

NARVA KEELTELÜTSEUM

MARIA JEMELJANOVA

11. KLASS

EESTIS TOODETUD LEHMAPIIMADE KOOSTISE JA MIKROBIOLOOGILISTE NÄITAJATE VÕRDLUS

JUHENDAJAD SVETLANA ANISSIMOVA JA TRIINU VISNAPUU

SISSEJUHATUS

Antud teemat peab autor aktuaalseks, kuna lehmapiim on igapäevane toiduaine, mida inimesed on aastatuhandeid toiduks kasutanud. Piima tarbitakse joogipiimana, hapupiimatoodete saamiseks ning ka toorainena kulinaarias. Eestis on piimatööstus hästi arenenud ja seetõttu on turul esindatud lai valik lehmapiima tooteid. Narva linna kauplustes on võimalik osta erinevate tootjate joogipiima, mis on erineva rasvasusega ja sellest tulenevalt on ka hinnaerinevus üsna suur. Väiketootjate pastöriseerimata piima müüakse ka toidukioskites.

Uurimistöö eesmärk oli selgitada välja, milline testitud joogipiimadest sisaldab rohkem toitaineid, nagu valgud, suhkrud, C-vitamiin ning vähem mikroobe, mis võivad mõjutada piima kvaliteeti, säilivust ja toiduohutust. Töös analüüsiti nende näitajate suhtes nelja erineva rasvasusega pastöriseeritud joogipiima ja kahe tootja pastöriseerimata piima. Tulemuste põhjal saab teha järelduse, millise toote tarbimisel saaks organism võimalikult palju toitaineid ja millise piima tarbimine on ohutu.

Hüpotees: pastöriseeritud piim sisaldab vähe mikroobe ja on tarbimisel ohutu, kuid vähema valkude, süsivesikute ja vitamiinide sisaldusega. Pastöriseerimata piim sisaldab suurt hulka toitaineid, aga võib olla tarbijale ohtlik, kuna seda piima ei kuumtöödelda ja selles sisaldub rohkem mikroorganisme (sh võimalikke patogeenseid baktereid).

Uurimuses oli püstitatud mitu ülesannet:

- tutvuda lehmapiima põhiliste iseloomulike näitajatega (happesus, mikrofloora, kvaliteedinäitajad, valkude, rasvade, süsivesikute ja vitamiinide sisaldus);
- tutvuda Eestis ja Euroopa Liidus kehtivate piima kvaliteedinõuetega;

- tutvuda erinevate piima koostise ja mikrobioloogiliste näitajate määramise meetoditega;
- määrata katseliselt kuue piima valgu, suhkru ja C-vitamiini sisaldus ja mikroelementide arvukus;
- töödelda ja üldistada katsete käigus saadud andmed ja esitada järeldused.

Avaldan tänu käesoleva uurimistöö juhendajale Svetlana Anissimovale abivalmis juhendamise eest ja Triinu Visnapuule (Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituut) abi eest eksperimentaalse tegemisel.

1. TEOREETILINE OSA

1.1. PIIMA KOOSTIS

Piim on toitev vedelik, mida toodavad emaste imetajate piimanäärmete koed. Lehmapiima tarbivad inimesed juba mitmendat aastatuhandet. Peale vahetu tarbimise puhtal kujul kasutatakse seda laialt hapupiimatoodete saamiseks ning ka kulinaarias.

Piim sisaldab vett, valke, rasvu, süsivesikuid, orgaanilisi happeid ja muud. Piim sisaldab ka erinevaid mineraalaineid ja vitamiine.^[1] (vt Lisa tabel 1.)

Piimarasv on tähtis energia- ja erinevate vajalike rasvhapete allikas, mida on vaja membraanide ja hormoonide sünteesil ja on muu hulgas oluline südamelihaste tööks, tagades organismi vastupanu põletike ja infektsioonide suhtes.

Valgud on kõikide organismi ehitamiseks ja selle funktsioneerimiseks vajalike aminohapete allikas. Kaseiin on üks piimas sisalduvatest põhivalkudest, sisaldades peale aminohapete ka fosforit, mis on vajalik luude kasvu ja tugevnemise jaoks.

Valgulised immunoglobuliinid mängivad tähtsat rolli organismi kaitsesüsteemi kujunemises ja immuunsüsteemi arengus. Need tagavad kaitse mikroobide poolt põhjustatud infektsioonide vastu.

Laktoos on galaktoosi ja glükoosi allikas, mis toimib organismi energiaallikana. Toetab organismi kaltsiumi omandamist.

Kaltsium, kaalium, fosfor ja magneesium soodustavad toitainete omandamist, tagavad luukoe tervislikku tihedust, vastutavad normaalse vererõhu eest. Kaltsium, B12-vitamiin ja kaalium omavad südame-veresoonkonna tegevust soodustavat mõju ja reguleerivad ainevahetusprotsesse.

D-vitamiini on vaja kaltsiumi omandamiseks ja selle ainevahetuse jaoks.

Mitmekesine mikroelementide sisaldus tagab kõikide organismi rakkude normaalse arenemise, mis peegeldub näiteks juuste, hammaste, küünte ja naha tervises.^[2]

1.2. LEHMAPIIMAKVALITEET

1.2.1. Piima happesus

Lehmapiima kvaliteeti, nagu ka teiste loomakasvatuse harude toodangu kvaliteeti, hinnatakse antud toodangu suhtes esitavate ühisnõuetega. Need on välja töötatud, lähtudes kehtivatest normatiividest ja standarditest. Standardite abil saab suunata organiseerivaid, tehnoloogilisi, majanduslikke ja teisi tegevusi, mille eesmärk on toodangu kvaliteedi tõstmine. Piima sanitaarkvaliteeti hinnatakse selle happesuse, võimalike nakkushaiguste tekitajate olemasolu, mikroorganismide sisalduse 1 ml piimas ja coli-tiitri¹ järgi.^[4]

Happesus on piima tähtis omadus. Selle abil saab hinnata toote värskust ja kvaliteeti. Piimas määratakse aktiivset ja tiitritavat happesust. Aktiivset happesust iseloomustab vabade vesinikioonide kontsentratsioon, mida väljendatakse pH-väärtusega (pH vesinikeksponent on negatiivne logaritmi lahuse vaba ionide H⁺ ja OH⁻ kontsentratsioonist). Piima pH kõigub 6,3 ja 6,9 vahel, keskmiselt on see vahemikus 6,5–6,6. Tiitritav (üldine) happesus arvestab nii aktiivseid H⁺ ioone kui ka potentsiaalseid, mis muutuvad aktiivseteks piima tiitrimise protsessis leelise abil. Piima üldhappesus on põhjustatud valkude, happeliste soolade ja gaaside sisaldusest. Tiitritavat happesust määratakse tiitrimisega leelise abil fenolftaleiini juuresolekul ja väljendatakse leelise 0,1 milliliitrite arvuga, mida on vaja 100 ml piima neutraliseerimiseks; iga kulutatav leelise milliliiter vastab piima happesuse 1°-le Turneri järgi (°T).

Värskel piimal üldhappesus on 17–18 °T, kuid juba kahe tunni pärast, kui piima mitte jahutada, tõuseb happesus kuni 22 °T. Antud näitaja suurenemisel hakkab piim hapnema. Üldhappesuse suurenemine toimub bakterite tegevuse tulemusena, mis muudavad piimasuhkru piimhappeks.^[5]

1.2.2. Piima mikrobioota

Kuna piimas on kõrge toitainete sisaldus, on see ideaalne keskkond mikroorganismide paljunemiseks. Üldiselt võib mikrofloorat (mikrobiootat) jagada kaheks rühmaks: normaalne mikrofloora (sellesse rühma kuuluvad mikroorganismid, mille olemasolu on piima jaoks normaalne ega kutsu esile piima riknemist) ja ebasoovitav mikrofloora (selle rühma mikroorganismid satuvad piima sisse pigem juhuslikult ja põhjustavad selle riknemist või ohtu tarbija tervisele). Normaalse mikrofloora esindajateks on homo- ja heterofermentatiivsed piimhappekääritajad (valdavalt laktokokid ning laktobatsillid) ning ka *Escherichia coli* (soolekepik). Juhuslikult võivad piimasse sattuda piima riknemist põhjustavad batsillid, võihappebakterid ja paljud teised nakkushaiguste tekitajad.

¹Coli-tiiter on uuritava materjali minimaalne kogus milliliitrites (tahkete ainete puhul grammides), milles on tuvastatud üks soolekepik.^[3]

Piima bakteriaalne faas on ajaperiood, mille jooksul pisikud ei paljune piimas sisalduva lüsootsüümi, immuunglobuliinide ja antibakteriaalse glükoproteiini laktoferiini tõttu.

Bakteriaalse faasi kestus (24–48 tundi) sõltub piima jahutamise tõhususest, algsest pisikute arvust piimas ja piima säilitustemperatuurist. Keskmiselt suureneb mikroorganismide arv piimas 10–12 °C juures ühe ööpäevaga kümnekordselt. Mida kõrgem temperatuur, seda kiiremini toimub paljunemine. Kuid 5–10 °C juures võivad hakata arenema külmalembesed roisupisikud. Need kutsuvad esile piima riknemise, mille tõttu muutub piim kasutuskõlbmatuks. Piima mikroobide arvukuse vähendamiseks ja pikema säilivusaja tagamiseks kasutatakse pastöriseerimist².^[4]

1.2.3. Valkude sisaldus piimas

Valgud on organismi põhiline ehitusmaterjal. Aminohappeid on vaja lihasmassi säilitamiseks, kahjustatud kudede taastamiseks ja vere punaliblede – erütrotsüütide – tootmiseks. Ilma piisava koguse valguta ei suuda meie organism oma elutegevust toetada (vt 1.1. Piima koostis.)

Piimavalgud on aminohapetest koosnevad kõrgmolekulaarsed ühendid, mis on seotud omavahel valkudele iseloomulike peptiidsidemetega. Valgu kontsentratsioon piimas kõigub vahemikus 2,8% kuni 4,6%. On olemas kaht liiki piimavalke: vadakuvalgud, mis moodustavad 14% piimavalgust, ja kaseiinid (82%).^[7] Kaseiin on liitvalk, mis sisaldub piimas fosfori ja kaltsiumi ionide osavõtul moodustuvate graanulite kujul. Hapete toimel kaseiin kalgendub ja sadestub. Seda protsessi kasutatakse kohupiima, juustude ja hapupiimajookide tootmisel. Vadakuvalgud kuuluvad lihtvalkude hulka. Põhilised vadakuvalgud on albumiinid ja globuliinid. Vadakuvalgud on hästi omastatavad, mis tõstab nende väärtust, seepärast kasutatakse neid valke tihti lisanditena piimatoodete tootmisel.^[8]

1.2.4. Suhkrute ja C-vitamiini sisaldus piimas

Süsivesikud on organismile tähtis energiaallikas (1 g glükoosi annab 3,8 kcal). Samuti osalevad suhkrud kaltsiumivahetuse reguleerimises. Piimasuhkrust moodustab enamiku laktoos. Piimhappebakterid lagundavad laktoosi glükoosiks ja galaktoosiks ning seejärel toodavad piimhapet, mis põhjustab piima hapnemist ning pärsib roisubakterite paljunemist. Oma aeglase imendumise tõttu võib laktoos seedimisprotsessis jõuda jämesoolde ja seega pärssida roisubakterite paljunemist. Laktoosi lagunemise lõpp-produktid on piiritus ja süsihappegaas. Peale laktoosi on olemas aminosuhkrud, mis stimuleerivad mikroorganismide kasvu.^[5]

C-vitamiin on antioksüdant, mis tõstab immuunsust, tugevdab veresooni, soodustab rakkude paljunemist ja kasvu, aitab organismil võidelda haiguste ja infektsioonide vastu, tugevdab luid ja

² Pastöriseerimine (UHT) on 4–15 sekundi vältel vedelike soojendus 135–150 °C-ni^[6]

hambaid, aitab vähendada trombide tekkeriski.^[9] C-vitamiini sisaldus piimas on madal (1,5 mg / 100 g^[11]), sellepärast ei saa piima pidada antud vitamiini oluliseks allikaks.^[2]

1.3. PIIMA KVALITEEDINÕUDED EESTIS JA EUROOPA LIIDUS

Enne müügile jõudmist peab kogu piimatoodang läbima kvaliteedikontrolli ja vastama kehtestatud nõuetele.

Toorpiima tootja peab arvestama kolme liiki nõudeid:

- Euroopa Liidu nõuded (vt Euroopa Liidu regulatsioon (EC) Nr 853/2004^[10]),
- Eesti Vabariigi õigusaktides kehtestatud nõuded (vt määrus nr 71 „Toorpiima käitlemise hügieeninõuded“^[11]),
- toorpiima tootja ja piimatööstuste vahelistes lepingutingimustes toodud nõuded

Peamised nõuded joogipiimale on:

- bakterite üldarv piimas alla 100 000 b/ml,
- somaatiliste rakkude arv alla 400 000 raku milliliitris,
- pidurdusainete jääksisaldus peab olema alla 0,01 RÜ/(cm³)³,
- rasvata kuivaine sisaldus \geq 8,5%,
- valgusisaldus \geq 28 g/l,
- tihedus 20 °C juures 1028 g/l.

Pastöriseeritud piima mikrobioloogilised näitajad on ära toodud Euroopa Ühenduse Komisjoni määruses (EÜ) 1441/2007^[12]. Selles määruses esitatakse muu hulgas ka nõuded enterobakterite ja *Listeria monocytogenes*'ite sisaldusele pastöriseeritud piimas.

Peamised nõuded on:

- bakterite üldarv alla 30 000 b/ml
- enterobakterite arvukus alla 1 bakteri milliliitris.^[13]

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. MATERJAL

Töös testiti järgmisi lehmapiima proove:

1. Pastöriseerimata toorpiim (Konju mõisa talu)^[14] – soetatud turult
2. Pastöriseerimata toorpiim (Nopri Talumeierei)^[15] – soetatud kauplusest
3. Pastöriseeritud Alma piim 2,5% (Valio)^[16] – soetatud kauplusest
4. Pastöriseeritud Pere piim 2,5% (Pere)^[17] – soetatud kauplusest

³ Rahvusvaheline Ühik (RÜ) on rahvusvaheliselt määratud bioloogiliselt toimiva aine kogus mingis aines.

5. Pastöriseeritud Alma täispiim 3,5% (Valio)^[18] – soetatud kauplusest
6. Pastöriseeritud Alma rasvavaba piim 0,05% (Valio)^[19] – soetatud kauplusest

Katsete ajal ja tabeli täitmisel kasutati piimaproovide numeratsiooni, (numeratsioon langeb kokku proovide nimekirjas esitatud numeratsiooniga).

Proovide päritolu

Töö tegemiseks osteti Narva kauplustest kuus lehmapiima erinevatelt tootjatelt. Piimaproovid olid erineva rasvasisaldusega ning valikus olid esitatud nii toorpiimad kui ka pastöriseeritud piimad. Kõik piimaproovid olid värsked ning säilitusaeg ei olnud katsete tegemise ajaks möödunud. Piimad olid ostetud üks päev enne katseid ning neid hoiti külmkapis temperatuuril 4 °C. Piimade laborisse transportimiseks kasutati termokotti, milles proovid säilitasid madala temperatuuri.

2.2. METOODIKA

2.2.1. Piima pH määramine

Piimaproovides määrati happelisust kasutades laia määramisskaalaga pH indikaatorpabereid (Whatman Panpeha, Sigma–Aldrich^[20]). Selleks kanti steriilse automaatpipeti otsikuga 50 µl proovi pH-paberile, võrreldi indikaatorvärvide värvimuutust tootja standardiga ning registreeriti proovi pH väärtused. Katset korrati iga proovi puhul kahel korral. Antud meetod võimaldab määrata proovide pH-väärtust täpsusega 0,5 ühikut vahemikus pH 0–9.

2.2.2. Valgu määramine

Piimaproovides määrati valgu sisaldus Folini reaktiiviga^[21] (Lowry meetod). Selleks tehti piimast $1 \cdot 10^2$ ja $1 \cdot 10^3$ lahjendused destilleeritud vette lõppmahuga 1 ml. Segati kokku 1 ml C-reaktiivi^[21] ja 100 µl lahjendust. Proove inkubeeriti 10 min ja pärast lisati 100 µl 1 N Folini reaktiivi^[22]. Proove inkubeeriti 40 minutit pimedas. Mõõdeti spektrofotomeetriselt optilist tihedust 750 nm. Kontsentratsiooni arvutati (mg/ml), korrutades koefitsiendiga 0,7 (saadud veise seerum albumiiniga tehtud valgukaliibrilt) ja lahjendusfaktoriga. Iga proovi valgusisaldus määrati kahes korduses.

2.2.3. Redutseerivate suhkrute määramine

Redutseerivate suhkrute määramiseks tehti piimast $1 \cdot 10^2$ lahjendus destilleeritud vette, võeti 400 µl DNSA (3,5-Dinitrosalicylic acid) reaktiivi^[23] ja segati 200 µl piima lahjendusega. Segu kuumutati 100 °C 10 minutit ja jahutati jääl. Lisati 800 µl destilleeritud vett. Mõõdeti optiline tihedus spektrofotomeetriselt 540 nm. Kontsentratsioon (mM) arvutati, korrutades saadud tulemust koefitsiendiga 0,17 (saadud glükoosiga tehtud kaliibrilt) ja lahjendusfaktoriga. Iga proovi redutseerivate suhkrute sisaldus määrati kahes korduses.

2.2.4. C-vitamiini sisalduse määramine piimas

C-vitamiini sisaldus tehti kindlaks sarnaselt varem näidatud meetodile^[24]. C-vitamiini määrati proovi tiitrimisega tärgliselahuse ja Lugoli lahusega mikrotiiterplaadil. Selleks võeti 100 µl proovi ja 20 µl 1% lahustuva tärglise lahust ning hakati 2 µl kaupa lisama joodi sisaldavat Lugoli lahust (3,3 g/l I₂; 6,7 g/l KI). Proov segati ning märgiti üles Lugoli lahuse maht, mis kulus lahuses sinise värvuse tekkeks. Põrdeala lähedal lisati tundlikkuse tõstmiseks Lugoli lahust 1 µl kaupa. Kontrollainena kasutati C-vitamiini lahust (1 mg/ml), mille alusel määrati C-vitamiini kontsentratsiooni ja värvuse muutuseks vajaliku Lugoli lahuse seos.

2.2.5. Mikrobioloogilised söötmed ja kultiveeritavate mikroobide arvukuse määramine pindkülvi ja süviskülvi meetoditega

Bakterite väljakülvid (pindkülv)

Bakterite arvukuse määramiseks tehti toorpiimade 1·10¹; 1·10²; 1·10³; 1·10⁴; 1·10⁵; 1·10⁶ lahjendused ja poepiimade 1·10⁰; 1·10¹; 1·10²; 1·10³ lahjendused steriilses füsioloogilises lahuses (0,9% NaCl) lõppmahuga 1 ml. Plaaditi steriilse klaasspaatliga 100 µl proovi MPCA (*Milk Plate Count Agar*) söötmele (kõik külvid kahes korduses). Söötmetassid pandi kasvama 37 °C juurde seitsmeks päevaks. Lahjenduste tegemine ja külvid tehti steriilses laminaarboksis.

Bakterite väljakülvid (süviskülv)

Bakterite arvukuse teadmiseks süviskülvi meetodiga tehti toorpiimade 1·10¹; 1·10²; 1·10³; 1·10⁴; 1·10⁵; 1·10⁶ lahjendused ja poepiimade 1·10⁰; 1·10¹; 1·10²; 1·10³ lahjendused steriilses füsioloogilises lahuses (0,9% NaCl) lõppmahuga 1 ml. Steriilsesse tassi pipeteeriti 500 µl proovi, valati peale ~20 ml MPCA söödet ja segati ning lasti tarduda (kõik külvid kahes korduses). Tassid pandi kasvama 37 °C juurde seitsmeks päevaks. Lahjenduste tegemine ja külvid tehti steriilses laminaarboksis.

Milk Plate Count Agar'i^[25] koostis:

- trüpton 50 g/l
- pärmiekstrakt 2,5 g/l
- glükoos 1,0 g/l
- kooritud piima pulber (antibiootikumivaba) 1 g/l
- agar 10 g/l

Bakterite väljakülvid (ENDO agar (selektiivne enterobakteritele; diferentseeriv *Escherichia coli*'le))

Enterobakterite ja *E. coli* arvukuse leidmiseks tehti toorpiimade 1·10⁰; 1·10¹; 1·10²; 1·10³ lahjendused ja poepiimade 1·10⁰; 1·10¹ lahjendused steriilses füsioloogilises lahuses (0,9%

NaCl) lõppmahuga 1 ml. Plaaditi 100 µl proovi steriilse klaasspaatliga ENDO agarile (kõik külvid kahes korduses). Tassid pandi kasvama 37 °C juurde 48 tunniks. Lahjenduste tegemine ja külvid tehti steriilses laminaarboksis.

ENDO agari^[26] koostis:

- dikaaliumfosfaat 3,5 g/l
- peptoon 10,0 g/l
- agar 15 g/l
- laktoos 10 g/l
- naatriumsulfit 2,5 g/l
- aluseline fuksiin 0,5 g/l

2.2.6. Proovide mikroskoopimine

Mikroskoopimiseks võeti 10 µl piima ja 40 µl vett (5x lahjendus). Proov tõmmati alusklaasile laiali ja kuivatati laualambi abil. See fikseeriti leegis, värviti Huckeri kristallvioletiga, pesti destilleeritud veega ja kuivatati. Preparaat mikroskoobiti õliimmersioonsüsteemis (1000-kordne suurendus).

Saadud tulemused (vt Lisa 3: Joonis 18; Joonis 19; Joonis 20; Joonis 21; Joonis 22; Joonis 23)

2.2.7. Pidurdusainete olemasolu hindamine piimas

Antibiootikumi olemasolu määramiseks plaaditi MPCA tassidele antibiootikumide suhtes tundliku *E. coli* DH5α rakud ja tilgutati tasside keskele 50 µl piima 1·10⁰ ja 1·10⁻¹ lahjendusega piimaproove. Tassid kuivatati ja pandi kasvama 37 °C juurde 28 tunniks. Antibiootilist mõju vaadati tekkiva lüüsitsooni olemasolu järgi. Lahjenduste tegemine ja külvid tehti steriilses laminaarboksis.

3. TULEMUSED JA JÄRELDUSED

3.1. PIIMA pH MÄÄRAMINE

Tabelis 1 on näidatud katsete tulemused.

Tabel 1. pH määramise tulemused

Piimaproov	1.	2.	3.	4.	5.	6.
pH näitaja	6,5	6,0	6,5	6,5	6,5	6,5

Saadud tulemustest lähtudes võib järeldada, et kõik kuus piimaproovi on peaaegu ühesuguse happesusega. Tulemus 6,0–6,5 näitab samuti, et kõik piimaproovid on õigesti säilitatud ja olid katsete tegemise hetkel värsked. Teistest veidi happelisem on Nopri toorpiim.

3.2. C-VITAMIINI SISALDUSE MÄÄRAMINE

Tabelis 2 on näidatud katsete tulemused.

Tabel 2. C-vitamiini sisalduse määramise tulemused (mg/ml)

Piimaproov	C-vitamiini sisaldus
1.	1,57
2.	1,18
3.	0,98
4.	0,98
5.	1,57
6.	1,18

Katsete käigus on selgunud, et kõige rohkem C-vitamiini sisaldub 1. ja 5. proovis ja kõige vähem 3. ja 4. proovis. Seega saab teha järelduse, et piimas sisalduva C-vitamiini kogus ei sõltu pastöriseerimisest. Üldiselt on lehmapiima C-vitamiini sisaldus väike, jäädes 1–1,5 mg/ml piiresse. Testitud piimade C-vitamiini sisaldus on sarnane või veidi väiksem kui lehmapiimadel üldiselt (vt Lisa tabel 1.)

3.3. MILK PLATE COUNT AGAR (PINDKÜLV)

Tabelis 3 on näidatud katsete tulemused. Pildil (vt Lisa 3: Joonis 2; Joonis 3; Joonis 4; Joonis 6; Joonis 8; Joonis 10; Joonis 12) on näidatud üldised bakterite kasvu tulemused.

Tabel 3. Milk Plate Count Agar (pindkülvimine) analüüsi tulemused (bakterit/ml)

	10^0		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}	
	lahjendus		lahjendus		lahjendus		lahjendus		lahjendus		lahjendus		lahjendus	
	1. katse	2. katse	1. katse	2. katse	1. katse	2. katse	1. katse	2. katse	1. katse	2. katse	1. katse	2. katse	1. katse	2. katse
1. proov	-	-	-	-	-	-	93	102	19	-	-	-	-	-
2. proov	-	-	-	-	-	-	-	-	14	10	3	4	1	0
3. proov	28	-	8	-	2	3	2	1	-	-	-	-	-	-
4. proov	53	-	9	-	4	-	0	1	-	-	-	-	-	-
5. proov	35	-	7	-	3	2	1	0	-	-	-	-	-	-
6. proov	39	-	4	6	1	-	0	0	-	-	-	-	-	-

3.4. MILK PLATE COUNT AGAR (SÜVISKÜLV)

Tabelis 4 on näidatud katsete tulemused. Pildil (vt Lisa 3: Joonis 1; Joonis 3; Joonis 5; Joonis 7; Joonis 9; Joonis 11) on näidatud üldised bakterite kasvu tulemused.

Tabel 4. Milk Plate Count Agar (süviskülvimine) analüüsi tulemused (bakterit/ml)

	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
	lahjendus	lahjendus	lahjendus	lahjendus	lahjendus	lahjendus	lahjendus
1. proov	-	-	-	-	22	9	8
2. proov	-	-	-	-	> 20	4	3
3. proov	-	360	99	8	-	-	-
4. proov	-	-	50	12	-	-	-
5. proov	-	-	86	9	-	-	-
6. proov	-	17	3	1	-	-	-

3.5. ENDO AGAR (ENTEROBAKTERID)

Tabelis 5 on näidatud katsete tulemused. Pildil (vt Lisa 3: Joonis 14; Joonis 15; Joonis 16; Joonis 17) on näidatud üldised bakterite kasvu tulemused.

Tabel 5. Endo agar (Enterobakterid) analüüsi tulemused (bakterit/ml)

	10 ⁰ lahjendus	10 ⁻¹ lahjendus	10 ⁻² lahjendus	10 ⁻³ lahjendus
1. proov	palju	palju	111	20
2. proov	palju	palju	122	41
3. proov	5	0	-	-
4. proov	10	1	-	-
5. proov	10	1	-	-
6. proov	10	2	-	-

3.6. ENDO AGAR (E. COLI)

Tabelis 6 on näidatud katsete tulemused. Pildil (vt Lisa 3: Joonis 14; Joonis 15; Joonis 16; Joonis 17) on näidatud üldised bakterite kasvu tulemused.

Tabel 6. Endo agar (E. coli) analüüsi tulemused (bakterit/ml)

	10 ⁰ lahjendus	10 ⁻¹ lahjendus	10 ⁻² lahjendus	10 ⁻³ lahjendus
1. proov	palju	palju	41	0
2. proov	palju	palju	8	0
3. proov	0	0	-	-
4. proov	0	0	-	-
5. proov	0	0	-	-
6. proov	0	0	-	-

3.7. VALGU MÄÄRAMINE (FOLINI REAKTIIVIGA)

Tabelis 7 on näidatud katsete tulemused.

Tabel 7. Valgu määramise (Folini reaktiiviga) tulemused (g/l)

	10 ⁻² lahjendus		
	1. katse	2. katse	Keskmine
1. proov	32,8	37,4	35,1
2. proov	33,4	34,4	33,9
3. proov	38,1	33,4	35,8
4. proov	38,1	33,9	36,0
5. proov	38,9	39,9	39,4
6. proov	25,9	32,6	29,3

Katsete käigus on selgunud, et kõige rohkem valke sisaldub proovis nr 5 ja antud näitaja poolest halvim proov on nr 6. Kuna proov 6 on vähese rasvasisaldusega piim ja proov 5 3,5% täispiim, siis on tulemustest selgesti näha, et rasvasisalduse vähendamisega väheneb ka valgu hulk piimas. Toorpiimad sisaldavad valku ligikaudu samapalju kui pastöriseeritud piimad. Kirjanduses toodud andmete alusel on tavaliselt lehmapiimas 3.2 g valku 100 g piima kohta (~0.32 mg/ml) (vt Lisa tabel 1.) Enamik testitud Eesti tootjate piimaproove ületab seda keskmist tulemust.

3.8. SUHKRU MÄÄRAMINE

Tabelis 8 on näidatud katsete tulemused.

Tabel 8. Suhkru määramise tulemused (g/l)

	1. proov	2. proov	3. proov	4. proov	5. proov	6. proov
1. katse	48,0	38,2	45,6	42,2	53,0	27,8
2. katse	50,5	50,4	45,4	0,43,9	52,1	30,0
Keskmine	49,3	44,3	45,5	43,1	52,6	28,9

Katsete käigus on selgunud, et kõige rohkem redutseerivaid suhkruid sisaldub proovis nr 5 ja antud näitaja poolest halvim proov on nr 6. Samaselt valgu määramise eksperimendile oli kõige suhkrurikkam täispiim ja vähese rasvasisaldusega lahja piim sisaldas vähe suhkrut. Toorpiimade suhkrusisaldus oli võrreldav pastöriseeritud piimadega.

3.9. PIDURDUSAINETE OLEMASOLU

Katsetest selgus, et ükski testitud piimadest *E. coli* DH5 α rakkude kasvu ei inhibeerinud. Kuna tüvi on tundlik antibiootikumide suhtes, siis ükski piim antud meetodiga määramisel ei sisaldanud antibiotsüklidest ainet ei sisalda.

Pildil (vt Lisa 3: Joonis 13) on näidatud üldised bakterite kasvu tulemused.

3.10. ÜLDJÄRELDUSED

Bakterioloogiliste külvide tulemustest võib järeldada, et pastöriseeritud piimas on bakterite arv väike, kõikides proovides peaaegu võrdne ja vastab normile. Pastöriseerimata piim ei vasta kvaliteetnõuetele, selles sisalduvate bakterite üldarv ületab maksimaalset lubatud piinormi ja järelkultuurist võib antud piima tarbimine olla tervisele ohtlik. Toorpiimades on ka suur enterobakterite ja soolekepike arvukus. See võib viidata toorpiimade käitlemisel (jahutamisel, pakendamisel ja tarneahelas) esinevatele probleemidele. Koostisainete sisalduse poolest (C-vitamiini, suhkrute ja valkude sisalduse poolest) on parimaks piim nr 5 (Alma täispiim 3,5%) ja halvimaks on piim nr 6 (Alma piim 0,05%). (vt Lisa tabel 2.)

Samas ei luba katse tulemused oletada, et antud piima tarbimine on tervisele ohtlik, kuna eksperimendi käigus on võimalik katseviga. Täpsemate tulemuste saamiseks ja laiemate järelduste tegemiseks vajalik korduskatsete tegemine.

KOKKUVÕTE

Lehmapiim on igapäevane toiduaine, mida kasutatakse juba mitmendat aastatuhandet nii puhtal kujul, hapupiimatoodete saamiseks kui ka kulinaarias. Eestis on piimatööstus hästi arenenud ja seetõttu riigi turul on esitletud lehmapiima lai valik erinevatelt tootjatelt. Valida müügivõrkude poolt pakutavatelt variantidest optimaalseim on küllaltki raske, seetõttu peab autor käsitlevat teemat aktuaalseks.

Uurimisküsimuseks oli välja selgitada, millise tootja toodud piim valida, et selle tarbimisel saaks organism võimalikult palju kasu (valgud, süsivesikud, rasvad, vitamiinid, mineraalained) ja et valitud piima tarbimine oleks samal ajal ohutu (anormaalse mikrofloora, infektsioonide tekitajate, antibiootikumide puudumine).

Käesoleva uurimuse eesmärk oli teha erinevate müügivõrkudes esitletud piima proovide võrdlemisanalüüs ja valida tarbija tervise jaoks optimaalne.

Hüpotees: pastöriseeritud piim on ohutu, kuid vähema valkude, rasvade, süsivesikute, vitamiinide ja mineraalainete sisaldusega. Pastöriseerimata piim sisaldab suurt hulka ülespool mainitud organismile kasulikke aineid, aga võib olla tarbijale ohtlik, kuna seda piima termiliselt ei töödelda ja selles säilib suur hulk baktereid. Probleemid piima jahutamisel või pakkimisel ning ebaõigel temperatuuril säilitamine võib toorpiima kvaliteedi rikkuda, sest bakterite arvukus ületab seatud piinormi.

Antud hüpoteesi kontrollimiseks kasutati eksperimentaalset uurimismeetodit. Proovide analüüsi teostati Tartu Ülikooli laboris.

Katsete tulemustest lähtudes tarbimiseks optimaalne on Alma 3,5% piim, kuna sisaldab testitud proovidest valkude, rasvade, süsivesikute, C-vitamiinide kõige suuremat kogust ja samas on väikse mikroobide sisaldusega ning seega võiks olla tervisele ohutu. Kuid antud tulemusi ei saa absoluutselt usaldusväärseteks pidada ilma lisaanalüüsideta.

Edaspidiseks uurimiseks võiks piima valikut laiendada – võtta teiste tootjate piima proovid antud toote turu täielikumaks uurimiseks.

INFOALLIKAD

1. *Молоко коровье (сырое)*. EDIMKA.RU. Loetud: <http://edimka.ru/prod282>
2. *Kasulik piim*. Piimaliit.ee (Eesti Piimaliidu koduleht). Loetud: <http://www.piimaliit.ee/kasulik-piim/>
3. *Коли-индекс, коли-титр*. MEDICAL-ENC.RU. Loetud: http://www.medical-enc.ru/10/coli_index.shtml
4. *Микрофлора молока*. NSAU.EDU.RU. Loetud: <http://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/microbiology/stu/bacter/ecologia/mfmol.htm>
5. *Состав и свойства молока*. GRANDARS.RU. Loetud: <http://www.grandars.ru/college/tovarovedenie/sostav-moloka.html>
6. *Heat Treatments and Pasteurization*. MILKFACTS.INFO. Loetud: <http://www.milkfacts.info/Milk%20Processing/Heat%20Treatments%20and%20Pasteurization.htm>

7. *Характеристика основных частей молока*. MPPNIK.RU. Loetud: <http://mppnik.ru/publ/1080-harakteristika-osnovnyh-chastey-moloka.html>
8. *Химический состав и потребительские свойства молока*. ZNAYTOVAR.RU. Loetud: <http://www.znaytovar.ru/new627.html>
9. *Витамин С (аскорбиновая кислота)*. 100VITAMINOV.RU. Loetud: http://100vitaminov.ru/vitamin_c.php
10. *Euroopa Liidu regulatsioon (EC) Nr 853/2004*. Loetud: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0853:20090420:ET:PDF>
11. *Toorpiima käitlemise hügieeninõuded*. Riigi Teataja. Loetud: <https://www.riigiteataja.ee/akt/1039899>
12. *KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 1441/2007, 5. detsember 2007, millega muudetakse määrust (EÜ) nr 2073/2005 toiduainete mikrobioloogiliste kriteeriumide kohta (EMPs kohaldatav tekst)*. Loetud: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:ET:PDF>
13. *Nõuded piimale*. Piima termilise töötlemise liigid. Loetud: <http://www.piiatermilinetootlus.edicypages.com/nouded-piimale>
14. Sait Koju mõisa talu (koduleht). Loetud: <http://www.pim24.eu>
15. Sait Nopri Talumeierei (koduleht). Loetud: <http://nopri.eu>
16. *Alma piim 2,5% IL*. Valio (koduleht). Loetud: <http://www.valio.ee/tooted/piimad/alma-piim-25-11>
17. NUPI.EE. Loetud: <http://www.nupi.ee/tooted/3317/pere-piim>
18. *Alma täispiim 3,5% IL*. Valio (koduleht). Loetud: <http://www.valio.ee/tooted/piimad/alma-piim-35-11>
19. *Alma piim 0,05% IL*. Sait Valio (koduleht). Loetud: <http://www.valio.ee/tooted/piimad/alma-piim-005-11>
20. *Whatman® Panpeha™ pH indicator strips*. SIGMAALDRICH.COM. Loetud: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z134147?lang=en®ion=EE>
21. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Loetud: <http://www.jbc.org/content/193/1/265.full.pdf>
22. *109001 | Folin-Ciocalteu's phenol reagent*. MERCKMILLIPORE.COM. Loetud: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Folin-Ciocalteu%27s-phenol-reagent,MDA_CHEM-109001
23. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Loetud: http://download.bion.com.cn/upload/month_1002/20100202_79e2638a4a8db64734c5QyCZjgBzadbY.attach.pdf

24. *Determination of Vitamin C Concentration by Titration*. Loetud:

http://www.outreach.canterbury.ac.nz/chemistry/documents/vitaminc_iodine.pdf

25. *Milk plate count agar (7703)*. Loetud:

http://www.neogen.com/Acumentia/pdf/ProdInfo/7703_PI.pdf

26. *M Endo Agar LES*. Loetud:

http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/273620.pdf

Kõikide veebilehtede viimane külastusaeg: 14.04.15

LISAD

Lisa 1

Tabel 1. Lehmapiima erinevate komponentide sisaldus^[1]

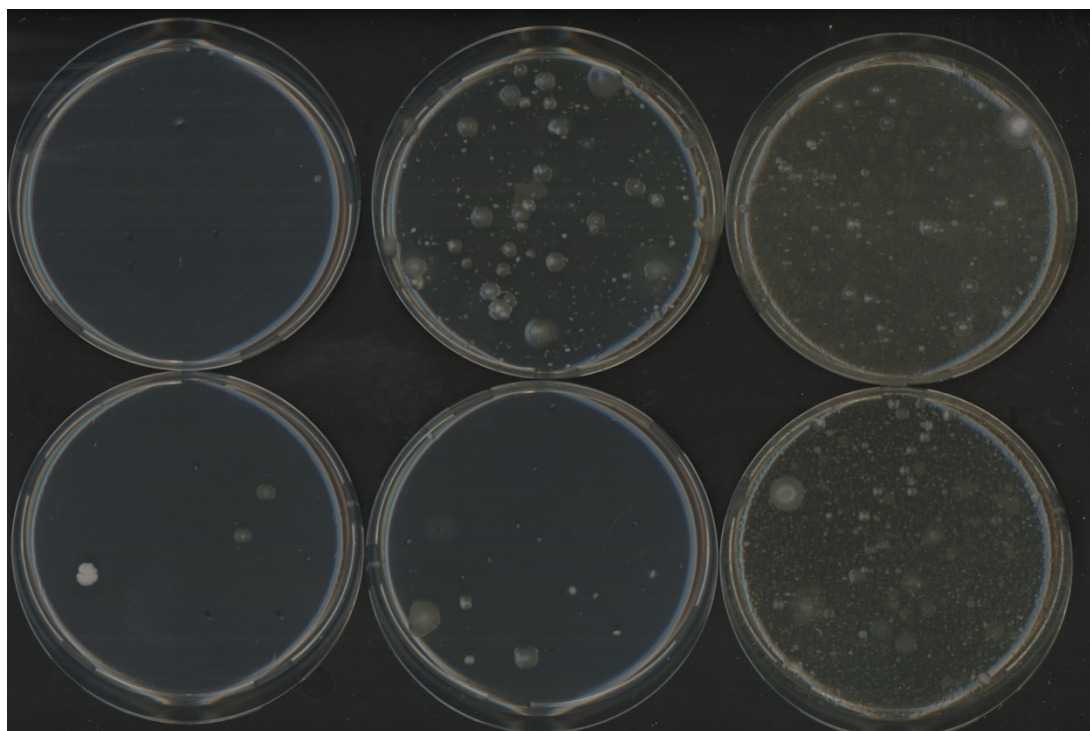
Komponent	Sisaldus (g/100 g piima kohta)
vesi, g	87,3
valgud, g	3,2
rasvad, g	3,6
süsivesikud, g	4,8
orgaanilised happed, g	0,14
tuhk, g	0,7
kaalium, g	0,146
kaltsium, g	0,12
magneesium, g	0,014
naatrium, g	0,05
fosfor, g	0,09
raud, g	$6,7 \cdot 10^{-5}$
jood, g	$9 \cdot 10^{-6}$
koobalt, g	$0,8 \cdot 10^{-6}$
margants, g	$6 \cdot 10^{-6}$
vask, g	$1,2 \cdot 10^{-5}$
molübdeen, g	$5 \cdot 10^{-6}$
fluor, g	$2 \cdot 10^{-5}$
tsink, g	$4 \cdot 10^{-4}$
A-vitamiin (retinool)	$3 \cdot 10^{-5}$
B-vitamiin (karotiin), g	$2 \cdot 10^{-5}$
E-vitamiin (tokoferool), g	$9 \cdot 10^{-5}$
C-vitamiin (askorbiinhape), g	$1,5 \cdot 10^{-3}$
B1-vitamiin (tiamiin), g	$4 \cdot 10^{-5}$
B2-vitamiin (riboflaviin), g	$1,5 \cdot 10^{-4}$
B9-vitamiin (fooliumhape), g	$5 \cdot 10^{-6}$
PP-vitamiin (niatsiin), mg	$1 \cdot 10^{-4}$
kalorsus, kcal	64

Lisa 2

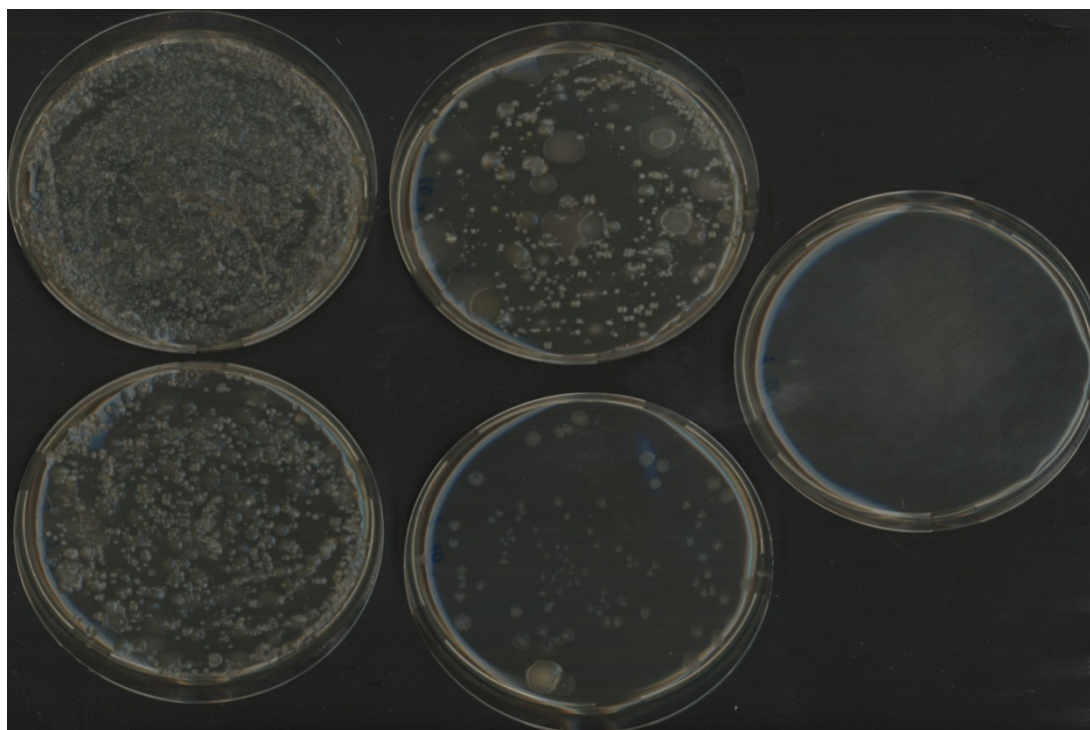
Tabel 2. Testitud piimaproovide koondtabel

Piim	pH (katsete tulemused)	Valgud (katsete tulemused)	Süsivesikud (katsete tulemused)	Vitamiin C (katsete tulemused)	Pidurdusained (katsete tulemused)	Mikrofloor (katsete tulemused)
1. Toorpiim (Konju mõisa talu)	6,5	35,1 g/l	49,3 g/l	1,57 mg/ml	0	100 000 – 190 000 b/ml
2. Toorpiim (Nopri Talumeierei)	6,0	33,9 g/l	44,3 g/l	1,18 mg/ml	0	100 000 – 140 000 b/ml
3. Alma piim 2,5% (Valio)	6,5	35,8 g/l	45,5 g/l	0,98 mg/ml	0	800 b/ml
4. Pere piim 2,5% (Pere)	6,5	36,0 g/l	43,1 g/l	0,98 mg/ml	0	900 b/ml
5. Alma täispiim 3,5% (Valio)	6,5	39,4 g/l	52,6 g/l	1,57 mg/ml	0	700 b/ml
6. Alma rasvavaba piim 0,05% (Valio)	6,5	29,3 g/l	28,9 g/l	1,18 mg/ml	0	500 b/ml
Norm	6,5-6,6	≥ 28 g/l	48 g/l	1,5 mg/ml	0	alla 100 000 b/ml (Toorpiimas) alla 30 000 b/ml (Pastöriseeritud piimas)

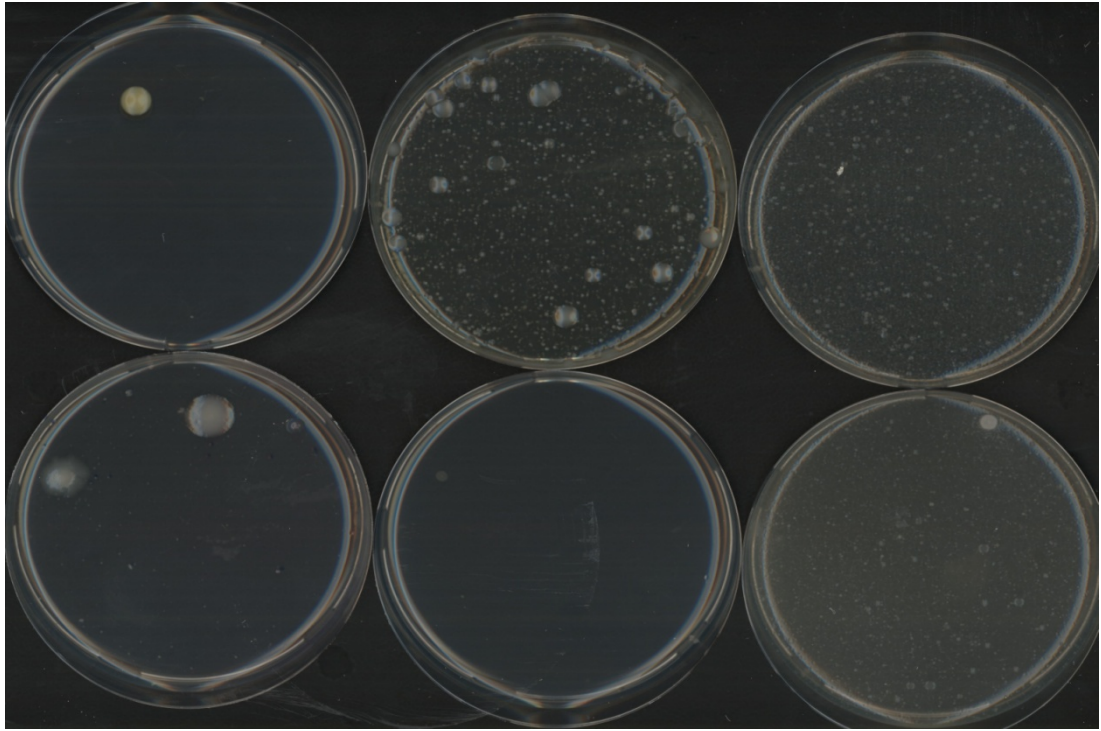
Lisa 3



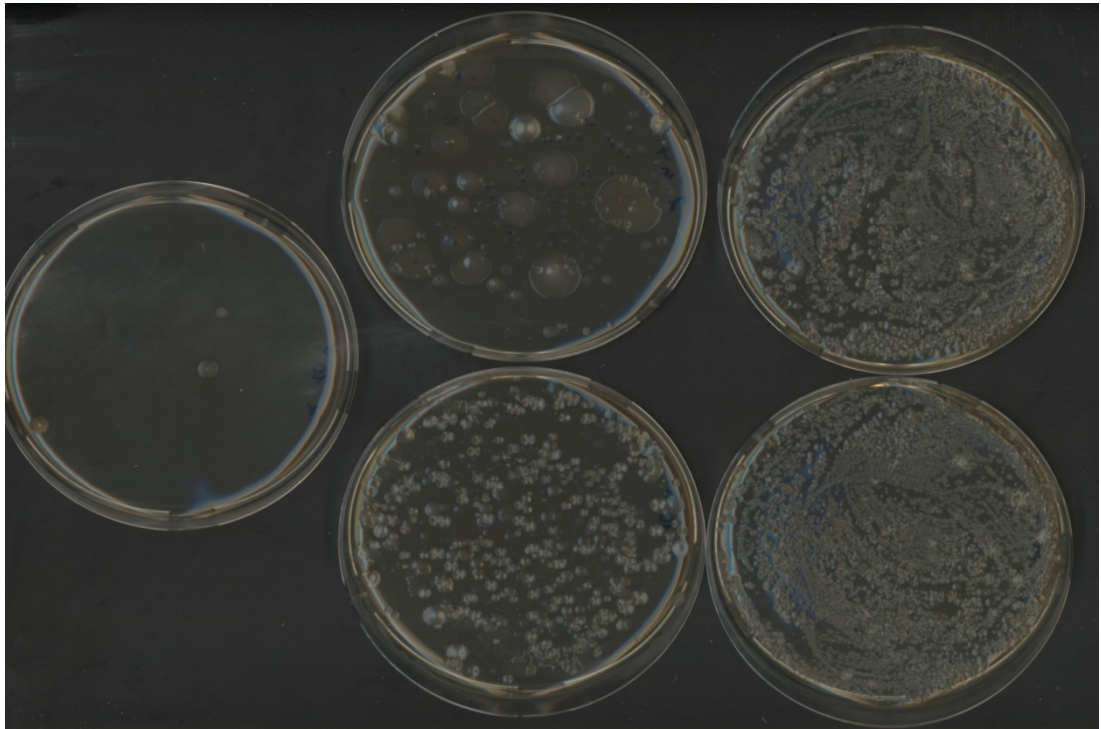
Joonis 1. Piima proov №1, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar (süviskülv)), autori foto



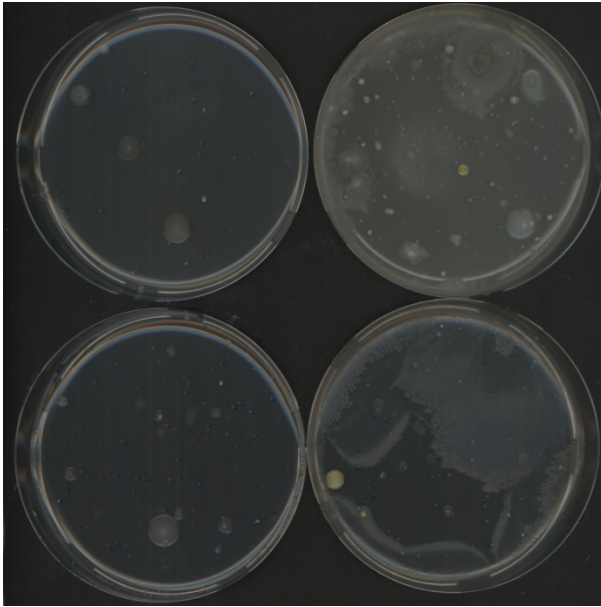
Joonis 2. Piima proov №1, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar), autori foto



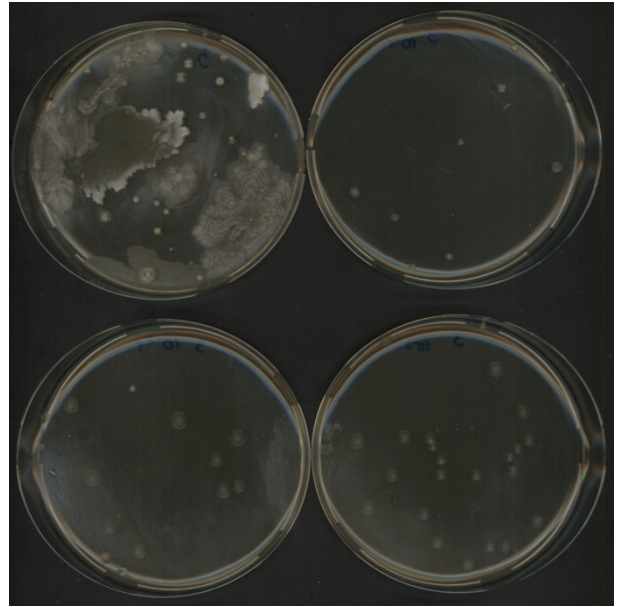
Joonis 3. Piima proov №2, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar (süviskülv)), autori foto



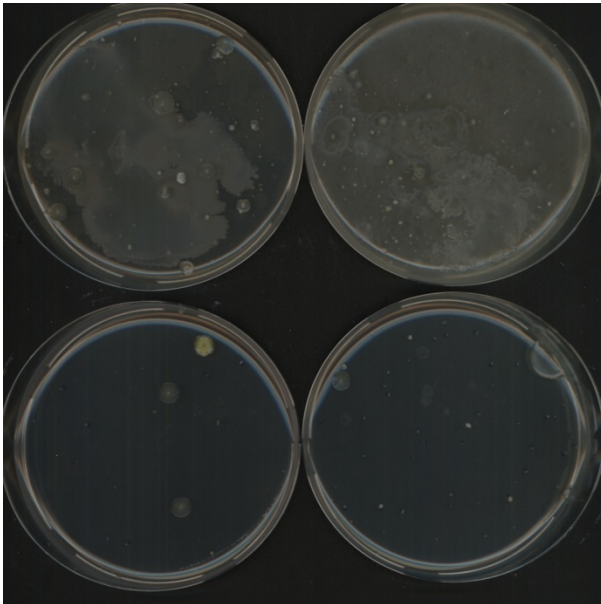
Joonis 4. Piima proov №2, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar), autori foto



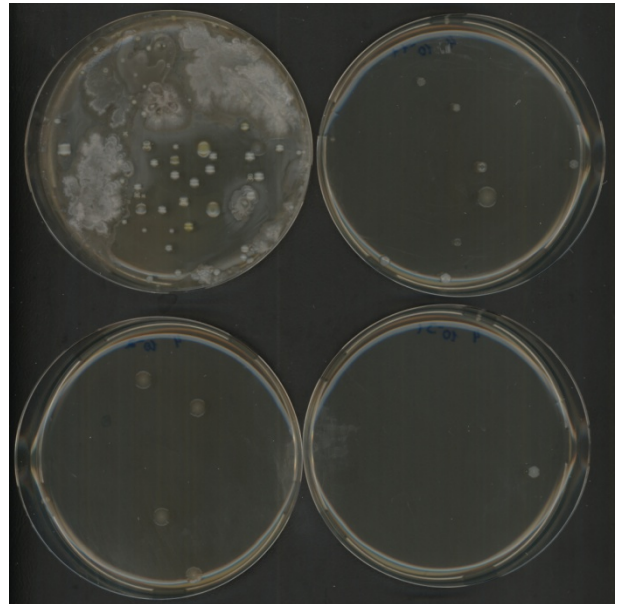
Joonis 5. Piima proov №3, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar (süviskülv)), autori foto



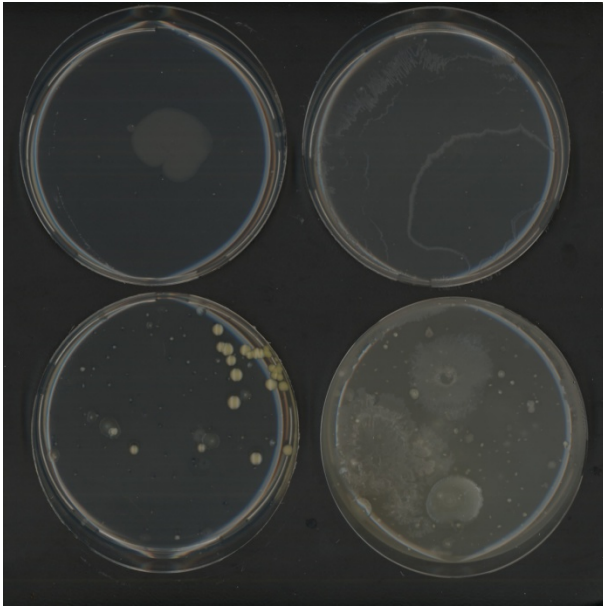
Joonis 6. Piima proov №3, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar), autori foto



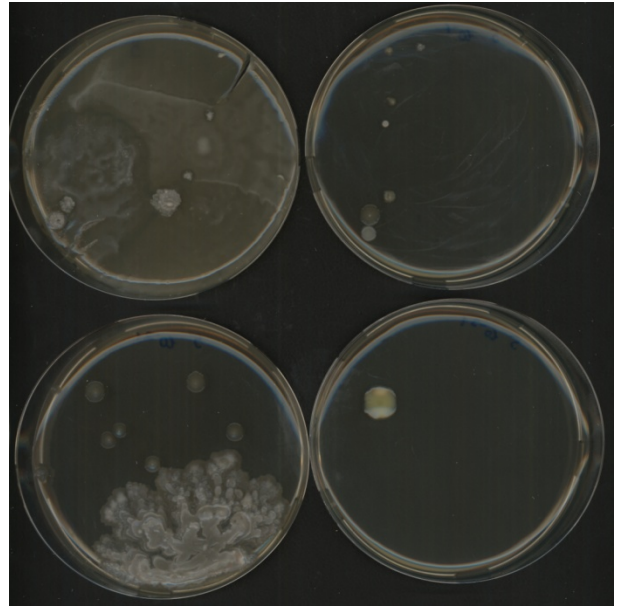
Joonis 7. Piima proov №4, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar (süviskülv)), autori foto



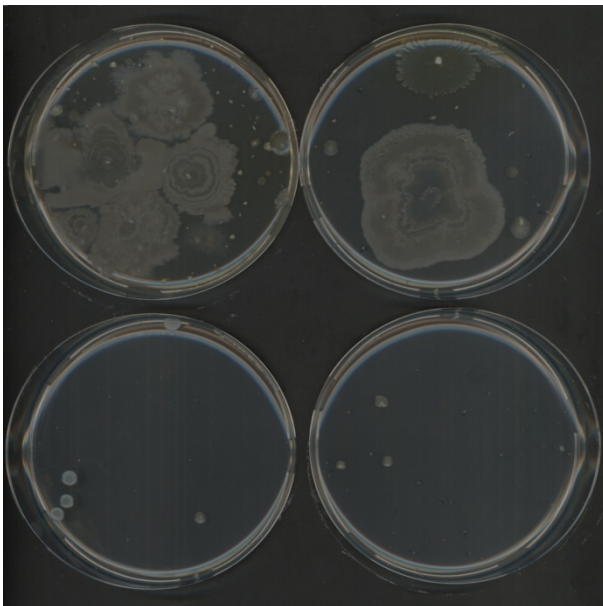
Joonis 8. Piima proov №4, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar), autori foto



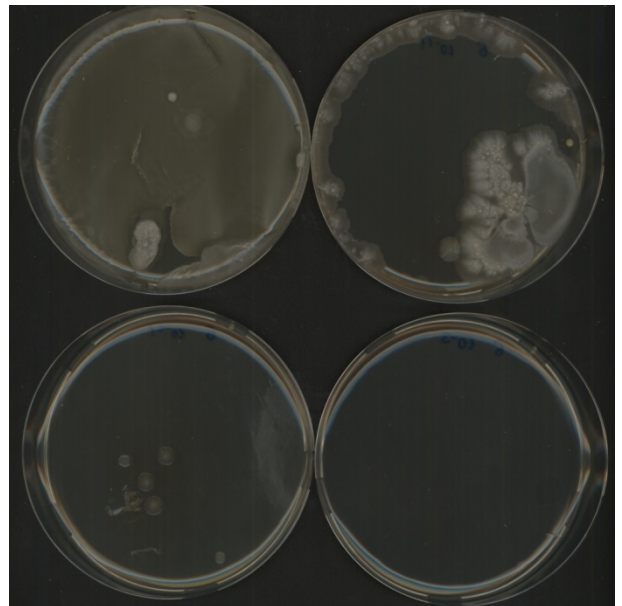
Joonis 9. Piima proov №5, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar (süviskülv)), autori foto



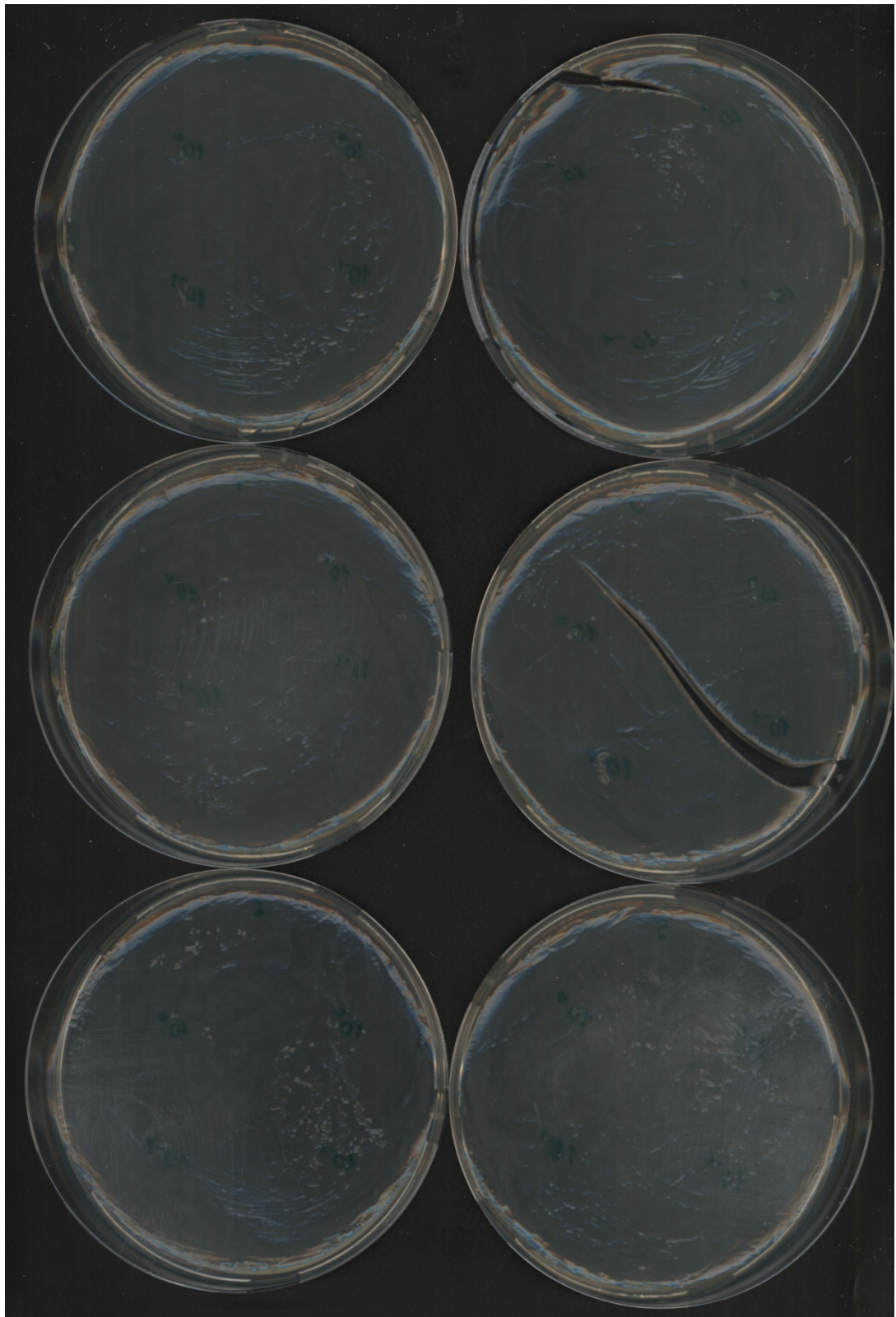
Joonis 10. Piima proov №5, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar), autori foto



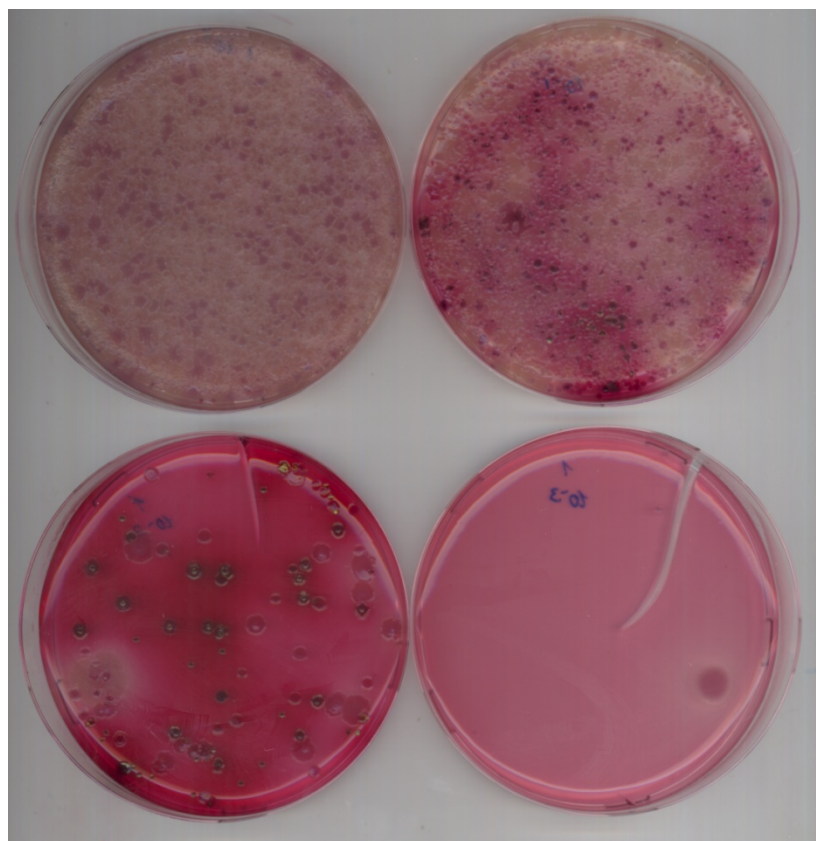
Joonis 11. Piima proov №6, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar (süviskülv)), autori foto



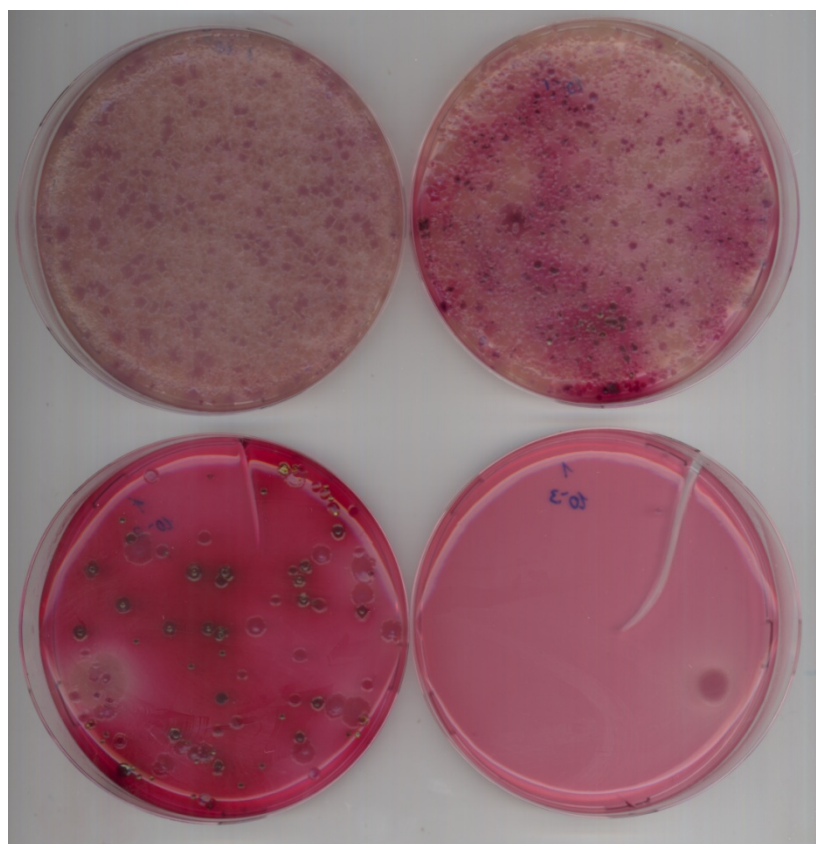
Joonis 12. Piima proov №6, mikrobioloogilise söötmete tulemused (Milk Plate Count Agar), autori foto



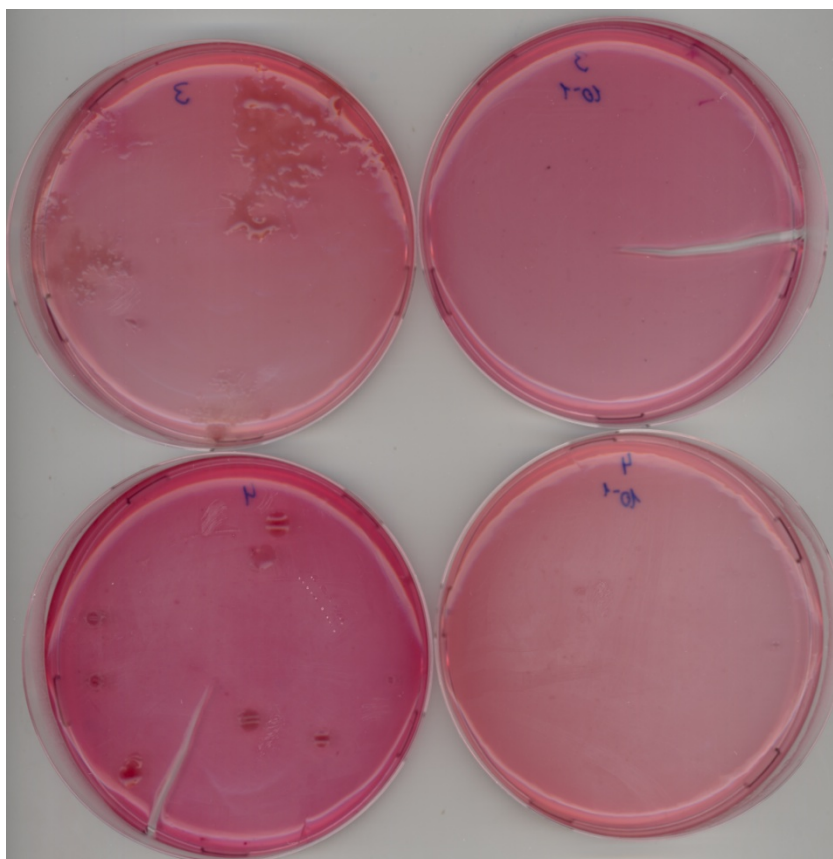
Joonis 13. 6 piima proovi, pidurdusainete olemasolu katsete tulemused, autori foto



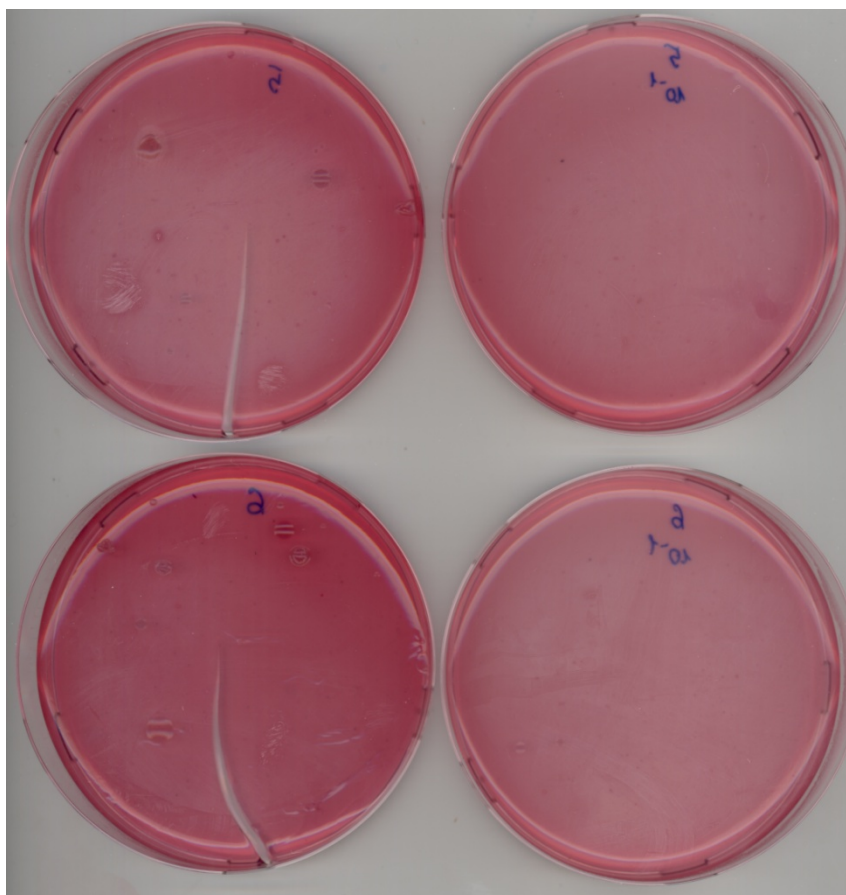
Joonis 14. Endo Agar, piima proov №1, autori foto



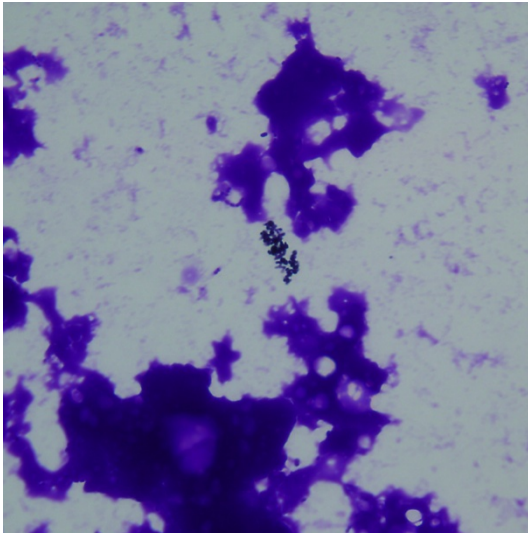
Joonis 15. Endo Agar, piima proov №2, autori foto



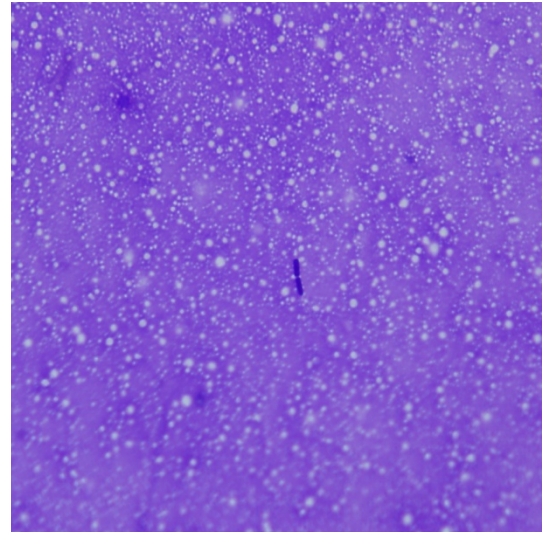
Joonis 16. Endo Agar, piima proovid №3, 4, autori foto



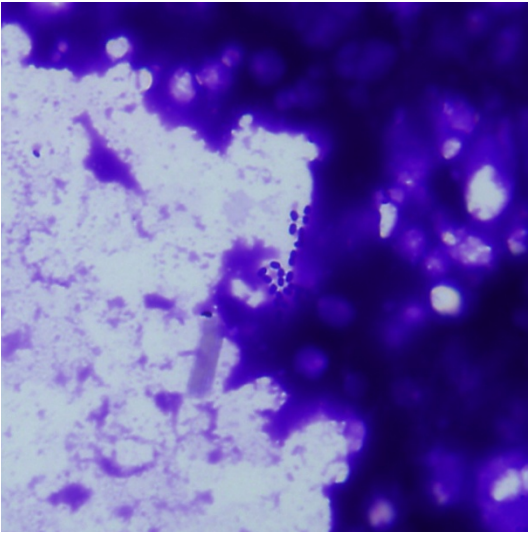
Joonis 17. Endo Agar, piima proovid №5, 6, autori foto



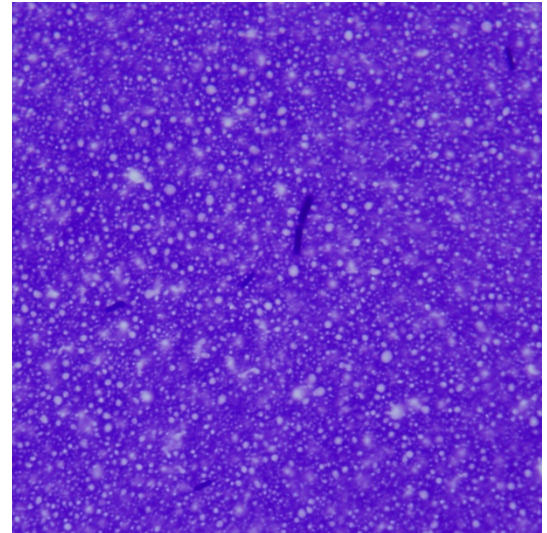
Joonis 18. 1. piima proovi mikroskoopimine



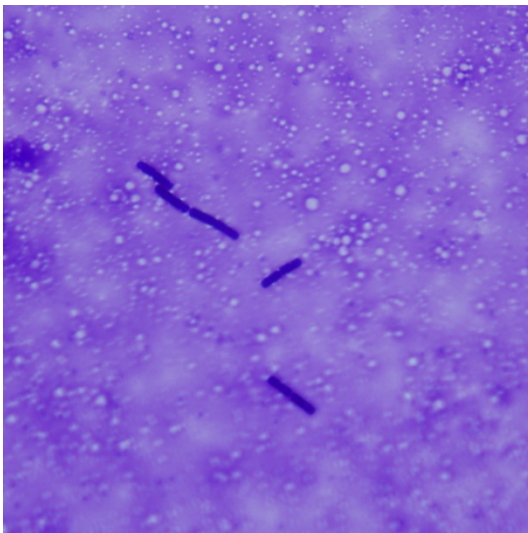
Joonis 19. 4. piima proovi mikroskoopimine



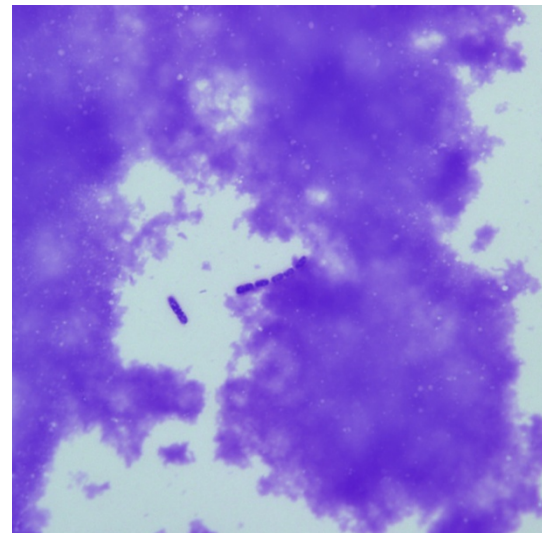
Joonis 20. 2. piima proovi mikroskoopimine



Joonis 21. 5. piima proovi mikroskoopimine



Joonis 22. 3. piima proovi mikroskoopimine



Joonis 23. 6. piima proovi mikroskoopimine