



EESTI MAAÜLIKOOL

Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut  
Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool

**Lisbeth Luik**

**AFLATOKSIINIDE MÕJU JUUSTUS ESINEVATELE  
PIIMHAPPEBAKTERITELE**

**EFFECT OF AFLATOXINS ON LACTIC ACID BACTERIA  
PRESENT IN CHEESE**

Bakalaureusetöö

Toiduainete tehnoloogia õppekava

Juhendaja: nooremprofessor Helena Andreson, *PhD*

Tartu 2021



Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Lisbeth Luik		Õppekava: Toiduainete tehnoloogia	
Pealkiri: Aflatoksiinide mõju juustus esinevatele piimhappebakteritele			
Lehekülgi: 46	Jooniseid: 3	Tabeleid: 8	Lisasid: 0
Osakond / Õppetool: Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1.7. Toiduteadused, Toiduainete ja jookide tehnoloogia T430 Juhendaja: nooremprofessor Helena Andreson Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2021			
<p>Juust on levinud piimatoode kogu maailmas. Sobilike niiskuse ning temperatuuri parameetrite tõttu, on juust hallitusseente arenemiseks hea keskkond. Mõned hallitusseente hulka kuuluvad <i>Aspergillus</i> perekonna liigid toodavad aflatoksiini, mis omab kantserogeenseid, mutageenseid ja immunosupressiivseid omadusi ning mida on 1990. aastal ilmunud teadusartiklis seostatud juustude hilise paisumisega, olles seni teadaolevalt ainus teadustöö, mis sellist seost kajastab. Kuna juustude paisumine on piimatööstuste jaoks probleemiks ka tänapäeval, väärrib antud teema laialdasemat uurimist.</p> <p>Bakalaureusetöö eesmärk on nii teaduskirjanduse kui eksperimentaalse töö alusel anda ülevaade aflatoksiinidest ja aflatoksiin B<sub>1</sub> poolt avaldatavast mõjust juustus esinevatele piimhappebakteritele.</p> <p>Töö raames teostati katsed hilise paisumisega juustudes sisalduvate mikroobide isoleerimiseks, säilitamiseks ja arvukuse määramiseks ning hinnati erineva kontsentratsiooniga aflatoksiini mõju piimhappebakterite referentstüvedele ning juustudest isoleeritud kultuuridele. Leiti, et uuritud juustude mikrobioloogiliste analüüside tulemused olid üksteisega sarnased ning ei selgitanud hilise paisumise põhjuseid. Aflatoksiini poolt avaldatav mõju esines vaid ühest juustust isoleeritud fakultatiivselt heterofermentatiivse <i>Lactobacillus paracasei</i> puhul, kus nii glükoosi kui galaktoosi kasvusöötmeaga katsutites ilmnnes 5. inkubatsioonipäevaks gaasi tootmine aflatoksiin B<sub>1</sub> kontsentratsioonil 10-40 µg/ml. Nimetatud süsivesikutega kasvusöötmete puhul täheldati ka aflatoksiini pärssivat toimet <i>L. paracasei</i> happe tootlikkusele juba toksiini madalatel kontsentratsioonidel vastavalt 10 ja 1 µg/ml.</p> <p>Kokkuvõtteks võib öelda, et ehkki töö ei kinnitanud aflatoksiin B<sub>1</sub> mõju homofermentatiivsete piimhappebakterite süsivesikute fermentatsiooniprotsessile ja selle seost juustude hilise paisumisega, väärrib teema edasist uurimist suurema hulga juustude isolaatide ja starterkultuuridega, seahulgas piimatööstuse keskkonnas esinevate fakultatiivselt heterofermentatiivsete piimhappebakteritega.</p>			
Märksõnad: Juust, aflatoksiin B <sub>1</sub> , piimhappebakterid, paisumine			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Bachelor's Thesis	
Author: Lisbeth Luik		Curriculum: Food technology	
Title: Effect of aflatoxins on lactic acid bacteria present in cheese			
Pages: 46	Figures: 3	Tables: 8	Appendixes: 0
Department / Chair: Chair of Food Science and Technology Field of research and (CERC S) code: 1.7. Food Sciences, Food and drink technology T430 Supervisor: assistant professor Helena Andreson Place and date: Tartu 2021			
<p>Cheese is a popular dairy product all over the world. Due to its suitable humidity and temperature parameters, cheese also constitutes a good environment for the development of molds. Some species of the genus <i>Aspergillus</i> produce aflatoxin, which has carcinogenic, mutagenic and immunosuppressive properties. Aflatoxin has been linked to the late blowing of cheeses in a scientific article published in 1990, being the only research known to date that reflects such correlation. As the blowing of cheeses is still a problem for the dairy industry today, this topic deserves further investigation.</p> <p>The aim of the Bachelor's thesis is to provide an overview of aflatoxins in general and the effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on homofermentative lactic acid bacteria found in cheese, based on scientific literature and experimental work in particular.</p> <p>During this research experiments were performed to isolate, preserve and quantify the microbes contained in late-blown cheeses, and to evaluate the effects of different concentrations of aflatoxin on reference strains of lactic acid bacteria and on cultures isolated from cheeses. The results of the microbiological analyses of the two cheeses examined were found to be similar to each-other and did not explain the late blowing. The effect of aflatoxin was only observed on the facultatively heterofermentative <i>Lactobacillus paracasei</i> isolated from cheese, where both glucose and galactose growth medium tubes showed gas production by day 5 of incubation, at aflatoxin B<sub>1</sub> concentrations of 10-40 µg/ml. Inhibitory effects of aflatoxin on <i>L. paracasei</i> acid production were also observed for these carbohydrate growth mediums even at low toxin concentrations of 10 and 1 µg/ml respectively.</p> <p>In conclusion, although our research did not confirm the effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on the carbohydrate fermentation process of homofermentative lactic acid bacteria and its involvement in the late blowing of the cheeses, the issue deserves further investigation with a wider range of cheese isolates and starter cultures, including facultatively heterofermentative lactic acid bacteria that are present in the dairy industry.</p>			
Keywords: Cheese, aflatoxin B <sub>1</sub> , <i>lactic acid bacteria</i> , blowing			

# SISUKORD

LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Juust ja selle säilivus.....	7
1.1.1. Juustu mikrobioloogiline koostis.....	7
1.2. Juustuvead .....	8
1.2.1. Varajane juustu paisumine .....	9
1.2.2. Hiline juustu paisumine .....	9
1.3. Aflatoksiinid .....	10
1.3.1. Aflatoksiinide tootmine .....	11
1.3.2. Toksiini sisaldus toidus ja selle mõju tervisele .....	12
1.4. Aflatoksiin B <sub>1</sub> mõju piimhappebakteritele .....	13
1.5. Aflatoksiin juustus.....	14
1.6. Piimhappebakterite mõju aflatoksiinile B <sub>1</sub> .....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. Eesmärk ja ülesanded .....	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. Uuritav materjal.....	20
2.2.2. Proovide ettevalmistamine külvideks.....	21
2.2.3. Mikrobioloogilised külvid .....	21
2.2.4. Mikroobide arvukuse hindamine ja isoleerimine .....	22
2.2.5. Aflatoksiini määramine .....	22
2.2.6. Isoleeritud piimhappebakterid ja referentstüved .....	23
2.2.7. Katsutite ettevalmistamine süsivesikute fermentatsiooniks .....	23
2.2.8. Süsivesikute fermentatsioon koos aflatoksiiniga.....	24
3. TULEMUSED JA ARUTELU .....	26
3.1. Mikrobioloogiliste külvide tulemused.....	26
3.2. Isoleeritud mikroobide morfoloogia ja identifitseerimine.....	26
3.3. Aflatoksiini hulk juustus.....	27
3.4. Aflatoksiini mõju piimhappebakteritele .....	28
KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED .....	37
KASUTATUD KIRJANDUS.....	39

## LÜHENDID

AFB1/AFB2	Aflatoksiin B <sub>1</sub> / Aflatoksiin B <sub>2</sub>
AFM1/AFM2	Aflatoksiin M <sub>1</sub> / Aflatoksiin M <sub>2</sub>
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i> , piimhappebakterid ingl. k.
<i>Lb.</i>	perekond <i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	perekond <i>Lactococcus</i>
JP	Juustuproov
ssp.	<i>subspecies</i> , alamliik ingl. k
<i>Str.</i>	perekond <i>Streptococcus</i>

## SISSEJUHATUS

Juust on populaarne piimatoode, mida valmistatakse ning tarbitakse igal pool üle kogu maailma. Kuigi juust on fermenteeritud toit, mida peetakse enamasti ohutuks, esineb aegajalt siiski ka juustu tarbimisega seotud haiguspuhanguid. Juustude, eriti valmimata juustude saastajateks on sageli hallitusseened. Lisaks ilmneb hallitusseeni tihtipeale ka kõvemate juustude pinnal. Hallitusseente hulka kuuluvad perekonna *Aspergillus* liigid nagu *A. flavus* ja *A. parasiticus* sünteesivad aflatoksiini, mis kuulub mükotoksiinide rühma ning mis satub tooteahelasse ebakvaliteetse tooraine või puuduliku tootmishügieeni tõttu. Aflatoksiinid omavad kantserogeenseid, immunosupressiivseid ja mutageenseid omadusi ning suuremate kontsentratsioonide puhul võib aflatoksiin olla ka surmav. Lisaks on bakalaureusetöö aluseks olemas Sutic ja Banina (1990) uuringus kirjeldatud aflatoksiini B<sub>1</sub> poolt avaldatavat mõju homofermentatiivsetele piimhappebakteritele, kus viimased muutuvad aflatoksiini mõjul heterofermentatiivseks ning hakkavad tootma gaasi. Sutic ja Banina (1990) uuringu tulemustel võib olla praktiline väärtus, aidates osaliselt mõista miks osad juustud ilma näilise põhjuseta tootmisprotsessi järgselt paisuvad. Kuna töö aluseks olev uuring on teadaolevalt aga ainus uuring, mis seostab aflatoksiini juustude paisumisega, on oluline antud teemat edasi uurida.

Bakalaureusetöö eesmärk on nii teaduskirjanduse kui eksperimentaalse töö alusel anda ülevaade aflatoksiinidest ja aflatoksiin B<sub>1</sub> poolt avaldatavast mõjust juustus sisalduvatele piimhappebakteritele. Töös on kajastatud teemasid nagu juustu mikrobioloogiline koostis, juustuvead, aflatoksiin ja selle teke, aflatoksiini sisaldus toidus ja mõju tervisele ning aflatoksiini ja piimhappebakterite vaheline sünergism. Eksperimentaalses osas teostati katsed hilise paisumisega juustudes sisalduvate mikroobide isoleerimiseks, säilitamiseks ja arvukuse määramiseks ning hinnati aflatoksiini toimet homofermentatiivsete piimhappebakterite referentstüvede ning juustudest isoleeritud kultuuride võimele kääritada süsivesikuid.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Juust ja selle säilivus

Juust on piimatoode, mis koosneb peamiselt piimarasvast ja koaguleeritud valkudest ning selle säilivus saavutatakse suures osas pH ja vee aktiivsuse kontrollimisega. Säilivust mõjutab ka mikroorganismide kasv juustus, mille ellujäämist mõjutab redokspotentsiaal ning starter ja mitte-starter organismide poolt toodetud antimikroobsete ühendite olemasolu (Little *et al.* 2008). Juustu peetakse fermenteeritud toiduna üldiselt ohutuks, kuid siiski esineb aeg-ajalt juustu tarbimisest tulenevaid haiguspuhanguid (Kim *et al.* 2018).

Piimatooted on suurepärane kasvukeskkond paljude mikroorganismide jaoks, mistõttu on neil ka lühem säilivusaeg (Losito *et al.* 2014). Peamiseks juustu mikroobidega saastumise allikaks on selle valmistamisel kasutatud toorpiim (Kim *et al.* 2018). Toorpiima mikrobiota mõjutab oluliselt juustude sensoorseid omadusi ning see võib sisaldada soovimatuid termostabiilseid baktereid, mis põhjustavad juustude pikaajalisel valmimisel tõsisemaid juustudefekte (Turgay *et al.* 2016). Toorpiima saastumise peamiseks põhjuseks on lüpsilehmade söötmine hallitusseente või patogeenidega saastunud söödaga (Borreani *et al.* 2019). Kuna piima kvaliteedis toimuvad muutused mõjutavad suurel määral juustu kvaliteeti, on oluline sööta loomi kvaliteetse toiduga ning tagada farmides ülim puhtus toorpiima saastumise vältimiseks (Huppertz, Kelly 2009). Ebapiisav toorpiima kvaliteet alandab juustude kvaliteeti ning võib põhjustada erinevaid juustuvigu (Turgay *et al.* 2016).

### 1.1.1. Juustu mikrobioloogiline koostis

Juustus esinev mikrobiota on suurel määral mõjutatud erinevatest teguritest nagu juustu veeaktiivsus, soolamiseetodid, tootmishügieen, kalgenemistingimused, piima kvaliteet jms (Hayaloglu, 2016). Juustu mikrobioloogilise koosluse moodustavad peamiselt starterkultuurid ja sekundaarne mikrobiota – viimasesse kuuluvad nii patogeensed kui ka juustu riknemist põhjustavad organismid (Sheehan *et al.* 2007).

Starterkultuurid vastutavad juustu valmistamisel happe tootmise eest. Lisaks osalevad starterkultuuride ensüümid proteolüüsis ja aminohapete muundamises maitseühenditeks, aidates kaasa juustu valmimisele (Beresford *et al.* 2001). Starterkultuuridena kasutatakse juustu valmistamisel enim laktokokke, laktobatsille ja streptokokke (Beresford *et al.* 2001, Sheehan *et al.* 2007). Starterkultuure võib kasutada eraldi või neid omavahel kombineerides. Kultuurid lisatakse tootmise alguses piima teadlikult või sisaldab piim vastavaid kultuure juba looduslikult (Beresford *et al.* 2001). Kõvemate juustude (Emmental, Parmesan, Grana Padano jn) starterkultuuride hulka kuuluvad näiteks termofiilsed piimhappebakterid nagu *Streptococcus thermophilus* ja *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Lisaks kasutatakse starterkultuuridena erinevaid *Lactococcus lactis ssp. lactis* ning *Lc. lactis ssp. cremoris* tüvesid (Hayaloglu 2016).

Sekundaarne mikrobiota ei osale juustu tootmisel happe produtseerimises, kuid mängib siiski suurt rolli juustu valmimisel, aidates erinevatele juustusortidele omaseid eripärasid esile tuua (Beresford *et al.* 2001). Juustu sekundaarne mikrobiota on mitmekesine organismide rühm, kuhu kuuluvad üldiselt propioonhappebakterid, mikrokokid, stafülokokid, pärmseened ja mitte-starter piimhappebakterid (*non-starter lactic acid bacteria*, ingl. k.) (Sheehan *et al.* 2007, Beresford *et al.* 2001). Mitte-starter piimhappebakterite kooslus koosneb omakorda fakultatiivselt heterofermentatiivsetest mesofiilsetest laktobatsillidest, pediokokkidest, enterokokkidest ja leukonostokitest (Sheehan *et al.* 2007, Hayaloglu 2016).

## 1.2. Juustuvead

Juustudel võib esineda mitmeid vigu, millest ühed on põhjustatud tootmisest tingitud faktoritest ning teised juustudes esinevatest mikroobidest. Levinud juustuvigadeks on maitsevead (happeline või mõru maitse), tekstuuri- ja värvusevead, vale niiskuse või happesuse tase, laikude ning hallituse esinemine (Hill, Ferrer 2021). Juustu pinda võivad mõjutada vead nagu kooriku mädanemine või pehme koorik, mis võivad tuleneda vähesest naatrium- ja kaltsiumkloriidi kontsentratsioonist (Luo *et al.* 2013, Bae *et al.* 2017). Samuti mõjutavad kooriku moodustumisel tekkivaid vigu ka pH ning temperatuur. Eelmainitud soolad võivad valedel kontsentratsioonidel põhjustada ka rasvast ja murenevat juustutekstuuri ning mõru metallist kõrvalmaitset (Guinee 2007).



Juustudes tekkivad tekstuurivead hõlmavad peamiselt lõhede ning pragude tekkimist, mis tekivad juustu sisse jäänud väljumata vadakust, pressimisel juustu sisse jäänud õhust või gaasi tootmisest bakterite poolt (Hill, Ferrer 2021). Gaasi tootmine on mõnes juustusordis (nt Šveitsi tüüpi juustudes) soovitud tulemus, samas kui teistes juustusortides (nt Camembert ja Cheddar) peetakse gaasi moodustumisel tekkivat paisumist defektiks (Tabla *et al.* 2016). Ebaloomulik gaasi tootmine on juustu puhul jagatud kaheks: varajane ja hiline gaasi tootmine (Caccamo *et al.* 2004).

### **1.2.1. Varajane juustu paisumine**

Juustude varajane paisumine on defekt, mida iseloomustab suurte gaasiaukude moodustumine juustus, käsnjas tekstuur ning ebameeldiv maitse (Bintsis, Papademas 2002). Varajase paisumisega kaasneb ka rõske aroom, pilude, lõhede ja ebaõigete juustu “silmade“ moodustumine juustu valmimise varajases faasis (Wyder 2018). Varajane paisumine ilmneb üldiselt juustu valmistamisel esimese 48 tunni jooksul ning on sagedasem tekkima juustudes, millel on kõrgem veeaktiivsus (pehmed, poolpehmed juustud) (Tabla *et al.* 2016, Bintsis, Papademas 2002). Selle defekti põhjuseks on liiga suur kolibakterite ja/või pärmseente arv. Erandjuhtudel suudavad varajast paisumist põhjustada ka propioonhappebakterid (Bintsis, Papademas 2002).

### **1.2.2. Hiline juustu paisumine**

Hiline paisumine on üheks tuntuimaks juustude riknemise põhjuseks ja selle probleemi põhjustajateks on tavaliselt klostriidid või heterofermentatiivsed piimhappebakterid (LAB, *lactic acid bacterial*, ingl. k.). Hilist paisumist suudavad põhjustada ka propioonhappebakterid (Bintsis, Papademas 2002). Hilinenud gaasi teke on probleemiks mitmetes juustusortides, mille laagerdumisperiood on maitseomaduste saavutamise jaoks pikem (6-12 kuud). Sellistes juustudes võivad ladustamise ajal tekkida lõhed ja praod, eriti kui laagerdumise kiirendamiseks on säilitustemperatuuri tõstetud (Oberberg *et al.* 2016). Hiline paisumine on iseloomulik kõvadele ja poolkõvadele juustudele ning võib ilmned 7-60 päeva pärast juustu valmistamist, sõltuvalt paisumist põhjustavast tüvest (Bintsis, Papademas 2002).

### 1.3. Aflatoksiinid

1960. aasta alguses suri Inglismaa farmides rohkelt kalkuneid (Lie, Marth 1967). Ülejäänud aasta vältel teatati ka pardipoegade ning faasanite kõrgest suremusest – üks farmer kaotas umbkaudu 10 000 pardipoega (Marth 1967). Hiljem tuvastati, et suremuse põhjuseks oli loomade söödas kasutatav maapähkljahu, mis oli riiki sisse toodud Brasiiliast, Indiast ning erinevatest Aafrika riikidest (Lie, Marth 1967). Loomad olid toksilisele ainele väga vastuvõtlikud ning nende haigestumisega kaasnes depressioon, häiritud kõnnak ning äkksurm. Lisaks maksakahjustustele esines paljudel loomadel ka ulatuslikke nahaaluseid verejookse jalgades, peas ja seljas (Marth 1967).

Maapähkljahu uurimise tulemusel eraldati jahust *Aspergillus flavus* liik, mis suudab toota kõrge toksilisusegaprodukte (Lie, Marth 1967, Marth 1967). 1961. aastal teostati söeluuring, mille käigus pardipoegade testgruppi söödeti eraldatud toksilise ainega. Tuvastatud toksilisele metaboliidile anti nimeks aflatoksiin (Lie, Marth 1967).

Aflatoksiinid kuuluvad mükotoksiinide rühma ning on sünteesitud liikide *Aspergillus flavus* ja *A. parasiticus* sekundaarsete metaboliitidena (Nazhand *et al.* 2020). Aflatoksiini võivad toota ka näiteks *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* ja *A. pseudotamari*, kuid nende esinemise tõenäosus on suhteliselt väike (Prettl *et al.* 2017). Aflatoksiinid on kumariini derivaadid, mis on enamus loomaliikidele tõsiselt mürgised, omades kantserogeenseid, mutageenseid ja immunosupressiivseid omadusi (Lie, Marth 1967, Peltonen *et al.* 2001).

Maailmas on tuvastatud rohkem kui 20 erinevat aflatoksiini vormi, millest neli omavad mõju inimese tervisele ning on tuvastatavad ultraviolettkiirguse abil (Nazhand *et al.* 2020, Sarma *et al.* 2017). Kaks neist eraldavad sinist nähtavat valgust ja on tähistatud kui B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) ja B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>). Teised kaks komponenti fluorestseeruvad kollakasrohelise värvusega ja neid nimetatakse G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) ja G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). Kõige suuremas kontsentratsioonis leidub toiduainetes üldjuhul aflatoksiini B<sub>1</sub> (Marth 1967). Aflatoksiinidega B<sub>1</sub> ja B<sub>2</sub> saastunud sööda tarvitamisel lagunevad need maksas aflatoksiinideks M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) ja M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) (Peltonen *et al.* 2001). Kõige suuremat toksilisust omavad AFB<sub>1</sub> ning selle metaboliseerumise tagajärjel tekkinud AFM<sub>1</sub> (Prettl *et al.* 2017).

Aflatoksiine tootvad seened võivad saastada erinevaid toiduaineid (nt. kakao, kohvi, tee, vürtsid, mais, ingver, hirss, riis, nisu, maapähklid, kaunviljad, kuivatatud puuviljad) ning loomasöötasid (Nazhand *et al.* 2020, Casquete *et al.* 2019, Mahrer *et al.* 2020, Kim *et al.*

2017, Kortei *et al.* 2021, Gichohi-Wainaina *et al.* 2021). Loomade toitmisel saastunud söödaga jõuab toksiin läbi lõpp-produktide, nagu liha, piim- ja piimatooted, ka inimeste toidulauale (Nazhand *et al.* 2020). Saasteainete piirnormide määrusega (EÜ 1881/2006) on Euroopas aflatoksiini kogusisalduse piirväärtus toiduainetes 4-15 µg/kg olenevalt toiduainest ning piimas ja piimatoodetes on AFM<sub>1</sub> piirnorm 0,05 µg/kg. Aflatoksiini kõik komponendid on määratud grupp 1 kantserogeenide hulka, olles ülemaailmseks terviseriskiks (Nazhand *et al.* 2020).

### 1.3.1. Aflatoksiinide tootmine

Kõige suurem ning olulisim aflatoksiini tootja on hallitusseente hulka kuuluv *Aspergillus flavus* (Casquete *et al.* 2019). Aflatoksiini tootmist *A. flavus* poolt mõjutab suuresti liigi geneetiline mitmekesisus, substraat ja geograafiline päritolu (Mahror *et al.* 2020). Kuigi seened suudavad kasvada erinevatel pH ja veeaktiivsuse tasemetel, siis toksiini produtseerivad tüved suudavad aflatoksiini toota vaid teatud temperatuuri ja veeaktiivsuse vahemikus, olles ka peamisteks protsessi mõjutavateks teguriteks (Mahror *et al.* 2020, Bhatnagar *et al.* 2006). Toksiini tootmise jaoks on ideaalne niiskuse tase üle 13% ning veeaktiivsuse tase üle 0,92 (Perczak *et al.* 2018, Mahror *et al.* 2020). Mahror *et al.* (2020) poolt läbi viidud uuringus uuriti kahe *A. flavus* tüve (A8R ja A82R) kasvu ning aflatoksiinide tootmist maapähkljahu ekstraktist saadud agaril. Uuringust selgus, et aflatoksiini tootmine toimus väiksemas veeaktiivsuse vahemikus (0,92-0,98), kui *A. flavus* tüvede kasvamise (0,85-0,98). Samuti tuvastati, et toksiini tootmiseks vajaminev temperatuur oli *A. flavus* tüvede kasvutemperatuurist (32-33 °C) veidike madalam (25-30 °C).

Aflatoksiini tootmine toimub enamasti pH vahemikus 3,4-5,5 ning sobivaks temperatuurivahemikuks on erinevad autorid määranud 25-37 °C (Bhatnagar *et al.* 2006, Nazhand *et al.* 2020). Kui temperatuur on madal, alla 25 °C, toksiini tootmine suures koguses aeglustub (Casquete *et al.* 2019). Sama efekt on ka liiga kõrgel temperatuuril (>37 °C), mille juures protsess seiskub täielikult (Bhatnagar *et al.* 2006).

### 1.3.2. Toksiini sisaldus toidus ja selle mõju tervisele

Aflatoksiinid on väga kantserogeensed ühendid, millega saastumine tekib peamiselt teravilja jms koristuseelse ja -järgse käitlemise ning ladustamise käigus (Prettl *et al.* 2017, Gichohi-Wainaina *et al.* 2021). Toksiiniga saastumine on peamiseks probleemiks just kuivatatud toodete puhul nagu pähkliid, kuivatatud puuviljad ja maitseained, kuid ka toorete põllumajandussaaduste puhul nagu köögiviljad, puuviljad ja teraviljad (Mahror *et al.* 2020, Kim *et al.* 2017). Ohtlikuks muudab toksiini tema suur püsivus ning kuumataluvus (Mahror *et al.* 2020). Aflatoksiin M<sub>1</sub> puhul on muret tekitavaks peamiselt selle sisaldus piimas ning piimatoodetes (koor, jogurt, juust), kuna toksiin talub pastöriseerimist (Kim *et al.* 2017).

Aflatoksiin satub inimkehasse enamasti mürgiste loomsete saaduste kaudu (Kortei *et al.* 2021). Toksiini mõju tervisele on sõltuv toksiini liigist, doosi suurusest ning kokkupuuteajast (Gichohi-Wainaina *et al.* 2021). Nii imetavate naiste kui ka emasloomade puhul imendub AFM<sub>1</sub> edasi ka piima, ohustades seekaudu imikuid ja loomade järglasi (Kortei *et al.* 2021, Cherkani-Hassani *et al.* 2020). Imikutel võib esineda krooniline aflatoksikoos, mis on tingitud just toksiini sisaldavast rinnapiimast ning millega võib kaasneda terratogeenne toime, mistõttu võib lastel tekkida väärareng (Sarma *et al.* 2017). Mürgise sööda tarvitamisel erituvad AFM<sub>1</sub> ja AFM<sub>2</sub> ka imetavate loomade kudedesse, bioloogilistesse vedelikesse ja piima, pannes alguspunkti saastunud toodete valmistamisesse mürgise tooraine kasutamise kaudu (Peltonen *et al.* 2001, Gichohi-Wainaina *et al.* 2021).

Aflatoksiinid põhjustavad aflatoksikoosi, millega võivad kaasneda erinevad vaegused (Sarma *et al.* 2017). Aflatoksikoos võib esineda kahte moodi – ägeda või kroonilise mürgistusena. Äge mürgistus tuleneb lühikese aja jooksul suures koguses aflatoksiini tarbimise tagajärjel ning sellega kaasneb oksendamise, kõhulahtisus ning halvemal juhul äkksurm (Gichohi-Wainaina *et al.* 2021, Rojan-Marin *et al.* 2018). Kroonilise mürgistusega kaasnevad aeglasemalt kulgevad vaegused nagu kasvu pidurdumine, seedeprobleemid ja immuunsüsteemi nõrgenemine (Sarma *et al.* 2017). Kõige ohtlikumaks peetakse AFB<sub>1</sub>, mis on ohtlik nii loomade kui ka inimeste tervisele, omades potentsiaali põhjustada vähkkasvajaid (Mahror *et al.* 2020). Kroonilise mürgistusega on kõige tihedamalt seotud hepatotsellulaarse vähi teke, mis kõige enam ohustab kroonilist B-hepatiiti põdevaid inimesi (Kortei *et al.* 2021, Arapcheska *et al.* 2015). Toksiini põhjustatud mürgistuse sümptomiteks on veel verejooksud ja tursed (Gichohi-Wainaina *et al.* 2021, Sarma *et al.* 2017). Samuti on näidatud toksiini rolli entsefalopaatia tekkes ning ka eluohtliku Reye

sündroomi arengus (Arapcheska *et al.* 2015). 2018. aastal kirjeldas Maailma Terviseorganisatsioon oma ülevaates aflatoksiinidest, et surmavaks koguseks võib lugeda 1-3 nädala jooksul, igapäevaselt 20-120 µg AFB<sub>1</sub> (kehamassi kg kohta) sisaldava toidu tarbimist (WHO, 2018).

Aflatoksiinid suudavad interakteeruda DNA-ga ning DNA ja RNA sünteesi eest vastutavate polümeraasidega, mistõttu võib aflatoksiini mutageense toime tõttu nii inimestel kui ka loomadel esineda mutatsioone geneetilises koodis ning muutusi DNA-s, mis põhjustavad kromosoomi kahjustusi (Arapcheska *et al.* 2015, Sarma *et al.* 2017). Toksiini poolt loomadele avaldatav mõju oleneb suuresti loomaliigist, vanusest, kui ka soost ning avaldub peamiselt ulatuslikke maksakahjustusi ja ka maksavähki põhjustades (Sarma *et al.* 2017, Wogan 1966). Toksiini toimel väheneb loomadel ja lindudel piima- või munatoodang (Arapcheska *et al.* 2015). Loomade aflatoksikoos põhjustab häireid loomade seedetraktis, vähendab loomade reproduktiivsust ja söögiisu ning põhjustab aneemiat ja kollatõbe (Sarma *et al.* 2017). Vasikatel on tihti täheldatud pimedaks jäämist, kukkumist, kõrvade tõmblemist ja hammaste krigistamist (Arapcheska *et al.* 2015). Pärast kliiniliste sümptomite esinemist, saabub loomade surm üldjuhul 72 tunni jooksul (Lie, Marth 1967).

#### **1.4. Aflatoksiin B<sub>1</sub> mõju piimhappebakteritele**

Aflatoksiin on osadele bakteritele (*Escherichia coli* ja *Salmonella typhi*) avaldanud DNA replikatsiooni ning kasvu ja rakkude jagunemisele pärssivat mõju (Tiwari *et al.* 1984). Burmeister ja Hesseltine (1966) uurisid 329 mikroorganismi tundlikkust aflatoksiinidele (segu, mis sisaldas aflatoksiine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ja G<sub>2</sub>). Aflatoksiinile osutusid kõige tundlikemaks grampositiivsed spoore moodustavad batsillid ja üks tüvi *Streptomyces* perekonnast. Uuringu käigus tuvastati, et aflatoksiinile olid kõige tundlikumad *Bacillus* perekonna liigid, mille puhul väljendus tundlikkus bakterite kasvu inhibeerimises ning millede puhul toksiini kontsentratsioon kasvusöötmes varieerus 5 – 40 µg/ml. Laktobatsillide kasvule aflatoksiini kontsentratsioon 30 µg/ml mõju ei avaldanud.

Aflatoksiin B<sub>1</sub> poolt avaldatavat mõju piimhappebakteritele on teadaolevalt vähe uuritud. Seda on uurinud Sutic ja Banina (1990), kes hindasid aflatoksiini mõju homofermentatiivsetele piimhappebakteritele. Homofermentatiivsed piimhappebakterid toodavad suhkrutest peamiselt piimhapet. See eristab neid heterofermentatiivsetest

piimhappebakteritest, kuna viimased toodavad suhkrutest piimhappe jt orgaaniliste hapete ja etanooli kõrval ka gaasi (Halasz 2017). Sutic ja Banina (1990) teadustöö tulemustest selgus, et teatud homofermentatiivsed piimhappebakterid (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Streptococcus lactis* (praeguse nimega *Lactococcus lactis*)), keda kasvatati erineva suhkru- (glükoos, galaktoos, laktoos, sahharoos) ja aflatoksiinisaldusega kasvusöötmes, hakkasid kuni 12-ööpäevase inkubeerimise ajal tootma gaasi. Saadud tulemuste alusel viitasid autorid võimalusele, et aflatoksiini toimel muutuvad homofermentatiivsed piimhappebakterid heterofermentatiivseks ning hakkavad muuhulgas tootma gaasi. Autorid tõid välja, et selline gaasi tootmine võib põhjendada juustude hilist paisumist, tekitades juustudes suuri auke ning lõhesid.

Teadaolevalt on antud uuring aga hetkel ainus teadustöö, mis seostab juustude paisumist aflatoksiinide mõjuga piimhappebakteritele, mistõttu väärrib antud teema kindlasti laiemat käsitlemist. Küll aga on varasemate uuringute käigus tõestatud, et mõned homofermentatiivsed tüved nagu *Lb. casei* ja *Lb. plantarum* on võimelised tootma tsitraadist väga väheses koguses gaasi ka ilma aflatoksiini juuresolekuta (Hayward 1957). Mullan (2003) on viidanud, et *Lactococcus lactis ssp. cremoris* või *Lc. lactis ssp lactis* abil valmistatud juustudes esineb kõrge tsitraadi sisaldus ning kui tsitraate fermenteerivate bakterite (nt *Lb. casei* ja *Lb. plantarum*) sisaldus juustus väga suureks läheb, võib toimuda gaasi tootmine.

## 1.5. Aflatoksiin juustus

Aflatoksiinid satuvad juustu kas saastunud tooraine (piima) või juustu valmistamisel kasutatava laabi kaudu (Rojan-Marin *et al.* 2018). Harva võib esineda ka otsest saastumist, kui hallitusseen hakkab kasvama otse kas piima või juustu pinnal (Jaksic *et al.* 2019). Juustu välise saastumise korral tungib aflatoksiin sobiva keskkonna olemasolul aja jooksul sügavamale juustukihtidesse, mis läbi suureneb ka toksiini kontsentratsioon juustus (Lie, Marth 1967). Kontsentratsiooni suurusjärku mõjutavad nii juustu tootmisprotsessid, valmimis- ja säilitamistingimused kui ka juustusort, mistõttu võib see juustudes varieeruda (Filazi, Sireli 2013).

Saastunud piimast juustu valmistades ei kao töötlemisprotsesside ajal piimast ära selles sisalduv aflatoksiin (Lie, Marth 1967). Piima töötlemise ajal jaguneb toksiin piimavalgu- ja

rasva kontsentreerimise ajal ebaühtlaselt vadaku ning kalgendi vahel (Applebaum *et al.* 1982). Kuigi valdav osa toksiini jääb kalgendisse, lahkeb osa toksiini kalgendist ka vadaku kaudu, kuna toksiin seondub vadakuvalkudega (Krstovic *et al.* 2018, Granados-Chinchilla 2016). Siiski on võimalik valmiva juustu potentsiaalset AFM<sub>1</sub> sisaldust langetada, vähendades kalgendi lõikepindala ning pikendades pressimisaega 1 tunnilt 2 tunnille, mis põhjustab suuremat toksiini väljumist juustust koos vadakuga (Filazi, Sireli 2013).

Vadaku eraldumine kalgendi lõikamisel tagab juustude kõrge valgusisalduse (Granados-Chinchilla 2016). Sellest tuleneva niiskuskao tõttu võib aga AFM<sub>1</sub> kontsentratsioon juustus, võrreldes piimaga, tõusta kuni viis korda (Rojan-Marin *et al.* 2018, Krstović *et al.* 2018). Toksiin seondub piimavalkudega, eriti kaseiiniga, mistõttu kaasneb juustu tootmisel piimavalgu kontsentreerumisega ka AFM<sub>1</sub> kontsentreerumine (Jaksic *et al.* 2019, Filazi, Sireli 2013, Applebaum *et al.* 1982). Nii on võimalik, et saastunud piimast toodetud juustus on toksiini kontsentratsioon mitu korda suurem kui juustu tootmiseks kasutatud piimas (Manetta *et al.* 2009). Pehme juustude puhul on kirjeldatud 2,5-3,3 kordset ning kõvemate juustude puhul 3,9-5,8 kordset toksiini koguse suurenemist (Filazi, Sireli 2013). Krstović *et al.* (2018) poolt sooritatud katse käigus kandus kahest piimaproovist juustu ligi 4 korda suurem kogus toksiini – algsetes piimaproovides määrati aflatoksiini koguseks 0,077±0,009 ja 0,118±0,008, samas kui neist piimadest valmistatud juustuproovides hinnati aflatoksiini koguseks vastavalt 0,484±0,008 ja 0,293±0,017. Sarnaselt leidsid ka Manetta *et al.* (2009), kes uurisid aflatoksiini ülekandumist piimast juustu, et aflatoksiiniga saastunud piimast juustu valmistades kogunes juustu 4,5 korda suurem kogus AFM<sub>1</sub>, kui algset piimas esines. Samas on leitud, et kuigi aflatoksiin on termostabiilne, võib kuumuse ning madala pH koostoimel koos piimavalkude denatureerumisega väheneda ka AFM<sub>1</sub> seondumisvõime kaseiiniga (Jaksic *et al.* 2019, Granados-Chinchilla 2016).

Aflatoksiini esinemist ja kontsentratsiooni muutuseid juustudes on uuritud erinevates teadusartiklites, mis on kajastatud tabelis 1.

**Tabel 1.** Ülevaade uuringutest, kus on tuvastatud aflatoksiini või uuritud toksiini ülekandumist piimast juustu

Juustusort	Tuvastatud aflatoksiin	Toksiini tootnud liik	Tuvastatud aflatoksiini kogus ( $\mu\text{g/kg}$ )	Artiklid
Cheddar	Aflatoksiin B <sub>1</sub>	<i>A. parasiticus</i>	15,600	Lie, Marth 1967
		<i>A. flavus</i>	1,960	
	Aflatoksiin G <sub>1</sub>	<i>A. parasiticus</i>	15,600	
		<i>A. flavus</i>	1,960	
Feta	Aflatoksiin M <sub>1</sub>	ND	0,35-0,52	Kamkar 2006
Grana Padano	Aflatoksiin M <sub>1</sub>	ND	0,246 ± 0,095*	Manetta <i>et al.</i> 2009
Parmesan	Aflatoksiin M <sub>1</sub>	ND	0,16*	Trombete <i>et al.</i> 2013
Valge juust	Aflatoksiin M <sub>1</sub>	ND	0,050-0,424	Sharifzadeh <i>et al.</i> 2017
Livanjski ehk Livno	Aflatoksiin M <sub>1</sub>	ND	0,293±0,017	Krstovic <i>et al.</i> 2018
			0,484±0,008	
			0,192±0,015	
			0,322±0,037	

Märkused: ND – not determined/ei olnud määratud; \* – analüüsitud proovide keskmine tulemus

Aflatoksiini tootvad hallitusseened vajavad oma elutegevuseks hapnikku, mistõttu on juustu korralik pakendamine väga oluline selle kvaliteedi ning säilivuse tagamiseks (Barrios *et al.* 1997). Taniwaki *et al.* (2001) korraldatud uuringus mõõdeti hallitusseente kasvu modifitseeritud atmosfääriga keskkonnas, kus vähendati hapniku ning suurendati süsinikdioksiidi sisaldust. Uuringu tulemustest selgus, et aflatoksiinide tekke vähendamiseks oli kõige sobilikum gaasi segu, mis sisaldas 40% CO<sub>2</sub> ja 1% O<sub>2</sub>. Antud gaasisegu puhul ei omanud aflatoksiini tootlus suurt tähtsust, kuna B<sub>1</sub> puhul oli toksiini tootlus 10 grammi juustu kohta 0,03  $\mu\text{g/kg}$  ning B<sub>2</sub> tootlust ei täheldatud üldse (<0,005  $\mu\text{g/kg}$  10 g juustu kohta).

## 1.6. Piimhappebakterite mõju aflatoksiinile B<sub>1</sub>

Aflatoksiinid on kuumuse ja steriliseerimise suhtes väga resistentsed, mistõttu on nende poolt põhjustatud toidusaaste vähendamiseks kasutusele võetud erinevaid füüsikaliseemilisi tehnoloogiaid (Nazhand *et al.* 2020, Bhatnagar *et al.* 2006). Kuigi mitmed meetodid on tõhusad, muudab nii mõnigi neist toidule iseloomulikke omadusi (Kim *et al.* 2017), mille hulgast võib välja tuua toidu sensorsete omaduste muutumise, toitainete ja maitse kadumise ning toiteväärtuse alanemise (Bhatnagar *et al.* 2006, Sezer *et al.* 2013).



Toksiini eemaldamiseks kasutatavate mittesöödavate adsorbentidega kaasneb vajadus need hiljem toiduainest eemaldada, mistõttu on alternatiivina pakutud toksiini eemaldamist toiduainetest, kasutades inimese tervisele ohutuid probiootilisi tüvesid (Kim *et al.* 2017).

Mitmed LAB-d suudavad vähendada toksigeensete seente kasvu ja kontsentratsiooni (Shehata *et al.* 2019), olles võimelised söödas või toidus sisalduvaid aflatoksiine siduma või lagundama vähem toksilisteks või mittetoksilisteks ühenditeks, alandades seeläbi nende kantserogeenset ning mutageenset toimet (Sezer *et al.* 2013, Kim *et al.* 2017). Sellest tulenevalt suudavad osad LAB tüved eemaldada AFB<sub>1</sub> vesilahusest ning mõned LAB tüved omavad võimet eemaldada AFM<sub>1</sub> ka piimast (Peltonen *et al.* 2001). Piimhappebakterite abil aflatoksiini mõju vähendamine või eemaldamine toimub toksiini füüsilisel sidumisel bakteri rakuseina või rakuseina komponentidega (Haskard *et al.* 2001, Peltonen *et al.* 2001). Seandumine põhineb bakterirakkude võimel adsorbeerida mükotoksiine (Perczak *et al.* 2018). Haskard *et al.* (2001) kirjeldasid oma uuringus AFB<sub>1</sub> seandumist bakteritega nõrkade mittekovalentsete interaktsioonide abil, näiteks seotuna hüdrofoobsete "taskutega" bakteripinnal. Tüvedevaheline erinevus seondunud toksiini kontsentratsiooni osas on suuresti põhjustatud bakteri rakuseina ja rakuümbrise erinevatest struktuuridest (Peltonen *et al.* 2001). Seandumisele avaldab mõju ka ümbritseva keskkonna pH ning temperatuur (Sezer *et al.* 2013).

Efektiivseteks aflatoksiini sidujateks vesilahuses on nimetatud *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Streptococcus thermophilus* ja *Bifidobacterium bifidum* (Ma *et al.* 2017, Perczak *et al.* 2018). Sezen *et al.* (2013) tuvastasid, et *Lb. plantarum* suutis siduda rohkem toksiini (46%) kui *Lc. lactis* (27%). Haskard *et al.* (2001) täheldasid, et efektiivseteks aflatoksiin B<sub>1</sub> sidujateks on ka tüved *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103) ja *Lb. rhamnosus* LC-705 (DSM 7061). Assaf *et al.* (2018) leidsid, et *Lb. rhamnosus* GG tüvi suutis siduda kuni 63% toksiinist, samas kui Abbes *et al.* (2013) teadustööst selgus, et *Lb. rhamnosus* GAF01 suutis piimast siduda maksimaalselt lausa 95% toksiini. Tajalli *et al.* (2016) korraldatud uuringus tuvastati probiootilise jogurti puhul *Lb. rhamnosus* GG tüve poolt samuti toksiiniga üle 90% seandumine. Probiootilise jogurtiga tegid katseid ka Mosallaie *et al.* (2019), kes tuvastasid *Lb. rhamnosus* PTCC 1637 tüve poolt toksiiniga 96% seonduvuse. *Lb. rhamnosus* tüvede puhul on kirjeldatud toksiiniga seandumisel ka head stabiilsust (Abbes *et al.* 2013). Haskard *et al.* (2001) uuringust selgus, et peale töötlemist säilis kuni 71% seotud AFB<sub>1</sub> kogusest ning Abbes *et al.* (2013) näitas, et *Lb. rhamnosus* GAF01 ja AFM<sub>1</sub> vahelise kompleksi pesemisel säilis 95% seotud AFM<sub>1</sub>

kogusest. Seega on erinevate autorite uuringuid võrreldes edukaimaks AFB<sub>1</sub> sidujaks *Lb. rhamnosus* liik, mille erinevad tüved suudavad siduda ning säilitada vähemalt 70% seotud toksiinist (Kim *et al.* 2017, Assaf *et al.* 2018, Haskard *et al.* 2001, Tajalli *et al.* 2016).

Peltonen *et al.* (2001) uuringus hinnati toksiiniga saastunud lahusest pärit AFB<sub>1</sub> seondumist 20 piimhappebakteri ja bifidobakteri tüvega, kus selgus, et kõige paremini (17,3 kuni 59,7%) sidusid aflatoksiini B<sub>1</sub> vesilahusest perekonna *Lactobacillus* tüved (*Lactobacillus amylovorus* CSCC 5160 ja CSCC 5197). *Bifidobacterium* perekonna tüved (*Bb. lactis* CSCC 1906, *Bb. animalis* CSCC 1941) sidusid toksiini 18,0 kuni 48,7% ning perekond *Lactococcus* tüvi (*Lc. lactis ssp. cremoris* ARH74) 5,6 kuni 41,1%. Bakteriga seondunud aflatoksiini kogust ja ka seondunud koguse püsivust mõjutab suurel määral bakterirakkude töötlemine happe või kuumusega, mille tulemusel suureneb nende võime aflatoksiiniga seonduda, kuna termiliselt inaktiveeritud piimhappebakteri raku pinnal toimuvad struktuuri muutused, mis tagavad suurema seondumisvõime toksiiniga (Kim *et al.* 2017, Perczak *et al.* 2018). Eluvõimetute piimhappebakterite puhul on kirjeldatud püsivamat toksiini sidumise võimet, kui elujõuliste piimhappebakterite puhul (Ma *et al.* 2017). Bakterite elujõulisus väheneb tänu mao happelisele keskkonnale, mille tagajärjel võivad elusad bakterid seedetrakti läbides osa seotud aflatoksiini sisaldusest organismi uuesti lahti lasta (Ma *et al.* 2017, Haskard *et al.* 2001, Perczak *et al.* 2018).

Lisaks füüsilisele seondumisele, on toksiini eemaldamises suur roll ka LAB-ide poolt toodetud, seente tegevust pärssivatel, madala molekulmassiga ühenditel nagu näiteks orgaanilised happed (äädik- ja piimhape), vesinikperoksiid, reuteriin, bakteriotsiinid, valgulised ühendid, hüdroksüülrasvhapped ja fenoolsed ühendid (Shehata *et al.* 2019, Perczak *et al.* 2018). Orgaaniliste hapete tootmine alandab toidukeskkonna pH-d, luues ebasoodsad tingimused potentsiaalselt patogeensete mikroorganismide ja seente paljunemiseks (Guimaraes *et al.* 2018). LAB-ide poolt toodetud ühendid moodustavad tihti omavahel sünergismi, suurendades seeläbi oma seentevastast toimet (Fernandez *et al.* 2017). Näiteks propioonhappega võib sünergismi tekitada kapronhape, mis on piimhappebakterite poolt toodetud rasvhape ning omab tugevat seentevastast toimet (Perczak *et al.* 2018, Fernandez *et al.* 2017).

Piimhappebakterite poolt toodetud bakteriotsiine peetakse samuti efektiivseks AFB<sub>1</sub> vastu võideldes, kuna bakteriotsiinid on värvitud ja lõhnatud ning omavad tugevaid antimikroobseid omadusi (Sezer *et al.* 2013). Seente kasvu pärssimisel on tõhusaks tunnustatud peamiselt *Lb. reuteri* poolt glütseroolist toodetav reuteriin. Reuteriin pärsib DNA

biosünteesis osaleva ensüümi ribonukleaasi aktiivsust, pärssides ka *Aspergillus* perekonna liikide kasvu, mistõttu on toodete valmistamisel soovitatav LAB kultuuridele juurde lisada glütserooli (Perczak *et al.* 2018).

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Eesmärk ja ülesanded**

Bakalaureusetöö eesmärk on nii teaduskirjanduse kui ka eksperimentaalse töö alusel anda ülevaade aflatoksiinidest, nende sisaldusest toidus ja mõjust tervisele ning tuvastada aflatoksiin B<sub>1</sub> poolt avaldatav mõju juustus sisalduvatele piimhappebakteritele.

Bakalaureusetöö eksperimentaalse osa ülesanded:

- 1) planeerida ja teostada katsed hilise paisumisega juustudes sisalduvate mikroobide isoleerimiseks, identifitseerimiseks, säilitamiseks ja arvukuse määramiseks;
- 2) tuginedes Sutic ja Banina (1990) artiklile, selgitada, milline on aflatoksiini mõju homofermentatiivsete piimhappebakterite referentstüvedele ning juustudest isoleeritud kultuuridele.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

#### **2.2.1. Uuritav materjal**

Bakalaureusetöös teostati katsed, vahemikus oktoober 2020 - märts 2021, ühest Eesti piimatööstusest pärit kahe viilutatud ja pakendatud juustuga (üks poolkõva lahtise tekstuuriga ning teine poolkõva kinnise tekstuuriga juust, edaspidi vastavalt JP1 ja JP2). Uuritavad juustud olid analüüsimisele saabudes paisunud (pakend kummis) – tegu oli juustude hilise paisumisega, mis toimus 1 - 2 kuud pärast juustude pakendamist. Antud piimatööstuse andmetel vastasid nii juustu toorme kui juustupartiide mikrobioloogilised analüüsid, sh. klostriidide arvukus, nõuetele.

### 2.2.2. Proovide ettevalmistamine külvideks

Juustude mikrobioloogiliste analüüside teostamiseks kaaluti 25 g vastavat juustu Falcon tuubi, millele lisati juurde 225 ml 0,1% peptonlahust. Saadud segu valati filtriga homogeniseerimiskotti (*VWR Blender bag*, USA) ning homogeniseeriti homogenisaatoris *Stomacher®400 Circulator* (*Seward Ltd.*, Inglismaa) 8 minutit, 300 rpm. Saadud lahusest tehti 0,1% peptonlahusega kümnendlahjenduste rida kuni  $10^{-11}$ .

Lahjenduste tegemisel kasutatud peptonlahused ning kõik töös kasutatud steriilsed sötmed valmistati ette Eesti Maaülikooli toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetooli laborispetsialisti Kersti Veske poolt.

### 2.2.3. Mikrobioloogilised külvid

Katseseeriade käigus kasutatud sötmed erinevate mikroobide süviskülvideks olid:

- bakterid: *Milk Plate Count Agar (LAB 115)* (*LabM Ltd.*, Inglismaa);
- hallitus- ja pärmseened: *Sabouraud Dextrose Agar CE* (*LabM, Ltd.*, Inglismaa);
- piimhappebakterid: *MRS, Man, Rogosa and Sharpe Agar (LAB093)* (*LabM Ltd.*, Inglismaa).

Pindkülvid teostati järgnevatele sötmetele:

- kolilaadsed bakterid: *Violet Red Bile Agar (LAB 31)* (*LabM Ltd.*, Inglismaa);
- enterobakterid: *Violet Red Bile Agar (Biolife, Itaalia)* koos glükoosiga 10g/l;
- stafülokokid: *Baird-Parker Medium Base (ISO) (LAB285)* (*LabM Ltd*, Inglismaa);
- piimhappebakterid: *MRS, Man, Rogosa and Sharpe Agar (LAB093)* (*LabM Ltd.*, Inglismaa) ja *M17 Agar (LAB092)* (*LabM Ltd*, Inglismaa).

Süviskülvide puhul pipeteeriti tühjale steriilsele Petri tassile 1 ml homogeniseeritud juustuproovide vastavat kümnendlahjendust, millele valati peale ~ 50 °C vedel agarsööde. Agarsööde ja proov segati ning jäeti tarduma.

Pindkülvide korral teostati tardsötmetele juustuproovide väljavalitud kümnendlahjendustest 10 µl külviaasaga tihe külv.

Kõikide külvide puhul tehti ka paralleelsed külvid, et suurendada tulemuste statistilist usaldusväärsust.

Bakterite üldarvu määramiseks inkubeeriti külvitasse 24-72 tundi temperatuuril 30 °C; hallitus- ja pärmseente tase kuni 5 ööpäeva 25 °C juures ning stafülokokkide, enterobakterite ja kolilaadsete tase temperatuuril 37 °C. M17 ja MRS söötmele tehtud külvide puhul inkubeeriti tase aeroobsetes tingimustes 35 °C juures ning lisaks inkubeeriti MRS külvitasse paralleelselt nii mikroaeroobselt 10% CO<sub>2</sub> keskkonnas kui ka anaeroobselt temperatuuril 37 °C.

#### **2.2.4. Mikroobide arvukuse hindamine ja isoleerimine**

Mikroobide üldarvu arvutamiseks süviskülvitassidelt kasutati valemit: (*pesasid moodustavate ühikute arv söötmel \* lahjendustegur*) / *külvimäär (ml)*, kus pesasid moodustavate ühikute arvuks võeti paralleelkülvide keskmine väärtus ning lahjendusteguriks oli proovi vastav kümnendlahendus (10, 100, 1000, ... kordne). Mikroobide üldarvu väljendatakse pesasid moodustavate ühikutena (PMÜ) 1 ml või g algproovi kohta. Loendamisel valiti võimalusel söötmetass, millele oli 30-300 PMÜ.

Pindkülviga tassidel loendati söötmetele kasvanud pesade hulk ( $PMÜ * 100 * lahjendustegur$ ) ning kirjeldati pesade morfoloogiat. M17 ja MRS söötmetel väljakasvanud pesadest tehti Grami preparaadid ning mikroskopeeriti. Nii uuriti erinevate mikroobide rakumorfoloogiat, kirjeldades mikroobide värvumist, kuju, suurust ning asetust. Erineva morfoloogiaga mikroobid isoleeriti ning kasvatati puhaskultuuridena. Puhaskultuuride säilitamiseks pandi isolaadid edasiste katsete jaoks glütseroolilahusesse ning säilitati temperatuuril -80 °C.

#### **2.2.5. Aflatoksiini määramine**

Aflatoksiini ja juustude paisumise vahelise seose määramiseks saadeti mõlemad paisunud juustupakid Põllumajandusuuringute Keskusesse, et määrata juustudes sisalduv AFM<sub>1</sub> hulk.

## 2.2.6. Isoleeritud piimhappebakterid ja referentstüved

Fermentatsioonikatsetes kasutatud referentstüved ja juustudest (JP1 ja JP2) isoleeritud piimhappebakterid olid järgnevad:

- *Lactobacillus casei* (ATCC 393);
- *Lactococcus lactis ssp. lactis* (CHOOZIT™ MC 70 FRO 500 DCU);
- *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* (CHOOZIT™ MD 89 LYO 50 DCU);
- *Lactobacillus curvatus* (CRL 1000);
- *Lactobacillus paracasei* (JP2 isolaat SE MA C3);
- *Lactobacillus rhamnosus* (JP1 isolaat SL AE A3).

Juustust JP2 isoleeritud *Lb. paracasei* oli fermentatsioonikatsete eel Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis MALDI-TOF meetodil tuvastatud homofermentatiivse liigina *L. curvatus*, mis osutus hilisemal identifitseerimisel Terviseameti Kesklaboris (MALDI-TOF meetodiga) ja EMÜ Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetoolis doktorant Liis Lutter'i poolt API Kit meetodiga fakultatiivselt heterofermentatiivseks liigiks *Lb. paracasei*.

## 2.2.7. Katsutite ettevalmistamine süsivesikute fermentatsiooniks

Töös järgnevalt kirjeldatud katsemetoodika lähtus Sutic ja Banina (1990) artiklis toodud metoodikast.

Katsete jaoks valmistati söötmed, kasutades *BBL™ Phenol Red Broth Base* (Becton, Dickinson, Prantsusmaa) söödet, millele lisati juurde 1% vastavat süsivesikut (glükoos, galaktoos, laktoos või sahharoos). Ühe bakterikultuuri jaoks märgistati iga söötme puhul 15 katsutit arvestades kolme paralleeli ehk kokku 60 katsutit (15 laktoosiga, 15 glükoosiga, 15 galaktoosiga ja 15 sahharoosiga söödet). Märgistatud katsutid täideti 5 ml vastava söötmega ning katsutisse lisati ka Durham tuub (6 mm, *Marienfeld*, Saksamaa) (põhi üleval pool ehk tagurpidi). Sellele järgnes katsutite autoklaavimine, mille käigus katsutis olev sööde liikus Durham tuubi. Glükoosi ja galaktoosiga katsuteid autoklaaviti 121 °C juures 15 min, laktoosi ja sahharoosi autoklaaviti 3 minutit, et viimased ei laguneks.

### 2.2.8. Süsivesikute fermentatsioon koos aflatoksiiniga

9 ml füsioloogilist lahust sisaldavasse katsutisse kanti 10 µl külviaasaga uuritavat, 24 h MRS söötmel kasvanud, bakterit nii palju, kuni katsutis olev lahus vastas McFarland 2.0 standardile. Seejärel pipeteeriti antud katsutist 100 µl bakterikultuuri igasse eelnevalt ettevalmistatud 5 ml söötme ja Durham tuubiga katsutisse, kuhu lisati ka aflatoksiini B<sub>1</sub> (*Aflatoxin B<sub>1</sub> crystalline, Acros organics, Iisrael*). Aflatoksiini pipeteeriti katsutitesse neljas kontsentratsioonis – 1, 10, 20 ja 40 µg/mL. Valmistati ka kontrollproov (0), kuhu aflatoksiini ei lisatud. Kõik kontsentratsioonid, sh kontrollproov, tehti kolmes korduses. Iga katse läbiviimisel kasutati katsetingimuste ja süsivesikute fermentatsiooni kontrollina kõigi süsivesikutega söötmete puhul (kahes paralleelis) *Escherichia coli* WDCM 0020 tüve, ilma aflatoksiinita (joonis 1).



**Joonis 1.** Süsivesikute fermentatsiooni kontrollkatse *Escherichia coli* bakteriga, kus kollane värvus näitab happe tootmist, punane/roosa värvus näitab, et happe tootmist ei toimunud ning mull Durham tuubis osutab *E. coli* võimele moodustada süsivesikute fermentatsioonil gaasi. Näeme, et esimeses kolmes katsutis, kus oli vastavalt glükoos, galaktoos ja laktoos, toodeti nii hapet kui gaasi ning sahharoosi sisaldavas neljandas katsutis ei toimunud ei happe ega gaasi produktsiooni.



Kõiki katsuteid loksutati umbes 5 sekundit vortexil (*Vortex Genie 2 Mixer, Scientific Industries Si<sup>TM</sup>*, Inglismaa) ning asetati inkubeerima temperatuurile 30 °C. Fermentatsiooni kulgu ehk happesust ja gaasi produktsiooni hinnati 24, 48 ja 72 tunni järel ning 5ndal ja 12ndal päeval.

Tulemuste hindamisel arvestati kolme paralleelkatsuti keskmist tulemust ehk 2 katsutit kolmest pidid andma sama tulemuse. Katsutid, mis värvusid kollaseks viitasid happe tootmisele, punase värvusega katsutites hapet ei toodetud. Katsutid, mis värvusid oranžiks märgiti vahepealseks. Gaasi tootmist katsutites jälgiti mulli tekkimisega Durham tuubis – katsutites, milles mulli ei tekkinud, gaasi tootmist ei toimunud.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. Mikrobioloogiliste külvide tulemused

Mikrobioloogiliste analüüside tulemused olid mõlema uuritud, hilise paisumisega, juustu JP1 ja JP2 puhul sarnased (tabel 2).

**Tabel 2.** Mikroobide üldarv uuritavates juustudes

Uuritav juust	Mikroobide üldarv, PMÜ/g		
	Bakterid	Hallitus- ja pärmseened	Piimhappebakterid
JP1	$4,35 \times 10^8$	$1,00 \times 10^4$	$2,30 \times 10^8$
JP2	$7,65 \times 10^8$	$2,00 \times 10^3$	$2,53 \times 10^8$

*Coli*-laadseid, enterobaktereid ega ka stafülokokke JP1 ja JP2 juustudes ei tuvastatud ning kuna ka kloostiidide sisaldus vastas piimatööstuse andmetel antud juustupartiis ning juustu valmistamisel kasutatud toorpiimas nõuetele, ei saa juustude paisumist põhjendada sekundaarse mikrobiotaga seotud saastatusega.

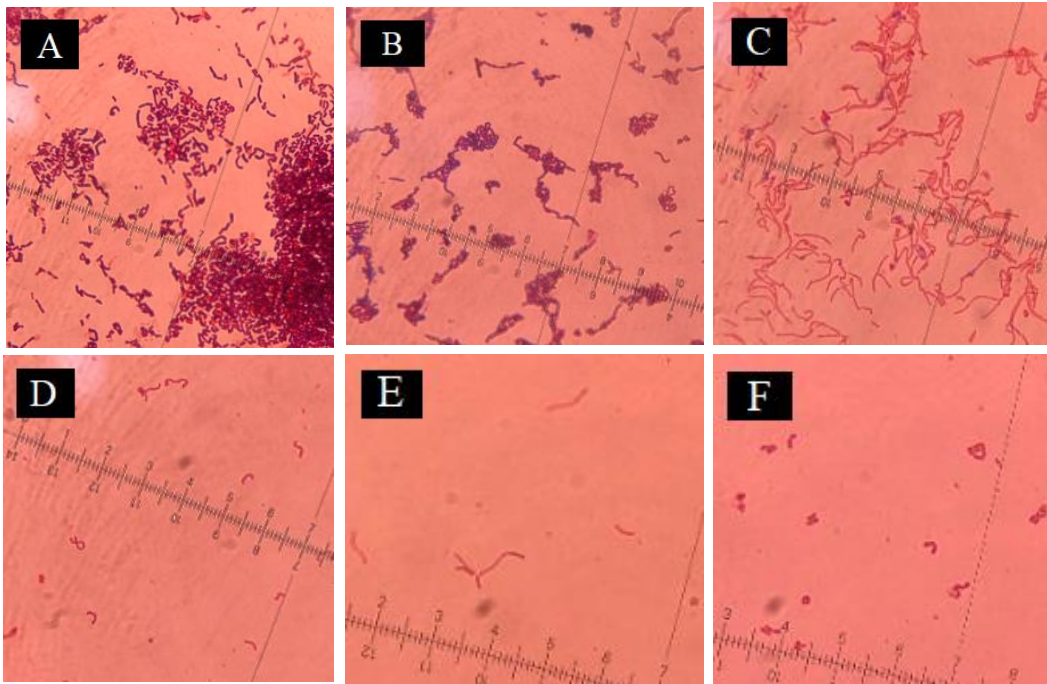
#### 3.2. Isoleeritud mikroobide morfoloogia ja identifitseerimine

M17 ja MRS söötmetel väljakasvanud erineva morfoloogiaga pesadest tehti Grami preparaadid ning mikroskopeeriti. Kõik MRS kui ka M17 söötmetel kasvanud bakterid olid grampositiivsed, kuid erinesid nii suuruse kui asetuse poolest.

MRS söötmel esinesid:

- 1) pulkbakterid, kes paiknesid nii suuremates kobarates, kui ka üksikult, olles suurusega  $1 \times 2-3 \mu\text{m}$  (joonis 2A ja 2B);
- 2) pikemad, üksikult asetsevad pulkbakterid, suurusega  $1 \times 3-4 \mu\text{m}$  (joonis 2C);
- 3) väiksemad krussis üksikult asetsevad pulkbakterid, suurusega  $0,5 \times 1-2 \mu\text{m}$  (joonis 2D).

M17 söötmel kasvasid kokid suurusega  $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ , kes paiknesid väikestes kobarates (joonis 2F) või ahelates (joonis 2E).



**Joonis 2.** MRS ja M17 söötmetelt isoleeritud bakterite Grami preparaadid

Erineva rakumorfoloogiaga mikroobid isoleeriti ning kasvatati puhaskultuuridena. Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi MALDI-TOF tuvastamisele saadeti kokku 19 juustudest isoleeritud bakterikultuuri, millest ühte kultuuri MALDI-TOF ei tuvastanud. Kokku identifitseeriti 4 bakteriliiki: 3 *Lactococcus lactis*, 5 *Lactobacillus paracasei*, 9 *Lb. curvatus* ja 1 *Lb. rhamnosus*.

Antud 19 proovist, mis Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi MALDI-TOF tuvastamisele saadeti, oli tulemus kooskõlas mikroskoobi all nähtavaga vähemalt viiel juhul. Seitsmel juhul erines tuvastamiselt saadud tulemus mikroskopeerimisel vaadeldud rakumorfoloogiaga, mistõttu tuleks kultuurid, mille puhul erinevus tekkis, teiste tuvastusmeetoditega (nt. molekulaarsete meetoditega) uuesti identifitseerida.

### 3.3. Aflatoksiini hulk juustus

Mõlemad paisunud juustupakid saadeti AFM<sub>1</sub> sisalduse tuvastamiseks Põllumajandusuuringute Keskusesse, et tuvastada aflatoksiini ja juustude paisumise vaheline seos. Põllumajandusuuringute Keskus ei tuvastanud kummaski juustus AFM<sub>1</sub>. Seega ei ole juustupakkides ilmnenud hiline paisumine seotud aflatoksiiniga.

### 3.4. Aflatoksiini mõju piimhappebakteritele

Lähtudes Sutic ja Banina (1990) uuringust, valiti üheks katse käigus uuritavaks bakteriks *Lb. casei* referentstüvi. Uuritavate juustude starterkultuuride kompositsiooni põhjal lisati uuritavate bakterite hulka *Lc. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* ja *Lc. lactis ssp. lactis* referentstüved. MALDI-TOF meetodil LAB liikide tuvastamise põhjal lisati uuringusse ka homofermentatiivsed *Lb. rhamnosus* (isolaat JP1 juustust), *Lb. curvatus* (referentstüvi) ning fakultatiivselt heterofermentatiivne *Lb. paracasei* (algsest määratud kui homofermentatiivne *Lb. curvatus*, isolaat JP2 juustust).

Aflatoksiin B<sub>1</sub> mõjutas kõikide bakterite süsivesikute fermenteerimisprotsesse erinevalt. Kõige halvemini kääritasid bakterid laktoosi, eriti *Lb. casei* ATCC 393 ja *Lb. curvatus* CRL 1000 (tabel 3 ja tabel 8), mille puhul laktoosiga söötmes gaasi tootmist ei toimunud ning ka happe tootmine kas puudus või oli väga vähene.

**Tabel 3.** Aflatoksiin B<sub>1</sub> toime *Lactobacillus casei* ATCC 393 võimele kääritada süsivesikuid

Suhkur	Aflatoksiini kontsentratsioon µg/mL	Inkubeerimiseaeg									
		24 h		48 h		72 h		5 päeva		12 päeva	
		H	G	H	G	H	G	H	G	H	G
Glükoos	0	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	1	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	10	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	20	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	40	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
Galaktoos	0	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	1	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	10	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	20	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	40	v	-	v	-	v	-	v	-	+	-
Laktoos	0	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
Sahharoos	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Märkused: H = hape; G = gaas; + positiivne, - negatiivne, v vahepealne

Aflatoksiin B<sub>1</sub> *Lb. casei* ATCC 393 tüvele mõju ei avaldanud. Toksiini mõjul ei toimunud gaasi tootmist süsivesikutest terve inkubeerimisperioodi jooksul. Antud tulemus ei ole

kooskõlas käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalse osa aluseks olnud Sutic ja Banina (1990) uuringuga, milles *Lb. casei* 17s tüve kasutusel ilmnis nii laktoosi kui ka glükoosiga proovide puhul peale 72-tunnist inkubeerimist gaasi teke 40 µg/ml aflatoksiini sisaldusega katsutites. 12. päevaks oli antud süsivesikute puhul gaasi tootmine esinenud ka katsutites, mis sisaldasid 10 ja 20 µg/ml aflatoksiini. Lisaks esines Sutic ja Banina (1990) uuringus *Lb. casei* poolt gaasi tootmine ka pärast 12-päevast inkubeerimist galaktoosiga katsutites, mis sisaldasid 40 µg/ml aflatoksiini.

Kuni viienda päevani ei toimunud käesolevas töös happe tootmist laktoosi ja sahharoosi puhul ning glükoosi ja galaktoosiga katsutite puhul oli happe tootmine minimaalne (katsutites olevad söötmed värvusid õrnalt punasest oranžiks). 12. päevaks värvusid glükoosi ja galaktoosiga katsutid sõltumata aflatoksiini kontsentratsioonist kollaseks (toimus happe tootmine), laktoosiga katsutid värvusid õrnalt oranžiks (toimus nõrk happe tootmine) ning sahharoosi puhul jäid kõik katsutid punaseks (happe tootmist ei esinenud). Need tulemused erinevad samuti oluliselt Sutic ja Banina (1990) uuringu tulemustest, kus happe tootmine ilmnis peale 24-tunnist inkubatsiooni peaaegu kõikides katsutites kõigi nelja süsivesiku puhul.

Sarnaselt *Lb. casei* ATCC 393 tüvele, ei avaldanud AFB<sub>1</sub> mõju ka JP1 juustust isoleeritud *Lb. rhamnosus*'e võimele kääritada süsivesikuid (tabel 4).

**Tabel 4.** Aflatoksiin B<sub>1</sub> toime juustust JP1 isoleeritud *Lactobacillus rhamnosus* võimele kääritada süsivesikuid

Suhkur	Aflatoksiini kontsentratsioon µg/mL	Inkubeerimiseaeg									
		24 h		48 h		72 h		5 päeva		12 päeva	
		H	G	H	G	H	G	H	G	H	G
Glükoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Galaktoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Laktoos	0	-	-	v	-	v	-	+	-	+	-
	1	-	-	v	-	v	-	+	-	+	-
	10	-	-	v	-	v	-	+	-	+	-
	20	-	-	v	-	v	-	v	-	+	-
	40	-	-	v	-	v	-	v	-	+	-
Sahharoos	0	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-

*Märkused:* H = hape; G = gaas; + positiivne, - negatiivne, v vahepealne

Alates esimesest inkubatsiooni päevast (24 tunni möödudes) toimus happe tootmine glükoosi ja galaktoosiga katsutites. 12. päevaks esines laktoosiga katsutites täielik happe tootlus ning sahharoosiga katsutites nõrk happe tootmine. Gaasi tootmist toksiini mõjul ei esinenud ühegi süsivesiku puhul terve inkubeerimisperioodi jooksul. Gaasi tootmist ei esinenud ka *Lc. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* MD 89 LYO tüve kasutamisel (tabel 5).

**Tabel 5.** Aflatoksiin B<sub>1</sub> toime *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* MD 89 LYO võimele kääritada süsivesikuid

Suhkur	Aflatoksiini kontsentratsioon µg/mL	Inkubeerimiseaeg									
		24 h		48 h		72 h		5 päeva		12 päeva	
		H	G	H	G	H	G	H	G	H	G
Glükoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Galaktoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Laktoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Sahharoos	0	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-

*Märkused:* H = hape; G = gaas; + positiivne, - negatiivne, v vahepealne

*Lc. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* MD 89 LYO tüve kasutamisel esines peale 24-tunnist inkubatsiooni kõikides glükoosi, galaktoosi ning laktoosiga katsutites happe tootmine. Sarnased tulemused saadi ka *Lc. lactis ssp. lactis* MC 70 FRO tüve puhul (tabel 6), kuid kui sahharoosiga söötmetes tekkis *Lc. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* puhul happe tootmine peale 48-tunnist inkubatsiooni, siis *Lc. lactis ssp. lactis* MC 70 FRO tüve puhul jäi sahharoosi puhul nii hape kui gaas produtseerimata. Antud tulemus erineb osaliselt Sutic ja Banina (1990) uuringust. Kuigi mainitud autorite uuringus ei toimunud sarnaselt käesoleva uuringuga sahharoosiga söötmes *Str. lactis* AK-60 (praeguse nimega *Lc. lactis*) tüve kasutamisel gaasi tootmist, v.a 12. päeval 40 µg/ml aflatoksiini sisaldavas katsutis, siis erinevalt käesolevast tööst, ilmnes Sutic ja Banina (1990) uuringus happe tootmine 3. päevaks kõikides katsutites. Uuringutulemuste lahknemine võib tuleneda kasutatavate tüvede vahelisest erinevusest.

**Tabel 6.** Aflatoksiin B<sub>1</sub> toime *Lactococcus lactis ssp. lactis* MC 70 FRO võimele kääritada süsivesikuid

Suhkur	Aflatoksiini kontsentratsioon µg/mL	Inkubeerimiseaeg									
		24 h		48 h		72 h		5 päeva		12 päeva	
		H	G	H	G	H	G	H	G	H	G
Glükoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Galaktoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Laktoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Sahharoos	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Märkused:* H = hape; G = gaas; + positiivne, - negatiivne, v vahepealne

Kõikidest katsetatud bakteritüvedest oli juustust JP2 isoleeritud *Lb. paracasei* (algselt identifitseeritud kui *Lb. curvatus*) ainus, mille puhul ilmnes AFB<sub>1</sub> mõjul gaasi tootmine (tabel 7).



**Tabel 7.** Aflatoksiin B<sub>1</sub> toime juustust isoleeritud *Lactobacillus paracasei* võimele kääritada süsivesikuid

Suhkur	Aflatoksiini kontsentratsioon µg/mL	Inkubeerimiseaeg									
		24 h		48 h		72 h		5 päeva		12 päeva	
		H	G	H	G	H	G	H	G	H	G
Glükoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	-	-	v	-	+	-	+	+	+	+
	20	-	-	v	-	v	-	+	+	+	+
	40	-	-	v	-	+	-	+	+	+	+
Galaktoos	0	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
	20	-	-	v	-	v	-	+	+	+	+
	40	-	-	v	-	v	-	+	+	+	+
Laktoos	0	-	-	v	-	+	-	+	-	+	-
	1	-	-	-	-	-	-	v	-	+	-
	10	-	-	v	-	+	-	+	-	+	-
	20	-	-	v	-	+	-	+	-	+	-
	40	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Sahharoos	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	1	-	-	-	-	v	-	+	+	+	+
	10	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
	20	-	-	-	-	v	-	+	+	+	+
	40	-	-	-	-	v	-	+	+	+	+

*Märkused:* H = hape; G = gaas; + positiivne, - negatiivne, v vahepealne

Aflatoksiin B<sub>1</sub> avaldas juustust isoleeritud *Lb. paracasei* süsivesikute fermentatsiooniprotsessile erinevat mõju, mis varieerus olenevalt süsivesikust, inkubatsiooniajast ning toksiini kontsentratsioonist erinevate süsivesikutega katsutites. Glükoosi puhul puhul ilmnes 0 ning 1 µg/ml aflatoksiini kontsentratsiooniga katsutites happe tootmine peale 24-tunnist inkubatsiooni, kuid gaasi tootmist ei ilmnunud terve uurimisperiodi vältel. Seevastu glükoosiga katsutites, kus aflatoksiini kontsentratsioon oli kas 10, 20 või 40 µg/ml, esines peale 48-tunnist inkubeerimist nõrk happe tootmine ning 5. päevaks oli antud katsutites tuvastatav nii happe- kui ka gaasi tootmine (joonis 3).



**Joonis 3.** Juustust JP2 isoleeritud *Lb. paracasei* glükoosi fermentatsiooni tulemused 12. päeval – kõikides katsutites toimub happe produktsioon ning gaasi produktsioon toimub katsutites, mis sisaldavad 10, 20 ja 40 µg/ml aflatoksiini B<sub>1</sub>.

Sarnast mustrit täheldati ka galaktoosiga katsutites, mille puhul toimus nii happe kui ka gaasi tootmine 5. päevaks katsutites, kus aflatoksiini kontsentratsioon oli 10, 20 või 40 µg/ml. Kuna glükoosi ning galaktoosiga katsutites, kontsentratsioonil 0 µg/ml aflatoksiini, gaasi tootmist ei esinenud, võib antud süsivesikusöötmete puhul seostada gaasi teket aflatoksiiniga B<sub>1</sub>. Tulemust toetab osaliselt Kask *et al.* (2003) uuring, mille käigus isoleeriti Eestis valmistatud juustudest baktereid ning uuriti nende kasvu ning elujõulisust erinevates keskkonnatingimustes. Nimetatud uuringus küll aflatoksiini ei kasutatud, aga leiti, et ükski isoleeritud kuuest *Lb. paracasei* tüvest MRS puljongis (mille koostisesse kuulub ka glükoos) gaasi ei tootnud.

Võib oletada, et AFB<sub>1</sub> omas inkubeerimise algul *Lb. paracasei* happe tootlikkusele, glükoosi ja galaktoosiga kasvusöötmetes, inhibeerivat mõju.

Laktoosi puhul esines happe tootmine kõikides katsutites alates 12. päevast, kuid gaasi tootmist ei esinenud. Kõikides sahharoosiga katsutites toimus 5. päevaks happe tootmine ning katsutid, mis sisaldasid 1, 20 või 40 µg/ml kontsentratsioonil aflatoksiini, oli märgata ka gaasi tootmist. 12. päevaks oli gaasi tootmine toimunud ka katsutis, mis sisaldas 10 µg/ml

aflatoksiini. Gaasi tootmist täheldati 5. päeval aga katsutis, kuhu aflatoksiini polnud lisatud. Viimast leidu saab võrrelda Sutic ja Banina (1990) uuringuga, kus *Str. lactis* (*Lc. lactis*) bakteri kasutusel ilmnis gaasi tootmine glükoosi söötmega katsutis, mis aflatoksiini ei sisaldanud, mille puhul võib oletada, et antud juhtudel ei olnud gaasi tootmisel aflatoksiiniga mingit seost ning gaas tekkis mõne muu faktori tõttu.

Võrreldes juustust isoleeritud *Lb. paracasei* tulemusi *Lactobacillus curvatus* referentstüvega CRL 1000, näeme, et aflatoksiin B<sub>1</sub> ei avaldanud viimasele mingit mõju (tabel 8).

**Tabel 8.** Aflatoksiini B<sub>1</sub> poolt avaldatav mõju *Lactobacillus curvatus* CRL 1000 süsivesikute kääritamise protsessile

Suhkur	Aflatoksiini kontsentratsioon µg/mL	Inkubeerimiseaeg									
		24 h		48 h		72 h		5 päeva		12 päeva	
		H	G	H	G	H	G	H	G	H	G
Glükoos	0	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	1	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	10	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	20	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	40	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
Galaktoos	0	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	1	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	10	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	20	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
	40	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-
Laktoos	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sahharoos	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Märkused:* H = hape; G = gaas; + positiivne, - negatiivne, v vahepealne

Kuna fermentatsiooni muster osutus *Lb. paracasei* omast (algselt identifitseeritud kui *Lb. curvatus*) väga erinevaks, saadeti juustust isoleeritud tüvi uuele tuvastamisele, seekord Terviseameti Kesklaborisse, kus MALDI-TOF meetodiga leiti, et tegu on *Lb. paracasei*'ga, mida kinnitas ka EMÜ Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetoolis API Kit CHL50 meetodiga identifitseerimine. API Kit CHL50 meetodiga tuvastamisel fermenteeris *Lb. paracasei* 48 h inkubatsiooni jooksul glükoosi ja galaktoosi ning ei fermenteerinud sahharoosi, mis on kooskõlas läbiviidud katsega. Osaline erinevus oli laktoosi kääritamise

protsessis, kus API Kit meetodil fermenteeris *Lb. paracasei* laktoosi täielikult juba 24 h inkubatsiooni jooksul, kuid toksiiniga läbiviidud katses kontrollproovi puhul fermenteeris *Lb. paracasei* laktoosi 48 h jooksul vaid vähesel määral (tabel 7).

Uuringu eksperimentaalse osa tulemustest selgus, et katse käigus kasutatud homofermentatiivsetele tüvedele aflatoksiin mõju ei avaldanud. Üheski homofermentatiivset bakterit sisaldanud süsivesiku söötmega katsutis ei tekkinud terve inkubeerimisperioodi (12 päeva) jooksul gaasi. Seega ei mõjuta aflatoksiin B<sub>1</sub> homofermentatiivseid piimhappebaktereid sel määral, et viimased gaasi tootma hakkaks, mistõttu antud uuringu bakalaureusetöö aluseks oleva Sutic ja Banina (1990) uuringu tulemusi ei kinnita.

Aflatoksiin B<sub>1</sub> avaldas mõju vaid fakultatiivselt heterofermentatiivsele *Lb. paracasei* süsivesikute kääritamise protsessile. Toksiini mõju antud bakteri puhul avaldus glükoosi ja galaktoosi söötmega katsutites gaasi tekkega ning bakteri happe tootlikkuse inihbeerimisega.

Töö tulemuste põhjal oleks oluline laiendada uuritavate homofermentatiivsete bakterite hulka. Käesoleva uuringu tulemused seoses bakteriga *Lb. casei* erinesid bakalaureusetöö aluseks oleva uuringu tulemustest, mistõttu oleks üldiste järelduste tegemiseks vajalik katsetada suuremat hulka erinevate bakterite tüvesid. Kuigi *Lb. paracasei* on fakultatiivselt heterofermentatiivne ning peaks spetsiifilistest substraatidest nagu laktoos või galaktoos gaasi tootma (Blaya *et al.* 2018), siis käesolevas uuringus antud süsivesikutega ilma aflatoksiiniga söötmetes gaasi tootmist ei esinenud, mistõttu tuleks põhjalikumalt uurida *Lb. paracasei* fermenteerimisprotsesse ning nendele avalduvat toimet aflatoksiini poolt.

## KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

Bakalaureusetöös anti kirjandusallikate põhjal ülevaade aflatoksiinist ning selle poolt avaldatavast mõjust juustule ning piimhappebakteritele. Lisaks viidi läbi eksperimendid, mille käigus määrati kahe juustu mikrobioloogiline koostis, isoleeriti ja säilitati juustudest tuvastatud mikroobide puhaskultuurid ning teostati katsed aflatoksiin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) mõju kohta juustudest isoleeritud piimhappebakteritele ning referentstüvedele.

Bakalaureusetöö eksperimentaalse osa mikrobioloogiliste analüüside tulemused olid mõlema analüüsitud juustu puhul sarnased. Juustuproovidest isoleeriti 4 bakteriliiki – *Lc. lactis*, *Lb. curvatus*, *Lb. rhamnosus* ning *Lb. paracasei*. Tuvastatud bakterite leid on üldiselt ootatud tulemus, kuna uuritud juustude valmistamisel kasutatav starterkultuuride segu, sisaldab kolme *Lc. lactis* alamliiki ning muud tuvastatud bakterid kuuluvad mitte-starter piimhappebakterite hulka ning on juustu sattunud ilmselt kas piima, töötlemis- või tootmisseedmete jms kaudu. Patogeenseid ning muid paisumist põhjustavaid mikroobe nagu enterobaktereid, *coli*-laadseid ega ka stafülokokke juustudest ei tuvastatud. Ka klostriidide hulk vastas uuritud juustupartiides piimatööstuse andmetel nõuetele. Mõlemad uuritud juustud, millel esines nn hiline paisumine ei sisaldanud aflatoksiini M<sub>1</sub>, mis tähendab, et juustupakkides ilmnenud paisumisel ei olnud tõenäoliselt seost aflatoksiiniga.

Fermenteerimiskatsete tulemusena ilmnes, et AFB<sub>1</sub> avaldas mõju vaid ühest uuritud juustust isoleeritud fakultatiivselt heterofermentatiivsele *Lb. paracasei* tüvele. AFB<sub>1</sub> poolt avaldatav mõju väljendus gaasi tootmises, mis esines alates viiendast inkubeerimispäevast, nii glükoosi kui ka galaktoosiga katsutites, mis sisaldasid 10, 20 ja 40 µg/ml aflatoksiini, samas kui kontrollkatsutis (0 µg/ml aflatoksiini B<sub>1</sub>) gaasi teket ei ilmnenud, mistõttu võib järeldada, et on võimalik, et *Lb. paracasei* hakkas gaasi tootma AFB<sub>1</sub> mõjul. Kuna antud *Lb. paracasei* isoleeriti hilise paisumisega juustust, siis tasuks uurida antud tüve fermenteerimisprotsesse, et leida, kas see tüvi oma metaboolsete omadustega võiks olla antud piimatööstuses juustude hilise paisumise põhjuseks.

Erinevalt bakalaureusetöö aluseks olnud Sutic ja Banina (1990) uuringust, *Lb. casei* AFB<sub>1</sub> mõjul süsivesikute fermenteerimisprotsessi tulemusena gaasi tootma ei hakanud. Antud tulemus võib olla tingitud kummaski uuringus kasutatatud tüvede erinevusest. Samuti ei

tootnud gaasi ka ükski teine töös kasutatud homofermentatiivsetest tüvedest, mistõttu ei kinnita antud töö Sutic ja Banina (1990) uuringus tehtud järeldusi, mille kohaselt muutuvad homofermentatiivsed piimhappebakterid aflatoksiini B<sub>1</sub> mõjul heterofermentatiivseks ning hakkavad tootma gaasi.

Käesolevas töös saadud tulemustel on praktiline väärtus, kuna need võivad aidata osaliselt mõista miks juustud tootmisprotsessi järgselt paisuvad. Kuna töö tulemused erinevad osaliselt bakalaureusetöö aluseks olnud uuringust, on oluline antud teemat laialdasemalt edasi uurida. Näiteks Eesti piimatööstustega koostöös selgitada, kui suur on üldse aflatoksiini esinemise probleem piimatoodetes. Samuti oleks oluline laiendada uuritavate homofermentatiivsete piimhappebakterite hulka ning testida spetsiifilisi tüvesid, selgitades, miks bakterid pikemal inkubeerimisel gaasi tootma hakkavad ning kas ja kuidas aflatoksiin seda protsessi mõjutab.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abbes, S., Salah-Abbes, J. B., Sharafi, H., Jebali, R., Noghabi, K. A., Oueslati, R.** (2013). Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM<sub>1</sub> in vitro and to counteract AFM<sub>1</sub> immunotoxicity in vivo. – *Journal of Immunotoxicology*. Vol. 10, No. 3, pp. 279-286.
- Aflatoxins Recent Advances and Future Prospects. (2013). /Toim. M. Razzaghi-Abyaneh. Croatia: Intech. 408 lk.
- Applebaum, R. S., Brackett, R. R., Wiseman, D. W., Marth, E. H.** (1982). Aflatoxin: Toxicity to Dairy Cattle and Occurrence in Milk and Milk Products - A Review. – *Journal of Food Protection*. No. 45, pp. 752-777.
- Arapcheska, M., Jovanovska, V., Jankuloski, Z., Hajruali-Musliu, Z., Uzunov, R.** (2015). Impact of aflatoxins on animal health and human health. – *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*. Vol. 2, No. 2, pp. 156-161.
- Assaf, J. C., Atoui, A. K., Chokr, A., Louka, N.** (2018). A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M<sub>1</sub> to *Lactobacillus rhamnosus* GG. – *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 2, No. 2, pp. 120-127.
- Bae, I., Park, J. H., Choi, H. Y., Jung, H. K.** (2017). Emerging Innovations to Reduce the Salt Content in Cheese; Effects of Salt on Flavor, Texture, and Shelf Life of Cheese; and Current Salt Usage: A Review. – *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. No. 37, pp. 793-798.
- Barrios, M. J., Medina, L. M., Cordoba, M. G., Jordano, R.** (1997). Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* isolated from cheese. – *Journal of Food Protection*. No. 60, pp. 192-194.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M.** (2001). Recent advances in cheese microbiology. – *International Dairy Journal*. Vol. 11, No. 4-7, pp. 259-274.
- Bhatnagar, D., Cary, J. W., Ehrlich, K., Yu, J., Cleveland, T. E.** (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. – *Mycopathologia*. No. 162, pp. 155-166.

- Bintsis, T., Papademas, P.** (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. – *Dairy Technology*. Vol. 55, No. 3, pp. 113-120.
- Blaya, J., Barzideh, Z., LaPointe, G.** (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. – *Dairy Science*. Vol. 101, No. 4, pp. 3611-3629.
- Borreani, G., Ferrero, F., Nucera, D., Casale, M., Piano, S., Tabacco, E.** (2019). Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium spp.* and *Paenibacillus spp.* spores in silage, total mixed ration, dairy cow fees, and raw milk. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 102, No. 9, pp. 8273-8289.
- Burnmeister, H. R., Hesseltine, C. W.** (1966). Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin. – *Applied Microbiology*. Vol. 14, No. 3, pp. 403-404.
- Button, J. E., Dutton, R. J.** (2012). Cheese microbes. – *Current Biology*. Vol. 22, No. 15, pp. R587-R589.
- Caccamo, M., Melilli, C., Barbano, D. M., Portelli, G., Marino, G., Licitra, G.** (2004). Measurement of gas holes and mechanical openness in cheese by Image Analysis. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 87, No. 3, pp. 739-748.
- Casquete, R., Benito, M. J., Aranda, E., A, M., Ruiz-Moyano, S., Gordoba, M. G.** (2019). Gene expression of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system to control aflatoxin production. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 102, No. 9, pp. 7765-7772.
- Cherkani-Hassani, A., Ghanname, I., Zinedine, A., Sefrioui, H., Qmichou, Z., Mouane, N.** (2020). Aflatoxin M<sub>1</sub> prevalence in breast milk in Morocco: Associated factors and health risk assessment of newborns “CONTAMILK study”. – *Toxicon*. Vol. 187, pp. 203-208.
- EÜ 1881/2006. Euroopa Komisjoni määrus (EÜ) nr 1881/2006, 19.detsember 2006, millega sätestatakse teatavate saasteainete piirnõrmiid toiduainetes. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20201014&qid=1620801695599&from=ET>. (12.05.21)
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfosses-Foucault, E., Daga, M., Arora, G., I, F.** (2017). Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. – *Food Control*. Vol. 78, pp. 350-356.
- Gichohi-Wainaina, W. N., Kumwenda, N., Zulu, R., Munthali, J., Okori, P.** (2021). Aflatoxin contamination: Knowledge disparities among agriculture extension officers,



- frontline health workers and small holder farming households in Malawi. – *Food Control*. Vol. 121.
- Guimaraes, A., Venancio, A., Abrunhosa, L.** (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. – *Food Additives & Contaminants*. Vol. 35, No. 9, pp. 1803-1818.
- Guinee, T. P.** (2007). Salt in cheese. /Toim. P. L. H. McSweeney. Cheese problems solved. England: Woodhead Publishing. 736 lk.
- Halasz, A.** (2017). Lactic acid bacteria. – *Food quality and standards*. Vol. 3.
- Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S., Ahokas, J. T.** (2001). Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria. – *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, No. 7, pp. 3086-3091.
- Hayaloglu, A. A.** (2016). Cheese: Microbiology of cheese. Reference Module in Food Sciences. Amsterdam: Elsevier. pp. 1.11.
- Hayward, A. C.** (1957). Detection of gas production from glucose by heterofermentative lactic acid bacteria. – *Microbiology Society*. Vol. 16, No. 1, pp. 9-15.
- Hill, A., Ferrer, M. A.** (2021). Cheese Making Technology eBook. Peatükk V: Defects and Grading. Simple Book Publishing.
- Huppertz, T., Kelly, A. L.** (2009). Properties and constituents of cow's milk. /Toim. A. Y. Tamime. Milk processing and quality management. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. 324 lk.
- Jaksic, S., Balos, M. Ž., Prodanov-Radulovic, J., Igor, J., Krstović, S., Stojanov, I., Masic, Z.** (2019). Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and assessing the possibility of its occurrence in milk products. – *Journal of Food Quality*. Vol. 10, No. 1, pp. 37-49.
- Kamkar, A.** (2006). A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Iranian Feta cheese. – *Food Control*. Vol. 17, No. 10, pp. 768-775.
- Kask, S., Adamberg, K., Orłowski, A., Vogensen, F. K., Møller, P. L., Ardö, Y., Paalme, T.** (2003). Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. – *Food Research International*. Vol. 36, No. 9-10, pp. 1037-1046.
- Kim, N. H., Lee, N. Y., Kim, M. G., Kim, H. W., Joo, I. S., Heo, E. J., Rhee, M. S.** (2018). Microbiological criteria and ecology of commercially available processed cheeses according to the product specification and physicochemical characteristics. – *Food Research International*. Vol. 106, pp. 468-474.

- Kim, S., Lee, H., Lee, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y., Choi, K. H.** (2017). Invited review: Microbe-mediated aflatoxin decontamination of dairy products and feeds. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 100, pp. 871-880.
- Kortei, N. K., Annan, T., Akonor, P. T., Richard, S. A., Annan, H. A., Wiafe-Kwagyan, M., Akpaloo, P. G.** (2021). Aflatoxins in randomly selected groundnuts (*Arachis hypogaea*) and its products from some local markets across Ghana: Human risk assessment and monitoring. – *Toxicology reports*. Vol. 8, pp. 186-195.
- Krstovic, S., Vranjes, A. P., Kasalica, A., Jevtic, M., Igor, J.** (2018). Aflatoxin M<sub>1</sub> Transfer Rate from Milk into Cheese and Whey During the Production of Hard Cheese. – *Contemporary Agriculture*. Vol. 67, No. 3-4, pp. 215-220.
- Lie, L. J., Marth, E. H.** (1967). Formation of Aflatoxin in Cheddar Cheese by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 50, No. 10, pp. 1708-1710.
- Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., McLaughlin, J.** (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. – *Food Microbiology*. Vol. 25, No. 2, pp. 304-312.
- Losito, F., Arienzo, A., Bottini, G., Priolisi, F. R., Mari, A., Antonini, G.** (2014). Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 97, No. 1, pp. 46-55.
- Luo, J., Pan, T., Guo, H. J., Ren, F. Z.** (2013). Effect of calcium in brine on salt diffusion and water. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 96, pp. 824-831.
- Ma, Z. X., Amaro, F. X., Romero, J. J., Pereira, O. G., Jeong, K. C., Adesogan, A. T.** (2017). The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B<sub>1</sub> in vitro and in artificially contaminated corn silage. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 100, No. 9, pp. 7198-7210.
- Mahrer, N., Jinap, S., Nor-Khaizura, M. R., Radu, S., John, J. M., Rahman, M. A., Sharif, Z.** (2020). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in peanut meal extract agar. – *Journal of Food Microbiology*. Vol. 335.
- Manetta, A. C., Giammarco, M., Giuseppe, L. D., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Lambertini, L.** (2009). Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> during Grana padano cheese production from naturally contaminated milk. – *Food Chemistry*. Vol. 113, No. 2, pp. 595-599.

- Marth, E. H.** (1967). Aflatoxins and other mycotoxins in agricultural products. – *Journal of milk and food technology*. Vol. 30, No. 6, pp. 192-198.
- Milk proteins: From structure to biological properties and health aspects. (2016). /Toim. I. Gigli. Croatia: Intech. 294 lk.
- Mosallaie, F., Jooyandeh, H., Hojjati, M., Fazlara, A.** (2019). Biological reduction of aflatoxin B<sub>1</sub> in yogurt by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. – *Food Science and Biotechnology*. Vol. 29, pp. 793-803.
- Mullan, W. M.** (2003). Causes of early gas production in Cheddar cheese. – *Journal of Dairy Technology*. Vol. 53, pp. 63-68.
- Nazhand, A., Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Santini, A.** (2020). Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds. – *Foods*. Vol. 9.
- Oberg, C. J., Oberg, T. S., Culumber, M. D., Ortakci, F., Broadbent, J. R., McMahon, D. J.** (2016). *Lactobacillus wasatchensis* sp. nov., a non-starter lactic acid bacteria isolated from aged Cheddar cheese. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 66, No. 1, pp. 158-164.
- Ortakci, F., Broadbent, J. R., Oberg, C. J., McMahon, D. J.** (2015). Late blowing of Cheddar cheese induced by accelerated ripening and ribose and galactose supplementation in presence of a novel obligatory heterofermentative nonstarter *Lactobacillus wasatchensis*. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 98, No. 11, pp. 7460-7472.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S.** (2001). Aflatoxin B<sub>1</sub> binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. – *Journal of Dairy Science*. Vol. 84, No. 11, pp. 2152-2156.
- Perczak, A., Golinski, P., Bryia, M., Wasškiewicz, A.** (2018). The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. – *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. Vol. 69, No. 1, pp. 32-45.
- Prettl, Z., Desi, E., Lepossa, A., Kriszt, B., Kukoyla, J., Nagy, E.** (2017). Biological degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by a *Rhodococcus pyridinivorans* strain in by-product of bioethanol. – *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 224, pp. 104-114.
- Rojan-Marin, V., Carvajal-Moreno, M., Gonzalez-Villasenor, M. C., Garcia-Hernandez, E. A., Gonzalez-Mendoza, A.** (2018). Presence of aflatoxin carcinogens in fresh and matured cheeses. – *Pharmaceutica Analytica Acta*. Vol. 9. No. 3.

- Sarma, U. P., Bhetaria, P. J., Devi, P., Varma, A.** (2017). Aflatoxins: Implications on health. – *Indian Journal of Biochemistry*. Vol. 32, No. 2, pp. 124-133.
- Sezer, C., Güven, A., Bilge, N., Vatansever, L.** (2013). Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid bacteria. – *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*. Vol. 37, No. 5, pp. 594-601.
- Sharifzadeh, A., Ghasemi-Dehkordi, P., Foroughi, M., Mardanpour-Shahrekordi, E.** (2017). Aflatoxin M<sub>1</sub> Contamination Levels in Cheeses Sold in Isfahan Province, Iran. – *Osong Public Health and Research Perspectives*. Vol. 8, No. 4, pp. 260-263.
- Sheehan, J. J., Beresford, T., McSweeney, P. L.** (2007). The microbiology of cheese ripening. /Toim. P. L. H. McSweeney. Cheese problems solved. England: Woodhead Publishing. 736 lk.
- Shehata, M. G., Badr, A. N., El Shoaimy, S. A., Asker, D., Awad, T. S.** (2019). Characterization of antifungal metabolites produced by a novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. – *Annals of Agricultural Science*. Vol. 64, No. 1, pp. 71-78.
- Sutic, M., Banina, A.** (1990). Influence of aflatoxin B<sub>1</sub> on gas production by lactic acid bacteria. – *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*. Vol. 10, No. 3, pp. 149-153.
- Tabla, R., Gomez, A., Simancas, A., Rebollo, J. E., Molina, F., Roa, I.** (2016). *Enterobacteriaceae* species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity. – *Small Ruminant Research*. Vol. 145, pp. 123-129.
- Tajalli, F., Jamab, M. S., Adibpour, N., Meheraban, M.** (2016). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* Effect on the Aflatoxin M<sub>1</sub> Reduction in Probiotic Yogurt. – *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. Vol. 24, No. 5, pp. 8-21.
- Tiwari, R. P., Dham, C. K., Gupta, L. K., Saini, S. S., Bhalla, T. C., Vadehra, D. V.** (1984). Mechanism of inhibitory effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. – *Applied Microbiology*. Vol. 30, pp. 419-426.
- Trombete, F. M., Castro, I., Teixeira, A. S., Saldanha, T., Fraga, M. E.** (2013). Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in grated parmesan cheese marketed in Rio de Janeiro - Brazil. – *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 56, No. 6, pp. 1-5.
- Turgay, M., Schaeren, W., Wechsler, D., Bütikofer, U., Graber, H. U.** (2016). Fast detection and quantification of four dairy propionic acid bacteria in milk samples using

real-time quantitative polymerase chain reaction. – *International Dairy Journal*. Vol. 61, pp. 37-43.

World Health Organization (WHO). (2018). Aflatoxins. – Food Safety Digest. [https://www.who.int/foodsafety/FSDigest\\_Aflatoxins\\_EN.pdf](https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_EN.pdf). (20.03.2021)

**Wogan, G. N.** (1966). Chemical Nature and biological effects of the aflatoxins. – *Department of Nutrition and Food Science*. Vol. 30, No. 2, pp. 460-470.

**Wyder, M. T., Arias-Roth, E., Jakob, E.** (2018). Cheese yeasts. – *Yeasts*. Vol. 36, No. 3, pp. 129-141.

**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks  
ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Lisbeth Luik,

Sünniaeg 31/05/1999

1. annan Eesti Maülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö Aflatoksiinide mõju juustus esinevatele piimhappebakteritele, mille juhendaja on Helena Andreson

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor \_\_\_\_\_

(allkiri)

Tartu, 24.05.2021

**Juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Luban lõputöö kaitsmisele.

\_\_Helena Andreson\_\_\_\_\_

(juhendaja nimi ja allkiri)

\_\_24.05.2021\_\_\_\_\_

(kuupäev)