

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

Keemia- ja materjalitehnoloogia teaduskond

Toiduainete instituut

Leivahallituste isoleerimine ja identifitseerimine

Magistritöö

Marju Seer

Toidutehnika ja tootearenduse õppekava

TALLINN 2015

TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Faculty of Chemical and Materials Technology

Department of Food Processing

**Isolation and identification of bread-contaminating
moulds**

Master thesis

Marju Seer

Food engineering and product development

TALLINN 2015

Deklareerin, et käesolev magistritöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud või (avaldamata tööde korral) toodud autorlus välja põhitekstis.

Autor: Marju Seer

.....

(allkiri ja kuupäev)

Üliõpilase kood: 132822KATMM

Töö vastab kehtivatele nõuetele:

Juhendaja: Marianna Bessmeltseva

Tallinna Tehnikaülikool, toiduainete instituut. Doktorant

.....

(allkiri ja kuupäev)

Kaasjuhendaja: Inga Sarand

Tallinna Tehnikaülikool, toidutehnoloogia õppetool. Vanemteadur

.....

(allkiri ja kuupäev)

Kaitsemisele lubatud "....." 201.....a.

Toiduteaduse õppetooli juhataja professor Raivo Vokk

.....

ANNOTATSIOON

Hallitused on kõige levinumad mikrobioloogilist riknemist põhjustavad organismid küpsetistes, sealhulgas rukkileivas. Kuna küpsetamine hävitab seente eosed leivas, sõltub leiva saastumise määr ja hallitusseente mitmekesisus suurelt osalt tööstuse keskkonnatingimustest, kus toimub leiva viilutamine ja pakendamine. Antud uuringus kasutati kaheksat erinevat rukkileivasorti viielt erinevalt pagaritööstuselt. Need leivad valiti pikaajaliseks säilitamiseks (kuni 1 kuu). Leiva pinnal kasvanud erineva morfoloogiaga seened isoleeriti ning kultiveeriti pärmiekstraktiga agaril (*Yeast extract agar, YES*) koos β -tsüklodekstriini lisandiga. Aflatoksikogeense aktiivsuse uurimiseks eksponeeriti Petri tasse UV valguse käes.

Isoleeritud seened identifitseeriti kasutades M13 praimereid ja juhuslikult amplifitseeritud polümorfse DNA-PCR (*randomly amplified polymorphic DNA-PCR, RAPD-PCR*) ning 26S rDNA sekveneerimist. Tuvastati järgmised hallitusseente liigid: *Penicillium cinerascens*, *Penicillium citrenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus intermedius*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus oryzae*.

Eksperimendi käigus isoleeriti leiva pinnalt ka kaks pärmiliiki *Pichia anomala* ja *Saccharomyces cerevisiae*, mis pärssisid nähtavalt hallituste kasvu. Seetõttu valiti need pärmi isolaadid edasisteks uuringuteks antimikroobsete omaduste suhtes. Katsete käigus selgus, et antud pärmi isolaadid aeglustasid seeneniidistiku teket ja sporuleerumise protsessi.

Märksõnad: Leib, hallitusseened, identifitseerimine, aflatoksiinid, PCR, fluorestsents, aflatoksiin, ohratoksiin

Töö koosneb 39 leheküljest, 2 tabelist ja 13 joonisest.

ABSTRACT

Fungi are the most frequent cause of microbial spoilage in baking products including rye bread. As baking process destroys fungal spores in bread, post-processing contamination rate and biodiversity of bread spoiling moulds will totally depend on bakery environment. In current study 8 rye bread sorts from 5 different bakeries were selected for long-term storage (up to 1 months). Fungal colonies with different morphology developed on the bread surface during storage were isolated and cultivated on *YES* agar with the addition of β -cyclodextrin. Aflatoxicogenic activity of isolated fungi was studied using treatment of agar plates with UV.

DNA fingerprintints of isolated fungi were obtained using RAPD-PCR with M13 primers. Single representatives of each RAPD group were chosen for identification with Sanger sequencing. Selected isolates were identified as *Penicillium cinerascens*, *Penicillium citrenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus intermedius*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus oryzae*, *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* species.

P. anomala and *S. cerevisiae* yeast species were selected for further antimicrobial studies as they were isolated from rye breads which demonstrated the longest mould-free shelf-life. Ability of selected strains to suppress the growth of reference mould was evaluated, revealing the suppressing effect on the growth of fungal mycelium and sporulation process.

Keywords: Bread molds, identification of aflatoxins, PCR, fluorestsents, aflatoxin, ochratoxin

The work consists of 39 pages, 2 tables and 13 figures.

Sisukord

Kasutatud Lühendid	8
Sissejuhatus.....	9
1 Kirjanduse ülevaade.....	10
1.1 Rukkileib	10
1.2 Leiva mikrobioloogiline riknemine.....	10
1.2.1 Bakteritega põhjustatud riknemine	11
1.2.2 Pärmidega põhjustatud riknemine.....	11
1.2.3 Hallitusseente põhjustatud riknemine	12
1.3 Leibades levinud mükotoksiinid	12
1.3.1 Aflatoksiinid	13
1.3.2 Ohratoksiin A.....	14
2. 3 Fusaariumi toksiid.....	15
1.3.3 Deoksünivalenool ehk DON toksiid	16
1.3.4 Zearalenon ehk ZEN.....	16
1.4 Hallitusseente identifitseerimine	17
1.4.1 Morfoloogilised uuringud	17
1.4.2 Molekulaarsed uuringud	17
1.4.2.1 RAPD-PCR.....	17
1.4.2.2 DNA sekveneerimine	18
2 Eksperimentaalne osa.....	19
2.1 Leiva näidised ja hallituste isoleerimine	19
2.2 DNA eraldamine hallituse kultuuridest.....	19
2.3 RAPD PCR M13 praimeriga.....	19
2.4 Elektroforees agarosgeelis.....	20
2.5 DNA sekveneerimine	20

2.6	Aflatoksikogeense aktiivsuse uurimine hallituseente isolaatides	21
2.7	Hallitusvastase aktiivsuse uurimine pärmseente isolaatides	21
3	Tulemused ja arutelu	23
3.1	Hallituse isoleerimine ja identifitseerimine.....	23
3.1.1	Isolaatide morfoloogiline mitmekesisus	23
3.2	Isoleeritud seente genotüüpiseerimine ja identifitseerimine	27
3.3	Hinnang uuritud isolaatide mükotoksiinide aktiivsusele	29
3.4	Potentsiaalsete hallitusvastaste omaduste tuvastamine pärmseente isolaatides	31
	Järeldused.....	33
	Kokkuvõte.....	34
	Summary	35
	Kasutatud kirjandus	36

KASUTATUD LÜHENDID

AF – aflatoksiin

AFB1 – aflatoksiin B1

AFB2– aflatoksiin B2

AFG1 – aflatoksiin G1

AFG2 – aflatoksiin G2B. –*Bacillus*

DON – deoksünivalenoon

OTA – ohratoksiin A

PCR – polümeraasahelreaktsioon, ing. k. *polymerase chain reaction*

RAPD – juhuslikult amplifitseeritud polümorfne DNA, ing. k. *randomly amplified polymorphic DNA*

ZEN - zearalenoon

UV – ultraviolet valgus

YES – pärmiekstrakti agar (yeast extract sucrose agar)

YPD-pärmiekstrakti peptooni, dekstroosi agar (*Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*)

Sissejuhatus

Rukkileiva tarbimisel Eestis on pikk ajalugu. Rukkileib sisaldab palju vitamiine ja mineraalaineid ning on kiudainerikas, mis teeb selle pagaritoote tasakaalustatuks ja tervislikuks toiduaineks. (Kulp *et al.*, 2003).

Eestis toodetakse umbes 150 erinevat rukkileiva sorti. Kõige rohkem tarbitakse rukkisegaleiba (50.1-89.9% rukkijahu) ning rukkileiba, milles rukkijahu sisaldus on suurem kui 90% (Viiard, 2014, 12).

Nagu kõik kõrge vee aktiivsusega toiduained on ka leivad vastuvõtlikud bakterite ja/või seente poolt põhjustatud mikrobioloogilisele riknemisele. Erinevalt nisujahust tehtud leibadest, mis on vastuvõtlikud bakteriaalsetele haigustele, on rukkileiva mikrobioloogiline riknemine põhjustatud peamiselt seentest (hallitus- ja pärmseentest) (Saranraj *et al.*, 2012).

Hallitusseente poolt põhjustatud tööstuslikud kaod varieeruvad 1-5 %, sõltuvalt rukkileiva sordist, aastaajast ja tootmise viisist. Leivad võivad olla saastunud väga mitmesuguse hallitusega, kuid *Penicillium* ja *Aspergillus* liikidele kuuluvad hallitused on kõige levinumad. Mõlema sugukonna esindajad on üldtuntud mükotoksiinide tootjad, mis tähendab, et peale majandusliku kahjumi, võivad need põhjustada ka terviseprobleeme. (Legan, 1993)

Antud magistritöö eesmärk oli:

- i:** Isoleerida ja identifitseerida rukkileibade säilimise käigus nende pinnalt pärm- ja hallitusseeni.
- ii:** Tuvastada saadud hallitusseente isolaatide mükotoksikogeenne aktiivsus, kasutades mikrobioloogilisi analüüsimismeetodeid
- iii:** Uurida isoleeritud pärmide hallitusvastast aktiivsust.

1 Kirjanduse ülevaade

Kirjanduse ülevaade annab teavet leivast üldiselt, leiva mikrobioloogilist rikkemist põhjustavate mikroorganismide ja mükotoksiinide kohta. Samuti saab infot hallitussente identifitseerimise kohta.

1.1 Rukkileib

Rukkileivaks nimetatakse leiba, mille koostises on vähemalt 90% rukkijahu. Kui rukkijahu osa leiva retseptuuris on väiksem (50,1-89,9%), siis saadud pagaritoodet nimetatakse rukki-segaleivaks (Kapten-Leppik, 2007).

Traditsioonilist rukkileiba tehakse piirkondades: Põhja-, Kesk-, ja Ida-Euroopa (kaasaarvatud Baltiriigid), mida teatakse ka rukkikasvatus maadena. Baltimaades on rukkileiva tarbimine väga levinud. Eestis tarbitakse aastas umbes 19,9 kg rukkileiba inimese kohta, Lätis ja Leedus on need numbrid vastavalt 14,7 ja 52,3 kg. Klassikaline Eesti rukkileib valmistatakse täistera rukkijahust, kasutades juuretist, mis annab leivale iseloomuliku hapu maitse ning aroomi. Paljudes retseptuurides puuduvad ka pagaripärmid, mis tähendab, et leiva kerkimisel osalevad ainult juuretisest ning toorainetest pärinevad mikroorganismid. (Viird, 2014, 12)

Tänapäeva tarbija eelistab just traditsiooniliselt valmistatud rukkileiba, mis on tehtud ilma E-ainete lisamiseta. Konservantide puudumine leivas tähendab tihti, et mikrobioloogiline rikkemine muutub peamiseks leiva säilivusaega limiteerivaks faktoriks. (Saranraj *et al.*, 2012)

1.2 Leiva mikrobioloogiline rikkemine

Leiva mikrobioloogiline saastumine võib toimuda igas tootmisetapis ning sõltub nii toormaterjalist kui ka ümbritsevast keskkonnast (nt. õhust, tootmispindadelt ning seadmetest). (Saranraj *et al.*, 2012)

Saastumist põhjustavate mikroorganismide järgi saab leiva mikrobioloogilised haigused jagada kolmeks grupiks: bakterite, pärmseente ja hallitussente poolt põhjustatud .

1.2.1 Bakteritega põhjustatud riknemine

Leiva bakteriaalse riknemise kõige levinumateks mikroorganismideks on sugukonda *Bacillus* kuuluvad mikroorganismid. Need on gram-positiivsed, aeroobsed või fakultatiivsed anaeroobsed, spore moodustavad kepikesed. Leibade saastumine antud bakteritega toimub tavaliselt toorainete (näiteks suhkrul, jahu, pärmide) ja tootmisseadmete kaudu. Jahu madalale vee aktiivsusele vaatamata näitavad uuringud, et paljud jahusordid on saastunud *Bacillus* sugukonda kuuluvate bakteritega. (Yibar *et al.*, 2012)

Bacillus sugukonna esindajad tekitavad leival haigust nimega „kartuli- või venimishaigus”. Kõige sagedamini põhjustavad „kartulihaigust” *Bacillus subtilise* tüved, kuid *Bacillus licheniformis*, *Bacillus magaterium* ja *Bacillus cereus* on samuti seostatud selle haigusega. Kartulihaiguse esimeseks sümptomiks on puuviljane kõrvalaroom, mis sarnaneb ananassi lõhnaga. Hiljem muutub leivasisu haigusetekitaja poolt toodetud proteolüütiliste ja amülolüütiliste ensüümide toimele värvituks, pehmeks ja kleepjaks, mis teeb saastunud leiva söödamatuks. (Saranraj *et al.*, 2012)

Batsillide põhjustatud leiva riknemine esineb tavaliselt suveperioodil, kui keskkonnatingimused muutuvad soojemaks ja niiskemaks. Kuna enamuse *Bacilluse* saastatusest tuleb töötlemata toorainest, oleks vajalik alati kontrollida toorainete mikrobioloogilist puhtuseastet ning vältida töötlemata toorainete (näiteks seemnete) kasutamist. (Saranraj *et al.*, 2012)

Bacilluse esinemine toidus võib põhjustada inimestel terviseriske. Näiteks toodavad *B. cereus* liiki kuuluvad bakterid vähemalt kahte tüüpi toksiine, millest üks on termostabiilne. Batsillusega saastumist esineb rohkem nisujahust tehtud leibades. Rukkiitaigna suhteliselt madal pH kaitseb rukkileibasid bakteritega põhjustatud riknemise eest, kuid ei pärsi kahjulike seente kasvu (Yibar *et al.*, 2012).

1.2.2 Pärmidega põhjustatud riknemine

Leiva pinnal võivad areneda nii aeroobsed kui ka anaeroobsed pärmid, moodustades kriiditükkidega sarnanevaid valgeid plekke. Just sellise sarnasuse tõttu nimetatakse pärmide põhjustatud infektsiooni leiva kriidihaiguseks. Kõige levinumad kriidihaiguse tekitajad on *Pichia butonii*, *Pichia anomala* ja *Endomyces fibuliger* liikidesse kuuluvad pärmid (Saranraj *et al.*, 2012). *P. burtonii* ja *E. fibuliger* kasvavad hüüfidena ja seetõttu sarnanevad nad

pealtnäha hallitustega, kuigi tegu on pärmidega. Pärmidega tekitatud leivainfektsioonid ilmnevad kahel erineval viisil. Esiteks, nähtav pindmine kasv, mille tulemusena moodustuvad leiva pinnal valge- või roosakavärvilised plekid. Teiseks, fermentatiivne riknemine, mida iseloomustab alkoholne kõrvalaroom. Fermentatiivset riknemist põhjustavad pärmide hulka kuuluvad *P. Burtonii* tüved. Kuna nakatumine toimub saastunud töövahendite ja masinate kaudu, on hügieeni kontrollimine leivatööstuses äärmiselt oluline (Saranraj *et al.*, 2012).

1.2.3 Hallituseente põhjustatud riknemine

Vaatamata sellele, et pärmide tekitatud leivainfektsioonid põhjustavad majanduslikku kahju, ei ole pärmiga saastunud leibade tarbimine tavaliselt inimese tervisele ohtlik. (Deschuyffeleer *et al.*, 2011). Leiva saastumine hallituseentega on tervisele ohtlik, kuna seente poolt toodetud toksilised metaboliidid akumulieruvad leiva sisus. (Saranraj *et al.*, 2012)

Plastikkotti pakendatud leiva säilivusajaks märgitakse tihti isegi 9-10 päeva, samas aga tekivad hallituseentega nakatunud leibade pinnal hallituse täpid juba mõni päev pärast pakendamist (Lund *et al.*, 1996). Kuna optimaalne küpsetustemperatuur hävitab seente eosed, siis tuleb ennetada saastumist pindade ja õhu kaudu. Hallitused satuvad leivale tavaliselt tööstusseadmetelt leiva jahutamisel, viilutamisel ja pakkimisel. Leiva riknemist põhjustavad üldjuhul *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Eurotium sp.*, *Aspergillus sp.* ja *Monilia sitophilia*. (Saranraj *et al.*, 2012)

1.3 Leibades levinud mükotoksiinid

Mükotoksiinid (Kreeka keeles: „*Mykes*“ tähendab seen ja Ladinakeeles „*toxicum*“: mürk või toksiin) on sekundaarsed hallituseente metaboliidid, mis avaldavad mõju nii inimeste kui ka loomade tervisele. Põllumajandussaaduste riknemise tõttu põhjustavad mükotoksiinid märkimisväärset materiaalselt kahju. Põllumajanduses on peamised mükotoksiinid aflatoksiinid (aflatoksiin B1, B2, G1, G2), ohratoksiin A (OTA), zearalenone (ZEN), trihhosteenid (eriti deoksünivalenoon, ehk DON, T-2 ja HT-2) ja fumonisiinid. Kirjanduse andmetel kuuluvad mükotoksiine tootvad hallitused peamiselt kolme perekonda: *Aspergillus*, *Fusarium*, ja *Penicillium*. (Schmidt, 2003)

Paljud hallituseened on võimelised tootma rohkem kui üht toksiini. Mükotoksiinid võivad sattuda leiba, kas otse toormaterjalidega (jahu, seemned), või siis valmisleiva saastumisel toksikogeensete hallituste tüvedega. Nisu ja rukkiterade saastumine võib toimuda juba põllul

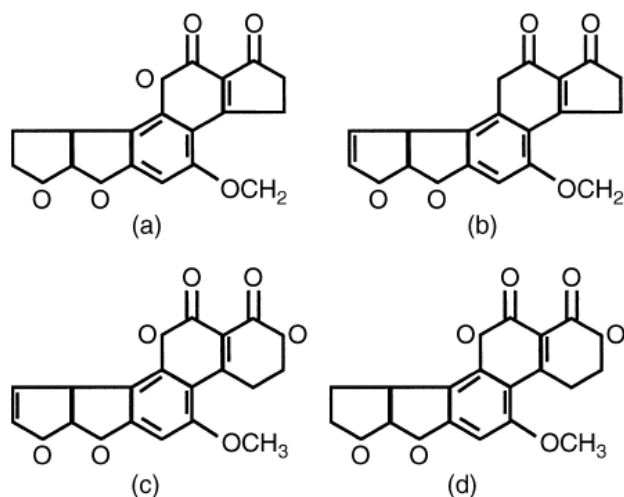
(enne saagikoristust), või siis saagikoristuse, töötlemise ning transportimise ajal. Kõige levinumad hallituse liigid, mis kahjustavad teraviljade saake juba põllul, kuuluvad sugukonda *Fusarium*. Liigid *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. tricinctum* ja *F. roseum* satuvad teraviljadele otse mullast. Antud liigid toodavad palju erinevaid toksine (ZEN, DON, T-2 ja HT-2). (Schmidt, 2003)

Leiva küpsetamine hävitab seente eosed, mis tähendab, et valmisleibade saastumisel mükotoksiinidega mängivad rolli just leivatööstuse keskkonnast pärinevad hallitused ehk hoiustamisel saastavad hallitused. Hoiustamisel saastavad hallitusseente hulka kuuluvad perekondade *Penicillium* ja *Aspergillus* esindajad, sealhulgas ohratoksiini A tootvad *Penicillium verrucosum* ja *Penicillium nordicum* ning palju *Flavi* ja *Nigri* üksusesse kuuluvad *Aspergillus*-ed (nt. *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* ja *Aspergillus ochraceus*), mis on seotud afla- ja ohratoksiinide tootmisega (Chu,2003).

1.3.1 Aflatoksiinid

Aflatoksiinid (A.flavus-toksiinid, ehk AF toksiinid) (Joonis 1) on enim uuritud toksiinide grupp ja seda toodavad väga paljud *Aspergillus* hallitusseente liigid. Pitt *et al.*, järgi koosneb perekond *Aspergillus* enam kui 180 liigis (Pitt, *et al.*, 2000). Selle perekonna esindajad moodustavad spoore, mis tagavad seenete laialdase leviku ja tänu millele elavad need üle ka ebasoodsamad keskkonnatingimused. Soodsate tingimuste tekkel arenevad spooridest hallitusseened. (Moss, 2002). *Aspergillus* leidub pinnases, taimede lehtedel, lilledel ja on inimestele ja loomadele patogeeniks (Marin 2013, Calvo, 2004). Aflatoksiine tootvad *Aspergillus*ed kuuluvad *Flavi* üksusesse. Kõige levinumad aflatoksikogeensed hallitused on *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Aspergillus niger* ja *Aspergillus bombycis*. (Calvo, 2004)

Nagu mitmed teisedki heterotsükliilised ühendid on aflatoksiinid fluorestsereivad ja on selle järgi eristatavad. Nii aflatoksiin G1 (AFG1), kui ka aflatoksiin G2 (AFG2) toodavad kollakasrohelist fluorestsentsi, kuid aflatoksiin B1 (AFB1) kui ka aflatoksiin B2 (AFB2) toodavad UV valguse käes sinist fluorestsentsi. (Hussein *et al.*, 2001)



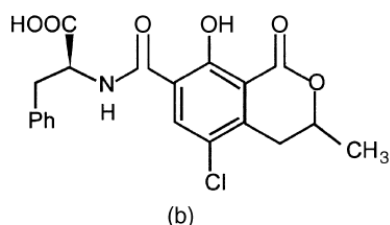
Joonis 1. Aflatoksiinide ehitus. (a) aflatoksiin B1, (b) aflatoksiin B2, (c) aflatoksiin G1, (d) aflatoksiin G2, (Calvo, 2004)

Aflatoksiinide sisaldust toodetes tootmisüksustes üldjuhul spetsiaalselt ei testita ja seetõttu jõuavad müüki nakatunud tooted. (Calvo, 2004)

Aflatoksiinid on tuntud mutageenid ja kantserogeenid ning nende sattumine inimese seedetrakti on otseselt seotud maksavähiga. Aflatoksiin põhjustab rakkudes mutatsioone ja seetõttu seostatakse aflatoksiini erinevate vähkkasvajate tekkega. (Calvo, 2004)

1.3.2 Ohratoksiin A

Ohratoksiin A (OTA) on isokumariini ja fenüülalaniini derivaat (Joonis 2) mille organismi sattumine on seotud neerude haigusega ja maksa nekroosiga. Peale selle on ohratoksiinil ka immuunsüsteemi ning DNAd kahjustav toime. Ohratoksiini toodavad perekondadesse *Aspergillus* ja *Penicillium* kuuluvad hallitused (Calvo, 2004, Hussein *et al.*, 2001).

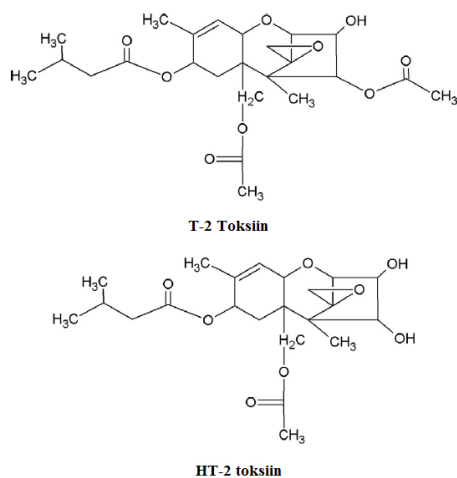


Joonis 2. Ohratoksiini struktuur. (Calvo, 2004)

Erinevalt aflatoksikogeensetest *Aspergillustest* ei ole OTA tootmine seotud kindla taksonoomilise grupiga, vaid on hajunud erinevate üksuste vahel. Peale *A. ochraceus* liigid toodavad OTAt ka *A. glaucus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* ning palju teised *Aspergillus* esidajad. (Cabanés *et al.*, 2010)

2. 3 Fusaariumi toksiinid

2.3.1 T-2, HT-2 toksiinid



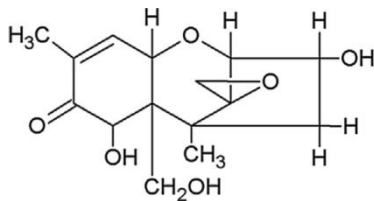
Joonis 3. T-2 ja HT-2 toksiini molekulaarne ehitus (Marin 2013)

T-2 toksiini (Joonis 3) peamine tootja on *Fusarium sporotrichioides* (Calvo, 2004). Antud toksiini toodavad veel *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. pseudograminearum*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. venenatum* (Chu, 2003, Frisvad *et al.*, 2007). Toksiini leidub enim maisis, nisus, odras, riisis, rukkis ja teistes teraviljades. Optimaalne temperatuur antud mükotoksiini tootmiseks on 15°C. Kõrgemal temperatuuril (mõnes kirjandusallikas ka 22,5 °C) toodetakse toksiini H-T2 (Calvo, 2004, Chu, 2003)

ToksiinT-2 mõjutab paljusid organeid, sealhulgas närvisüsteemi, immuunsüsteemi, seedetrakti (Chu, 2003).

1.3.3 Deeksünivalenool ehk DON toksiin

Toksiini DON (joonis 4) toodab põhiliselt *F. graminearum* ja teised lähedased hallitusseened nagu *F. culmorum* ja *F. crookwellense*. Seda toksiini leidub sealhulgas odras, kaeras, sorgos ja rukkis. Ülemaailmselt on suurenenud teraviljade saastumine DON toksiiniga. Kui terade arenemise ajal on ilmastik külm ja niiske, siis on viljaterad *F. graminearum* seene suhtes eriti tundlikud. Nimetatud liik tekitab viljahaiguse nimega „kõrreliste juuremädanik”, tootes samal ajal toksiini. Optimaalne temperatuur toksiini tootmiseks on 24°C. Toksiini DON leidub hulgaliselt Soome ja Ameerika ühendriikide taliviljades. (Chu, 2003)



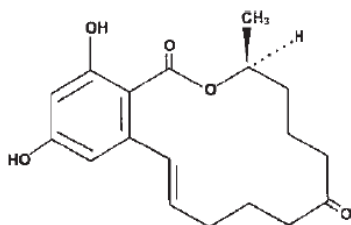
Joonis 4. DON toksiini molekulaarne ehitus

Toksiin DON võib põhjustada kehakaalu kaotust (ka anoreksiat), immuunpuudulikkust, iiveldust, oksendamist, peavalu ja palavikku. Looduslikult saastunud vilja tarbimine on nii inimesele kui ka loomadele ohtlik (Chu, 2003, Calvo, 2004).

1.3.4 Zearalenon ehk ZEN

Toksiini ZEN (Joonis 5) toodavad *Fusarium crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* (Frisvad *et al.*, 2007).

Toksiini ZEN seostatakse östrogeeni ja steroidireseptoriga, mis stimuleerivad valgusünteesi ja imiteerivad hormonaalset aktiivsust, tekitades naiselikke tunnuseid meestel ning viljatust naistel (Peraica *et al.*, 1999). Looduslikult saastuvad ZEN-iga enamasti teravilja (mais ja nisu) terad (Chu, 2003).



Joonis 5. ZEN toksiini ehitus. (Chu, 2003)

1.4 Hallituseente identifitseerimine

Hallituseente identifitseerimiseks kasutatakse kas morfoloogilisi või siis molekulaarseid meetodeid.

1.4.1 Morfoloogilised uuringud

Morfoloogiline identifitseerimine leiab aset pärast seda, kui kultuur on kasvanud selektiivsöötmel. Morfoloogiline tüpiseerimine hõlmab endas kolooniate iseloomustamist (värvust, mütseeli pikkus, spooride olemasolu jne.) ning kultuuri mikroskoopilisi uuringuid (koniidide ja koniidikandjate ehitus ja värv) (Varga *et al.*, 2011).

Morfoloogia järgi identifitseerimine on suhteliselt odav ja nõua erilisi ressursse. Peamised vahendid on mikroskoop ja söötmed. Selle meetodi järgi identifitseerimine on keerukas, sest on palju ühe kuju ja välimusega hallituseeni mis teeb nende identifitseerimise peaaegu võimatuks (Varga *et al.*, 2011).

1.4.2 Molekulaarsed uuringud

Molekulaartasemel meetodid on aeganõudvamad ja kallimad, võrreldes morfoloogilise identifitseerimisega, kuid nad on väga täpsed. Enamuse molekulaarsete meetodite põhjal tehtavates testides leiab aset polümeraas ahelreaktsioon ehk PCR

PCR on molekulaarne *in vitro* tehnika, mis on laialdaselt kasutusel amplifitseerimaks teatud DNA sekvensi, mis asetseb kahe teadaoleva sekvendi vahel. Selle leiutas Kary Mullis 1983 aastal. Algpärane tehnika oli lihtsustatud, et ühe- või kaheaheelalist DNA võib kasutada alusmallina. Oligonukleotiidide praimerid on lühikesed üheaheelalised DNA molekulid. Kui amplifikatsioon toimub, siis seonduvad komplementaarse järjestuse sekvendid DNA proovile, mis on eelnevalt denatureeritud. Neid amplifitseeritud fragmente võib seejärel eraldada ja visualiseerida agarosgeelil. PCRi iseloomustab kiirus, tundlikkus, stabiilsus ja reprodutseeritavus. (Hoff, 2012)

1.4.2.1 RAPD-PCR

RAPD (juhuslikult amplifitseeritud polümorfne DNA) erineb tavalisest PCR-st ainult ühe juhuslikult valitud järjestusega lühikese praimeriga kasutamise poolest. Et võimaldada praimerile kinnitumist antud DNA-le, on reaktsioonide spetsiifilisust vähendatud, lubades

praimeril seonduda ka vähem sarnase regiooniga. Kui selle praimeri seostumiskohad on mõne tuhande aluspaari piires ja asuvad erinevates ahelates, amplifitseeritakse nende piirkondade vahele jääv DNA järjestus (Williams *et al.*, 1990). Seente puhul võib selle järjestuse pikkus varieeruda 200-3500 bp. Saadud fragmente lahustatakse ja visualiseeritaks agarosgeelis, ning saadud mustrite baasil tehakse geneetiline tüpiseerimine. See tehnika on esmane näide üksik praimeri amplifitseerimise reaktsioonist. (Hoff, 2012)

1.4.2.2 DNA sekveneerimine

Kõige täpsema tulemuse PCR'i abil amplifitseeritud DNA'st on võimalik saada antud piirkonna nukleotiidide järjestuse määramisega sekveneerimisel ning saadud tulemuste võrdlemisel avalikus andmebaasides olevate järjestustega, kasutades BLAST programme. Sekveneerimise huvipiirkondades hõlmab endas domeeni D1 ja D2 26S geenis, 18S ja 5.8S rRNA geeni. Paljud varasemad kirjandusallikad kinnitavad amplifitseerimise ja ITS regiooni sekveneerimise kasulikkust kiireks hallituse identifitseerimiseks. Varasemalt amplifitseeritud ja sekveneeritud regioonid on leitavad online portaalides ja seega on lihtsam teha kindlaks seente tüve konkreetse perekonna liik ning see ka kirja panna. (Hoff, 2012)

2 Eksperimentaalne osa

2.1 Leiva näidised ja hallituste isoleerimine

Kaheksa erinevat viilutatud rukkileiba osteti viielt erinevalt Eesti pagaritootjalt. Leivatööstused tähistati tähtedega „A“, „B“, „C“, „D“ ja „E“. Leivatööstusest „A“, „B“, „D“ saadi kaks erinevat leivasorti (tähistus vastavalt AI ja AII, BI ja BII ning DI ja DII). Leivatööstustest „C“ ja „E“ koguti kummastki üks leivasort (tähistused CI ja EI). Leivad hoiustati toatemperatuuril kuu aega, et hallitus saaks kasvada ja areneda. Hallitusseente kasvu katseleibadel kontrolliti 1,2,3 ja 4-nda nädala möödumisel hoiustamise algusest. Neljanda nädala lõpus eraldati leiva pinnalt erineva morfoloogiaga hallitusseente kolooniad ja külvati Sabroud Dextrose agarile koostisega (g/l): pepton 10, D-glükoos 40, agar 12, pH = 5,3. Seejärel inkubeeriti hallitusseeni 7 päeva, 25°C juures. Isolaatide puhaskultuure (kokku 23) kasvatati Sabraud Dextrose agaril 7 päeva, 25°C juures ja hoiustati seejärel +4 °C juures edasisteks uuringuteks.

2.2 DNA eraldamine hallituse kultuuridest

Hallituste puhaskultuure kultiveeriti 1 ml vedelas Sabraud Dextrose söötmes 5 päeva, 25 °C juures. Puhaskultuuride biomassist eraldati DNA kasutades GenElute Bacterial Genomic DNA Kit'i (Sigma-Aldrich., USA), järgides tootjapoolset kasutusprotokolli.

2.3 RAPD PCR M13 praimeriga

PCR reaktsioon viidi läbi 25 µl mahus, kasutades M13 praimerit (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'). PCR segu täpne koostis on näidatud Tabelis 1.

Tabel 1. Hallitusseente puhaskultuuridest eraldatud DNA RAPD PCR segu koostis

RAPD PCR segu sisaldab	
Kogus	aine
100 ng	DNA
4 µl /10 pmol/µl;	praimer M13
2,5 µl	DreamTaq Polymerase 10x puhvrit(Fermentas
5 µl	5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load(Solis BioDyne).
Autoklaavitud vett kuni lõppmahuni 25 µl.	

PCR viidi läbi seadmel Eppendorf Thermal Cycler (Eppendorf) järgmise programmiga:

- 95⁰C juures 15 minutit
- 40 korda tsükkel: 94⁰C juures 1 minut, 50⁰C juures 1 minut, 72⁰C juures 2 minutit
- 72⁰C juures 5 minutit
- Jahutamine kuni 10⁰C

2.4 Elektroforees agarosgeelis

RAPD – PCR produktide analüüsimiseks kasutati etiidiumbromiidi (0,5 µg/ml, 100 ml geelile) sisaldavat 1% agarosgeeli (Agarose Electrophoresis Grade, Invitrogen) 1 x TAE puhvris (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Elektroforees teostatati foreesivannis (Bio-Rad Wide Mini-Sub Cell GT, vooluallikas PowerPac Basic) 95 V juures 45 minuti jooksul. Geel pildistati läbivalgustamisel UV-kiirgusega.

2.5 DNA sekveneerimine

Uuritud mikroorganismide identifitseerimiseks kasutati D1/D2 regiooni 26SrDNA sekveneerimist. D1/D2 regiooni amplifitseeriti kasutades praimerid NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) ja NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Tabelis 2 on näidatud PCR segu koostis.

Tabel 2. PCR segu, DNA sekveneerimiseks

RAPD PCR segu sisaldas	
Kogus	aine
4,0 µl	praimerit NL1
4,0 µl	praimer NL4
10,0 µl	5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne)
Autoklaavitud vett kuni lõppmahuni 50 µl.	

PCR viidi läbi seadmel Eppendorf Thermal Cycler (Eppendorf), programmiga:

- 95 °C 15 minutit
- 35 korda tsükkel: 95 °C 30s, 57 °C 1 minut, 72 °C 1 minut

- 72 °C 10 minutit
- jahutamine kuni 10 °C

Saadud PCR produktid puhastati *GeneJet PCR purification Kit* (Fermentas) abil vastavalt tootja instruksioonile. Saadud DNA kontsentratsioon mõõdeti 260 nm juures seadmel NanoDrop1000 Spektrofotomeeter (Thermo Fisher Scientific Inc).

D1/D2 26SrDNA sekveneeriti Eesti Biokeskuses. Saadud DNA nukleotiidsed järjestust võrreldi andmebaasiga BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information), ning identifitseeriti uuritav mikroorganism.

2.6 Aflatoksikogeense aktiivsuse uurimine hallitusseente isolaatides

Kõik isolaadid kultiveeriti *Yeast extract sucrose* agaril (YES) järgmise koostisega (g/l): pärmiekstrakt 20, sahharoos 150, MgSO₄·7H₂O 0,5, agar 20, lisatud veel 0,3% metüül-β-tsüklodektriini. (Sigma, USA). Kultuure inkubeeriti 7 päeva, 25°C juures. Kultuure vaadeldi perioodiliselt UV (365nm) lambi all selleks, et tuvastada roheline/sinise fluorestsentsi olemasolu. Vastavalt fluorestsentsi ringi olemasolule/puudulikkusele kolooniate ümber agaril rühmitati isolaadid positiivseteks või negatiivseteks. Positiivse kontrollina kasutati hallitusseen *Aspergillus bombycis* tüve RAI-LI.

2.7 Hallitusvastase aktiivsuse uurimine pärmseente isolaatides

Kahe pärmi tüve võimalik hallitusvastane toime tuvastati kasutades “*dual agar plate*” uuringut. Esimeses katses kultiveeriti *Pichia anomala* ja *Sacharomyces cerevisia* puhaskultuure üleöö 30°C juures YPD vedelsöötmes (yeast extract peptone, dextrose) koostisega (g/l): bakteriaalne peptoon 20, pärmiekstarkt 10, glükoos 20. Seejärel inokuleeriti 5 µl kasvatatud pärmisuspensioon YPD agariga (agar 15 g/l) Petri tassi keskele. Petri tasse inkubeeriti 48h 30°C juures. Seejärel kaeti inkubeeritud tassid 20ml *Aspergillus niger* spooridega nakatatud Saboraud dextrose agariga. Pärast agari tardumist inkubeeriti tasse 7 päeva 25°C juures. Inhibeerimissoonte olemasolu kontrolliti iga 24h möödumisel.

Teises katses inkubeeriti 5 µl pärmisuspensiooniga inokuleeritud YPD agariga tasse 48h 30°C juures ning pärast seda kaeti tassid 20ml Saboraud dextrose agariga. Pärast agari

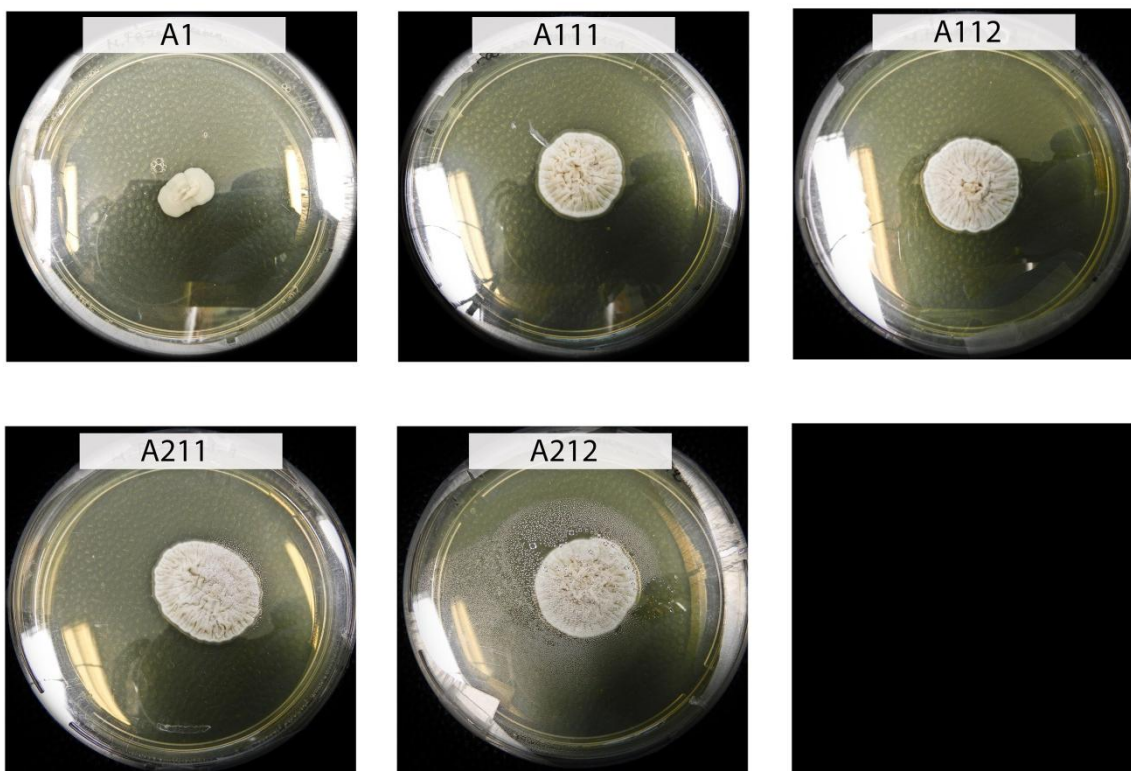
tardumist paigutati tassi keskele 5mm diameetriga *A. niger* mütseeli tükk. Tasse inkubeeriti 7 päeva 25°C juures. Inhibeerimissoonte olemasolu kontrolliti iga 24h möödumisel.

3 Tulemused ja arutelu

3.1 Hallituse isoleerimine ja identifitseerimine

3.1.1 Isolaatide morfoloogiline mitmekesisus

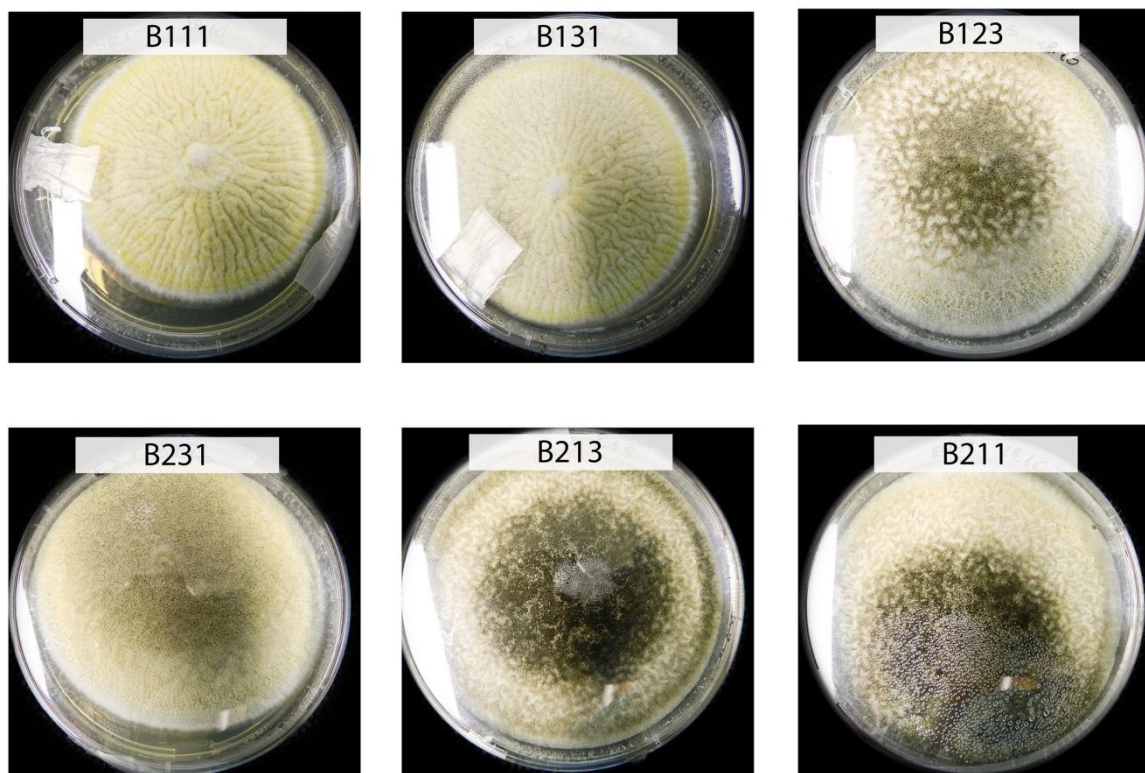
Võrreldes teiste tööstuste leibadega olid pikema säilivusajaga leivad AI, AII ja EI. Esimesed silmaga nähtavad hallitusekolooniad ilmsid jahusarnaste väikeste valgete täpikete näol, nendel leibadel kolmanda katsenäda lõpus. AI ja AII leibadelt isoleeritud hallitusseente seas oli ainult kaks morfoloogiliselt erinevat liiki (Joonis 6). Enim isoleeritud hallitus tootis YES agaril umbes 6 cm läbimõõduga valgeid kolooniaid, kindlaid märke spooride tekkest ei täheldatud. Üksikud isolaadid moodustasid väiksemaid kolooniaid ja ei moodustanud mütseeli. Mikroskoopeerimine näitas, et need on pärmseened.



Joonis 6. Isolaadid leivalt AI– *Pichia anomala*(pärm) ;A111,A112,A211, A212 – *Penicillium cinerascens*

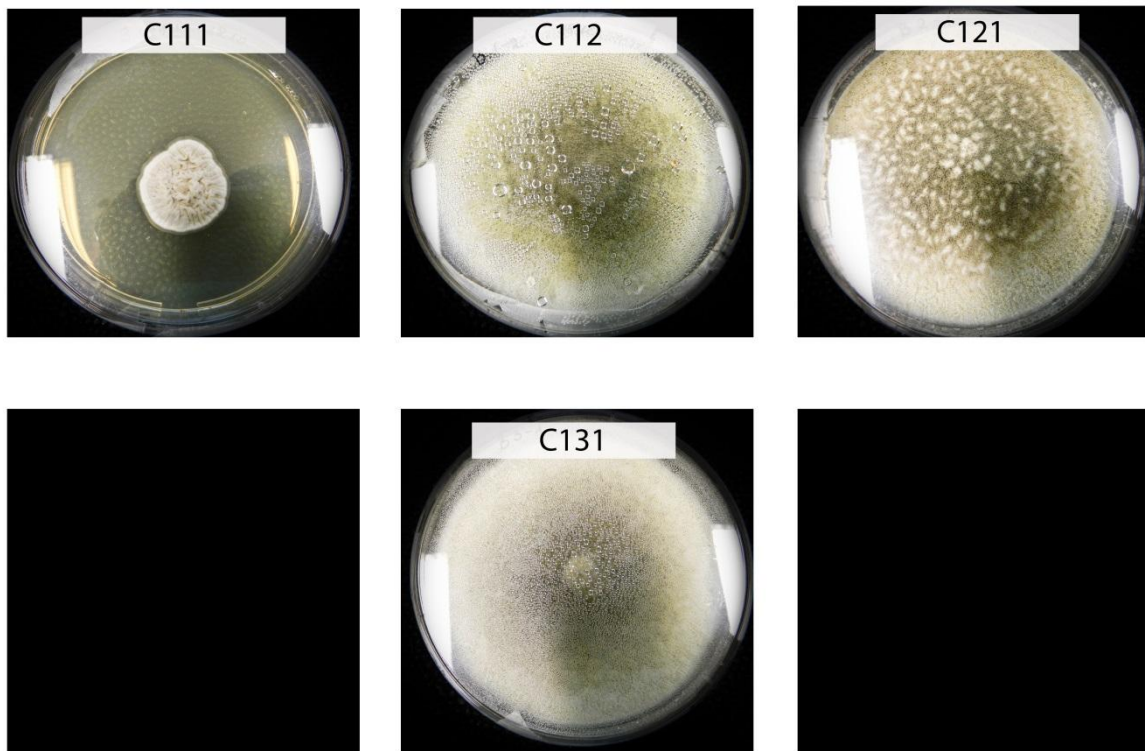
Tööstusest „B“ saadud leibadel BI ja BII ilmsid esimesed märgid hallitusseene poolt põhjustatud riknemisest esimese katsenäda keskel (Joonis 7). Leiva BI pinnalt isoleeriti

kahte tüüpi kolooniad: B111 ja B131 - väiksed, valged, velvetilised kolooniad ning B123 - oliivroheline koniidiga kolooniad (joonis 7). Leivas BII leiti ainult B123 tüüpi hallitusi. Esimese grupi hallitusseened tootsid YES agarsöötmel suuri, kahvatukollaseid, valge või kollase äärejoonega kolooniaid (B111, B132, joonis 7). Teine grupp tootis suuri, elevandiluukarva, kahvatu- kuni tume-oliiviroheliste koniidide ja rikkaliku sporulatsiooniga kolooniaid (B123, B213, B231, B211, joonis 7).



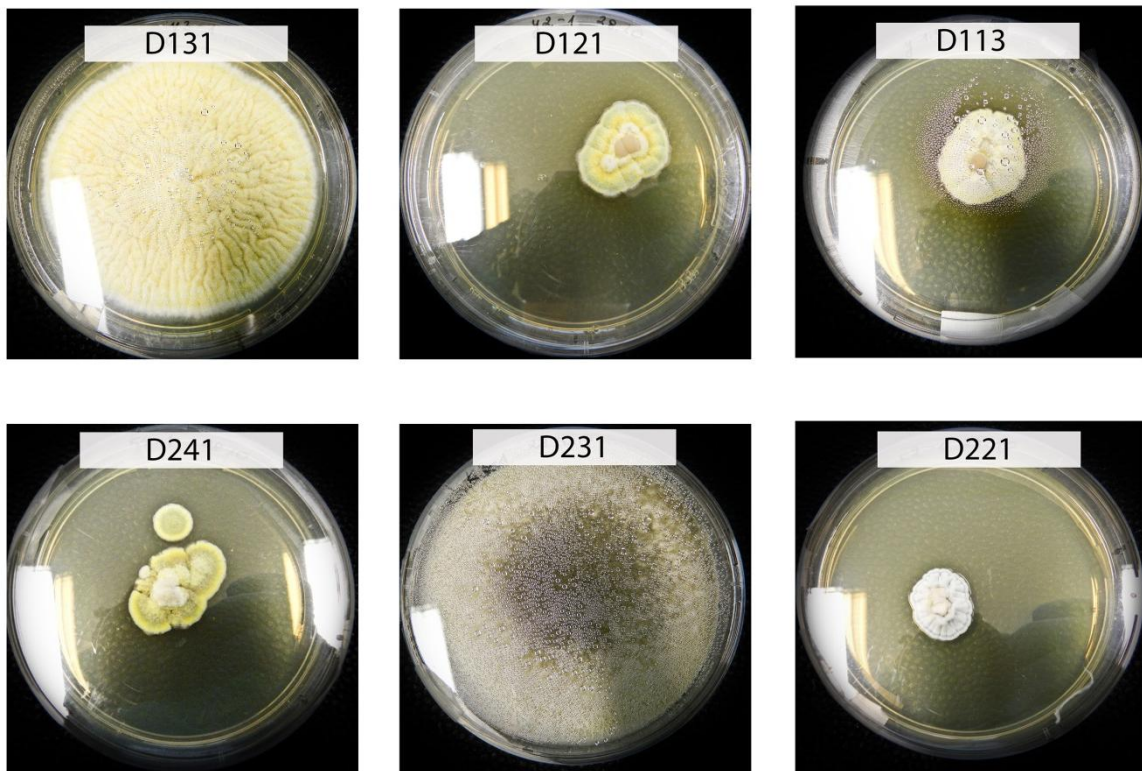
Joonis 7. Tööstuse „B“ hallitusseente isolaadid. B111, B131 – *Aspergillus oryzae*; B123, B231 – *Aspergillus niger*; B213, B211 – *Aspergillus brasiliensis*

Esimesel katsenädalal tuvastati hallitusseene poolt põhjustatud riknemist ka tööstuse „C“ katseleibadel. Eksperimendiperioodi lõpul tuvastati leiva CI pinnalt kahte tüüpi hallitusseene kolooniaid. Esimest tüüpi kolooniad - C111 olid kahvatuhallid, tundus, nagu oleks leivale jahu raputatud. Teist tüüpi kolooniad – C112, C121 ja C131 olid suured, pikkade valgete hüüfidega ja musta värvi koniididega. YES agarsöötmele täheldati esimest tüüpi hallitusseente puhul sarnasust hallitusseentega, mis esinesid tööstuse „A“ leibadel (C111, joonis 8). Teine grupp moodustas suure elevandiluukarva mustade-oliivirohelise spooridega kolooniaid, mis olid sarnased Tööstusest „B“ saadud isolaatidega (C112, C121 ning C131, joonis 8).



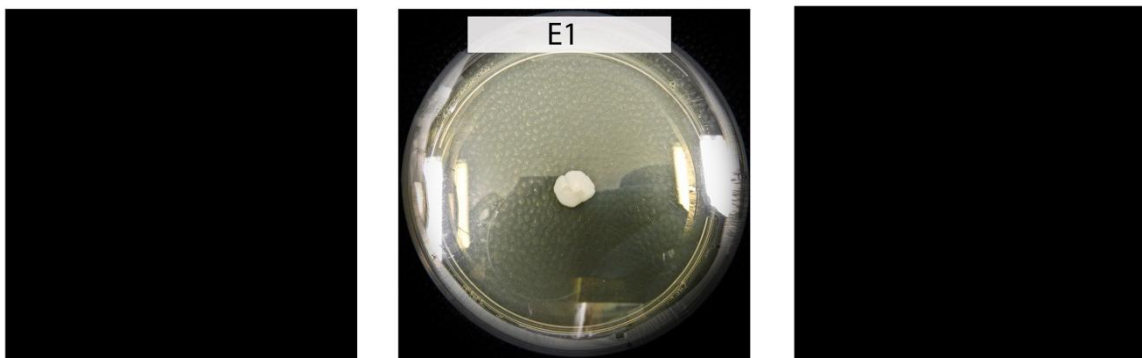
Joonis 8. Tööstuse „C“ hallitusseente isolaadid. C111– *Penicillium cinerascens*; C112, C121, C131– *Aspergillus niger*

Tööstusest „D“ saadud leibades DI ja DII täheldati esimesi hallitusseente täppe juba esimese katsenäda lõpus. Leibast DI isoleeriti väiksed valged kolooniad, leibast DII aga laialt levinud kolooniad oliivroheline või sinakas-hallikate koniididega. Morfoloogiliste iseärasuste alusel jagati YES agaril kasvanud DI ja DII leibadest isoleeritud seemed nelja gruppi. Esimene grupi moodustas YES aga söötmel kasvanud kahvatukollase hallitusseene koloonia, mis oli sarnane B111 ja B131 isolaatidega (D131, joonis 9). Teise grupi esindajad moodustasid väikesed (umbes 5 cm läbimõõduga) halli ja kollase äärega valged kolooniad (D121, D113 ja D241, joonis 9). Kolmanda grupi moodustasid valged, hallikas-valged, spoore mittemoodustavad hallitusekolooniad (D221, joonis 9). Viimane grupp koosnes elevantiluukarva, oliivrohelist spooridega kolooniatest (D231, joonis 9). Seda tüüpi kolooniaid leiti ka „B“ ja „C“ tööstustest saadud leibadest.



Joonis 9. Tööstuse „D“ hallitusseente isolaadid. D131– *Aspergillus oryzae*; D113, D121, D241 – *Aspergillus intermedius*; D231– *Aspergillus niger*; D221 – *Penicillium citrenum*

Tööstusest „E“ saadud leib näitas kõige pikemat säilimisaega. Esimese kolme nädala jooksul ei näidanud see leib mingisuguseid hallitusseente poolt põhjustatud riknemise märke. Alles katsekuu lõpus oli leiva pinnal näha väikseid kolooniaid (meenutasid jahu osakesi kooriku pinnal). Isoleeritud seened moodustasid YES agarsöötmel väikseid elevandiluuvärvi, pehme ja mati pinnaga kolooniaid (joonis 10). Mikroskopeerides oli näha, et tegu on pärmile omaste rakkudega.



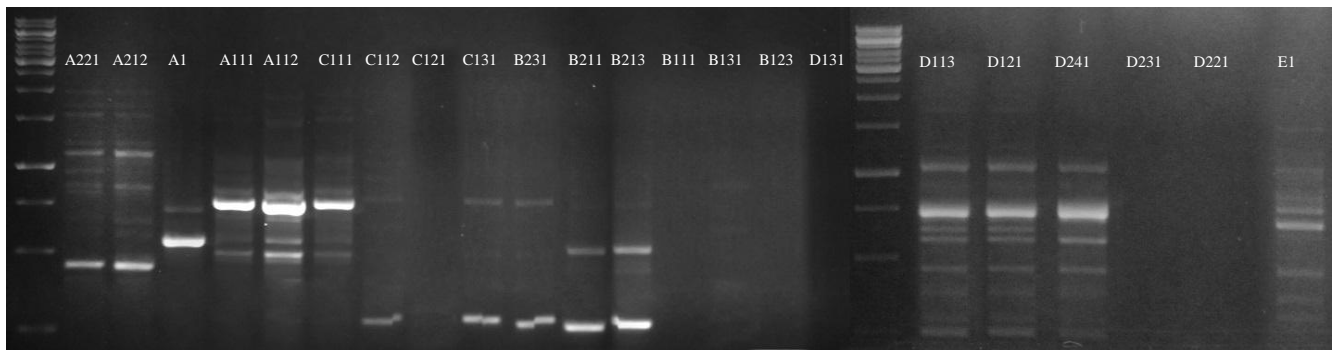
Joonis 10. Tööstuse E isolaadid.. E1– *Saccharomyces cerevisiae*

Leiva küpsemisel hallituse eosed hävinevad ja pärm inaktiveerub. Valmistoote saastumine saab toimuda pärast küpsetamist õhu, mustade tööstuspindade, seadmete ja toidukäitleja kaudu. Suvel on hallitustega saastumise oht suurem, kõrgema õhuniiskuse ja temperatuuri tõttu, kuna siis on tagatud mikroorganismide kasvuks soodsamad tingimused (Saranraj *et al.*, 2012).Lund *et al.* (1996) on leidnud, et leivad, mis on tehtud kasutades kõrgeid hügieeni standardeid, esineb hallitusseentega põhjustatud riknemist palju vähem, võrreldes leibadega, mis on toodetud madalama hügieenitasemega tootmistehhis. Sama korrelatsiooni võib täheldada ka leibades esinevate hallitusseente liigilise koostise osas – mida madalamad on tootmishügieeni standardid leibade tootmise ajal, seda rikkam on leibadest isoleeritud mükofloora mitmekesisus. Sellest võib järeldada, et tootja, kelle katseleibadel esineb palju hallitusi, ei ole tootja piisavalt hügieenistandardeid järginud.

3.2 Isoleeritud seente genotüüpiseerimine ja identifitseerimine

Morfoloogiline identifitseerimine ei ole täielikult usaldusväärne, eriti kui tegu on sarnaste hallitusseente isolaatidega (Kumeda *et al.*, 1996)

Antud töös kasutati mikroorganismide genotüüpiseerimiseks RAPD-PCRi, mille abil tuvastati isolaatide seast 14 genotüüpi (joonis 11). Nendest genotüüpidest valiti sekveneerimiseks üks esindaja. Esindajate identifitseerimiseks kasutati D1/D2 regiooni sekveneerimist, mille tulemusena tuvastati 8 liiki: *Pichia anomala*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus intermedius*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium cinerascens* ja *Saccharomyces cerevisiae*.



Joonis 11. M13 praimeriga amplifitseeritud DNA PCR-produktide mustrid. A211, A212, A111, A112, C111 – *Penicillium.cinereascens*; A1 – *Pichia anomala*; C112, C121, C131, B231, B123, D231 – *Aspergillus niger*; B211, B323 – *Aspergillus brasiliensis*; B131, B111, D131 – *Aspergillus oryzae*; D241, D113, D121 – *Aspergillus intermedius*; D221 – *Penicillium citrenum*; E1 – *Saccharomyces cerevisiae*

Pärmseent *Pichia anomala* seostatakse toidu ja söödaga. Seda kasutatakse toidu ja sööda tootmisel, samas põhjustab see toiduriknemist (Passoth *et al.*, 2005). Tootmises kasutatakse *P.anomala* just seepärast, et ta inhibeerib hallituste kasvu erinevates keskkondades (Passoth *et al.*, 2005). Lisaks hallitustele inhibeerib *P. anomala* ka teisi pärmiliike (Walker, 2011). Katseleibades oli ta saasteorganism, tekitades kriidahaigust, kuid pärssides hallituste kasvu. Nakatumine antud pärmiga toimub saastunud töövahendite ja pindade kaudu (Deschuyffeleer *et al.*, 2011).

Penicilliumi perekonda kuulub 354 liiki. *Penicillium* on üks levinuimaid hallitusi meie elukeskkonnas. Seda leidub nii pinnases, taimedes, õhus kui ka toidus. Toiduainete tööstuses kasutatakse seda mõnede juustude ning fermenteeritud vorstide tootmisel (Visagie *et al.*, 2014).

Meie katseleibades identifitseeriti kaks selle perekonna liiki, milleks olid *P. Cinerascens* ja *P.citrinum*. Neist viimane on levinud hallitus ning seda leidub pinnases, viljaterades, vürtsides, siseruumides, toidus ja välisõhus (Houbraken *et al.*, 2010). Selle liigi tüved on seotud tsitriniini tootmisega (Park *et al.*, 2008). Leivast on *P.citrinum* ka varem isoleeritud (Yanhong, 2011).

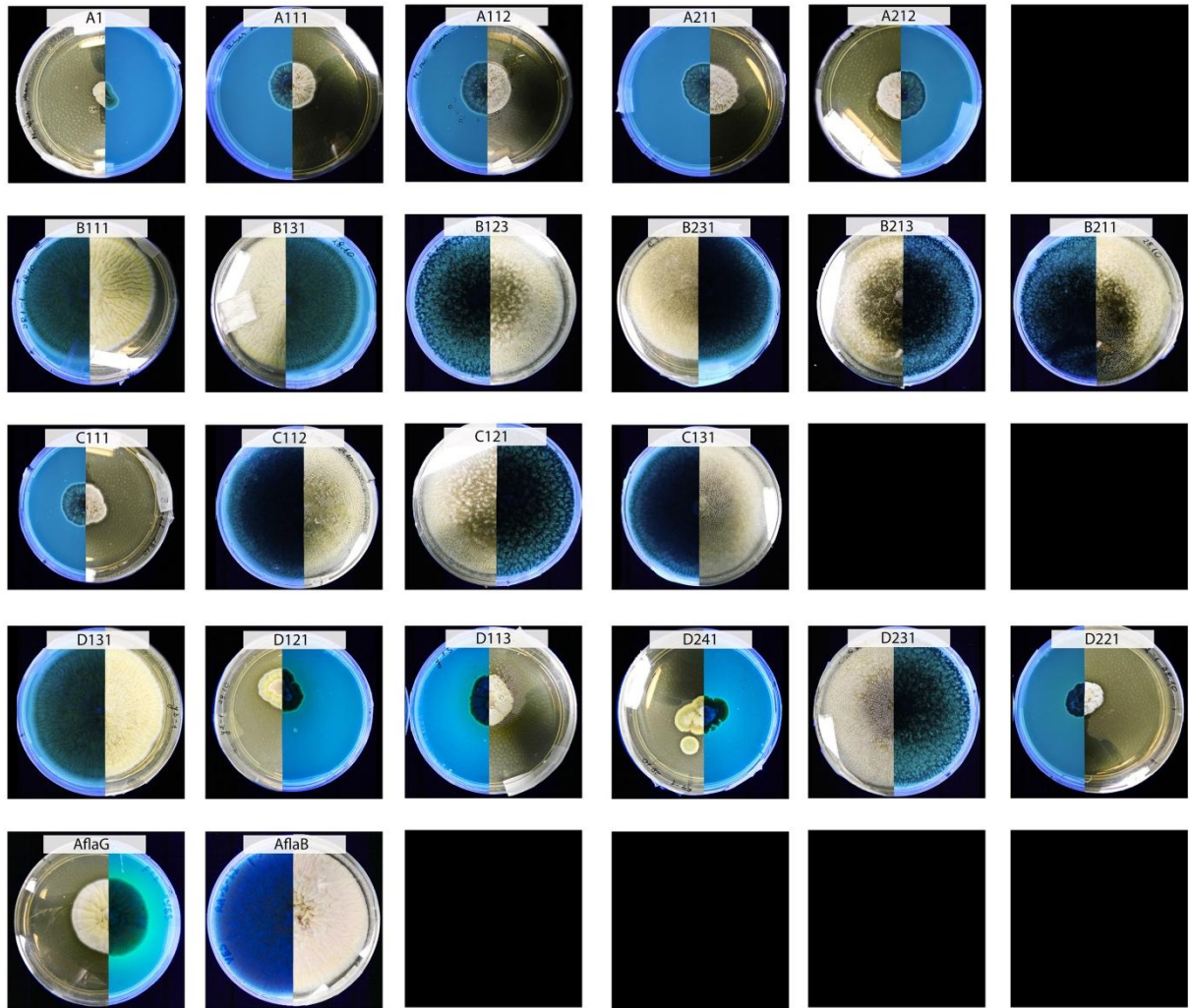
Hallitusseente perekond *Aspergillus* on toidus ja söödas väga levinud. Leitud on umbes 132-200 *Aspergillus* liiki. Paljusid selle perekonna hallitusi seostatakse mükotoksiinide tootmisega. Ühed enimlevinud *Aspergilluse* liigid on *A.flavus* ja *A.niger*, mis põhjustavad toidu riknemist (Shehu *et al.*, 2011). *Aspergillus Flavi* üksusesse kuuluvad liigid, mille

kolooniad on kollakas-rohelised või pruunikas-mustade spooridega. Paljud *Flavi* üksusesse kuuluvad liigid toodavad aflatoksiini.

Viimased uurimused on näidanud, et *Flavi* üksusesse kuuluvaid liike ei ole võimalik ainult morfoloogilise identifitseerimisega kindlaks määrata. Ka meie katseleibades leitud *A. oryzae* kuulub *Flavi* üksusesse (Varga *et al.*, 2011). *Aspergillus oryzae* kasutatakse palju jaapani fermenteeritud toitude valmistamisel. Väga harva isoleeritakse antud hallitust mujalt kui fermenteeritud toitudest. Arvatakse, et fermenteerimisel kasutatav tüvi on „kodustatud“ vorm *A.flavusest*, mida leidub taimede lehtedel (Pitt *et al.*, 2010, 382). Nii *A. oryzae* kui ka *A. niger* on maailmas ühed enim kasutatud ja suure majandusliku tähtsusega hallitusi (Hu *et al.*,2011)

3.3 Hinnang uuritud isolaatide mükotoksiinide aktiivsusele

Tähtsamateks teraviljade ja valmisleibadega seotud toksiinideks loetakse DON, ZEN, T-2, HT-2, aflatoksiinid B1,B2, G1, G2 ja OTA (Frisvad *et al.*, 2006). Antud toksiinidest on ainult aflatoksiinid ja OTA seotud *Aspergillus* ja *Penicillium* perekonda kuuluvate hallitusseentega (Schmidt, 2003).



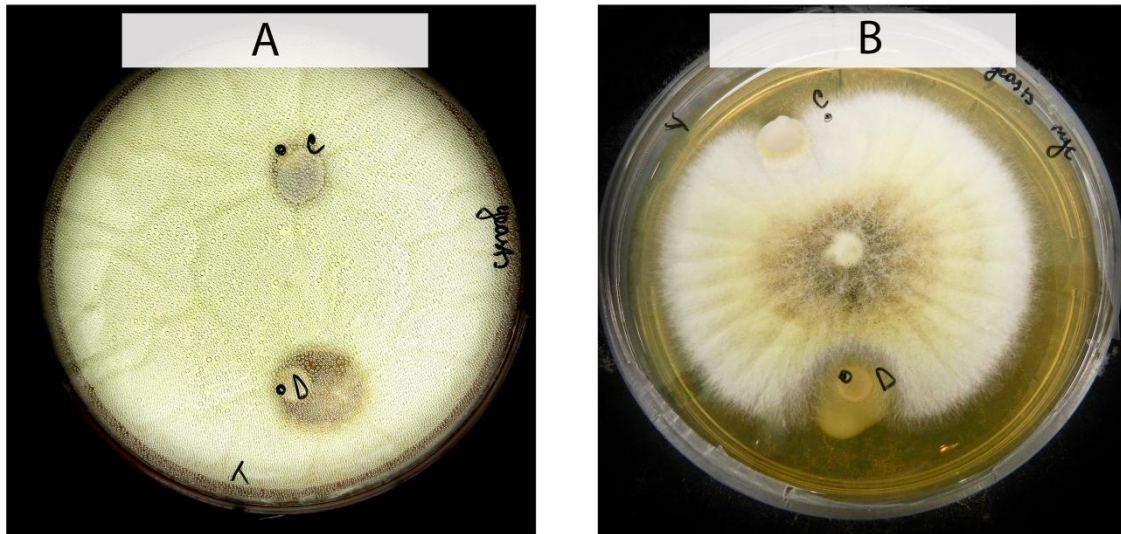
Joonis 12. Uuritud isolaadid UV valguse käes. A211, A212, A111, A112, C111 – *P. cinerascens*; A1 – *P. anomala*; C112, C121, C131, B231, B123, D231 – *A. niger*; B211, B323 – *A. brasiliensis*; B131, B111, D131 – *A. oryzae*; D241, D113, D121 – *A. intermedius*; D221 – *P. citrenum*; E1 – *S. cerevisiae*; AflaG – *A. bombycis* T00-M (Aflatoksiin G1,G2 positiivne kontroll); AflaB – *A. bombycis* RAI-L1 (Aflatoksiin Ba,B2 positiivne kontroll).

Kirjanduse andmetel toodavad aflatoksiine ainult *Flavi* üksusesse kuuluvad *Aspergillus* liigid (Schmidt, 2003). Erinevalt aflatoksiinidest ei ole ohratoksiin A tootmine *Aspergilluse* poolt seksiooni-spetsiifiline. Perekonnast *Penicillium* on toodavad OTAd ainult kaks liiki – *Penicillium verrucosum* ja *Penicillium nordicum* (Cabañes *et al.*, 2010). Antud töös isoleeritud hallitusseentest võib ainult *A. oryzae* olla seotud afla- ja ohratoksiinide tootmisega ning *A. niger* võib produtseerida ohratoksiini (Frisvad *et al.*, 2006).

Juba 1973 aastal oli aflatoksiinide ja OTA määramine aktuaalne teema. Antud toksiinide sisaldust toiduproovis saab määrata ainult instrumentaalsete meetodite (nt. vedelkromatograafia) abil, mis üldjuhul on kallid ja aeganõudvad ning seetõttu ei sobi laialdaseks skriininguks. Seetõttu on välja töötatud mikrobioloogiline kiirtest fluorestseeruvate mükotoksiide (afla- ja ohratoksiine) tuvastamiseks (Fente *et al.*, 2001). Nii aflatoksiin B1 kui ka B2 puhul on nähtav intensiivne sinine fluorestsents UV lainepikkusel 365 nm. Aflatoksiinid G1 ja G2 toodavad samal lainepikkusel rohelist fluorestsentsi (Espinosa-Calderón *et al.*, 2011, 115). Sõltuvalt keskkonna pH väärtusest fluorestseerub OTA UV valguses rohelisena (happeline keskkond) või sinisena (aluseline keskkond) (Khoury *et al.*, 2010). Mikrobioloogilise testi läbiviimises kasutatakse SAB, YES agarid, kuhu lisatakse tihti ka β -metüülsiklodekstriini. Nendel agaritel kultiveerimisel tekib isolaatide puhul, mis toodavad OTA ja AF, 3-4 päeva jooksul UV valguse käes (365nm) kolooniate ümber sinine või sinakas-roheline rõngas. Fluorestsentsi intensiivsus suureneb aja jooksul (Fente *et al.*, 2001) Joonisel 12 on toodud käesoleva töö käigus saadud hallitusseente kolooniad UV valguse all. Positiivse kontrollina kasutati *A. bombycis* T00-M (toodab OTA ning „G“ tüüpi aflatoksiine) ja *A. bombycis* RA1-L1 (toodab „B“ tüüpi aflatoksiine). Tehtud katse tuvastas, et erinevatest leivatööstustest pärit leibades puuduvad mükotoksikogeensed hallitusseened, kuna tassides YES agariga puudus OTA või aflatoksiinidele iseloomulik fluorestsents (joonis 12).

3.4 Potentsiaalsete hallitusvastaste omaduste tuvastamine pärmseente isolaatides

P.anomala ja *S.cerevisiae* on hästi tuntud pärmide liigid mis on seotud nii nimetatud leiva „kriidi haigusega“ (Lund *et al.*, 1996) Liiki *P.anomala* kuuluvad pärme nimetatakse ka mõrvarpärmideks, kuna need eraldavad kasvukeskkonda rakukestasid lüüsivaid ensüüme (Passoth *et al.*, 2006). Käesoleva uurimistöös eraldati ülalmainitud pärmid leibadest, kus hallitust ei täheldatud või siis ilmnes see alles katseperioodi lõpus. Seetõttu otsustati uurida antud pärmi isolaatide potentsiaalset hallitusvastast toimet.



Joonis 13. Kahekordse agari test. A – Petri tassile on kantud *Aspergillus niger* spoori suspensioon. Pärmid isolaadid tassil C – *Pichia anomala*; D - *Saccharomyces cerevisiae* B – Petri tassi on nakatatud seeneniidistikuga. Pärmid isolaadid tassil C – *Pichia anomala*; D - *Saccharomyces cerevisiae*

Mõlemad uuritud pärmid demonstreerisid hallituseente kasvu pidurdavat toimet. Inhibeerimissoont saab näha nii spooridega (joonis 13, A) kui ka mütseeli tükiga (joonis 13, B) saastunud tassil. *S. Cerevisiae* puhul oli näha inhibeerimistsooni pärmid koloonia ümber mitu korda suuremana võrreldes *P. anomala*-ga tekkinud inhibeerimistsooniga. Antud katse tulemused langevad kokku leibades saadud tulemustega, kuna *S. cerevisiae* oli isoleeritud katseleivast, mis ei läinud hallitama isegi katseperioodi lõpus.

Järeldused

Teostatud katsete põhjal võib teha järgmiseid järeldused:

- 1: Katse käigus isoleeritud ja identifitseeritud seened kuuluvad *P. anomala*, *S. cerevisiae*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. intermedius*, *A. brasiliensis*, *P. cinerascens* ja *P. citrinum* liikidele
- 2: Suurem osa isoleeritud hallituse liike leiti erinevatest leivatööstustest saadud leibadest. Pärmid ja üksikud hallitusseened nagu *P. citrinum* ja *A. intermedius* olid tööstuse-spetsiifilised hallitused.
- 3: Mükoloogiline mitmekesisus langes hästi kokku hallitusseente vaba säilimisperioodi pikkusega
- 4: Saadud hallitusseente isolaadid on ohutud tarbijate tervisele, kuna neil puudub mükotoksikogeenne aktiivsus.
- 5 : Pärmide isolaadid *P. anomala* ja *S. Cerevisiae* omavad kõrget hallitusvastast aktiivsust. Antud tüvesid tuleks tulevikus katsetada hallitus vastase toimega starter kultuuridena rukkileibade tootmisel.

Kokkuvõte

Rukkileibade hallitamine põhjustab suuri majanduslikke kadusid ning tänu mükotoksiinide tootmisele võib see kujutada ohtu ka tarbija tervisele. Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli isoleerida ja identifitseerida pärm- ja hallitusseeni, mis tekivad rukkileibade pinnale toodete säilitamise ajal ning tuvastada saadud isolaatide mükotoksigogeenset ohtu. Kuna katse käigus avastati ka üks hallitamata leib, kust isoleeriti ainult pärme, otsustati uurida antud isolaatide potentsiaalset hallitusevastast toimet.

Käesoleva töö käigus tõestati, et mükoloogiline mitmekesisus ja hallitusseente vaba perioodi pikkus varieerub erinevate leivatööstuste vahel. Leivad, kust isoleeriti ainult ühte tüüpi hallitust või ainult pärme, demonstreerisid kõige pikemat säilimisaega (3-4 nädalat). Vastupidi leivad, kust isoleeriti erinevatele liikidele kuuluvaid hallitusi, läksid hallitama esimestena.

Eksperimentaalsetest leibadest isoleeriti kokku 6 erinevaid hallitusseente ning 2 pärmliiki. Kuna isoleeritud oli ainult *Aspergillus* ja *Penicillium* perekondade esindajad, siis sai ignoreerida DON, ZEN, T-2 ja HT-2 tootmist ja fokuseerida ainult saadud isolaatide potentsiaali toota afla- ja ohratoksiine. Antud tulemustest selgus, et vaatamata sellele, et *A. oryzae* ja *A. niger* liigi esindaja toodavad toksiine, siis isoleeritud tüved ei oma toksigogeenset aktiivsust.

Kõige huvitavam avastus oli tehtud aga pärmseente isolaatidega, mis demonstreerisid kõrget hallitusvastast toimet, pidurdades nii mütseeli kui ka spooride arenemist kontamineeritud Petri tassidel. Saadud isolaate võib tulevikus katsetada hallitusvastase toimega starterkultuuridena rukkileibade tootmisel.

Summary

Mould spoilage of bread causes significant economic losses and the production of mycotoxins may be hazardous to consumers' health. The main aim of the present study was to isolate and identify contaminating fungi from rye breads purchased from different Estonian bakeries. The ability of isolated strains to produce mycotoxins was also investigated. As some yeast strains were isolated from breads demonstrating the longest mould-free shelf life, their potential anti-mould activity was evaluated using microbiological techniques.

Six different mould species and two yeast species were isolated and identified as *A. niger*, *A. oryzae*, *A. intermedius*, *A. brasiliensis*, *P. cinerascens* and *P. citreum*, *P. anomala*, *S. cerevisiae*. Obtained results demonstrated the strong correlation between short shelf life of studied breads and numbers of isolated mould species - breads with more diverse contaminating mycoflora showed the first signs of mould spoilage already at the end of the first storage week.

As only representatives of *Aspergillus* and *Penicillium* genera were isolated from moulded samples, further mycotoxicological studies of obtained isolates were focused on their possible aflatoxin- and ochratoxinogenic activity. Cultivation on specific media together with UV treatment revealed the absence of mentioned toxins in cultivation media. These results demonstrated that despite of previously reported mycotoxinogenic activity of some *A. niger* and *A. Oryzae* strains, studied isolates could be recognised as safe.

Correlation between the presence of yeasts on studied bread surfaces and prolonged shelf-life of these breads gave us an idea to study the potential anti-mould activity of isolated yeasts. The ability to inhibit both spore germination and mycelium growth was detected in case of both studied yeast strains. These strains will be used in future studies in order to create functional starter culture for bread industry.

Kasutatud kirjandus

Ahaotu N. N., Ogueke, C. S., Ahoutu, I. 2010. Hydrolytic Enzymes of Moulds Involved in Bread Spoilage. - New York Science Journal, 3(11), 27-36

Cabañes, F.J., Bragulat, M.R., Castellà, G. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. – Toxins, 2, 1111-1120.

Calvo, A.M. (2004). Chapter 9 mycotoxins-toxins in food. CRC press.

Chu, F.S., 2003, Chapter 29 mycotoxins-Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications, CRC press.

Deschuyffeleer, N., Audenaert, K., Samapundo, S., Ameye, S., Eeckhout, M., Devlieghere, F. (2011). Identification and characterization of yeasts causing chalk mould defects on par baked bread. - Food microbiology, 28, 1019-1027.

Espinosa-Calderón, A., Torres-Pacheco, I., Millán-Almaraz, J.R., Contreras-Medina, L.M., Muñoz-Huerta, R.F., Guevara González, R.G. (2011). Methods for detection and quantification of aflatoxins. - Aflatoxins - Detection, Measurement and Control, InTech, 109-128.

Fente, C. A., Ordaz, J. J., Vázquez, B. I., Franco, C. M., Cepeda, A. (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus strains*. - Appl Environ Microbiol, 67 (10), 4858–4862.

Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., Samson, R.A. (2006). Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. - Adv Exp Med Bio, 571, 33-46.

Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A. (2007) mycotoxin producers-Food mycology a multifaceted approach to fungi and food, CRC press, 135–159.

Hoff, J. W. (2012). Molecular typing of wine yeasts: evaluation of typing techniques and establishment of a database: Magistritöö. Stellenboschi Ülikool, Stellenbosch.

Houbraken, J. A. M. P., Frisvad, J., Samson, R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. - *Fungal Diversity*, 44, 117–133.

Hu, H. L., Brink van Den, J., Gruben, B. S., Wösten, H. A. B., Gu, J.-D., Vries de, R. P. (2011). Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. - *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 (1), 248–252 .

Hussein, H.B., Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. - *Toxicology*, 167, 101-134 .

Kapten-Leppik, K (2007) Leibade valmistamise tehnoloogiat [WWW] www.leivaliit.ee/files/1191490949.pdf / (28.05.2015).

Khoury, A. E., Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. - *Toxins* , 2(4), 461-493.

Kulp, K., Lorenz, K. (2003). Handbook of Dough Fermentations (Food Science and Technology), New York:Marcel Dekker, 295

Kumeda Y., Asao, T., 1996, Single strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus section Flavi*. - *Appl Environ Microbiol.*, 62(8), 2947–2952.

Legan, J.D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions.- *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32 (1-3), 33-53.

Lowes, K. F., Shearman, C., A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D. B., Merry, R. J., Gasson, M.J. (2000). Prevention of Yeast Spoilage in Feed and Food by the Yeast Mycocin HMK. - *Appl Environ Microbiol*, 66(3), 1066–1076.

Lund, F., Filtenborg, O., Westall, S., Frisvad, J.C. (1996). Associated mycoflora of rye bread. - *Letters in Applied Microbiology*, 23, 213-217.

Lund, F., Filtenborg, O., Westfall, S., Frisvad, J. C. (1996). Associated mycoflora of rye bread. - *Letters in Applied Microbiology*, 23 (4), 213–217.

Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho,G., Sanchis,V. (2013). Mycotoxins:occurrence, toxicology and exposure assesment. - food and chemical toxicology, 60, 218-237.

Moss, M.O. (2002). Risk assessment for aflatoxins in foodstuff. - J of International biodeterioration & biodegradation, 50, 137-142.

Park, S. Y., Ryu, Kim, R., Choi, S. K., Lee, C. H., Kim, J. G., Park, S. H. (2008). Citrinin, a mycotoxin from *Penicillium citrinum*, plays a role in inducing motility of *Paenibacillus polymyxa*. - FEMS Microbiol Ecol, 65(2), 229-37.

Passoth, V., Fredlund,E., Druvefors, U. Ä., Schnürer,J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. - FEMS Yeast Research, 6 (1), 3-13.

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic,M.(1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. - Bulletin of the world health organization, 77(9), 754-766.

Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2012). Chapter 8 *Aspergillus* and related telemorphs. - Fungi and Food Spoilage. Springer Science & Business media, [WWW] (https://books.google.ee/books?id=hlTTBwAAQBAJ&dq=A.+oryzae++as+spoilage&hl=et&source=gbs_navlinks_s) (27.05.2015)

Pitt, J. I., Basilico,J.C., Abarca,M.L., and Lopez,C., 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med. Mycol.*, 38 (1), 41-46.

Saranraj, P., Geetha, M. (2012). Microbial spoilage of bakery products and its control by preservatiives. - International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 3(1), 38-48.

Shemidt, H. (2003). Classification, Identification and Detection of Toxigenic Moulds: Doktoritöö. Müncheni Tehnikaülikool, Freising.

Shehu, K., Bello, M. T. (2011). Effect of Environmental Factors on the Growth of *Aspergillus* Species Associated with Stored Millet Grains in Sokoto. - Nigerian Journal of Basic and Applied Science, 19(2), 218-223

Walker, G.M. (2011). *Pichia anomala*-cell physiology and biotechnology relative to ohter yeast. - *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(1), 25-34.

Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2011, Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*, *Studies in Mycology* 69: 57–80.

Viiard, E. (2014). Diversity and Stability of Lactic acid bacteria during rye sourdough propagation : Doktoritöö. Tallinna Tehnikaülikool, Tallinn.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. - *Nucleic Acids Res*, 18(22), 6531-5.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. - *Studies in Mycology*, 78, 343–371

Yanhong, L., Juming, T., Zhihuai, M., Jae-Hyung, M., Shunshan, J., Shaojin, W. (2011). Quality and mold control of enriched white bread by combined radio frequency and hot air treatment. - *Journal of food engineering*, 104 (4), 492-498

Yibar, A., Cetinkaya, F., Soyutemiz, G. E. (2012). Detection of rope producing *Bacillus* in bread and identification of isolates. to Species Level by Vitek 2 System – *Biol environ. Sci*, 6(18), 243-248.