiireneb nende sadestumine kala pinnale.

Kala kasutatakse seejuures elektroodina ja talle antakse laeng, mis on suitsuosakeste laengule vastupidine.

Elektrisuitsutamisseadme töö skeem on järgmine:



Tavalise suitsutamisega võrreldes on elektrisuitsutamisel mitmed eelised, suitsutamine toimub tunduvalt kiiremini, protsessi on hõlbus reguleerida ja rasvakaod on väiksemad. Selle menetluse puuduseks on aga toote suhteliselt nõrk suitsumaitse.

Uueks suitsutamiseviisiks on ka suitsuta suitsutamine. Siis kastetakse soolatud kalatükid 30...60 sekundiks suitsutamisevedelikku, milleks on puidu utmisproduktide lahus. Kala omandab seejuures suitsulõhna ja kollaka värvuse. Pärast seda pannakse kala soojendusaparaati, kus seda tahendatakse ja keedetakse infrapunaste kiirtega 15...30 minutit.

Kalakonservid jagatakse steriliseeritavateks ja mittesteriliseeritavateks (preservid) konservideks.

1) Steriliseeritavate konservide valmistamisel pannakse eeltöödeldud kalaliha koos õli ja lisanditega karpi ning steriliseeritakse.

2) Preservid kujutavad endast töödeldud kala, mis on paigutatud karpi koos soola, vürtside, suhkru või eriliste kastmetega. Neid karpe hoitakse preservative valmimiseni -2 kuni 2° temperatuuris. Valminud preserve hoitakse kuni tarvitamiseni -4 kuni -8° temperatuuris.

#### d. Kalakonservide steriliseerimine

Steriliseerimise peamiseks eesmärgiks on mikrofloora hävitamine toodetes ja ensüümide inaktiveerimine ning konservide kulinaarne töötlemine soojaga. Steriliseerimine peab tagama konservide maitseomaduste, toiteväärtuse ja neis sisalduvate vitamiinide säilivuse.

Kalatoodete täielik steriilsus saavutatakse 140...  
160° juures. Nii kõrge temperatuuri juures aga kala maitse halveneb ja mõned toitained ning vitamiinid lagunevad. Seepärast steriliseeritakse kalakonserve 112...120° juures, mis hävitab enamiku mikroobiliike. Säilivad vaid mõnede termofiilsete bakterite spoorid. Spooride vastupidavus

temperatuurile oleneb steriliseeritava toote liigist, spooride vanusest, arvust jms. Konservis esinevad valgud ja rasvad tõstavad, tomatikaste ja äädikhape aga vähendavad bakterispooride vastupidavust kuumutamisele. Tomatikastme bakteritsiidset toimet tõstavad vürtsid, eriti koriander.

Kalakonservide steriilsuse tagamiseks tuleb rangelt kinni pidada tootmise sanitaarreežimist. Vaatamata püüetele ei õnnestu alati saada steriilset toodangut.

Vaikse Ookeani Kalamajanduse ja Ookeanograafia Teadusliku Uurimise Instituudi andmeil kuuluvad kalakonservide jääkmikrofloorasse kõige sagedamini aeroobsetest sporogeensetest bakteritest Bac. subtilis, Bac. cereus jt. Nimetatud aeroobsed bakterid ei kujuta aga endast konservide saatusel ohtu, sest nende spoorid vaevalt hakkavad arenema hermeetilistes konservikarpides.

Kalakonservide jääkmikrofloorasse kuuluvad sageli ka termofiilsete bakterite Lactobac. thermophilus ja Bac. thermophilus anaerobicus spoorid. Ka nende bakterite spoorid ei ole ohtlikud, sest nad hakkavad arenema alles 40... 60° juures.

Kui konservide valmistamisel ei peeta kinni tehnoloogilisest režiimist, siis võib jääkmikrofloora hulgas leida ka anaeroobsete bakterite liike (Bac. sporogenes, Bac. lentoputrescens, Bac. perfringens ja harva Cl. botulinum). Mainitud bakteritest on kõige ohtlikum Cl. botulinum, kes produtseerib inimestele ohtlikku mürgist toksini. Cl. botulinum'i toksiin on vastupidav maomahla soolhappele. Toksiini toime nõrgeneb järk-järgult 100° temperatuuris, aluselises keskkonnas, valguse ja õhu toimel. Ka 120° temperatuuris steriliseerimisel ei ole garanteeritud Cl. botulinum'i spooride hävimine. Konservide saastumist botulismitekitajatega ei ole võimalik kindlaks teha väliste tunnuste järgi, sest karpide kummumist ei teki.

Toidumürgistusi võivad põhjustada ka stafülokokkide patogeensete vormidega saastunud konservid, sest need produtseerivad enterotoksiine. Stafülokokke tuleb ette pea-

miselt ainult suitsukala õlikonservides, sest kuumutamise suhtes tundlikud mikroobid võivad säilida õli kaitsva toime tõttu.

Kõik kalakonservid steriliseeritakse kindlaksmääratud ja kontrollitud režiimide järgi. Konservide steriliseerimisrežiimid olenevad konservitaara liigist, toodete keemilisest koostisest ja omadustest, saastumise astmest, mikrofloora iseloomust ning sterilisaatorite tehnilistest võimalustest.

Plekktarasse pakitud kalakonserve steriliseeritakse autoklaavis 120° juures. Klaaspurkidesse pakitud kalakonserve steriliseeritakse kuumas vees veesurve või suruõhu abil loodava vasturõhuga.

Viimasel ajal on hakatud rakendama ka kõrgsagedusvooluga steriliseerimist.

Kõrgsagedusvooluga steriliseerimine erineb põhimõtteliselt konservide steriliseerimisest auruga või mõne muu soojusallikaga kuumutamise teel. Sellise steriliseerimisviisi puhul tekib soojus üheaegselt kogu toote mahus, olenemata selle soojajuhtivusest. Tootesse neelduv elektrienergia muutub soojusenergiaks, mille toimel mikroobid hävivad. Steriliseerimise kestus on lühem kui tavalise steriliseerimise puhul, mistõttu toote loomulikud omadused säilivad tunduvalt paremini.

Kalakonserve on võimalik steriliseerida ka kuumutamise ta, kasutades ioniseerivaid kiirgusi. Selle steriliseerimisviisi kasutamine on aga piiratud, sest ei ole veel täielikult selgitatud, kas kiiritamine põhjustab mürgiste ainete tekkimist toodetes või mitte.

#### e. Tootmiskontroll kalakonservitehastes

Tehnilise, keemilise ja bakterioloogilise tootmiskontrolli tagamiseks peavad konservitehase laboratooriumis töötama kvalifitseeritud insenerid, tehnoloogid, keemikud ja mikrobioloogid.

Kontrolli teostatakse kalakonservitehastes organoleptiliste, füüsikaliste, keemiliste, füüsikalis-keemiliste ja mikrobioloogiliste meetoditega.

Organoleptiliselt määratakse konservi välimus, värvus, lõhn, maitse ja konsistents.

Keemiliste meetoditega määratakse tootes vee-, rasva-, valgu-, sahhariidi-, vitamiini- ning maitseainete ja konservimisagensite (keedusool, äädikhape) sisaldus ja tehakse kindlaks toote kvaliteeti halvendavate raskemetalli soolade olemasolu.

Füüsikaliste ja füüsikalis-keemiliste meetoditega kontrollitakse tehnoloogilise protsessi tingimusi, nagu temperatuuri, õhu niiskust jm.

Mikrobioloogiliste meetoditega kontrollitakse ettevõtte tootmisseadmete ja inventari sanitaar-hügieenilist seisukorda, tooraine, pooltoodete ja materjalide mikroobidega saastatuse astet ning konservide steriilsust.

Mikrobioloogilised analüüsid tehakse vajaduse korral ka tükeldatud kala saastatuse määramiseks.

Konservide saastatust mikroobidega enne steriliseerimist kontrollitakse kaks korda vahetuse jooksul. Nimelt võetakse vahetuse algul ja pärast lõunavaheaega valmistatud esimese 10 karbi hulgest üks konservikarp bakterioloogiliseks analüüsiks.

Analüüsil määratakse kindlaks mikroobide nn. üldarv ja eraldi nende spooride arv. Kui 1 g tootes avastatakse üle 5000 mikroobi või üle 50 spoori, siis võetakse toote bakteriaalse saastumise kollete ja põhjuste selgitamiseks otsekohe abinõud tarvitusele. Selleks korraldatakse konservide valmistamise protsessi täielik mikrobioloogiline uurimine. Analüüsiandmete alusel tehakse kindlaks toote bakteriaalse saastumise kolded.

Bakterioloogiliste analüüside tegemisel pööratakse tähelepanu mitte ainult mikroobide arvule, vaid ka mikrofloora liigilisele koosseisule. See on väga tähtis, sest toote saastatus termofiilsete mikroobidega võib põhjustada

suure arvu konservikarpide bombaaži (mõhnumist) pärast steriliseerimist.

Kalakonservide toiteväärtus on kõrge, sest nende valmistamisel kõrvaldatakse mittesöödavad osad ja lisatakse õli ning maitseaineid, mis parandavad kala maitseomadusi ja töstavad toiteväärtust.

Konservide toiteväärtust hinnatakse neis leiduvate valkude, rasvade, mineraalainete, vitamiinide ja sahhariidide sisalduse järgi.

Kalakonservides moodustavad lämmastikku sisaldavate ainete põhimassi valgud, 80...97 % üldlämmastikust on valgulämmastik.

Sprotikonservis on keskmiselt 54 % kuivainet, sellest 16 % valku, 31 % rasva, 0,6 % sahhariide ja 3 % mineraalaineid. Sellise konservi aktiivne happesus (pH) on 6,5 ja tiitritav happesus 0,3. 100 g sprotikonservi vaba energia sisaldus on 365 kcal (kalorsus on 365). Tomatikastmeskonservide kuivainesisaldus on enamasti madalam kui õlikonservide kuivainesisaldus. Näiteks tomatikastmes haugikonservi kuivainesisaldus on keskmiselt 25 %, valgusisaldus 14 %, rasvasisaldus 4 %, sahhariidide sisaldus 3,6 % ja mineraalainete sisaldus 3 %. Selle konservi aktiivne happesus on 5,5 ja 100 g kalorsus ainult 110 kcal.

Mineraalainetest sisaldavad kalakonservid K-, Na-, Ca-, Mg-, Fe-, P-, I-, Mn- ning Cu-soolasid jne. Näiteks 100 g sprotikonservis on 350 mg K<sub>2</sub>O, 635 mg Na<sub>2</sub>O, 300 mg CaO, 53 mg MgO ja 348 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Lakkimata plekk-karpi paigutatud kalakonservides teki-  
vad tinasoolid, mille sisaldus 1 kg toote kohta ei tohi üle-  
tada 200 mg.

Kalakonservides on vitamiinide A, B<sub>1</sub> ja C sisaldus ma-  
dal, märgatavalt rohkem on vitamiine B<sub>2</sub> ja PP.



## 5. Munade ja munaproduk- tide mikrobioloogia

Muna toiteväärtus on kõrge, ta sisaldab toorkaalust keskmiselt 12 % täisväärtuslikke valke, 11,4 % kõrgväärtuslikku rasva, mineraalainest kaltsiumi, fosforit ja rauda, peale selle vitamiine A, B<sub>1</sub>, E, D jt. Vitamiini C sisaldus on seevastu munas madal.

Muna koosneb koorest, kestast, munavalgest ja munakollasest. Muna koores on 4...30  $\mu$ m diameetriga poerid. Muna koor koosneb põhiliselt kaltsium- ning magneesiumkarbonaatidest ja -fosfaatidest. Munavalge ja -kollane erinevad oma koostiselt suurel määral. Kui munavalge sisaldab peamiselt vaid vett ja valke, siis munakollases on väärtuslikke toitaineid rohkem, nimelt valke, rasva, vitamiine, mineraalaineid ja tähelepandavalt kõrges koguses letsitiini. Munas esinevaid toitaineid omastab organism 95...97 % ulatuses.

Toiduks kasutatav muna peab olema värake. Täiesti värskel munal on koor puhas ja läikiv, munavalge on kergelt sültjas, munakollane asub muna keskel ja eraldub munavalgest järsu piirdega ning on sellest kergesti eraldatav.

Olenevalt munade vanusest, samuti kvaliteedist, kaalust ja säilitamisviisist liigitatakse kanamunad dieet-  
je laumunadeks. Esimesse liiki kuuluvad munad, mis jõuavad tarbijani hiljemalt 5 ööpäeva pärast munemist ning mida ei ole hoitud minustemperatuuril või lubjalahuses. I. kategooria dieetmunad kannavad punasevärvilist, II kategooria munad aga sinisevärvilist tekplit. Kategooriatesse jaotamine toimub suuruse alusel. Kasalikuna on tarvitada I kategooria mune (suuremates munades on veesisaldus väiksem). Silmas tuleb pidada, et karkeeritakse ainult dieetmune.

Laumunadeks kvalifitseeritakse värsked külhooones ja lubjalahuses säilitatud mune.

Konservitud munade kasutamisel peab arvestama, et munavalge ei ole enam hästi vahustatav ja enne keetmist peab koosesse torkama mõned augud, sest muldu munakoos lõhkeb.

Tervetelt kanadelt saadud munad on mikroobivabad. Nii-  
suguseid mune võib säilitada värskena pikemat aega, kül-  
hoone tingimustes koguni pool aastat ja kanemel. Kui soov-  
vitakse kodus mune säilitada, siis on soovitatav sulgeda kas  
vaselini või parafiiniga munakooses olevad poorid, et ta-  
kistada mikroobide sissepääsu munasse. Paar kuni kolm kuud  
on võimalik mune säilitada ka soola või liiva sees, hästi  
sobib ka 10 %-line vesiklaasi- või lubjalahus.

Kui mikroobid on munasse sattunud, siis riknevad mu-  
nad kiiresti, sest muna on mikroobidele väga soodsaks are-  
nemiskeskkonnaks. Eriti kiiresti rikneb munarebu. Muna-  
valge säilib värskena kauem, sest see sisaldab bakterit-  
siidse toimega ainet lüsotsüümi ning munavalge pH (8,0...  
9,0) pidurdab mikroobide paljunemist samuti mõnel määral.

Mikroobid võivad munasse sattuda nii endogeenselt kui  
ka eksogeenselt.

Endogeenselt võivad munad infitseeruda kanade söötmis-  
vigade ja haiguste puhul juba munasarjas ja munajuhas.  
Näiteks võivad salmonelloosi ja tuberkuloosi põhdevate ka-  
nade munad sisaldada nende haiguste tekitajaid.

Eksogeenselt nakatuvad munad mikroobidega kooses esi-  
nevate pooride kaudu. Mikroobide pooride kaudu munasse  
tungimist tõkestab teataval määral koort kattev õhuke pea-  
liskest, mis aga munade käsitsemisel ja transportimisel  
kergesti hävib.

Munakoorel leidub mitmesuguseid mikroobe ja mikroseen-  
te spore, mis seal idaneda võivad. Mikroobid paljunevad  
ja tungivad pooride kaudu munasse. Toatemperatuuris tungi-  
vad mikroobid munasse pooride kaudu 1...2 nädala jooksul.  
Paari nädala jooksul toimub munavalkude osaline hüdroliüs  
ja lüsotsüümi inaktiveerumine. See loob soodsad tingimu-  
sed mikroobide sissetungiks. Eriti kiiresti tungivad mu-  
nasse need mikroobid, mis on võimelised lahustama lubja-

koore all asuvat sisemist koorekesta, näiteks Proteus vulgaris, Bac. subtilis, Bac. pumilus, Ps. fluorescens. Muna riknemist põhjustavad veel E. coli, Achromobacter sp., Serratia sp., Ps. aeruginosa, Cl. butyricum, peale selle mitmesugused flavobakterid, diplo-, strepto- ja mikrokokid.

Kui muna roiskumise põhjustajaks on perekonna Proteus liigid, siis munakoore kaotab loomuliku värvuse, tuhmub ja omandab hallikas-roheka varjundi. Munavalge muutub halliks ja rebu mustjasrohelisteks. Niisugune muna lõhnab tavaliselt juba ka väävelvesiniku järele ( $H_2S$  tekib väävlit sisaldavate valkude lagunemisel).

E. coli'ga saastumise korral munakoorel muutusi märgata ei ole, küll aga lõhkeb rebukest, mistõttu rebu seguneb munavalgega ja muna sisu tervikuna lõhnab juustusarnaselt.

Külmahoonetes säilitamisel põhjustavad munade riknemist peamiselt perekondade Pseudomonas ja Achromobacter liigid. Nende liikide elutegevusest tuleneva riknemise algul muutub munavalge rohekaks ja hakkab veelduma, sellesse tekivad aegamisi väikesed valged helbed. Pikkamisi muutub munavalge kas kollakasrohelisteks või koguni pruuniks. Rebus ei toimu pikema aja jooksul muutusi. Sellise muna lõhn võib meenutada sagedasti kas rohu või ammoniaagi lõhna.

Munakoorel esinevad hallitusseened kasvavad läbi pooride munasse, kus neil on arenemiseks soodsad tingimused. Seenniidid arenevad eriti lopsakalt muna õhuruumis, kust nad tungivad munavalgesse, moodustades seal tiheda põimiku. Munade hallitamine oleneb säilitamisruumi temperatuurist, õhuniiskusest ja muna vanusest. Täiesti värsked munad ei hallita, kahe kuni kolme nädala vanused munad hallitavad aga intensiivselt, sest munavalge kaotab selleks ajaks bakteritsiidsed omadused. Munade hallitumist põhjustavad mikrooseente perekondade Penicillium, Aspergillus, Cladosporium, Mucor jt. liigid.

Inimestele patogeensetest mikroobidest võivad munades esineda perekonda Salmonella kuuluvad mikroobid. Sagedamini esinevateks liikideks on seejuures S. gallinarum, S. typhimurium ja S. enteritidis. Salmonellidega infitseerumisest tekib inimesel toidumürgistusi kanamunade puhul harva, pardimunade puhul aga võrdlemisi sagedasti. Raskekujulisi, mõnikord surmaga lõppevaid toidumürgistusi põhjustavad infitseerunud munadest valmistatud kuumutamata munatoidud. Tugev keetmine hävitab munas esinevad salmonellid. Pardimune tuleks keeta 8...10 minutit ja pärast keetmist aeglaselt jahutada.

Munamelanž valmistatakse värskest munadest, mis eraldatakse koorest, segatakse, filtreeritakse ja säilitatakse külmutatult plekktoosides. Külmutamine toimub  $-15...-18^{\circ}$  juures, säilitamine aga  $-5...-10^{\circ}$  juures. Munamelanž on kergesti riknev toode, mida kasutatakse peamiselt töötuaes. Mikroobidest satuvad kõige sagedamini melanži mitmesugused kokid ja mikroseened, mõnikord ka *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Bac. subtilis*, harvem patogeensed bakterid perekonnast *Salmonella*. Kui melanži säilitatakse madalas temperatuuris, siis valmistamisel melanži sattunud mikrofloorast osa hävib. Pardimunadest valmistatud melanžis on ligikaudu 10 korda rohkem *Salmonelle* kui kanamunadest valmistatud melanžis. Et munade koor on sagedasti saastunud salmonelloosi tekitavate bakteritega, siis on soovitatav muna koort puhastada ja desinfitseerida hõbenitraadi lahusega (1:20000) 15 minuti jooksul. Pärast seda pannakse munad 2 % -lisse söögisooda lahusesse ja lõpuks pestakse veega. Melanži sanitaarse seisundi hindamiseks määratakse kolititer, amonifitseerivate bakterite arvukus, eriti aga vulgaris'e ja Salmonella-rühma arvukus. Kui melanž on saastunud ainult *Pr. vulgaris*'ega, siis on selle organoleptilised omadused täiesti normaalsed ja seda võib kasutada nende toodete valmistamiseks, mida küpsetatakse suhteliselt madalal temperatuuril. Kui melanži kolititer on 0,1 või madalam, siis võib seda kasutada vaid nende toodete valmistamiseks,

kus kasutatakse kõrget temperatuuri, sedagi tingimusel, et melaníis ei esine patogeenseid mikroobe.

Munapulber valmistatakse kõrgekvaliteedilistest kanamunadest ja melaníist. Munapulber saadakse munavalge ja -kollase kuivatamise ja jahvatamise teel. Produkt ei sisalda üle 9 % vett. Hea munapulber on kollaka värvusega, ühtlaselt pulbriline, hea lõhna ja maitsega. Munapulber rikneb kiiresti, seepärast tuleb seda hoida õhukindlas nõus ja kuivas ruumis, relatiivse õhuniiskusega mitte üle 60... 65 %. Ka munapulbrisse võivad valmistamise käigus sattuda mikroobid. Kõige sagedamini leidub Subtilis-rühma, coli-aerogenes-rühma ja stafülokokkide esindajaid, mõnikord aga ka tuberkuloosi- ja salmonelloositekitajaid jt. On kindlaks tehtud, et salmonelloositekitajad võivad munapulbris säilida kuni 9 kuud. Lindude tuberkuloositekitajad (*Mycobacterium tuberculosis avium*) muutuvad kahjutuks 8...10-minutilise keetmisel. Munapulbri sanitaarse seisundi hindamiseks tuleb läbi viia samad analüüsid mis melaníi puhul.

## 6. Sööta de m i k r o b i o l o o g i a

Taimede maapealsetel ja maa-alustel osadel esineb alati mitmesuguseid mikroobe. Mikroobide kasvu ja arengut taimeosadel võimaldab asjaolu, et taimerakkudest eksosmoot-  
selt eritub mitmekesisist mikroobidele kasutuskõlblikku orgaanilist ainet. Et orgaanilise aine eksosmoos sõltub taime kasvufaasist, siis erineb ka mikroobide arvukus taimeosadel vegetatsiooni eri perioodidel.

Taimede maapealsetel osadel esinevad peamiselt rois-  
bakterid (*Ps. herbicola, Ps. fluorescens, Bac. subtilis, Aerobacter cloacae, A. aerogenes* jt.), piimhappebakterid

(Lactob. plantarum, Str. mesenterioides, Lactob. brevis jt.), võihappebakterid (Cl. butyricum), mikroseenad (perekonnad, Penicillium, Aspergillus, Gladosporium, Botrytis, Geotrichum) ning pärmid (Saccharomyces, Candida).

Taimede epifüütsest mikrofloorast on peamise praktilise tähtsusega piimhappebakterid, sest nende poolt produtsseeritud piimhape takistab roisubakterite ja võihappebakterite paljunemist silos.

Siloks ehk silosöödaks nimetatakse mahlakat loomasööta, mis saadakse haljas- ja toorsööda loomulikul või kunstlikul hapendamisel. Silo võib edukalt asendada haljas-, kore- ja jõusööta ning juurvilja. Õigesti valmistatud silos säilitab lähtematerjal oma omadused - roheline värvuse ja mahlakuse, kusjuures taimede kõvad osad muutuvad pehmeks ja söödavamaks, toitainete, vitamiinide ja mineraalsoolade kaod on aga väikesed.

Silo on toitainete kõrge kontsentratsiooniga sööt. Silo ühes söötühikus on umbes 1,5 kg kuivainet, millest vaid 0,5 kg on ballasti (söötühiku (sü) all mõistetakse 1 kg kaera toitainetesisaldust, ühe söötühiku annab näiteks 7,4 kg maisisilo).

Liblikõieliste silo on valgurikas toorsööt. Oskuslikult valmistatud silo ei jää maha karjamaasöödast, põld- ja kultuurheinast ning ületab üldiselt toiteväärtuselt söödajuurviljad- ja mugulviljad, aga ka söödateraviljad. Sellise silo valgurikkus on suure tähtsusega, sest valgupuudus söödas pidurdab kõige rohkem loomade produktiivsuse tõstmist. Mineraalainetest leidub silos palju Ca ja P: Üks sü silo sisaldab keskmiselt 15...30 g CaO ja 3...6 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Sileerimisel säilivad ka vitamiinid. Ainult punane porgand on vitamiinide poolest rikkam kui silo. Noorelt koristatud ja hästi säilitatud heina vitamiinisisaldus on silo vitamiinisisaldusega võrdne, kõik teised söödad jäävad vitamiinide osas silostkaugele maha.

Sileerimismaterjaliks võivad olla

① spetsiaalselt silo valmistamiseks kasvatatud kultuurid;

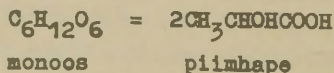
- 2) põldhein ja niiduhein ning nende ädal;
- 3) põllunduse ja köögiviljanduse jäätmed (pealsed);
- 4) juur- ja mugulviljad;
- 5) põllumajandussaaduste töötlemise jäätmed (praak, õlleraba, peedimass, pulp (tähtsusetööstuse jääk));
- 6) metsikult kasvavad taimed - pilliroog ja kõrkjad.

Silokultuurid võivad anda hektari kohta 5000 ja rohkem sü, seejuures 500 ja rohkem kg seeduvat valku.

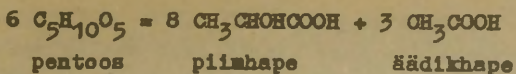
#### a. Sileerimisprotsessi mikrobioloogia

Mikroobide paljunemise dünaamika silos sõltub sileeritava materjali mahla sahhariidisisaldusest ja silo tihedusest. Silos esinevate mikroobide selekteerumine oleneb peamiselt silo hapniku-, piim-, ja äädikhappesisaldusest ning mahla puhverduomadustest. Silos esineva hapniku hulk pidevalt väheneb ja CO<sub>2</sub> hulk tõuseb taimerakkude ja mikroobide hingamise tagajärjel. Hapnikusisalduse languse ja CO<sub>2</sub> sisalduse tõusu tõttu lähevad taimerakud üle anaeroobsele energia vabastamisele, mille tulemusena tekib etüülalkoholi ja CO<sub>2</sub>. Süsihappegaasi eraldavad silosse ka atüüpilised piimhappebakterid, roisubakterid, võihappebakterid ja pärmid.

Et süsihappegaasi moodustamiseks kulutatakse rohkesti sahhariide, siis tuleb sileerimisel rakendada kõiki võtteid CO<sub>2</sub> tekkimise pidurdamiseks. Süsihappegaasi produktsiooni on võimalik pidurdada piimhapekäärimise aktiivse teel. Piimhapekäärimisel tekib lõpp-produkt teatavasti ilma CO<sub>2</sub> moodustumiseta



Keskkonnatingimused ja silo koostis mõjutavad piimhappelise käärimise kulgu ja käärimisprodukte. Näiteks tüüpilise piimhappebakteri - L. plantarum'i toimel tekib pentooside oksüdeerimisel piimhappe kõrval ka äädikhape



Piimhappebakterite esinemissagedus sileeritavatel taimedel varieerub, sõltudes taimeliigist, kasvufaasist, taime pinna ja massi vahelisest suhtest, kasvukohast, aastaajast ja ilmastikust.

Alati ei jätku taimeosadel esinevatest piimhappebakteritest intensiivse piimhapekäärimise esilekutsumiseks, mistõttu on soovitatav lisada piimhappebakterite juuretist.

Silo sügavamates kihtides on tingimused piimhapekäärimiseks soodsamad, seal väheneb roisubakterite ja teiste gaasimoodustajate aktiivsus. Mõned roisubakterid nagu *A. cloacae* arenevad hästi ka anaeroobsetes tingimustes. Hapete moodustumine on suurel määral silomassi temperatuurist.

Sileerimisprotsessi faasid on 1) epifüütse mikrofloora domineerimise faas, 2) silo peakäärimise faas, 3) piimhapekäärimise hääbumise faas.

Silohoidlasse paigutatud haljasmassi rakkude turgor langeb, kolloidid koaguleeruvad ja rakukestad katkevad osaliselt, mille tagajärjel eraldub rakumahl, mis täidab massis olevad tühikud. Taimerakumahl on heaks toitekeskkonnaks haljasmassiga hoidlasse sattunud mikroobidele, kelle seas ülekaalukas osa kuulub roisubakteritele (*Ps. herbiicola*, *Ps. fluorescens*, *Aerobacter cloacae*). Nende kõrval hakkavad arenema ka pärmsened, batsillid ja piimhappebakterid. Esimeses faasis võib happebatsillid harilikult arenema ei hakka. Haljasmassis ja sellest eraldunud mahlas jätkuvad ensümaatilised protsessid. Temperatuur on sellel perioodil 30...35°. Mahlakas, hästi tihendatud silos kujuneb esimene faas lühikeseks. Kohevas haljasmassis kujuneb aga I faas võrdlemisi pikaks, mis võimaldab roisubakterite tormilist arenemist. J. Klaari andmeil ulatub mittehuldavalt tihendatud liblikõieliste haljasmassis roisu-



bakterite arv 1 g massi kohta 600...700 miljonini. Roisubakterite intensiivne kasv tingib silo mahlas esinevate valkude lagunemist, mille tulemusena moodustub ammoniaaki, indooli ja skatooli. Piimhappebakteritest kohtame käärinise I faasil nõrga happetekitamisevõimega Str. mesenterioides't.

Sileerimise peakäärinise faasis (II) saavutab normaalselt valmivas silos ülekaalu piimhapekäärimine, vähenema hakkab aga aeroobsete roisubakterite arv. Enamik roisubakteritest hävib happelise keskkonnareaktsiooni tõttu ja hapnikupuuduse pärast, säilivad aga Bac. pumilus'e, Bac. subtilis'e ja Cl. butyricum'i spoorid. Kui silohoidlas mingil põhjusel aga langeb silomassi happesus (vihmavesi, põhjavesi) või tõuseb hapnikusisaldus, siis hakkavad batsillide spoorid idanema. Õhu juurdepääs võimaldab mikroosente arenemist, kes kasutavad ära silo orgaanilised happed, mille tagajärjel keskkonnareaktsioon muutub neutraalseks, see aga võimaldab roisubakterite intensiivset arenemist ning ühtlasi algab energiline valgu lagunemisprotsess.

Peakäärinise faasis hakkab silos intensiivselt arenema L. plantarum. Selle mikroobi rakkude arv tõuseb 1 g silos hõlpsasti sileeruva materjali puhul 1,2...1,4 miljardini. Str. mesenterioides kui tundlik tugevamalt happelise reaktsiooni suhtes surutakse kergesti sileeruva materjali puhul L. plantarum'i poolt alarindesse. Liblikõieliste silos vältab Str. mesenterioides'e paljunemine suhteliselt kauem, mistõttu seal on ka roisubakterite arvukus pikemat aega kõrgem.

Peakäärinisel esineb L. plantarum'i kõrval ka L. breve, mis on happesuse suhtes resistentsem ja hakkab domineerima alles neljandal-viiendal sileerimisinädalal. Peakäärinise faasis paljunevad ka perekonna Saccharomyces liigid, kuid nende arvukus tõuseb vaid mõnekümne tuhandeni 1 g silo kohta.

Sileerimise kolmandas faasis, mis on tuntud piimhapekäärinise hääbumise faasina, piimhappebakterite paljunemine

pikkamisi vaibub. Bakterite tekitatud piimhape koguneb ja hakkab pikapeale kahjulikult mõjuma nii happetekitajatele kui ka *L. breve*'le, kes on küll piimhappebakteritest happeskontsentratsiooni suhtes vastupidav.

Juuretiste kasutamine sildeerimisel. Sildeerimisel on otstarbekas kasutada juuretisena *L. plantarum*'i tüvesid, mis on isoleeritud kõrgekvaliteetsest silost.

*L. plantarum*'i tüvedest kultuuride valmistamiseks võetakse 1/2 liitrit 6...8 %-list õllevirret (suhkrusisaldus sahharimeetri järgi 6...8 %), millele lisatakse 1 % peenes- tatud kriiti ja steriliseeritakse 0,6 atm. juures 30 minu- tit. Jahutatud õllevirdesse lisatakse 0,5 % *L. plantarum*'i vedelkultuuri ja asetatakse termostaati (25°) kaheks ööpäe- vaks. Selle aja jooksul tõuseb kultuuri happesus 80...90° Th -ni ja üks ml sisaldab siis keskmiselt 1...1,3 miljardit piimhappebakterit.

*L. plantarum*'i õllevirdekultuurist on võimalik ka ma- jandis juuretist valmistada, mida lisatakse ühele tonnile haljasmassile 5...8 liitrit. *L. plantarum*'i kultuurist val- mistatakse majandis tarbejuuretis. Tarbejuuretise valmista- miseks võetakse kaera, timuti, herne või ristiku paari sen- timeetri pikkusi hekslaid. Hekslid (10 kg) asetatakse puh- tasse kotti, kuhu lisatakse ka 5 kg kas rukki-, kaera- või odrajahu. Kott paigutatakse katlasse, milles on 100...105 l vett ja keedetakse 1 tund. Hekslikott võetakse katlast välja, sööde valatakse piimanõudesse ning jahutatakse 40°- ni, siis inokuleeritakse see 0,5 %-lise piimhappebakterite kultuuriga. Kultuur paigutatakse sooja ruumi (20...25°) kaheks päevaks. Niisugust juuretist lisatakse tonnile hal- jasmassile vähemalt 5 liitrit. Viimasel ajal kasutatakse seda võimalust väga harva.

Silobakteripreparaatide tööstusliku tootmise tehnoloogia Eesti NSV tingimuste jaoks töötas välja J. Klaar.

J. Klaari järgi kasvatatakse silobakterijuuretist si- lobaktermassi valmistamistehnoloogias juustuvadakupuuvilla- koogi-hüdrolüsaatsöötmes pepsiini ja mangaankloriidi lisa-

misega ning perioodilisel neutraliseerimisel. Sellest eraldatakse mikroobirakud tsentrifuugimisel. Ühest tonnist söötmetest saab 12...15 kg silobaktermassi. Seda kasutatakse vahetult sileerimisel ja ühe tonni haljasmassi kohta kulub 40...50 g (lahustatuna 10...15 liitris vees).

Silobaktermassi on võimalik kasvatada ka juustu-, kohupiima- ja kaseiinivadaku baasil ning hüdrolüüsitud rukki-hernejahu-vadaku söötmes.

Silobakterkultuur väljastatakse enamasti kuivpreparaadina, kas brikettidena või tünni pakitult.

## b. Silo bakterioloogiline uurimine

Silo bakterioloogiliseks uurimiseks võetakse proovid hoidla mitmest kohast, vähemalt 50 cm sügavuselt. Proovid võetakse spetsiaalsete steriilsete puuride abil ja viiakse steriilsetesse klaaspnrkidesse. Proovi massi peab olema vähemalt 0,5 kg. Proovid püütakse analüüsida võimalikult kohe. Kuni analüüsimiseni hoitakse proove vähemalt 5° temperatuuris.

Laboratooriumis võetakse toodud proovidest analüüsiks omakorda 50-grammine keskmine proov, mida uuritakse Üleliidulise Põllumajandusliku Mikrobioloogia Instituudi poolt väljatöötatud lahendusmeetodil.

Silos määratakse roisubakterite ja piimhappebakterite arvukus, Escherichia-Klebsiella rühma bakterite ning viihappebakterite tiiter.

Roisubakterite arvukus määratakse lihapeptonagaril kolme päeva jooksul 30° juures.

Escherichia-Klebsiella rühma tiiter määratakse tavaliselt Kessleri söötmes 37° juures. Sileerimisprotsessi algul võib selle rühma mikroobide tiiter tõusta kuni 10<sup>8</sup>. Viimasel ajal soovitatakse mitmete autorite poolt kolibakterite arvukust määrata Endo söötmel. Et Endo söötmel kasvavad ka mõned teised bakterid, nagu Ps. fluorescens, siis on soovitatav sellele lisada 100 ml kohta 1 ml 5%-list fenoolilahust, mis pidurdab saastavate mikroobide, mitte aga kolibakterite arenemist.

Võihappebakterite tiiter määratakse kartulisöötmes ja steriilses piimas 37° juures 3 päeva jooksul. Kartulisöötme valmistamiseks võetakse 300 g kooritud aurutatud kartuleid 1 liitri vee kohta. Kartulid purustatakse ja saadud massi steriliseeritakse 1 tund 1 atm juures.

Võihappebakterite spooride määramiseks hoitakse katseklaasidesse tehtud külve 10 minuti jooksul 80° juures, millise aja jooksul hävivad bakterite vegetatiivsed vormid. Kralduva gaasi jälgimiseks on soovitatav kultuurid katseklaasides katta sulatatud parafiiniga. Võihappebakterite tiitri määramisel arvestatakse gaasi moodustumist ja tüüpilist võihappe lõhna. (Võihappebakterid on ümarate otstega pikad pulkpisikud, millel spoorid moodustuvad kas terminaalset või tsentraalselt, need mikroobid kuuluvad perekonda Clostridium ja on kõik anaeroobid).

Kvaliteetses silos ei tõuse võihappebakterite tiiter üle 10, võihappeliselt käärinud silos aga on nende tiiter  $10^6 \dots 10^8$ .

### c. Söötade pärmistamine

Söödapärmi kõrval on suure praktilise tähtsusega söötade pärmistamine, mida on majandis võimalik hõlpsasti läbi viia.

Pärmseened sisaldavad palju kergesti seeduvat valku ning on rikkad ergosterooli ja riboflaviini (vitamiin B) pooldest. Seetõttu on söödapärmil ja pärmistatud söötadel suur tähtsus.

Söötade, eriti jõusöötade pärmistamisel kasutatakse kahte meetodit: 1) pärmistamine juuretisega ja 2) pärmistamine juuratiseta.

1) Juuretise kasutamisel tehakse 12 tundi enne sööda valmistamise algust presspärmil (S. cerevisiae) rikastus. Selleks valmistatakse pärmistamisele kuuluvast söödast (10 %) sooja vee lisamisega rokk, millele lisatakse temperatuuril 30...35° iga kg sööda kohta 5 g pärmil. Pärmil rikastamiseks

hoitakse rokka 24...27° juures 6 tundi (aeg-ajalt segatakse), siis lisatakse rikastatud pärmile veel 10 % sööta ja niipalju vett, et segu konsistents oleks tainataoline. Segu hoitakse samas temperatuuris ja segatakse 15-minutiliste vaheaegade järele.

Söötade pärmistamine viiakse läbi kastides. Juuretisele lisatakse esialgu 1/5 osa töödeldavast söödast ja niipalju sooja vett, et saadakse paks rokk. Segatakse ja 30 minuti järel lisatakse 1/5 osa söödast. Kolme tunni pärast lisatakse ülejäänud 2/5 osa sööta. Mass segatakse vähese veega ja 3 tunni järel on sööt tarvitamiseks valmis.

Järgmise teo pärmistamiseks võetakse juuretise asemel eelmisel päeval valmistatud pärmistatud sööta. Iga 5...10 päeva järel tuleb valmistada uus pärmijuuretis, sest söödas kasvavad ka piimhappebakterid ja Cryptococcus'e ning Myco-derma' perekonna pärmseened.

Juuretiseta meetodil toimub sööda pärmistamine 6...8 tunni jooksul. 1/5 osa töödeldavast söödast rikastatakse pärmiga rokataolisel konsistentsil. Iga kg sööda kohta lisatakse 5 g presspämi. 3...4 tunni pärast lisatakse kogu pärmistamiseks ettenähtud sööt rikastisele ja segatakse sooja veega paksuks pudruks. Seda massi hoitakse veel 3...4 tundi 24...27° juures, et pärm saaks küllaldaselt paljuneda. Pärast seda on sööt rikastatud ja seda võib sööta loomadele.

Mõnedes majandites kasutatakse loomasöödana ka õlleraba, praaka, pulpi ja kalatööstuse jäätmeid. Ölleraba, pulp ja praak kui veerikkad tööstusjäätgid (veesisaldus 80. 96 %), riknevad kiiresti neis paljunevate mikroobide (Bac. subtilis, Bac. pumilus, Ps. fluorescens, Pr. vulgaris jt.) elutegevuse tagajärjel.

Kalatööstuse jäätmed kui valgurikas materjal riknevad hõlpsasti valgulagundajate mikroobide (Ps. fluorescens, Pr. vulgaris, Bac. subtilis, Bac. pumilus, Cl. putrificum, Cl. sporogenes) intensiivse arenemise tagajärjel.

Ölleraba tuleb kiiresti sööta loomadele, lühiajalist

säilimist soodustab hapu vadaku lisamine, mis pidurdab valgulagundajate ja võihappebakterite kasvu. Ka kartulipulbi säilimist soodustab hapu vadaku lisamine, mis soodustab piimhapekäärimist. Praaka on otstarbekohane säilitada sileeritult. Sileerimiseks võetakse ühe kaaluosa aganate kohta 2,5 kaaluosa praaka. Ka kalajäätmeid on majandites soovitatav sileerida või hapestada. Kalajäätmeid sileeritakse koos kartulitega, kusjuures 100 kg kartulite kohta võetakse 10...15 kg kalajäätmeid. Kui kalajäätmeid soovitakse säilitada hapestamise teel, siis lisatakse 100 kg jäätmete kohta 1,5...3,0 kg sipelghapet või 3...4 kg kontsentreeritud väävelhapet.

## 7. Kasvuainete mikrobioloogiline tootmine

Käesolevas õpikus loeme kasvuainete hulka kuuluvaks muude hulgas ka vitamiinid ning asendamatud aminohapped. Aminohapete mikrobioloogilisest tootmisest tuleb juttu tagapool (lk. 221 jj.), siinkohal valgustame mõne vitamiini saamist mikroobikultuuridest.

Suurem osa mikroobe produtseerib oma elutegevuses neid või teisi vitamiine, s.t. mikroobid on võimelised sünteesima enamikku kõrgematele organismidele asendamatutest vitamiinidest. Üldiselt on vitamiinide mikroobne süntees normis küllalt mõõdukas, ainult mõnedes kultuurides kogunevad teatavad vitamiinid sellistes hulkades, et nende tööstuslik tootmine muutub tasuvaks. Siinjuures tuleb arvestada, et enamikku vitamiine on ökonoomsem toota keemilise sünteesi teel.

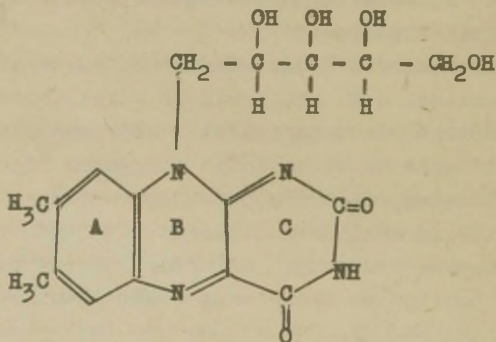
Mikroobide sünteesitud vitamiine võib tarvitada kas otse mikroobimassi koosseisus lisatoiduna või siis isoleeritud puhaspärraaratidena. Esimene kasutusviis tuleb praktiliselt arvesse ainult pärrimassi puhul.

Vitamiine sünteesivad mikroobid intratsellulaarselt. Siiski ekskrateerivad paljud mikroobid ka täielikul söötmel vähesel hulgal B-rühma vitamiine keskkonda. Kui taoliste mikroobide kasvu pidurdada mõnede oluliste kasvufaktorite nälguse abil, võib ekskretsioon tõusta mitmekordselt. Tüvesid, kelle produktsioon ulatuks tootmiseks sobivate mastaapideni, on siiski ainult üksikuid.

Kaasajal toodetakse mikroobidloogiliselt peamiselt riboflaviini ja kobamiini.

### a. Riboflaviini tootmine

Riboflaviin ehk vitamiin B<sub>2</sub> (keemiliselt 6,7-dimetüül-9-(1'-D-ribitüül)) esineb kõigis rakkudes, kus toimivad hingamise flaviinensüümid. Vitamiini sünteesivad taimed ja enamik mikroobe. Kõrgematele loomorganismidele ja laktobatsillidele on riboflaviin asendamatu faktor. Ainult vähesed mikroobid sünteesivad riboflaviini sel määral, et eritavad seda küllaldastes hulkades keskkonda.



Rõngad A ja B sünteesitakse vaheproduktist, mis pärineb puriinide metabolismist. Kuidas B-le liitub ribitoolkülghel, pole teada.

Mitmed kaalutlused näitavad, et riboflaviini "ülemäärane" süntees, millel põhjenebki selle vitamiini eritamine mõnede mikroobide rakkudest, on liigsete puriinide kogunemise resultaat, bioloogiliselt esindab ekskreeteeritava riboflaviini sünteesi detoksikatsioonimehhanismi.

Riboflaviini toodetakse käesoleval ajal näiteks USA-s umbes 200 tonni aastas (NSV Liidu kohta andmed puuduvad). Kolmveerand sellest saadakse mikrobioloogiliselt. Toodangut kasutatakse enamikus söödalisisandina kodulindudele ja sigadele. Väiksem osa läheb otseselt inimeste tarbeks, eeskätt jahusse ja leivasse lisamiseks.

Produtsendiks on enamasti tüved pärmiliigist *Ashbya gossypii* tugevasti õhustatavates süviskultuurides. Kohaste tüvede valik on küllalt raske, seejuures pidevalt kulgev töö, sest produtsendid kalduvad degenerereerima.

Riboflaviini toodangu mõttes on keskkonna koosseisu üsna täpne regulatsioon väga oluline. Erilist tähelepanu tuleb pöörata süsinikuallikale. Hea produktsiooni annavad glükoos, puhastatud sahharoos ja maltoos. Melassis esinevad toor-sahhariidid võimaldavad küll pärmseene tugevat kasvu, annavad aga vähese riboflaviini toogi. Vajalik on orgaaniline lämmastik (pärmiekstrakt, teraviljaleotised, piiritusetööstuse praak, loomsete subproduktide leotised). Loomsed proteiinid kindlustavad paremaid tulemusi kui taimsed.

Meediumide koosseisud on üldiselt eri ettevõtetes erinevad (koosseisud on patenteeritud). Näitena esitame nn. Pfeiferi keskkonna koostise: 2 % glükoosi, 2 % teraviljaleotist, 1 % loomseid leotisi, 0,1...0,2 % vahustusvastaseid õltsid, pH 6,0...7,0. Steriliseerida tuleb hoolikalt, kuid mitte seejuures rakendada pikaajalisi temperatuurimenetlusi (saagis langeb). Õhustuse optimum on 0,25 mahtu minutis (liigne aeratsioon kahjustab riboflaviini tootmist).

Inokulum moodustab mahult 0,5...1,0 % tootmismahust. Inokuleeritakse 24...48 tunni vanuse kultuuriga. Inokubatsioonitemperatuur 26...28°. Riboflaviini maksimumsaagis



saadakse 4...5 päeva pärast. Peaaegu kogu glükoos kasutatakse juba esimese 24 tunni jooksul, mille kestel toimub pärmi intensiivne kasv. Keskkonna pH langeb seejuures 4,5-ni. Riboflaviini akumulereerumine algab alles pärast seda. Mõnes ettevõttes rakendatakse kultuuri toitmist glükoosiga vahelduvate tsüklitena. See võimaldab saagise tõsta kuni 1760  $\mu$ g/ml. Maailmarekord 2500  $\mu$ g/ml on saavutatud seenega *Eremothecium ashbyi*, mis aga mõnede negatiivsete tootmisomaduste pärast on tänapäeval tagaplaanile surutud. Mõnevõrra (eriti Jaapanis) toodetakse riboflaviini ka atsetoon-butanoolkäärimise kõrvalproduktina *Clostr. acetobutylicum*'i kultuurides.

Riboflaviini tootmisel ei saa kasutada metallkultivaatoreid või muid metallist seadmeid (eriti raud viib toogi alla). Seadmed valmistatakse seepärast peamiselt klaasist, rakendatakse ka deferriseerivaid agenseid ( $\alpha$  -  $\alpha$  - dipüridüül, Na-hüdroosulfit ja  $\text{CaCO}_3$ ). Flavinogenees nõuab siiski Fe jälgi.

A. gossypii kultuurides koguneb riboflaviini tootmis tingimustes tavaliselt  $\geq 1000 \mu$ g/ml. Produkt redutseeritakse kas mikrobioloogiliselt (*Str. liquefaciens* või *Str. faecalis*) või keemiliselt (ditioniit, stannokloriid, kromokloriid), mille järel riboflaviin sadestub punakaspruuni massina, millest umbes 80 % moodustab vitamiin. Järgneb tsentrifuugimine. Teine isoleerimismoodus on orgaaniliste solventide kasutamine. Produkti ekstraheerimiseks on selles osas kasutatud eriti isopropanooli.

#### b. Kobamiidide tootmine

Kobamiidid kui bioloogiliselt aktiivsed ained avastati 1948.a. (E.L. Rickes, E. Lester-Smith). Avastajad isoleerisid kobamiidi maksast antianemilise faktorina. Esialgu läks faktor käibesse APA (anti-pernicious-anaemia)

või loomade proteiinfaktori APF (animal-protein-factor) nime all, üsna pea aga rakendati selle tähistamiseks ka kaubanduslikku nimetust "vitamiin B<sub>12</sub>". Samal 1948.a. avastas E.L.R. Stokstad selle faktori sünteesi mikroobikultuurides (*Flavobacterium solare*). Peagi avastati rida teisigi produtsente (eriti tuleks märkida *Str. griseus*'t). Edasised uurimised näitasid, et tõepoolest on mikroobid ainsad vitamiin B<sub>12</sub> produtseerijad kogu looduses. Loomadesse satub vitamiin kas toiduga või seedetrakti mikroobide sünteetiva tegevuse tulemusena (mäletsejad). Mikroobidestki toodavad seda ainult teatavad pärisbakterilised ja kiirikulised, mitte aga mikroseened (ka pärmid mitte). Parimad produtsendid on mäletsejate soolestikumikroobid.

Vitamiin B<sub>12</sub> pole tegelikult üks individuaalne aine, vaid terve perekond aineid, mis on keemiliselt lähedased, kuid annavad loomadel erinevaid kasvu stimuleerivaid efekte.

Kõigis vitamiin B<sub>12</sub> alla paigutatavates ühendites esinevad koobalt ja porfüriintuum. Erinevused ilmnevad liitavas nukleotiidjäägis ning rühmas, mis vahetult liitub koobalti aatomiga. Algul tähistati perekonna liikmeid kui B<sub>12b</sub>, B<sub>12c</sub> jne., satuti aga raskustesse, kui B<sub>12</sub> alla paigutatavaid ühendeid järjest juurde tuli. Alates 1956.a. loodi süstemaatiline nomenklatuur. Üldine osa - porfüriintuum + Co - kannab kobinamiidi nime. Kui molekulisse liituvad veel fosfaatjääk ja riboos, on tegu kobamiidiga. Vitamiin B<sub>12</sub> alla mahtuvad ained on vaadeldavad kobamiidsooladena, kuhu liituvad puriinalused, bensimidiasool või muud orgaanilised alused. Perekonna olulisim liige, maksa vitamiin B<sub>12</sub> ehk tsüaanokobalamiin on keemiliselt 5,6-dimetüül- $\alpha$ -bensimidiasool-kobamiid-tsüaniid. Vastavad vahekorrad ilmnevad joonisel 9.

Kobamiidide füsioloogilist funktsiooni mikroobirakus ei tunta. Kõrgemates organismides esineb vitamiin B<sub>12</sub> koensüümi vormis, milles koobalti küljes on üks adenini jääk, mis vitamiiniga võrreldes asendab tsüaanrühma.

Vitamiin B<sub>12</sub> on oluline inimese ja paljude koduloomade normaalseks kasvuks. Puhast preparaati toodetakse USA-s üle 350 kg aastas (mujal tunduvalt vähem). Osa produkti läheb farmatseutiliseks kasutamiseks aneemia vastu, suurem osa aga loomasöödade rikastamiseks (10...15 mg liisandina tonni kohta).

Algul toodeti vitamiin B<sub>12</sub> mõne antibiootikumi (neomütsiin, kloortetratsükliin) või atsetooni ja butanooli tootmise kõrvalproduktina. Käesoleval ajal rakendatakse aga protsesse, milles kobamiid on põhiproduktiks. Produksente on palju, saagis kõigub eri mikroobide juures üsna suurtes piirides (0,1...2,0 µg/ml). Suurim took saadakse perekonna Propionibacterium liikide abil. Täiesti tootmist rahuldavaid mutante pole aga seni õnnestunud saada.

Propionibacterium sp. rakendamisel kasutatakse enamasti söödet, milles süsinikuallikaks on glükoos, vajaliku valgulise lämmastiku allikaks aga kalajahu, teraviljalootis või viinapraak. Stimulaatorina lisatakse väikeses koguses koobalti-soolasid. Mõnikord lisatakse ka produkti prekursorit (5,6-dimetüül-bensimidiasooli).

Tööstuses kasutatakse produktsentidena ka Streptomyces olivaceus't ja Bac. megaterium'i.

Tootmisel inokuleeritakse sööde mahult 5 % inokulumiga. Kultiveerimine toimub 27° juures õhustuse (läbipuhumise) ja agitatsiooni tingimustes. Kobamiid ilmub kultivaatorisse alles inkubatsiooni hilisstaadiumides, seoses mikroobide autolüüsiga. 60...80 tunni kestel jääb kobamiid intratsellulaarseks, pärast kolmandat inkubatsioonipäeva hakkab aga pikkamisi välja filtreeruma. Söödet kuumutatakse vitamiini vabastamiseks hapetega ja kuivatatakse kontsentraatide saamiseks.

Märkimist väärib avastus, et roiskvete mudas esineb kobamiidi küllalt kõrgetes kontsentratsioonides (0,1...0,2 µg/ml). Sellist muda kasutatakse väetiseks milorganiidi nime all. On katsetatud sellest ka vitamiini B<sub>12</sub> tööstuslikku eraldamist.

#### IV. MIKROBIOLOOGILINE KEEMIA TÖÖSTUS

##### 1. Tööstusalkoholi tootmine

Etanooli vajadus kaasaegses rahvamajanduses tõuseb pidevalt. Tegu on solvendiga, mis kasutamise võimalustelt ja mõõtmelt on teisel kohal pärast vett. Etanooli kasutatakse eriti laialt värvainete, lakkide ja õlide lahustina, peale selle leiab see kasutamist toorainena keemilise sünteesi tööstuses (kautšuk) ja põletisainena (eriti mitut tüüpi raketimootoreis).

Põhiline osa rahvamajanduses vajatavast etanoolist toodetakse kaasajal keemilise sünteesi teel koksiahjude etüleeni või looduslikust gaasist (maailma ulatuses ligi 85 % kogutoodangust), ometi on kindel koht ka käärimise teel, s.o. mikrobioloogiliselt saadaval etanoolil, mida eelistatakse reas farmaatsiatööstuse harudes. Olulisimaks probleemiks on odava ja kergesti konverteeritava tooraine saamine. Põhimõtteliselt võib kõik taolised toorained, mis tavaliselt kujutavad endast tööstusharude jääkprodukte, jaotada kaheks rühmaks: 1) lahustuvaid suhkruid ja 2) polüsahhariide kui fermenteerimismaterjali sisaldavateks tooraineteks. Eri kohale tuleks asetada paberitööstuse jääkproduktid - sulfitvedelikud - baseeruv etanooli tootmine. Üldiselt võib tooraine sisaldada mistahes kääritatavat materjali (sahhariidi), mis allub käärimisele kas otse või pärast hüdrolüüsi.

Oma arengutee algul XIX sajandi teisel poolel oli tööstusalkoholi tootmine ühendatud pärmitööstusega, käesoleval ajal on see iseseisev tööstusharu ja kasutab pinnapärme, mis võivad taluda kõrgeid etanoolikontsentratsioone. Kasutatakse peamiselt (Sacch. cerevisiae) või (Schizosacch. pombe) valitud rasse. Inokulum valmistatakse ette pärmi passeerimisega järjest suurematesse mahutitesse (inokulumi, mida ni-

metatakse starteriks, kasutatakse peamiselt mitmesugustes virretes), kuni pärmisuspensioon on küllalt mahukas ja tihe selleks, et seda viia põhilisse fermenterisse.

Järgnevalt vaatleme protsessi vastavalt põhilisele toorainele.

#### a. Tooraineks melass

Melassiks nimetatakse suhkrutööstuse jääkprodukti, mis pärast suhkru väljakristalliseerimist sisaldab veel umbes 50 % suhkrut, ligi 20 % muid orgaanilisi aineid, 10 % mitmesuguseid sooli ja umbes 20 % vett. Tarvitatakse põhiliselt suhkruroo-melassi, kuid etanooli tootmisel on kasutatav ka suhkrupeedi-melass.

Etanooli tootmiseks lahjendatakse melass kohase meski saamiseks veega suhkrusisalduseni 10...15 %. Sellise lahjendusastme juures sisaldab meski veel küllaldaselt enamiku pärmide eluks vajalikest ainetest. Puudu tuleb siiski lämmastikust, mis pärast meskit täiendatakse kas ammoniaagiga,  $\text{NH}_4$ -fosfaadiga või  $\text{NH}_4$ -sulfaadiga.

Lahjendusmäärä valikul tuleb arvestada rida vastassuunalisi toimeid. Üle 10...15 % suhkrusisaldus pidurdaks pärmide kasvu. Suhteliselt kõrge suhkrusisaldus toob kaasa tugeva alkoholkäärimise ja etanooli kontsentratsiooni sellise tõusu, mis peagi pidurdab käärimist ja nõuab pikemat aega antud suhkrukoguse kasutamiseks. Suhkrukontsentratsiooni madaldamine alla 10 % viib jällegi fermentatsiooniruumi kadudele ja tootmispinna ebaökonomsele kasutamisele.

Melassmeski steriliseerimine oleks liiga kulukas toiming ja tööstusalkoholi tootmisel seda reeglina ei tehta. Pealegi kindlustavad protsessi küllaldase puhtuse inokulum suur maht (4...6 % meski lõppmahust) ja madal pH, mis reguleeritakse väävelhappe lisamisega väärtuseni 4,0...4,5. Sellistes tingimustes välditakse bakterite arengut tootmis-tsükli kestel praktiliselt täielikult, inokuleeritud pärmid aga on eluvõimelised. Ohtlikemaks kontaminandiks on või-

happebakterid. Nende tegevusvõimaluse täielikuks vältimiseks lastakse meskis enne pärmiga inokuleerimist mõnikord areneda piimhappebaktereid ja koguneda piimhappel või siis lisatakse meskisse puhast piimhapet.

Pärast meski pärmiga inokuleerimist luuakse selles õhu läbipuhumisega teatud ajaks aerobioos, mis peab soodustama pärmide kasvu. Kui aga pärmirakkude vajalik kontsentratsioon on saavutatud, lõpetatakse meediumi aereerimine ja protsess läheb üle anaeroobsesse faasi, s.o. käärimisele ja etanooli kogunemisele.

Meski algtemperatuur hoitakse 21...27° juures. Pärmide elutegevuse tagajärjel meediumi temperatuur tõuseb ja on vaja rakendada jahutusseadmeid. Kasutatavad on nii sisemise kui ka välimise jahutamise meetodid. Temperatuuri tõusu tuleb vältida mitte ainult pärmide ettenähtud laadiga elutegevuse huvides - temperatuuril üle 26° oleks ka koguneva etanooli aurumine nii tugev, et see tähendaks majanduslikku kahju. Ühtlasi infitseeruks keskkond hõlpsasti kontaminantidega.

Käärimisprotsess kestab umbes 48 tundi, siis on üldiselt protsess lõppenud. Teoreetilisest saagisest saadakse tavaliselt 90 % etanooli, on aga saavutatud ka 99 % kasutatud suhkru konverteerimine etanooliks ja süsihappegaasiks.

On arendatud välja pidevalt kulgevad protsessid nii starteri saamiseks kui ka melassi kääritamiseks.

Kääritatud meskit nimetatakse tööstusterminoloogias "õlleks". Sellest etanool destilleeritakse välja. Eraldatakse erineva etanoolisisaldusega fraktsioonid. Kõrge etanoolisisaldusega fraktsioonid rektifitseeritakse kuni 95 % etanooli kontsentratsiooni, madala sisaldusega fraktsioonid redestilleeritakse koos uute "õlle" portsudega. Lõpuks järelejäävad alkoholivabad materjalikogused lähevad väetiseks või loomasöödaks.

## b. Tooraineks tärglist sisaldavad materjalid

KLIS

Enne põhiprotsessi tuleb need materjalid allutada tärglise hüdrolüüsile, et tekiks pärmidele kättesaadavad subkrud.

Toormaterjaliks on siin teravili või kartul. Teraviljadest eelistatakse maisi, rukist ja otra. NSV Liidus välditakse taoliste toiduteraviljade kasutamist tööstustarbedeks, laialdaselt aga kasutatakse neid tööstusalkoholi saamiseks USA-s, kus esineb suuri teraviljaülejääke.

Algul tooraine matsereeritakse või jahvatatakse. Tärglis želatiniseeritakse kestmisega. Järgneb hüdrolüüsiprotsess, milles agensina kasutatakse kas lahjendatud happeid või kõrge diastaatilise (amülolüütilise) aktiivsusega odralinnaseid. Viimasel ajal levib ensüümpreparaatide kasutamine (amülolüütilised ensüümid Aspergillus niger'i A. oryzae' ja Rhizopus delemar'i kultuuridest). "Amülo"-tehnoloogia kohaselt kasvatatakse hallitusseent aereeritavas virdes 38° juures 24 tundi, siis jahutatakse keskkond 33°-ni (enne seene võtmist inokuleerimiseks), s.t. seente ensüüme kasutatakse koos mütseeliga, ilma isoleerimiseta. Uuem tehnoloogia näeb ette seente kasvatamist süviskultuurides ja mütseelist enam või vähem puhastatava ensüümpreparaadi isoleerimist.

Väga oluline on teraviljaidude eemaldamine, sest neis sisalduvad lipiidid on protsessi puhtuse seisukohalt üsna ohtlikud.

Happelisel hüdrolüüsil kasutatakse kas väävel- või soolhapet. Meskile lisatava happe hulk sõltub materjalist. Järgnevalt meski allutatakse ülekuumendatud veeauru toimel rõhu all. Pärast täielikku tärglise hüdrolüüsi happe jäägid neutraliseeritakse kriidi, lubja või ammoniaakveega. Kui happena kasutati  $H_2SO_4$  ja neutraliseerijana  $CaCO_3$  või lubja, tekib  $CaSO_4$ -pretsipitaat, mis meskist eemaldatakse sadestuse ja filtreerimisega. Meskit tugevdatakse ammoniaagiga või ammoniumsooladega.

Linnastega hüdrolüüsimisel need jahvatatakse. Algul lisatakse linnaseid väikeses hulgas - umbes 10 % koguvajadusest. Selles nn. eel-linnastamise (pre-malting) astmes meski vedeldatakse, nii et seda oleks kerge pumbata kuukeritesse (cookers), kus massi aurutatakse tärglise lahustuvaks muutmiseks (solubiliseerimiseks). Järgneb kiire jahutamine. Kiirus on vajalik mitte-kääritatavate ainete tekke vältimiseks. Jahutatakse 50...60°-ni. Siis lisatakse massile ülejäänud linnased ja toimetatakse tärglise hüdrolüüsi. Kõrgem temperatuur soodustab seejuures tärglise dekstriniseerimist, madalam temperatuur - sahharifikatsiooni. On välja töötatud (Kolahhov) kiire pidevprotsess teraviljatärglise töötlemiseks.

"Amülo"-protsess kasutab valitud hallitusseeni vastavalt ettevalmistatud massis. Kõigepealt leotatakse teravilja mõni tund vees, siis lisatakse vett veelgi enam ja allutatakse rõhu all kõrgele temperatuurile (autoklaavitakse). Selles protsessis muutub tärglis lahustuvaks. Et kergendada vedeldumist, lisatakse keskkonda veel sool- või väävelhapet. Steriliseeritud meski jahutatakse temperatuurini 38...40° ja inokuleeritakse seene puhaskultuuriga. Inkubatsiooni kestel puhutakse meskist läbi steriilset õhku. Selliselt töödeldud meski inokuleeritakse pärast temperatuuri madaldamist sobiva tasemeni (20...25°) pärmiga. Tuntakse aga ka meetodit, mille puhul meskisse hapet ei lisata, temperatuur viiakse kohe pärmide eluks sobiva tasemeni ja keskkond inokuleeritakse samaaegselt hallitusseene ning pärmiga.

Jaapanis kasutatakse pisut modifitseeritud tehnoloogiat. Diastaatilise preparaadi tootmiseks kasutatakse seeni *Aspergillus flavus-oryzae* rühmast. Neid kasvatatakse erilistel perforreeritud põhjaga alumiiniumpannidel, millel on 70 % niiskusega kliid ja mida pidevalt läbi puhutakse. Õhuvoolu tugevusega reguleeritakse ka kasvukeskkonna temperatuuri, mis seente elutegevuse tagajärjel kaldub tõusma. Nii inkubeeritakse segu 48 tundi ligi 45° temperatuuril. Seejärel kuivatatakse kliid koos hallitusega ja jahvatatakse nagu linnaseid.



Kui toormaterjaliks on nisujahu, piisab "looduslikust" amülaasist ja seenkultuuri saharifikatsiooniks ei ole tarvis. Siis nisujahu ekstraheeritakse 0,5 % Na-sulfitiga. Saadakse nn. sulfit-diastaasi segu, mida lisatakse kúpsetatud teradele, et tärklist saharifitseerida.

Saadud tärklike hüdrolüsaadid koos nn. tugevdavate toitainete lisanditega inokuleeritakse sobivate pärmütüvedega ja viiakse läbi käärimisprotsess. See, nagu ka järgnev destillatsiooniprotsess, sarnaneb üldjoontes sellega, mida kirjeldasime juba eespool.

### c. Toofaireks tselluloossed materjalid

Тр

Tööstuspiirituse valmistamine tselluloosetest ainetest teenib peale etanooli tootmise veel teist ülitähtsat eesmärki - looduse vabastamist päberi- ja puidutööstuse jääkproduktidest, eriti looduslike veekogusid reostavast sulfitleelisest. Viimane on hästi kasutatav tööstuspiirituse tootmiseks, kui vedelik eelnevalt vabastada vääveldioksiidi liiast (seda saab teha veeaurujoa läbijuhtimisega). Puidujätmete puhul on probleemiks tselluloosi hüdrolüüs kääritatavate suhkrueni.

Tuntakse vähemalt kolme tehnoloogilist protsessi tselluloosi kasutamiseks jääkpuidus.

Bergius-Rheinau meetodi kohaselt puit peenestatakse ja kuivatatakse 0,5 %-lise veesisalduseni. Kuivale purule lisatakse 40 % soolhapet (umbes 20° temperatuuril). Hapu ekstrakt destilleeritakse üle vaakuumis 36° juures. Eraldatavad happkogused regenereeritakse ja rekontsentreeritakse ning kasutatakse uuesti. Hüdrolüsaat kontsentreeritakse nn. piserduskuivatusega, kuivatatud aine kogutakse seadmes, mis tsentrifugaaljõu abil kogub õhust väikesi osakesi (nn. tsüklonis). Tahkes hüdrolüsaadis on üsna kõrge protsent kääritatavaid suhkruid. Neist valmistatud vesilahused tugevdatakse toitesooladega ja inokuleeritakse pärmiga ning kääritatakse.

Scholler-Torneschi järgi kuumutatakse peenestatud puitu ca 170° juures ja ekstraheeritakse rõhu all 0,4 % happega. Puitu ei kuivatata ega püüta hapet tagasi saada. Kui kasutati soolhapet, neutraliseeritakse ekstrakt  $\text{CaCO}_3$  lisamisega, lastakse tahketel osadel sadeneda, vedelik filtreeritakse ja kasutatakse käärimissubstraadina pärast inokuleerimist valitud pärmitüvedega.

Giordani-Levne meetod erineb eelmisest selle poolest, et kasutatakse 0,5 % väävelhapet ja neutraliseerimine toimub lubjaga.

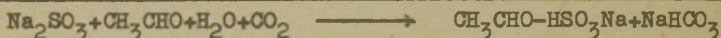
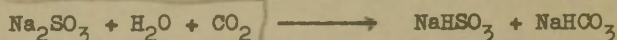
Nagu märgitud, sel või teisel teel saadud hüdroolüsaadid inokuleeritakse pärast toitainetega tugevdamist pärmidega ning viiakse läbi käärimine, mille põhiproduktiks on etanool, kõrvalproduktideks aga äädikhape, ligniin, furfurool jt. ained

Sulfit-vedelikku kasutatakse enamasti Heijkenskjöldi meetodi puhul. Vedelikule lisatakse kriiti või lupja, et pH tõuseks kuni 5,5. Vaba  $\text{SO}_2$  eemaldatakse kuumutamiseega umbes 90° juures. Segu aereeritakse läbipuhumisega umbes 2 tunni jooksul. Jääkvedelikul lastakse mõni aeg seista ja settida. Pärast toitainetega tugevdamist inokuleeritakse vedelik pärmiga ja viiakse läbi käärimisprotsess.

## 2. Glütserooli tootmine

Tutvumine käärimise mehhanismiga Embden-Meyerhof-Par-nase skeemi järgi näitab, et normaalseltki tekivad glükoosi lagundamisel pärmide poolt väikesed glütseroolikogused. Kuigi glükoosi degradatsioon kulgeb glükolüüsil reeglina üle glütseeraldehüüd-3-fosfaadi püroviinamarihappeni, võib fruktoos-1,6-difosfaadi molekuli lõhkumisel tekkiv teine trioos, dihüdrosüatsetoonfosfaat mitte täielikult aldehüüdiks isomeriseeruda, vaid toimida elektronide aktseptorina NADH-i

suhtes, mis tekib käärimislikus oksüdatsioonireaktsioonis glütseeraldehüüd-3-fosfaadi oksüdeerimise arvel. Seega teenib dihidroksüatsetoonfosfaat NADH-d reoksideeriva agensina. Tekkiv glütserüülfosfaat minetab kergesti fosfaatrühma ja annab glütserooli (1,2,3-propaantriooli). Normaalsel etanoolkäärimisel on glütserooli teke praktiliselt tähtsusetu, kui aga keskkonnas esineb atseetaldehüüdi siduvaid aineid, olukord muutub. Juba enne I maailmasõda avastas Neuberg Na-sulfiti kui selleks sobiva agensi. Selle lisamine käärivasse meskisse tõstab glütserooli toogi kümne- ja enamakordseks. Na-sulfit seob atseetaldehüüdi järgmiselt:



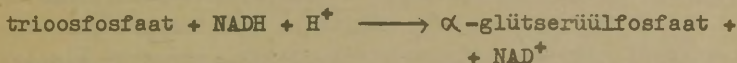
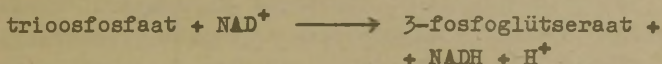
Sidumise tulemusena ei saa atseetaldehüüd enam funktsioneerida vesiniku aktseptorina ja suurelt osalt regenereeritakse NADH nüüd dihidroksüatsetoonfosfaadi redutseerimise arvel.

Eksisteerib kolm põhilist glütserooli tootmise tehnoloogiat: saksa, inglise ja ameerika oma.

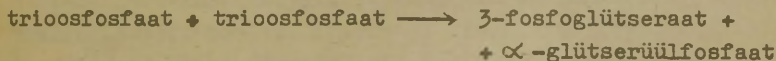
Saksa meetodi (Connstein, Ludecke) järgi on tooraineks peedisuhkur. Kääritamisel kasutatakse Na-sulfitile vastupidavamaid pinnapärme. Etanool ja atseetaldehüüd destilleeritakse välja, sulfiti liig sadestatakse kaltsiumsoolana. Glütserool saadakse keskkonnast kätte destilleerimisega osalises vaakuumis.

Inglise meetod (Cocking-Lilly) on oluliselt vaid eelmise modifikatsioon. Käärivasse meskisse lisatakse perioodiliselt Na-sulfiti ja Na-vesiniksulfiti segu vesilahusena. Na-vesiniksulfit on tugevasti inhibeeriv etanoolkäärimise suhtes, seepärast antakse seda soola algul segus vähe. Järk-järgult suurendatakse selle kogust. Inglise meetod on lühema käärimisajaga ja annab suurema glütserooli saagise kui sulfitprotsess.

Ameerikas töötati välja printsipiaalselt uus Na-karbo-  
naatmenetlus (Koff, Linder, Beyer). Menetlus põhjeneb avas-  
tusel, et glütserooli tooki tõstab keskkonna leeliselise  
reaktsioon. Nimelt soodustab selline reaktsioon dismutat-  
siooni (ehk Cannizzaro reaktsiooni) kahe trioosfosfaadi  
(dihüdroksiüatsetoonfosfaat, glütseeraldehüüd-3-fosfaat) va-  
hel, mille tulemusena üks molekul oksüdeeritakse happeks,  
teine redutseeritakse alkoholiks (täpsemini -  $\alpha$ -glütserüül-  
fosfaadiks):



Summaarselt:



Suurim saagis esineb ameerika meetodi rakendamisel  
siis, kui kasutatakse eriliselt leeliselise keskkonna jaoks  
selekteeritud ("treenitud") pärmitüvesid. Tooraineks on  
siin nn. must melass, millele lisatakse mineraalsooli. Lee-  
listajana kasutatakse Na-tuhka või mõnda muud odavat agen-  
sit.

### 3. A t s e t o o n i   j a   b u t a n o o l i t o o t m i n e

Paljud mikroobid moodustavad anaeroobse ainevahetuse  
lõpp-produktidena atsetooni ja butüülalkoholi (2-propanooni  
 $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$  ja n-butanooli  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ ). Nimetatud  
produktide kujunemine toimub sahhariidide degradatsioonil.  
Sahhariidide nn. atsetoon-butanoolkääritamisel esineb tege-  
likult rida lähedasi protsesse, mis erinevad bakteriaalsete

agensite ning produktide kvalitatiivse ja kvantitatiivse koostise poolest. Põhiliselt võib neid protsesse vaadelda kolme tüübina. Esimene, ühtlasi praktiliselt tähtsaim tüüp annab valdavate lõpp-produktidena butanooli, atsetooni ja etanooli, peale selle vähemal määral äädikhapet, sipelghapet, võihapet, isopropanooli, atsetüül-metüülkarbinooli,  $\text{CO}_2$  ja  $\text{H}_2$ . Teine siia kuuluv käärimistüüp annab põhiliste produktidena atsetooni ja etanooli. Kolmandat tüüpi iseloomustab butanooli, isopropanooli ja atsetooni domineerimine lõpp-produktide hulgas.

Vaatamata sellele et atsetooni ja butanooli moodustavad paljud bakterid, kasutatakse tööstuses produtsentidena praktiliselt vaid perekonna *Clostridium* teatavaid liike.

Atsetooni ja butanooli mikrobioloogiline tootmine on üks esimesi mikroobide puht-tööstuslikke rakendusi teatavate keemiliste ainete tootmisel. Esimeseks suuremaks stiimuliks sellele tööstusharule oli sünteetilise kautšuki vajadus. Viimast toodeti esialgselt isopreeni või butadieeni polümeeriseerimisega, neid aineid aga oli hõlpsaim saada isoamüül- ja n-butüülalkoholist. Tugeva tõuke antud tööstusharu arenemisele andis I maailmasõda, mis seadis esiplaanile atsetooni tootmise (kasutati lahustina lõhkeainetööstuses). Mikroobidest tõusis seetõttu esikohale *Clostr. acetobutylicum* (varem *Clostr. butylicum*).

## a. Produtsendid

Nagu märkisime, kasutab kaasaegne tööstus atsetooni ja butanooli (A-B) tootmisel perekonna *Clostridium* esindajaid. Klostriidid on anaeroobsed sporegeensed bakterid, kes on muldades üsna tavaliselt esindatud. Eriti rohkesti leitakse neid liblikõieliste taimede risosfäärist, kus nad tõenäoliselt viivad läbi "koostööd" õhulämmastiku fikseerijatega lämmastiku "konserveerijatena".

Alates I maailmasõja päevist kasutab tööstus peamiselt *Clostr. acetobutylicum*'i tüvesid. Tuleb märkida, et eri tü-

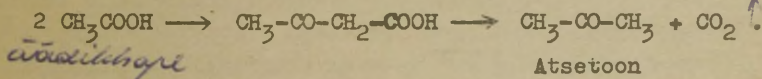
vede produktioonivõime on väga erinev, seepärast kasutatakse spetsiaalselt ja rangelt selekteeritud tüvesid, kusjuures valik toimub konkreetset kasutada oleva sahhariidse materjali suhtes. Parimaid produktivõime iseloomustab termoresistantsuste spooride olemasolu. Sel alusel on välja töötatud eriline kuumusšoki menetlus sobivate tüvede valikuks. Spooride suspensiooni kuumutatakse 100° juures 1...2 minutit. Operatsiooni tehakse paljukordselt (Weizmann soovitatav 100...150 kuumusšokki).

A-B-käärimise iseloomulik puudus on madal saagikus, mida tingib produktivõime tundlikkus lõpp-produktide suhtes (butanooli kontsentratsiooni ei kannata Clostr. acetobutylicum üle 1,3 %). Tegelikult esineb perekonnas ka kõrgema tolerantsusega liike, kuid need ei sobi tööstuslikuks kasutamiseks kõrge patogeensuse tõttu. Teised liigid ei sobi jälle madala üldise toogi, tooraine nõrga kasutamisevõime, tähtsuse mittekasutamise, aeroobsuse või ebapüsivate kultuuritunnuste tõttu.

McCoy eraldab tööstusele sobivad A-B-produktendid erilisse utilitaarsesse perekonda Clostridium alarühma, mille esindajad annavad toiduga granuloosreaktsiooni, ei evi katalaasi ja moodustavad tunduvalt rohkem võihapet ning neutraalseid produkte kui patogeensed klostriidid.

#### b. Atsetooni ja butanooli teke

Atsetoon (2-propanoon) moodustub tüüpiliselt nähtavasti äädikhappe kondensatsioonil tekkiva atsetoatsetaadi dekarboksüülimisel:

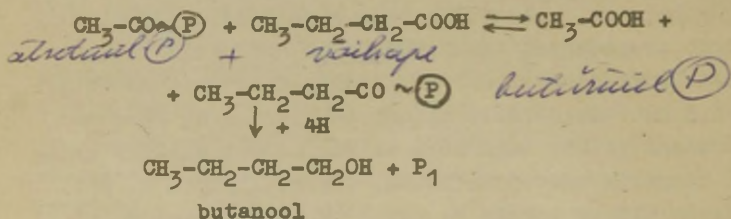


Keskkonnas üksinda antud äädikhapet aga atsetooniks ei muudeta. Samaaegselt peab toimuma glükoosi või muude ainete käärivõime energia hankimiseks, sest äädikhappe kondensat-

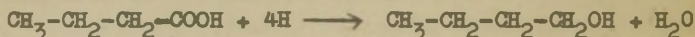
sioon atsetoatsetaadiks on endergooniline protsess, mis iga mooli produkti kohta nõuab 16 kcal. (Protsess kulgeb üle aktiveeritud atsüülühendi - üle atsetüül-CoA.).

Otsustav on atsetoatsetaat-dekarboksülaasi esinemine. Clostr. acetobutylicum'i rakkudest on see isoleeritud.

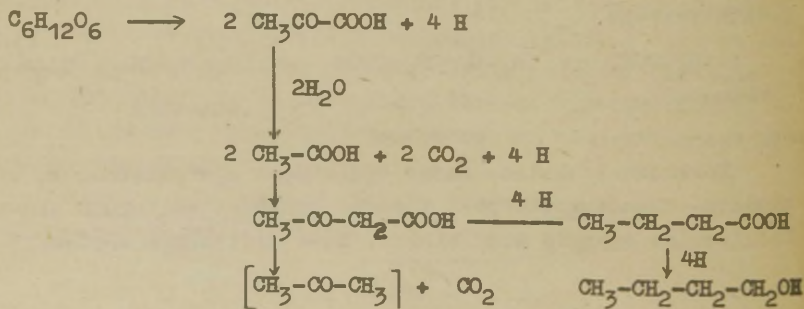
Butanooli teket kujutletakse põhiliselt lähtuvana butürüülfosfaadist kui vahetust eellasest. Butürüülfosfaat tekib atsetüülfosfaadi ja vöihappe reageerimisel:



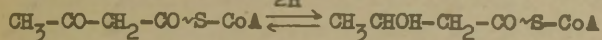
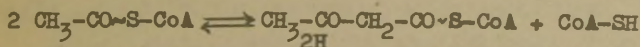
Tegelikult võib redutseerimine toimuda ka juba vöihappe tekkel:



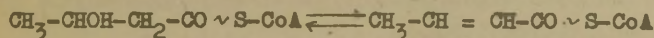
vöi ka atsetoatsetüül-CoA tasemel ( $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-CO-CoA} + 4\text{H}$ ), nii et osa atsetoatsetaadi muutumisel atsetooniks läheb ka-duma vesinikuaktseptor, mis toimib püruvaadi muutmisel atsetaadiks. Seepärast üks atsetoatsetaadi molekul konverteeritakse atsetooniks, teine tingimata taandatakse butanooliks. Kokkuvöttes on butanooli teke seepärast paratamatu järeldus atsetooni tekkest. Tervikuna vöib asjakäiku lihtsustatult kujutada nii:



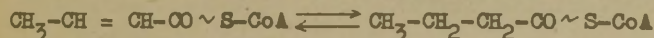
Tuleb arvestada, et tegelikult toimuvad protsessid hapetega aktiveeritud atsüülühendite tasemel, mis aga siinkohal on ülevaatlikkuse huvides jäetud osutamata. Täpsemalt osutades põhilisi vaheprodukte püruvaadist alates, saame järgmise rea:



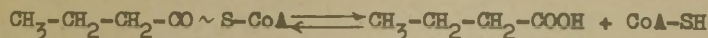
oksübutüürüül-CoA



krotonüül-CoA



butüürüül-CoA



võihape

### c. Produktide kasutamine

Butanooli kasutatakse tööstuses lakkide tootmiseks

auto- ja lennukitööstusele, aga ka mööblile jm. Peale selle tarvitatakse butanooli värvilahustina, rooste eemaldajana, katalüsaatorina kautšuki saamiseks, fotomaterjalide tootmisel, kunstnaha valmistamisel. Otseselt kasutatakse butanooli veel etüülalkoholi denatureerimisel, veetustamispreparaadina, vahutekkevastase agensina, keemilise puhastusvahendina. Butanoolist valmistatakse ka n.-ö. sekundaarseid tooraineid - butüülpropionaati, butüülaldehüüdi, butüülksantiini ja dibutüülftalaati. Eriti viimane on oluline plastmasside valmistamisel. Laboratoorses praktikas on butanool asendamatu



vooluti paljude ainete (näiteks aminohapete) kromatograafilisel analüüsil.

Vähemalt sama lai on atsetooni kasutamisalala. Seda tarvitatakse kunstiidi, määrete, kunstnaha, aerolakkide, sünteetilise kautšuki, kloroformi, antifriiside, jodoformi, ravimite, suitsuta püssirohu, nitrotselluloosliimide, atsetaatselluloosi, püroksüliini ja fotograafiliste kilede tootmisel. Peale selle kasutatakse atsetooni värvide ja lakkide lahustina ja etanooli denatureerijana. Erakordselt mitmekesist kasutamist leiab atsetoon laboratoorses töös, alates valgu denatureerijast ja lõpetades kromatograafiliste ilmutite komponendiga.

#### d. Toormaterjal ja keskkond

Tavalisemad toorained A-B-tööstuses on melassid ja teravili.

Kasutatakse nii roo- kui ka peedimelasse, mis lahjendatakse 6 % suhkrusisalduseni. Tugevdamiseks lisatakse 0,4 % ammooniumsulfaati ja fosfaate arvestusega 0,2 %  $P_2O_5$ . Tugevdajana on kasutatav ka ammoniaakvesi, mis ühtlasi reguleerib alg-pH soovitavas suunas. Happesuse tõhusa reguleerijana lisatakse keskkonda ka  $CaCO_3$  (kuni 0,5 %), kuigi see veidi vähendab A-B tootki. Eelmise tsükli jääksööde pärast A-B väljaeraldamist osutub vähesel määral uude melasskeskkonda lisatuna heaks protsessi stimulaatoriks (see võte kannab rahvusvahelist nimetust slopping back).

Enne fermenteritesse juhtimist melasskeskkond steriliseeritakse, kusjuures temperatuur hoitakse tasemel (105...107°), mis veel ei lõhu suhkruid. Pärast steriliseerimist on keskkonna reaktsioon pH 5,5...6,0 piires, mis on sobiv Clostr. acetobutylicum'i inokuleerimiseks.

Sahhariidide allikaks tööstuses võib olla aga ka teravili. Varem kasutati teravilja üsna laialdaselt, käesoleval ajal on enamikus atsetooni ja butanooli mikrobioloogiliselt tootvates maades loobunud teravilja raiskavast kasutamisest.

Tähtsate kohale toorainena on teravili jäänud siiski USA-s, kus eelistatud on mais. Enne kasutamist eraldatakse teristest idud, mis sisaldavad hinnalist maisiõli ning valmistatakse jäme jahu, mis segatakse veega 3...10 %-liseks rokakts ja mida keedetakse 2 atms juures kuni 2 tundi, et muuta tärglist lahustuvaks. Clostr. acetobutylicum suudab tärglist ja teisi polüsahhariide ensümaatilisel hüdrolüüsida, seepärast pole vaja meskit eel-hüdrolüüsida. Autoklaavimisel üheaegselt tärgklise želatiniseerimisega steriliseeritud meski lastakse steriilsetes tingimustes läbi jahuti (temperatuur viiakse 37°-ni), suunatakse suurtesse fermenteritesse, inokuleeritakse ja kääratakse 48...72 tundi. Meski pH on 6,0...6,5, mingeid lisandeid pole tarvis. Mineraalsoolad viiks alla neutraalproduktide toogi ja tõstaksid hapete oma.

Väga perspektiivseks tooraineks on atsetooni- ja butaanooli-tööstuses ka sulfitleelised, mis on siin hästi kasutatavad pärast väävlisshappe sadestamist lubja abil (sadestub Ca-sulfitina) pH 10 juures. Järgnevalt sadestatakse pH 11,5 juures ligniin  $\text{Ca(OH)}_2$  uute portsude lisamisega. Lõpuks eemaldatakse Ca-liig 1 % Na-sulfaadi abil ja lahuse pH viiakse väävelshappe lisamisega 5,8-ni. Sademed eemaldatakse, lahusele lisatakse 0,05 % diammooniumvesinikfosfaati, 0,1 % melassi ja 0,1 %  $\text{CaCO}_3$ . Selles keskkonnas on sobivaimaks agensiks Clostr. butylicum, kes võib kääritada 70...80 % lahuses leiduvaist redutseerivaist suhkruist.

Peale loetletute on proovitud väga mitmesuguseid lähteaineid. Põhimõtteliselt on kasutatavad mistahes ained, mis sisaldavad kääritatavaid sahhariide. Huvi võivad siiski eeskätt pakkuda majanduslikult õigustatud toorained, neid aga polegi väga palju.

#### e. Kultiveerimismeetodid.

Tööstuses kasutatavate bakterikultuuride pidevad ümberkülvivid tavalistel bakterioloogilistel keskkondadel viivad mõninga aja jooksul kultuuri mandumisele ja produktide toogi

väheneb. See asjaolu teeb vajalikuks pideva selektsioonitöö. Nagu eespool märkisime, on parimad kultuurid need, mille spoorid on termoresistentseimad. Sellel sõltuvusel põhjenevadki efektiivseimad atsetoon-butanolkäärimise agensite selektsioonimeetodid. Põhimõtteliselt on sellega seotud võte lihtne - tuleb kuumusega surmata vegetatiivsed rakud ja vähema termoresistentsusega spoorid. Kultuur viiakse sporulatsiooni stimuleerivatesse tingimustesse, siis kuumutatakse 100° juures 1...2 minuti jooksul kindlais mahu, klaasi paksuse jm. tingimuste juures.

Isoleeritud tüvede aktiivseisundis säilitamiseks kasutatakse järgmist passeerimist: inokuleeritud söödet, mille koosseis stimuleerib sporulatsiooni, hoitakse mõni päev 18...20° juures, sealt passeeritakse kultuur värskele söötmele ja kuumutatakse, edasi viiakse vegetatiivseks kasvuks soodsatesse tingimustesse, mis lubab kuumutamisel eluvõimeliseks jäänud spooridel idaneda. Saadud kultuuri passeeritakse järgnevalt iga päev nädala jooksul, viiakse uuesti 18...20° juurde jne. Sellist tsüklit korratakse vahetpidamata 100...150 korda, siis säilib kultuuri küllaldane aktiivsus vähemalt 7 aastat.

#### f. Fermentatsioon

Käärimisprotsess viiakse läbi väga suurtes, tuhandeid liitreid meskit mahutavais fermenteris bätš-protsessi alusel. Fermenterid on alumises osas silindrikujulised, ülises osas ahenevad koonusjalt teravaks tipuks (tuletavad meelde katusega ümmarguse põhiplaani kindlustorni).

Inokulumi viiakse steriilsesse meediumi 3...5 % kogu meski mahust. Tuleb rõhutada, et vastupidi pärmi kasutamisel kohatavale tehnoloogiale tuleb atsetoon-butanolkäärimisel kui bakteriaalsel protsessil kõige)rangemalt steriilsusnõudeid seirata. Antud tootmisharus on veel väga oluline tõeliselt)anarobsete tingimuste loomine. Selle kindlustamiseks jäetakse fermenterisse mõnevõrra käärimisgaase

(CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>), mis kogunemisel annavad kõrgeenenud rõhu.

Käärimistsükkel kestab 2 päeva, siis gaasiteke oluliselt lakkab. Produktide dünaamikat kujutab joonis 10, mis on laenatud W.H. Petersonilt ja E.B. Fredilt. V. Sa-pošnikov avastas atsetoon-butanoolkäärimise dünaamike uurimisel neutraliseerijata keskkondades protsessi kahefaasilisuse. Esimeses faasis toimub intensiivne hapete kogunemine (peamiselt äädik- ja võihape). Söötme pH langeb 5,8...6,0-lt 5,0...5,4-ni. Samal ajal toimub energiline rakkude paljunemine ja biomassi akumulatsioon.

16...18 tunni jooksul on hapete kogunemine proportsionaalne biomassi suurenemisega. Siis algab happesuse langus (pH tõus) - toimub nn. happesuskõvera murre (vt. joonis 11) ja pH saavutab hapete reutiliseerimise tõttu teatava enam-vähem püsiva nivoo. See murre tähistab protsessi üleminekut teise faasi, mis on seotud juba bakterite arvu järkjärgulise langusega. Just selles faasis algab intensiivne butanooli ja atsetooni moodustumine, ühtlasi hakkab tormiliselt eralduma gaase (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>).

Kahefaasilisus ilmneb siis, kui keskkonnas puudub hapete neutraliseerija. Ilmneb, et n.-õ. produktide bioloogilised huvid ja tootmise tehnoloogilised huvid on vastuolus. Tingimused, mis mikroobile on bioloogiliselt kahjulikud, on samal ajal kasulikud atsetooni ja butanooli tekke seisukohalt.

1932.a. patenteerisid Wheeler ja Goodale ka atsetoon-butanoolkäärimise pidevprotsessi tehnoloogia. Kaua aega oletati siiski, et antud tootmisharus on pidevprotsess võimatu, sest - nagu eespool märgitud - Clostr. acetobutylicum kaldub degenerereerima ja solventide produtseerimise võimet kaotama juba lihtsalt sagedasel passeerimisel, rääkimata siis pidevast vegeteerimisest. 1958.a. aga õnnestus Tšehhoslovakkias saavutada produktide omaduste säilimine vegetatiivsel passeerimisel. USA-s loodi samal ajal väikese degeneratsioonikalduvusega uus tootlik bakteritüvi, mida nimetati Clostr. saccharo-acetobutylicum ja mida õn-

nestus pidevkultivaatoris passaažideta hoida eksponentsiaalses kasvufaasis.

Pidevprotsessi suurimaks eelisaks antud tootmisharus on ühe põhilise takistuse ületamine atsetooni ja butanooli tootmisel - see tehnoloogia võimaldab hoida produktide kontsentratsiooni madalal tasemel ja sellega kõrvaldada butanooli toksilisusest johtuva bakterite elutegevuse pärssimise. Peab aga kohe ütleva, et sellest hoolimata uuritakse vähe selle tehnoloogia võimalusi. Põhjuseks on kõnealuste produktide mikrobioloogilise tootmise üldine langustendents. Ainult uute odavate sahhariidsete toorainete ilmumine, mis kujutaksid endast loodust reostavaid jääkprodukte, võiks asjale uut hoogu anda.

#### g. Infektsioon kontaminantidega

Põhilist ohtu esindavad piimhappemikroobid, kes kasvavad hästi anaeroobsetes tingimustes. Eriti tuleks ses suhtes esile tõsta Lactobacillus leichmann'i kui kõrge piimhappe-produktiivsusega liiki. Tekkivat piimhapet kasutavad klostriidid väga aeglaselt. Seoses muutunud tingimustega võib söötmes pealegi lima tekkida, mis viib söötme vahustumisele.

Teiseks ohtlikuks infektandiks on antud tööstusharus bakteriofaagid, kes otseselt hävitavad atsetooni ja butanooli käärimisagenseid. Minevikus esines juhte, kus bakteriofaagiga nakatumise tõttu tuli tehas sulgeda. Faagide tegevus on väga drastiline - need viivad mõne tunniga enamiku bakterite hävingule.

Igasuguse infektsiooni vastu võitlemiseks peab tööstuses pidama piinlikku puhtust ja steriilsust. Faagidega võitlemiseks eksisteerivad veel erimeetodid. Elukõige kasutatakse Clostr. acetobutylicum'i immuniseerimist nõrgestatud faagidega. Eksisteerib rida tehnilisi võtteid, mis on immuniseerimisel (see toimub tavaliselt maksaekstraktides) kasuta-

tavad. 3...5-kordne passeerimine annab bakteritele faagresistentsuse, kuid samal ajal muudab ebasoovitavalt bakterite kultuuriomadusi. Peamine kahju on atsetooni suhtelise osa tõsus käärimisproduktide seas väärtuslikuma butanooli kahjuks.

Hiljuti avastati, et klostriide kahjustavad faagid on tüvespetsiifilised. See lubab infitseeritud fermenterit re-inokuleerida teise bakteritüvega.

#### h. Produktide eraldamine

Pärast teatavat säilitust eri tankis atsetoon ja butanool tavaliselt destilleeritakse välja ja fraktsioneeritakse. Viimasel ajal on aga kohati loobutud atsetooni puhastamisest. Atsetoon on odavam produkt - seda toodetakse keemilise sünteesi teel tunduvalt odavamini. Mikrobioloogiline tööstus peab andma just butanooli. Sellepärast sageli produktide seast atsetooni enam ei eraldata - see antakse müügile koos isopropanooli ja etanooliga üldise segu-solvendina.

Esimene destillaat sisaldab 20...30 % solvente. Järgneb fraktsioneeriv destilleerimine. Esimeses fraktsioonis eraldub atsetoon koos etanooliga, järgneb butanool-vesi aseptroop (63 % butanooli, mis normaalrõhul keeb 92° juures). Edasine fraktsioonide destilleerimine võib anda puhtad solvendid.

Pärast solventide eraldamist järelejääv materjal sisaldab üsna suuri koguseid riboflaviini. Vitamiini tootmine sellest jäägist on majanduslikult tasuv, kuid seda ei tehta igalpool.

Vähemal määral kasutatakse solventide eraldamiseks ka teisi meetodeid, näiteks adsorptsiooni aktiivsöel.

## 1. Produktide took

Üldiselt viiakse atsetoon- ja butanoolkäärimisel kuni 30 % kääritatavaist sahhariididest solventideks (see tähendab solventide akumuldeerumist keskkonnas kuni 2 % ulatuses). Kui suhkruid anda mitte 6 %, nagu tavaliselt, vaid rohkem, siis tõuseb küll solventide took, fermentatsiooni kasutegur aga langeb.

Solventide took sõltub üsna tugevasti keskkonnareaktsioonist. Maksimaalne saagis esineb nõrgalt leeliselise keskkonna puhul. Väljatulekut reguleerib ka mikroobide lämmastiktootumise režiim (suure hulga aminohapete esinemisel hoitakse protsess esimeses faasis ja neutraalsed solvendid ei kogune). Kergesti omastatava lämmastiku küllusel langeb eriti butanooli took. Puudulikul lämmastiktootumisel esineb vastupidine efekt.

Milline on produktide väljatulek toorainekogusega võrreldes? Veidi aitavad selles orienteeruda arvutused, mis näitavad, et Clostr. acetobutylicum'i protsessis saab 3 kg tärglise kääritamise arvel keskmiselt 1 kg orgaanilisi lahusteid. 1000 kg maisi arvel, milles on 650 kg tärglist, saadi butanooli 163 kg, atsetooni 70 kg, süsihappegaasi 407 kg, molekulaarset vesinikku 11 kg ja orgaanilisi happeid 12 kg. Peaaegu alati koguneb kilo-kahe piirides veel atsetooni ( $\text{CH}_3\text{-CHOH-CO-CH}_3$ ). Puskariõlised esineb 0,5...1 %. Nende hulgas on amüülalkoholi, isoamüülalkoholi, heksüülalkoholi jt. (muidugi on ka butanool ise teatav puskarõli). Peale "tavaliste" orgaaniliste hapete (äädik-, sipelg- ja võihape) leitakse fermenteerimiskeskkonnast kaprüül- ja kapriinhapet, mis hõlpsasti annavad estreid loetletud alkoholidega.

Nagu teada, on atsetoon-butanoolitööstuse primaarseks eesmärgiks butanooli saamine. On püütud leida võtteid selle produkti osatähtsuse tõstmiseks. Bakteritüvede selektsioon on andnud võimaluse atsetooni osa langetamiseks 20...25 %-ni. Probleemiks on aga jäänud protsessi juhtivate ainete lisamise võimalus. Asi on selles, et vaatamata kauaaegsele toot-

mispraktikale, on teadmised atsetoon-butanoolkäärimisest ikkagi veel väga ebatäielikud, mis ei luba leida ratsionaalset lahendust antud küsimuses. On saavutatud ainult mõningat edu puhtempiirilisel teel.

#### j. Tööstusharu perspektiivid

Maailma mastaabis langeb käärimisel saadava butanooli osatähtsus mitte just kiiresti, aga pidevalt. Atsetooni mikrobioloogiline tootmine on juba tähtsuse kaotanud. Kaasajal, kivisöekeemia baasil areneva keemilise sünteesi töötuse pideva laienemise tingimustes toodetakse mikrobioloogiliselt veel umbes 2/3 butanooli ja ainult 1/10 atsetooni koguproduksioonist. Probleemiks on eeskätt tooraine valik. Teravili kulub maailmas täheldatava demograafilise plahvatusetõttu ikka tungivamalt inimtoiduks või loomasöödaks. Tõusnud on ka melasside hind, mida põhjustab melasside kasutusvõimaluste avardamine ja nõudmise suurenemine.

Teiseks probleemiks atsetooni ja butanooli mikrobioloogilisel tootmisel on vajadus leida teid butanooli kui vääruslikuma produkti saagikuse tõstmiseks ja atsetooni ning butanooli suhte efektiivseks kontrolliks. Vaatamata intensiivsetele uurimistele pole seda seni teha suudetud.

Siiski ei saa ennustada käsitletava tööstusharu täieliku langust. Seoses vajadusega vabaneda järjest kasvavaist tööstuslike jääkproduktide kogustest, eriti sulfitleelistest, mis tohutuis hulkades tekivad paberi- ja tselluloositööstuses, tekivad kindlad perspektiivid ka antud mikrobioloogilisele tootmisharule. Vaevalt küll atsetooni ja butanooli mikrobioloogiline tootmine tulevikus osatähtsust juurde võib, kuid tõenäoliselt stabiliseerub see nimetatud produktide keemilise tootmise kõrval mingile püsivale ja küllalt arvestatavale tasemele.



#### 4. Orgaaniliste hapete mikro- bioloogiline tootmine

Paljud mikroobid käärivad suhkruid mitmesugusteks orgaanilisteks hapeteks. Tõsi küll, mitte igakord ei ole seejuures tegu käärimisega sõna ranges mõttes. Nagu käesolevaski õpikus toodud, sisaldab käärimise definitsioon tingimata anaeroobsust. Paljud orgaanilised happed (äädikhape, sidrunhape jt.) tekivad mikroobide elutegevuses aga õhuhapniku osavõtul. Tõelise käärimisega ühendab neid protsesse siiski produktide üsna ebatäielik oksüdeeritustase. Kumma-ki tüübi eristamiseks räägitakse anoksübiontilistest ja oksübiontilistest käärimisprotsessidest.

Käesolevas õpikus ei peatu me käärimiste biokeemilisel küljel (see on mikroobibiokeemia kursuse ülesandeks), iseloomustame aga lühidalt produtsente ja protsessi tootmis-tingimusi.

Orgaanilised happed on kaasaegses rahvamajanduses üsna tähtsad produktid. Toiduainetetööstus kasutab neid happes-  
tajatena ehk atsiduleerivate agensitena, keemiatööstus läh-  
teainena näiteks plastmasside valmistamiseks. Enamikku or-  
gaanilisi happed toodetakse seejuures mikrobioloogiliselt. Mõnda neist toodetakse isegi ainult mikrobioloogiliselt (piimhape), teisi nii keemilise sünteesi korras kui ka mik-  
robioloogiliselt (äädikhape).

Kõige stabiilsem ja laiem on äädik-, sidrun- ja piim-  
happe mikrobioloogiline tootmine.

##### 4.1. Äädikhappe tootmine

Tootmise aluseks on nn. äädikhapekäärimine, mille käi-  
gus etanol oksüdeeritakse mikroobsete agensite poolt äädik-  
happeks (etaanhappeks). Tegelikult on äädikhape üsna tava-

line mikroobse metabolismi produkt, kuid enamikul juhtudel moodustub seda tootmise tarbeks liiga väikestes hulkades. Ainult oksübiontilises protsessis, mida viivad läbi perekondade *Acetobacter* ja *Acetomonas* esindajad (nn. äädikhappebakterid) moodustub produkti tootmiseks küllaldasel määral.

Äädikhapekäärimine on eksergooniline protsess (selles protsessis varustuvad äädikhappebakterid elutegevuseks vajaliku energiaga). Iga mooli etanooli oksüdeerimisel äädikhappeks vabaneb 117 kcal energiat. Protsessi lõpp-produkt - äädikhape - on veel üsna ebatäielikult oksüdeerunud ühend ja sisaldab üsna suurt vaba energia varu. Sellest tulenevalt ongi energiatook suhteliselt madal ja vajaliku energia koguse saamiseks peavad bakterid "läbi töötama" suuri etanoolikoguseid. Selle poolest meenutab protsess tõelist käärimist. Hingamisprotsessile lähendab seda asjaolu, et vesiniku lõppaktseptoriks on molekulaarne hapnik. Sarnasust suurendab veel see, et äädikhappebakterid võivad olukorras, kus etanool on keskkonnast ammendatud, äädikhapet  $O_2$  manulusel ja osavõtul edasi oksüdeerida, andes madalaima energiasisaldusega lõpp-produkte -  $CO_2$  ja  $H_2O$ . Seega asub äädikhapekäärimine tõelise käärimise ja hingamise vahemail ning kohaseim on seda nimetada oksübiontiliseks käärimiseks.

Tööstuses kasutatakse äädikhapet väga laialdaselt. Äädikhape on vajalik atsetaatselluloosi, plastmasside, atsetüülsalitsülaadi (aspiriini) jm. produktide tootmisel. Tööstustarbelist äädikhapet aga kaasajal mikrobioloogiliselt peaaegu ei toodeta - selle annab keemiline süntees. Mikroobse protsessi tähtsus eeskätt nn. söögiäädika tootmises. Siin lähtutakse tärklis- või suhkurkeskkondadest, mis allutatakse eeskätt alkoholkäärimisele. Sellele järgneb atsetifikatsioon, s.o. äädikhapekäärimine. Kaasaja maailmaproduktisioonist toodetakse 40 % äädikhapet mikrobioloogiliselt, 30 % puidu destillatsioonist ja 30 % sünteesi teel. Nagu näeme, on käsitletav mikrobioloogilisel tootmisharul küllalt tähtis koht äädikhappe üldproduktisioonis.

Söögiäädikat tuntakse ka vinegaari nime all, mis tule-  
tub prantsusekeelsest nimetusest vin aigre (hapu vein), kui-  
gi mitte kogu söögiäädikas pole hapnenud vein. Kasutusel on  
ka muud allikad peale viinamarjamahla. Asi sõltub tarbijate  
maitseharjumustest, sest korralik söögiäädikas ei ole liht-  
salt äädikhape. Seda maitsestavad mitmesugused lisandijäl-  
jed, mis sõltuvad valitud toorainest. Veiniäädikas on eri-  
ti populaarne Vahemeremaades. Bestis eelistatakse siiski  
ühekülge, nagu "lameda" maitsega puhast äädikhapet (süntee-  
si saadust). Inglismaal saadakse enamuse söögiäädikat lin-  
nasemeskist, USA-s õunamahlast, Kanadas viskist. Vähemal  
määral toodetakse söögiäädikat meest, kuid ka muudest vürt-  
side ja rohtudega ettevalmistatud materjalidest.

Söögiäädikat kasutatakse toitude vahetuks maitsestami-  
seks, aga ka konserveerimiseks ning marineerimiseks ja rea  
kastmete (näiteks majoneesi) valmistamiseks. Söögiäädika  
maailmaproduksioon ulatub 90...100 miljoni liitrini aastas.

#### a. Kasutatavad bakterid

Äädikhappebakterid on looduses laialt levinud. Neid  
esineb õhutolmu kübemetel, valminud viljade ja marjade pin-  
nal, kust satuvad veinivirdesse ja võivad esile kutsuda  
selle hapustumist. Ülekandjaiks on peamiselt putukad, ees-  
kätt kärbes *Musca cellaris*. Et äädikhappebakterid on loo-  
duses laialt levinud, algab äädikhapekäärimine vastavas  
substraadis kergesti spontaanselt. Nõrga etanoolilahuse  
lahtisel seismisel tekib juba 1...2 nädalaga vedeliku pin-  
nale kile, milles domineerivad äädikhappebakterid. Liigi-  
liselt valitseb siin üsna suur mitmekesisus. Olulisimad  
liigid on alljärgnevad.

Acetobacter aceti Seda iseloomustab võrdlemisi nõrk  
kilemoodustamise võime. Rakud on lühikesed, liikumatud,  
asporogeensed pulgakesed, mis on väga resistentsed etanooli  
suhtes - *A. aceti* võib aktiivselt toimida isegi 11 % etanoo-  
lisisalduse juures. Substraadis võib see bakter akumulööri-

da kuni 6 % äädikhapet. Heaks keskkonnaks on talle nii vein kui õlu. Optimaalne kasvutemperatuur on 34°.

A. pasteurianum on morfoloogiliselt eelmisele väga lähedane. Etanoolilahuste pinnal annab iseloomuliku kuiva kortsulise kile.

A. orleanense kasvab eriti hästi viinamarjaveini lahustes. Praktikas laialt kasutatav äädikhappe saamiseks tööstusmastaapides. Iseloomustav on kõrge resistentsus etanooli suhtes (aktiivne elutegevus 10...12 %-lisel kontsentratsioonil). Käärimisenergia on kõrge - võib substraadis koguda kuni 9,5 % äädikhapet.

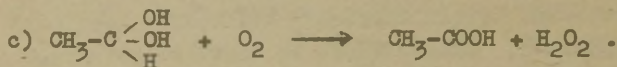
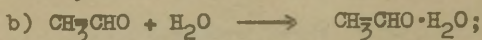
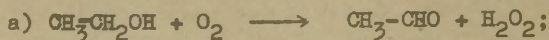
A. xylinum on laialt levinud metsik äädikhappebakter. Kultuurides annab söötme pinnale suhteliselt paksu kile. Võib akumuleerida äädikhapet kuni 4,5 % sisalduseni. Iseloomustav on tugevalt väljendunud võime äädikhapet edasi oksüdeerida.

A. schützenbachii on koos lähedase A. curvum lga kõige enam kasutatavad liigid NSV Liidu mikrobioloogilises äädikhappetööstuses. Põhiline erinevus nende vahel on optimaalses kasvutemperatuuris, mis esimesel on mõnevõrra madalam (28° teise 35...37° vastu). Kilemoodustamise võime on nõrk. See nõuab kokkupuutepinna suurendamist substraadiga (puitlaastmenetluse teel).

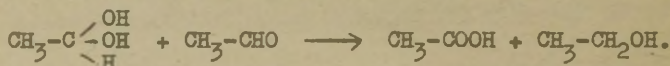
Tootmises saadakse etanool, mis on atsetifikatsiooni lähteaineks, nii nagu eespool (vt. lk. 17 jj.) kirjeldatud. Erinevus võib seista ainult selles, et siin on eesmärgiks maksimaalse alkoholi hulga saamine kääritavas materjalis. Seepärast kasutatakse kääritamiseks spetsiaalselt selekteeritud pärmitüvesid. Kui lähtematerjaliks on vein, siis väljutakse veinitootmisel tavalist vääveldioksiidiga töötlemist (SO<sub>2</sub> inhibeerib äädikhappebaktereid). Enne inokuleerimist sobiva äädikhappebakteriga lastakse alkoholilist toormaterjali 2...3 nädalat seista.

## b. Atsetifikatsioon

Äädikhapekäärimist võib ligikaudu väljendada järgmiste võrranditega:



See tähendab, et esimeses etapis moodustub atseetaldehüüd, mis järgnevalt hüdrateerub. Atseetaldehüüd hüdraadi oksüdeerimisel tekib juba äädikhape. Puuduliku aeratsiooni korral toimub atseetaldehüüdi oksüdeerimine dismutatiivselt, s.t. üks molekul oksüdeeritakse teise redutseerimise arvel:



See, n.-õ. koduses majapidamises täheldatud protsess arendati tööstuslikuks eriti Prantsusmaal. Kaasajaks väljakujunenud nn. aeglane atsetifikatsioon kannabki Orleans'i protsessi nime.

Orleans'i protsess kulgeb spetsiaalsetes külitil asetatud vaadides, mis sisaldavad 1/3...1/2 mahtu valmis pastöörimata äädikat koos aktiivsete bakteritega. Siia lisatakse 1/2 mahtu veini või muud alkoholilist vedelikku. Lahuse temperatuur tõstetakse algul 20...30°, paari päeva pärast veel 3...4° võrra (siis, kui protsess on alanud ja vedeliku pinnal on moodustunud suhteliselt massiivne kile). Et bakterite ja lahuse kokkupuutepind on väike, siis on protsess tervikuna aeglane, kestab 8...10 päeva. Protsess lõpetatakse veel jääketanooli olemasolul (vastasel korral oksüdeeriksid bakterid äädikhapet edasi). Aami sisu eemaldatakse pooles ulatuses ja asendatakse uue alkoholvedelikuga. Nii kordub protsess peatuseta ja kannab poolpideva protsessi iseloomu. Vaadides vedeliku kohale jäävat ruumi tingimata õhustatakse.

Suurtööstuse jaoks on see protsess liiga aeglane. See pärast töötati juba XIV sajandil Saksamaal välja kiirmeetodi põhilused. Põhiline võte on selles, et alkoholvedelikul lastakse nõrguda läbi ja üle hõredalt pakitud tahke materjali (näiteks laastude), mis on infitseeritud äädikhappebakteritega. Peab märkima, et kuigi kiire protsess tõstab atsetifikatsiooni intensiivsust ja tunduvalt lühendab sama produktkoguse saamiseks vajalikku aega, jääb kiirmetodil saadav produkt kvaliteedilt maha Orleans'i tehnoloogia kohaselt saadavast produktist. Aeglase protsessi puhul maitsestavad vinegaari lisaproductid (meeldiva lõhnaga õun- ja viinhappe estrid).

Kaasaegses tööstuse viiakse käärimist kiirmetodil läbi erilistes atsetifikaatorites. Need on 20000...25000-liitrise mahuga puust anumad, mis on seest varustatud perforeeritud riiulitega, kuhu asetatakse tahke materjal aktiivpinna suurendamiseks. Originaalselt olid selleks pöökpulaastud, kuid kaasajal kasutatakse eri maades erisuguseid materjale - asi sõltub maitsest ja söögiäädika tüübist. Kui tooraineks on linnaseekstrakt, siis kasutatakse antud funktsioonis kaseraagusid. Sageli kasutatakse ka kaselaaste, kuid tööstuses kohtame ka koksi, roogpalmi jm. materjale. On kasutatud ka maisitõlvikuid ja viinamarjakobarate varsi.

Värskest täidetavasse atsetifikaatorisse pumbatakse teisest, aktiivsest atsetifikaatorist juurde aktiivvedelikku ja lastakse segul tsirkuleerida, kuni laastudel või muul materjalil on küllaldaselt äädikhappebaktereid. Järgnevalt lastakse aamist läbi valguda toorainel - alkoholvedelikul. Kui see jõuab põhja, siis toimub jahutus ja uus tsirkulatsiooni juhtimine.

Et atsetifikatsioon on aeroobne protsess, siis on atsetifikaatorid varustatud õhustusseadmetega. Õhustusega reguleeritakse ka temperatuuri, mille optimum on 26...30°. Kõrgemal temperatuuril bakterid inaktiveeruvad, etanool ja hape aga aurustuvad. Madalamal temperatuuril jällegi ähvardab infektsioon tülika limastajaga (*A. xylinum*).

Atsetifikaatorist lahkuv äädikas sisaldab keskmiselt 7...9 % tiitritavaid happeid, mille seas domineerival kohal on äädikhape ja veidi jääkalkoholi. Maitse pehmemamiseks hoitakse toorprodukti kuni 6 kuud suurtes tärtes. Peamine on pehmitamisel jääk-etanooli ja käärimisel tekkinud muude alkoholide esterifikatsioon.

Valmis produkt filtreeritakse, villitakse pudelisse ja pastööritakse.

Bakterioloogilisest seisukohast on äädikhappe tootmine üsna primitiivne protsess. Kontrollimäär protsessi üle on üsna väike. Väga harva reguleeritakse ka bakteriofloora koosseisu, mis pigem kujuneb spontaanselt. Et aga protseduur majanduslikult on väga efektiivne, siis jätkub tööstusprotsess juba aastakümneid kord kujunenud viisil. Alles viimasel ajal on hakatud katsetama uusi meetodeid, eeskätt süviskultuuride rakendamise võimalusi (läbipuhumine, vahus kasvatamine). Teine viimaseaegne uuenduskatse seisneb puust aamide vahetamises metalltankidega (roostevabast terasest).

### c. Infektsioon, lõpp-produkti defektid

Ohtlikemad infitseerijad on nematoodide hulka kuuluvad äädikaussid Anguillula aceti. Need 1...2 mm pikkused ussikesed ( $\sigma^7$  kuni 1 mm,  $\varphi$  - 1...2 mm) võivad aktiivselt paljuneda kuni 6 % äädikhappesisaldusega keskkondades. Antud nematoodid toituvad äädikhappekahjustest. Inimesele on need ussid tegelikult kahjutud, kuid muudavad produkti eemaletõukavaks. Neist vabanemiseks piisab äädika kuumutamisest 45° juures ja järgnevast filtreerimisest. Äädikaussi levitab kärbes Drosophila fenestratum. Et infektsiooni vältida, tuleb atsetifikaatorite õhustusavad katta mitmekordse marliga.

Muudest kahjuritest on olulisimad A. aceti ja A. xylinum. Esimene toob kaasa produkti hägustamise, teine limastumise. Võitluseks nende metsikute bakteritega tuleb atse-

tifikatsioon peatada, atsetifikaator tühjendada, pesta ja desinfitseerida. Valmisprodukti tuleb pastöörida.

Kui kiirmenetlusel toimub teoreine ebaühtlane jaotumine atsetifikaatoris, võivad tekkida nn. surnud tsoonid, kus on madal happesus. Need tsoonid võivad infitseeruda pärmidega perekonnast Candida, mis viivad etanooli ja äädikhappe kadudele.

#### 4.2. Piimhappe tootmine

Väikestes kogustes moodustavad piimhapet ( $\alpha$ -hüdroksüpropaanhape,  $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$ ) väga paljud mikroobid, nii bakterid kui ka mikroseened. Esineb aga baktereid, kellel piimhape on suhkrute anaeroobse dissimilatsiooni peamine lõpp-produkt. Neid tuntakse piimhappebakteritena.

Piimhape on vanimaid tuntud orgaanilisi happeid. Puhatal kujul eraldas selle esmakordselt Scheele 1780.a. Kaasajal on piimhape laialt kasutatav tööstuses ja igapäevases majapidamises. Sellel on meeldiv hapu maitse, kusjuures lõhna ei ole. See teeb temast sobiva atsiduleerimisagensi toitvate ja jookide jaoks. Et piimhape seguneb veega igas vahekorras, ei teki tööstuses tema tarvitamisel kristallisatsiooniprobleemi. Suppide, džemmide, marinaadide koosseisus toimib piimhape peale maitseomaduste reguleerimise veel konserveerijana.

Nahatööstus tarvitab Ca-laktaati nahkade (eriti karusnahkade) töötlemisel. Tekstiilitööstuses on piimhape siidi viimistlemisel kasutatavaks agensiks.

Kontsentreeritud piimhappelahustes toimub spontaanne anhüdrüüdi teke ja inter-esterifikatsioon, mis annab polülaktaadi. Kuumutades polülaktaati taimeõlidega (või ka sünteetiliste õlidega) saadakse katalüütilises protsessis elastne aine-resinvaik, mis on töödeldav termoplastikuks.

Ca-laktaat on farmatseutilistes preparaates kaltsiu-



mi-allikaks. USA-s kasutatakse seda ka noorloomade sööda-  
lisaks talvisel laudaperioodil. Meil seda ei tehta pro-  
dukti kõrge hinna tõttu. Ühtlasi on Ca-laktaat küpsetus-  
pulbrite komponendiks (ajalooliselt oli see piimhappe toot-  
mise esimene eesmärk).

Cu-laktaati tarvitatakse elektroplaatimisel, eriti  
trükiklišeede valmistamisel.

Alküül-laktaadid on olulisi komponente plastikute val-  
mistamisel.

Piimhappe akrüülestrid on polümeeride tootmise alu-  
seks, mida kasutatakse lakkide ja vööpade valmistamiseks.

Nagu näeme, on piimhappel kaasaegses rahvamajanduses  
üsna mitmekesised funktsioonid. Piimhappe laiemat tarvita-  
mist takistab mikrobioloogilisest tööstusest saadava pro-  
dukti kõrge hind. Seejuures saadakse aga peaaegu kogu  
tööstuslikult toodetav piimhappe mikrobioloogiliselt. Kri-  
ti kallis teeb piimhappe raske isoleerimis- ja puhastus-  
protsess. Teiseks tõstab produkti hinda vajadus kasutada  
väga kallihinnalisest mittekorrodeeruvast materjalist sis-  
seseadet. Kõige selle tõttu on püütud leida teid piimhappe  
keemiliseks sünteesiks. Tööstuses on keemilise sünteesi  
meetoditel seni aga üsna väike tähtsus.

Piimhappe maailmatoodang ulatub kaasajal 10...12 mil-  
joni kilogrammini aastas.

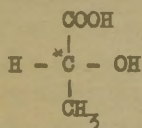
#### a. Käärimisprotsess ja agensid

Teatavasti eristatakse homo- ja heterofermentatiivset  
piimhappe-käärimist sõltuvalt sellest, kas produktid moo-  
dustavad peaaegu ainult piimhapet (muid produkte jälgedena)  
või siis koos piimhappega märgatavais hulkades ka etanooli,  
äädikhapet,  $CO_2$ , glütserooli jm. lõpp-produkte.

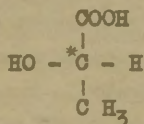
Beokeemiast teame, et käärimised kulgevad püroviina-  
marihappeni ühtset rada pidi. Küsimuses on seega tee püru-  
vaadilt laktaadile. Eksisteerib kaks võimalust: a) püru-

vaat redutseeritakse otseselt laktaadi dehüdrogenaasi osavõtul  $\text{NADH} + \text{H}^+$  arvel piimhappeks; 6) protsessis esineb vaheprodukt metüülglükoosil  $\text{CH}_2\text{-CO-CHO}$ , mis glükosalaasi toimel (koensüüm - glutatioon) hüdreeritakse piimhappeks. Selliste homofermentatiivsete radade agensitena tunneme tervet rida graampositiivseid kokke ja nn. piimhappebaktereid, kelle seast tähtsamad on Lactobacillus delbrueckii, L. bulgaricus ja Bac. dextralacticus. Nimelt homofermentatiivset protsessi rakendataksegi piimhappe tööstuslikul tootmisel.

Piimhape on teatavasti toatemperatuuril värvitu, siirupja koekristantsiga vedelik, mille molekuli ehitust iseloomustab ühe asümmeetrilise süsinikuatomi esinemine, mistõttu esineb optiline isomeeria. Tuntakse kaht optiliselt aktiivset vormi: D(-)-piimhapet ja L(+)-piimhapet.



D(-)-piimhape



L(+)-piimhape

Enamasti produtseerivad piimhappebakterid piimhappe ratseemilist segu, kuid Rhizopus oryzae moodustab ainult L(+)-vormi. Ratseemilisus tuleneb laktaadi ratsemaasi tegevusest, Rh. oryzae'l see ensüüm aga puudub.

On selge, et tööstus tahab produkti saada võimalikult suures hulgas, kontsentreeritud kujul, ballastainete minimaalsete lisandega. Tööstuse rentaabluse huvides on vaja, et käärimisel kasutataks lähteaine sahhariidid ära võimalikult täielikult. Seepärast on väga oluline õigete produtsetide valik, kes oleksid võimalikult aktiivsed ja kõrge utiliseerimiskoeffitsiendiga, andes ühtlasi maksimaalselt homofermentatiivse protsessi. Parimini vastab neile nõuetele L. delbrueckii, keda iseloomustab tehnoloogiliselt soodsast küljest veel termofiilsus (optimaalne kasvutempe-

ratuur 48...50°). Termofiilsuse tõttu on *L. delbrueckii* kultiveerimisel vähe ohtu kontaminantidega risustumiseks ja protsessi saab läbi viia aseptilistes tingimustes, mis lihtsustab tehnoloogiat ja madaldab produkti maksumust. Kõnealune mikroob konverteerib piimhappeks kuni 98 % kasutatud suhkruid. Lõpuks on *L. delbrueckii* positiivseks omaduseks veel kõrge happetolerantsus. Negatiivsetest joontest tuleb nimetada erakordset nõudlikkust kasvukeskonnas, eriti toitainete sisalduse suhtes. Sünteetilistes söötmetes on seda mikroobi väga raske kultiveerida - vajab keerulise koostisega looduslike substraate. Eriti vajab *L. delbrueckii* tüsilikke lämmastikühendeid (valke, peptiide, lihtsalt aminohapped teda ei rahulda). Seepärast sõltub tööstuses kasutatava laktobatsilli konkreetne valik peamiselt sellest, missugusel toorainel tehas töötab. *L. delbrueckii* tüved eelistavad virdeid ja teraviljadest lähtuvaid meskisiid, eriti hästi "töötab" see liik maisisuhkrut sisaldavate keskkondades. Kui tooraineks on piimavada, tuleb kasutada *L. bulgaricus*'e või *Streptococcus lactis*'e tüvesid, kes on võimelised laktoosi kasutama. Kartulitel ja sulfitoleelistel baseeruv tootmine peab kasutama *L. pastosus*'t.

#### b. Tooraine ja tööstuslik kääritamine

Teraviljadest saadavaist virdeist ei ole vaja eemaldada jämedalt purustatud seemnete jääke. Vastupidi, kui on tegu puhasvirdega, on isegi soovitatav lisada veidi rukki-, resp. maisijahu. See kindlustab *L. delbrueckii* lämmastiktootumise. Välja arvatud võimetus kääritada laktoosi, ei ole antud bakter sahhariidide suhtes eriti spetsiifiline - ta võib kääritada glükoosi, fruktoosi, galaktoosi, maltoosi, sahharoosi, isegi mõningaid polüsahhariide (inuliin, dekstriinid, tärklis). Tärklis-tooraine siiski enne protsessi hüdrolüüsitakse maltoosini ja madalamate dekstriinideni. Selleks lisatakse 24...25 %-lisele tärklisekliistrile

10...12 % linnaseid, mis sisaldavad aktiivset amülaasi, samuti aga ka toitaineid laktobatsillile. Hüdroolüüsitud segule lisatakse vett, nii et lõpuks kujuneks 10...12 %-line kontsentratsioon maltoosi osas. Käärimine viiakse läbi suurtes, tuhandeid liitrit mahutavates puit- või metallanumates 50° juures. Inokulum moodustab söötme mahust seejuures tühise murdosa (inokulum kasvatakse tavaliselt vaid 3...5-liitrites anumates ja seda lisatakse mahu järgi mitte üle ühe protsendi). Käärimise ajal lisatakse iga 6...12 tunni järel piimhappe neutraliseerimiseks kriiti või lupja. Keskkonna alg-pH on 5,5...6,0. Käärimine vajab 5...6 päeva. Nüüd lisatakse lupja kuni pH 10-ni ja bakterid surmatakse segu temperatuuril tööstuslega 100°-ni. Selles protsessis sadestuvad ühtlasi valgud.

Kasutatakse ka puhtaid suhkrukeskkondi (produkti ekstraheerimise hõlbustuseks). Siis on tegu glükoosilahusega, mis saadakse maisitärklise hüdroolüüsil mineraalhapetega. Et baktereil oleks sellises keskkonnas vajalikku lämmastikku, lisatakse maisitärklisele enne hüdroolüüsi väike osa otra. Puhtast suhkrulahusest on laktaadi isoleerimine tunduvalt hõlpsam kui virdest, mis sisaldab rohkesti aminohappeid. Laktobatsill aminohappeid ei kasuta, need aga takistavad piimhappe puhastamist. Ballastaineteks on selles mõttes ka virdes esinevad dekstriinid (linnased hüdroolüüsivad tärklise umbes 82...85% ulatuses maltoosiks, ülejäänud osas jäävad mitmesuguse liitsusega dekstriinid).

Sapošnikov soovitas toitekeskkonnaks vikiseemnete ekstrakti (selles esineb vähe ballastaineid). Kasutatavad on ka muud liblikõieliste seemned. Saadav vedelik on valgeikas, sisaldab aga vähe vabu aminohappeid (ekstraheerimine toimub 3 % MgSO<sub>4</sub> abil 75...76° juures). Paralleelselt valmistatakse suhkrulahus, hüdroolüüsides tärklisist mitte linnastega, vaid väävelhappaga (see hüdroolüüs ei anna dekstriini, nagu näidatud juba ülal). Mõlemad lahused ühendatakse ja lahjendatakse 10...12 % suhkrusisalduseni.

Toorainena kasutatavad on ka melassid, pastööritud va-

dak, kartul (kartulitärklis hüdrolüüsitakse mineraalhappega või seentest saadud ensüümidega). Katsetatud on ka sulfitteelisi.

Kääritamine on piimhappe tootmisel, nagu nägime, tehnoloogiliselt suhteliselt lihtne. Puhta L-(+)-piimhappe tootmisel Rh. oryzae abil (tööstuslikus mastaabis kasutatakse seda vähe, ometi on see vajalik siis, kui ratseemiline segu ei rahulda tarbimisvajadusi) kasutatakse puhta glükoosi keskkondi soolade lisanditega. Tegu on aeroobse hallitusseenega, seepärast toimub protsess kas pind- või süviskultuuris. Tsükkel kestab pindkultuuri puhul kuni 20 päeva, süviskultuuri puhul 2...3 päeva. Saagikus moodustab 60...75 %.

### c. Produkti ekstraheerimine ja puhastamine

Piimhappe kättesaamine käärimiskeskonnast on antud tootmisharu tüsilikem probleem. Valkude ja lisandite sade filtreeritakse välja, aga filtraadist ei saa hapet kuigi edukalt välja kristallida selle madala sulamistemperatuuri (18°) tõttu. Destillatsioon madaldatud rõhudel viib aga produkti kadudele. Seepärast kasutatakse kaasajal peamiselt piimhappesoolade (laktaaside) moodustamist sekundaarsete või tertsiaarsete alkuulaminiididega. Saadavad soolad on küllalt stabiilsed vesilahuseist orgaaniliste solventide abil eraldamiseks. Solvent aurustatakse, sool lõhustatakse uuesti vaba piimhappe saamiseks.

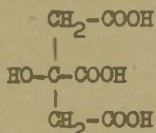
On katsetatud mitmeid muidki meetodeid. Täiuslikem aga ühtlasi kalleim meetod piimhappe isoleerimiseks on esterifikatsioon. Estrid destilleeritakse keskkonnast välja ja hüdrolüüsitakse piimhappeks ning alkoholiks. Seda menetlust kasutatakse tooraine saamiseks plastmasside tootmisel, sest see meetod lubab saada üsna kõrgekonsentratsioonilise piimhappelahuse.

NSV Liidus kasutatakse põhiliselt piimhappe väljakristallimist Ca-laktaadina. Kristallid eraldatakse vedelikust

tsentrifuugimisega. Laktaat ise lõhustatakse väävelhappega, Sadeneb kips ja lahusesse vabaneb piimhape. Saadav produkt on nn. tehniline piimhape ja sisaldab produkti umbes 10 %.

#### 4.3. Sidrunhappe tootmine

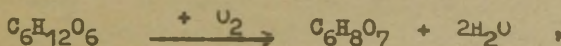
Ka sidrunhape (2-hüdroksü-1,2,3,-propaantrikarbok-süülhape) kujutab endast oksübiontilise protsessi, s.o. ebatäieliku oksüdatsiooni produkti. Sidrunhappe struktuur-valem



näitab, et tegu on trikarboonhappega. Nagu teada, on sel-  
lel happel äärmiselt tähtis koht sahhariidide aeroobses ai-  
nevahetuses (tuletagem meelde tsitraat- ehk Krebsi tsükli),  
selle akumulatsioon mitmete mikrooseente (*Aspergillus niger*,  
*A. wentii*, *Penicillium sp.*, *Citromyces sp. jt.*) kultuurides  
ei ole aga seni täiesti lahendatud küsimus.

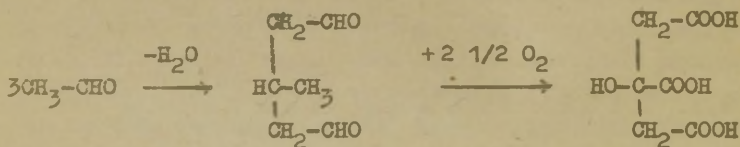
#### a. Tekkeprotsess, produtsent ja produkt

Summaarselt võib sidrunhappe teket väljendada võrrandi-  
ga

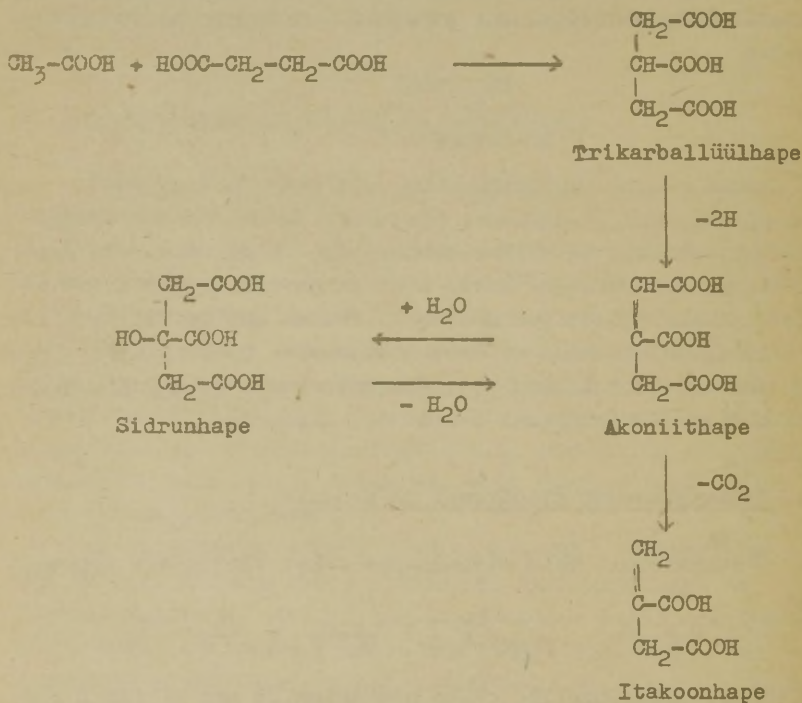


produkti mükoloogilise tekke mehhanismist aga ei räägi see  
võrrand midagi. Nagu öeldud, küsimuses puudub selgus (vaja  
on postuleerida sellist mehhanismi, mis lubaks seletada nii  
produkti akumulatsioonist kui ka protsessi füsioloogilist  
tähtsust. Eksisteerib kolm põhilist hüpoteesi sidrunhappe  
tekkemehhanismi kohta.

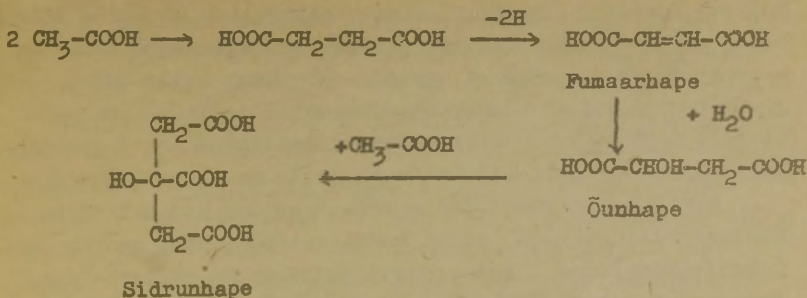
Esimene hüpotees eeldab a. seetaldehüüdi kondensatsioonist lähtuvat tekketeed:



Teise hüpoteesi kohaselt on lähtekohtadeks äädikhape ja merevaikhape:



Kolmanda hüpoteesi kohaselt algab protsess Thunbergi kondensatsiooniga:



Oluliselt on aga probleem lahendamata. Võib-olla konkreetsel juhul toimib üks esitatud radadest, võib-olla esineb korraka mitu paralleelset tekketeed. Võimalik on ka see, et sidrunhappe mükoloogiline teke oksübiontilises käärimisprotsessis on mingis seoses ka Krebse tsükli funktsioneerimisega. Üldiselt on sidrunhape, nagu märgitud, ainevahetuses tähtsaks võtme-intermediaadiks. Et ta aga normis on intermediaat, s.o. vaheprodukt teel süsihappegaasile ja veele, siis ei kogune teda normaalselt kuigivõrd märgatavates kogustes. Tõepoolest ei leidu organismides kuigivõrd sidrunhapet. Erandiks on aga tsitrusviljad, ananass, karusmarjad. Sidrunhappe esimene tööstuslik tootmine toimuski sidrunitest.

Mikroosente mõned liigid akumuleerivad kindlaid toitumistingimustes keskkonda üsna suuri sidrunhappe koguseid. Selle eelduseks on mitut laadi toitumiseadefitsiitsused, eeskätt fosfori, raua, mangaani, tsingi ja vase puudus toitelahuses. Tuleb märkida, et sidrunhapet akumuleeriv seen on bioloogilisest vaatepunktist "haige" seen. Kuidas siin nälgu toimib, ei ole selge. Tõenäoliselt on asi takistustes, mida organism talub ensüümide sünteesimisel, mis peavad asja sidrunhapest edasi viima (akonitaas, isotsitraadi dehüdrogenaas).

Kaasajal on sidrunhappe peamiseks produtsendiks Aspergillus niger. Produtsena avastati see seen 1916.a.



(Thorn, Currie). Produkti mikrobioloogiline tootmine läks hoogu pärast I maailmasõda (tähtsat osa etendasid selles Butkevitsi ja Kostõtševi uurimised). Kuni selle ajani tuli 90 % maailma sidrunhappetoodangust Itaaliast, kus seda toodeti sidrunest. Mikroseente rakendamine antud tootmis-  
harus andis Itaalia sidrunikasvatusele parandamatu löögi.

Sidrunhapet kasutatakse esmajärgulise atsidulandina toiduainetetööstuses, eriti kondiitritööstuses, aga ka parfümeeriatööstuses. Hea aromaat ja kerge omastatavus soodustavad kasutamist toiduainetetööstuses. Asendamatu on sidrunhape mõnedes karastavates jookides, kissellipulbris jm. Tsitraadid ja tsitraatestrid leiavad ikka enam kasutamist želeestajatena, plastikaatoritena, lahustava agensina (näiteks õlianusis rauapinnal). Sidrunhape stabiliseerib vedel-detergente värvuse kao vastu, seepärast kasutatakse seda ka tekstiilitööstuses siitsi värvimisel, peale selle veel peeglite hõbetamisel, tintide valmistamisel jm.

#### b. Tehnoloogia põhijooned

Sidrunhappe tootmistehnoloogia on väga lihtne. Söötmeks on tavaliselt puhtad sahharoosilahused (puhastamata sahhariidmaterjal ei annaks võimalust söötme anorgaanilise koostise kontrollimiseks). Sahharoosi kontsentratsioon viiakse 12...15 %-ni. Anorgaanilisi soolasid antakse kriitilises koguses. Lämmastik viiakse söötmesse ammooniumnitraadina, mille kasutamine tõstab sidrunhappe saagist. Toorainele lisatakse mõningane kogus ferrotsüaniidi, mille stimuleeriv toime põhjeneb tõenäoliselt sellel, et vähendab seal vaba raua hulka ja seob kahjulikke mikroelemente. Võimalik on ka otsene toime seenesse. 1953.a. pani Moyer ette kasutada lahjendatud melasse, millele lisada mitmesuguseid madalamaid alkohole (metanool, etanool, isopropanool), mis kõrvaldavad melassis leiduvate tsingi-, raua- ja mangaani-  
ioonide takistava toime sidrunhappe akumulereerumise. Kui metanooli hulk tõstetakse lähtemediumis 4 %-ni, siis võib

kasutada senisest laiemat ringi toorsahhariide, muuhulgas ka teraviljatärklisist ja kaubanduslikku glükoosi. Metanooli taolise toime mehhanism on seni tundmata.

Kasutatakse pind- ja süviskultuure. Pindkultuuride puhul, mis on viimase ajani valdavaks tootmisviisiks olnud, kasvatatakse Aspergillus niger'it tiheda viltja kihina õhukesel söötmekihil laiades vannides. Söötmereaktsioon reguleeritakse madalale - tavaliselt pH 3,5 juurde, aga isegi pH 2...3 vahele. Riistad ja sööde on steriilsed, kultuurivannide kohalt puhutakse läbi steriilset õhku. "Vildi" kasvatamine kestab 1...2 päeva, siis lastakse lahusel kultuuri alt ettevaatlikult ära joosta (et seenvilt säiliks tervena). "Vildi" alumine pind pestakse steriilse veega ja siis viiakse tugava saankihi alla juba lahus, milles peab kogunema sidrunhape. Inkubatsioon kestab 28...30° juures 7...10 päeva. Siis "vilt" eemaldatakse ja sidrunhape sadestatakse kuumast lahusest, mis eelnevalt neutraliseeritakse. Neutraliseerimisel (kriit, lubi) tekkinud Ca-tsitraadist saab vaba happe kätte väävelhappega menetlemisel. Sidrunhape saagis moodustab tavaliselt 60...90 % kasutatud suhkrutest.

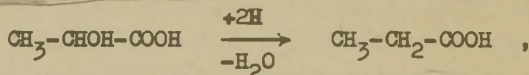
Süviskultuuridel, mis viimasel ajal levima hakkavad, on aerobseid mikroobe kasutatavas tööstuses suuri eeliseid. Sidrunhappe tootmisel piirab üleminekut aga tehnilise ümbervarustumise kõrge maksumus. Süviskultuurides õnnestuvad vaid teatavad A. niger tüved.

#### 4.4. Propioonhappe tootmine

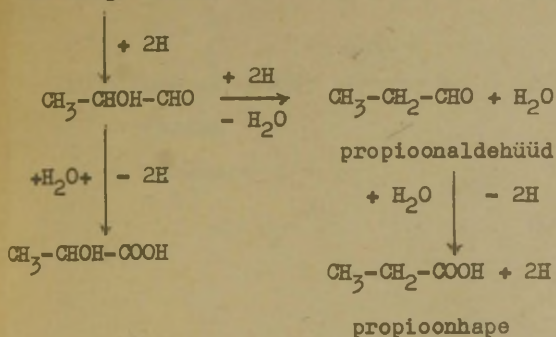
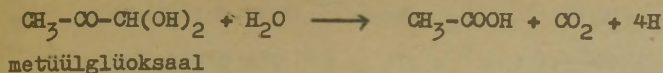
Propioonhapped (propanhapped) moodustavad üsna paljud mikroorganismid kui suhkrute dissimilatsiooni lõpp-produkti, kuid muude produktidega võrreldes enamasti väikeses kogustes. Perekonnas Propionibacterium on aga propioonhappe sahhariidide anaeroobse lagundamise peamine lõpp-produkt. Looduses on selle perekonna liigid (neid erista-

takse ll) laialt levinud. Kultuurides võivad nad kasutada glükoosi, maltoosi, laktoosi, piimhapet, primaarseid üheaatomilisi alkohole, glütserooli, piimhapet ja sugulasühendeid. Käärimisproduktide seas on valdaval kohal, nagu märgitud, propioonhape  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$ , selle kõrval koguneb keskkonda aga ka äädikhapet, merevaikhapet, atsetüülmetüülkarbinooli,  $\text{CO}_2$  jt. aineid. Propioonbakterid on liikumatud, graampositiivsed mikroobid. Füsioloogiliselt iseloomustab neid kõrge nõudlikkus toitekeskkondade suhtes. Peale suhkru või muude ülalloeletud süsinikuallikate vajavad nad rikkalikke lämmastikuallikaid. Laboratoorses kultuurides rahuldatakse need nõuded enamasti pärmiekstrakti abil. Enamik liike nõuab keskkonda vitamiinide (eriti pantotenaadi ja biotiini) lisamist. Samal ajal on mõned liigid viimasel ajal tähelepanu võitnud kui vitamiin  $\text{B}_{12}$  produtsendid.

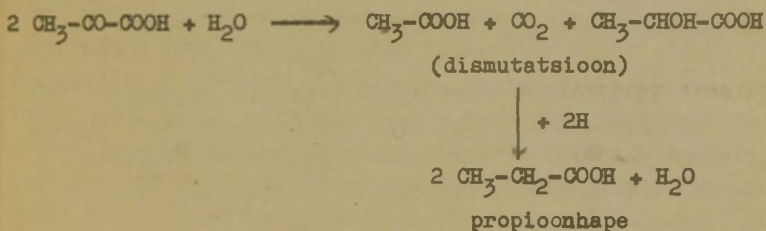
Propioonhappe biokeemiline tekkete ei ole selge. Tõenäoliselt eksisteerib propioonhappe tekkel rida paralleelmehhanisme, mis protsessi hilisemates etappides üksteisest tunduvalt erinevad. Kluyveri ja Bernhaueri järgi tuleb põhiliseks tekketeeks lugeda reaktsioone, milles piimhappe redutseeritakse ja dehüdrateeritakse



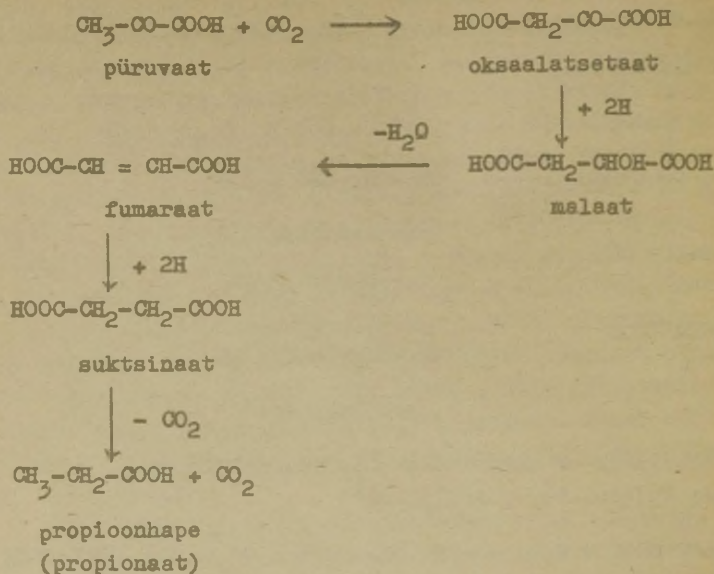
tõenäolisem on aga propioonhappe teke üle metüülglüksoali ja propioonaldehüüdi (Wood, Werkman), milline tee on tõestatud Prop. arabinosum'i juures.



Edasiselt on osutatud ka üle fosfoglütseraadi ja püruvaadi kulgeva tee võimalikkust



Reeglipärane on nähtavasti ka merevaikhappe dekarboksüülimine propioonhappeks, kusjuures merevaikhape (suktsinaat) ise tekib püruvaadist CO<sub>2</sub> (heterotroofse) fikseerimise tulemusena.

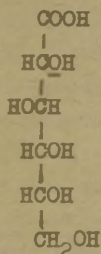


Propioonhapet kasutatakse peamiselt ühendina. Nii on tselluloos-propionaat üsna tähtis termoplastik, propioonhappestrid on kasutamisel parfümeeriäätööstuses, tsinkpropionaat evib preservatiivseid ja fungitsiidseid omadusi.

Enamik tööstuslikku propioonhapet toodetakse kaasajal sünteetiliselt, lähtudes looduslikust gaasist, väike osa saadakse siiski ka mikrobioloogiliselt. Mikrobioloogilist tootmist õigustab suure hulga odava tooraine - eriti tselluloositööstuse jääkproduktide olemasolu. Lisada tuleb aga pärmiekstrakti või muud materjali, mis on rikas orgaanilisest lämmastikust, samuti mineraalsoolaid. Tööstuses kasutatakse liiki Propionibacterium technicum, mis on kasvatatav ka otse tärklisist sisalduvais keskkondades. Sõltuvalt toorainest kestab tööstuslik tootmistsükkel 7...12 päeva (temperatuuril 30°).

#### 4.5. Glükoonhappe tootmine

Glükoonhape



on glükoosi otsese oksüdeerimise derivaat. Selle happe mikrobioloogiline teke avastati möödunud sajandil (Boutroux, 1887) Acetobacter aceti' kultuurides. Käesoleval sajandil näidati, et kõige enam tekib seda ebatäieliku oksüdeerimise produkti siiski mikrosteente elutegevuses. Vastavalt sellele orienteerus ka tööstus bakteritelt seentele. Kuni 1922.a. olid põhilisteks tööstuslikeks produtsentideks A. oxydans ja A. gluconicum, praegu saadakse aga ligi 99 % glükoonhappe kogutoodangust seente abil, kusjuures peamiseks produtsendiks on Aspergillus niger'i valitud tüved. Selle kõrval kasutatakse vähesel määral ka Penicillium luteum-purpurogenum'i ja Pen. chrysogenum'i tüvesid.

Tuleb märkida, et glükoonhappe tootmine on mikrobioloogilise tööstuse üks pidevalt laienevaid tööstusharusid. Ameerika Ühendriikides toodetakse seda hapet käesoleval ajal ligi 2000 tonni aastas (mujal palju vähem). Sünteetiliselt toodetakse glükoonhapet glükoosilahuse elektrolyüüsi teel bromiidide ja puhvri manulusel, kuid väga piiratud ulatuses. Valdav enamik glükoonhapet toodetakse mikrobioloogiliselt.

Tootmistehnoloogia on suhteliselt lihtne. Aspergillus niger'it kultiveeritakse glükoosilahuses, mis on soo-

ladega rikastatud. Keskkonnas luuakse karbonaatidega kaltsiumi liig umbes 0,3 % ulatuses. Kultivaatoriteks on suured pöörlevad silindrid (pöörlemine toimub silindri horisontaalsel pikiteljel kiirusega 8...14 pööret minutis. Sööde steriliseeritakse kultivaatoreis, kriit aga eraldi enne lisamist. Kuni 150 % lisatakse booriühendeid, peamiselt boraatidena. Boori lisamisel on hämmastav positiivne efekt glükoosi utiliseeritavuse suhtes - seen saab selliste lisanditega keskkonnas edukalt areneda ka 35 % glükooisisalduse juures. See annab tohutu efekti tootmisökonoomia osas (tootmispinna ja kultivaatorite mahu kokkuvõid). Boor takistab Ca-glükonaadi sadestumist, millega loob keskkonnas tingimused kõrge suhkrukontsentratsiooni talumiseks.

Produtsentseent kasvatatakse, nagu ilmneb esitatud pöörlemisrežiimistki, süviskultuurina, seda aga läbipuhumiseta (selle ülesandeid täidab kultivaatorite pöörlemine, õhku puhutakse üle meediumi pinna). Kultiveerimine toimub 30...32° juures. Inkubatsioon lõpetatakse, kui suhkrukontsentratsioon langeb meediumis alla 1 %. Siis peatatakse trumli pöörlemine ja oodatakse, kuni seenemütseel pinnale kerkib. Alt lastakse meedium välja ja viiakse uus kogus asemele. Ilmneb, et protsess on n.-ö. poolpidev. Üks tootmistsükkel vältab keskmiselt 10 tundi.

Kultivaatorist väljutatud sööde filtreeritakse ning segatakse  $\text{Ca(OH)}_2$  suspensiooniga. Glükoonhape isoleeritaksegi kaltsiumsoolana.

Väga soovitav oleks produkti edasise kasutamise huvides seda teatavas koguses saada mitte kaltsium-, vaid naatriumsoolana. Seni on see õnnestunud süvis-aereeritud kultuurides vaid ühe *A. niger*'i tüvega, kuid ligi neli korda pikema tootmistsükli kestel.

Glükoonhapet kasutatakse eelkõige farmaatsiatööstuses - kaltsiumglükonaat on kaltsiumi allikaks seda vajavatele patsientidele, raudglükonaat on vahend toitumiseliku aneemia vastu, naatriumglükonaat aga vahend, mis väldib Mg- ja Ca-glükonaatide sadestumist leeliselistest lahustest.

Na-glükonaat on lisandina 5...10 % soodalahuses efektselt kasutatav vahustumisvastane vahend piimatööstuse automaatpesijates.

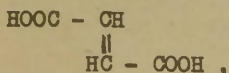
Glükoonhape pikendab jahuproduktide kasutuskõlblikkust (annab neile mureduse), mistõttu on kasutatav kondiitritööstuses. Glükoonhappe delta-laktoon on küpsetuspulbrite komponent, mis kindlustab CO<sub>2</sub> kontrollitava, aeglase vahanemise.

#### 4.6. Fumaarhappe tootmine

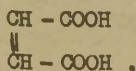
Nagu teada, on fumaarhape (trans-buteendihape) tsitraatsükli normaalne vaheprodukt. Selle akumulereerumist keskkonnas kohtame aga vaid väheste mikroobiliikide juures. Produutsentideks on mõned mikroseenid perekondadest Mucor, Cunninghamella, Circinella, Rhizopus. Koos fumaarhappega koguneb teisi happeid ja etanooli.

Tuleb märkida, et loetletud seente elutegevuse tagajärjel märgatavates kogustes akumulereeruv fumaarhape ei ole pärit tsitraatsüklist. Tõenäoliselt on tegu iseseisvate C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> ja C<sub>3</sub>-C<sub>1</sub> kondensatsiooniprotsessidega, mida aga kuigivõrd ei tunta.

Mikrobioloogiliselt toodetav fumaarhape on transvormiline



millega produkt erineb keemilise sünteesi teel benseenist saadavast tsiss-vormist



mida kaubanduses tuntakse maleiinhappe nime all.



Kolmveerahd maailma fumaarhappe aastatoodangust (mitu tuhat tonni) kulutatakse alküülvaikude (resiinide) valmistamiseks. Produkt on vajalik ka nahaparkimisel ja paberitööstuses (viimasel - paberi läigestamisel ehk lihtimisel).

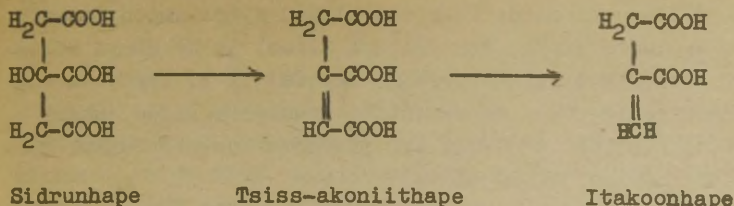
Trans-tsiss-isomeeris tõttu ei ole sünteetiline produkt alati sobiv mikrobioloogilise produkti asendamiseks.

Tööstuses kasutatakse kaasajal peamiselt *Rhizopus* seente kultuure (*Rh. nigricans*, *Rh. oryzae*), mida kasvatatakse nii süvis- kui pindkultuuridena glükoosi + soolade lahuseis. Tootmistsükkel kestab 28° juures keskmiselt 3 päeva. Saagis moodustab kuni 60 % tarvitatud glükoosist.

#### 4.7. Itakoonhappe tootmine

Itakoonhape (3-metüleenbutaandihape) ja selle mikrobioloogilise tootmise võimalus avastati 1929.a. Jaapanis. Tegu on väga reaktiivse ainega, mille estrid on hästi polümeriseeritavad ja annavad plastmasse. Peale selle kasutatakse itakoonhapet vaikude-resiinide ja detergentide tootmiseks.

Itakoonhape tekib tõenäoliselt tsiss-akoniithappe dekarboksüülimisel perekonna *Aspergillus* mõnede liikide elutegevuses. Algselt avastatud *A. itaconicus* isoleeriti soolatud ploomidest valmistatud hapust mahlast. See kultuur aga kaotas mõne aja pärast produktsioonivõime. Uus produktsent, mida kasutatakse tööstuses tänapäevani, avastati USA-s 1945.a. (*A. terreus*). Selles kultuuris on itakoonhappe tekke peatee Bentley ja Thiesseni järgi järgmine:

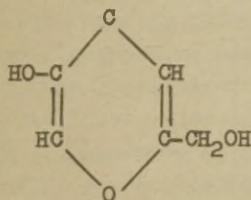


Tootmises kasvatatakse *A. terreus*'t nii pind kui ka süviskultuurides. Söötteks on soolaga rikastatud glükoosilahus, mille reaktsioon reguleeritakse pH 2 juurde. Inokuleeritakse spooridega, tootmistsükkel kestab 12 päeva. Saagis moodustab kuni 60 % kasutatud glükoosist.

Kaasajal viiakse tootmine ikka enam keemilise sünteesi alustele, sest itakoonhappe mikrobioloogiline tootmine on väga kalline.

#### 4.8. K o j i - h a p p e t o o t m i n e

Koji-hape, mis avastati 1907.a., on teatav metaboolne kuriositeet. Keemiliselt on tegu 5-hüdroksü-2-hüdroksümetüül- $\gamma$ -pürooniga



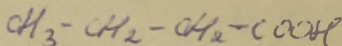
mis toimib antibiootikumina ja mida intensiivselt kasutatakse fungitsiidide ja insektitsiidide valmistamiseks raskemetallikompleksidena, millel on rida eeliseid **borderoov**-deliku ees.

Koji-hapet produtseerivad mitmed mikroseened (enamik *Aspergillus*'e liike, *Penicillium dalae*) ja ka mõned bakterid. Tootmisel kasutatakse *A. oryzae*' ja *A. flavus*'e valituid tüvesid, mida kasvatatakse pindkultuurides suhkrusoolade söötmeil pH 2,0...5,0 juures. Tootmistsükkel kestab 30° juures 9...20 päeva.

#### 4.9. Või h a p p e t o o t m i n e

Võihapekäärimise avastas L. Pasteur juba 1861.a., kuid mitme järgneva aastakümne jooksul ei pööratud sellele protsessile kuigivõrd tähelepanu. Teoreetiline huvi võihappe (butaanhappe) vastu tõusis siis, kui selgus selle protsessi väga lai looduslik levik. Bredman uuris võihapekäärimise seisukohalt eri geograafilistest punktides kogutud 152 mullaproovi ja leidis vastavat võimet tervelt 137-s proovis. Ilmnes, et võihapekäärimine on peaaegu universaalne protsess, võihape esineb aga anaeroobsete protsesside produktide seas peaaegu niisama sageli kui CO<sub>2</sub> aeroobsete protsesside produktide seas.

##### a. Võihappe teke



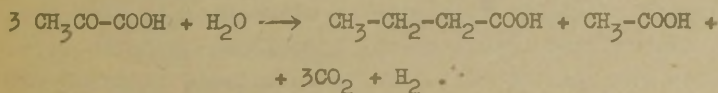
Katsetingimustes võib võihapet saada mitmesuguste sahhariidide, sealhulgas ka raskesti lagundatavate polüsahhariidide, isegi tselluloosi kääritamisel. Peale selle võivad võihapekäärimise substraadiks edukalt olla mitmesugused laktaadid ja püruvaadid. Võihape on küllastatud alifaatne monokarboonhape valemiga CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH. Toatemperatuuris esineb ta värvitu vedelikuna, millel kõrgemates kontsentratsioonides on terav, madalal kontsentratsioonides aga üsna ebameeldiv, kuigi mitte terav lõhn.

Tüüpilist võihapekäärimist kutsuvad esile mitmed perekonna Clostridium liigid. Neid uuris ja klassifitseeris mõõdnud sajandi lõpukümneteil Hollandi mikrobioloog Martinus Beijerinck, kes ühendas need omaette perekonnaks Granulobacter rakkudes esineva rohke granuloosi tõttu. Kaasaegne süstemaatika enamasti ei tunnusta neid liike iseseisva perekonnana ja kannab need perekonda Clostridium. Protsessi mehhanismi uurimise seisukohalt on eriti tähtsad Cl. butyricum, Cl. polymyxa ja Cl. kluyveri, kõige laiemal levikuga looduses on aga S. Vinogradski poolt avastatud Cl. pasteurianum, kes on tüüpiline mullamikroob ja keda tõstab esile molekulaarse lämmastiku sidumise võime.

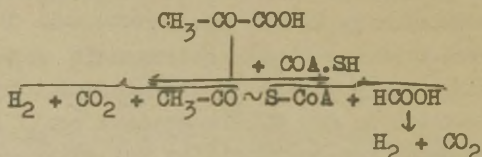
Morfoloogiliselt on võihappebakterid sporoogeensed peritrihhaalsed pulkpisikud pikkusega 3...12  $\mu$  m. Sporulatsioonifaasis muutub võihappebakterite rakukuju käevjaks. Sel ajal sisaldavad rakud rohkesti granuloosterakesi, mis joodiga värvuvad tumesiniseks. Spoorid on väga termoresistentsed - kannatavad üsna mitmeminutilise keetmist vees. Füsioloogiliselt on tüüpilised võihappebakterid obligatoorsed anaeroobid.

Võihapekäärimisel tekib koos võihappega alati tunduvates hulkades äädikhapet,  $CO_2$  ja  $H_2$ , peale selle varieeruvates hulkades vähemal määral piimhapet, propioonhapet, kaproonhapet, atsetooni, etanooli, butanooli jt. ühendeid. Järelikult on tegu heterofermentatiivse protsessiga. Kultuurides saab tekkivate ainete hulgasuhteid mõnevõrra reguleerida keskkonnatingimuste abil. Eriti toimiv on ses suhtes pH väärtus.

Võihapekäärimise spetsiifilistele reaktsioonidele eelneb (kui substraadiks on sahhariidid) "üldine" reaktsiooniahel püroviinamarihappeni. Sellest lähtudes võib protsessi peamisi summaarseid tulemusi väljendada võrrandiga



Toodud summaarne võrrand ei valgusta aga protsessi mehhanismi. Tõenäoliselt toimib siin paralleelselt mitu mehhanismi, mille loomuse suhtes ei ole seni täit selgust.  $\text{CO}_2$  ja  $\text{H}_2$  tekivad kas püroviinamarisid happe lagunemisel tekkinud vormiaadist või siis otseselt püruvaadi dekarboksüülimisel:



Cl. kluuver'i näitel on tuvastatud võihappe teke reaktsiooniahelas, mille esimeseks lüliks on kahe atsetüül-CoA ( $\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$ ) molekuli kondenseerumine atsetoatsetüül-CoA-ks. ( $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-CO-S-CoA}$ ). Saadud ühend läbib kaks redutseerimist ja dehüdratatsiooni ning annab üle  $\beta$ -hüdrosübutüürüül-CoA ja krotonüül-CoA kulgevas rajas butüürüül-CoA. See kondenseerub atsetaadiga ja annab võihappe ning atsetüül-CoA. Äädikhappe tekib seejuures püruvaadist üle atsetaldehyüdi viimase hüdrateerival oksüdeerimisel. Tervikuna kujuneb tsükkel, mille esitame joonisel 12.

## b. Võihappe tootmine

Võihappe tööstusliku tootmise aluseks on võihappekäärimine. Lähtematerjaliks-tooraineks on mitmesugused taimse päritoluga materjalid, milles leidub küllaldaselt tärklisi (kartul, jahu) või suhkruid (tärklisesiirup, melass). Tärklisesubstraatide puhul kasutatakse protsessi kiirendamiseks eel-hüdrolüüsi (kuigi võihappebakterid ka ise evivad amüloolüütilist võimet) väävelhappe abil, kusjuures hüdroolüüs võib olla ka mittetäielik. Väävelhappe neutraliseeritakse pärast hüdroolüüsi jõudmist vajaliku astmeni kriidi abil. Selle tulemusena sadestub vää-

velhape kipsina reaktsioonikeskkonnast välja. Saadud lahusele lisatakse NSV Liidus lämmastikuallikana tavaliselt vikijahu. Segu jahutatakse 40°-ni ja inokuleeritakse võihappebakterite puhaskultuuriga. Kasutatakse vaid kõrge käärimisenergiaga Cl. butyricum'i ja Cl. saccharobutyricum'i tüvesid. Soodsatel tingimustel (30...40°) kestab käärimine kuni nädalapäevad ja annab suhteliselt rohkesti põhiprodukti - võihapet. Protsessi kestel on vaja tekkivat võihapet neutraliseerida. Seda tehakse kriidiga.

Protsessi lõpul neutraliseeritud võihape (kaltsiumbutüraat) eemaldatakse. Võihapet tarvitatakse kas sooladena-butüraatidena nahatööstuses, suurem osa läheb aga estritena lõhna-ainete tootmiseks parfümeeritööstusesse.

Võihapet võib saada ka lämmastikühendite baasil. Siis on tooraineks alkoholi- või suhkrutööstuse jäägid. Siin luuakse leeliselise keskkond, lisatakse alumiiniumsoolasid ja meedium inokuleeritakse puhaskultuuriga. Antud keskkonnas toimub intensiivne desamiinimine. Üsna kiiresti viiakse ligi 90 % lämmastikku ammoniaagiks ja algab käärimine. Taolistes keskkondades akumuleerub võihape kõrval tunduvald propioonhappe koguseid.

#### 4.10. A m i n o h a p e t e m i k r o b i o - l o o g i l i n e t o o t m i n e

Mikroobirakus toimub pidev aminohapete süntees ning nende kasutamine. Põhiliselt on aminohapped valgusünteesi materjaliks, kuid tervel real aminohapetel on peale selle arvukalt muid biokeemilisi ja füsioloogilisi funktsioone, mis tingivad aminohapete kasutamist veel mitmesuguste muude ühendite sünteesiks (mõned hormoonid, puriinid, pürimidiinid, koliin, kreatiin, koensüümid, melaniinid jt. ühendid). Vastavalt sellele eristame mikroobirakus nn. vabu ehk metaboolse fondi aminohappeid ja seotud

aminohappeid. TRÜ taimefüsioloogia ja -biokeemia kateedris pärmidega läbiviidud uurimised näitavad, et aminohapete süntees on mikroobides hästi reguleeritud - neid moodustatakse samades proportsioonides, milles neid kasutatakse (metaboolse fondi ja summaarse valgusuheline aminohapeline kocsseis on sarnased). Seetõttu normis ei saa mikroobidelt oodata ühe või mõne üksiku aminohappe ülemäärast akumulereerimist. Ometi esineb erandjuhte. Tavaliselt on siis tegu bioloogiliselt vigaste mutantidega, kes kulutavad elujõudu neile tarbetuks ühe või teise aminohappe ülemääraseks sünteesiks. Neid juhte on hakatud laialdaselt uurima praktilise tööstusliku kasutamise eesmärgil. Tuleb ütelda, et taolistes uurimistes on saavutatud tähelepanavat edu ning mõnede aminohapete mikrobioloogiline tootmine laieneb üha.

Aminohapete mikrobioloogiline tootmine põhjeneb mitte üksnes anormaalsetel sünteesiprotsessidel, vaid ka taoliste vabade aminohapete võimel keskkonda difundeeruda ja seal koguneda. Eriti täheledatakse aminohapete eritumist välja poole mikroobirakku kasvu eksponentsiaalfaasi lõpul, kui valgusünteesi intensiivsus langeb. Kõige tavalisemalt erituvad aminohapped, mis domineerivad nii metaboolse fondis kui ka valgus. Siia kuuluvad eelkõige "transamiinimisaminohapped" (s.o. antud protsessis doonorine või vahendajana toimivad aminohapped): glutamiinhape, asparagiinhape ja alaniin. Nende kõrval esineb sageli ka ühe mitmekülgsimate funktsioonidega aminohape - glütsiini - eritumist, selle järel ka leutsiini, seriini ja valiini eritumist. Kõige olulisemaks peetakse kaasajal aga lüsiini eritavate mutantide saamist - on ju lüsiini üks defitsiitsemaid aminohappeid inimtoidus (eriti tuleks rõhutada selle puudumist või vähesust nisujahutooteis, iseäranis rikastamata saias) ja loomasöödas, mistõttu peetakse vajalikuks mitmete toiduainete rikastamist lüsiiniga. USA-s rikastatakse peaaegu kogu suurtootmisest tulev sai, meil väärneb selles suhtes täit tähelepanu ja eelistamist vadakusai.

Märgime, et enamikku toodetavaist aminohappeist saadakse tänapäeval ka keemilise sünteesi teel - nii toodetakse koguni valdav hulk aminohappeid. Ometi säilitab mikrobioloogiline tootmine oma tähtsuse ja kindla osa seetõttu, et ainult nii saadakse aminohappeid bioloogiliselt aktiivses L-vormis. Keemiline süntees seevastu annab L- ja D-vormide ratseemilise segu, s.o. vähemtegusa produkti.

Lüsiin on esimene aminohape, mida hakati laialdaselt tootma mikrobioloogiliselt. Tegu on inim- ja loomatoidus asendamatu aminohappega. Lüsiini akumulatsioonivõime suhtes on läbi uuritud väga palju liike mikroosente, kiirikuliste ja bakterite seast ning proovitud ses suhtes tohutut hulka looduslikke ja indutseeritud mutanttüvesid. Parimad tööstuslikus tootmises kasutatavad tüved annavad 10...20 mg/ml lüsiini. Otsingutele on suureks takistuseks asjaolu, et eeldatavate prekursorite viimine toitekeskkonda ei anna ekstratsellulaarse lüsiini hulga tõusu.

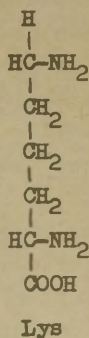
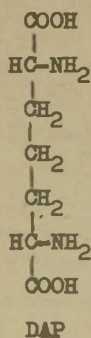
Edukaimateks produktentideks on jaapanlaste andmeil mõned Micrococcus glutamicus'e radiokoobalt- ja ultraviolettmutandid.

Üks tuntumaid kaasaegseid lüsiini tootmistehnoloogiad näeb ette selle aminohappe tootmist kaheastmelises protsessis. Esimeses astmes toodetakse Escherichia coli tüve ATCC 12408 abil  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminopimeelhapet (DAP), teises astmes dekarboksüülitakse DAP vastava dekarboksülaasi abil, mida moodustab rohkesti Aerobacter aerogenes'e tüve ATCC 12409 kultuurides.

Esimese astme tooraineks on glütseroolilahus koos teraviljaleotise ja mineraalsoolade lisanditega. Neutraalseerijana kasutatakse 0,5 %  $\text{CaCO}_3$ . Inkubatsioon toimub 28° juures agiteerimise ja aereerimise tingimustes, kusjuures pH tuleb protsessi kestel hoida 7,0...7,5 vahemikus. Söötmes koguneb kolme päevaga kuni 9 mg/ml DAP. Produktent ise seda edasi ei muunda. Analoogilises söötmes kasvatatakse teises kultivaatoris samal ajal A. aerogenes't. Selle mass kogutakse, töödeldakse toluooliga ja



viiakse pärast seda protsessi esimese astme jääksöötmesse. Selles toimub 24 tunni jooksul 28° juures väheste hulkade püridoksiini, etüleendiamiintetraatsetaadi (EDTA) ja sidrunhappe manulusel DAP-i dekarboksüülimine lüsiiniks:



Lüsiin eraldatakse söötmet adsorptsioon-kromatograafiliselt kationiitidel.

Glutamiinhape ei kuulu asendamatute aminohapete hulka. Selle utilitaarne tähtsus seisneb peamiselt selles, et mono-naatriumglutamaati kasutatakse maitseainena.

Produtsentidena kasutatakse Micrococcus'e, Cephalosporium'i ja Bacillus'e liike vastavalt sünteetilisel söötmel, peedisuhkru melassil ja sojajahu või nisugluteeni suspensioonidel kultiveerimisel.

## 5. Ensüümpreparaatide mikrobioloogiline tootmine

Puhtaid ensüüme vajab eelkõige kaasaegne laboratoorne töö, ensüümpreparaadid on aga viimasel ajal tunginud ka mit-

mesugustesse tööstusharudesse, kus ensüüme kasutatakse väga mitmesuguses puhtusastmes (nn. toorpreparaatidest kuni kõrge puhtusastmega aineteni). Esimesed tööstuslikult toodetavad ensüümid olid pärit pankreasest, soolelimadest, verest, osalt ka taimekudedest. Pisut hiljem avastati võimalus mõningaid ensüüme odavalt ja kiiresti toota mikroobide abil. Enamik mikroobiensüüme on intratsellulaarsed ning nende kättesaamisega on suuri raskusi. Praktiliselt toodetavad ekstratsellulaarsed, s.o. rakust keskkonda eritavad ensüümid on enamasti hüdrolaaside klassi esindajad. Nendel ensüümidel on mitmetes toiduainetetööstuse harudes rida eeliseid ka traditsiooniliste tootmisviisidega võrreldes. Nimetagem atoksilisust, spetsiifilisust (kasutamisel ei teki ebasoovitavaid muutusi), möödukat toimumistemperatuuri, neutraalsusele lähenevat keskkonnareaktsiooni. Kui nendega kõrvutada näiteks happelise hüdrolyüüsi tingimusi tärglase lagundamisel (mis lisaks kõigele nõuab veel kõrgendatud rõhku, kulutab hinnalisi happesid jne.), siis on ensüümide kasutamise eelised ilmsed. Eriliste spetsiifiliste eelistena tuleks veel esile tõsta võimalust ensümaatilise protsessi peatamiseks vajalikul ajal pehmete tingimustega, mis küll inaktiveerivad ensüümi, ei mõjuta aga produkti.

Mikroobiensüümide tööstuslikuks tootmiseks kasutatakse eriliselt valitud tüvesid mutantide seast, kes akumulerevad keskkonnas suuri koguseid soovitatavat ensüümi. Enamasti kasutatakse mitmesuguseid bakteriliike ja mikroseeni, harvemini kiirikulisi. Reeglina kasvatatakse produktente suhteliselt väikestes mahutites, et vältida suuri majanduslikke kahjusid, mis kaasnevad kõrvalise infektsiooniga (tavaliselt kuulub nakatunud kultivaator hävitamisele ja suurte puhul on kahju suurem).

Nagu eespool märgitud, väljastavad tööstused ensüüme väga mitmesuguses puhtusastmes. Minimaalse töötlemise korral kaubastatakse lihtsalt stabiliseeritud kultuurifiltraatid. Edasine töötlus nõuab eelkõige ensüümi sadestamist

rakuvabadest filtraatidest (tavaliselt toimub see atsetooni või mõne alifaatse alkoholi lisamisega, kasutatakse aga ka otsest sadestamist pärast kontsentreerimist vaakuumis). Sade filtreeritakse või tsentrifuugitakse. Kui edasist töötlust ei ole ette nähtud, kuivatatakse sade madalatel temperatuuridel ning suunatakse tarbimisse. Vastasel juhul allutatakse sade mitmesuguse tüsilikkusastmega edasisele puhastamisele, mis sisaldab uusi korduvaid lahustamisi ja sadestamisi, lisandite eemaldamise operatsioone, fraktsioneerimist suurtes adsorbent- või ionvahetusko- lonnides või tsentrifuugis jm. valkude puhastamiseks ettenähtud võtteid.

Tööstustehnoloogilised probleemid seostuvad peamiselt aktiivsete mikroobitüvede valikuga, kultivaatorite ehitamisega ning kultiveerimisrežiimiga. Kriti mikroseeente kui produktentide kasutamisel on väga oluline õhustusrežiimi püsivus. Seepärast rakendatakse süviskultuure, vahuskultuure, kasvatamist kobedates orgaanilistes massides jm.

H ü d r o l a a s i d e s t kõige olulisemad on amülolüütilised ensüümid, mida saab kasutada kõigis tööstusharudes, kus on vajalik tärglise hüdrolüüs. Kõige laiemalt on amülaaspreparaadid kasutusel tööstusalkoholi tootmisel teraviljaproduktidest. Mikroseeentest pärit amülaas võib selles tööstusharus täielikult asendada linnaseid ja isegi kaasa tuua põhiprodukti toogi mõningase tõusu.

Toiduainetetööstus kasutab amülaaspreparaate glükoo- si ja glükooisisirupi tootmiseks tärglisest. Ensüümi va- lik (s.o. produktendi valik) sõltub seejuures tooraine loomusest. Edasi on amülaasid kasutatavad kúpsetusjahu "tugevdamiseks", väikelaste eeldigesteeritud toitude val- mistamiseks, šokolaadi ja likööriisirupite töötlemiseks jne.

Osaliselt on amülaasid kasutatavad linnaste asenda- jaina keõlletööstuses. Viimasel ajal on mikroobseid amülaase rakendatud ka leivatööstuses, mille tulemusena

saadakse taigna parem kerkimine ja leivatoodete magusam maitse.

Lõpuks kasutavad amülaase tekstiili- ja paberitööstus. Esimeses eemaldatakse poolfabrikaatidest amülaasi abil tärglislihti, paberitööstuses saadakse amülaaside toimel teatavaid dekstriine, mis on vajalikud kattepaberitele nõutava kvaliteedi andmiseks.

Amülaaside tootmiseks kasutatakse peamiselt Aspergillus niger ja A. oryzae kultuure, harvemini liike perekonnast Rhizopus. Nende seente kasvatamiseks on sobivaimaks keskkonnaks osutunud nisukliid. Keskkonna ettevalmistamisel kliid niisutatakse veega või nõrkade happelahustega, steriliseeritakse ja inkubeeritakse seesnespooridega. Inkubatsioon toimub 25...32° juures madalates "pannides". 4...6 päeva pärast kliid leostatakse veega või puhverlahusega. Ensüüm sadestatakse etanooliga.

Tootmises esineb palju modifikatsioone kirjeldatud põhitehnoloogiast lähtudes. Teatava pöörde on toonud roteerivate trumlite kasutuselevõtt "pannide" asemel. Trumlite laiemat levikut takistavad nendega seostuvad raskused temperatuuri reguleerimisel ja kõrvalise infektsiooni vältimisel.

Teine olulisem viimaste aastate uuendus on süviskultuuride rakendamine. Sel juhul kasutatakse keskkonnana mineraalsooladega rikastatud tärglisesuspensioone või lahuseid. Produtsendiks on siis tavaliselt A. niger. Eriti märkimisväärne on selle tehnoloogia puhul, seoses tingimuste suhteliselt hõlpsa reguleeritavusega, võimalus protsessi juhtida soovitavat tüüpi amülaaside ( $\alpha$ -,  $\beta$ - või  $\gamma$ -amülaaside) domineerivale akumulatsioonile. See on oluline preparaatide kasutamisel kindlate toormaterjalide juures. Teatavasti toimivad  $\alpha$ -amülaasid nii amüloosisse kui amülopektiinisse (annavad mõlemast madalama molekulaaluga dekstriine määratlemata seguna ja ainult mõnevõrra maltoosi). Väliselt on  $\alpha$ -amülaaside

toime resultaadiks substraadi kiire veeldumine (likvefaktioon) ja keskkonna viskoossuse langus.  $\beta$ -Amülaas annab amüloosist kui ka amülopektiinist lõhustumisproduktina peamiselt maltoosi (maltoosijäägid eraldatakse polümeersete ahelate otstest). Amüloosi lõhustab  $\beta$ -amülaas praktiliselt täielikult maltoosiks, amülopektiini lõhustamine peatub või pidurdub ahela hargnemiskohtades (mäletatavasti on amüloosi molekuli ehituseks polümeerne hargnematu, amülopektiini molekuli ehituseks aga tugevasti hargnenud ahel).

Peale  $\alpha$ - ja  $\beta$ -amülaaside toodavad mikroseened erinevais hulgalistes vahekordades ja eritavad keskkonda veel dekstrinaase (lõhustavad nii amüloosist tekkinud hargnematute kui ka amülopektiinist saadud hargnenud ahelaga dekstriinimolekule maltoosini) ning nn. amüloglükosidaasi (lõhustab amüloosi, amülopektiini ja dekstriine glükoosini, eraldades polümeersete ahelate otstest järjest glükoosijääke).

Mõnevõrra kasutatakse tootmises amülooside produktidena ka perekonna Bacillus liike (B. subtilis, B. mesentericus, B. macarans, B. polymyxa). Erinevalt seente kultuuridest tuleb bakterite kasutamisel keskkonda rikastada tunduvate lämmastikukogustega (hüdrolüüsitud valgulised materjalid, pärmiekstrakt, destilleerimistööstuse jäätmed, teraviljaleotised), tärklisest seevastu aga lisada ei ole tarvis - bakterid toodavad amülaase ka tärklisevabas keskkonnas. Kultuuride tugev õhustamine on obligatoorne.

Kaasajal toodetakse mikrobioloogiliselt üsna ulatuslikult ka tsellulosaasi, mida kasutatakse mõnedes puidutöötlemise harudes, kus on tarvis puidu arvel saada fermenteeritavaid substraate, samuti tekstiilitööstuses. Tsellulolüütilistes bakterites (Cytophaga sp., Vibrio sp.) on tsellulaas konstitutiivne ensüüm. Sellest hoolimata kasutatakse tsellulaasi tööstuslikuks tootmiseks tegelikult tsellulolüütilisi mikroseeni, kus tsellu-

laas on küll vaid indutseeritav ensüüm, seevastu aga annab induksiooni (tselluloosi manulus) korral hoopis kõrgema produktsiooni.

Põhilisteks produktentideks on tööstuslikus protsessis *Myrothecium verrucaria* ja *Trichoderma koningi* valitud tüved. Tuleb märkida, et kaasajal on tsellulaasi produktsioon veel üsna väike, kuid tõenäoliselt ootab selle ensüümi tootmist tunduv progress. Nimetatud ensüümi kättesaadavus teeks suhteliselt hõlpsasti kasutatavaks mitmesugused massilised puidutöötlemise jäätmed ka keemia- ja mikrobioloogilises tööstuses. Seni ei ole veel siiski lõplikult stabiliseerunud ka ensüümi tootmise tehnoloogia. Selles suunas käivad aga mitmetes maades ulatuslikud uurimistööd.

Suhteliselt ulatuslikult toodetakse kaasajal mikrobioloogiliselt s a h h a r a a s i ( $\beta$ -fruktofuranosidaasi), mida tööstuspraktikas ja kaubanduses sageli tuntakse ka invertaasi nime all. Teatavasti toimub selle ensüümi katalüüsival toimel sahharoosi lõustumine glükoosiks ja fruktoosiks. Saadav segu on nn. invertsuhkur, mille nimetus pärineb sellest, et vastupidiselt saharoosilahusele, mis pöörab polariseeritud valguskiire polarisatsioonitasandit paremale, pöörab glükoosi ja fruktoosi segulahus seda vasakule, tingituna fruktoosi tugevamast levorotatoorsusest glükoosi dekstrorotatoorsusega võrreldes; vrd.  $[\alpha]_{20}^D$  on saharoosil  $+66,5^\circ$ , glükoosil  $+52,7^\circ$ , fruktoosil  $-92,25^\circ$ , invertsuhkrul  $-32,6^\circ$ . Invertsuhkur on lahustavam kui saharoos ega kristalliseeru kontsentratsiooni tõustes nii kergesti välja kui viimasena nimetatu. Ka on invertsuhkur väga hügrokoopne ja aitab niiskena säilida materjalidel, mille kuivamist tuleb vältida. Need omadused, kaasa arvatud kõrgem magususaste, teevad invertsuhkru väärtuslikuks tooraineks kondiitritööstuses.

Ensüüm invertaas leiab kasutamist veel paberitööstuses, kus selle abil saadakse mitmesuguseid plastitsee-rivaid agenseid.

Sahharaasi sünteesivad väga paljud mikroobid (enamik mikroobe on võimelised sahharoosi kasutama süsinikuallikana). Eriti paistavad selles osas silma pärmid, aga ka mõned filamentsed mikroseened. Tootmisel on teatavaks raskuseks asjaolu, et tegu on intratsellulaarse ensüümiga. Seetõttu on vaja ensüümi isoleerimiseks eelkõige purustada mikroobirakud (toimub enamasti autolüüsi teel). Produktsentidena kasutatakse tööstuses peamiselt Saccharomyces cerevisiae valitud tüvesid, millel on kõrge sahharaasi moodustamise võime. Kultiveerimine toimub tingimata tugeva õhustamisega 2 % sahharoosisisaldusega söötmes (sahharaasi süntees tõuseb siis mitmekordselt). Inkubeerimise lõppedes (kuni 48 tundi) tseentrifuugitakse rakumass välja ja autolüüsitakse kloroformi, etüülatsetaadi või toluooli manulusel. Vabastatud ensüüm isoleeritakse, kasutades adsorptsiooni- ja sadestusmeetodeid. Tuleb märkida, et puhastamise käigus sahharaas muutub üsna ebastabiilseks, seepärast väljastab tööstus ensüümi ka lihtsalt lahusena.

Mikrobioloogiliselt toodetakse tänapäeval ka l a k - t a a s i , mis, nagu eelmisedki ensüümid, leiab kasutamist toiduainetetööstuses. Piimasuhkru laktoosi hüdrolyüs glükoosi ja galaktoosi seguks väldib näiteks suhkru väljakristallumist vadaku- ning täispiimakontsentratsioonidest, samuti ka jäätise valmistamisel.

Produktsentideks on peamiselt valitud pärmitüved liikidest Saccharomyces lactis, S. fragilis ja Candida pseudotropicalis. Söötteks on enamasti selitatud, s.t. suu-remas osas deproteineeritud vadak. Kultiveerimisel aereeritakse keskkonda intensiivselt. Tegu on intratsellulaarse ensüümi tootmisega, selle isoleerimine sarnaneb üldjoontes sahharaasi isoleerimisega, selle olulise erinevusega, et pärast tseentrifuugimist rakumass kõigepealt kiiresti külmutatakse ja kuivatatakse vaakuumis, et inaktiveerida glükolüütilisi ensüüme. Produkt kaubastatakse tahkel, s.o. kristallilisel kujul.

Mikrobioloogiliselt toodetavate hüdrolaaside seas

tuleb tingimata nimetada veel proteaase. Kõrvuti mikroobsete produtsentidega kasutatakse laialdaselt ka taimi (papaiin Carica papaya' rohelistest viljadest, fitsiin fiikusest, bromelaiin ananassist) ja loomi (pepsiin ja trüpsiin mitmesuguste loomade seedeorganeist). Mikroobsetest allikatest on esile tõstetavad eeskätt mikroseened (Aspergillus amarii, A. flavus-oryzae, A. niger) ja Bacillus subtilis, mis on tööstuslikult kasutatavad. Tootmistehnoloogia sarnaneb suuresti mikroobsete amülaaside tootmise tehnoloogiaga. Söötmete valmistamisel kasutatakse nisukliisid, õllepraaka, sojaubade jäätmeid pärast "piima" eraldamist jt. Kasutatavast tahkest materjalist eraldatakse ensüümid vee või puhvriga (pH 6,5) ekstraheerimisega. Lahused kontsentreeritakse vaakuumis ja ensüümid sadestatakse etanooli, atsetooni või ammoooniumsulfaadi lisamisega. Aspergillus'e liikidest saadavad proteaasid paistavad silma toimimiseks sobiva laia pH-skaala poolest (3,5...9,0), mis soodustab nende praktilist kasutamist.

Mikroseente puhul rakendatakse kaasajal ka süviskultuure, samuti kasvatamist poorsetel mineraalsetel materjalidel.

Toodetavad proteaasid kuuluvad peamiselt ekstra-  
tsellulaarsete proteolüütiliste ensüümide, nn. endopeptidaasid tüüpi ensüümide hulka (endopeptidaasid ehk proteinaasid lagundavad suuri valgumolekule väiksemaiks, kuid siiski küllalt suurteks proteoside ja peptoonide molekulideks; eksopeptidaasid, mis lokalisatsioonilt on intratsellulaarsed, seevastu lagundavad edasi proteiinide kõrgemaid laguprodukte; endo- ja eksopeptidaaside lokalisatsioon on funktsionaalsest aspektist kergesti mõistetav kui mikroobidele otstarbekohane). Eksopeptidaaside (nii aminopeptidaaside kui ka karboksüpeptidaaside) tootmine on tunduvalt raskem. Nende saamiseks eelistatakse Bacillus subtilis'e tüvesid, mille puhul on kerge mikroobe kultiveerimistingimustega, eriti meediumi koosseisu-



ga, suunata ekso- või endopeptidaaside domineerivale sünteesile.

Proteaase kasutatakse pagaritööstuses, kus nende lisamine soodustab taigna ~~kerkimist~~. Lisamisega tuleb siiski ettevaatlik olla, sest liigne proteaaside hulk viib halvasti töödeldava tihke, veniva taigna tekkele. Õlletööstuses väldib proteaaside lisamine õlle hägustumist valkude sadenemise tagajärjel. Lihatööstus kasutab proteaase produktide pehmemdamiseks, samuti dieetliha (s.o. liha hüdrolüsaatide) tootmiseks.

Kindla koha on proteaasid võitnud ka nahatööstuses, kus nende abil eemaldatakse karvu ja pehmitatakse toor nahka.

Muudest proteaaside kasutusalaadest võiks nimetada fototööstust (kasutatakse želatiinikihist hõbeda regeneerimiseks).

Mikrobioloogiliselt toodetakse ka pektiinaase, mida kasutatakse puuviljamahlade tootmisel nende selgitamiseks (lagundatakse kolloidsed pektiinained, mis võivad põhjustada püsiva hägu). Toimimise käigus langeb ka mahla viskoossus. See lubab mahlasid kergemini edasisele töötlusele allutada, näiteks kontsentreerida.

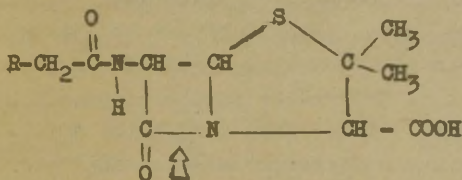
Pektinaaside teine võimalik kasutusala on tekstiilitööstus, kus need ensüümid võimaldavad asendada traditsioonilisi tülikaid võtteid kiudude kättesaamiseks vasta vaist kiudtaimedest (lina, džuu, kanep). Tuleb märkida, et koos alkoholsete jookide valmistamisega, s.t. etanoolkäärimisega, on kiudtaimede töötlemisel rakendatav pektiini kääritamine vanimaid tootmises rakendatavaid mikrobioloogilisi protsesse. Aastasadu ja -tuhandeid on vastav tehnoloogia püsinud oluliselt muutmatuna ning leiab suuremas osas rakendamist veel kaasajalgi. Ensüümide-pektinaaside kasutamine on siiski alles katsetamisjärgus.

Tuntakse kaht tüüpi kiudtaimede ligu, s.o. matsereerimist. Esimene, kasutuskestuselt vanem tüüp on anaeroobne. Traditsiooniliselt viiakse seda läbi spetsiaalsetes

tiikides (ligu kestab 6...10 päeva), kaasajal ka erilistes tankides. Agentideks on peamiselt perekonda Clostridium kuuluvad liigid (eeskätt Cl. felsineum ja Cl. butyricum). Uuem leotüüp on aerobne, mis kulgeb läbipuhutavais tankides. Agentideks on perekonda Bacillus kuuluvad bakterid (Bacillus macerans, B. polymyxa, B. comessii), keda sageli rakendatakse puhaakultuuridena. Viimasel ajal on pika ja sooja sügisega maades kujunenud aerobse leo uus alatüüp - ligu lahtise õhu käes laiades madalates niisutatavates taimekihtides (protsess kestab 2...12 nädalat), milles toimivad mikroseenid perekondadest Rhodotorula, Cryptococcus, Cladosporium ja Penicillium.

Ka proteaaside tootmiseks kasutatakse nimelt seente kultuure.

Mikrobioloogiliselt toodetavatest hüdrolaasidest nimetame lõpuks p e n i t s i l l i n a a s i. See ensüüm katalüüsib teatavasti penitsilliinimolekuli peptiidside hüdrolüüsi  $\beta$ -laktaamrõngas:



Produtsentidena kasutatakse penitsillinaasi tootmisel kas Actinomyces candidus'e või B. subtilis'e ja B. cereus'e kultuure, kellel ensüüm on induktiivne. Penitsillinaasi kasutatakse kliinikupraktikas penitsilliinensitiivsuse korral. Teine kasutusala on juustutöööstus nendes piirkondades, kus lehmadesse on massiliselt penitsilliini manustatud (piimasse üleminev penitsilliin inhibeerib mikroobe piimhappebakterite rühmast).

Mitte-hüdrolüütilistel ensüümidel on mikrobioloogiatööstuses väiksem tähtsus. Nimetada tuleks siiski k a t a l a a s i tootmist Aspergillus'e või mõnede pärmiiliidide abil. Katalaasi kasutatakse meditsiinis vesinike-

roksiidi toime kontrollimiseks kirurgiliste materjalide, eriti haavaõmblusniitide pleegitamisel. Samal otstarbel võib katalaasi kasutada ka nahatööstuses (liiga kestev  $H_2O_2$  mõju võib kahjustada töödeldavaid materjale). Edasi on katalaas hapniku vabastajana kasutatav poorsete materjalide (vahtkummi, kärgbetoon) tootmisel.

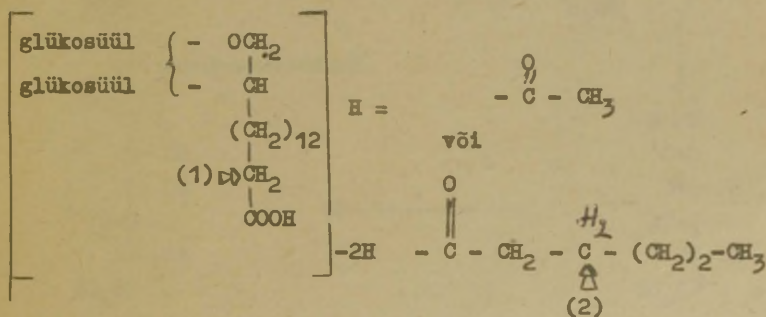
## 6. Mikroobid kui keemia- tööstuse reagentid

Eelnevas oleme näidanud mikroobide kasutusalasid, kus mikrobioloogiline tehnoloogia on ainuvalitsev. Koos sellega osutasime, et mitmete rahvamajandusele oluliste produktide tootmisel on keemiline süntees mikroobide kasutamise suuremal või vähemal määral välja tõrjunud. Mõnes tootmis-  
harus säilitavad mikroobid siiski oma koha produkti eriliste kvaliteedinäitajate tõttu. Selle kõige kõrval esineb aga juhte, kus mikrobioloogiline ja keemiline tehnoloogia ei võistle omavahel, vaid teataval viisil teineteist täiendavad. Siin on kaks põhimõttelist võimalust: esiteks võib mikroobne produkt olla tooraineks keemiatööstusele (sünteesi teatavad algastmed viiakse läbi mikroobide abil), teiseks on võimalik mõnes sünteesiprotsessis teatavaid vaheastmeid kõige otstarbekohasemalt mikroobide abil "katalüüsida" (mikroobid kui "elusad reagentid"). Kirjeldame lühidalt kummastki alaliigist esileküündivamaid näiteid.

Sünteesilise buunakautsuki tootmisel on lähteaineteks teatavasti 1,3-butadien ehk divinüül ( $CH_2 = CHCH = CH_2$ ) ja klorobutadien ehk kloropreen ( $C_4H_5Cl$ ). Kumbagi saadakse etanoolist või naftast küllalt keerulise keemilise menetluse teel, kuid on võimalik saada ka sellistest mikroobsetest produktidest nagu 2,3-butaandiool (sünonüümid 2,3-butüleenglükool, 2,3-dihüdroksübutaan, dimetüületüleenglükool) valemiga  $CH_3-CHOH-CHOH-CH_3$ , samuti mõned sugu-

lasühendid, mis on keemiliselt kergesti muudetavad 1,3-butadieeniks. Tuleb tunnistada, et laia levikut selline menetlus ei ole leidnud, mõned pidevprotsessi põhimõttel töötavad tehased siiski eksisteerivad ja võivad olla antud küsimuses kujukaks näiteks. Produktsentidena 2,3-butaandiooli tootmisel (millele kaasajal otsitakse ka uusi kasutusalaarid antifriisina, mõnede plastikute lähtematerjalina, polüetaalatide toorainena ning farmaatsiatööstuse abimaterjalina) tulevad arvesse B. polymyxa', A. aerogenes'e ja S. marcescens'i valitud mutanttüved.

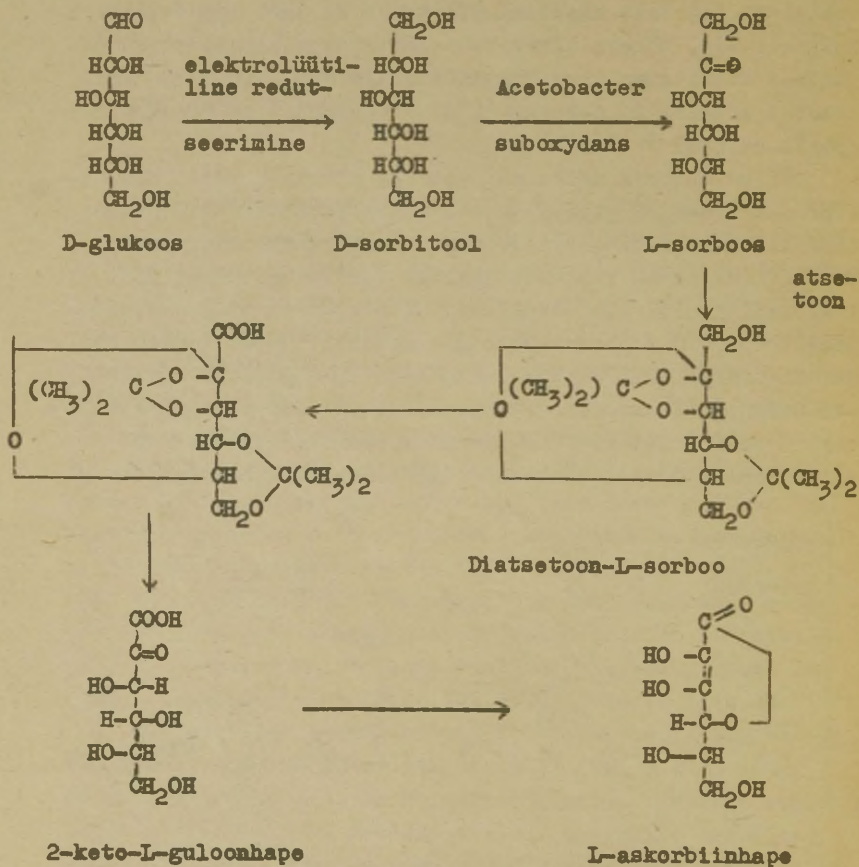
Teise näitena võiksime esitada Ustilago zaeae' sünteesiproducti ustilagiinhape, mis läheb parfümeeriatööstusse hinnaliste makrotsükliiliste muskuste sünteesi lähteainena. Ustilagiinhape on lähissugulaslike monokarboonhappeliste D-glükolipiidide seni täpsemalt määratlemata segu. Tõenäoliselt 65...70 % moodustab segus ustilagiinhape A (monoatsetüül-mono- $\beta$ L-hüdrosüheksanoüül-di- $\beta$ -D-glükosüül-15-D-16-dihüdrosüheksadekanoinhape) ja 25...30 % ustilagiinhape B (monoatsetüül-mono- $\beta$ L-hüdrosüoktanoüül-di- $\beta$ -D-glükosüül-2-D-15-D-16-trihüdrosüheksadekanoinhape)



Ustilagiinhape A

Ustilagiinhape B valem erineb toodust nooltega osutatud kohtades, kus (1)  $\text{CH}_2$  kohal on  $\text{HOCH}$  ja (2) kohal  $\text{H}$

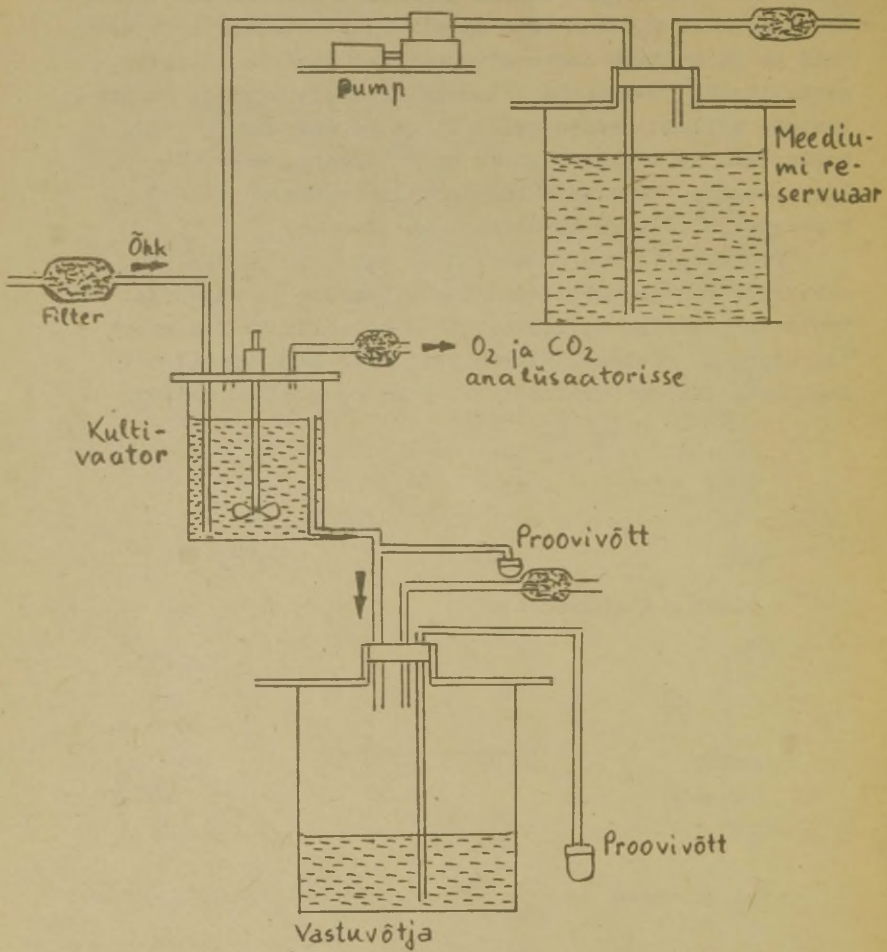
Kolmanda näitena, juba teisest alagrupist, nimetame, et askorbiinhappe (vitamiin C) tootmisel kasutatakse võrdlemisi laialdaselt ühe vaheastme teostamiseks "elusa reagendina" Acetobacter suboxydans'i vastavaid tüvesid. Koha ja "reageni" toime iseloomu üle võime otsustada alljärgneva skeemi järgi.



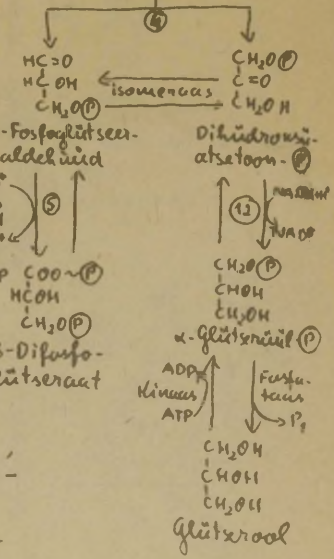
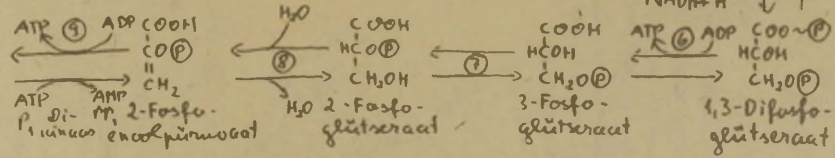
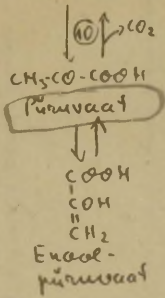
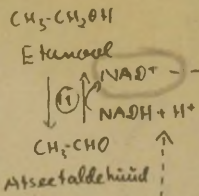
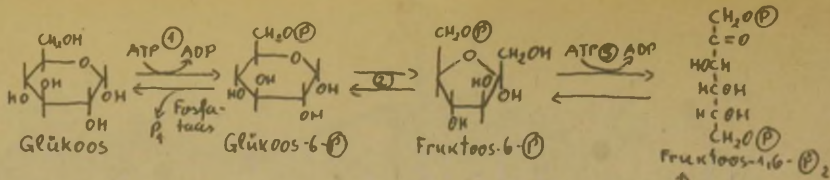
Toodud skeemiga on märgitud askorbiinhappe tootmise nn. Reichstein-protsessi põhijooned. Nagu näeme, viiakse selles mikroobi abil läbi õieti ainult üks aste - D-sorbitooli konversioon L-sorboosiks. Antud konversiooni on võimalised läbi viima enamik perekonna Acetobacter liike. Tööstuslikult rakendatakse sageli *A. suboxydans*'i tüvesid, kuid ka *A. xylinum* leiab mõnikord kasutamist. Viimase negatiivseks jooneks on tihedate tsellulooskilede moodustamine, millega seoses selle liigi tegevus muutub väga aeglaseks. *A. xylinum* annab ca 6 nädalaga vaid 40...60% -lise saagise, kuna *A. suboxydans* konverteerib juba 7...8 päevaga 80...90 % sorbitooli sorboosiks.

Protsess toimub roostevabast terasest valmistatud mahuteis, mis on varustatud õhustusseadme ja segajaga. Protsessi steriilsus kõrvaliste mikroobide suhtes on obligatoorne. Söötme lähtekoosseisus antakse sorbitooli kontsentratsioon tavaliselt 20 % mahuprotsendi piires.

JOONISED



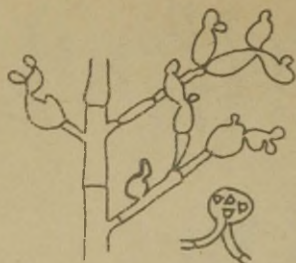
Joon. 1. Pidevkultiveerimisseadme lihtsustatud skeem.



Joon. 2. Etanoolkäärimise skeem.

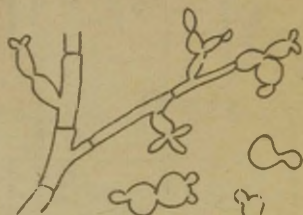
Ensüümid: (1) - heksokiinase, (2) - glükoosfosfaadi isomeeras, (3) - fosfofruktookiinase, (4) - ketosiil-difosfaadi aldolaas, (5) - glütseeraldehyidfosfaadi dehüdrogenaas, (6) fosfoglütseeri kiinase, (7) - fosfoglütseromutase, (8) - fosfopüruvaadi hüdraatase (enolaas), (9) - püruvaadi kiinase, (10) - püruvaadi dekarbomüraas, (11) - alkoholi dehüdrogenaas, (12) - glütserool-3-fosfaadi dehüdrogenaas





### Ascomycetes

Endomycopsis; moodustab mütseeli ja punguvaid üksik-rakke. Mütseel moodustab askusi. Kaotades spoorimoodustamise võime — Kaotades mütseelimoodustamise võime

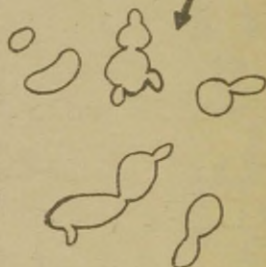


### Fungi imperfecti

Candida; moodustab mütseeli ja üksikuid punguvaid rakke, mitte aga askusi. Kaotades mütseelimoodustamise võime

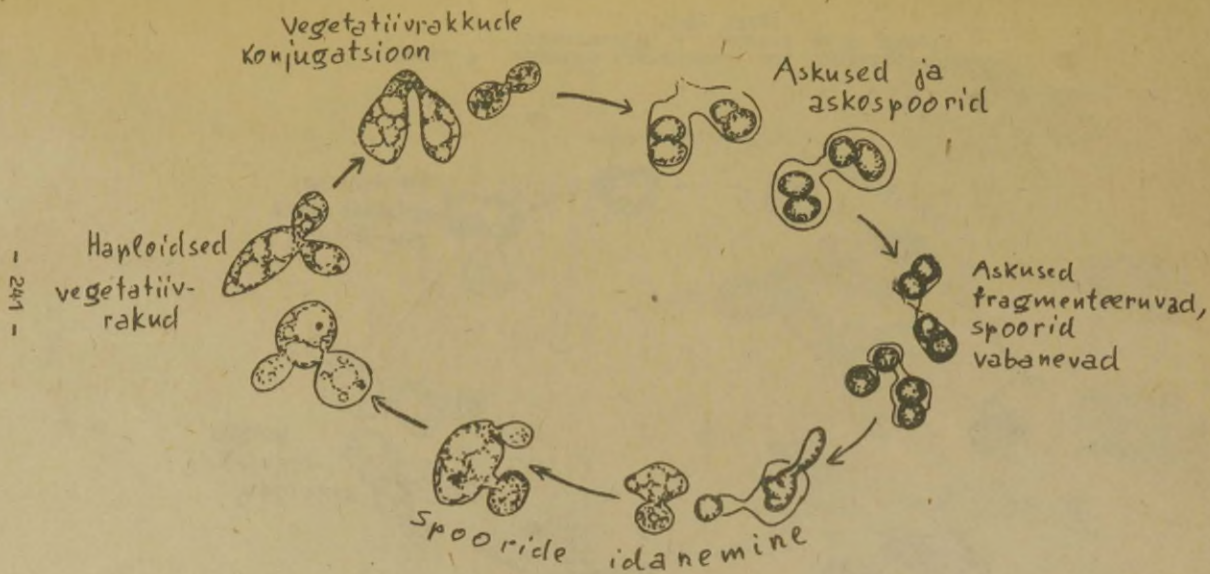


Saccharomyces, Hansenula jt. ei moodusta mütseeli, ekris-teerivad punguvad üksik-rakud. Askospore moodustab rakus, mis moodustub kahelst konjungeerunud rakust, või nende järglases. Kaotades spoorimoodustamise võime

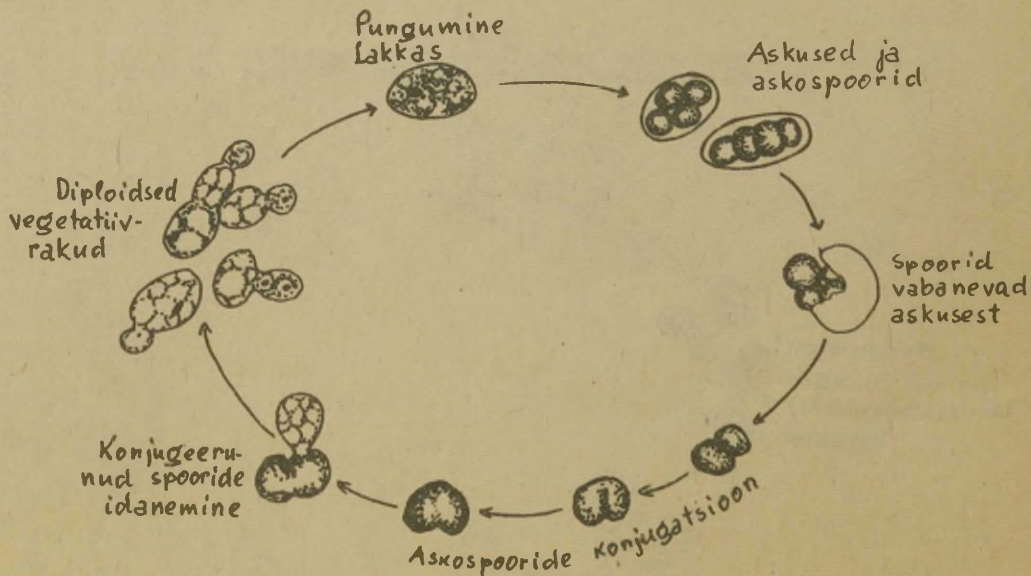


Cryptococcus jt. asporogeensed perekonnad. Kasva-vad üksikrakkudena, palju-nevud pungumisega, ei moodusta mütseeli ega spore

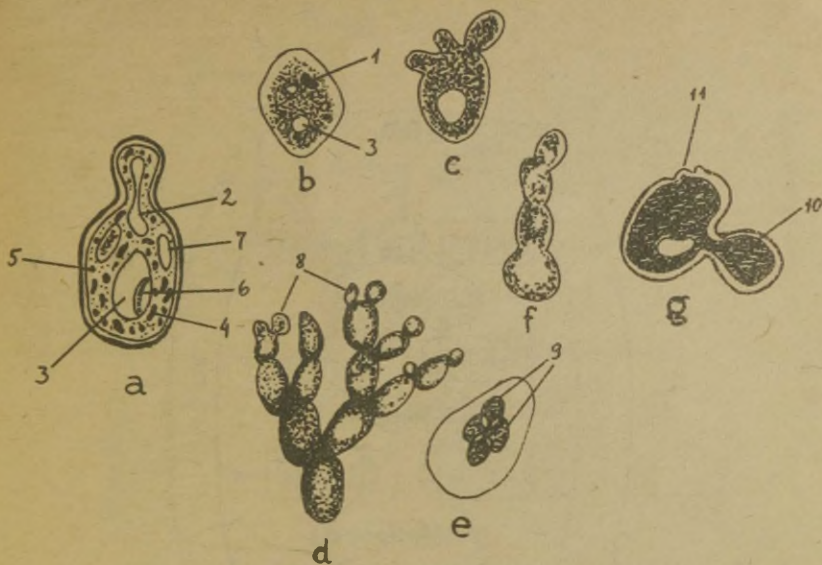
Joon. 3. Üleminekud pärmirühmade vahel, lähtudes askomütsetidest.



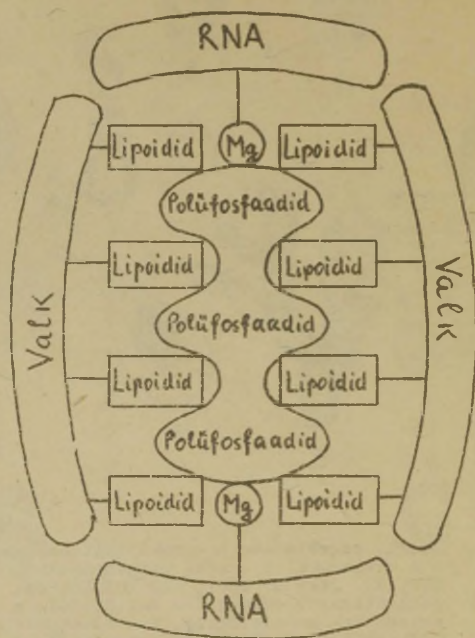
Joon. 4. Pärmide elutsükkel, kui konjugeeruvad vegetatiiv-rakud, A. Henrici ja E. Ordali (1949) järgi.



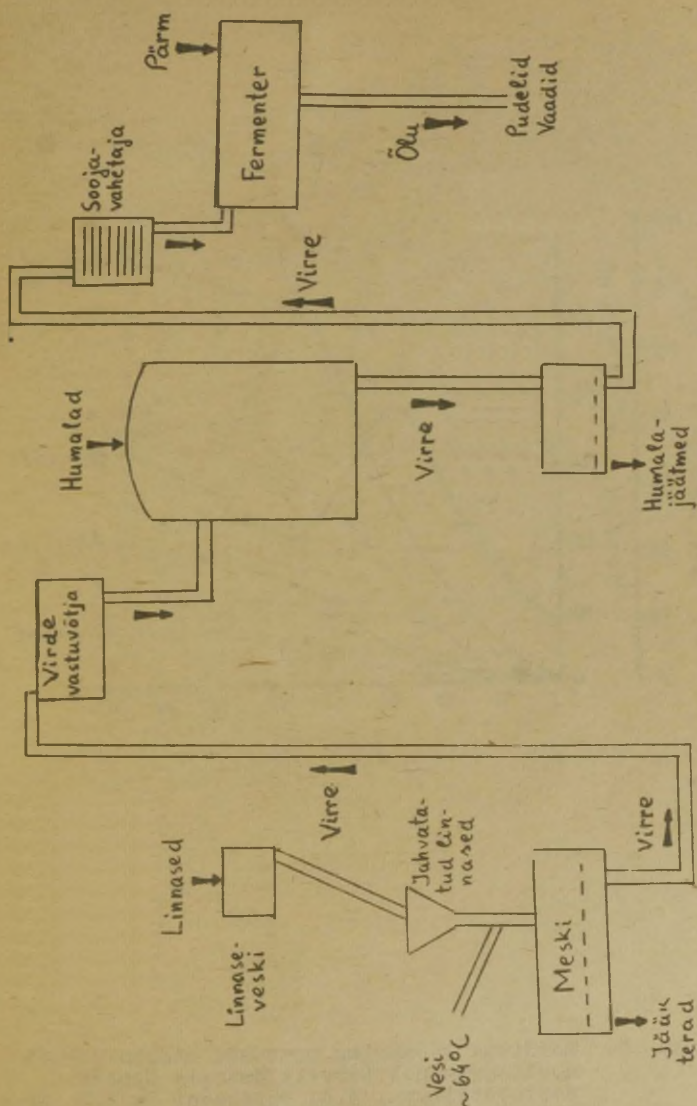
Joon. 5. Pärmide elutsükkel, kui konjugeeruvad askosporid, A. Henrici ja E. Odrali (1949) järgi.



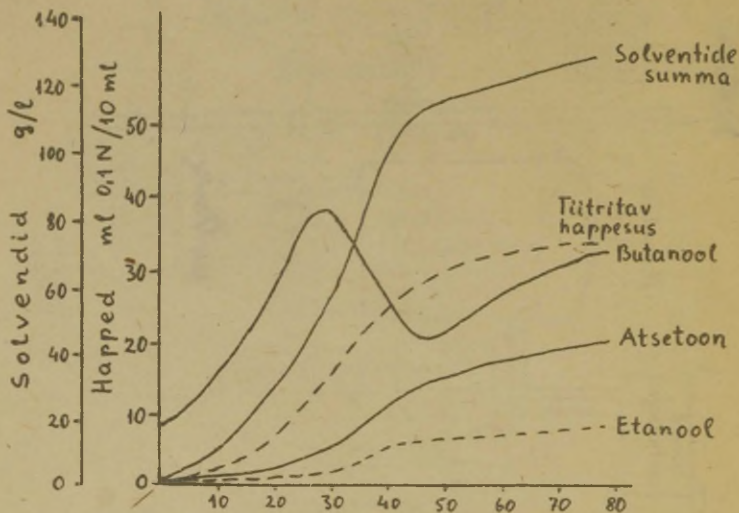
Joon. 6. *Sacch. cerevisiae*: a - raku ehitusskeem, b - üksikrakk, c - rakk pungumisstaadiumis, d - rakkude ahel, mis kujunes rea järjestikuste pungumiste tagajärjel, e - askospori moodustumine, f - askospori "idanemine" ja järgnevad pungumised, g - punguva raku elektronmikrograaf; 1 - tuum, 2 - poolduv tuum, 3 - vakuool, 4 - mitokondr (kondriosoom), 5 - ribosoom, 6 - metakromatiin (volutiin), 7 - glükogeeni-graanul, 8 - pungad, 9 - askosporid, 10 - noor pung (eksisteerib tsütoplasma ühendussild emarakuga), 11 - pind, millelt rebenes pung.



Joon. 7. Babesch-Ernsti graanulite ehitusskeem  
Widra (1959) järgi.



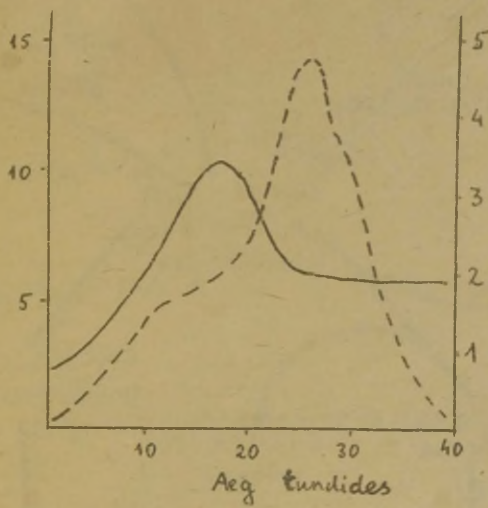
Joon. 8. Õllepruulimise põhioperatsioonide diagramm  
Rose'i, (1961) järgi.



Joon. 9. Meediumi koosseisu muutused atsetoon-butanolkäärinisel teraviljameskis Clostr. acetobutylicum, W.A. Petersoni ja E.B. Fredi, (1932) järgi.

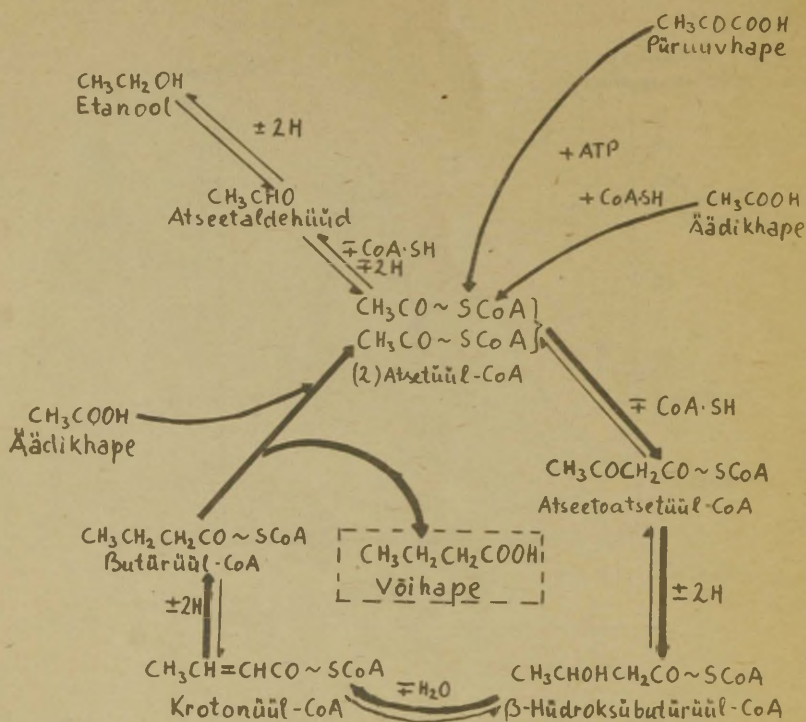
Gaasitene  
( $10^3$  kuupjalga/tn)

Happesus  
 $\times 2/100$

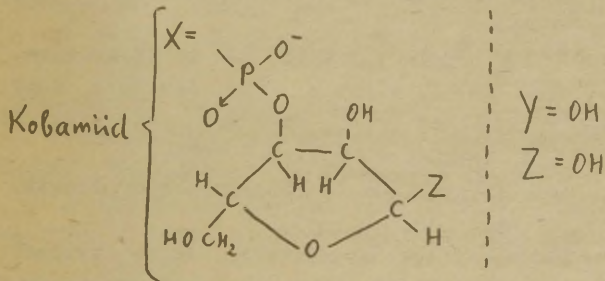
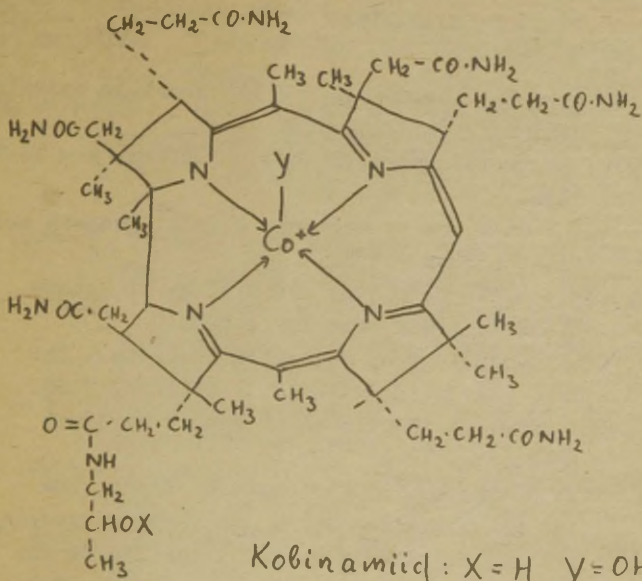


Joon. 10. Gaasitekke ja happesuse dünaamika atsetoon-butanoolkäärimisel H. Reilly (1920) järgi.





Joon. 11. Võihappe-tsükkel H.A. Barkeri (1956) järgi.



Joon. 12. Kobamiidide nomenklatuuri süsteem  
D. Perlmani (1959) järgi.

## KIRJANDUS

- K.A. Barbajancv, K.P. Lemarinje. Kalakonservide tootmine. "Valgus", Tallinn, 1967.
- H.A. Barker. Bacterial Fermentations. J. Wiley, New York, 1956.
- J. de Clerck. A Textbook of Brewing. 2 Vols. Chapman and Hall, London, 1958.
- A.H. Cook (Ed.). The Chemistry and Biology of Yeasts. Academic Press, New York, 1958.
- H. Eller. The Technology of Sour Milk Products. Int. Sem. UNO on the Milk Ind., Tallinn, 1966.
- J.W. Foster. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York, 1949.
- E. Eving. The Technology of Pasteurized, Sterilized and Reconstituted Milk. The Intern. seminar for the fellowship group of the UNO on the milk industry in the Estonian S.S.R., Tallinn, 1966.
- H e n r i c i ' s Molds, Yeasts, and Actinomycetes. Sec. ed. J. Wiley a. Sons, New York, 1947.
- Informatsiooniline kiri Nr. 2. ENSV Rahvamaj. Nõuk. Tehn. Inf. Keskbüroo, Tallinn, 1963.
- M. Ingram. An Introduction to the Biology of Yeasts. Pitman, London, 1955.
- A. Kockova-Kratochvilova, M. Kutkova. Atlas kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů. Praha-Bratislava, 1961.
- P.V. Kugenev. Piimandus. "Valgus", Tallinn, 1966.
- J. Lodder and N.J.W. Kreger van Rij. The Yeasts, a Taxonomic Study. North-Holland Publishing Co, Amsterdam, 1952.
- C.C. Lindegren. The Yeast Cell, Its Genetics and Cytology. Educational Publ., St. Louis, 1949.

- P. Margus, E. Must. Kvaliteetse piima tootmine. ERK, Tallinn, 1964.
- L.W. Marrison. Wines and Spirits. Penguin Books, London, 1957.
- W.N. McCutchan, and R.J. Hickey. The Butanol-Acetone Fermentations. Industrial Fermentations, Vol. 1. Chemical Publishing Co, New York, 1954.
- O. Mráz, J. Tesarčík, F. Vařejka. Nomina und Synonyma... VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1963.
- I.M. Ništši, A.F. Krenev. Liha- ja kalakaubad. Eesti Tarbijate Kooperatiivide Vabariiklik Liit, Tallinn, 1955.
- Piima ja piimatoodete tehnoloogia. Eesti NSV Rahvam. Nõuk. Inf. Keskbüroo, Tallinn, 1965.
- S.C. Prescott and C.G. Dunn. Industrial Microbiology. 3-rd ed. McGraw Hill, New York, 1959.
- A.H. Rose. Industrial Microbiology. Butterworths, London, 1961.
- H.H. Schopmeyer. Lactic Acid. Industrial Fermentations, Vol. 1. Chemical Publishing Co, New York, 1954.
- R.Y. Stanier, M. Doudoroff, E.A. Adelberg. General Microbiology. Mac Millan, London-Melbourne, 1966.
- J. Starka. Physiologie and Biochemie der Mikroorganismen. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1968.
- R. Steel (Ed.) Biochemical Engineering. Heywood, London, 1959.
- N.M. Stelling-Dekker. Die Sporogenen Hefen. I Teil. Drukkerij Holland, Amsterdam, 1931.
- R.S.W. Thorne. Brewers Yeast. In: Yeasts [Ed. by W. Roman] . Junk. The Hague, 1957.
- V. Tohver. Mikroobide biokeemia. I osa. TRÜ rotaprint. Tartu, 1966.

- Tootmiskogemusi piimatööstuses. ENSV Min. Nõuk. Riikl.  
Teadusl.-Tehnil. Komitee. Tehnilist informatsiooni  
12. Tallinn, 1958.
- J. White. Yeast Technology. Chapman and Hall, London,  
1954.
- J. Zolotin. Equipment Used in the Milk Industry. Int.  
Sem. UNO on the Milk Ind., Tallinn, 1966.