

**KÕRGE TEMPERATUURI JA HAPPEGA TÖÖTLEMISE MÕJU
IDANDATUD TERADE KVALITEEDILE**

Magistritöö

Üliõpilane: Ksenia Šestopalova, 203940KATM
Juhendajad: Anna Traksmäe, PhD. Tallinna Tehnikaülikool, KBI vanemlektor
Mary-Liis Kütt, PhD. TFTAK, Filamentsete seente kultiveerimise grupijuht
Õppekava: Toidutehnoloogia ja -arendus

Tallinn 2022

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Ksenia Šestopalova

22.05.2022

(Digitaalselt allkirjastatud)

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Anna Traksmäe, Mary-Liis Kütt

22.05.2022

(Digitaalselt allkirjastatud)

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Toomas Paalme

(Digitaalselt allkirjastatud)

SISUKORD

LÜHENDID.....	7
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ANALÜÜS	9
1.1 Terade lühikirjeldus.....	9
1.1.1 Rukis	10
1.1.2 Nisu.....	11
1.1.3 Kaer	12
1.2 Terade idanemisel toimuvad protsessid	13
1.2.1 Idanemise mõju terade süsivesikute, lipiidide ja valkude sisaldusele	13
1.2.2 Bioaktiivsed ained	14
1.3 Terade mikrofloora.....	17
1.3.1 Piimhappebakterid	18
1.3.2 Hallitus- ja pärmseened	19
1.4 Enamlevinud terade töötlemise meetodid	20
1.4.1 UV-kiirgus	20
1.4.2 Kiiritus.....	20
1.4.3 Kõrgsurve.....	21
1.4.4 Mikrolained	21
1.4.5 Kuum aur	22
1.4.6 Orgaanilised happed	22
2. TÖÖ EESMÄRGID	24
3. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	25
3.1 Uuritav materjal	25
3.2 Meetodid.....	26
3.2.1 Algeterade eeltöötlemine kõrgete temperatuuridega	26
3.2.2 Happelise keskkonna mõju terade kvaliteedile	26
3.2.3 Ensümaatilise aktiivsuse määrimine	28
3.2.4 Suhkrute sisalduse määramine	29
3.2.5 Terade idanevuse määramine.....	30
3.2.6 Bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvu määramine	30

3.2.7	Bakterite ja hallitus/pärmseente identifitseerimine amplikon järgmise põlvkonna sekveneerimise meetodil	31
4.	TULEMUSED JA ARUTELU	32
4.1	Algterade eeltöötlemine kõrgete temperatuuridega	32
4.2	Happelise keskkonna mõju terade kvaliteedile	33
4.2.1	Happelise keskkonna mõju rukkiteradele	35
4.2.2	Happelise keskkonna mõju idandatud rukkiteradele.....	38
4.3	Ensümaatilise aktiivsuse määramine	40
4.4	Suhkrute sisalduse määramine	42
4.5	Metagenoomne analüüs	43
	KOKKUVÕTE	46
	TÄNUAVALDUSED.....	47
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	48

ANNOTATSIOON

Idandatud terad on kõrge vabade suhkrute ja niiskusesisaldusega pooltooted pagaritööstusele, mille kvaliteet ja säilivusaja pikkus sõltub olulisel määral idandatud terade mikrobioloogilisest mitmekesisusest. Mida kõrgem on erinevate bakterite ning hallitus/pärmseente arv idandatud teradel, seda lühem võib olla lõpptoote säilivusaeg. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida töötlemise mõju terade idanevusele ja mikrobioloogilistele parameetritele sõltuvalt töötlemise meetoditest. Mikroorganismide arvukuse vähenemiseks töödeldi teri kahe meetodiga: kuumtöötlemisega ja leotamisega piimhappes, mis on idandatud terades loomulik metaboliit pärast, mis tekib teradele mikroorganismide elutegevuse tagajärjel. Täpsema ülevaate saamiseks määrati üldmikrobioloogia analüüsi abil bakterite ja hallitus- ja pärmseente üldarv ning sekveneerimise abil identifitseeriti mikroorganisme liikide tasemel. Samuti määrati idanevuse astet, ensümaatilist aktiivsust ja suhkrute sisaldust.

Antud magistritöö koosneb kirjanduse ülevaatest ja eksperimentaalsest osast. Magistritöö teoreetilise osa esimene pool käsitleb rukki-, nisu- ja kaeraterade ehitust ja keemilist koostist, ning algterade ja idandatud terade mikrofloorat. Töö teine pool kirjeldab protsesse, mis toimuvad terade idanemisel ja enamlevinud terade töötlemise meetodeid mikrobioloogilise kvaliteedi parandamiseks.

Eksperimentaalses osas viidi läbi kuumtöötlemise katse ja leotamine piimhappes, et minimeerida mikroorganismide arvukust, ning seeläbi tõsta lõpp-toote kvaliteeti ja pikendada säilivusaega. Igas töötlemisetapis uuriti mikroorganismide üldarvu ning kuidas töötlemine mõjutab terade idanevust.

Uurimistöö tulemusena selgus, et termiline eeltöötlemine ei sobi teradele, kuna see pärsib terade idanevust. Leotamine piimhappe lahuses vähendas mikroorganismide arvukust ning selle töötlemise mõju terade idanevusele oleneb pH-st ja leotamise ajast. Samuti leiti, et pärast töötlemist on rukkiteradel alles mikroorganismid, kes kuulusid perekondadesse *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Filobasidium*, *Sporobolomyse* ja *Vishniacozyma*.

Töö koosneb 53 leheküljest, 16 joonisest, 4 tabelist.

Märksõnad: idandatud terad, idanevus, termiline töötlus, piimhappe töötlus, mikroorganismid

ABSTRACT

Sprouted grains are moist and full of mono- and disaccharides. These products are excellent source of nutrients and are often used in the bakery industry. However, the sprouted grains are also a suitable environment for microbial growth. Therefore, the shelf-life of sprouted grains depends on the quality of raw grains and production process. The purpose of present master thesis “Effect of high temperature and acid treatment on the quality of sprouted grains” was to analyze the effect of treatment to grain germination and microbiological parameters depending on the processing methods. To reduce the number of microorganisms, the grains were treated by two methods: heat treatment and soaking in lactic acid, which is a natural metabolite in germinated grains produced by microorganisms. For a more detailed overview, the total number of bacteria and molds / yeasts was determined by general microbiological analysis and microorganisms at the species level were identified by sequencing. The degree of germination, enzymatic activity and sugar content were also determined.

This thesis is divided into literature overview and experimental part. The first part of the literature overview of the thesis describes the construction and chemical composition of rye, wheat and oat grains, and the microflora of primary grains and germinated grains. The second part of the thesis describes the processes of grain germination and common grain processing methods to improve microbiological quality.

In the experimental part, a heat treatment test and soaking in lactic acid were performed in order to minimize the number of microorganisms, and thus to improve the quality of the final product and to extend the shelf life. The total number of microorganisms at each stage and how the treatment affects the germination of the grains were examined.

As a result of the research, it was concluded that thermal pre-treatment is not suitable as it inhibits the germination of grains. In contrast, soaking in a lactic acid solution had a positive effect on the reduction of microorganisms. The effect of lactic acid treatment on the germination of the grains depends on the pH and the time of soaking. Microorganisms isolated from lactic acid treated rye grains belonged to the following genus: *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Filobasidium*, *Sporobolomyse* and *Vishniacozyma*.

This thesis consists of 53 pages, 16 figures, 4 tables.

Keywords: sprouted grains, germination, heat treatment, lactic acid treatment, microorganisms

LÜHENDID

- CFU – Kolooniaid moodustav ühik (*Colony-forming unit* ingl. k.)
- DNA – Desoksüribonukleiinhape (*Deoxyribonucleic acid* ingl. k)
- EFSA – Euroopa Toiduohutusamet (*European Food Safety Authority* ingl. k.)
- FDA – USA Toidu- ja Ravimiamet (*United States Food and Drug Administration* ingl. k.)
- GABA - γ -aminovõihape (*Gamma-aminobutyric acid* ingl. k.)
- HPP – Kõrgsurve töötlus (*high pressure processing* ingl.k)
- IP6 – Inositool heksakisfosfaat (*Inositol hexaphosphate* ingl. k.)
- LA – Piimhape (*lactic acid* ingl. k.)
- LAB – Piimhappebakterid (*Lactic Acid Bacteria* ingl. k.)
- MilliQ – Deioniseeritud vesi
- MW – Mikrolained (*Microwaves* ingl. k.)
- NGS – Järgmise põlvkonna sekveneerimine (*Next Generation Sequencing* ingl. k.)
- PCA – Universaalsööde bakterite kasvatamiseks (*Plate Count Agar* ingl. k.)
- PINA – Puroindoliin A (*Puroindoline-A* ingl. k.)
- PINB – Puroindoliin B (*Puroindoline-B* ingl. k.)
- RI – Murdumisnäitaja (*Refractive index* ingl. k.)
- rRNA – Ribosomaalne ribonukleiinhape (*Ribosomal ribonucleic acid* ingl. k.)
- SDA – Universaalsööde hallitus/pärmseente kasvatamiseks (*Sabouraud Dextrose Agar* ingl. k.)
- SS – Ülekuumendatud aur (*Superheated Steam* ingl. k.)
- UV – Ultraviolettkiirgus (*Ultraviolet* ingl. k.)

SISSEJUHATUS

Teravili on üks maailma tähtsamaid põllumajandustooteid nii inimeste toiduna kui ka loomasööda peamise komponendina. Teraviljad on maailmas enim tarbitud toidugrupp ja neid kasvatatakse umbes 60% maailma haritavast maast. Peamisteks teraviljaliikideks on nisu, rukis, oder, kaer, riis, hirss, mais, sorgo ja tatar.

Idandatud terad on unikaalse maitse ja aroomiga terad mida saadakse tööstusliku protsessi käigus, kus esmalt toored terad pestakse ja leotatakse ning seejärel idandatakse kasvatünnides. Idandatud terad on pagaritoodete jaoks asendamatuks tooraineks ning sisaldavad bioloogiliselt aktiivseid ühendeid nagu vitamiinid, antioksüdandid ja fenoolid, mis on kasulikud inimese tervisele ja on heaks lisandiks erinevatele küpsetistele. Idandatud terade eeliseks on see, et nad lihtsustavad tootmisprotsessi ja vähendavad sellele kuluvat aega, sest ei vaja enne taigasse lisamist täiendavat töötlemist võrreldes kuivade teradega, mida on vaja enne leotada. Siiski võivad idandatud terad olla patogeensete mikroorganismide allikaks. Idanenud terade pinnal leiduvad bakteriliigid pärinevad sageli mullast ja võivad saastata niiskeid toiduaineid, lühendades nende säilivusaega ja ohustada inimese tervist.

Teravilja ja nende saaduste ülemaailmne tähtsus ja laialdane kasutamine muudab teravilja säilitamise üheks olulisemaks toiduohutuse küsimuseks. Säilitatud teravilja saastumine putukate ja mikroorganismidega on teraviljatööstuse peamine probleem, kuna see mõjutab terade kvaliteeti. Teraviljas leiduvad mikroorganismid võivad mõjutada terade ohutust, kvaliteeti ja funktsionaalseid omadusi. Mõned hallitused võivad potentsiaalselt toota kahjulikke mükotoksiine ja kujutada endast tõsist ohtu tarbijate tervisele. Oluline on vähendada teravilja saastatust ja tagada ohutus nii inimese- kui ka loomatoidus.

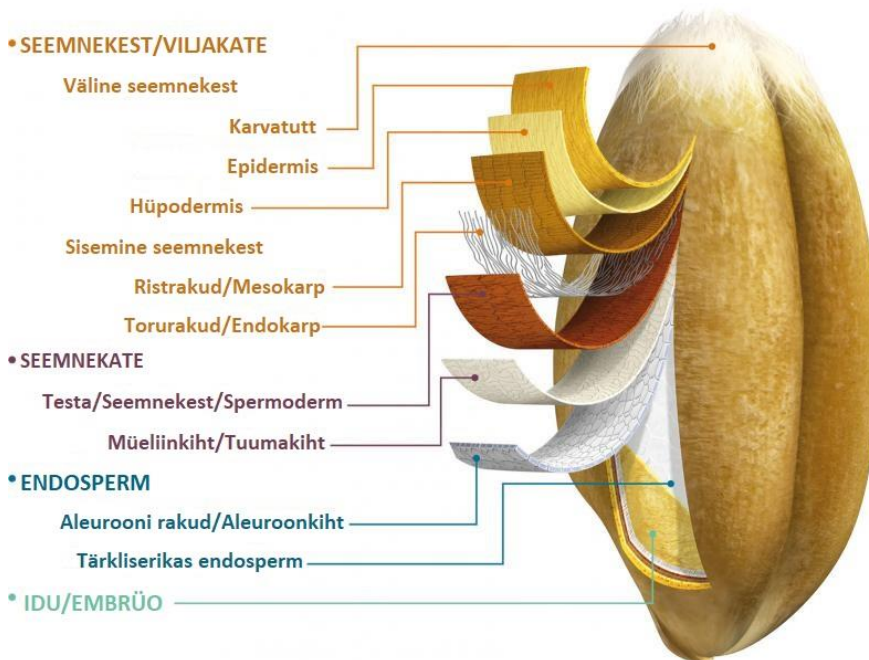
Mikrobioloogiliste koosluste vähendamiseks on välja töötatud mitmeid töötlemise meetodeid. Kõige enam levinud on: UV-kiirguse kasutamine, töötlemine mikrolainetega, kõrgsurvetöötlemine, happetöötlemine, kuumtöötlemine.

Antud töö eesmärgiks oli vähendada mikroobide arvukust ja samal ajal säilitada rukki, nisu ja kaera terade idanemisvõime. Kuna Puratos Malt OÜ suurim osa on idandatud rukkiterade toodang (ca 85% kogu idandatud terade toodangust), siis on magistritöö põhitähelepanu suunatud rohkem rukkiterade protsessidele ja uuringutele.

1. KIRJANDUSE ANALÜÜS

1.1 Terade lühikirjeldus

Teraviljad kuuluvad kõrreliste sugukonda, mida nimetatakse *Gramineae*. Nad toodavad kuivi üheseemnelisi vilju, mida nimetatakse teradeks ning mis koosnevad viljakestast ja seemnest. Seeme ise koosneb embrüöst (idu), endospermist, tuumaepidermist ja seemnekestadest (joonis 1) (Lemmens *et al.*, 2019). Teravilju kasvatatakse nende kõrge toiteväärtusega söödavate seemnete pärast, mida sageli nimetatakse teradeks. Mõned teraviljad on tsivilisatsiooni algusest peale olnud põhitoiduks nii otseinimestele kui ka loomadele. Teraviljad on kõige olulisemad toiduallikad ning teraviljapõhised toidud on maailma elanikkonna peamine energia-, valgu-, B-vitamiinide ja mineraalainete allikas. Üldiselt on teravilja tootmine suhteliselt odav, seda on lihtne säilitada ja transportida ning see ei rikne kuivana hoides kergesti (McKevith 2004).



Joonis 1. Nisutera ehitus (muudetud allikast: <http://grain-gallery.com/en/wheat/images>)

Tabel 1. Rukki, nisu ja kaera keemiline koostis, koostis 100 g kohta (Fineli database, <https://fineli.fi>)

Komponent	Rukkis	Nisu	Kaer
Valk	9,6 g	12,9 g	13,6 g
Lipiidid (rasvad)	2,5 g	2,5 g	7,2 g
Süsivesikud	57,1 g	52,9 g	60,0 g
Tärklis	55,8 g	50,3 g	58,8 g
Kiudained	18,1 g	9,9 g	10,0 g
Mineraalained			
Kaltsium	34 mg	32 mg	47 mg
Raud	3 mg	3,9 mg	4,7 mg
Jood	5 µg	5 µg	20 µg
Kaalium	450 mg	417 mg	414 mg
Magneesium	103 mg	121 mg	142 mg
Naatrium	1 mg	1 mg	1 mg
Fosfor	298 mg	347 mg	471 mg
Seleen	4,9 µg	7,6 µg	12 µg
Vitamiinid			
Folaadid	40 µg	45 µg	43,6 µg
Niatsiin	0,2 mg	5 mg	0,8 mg
Riboflaviin	0,10 mg	0,15 mg	0,09 mg
Tiamiin (B1)	0,28 mg	0,4 mg	0,33 mg
Karotenoidid	219,7 µg	224,1 µg	177 µg
E-vitamiin alfatokoferool	1 mg	1 mg	0,8 mg
K-vitamiin	5,9 µg	2,6 µg	2,1 µg

1.1.1 Rukis

Rukis (*Secale cereale*) on kõigist teraviljakultuuridest kõige talvekindlam. Erinevalt nisust ja muudest teraviljasortidest kasvab rukis hästi kehvematel muldadel, taludes madalat pH-d ja kehva viljakust.

Seega on rukis väärtuslik kultuur liiva- või turbamuldadel (Feng 2019). Rukkitera keemiline koostis oleneb rukkisordist, kliima- ja kasvutingimustest, mulla kvaliteedist ja teistest põllumajanduslikest teguritest. Rukkitera põhikoostis on sarnane teiste teraviljade koostisega. Tähtsaks on rukkitera ja -jahu põhikomponent (Slukova *et al.*, 2021). Rukkitera põhi keemiline koostis on toodud Tabelis 1.

Rukkitera peamised keemilised koostisosad on tähtsaks, kiudained, valgud ja mineraalained (tuhk). Tähtsaks leidub peamiselt endospermis ja selle sisaldus rukkiteras on vahemikus 57,1–65,6 g/100 g (Hansen *et al.*, 2004). Rukis sisaldab suures koguses kiudaineid, mis on jaotunud kogu rukki tuumas. Rukki kiudainete sisaldus on tavaliste teraviljade seas tegelikult kõrgeim. Rukki endospermis on kiudainesisaldus suurem kui nisu endospermis. Kiudainete kogusisaldus rukkiteras on vahemikus 14,7–20,9 g/100 g. Rukki sisalduvad kiudained koosnevad arabinoksülaanist, tselluloosist, β -glükaanist, fruktaanidest ja ligniinist (Poutanen *et al.*, 2014). Kiudainete koostise poolest on rukis sarnane nisuga, kuid kiudainete sisaldus ja arabinoksülaani lahustuvus on rukkiteradel suurem kui nisuteradel. Arabinoksülaani üldsisaldus rukkiterades on vahemikus 6,5–12,2 g/100 g (Jonsson *et al.*, 2018). Erinevates riikides kasvatatud rukkikultuuride valgusisaldus on vahemikus 9,0–15,4 g/100 g ja tuhasisaldus 1,61–2,24 g/100 g (Hansen *et al.*, 2004; Jonsson *et al.*, 2018). Nisuga võrreldes sisaldab rukis tavaliselt vähem tähtsaks ja toorvalku, kuid rohkem kiudaineid. Samuti on täisteratootena tarbitav rukis hea fenoolsete ühendite, vitamiinide, mikroelementide ja mineraalainete allikas (Poutanen *et al.* 2014).

1.1.2 Nisu

Nisu on paljudes maailma riikides peamine teraviljakultuur. See kuulub *Triticum* perekonda, mida on tuhandeid liike (McKevith 2004). Selle tekstuurid omadused määravad lõpptootete kvaliteeti. Nisul on kaks tekstuuriklassi – pehme (*Triticum aestivum*) ja kõva (*Triticum turgidum/durum*). Neid kahte nisuklassi kasutatakse erinevatel eesmärkidel. Kõva nisu kasutatakse peamiselt leiva ja pasta valmistamiseks, pehmet nisu aga küpsiste ja kookide valmistamiseks (Xu *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2016; Serna-Saldivar 2010: 22). Terade kõvaduse erinevused tulenevad kahe puroindoliini valgu - puroindoliin A (PINA) ja puroindoliin B (PINB) olemasolust või puudumisest. Mõlema valgu olemasolu on seotud pehme tekstuuriga, samas kui nende puudumine või mutatsioon põhjustab kõva teksturi. Kuna puroindoliinid on tähtsaksgraanulitega seotud valgud ja osalevad tera tekstuuris, võivad need mõjutada tähtsaks koostist ja omadusi (Kumar *et al.*, 2016; Morris 2002; Serna-Saldivar 2010: 22).

Nisu terad on üldiselt ovaalse kujuga, kuigi sõltuvalt liigist võivad terad olla sfäärilised ja pikad või kitsad ja lamedad. Tera on tavaliselt 5–9 mm pikk, kaalub 35–50 mg ja selle ühel küljel, kus see algselt kontakteerus nisuõiega, on korts. Nisu tera sisaldab 2-3% idu, 13-17% kliisid ja 80-85% jahust endospermi (Šramková *et al.*, 2009). Nisuidud on rikkad valgu- (25%) ja lipiidide (8–13%) poolest ning on ka oluline E-vitamiini allikas. Nisukliid tekitavad tuumale kaitsekihi ja moodustavad üle 8% tuuma kogumassist. Endosperm moodustab suurema osa (80–85 massiprotsenti) tuumast ning koosneb valgu- ja tähtsaksmaatriksist. Nisu valgu sisaldus jääb tavaliselt vahemikku 10–18% kogu kuivainest (Xu *et al.*,

2019). Nisu peamine varuvalk on gluteen, millest oluliselt sõltuvad jahu küpsetusomadused. Gluteenisaldus on oluline tsöliaakia või muu gluteenitalumatusega inimestele (Yacoubian 2021).

1.1.3 Kaer

Kaer (*Avena sativa*) on inim- ja loomatoidus tähtis ja väärtuslik teravili, mis kasvab hästi kehvadel pinnasel ja jahedas ning niiskes kliimas. Kaera kasutatakse kaerahelveste, kaerajahu, kaerapiima ja muu toidu valmistamiseks. Kaeral on kõrgem lipiidide sisaldus kui enamikul teistel teraviljadel (Yang *et al.*, 2019; McKeivith 2004). Kaeraterad sisaldavad peaaegu kolm korda rohkem rasva kui nisu ja rukis (Tabel 1). Need rasvad on aga enamasti küllastumata rasvhapped. Samuti ka kaer sisaldab rohkem valku kui nisu. Kaera peamine valk on avenaliin. Kaer on rikkam fosfori, vase, ja magneesiumi poolest, nisu aga tsingi, seleeni ja raua poolest. Need on rikkad ka mangaani, vase, raua ja seleeni poolest (Yacoubian 2021).

Kaeraterad sisaldavad märkimisväärses koguses lahustuvat kiudainet β -glükaani, millel on mitmeid tervisega seotud eeliseid, sealhulgas söögijärgse glükoosivastuse vähenemine ja vere kolesteroolitaseme paranemine (Zhou *et al.*, 2019). Kaeras sisalduv β -glükaan varieerub vahemikus 2,3–8,5 g/100 g. β -glükaan jaotub läbi endospermi ja paikneb endospermi rakuseintes, moodustades umbes 75% endospermi rakuseintest (Butt *et al.*, 2008). β -glükaanil on head funktsionaalsed ja toitainelisedomadused, millel on kõrge viskoossus juba suhteliselt madalatel kontsentratsioonidel. Glükaanide viskoossus on stabiilne laias pH vahemikus (pH 2–10), kuid see langeb temperatuuri tõustes. Oma viskoossuse tõttu võib β -glükaan häirida pruulimisprotsessi või piirata kaerapõhise loomasööda toiteväärtust. Teisest küljest saab β -glükaani kasutada toiduainetööstuses paksendajana, kuid oluline on jälgida lisatava β -glükaani kogust, mis võib nii positiivselt kui ka negatiivselt mõjutada jookide ja toitade sensorset kvaliteeti (Butt *et al.*, 2008).

1.2 Terade idanemisel toimuvad protsessid

Seemnete idanemine on keeruline protsess, mis algab kuivade seemnete vee sisse võtmisest ja jätkub embrüonaalse telje pikenemiseni. Idanemise ajal toimuvaid keerulisi füüsikalisi- ja ainevahetusprotsesse võib jagada kolmeks faasiks, mis on peamiselt seotud seemnete vee omastamisega. I faas - varajane faas. Hõlmab vee imbumist ja omastamise kuivade seemnete poolt. I faasis leotatud seemne rakumaterjal ja maatriks muutuvad täielikult hüdreerituks. II faas - keskmine faas, sisaldab vee omastamise faasi ja nähtavat juure väljaulatumist läbi seemnekestade. Toimub reservmaterjali mobiliseerimine ja juurekasvuks vajaliku endogeense metabolismi aktiveerimine. Juur ilmub II faasi lõpuks ja idanemine peatub. III faasis imab seeme endasse täiendava koguse vett. Toimub põhiline varumaterjali mobilisatsioon ja seemik hakkab kasvama (Lemmens *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2017).

Idanemine põhjustab olulisi muutusi seemnete biokeemilistes, toitumis- ja sensoorsetes omadustes. Selle protsessi käigus toimub seemnekatete nõrgenemine, metaboolse aktiivsuse sisselülitumine, geenide transkriptsiooni aktiveerimine, embrüonaalsete rakuseinte lõdvestumine ning organellide uuesti kokkupanek ja biogenees, intensiivne seemnete säilitamisühendite (tähts, varuvalgud jt) lagunemine ning struktuursete valkude ja teiste rakukomponentide süntees (Benincasa *et al.* 2019). Vitamiinide kogused ja sekundaarsed ühendid, millest suuremat osa peetakse kasulikeks antioksüdantideks, suurenevad sageli idanemise ajal. Idanemise ajal väheneb fütiinhape sisaldus. Fütiinhape on terade peamine fosfori allikas ning seda peetakse ka antinutriendiks inimorganismi jaoks, kuna takistab raua, tsingi ja kaltsiumi imendumist ning võib soodustada mineraalide puudust (Suliman *et al.*, 2008, Lemmens *et al.*, 2019).

1.2.1 Idanemise mõju terade süsivesikute, lipiidide ja valkude sisaldusele

Süsivesikud. Idanemine käivitab tähtsist lagundavate ensüümide, nagu α -amülaas ja α -glükosidaas, sünteesi. Ensüümide toimel tähtsist osaliselt hüdrolyüsib glükoosiks, maltoosiks ja maltotriiosiks, aga ka paljudeks dekstriinideks ning sellest tulenevalt suhkrusisaldus suureneb. Teraviljade idanemisel tekkivad suhkrud on areneva embrüo energiaallikaks (Coulbaly ja Chen, 2011; Lemmens *et al.*, 2019).

Idanemine ei mõjuta mitte ainult tähtsisesisaldust, vaid ka selle toiteomadusi, mida ei saa hinnata ainult selle hulga põhjal. Seeditavuse põhjal saab tähtsist jagada kiiresti seeditavaks, aeglaselt seeditavaks ja ensüümiresistentseks tähtsisteks. Paljud uuringud on näidanud, et tähtsist seeditavus suureneb idanemise tagajärjel (Lemmens *et al.*, 2019). Idandatud teraviljad on üldiselt paremini seeditavad, sest ensüümid on juba lagundanud tähtsistegraanuleid, samuti on selliste terade rakusein õhem ja vabanenud suhkrud on kergemini omastatavad (Yan *et al.*, 2010).

Idandamine kutsub esile biokeemilisi muutusi süsivesikutes. Erinevate teraviljade uuringud on näidanud, et idanemise ajal aktiveeruvad hüdrolyütilised ensüümid, mis põhjustavad tähtsist ja

mittetähtslike polüsahhariidide lagunemist ja redutseerivate suhkrute sisalduse suurenemist (Gebreegziabher *et al.*, 2015).

Tähtslik on teraviljaseemnetes kõige enam leiduv varusüsivesik. Tähtslike kaks komponenti, amüloos ja amülopektiin, hüdrolyüsitakse esmalt α -amülaasi toimel, lõhustades α -(1-4) glükosiidsidemeid suurte oligomeeride mitteredutseerivast otsast glükosijääkide vahel, et toota amüloosist glükoosi ja maltoosi, ja amülopektiinist dekstriini. β -amülaas toodab tähtslikest maltoosi, hüdrolyüsidest α -1,4-glükaani sidemeid. Maltaasi toimel muudetakse maltoos glükosiks (Ma *et al.*, 2017).

Kiudained sisalduvad teravilja rakuseintes. Nisu ja rukki rakuseinad on üles ehitatud peamiselt arabinoksülaanist. Odra, kaera, sorgo ja hirsirakuseinad aga peamiselt β -D-glükaanist. Idanemise tulemusena hüdrolyüsitakse need rakuseina polüsahhariidid ensüümide toimel. Idanemine kutsub esile muutused lahustumatute ja lahustuvate kiudainete koostises ja sisalduses (Lemmens *et al.*, 2019). Idanemise mõju terade kiudainete sisaldusele on sageli muutuv ja sõltub rangelt kiu fraktsioonist, idanemisajast ja genotüüpidest (Benincasa *et al.*, 2019).

Lipiidid. Lipiidide katabolism tagab energia- ja süsinikuallikad, mis on vajalikud biokeemiliseks ja füüsikalise-keemiliseks muutumiseks terades kasvu ajal. Sellega seoses suureneb terade idanemise ajal ensüümide lipaasi ja lipoksügenaasi aktiivsus. Idanemistemperatuuri tõstmine toob kaasa suurema lipiidide lagunemise. Lipaas katalüüsib triglytseriidide lagunemist glytserooliks ja vabadeks rasvhapeteks (Lemmens *et al.*, 2019). Glytserool ja vabad rasvhapped muundatakse peamiselt sahharoosiks (Bewley ja Black 1994:107).

Valgud. Enamiku teraviljade peamised varuvalgud liigitatakse nende lahustuvusomaduste järgi albumiinideks (vees lahustuv), globuliinideks (soolas lahustuv), gluteliinideks (leelilahustuv) ja prolamiinideks (alkoholis lahustuv). Teravilja idanemise käigus hüdrolyüsitakse varuvalgud proteolüütiliste ensüümide toimel 2–3 päeva pärast paisumist peptiidideks ja aminohapeteks, mis suurendab toitainete biosaadavust (Benincasa *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2017).

Varuvalgud ei lagune mitte ainult erineva molekulmassiga peptiidideks, vaid ka vabadeks aminohapeteks, mille sisaldus suureneb näiteks kaera idanemisel 5-10 korda (Lemmens *et al.*, 2019). Lisaks vabade aminohapete sisalduse suurenemisele on täheldatud olulisi muutusi ka vabade aminohapete koostises. Eelkõige sisaldavad idandatud täisterad suuremas koguses asendamatu aminohappeid, mida on vaja inimorganismis valkude sünteesiks. Teravilja liik ja idanemisaeg mõjutavad aminohapete koostist kõige enam (Hung *et al.*, 2012; Benincasa *et al.*, 2019).

1.2.2 Bioaktiivsed ained

Idandatud terad sisaldavad erinevaid bioaktiivseid ühendeid, nagu vitamiinid, γ -aminovõihape, antioksidandid, fenoolühendid. Neid bioaktiivseid ühendeid saab idanemisprotsessis sünteesida või transformeerida (Gan *et al.*, 2017).

Vitamiinid. Vitamiinid on rühm orgaanilisi ühendeid. Üldiselt võib vitamiinid jagada veeslahustuvateks ja rasvlahustuvateks vitamiinideks. Esimene grupp sisaldab peamiselt B-vitamiini kompleksi ja C-vitamiini ning viimane sisaldab A-, D-, E- ja K-vitamiine. Teraviljade vitamiinisaldus on oluline terade arenguks ja suureneb idanemisel biosünteesi tulemusena. Erinevused idandatud terade vitamiinisalduses sõltuvad teravilja tüübist ning leotamise ja idanemise tingimustest (Lemmens *et al.*, 2019).

Uuringud näitavad, et idandatud terad sisaldavad rohkem vitamiine kui algterad (Gan *et al.*, 2017). Idanemine suurendab erinevate vitamiinide sisaldust teraviljades ja kaunviljades, nagu tokoferoolid (α -, β - ja γ -tokoferoolid), riboflaviin (vitamiin B2) ja üldniatsiin (vitamiin B3) tänu nende vitamiinide sünteesile idude poolt (Nkhata *et al.*, 2018). C-vitamiin on tuntud kui askorbiinhape. C-vitamiini sisaldus teraviljades on tavaliselt märkamatu või väga madal (Lemmens *et al.*, 2019; Gan *et al.*, 2017).

E-vitamiin (mis koosneb tokoferoolidest ja tokotrienoolidest) on tuntud antioksidant. See eemaldab rakumembraanidest vabad radikaalid ja paikneb peamiselt teravilja embrüos. Tokoferoolid sünteesitakse ja säilitatakse embrüos ning transporditakse seemnete idanemise ajal juurtesse ja idudesse (Lemmens *et al.*, 2019).

Üldiselt on idandamine kasulik meetod vitamiinide sisalduse suurendamiseks söödavates seemnetes. Need vitamiinirikkad idandatud seemned ja idud on suurepärased looduslikud vitamiiniallikad inimeste toidus (Gan *et al.*, 2017). Lintschinger *et al.*, (1997) märkisid, et nisuidude loputamine kuuma veega 70°C juures vähendas C-vitamiini sisaldust 40–60%. Seetõttu tuleb protsessi tingimusi hoolikalt valida, et see vitamiin säiliks, kuna see on üks kuumuse ja valguse suhtes kõige ebastabiilsemaid vitamiine.

γ -aminovõihape. γ -aminovõihape (*Gamma-aminobutyric acid* ehk GABA) on mittevalguline aminohape (aminohapped, mis ei osale valkude biosünteesis ehk ei kuulu valkude hulka), mida leidub laialdaselt nii taimedes kui ka loomades (Gan *et al.*, 2017). γ -aminovõihape toimib kesknärvisüsteemis domineeriva inhibeeriva neurotransmitterina ja on efektiivne ka vererõhu langetamisel (Lemmens *et al.*, 2019). Teraviljades γ -aminovõihappe (GABA) on oluline kasvuregulaator, mille roll on seemnete idanemise reguleerimine. Taimekoed sisaldavad normaalsetes tingimustes väikeses kontsentratsioonis GABA-d, kuid see võib suureneda erinevatel taimeliikidel erinevates stressitingimustes, näiteks madalamal temperatuuril, kuumastressi puhul ning põuastressi korral (Zhou *et al.* 2021; Ramos-Ruiz *et al.*, 2019). Olenemata teravilja liigist suureneb GABA kogus idanemise ajal tänu biokeemiliste protsesside tõttu (Benincasa *et al.*, 2019; Tiansawang *et al.*, 2016). Samuti mõjutavad teravilja GABA sisaldust suuresti nii keskkonnatingimused idanemise ajal (st temperatuur või abiootiline stress) kui ka terade töötlemine enne idanemist (st leotamine) (Benincasa *et al.*, 2019).

Antioksidandid. Üldiselt teravilja idanemine suurendab antioksidantset aktiivsust (Lemmens *et al.*, 2019). Idandatud terade kõrgem antioksidantne aktiivsus on peamiselt tingitud E-vitamiini ja polüfenoolide kogusest (Kim *et al.*, 2013). Viimased on sekundaarsed taimede metaboliidid ning mängivad rolli taimede kaitsmisel keskkonnamõjude eest. Polüfenoolsete ühendite antioksidantne aktiivsus on seotud nende võimega eemaldada vabu radikaale, katkestada radikaalseid ahelreaktsioone ja kelaatida metalle. Peamisteks polüfenoolideks teravilja terades on p-hüdrosübensoe-, feruliin-,

sinapiin-, vanill- ja p-kumaarhape, kaeras ka avenantramiidid. Suurenenud antioksüdantide võime on oluline idandatud terade kaitseks (Lemmens *et al.*, 2019).

Mineraalained. Idandatud terade kasutamise eeliseks on ka antitoinainete nagu fütiinhappe ja trüpsiini inhibiitorite sisalduse vähenemine. Fütiinhape seob mineraale ja valke ning mõjutab seega nende lahustuvust ja biosaadavust. Taimedes aitab fütiinhape säilitada fosforit ja katioone, nagu kaltsium ja magneesium, mida seemikud idanemise ajal vajavad. Idanemisprotsess suurendab terade fütaasi aktiivsust, mille tulemusel väheneb fütiinhappe sisaldus nisu puhul umbes 62% ja kaera puhul 69% pärast 5-päevast idanemist. On leitud, et mõnede mineraalide, nagu raud, tsink, kaltsium ja mangaan, biosaadavus idandatud terades suureneb (Krapf, 2021).

Fütaadid. Fütiinhape on keemiliselt tuntud kui inositolheksakisfosfaat (IP6) ja ka müoinositol (1,2,3,4,5,6-heksakisfosforhape). Fütaadid on fütiinhappe soolad ja fosfaadi peamised vormid teraviljaterades. Fütaatide võime moodustada lahustumatuid komplekse mineraalide, valkude, süsivesikute ja lipiididega vähendab aga nende biosaadavust ning seetõttu peetakse neid toitumisevastaseks faktoriks. Eelkõige mõjutab fütaatide sisaldus ja vormid mineraalide, nagu kaaliumi, raua, tsingi, kaltsiumi, magneesiumi, vase ja mangaani imendumist, kuna fütaatidel on tugev kelaadimisafiinsus katioonidega (Kumar *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2013).

1.3 Terade mikrofloora

Teraviljade mikroobne saastumine toimub saagi kasvu, koristamise ning koristusjärgse kuivatamise ja ladustamise ajal, ning see pärineb mitmest allikast, sealhulgas õhust, tolmust, veest, pinnasest, putukatest, lindude ja näriliste väljaheidetest, samuti saastunud seadmetest ja ebasanitaarsest käitlemisest (Los *et al.*, 2018a). Teravilja saab väga edukalt säilitada kuivana, kuid kui teravilja enne säilitamist korralikult ei kuivatata, muutuvad nad kiiresti riknevaks. Saagikoristuse ajal sisaldavad need tavaliselt kümneid kuni sadu tuhandeid seeni ja tuhandeid kuni miljoneid baktereid grammi kohta. Seente populatsioonid võivad olla vahemikus 10^7 kuni 10^9 CFU/g, samas kui bakterite arv võib varieeruda vahemikus 10^6 kuni 10^8 CFU/g. Algterade mikrofloora koosneb paljudest filamentsetest seentest, bakteritest, pärmseentest, mõnedest hallitustest (lima) ja algloomadest (Bianchini *et al.*, 2014). Teraviljade saastumistase bakteriaalsete patogeenidega on üldiselt väga madal ja kuigi võivad teraviljadel esineda sellised liigid nagu *Salmonella*, *Escherichia coli* ja *Bacillus cereus*, ei ole teraviljaga seotud bakterid üldjuhul patogeensed. Kõige sagedamini kuuluvad nad sugukondadesse *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae* ja *Bacillaceae* (Los *et al.*, 2018a, 2018b; Bianchini *et al.*, 2014).

Viimasel ajal on kogu maailmas levinud huvi värskete idandatud terade söömise vastu, kuna arvatakse, et need on tervisele kasulikud tänu oma kõrgele valgu-, mineraal- ja vitamiinisaldusele. Idandatud terad kasvatatakse algteradest, kus teri inkubeeritakse soojades, niisketes ja toitainerikastes tingimustes, mis on ideaalne keskkond ka mikroobide kasvuks. Bakterite kasvuks on soodsad ka normaalsed idanemistingimused (2–7 päeva idanemist, temperatuur 20–40°C ja optimaalne veeaktiivsus, pH ja toitainete kättesaadavus). Need tasemed võivad idanemise ajal tõusta, jõudes populatsioonideni kuni 10^8 – 10^{11} CFU/g. Need kõrged mikroobide arvud on peamine põhjus, miks idandatud terade säilivad toatemperatuuril vaid lühikest aega (Peles *et al.*, 2012).

Teraviljade mikroflooras võib leida ka mulla tüüpilisi mikroorganisme. Muld sisaldab viit peamist mikroorganismide rühma. Need on bakterid, aktinomütseedid, seened, vetikad ja algloomad (Tabel 2) (Nadu 2018:154).

Tabel 2. Mullas esinevad mikroorganismid (Nadu 2018:154)

Mulla mikroorganismid	Näited
Bakterid	<i>Agrobacterium</i> <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Pseudomonas</i>
Aktinomütseedid	<i>Actinomyces</i> <i>Nocardia</i> <i>Sreptomycetes</i>
Seened	<i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Alternaria</i> <i>Cladosporum</i>
Mulla vetikad	<i>Anabaena</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Nostoc</i>
Algloomad	<i>Calpoda</i> <i>Nematodes</i> <i>Pleurotricha</i> <i>Heteromita</i>
Bacteriofaagid	T4 bakteriofaag

1.3.1 Piimhappebakterid

Piimhappebakterid (Lactic Acid Bacteria ehk LAB) on grampositiivsed, mittesporuleerivad, mittepigmenteerunud ja mitteliikuvad vardad ja kokid, millest enamik on mittehingavad, kuid aerotolerantsed anaeroobid. Neil puuduvad tsütokroomid ja porfüriinid ning seetõttu on nad katalaasi- ja oksüdaasi suhtes negatiivsed. LAB kipub olema toitainete nõudlik, nõudes sageli spetsiifilisi aminohappeid, B-vitamiine ja muid kasvufaktoreid (Liptáková *et al.*, 2017).

Piimhappebakterid on üldlevinud ja heterogeensed liigid, mille ühiseks tunnuseks on piimhappe tootmine suhkru metabolismi tulemusena (Liptáková *et al.*, 2017). Piimhape (LA) on üks anaeroobsel hingamisel tekkivatest saadustest, mis koguneb seemnetesse (Ha ja Xuan 2018). On hästi teada, et LAB suudavad pärssida rikneva mikrofloora ja patogeenide kasvu ja ellujäämist. Booyesen *et al.*, 2002 tuvastasid terades järgmisi liike: *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* ja *Lactococcus*. Algeterades avastati antimikroobseid aineid tootvad LAB liigid, mis kuuluvad *Enterococcus spp* ja *Lactococcus spp*. hulka (Lingani *et al.*, 2009; Booyesen *et al.*, 2002).

LAB liigid, mis on samuti osa terade looduslikust mikrobiotast, võivad terades ja teraviljatoodetes mängida positiivset rolli. Üldiselt tunnistab Euroopa Toiduohutusamet (EFSA) LAB-i toidus kasutamiseks

ohutuks. Toidukultuuridena kasutatakse kõige sagedamini *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* jt. perekondadesse kuuluvaid LAB tüvesid. LAB-i saab kasutada kasuliku ja tõhusa strateegiana patogeenide esinemissageduse ennetamiseks või vähendamiseks, mis parandab toiduohutust ja tarbijate tervist (Oliviera 2014:6).

1.3.2 Hallitus- ja pärmseened

Suuremate invasiivsete põldudel levivate hallitusseente hulka kuuluvad perekonnad *Alternaria*, *Fusarium*, *Drechslera*, *Cladosporium*, *Botrytis* ja *Phoma*, kuid leidub ka paljusid teisi perekondi. *Aspergillus* liike peetakse üldiselt säilitusseenteks, kuid mõned võivad tungida teradesse juba põllul enne saagikoristust. Eriti levinud on aga erinevad *Alternaria* liigid. Neid leidub peaaegu alati nisu- ja odra tuumadel, kus nad põhjustavad plekke (Bianchini *et al.*, 2014; Laca *et al.*, 2006). Kuna põldseened vajavad kõrget niiskusesisaldust, on säilitustingimused nende kasvuks ebasoodsad, kuid mõned seemned, sh *Penicillium* ja *Fusarium* liigid, aga ka mitmesugused pärmiliigid suudavad end enne saagikoristust seemnetes sisse seada ja säilitamise ajal kasvama hakata (Los *et al.*, 2018b). *Alternaria* ja *Fusarium* liigid ning *Aspergillus* ja *Penicillium*, võivad toota teraviljas mükotoksiine. Need sekundaarsed metaboliidid on mürgised ja erineval määral kahjulikud ning kujutavad endast tõsist ohtu nii inimeste kui ka loomade tervisele (Akkermans *et al.*, 2018). Paljude mükotoksiinide hulgas on viis peamist mükotoksiini – aflatoksiinid, ohratoksiinid, fumonisiinid, deoksünivalenool ja zearalenoon (Lee ja Ryu 2017). Lisaks on mükotoksiinid vastupidavad kaasaegsetele toidutöötlemismeetoditele ja võivad saastada valmis ning töödeldud toiduaineid. Mükotoksiine tootvate mikroorganismide esinemise vähendamine põllukultuurides on oluline teema, et tagada toitumise jätkusuutlikkus ja toiteväärtus piirkondades, kus toit sõltub peamiselt teraviljast (Akkermans *et al.*, 2018; Bullerman ja Bianchini, 2009).

Kuna mükotoksiinid on väga stabiilsed ja ei lagune isegi kõrgetel temperatuuridel (küpsetamisel), on nendest lahti saamine väga keeruline ning vajalik on rakendada ennetavaid meetmeid, nagu näiteks mükotoksiine tootvate mikroorganismide (hallituste) vähendamine teradel (Quillien 2002; McKeivith 2004).

1.4 Enamlevinud terade töötlemise meetodid

Traditsioonilised terade riknemise vastu võitlemise meetodid hõlmavad termilise ja keemilise steriliseerimise meetodeid, mille abil vähendatakse mikroorganismide arvu, kuid need meetodid võivad kahjustada teravilja ja teraviljatoodete kvaliteeti ja funktsionaalseid omadusi. Teraviljade saastusest puhastamise alternatiivseteks meetoditeks on UV-kiirguse kasutamine, kiiritamine, kõrgsurvetöötlemine, happetöötlemine, kuumtöötlemine (Bullerman ja Bianchini, 2009).

1.4.1 UV-kiirgus

Ultraviolettkiirgus (UV) on elektromagnetiline kiirgus, mille lainepikkus on lühem kui nähtava valguse ulatus, kuid pikem kui õrn röntgenkiirgus. Toiduainetööstuses kasutatakse laialdaselt UV-kiirgust (vahemikus 200 kuni 280 nm) toiduainete säilivusaja pikendamiseks (Soni *et al.*, 2016). Ultraviolettkiirgus võib positiivselt mõjutada terade idanemist ja idanemise intensiivsust (Kondrateva *et al.*, 2019). Samas on näidatud, et bakterite spoorid on UV-kiirgusele vastupidavamad kui vegetatiivsed rakud. Paljud uuringud on teatanud *Bacillus* spooride resistentsusest UV-kiirguse suhtes ning tõenäoliselt peitud resistentsuse mehhanism spooride kattekihis. Vastupidavus UV-le on aga liigiti erinev, näiteks, *B. cereus* on vastupidavam kui *B. Subtilis*. Meetod, mis on näidanud paljulubavaid tulemusi spooride inaktiveerimisel, on kiiritamine eksimeer-UV-laseriga (248 nm, vootihedus 350 J/m²) (Soni *et al.*, 2016). Lisaks on teada, et UV ja kerge kuumtöötlemine (60°C, 3,58 min) kombinatsioon suurendab mikroorganismide inaktivatsiooni efektiivsust (Kondrateva *et al.*, 2019).

1.4.2 Kiiritus

Kiiritamine on tõhus meetod mikroorganismide inaktiveerimiseks ning see on osutunud edukaks toiduainete ohutuse tagamisel ja säilivusaja pikendamisel. Kuna kiiritamine on füüsikaline protsess, ei ole kiiritamise ajal vaja lisada täiendavaid kemikaale, mis inaktiveerimisprotsessi katalüseeriks. Seega on kiiritusprotsess kasulik ja soovitatav alternatiivina mitmesuguste värskete, kiiresti riknevate ja kõrge valgusisaldusega toiduainete säilitamisel ja töötlemisel (Sujatha *et al.*, 2017). FDA (Food and Drug Administration) poolt heaks kiidetud maksimaalne doos seemnete töötlemiseks on 8 kGy. Samas näitab enamus uurimusi, et piisab juba väiksemate dooside, näiteks 2 kGy või alla selle kasutamisest a seemnete töötlemiseks. 1,5 kGy doosiga järjepidevalt kiiritamine võib mikroobset saastet vähendada keskmiselt 3,18 log CFU/g võrra, kuid selle mõju terade idanemisele, saagikusele ja välimusele ning võimalikule toitainete kaole on murettekitav (Ding *et al.* 2013). Kiiritustehnoloogia on olnud väga tõhus *Aspergillus*, *Penicilliumi*, *Rhizopus* ja *Fusarium'i* seeninfektsioonide tõrjumisel paljudel teradel ning pikendab säilivusaega üle 6 kuu (Ikegwu *et al.*, 2021).

1.4.3 Kõrgsurve

HPP-d (high pressure processing) kasutatakse praegu patogeensete või riknemist põhjustavate vegetatiivsete rakkude arvu vähendamiseks. Kompressioonist ja kokku tõmbumisest tingitud raku mahu vähenemine põhjustab vegetatiivsetes rakkudes morfoloogilisi muutusi, mis viib nende inaktiveerumiseni. Rakkude hukkumine on tingitud membraani kahjustustest, valkude denaturatsioonist ja membraaniga seotud ensüümide aktiivsusest (Soni *et al.*, 2016).

Inaktiveeriv mõju sõltub rohkem rõhu avaldamise kestusest ja vähem selle intensiivsusest. Toidutootjad võivad bakterite spooride inaktiveerimiseks kasutada rõhku vahemikus 550 kuni 600 MPa ja temperatuuri 70°C kuni 80°C. Uuringute põhjal tehti järeldus, et parim kombinatsioon *Bacillus* spooride inaktiveerimiseks toidus on temperatuur üle 80°C koos rõhuga üle 550 MPa ning kauem kui 12 minutit (Soni *et al.*, 2016).

HPP kasutamine seemnete desinfitseerimiseks näib samuti olevat väga paljutõotav. Seemnete töötlemine 500–600 MPa ja 2 minutit toatemperatuuril võib kaasa tuua bakterite arvukuse vähenemise 3,50 log CFU/g või rohkem (Neetoo *et al.*, 2008). Kombineerides HPP eelleotamise või kõrgemate temperatuuridega, võib kõrgsurvega seemnete desinfitseerimine olla veelgi tõhusam. Töötlemine keskmise rõhuga (300 MPa) pikema aja jooksul (15 minutit) annab sarnaseid desinfitseerimistulemusi, kuid kahjuks täheldati ka terade idanemise peetust (Wuytack *et al.*, 2003). Keskmiselt võib kõrgsurvetöötlemisega saavutada mikroobide vähenemist 5,09 log CFU/g, mis on seega üks tõhusamaid bakteri arvukuse vähendamise meetodeid (Ding *et al.*, 2013).

1.4.4 Mikrolained

Mikrolained (microwaves ehk MW) on elektromagnetlained (sagedusega 300 MHz kuni 300 GHz), millel on võrreldes tavapäraste keemiliste meetoditega parem mikroobe hävitav võime. Mikrolainetehnoloogiat kasutatakse laialdaselt enamikus teraviljatööstuses terade desinfitseerimiseks. Antud tehnoloogia kaitseb terasid putukate ja seente eest. Mikrolainetega töötlemine võib aga põhjustada mitmeid kahjulikke mõjusid seemnete idanemisele ja mõjutada teravilja kvaliteeti (Ikegwu *et al.*, 2021; Los *et al.*, 2018b; Chandrasekaran *et al.*, 2013).

Mikroorganismide inaktiveerimine mikrolainetega saavutatakse temperatuuridel, mis on madalamad, kui tavapärase pastöriseerimise temperatuur. Mikrolained inaktiveerivad mikroobe peamiselt termilise efektiga, denatureerides sealhulgas ensüüme, valke, nukleiinhappeid või muid rakulisi koostisosasid, mis omakorda viib raku surmani. Teine võimalik toimeviis on mittetermiline mõju, mis on põhjustatud mikrolainete olemusest ja mis ei ole seotud temperatuuri tõusuga MW töötlemise ajal. Leiti, et mikrolaineahjuga töötlemisel saavutatakse kõrgem mikroobide vähenemise tase muude stressitegurite abil, näiteks happelise pH või kõrge temperatuuri juuresolekul (Vadivambal *et al.*, 2007; Los *et al.*, 2018b).

1.4.5 Kuum aur

Töötlemine kuuma auruga on tõhusaim viis nii aja kui ka energia osas terade mikroobidest puhastamiseks ja seega ka mükotoksiinide tekke ennetamiseks. Lisaks leiti, et toidu riknemist põhjustavad bakterid ja seened on vähem kuumakindlad kõrge vee kättesaadavusega tingimustes. Lisaks klassikalisele küllastunud veeaurule (kuni 100°C) pakub ülekuumendatud aur (SS - *superheated steam*, kuni 250°C) tõhusamat mikroorganismide hävitamise efekti (Schmidt *et al.*, 2018). Võrreldes küllastunud auruga on sellel kiirem kuumutuskiirus, väiksem auru kadu, suurem tõhusus ja ohutus ilma saasteta. Seega suudab SS ebastabiilseid toitaineid kuumutamisprotsessis paremini säilitada. Mõned uuringud näitavad, et SS-i saab kasutada kuivatamiseks, patogeenide ja ensüümi inaktiveerimiseks ning toitude steriliseerimiseks toiduainetööstuses (Jin *et al.*, 2021). SS-i kasutamise peamised eelised toiduainete töötlemisel on et see tagab toote kõrgema kvaliteedi (värv, kokkutõmbumine ja rehüdratsiooni omadused), väiksemat oksüdatsioonikadu ja suuremat energiatõhusust (Alfy *et al.*, 2016). On teada, et alla 60-sekundilised töötlemisajad 170–200°C veeauru juures on piisavad mikroobide arvukuse vähendamiseks. Kuid ükski nendest meetoditest ei põhjustanud sensoorse või toiteväärtuse olulist langust (Jin *et al.*, 2021).

1.4.6 Orgaanilised happed

Toidu säilimisel võib mikroorganismide arvukus suurenda ning selle tõttu on toidu mikroobid otsene oht inimese tervisele. Mikroobide perekonnad nagu *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Listeria*, *Staphylococcus*, on tuntud kui toidu kaudu levivate haiguste põhjustajad (Coban 2020). Üheks võimaluseks vähendada mikroorganismide arvukust toorainetes (sh. terades) on orgaaniliste hapete kasutamine. Orgaanilisi happeid kasutatakse toidu lisa- ja säilitusainetena tänu keskkonna pH alandamisele, mis takistab toidu riknemist. Orgaanilisi happeid saab kasutada ka teravilja säilitamiseks. Uuringud näitasid, et mikroorganismide efektiivne vähenemine toimub orgaaniliste hapete, või hapete ja teatud soolade kombinatsiooni lisamisega (Los *et al.*, 2018 b). Iirimaa teadlased (Los *et al.*, 2018 b) leidsid et piimhappe (5,0%) ja NaCl (52%) kombinatsioon oli mikroorganismide vastu kõige tõhusam, saavutades keskmise vähenemise vastavalt 4,3 ja 4,7 log CFU/g.

Kui terade niiskussisaldus on üle 14% võivad terad ladustamise ajal kiiresti rikneda. Sel põhjusel kasutatakse kõrge niiskusega terade säilitamiseks orgaanilisi happeid nagu propioon-, sorbiin- ja äädikhape, ning hapete kombinatsioone sooladega. Orgaanilised happed võivad suurendada niiskusesisaldust ja tungida läbi endospermi. Orgaaniliste hapete ning soolade kombinatsioonil on hallitusevastane toime, mis pikendab valmistoote säilivusaega (Nsengumuremyi *et al.*, 2019). Nsengumuremyi *et al.*, 2019 näitas, et kaltsiumpropionaat (0,003%), kaaliumsorbaat (0,03%) ja naatriumbensoaat (0,3%) pärsivad *Eurotiumi*, *Aspergilluse* ja *Penicillium* kasvu ja mükotoksiinide tootmist nisu terades.

Orgaaniliste hapete ja soolalahuste kasutamist nisu mikroobse arvukuse vähendamiseks uuris Sabillón *et al.*, (2016). Selle uuringu jaoks kasutasid teadlased äädikhapet, piimhapet, sidrunhapet ja

propioonhapet, kolme erineva kontsentratsiooniga 1,0, 2,5 ja 5,0%. Uuring näitas, et iga happelahus vähendas esialgset mikroobi arvukust. Äädik-, piim- ja propioonhappe kontsentratsiooni tõstmine 5,0%-ni tõi kaasa *Enterobacteriaceae* ja hallitus ning pärmseente arvu vähenemist (vastavalt kuni 1,7, 2,3 ja 3,8 log CFU/g). Pärast antimikroobse aktiivsuse hindamist kontsentratsioonidel 1,0, 2,5 ja 5,0%, jõudsid teadlased järeldusele, et hallituse ja pärmseente vähendamiseks oli sidrunhappe lahus sõltumata selle kontsentratsioonist kõige vähem efektiivne. Samuti näitasid uuringud, et kõige tõhusamalt vähendasid nisutera mikroobi arvukust 5,0% piimhapest ja NaCl-st valmistatud lahused (Sabillón *et al.*, 2016; Magallanes López ja Simsek 2021). Siiski, võib orgaaniliste hapete kasutamine muuta ladustatava teravilja toiteväärtust, vähendades seega toitainete kogust ja kvaliteeti (Sabillón *et al.*, 2016).

2. TÖÖ EESMÄRGID

Magistritöö eesmärk oli uurida töötlemise mõju terade idanevusele ja mikrobioloogilistele parameetritele sõltuvalt töötlemise meetoditest. Põhitähelepanu oli pööratud mikroorganismide arvukuse vähendamisele, kuna idandatud terad on soodne keskkond mikroorganismide kasvule, mis omakorda mõjub terade säilimisele.

Selleks teostatakse rukki, nisu ja kaeraterade termiline töötlemine ja töötlemine happelises keskkonnas. Enne ja pärast töötlemist analüüsitakse teradel järgmised parameetrid:

- bakterite ja hallitus/pärmseente arvukus enne ja pärast töötlemist
- idanevuse aste
- Bakterite ja seente liikide detekteerimine eraldatud DNA-st
- Ensümaatiline aktiivsus
- Suhkrute sisalduse määramine

Saadud tulemuste põhjal selgub, milline töötlemisviis ja parameetrid sobivad paremini nii mikroorganismide vähendamiseks kui ka terade idanevuse säilimiseks.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

Ekspimentaalses osas kirjeldatud kuumtöötlemine, happelise keskkonna mõju terade kvaliteedile, ensümaatilise aktiivsuse määramine, suhkrute sisalduse määramine, terade idanevuse määramine, bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvu määramine ja metagenoomika olid teostatud Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskuses. Hallitus/pärmseente inkubatsioon toimus Tallinna Tehnikaülikooli Keemia ja biotehnoloogia instituudi laboris.

Kõik analüüsid viidi läbi kolmes paralleelis.

3.1 Uuritav materjal

Magistritöö uuritavaks materjaliks oli nisu, rukki ja kaera algterad, mida saadi ajaperioodil oktoober 2020 kuni november 2021 Puratos Malt OÜ tehasest.

Happelise keskkonna mõju uurimiseks kasutati 80% piimhapet (Sigma-Aldrich, Lactic acid, 80%), millest valmistati erineva pH-ga (2,5; 3,5) lahused. Terade leotamiseks ja loputamiseks kasutati kraanivett.

Bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvukuse uurimisel kasutati 96% etanooli ja füsioloogilist lahust (0,85% NaCl). PCA (*Plate Count Agar*) söötmete valmistamiseks kasutati PCA pulbrit (Neogen) ja destilleeritud vett; SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) söötmete valmistamiseks kasutati peptooni (Neogen), D-glükoosi, agarit (Neogen), destilleeritud vett, kontsentreeritud väävelhapet (H_2SO_4 , Sigma).

Ensümaatilise aktiivsuse määramiseks kasutati K-Malta kitis (Megazyme) olevaid reagente (puhvrid, ensüümid, substraadid, kontrolljahud teatud ensümaatilise aktiivsusega): Ceralpha substrate, Ceralpha substrate, Ceralpha Buffer A, Betamyl-3 Buffer A, Betamyl-3 Buffer B, Standardiseeritud α -amülaasi ja β -amülaasi aktiivsusega linnasejahu, Stopping reagent ([1% (w/v) Tris buffer solution (pH 8.5)]), Betamyl-3 substraadi lahus, Ceralpha substraadi lahus.

Detailne kirjeldus on toodud p. 3.2.3

3.2 Meetodid

3.2.1 Algterade eeltöötlemine kõrgete temperatuuridega

Alustuseks uuriti võimalust vähendada algterade mikroorganismide arvukust töödeldes terasid erinevatel temperatuuridel.

Kuumtöötlemise läbiviimiseks kaaluti 100 g uuritavaid teri (rukis, nisu, kaer) sõelale (sõelaava suurus 1 mm), terade kiht oli umbes 0,5 cm. Sõela peale asetatud terad viidi vastava režiimiga ($t^{\circ}= 120^{\circ}\text{C}$ või 150°C) eelnevalt soojendatud ahju (Metos SCC) ning hoiti 1 min, mõõtes sisetemperatuuri termoanduriga (Finest).

Termiliselt töödeldud teradel määrati: bakterite ja hallitus/pärmseente üldarv, terade idanevus. Terade idanevuse määramismeetod on välja toodud punktis 3.2.5 „Terade idanevuse määramine“ ja mikrobioloogiline meetod on välja toodud punktis 3.2.6 „Bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvu määramine“.

3.2.2 Happelise keskkonna mõju terade kvaliteedile

Mikroorganismide arvu vähendamiseks ja terade idanemisvõime säilitamiseks valiti meetod - leotamine happelises keskkonnas.

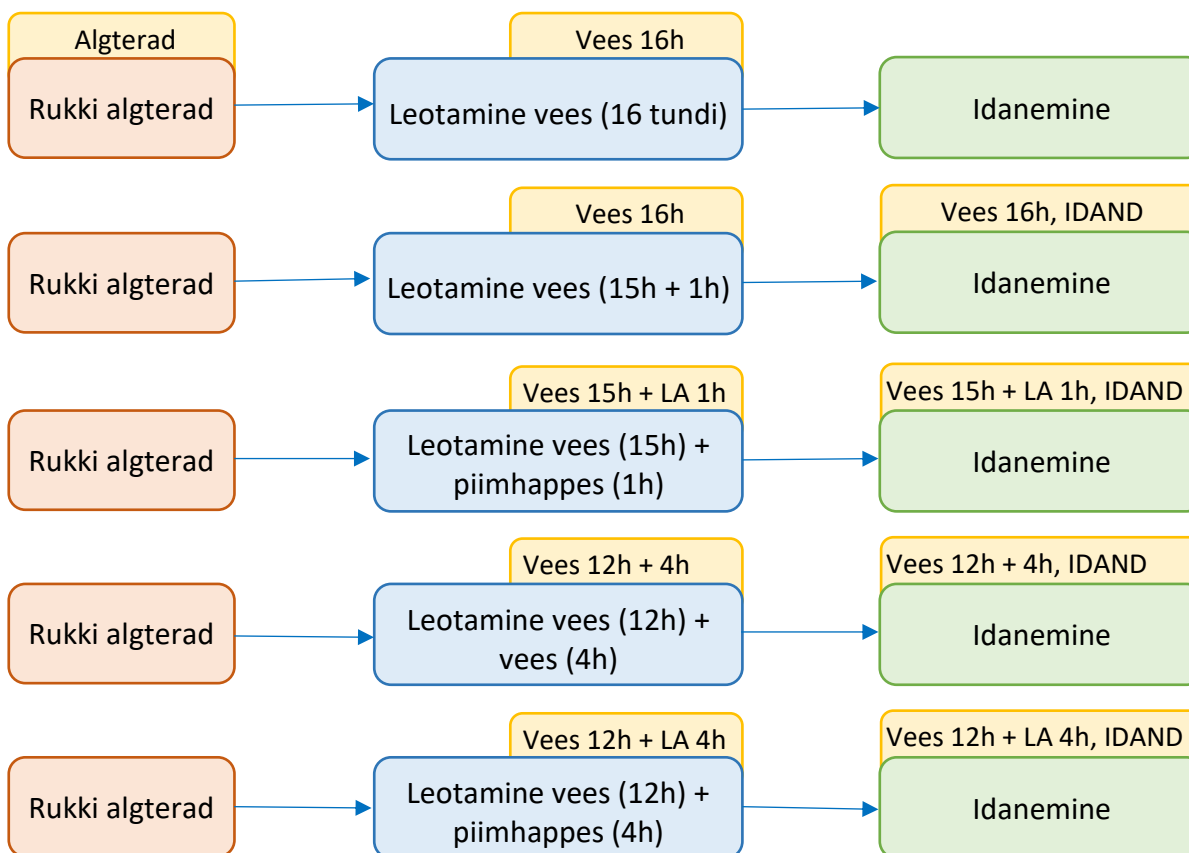
Happelise keskkonna mõju uurimiseks katsetati erineva pH-ga piimhappe lahuseid (pH 2,5; 2,7; 3,0 ja 3,5) ning leiti, et leotamine piimhappe lahuses pH väärtusega 2,5 näitas mikroorganismide arvukuse vähenemist aga leotamine piimhappe lahuses pH väärtusega 3,5 säilitas terade idanevust. Seega uuriti edaspidi ainult pH 2,5 ja 3,5 mõju rukki-, nisu- ja kaeraterade idanevusele ja mikrobioloogiliste parameetritele. Rukki, nisu ja kaera algterade töötlemiseks valmistati piimhappe lahused pH väärtustega pH 2,5 ja 3,5. Keeduklaasi kaaluti 100 g uuritavat algtera (rukis, nisu, kaer) ja leotati 280 ml vees või piimhappe lahuses 16 tunni jooksul. Leotatud teradel analüüsiti terade idanevust ja mikrobioloogilisi parameetreid ehk bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvukust. Terade idanevuse määramismeetod on välja toodud punktis 3.2.5 „Terade idanevuse määramine“ ja mikrobioloogiline meetod on välja toodud punktis 3.2.6 „Bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvu määramine“.

Töötlemist piimhappega teostati lisaks rukki algteradele ka idandatud rukkiteradele, et näha, kas idanemise käigus tekkinud mikrofloora arvukust saab hoopis protessi lõpus vähendada. Kõik kontrollproovid töödeldi kraanivees.

Selleks, et uurida happega töötlemise aja mõju terade kvaliteedile, töödeldi teri piimhappelahusega (pH 2,5) erinevalt 1 h või 4 h jooksul. Summaarne leotamisaeg enne idandamist oli 16 tundi ning algterade ja vedeliku suhe oli 1:2,8. Rukki algterasid leotati kolmel viisil (Joonis 2): i) 16 h vees; ii) 12 h

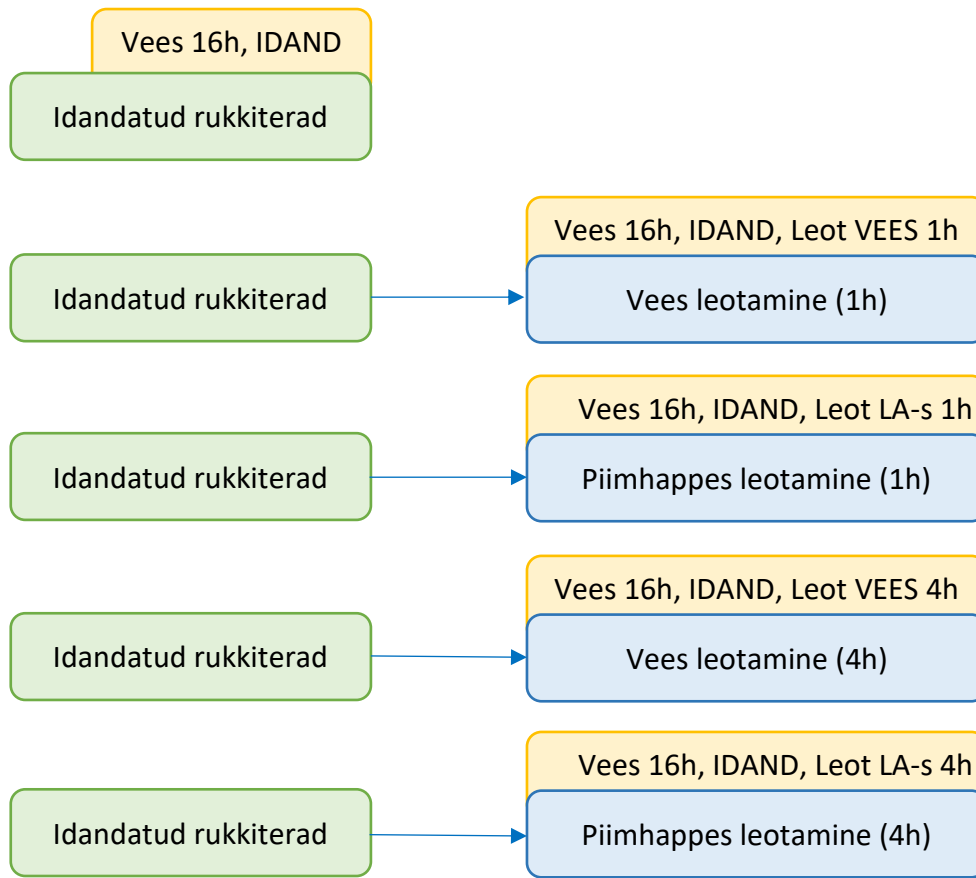
vees ja seejärel 4 h piimhappe lahuses (pH 2,5); iii) 15 h vees ja seejärel 4 h piimhappe lahuses (pH 2,5). Kõik kontrollproovid töödeldi kraanivees.

Algteradel, vees ja piimhappelahuses leotatud teradel määrati bakterite ja hallitus/pärmseente üldarv. Leotatud teradel määrati terade idanevus ja α - ja β - amülaaside aktiivsus. Terade idanevuse määramismeetod on välja toodud punktis 3.2.5 „Terade idanevuse määramine“ ja mikrobioloogiline meetod on välja toodud punktis 3.2.6 „Bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvu määramine“. Terades määrati ka suhkrusisaldust.



Joonis 2. Algterade eeltöötlemise skeem. Kollastes raamides on toodud proovide nimetused, mida kasutatakse edaspidi graafikutel: Vees 16h – Rukkiterad leotatud vees 16 h; Vees 16h, IDAND - Rukkiterad leotatud vees 15 + 1 h (et imiteerida happetöötamise tingimusi) ja idandatud; Vees 15h + LA 1h - Rukkiterad leotatud vees 15h + 1h pH 2,5 happes; Vees 15h + LA 1h, IDAND - Rukkiterad leotatud vees 15h + 1h pH 2,5 happes ja idandatud; Vees 12h + 4h - Rukkiterad leotatud vees 12h + 4h; Vees 12h + 4h, IDAND - Rukkiterad leotatud vees 12h + 4h ja idandatud; Vees 12 + LA 4h - Rukkiterad leotatud vees 12h + 4h pH 2,5 happes; Vees 12 + LA 4h, IDAND - Rukkiterad leotatud vees 12h + 4h pH 2,5 happes ja idandatud. LA – Lactic Acid – piimhape, IDAND – idandatud.

Selleks et uurida piimhappelahuse (pH 2,5) mõju mikroorganismide vähendamiseks juba idandatud teradel, leotati rukki algterad 16 tundi vees, lasti idanema ja alles idandatud terad leotati piimhappelahuses (pH 2,5) 1 ja 4 tundi (Joonis 3). Kontrollproovid (idandatud rukkiterad) leotati kraaniveega sama meetodi järgi (1 ja 4 tundi).



Joonis 3. Idandatud terade töötlemise skeem. Kollastes raamides on toodud proovide nimetused, mida kasutatakse edaspidi graafikutel: Vees 16h, IDAND - Rukkiterad leotatud vees 16 h ja idandatud; Vees 16h, IDAND, Leot Vees 1h - Rukkiterad leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud vees 1h; Vees 16h, IDAND, Leot LA-s 1h – Rukkiterad, leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud pH 2,5 happes 1h; Vees 16h, IDAND, Leot Vees 4h - Rukkiterad leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud vees 4h; Vees 16h, IDAND, Leot LA-s 4h – Rukkiterad, leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud pH 2,5 happes 4h. LA – Lactic Acid – piimhape, IDAND – idandatud.

Idandatud teradel, mis leotati vees või piimhappelahuses, samamoodi määrati bakterite ja hallitus/pärmseente üldarv vastavalt punktis 3.2.6 kirjeldatud meetodiga.

3.2.3 Ensümaatilise aktiivsuse määrimine

Ensümaatilise aktiivsuse määramiseks terades kasutati kommertsiaalset spektrofotomeetrilist meetodite komplekti (K-Malta, Megazyme, Iirimaa), kus α -amülaasi määramiseks on Ceralpha[®] meetod ning β -amülaasi aktiivsuse määramiseks on Betamyl-3[®] meetod. Ensümaatilise aktiivsuse määramine viidi läbi vastavalt tootja poolt toodud juhendile 96 süvendiga katseplaatidel.

Selleks kaaluti lüofiliseeritud ja jahvatatud teradest $0,5 \pm 0,01$ g proovi, millele lisati 5 ml puhverlahust [50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,02% NaN₃, pH 8,0]. Ekstraktsioon toimus karusell-segajal (Rotator SB3; Stuart, Inglismaa) 1 tunni jooksul toatemperatuuril, millele järgnes tsentrifuugimine $2000 \times G$ juures

10 min. Seejärel viidi ekstraktidega läbi ensümaatiline reaktsioon α - ja β -amülaaside aktiivsuse määramiseks, kus on kasutusel *p*-nitrofenüüluga märgistatud Ceralpha[®] ja Betamyl-3[®] substraadid. Eelnevalt 40°C-ni soojendatud sobiva lahjendusega ekstraktile (20 μ l) lisati samal temperatuuril Ceralpha[®] või Betamyl-3[®] substraati (20 μ l) ning segu inkubeeriti täpselt 10 min 40°C juures. Reaktsiooni peatamiseks lisati segule 300 μ l 1%-list Tris puhverlahust (pH 8,5). Seejärel mõõdeti lahuste neelduvused ($\lambda = 400$ nm) Synergy H1 plaadilugejaga (BioTek, USA) ning arvutati ensüümide aktiivsused (Valem 1), mis on esitatud Ceralpha[®] U või Betamyl-3[®] U ühikutes 1 g kasutatud jahu kohta.

Ensüümide aktiivsused arvutati vastavalt valemile:

$$U_{\alpha\text{- või } \beta\text{-Amylase}} = \Delta E_{400} \times F \quad (1)$$

kus:

ΔE_{400} on proovi neelduvus 400 nm juures, millelt on taustaneelduvus (*blank*) maha arvestatud. Faktorid (F) 315,6 (Ceralpha[®]) ja 19,7 (Betamyl-3[®]) võtavad arvutustes arvesse proovidega tehtud lahjendusi, kasutatud jahu kogust, ensümaatilise reaktsiooni ruumalasid, reaktsiooni aega ning *p*-nitrofenooli molaarset neeldumistegurit (ϵ mM).

3.2.4 Suhkrute sisalduse määramine

Ensümaatilise aktiivsuse muutumisega kaasneb ka suhkru sisalduse muutused. Kuna suhkru on ka mikroorganismide jaoks peamine toitaineline, siis kõrge suhkru sisaldus soodustab mikroorganismide kasvu. Seega, et uurida oligo-, di- ja monosahhariidide alg-, leotatud ja idandatud terades, viidi läbi suhkru analüüs HPLC meetodiga.

Suhkrute kontsentratsiooni määramiseks kaaluti jahvatatud algterad, leotatud ja lüofiliseeritud rukkiterad ning lüofiliseeritud ja seejärel jahvatatud idandatud terad 0,5 g +/- 0.01 gramm täpsusega kaaludel kolmes paralleelis ja homogeniseeriti 10 ml deioniseeritud veega (MilliQ). Saadud suspensiooni inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit karusell-segajal. Seejärel suspensioonid tsentrifugeeriti 21000 x G, 5 minutit. Saadud supernatant filtreeriti 3x MilliQ-ga pestud cutoff (cut-off 3 kDa) filtritega ja tsentrifugeeriti (14000 x G, 30 min). Lahjendatud ekstrakt süstiti Waters 2695 HPLC süsteemi (Waters Corporation, Milford, MA, USA) koos automaatse proovivõtjaga. Monosahhariidide määramiseks kasutati HPX-87P kolonni (BioRad Hercules, CA) temperatuuril +75°C ja süsteemi elueeriti MilliQ-ga voolukiirusel 0,6 ml/min ja standardainena kasutati glükoosi ja fruktoosi. Disahhariidide määramiseks kasutati sama süsteemi Zorbax kolonniga (Zorbax Carbohydrate Analysis column 4.6x250mm, Agilent); eluent 75/25 acetonitrile/MilliQ v/v; voolukiirus – 1,2 mL/min ja standardainena kasutati sahharoosi ja maltoosi. Oligosahhariidide määramiseks kasutati HPX-87H kolonni (BioRad Hercules, CA) (eluent – 5 mM H₂SO₄; voolukiirus – 0,6 mL/min) ja standardainena kasutati raffinoosi ja stahhüoos hüdraati. Ainete tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks kasutati Waters 2414 murdumisnäitaja detektorit (RI) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Andmete analüüs viidi läbi Empoweri

tarkvaraga (Waters Corporation, Milford, MA, USA) ja Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3.2.5 Terade idanevuse määramine

Terad (100 g) leotati vees/piihappelahuses (vastavalt jooniste 2 ja 3 skeemidele) ja asetati külma (+4°C) ruumi (kokku 16 tunniks). Leotatu terad asetati Petri tassidele eelnevalt veesleotatud neljast kihist filtripaberile (Deltalab, 73 g/cm², pooride diameeter 30-40 µm). Idanemine toimus toatemperatuuril, 72 tundi. Terade idanevust hinnati vastavalt joonisel 4 esitatud skaalale.

Idanevust hinnati vastavalt joonisel toodud skaalale ning kogu idanevuse % arvutati vastavalt valemile (2):

Idanevus, % = (Idandatud terade arv/ kogu terade arv) * 100 (2)



Joonis 4. Idandatud rukkiterade klassifikatsioon. 0 – ei idanenud, 1-5 idanenud sõltuvalt juurte ja lehtede pikkusest (Krapf *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2019)

3.2.6 Bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvu määramine

Bakterite ja hallitus/pärmseente üldarvu määramiseks oli vaja valmistada vastavalt PCA (*Plate Count Agar*) ja SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) söötmed. Üldarvukuse määramiseks kaaluti 5 g proovimaterjali (rukis, nisu, kaer, leotatud terad, idandatud terad) 50 ml-sse steriilsesse tuubi ja lisati 0,85% NaCl lahus kuni 50 ml-ni. Saadud proove loksutati toatemperatuuril 30 min kasutades Labnet Revolvrit.

Loksutamise eralduvad teradel olevad bakterirakud paremini lahusesse. Pärast loksutamist valmistati mikroorganisme sisaldava supernatandiga lahjenduste rida 0,85% NaCl lahusesse (10^{-2} kuni 10^{-7}).

Igast proovist tehti kolm paralleeli. Petri tassid pöörati ümber ja asetati inkubeerima inkubaatorisse (Bakterid: + 30°C, 48 tundi; Hallitus/pärm: + 24°C, 5 ööpäeva).

Pärast inkubatsiooniaja lõppu loendati kolooniad Petri tassidelt ja tulemused arvutati järgmise valemiga (3):

$$N = \sum C(n_1 + 0,1 * n_2) * d \quad N = \sum C(n_1 + 0,1 * n_2) * d \quad (3) \quad (\text{Randla 2015}),$$

kus:

N – mikroorganismide arv ühes grammis uuritavas proovis

ΣC – tassidel loendatud kolooniate summa

$(n_1 + 0,1n_2) * d$ – Petri tassile külvatud proovi maht, millest

n_1 – esimese lahjenduse tasside arv,

n_2 – teise lahjenduse tasside arv,

d – esimese lahjenduse lahjendustegur

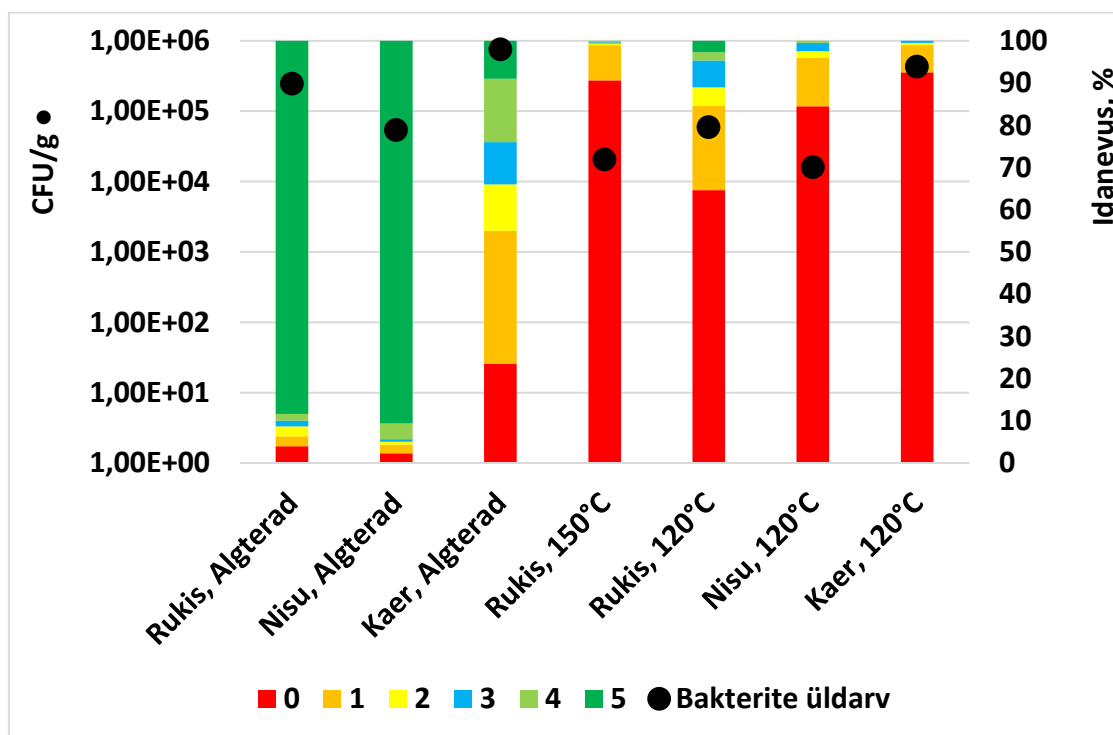
3.2.7 Bakterite ja hallitus/pärmseente identifitseerimine amplikon järgmise põlvkonna sekveneerimise meetodil

PCA ja SDA tassidel kasvanud kolooniate identifitseerimiseks kasutati DNA-põhist meetodit, täpsemalt 16S rRNA geeni järjestuse määramist järgmise põlvkonna sekveneerimise (Next Generation Sequencing – NGS) abil. Selleks koguti Petri tassil kasvanud rakuline materjal kokku: tassile pipeteeriti 1-2 ml steriilset 0,85 % NaCl lahust. Spaatli abil kraabiti materjal agarpinnalt lahti, rakususpensioon koguti steriilsesse 2 ml-sse tuubi, rakud fuugiti põhja (5000 x G, 10 min, +6°C), supernatant visati ära ning saadud rakusadet säilitati DNA eraldamiseni -20°C juures. DNA eraldamiseks kasutati kommertsiaalset DNA ekstraheerimise komplekti (Zymo Research Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep kit). Sekveneeriti 16S rRNA geeni kindlat lõiku (V4 regioon), kasutades NGS meetodikat iSeq 100 platvormil (Illumina, San Diego, CA, USA) nagu kirjeldatud artiklis Kazantseva *et al.*, 2021.

4. TULEMUSED JA ARUTELU

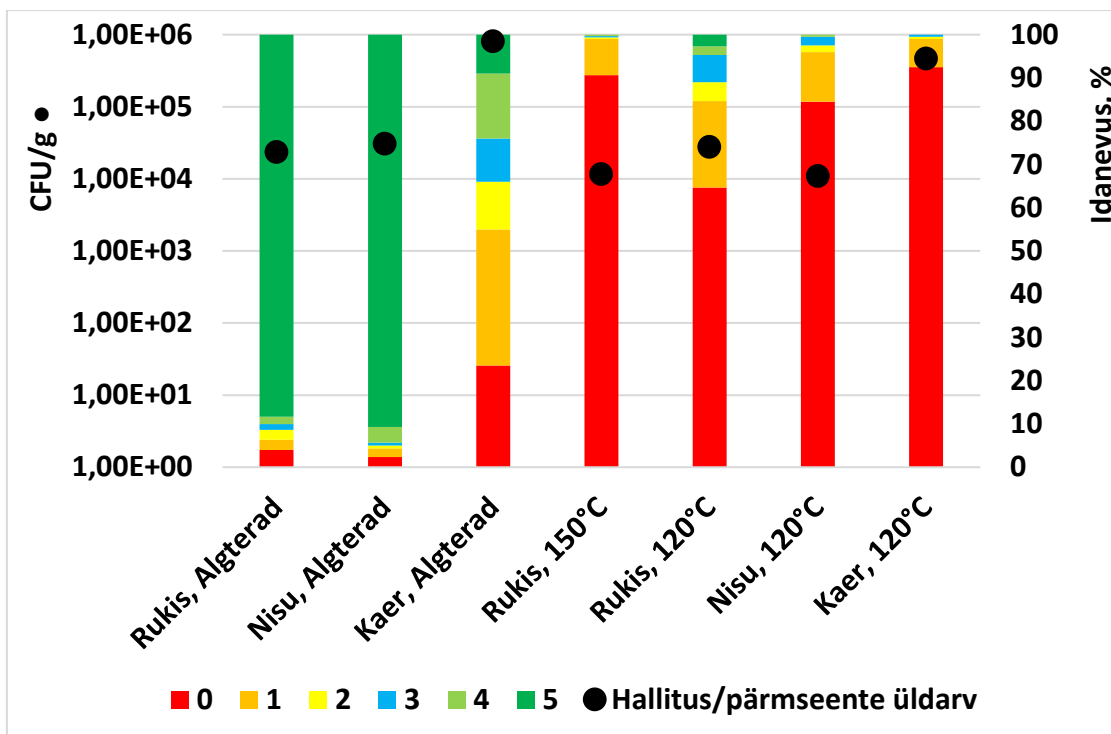
4.1 Algterade eeltöötlemine kõrgete temperatuuridega

Algterade eeltöötlemise esimene katse viidi läbi rukkiteradega. Ahju temperatuuril 120°C ühe minuti jooksul tõusis rukkiterade temperatuur 109°C-ni ja ahju temperatuuril 150°C tõusis rukkiterade temperatuur 137,8°C-ni. Peale kuumutamist viidi läbi mikrobioloogiline analüüs ja terade idanevuse hindamine (Joonis 5 ja 6). Tulemustest on võimalik välja lugeda, et rukkiterade töötlemine temperatuuril 150°C pärssib terade idanevust. Mikrobioloogilise analüüsi ja idanevuse hindamisel järeldati, et töötlemine temperatuuril 150°C ühe minuti jooksul ei sobi terade eeltötluseks, kuna 150°C küll vähendas bakterite üldarvu, aga mõjus letaalselt terade idanevusele. Kuna eesmärk oli mikroorganismide vähendamine ja idanevuse säilitamine, siis koos rukkiga viidi kaera ja nisu puhul kuumtöötlemine läbi samal meetodil ainult 120°C juures.



Joonis 5. Termiliselt töödeldud rukki-, nisu- ja kaeratera idanevus (%) ja bakterite arvukused CFU 1 g terade kohta.

Joonistel 5 ja 6 on näha, et termilise eeltöötlemise mõju 120°C juures oli mikroorganismide arvukusele minimaalne. Joonisel 5 on näha, et bakterite arv muutus ainult termiliselt töödeldud (150°C) rukkiteradel. Bakterite üldarv vähenes selle töötlusega 10 korda, kuid üle 90% rukkiteradest ei idanenud. Teistel režiimidel (120°C) ja terade liikidel jäi bakterite arvukus umbes sarnaseks.



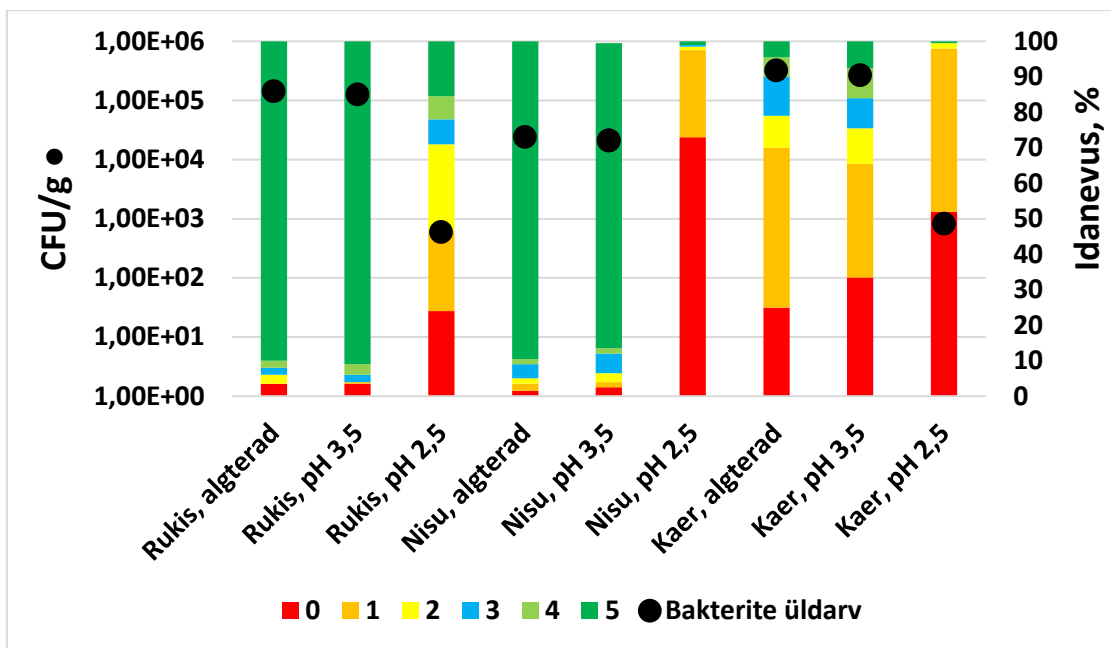
Joonis 6. Termiliselt töödeldud rukki-, nisu- ja kaeratera idanevus (%) ja hallitus/pärmseente arvukused CFU 1 g terade kohta.

Hallitus ja pärmseente arvukust illustreerib joonis 6. Joonisel on näha, et temperatuuri tõstmise ei mõjutanud oluliselt hallitus ja pärmseente arvukuse vähenemist. Samuti on jooniselt näha, et termiline eeltöötlemine mõjutab negatiivselt terade idanevust. Rukkiterade idanevus oli kõrgem kui nisu- ja kaerateradel. Sõltuvalt terade liigist 64% kuni 90% teradest ei idanenud peale termilist töötlemist.

4.2 Happelise keskkonna mõju terade kvaliteedile

Termiline eeltöötlemine näitas negatiivset mõju terade idanevusele ning minimaalset mõju mikroorganismide arvukusele. Seega kirjanduse alusel valiti alternatiivne meetod ehk töötlemine piimhapelahusega, et säilitada algterade maksimaalset idanevust ja hävitada mikroorganisme.

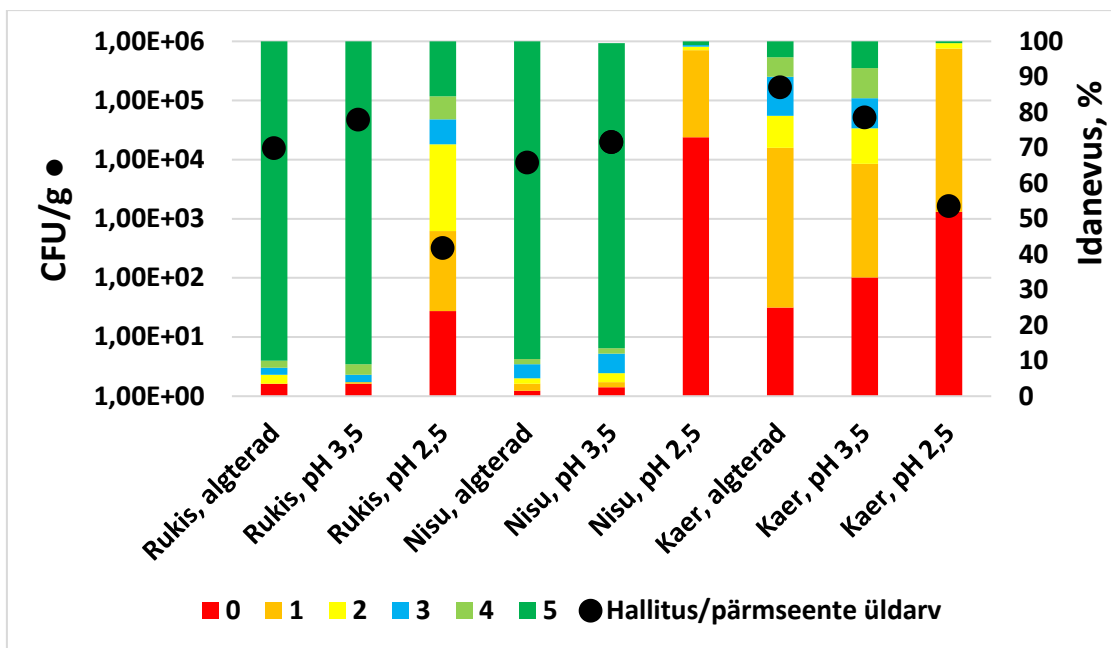
Happelise keskkonna mõju uurimiseks rukki-, nisu- ja kaerateradega teostati katsed erinevate pH väärtustega piimhapelahustega (pH 2,5 ja 3,5) 16 tunni jooksul. Joonised 7 ja 8 näitavad, et töötlemisel piimhappega on parem mõju idanevusele kui termilisel töötlemisel.



Joonis 7. Happelises keskkonnas leotatud terade idanevus (%) ja bakterite üldarvukus CFU 1 g terade kohta.

Joonistel 7 ja 8 on näha, et rukki- ja nisuterad idanevad paremini, kui kaeraterad. Siiski, kui leotada teri 16 happelises keskkonnas (pH 2,5) vähenes nisu- ja kaeraterade idanevus drastiliselt. Peale leotamist piimhappelahuses (pH 2,5), oli nisu idanemisaste ainult 27% ja kaera idanemisaste 48%, samas rukki puhul oli see 76%. Rukis näitas paremat idanemist kõigil pH tasemetel. Seega võib järeldada, et nisu- ja kaerateradele ei sobi pikk leotamine happelises keskkonnas (pH 2,5).

Lisaks leotati terasid piimhappe lahusega pH 3,5 juures. Antud pH juures leotatud terad idanesid paremini ja kiiremini kui piimhappelahuses pH väärtusega 2,5. Joonistel 7 ja 8 on näha, et nr. 5 (pikemate juurte ja lehtedega terad) idandatud terade osa domineerib algterades ja terades leotatud pH 3,5 lahuses. Suurem oli nr. 1-2 (halbema idanemusega terad) idandatud terade osakaal, kui terad leotati piimhappelahuses pH 2,5 juures (Joonis 7 ja 8). Terade hindamine toimus vastavalt punktis 3.2.5 esitatud skaalale.



Joonis 8. Happelises keskkonnas leotatud terade idanevus (%) ja hallitus ja pärmseente üldarvukus CFU 1 g terade kohta.

Happeline keskkond mõjus ka bakterite ja hallitus ja pärmseente arvukusele, kuid mitte nii intensiivselt kui termiline eeltöötlemine. Joonistel 7 ja 8 on näha, et leotamine piimhappe lahuses pH väärtusega 3,5 ei mõjutanud oluliselt bakterite ja hallitus/pärmseente vähenemist. Leotamine happelises keskkonnas mõjutas positiivselt mikroorganismide arvukuse vähendamisele. Rukki ja kaera puhul hallitus/pärmseente arv vähenes 100 korda, aga nisu puhul kolooniate kasvu ei esinenud (Joonis 8). Seega võib järeldada, et happeline töötlemine hävitab nisu terades hallitus/pärmseente arvukuse täielikult. Piimhappelahuse pH väärtus mõjutas oluliselt terade idanemist ja mikroorganismide arvu.

Piimhappe kontsentratsioon mõjus negatiivselt terade idanevusele, kuid vähendas mikroorganismide arvu, kuna leotamise aeg oli 16 tundi. Järgnevates katsetes optimeeriti meetodit ning edasi uuriti terade lühemajalist leotamist piimhappe lahuses.

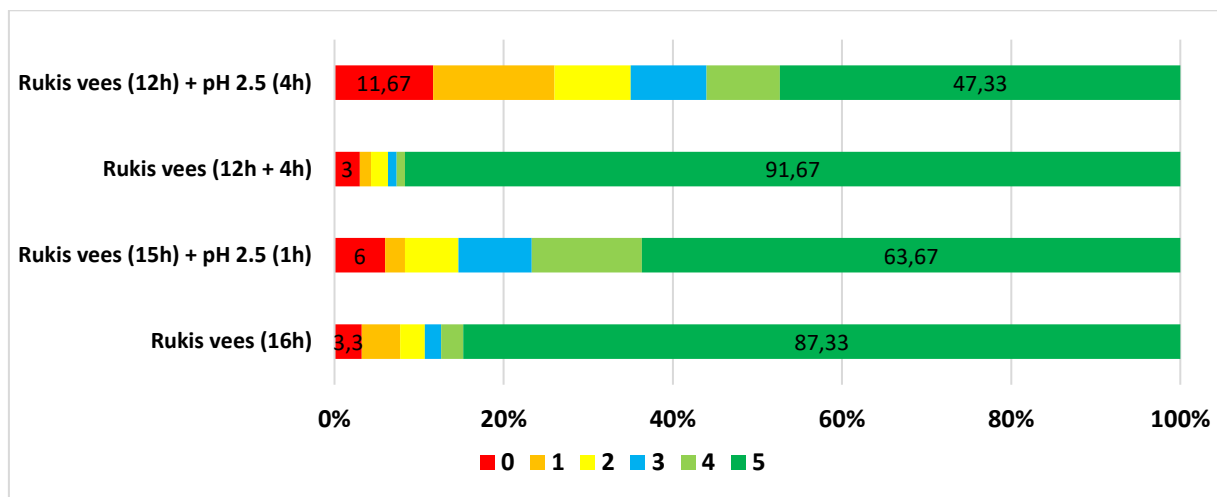
4.2.1 Happelise keskkonna mõju rukkiteradele

Võttes arvesse termilise töötlemise ja happelise keskkonna mõju algteradele, otsustati leida teist võimalust, et vähendada mikroorganismide arvu ja samal ajal säilitada algterade idanevust. Selleks uuriti leotamisaega happelises keskkonnas.

Kuna pärast kuumtöötlemist või leotamist piimhappes 16 tunni jooksul näitasid rukkiterad paremaid idanevuse ja mikrobioloogilise arvukuse vähenemise tulemusi, siis järgmised katsed viidi läbi rukkiteradega. Algterade summaarne leotamisaeg oli 16 tundi ehk algterad leotati alguses vees (kas 15h või 12h) ja seejärel toimus vee vahetus piimhappelahuse (pH 2,5) vastu vastavalt 1 või 4 tunniks.

Samuti viidi läbi katse ka idandatud teradega ehk peale 16 h leotust vees, lasti terad idanema ja seejärel leotati idandatud terad piimhappe lahuses 1 ja 4 tundi (Joonised 1 ja 2), et näha, kas idanemise käigus tagasikasvanud mikrofloora arvukust saab samuti vähendada. Kontrollproovid leotati ainult vees, et elimineerida vees leotamise positiivset efekti

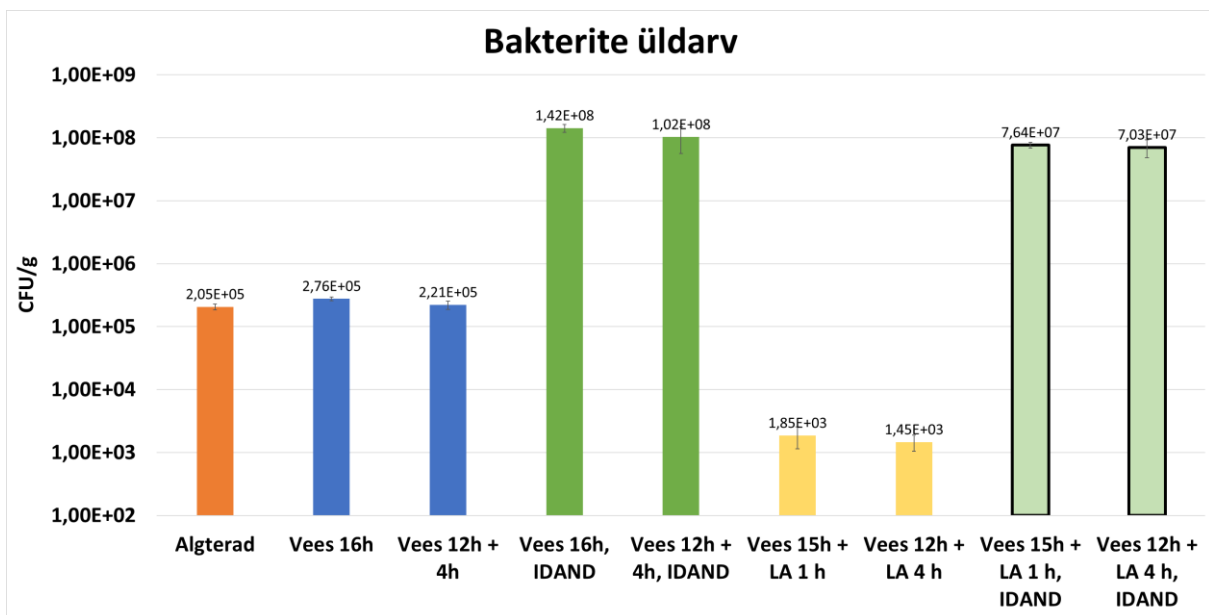
Joonisel 9 on toodud vee ja piimhappe lahuse (pH 2,5) mõju algterade idanevusele. Terade idanevuse hindamine toimus vastavalt joonisele 4.



Joonis 9. Vees ja happelises keskkonnas (pH 2,5 piimhappelahuses) töödeldud rukkiterade idanevus

Joonisel 9 on näha, et leotamine piimhappe lahuses (pH 2,5) 1 tund ja 4 tundi mõjutab terade idanemist võrreldes kontrollproovidega. Rukkiterade leotamine vees 16 tundi näitas sarnaseid tulemusi rukkiteradega, mis olid leotatud vees 12 tundi ja seejärel uues vees 4 tundi - ainult 3% terades ei olnud enam idanemisvõimelised. Algterade töötlemine piimhappes pärssis terade idanemist rohkem kui algterade leotamine vees. Võrreldes ainult vees leotatud teradega, siis terad mis olid leotatud 12 tundi vees ja seejärel 4 tundi piimhappes idanesid halvemini – umbes 11% terades ei idanenud. Tulemused kinnitavad fakti, et kauem leotamine piimhappes mõjutab negatiivselt terade idanevusele.

Joonisel 10 on toodud vees ja piimhappelahuses (pH 2,5) töödeldud rukkiterade bakterite arvukused.

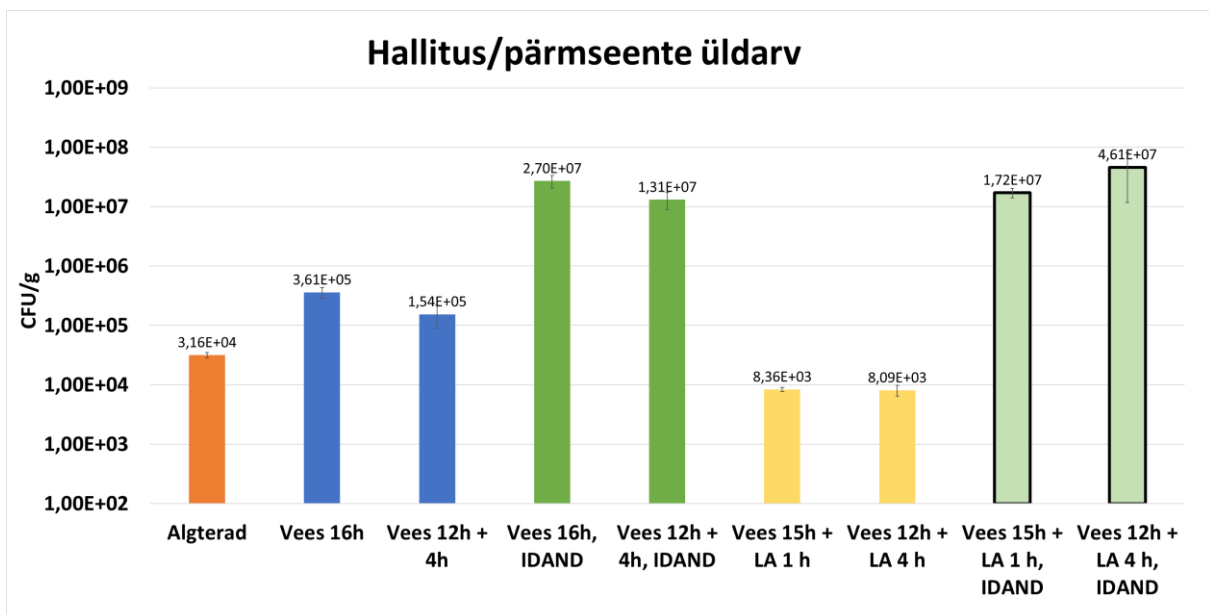


Joonis 10. Vees ja happelises keskkonnas töödeldud rukkiterade bakterite arvukused CFU 1 g kohta. LA – Lactic Acid – piimhape, IDAND – idandatud. Proovide lühendite seletus on toodud joonisel 2.

Tulemustest on võimalik välja lugeda, et bakterite üldarv algteradel ja vees leotatud teradel on sarnane. Tavaline leotamine vees 16 tundi ja leotamine vee vahetusega (vees 12h ja 4h) ei avalda mõju bakterite arvukusele. Leotamine piimhappes (pH 2,5) mõjutas positiivselt nii bakterite kui ka hallitus/pärmseente arvukuse vähenemisele. Terad, mis olid leotatud 12 tundi vees ja 4 tundi piimhappe lahuses näitasid sarnaseid tulemusi teradega, mis olid leotatud 15 tundi vees ja 1 happes (Joonis 10 ja 11). Bakterite arvukus vähenes 100 korda (10^5 -st kuni 10^3 CFU/g). Siiski mõjuspikem leotamine (4 h) piimhappe lahuses negatiivselt rukkiterade idanevusele.

Uuriti ka happelahuses leotamise mõju terade mikrobioloogilisele kvaliteedile idanemisel. Selleks algterad leotati vees 16 ja veevahetusega (12 + 4 h) ning võrdlemiseks leotati rukkiterad 15 h vees ja seejärel 1 h piimhappe lahuses (pH 2,5) ning kõik terad lasti idanema. Idandatud teradel määrati bakterite ja hallitus/pärmseente üldarv.

Algterade eeltöötlemine happelahusega (pH 2,5) vähendas idandatud terade bakterite arvukust 10 korda (10^8 kuni 10^7 CFU/g), seente arvukust see ei mõjutanud (10^7 CFU/g) (Joonis 10 ja 11).



Joonis 11. Veep ja happelises keskkonnas töödeldud rukkitera hallitus/pärmseente arvukused CFU 1 g kohta. LA – Lactic Acid – piimhape, IDAND – idandatud. Proovide lühendite seletus on toodud joonisel 2.

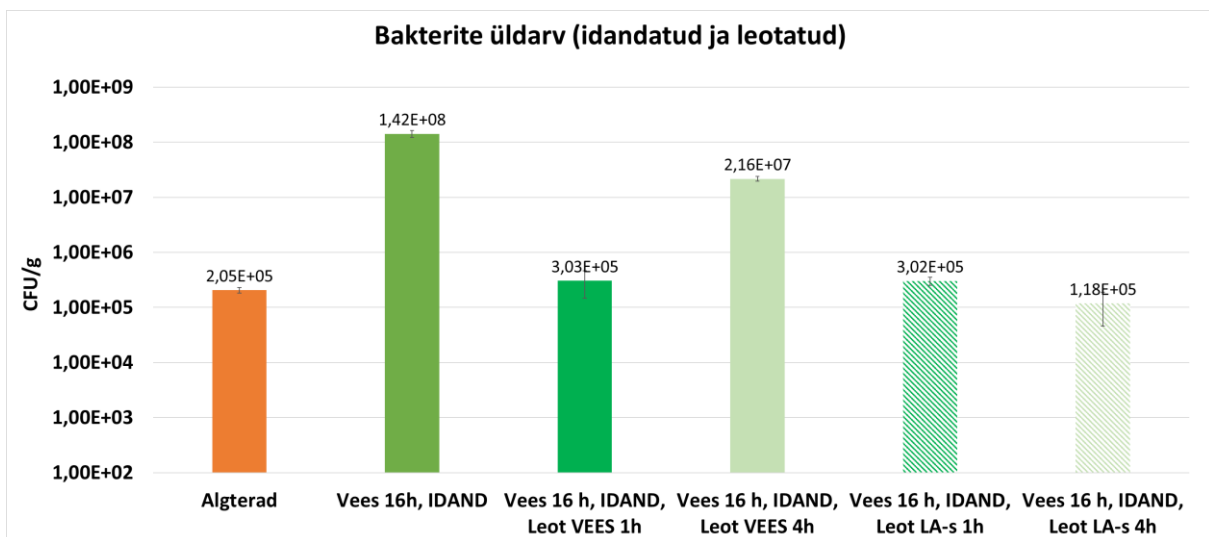
Võrreldes hallituse/pärmseente üldarvu algteradel ja vees leotatud teradel on hallituse/pärmseente üldarv algterades väiksem. Veep leotamisel kasvab hallitus/pärmseente arvukus 10 korda (10^4 - 10^5 CFU/g).

Algterade leotamine piimhappe lahuses 12+4 tundi ja 15+1 tundi näitas sarnaseid tulemusi bakterite üldarvuga, kuid vähendas hallitus/pärmseente arvu 100 korda (10^5 -lt 10^3 CFU/g). Algterade eeltöötlemine happelahusega (pH 2,5) ei mõjutanud seente arvukust (10^7 CFU/g) (Joonis 11). Kuna tulemused kahel meetodil on sarnased siis võib järeldada, et leotamine 1 tund happes (pH 2,5) sobib algsete rukkitera töötlemiseks paremini.

4.2.2 Happelise keskkonna mõju idandatud rukkitera

Kuna pärast happe töötlust idanevad terad hästi ja see on soodne keskkond mikroorganismidele nende kasvu taastamiseks, uuriti, kas piimhappe lisamine pärast idandamist aitab vähendada mikroorganismide arvukust. Selleks terad leotati ja pandi idanema. 72 tunni pärast võeti idandatud rukkitera ning töödeldi täiendavalt kas veega või piimhappelahusega.

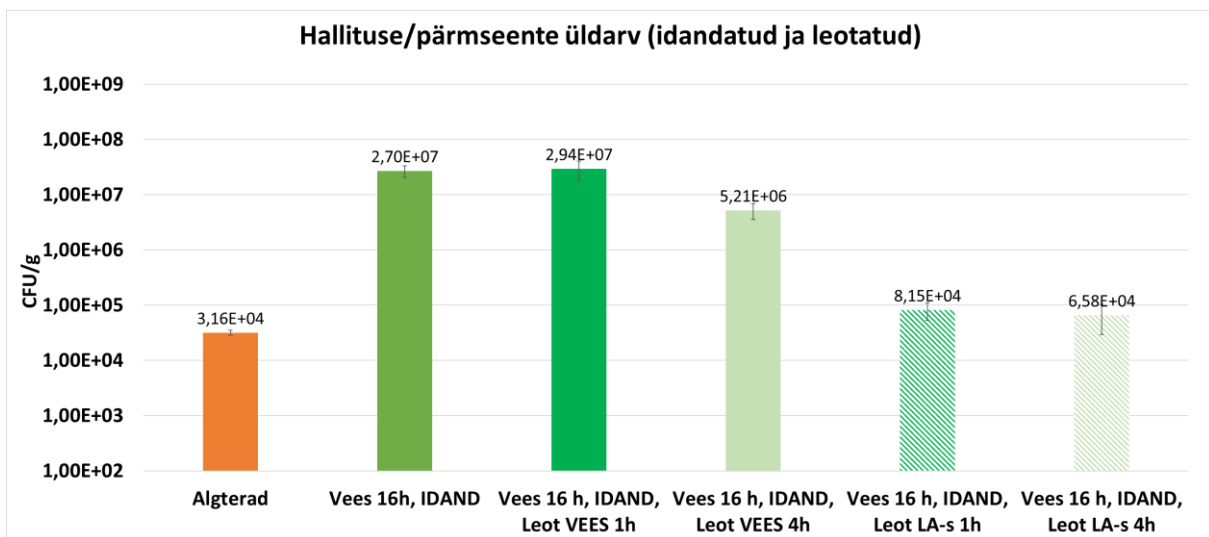
Joonisel 12 on toodud veep leotatud, idandatud ja veep/piimhappelahuses (pH 2,5) leotatud idandatud rukkitera bakterite arvukus.



Joonis 12. Veet ja happelises keskkonnas (1h ja 4h) töödeldud idandatud rukkiterade bakterite arvukused CFU 1 g kohta. LA – Lactic Acid – piimhape, IDAND – idandatud, Leot LA-s – idandatud terade leotamine piimhappes. Proovide lühendite seletus on toodud joonisel 3.

Joonisel 12 on näha, et leotamine 1 tund piimhappes vähendas bakterite arvu 1000 korda, kuid sarnane tulemus saavutati ka 1 tunni vees leotamisega (10^8 kuni 10^5 CFU/g). Idandatud terade leotamine vees 4 tundi mõjutas bakterite arvukust vähesel määral. Bakterite üldarv vähenes ainult 10 korda (10^8 - 10^7 CFU/g). See võib olla tingitud asjaolust, et kuigi algselt bakterite arvukus võis väheneda, siis 4 h niiseks ja toiteainerikkas keskkonnas hakkasid bakterid uuesti paljunema. Idandatud terade leotamise tulemused näitasid, et töötlemine piimhappe lahusega 1 tund ja 4 tundi ning 1tund vees näitavad peaaegu samu tulemusi (Joonis 12), millest saab järeldada, et bakterite arvukus ei vähenenud mitte piimhappe tagajärjel vaid lihtsalt veega või lahusega pesemise tõttu. Seega sobib lihtsalt idandatud terade pesemine katse lõpus bakterite üldarvukuse vähendamiseks.

Joonisel 13 on toodud vees leotatud, idandatud ja vees/piimhappelahuses (pH 2,5) leotatud rukkiterade hallitus/pärmseente arvukus.



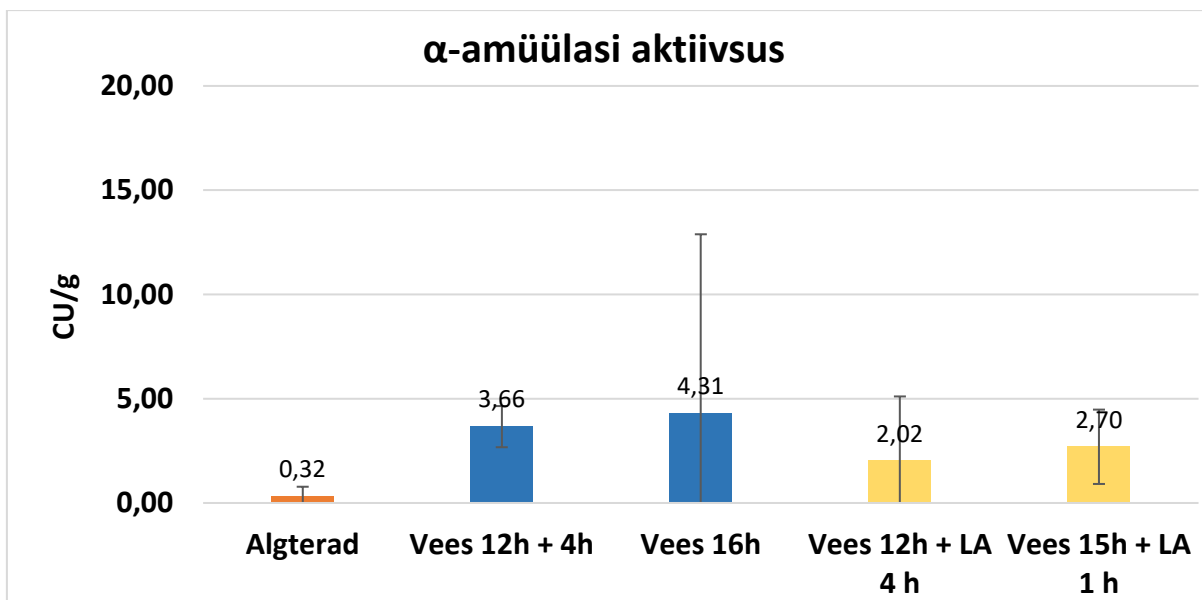
Joonis 13. Veet ja happelises keskkonnas (1h ja 4h) töödeldud idandatud rukkiterade hallitus/pärmseente (B) arvukused CFU 1 g kohta. LA – Lactic Acid – piimhape, IDAND – idandatud, Leot LA-s – idandatud terade leotamine piimhappes. Proovide lühendite seletus on toodud joonisel 3.

Jooniselt 13 on näha, et pärast idandamist tõusis hallitus/pärmseente arvukus 1000 korda. Kui idandatud teri leotada 1 tund vees, siis ei avalda see hallitus/pärmseente arvukusele erilist mõju. Kui idandatud teri leotada vees 4 h, siis väheneb hallitus/pärmseente arvukus poole võrra. Kirjandusest on teada, et LAB pärssivad hallituste kasvu. Vähenenud hallituse kasvu võib põhjustada bakterirakkude ja seente vaheline konkurents toitainete pärast (Ahlberg *et al.*, 2015). Sellest tulemusest võib järeldada, et kuna hallitused ja pärmid kasvavad aeglasemalt kui bakterid, siis pikem leotusaeg võib nende arvukust vähendada veelgi. Kõige efektiivsemalt mõjus idandatud teradele piimhappe töötlus, ja seda juba 1 tunni töötamise tagajärjel. Hallitus/pärmseente arvukus vähenes 1000 korda, mis on efektiivne mikroorganismide arvukuse langus, et tagada toote pikem säilivusaeg.

4.3 Ensümaatilise aktiivsuse määramine

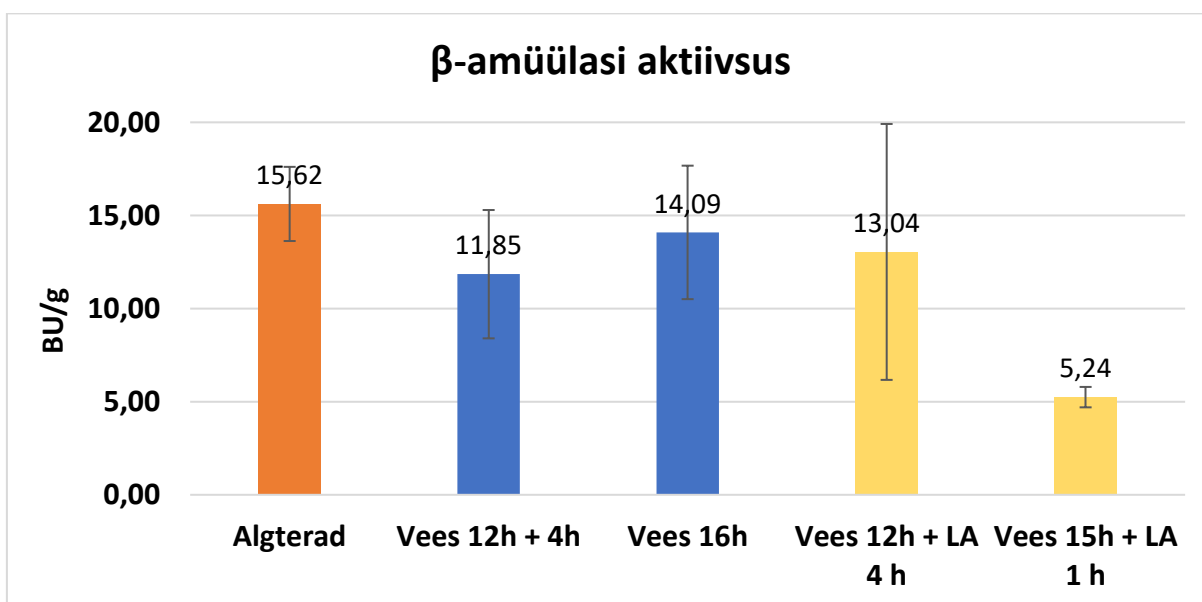
Karbohüdraatide lõhustamiseks kasutatavate ensümaatilise aktiivsuse näitab, et kui intensiivne on olnud tähtsuse hüdrolyüs, mille tõttu tekivad teraviljades vabad suhkrud. Amülaaside töö on oluline kuna sellega vabastatakse suhkruid energia saamiseks, et tera saaks kiiresti idanema hakata. Kahjuks sobivad vabanenud madalmolekulaarsed suhkrud toiduks ka mikroorganismidele, mille tagajärjel kasvab nende arvukus teraviljadel oluliselt. Antud katse eesmärk oli vaadata, kui ulatuslik on terade ensümaatilise aktiivsuse, et aru saada kui palju see mõjutab idanemise ja mikroorganismide kasvu erinevate töötlemisetappide puhul. Selleks määrati ensümaatilist aktiivsust algteradel ja leotatud teradel.

Proovide α - ja β -amülaaside aktiivsused määrati erinevatel päevadel. Proovide võrdlemisel (Joonis 14 ja 15) on näha, et rukki algteradel on kõige kõrgem β -amülaasi aktiivsus, kuid kõige madalam α -amülaasi aktiivsus võrreldes töödeldud proovidega.



Joonis 14. α - amülaasi aktiivsus (CU/g) erinevalt töödeldud rukkiteradel

Rukki töötlemata teradel oli väga madal α-amülaasi aktiivsus, mis suurenes leotamise ajal. Leotamine vees erinevatel tingimustel põhjustas α-amülaasi mõõduka tõusu. Algterade leotamine piimhappe lahuses 12+4 tundi ja 15+1 tundi näitas α-amülaasi tõusu võrreldes algteradega. Leotamise positiivne efekt ensüümiaktiivsuse tõusule on tõenäoliselt seotud ilmselt kuivade terade hüdratsiooniga, mille tagajärjel tõuseb terades ensümaatiline aktiivsus



Joonis 15. β - amülaasi aktiivsused (BU/g) erinevalt töödeldud rukkiteradel

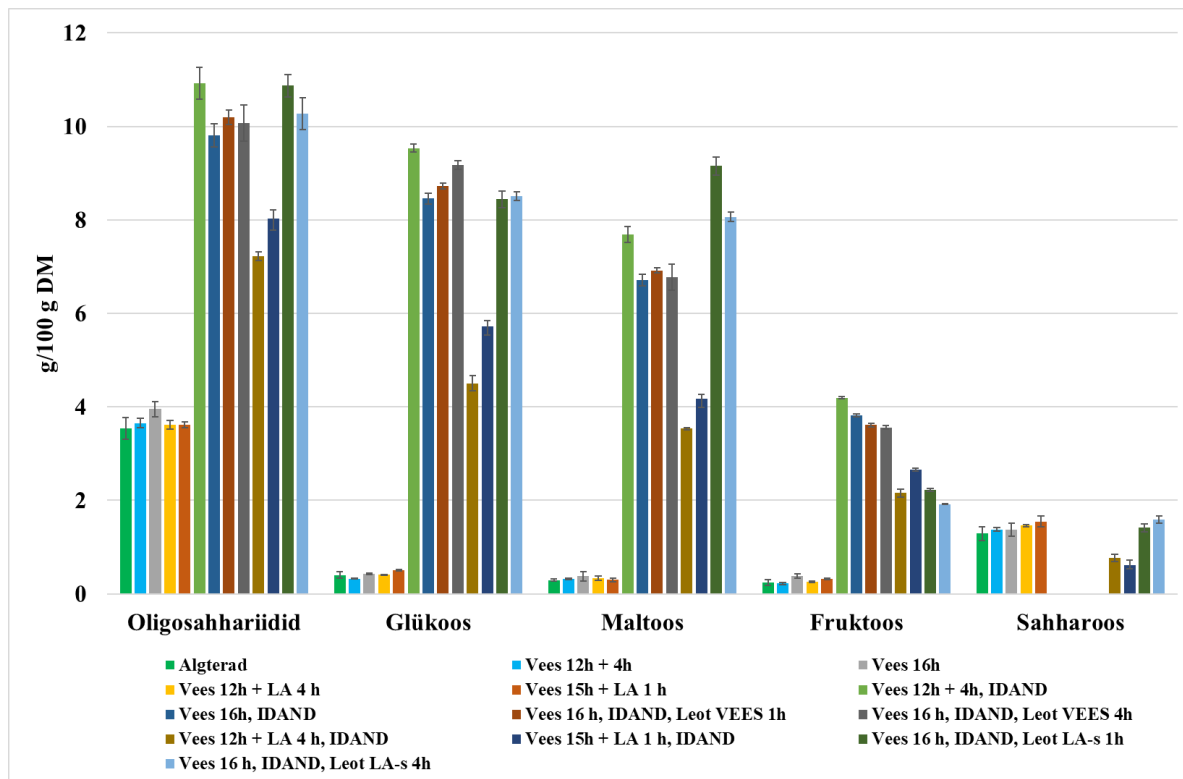
Tulemused näitavad, et algterade β-amülaasi aktiivsus on kõrgem kui töödeldud teradel. Proovide võrdlemisel on näha, et vees leotatud teradel (vees 16) ja teradel leotatud 12 tundi vees ja 4 tundi

piimhappe lahuses on sarnased β -amülaasi aktiivsused. Teradel, leotatud 15 tundi vees ja 1 piimhappe lahuses on kõige madalam β -amülaasi aktiivsus. Siiski on peaaegu kõikidel proovidel välja arvatud „leotatud vees 15 h ja seejärel piimhappes 1 h“ väga suur standardhälve, ning tulemusest joonistub pigem välja et kui algterades on veidi kõrgem β -amülaasi aktiivsus, siis igasugune töötlus vähendab seda.

4.4 Suhkrute sisalduse määramine

Kuna suhkrud on peamine toitaineline mikroorganismidele, siis analüüsiti täiendavalt, et kui palju vabu suhkruid erineva töötlustapi tagajärjel teradesse tekis.

Joonisel 16 on toodud eeltöödeldud ja idandatud rukkiterade suhkrute sisaldus, mis näitab tärglise intensiivset lagunemist.



Joonis 16. Suhkrute sisaldus eeltöödeldud ja idandatud rukkiteradel

Idandatud terade tulemused näitavad suhkrute sisalduse suurenemist, võrreldes alg- ja leotatud teradega. Suhkrute sisalduse suurenemist idandatud terades mõjutab intensiivistunud ensümaatiline aktiivsus. Joonisel 16 on näha, et algteradel ja leotatud teradel on mono-, di- ja oligosahhariidide sisaldus sarnane ja ei suurene. See võib olla seotud suhkrute väljapesemisega veega või piimhappega. Siiski, näitas sahharoos madalaimat kontsentratsiooni terades, mis olid idandatud ja töödeldud veega.

4.5 Metagenoomne analüüs

Nii eeltöödeldud algteradele kui ka idandatud ja piimhappes leotatud teradele tehti metagenoomne analüüs ehk koguti kokku kogu Petri tassil kasvanud rakuline materjal ning sekveeriti, et teada saada täpsemalt, millised bakterite ja hallitus/pärmseente liigid teradel pärast töötlust kasvasid. See teadmine on oluline, sest aitab tuvastada, et millisest töötlemise etapis on mikroorganismid teradele sattunud. Kui idandatud teradel domineerivad mullast pärit mikroorganismid, siis tuleb tugevamat töötlust rakendada algteradele. Kui leitud liigid kuuluvad aga piimhappebakterite perekonda, on need mikroorganismid arenenud teradele tõenäoliselt idanemise käigus. See on oluline teadmine tööstusele, et paremini oma idandatud terade tootmisprotsessi optimeerida.

Tabelis 3 on toodud kümme domineerivat bakteriliiki, mis esinevad algterades, leotatud ja idandatud terades. Kuna eelnevalt selgus, et leotamine ühe tunni jooksul on optimaalne nii mikroorganismide arvukuse alandamiseks kui ka idanemise jaoks, otsustati teha metagenoomne analüüs ainult nendest proovidest. Samuti uuriti algterades, leotatud vees ja idandatud terades erinevaid bakteriliike.

Tabel 3. Kümme bakteriliiki algterade, eeltöödeldud rukkiterade ja töödeldud idandatud rukkiterade proovides

TOP10, dataset average	Algterad	Leotatud vees 16 h	Leotatud vees 16h ja IDANDATUD	Leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud VEES 1 h	Leotatud vees 15h + 1 h pH=2,5 HAPPES	Leotatud vees 15h + 1 h pH=2,5 HAPPES ja IDANDATUD	Leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud HAPPES 1 h
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	+	+	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i>	-	+	-	-	+	-	+
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kosakonia hermannii</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Kosakonia unclassified</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudoclavibacter unclassified</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	+	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas unclassified</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	-	+	+	+	+	-

Rukki algeterade proovis domineerivad laia levikuga mullabakterid perekondadest *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Kosakonia* ja *Stenotrophomonas*. Tabelist selgub, et kõigis rukki proovides domineerivad liigid *Curtobacterium flaccumfaciens* ja *Pantoea agglomerans*. Võrreldes veega töötlemisel piimhappega kaob *Kosakonia* perekonda. Ja idandatud terade töötlemine happes tõenäoliselt tapab *Pseudomonas* ja *Stenotrophomonas* perekonna esindajad

Tabelis 4 on toodud üheksa seeneliiki, mis esinevad algeterades ja idandatud terades, mis olid töödeldud veega ja piimhappega.

Tabel 4. Üheksa seeneliiki algeterade, eeltöödeldud rukkiterade ja töödeldud idandatud rukkiterade proovides

	Algeterad	Leotatud vees 16 h	Leotatud vees 16h ja IDANDATUD	Leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud VEES 1 h	Leotatud vees 15h + 1 h pH=2,5 HAPES	Leotatud vees 15h + 1 h pH=2,5 HAPES ja IDANDATUD	Leotatud vees 16 h, idandatud ja leotatud HAPES 1 h
TOP 9, dataset average							
<i>Cladosporium delicatulum</i>	+	+	-	-	+	-	+
<i>Filobasidium oeirense</i>	+	+	-	-	+	+	-
<i>Filobasidium sp</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>Filobasidium unclassified</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>Filobasidium wieringae</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>Rhodotorula unclassified</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Sporobolomyces phaffii</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>Sporobolomyces roseus</i>	+	+	-	-	+	-	-
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	+	+	-	-	+	+	+

Seentest domineerivad *Cladosporium*, *Filobasidium*, *Sporobolomyces* ja *Vishniacozyma* perekonnad. Kahes proovis „Leotatud vees 16h ja IDANDATUD“ ja „Leotatud vees 16h, idandatud ja leotatud VEES 1h“ üritati analüüsida hallitus/pärmseente perekondi, kuid mõlemal korral oli raamatukogu kontsentratsioon võrreldav negatiivsed referents-kontrolliga, mille alusel võiks arvata, et tassidel kasvanud materjal ei olnud pärit hallitusseentelt ja pärmidelt.

5. JÄRELDUSED

Magistritöö andmete analüüsi tulemustest selgus:

1. Terade (nisu, kaera, rukki) kuumtöötlemine vähendas mikroorganismide arvukust, kuid samal ajal pärssis ka terade idanevust.
2. Terade (nisu, kaera, rukki) leotamine vees ja piimhappe lahuses (pH 3,5) ei vähendanud oluliselt mikroorganismide arvu.
3. Rukkiterade leotamine 16 tunni jooksul piimhappe lahuses madala pH (2,5) juures vähendas mikroorganismide arvu. Rukkiterade idanevust mõjutas happe leotus oluliselt kuid aktsepteeritaval tasemel. Nisu- ja kaerateradele mõjus madal pH (2,5) negatiivselt – üle poole teradest ei idanenud.
4. Algterade eeltöötlemise tulemused näitasid, et leotamine 15 tundi vees ja 1 piimhappes sobib paremini kui leotamine 12 tundi vees ja 4 piimhappes, kuna see mõjub positiivselt mikroorganismide vähenemisele.
5. Idandatud terade töötlemine piimhappe lahusega (pH 2,5) näitas, et ratsionaalsem on kasutada leotamist ühe tunni jooksul, sest mikroorganismide arvukus ei vähenenud oluliselt nlja tunnise piimhappe töötlusega.
6. Terad, mis olid leotatud piimhappelahuses näitasid, et α - ja β - amülaasi aktiivsused on madalamad ja seetõttu oli terades ka väiksem suhkrute sisaldus, võrreldes teradega, mida leotati ainult vees.
7. Terade idanemise käigus suureneb ensümaatiline aktiivsus, mille tagajärjel tõuseb terades suhkrute sisaldus. Piimhappelahusega töödeldud terades suhkrute sisaldus oli madalam, kuna happe töötlus pärsib ensüümide aktiivsust, ja selle tõttu väheneb ka terade idanevus ning suhkrute sisaldus.
8. Alg- ja töödeldud teradel tuvastati metagenoomse analüüsi abil enim mullas leiduvaid *Curtobacterium flaccumfaciens* ja *Pantoea agglomerans* baktereid. Sellest järeldub, et idandatud terade säilivusja pikendamiseks, tuleb eeltöötlust rakendada juba algteradele.
9. Töötlemine piimhappelahusega tõenäoliselt tapab *Kosakonia* perekonda võrreldes leotamisel ainult veega. Peale idandatud terade töötlemist piimhappelahusega *Pseudomonas* ja *Stenotrophomonas* esinemist ei tuvastatud.
10. Domineerivad seente liigid olid *Filobasidium*, *Sporobolomyse phaffi*, *Sporobolomyces roseus* ja *Vishniacozyma victoriae*. Peale idandatud terade töötlemist piimhappelahusega *Sporobolomyces roseus* ei tuvastatud, võrreldes algteradega ja veega töödeldud teradega.

KOKKUVÕTE

Idandatud terad sisaldavad bioaktiivseid ühendeid nagu vitamiine, antioksidante, fenoole, mis on kasulikud inimese tervisele ning on heaks täienduseks erinevatele pagaritoodetele. Kahjuks on aga terade idandamine niiske ja soe protsess, mis annab võimaluse ka teradele sattunud mikroorganismidel kasvada. Mikroorganismide arvukuse suurenemisel, võivad idandatud terad kujutada olulist ohtu inimese tervisele ning samuti väheneb sellega idandatud terade säilivus.. Seega tuleb leida meetodeid, kuidas vähendada teradel leiduvaid mikroorganisme, et nad ei saaks erinevates tootmisprotsessides edasi kasvada ja oma arvukust tõsta. Samas tuleb tagada terade kõrge kvaliteet ja idanemisvõime.

Käesoleva magistr töö eesmärk oli uurida töötlemise mõju terade idanemisele ja mikrobioloogistele parameetritele ning uurida alg- ja idandatud terade säilivusega seotuid aspekte. Mikroorganismide kasvu takistamiseks töötati välja kaks töötlemisviisi: kõrge temperatuuril ja töötlemine happelises keskkonnas. Selleks, et selgitada välja kui palju mikroorganisme on teradel enne ja pärast töötlemist, viidi läbi üldmikrobioloogia (mõõdeti bakterite ja hallitus/pärmseente üldarv) ja metagenoomne analüüs domineerivate bakterite ja seente liikide detekteerimiseks.

Algterade eeltöötlemise põhjal saab järeldada, et termiline töötlemine kõrgetel temperatuuridel vähendas bakterite ja hallitus/pärmseente arvukust, kuid samal ajal pärssis terade idanemist. Sõltuvalt liigist 64% kuni 90% terades ei idanenud. Parimad tulemused saadi kui terad töödeldi happelises keskkonnas. Peale leotamist (16 tundi) lahuses, mille pH oli 2,5, oli rukkiterade idanemine kõrgem kui nisu- ja kaerateradel.

Uuriti piimhappe lahuse (pH 2,5) mõju algterade ja idandatud rukkiterade mikroorganismide arvukuse vähendamiseks. Kuna leotamine piimhappelahuses 16 tundi oli liiga pikk, otsustati muuta leotamisaega. Algterad leotati alguses vees (kas 15 h või 12 h) ja peale seda toimus vee asendamine happelahusega (kas 1 või 4 tunniks), et summaarne leotamisaeg oleks endiselt 16 tundi. Tulemuste analüüsi käigus selgus, et leotamine piimhappes ühe ja nelja tunni jooksul näitasid sarnaseid mikrobioloogilisi tulemusi, seega leotamine ühe tunni jooksul on ratsionaalsem, aja ja ressurside säästmiseks. Kaardistati ka domineerivate bakterite ja seente liigid, mis esinesid algterades ning idandatud terades, et anda tööstusele ideid, millisest allikast terade mikrobioota pärineb ja millises tootmisetapis tuleks mikroorganisme vähendada.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada Puratos Malt OÜ koostöö ning samuti katsematerjalide eest. Eelkõige tänan oma juhendajaid, Anna Traksmäe ja Mary-Liis Kütt, kes aitasid oma soovitusel ja konsultatsioonidega. Aili Kallastu, Jekaterina Kazantseva, Anne Meikas (metagenoomika rühm), kes aitasid läbi viia metagenoomset analüüsi; Marina Junosovale, kes aitas läbi viia suhkruanalüüsi. Marie Kriisa konsultatsiooni eest ensümaatilise analüüsi teostamisel. Samuti tänan TFTA, et sain oma katseteks kasutada laborit, seadmeid ja katsematerjale.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V., Korhonen, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. - *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 207. Pp. 87-102.
- Alfy, A., Kiran, B.V., Jeevitha G.C., Hebbar, H.U. (2016). Recent Developments in Superheated Steam Processing of Foods. — *Critical Review Food Science Nutrition*. Vol. 56. Pp. 2191–2208.
- Benincasa, P., Falcinelli, B., Lutts, S., Stagnari, F., Galieni A. (2019). Sprouted Grains: A Comprehensive Review. – *Nutrients*. Vol. 11, Iss. 2. Pp. 421.
- Bewley, J. D., Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of development and germination*. New York: Springer.
- Bianchini, A., Stratton, J. (2014). Spoilage of Plant Products: Cereals and Cereal Flours. - *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 3. Pp. 459-464.
- Booyesen, C., Dicks, L. M. T., Meijering, I., Ackermann, A. (2002). Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. - *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 76. Pp. 63-73.
- Bullerman, L.B., Bianchini, A. (2009). Food safety issues and the microbiology of cereals and cereal products. - *Microbiologically Safe Foods*. Pp. 315-335.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R., Butt, M. S. (2008). Oat: unique among the cereals. - *European Journal of Nutrition*. Vol. 47. Pp. 68-79.
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing – a review. - *Food Research International*. Vol. 52, Iss. 1. Pp. 243– 261.
- Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Vol. 43, Issue 4. Pp. 569–591.
- Coulibaly, A., & Chen, J. (2011). Evolution of energetic compounds, antioxidant capacity, some vitamins and minerals, phytase and amylase activity during the germination of foxtail millet. - *American Journal of Food Technology*. Vol. 6. Pp. 40–51.
- Ding, H., Fu, T. J., Smith, M. A. (2013). Microbial Contamination in Sprouts: How Effective Is Seed Disinfection Treatment? - *Journal of Food Science*. Vol. 78, Iss. 4. Pp. 495-501.
- Ding, J., Feng, H. (2019). Controlled germination for enhancing the nutritional value of sprouted grains. *Sprouted Grains*. Ch. 5. Pp. 91–112.
- Feng, G. (2019). Rye. In: *Bioactive Factors and Processing Technology*. Ch. 9. Pp. 151-169.
- Fineli Database. [WWW] <https://fineli.fi/fineli/en/index> (17.03.2022)
- Gan, R. Y., Lui, W. Y., Wu, K., Chan, C. L., Dai, S. H., Sui, Z. Q., Corke, H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. - *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 59. Pp. 1-14.
- Gebreegiabher, G., Chiremba, C., Stone, A., Tyler, R., Nickerson, M. (2015). The potential of germination (sprouting) for improving the nutritional properties of cereals and pulses. [WWW] <https://canadianfoodbusiness.com/2015/12/23/the-potential-of-germination-sprouting-for-improving-the-nutritional-properties-of-cereals-and-pulses/> (03.05.2022)
- Ha, P. T. T., Xuan, T. D. (2018). Effect of Lactic Acid on α -Amylase Activity and Phytic Acid Content in Germination of Rice. - *International Letters of Natural Sciences*. Vol. 67. Pp. 9-15.

- Hansen, H. B., Møller, B., ANDERSEN, S. B., Jørgensen, J. R., Hansen, A. (2004). Grain Characteristics, Chemical Composition, and Functional Properties of Rye (*Secale cereale* L.) As Influenced by Genotype and Harvest Year. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52. Pp. 2282-2291.
- Hung V.P., Maeda T., Yamamoto S., Morita N. (2012). Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 92. Pp. 667–672.
- Ikegwu, T. M., Ezegebe, C. C., Okolo, C. A., Ofoedu, C. E. (2021). Postharvest Preservation Technology of Cereals and Legumes. - *Postharvest Preservation Technology of Cereals and Legumes*. Pp. 1-21.
- Jin, C., Guo, J., Zhu, H., Wen, J. (2021). Optimization of superheated steam treatment conditions for wheat aleurone layer flour. - *Food Science and Technology*. Vol.42. Pp. 1-8.
- Jonssona, K., Anderssonb, R., Knudsen, K. E. B., Hallmansd, G., Hanhinevae, K., Katinaf, K., Kolehmainene, M., Kyrøg, C., Langtonb, M., Nordlundh, E., Lærkec, H. N., Olseng, A., Poutanenh, K., Tjønnelandg, A., Landberga, R. (2018). Rye and health - Where do we stand and where do we go? - *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 79. Pp. 78-87.
- Kazantseva, J., Malv, E., Kaleda, A., Kallastu, A., Meikas, A. (2021). Optimisation of sample storage and DNA extraction for human gut microbiota studies. - *Center of Food and Fermentation Technologies*. Vol. 21, Iss. 158. Pp. 1-13.
- Kim, H. Y., Lee, S. H., Hwang, I. G., Woo, K. S., Kim, K. J., Lee, M. J., Kim, D. J., Kim, T. J., Lee, J., Jeong, H. S. (2013). Antioxidant and antiproliferation activities of winter cereal crops before and after germination. - *Food Science and Biotechnology*. Vol. 22, Iss. 1. Pp. 181–186.
- Kondrateva, N. P., Kasatkina, N.I., Kuryleva, A. G., Baturina, K. A., Ilyasov, I. R., Korepanov, R. I. (2019). Effect of treatment of seeds of grain crops by ultraviolet radiation before sowing. - *International AgroScience Conference*. Vol. 433. Pp. 1-7.
- Krapf, J. (2021). Investigation of the use of sprouted grains as feedstock for directly expanded cereals. - PhD Thesis. Pp. 197.
- Krapf, J., Ding, L., Brühan, J., Lorimer, L., Walther, G., Flöter, E. (2019). Effect of sprouting temperature on selected properties of wheat flour and direct expanded extrudates. – *Journal of Food Process Engineering*. Pp. 1-10.
- Kumar, R., Kumar, A., Sharma, N. K., Kaur, N., Chunduri, V., Chawla, M. (2016). Soft and Hard Textured Wheat Differ in Starch Properties as Indicated by Trimodal Distribution, Morphology, Thermal and Crystalline Properties. - *PLoS ONE*. Vol. 11, Iss. 1. Pp. 1-14.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., and Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. - *Food Chemistry*. Vol. 120, Iss. 4. Pp. 945– 959.
- Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C., Pandiella, S.S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. - *Journal of Food Engineering*. Vol. 72, Iss. 4. Pp. 332-338.
- Lee, H. J., Ryu, D. (2017). Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 65, Iss. 33. Pp. 7034-7051.
- Lemmens, E., Moroni, A. V., Pagand, J., Heirbaut, P., Ritala, A., Karlen, Y.-A., Lê, K., Van den Broeck, H. C., Brouns, F. J. P. H., De Brier, N., Delcour, J. A. (2019). Impact of Cereal Seed Sprouting on Its Nutritional and Technological Properties: A Critical Review. - *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 8, Iss. 1. Pp. 305-328.

- Lintschinger, J., Fuchs, N., Moser, H., Jager, R., Hlebeina, T., Markolin, G., Gossler, W. (1997). Uptake of various trace elements during germination " of wheat, buckwheat and quinoa. - *Plant Foods for Human Nutrition*. Vol. 50. Pp. 223–237.
- Los, A., Ziuzina D., Akkermans, S., Boehm, D., Cullen, P. J., Impe, J. V., Bourke P. (2018a). Improving microbiological safety and quality characteristics of wheat and barley by high voltage atmospheric cold plasma closed processing. – *Food Research International*. Vol. 106. Pp. 509-521.
- Los, A., Ziuzina, D., Bourke, P. (2018b). Current and Future Technologies for Microbiological Decontamination of Cereal Grains. - *Journal of Food Science*. Vol. 83, Iss. 6. Pp. 1484-1493.
- Ma, Z., Bykovac, N. V., Igamberdieva, A. U. (2017). Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. - *The crop journals*. Vol. 5. Pp. 459-477.
- Magallanes López, A. M., & Simsek, S. (2021). Pathogens control on wheat and wheat flour: A review. - *Cereal Chemistry*. Vol. 98, Iss. 1. Pp. 17–30.
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. - *British Nutrition Foundation*. Vol. 29, Iss. 2. Pp. 111-142.
- Morris, C. F. (2002). Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. - *Plant Molecular Biology*. Vol. 48. Pp. 633–647.
- Nadu, T. (2018). Microbiology. Department of School Education: Tamil Nadu. [WWW] https://www.brainkart.com/article/Soil-Microorganisms_35270/ (04.05.2022)
- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H. (2008). Potential application of high hydrostatic pressure to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouted seeds. - *The International Journal of Food Microbiology*. Vol. 128. Pp. 348–353.
- Nelson, K., Stojanovska, L., Vasiljevic, T., Mathai, M. (2013). Germinated grains: A superior whole grain functional food? - *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 91. Pp. 429–441.
- Nkhata, S. G., Ayua, E., Kamau, E. H., Shingiro, J. B. (2018). Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. - *Food Science & Nutrition*. Vol. 6. Pp. 2446–2458.
- Nsengumuremyi, D., Adadi, P., K. Oppong, G., v. Barakova, N., & F. Krivoshapkina, E. (2020). The Potential Application of Nanoparticles on Grains during Storage: Part 1 – An Overview of Inhibition against Fungi and Mycotoxin Biosynthesis. In: *Mycotoxins and Food Safety*. Pp. 1-33.
- Oliviera, P. (2014). Investigation of lactic acid bacteria mediated bioprotection with applications in cereal industry. Case-study: malting process. PhD Thesis, University College Cork. 271 p.
- Peles, F., Győri, Z., Bácskai, T., Szabó, Zs., Murvai, M., Kovács, B. (2012). Microbiological quality of organic wheat grains and sprouts. - *Analele Universităţii din Oradea*. Vol.18. Pp. 53-60.
- Poutanen, K., Katina, K., Heiniö, R. (2014). Rye. - *Bakery Products Science and Technology*. Ch. 4. Pp. 75-87.
- Quillien, J. F. (2002). Mycotoxins. - *Institut National de la Recherche Agronomique*. Flair Flow, France. Pp. 19-21.
- Ramos-Ruiz, R., Martinez, F., & Knauf-Beiter, G. (2019). The effects of GABA in plants. In: *Cogent Food and Agriculture*. Vol. 5, Issue 1. Pp. 1-12.
- Randla, T. (2015). Mikrobioloogilises töös kasutatavad põhimõtted ja -meetodid. Biotehnoloogia Laboratoorsete tööde juhend. Lisad. Elektroonne väljaanne. Pp. 1–227.

- Sabillón, L., Stratton, J., Rose, D. J., Flores, R. A., & Bianchini, A. (2016). Reduction in microbial load of wheat by tempering with organic acid and saline solutions. - *Cereal Chemistry*. Vol. 93, Iss. 6. Pp. 638–646.
- Schmidt, M., Zannini, E., Arendt, E. K. (2018). Recent Advances in Physical Post-Harvest Treatments for Shelf-Life Extension of Cereal Crops. – *Foods*. Vol. 7, Iss. 4. Pp. 45.
- Serna-Saldivar, S. (2010). *Cereal Grains. Properties, Processing, and Nutritional Attributes*. Monterrey: CRC Press. 793 p.
- Sluková, M., Jurkaninová, L., Švec, I., Skřivan, P. (2021). Rye – the nutritional and technological evaluation in Czech cereal technology – A review: Grain and flours. - *Czech Journal of Food Sciences*. Vol. 39, Iss. 1. Pp. 3-8.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Bremer, P. (2016). Bacillus Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. - *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 15, Iss. 6. Pp. 1139-1148.
- Šramková, Z., Gregorová, E., Šturdík, E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. - *Acta Chimica Slovaca*. Vol. 2, Iss. 1. Pp. 115 – 138.
- Sujatha, M., Hymavathi, T. V., Devi, K. U., Roberts, T. P. P., Kumar, D. P. (2017). Effect of Heat Treatment and Gamma Irradiation on *In Vitro* Protein Digestibility of Selected Millet Grains. - *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Vol. 6, Iss. 11. Pp. 1014-1020.
- Sulieman, M. A., Eltayeb, M. M., Babiker, E. E., Mustafa, A. I., Tinay, A. H. E. (2008). Effect of Sprouting on Chemical Composition and Amino Acid Content of Sudanese Lentil Cultivars. - *Journal of Applied Sciences*. Vol. 8, Iss. 12. Pp. 2337-2340.
- Tiansawang, K., Luangpituksa, P., Varayanond, W., Hansawasdi, C. (2016). GABA (γ -aminobutyric acid) production, antioxidant activity in some germinated dietary seeds and the effect of cooking on their GABA content. – *Food and Science Technology*. Vol. 36, Iss. 2. Pp. 313-321.
- Vadivambal, R., Jayas, D. S., & White, N. D. G. (2007). Wheat disinfestation using microwave energy. - *Journal of Stored Products Research*. Vol. 43, Iss. 4. Pp. 508– 514.
- Wang, J., Sun, B., Tsao, R. (2019). *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*. Singapore: Springer Verlag. 260 lk.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M., Meersseman, K., Michiels, C. W. (2003). Decontamination of seeds for seed sprout production by high hydrostatic pressure. - *Journal of Food Protection*. Vol. 66. Pp. 918–23.
- Xu, Y., Sun, X. S., Wang, D. (2019). Wheat. - *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*. Ch. 1. Pp. 3-20.
- Yacoubian, J. (2021). Oat vs Wheat - Health impact and Nutrition Comparison. - Haigazian Medical University. [WWW] <https://foodstruct.com/compare/oats-vs-wheat> (12.01.2022)
- Yan, S., Wu, X., Dahlberg, J., Bean, S. R., MacRitchie, F., Wilson, J. D., & Wang, D. (2010). Properties of field-sprouted sorghum and its performance in ethanol production. - *Journal of Cereal Science*. Vol. 51. Pp. 374–380.
- Yang, Z., Piironen, V., Lampi, A. M. (2019). Epoxy and hydroxy fatty acids as non-volatile lipid oxidation products in oat. - *Food Chemistry*. Vol. 295. Pp. 82-93.
- Zhou, M., Hassan, M. J., Peng, Y., Liu, L., Liu, W., Zhang, Y., & Li, Z. (2021). γ -Aminobutyric Acid (GABA) Priming Improves Seed Germination and Seedling Stress Tolerance Associated With Enhanced

Antioxidant Metabolism, DREB Expression, and Dehydrin Accumulation in White Clover Under Water Stress. In: *Frontiers in Plant Science*. Vol. 12. Pp. 1-14.

Zhou, S., Litao, T., Liu, L. (2019). Oats. In: *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*. Ch. 11. Pp. 185-206.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Ksenia Šestopalova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

“Kõrge temperatuuri ja happega töötlemise mõju idandatud terade kvaliteedile”,

mille juhendajad on Anna Traksmäe ja Mary-Liis Kütt,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

22.05.2021

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud üks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.