



**Jääga seonduvate valkude mõju külmutatud täistera nisujahust
taigna ja saia omadustele**

Magistritöö

Üliõpilane: Kadi Karro

Üliõpilaskood: 221505KATM

Juhendaja: Önnela Luhila, doktorant-nooremteadur

Õppekava: Toidutehnoloogia ja -arendus

Tallinn 2024

Autorideklaratsioon

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

Autor: Kadi Karro

.....

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle/magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Önnela Luhila

.....

[allkiri ja kuupäev]

Magistritöö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsekomisjoni esimees: prof. Toomas Paalme

.....

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Autorideklaratsioon	2
Sisukord	3
Annotatsioon	5
Abstract	6
Lühendid	7
Sissejuhatus	8
1. Kirjanduse ülevaade	9
1.1 Toidu külmutamine	9
1.2 Külmutamisega seotud probleemid toiduainetööstuses	9
1.2.1 Külmutamise mõju pagaritoodetele	10
1.3 Jääga seonduvad valgud	10
1.3.1 Antifriisvalgud (AFP)	11
1.3.2 Jäätuuma loovad valgud (INP)	13
2. Praktiline osa	14
2.1 Materjalid	14
2.2 Meetodid	14
2.2.1 Kultiveerimine	14
2.2.2 Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse määramine	14
2.2.3 Taignate valmistamine	15
2.2.4 Pärmide ellujäämise määramine	16
2.2.5 Kergitusvõime määramine	16
2.2.6 Saia küpsetamis- ja jahtumiskao määramine	17
2.2.7 Saia mahu ja erimahu määramine	17
2.2.8 Taigna ja saia tekstuuranalüüs	17
2.2.9 Saia veeaktiivsuse määramine	17
2.2.10 Saia sensoorne hindamine	18
2.2.11 Statistiline andmete analüüs	18
3. Tulemused ja arutelu	20
3.1 Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsus	20
3.2 Pärmide ellujäämine	20
3.3 Kergitusvõime	21
3.4 Küpsetamis- ja jahtumiskadu	22
3.5 Saia erimaht	24
3.6 Tekstuuranalüüs	24
3.6.1 Taigna tekstuur	24
3.6.2 Saia tekstuuranalüüs	28
3.8 Saia veeaktiivsus	33
3.9 Saia sensoorne hinnang	33
Kokkuvõte	35
Tänuavaldused	36

Kasutatud kirjandus	37
Lisad	41
Lisa 1. Sensoorse analüüsi hinnanguleht	41
Lisa 2. Sensoorse hindamise tulemused	44

Annotatsioon

Külmutamine ja külmutatuna säilitamine on üks viis, kuidas pikendada pagaritoodete säilivusaega ja seeläbi vähendada toidu raiskamist. Külmutamisega seotud kvaliteedilanguse piiramise eesmärgil uuritakse jääga seonduvate valkude mõju külmutatud toodetele.

Antud magistritöö keskendus *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetud jääga seonduvale valgule ning uuris kas ja kuidas see mõjutab nii taigna kui ka küpsetatud saia omadusi kaheksanädalase ajavahemiku vältel. Eesmärgiks oli kaardistada muutusi mida toob kaasa lisatud IBP ning seeläbi saada teada kas sellel valgul oleks potentsiaali parandada pagaritööstuses külmutatud toodete kvaliteeti.

Töö kirjanduse ülevaates kirjeldati külmutamisprotsessi ja sellega kaasnevaid probleeme, samuti külmutamise mõju pagaritoodetele. Lisaks kirjeldati erinevaid jääga seonduvaid valke ja nende toimemehhanisme. Praktilises osas määrati valgulahuse jää rekristallatsiooni inhibeerimise aktiivsust, pärmi ellujäävust, kerkimisvõimet, küpetamis- ja jahtumiskadu, saia erimahtu ja veeaktiivsus. Viidi läbi ka tekstuurianalüüs ning sensoorne hindamine.

Tulemustes leiti, et kasutades taigas rohkem kui 0,1 mg/kg jääga seonduvat valku, aitas see säilitada pärmide ellujäävust ja saia kerkimisvõimet. Samuti püsisid saiad pehmemad ja elastsemad. IBP lisamine ei mõjutanud oluliselt veeaktiivsust, saiade erimahtu ega sensoorseid omadusi. Saadud tulemused ühtisid ka kirjandusest leituga, mistõttu sobiks *Pseudomonas fluorescens* jääga seonduv valk kontsentratsioonidel üle 0,1 mg/kg täistera nisujahust saiade kvaliteedi säilitamiseks.

Töö koosneb 46 leheküljest, kus on 27 joonist, kaks tabelit ning kaks lisa.

Abstract

The effect of ice-binding proteins on frozen whole-wheat dough and bread

Freezing and frozen storage are effective methods to reduce food waste by extending the shelf life of baked goods. To minimize the quality loss associated with freezing, researchers are studying the effects of ice-binding proteins (IBPs) on frozen products.

This master's thesis focuses on the ice-binding protein produced by *Pseudomonas fluorescens* and examines its impact on the properties of both dough and baked bread over an eight-week period. The aim is to map the changes brought about by the added IBP and determine its potential to improve the quality of frozen bakery products.

The literature review describes the freezing process and its associated problems, as well as the effects of freezing on bakery products. It also introduces various ice-binding proteins and their mechanisms of action. In the practical part, the study measures the ice recrystallization inhibition activity of the protein solution, yeast survival, rising ability, cooking and cooling loss, bread specific volume, and water activity. Texture analysis and sensory evaluation are also conducted.

The results show that using more than 0.1 mg/kg of ice-binding protein in the dough helps maintain yeast survival and the bread's rising ability. The bread also remains softer and more elastic. The addition of IBP does not significantly affect the water activity, specific volume, or sensory properties of the bread. These findings are consistent with the literature, suggesting that the ice-binding protein of *Pseudomonas fluorescens* at concentrations above 0.1 mg/kg of whole wheat flour is suitable for maintaining bread quality.

The thesis comprises 46 pages, including 27 figures, two tables, and two appendices.

Lühendid

AFP - *antifreeze protein*, antifriisvalk

AFGP - *antifreezeglycoprotein*, antifriisglükovalk

IBP - *ice-binding protein*, jääga seonduv valk

INA - *ice-nucleation activity*, jää tuuma tekitav aktiivsus

INP - *ice-nucleating protein*, jää tuuma loov valk

ISP - *ice-structuring protein*, jääd struktureeriv valk

K - Kelvin, SI-süsteemi temperatuuriühik

LB - *lysogeny broth*, lüsogeenpuljong

TH - *thermal hysteresis*, termiline hüsterees

Sissejuhatus

ÜRO 2024.aasta toidujäätmete raporti (*Food waste index report*) põhjal tekib maailmas igal aastal 1 miljardi USD väärtuses toidujäätmeid, mis toodavad lagunemisel 10% kasvuhoonegaasidest. Samal ajal kannatab 29,6% maailma rahvastikust, 783 miljonit inimest, siiani nälga. (United Nations, 2024)

Nendest jäätmetest 16% moodustasid statistika andmete pagaritooted. Selle numbri vähendamiseks on mitmeid võimalusi: tootmismahude vähendamine, efektiivsemate tootmis- ja säilitamisvõtete arendamine, toidupankadesse annetamine. (United Nations, 2024) Antud magistritöös keskendutakse neist võimalustest külmutamisele ja külmutatuna säilitamisele, kuna see võimaldab hoida tooteid kõlblikuna väga pikka aega.

Kahjuks kaasneb külmutamisega ka mitmeid probleeme. Pagaritoodetes võivad toimuda nii füüsikalised kui keemilised muutused: niiskuskadu, sisemiste struktuuride ja mikrotoitainete lagunemine, värvuse ja lõhna muutused. Kõrvalekalded toote omadustes ja kvaliteedis kajastuvad aga tarbija sensoorses kogemuses ja võivad muuta selle tarbijale vastuvõetamatuks.

Toodete külmutamisel ja külmutatuna säilitamisel kvaliteedi languse minimaliseerimiseks on võimalik lisada neile jääga seonduvaid valke, mis aitavad ohjata erinevaid jääkristallide kasvust tingitud soovimatuid muutusi.

Selles töös võeti eesmärgiks uurida, kas ja kuidas mõjutab *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav jääga seonduv valk täistera nisujahust valmistatud tainast külmutamise ja sulatamise protsessis. Samuti uuritakse valgu mõju taignast küpsetatud saiale ja selle omadustele.

Kirjanduse ülevaates kirjeldatakse toidu külmutamist ning tuuakse välja mitmeid külmutamisega seotud probleeme toiduainetööstuses. Veel puudutatakse ülevaates külmutamise mõju pagaritoodetele ja keskendutakse jääga seonduvate valkude olemusele.

Töö praktilises osas kasvatatakse ette *Pseudomonas fluorescens* bakterikultuur, millest saadakse jääga seonduvat valku sisaldav lahus. Määratakse lahuse jää rekristallatsiooni inhibeeriv aktiivsus, mis aitab leida kõige väiksema lahuse kontsentratsiooni taignas, mille kasutamisel võiks veel märgata IBP mõju. Uuritakse valgu mõju pärmi ellujäävusele, kerkimisvõimele, küpsetamis- ja jahtumiskadudele, saia erimahule, taigna ja saia tekstuurile, veeaktiivsusele ja sensoorsele hinnangule kaheksa nädala vältel. Saadud tulemusi analüüsitakse, võrreldakse varasemate kirjandusest leitud andmetega ning arutletakse leitu üle.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Toidu külmutamine

Külmutamine on üks vanimaid ja laialdasemalt kasutatavaid toidu säilitamise meetodeid, mis võimaldab säilitada toidu maitset, tekstuuri ja toiteväärtust. Külmutamisprotsessis on mitmeid soodsaid koosmõjusid, mille tulemusena mikroorganismid ei saa kasvada ning keemilised reaktsioonid ja rakkude ainevahetusreaktsioonid aeglustuvad. (Delgado & Sun, 2001)

Külmumistemperatuuri defineeritakse kui temperatuuri, mille juures tekib esimene jääkristalli tuum. Puhta vee külmumistemperatuur on 0 °C ehk 273 K, kuid toidu külmutamise protsess on keerukam, kuna esineb nii vaba kui ka seotud vett. Toidus esinev vesi sisaldab lahustuvaid tahkeid aineid, mis põhjustavad külmumistemperatuuri languse alla 0 °C. Külmutamisprotsessi käigus suureneb lahustuvate tahkete ainete kontsentratsioon jäätumata vees, mis põhjustab järk-järgulist külmumistemperatuuri alanemist. (Levy, 2007)

1.2 Külmutamisega seotud probleemid toiduainetööstuses

Toiduainete külmutamisega kaasnevat probleeme põhjustavad mitmed füüsikalised ja keemilised muutused. Füüsikalistest muutustest on peamised niiskuskadu, jää rekristallatsioon ja toote sisemiste struktuuride lagunemine (Hou, Cheng, Kang, Zhang, & Zhou, 2019). Keemilisteks muutusteks loetakse valkude ja mikrotoitainete lagunemist, lipiidide oksüdatsiooni ning üleüldist maitse, värvi ja lõhna halvenemist (Neri et al., 2020).

Peamised tegurid, mis mõjutavad külmutatud toote kvaliteeti, on jäätuma moodustumise koht, kiirus ja temperatuur, mille juures tuuma moodustumine toimub. Jääkristallid tekivad, kui veemolekulid ühinevad jäätuma moodustamiseks. See tuum toimib ümbritseva vee jäätumise initsiatsioonipunktina ning moodustab kristallvõre. Homogeenne tuuma moodustumine võib toimuda spontaanselt väga puhastes vedelikes madalatel temperatuuridel (alla -40°C). (Chen et al., 2020)

Jääkristallide kasvukiiruse määrab peamiselt faasisiirde käigus eralduva latentse soojuse eemaldamise kiirus ja lahuse massiülekanne kiirus. Kui jääkristallide kasvust vabanev latentne soojus eemaldatakse tõhusamalt, siis jääkristallide kasv kiireneb. On teada, et toiduainete kiirkülmutamise käigus tekib suur hulk väikseid jääkristalle, kuid isegi sama jahutuskiiruse korral on erinevates külmutatud toiduainetes tekkivate jääkristallide suurus erinev. Selle põhjuseks on peamiselt erinev vaba vee sisaldus erinevates toiduainetes (Petzold & Aguilera, 2009; Chen et al., 2020).

Kõrgematel temperatuuridel toimub heterogeenne jäätuma moodustumine, mida katalüüsivad tolm, soolad, orgaanilised molekulid või bakterid, millel on jäätuma tekitamise aktiivsus (*INA-ice-nucleation activity*). (Pearce & Fuller, 2001)

Külmutamisega seotud probleemiks on ka jää rekristalliseerumine, mille vältel moodustuvad säilitamise ajal suuremad jääkristallid väiksemate arvelt. Väiksemad kristallid ei suuda oma pinnal

olevaid veemolekule sama kindlalt siduda kui suuremad kristallid, kuna need on väiksema läbimõõdu tõttu kumeramad ja neil on suurem pinnapealne vaba energia. Seetõttu migreeruvad väikeste kristallide pinnal olevad veemolekulid suuremate kristallide pinnale, mis omakorda viib suuremate kristallide kasvu ja väiksemate kristallide kadumiseni. (Hagiwara, Hartel & Matsukawa, 2006; Rahman et al, 2019)

1.2.1 Külmutamise mõju pagaritoodetele

Külmutatud taigna tehnoloogia on pagaritoodete industrialiseerimisel oluliselt edasi arenenud, kuid seisab silmitsi väljakutsetega, mis tulenevad taigna kvaliteedi langusest külmutatuna ladustamise ajal. (Liu et al., 2018) Külmutamisel on suur mõju taignale, peamiselt jääkristallide tekke tõttu, mis lõhuvad gluteenimaatriksit ning põhjustavad muutusi taigna mikrostruktuuris ja tekstuuris (Marshall, Fletcher, & Davies, 2004). Gluteenvalgud, gluteiin ja gliadiin, on taigna struktuuri ja elastsuse jaoks väga olulised, kuna gluteenivõrgustiku halvenemine on kvaliteedi languse peamine tegur. (Liu et al., 2018) Sarnane mõju gluteenimaatriksile on ka jää rekristalliseerumisel, mis toimub külmutatuna säilitamise ajal, sest kasvab suurte jääkristallide arv taignas (Marshall, Fletcher, & Davies, 2004).

Külmutamise ja külmutatuna säilitamise tulemuseks on ka tärglisegraanulite võrgustiku purunemine ja gaasihoidmisvõime vähenemine kerkimise vältel (Wang, Jin, & Xu, 2015). Jääkristallide kasv kahjustab taignas olevaid pärmirakke, vähendades nende elujõulisust ja mõjutades taigna kerkimisvõimet (Shi, Yu, Jin, & Lee, 2013; Liu et al., 2018). Lisaks, erituvad kahjustatud ning surnud pärmirakkudest ühendid, mis põhjustavad gluteenivõrgustiku depolümerisatsiooni (Nguyen et al., 2018). Seega võib külmutamine negatiivselt mõjutada taigna kvaliteeti ja omadusi. Optimaalsete küpsetustulemuste saavutamiseks tuleb mõista külmutamisprotsessi ja selle mõjusid. (Nguyen et al., 2018).

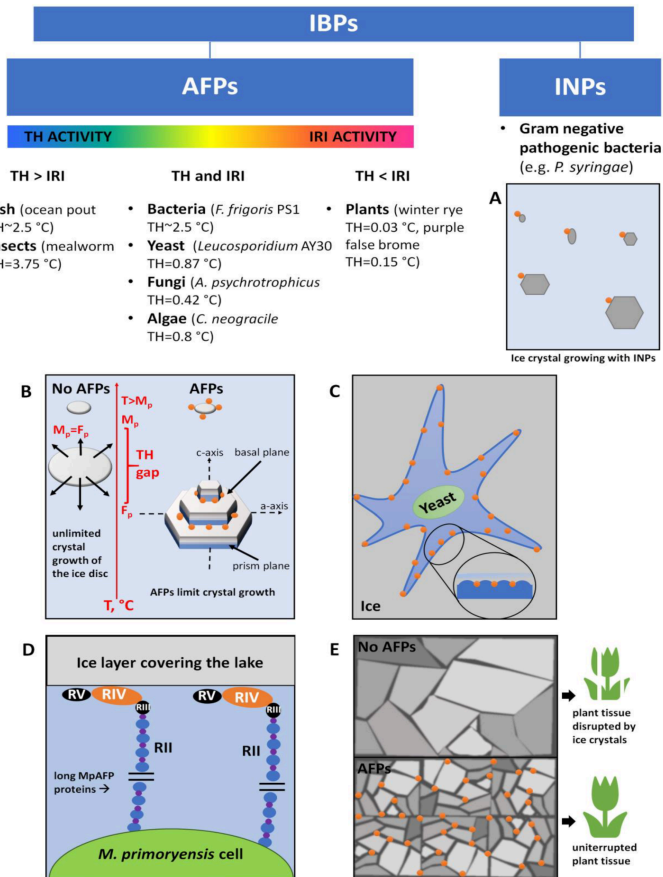
Lisandite, näiteks erinevate jääd struktureerivate valkude, lisamine võib aidata leevendada mõningaid külmutamise negatiivseid mõjusid taignale (Xu et al., 2009). Erinevates organismides leiduvad jääga seonduvad (IBP-d) ja antifriisvalgud (AFP-d) on võimelised pärssima jääkristallide kasvu ja rekristalliseerumist ning seeläbi kaitsma gluteenivõrgustikku, tärglise osakesi ja pärmirakke. (Liu et al., 2018)

1.3 Jääga seonduvad valgud

Külmades keskkondades elavad organismid toodavad jäätumisvastaseid valke (ice-binding proteins, IBPsid), et vältida külmakahjustusi. Need valgud avastati esmakordselt arktiliste kalade veres, kuid sarnaseid valke on hiljem leitud erinevates organismides, näiteks taimedes, seentes, putukates ja mikroorganismides. (Oude Vrielink, Aloj, Olijve, & Voets, 2016)

Algselt nimetati tuvastatud valgud jäätumisvastasteks valkudeks (antifreeze proteins, AFPd), nende termilise hüstereesi (TH) aktiivsuse ehk jäätumispunkti alandamisvõime tõttu. Mõned IBPd pärssivad jää rekristalliseerumist või soodustavad jääle kinnitumist. Termin IBP hõlmab kõiki nimetatud aktiivsusi omavaid valke, mis on joonisel 1 jagatud: (A) jäätuma valkudeks (INP-d), mis soodustavad jääkristallide moodustumist nullinähesel miinustemperatuuril, ja (B–E)

antifriisvalkudeks (AFP), mis vähendavad organismide kehavedelike külmumispunkti. (Bar Dolev, Braslavsky, & Davies, 2016; Białkowska, Majewska, Olczak, & Twarda-Clapa, 2020)



Joonis 1. Jääd siduvate valkude (IBP) klassifikatsioon, toimemehhanismid ja allikad. Antifriisvalkudele on omased erinevas vahekorras (B) termiline hüsterees (TH; M_p tähistab sulamistemperatuuri, F_p – külmumistemperatuur) ja (E) jää rekristalliseerumise inhibeerimine (IRI). IBP-d visualiseeritakse oranžide täppidega paneelidel (A–E), vesi on sinine ja jää halli värvi. (Białkowska, Majewska, Olczak, & Twarda-Clapa, 2020)

Toidutööstuses kasutatakse IBPde jaoks terminit "jääd struktureeriv valk" (ice structuring protein, ISP), mis viitab valkude võimele mõjutada jääkristallide kuju ja suurust tootes (Mangiagalli, Brocca, Orlando, & Lotti, 2020).

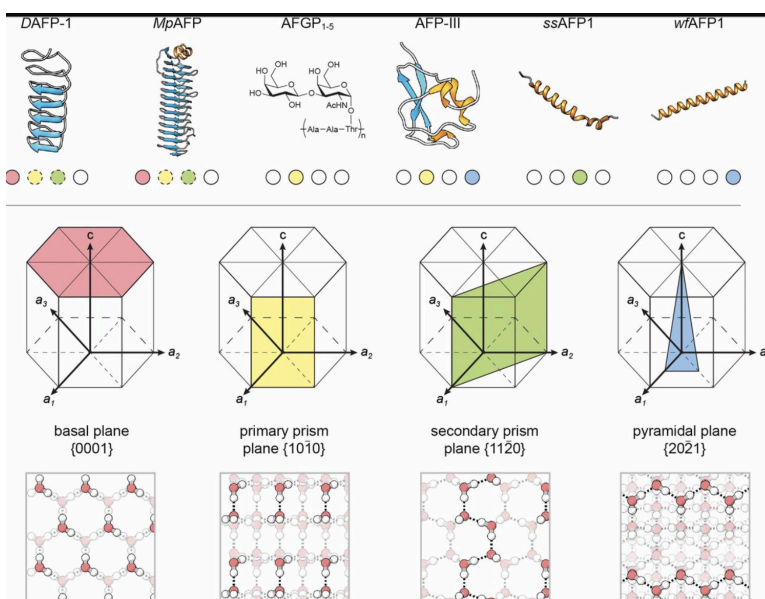
1.3.1 Antifriisvalgud (AFP)

Antifriisvalkudel (AFP-del) on mitu erinevat toimemehhanismi. Esiteks alandavad need külmumispunkti, mõjutamata märkimisväärselt sulamispunkti. See protsess on tuntud kui termiline hüsterees. (Avanov, 1990) Teiseks mõjutavad need jääkristallide kasvu, põhjustades väiksemate ja ebastandardsete kujudega, näiteks bipüramidaalsete või lapiku kuusnurkse diski kujuliste, jääkristallide teket (Li, Trinh, & Hew, 1991). Kolmandaks, võivad AFP-d jää rekristalliseerumise peatada, kuna need muudavad jää sulamistemperatuuri jääpinnale adsorbeerudes. Piisab, kui tõsta veidi väikeste ja langetada suuremate kristallide

sulamistemperatuuri, et kompenseerida nende sulamistemperatuuri erinevust. Kui kõigi jääkristallide raadiused ehk kõverused on võrdsed, rekristallatsioon peatub. (Ramløv ja Dennis Steven Friis, 2020)

Erinevalt traditsioonilistest antifriisühenditest nagu etüleenglükool ja sool (NaCl), toimivad AFP-d mittekolligatiivse mehhanismi kaudu, vähendades nende mõju osmootsele rõhule (Avanov, 1990). Nende efektiivsus on mooli alusel hinnanguliselt 200–500 korda suurem kui NaCl-il ning suudavad jääkristallide kasvu pärssida ka väga madalate kontsentratsioonide juures (Li, Trinh, & Hew, 1991, Olijve et al., 2016).

AFP-d kogunevad peamiselt vee ja jää kokkupuutepiirile, mõjutades kristallide kasvu. Erinevatest organismidest pärit AFP-d eelistavad spetsiifilisi kristalli tasapindu (Barrett, 2001), mis on näha joonisel 2. AFP-d saab suuruse ning struktuuri alusel jagada nelja gruppi (AFP I-IV), lisaks on eraldi grupp antifriisglükoproteiine (AFGP) (Ramløv & Dennis Steven Friis, 2020). Molekulaarsel tasandil võivad nende interaktsioonimehhanismid jääga olla erinevad. Tüüp I AFP-de seondumist jääga arvati alguses tuginevat vesiniksidemetele (Avanov, 1990), kuid hilisemad uuringud viitavad hüdrofoobsetele interaktsioonidele (Harding, Ward, & Haymet, 1999; Zhang & Laursen, 1998). Vastupidiselt sõltub tüüp III kalade AFP-de seondumine jääga hüdrofiilsetest interaktsioonidest (Li, Trinh, & Hew, 1991).



Joonis 2. Antifriisvalkude struktuur, eelistatud kinnitumistasapind ning moodustatav kristallivõre. Valku tootev organism (vasakult paremale): DAFP-1, põrnikas *Dendroides canadensis*; MpAFP, *Antarctic bacterium M. primoryensis*; AFGP1–5, erinevad Antarktilised *Notothernioid* kalade liigid; AFP-III, Ameerika emakala (*Zoarces americanus*); ssAFP1, nolgus (*Myoxocephalus scorpius*); wfAFP1, talvine lest ehk mustselg (*Pseudopleuronectes americanus*). (Olijve et al., 2016)

Jääga seonduvatele valkude struktuuris on iseloomulik piirkond, mis kinnitub jää pinnale. Selle jääga kokkupuutuva valgu pinna tasasus on tüüp III AFP-de jaoks äärmiselt oluline, kuna on tuvastatud suurt aktiivsuse langust selle piirkonna mutatsioonide puhul (DeLuca, Davies, Ye, & Jia, 1998). Täheldatud on ka, et termilise hüsteereesi väärtuse ja jää rekristalliseerumise inhibitsiooni aktiivsuse vahel puudub korrelatsioon, mida illustreerivad mõningad AFP-d, millel on madal

termiline hüsteerees, kuid tugev rekristalliseerumise inhibeerimise võimekus (Sidebottom jt, 2000; Barrett, 2001).

1.3.2 Jäätuumad loovad valgud (INP)

Jäätuumad loovad valgud (INP-d) on jääga seonduvate valkude (IBP) alamliik, mis aitab kaasa jää kristalliseerumisele nullilähedastel temperatuuridel (vahemikus 0 kuni -3 °C). Need valgud toimivad, paigutades oma jää sidumiskohtadesse vabu veemolekule, mis toimivad jääkristallide moodustumisel kristallituumadena (Kawahara, 2017).

INP-sid leidub erinevates organismides, näiteks bakterites, taimedes ja putukates, kus need valgud kontrollivad jää moodustumise asukohta organismis ja tagavad kaitse külmumise eest (Bar Dolev, Braslavsky, & Davies, 2016). Kuigi INP-de jäätuumade moodustumise mehhanismid pole täielikult teada, on teada, et need seonduvad jääkristallidega samamoodi nagu kristallid omavahel. Külmumisvastased valgud (AFP-d) võivad INP-sid deaktiveerida nendega seondues, pärssides potentsiaalselt tõhusamalt jääkristallide kasvu. Siiski on INP-de täielik iseloomustamine keeruline, kuna need on suure molekulmassiga, neil on kalduvus valesti voltida ja jää tuumade moodustumise aktiivsuse mõõtmismeetodid on keerukad (Kawahara, 2017).

Bakterites ja seentes leidub mitmesuguseid biogeenseid jäätuumad moodustavaid ühendeid (Davies, 2014; Kawahara, 2002). Suurima aktiivsusega neist on INA bakterite jäätuumad loovad valgud (Kawahara Citation 2002). INA bakteri funktsioon on alajahutuspunkti alandamine ja jäätuumad moodustumise katalüüsimine. INP-de lisamine võib märkimisväärselt vähendada alajahutuspunkti ja jää tuumad moodustumise aega, lühendades seega külmumisaega. Kõige levinumad INA-d tootvad bakterid kuuluvad perekondadesse *Erwinia*, *Pseudomonas* ja *Xanthomonas*. INA-sid leidub ka mõnedes seenetüvedes (Rubiolo, 2000).

2. Praktiline osa

Antud magistriastme lõputöö praktilise osa eesmärgiks oli uurida *Pseudomonas fluorescens* poolt ekspresseeritud jääga seonduva valgu mõju täisteranisujahust saia kvaliteedile taigna eelneval külmutamisel ja sügavkülmas säilitamisel. Uurimuse põhjal saab näha, kuidas erinevad valgukontsentratsioonid taignas mõjutavad nii taigna kui saia erinevaid omadusi, võrreldes kontrollpartiiga, mille retseptis puudusid jääga seonduvad valgud. Saadud tulemusi võrreldakse kirjandusest leitudga, misjärel selgub kas ja kuidas on võimalik kasutada ekspresseeritud valku külmutatud taignast valmistatud saia kvaliteedi parandamiseks.

2.1 Materjalid

Jääga seonduvat valku tootva *Pseudomonas fluorescens* bakterikultuur saadi ettevõttelt Lallemand. Bakterikultuuri ettekasvatamiseks kasutati LB (lüsogeenpuljong)-agarit (LabM) ja kultiveerimiseks pärmiekstrakti (LabM) ja glütserooli (Lach-Ner).

Taigna valmistamiseks kasutati täisteranisujahu (Tartu Mill, lot 137060), kuivpärimi (Kitchen Mood), päevalilleõli (Olivia), 2,5% piima (Valio), soola (Santa Maria) ning suhkrut (Extra Line). Tooted osteti Eesti toidupoodidest.

2.2 Meetodid

2.2.1 Kultiveerimine

Jääga seonduvat valgu sisaldava supernatandi saamiseks kultiveeriti *Pseudomonas fluorescens* bakterikultuuri vedelsöötmes. Nelja 2 L koonilisse kolbi segati 400 ml vedelsöödet, mis koosnes pärmiekstraktist (10 g/L), glütseroolist (20 g/L) ja destilleeritud veest. Kolbe koos söötmega autoklaaviti 121 °C juures 15 minutit Systec DX-90 autoklaavis. Pärast söötmete jahtumist toatemperatuurini, lisati igasse kolvi 20 ml eelkasvatatud bakterikultuuri.

Söötmeid kasvatati Innova 43 Incubator Shaker Series loksutil 72 h (30 °C, 160 rpm). Lahuseid tsentrifugeeriti, kasutades selleks Beckman J6-HC tsentrifuugi 10 min (10 °C, 4000 rpm), seejärel eemaldati vedelik ja järelejäänud rakud segati 400 ml eelpool mainitud meetodil valmistatud vedelsöötmega. Uus segu kasvatati Innova loksutil 72 h (5 °C, 160 rpm) ning tsentrifugeeriti Beckman tsentrifuugis 10 min (10 °C, 4000 rpm). Saadud supernatant eraldati rakkudest ning seda kasutati taignate valmistamisel.

2.2.2 Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse määramine

Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsust määrati kasutades kihelist modifitseeritud sahharoosi meetodit vastavalt eelnevalt kirjanduses kirjeldatule (Kaleda et al., 2018). Proovide analüüsiks kasutati Nikon Eclipse E 200 mikroskoopi ja Linkam PE 120 kiirjahutuskaamrit. Aktiivsuse määramiseks segati kokku 25 µl supernatanti ja samas koguses eelnevalt valmistatud 70% sahharoosilahust. Valmis segust pipeteeriti katseklaasile 3,5 µl, kaeti katteklaasiga ning proovi aurustumise vältimiseks lisati katteklaasi servadesse silikoonõli.

Proovi külmutati vedelas lämmastikus 5 sekundit, misjärel asetati see mikroskoobi kiirjahutusplaadile. Plaadil kasutatud režiim on välja toodud tabelis 1. Jää rekristalliseerumisest tehti Motic Images 3.0 abil pildid pärast neljandat ja kuuendat intervalli.

Tabel 1. Kiirjahutusplaadi režiim.

Intervall	Temperatuur, °C	Aeg, s	Temperatuuri muutmise kiirus, °C/min
1	-10,0	30	20
2	-7,0	15	10
3	-9,0	15	10
4	-6,8	60	10
5	-8,0	5	10
6	-6,8	180	10

Edasiselt lahjendati olemasolevat proovi 1:1 suhtes 35% sahharoosi lahusega ning korraldi kiirjahutusplaadil mikroskopeerimist. Proove lahjendati analoogselt edasi, kuni mikroskoobi all rekristalliseerumise inhibeerimist enam ei täheldatud. Tehtud pildidel mõõdeti jääkristallide suurus, kasutades pilditötlusprogrammi Image J. Mõõtmete alusel arvutati Ostwaldi valemiga (valem 1) välja jääkristallide kasvukiirus (Rahman et al. 2019). Proovide lahjendustest ja arvatud kasvukiirustest koostati graafik, kus lahendusaste asus x-teljel ning kasvukiirus y-teljel. Graafiku alusel lahendati ruutvõrrand, mille tulemusena saadi lahendus, kus jääkristallide kasvukiirus oli 50% maksimaalsest kasvukiirusest.

$$r^3 = r_0^3 + kt, \quad k = (r^3 - r_0^3)/t, \quad \text{kus} \quad \text{(valem 1)}$$

r = keskmine jääkristallide raadius katse lõpus, µm

r₀ = jääkristallide raadius katse alguses, µm

k = kristallide kasvukiirus, µm³/min

t = aeg, min

2.2.3 Taignate valmistamine

Taignate valmistamiseks kasutati katseliselt optimeeritud täisteranisujahu baasil retsepti.

- 900 g täisteranisujahu
- 15 g kuivpärm
- 120 g suhkrut
- 22,5 g peensoola
- 375 g piima (2,5%)
- 48 g päevalilleõli

Vastavalt retseptuurile arvutati välja iga taigapartii puhul kasutatav valgulahuse ja negatiivse lahuse kogused ning need kanti tabelisse 2. Samuti arvutati välja igas taignas sisalduva valgu kontsentratsioon Lowry valgu määramise meetodikaga (Shen, 2023). Toorainete nimistus väljatoodud lahuse all on mõeldud kultiveerimise protsessi lõpus saadud supernatanti. Negatiivse lahuse puhul on mõeldud jahutamata bakterikultuuri supernatant, milles jääga seonduva valgu aktiivsus puudub.

Tabel 2. Taignasse lisatava katselahuse kogused.

Kontsentratsioon (mg/kg)	0,45	0,1	0,05	0,03	0,02	0
Tooraine (g)						
lahus	375	75	37.5	25	18.75	0
negatiivne lahus	0	300	337.7	350	356.25	375

Kõik koostisosad kaaluti eelnevalt välja ning segati kokku Kitchen Aid Heavy Duty 5KPM5 lauamiksris, kasutades esmalt 2 minutit kiirust 1 (60 rpm) ning seejärel 3 minutit kiirust 2 (95 rpm). Igast taignast vormiti 80±2 g pallid, mis pakendati toidukilesse. Seejärel külmutati taigapalle analoogselt Zhang et al. 2008 aasta artikliga kiirkülmutis Foster Surf Navigation 3 tundi, temperatuuril -18 °C. Edasi säilitati taigapalle samal temperatuuril sügavkülmas, analüüsimiseks sulatati neid 15 tundi 4 °C juures külmkapis. Proovide analüüs sooritati iga kahe nädala tagant, kokku kestis katse kaheksa nädalat.

2.2.4 Pärimi ellujäämise määramine

Pärimi ellujäämise määramiseks kasutati Zhao et al. (2022) artiklis kirjeldatud meetodikat. Sulatatud taignast kaaluti 20,0 g, lisati 180 g destilleeritud vett ning segati magnetsegajal Минприбор СССР MM3M ja MM-5 30 minutit. Segu jäeti seejärel 15 minutiks settima.

Eppendorfidesse pipeteeriti 0,4 ml eelnevalt valmistatud suspensiooni ning 0,4 ml metüleensinise lahust (kontsentraat lahjendatud destilleeritud veega, vahekorras 1:5). Proovid segati Vortexil ning jäeti 10 minutiks toatemperatuuril seisma. Igast taignasuspensioonist tehti kolm paralleeli.

Mikroskopeerimiseks pipeteeriti 10 µl proovi Bürkeri kambrisse. Vaatlemisel kasutati Nikon Eclipse E 200 mikroskoopi 10x suurendusega ja pildil otsiti üles Bürkeri kambri keskmine tihedam ruudustik. Kasutades Motic Images 3.0 programmi, lisati rakkude loendamiseks mikroskoobi pildile ruudustik ning salvestati pildid, mis hiljem prinditi värviliselt. Piltidelt loeti kolmes ruudus nii elusad kui surnud pärimirakud ja arvutati pärimi ellujäämise protsent. Elus pärimirakud olid tuvastatavad kui värvumata rakud, surnud rakud olid värvunud üleni siniseks.

2.2.5 Kergitusvõime määramine

Pärimi kergitusvõime määramiseks asetati 80 g taigapallid võiga määratud küpsetusvormidesse ja mõõdeti joonlauaga nende kõrgused. Seejärel pandi need Metos System Rational HCPC ahju 45 minutiks kerkima (32 °C, õhuniiskus 80%) ja mõõdeti kõrgused pärast kerkimist (Zhao et al., 2022). Taigapalle küpsetati samas ahjus 200 °C 15 minutit (õhuniiskus 50%) ja mõõdeti saiade lõplik kõrgus. Iga partii kohta tehti mõõtmistele kaheksa paralleeli.

2.2.6 Saia küpsetamis- ja jahtumiskao määramine

Küpsetamis- ja jahtumiskao leidmiseks, kaaluti taignapallid pärast 45 minutit Metos System Rational HCPC ahjus kergitamist 0,01 g täpsusega, kasutades selleks Radwag WLC 6/A2 kaalu. Vormide massid olid eelnevalt fikseeritud. Seejärel küpsetati taignapallid 200 °C juures 15 minutit (õhuniiskus 50%) ja saiad kaaluti koheselt pärast ahjust väljavõtmist 0,01 g täpsusega samal kaalul. Saiadel lasti vormides 1,5 tundi jahtuda ja kaaluti uuesti. Kõigi partiide puhul tehti kaheksa paralleeli.

2.2.7 Saia mahu ja erimahu määramine

Erimahu leidmiseks kasutati Sharadanant ja Khan (2003) artiklis kirjeldatud meetodikat. Esmalt kaaluti 1,5 h jahtunud saiad 0,01 g täpsusega kaalul Radwag WLC 6/A2. Saiade mahu määramiseks kasutati spetsiaalseid silikageelist graanuleid, mille diameeter oli 0,5 cm. Selleks täideti 1 L keeduklaas mõõtjoneeni graanulitega ning tasandati. Keeduklaasist kallati ½ graanulitest 500 ml mahuga mõõtesilindrisse, keeduklaasi asetati varasemalt kaalutud sai. Sai kaeti väljakallatud graanulitega mõõtjoneeni, tasandati ning kirja pandi mõõtesilindrisse ülejäävate graanulite maht, mis on võrdne mõõdetava saia mahuga.

2.2.8 Taigna ja saia tekstuuranalüüs

Tekstuuranalüüs viidi läbi, kasutades TA-XT2i Stable Micro Systems tekstuurianalüsaatorit ja tulemuste läbi töötamiseks programmi Texture Expert Exceed. Nii taigna kui saia puhul tehti igal mõõtmispäeval neli paralleelset mõõtmist.

Taigna mõõtmiseks kasutatavad seadme parameetrid võeti analoogselt Rodriguez-Sandoval et al. (2008) artiklis kirjeldatuga. Taignast vormiti silinder läbimõõdu ja kõrgusega 10 mm, mida deformeeriti 30%, kahe deformatsiooni vahel oli ooteaeg 10 s ja mõõtmiskiirus 1 mm/s. Mõõtmiseks kasutati silindrilist ($d = 25$ mm) mõõtepead P25.

Saia puhul kasutatud seadme parameetrid põhinevad Zhao et al. (2022) artiklil. Analüüsimiseks lõigati eelnevalt 1,5 h jahtunud saia keskosast 25 mm paksune viil. Saiaviilu deformeeriti 40%, kahe deformatsiooni vaheline ooteaeg oli 5 s ning mõõtmiskiirus 1 mm/s. Saia mõõtmisteks kasutati silindrilist ($d = 36$ mm) mõõtepead P36R.

2.2.9 Saia veeaktiivsuse määramine

Veeaktiivsuse määramiseks kasutati AACC küpsetamise meetodikat (Cereals & Grains Association, 2024). Mõõtmiste läbiviimiseks kasutati veeaktiivsusanalüsaatorit AquaLab S3 (Mettler Toledo) toatemperatuuril. Seadme analüüsitops täideti pooleldi samal päeval küpsetatud ning jahtunud saia. Tops asetati mõõtmiseks seadmesse ning iga saiapartii puhul korraldati mõõtmisi kolm korda.

2.2.10 Saia sensoorne hindamine

Sensoorse analüüsi läbiviimisel kasutati 1,5 cm paksuseid viile samal päeval küpsetatud ja 1,5 h jahtunud saiadest. Referentsina oli kasutusel Eesti Pagari täisterasepik, mis oli soetatud eelneval päeval kaubandusketist. Uuritavad saiad märgistati kolmekohalise koodiga ja asetati koos referentsiga taldrükule, mis on nähtav joonisel 3.



Joonis 3. Sensoorsel hindamisel kasutatud väljapanek taldrikul. Vasakult-paremale: kolm IBPd katse käigus küpsetatud saia, mis on märgistatud juhusliku kolmekohalise koodiga ja referentstiks kasutatav sai.

Sensoorse hinnangu andsid assessorid saiate välimusele, struktuurile, aroomile ning maitsele. Proove hinnati skaalal 1 - 10, oma hinnangud pandi kirja hinnangulehele, mis on välja toodud lisas 1.

2.2.11 Statistiline andmete analüüs

Töö praktilises osas saadud tulemusi analüüsiti Microsoft excelis, kus arvatati kõigi tulemuste aritmeetilised keskmised ning standardhälbed. Kerkimise, pärimi ellujäävuse ja kadude puhul arvatati ka erinevuse protsent.

Küpsetamiskao arvutamisel kasutati valemit 2 (Poikalainen et al., 2017), kus K_k - küpsetuskadu (%), m_1 - mass vahetult enne küpsetamist (g) ja m_2 - mass vahetult pärast küpsetamist (g).

$$K_k = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \cdot 100\% \quad (\text{valem 2})$$

Jahtumiskao arvutamiseks kasutati valemit 3 (Poikalainen et al., 2017), kus K_j - jahtumiskadu (%), m_1 - mass vahetult pärast saia küpsetamist (g) ning m_2 - mass peale 1,5 h jahtumist (g).

$$K_j = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \cdot 100\% \quad (\text{valem 3})$$

Tekstuuri profiilanalüüsi läbiviimisel kasutatud programmist Texture Expert Exceed saadi programmi poolt arvatud piikide suuruste tabel, mida kasutati Excelis tekstuuri parameetrite välja arvutamiseks, kasutades valemeid 4-10. (Laos, n.d.)

$$Tugevus = F_2 \quad (\text{valem 4})$$

$$Taastuvus = \frac{L_2}{L_1} \quad (\text{valem 5})$$

$$Kohesioon = \frac{A_2}{A_1} \quad (\text{valem 6})$$

$$Elastsus = \frac{A_4}{A_3} \quad (\text{valem 7})$$

$$Kleepuvus = A_5 \quad (\text{valem 8})$$

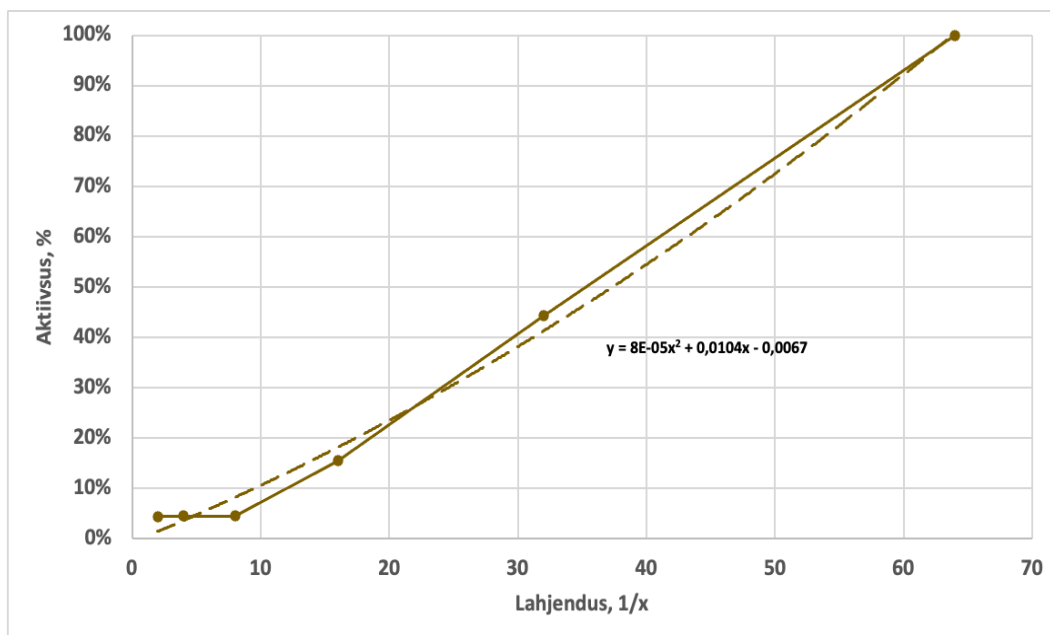
$$Kummissus = \frac{A_2}{A_1} \cdot F_2 \quad (\text{valem 9})$$

$$Sitkus = \left(\frac{A_2}{A_1} \cdot F_2 \right) \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (\text{valem 10})$$

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsus

Inhibitsiooni aktiivsuse leidmiseks koostati mikroskopeerimise tulemuste põhjal joonis 4. Jooniselt saadud ruutvõrrand lahendati ja leiti, et jää rekristallatsioon on 50% inhibeeritud vastavalt 35-kordse lahjenduse juures.

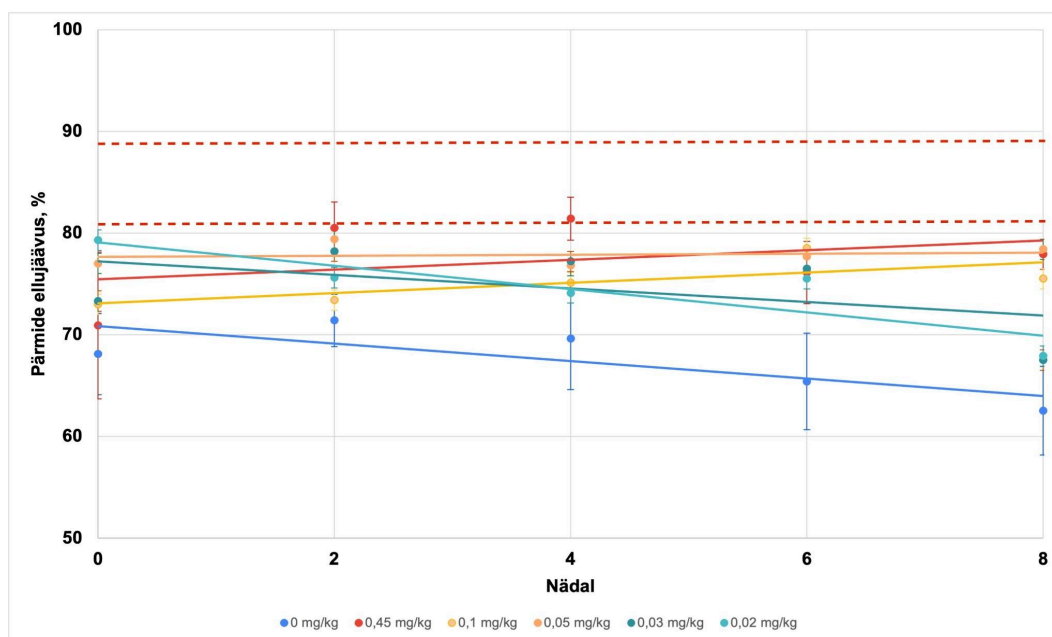


Joonis 4. Jääkristallide kasvukiirus sõltuvalt IBP kontsentratsioonist lahuses.

Taignate valmistamisel otsustati lahjendada valgulahust vedelikus maksimaalselt 20 korda. Selle lahjenduse korral oli valgukontsentratsioon taigas 0,02 mg/kg, mis oli minimaalne kontsentratsioon, mille puhul täheldati taigas ja saias valgu jää rekristallatsiooni inhibeerivat toimet.

3.2 Pärmide ellujäämine

Pärmide ellujäämise arvutamiseks loendati mikroskoobi piltidelt elus ja surnud rakud. Protsentuaalsete tulemuste saamiseks leiti elus rakkude osakaal kõigist loetletud rakkudest ning need kanti joonisele 5.



Joonis 5. Pärmide ellujäävus erinevates taigapartiides. Punase punktiirjoonega on välja toodud külmutamata kontrolltaigna tulemus ($85\% \pm 4\%$).

Graafikul on visualiseeritud, kuidas kõrgemate valgulahuse kontsentratsioonidega (0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg ja 0,45 mg/kg) taignates püsis pärmide ellujäämise protsent katse lõpuni sarnasel tasemel. Väiksemate kontsentratsioonidega taigapartiides (0,03 mg/kg, 0,02 mg/kg ja 0 mg/kg) langes pärmide ellujäävus aga kaheksa nädala jooksul keskmiselt 10% võrra.

Võrreldes külmutamata taignaga, oli tulemus siiski madalam, mis viitab sellele, et *P. fluorescens* jääga seonduvad valgud ei kaitse pärmirakke esialgse külmutamise käigus tekkinud jääkristallide poolt tekitatud kahjustuste eest. IBP-de efekti on näha külmutatuna säilitamise ajal, mille käigus toimub peamine kvaliteedi langus jää rekristallisatsiooni tõttu. Esialgse pärmirakkude ellujäävuse langusega saab korreleerida ka madalamaid tulemusi teistes analüüsitud parameetrites.

Sarnased tulemused saadi ka Nguyen et al. (2018) artiklis, kus täheldati oluliselt suuremat pärmide ellujäävust jääga seonduva valguga lisamisel. Kui kontrollgrupis määrati neljandal nädalal ellujäävuseks 48,5%, siis rohkem kui 0,3 mg/kg valguga lisamisel oli ellujäävuse maksimum 71,5%.

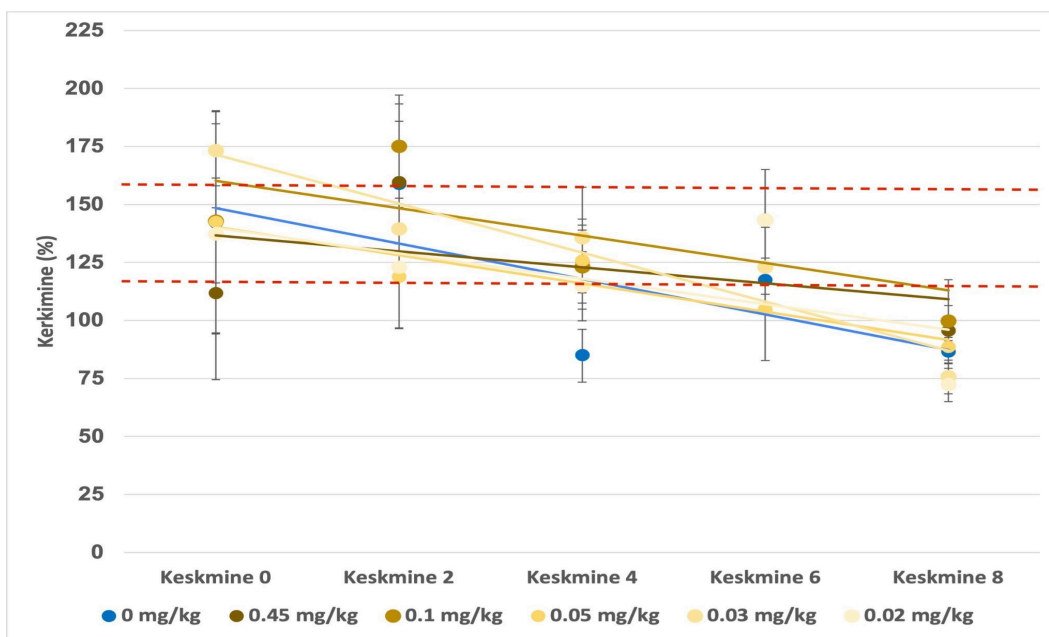
3.3 Kergitusvõime

Kerkimine nädalal 0 ja nädalal 8 on nähtav joonistel 6a ja 6b, kus on visuaalselt märgata kergitusvõime langemist taignates katseperioodi jooksul.



Joonised 6a ja 6b. Kerkimine nädalal 0 (vasakul) ja nädalal 8 (paremal).

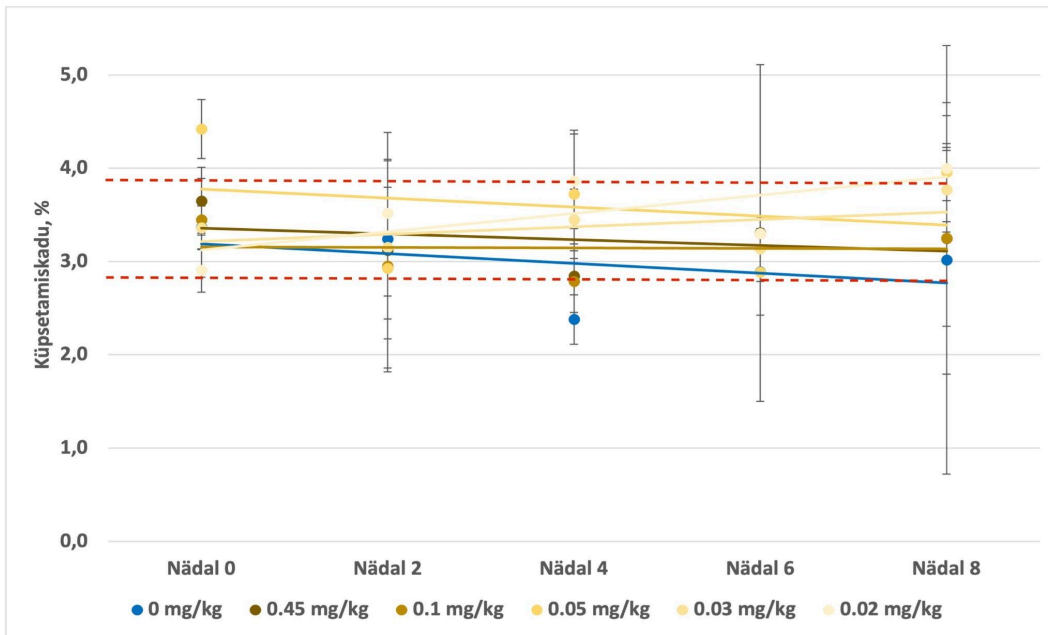
Kerkimisel on oluline gaasitootva pärmie ellujäävus ning gluteenivõrgustiku võime hoida tekkinud gaase taigas (Chiotellis & Campbell, 2003). Graafiliselt välja toodud tulemustest (joonis 7) on näha, et nii negatiivse (0 mg/kg) kui ka kõigi IBPd sisaldavate taigaste kerkimine langes kaheksa nädala jooksul keskmiselt 25%. Kuigi olulist erinevust partiides ei täheldatud, hakkas negatiivsel kontrollproovil kerkimisvõime langema neljandal nädalal, samas kui IBP-d sisaldavatel partiidel kuuendal ja kaheksandal nädalal. Küll aga ei olnud ükski tulemus oluliselt erinev külmutamata taigana kerkimisvõimest, mis jäi vahemikku $140 \pm 20\%$.



Joonis 7. Taigaste kerkimine (%) ja muutus katse jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud külmutamata taigana kerkimise keskmine vahemik ($140 \pm 20\%$).

3.4 Küpsetamis- ja jahtumiskadu

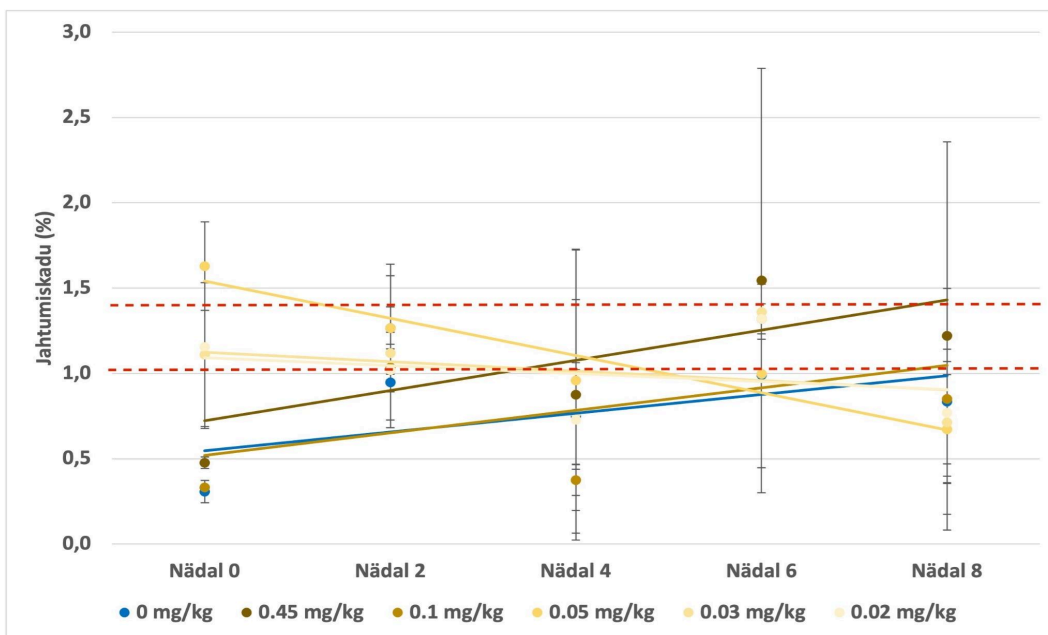
Küpsetamise käigus toimuv massikadu on enamjaolt kuumusega aurustuv vesi ning vähesel määral erinevad muud ühendid, näiteks CO_2 ja orgaanilised happed. (Poikalainen et al., 2017)



Joonis 8. Saiade küpsetamiskadu (%). Punase punktiiriga värskest külmutamata taiglast tehtud saia tulemus ($3,37 \pm 0,49\%$).

Joonisel 8 on näha saiade küpsetamiskaod kogumassist kaheksa nädala lõikes. Kõigi saiapartiide puhul jäi kaoprotsent $2,38\% \pm 0,27\%$ ja $4,42\% \pm 0,32\%$ vahele. Võrreldes tulemusi külmutamata taiglast küpsetatud saia (kadu $3,37 \pm 0,49\%$), suuri erinevusi ei leitud, kuna külmutatud taiglast saiade kaod langesid värskesse saia samasse vahemikku. Märkimist väärib muutus 0 mg/kg külmutatud saias, mille küpsetamiskadu langes juba neljandal nädalal kogu katse miinimumini.

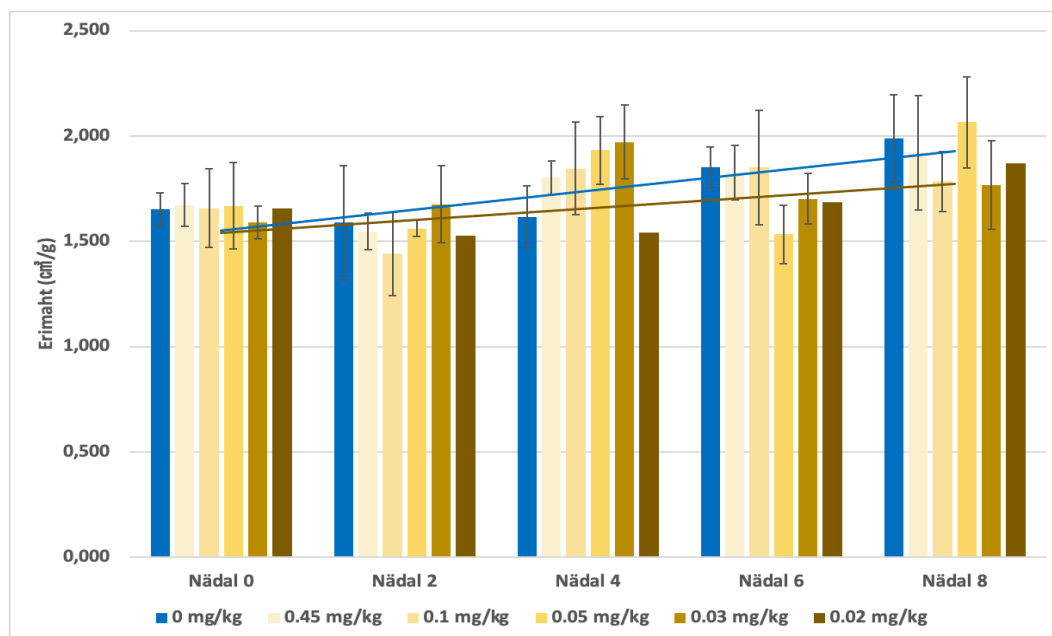
Saiade jahtumiskadu kogumassist on kujutatud joonisel 9. Kuigi trend joonisel näitab märgatavaid muutusi jahtumiskaos, siis tegelikult oli muutus keskest läbi 1%, mis ei ole mõõtmiste täpsust arvestades statistiliselt oluline.



Joonis 9. Saiade jahtumiskadu (%). Punase punktiiriga värskest külmutamata taiglast tehtud saia tulemus ($1,24 \pm 0,28\%$).

3.5 Saia erimaht

Saiade erimahu arvutamiseks jagati saia ruumala tema massiga ning tulemused kanti joonisele 10. Olulisi muutusi kaheksa nädala jooksul erimahus ei toimunud. See on kooskõlas eelnevalt täheldatud langenud kerkimisvõime ja suurenenud jahtumiskadude tulemustega, mis muutusid üksteisega sarnases suhtes.



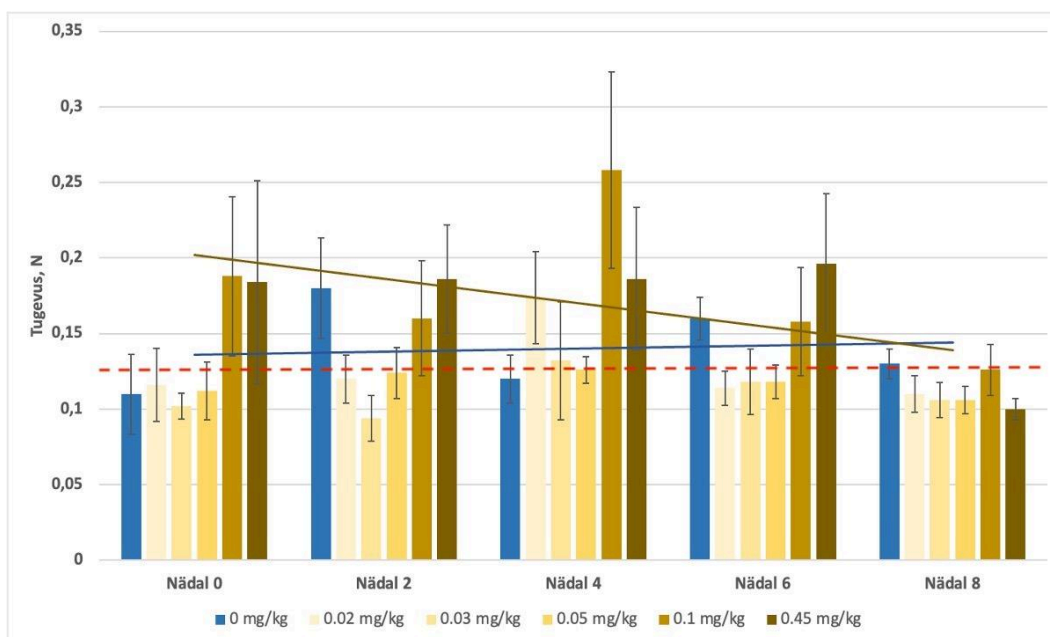
Joonis 10. Saiade erimaht (cm³/g) nädalate lõikes.

3.6 Tekstuuranalüüs

Tekstuuri omadused on oluline osa sensoorsest kogemusest toote tarbimisel. Toidu söömisel mängivad suurt rolli näiteks tunnetus suus, kleepumine suuõõnde, närimise lihtsus selles, kuidas tarbija tootesse suhtub. Tekstuuranalüüs aitab prognoosida tarbijapoolset arvamust uuest tootest enne sensoorse analüüsi läbi viimist ning säilitada juba turul oleva toote kvaliteeti. (Chen & Rosenthal, 2015; Kadam, Tiwari, & O'Donnell, 2015). Tekstuurprofiilanalüüsi tulemuste põhjal koostati joonised taigna ja saia seitsmele põhilisele tekstuuri omadusele: tugevus, kleepuvus, elastsus, taastuvus, kohesioon, kummissus ja sitkus.

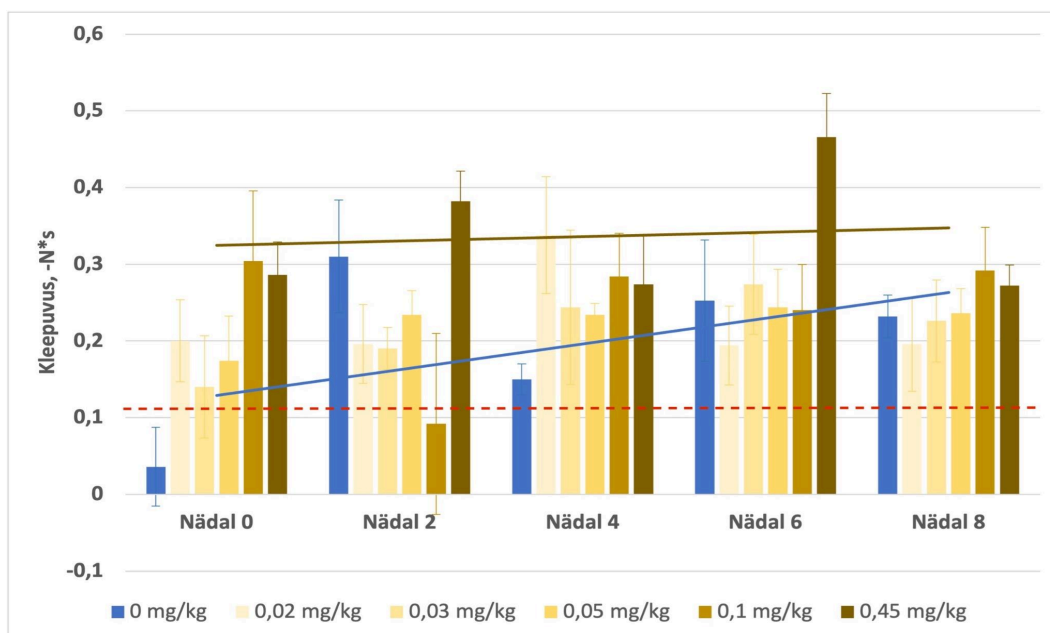
3.6.1 Taigna tekstuur

Taignate tugevuse määramisel ei märgatud väiksemate valgukontsentratsioonide puhul olulisi muutusi katseperioodi vältel. Joonisel 11 on näha, et kaks suurema valgu kontsentratsiooniga taignapartiid (0,1 mg/kg ja 0,45 mg/kg) püsisid kuni kuuenda nädalani tugevamana, siis hakkas tõenäoliselt taignas sisalduva valgu aktiivsus langema, mis põhjustas omakorda tugevuse languse taigna partiis.



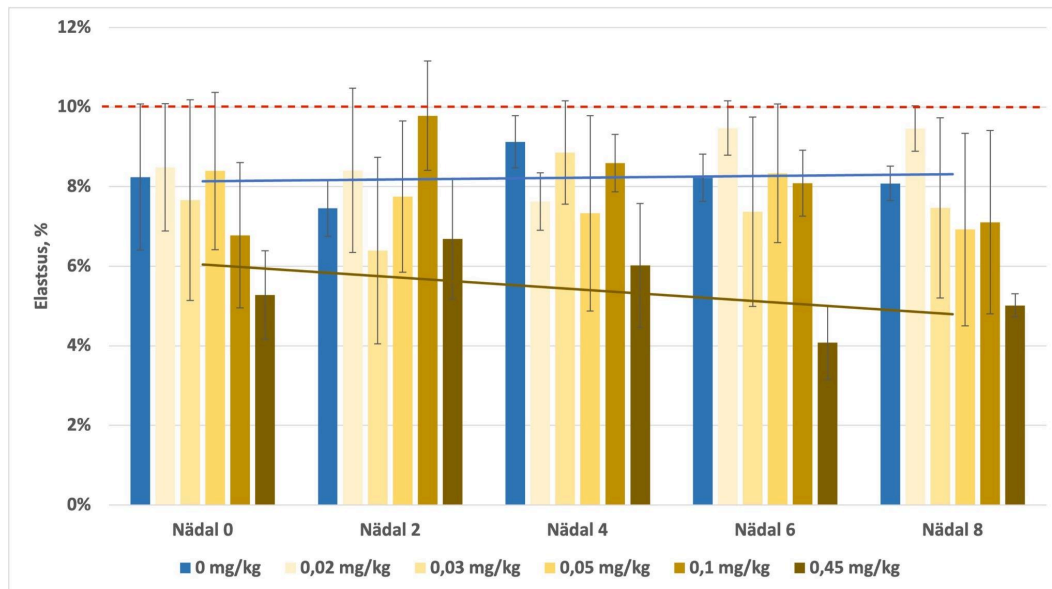
Joonis 11. Taignate tugevus kaheksa nädala vältel. Punase punktiirjoonega on välja toodud värske taigna tulemus ($0,13 \pm 0,01$ N). Sinise ja pruuni trendiirjoonega on näha vastavalt 0 mg/kg taigna ja 0,45 mg/kg taigna tugevuse muutusi kaheksa nädala jooksul.

Taignate kleepuvus pärast külmutamist ja sulatamist tõusis aja jooksul kõigis partiides ning analüüsitulemused toodi välja joonisel 12. Suurim muutus, toimus 0,45 mg/kg taignas, mis saavutas kuuendal nädalal suurima kleepuvuse ($-0,47 \pm 0,06$ N*s). Teiste IBPd sisaldavate partiide muutused sarnanesid IBP-vabale kontrolltaignale, varieerudes vahemõõtmiste tulemustes, kuid saavutades kaheksandaks nädalaks sarnase suurusjärgu negatiivse kontrolltaignaga.



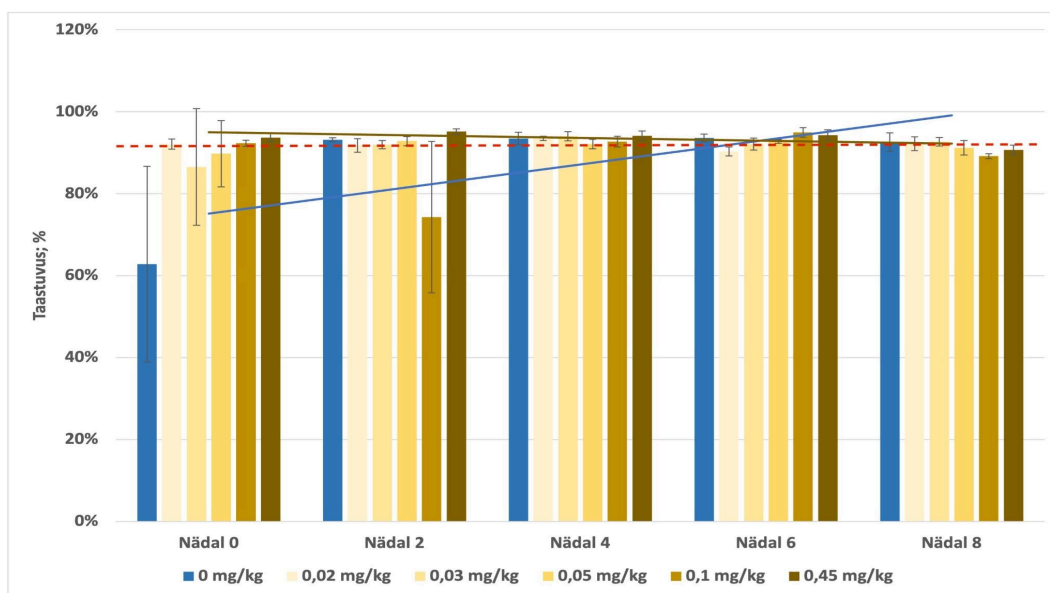
Joonis 12. Taignate kleepuvus (-N*s) katse vältel. Punase punktiirjoonega on välja toodud värske külmutamata taigna tulemus ($-0,11 \pm 0,01$ N*s). Sinise ja pruuni trendiirjoonega on näha vastavalt 0mg/kg taigna ja 0.45 mg/kg taigna kleepuvuse muutusi kaheksa nädala jooksul.

Elastsus taigates püsis kogu katse jooksul üle 6%, mis on kujutatud joonisel 13. Erinevus esines kõige kontsentreeritumas IBP taigna (0,45 mg/kg) puhul, mille elastsus oli maksimaalselt 6,68% ning aja jooksul langevas tendentsis. See võib olla seotud jääga seonduvate valkude lisamisega taigna koostisesse, mille tagajärjel langeb gluteeni osakaal taignas (Paraskevopoulou, Provatidou, Tsotsiou, & Kiosseoglou, 2010).



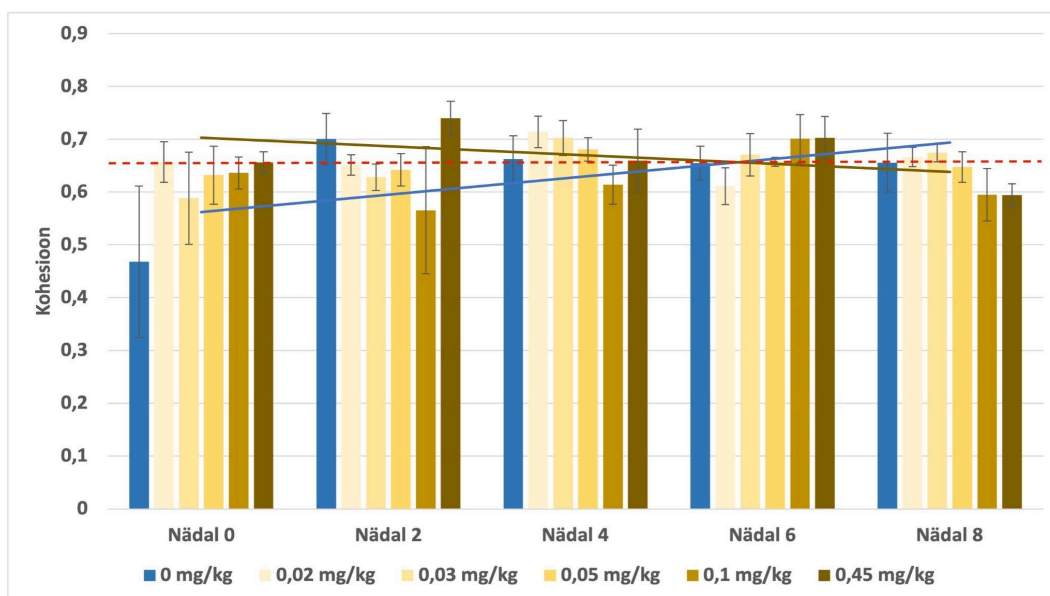
Joonis 13. Taigate elastsus (%) kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg taigna ja 0,45 mg/kg taigna muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värskelt külmutamata taigna tulemus ($10 \pm 2\%$).

Taastuvus näitab taigna võimet taastada kuju ja ruumala, mida see omas enne deformatsiooni. Mõõtmistulemused kaheksa nädala jooksul on toodud joonisel 14. Jääga seonduvat valku sisaldavate tainaste puhul oli taastuvus stabiilselt umbes 90%, mis on sarnane külmutamata taigna tulemustele. Negatiivse kontrolltaigna tulemus nädalal 0 ja 0,1 mg/kg taigna tulemus teisel nädalal olid märkimisväärselt madalamad, kuid jäävad vea piires samasse suurusjärku.



Joonis 14. Taignapartiide taastuvus (%) kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg taigna ja 0,45 mg/kg taigna muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värske külmutamata taigna tulemus ($92 \pm 2\%$).

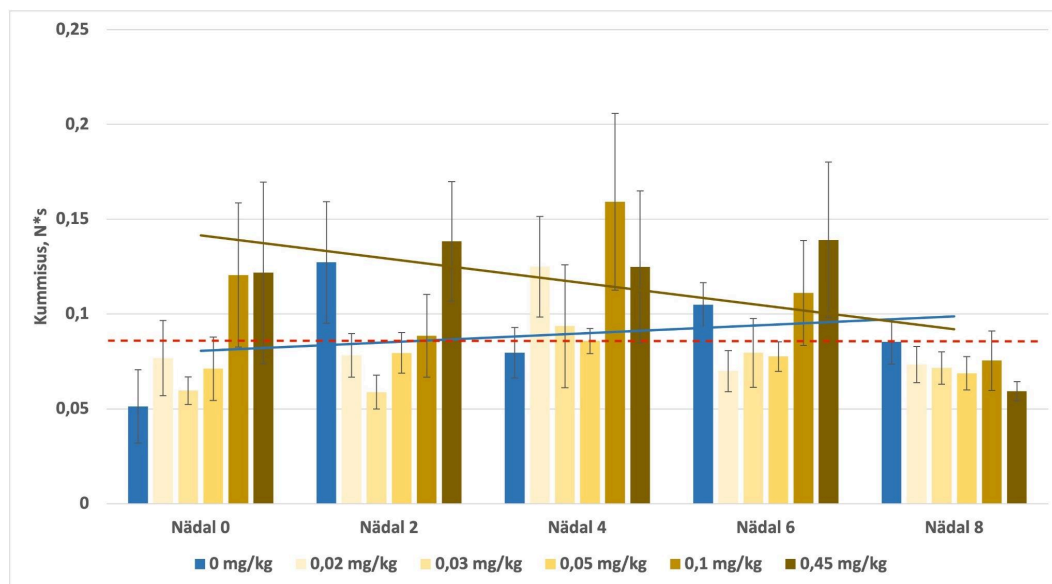
Sarnaselt taastuvusele püsis värske taignaga samas vahemikus ka kõigi IBPd sisaldavate tainaste kohesioon, mis on näha joonisel 15. Kohesioon näitab taigas leiduvate sisemiste sidemete tugevust. Kuigi tulemustes oli märgata väikest langust kohesioonis 0,1 mg/kg ja 0,45 mg/kg kontsentratsioonide mõõtmise kaheksandal nädalal, ei ole see piisavalt suur, et olla statistiliselt oluline.



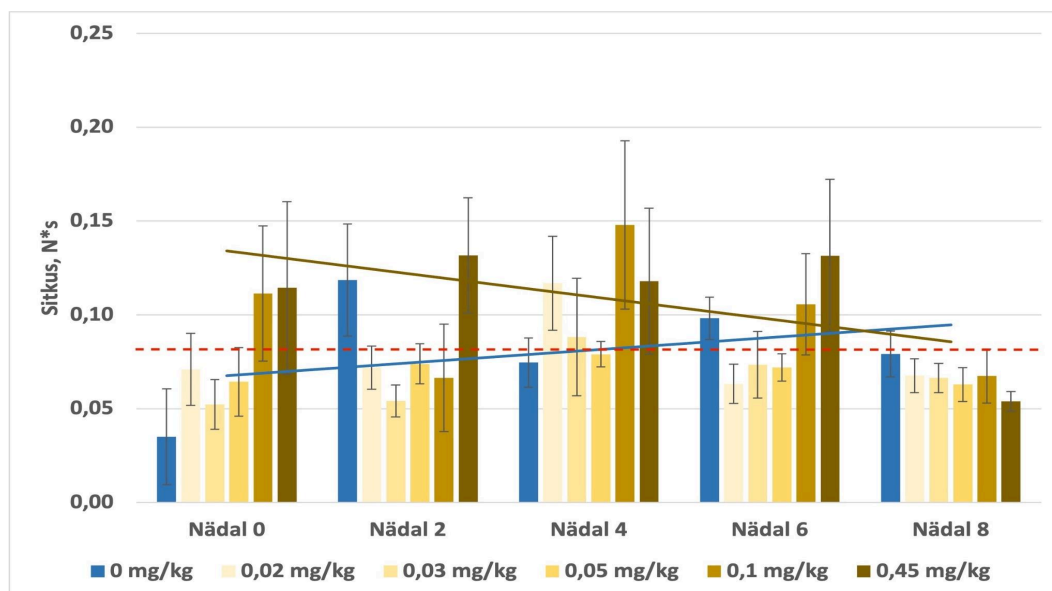
Joonis 15. Taignapartiide kohesioon kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg ja 0,45 mg/kg taigna muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värske külmutamata taigna tulemus ($0,66 \pm 0,05$).

Joonistel 16 ja 17 on toodud välja taignate kummissus ja sitkus. Mõlema parameetri puhul on näha, et 0 mg/kg partii väärtus nädalate vältel kuni 0,07 N*s Madalamate IBP-de kontsentratsioonide juures

(0.02-0.05 mg/kg) on kummisuse ja sitkuse tulemused stabiilsemad, samas kõrgemate kontsentratsioonidega IBPsid sisaldavate partiide tulemused varieeruvad maksimaalselt kuni kuuenda nädalani, mil nii kummisus kui sitkus langevad. Mõlemad parameetrid sõltuvad otseselt taigna tugevusest, mis korreleerub alltoodud tulemusega.



Joonis 16. Taigapartiide kummisus kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg ja 0.45 mg/kg taigna muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värske külmutamata taigna tulemus ($0,08 \pm 0,01 N*s$).

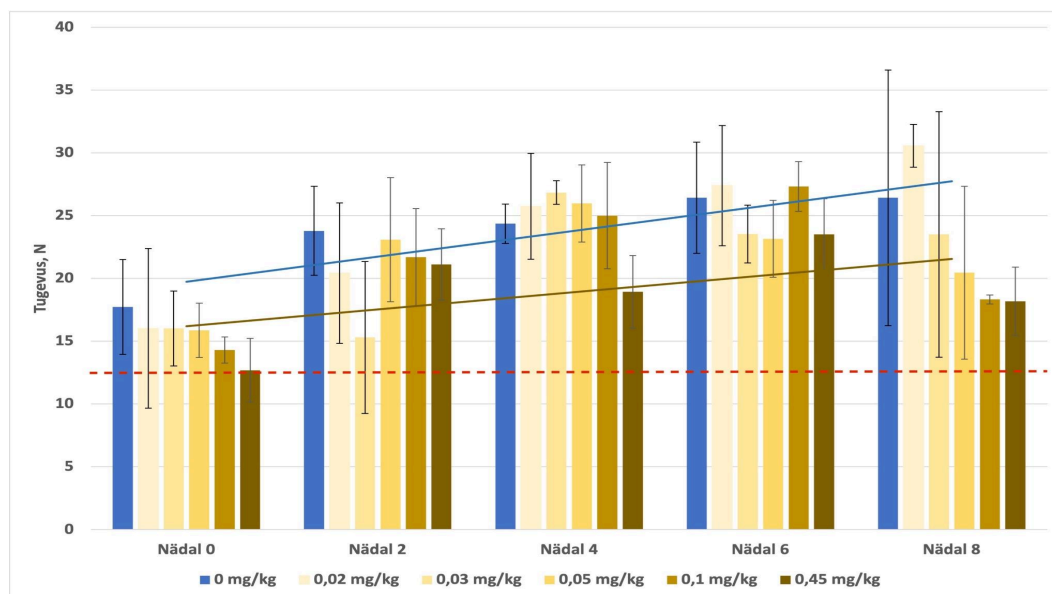


Joonis 17. Taigapartiide sitkus kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg ja 0.45 mg/kg taigna muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värske külmutamata taigna tulemus ($0,08 \pm 0,01 N*s$).

3.6.2 Saia tekstuuranalüüs

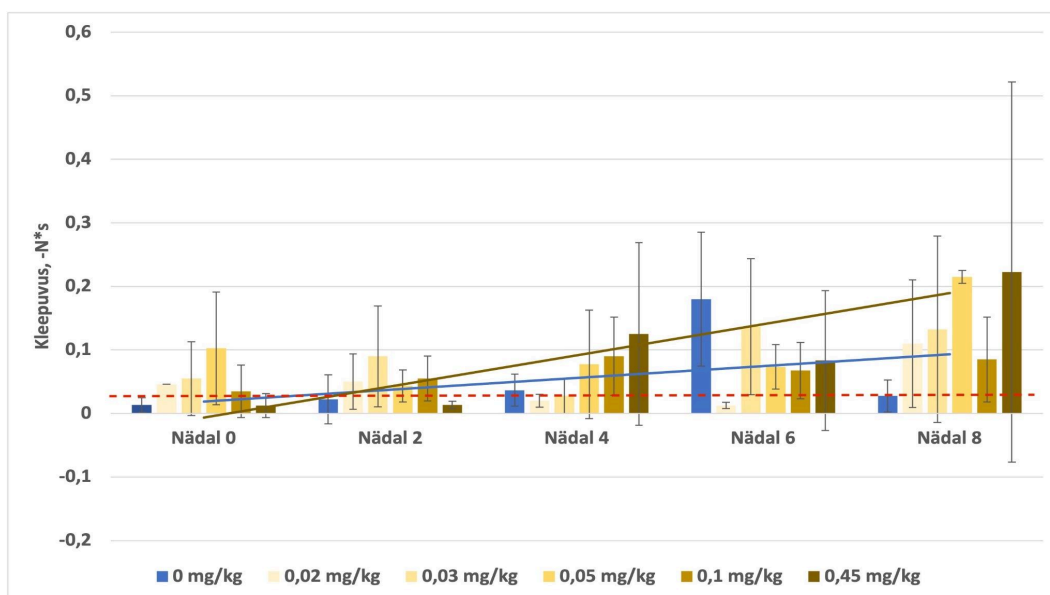
Saiade tugevuste (N) väärtused on kujutatud joonisel 18, kus on märgata nii negatiivse kontrollsaia kui ka kahe lahjema IBP kontsentratsiooniga saia tugevuse järk-järgulist tõusu pärast neljandat nädalat. Suurema IBP kogusega (0,05-0,45 mg/kg) saia puhul püsib tugevus väiksemana, mis ühtib ka Liu, Liang, Zhang et al. (2018) artikli saadud tulemustega.

Jäätumine on võimalik vaba vee ja nõrgalt seotud vee puhul. IBP seob vett tugevamalt teiste molekulidega, mistõttu väheneb jäätuva vee hulk. Väiksemat ja stabiilsemat tugevuse väärtust IBP saiaades saab põhjendada madalama jäätuva vee hulgaga saias. (Liu, Liang, Zhang, et al., 2018) Seetõttu on ka suurema IBP kontsentratsiooniga saiaidel madalam tugevuse tulemus.



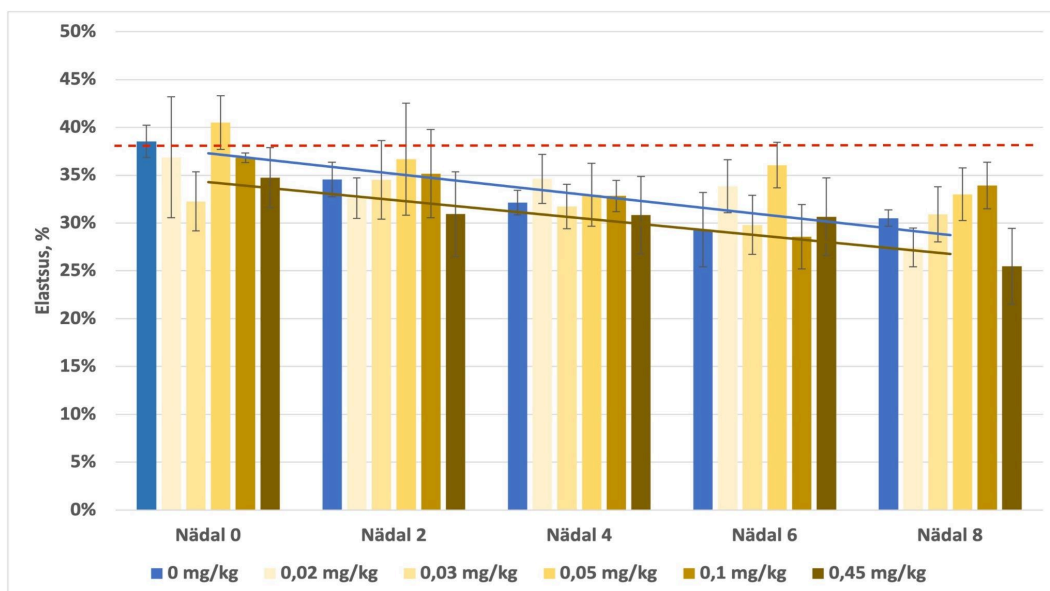
Joonis 18. Saiapartiide tugevus kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg saia ja 0,45 mg/kg saia tugevuse muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värske külmutamata taignast küpsetatud saia tulemus ($12,43 \pm 0,77$ N).

Saiade kleepuvus (joonis 19.) tõusis katseperioodi jooksul märkimisväärselt alates neljandast nädalast. Suurim muutus toimus 0,05 - 0,45 mg/kg saia puhul. IBP lisamisel vähenes saia koostises pärmi protsentuaalne osakaal, kuna koostisesse lisatakse juurde valku. Pärm osakaalu vähenemise koosmõju külmutamise tagajärjel vähenenud veehoidmisvõimega põhjustab suurenenud kleepuvust saiaades (Singh, Jha, Chaudhary, & Upadhyay, 2012).



Joonis 19. Saiapartiide kleepuvus (-N*s) kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg saia ja 0,45 mg/kg saia muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värskelt külmutamata taigast küpsetatud saia tulemus ($-0,03 \pm 0,01$ N*s).

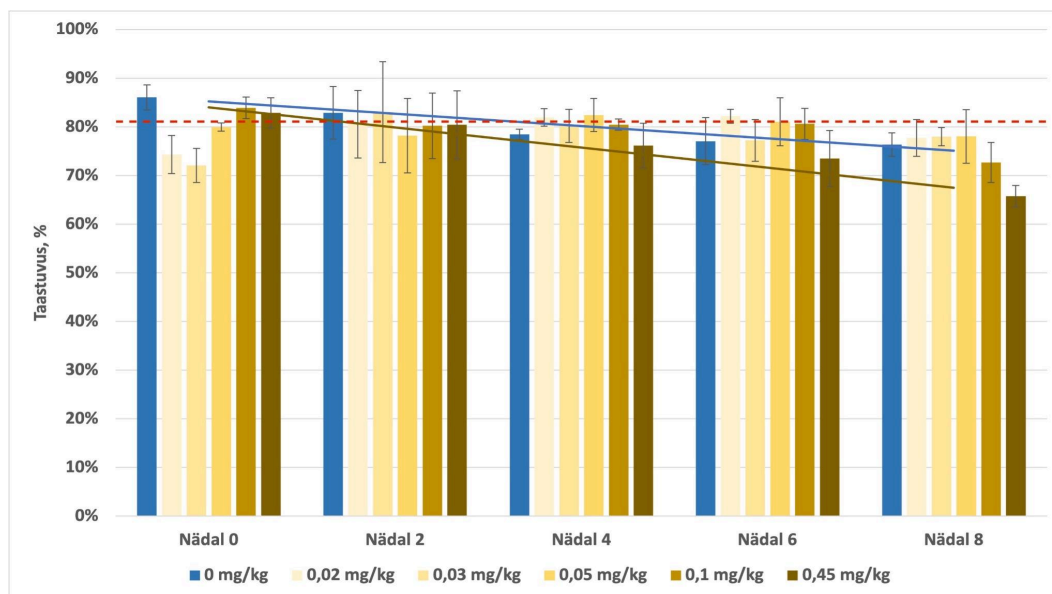
Elastsus langes kaheksa nädala jooksul nii kontrollpartii kui IBP saiate puhul, mis on kujutatud joonisel 20. Seda täheldati ka Nguyen et al. (2018) katsetes, kus pärast nelja nädalat oli kontrollsaia elastsus langenud ligi 30%. Lisades 0,3 mg/kg IBP, vähenes saia elastsus ainult 15%. (Nguyen et al., 2018)



Joonis 20. Saiade elastsus (%) kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg saia ja 0,45 mg/kg saia muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värskelt külmutamata taigast küpsetatud saia tulemus (38 ± 2 %).

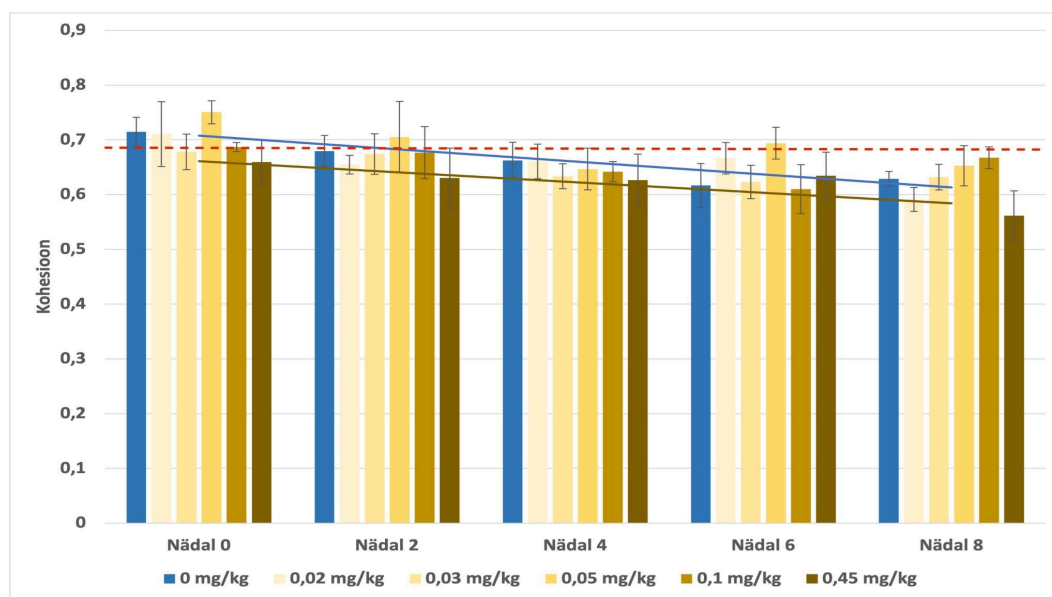
Saiapartiide taastuvus ajas muutus langevas tendentsis, kuigi kõigi partiide puhul on märgata suuremat langust alates neljandast nädalast (joonis 21). Võrreldes tulemusi külmutamata taigast saia, on taastuvus katsepartiidel kaheksandaks nädalaks 5-15% madalam. Taastuvuse langust

põhjustavad jääkristallid, lõhkudes pikemal sügavkülmas säilitamisel aina rohkem gluteenivõrgustikku.



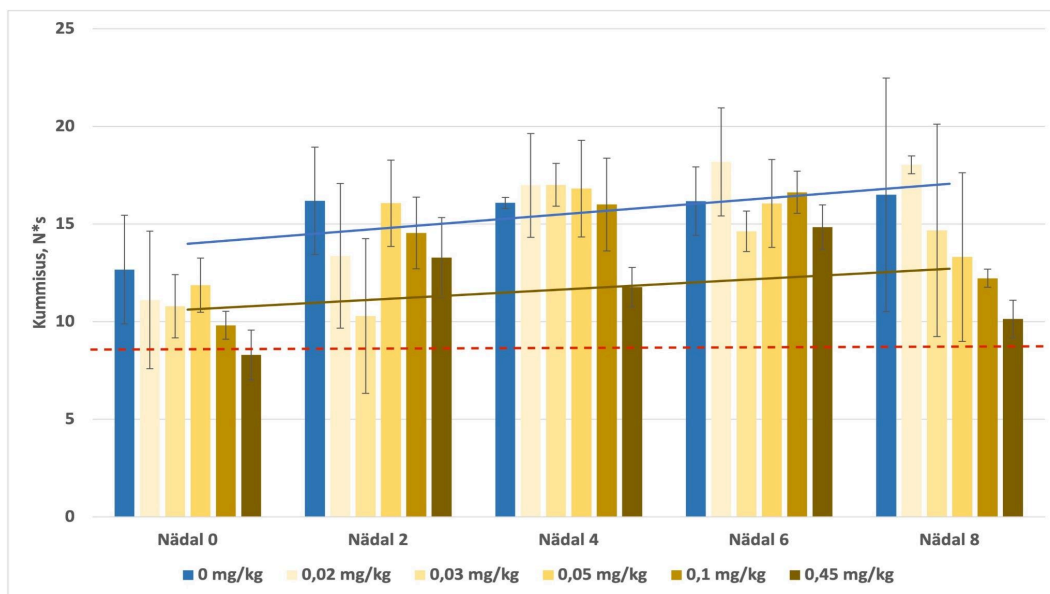
Joonis 21. Saiade taastuvus (%) kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg saia ja 0,45 mg/kg saia muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värskelt külmutatud taigast küpsetatud saia tulemus ($81 \pm 2 \%$).

Nagu eelnevalt mainitud, lõhuvad kasvavad jääkristallid pikemal külmutatuna säilitamisel taigna sisemisi sidemeid. Seetõttu on näha langust ajas ka saiaade kohesiooni tulemustes, mis on toodud joonisel 22. Värske saiaade kohesiooni tulemuseks saadi $0,69 \pm 0,01$ ning veel teisel nädalal olid IBP saiaade väärtused sarnasel tasemel. Alates neljandast nädalast, toimus saiaades sisemiste sidemete suurem lagunemine, mis viitab IBP efektiivsuse langemisele.

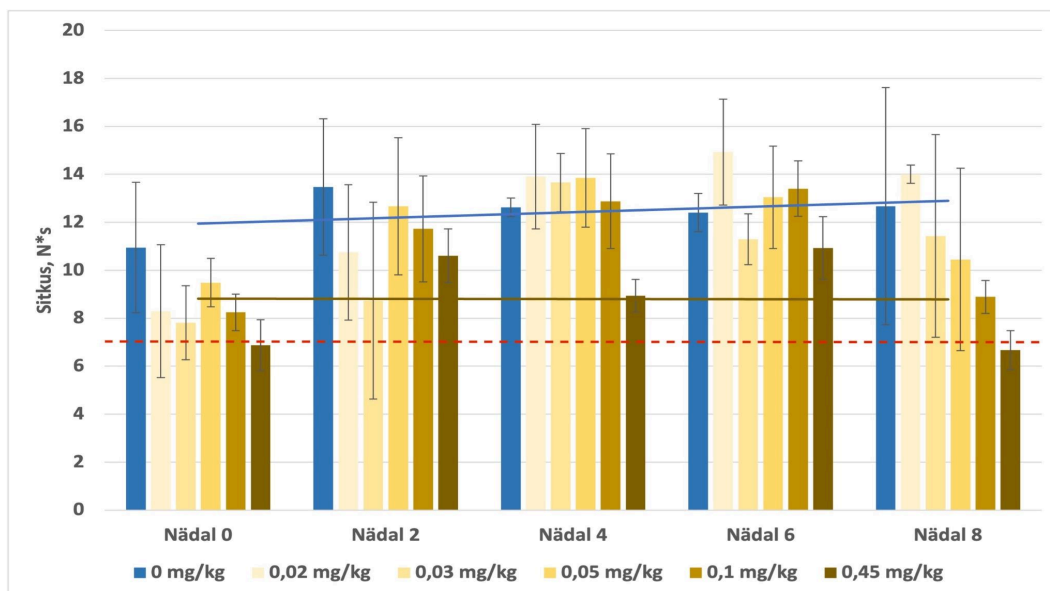


Joonis 22. Saiade kohesioon kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg ja 0,45 mg/kg saiaade muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värskelt külmutatud taigast küpsetatud saiaade tulemus ($0,69 \pm 0,01$).

Saiade kummissus ja sitkus sõltuvad oluliselt mõõdetud tugevusest, mistõttu on näha sarnaseid muutusi joonisel 23 ja 24 nagu eelnevalt tugevust illustreerinud joonisel. Mõlema omaduse puhul võib täheldada, et suurema koguse IBP lisamisel püsivad tulemused stabiilsemad. Seda kinnitavad ka kirjandusest leitud tulemused, kus 0,3 mg/kg IBP lisamisel oli kummissuse tulemus neljanda nädala mõõtmisel 30% väiksem kui kontrollsaial. (Nguyen et al., 2018)



Joonis 23. Saiade kummissus kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg ja 0,45 mg/kg saia muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värskelt külmutamata taigenast küpsetatud saia tulemus ($8,62 \pm 0,57 N^*s$).

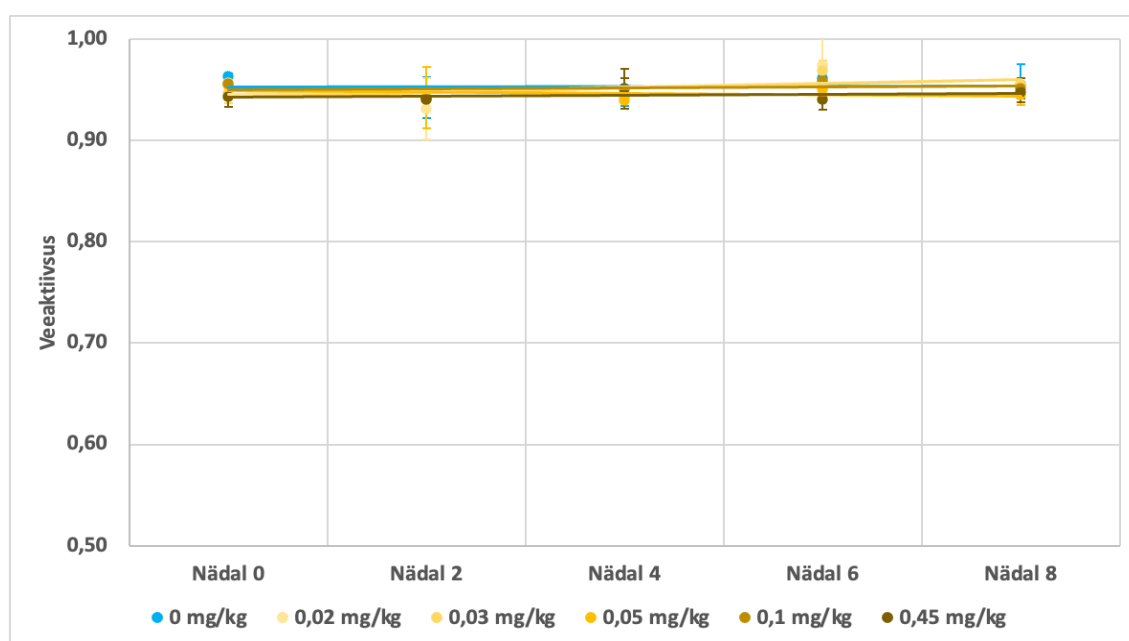


Joonis 24. Saiade sitkus kaheksa nädala vältel. Sinise ja pruuni trendijoonega on näha vastavalt 0 mg/kg ja 0,45 mg/kg saia muutusi kaheksa nädala jooksul. Punase punktiirjoonega on välja toodud värskelt külmutamata taigenast küpsetatud saia tulemus ($7,01 \pm 0,58 N^*s$).

3.8 Saia veeaktiivsus

Veeaktiivsus saiaades näitab saia aururõhu ja puhta vee aururõhu suhet, mille järgi saab hinnata mikroobidele kättesaadava vee hulka. Puhtal (destilleeritud) veel on veeaktiivsuse väärtus 1, nisujahust saial on see keskmisel 0,96 (AACC, 1989). Joonisel 25 on kujutatud katse vältel saadud mõõtmistulemused. Kaheksa nädala jooksul kõikusid kõigi saiapartiide veeaktiivsused vahemikus 0,93 kuni 0,98, kusjuures ei esinenud olulisi erinevusi partiide vahel.

Tulemuste põhjal ei leitud IBP-de mõju veeaktiivsusele, mis ühtib kirjanduse andmetega. Chen, Wu, Li, & Wang (2016) andmetel mõjutab IBP lisamine nõrgalt seotud vee ja tugevalt seotud vee suhet tootes, mis ei kajastu veeaktiivsuses, mis näitab vaba vett. IBP seob vee tootes veelgi tugevamalt, mistõttu on sellel väiksem võimalus jääda. (Chen, Wu, Li, & Wang, 2016)



Joonis 25. Saiade veeaktiivsus katse vältel.

3.9 Saia sensoorne hinnang

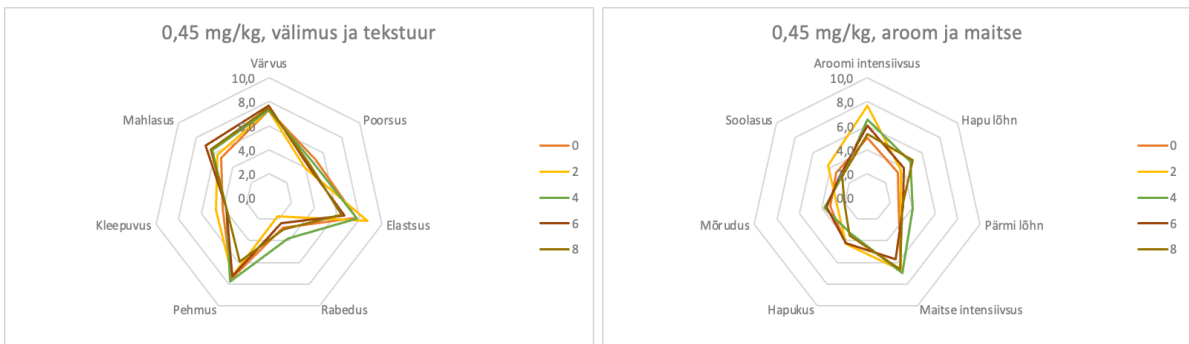
Tarbija vaatepunktist on IBP lisamisel kõige olulisemad saia sensoorsed omadused (Kadam, Tiwari, & O'Donnell, 2015). Igal mõõtmispäeval anti hinnang saiaade välimusele, tekstuurile, maitsele ja aroomile, kasutades sensoorse analüüsi hinnangulehte (Lisa 1). Tulemused negatiivse kontrollsaia ja 0,45 mg/kg saia sensoorsel hindamisel on toodud joonistel 26a ja 26b ning 27a ja 27b.

Negatiivse kontrollsaia (IBP 0 mg/kg) välimuse ja tekstuuri puhul toimusid suurimad muutused saia pehmuse ja elastsuse hinnetes. Kui katse alguses hinnati mõlemat omadust keskmiselt kaheksa punktiga, siis pärast kaheksat nädalat said need hindeks kuus punkti. Aroomi- ja maitseomadused olid kontrollsaial kõige tugevamad teisel nädalal, kui aroomi intensiivsus sai hindeks keskmiselt kaheksa punkti ning maitse intensiivsus seitse punkti. Katse lõpuks langes aroomi intensiivsus neljale punktile ning täheldati rohkem hapukat aroomi.



Joonis 26a ja 26a. 0 mg/kg saia sensoorse hindamise tulemused.

IBP-d sisaldavad saiad said assessoritelt partiide üleselt sarnaseid hindeid, mis on välja toodud lisas 2. Kõige suurema valgukontsentratsiooniga saia puhul hinnati pehmust ja elastsust võrdset kontrollsaiaiga - algul kaheksa punktiga ning katse lõppedes kuue punktiga. Aroomi ja maitse puhul täheldati mõningast aroomi intensiivsuse langust, kuid võrreldes negatiivse kontrollsaiaiga, on IBP saiate tulemused stabiilsemad.



Joonis 27a ja 27b. 0,45 mg/kg sensoorse hindamise tulemused.

Kokkuvõte

Külmutamine ja külmutatuna säilitamine on üks viis, kuidas vähendada toidu raiskamist, pikendades pagaritoodete säilivusaega. Paratamatult põhjustavad külmutamise ja säilitamise käigus erinevad probleemid toote omaduste muutusi, mis langetavad selle kvaliteeti. Nende probleemidega võitlemiseks saab lisada tootesse jääga seonduvaid valke, mis võivad hoida jääkristallide poolt tekitatud kvaliteedilangust kontrolli all.

Antud magistritöö keskendus *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetud jääga seonduvale valgule ning uuris kas ja kuidas see mõjutab nii taigna kui ka küpsetatud saia omadusi kaheksanädalase ajavahemiku vältel. Eesmärgiks oli kaardistada muutusi, mida toob kaasa lisatud IBP ning seeläbi saada teada, kas sellel valgul oleks potentsiaali parandada pagaritööstuses külmutatud toodete kvaliteeti.

Praktilise tööna kasutati *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetud jääga seonduva valgu lahust täistera nisujahust taignate valmistamisel erinevates kontsentratsioonides: 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg ja 0,45 mg/kg. Kõik erinevad taignapartiid külmutati ja säilitati -18 °C juures kaheksa nädalat. Analüüsimiseks sulatati iga kahe nädala järel osa taignapartiidest, mille tulemusi võrreldi samadel tingimustel valmistatud ja säilitatud kontrollpartiiga. Läbi viidi valgulahuse jää rekristallatsiooni inhibeerimise aktiivsuse, pärmi ellujäävuse, kerkimisvõime, küpetamis- ja jahtumiskao, saia erimahu ja veeaktiivsuse määramised. Lisaks veel tekstuurianalüüs ning sensoorne hindamine.

Tulemustes leiti, et kasutades taignas rohkem kui 0,1 mg/kg jääga seonduva valgu lahust, aitas see säilitada pärmi ellujäävust ja saia kerkimisvõimet. Samuti püsisid saiad pehmemad ja elastsemad. IBP lisamine ei mõjutanud oluliselt veeaktiivsust, saia erimahtu ega sensoorseid omadusi. Saadud tulemused ühtisid ka kirjandusest leituga, mistõttu sobiks *Pseudomonas fluorescens* jääga seonduv valgu lahus kontsentratsioonidel üle 0,1 mg/kg täistera nisujahust saia kvaliteedi säilitamiseks.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat, Önnela Luhilat kogu lõputöö läbiviimise juhendamise eest. Samuti tema väärtusliku nõu eest keelelise abi ja kommentaaride näol.

Tahan tänada ka Karinat, kes aitas eksperimentaalse osa läbiviimisel ning kõiki kaheksal nädalal jooksul osalenud assessoreid: Atefe, Anna, Katrin, Tiina, Kristel ja Evelyn.

Viimasena soovin saata suurimad tänud oma perele ja lähedastele toetuse eest kogu töö kirjutamise vältel.

Kasutatud kirjandus

- AACC. (1989). Cereal Chem 1989 | Water Activity and Moisture Content of Dough and Bread. Retrieved from www.cerealsgrains.org website: <https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1989/Documents/CC1989a31.html>
- Avanov, A. Y. (1990). Biological antifreezes and the mechanism of their activity. *Molecular Biology*, 24(3), 473–487.
- Bar Dolev, M., Braslavsky, I., & Davies, P. L. (2016). Ice-Binding Proteins and Their Function. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 515–542. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014546>
- Barrett, J. (2001). Thermal hysteresis proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(2), 105–117. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(00\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(00)00083-2)
- Białkowska, A., Majewska, E., Olczak, A., & Twarda-Clapa, A. (2020). Ice Binding Proteins: Diverse Biological Roles and Applications in Different Types of Industry. *Biomolecules*, 10(2), 274. <https://doi.org/10.3390/biom10020274>
- Cereals & Grains Association. (2024). Retrieved 2024, from www.cerealsgrains.org website: <https://www.cerealsgrains.org/resources/Methods/Pages/44Moisture.aspx>
- Chen, J., & Rosenthal, A. (2015). Food texture and structure. *Modifying Food Texture*, 3–24. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-333-1.00001-2>
- Chen, X., Shi, X., Cai, X., Yang, F., Li, L., Wu, J., & Wang, S. (2020). Ice-binding proteins: a remarkable ice crystal regulator for frozen foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(20), 3436–3449. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1798354>
- Chen, X., Wu, J., Li, L., & Wang, S. (2016). The cryoprotective effects of antifreeze peptides from pigskin collagen on texture properties and water mobility of frozen dough subjected to freeze–thaw cycles. *European Food Research & Technology*, 243(7), 1149–1156. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2830-x>
- Chiotellis, E., & Campbell, G. M. (2003). Proving of Bread Dough II. *Food and Bioproducts Processing*, 81(3), 207–216. <https://doi.org/10.1205/096030803322437974>
- Delgado, A. E., & Sun, D.-W. (2001). Heat and mass transfer models for predicting freezing processes – a review. *Journal of Food Engineering*, 47(3), 157–174. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(00\)00112-6](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(00)00112-6)
- DeLuca, C. I., Davies, P. L., Ye, Q., & Jia, Z. (1998). The effects of steric mutations on the structure of type III antifreeze protein and its interaction with ice. *Journal of Molecular Biology*, 275(3), 515–525. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1482>
- Ding, X., Li, T., Zhang, H., Guan, C., Qian, J., & Zhou, X. (2020). Effect of Barley Antifreeze Protein on Dough and Bread during Freezing and Freeze-Thaw Cycles. *Foods*, 9(11), 1698. <https://doi.org/10.3390/foods9111698>
- Hagiwara, T., Hartel, R. W., & Matsukawa, S. (2006). Relationship between Recrystallization Rate of Ice Crystals in Sugar Solutions and Water Mobility in Freeze-Concentrated Matrix. *Food Biophysics*, 1(2), 74–82. <https://doi.org/10.1007/s11483-006-9009-0>

- Harding, M. M., Ward, L. G., & Haymet, A. D. J. (1999). Type I “antifreeze” proteins. Structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition. *European Journal of Biochemistry*, 264(3), 653–665. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00617.x>
- Hou, Q., Cheng, Y., Kang, D., Zhang, W., & Zhou, G. (2019). Quality changes of pork during frozen storage: comparison of immersion solution freezing and air blast freezing. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 109–118. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14257>
- Jia, C., Huang, W., Wu, C., Zhong, J., Rayas-Duarte, P., & Guo, C. (2012). Frozen Bread Dough Properties Modified by Thermostable Ice Structuring Proteins Extract from Chinese Privet (*Ligustrum vulgare*) Leaves. *Cereal Chemistry Journal*, 89(3), 162–167. <https://doi.org/10.1094/cchem-11-11-0136>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O’Donnell, C. P. (2015). Improved thermal processing for food texture modification. *Modifying Food Texture*, 1, 115–131. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-333-1.00006-1>
- Kaleda, A., Tsanev, R., Klesment, T., Vilu, R., & Laos, K. (2018). Ice cream structure modification by ice-binding proteins. *Food Chemistry*, 246, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.152>
- Kawahara, H. (2017). Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins. *Springer EBooks*, 237–257. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_11
- Laos, K. (n.d.). *TOIDUFÜÜSIKA JA STRUKTUUR: Laboratoorsed tööd*.
- Levy, F. L. (2007). Enthalpy and specific heat of meat and fish in the freezing range. *International Journal of Food Science & Technology*, 14(6), 549–560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb00901.x>
- Li, X., Trinh, K. Y., & Hew, C. L. (1991). Expression and characterization of an active and thermally more stable recombinant antifreeze polypeptide from ocean pout, *Macrozoarces americanus*, in *Escherichia coli* improved expression by the modification of the secondary structure of the mRNA. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(8), 995–1002. <https://doi.org/10.1093/protein/4.8.995>
- Liu, M., Liang, Y., Wang, Y., Zhang, H., Wu, G., Wang, L., ... Qi, X. (2018). Effects of recombinant carrot antifreeze protein from *Pichia pastoris* GS115 on the physicochemical properties of hydrated gluten during freeze-thawed cycles. *Journal of Cereal Science*, 83, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.016>
- Liu, M., Liang, Y., Zhang, H., Wu, G., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2018). Production of a recombinant carrot antifreeze protein by *Pichia pastoris* GS115 and its cryoprotective effects on frozen dough properties and bread quality. *LWT*, 96, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.074>
- Mangiagalli, M., Brocca, S., Orlando, M., & Lotti, M. (2020). The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins. *New Biotechnology*, 55, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.003>
- Marshall, C. B., Fletcher, G. L., & Davies, P. L. (2004). Hyperactive antifreeze protein in a fish. *Nature*, 429(6988), 153–153. <https://doi.org/10.1038/429153a>

- Neri, L., Faieta, M., Di Mattia, C., Sacchetti, G., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2020). Antioxidant Activity in Frozen Plant Foods: Effect of Cryoprotectants, Freezing Process and Frozen Storage. *Foods*, *9*(12), 1886. <https://doi.org/10.3390/foods9121886>
- Nguyen, C. T., Yuan, M., Yu, J. S., Ye, T., Cao, H., & Xu, F. (2018). Isolation of ice structuring collagen peptide by ice affinity adsorption, its ice-binding mechanism and breadmaking performance in frozen dough. *Journal of Food Biochemistry*, *42*(3), e12506. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12506>
- Olijve, L. L. C., Meister, K., DeVries, A. L., Duman, J. G., Guo, S., Bakker, H. J., & Voets, I. K. (2016). Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(14), 3740–3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524109113>
- Oude Vrielink, A. S., Aloï, A., Olijve, L. L. C., & Voets, I. K. (2016). Interaction of ice binding proteins with ice, water and ions. *Biointerphases*, *11*(1), 018906. <https://doi.org/10.1116/1.4939462>
- Paraskevopoulou, A., Provatidou, E., Tsotsiou, D., & Kiosseoglou, V. (2010). Dough rheology and baking performance of wheat flour–lupin protein isolate blends. *Food Research International*, *43*(4), 1009–1016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.010>
- Pearce, R. S., & Fuller, M. P. (2001). Freezing of Barley Studied by Infrared Video Thermography. *Plant Physiology*, *125*(1), 227–240. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.227>
- Petzold, G., & Aguilera, J. M. (2009). Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods. *Food Biophysics*, *4*(4), 378–396. <https://doi.org/10.1007/s11483-009-9136-5>
- Poikalainen, V., Laikoja, K., Traksmaa, A., Laos, K., Lepasalu, L., Soidla, R., ... Tatar, V. (koostaja). (2017). Toiduainete tehnoloogia. In *dspace.emu.ee*. Audiomeister. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10492/3770>
- Rahman, A. T., Arai, T., Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Ohyama, Y., & Tsuda, S. (2019). Ice recrystallization is strongly inhibited when antifreeze proteins bind to multiple ice planes. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36546-2>
- Ramløv, H., & Dennis Steven Friis. (2020). Contents of Volume 2—Antifreeze Proteins: Biochemistry, Molecular Biology, and Application. *Springer EBooks*, 1–6. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41948-6_1
- Rodríguez-Sandoval, E., Fernández-Quintero, A., Sandoval-Aldana, A., & Cuvelier, G. (2008). Effect of processing conditions on the texture of reconstituted cassava dough. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *25*(4), 713–722. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322008000400008>
- Sharadanant, R., & Khan, K. (2003). Effect of Hydrophilic Gums on the Quality of Frozen Dough: II. Bread Characteristics. *Cereal Chemistry Journal*, *80*(6), 773–780. <https://doi.org/10.1094/cchem.2003.80.6.773>
- Shen, C. (2023). Quantification and analysis of proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, (2nd edition), 231–257. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91788-9.00002-8>
- Shi, K., Yu, H., Jin, J., & Lee, T.-C. (2013). Improvement to baking quality of frozen bread dough by novel zein-based ice nucleation films. *Journal of Cereal Science*, *57*(3), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.01.010>

- Singh, N., Jha, A., Chaudhary, A., & Upadhyay, A. (2012). Enhancement of the functionality of bread by incorporation of Shatavari (*Asparagus racemosus*). *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2038–2045. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0731-y>
- United Nations. (2024). *Food Waste Index Report 2024. Think Eat Save: Tracking Progress to Halve*. Retrieved from <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/45230>
- Wang, P., Jin, Z., & Xu, X. (2015). Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage – A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.005>
- Zhang, C., Zhang, H., Wang, L., & Guo, X. (2008). Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1029–1036. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.07.010>
- Zhang, W., & Laursen, R. A. (1998). Structure-Function Relationships in a Type I Antifreeze Polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34806–34812. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34806>
- Zhao, A., Shi, P., Yang, R., Gu, Z., Jiang, D., & Wang, P. (2022). Isolation of novel wheat bran antifreeze polysaccharides and the cryoprotective effect on frozen dough quality. *Food Hydrocolloids*, 125, 107446. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107446>

Lisad

Lisa 1. Sensorse analüüsi hinnanguleht

Name:

Date:

SENSORY ANALYSIS

Scale: 0...10

APPEARANCE

Color of the inside

Assess the color of the inside of the bread according to the scale, light- dark.

- Reference = 5

175	728	027

Porosity

Assess the porosity on the scale, dense – porous.

- Reference= 7

175	728	027

AROMA

Intensity of aroma

Characteristic wheat bread aroma, low intensity – high intensity.

- Reference= 7

175	728	027

Sour aroma

Intensity of the sour aroma, low intensity – high intensity.

- Reference= 5

175	728	027

Yeast aroma

Intensity of the yeast aroma, low intensity – high intensity.

- Reference= 3

175	728	027

STRUCTURE**Recovery**

Recovery of the bread on the scale, no recovery – fast recovery; assess 5 sec after applying pressure on the bread.

- Reference= 8

175	728	027

Crumbling

Crumbling of the bread on the scale, no crumbling – lots of crumbling; assess the number of particles that fall out after tearing the bread.

- Reference= 2

175	728	027

Softness

Bite through the soft inside of the bread and assess the force needed; scale hard – soft.

- Reference= 8

175	728	027

Adhesiveness

Assess the adherence of the bread by chewing a 1.5x1.5 cm piece of bread 5 times and feeling how much of the bread gets stuck on the teeth; scale low adherence – high adherence

- Reference= 3

175	728	027

Moisture

Assess the moistness of the bread; scale dry – moist.

- Reference= 5

175	728	027

TASTE

Intensity of taste

Characteristic wheat bread taste, low intensity – high intensity.

- Reference= 6

175	728	027

Sour taste

Intensity of the sour taste, low intensity – high intensity.

- Reference= 4

175	728	027

Bitter taste

Intensity of the bitter taste, low intensity – high intensity.

- Reference= 2

175	728	027

Salty taste

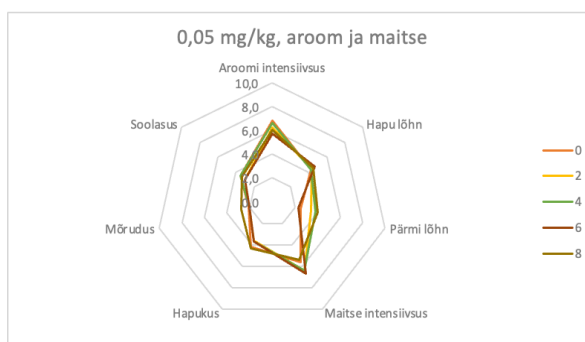
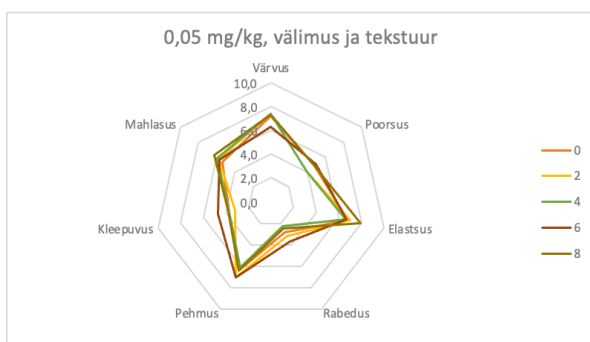
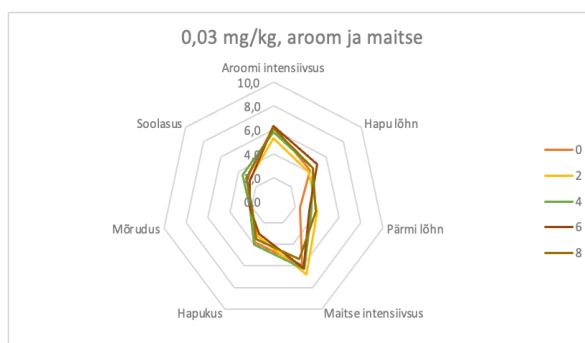
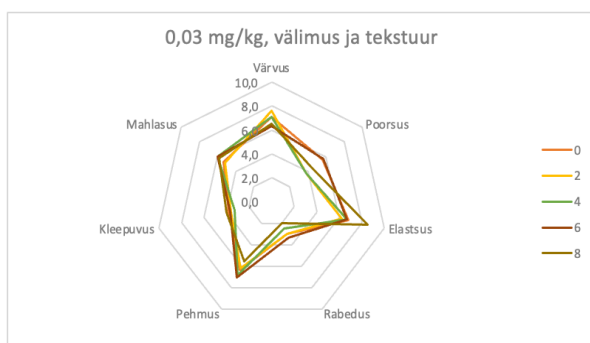
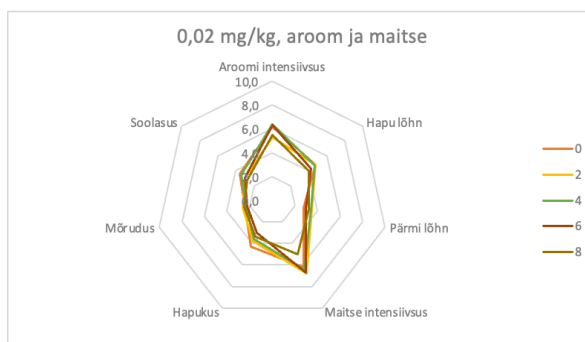
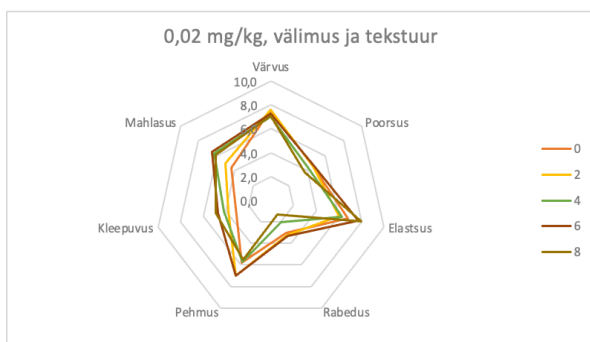
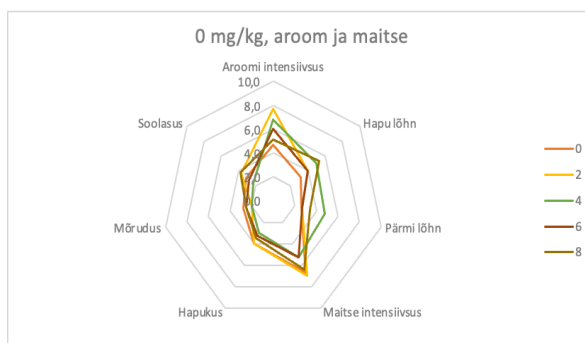
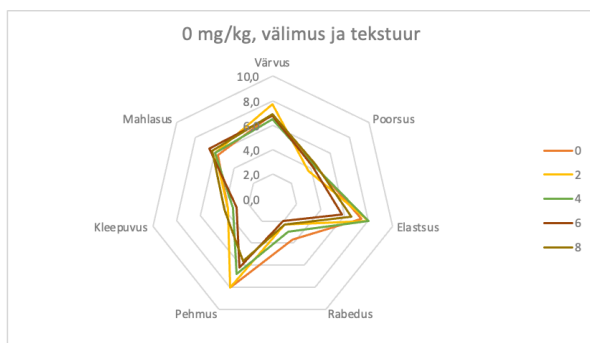
Intensity of the salty taste, low intensity – high intensity.

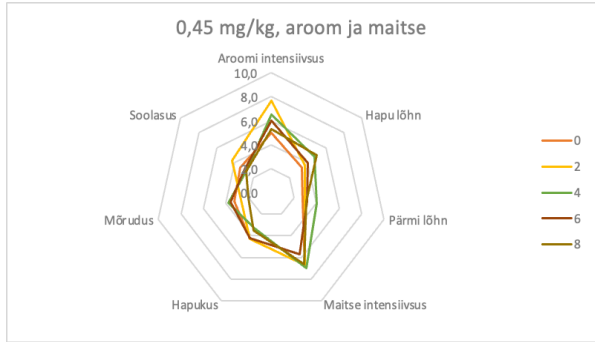
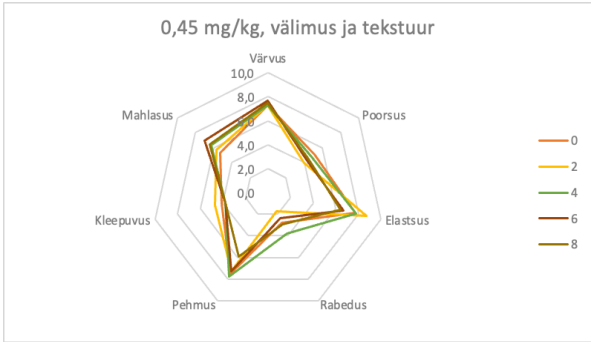
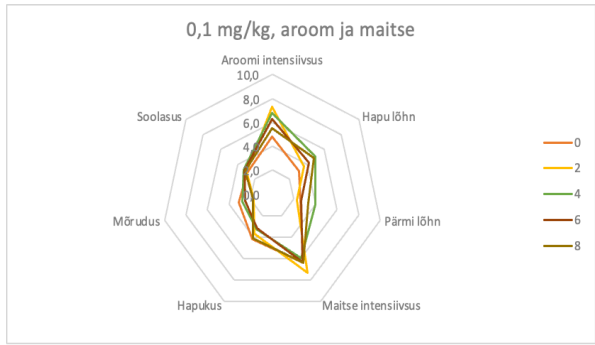
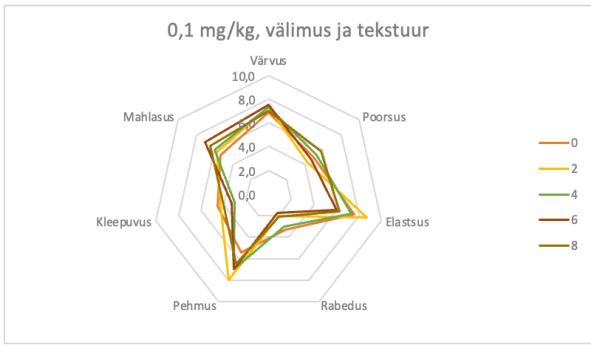
- Reference= 3

175	728	027

Additional comments (regarding off-flavors or any other distinguishable differences between samples):

Lisa 2. Sensoorse hindamise tulemused





Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadi Karro

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Jääga seonduvate valkude mõju külmutatud täistera nisujahust taigna ja saia omadustele”, mille juhendaja on doktorant-nooremteadur Önnela Luhila,

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

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

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

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

____20.05.2024____ (kuupäev)

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