

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

Keemia- ja materjalitehnoloogia osakond

Toiduainete instituut

**VALGU, LAKTOOSI KONTSEENTRATSIOONI JA
TEMPERATUURI MÕJU LAKTOOSI
KRISTALLISEERUMISELE JÄÄTISE
MUDELLAHUSTEST**

Magistritöö

Kristi Hüüdma

Toidutehnika ja tootearendus
KATM02/11

2015

TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Faculty of Chemical and Materials Technology

Department of Food Processing

**INFLUENCE OF PROTEIN, LACTOSE
CONCENTRATION AND TEMPERATURE ON
LACTOSE CRYSTALLIZATION IN ICE CREAM
MODEL SOLUTIONS**

Master's thesis

Kristi Hüdma

Food technology and product development
KATM02/11

2015

Autorideklaratsioon

Deklareerin, et käesolev magistritöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud või (avaldamata tööde korral) toodud autorlus välja põhitekstis.

Autor: Kristi Hүүdma

.....

(allkiri ja kuupäev)

Üliõpilase kood:

Töö vastab kehtivatele nõuetele:

Juhendaja: Katrin Laos, TTÜ, Toiduainete instituut, dotsent

.....

Kaasjuhendaja: Kristi Kõrge, AS Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia
Arenduskeskus, projektijuht

.....

Kaitsmisele lubatud "....." 201.....a.

TTÜ, professor Raivo Vokk

SISUKORD

SISUKORD	4
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Jäätise koostis ja struktuur	8
1.1.1 Liivasus	8
1.1.2 Liivasuse teket mõjutavad tegurid	9
1.2 Laktoos	11
1.3 Laktoosi kristalliseerumine	13
1.3.1 Üleküllastatuse ja temperatuuri mõju kristalliseerumisele	14
1.3.2 Laktoosikristallide kasvukiirust mõjutavad tegurid	16
1.3.3 Laktoosikristallide morfoloogia	18
1.3.4 Piimavalgud ja laktoosi kristalliseerumine	20
1.4 Meetodeid laktoosi kristalliseerumise uurimiseks	24
2 EKSPERIMENTAALOSA	26
2.1 Kasutatud materjalid	26
2.2 Meetodid	26
2.2.1 Jäätise mudelsegude valmistamine	26
2.2.2 Laktoosikristallide mikroskoopiline analüüs	30
2.2.3 Laktoosikristallide suuruse määramine	30
3 TULEMUSED JA ARUTELU	31
3.1 Pikaajaline katse -20 °C juures	31
3.2 Kiirmeetod	34
3.2.1 Paralleelkatsete kokkulangevus	39
3.3 Järeldused	41
3.3.1 Valgu mõju laktoosi kristalliseerumisele	41

3.3.2 Laktoosi kontsentratsiooni ja säilitustemperatuuri mõju.....	42
3.3.3 Analüüsi meetodika.....	43
4 KOKKUVÕTE.....	45
ABSTRACT	47
KASUTATUD KIRJANDUS	49

SISSEJUHATUS

Laktoosi kristalliseerumisel võib piimasuhkrut sisaldavates toidutoodetes esineda sensoorne defekt. Seda põhjustab tajutava suurusega laktoosikristallide esinemine toidus, tingides ebameeldiva teralise suutunnetuse. Külmutatud toodetes nagu jäätis toimub temperatuuri langetamisel segus sisalduva vee jäätumine. Sellest tulenevalt veeslahustuvad komponendid külmkontsentreeruvad, põhjustades seerumfaasi üleküllastumise laktoosi suhtes. Jäätise puhul on aga tegu mitmekomponentse süsteemiga, selle valmistamine hõlmab mitmeid etappe erinevatel temperatuuridel ning jäätise säilitamisperiood on võrdlemisi pikk. Seega võib laktoosi kristalliseerumise prognoosimine ja mõjutegurite uurimine jäätises osutada võrdlemisi keerukaks.

Kristalliseerumise uurimiseks toiduainetes on mitmeid analüüsimeetodeid, kuid tõhusaim näib olevat mikroskopeerimine. Suure eelisena võimaldab mikroskoop kristallide esinemise varakult tuvastada. Digikaameraga varustatud mikroskoop ning sobiv tarkvara võimaldavad proovis toimuvaid muutusi reaalsajas jälgida ning kristalliseerumisprotsessi eri etappe ka piltidena jäädvustada. Tänu sellele on võimalik välja selgitada iseloomulikke parameetreid nagu kristallide kuju või kasvukiirus.

Jäätiste puhul oleks süsteemi võimalikult tõepäraseks kirjeldamiseks kohane analüüsi teostamine madalal temperatuuril. Termoaluse abil on võimalik mikroskopeerimise vältel proovi sulamist vältida, kuid seejuures on praktilistel rakendustel suureks takistuseks protsesside väga aeglane toimumine. Seetõttu saavutatakse oluline aja kokkuhoid jäätiste kvaliteedianalüüsil, kui sarnane protsess oleks võimalik esile kutsuda kõrgemal temperatuuril lühema aja jooksul ning seostada tulemused jäätise säilitustemperatuuridel toimuva kristalliseerumisega.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli laktoosi kontsentratsiooni, säilitustemperatuuri ning valguallika mõju uurimine laktoosi kristalliseerumisele jäätise mudelsegudest. Kristallide kindlaks tegemisel ja analüüsimisel võeti aluseks kirjanduses kirjeldatud meetod, mille käigus uuriti digikaameraga varustatud mikroskoobi abil laktoosi kristalliseerumist vesilahustest. Seega püüti käesolevas töös rakendada vesilahuste puhul efektiivset meetodikat keerulisema

segu analüüsil ning uurida ühtlasi jäätiseseegade puhul relevantsete parameetrite mõju laktoosi kristalliseerumisele.

Eelnevast lähtuvalt püstitati töö eesmärgid:

- uurida 12 kuu vältel laktoosi kristalliseerumist jäätise mudellahustes, säilitades kolme erineva laktoosikontsentratsiooniga lahuseid -20 °C juures
- uurida laktoosi kristalliseerumist kontsentreeritud mudellahustest, säilitades kolme erineva laktoosikontsentratsiooniga lahuseid toatemperatuuril ja 5 °C juures (kiirmeetod)
- koostada kristalliseerumiskõverad ning analüüsida kiirmeetodi sobivust -20 °C juures toimuvate kristalliseerumisprotsesside kirjeldamiseks
- analüüsida laktoosi kontsentratsiooni, säilitustemperatuuri ja valguallika mõju laktoosi kristalliseerumisele

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Jäätise koostis ja struktuur

Jäätis on keeruline mitmekomponendiline süsteem, sisaldades samaaegselt mitut faasi, mis kõik avaldavad mõju toote kvaliteedile ja omadustele. Jäätisesegu koostisosad on vesi, rasv, piima rasvata kuivained (kaseiinmitsellid, vadakuvalgud, laktoos ja piimasoolad), suhkrud (sahharoos ja osaliselt hüdrolyüsunud tärklis, sealhulgas glükoos, maltoos ja kõrgemad sahhariidid), stabilisaatorid ja emulgaatorid. Dünaamilisel külmutamisel (friseerimisel) lisatakse ka õhk (Goff, Hartel, 2013).

Jäätisesegu külmutamisel vesi külmub jääkristallideks, suhkrud ja stabilisaatorid aga kontsentreeruvad külmumata seerumfaasis. Dünaamilise külmutamise järel on külmunud, olenevalt segu koostisest, ligi 50% veest. Järgneval kalestamisel külmunud vee hulk suureneb, kuni jäätunud on 75-80% veest. Seega ka väga madalate säilitustemperatuuride juures ei ole kogu vesi jäätises külmunud. Külmumata veefaas ehk seerum sisaldab lahustunud suhkruid ja soolasid ning veefaasi valke ja stabilisaatoreid. Tüüpilise jäätisesegu puhul on seerumi klaasisiirdetemperatuur alla $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, seega tavapäraste säilitustingimuste juures ei ole seerumfaas klaasjas olekus (Goff, Hartel, 2013).

Jäätise maitset ja tekstuuri mõjutavad suurel määral piima rasvata kuivained. Kui jäätisesegu valmistamisel kasutatakse koort, piima või lõssi, sisaldub nendes koostises juba teatud määral piima rasvata kuivaineid. Üldiselt ei ole nende hulk aga piisav, et saavutada vajaminev valkude funktsionaalne toime ega ettenähtud kuivaine sisaldus jäätises. Seega sisaldavad jäätisesegud üldjuhul täiendavat piima rasvata kuivaine allikat, enamasti kontsentreeritud või kuivatatud piimaprodukti kujul (Goff, Hartel, 2013). Valkude funktsionaalsus avaldub rasva- ja õhustruktuuride puhul piirpindadele adsorbeerudes. Külmumata faasis aga parandavad kaseiini mitsellid ning vadakuvalgud jäätise struktuuri ja suurendavad viskoossust. Lisaks aitavad valgud kaasa vahu moodustumisele ning pärsivad toote säilitamisel jää- ja laktoosikristallide kasvu (Morr, 1985).

1.1.1 Liivasus

Jäätise puhul on üks ebameeldivamaid defekte liivasus. Liivasus on kare, teraline suutunnetus, mida põhjustab laktoosi kristalliseerumine jäätise seerumfaasis. Jäätisesegus on

laktoosisisaldus tavaliselt vähem kui 6-7%, kuid piirsisaldus liivasuse tekkimiseks oleneb suuresti kasutatavast stabilisaatorist. (Goff, Hartel, 2013). Jäätises jääkristallide tekkimisel lahustunud aine üha kontsentreerub, kuna lahusti ehk vedelas olekus vee ruumala väheneb külmumise tõttu. Selle tagajärjel friseerimise temperatuuril $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures laktoosi kontsentratsioon kahekordistub, -10 kuni $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures aga suureneb koguni 3-5 korda (McSweeney, Fox, 2009).

Sensoorsed omadused olenevad muuhulgas osakeste suurusest. Kristallilistel koostiosadel toidus on kriitiline tuvastamislävi. Selle kriitilise suuruse ületamisel on kristallid suus tuntavad ning toidul on kare tekstuur. Kriitilise tuvastamislävi väärtus oleneb kristallide omadustest, eeskätt kui kiiresti need suus sulavad või lahustuvad. Kiiresti sulavad kristallid, näiteks jääkristallid, võivad olla kuni $50\text{ }\mu\text{m}$ suurused, enne kui on sensoorselt tajutavad. Seevastu kristallid, mis suus aeglaselt sulavad, nagu laktoosikristallid liivases jäätises, on suus tuvastatavad juba $15\text{ }\mu\text{m}$ juures (Hartel, 2008). Seejuures on leitud, et liivasus ei olene kristalliseerunud laktoosi kvantiteedist, vaid kristallide suurusest. Liivases jäätises võib kristalliseerunud laktoosi hulk olla väga väike võrreldes jäätisega, kus liivasust ei esine (Nickerson, 1956).

1.1.2 Liivasuse teket mõjutavad tegurid

Laktoos jäätises pärineb piima rasvata kuivainetest, mistõttu nende koguse suurendamine jäätisesegus toob eeldatavasti kaasa ulatuslikuma ja kiirema laktoosi kristalliseerumise tootes. Võib juhtuda, et laktoos on juba ühes või mitmes jäätisesegu algkomponendis kristalliseerunud kujul, kuid pastöriseerimise käigus saavutatakse siiski laktoosi täielik lahustumine (Whitaker, 1933).

Oluline tegur liivasuse tekkimiseks on temperatuuri kõikumised või “termošokid”. Jäätise puhul esinevad temperatuuri kõikumised erinevatel põhjustel säilitamise ja tarneahela käigus (Hartel, 1998). Temperatuuri kõikumisi esineb näiteks ebapiisavalt jahutatud transpordivahendites, aeglasel käitlemisel, termostaatide kehval seadistamisel ja muudel juhtudel (Whitaker, 1933).

Liivasuse tekkimist soodustab ka inertsete kristallialgete esinemine segus. Lisandid nagu pähkliid või puuviljad võivad sisaldada tolmuosakesi, mis toimivad laktoosi kristalliseerumisel

katalüsaatoritena ning seega suurendavad liivasuse tekke tõenäosust (Hartel, 1998). Pähkliükikeste mõju liivasuse kujunemisel põhjendatakse ka asjaoluga, et need seovad niiskust. Seeläbi tekib pähkliosaakese läheduses külmumata faasi täiendav kontsentreerumine, soodustades laktoosi kristalliseerumist (Whitaker, 1933).

Kalestamisel on liivasuse vältimiseks oluline võimalikult kiiresti toote temperatuuri langetamine temperatuurile $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ või alla selle. Seeläbi on võimalik kristalliseerumise tõenäosust vähendada, kuna langeb difusioonikiirus külmumata faasis. Kalestustemperatuuri varieerimisel leiti, et tootes saavutatakse sisetemperatuur $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ligikaudu tunni jooksul, kui kalestamine viia läbi alkoholivannis temperatuuril $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 tunni jooksul kui kalestamine viidi läbi kalestamisruumis $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures ning 28 tunni jooksul kui kalestamine viidi läbi kalestamisruumis, asetades toote eraldi pappkasti. Tootmise käigus paigutatakse pakendatud tooted sageli ruumi kokkuhoiu ja käitlemislihtsuse eesmärgil võimalikult tihedalt laotuna, mille tagajärjel aga toote sisetemperatuuri langus on aeglasem ning seeläbi on oht soodustada liivasuse teket (Whitaker, 1933).

Liivasuse ennetamise meetodina kasutatakse laktoosi seemnekristallide lisamist friseerimisel või vahetult enne. Seeläbi fikseeritakse segus üleküllastunud laktoos arvukate pisikeste kristallidena. Tekkinud kristallide suurus ei ületa $10\text{ }\mu\text{m}$. Kristallitsentrite spontaansel moodustumisel friseerimisel või kalestamisel ei moodustu piisavalt arvukalt kristallitsentreid, mistõttu toode muutub kiiremini liivaseks. Seemnekristallide toimetel tekib aga väga arvukalt tsentreid ning seeläbi ei ole tõenäoline nende kasv sensoorselt tuntava suurusega kristallideks (Nickerson, 1954).

Seemnekristallide kasutamine on levinud kondenspiima valmistamisel, et moodustuksid arvukad kristallitsentrid, kuid ei tekiks suuri, suus tuntavaid laktoosikristalle. Jäätise uurimisel on aga katsete tulemusel selgunud, et ebaadekvaatne seemnekristallide lisamine, kui kristallialgeid on liiga vähe, hoopis kiirendab liivasuse teket. Liivasuse avaldumine ei olene seejuures ainult kristallide suurusest, vaid ka arvukusest. Suhteliselt väiksema arvu kristallide korral võivad nende mõõtmed ulatuda $30\text{ }\mu\text{m}$ -ni, põhjustamata liivasust, samas kui arvukate kristallide esinemisel tootes peab nende suurus defekti vältimiseks jääma alla $15\text{ }\mu\text{m}$. Efektiivselt lisatud seemnekristallidega jäätistes katseperioodi vältel liivasust ei esinenudki, ka kõrge kuivaine sisaldusega jäätisesegude puhul mitte (Nickerson, 1954).

Kõrgema kuivaine sisaldusega jäätise valmistamisel on kasutatud meetodit, kus liivasuse vältimise eesmärgil lisatakse täiendav piimapulber friseerimisel. Algselt arvati, et piimapulbri koostises leiduv laktoos sel juhul ei lahustu, kuna friseerimisel osaliselt külmutatud segu on juba laktoosi suhtes küllastunud. Hilisemate katsete käigus selgus, et laktoosi kristalliseerumine toimus sama kiiresti nii jäätises, kuhu oli lisatud seemnekristalle, kui ka jäätises, millele lisati piimapulbrit (Nickerson, 1957).

Piimapulbris esineb laktoos mittekristallilises ehk klaasjas olekus. Katsetes leiti, et pulbri kokkupuutel küllastatud laktoosilahusega ei ole klaasjas olek stabiilne ning toimub ulatuslik kristalliseerumine. Sama täheldati pulbri kontakti viimisel kalestatud jäätisega ning pulbris oli järgmisel päeval niiskuse sidumise mõjul tekkinud arvukalt väikeseid kristalle. Katsete põhjal selgus, et piimapulbri lisamise toime on põhimõttelt tüüpiline seemnekristallide lisamise mehhanism, mille puhul soodustatakse arvukate laktoosikristallide teket (Nickerson, 1957).

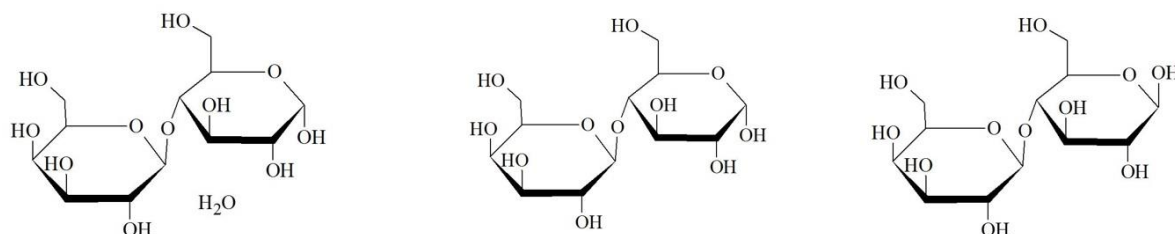
1962. aastal täheldas Nickerson, et tööstuslikult toodetud jäätistes liivasuse defekti praktiliselt enam ei esine. Ilmseid põhjuseid, mis probleemi elimineerida võimaldasid aga ei olnud avaldatud. Küll aga oli toimunud üldine kvaliteedi, tehnoloogia ja töötlemisseadmete areng. Selguse saamiseks uuriti erinevate tegurite mõju. Kristalliseerumist aeglustab märgatavalt madalamal temperatuuril säilitamine. Seevastu želatiini ja emulgaatorite kasutamine liivasuse vältimisel märgatavat efekti ei andnud (Nickerson, 1962).

Stabilisaatorite mõju uurimisel leiti, et nende olemasolul oli kristallitsentrite moodustumine aeglasem ning neid moodustus vähem. Küll aga toimus kristalliseerumine tavapärase kiirusega, kui oli kasutatud seemnekristalle. Uuritud stabilisaatorid olid merelise või taimse päritoluga kummide baasil. Seevastu ka kontrollproovid, mis ei sisaldanud stabilisaatorit, ei muutunud katseperioodi vältel liivaseks. Selgeid põhjusi selleks ei ole teada (Nickerson, 1962).

1.2 Laktoos

Laktoos on disahhariid D-glükoosi- ning D-galaktoosimolekulist, mis on omavahel seotud β -1,4-glükosiidsideme kaudu. Süstemaatiline nimetus on β -O-D-galaktopüranosüül-(1-4)- α -D-glükopüranos (α-laktoos) või β -O-D-galaktopüranosüül-(1-4)- β -D-glükopüranos (β-laktoos). Laktoosil on kaks isomeeri vormi, α- ja β-laktoos, mis erinevad glükoosi C-1 hüdroksüülrühma steerilise konfiguratsiooni poolest (Johnson, Conforti, 2003). Kristalliline laktoos esineb kolme

vormina: α -laktoos monohüdraat, $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, α -laktoos anhüdriid, $C_{12}H_{22}O_{11}$ ning β -laktoos anhüdriid, $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Goff & Hartel, 2013). Molekulide struktuur on esitatud joonisel 1. Toatemperatuuril on laktoosilahuste magusus ligi 20% sahharoosi omast (Gänzle *et al.*, 2008).



Joonis 1. Laktoosimolekulide struktuur.

Vasakult paremale: α -laktoos monohüdraat, α -laktoos anhüdriid ja β -laktoos anhüdriid.

α -laktoosi kristalle on võimalik vesilahustest eraldada monohüdraadina, mille sulamispunkt on 201,6 °C. Peamised kristallikujud on olenevalt kristalliseerumise tingimustest prismad, püramiidid või tomahoogid. Kristallid on kõvad ja raskesti lahustuvad (Gänzle *et al.*, 2008).

α -laktoosi anomeer on β -laktoos, mis ei sisalda veemolekule ning mida nimetatakse seega ka β -anhüdriidiks, sulamispunkt on 252,2 °C. β -anhüdridi kristallid, mis on magusamad ja oluliselt kergemini lahustuvad kui α -hüdraat, esinevad tavaliselt vesilahustest kristalliseerituna ebahühtlaste teemantitena ning alkoholi baasil lahustest kristalliseerituna nõelataoliste prismadena (Gänzle *et al.*, 2008).

Vesilahustes on α - ja β -laktoosi sisaldused tasakaalus. Olenemata lahuse valmistamiseks kasutatud vormist toimub optiline rotatsioon, mille tulemusel saavutatakse tasakaaluolek, kus lahus sisaldab 37,3% α - ja 62,75% β -laktoosi. Eri vormide vahekord tasakaaluolekus on vahel vähesel määral temperatuurist, ent ei olene pH-st. Mutarotatsiooni kiirus aga on tugevalt nii temperatuurist kui pH-st, samuti teiste suhkrute ja soolade olemasolust. Madalatel temperatuuridel on mutarotatsiooni kiirus madal, kuid kasvab 2,8 korda iga 10 °C temperatuuritõusu kohta, toimudes 75 °C juures pea koheselt (Gänzle *et al.*, 2008). Kirjanduse andmetel kestab näiteks lahjade lahuste puhul (5g laktoos / 100mL vesi) mutarotatsiooni tasakaalu saabumine olenevalt temperatuurist vahemikus 6,5 h (19 °C juures) kuni 1 h (52 °C juures), olles tugevasti temperatuur-sõltuv (Raghavan *et al.*, 2000).

Temperatuurivahemiku 25-35 °C puhul on leitud, et sahharoos aeglustab tugevalt laktoosi mutarotatsiooni kiirust, kuid seda sahharoosi sisaldustel 40% ja rohkem. Suurema kontsentratsiooni (62% sahharoosi) puhul, nagu kondenspiimas, aga sahharoosi toimel laktoosi lahustuvus väheneb ning mutarotatsioon toimub väga aeglaselt (Patel, Nickerson, 1970). Kirjanduse andmete kohaselt sahharoosi olemasolul lahuses laktoosi lahustuvus väheneb tugevalt. Sahharoosi lahustuvust vähendab laktoos vaid vähesel määral. Laktoosisisalduse proportsionaalse suurendamise korral tekivad aga mõlema aine puhul väiksemad kristallid ning saadav kristalliline mass on pehmem ja siledam (Nickerson, 1976).

1.3 Laktoosi kristalliseerumine

Kristalliseerumine on mitmeastmeline protsess. Esmalt toimub nukleatsioon ehk kristallialgete teke, järgneb kasvufaas, mille käigus moodustub kristallistuva materjali põhimass. Viimane faas on rekristalliseerumine. Kristalliseerumine ei ole aga pelgalt struktuuriline muutus. Segude puhul eeldab see ühtlasi molekulide ulatuslikku ruumilist ümberpaiknemist süsteemis, kuna moodustuva kristalli koostis on väga erinev süsteemi keskmisest molekulaarsest koostisest (Hartel, 1998).

β -laktoos on oluliselt suurema lahustuvusega toatemperatuuril, α -laktoos aga temperatuuridel üle 93,5 °C (Gänzle *et al.*, 2008). Liivasesst jäätisest eraldatud kristallide analüüsil on kindlaks tehtud, et liivane materjal koosneb α -laktoosi kristallidest (Zoller, Williams, 1921).

Laktoosi lahustuvus on üldiselt teiste disahhariididega võrreldes madal, kuid temperatuuri mõju lahustuvusele on suurem (Gänzle *et al.*, 2008). Laktoosi lahustuvus 10 °C juures on ligi 17g / 100g vee kohta. Sahharoosi lahustuvus 12,2 °C juures on 198,6g / 100g vee kohta. Sahharoosi puhul on väga keeruline tugevalt üleküllastatud allajahutatud lahuses kristalliseerumist indutseerida. Selle saavutamisel kulub aga nädalaid või isegi kuid enne, kui kristallid märgatavalt suurenevad. Seda eriti juhul, kui lahus sisaldab ka kolloidset materjali nagu pektiin või valgud. Laktoosi puhul on tema oluliselt madalama lahustuvuse tõttu aga sahharoosiga võrreldes oluliselt keerulisem tugevalt üleküllastatud lahuseid valmistada. Väga kontsentreeritud laktoosilahuste puhul esineb tihti kristalliseerumine isegi juhul kui lisatakse ühendeid, mis mitmete teiste lahuste korral võimaldavad kristalliseerumist vältida (Zoller, Williams, 1921). Hilisematel andmetel on aga ka laktoosilahuseid võimalik tugevalt üleküllastada, enne kui esineb spontaanne kristalliseerumine (Gänzle *et al.*, 2008).

1.3.1 Üleküllastatuse ja temperatuuri mõju kristalliseerumisele

Küllastatud laktoosilahuse edasisel kontsentreerimisel või jahutamisel oleneb kristalliseerumise toimumine siiski üleküllastatuse astmest. Teadaolevalt esineb kolm eri astet: metastabiilne, labiilne ja klaasjas (Whitaker, 1933).

Metastabiilne olek leiab aset koheselt küllastumispunkti ületamise järel. Normaalingimustel kristallide teket selles olekus ei toimu. Ulatuslikku kristalliseerumist ei toimu ka agitatsiooni, kristalliseemnete või muude kristalliseerumist indutseerivate mõjurite toimel. Metastabiilse ala piire on jäätises keeruline määrata jää moodustumise ja jäätisesegu ülejäänud komponentide võimaliku mõju tõttu (Whitaker, 1933).

Metastabiilses olekus laktoosilahuse kontsentratsiooni suurendamisel saabub labiilne olek. Üleküllastatud labiilses laktoosilahuses toimub spontaanne kristallituumade teke ning kristallide kiire kasv. Sellises olekus üleküllastatud lahuste puhul on kristallid tihti ebakorrapärase kujuga ning iseloomulik on kristalliklastrite moodustumine (Whitaker, 1933).

Tootmisprotsessi tehnoloogiliste parameetrite mõju uurimisel on leitud, et laktoosi kristalliseerumine toimub seda varem, mida kauem toimub jäätisesegu friseerimine ning mida madalam on selle vältel jahutamistemperatuur (vahemikus -4 kuni -6 °C). Agitatsiooni toime kristalliseerumiskiirusele oli suurim madalaimal katsetatud temperatuuril ehk -6 °C juures, mistõttu on põhjust arvata, et ligikaudu sel temperatuuril toimub segus laktoosi üleminek metastabiilsest labiilsesse alasse (Whitaker, 1933).

Kui üleküllastatud ja mitte-kristallistunud laktoosilahust veelgi kontsentreerida, toimub üleminek labiilsest alast klaasjasse olekusse, mida võib nimetada ka tahkeks lahuseks. Molekulaarne liikumine on sel puhul minimaalne ning difusiooni praktiliselt ei esine. Kuna puuduvad täpsed andmed madalatel temperatuuridel esineva külmumata vee hulga kohta jäätises, ei ole teada, kas laktoos seal klaasjas olekus esineb (Whitaker, 1933).

Jäätisesegu säilitatakse friseerimise eel temperatuuril 1,6 - 4 °C ning neil tingimustel peaks küllastumiseks lahuses sisalduma ligi 11% laktoosi. Seega peaks olema kogu laktoos lahustunud, kuna laktoosisisaldus külmutamata jäätisesegus üldjuhul 11%-ni ei küündi.

Friseerimise käigus külmub osa veest. Kuna jää moodustub ainult veest, siis vastavalt külmumata osa, mis sisaldab sahharoosi, laktoosi, soolasid ja muid komponente, kontsentreerub proportsionaalselt külmumise astmega. 0 °C juures on inter- ja ekstrapoleerimise andmete põhjal jäätisesegu külmumata osa laktoosi suhtes küllastunud. Temperatuuri edasise alanemisega kontsentratsioon ja seeläbi üleküllastatuse aste suureneb (Whitaker, 1933).

Kirjanduse andmetest selgub ka, et küllastunud sahharoosi lahustes on laktoosi lahustuvus oluliselt madalam. Lisaks toimub lahuse edasine kontsentreerumine külmumisel. Kuid temperatuuri langedes ja sahharoosi üleküllastuse astme kasvades suureneb drastiliselt ka viskoossus. Tulemusena väheneb märgatavalt laktoosi difusioonikiirus, pidurdades seega laktoosi kristalliseerumiskiirust (Whitaker, 1933).

Jäätise külmumata faas võib seega olla küll kontsentreeritud laktoosi ja vee eutektilisest punktist, kuid kineetiliste piirangute tõttu ei kristalliseeru laktoos sellistest külmutamisel kontsentreerunud lahustest koheselt. Jäätise madalatel säilitustemperatuuridel ning külmumata faasi kõrge viskoossuse juures ei ole laktoosimolekulid piisavalt mobiilsed, et kergesti kristalliseeruda. Antud juhul jääb üleküllastunud laktoosilahus seega metastabiilsesse olekusse, kuni miski kristalliseerumise indutseerib (Hartel, 1998).

Kiirel külmutamisel võib laktoos jäätises seega kontsentreeruda üleküllastatud olekusse nii, et kristalle ei teki (Decker *et al.*, 1939). Molekulide liikuvus külmumata faasis on väga madal. Temperatuuri tõus aga põhjustab difusioonikiiruse suurenemise ning viskoossuse vähenemise. Ühtlasi sulab temperatuuri tõustes osa jääkristallidest (Whitaker, 1933). Seega kui esinevad temperatuurikõikumised, näiteks toote säilitamisel või tarnimisel, võib esineda α -laktoosi kristalliseerumine jääkristallide sulamisest tingitud seerumfaasi lahjenemise ning viskoossuse vähenemise tagajärjel (Decker *et al.*, 1939).

Jäätises stabilisaatoritena kasutatavate polüsahhariidide uurimisel on leitud, et need pärsivad jääkristallide kasvu, kuna suurendavad viskoossust ja aeglustavad seeläbi molekulaarse difusiooni kiirust. Seega temperatuuri kõikumistest tingitud jää osalise sulamise korral ei õnnestu veemolekulidel rekristalliseerumisel nii kergesti olemasolevate jääkristallideni migreeruda, ehkki see on termodünaamiliselt soodsam protsess. Seeläbi välditakse jääkristallide kasvu (Goff *et al.*, 1993).

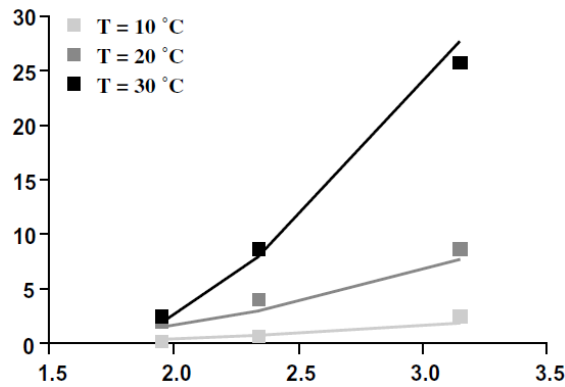
Temperatuuri kõikumised soodustavad ka laktoosi rekristalliseerumise protsesse. Rekristalliseerumisel toimub Ostwaldi vananemine ehk väiksemate kristallide kahanemine ja suuremate kristallide kasv, isomassi ümardumine ehk kristalli krobeliste servade muutumine siledaks ning lähestikku (mõni μm) paiknevate väiksemate kristallide ühinemine suuremaks kristalliks (Hartel, 1998).

Temperatuuri tõusul kõik olemasolevad kristallid sulavad pisut, kuid täielik lahustumine on tõenäolisem väikeste kristallide puhul. Kui temperatuur seejärel taas langeb, sadeneb lahustunud laktoos olemasolevatele tsentritele ehk suurematele kristallidele, mis temperatuuri tõustes ei lahustunud. Seega rekristalliseerumise protsessi käigus väikesed kristallid lahustuvad ning selle arvel toimub suuremate kristallide kasv (Whitaker, 1933).

1.3.2 Laktoosikristallide kasvukiirust mõjutavad tegurid

Nukleatsiooni kiiruse uurimisel on leitud, et üleküllastatuse suurendamine tõstab nukleatsiooni kiirust. Temperatuuri mõju ei ole nii ilmne. Täheledatai, et kasutades üleküllastuse väljendamiseks suhtelist väärtust, näib temperatuuri tõstmisel nukleatsiooni kiirus kasvavat. See efekt on aga tingitud laktoosi lahustuvuse ja temperatuuri sõltuvusest. Absoluutne üleküllastus väljendab aga erinevust lahuse kontsentratsiooni ja konkreetse temperatuuril aine lahustuvuse vahel. Absoluutse üleküllastuse väärtusi kasutades leiti, et nukleatsiooni kiirus praktiliselt ei sõltu temperatuurist. Temperatuuri efekti täheldati aga madalatel üleküllastuse astmetel, vähem kui 20 g α -laktoosi / 100 g vees (McLeod *et al.*, 2011).

Mikroskoopilisel analüüsil on täheldatud, et kõrgema temperatuuri ja üleküllastatuse juures on vaateväljas kristalliseerunud pindala suurem. Ühesuguse üleküllastatuse juures kristalliseerumise kiirus kasvas temperatuuri tõstmisel, seda põhjusel, et kõrgem temperatuur soodustab nukleatsiooni ning massiülekanne etappe. Sama temperatuuri puhul omakorda kristalliseerumise kiirus kasvas üleküllastatuse suurendamisel. Kristalliseerumise kiirus võib aga siiski väheneda väga kõrgete üleküllastuste või temperatuuride puhul, kuna potentsiaalselt väheneb molekulaarne mobiilsus. Eksperimentaalsete ja eeldatud kasvukiiruste sõltuvus üleküllastuse astmest eri temperatuuridel on esitatud joonisel 2 (Arellano *et al.*, 2004).



Joonis 2. α -laktoosi kasvukiiruse (mm/h) sõltuvus üleküllastatuse astmest eri temperatuuridel. Eksperimentaalsete andmete võrdlus arvutuslike tulemustega (Arellano *et al.*, 2004).

Lisaks on täheldatud, et sarnase kuju ja suurusega kristallid ei kasva samadel tingimustel ühesuguse kiirusega. Nähtus on tuntud kui kasvukiiruse dispersioon. Katsetulemustest on selgunud, et kiiruste dispersioon on seda laiem, mida kõrgem temperatuur ja üleküllastus. Seega laienemine on seda ulatuslikum, mida suurem on keskmine kasvukiirus. Seejuures on üleküllastuse mõju suurem kui temperatuuri mõju (Arellano *et al.*, 2004).

Üldjuhul üleküllastatuse suurendamisel kristallide kasvukiirus suureneb järsult (Gänzle *et al.*, 2008). Võrreldes anhüdriidsete kristallivormidega, tekib monohüdraadina kristalliseerumise korral paikne üleküllastatuse suurenemine kristalli vahetus läheduses, võrreldes lahuse keskmise üleküllastatusega. Mida kõrgem on lahuse üleküllastatus, seda suurem on suhteline paikne üleküllastatuse kasv. Seega peaks ka sellest aspektist lahuse üleküllastatuse suurenemisel kasvukineetika suurenema (Garnier *et al.*, 2002).

Uurides piima rasvata kuivaine sisalduse, kristallitsentrite olemasolu ning mutarotatsiooni kiiruse mõju laktoosi kristalliseerumisele leiti, et -23,3 °C juures ei olnud ükski neist teguritest kristalliseerumiskiirust määrav faktor. Järeldati, et sedavõrd madalal temperatuuril on limiteeriv tegur süsteemi kõrge viskoossus ja seeläbi molekulide piiratud migreerumine ja ümberorienteerumine. Seevastu -16,7 °C juures osutus limiteerivaks kristallitsentrite moodustumise etapp. Kui kristallitsentreid veel tekkinud ei ole, kulgeb kristalliseerumine siiski aeglaselt. -16,7 °C juures ja kõrgemal temperatuuril, juhul kui kristallitsentrid on tekkinud, saab limiteerivaks mutarotatsiooni kiirus. Leiti aga, et kõigi piima rasvata kuivaine sisalduste (10-18%) puhul oli mutarotatsiooni kiirus sama (Nickerson, 1956).

Jäätise kalestamise temperatuuridel on β -laktoosi konversioon α -laktoosiks väga aeglane.

Jäätisesegus on kaks vormi tasakaalus, kuna pastöriseerimise temperatuur kindlustab kiire konversiooni. Tasakaal püsib friseerimiseni, mil osa vett külmub ning segu muutub α -laktoosi suhtes üleküllastatuks. Kuna α -laktoosi sadenemine toimub madalatel temperatuuridel kiiremini kui β -laktoosi konversioon, on sellel pidurdav mõju laktoosi jätkuvale kristalliseerumisele. Temperatuuri tõustes konversiooni kiirus aga tõuseb ning rohkem α -laktoosi on lahuses, soodustades seeläbi kristalliseerumist (Whitaker, 1933).

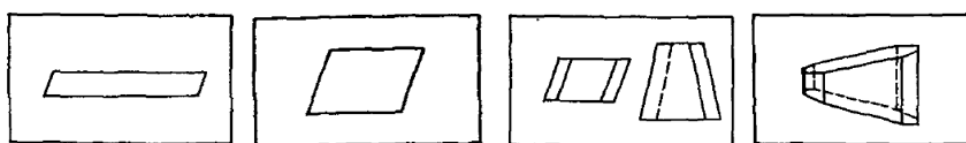
Vesilahuste uurimisel on leitud, et üleküllastuse astme suurendamisel kristallide kasv kiireneb, kuna lahuses on kaks vormi juba tasakaalus, mistõttu α -laktoosi sisaldus ei vähene konversiooni toimel. (Nickerson, Moore, 1974). α - ja β -vormi suhe ei sõltu teatud üleküllastatuse juures laktoosi kontsentratsioonist ning kui laktoosisisaldus on üle 60% massist, α -laktoosi suhteline hulk suureneb ning β -laktoosi suhteline hulk vastavalt väheneb. Kirjandusallikate põhjal üleküllastatuse suurenemisel on ebapuhtustel kristalliseerumisele üha väiksem mõju, võimaldades suuremate kristallide kasvu. Seega võib madalatel üleküllastustel olla väiksemate kristallide tekkepõhjuseks β -vorm, mis ebapuhtusena käitudes aeglustab kristallide kasvu ning toimib ka nukleatsiooni inhibiitorina (Garnier *et al.* 2002; Nickerson, Moore, 1974).

1.3.3 Laktoosikristallide morfoloogia

Kasvukiirus on kristalli eri tahkude puhul erinev, mõjutades kristalli kuju. Seejuures on kristallide moodustumisel kriitiline tegur molekuli integreerimine kristallipinnale (Gänzle *et al.*, 2008). α -laktoosi molekulide kokkupakkumine lahuses hõlmab keerulist vesiniksidemete võrgustikku. Iga α -laktoosi molekul osaleb 14 intermolekulaarse vesiniksideme moodustamises ning iga veemolekul on vesiniksidemete kaudu seotud 4 erineva α -laktoosi molekuliga (Garnier *et al.*, 2002).

Laktoosikristallide levinumad kujud on püramiidid, tomahook ja prisma. Olenevalt kristalliseerumistingimustest võivad need aga esineda ka mitmesuguste muude kujudena. Peamiselt oleneb see lahuse üleküllastusest. Suur üleküllastus tingib kiire kristalliseerumise ning moodustuvad nõeljad prismad. Üleküllastuse vähenemisel toimub kristalliseerumine vastavalt teemantikujuliste plaatidena, seejärel püramiidide ja tomahookidena ning viimaks täielikult välja kujunenud arvukate tahkudega kristallidena. Vesilahustes on enamik kristalle üldiselt tomahookid või püramiidid, kõrgematel kontsentratsioonidel aga piklikud kuubilaadsed, seejuures lahuse kõrgema algkontsentratsiooni puhul esineb suurem hulk piklikumaid kristalle (Gänzle *et al.*, 2008; Nickerson, Moore, 1974).

Herringtoni andmetel oleneb kristallide kuju eeskätt kristalliseerumise rõhust ehk nende kasvamise kiirusest. Kui kutsutakse esile piisavalt kiire kasv, moodustuvad ainult prismad. Kristalliseerumise rõhu vähenemisel tekivad üha lühemad ja laiemad prismad. Edasisel vähenemisel moodustuvad teemantikujulised plaadid, mis püramiidikujuliste kristallide puhul on põhjatahuks. Teemantikujulised kristallid on seega üleminek prismade ja püramiidide vahel. Püramiidid tekivad vähesema üleküllastusega lahustes. Lahjematel lahustes esinevad kristallid kolmnurga-taoliste plaatidena. Aeglase kristalliseerumise korral formuleeruvad neist edasi tomahookid (Herrington, 1934). Kristallide morfoloogia on illustreeritud joonisel 3.



Joonis 3. Laktosikristallide morfoloogia. Vasakult paremale: prisma, teemantikujuline plaat, püramiidid ning tomahook (Herrington, 1934).

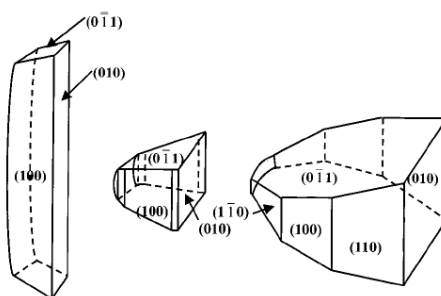
Tomahookid võivad üle minna prismadeks kui kristalliseerumist kiirendatakse ja vastupidi. Algselt kiirel kristalliseerumisel moodustunud prismad võivad protsessi aeglustumisel laieneda ning omandada tomahooki-taolise kuju (Herrington, 1934).

On leitud, et mida kõrgem on lahuse viskoossus, seda tõenäolisemalt esinevad kristallikujud, mis ei ole tomahookid (Williams, Peter, 1930). Sahharoos mõjutab kristallide morfoloogiat kaudselt. Sahharoosi olemasolu suurendab lahuse viskoossust ning vähendab laktoosi lahustuvust, mistõttu kristalliseerumise protsess on kiirem. Seega on täheldatud laktoosi kristalliseerumist peamiselt püramiididena, kui lahuses sisaldub ka sahharoosi (Herrington, 1934).

On täheldatud, et β -laktoosi mõju kristallide kasvule sõltub tekkiva α -laktoosi kristalli tüübist. Inhibeerides nõela- või prismakujuliste kristallide teket, on rohkem aega mutarotatsiooni kaudu α -laktoosi koguse vähendamiseks ning seeläbi väheneb ka kristalliseerumise rõhk ning moodustuvad enamlevinud α -laktoosi kristallikujud (Nickerson, Moore, 1974).

Hilisemates töödes seletatakse üksikute kristallide väga iseloomulikku tomahooki kuju vesilahuste puhul β -laktoosi molekulide spetsiifilise adsorptsiooniga kristalli suurimal tahul (Garnier *et al.*, 2002). Mutarotatsiooni tõttu toimub α -laktoosi nukleatsioon ja kasvamine

üldjuhul väga ebapuhtast lahusest, seda β -laktoosi olemasolu näol. Katsetulemustest selgus, et α -laktoos monohüdraadi kristallide tomahoogi kuju tuleneb β -laktoosi kasvu inhibeerivast toimest, kuna see kinnitub kindlatele kristallitahkudele. β -laktoosi kõrvaldamisel lahusest moodustusid peenikesed nõelataolised trapetsilaadsed kristallid. Joonisel 4 on illustreeritud α -laktoosi kristallikujud. Iseloomulik tomahoogi kuju on joonisel parempoolsem, seejuures spetsiifiline β -laktoosi adsorbeerumine toimub tomahoogi kujulise kristalli suurimal tahul (011) (Raghavan *et al.*, 2000).



Joonis 4. α -laktoosi kristallikujud erineva β -laktoosi sisalduse korral: <15%, 35% ja 60% (Raghavan *et al.*, 2000)

Hilisemates katsetes on leitud, et plaadikujulised kristallid on sisuliselt samuti tomahoogi kujulised, kuid osade tahkude kasv on väga palju aeglasem, mistõttu iseloomulik kuju ei ole selgelt esile tulnud. Erikujuliste kristallide olemasolu lahuses viitab üldjuhul erinevate ebapuhtuste lülitamisele kristallvõresse. Lisaks võivad tomahoogikujulised kristallid paikneda eri tahule toetudes, mistõttu mikroskoobi abil preparaadi üldpildi vaatlusel võib kuju olneda sellest, milline tahk on parasjagu mikroskoobi vaatevälja suunas (Arellano *et al.*, 2004).

1.3.4 Piimavalgud ja laktoosi kristalliseerumine

Valgud piimas liigituvad kaseiinideks ja vadakuvalkudeks. Kaseiinid moodustavad 75-80% valkude kogusisaldusest ning esinevad ainult piimas. Peamised kaseiinvalgud on α_{s1} -, α_{s2} -, β - ja κ -kaseiin. Kaseiinid esinevad piimas kolloidsete mitsellidena, diameetriga 50 kuni 500 nm, ja nende eraldamine on võimalik ultratsentrifuugimise teel. Mitsellidesse on seotud suur hulk kaltsiumi ja fosforit, aga ka muid mineraalaineid nagu magneesiumi ja tsitraate. Kaseiini mitsellid on kuumuse suhtes võrdlemisi stabiilsed. Vadakuvalgud on α -laktalbumiin, β -laktoglobuliin, seerumalbumiin, immunoglobuliinid ja mõned väiksemad valgud. Vadakuvalgud hakkavad kalgenduma ligikaudu 77 °C juures. Piimasuhkur ehk laktoos on piimas lahustunud kujul ning seeläbi peamine põhjus, miks piima külmumispunkt on madalam kui veel (Goff, Hartel, 2013).

Piima külmutamisel saavutatakse proteiinide täielik stabiilsus ligi $-29\text{ }^{\circ}\text{C}$ kraadi juures, mil pea kogu vesi on külmunud. Laktoos on neil tingimustel amorfses klaasjas olekus ning ei ole võimeline lahjendamiseta kristalliseeruma. Temperatuuril $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja kõrgemal on aga laktoosi kristalliseerumine võrdlemisi kiire ning esineb flokulatsioon. Üldiselt tingimused, mis külmutatud piimas soodustavad kristalliseerumist, kiirendavad ühtlasi valkude destabiliseerumist. Laktoosi kristalliseerumine mõjutab kolloidsete kaseinaatide stabiilsust. Mõju seisneb aga soola kontsentratsiooni muutustes külmumata faasis, mitte laktoosi otseses toimes mitsellstruktuuridele (Nickerson, 1976).

Kaseiini mitsellid on külmutatud piimatoodetes ebastabiilsed ning polümeriseeruvad järkjärgult, kui säilitustingimused võimaldavad laktoosi kristalliseerumist. Kaseiini mitsellid püsivad aga stabiilsed ning omavad külmutatud magustoitudes ja jäätises stabiliseerivat toimet, kui laktoosi kristalliseerumine hoitakse ära stabilisaatorite ja magusainete lisamise kaudu (Morr, 1985).

Jäätisesegus on valku tavaliselt 3-4%. Nagu eelnevalt mainitud, sisaldavad jäätisesegud üldjuhul täiendavat piima rasvata kuivaine allikat, need aga doseeritakse kontsentreeritud või kuivatatud kujul ehk pulbritena (Goff, Hartel, 2013). Lõssipulbri eelised on säilivus, kättesaadavus ning madal niiskussisaldus. Säilitamisel tuleb aga vältida kokkupuudet niiskuse, kuumuse ning hapnikuga, kuna pulber on hügrokoopne ning oksüdeeruv. Täispiimapulbrit kasutatakse harva, kuna oksüdeerumise tõenäosus on suur, mistõttu see võib põhjustada jäätise maitseomaduste halvenemise (Goff, Hartel, 2013).

Vadakuivaine on laialdaselt kasutusel, kuna on võrdlemisi odav piimakuivaine allikas. Vadak sisaldab vett, laktoosi, vadakuvalke, väikeses koguses rasva ja väga vähe kaseiini. Lõssipulbris on 54,5% laktoosi ja 36% valku, vadakupulbris aga 72-73% laktoosi ning ainult 10-12% valku. Sellest tingitult võib jäätisesegu puhul esineda kõrge laktoosisisaldusega seonduvaid probleeme, eeskätt külmumistemperatuuri alanemist ning liivastust. Ainuke vadakupulbri eelis on madalam hind (Goff, Hartel, 2013).

Teisalt on üha enam saadaval vähendatud laktoosisisaldusega vadakutooteid. Ehkki laktoos võib jäätises osutada probleemseks koostisosaks, on vadakuvalkude funktsionaalsed omadused väga head. Laktoosisisaldust on võimalik vähendada laktoosi ensümaatilisel hüdrolyüüsil

glükoosiks ja galaktoosiks. Seejuures võib probleemseks osutada monosahhariidide suuremast sisaldusest tingitud külmumispunkti alanemine. Vadakuvalgu isolaate, mille laktoosi- ja valgusisaldus on sarnane lõssi omale, on võimalik toota ultrafiltratsiooni teel (Goff, Hartel, 2013).

Valkude mõju laktoosi kristalliseerumisele on põhjalikult uuritud pulbrites, kuna laktoos esineb sel juhul amorfses metastabiilses olekus ning võib spontaansel kristalliseerumisel põhjustada pulbrite tükilisust (Das, Langrish, 2012). Laktoosi- ja vadakupulbrite gravimeetrilisel analüüsil on täheldatud, et amorfse laktoosi kristalliseerumisel valkude ja soolade olemasolu aeglustab kristalliseerumiskiirust (Ibach, Kind, 2007).

Laktoosi üleküllastunud lahuses α -laktoosi kristallistumiskineetika uurimisel aga on leitud, et vadakuvalgud sisalduses 5g / 100g vee kohta ei mõjuta kristalliseerumiskiiruse konstanti, ehkki avaldavad tugevasti mõju kristallide lõppsuurusele. Valkude puudumisel kasvasid laktoosikristallid ~105 μm suurusteks, vadakuvalkude olemasolul nimetatud kontsentratsioonis aga vaid ~30 μm suurusteks. 60 minutiga oli puhtas üleküllastatud laktoosilahuses enim esinev suurus ligi 80 μm , vadakuvalke sisaldavas lahuses aga ligi 25 μm (Mimouni *et al.*, 2005).

Kuna leiti, et kristalliseerumisprotsessi kiiruskonstant valkude juuresolekul ei muutu, moodustub järelkult vadakuvalke sisaldavas lahuses sama mass kristalle, kuid tekib arvukamalt väikeseid kristalliühikuid. Nähtust põhjendab mõneti asjaolu, et vadakuvalgud on hüdrofiilsed ning võivad siduda vett. Suure tõenäosusega soodustavad vadakuvalgud ka nukleatsiooni, kuna tekitavad lokaalselt laktoosi üleküllastusega alasid (Mimouni *et al.*, 2005).

Hilisemates töodes on leidnud täiendavat kinnitust, et vadakuvalgud ei aeglusta laktoosi kristalliseerumise üldkineetikat, kuid pärsivad kristallide kasvu. Vadakuvalkude juuresolul on küll pidurdunud kristallide kasv, kuid vadakulisandiga laktoosilahustes on üldine kineetika isegi kiirem kui lisanditeta laktoosilahuste puhul. See on tingitud nukleatsioonikiiruse kasvust vadakuvalkude olemasolul (Gernigon *et al.*, 2013).

Kaseiinide puhul on täheldatud, et valgud pidurdavad laktoosi kristalliseerumise üldkiirust ning valgu inhibeeriv toime suureneb valgukoguse suurendamisel laktoos-valk segus. 2% kaseiinilisandiga laktoosipulbrite analüüsil leiti, et valgu olemasolu inhibeerib laktoosi tahkefaas kristalliseerumise korral nukleatsiooniprotsessi. Kristallide kasvufaas seevastu

praktiliselt ei erine kaseiini olemasolul või puudumisel. Täheledata aga, et valgu olemasolul segus on kristalliseerumisprotsessiks vajalik kõrgem niiskussisaldus, demonstreerides seeläbi valgu inhibeerivat efekti nukleatsioonietapile. Suurema niiskussisalduse juures saavutavad molekulid ilmselt piisava mobiilsuse, et kristallide moodustumiseks ümber paikneda (Das, Langrish, 2012).

Laktoosi anomeersete vormide sisalduste uurimisel tahkefaas segudes leiti kristalliseerunud laktoosi analüüsil, et β -anhüdrüidi vormi esineb ainult puhta pihuskuivatatud laktoosi korral, kuid mitte laktoos-valk segudes. Puhta pihuskuivatatud laktoosi puhul esines 1h pärast kristalliseerumise algust ka α/β -vormide segufaas, kuid seejärel see lagunes. Sellise segufaasi tekkepõhjust seostatakse kiire kristalliseerumisega laktoos-valk-vesi segu kõrge viskoossuse tingimustel. Kõrge viskoossus tingib piiratud molekulaarse liikumise, seega α - ja β -isomeerid lõksustatakse kiirel kristallisatsioonil segunenud faasina. See faas on aga niiskuse ligipääsul ebastabiilne. Selle põhjuseks on ilmselt üleslahustumise ja rekristalliseerumise protsessid (Barham *et al.*, 2006).

Laktoos-valk segude puhul täheledata, et kristalliseerunud materjal ei esinenud iseloomulikke tomahoogikujulisi kristalle. Pihuskuivatatud laktoosis esinesid plaadikujulised kristallid, mille teket seostatakse jällegi kõrge viskoossusega, mis pärsib molekulaarset liikumist. Laktoos-valk segude puhul puudusid selged kristalliseerumise tunnused isegi 144h kokkupuutel niiske õhuga. Arvati, et selle põhjuseks võib olla valkude juhuslik kinnitumine erinevatele α -laktoos monhüdraadi tahkudele (Barham *et al.*, 2006).

Ricotta vadakus viidi läbi valkude sadestamine ning võrreldi seejärel saadud vadakuproovis laktoosi kristalliseerumist puhta laktoosilahusega. Vadakus oli kristallisuurus väiksem. Vadakus võis kristallide väiksem suurus olla tingitud valgu- või mineraalainete jääkidest. Kiirem jahutamine soodustas nõelataoliste kristallide teket. Puhtas laktoosilahuses aga nõelataolisi kristalle ei esinenud. Sellest järeldata, et ebapuhtuste olemasolu mõjutab kristallikuju enam, kui kristalliseerimistingimused valitud temperatuurivahemikus ja jahutamise kiirustel. Jõuti jällegi järeldusele, et makromolekulid nagu valgud võivad adsorbeeruda kristallipinnale ning mõjutada seeläbi ülejäänud molekulide kinnitumist kristallivõresse. Märkiti ka, et lisandite mõju kasvava kristalli teatud tahkudele vajab siiski edasist uurimist (Pisponen *et al.*, 2014).

1.4 Meetodeid laktoosi kristalliseerumise uurimiseks

Jäätise struktuuri uurimisel külmunud olekus on süsteemi adekvaatseks kirjeldamiseks oluline, et ka analüüs viiakse läbi madalal temperatuuril. Caillet *et al.* on kirjeldanud mikroskoopilist analüüsi, mille käigus $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures säilitatud proovid sukeldati vedelasse lämastikku, et peatada kristalliseerumisprotsessid ning täielikult tahkestada rasvakomponendid. Mõnesentimeetrise küljepikkusega kuubikukujulised proovitükid poleeriti ning vaadeldi külmruumis $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures, kasutades stereomikroskoopi ning digitaalset kaamerat. Vältimaks kondensaadi teket optilistele seadmetele või proovi härmatumist viidi analüüs läbi laminaariboksis vähesel ülerõhul. Meetod võimaldas *in situ* uurida jäätise struktuuri võimalikult algupärasel kujul, nagu see külmunud proovis on (Caillet *et al.*, 2003).

Laktoos, sarnaselt paljudele orgaanilistele ühenditele, pöörab polariseeritud valguse polarisatsioonitasandit. Mil määral polarisatsioonitasand pöördub on ainete puhul erinev ning seda väljendab spetsiifilise rotatsiooni väärtus. Kuna need väärtused on α - ja β -laktoosilahuste ning ka kahe vormi segu puhul erinevad, on võimalik polarimeetrilisel analüüsil määrata eri vormide esinemist segus. Samuti on spetsiifilise rotatsiooni väärtuse muutuse registreerimisel võimalik mutarotatsiooni kineetikat analüüsida. Meetod on usaldusväärne ja küllaltki tundlik, kuid jäätises laktoosi määramisel on sel ka mõningaid puudusi. Kuna eelnevalt tuleb valgud sadestada, on proovi ettevalmistus aeganõudev. Samuti on analüüsil oluline täpne temperatuurikontroll ning meetodit on keerulisem tootmisettevõtetes rakendada (Whitaker, 1933).

Mikroskoopiline analüüs seevastu on oluliselt lihtsam, kiirem ning ka tundlikum. Seejuures muutusid jäätised, kus mikroskoobi abil kristallide olemasolu täheldati, kõigil juhtudel hilisemal ajahetkel liivaseks, tõestades mikroskoopilise analüüsi usaldusväärsust. Kuna mikroskoobi abil on võimalik tuvastada väiksemaid kristalle kui organoleptiliselt tajutav, võimaldab see liivasuse teket kindlaks teha enne kui see sensoorse defektina avaldub (Whitaker, 1933).

Murdumisnäitaja mõõtmisel on samuti võimalik lahustes kristalliseerumist määrata, kuid see ei ole piisavalt tundlik meetod, et kirjeldada protsessi algstaadiumis. Toidusüsteemides, kus kristalliseerumine põhjustab defekti on oluline just kristallide tekkimiseks kuluva induktsiooniaja tuvastamine. (Arellano *et al.*, 2004). McLeod *et al.* on kasutanud α -laktoos

monohüdraadi primaarse nukleatsiooni induktsiooniga mõõtmiseks UV/Vis spektrofotomeeri abil turbiidsuse muutusi registreerides (McLeod *et al.*, 2011). Optimaalseim meetod näib aga olevat digitaalne mikroskoopia, mis võimaldab *in situ* analüüsida kristalliseerumise algetappe ning registreerida seejuures ka kristallide morfoloogiat ning mõõtmete muutusi ajas. Puuduseks on tundlikkuse vähenemine pikema katseperioodi puhul, kui esineb juba kristallide kattumine. Sel juhul on aga jällegi sobiv murdumisnäitaja kaudu süsteemi kristalliseerumise ulatuse kirjeldamine (Arellano *et al.*, 2004).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Kasutatud materjalid

Piimavalgu allikana kasutati vadaku-, lõssi- ja Nutrilac IC-1590 pulbrit. Lõssipulber (UD Chemie Tallinn OÜ) on toodetud pastöriseeritud lõssi pihustuskuivatamisel. Demineraliseeritud vadakupulber (OSM we Wloszczowe) on toodetud juustutootmise käigus saadud värskest vadakust pihustuskuivatamisel. Nutrilac IC-1590 pulber (Arla Foods Ingredients) on naturaalne piimavalgu stabilisaator, asendamaks lõssi-, peti- või vadakupulbrit eri tüüpi jäätistes ning sarnastes toodetes. Tegu on kõrge funktsionaalsusega, madala valgusisaldusega seguga. Spetsifikatsioonides leiduvad andmed pulbrite koostise kohta on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Piimavalgu allikatena kasutatud pulbrite koostis

	Lõssipulber	Vadakupulber	Nutrilac IC-1590
Valgud	≥35%	≥11%	13-17%
Laktoos	ca 50%	≥75%	70-78%
Rasvad	≤1,25%	≤1,5%	≤3%
Niiskus	≤4%	≤5,5%	≤5%
Tuhk		≤5%	≤8,5%

Mudelsegude valmistamisel kasutati ka sahharoosi ning laktoosipulbrit, mis hangiti kohalikul toidutootjalt. Kõigi segude valmistamisel kasutati destilleeritud vett. Segu komponentide kaalumiseks kasutati Mettler Toledo PL 4001-L kaalu (täpsus 0,1g). Segude kuumutamise vältel kontrolliti temperatuuri TFA Dostmann digitermomeetri abil (mõõtepiirkond -40 kuni 200 °C).

2.2 Meetodid

2.2.1 Jäätise mudelsegude valmistamine

Jäätise mudelsegu koostisosad olid sahharoos, destilleeritud vesi ning valguallikana Nutrilac, lõssi- või vadakupulber. Laktoosisisalduse varieerimiseks lisati laktoosipulbrit. Mudelsegude valmistamiseks kaaluti retseptuuris ettenähtud kogused kuivaineid, lisati destilleeritud vesi,

segati hoolikalt klaaspulgaga ning kuumutati 85 °C-ni, jätkates pidevat segamist.

Pikaajalise säilivuse uurimisel valati iga segu valmistamise järgselt Eppendorf tuubidesse mahuga 1,5 mL (iga keedu kohta 20), korgid kaeti Parafilmiga ning proovid paigutati plastikaatkottidesse. Pikaajalise säilivuse uurimise tarbeks valmistatud mudelsegudes määrati kõigi keetude puhul ka niiskussisaldus halogeen-niiskusanalüsaatori Mettler Toledo HR83 abil. Iga mudelsegu puhul valmistati kolm paralleeli ehk kolm eraldi keetu.

Kiirmeetodi proove säilitati toatemperatuuril 24,6 (\pm 1) °C ja 5 °C juures. Toatemperatuuril säilitatud proovide puhul märgitakse edaspidises tekstis ja tabelites temperatuuriks 25 °C. Uuritav mudelsegu valati valmistamisjärgselt mitmesse Eppendorf tuubi, millest igäüht kasutati preparaadi valmistamiseks vaid üks kord, et vältida korduva pipeteerimise võimalikku mõju kristalliseerumisele.

Laktoosikristallide teket ja kasvu uuriti kolmel erineval kontsentratsioonil. -20 °C juures säilitatavate mudelsegude puhul oli laktoosi kontsentratsioon 5%, 7,5% ning 15% mudelsegu massist. Kiirmeetodi retseptuuri välja töötamisel oli eesmärgiks imiteerida -20 °C juures säilitatud proovides toimuvat külmkontsentreerumist. Lähtuti kirjanduse andmetest, et külmkontsentreerumisel külmub kuni 80% veest (Goff, Hartel, 2013). Laktoosi kontsentratsioon kiirmeetodi mudelsegudes oli lõssipulbrist mudelsegudes 12%, 19% ja 33%, vadakupulbrist mudelsegudes 13%, 20% ja 33% ning Nutrilac mudelsegudes 13%, 20% ja 34% mudelsegu massist. Mudelsegude retseptuur ning laktoosisisaldused on esitatud tabelites 2 ja 3.

Tabel 2. Pikaajalise säilivuse retseptuur.

Mudelsegu (% laktoos)	Laktoos/vesi (% laktoos)	Valgupulber (g)	Sahharoos (g)	Laktoos (g)	Vesi (g)	Kokku (g)	Kuivaine (%)
Lõss (5,3%)	6,9%	10	13	-	77	100	22,2
Lõss (7,5%)	10,0%	10	13	2,2	74,8	100	25,3
Lõss (15%)	22,3%	10	13	9,7	67,3	100	32,8
Vadak (5,3%)	6,6%	6,9	13	-	80,1	100	20,2
Vadak (7,5%)	9,6%	6,9	13	2,2	77,9	100	22,4
Vadak (13,7%)	17,1%	6,9	13	9,7	80,1	109,7	29,9
Nutrilac (5,3%)	6,7%	7,5	13	-	79,5	100	20,6
Nutrilac (7,5%)	9,7%	7,5	13	2,2	77,3	100	22,8
Nutrilac (15%)	21,5%	7,5	13	9,7	69,8	100	30,3

Tabel 3. Kiirmeetodi retseptuur.

Mudelsegu (% laktoos)	Laktoos/vesi (% laktoos)	Valgupulber (g)	Sahharoos (g)	Laktoos (g)	Vesi (g)	Kokku (g)
Lõss (12,1%)	34,4%	5	6,5	-	7,7	21,9
Lõss (18,7%)	50,1%	5	6,5	1,1	7,5	20,1
Lõss (32,6%)	112,2%	5	6,5	4,9	6,7	23,1
Vadak (13%)	33,6%	3,5	6,5	-	8,0	20,7
Vadak (20,1%)	48,6%	3,5	6,5	1,1	7,8	18,9
Vadak (33,1%)	94,7%	3,5	6,5	4,9	8,0	22,9
Nutrilac (12,8%)	33,8%	3,8	6,5	-	8,0	20,9
Nutrilac (19,8%)	49,0%	3,8	6,5	1,1	7,7	19,1
Nutrilac (34,2%)	108,7%	3,8	6,5	4,9	7,0	22,2

2.2.2 Laktoosikristallide mikroskoopiline analüüs

Mudelsegudes laktooskristallide tekke ja kasvu uurimiseks valmistati mikroskopeerimist võimaldavad preparaadid. Alusklaasile pipeteeriti 5 µL proovi ning kaeti seejärel katteklasaiga. Mikroskopeeriti toatemperatuuril ($24,6 \pm 1$ °C) polarisatsioonmikroskoobiga Nikon Eclipse E200, kogusuurendusega 100 korda. Mikroskoop oli varustatud digikaameraga Nikon Digital Sight DS-U, mikroskoobipiltide jäädvustamisel personaalarvutisse kasutati NIS-Elements D 3.1 tarkvara. Laktoosikristallide suuruse määramiseks mikroskoobipiltidelt kasutati ImageJ Fiji pildianalüüsi tarkvara.

-20 °C juures säilitatavaid proove analüüsiti koheselt peale segude valmistamist ning seejärel 12 kuu vältel, teostades analüüsi olenevalt katseperioodi etapist 1- või 2-kuulise intervalliga. Enne preparaadi valmistamist sulatati proovid toatemperatuurile.

Kiirmeetodi käigus tehti kõigi mudelsegude puhul ülesvõtte kord päevas, maksimaalselt 4 päeva vältel. 19%-lise laktoosikontsentratsiooniga segude puhul tehti analüüse sagedamini, uurides kristalliseerumise toimumist mudelsegude valmistamise järgselt kord tunnis. Täiendavalt viidi läbi lõssipulbrist mudelsegu (19%) analüüs, kus algetapis tehti ülesvõtteid iga 15 minuti järel.

2.2.3 Laktoosikristallide suuruse määramine

Pildianalüüsi tarkvara ImageJ Fiji abil leiti kristallide keskmine suurus. Esmalt lahutati taust, seejärel konverteeriti pilt 8-bitiseks, misjuhul pilt on kahevärviline. Korrigeeriti lävendväärtust, mille korral kuvatakse objekt pildil heledana, ülejäänud taust aga tumedana. Tulemuseks saadi binaarne kujutis, kus objektid on valged (väärtus 225) ja taust must (väärtus 0). Programmi abil leiti valitud alas osakeste hulk ja kogupindala ning vastavalt osakeste keskmine suurus ruutmikromeetrites. Sealt arvutati ekvivalent diameeter, ehk sellise ringi diameeter, mille pindala on võrdsustatud osakese keskmise suurusega. Ekvivalent diameeterid arvutati valemi 1 järgi, kus d_E on ekvivalent diameeter (µm) ning S kristalli keskmine suurus (µm²) ehk pildianalüüsi mõõtetulemus.

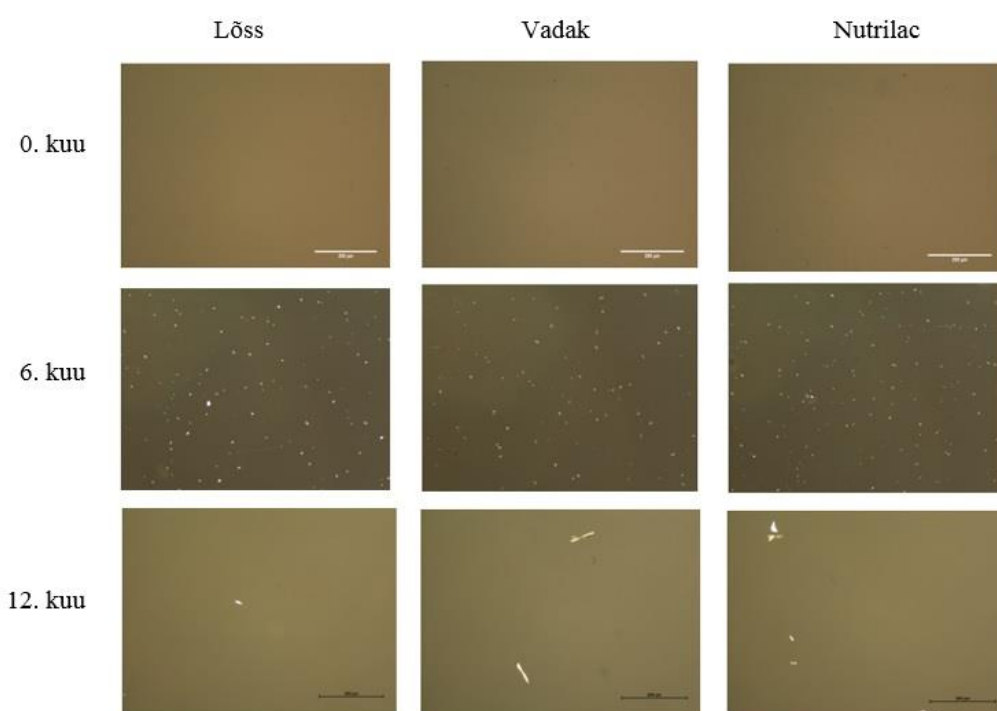
Valem 1:

$$d_E = \sqrt{\frac{4}{\pi} \times S}$$

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Pikaajaline katse -20 °C juures

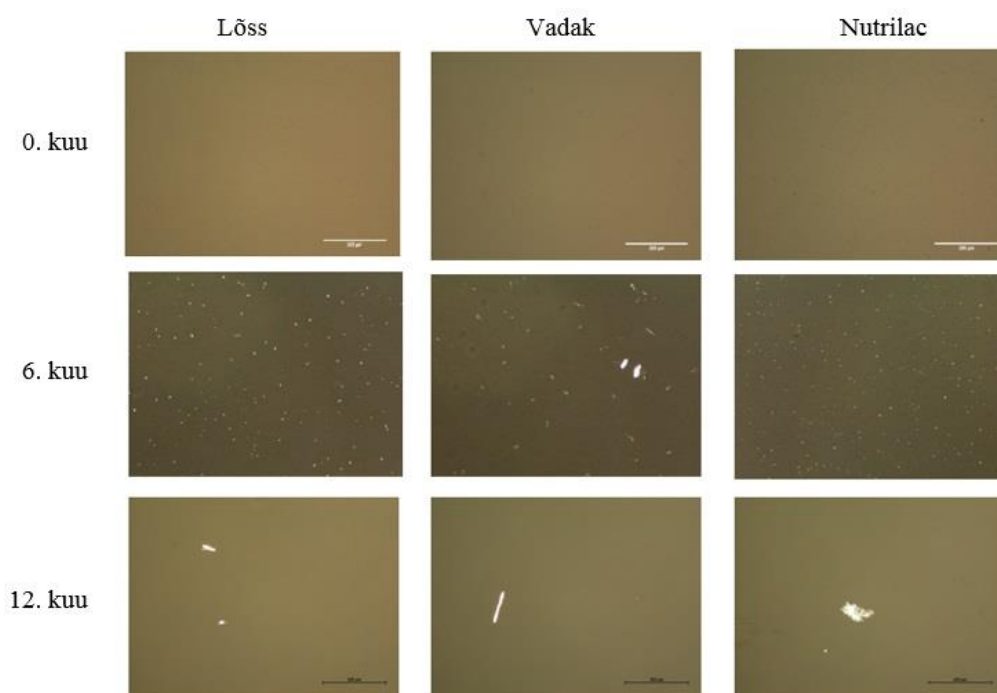
-20 °C juures säilitatud 5%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused on esitatud tabelis 4 ja joonisel 5 ning 7,5%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused tabelis 5 ja joonisel 6. Kõikides töös esitatud tabelites on kasutatud järgmisi lühendeid: n – keskmine osakeste arv, d_E – kristallide keskmine ekvivalent diameeter, sd – standardhälve. Tabelites esitatud väärtused on iga valguallika ja laktoosi kontsentratsiooniga mudelsegu kolme paralleeli ehk kolme erineva keedu keskmine tulemus.



Joonis 5. -20 °C juures säilitatud 5%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused. Skaala 200 µm.

Tabel 4. -20 °C juures säilitatud 5%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused.

Aeg	Löss 5%			Vadak 5%			Nutrilac 5%		
	n	d_E	sd	n	d_E	sd	n	d_E	sd
1.-3. kuu	0	0	-	0	0	-	0	0	-
4. kuu	105	2,2	0,5	126	2,9	0,7	63	1,9	0,8
6. kuu	167	2,5	0,9	128	3,5	0,4	287	2,5	0,4
7. kuu	37	2,8	1,1	25	2,7	0,3	36	3,6	0,9
8. kuu	7	4,5	2,5	15	1,9	0,9	9	5,5	3,3
10. kuu	5	19,5	10,3	51	5,4	3,2	49	3,7	0,4
11. kuu	5	7,2	1,8	16	5,1	0,4	3	6,8	3,3
12. kuu	5	5,5	0,2	2	16,3	9,7	5	11,2	3,0



Joonis 6. -20 °C juures säilitatud 7,5%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused. Skaala 200 µm.

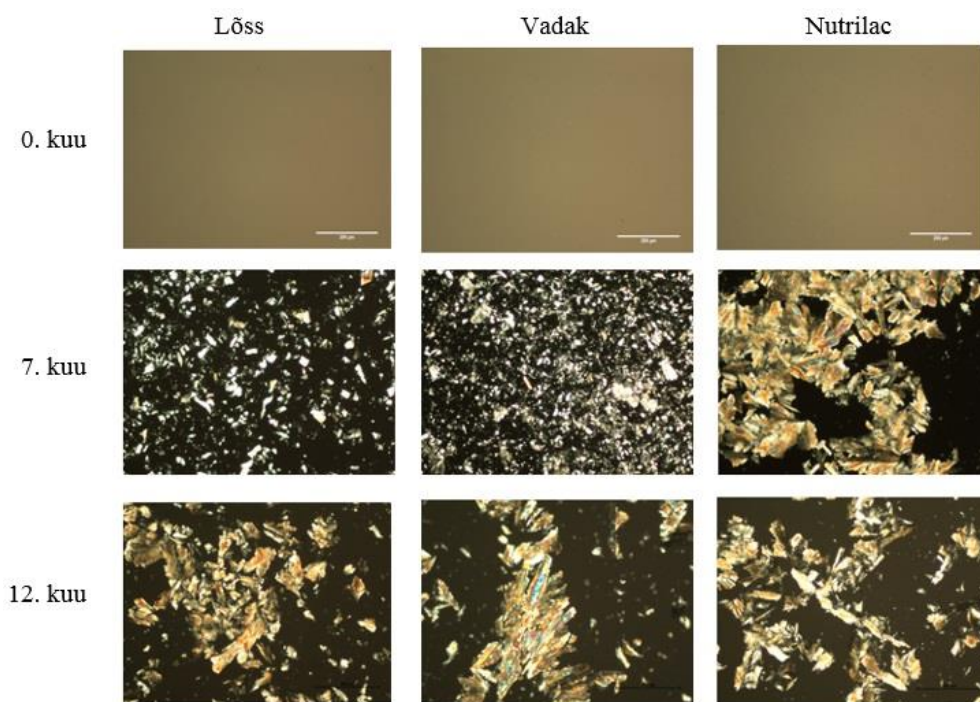
Tabel 5. -20 °C juures säilitatud 7,5%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused.

Aeg	Löss 7,5%			Vadak 7,5%			Nutrilac 7,5%		
	-20 °C								
	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
1.-3. kuu	0	0	-	0	0	-	0	0	-
4. kuu	150	1,7	0,2	65	2,3	0,3	108	1,8	0,6
6. kuu	180	3,1	0,2	143	3,4	1,5	249	2,4	0,1
7. kuu	18	3	1,0	20	3,2	1,7	84	3,4	1,2
8. kuu	9	3	0,5	11	1,4	0,2	9	3,9	2,5
10. kuu	5	19,3	6,6	11	7,4	1,5	12	8,1	4,1
11. kuu	12	6,9	2,1	13	6,8	4,8	3	21,6	10,5
12. kuu	3	15,4	3,9	2	23,9	9,0	39	11,6	1,6

5% ja 7,5% laktoosisaldusega mudelsegude puhul kristallide tekkimise aja ja edasise suurenemise osas tulemused oluliselt ei erinenud. Kristallide esinemine oli täheldatav 4. kuu katsepiltidel. 6. kuu katsepiltidel olid kristallid suurenenud, kuid 7. kuul oli mingil põhjusel märgata vaid üksikuid suuremaid kristalle. 7.-12. kuu katsepiltidel leidis üksikuid küllaltki suuri kristallitaolisi moodustisi, kuid neil puudus korrapärane kuju ning need ei sarnanenud kõrgema kontsentratsiooniga mudelsegude kristallidele. Osakeste vähenenud arv ja seejuures keskmise ekvivalent diameetri standardhälbe suur väärtus viitab asjaolule, et esineb osakeste lai suurusjaotus. Üldiselt 5% ja 7,5%-lise laktoosikontsentratsiooniga mudelsegude puhul

kristallid küll tekkisid ja vähesel määral kasvasid, kuid katseperioodi teises pooles esinesid enamasti vaid üksikud, ebamäärase kujuga kristallitaolised osakesed. On võimalik, et 12-kuulise katseperioodi vältel esines külmutusseadme riketest või elektrikatkestustest tingitud säilitustemperatuuri kõikumisi, mis võisid katsetulemusi mõjutada.

15%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused on esitatud tabelis 6 ja joonisel 7. 15%-lise laktoosisaldusega segude puhul oli kristallide esinemine märgatav 4. kuu mikroskoobipildidel. Tabelis on 4. kuu tulemustena esitatud kahe paralleeli keskmine tulemus, misjuhul esinesid proovis eraldiseisvad väikesed kristallid. Kõigi kolme valguallika puhul ilmnesis aga 4. kuul ühe paralleeli pildidel ebamäärase kujuga suured kristallilised moodustised, mida kristallide klasterdumise tõttu pildianalüüsi tarkvara abil mõõta ei õnnestunud.



Joonis 7. -20 °C juures säilitatud 15%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused. Skaala 200 µm.

Tabel 6. -20 °C juures säilitatud 15%-lise laktoosisaldusega mudelsegude katsetulemused.

Aeg	Löss 15%			Vadak 15%			Nutrilac 15%		
	n	d _E	sd	-20 °C			n	d _E	sd
				n	d _E	sd			
1.-3. kuu	0	0	-	0	0	-	0	0	-
4. kuu	149	2,0	0,6	23	1,9	0,4	138	1,5	0,4
6. kuu	2156	7,2	-	160	2,8	-	147	3,3	1,8
7. kuu	909	7,4	-	1398	8,2	2,2	82	3,1	0,2

6. kuul oli lõssipulbrist mudelsegus tekkinud oluliselt suuremad kristallid kui kahe ülejäänud valguallika puhul. Vadakupulbrist mudelsegude puhul oli aga 6. ja 7. kuu analüüsi vahelisel ajal toimunud drastiline kristallide hulga suurenemine. Nutrilac mudelsegu madal tulemus on tingitud asjaolust, et ühe paralleeli puhul oli juba tekkinud klasterdunud kristalliline materjal, kuid eraldiseisvate osakeste eristamatuse tõttu ei olnud võimalik suurusi arvesse võtta.

6. ja 7. kuu analüüsidel olid kristallid enamikel katsepiltidel omandanud ka eristatava kuju. Leidus püramiidi- ja prismalaadse kujuga kristalle, kuid kristallide väga krobeliste servade ja klastrite moodustumise tõttu ei olnud morfoloogia siiski selgelt määratletav.

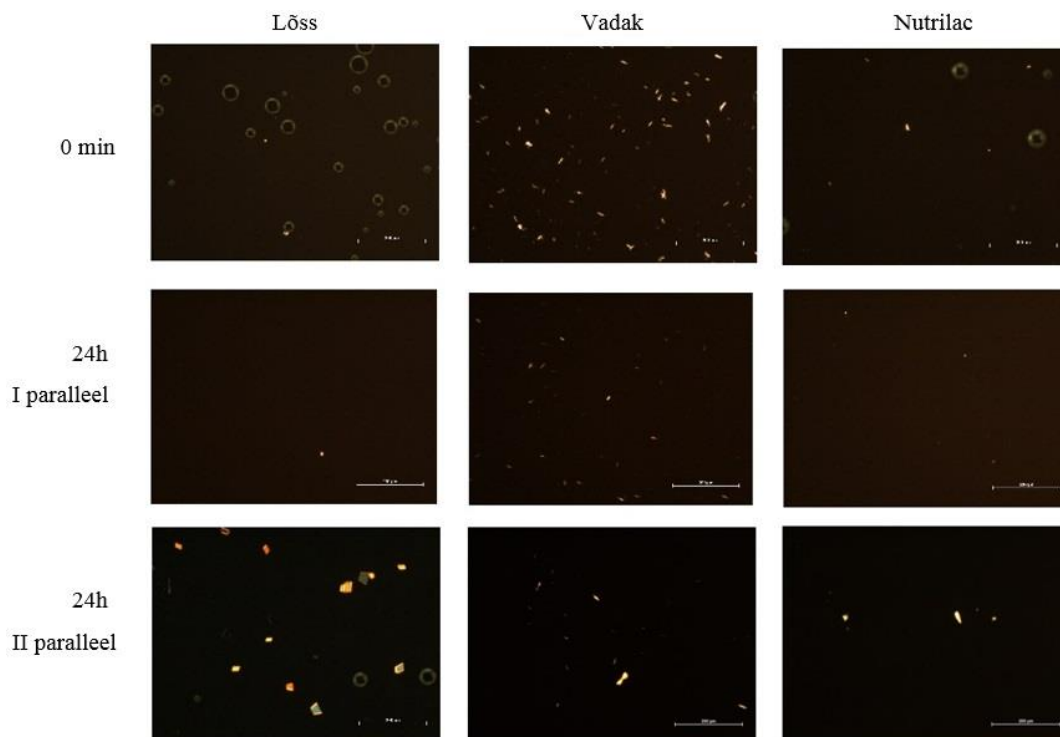
8. kuul oli kõigi valguallikate 15% mudelsegudes moodustunud kristalliklastrid, mida eraldiseisvate osakeste eristamatuse tõttu pildianalüüsi tarkvara abil analüüsida ei õnnestunud. Kristalliklastrid esinesid ka kõigi järgnevate analüüside käigus.

15%-lise laktoosisisaldusega segude puhul avaldus mõneti laktoosikristallidele iseloomulik morfoloogia, lahjemates segudes aga mitte. Ebaharilike kristallikujude tekkimisel võib põhjuseks olla pikaajalise säilivuse mudelsegude kõrge veesisaldus. Valmistamise hetkel sisaldasid segud 70-80 % vett segu kogumassist. Katse 12-kuulise kestvuse jooksul võis esineda proovide säilituskapist võtmisel teatud määral termošokke. See võis aga väikesemahuliste proovide puhul olla piisav ümberkristalliseerumise protsesside esilekutsumiseks, põhjutades väga suurte ning ebamäärase kujuga kristallide tekke.

3.2 Kiirmeetod

Kõigi valguallikate mudelsegude puhul leiti eelkatsete käigus, et kõrgeima uuritava laktoosikontsentratsiooniga (33-34%) mudelsegude puhul oli mikroskopeerimise alghetkeks juba toimunud ulatuslik kristalliseerumine ning seega edasist analüüsi läbi ei viidud.

12-13% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi katsetulemused 5 °C juures on esitatud joonisel 8 ja tabelis 7 ning 25 °C juures säilitatud proovide tulemused joonisel 9 ning tabelis 8. 19-20% laktoosi sisaldanud mudelsegude katsetulemused 5 °C juures on esitatud joonisel 10 ja tabelis 9 ning 25 °C juures säilitatud proovide tulemused joonisel 11 ning tabelis 10.



Joonis 8. 5 °C juures säilitatud 12-13% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused. Skaala 200 µm.

Tabel 7. 5 °C juures säilitatud 12-13% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused.

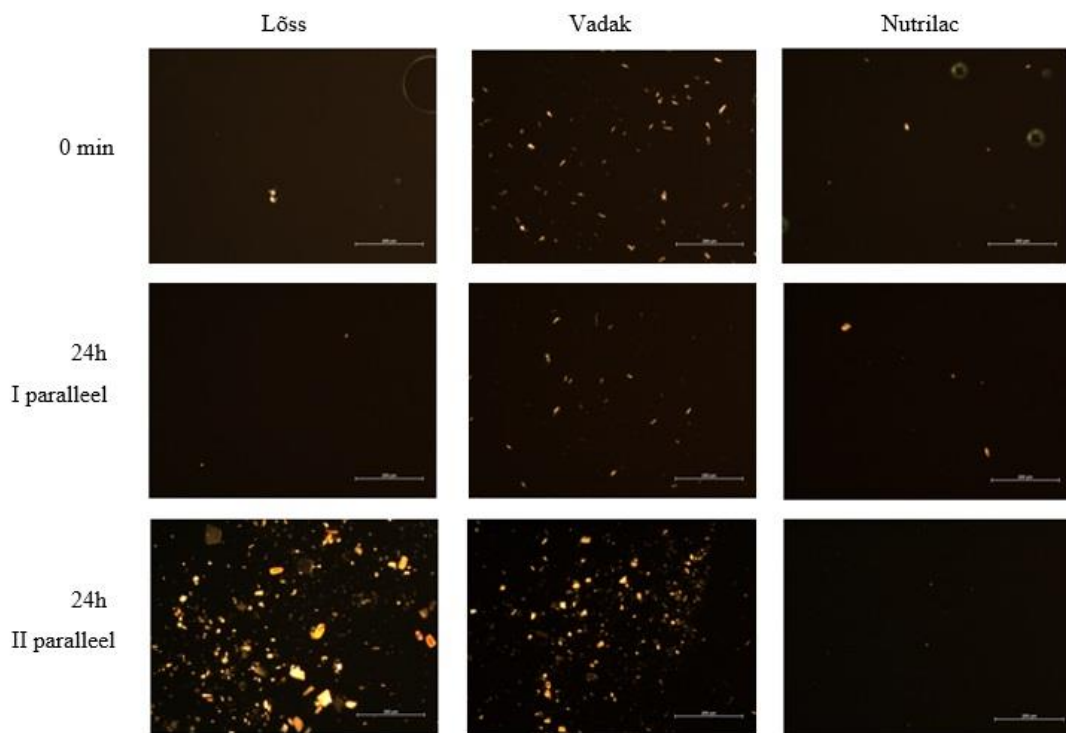
Löss 12%				Vadak 13%			Nutrilac 13%		
<i>paralleel I / 5 °C</i>									
<i>Aeg</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
0min	6	7	3,8	57	5,8	2,1	5	4,9	1,9
24h	1	15,9	7,9	13	4,8	0,4	4	4,9	4,0
48h	33	8,4	0,2	35	9,5	1,4	22	30,6	28,9
<i>paralleel II / 5 °C</i>									
<i>Aeg</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
0min	7	2,6	0,5	94	8,8	5,1	3	5,3	2,0
24h	83	11,3	5,1	29	8,7	1,2	2	29,9	0,3
48h	16	16,6	6,2	135	25	23,0	43	10,2	1,1

Kiirmeetodi katsetulemused on tabelites esitatud vastava preparaadi kolme erineva ala piltide keskmistamisel saadud väärtustena. Seega väljendab standardhälve kiirmeetodi tabelite puhul kristallide suuruse dispersiooni prepareeritud proovikoguse ulatuses, mitte paralleelkatsete vahel.

Töös ei ole välja toodud osakeste suurusjaotust ning tabelites esitatud väärtused on saadud robustsel meetodil katsetulemusi keskmistades, arvestamata visuaalsel vaatlusel ilmnevaid drastilisi erisusi kristallide suuruse ja morfoloogia osas. Sellisel kujul andmete esitamise eelis

on aga teatav ülevaatlikkus, mis proovide paljususe ja mitte-kokkulangevate paralleelkatsete korral võimaldab tulemusi siiski kompaktselt esitada ja omavahel võrrelda.

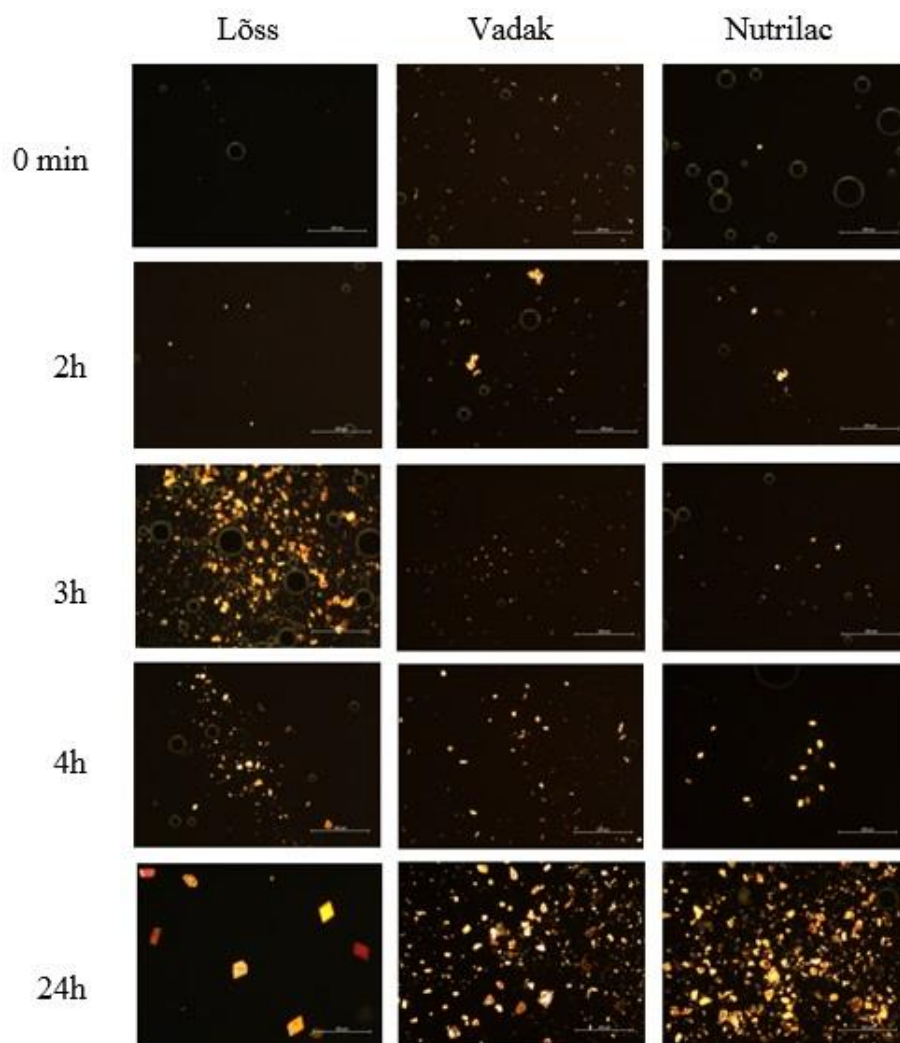
Seetõttu võivad tabelites esitatud ekvivalent diameetri väärtused näida mõnel juhul joonistega vastuolus. Kui aga seejuures jälgida ka osakeste arvu ning standardhälbe väärtusi, väljendub kristalliliste osakeste laia suurusjaotuse esinemine proovis ning keskmistamise tasandav efekt ekvivalent diameetri väärtusele.



Joonis 9. 25 °C juures säilitatud 12-13% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused. Skaala 200 μm.

Tabel 8. 25 °C juures säilitatud 12-13% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused.

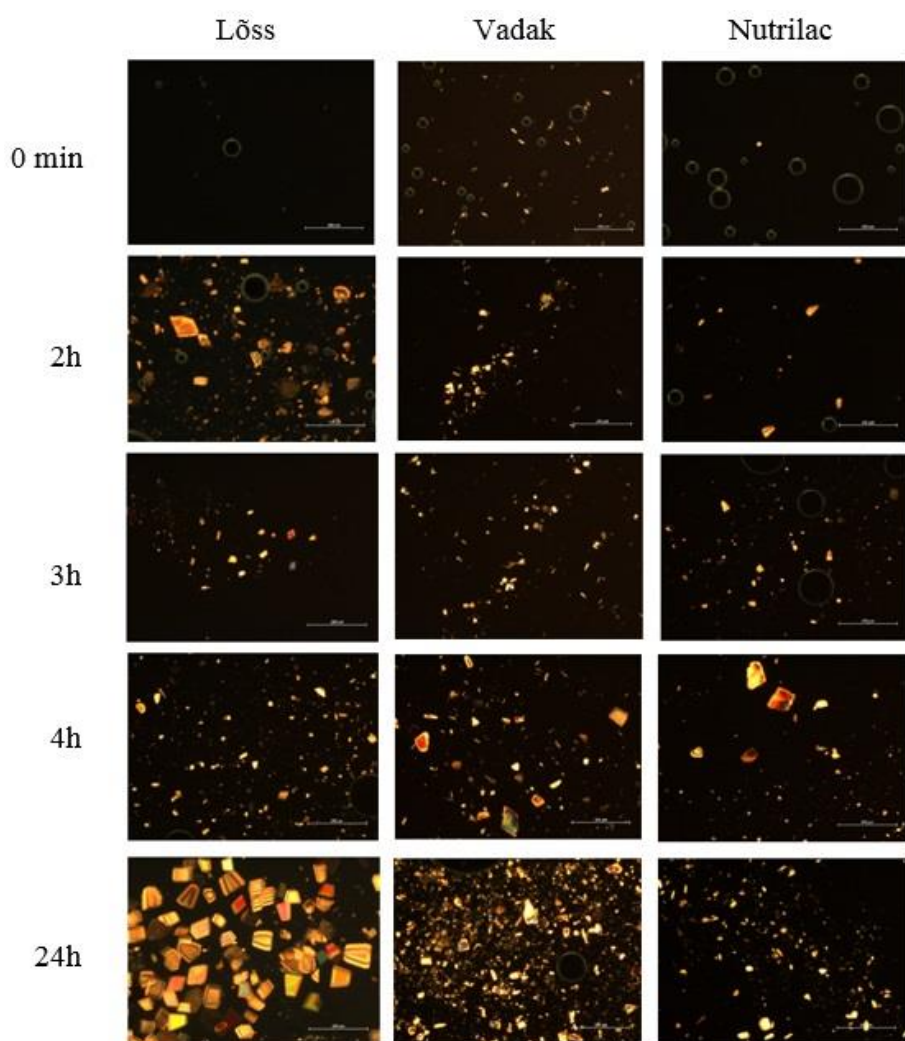
Löss 12%				Vadak 13%			Nutrilac 13%		
<i>paralleel I / 25 °C</i>									
<i>Aeg</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
0min	6	44,0	41,5	57	5,8	2,1	5	4,9	1,9
24h	3	6,8	-	20	6,6	0,4	9	5	1,2
48h	13	3,5	0,5	56	6,6	1,3	3	5,3	2,0
<i>paralleel II / 25 °C</i>									
<i>Aeg</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
0min	7	2,6	0,5	94	8,8	5,1	3	5,3	2,0
24h	275	8,3	0,8	156	8,4	1,4	5	4,7	3,8
48h	346	14,2	3,3	1212	8,2	1,9	149	9,2	0,9



Joonis 10. 5 °C juures säilitatud 19-20% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused. Skaala 200 µm.

Tabel 9. 5 °C juures säilitatud 19-20% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused.

	Löss 19%			Vadak 20%			Nutrilac 20%		
	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
	5 °C								
<i>Aeg</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
0min	6	2,8	3,1	54	6,0	1,6	14	10,0	2,9
1h	1	6,6	-	19	40,5	-	71	7,8	3,0
2h	9	5,6	0,3	20	9,4	2,1	10	12,6	1,4
3h	135	10,7	0,9	40	5,5	1,6	9	15,6	11,6
4h	41	13,4	5,4	48	7,4	0,1	14	14,2	3,3
24h	38	27,5	23,9	449	9,1	1,0	563	10,0	0,3



Joonis 11. 25 °C juures säilitatud 19-20% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused. Skaala 200 µm.

Tabel 10. 25 °C juures säilitatud 19-20% laktoosi sisaldanud mudelsegude kiirmeetodi tulemused. Skaala 200 µm.

<i>Aeg</i>	Löss 19%			Vadak 20%			Nutrilac 20%		
	<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>	<i>25 °C</i>			<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>
				<i>n</i>	<i>d_E</i>	<i>sd</i>			
0min	134	2,8	3,1	54	6,0	1,6	14	10,0	2,9
1h	-	-	-	26	5,8	0,2	61	8,6	0,8
2h	110	10,2	4,0	55	8,2	2,1	10	14,1	4,1
3h	114	7,1	1,5	59	7,6	1,4	25	15,9	9,4
4h	68	18,8	13,4	134	8,2	1,1	57	13,6	4,7
24h	343	16,3	2,2	537	8,9	1,7	83	10,7	4,5

3.2.1 Paralleelkatsete kokkulangevus

Paralleelkatsete kokkulangevus lõssipulbrist mudelsegudes

12% laktoosisisaldusega segude puhul paralleelkatsed kummagi säilitustemperatuuri puhul kokku ei langenud. Analüüsi alguses visuaalsel vaatlusel proovides kristalle ei leidunud, pildianalüüsi tarkvara abil aga siiski osakeste leidumine tuvastati. Nii 25 °C kui ka 5 °C juures säilitatud proovide puhul täheldati esimese paralleelkatse korral kristalliseerumist 48h möödumisel, teise paralleelkatse puhul aga juba 24h järel. Tabelites 7 ja 8 esitatud väärtuste puhul on näha osakeste arvu ja standardhälbe väärtuste suur kõikumine, mistõttu on alust arvata, et tulemusi mõjutasid eeskätt mudelsegude valmistamise protseduur ning analüüsimetoodika. Eriti avaldub see 25 °C juures säilitatud proovide võrdlusel, kus teise paralleeli puhul on näha osakeste arvu ja ekvivalent diameetri väärtuste suurenemine ajas, esimese paralleeli puhul aga vastavatel ajahetkedel sarnaseid tulemusi ei saadud.

19% segude puhul oli esimese paralleelkatse segu alghetkel kristallideta, teise paralleelkatse segus leidis aga suuri kristalliseerunud osakesi, mis võisid olla tingitud lahustumata jäänud kuivainest. Esimese paralleelkatse puhul tekkisid nii 25 °C kui 5 °C juures säilitatud proovides 24h järel arvukad korrapärase kujuga kristallid. Kuna kristallid olid mõõtkavaga võrdlemise põhjal juba suuremad kui 50 µm leiti, et analüüse tuleb teostada sagedamini. Korduskatse lõpul kontrolliti vaatlusel 24h tulemuste sarnasust.

19% laktoosisisaldusega segude teise paralleelkatse puhul teostati analüüsi kord tunnis, nelja tunni vältel. 25 °C juures ei toimunud kristallide suuruse muutused loogilises järjestuses ning varasemal ajahetkel esinesid juba oluliselt suuremad kristallid kui hilisemas etapis. Põhjusteks võivad olla nii pipeteerimisest tingitud efekt, kui ka segu valmistamisel lahustumata jäänud kuivaine osakesed.

5 °C juures kuni 4h säilitatud 19% laktoosisisaldusega segude puhul oli esimeses paralleelkatses kristallide mõningane kasv aja möödumisel jälgitav, ent seejuures esines ka ebakorrapärase kujuga kristallilisi osakesi, mis võisid olla tingitud lahustumata jäänud kuivainest. Tabelis 8 kajastub jällegi tulemuste ebaloogiline muutumine ajas, eeskätt osakeste arvu ja standardhälbe väärtuste kõikumiste näol analüüsi perioodi vältel.

Lõssipulbrist mudelsegu puhul olid 19% laktoosisisalduse korral 25 °C juures mõlemas paralleelkatses laktoosikristallid peamiselt püramiidse kujuga, 5 °C juures tekkisid mõlema

paralleeli puhul valdavalt prisma- või teemantikujulised kristallid.

Paralleelkatsete kokkulangevus vadakupulbrist mudelsegudes

Vadakupulbrist mudelsegude puhul oli kõigil juhtudel juba alghetkel preparaadis arvukad nõeljad kristallid. Teiste valgupulbrite baasil mudelsegudes vaatlusperioodi vältel sarnaste kristallide esinemist ei täheldatud.

13% laktoosikontsentratsiooniga mudelsegude puhul esimeses paralleelkatses 24h vältel muutusi ei täheldatud. 48h järel olid alghetkel esinevad nõeljad kristallid pisut suuremad ning esines klastreid. Teise paralleelkatse korral oli 24h järel proovis ka mitte-nõeljaid kristalle, seejuures 25 °C juures säilitatud proovis avaldus üksikute kristallide puhul püramiidikujuline morfoloogia. Mitte-nõeljaid kristalle täheldati teise paralleelkatse puhul ka 48h järel. Esimese ja teise paralleelkatse tulemused ei olnud seega katseperioodi lõpul kokkulangevad.

20% laktoosikontsentratsiooniga mudelsegude puhul ilmnid 24h möödudes mõlemas paralleelkatses ebamäärase kujuga krobeline servadega kristallid ning 25 °C juures ka korrapärase kujuga kristallid. Teise paralleelkatse segu sagedam analüüs näitas, et mitte-nõeljaid kristalle on vadakupulbrist mudelsegus võimalik täheldada juba 2h järel.

Sarnaselt lõssipulbrist mudelsegudega ilmnis paralleelkatsete kokkulangematus ning ajalise järjestuse suhtes ebaloomilised kristallide suuruse ja hulga muutused.

Paralleelkatsete kokkulangevus Nutrilac pulbrist mudelsegudes

Alghetke pildidel esines kõigil juhtudel tähnikesi, mis võisid olla tingitud preparaadiklaasi ebapuhtustest. Seda väidet ei olnud võimalik aga enne välistada või kinnitada, kui alghetkel kristallialgetena paistvad osakesed ei olnud aja möödudes kasvanud või sarnaseid osakesi juurde tekkinud.

13% laktoosikontsentratsiooniga segude puhul leidsid esimeses paralleelkatses 24h järel mõlema säilitustemperatuuri puhul proovides vaid üksikud väikesed kristallitaolised tähnid. 48h järel 25 °C juures säilitatud proovides olulisi muutusi toimunud ei olnud. 5 °C juures säilitatud proovides oli aga ühel pildil näha korrapärast, suurte mõõtmetega teemantikujulist kristalli, kahel ülejäänud pildil aga arvukaid ebakorrapärase kujuga kristalle. Tabelites 7 ja 8 kajastub see standardhälbe äärmiselt suure väärtusena. Teise paralleelkatse puhul olid nii 5 °C

kui 25 °C juures säilitatud proovides vaid üksikud kristallid ning enamik prepareeritud proovikogusest oli kristallideta. 48h järel leidis mõlema säilitustemperatuuri puhul proovides arvukalt ebakorrapärase kujuga kristalle.

20% laktoosikontsentratsiooniga segude puhul samuti märgatavaid sarnasusi paralleelkatsete tulemuste vahel ei esinenud. Esimeses paralleelkatses tekkisid 25 °C juures 24h jooksul ebaharilikult suurte mõõtmetega tomaoogikujulised kristallid. Kord tunnis analüüsitud proovides ilmnis jällegi tulemuste ebaloogiline muutumine ajas ehk varasemal ajahetkel leidis juba arvukamalt ja suuremate mõõtmetega kristalle kui hilisemal ajahetkel. Korduskatse 24h analüüsitulemused sarnanesid 4h tulemustega, mitte aga esimese paralleelkatse 24h tulemustega. 5 °C juures 24h järel arvukad ebakorrapärase kujuga kristallid, sarnaselt vadakupulbrist mudelseguga samadel tingimustel. Sagedama analüüsi käigus selgus, et esimese paralleelkatse 24h tulemustele sarnane olukord on täheldatav juba 1h järel. Korduskatse 24h proovis oli osakeste arv ja mõõtmed suurenenud.

Üldiselt avaldus Nutrilac pulbrist mudelsegude piltidel samuti laktoosikristallide aja ja kontsentratsiooni suhtes järjestamatu kristallide arvukus ja suurus, mis on tõenäoliselt tingitud pipeteerimise mõjust ning mudelsegude valmistamise protseduurist.

3.3 Järeldused

3.3.1 Valgu mõju laktoosi kristalliseerumisele

-20 °C juures säilitatud proovide puhul 5%- ja 7,5%-lise laktoosikontsentratsiooniga mudelsegudes valguallikast olenevaid erinevusi ei täheldatud.

15% laktoosi sisaldanud mudelsegude puhul oli suurte kristalliklastrite moodustumine esimesena täheldatav Nutrilac mudelsegus. Katse lõpuks olid aga sarnased klastrid tekkinud kõigi valgupulbrite mudelsegudes ning morfoloogia erinevusi ei esinenud. 6. kuul oli aga ilmnunud ligi kahekordne erinevus ekvivalent diameetri väärtustes lõssi- (7,2 µm) ja vadakupulbrist (2,8 µm) mudelsegude puhul. See langeb kokku kirjanduse andmetega, mille kohaselt vadakuvalgud ei aeglusta laktoosi kristalliseerumise üldkineetikat, kuid pärsivad kristallide kasvu (Gernigon *et al.*, 2013). Nutrilac mudelsegus oli samal ajahetkel keskmine ekvivalent diameeter 3,3, mille alusel sarnaneb Nutrilaci toime laktoosi kristalliseerumisele pigem vadakupulbrist mudelsegudele, kui lõssipulbrist mudelsegudele.

Kuna kiirmeetodi puhul paralleelkatset ei olnud kokkulangevad, ei ole ka võimalik üheselt, numbriliste näitajate alusel hinnata valgumõju kristalliseerumisele. Küll aga oli teatud juhtudel märgatav valgumõju kristallide morfoloogiale.

Lõssipulbrist mudelsegudes oli kõige sagedamini täheldatav korrapäraste kristallide esinemine. 25 °C juures säilitamisel tekkisid peamiselt püramiidikujulised kristallid, 5°C juures aga teemantikujulised kristallid. Vadakupulbrist mudelsegudes oli väga iseloomulik nõeljate kristallide esinemine, mis on kooskõlas vadakuvalkude kirjanduses mainitud mõjuga laktoosi kristalliseerumisele (Pisponen *et al.*, 2014). Seejuures esines aga sagedasti ka ebakorrapäraseid mitte-nõeljaid kristalle, mis võisid olla tingitud korralikult lahustumata kuivainest mudelsegu valmistamisel. Nutrilac pulbrist mudelsegudes saadi kõige muutlikumaid tulemusi, mistõttu on ka keeruline üldistavaid järeldusi teha. Enamasti kui kristallid olid tekkinud, sarnanesid need pigem vadakupulbrist mudelsegudeski esinenud ebakorrapärastele kristallidele. Seejuures võib jällegi tegu olla kuivaine mittetäieliku lahustumisega.

3.3.2 Laktoosi kontsentratsiooni ja säilitustemperatuuri mõju

-20 °C juures säilitatud proovide 5%- ja 7,5%-lise laktoosisisaldusega mudelsegude tulemused praktiliselt ei erinenud. Tulemuste sarnasus on seletatav asjaoluga, et mudelsegude suhteliselt kõrge veesisalduse juures on laktoosi kontsentratsioonide erinevus vaid 2,5%.

Seevastu 15% laktoosikontsentratsiooniga mudelsegude puhul olid sama ajahetke võrdlemisel tekkinud ligikaudu kaks korda suuremad kristallid kui 7,5% mudelsegu puhul. Lõssisegu näitel oli 7. kuul kristallide keskmine ekvivalent diameeter 15%-lise segu puhul 7,2 µm ning 7,5%-lise segu puhul 3,0 µm.

Kiirmeetodi puhul oli laktoosi kontsentratsiooni ja säilitustemperatuuri mõju paralleelkatsete erinevuste tõttu võimalik hinnata vaid katsepiltide alusel, mitte aga numbriliste väärtuste põhjal. Üldise tendentsina tekkisid suuremad erinevused laktoosi kontsentratsiooni mõjul, mitte erineva säilitustemperatuuri tagajärjel. Kõrgema laktoosi kontsentratsiooni (19-20%) korral tekkis enamasti ühesuguse säilitusaja kohta tunduvalt arvukamalt ning suuremaid kristalle, kui madalama kontsentratsiooniga (12-13%) segudes.

Temperatuuri mõju avaldus mõneti lõssipulbrist segu puhul, kus esinesid korrapärased kristallid ning seeläbi märgatavad morfoloogia erinevused. Kirjanduse andmete põhjal tekivad pigem teemantikujulised kui püramiidsed kristallid kiirema kristalliseerumise tagajärjel (Herrington, 1934). Tõenäoliselt on 5 °C juures lõssipulbrist mudelsegus pigem teemantikujuliste kristallide tekkimise põhjuseks madalama temperatuuriga kaasnev laktoosi lahustuvuse langus ning seeläbi kõrgem kristalliseerumise rõhk.

3.3.3 Analüüsi metoodika

-20 °C juures säilitatud proovide puhul oleks pika katseperioodi (12 kuud) vältel olnud otstarbekas hoida paralleelproove erinevates külmkappides, et vältida seadme võimalikest rikestest tingitud muutusi, mille mõju katsetulemustele ei ole võimalik hiljem kindlaks teha.

Kuna kiirmeetodi käigus ei saadud järjepidevaid tulemusi, ei olnud võimalik nendest ka üheseid järeldusi teha ega tulemusi pikaajalise katse andmetega seostada. Seejuures täheldati, et pikaajalise katse käigus mudelsegudes moodustunud kristallid ei sarnanenud kiirmeetodi proovides esinenud kristallidele. Põhjusteks on tõenäoliselt nii drastiliselt erinev kuivaine sisaldus kui ka säilitustemperatuur, kus pikaajalise katse puhul kaasneb vee külmine, kiirmeetodi puhul aga mitte.

Kiirmeetodi katsetulemuste põhjal võib järeldada, et kokkulangevate paralleelkatsete saavutamiseks ning erinevate parameetrite mõju hindamiseks jäätise mudelsegus tuleks modifitseerida katse ülesehitust. Probleemaatiline võib esiteks olla kiirmeetodis kasutatav suur kuivaine kogus, mille puhul mittetäieliku lahustumise tagajärjel võib segus juba alghetkel esineda kristallilist materjali ning sellest tulenevalt spontaanse kristalliseerumise tulemused olla moonutatud. Seejuures põhineb töös kasutatud retseptuur eeldusel, et külmutamisel on jäätunud 80% veest. Võimalusel tuleks aga proovide külmkontsentreerumise ulatus samuti mõõtmisel kindlaks teha, kuna kirjanduse andmetel see olenevalt segu koostisest varieerub. Üheselt tõlgendatavate tulemuste saamiseks tuleks ilmselt katsetada laiemas laktoosi kontsentratsioonide vahemikus ning otstarbekas võiks olla ka paralleelne võrdlus vesilahustega, et konkreetsemalt kindlaks teha valguallika ning temperatuuri mõju laktoosi kristalliseerumisele.

Kiirmeetodi tulemustest selgub ka kristallide mõõtmete ja hulga ebaloogiline muutumine ajas. Selle põhjuseks võib olla pipeteerimise suur mõju tugevasti kristalliseerunud segude puhul. Pipetiga ei pruugi sel juhul õnnestuda proovi kristalliseerunud osa tõhusalt preparaadiklaasile üle kanda ning katsepiltidel võivad kristallid puududa, ehkki need mudelsegus esinevad. Lahenduseks võiks olla mikroskopeerimisel suurema ruumala vaatlus. Arellano *et al.* esitatud meetodis uuriti näiteks 0,4 mL proovikogust, mis mikroskoopiliseks analüüsiks paigutati väikesesse ringjasse klaashoidjasse.

Praktilise rakenduse ehk jäätiste sensoorse defekti prognoosimise seisukohalt oleks otstarbekas siiski meetodika välja arendada jäätiseproovidele ning paralleelselt teostada sensoorseid teste. Katsetulemuste käigus ilmnes, et kristalliseerumine ja kristallide järgnev kasv ei toimu ühtlaselt, mistõttu ekvivalent diameeter ei väljenda piisavalt hästi kristalliseerumise iseloomu. Samas proovis võib esineda nii väga tihedalt paiknevaid väikeseid kristalle, aga ka harvalt paiknevaid üksikuid suuremaid kristalle. Kuna liivasuse avaldumine oleneb nii kristallide suurusest kui ka arvukusest (Nickerson, 1954), oleks otstarbekas mikroskoopilise analüüsi tulemused siduda samade proovide sensoorsete testide tulemustega.

4 KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli uurida laktoosi kontsentratsiooni, säilitustemperatuuri ning valguallika mõju laktoosi kristalliseerumisele jäätise mudelsegudest. Kristallide kindlaks tegemisel ja analüüsimisel kasutati digikaameraga varustatud mikroskoopi. Jäädvustatud pilte analüüsiti pilditöötlustarkvara abil. Püüti välja töötada meetodika, mille abil oleks külmkontseerumisega kaasnevat laktoosi kristalliseerumist võimalik imiteerida kõrgemal temperatuuril ja vastavalt kontseeritumate mudelsegudega, et kristalliseerumisprotsess toimuks kiiremini. Katseandmetest plaaniti koostatada kristalliseerumiskõverad, kust oleks selgunud kristallide teatud suuruse saavutamiseks kuluv aeg erineva säilitustemperatuuri puhul. Välja töötatud meetodikat oleks tõenäoliselt võimalik rakendada jäätistes liivasuse tekke prognoosimiseks.

-20 °C juures säilitatud mudelsegude puhul avaldus eelkõige laktoosi kontsentratsiooni mõju. 5%- ja 7,5%-lise laktoosikontsentratsiooniga mudelsegude tulemused oluliselt ei erinevad, kuid 15%-lise laktoosikontsentratsiooniga mudelsegudes oli kristalliseerumine kiirem ja ulatuslikum. 8. katsekuust alates ei olnud 15% mudelsegudes kristallide klasterdumise tõttu enam võimalik nende suurusi mõõta.

5%- ja 7,5%-lise laktoosikontsentratsiooniga proovides valguallikast olenevaid erinevusi ei täheldatud. 15% laktoosi sisaldanud mudelsegude puhul ilmnes 6. kuul vadakupulbri mudelsegus oli inhibeeriv toime laktoosikristallide kasvukiirusele, kui vadakupulbri mudelsegus oli kristallide keskmine ekvivalent diameeter poole väiksem kui lõssipulbri mudelsegus. Nutrilaci toime laktoosi kristalliseerumisele sarnanes pigem vadakupulbri mudelsegudele, kui lõssipulbri mudelsegudele.

Kiirmeetodi puhul saadi paralleelkatsete käigus vastuolulisi tulemusi, mistõttu ei olnud võimalik teha üheseid järeldusi valgu, laktoosi kontsentratsiooni ning temperatuuri mõjude kohta. Täheldati, et kõrgem laktoosi kontsentratsioon ning säilitustemperatuur soodustavad kristalliseerumist. Lõssipulbri mudelsegudes tekkis kõige sagedamini korrapärase kujuga kristalle ning vadakupulbri mudelsegudes esines kõigil juhtudel juba analüüsi alguses arvukalt nõeljaid kristalle.

Meetodi abil ei saavutatud soovitud tulemusi tõenäoliselt mitteoptimaalse katse ülesehituse tõttu. Kiirmeetodi mudelsegude oluliselt madalama veesisalduse tõttu võis juhtuda, et kogu kuivaine ei lahustunud korralikult. Lisaks näis kiirmeetodi tulemuste põhjal määrav roll olevat pipeteerimisel, muutes väikeste proovikoguste juures kristalliseerunud materjali kätte saamise ja preparaadile üle kandmise väga juhuslikuks, eriti kui segu oli juba ulatuslikult kristalliseerunud.

Kiirmeetodi mitte-järjepidevate tulemuste tõttu ei olnud võimalik koostada kristalliseerumiskõveraid ega täpsemalt analüüsida valgust, säilitustemperatuuri ning laktoosi kontsentratsiooni mõju. Seega kõiki töös püstitatud eesmärke ei saavutatud.

ABSTRACT

Lactose crystallization in frozen desserts may cause a sensory defect known as sandiness. The defect is caused by crystals that are large enough to be detected on the tongue, resulting in unpleasant gritty mouthfeel. In frozen products such as ice cream, water gradually freezes into ice as the temperature is lowered. Consequently, the water soluble components freeze-concentrate, causing the serum phase to become supersaturated with lactose. Considering the long storage period of ice cream, it would be useful to be able to predict the development of sandiness in the product before it reaches sensorically detectable limits.

The aim of this thesis was to study the influence of protein, lactose concentration and temperature on lactose crystallization in ice cream model solutions. A method was developed in order to imitate crystallization during freeze-concentration at higher temperatures and thus in more concentrated solutions, to accelerate the crystallization process. The data would be used to construct a crystallization curve based on the time for crystals to develop to a certain size at different storage temperatures.

Skim milk powder, whey powder and Nutrilac IC-1590 powder were used as sources of protein. The model solutions containing 5%, 7,5% and 15% lactose (w/w) were stored at -20 °C for 12 months. The corresponding concentrated model solutions with 13%, 20% and 34% lactose (w/w) were stored at 5 °C and 25 °C for up to 48 hours. All samples were analyzed using a microscope equipped with a digital camera. Image analysis software was used to determine the size and count of crystals.

The results were very similar for 5% and 7,5% solutions at -20 °C, however crystallization proceeded significantly faster in 15% solutions, indicating the substantial influence of lactose concentration. Protein did not appear to have a large influence on crystallization, except in 15% solutions. 6th month analysis revealed the inhibiting effect of whey proteins on lactose crystal growth as the crystals were half the size of crystals in skim milk powder based solution. Crystallization in Nutrilac based model solutions was similar to whey powder model solutions.

The accelerated method did not provide repeatable results and therefore it was not possible to

analyze in detail the influence of protein, lactose concentration and temperature. However, the overall tendency was that higher lactose concentration and temperature promoted lactose crystallization. Since the results of the accelerated method were inconsistent, it was not possible to construct crystallization curves and draw conclusions on the influence of different parameters on lactose crystallization. Thus, not all the previously defined aims of the thesis were reached.

KASUTATUD KIRJANDUS

Arellano, M., Aguilera, J., Bouchon, P. Development of a digital video-microscopy technique to study lactose crystallisation kinetics in situ. – *Carbohydrate Research*, **2004**, 339, 2721-2730.

Barham, A., Haque, M., Roos, Y., Hodnetta, B. Crystallization of spray-dried lactose/protein mixtures in humid air. – *Journal of Crystal Growth*, **2006**, 295, 231-240.

Caillet, A., Cogne, C., Andrieu, J., Laurent, P., Rivoire, A. Characterization of ice cream structure by direct optical microscopy. Influence of freezing parameters. – *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **2003**, 36, 743-749.

Das, D., Langrish, T. Activated-rate theory: Effect of protein inhibition and the temperature dependence of crystallization kinetics for lactose-protein mixtures. – *Food Research International*, **2012**, 48, 367-373.

Decker, C., Arbuckle, W., Reid, W. Alpha hydrate and beta anhydride lactose crystals in sandy ice cream. – *Agricultural Experiment Station Research Bulletin*, **1939**, 302.

Gänzle, M., Haase, G., Jelen, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. – *International Dairy Journal*, **2008**, 18, 685-694.

Garnier, S., Petit, S., Coquerel, G. Influence of supersaturation and structurally related additives on the crystal growth of α -lactose monohydrate. – *Journal of Crystal Growth*, **2002**, 234, 207-219.

Gernigon, G., Baillon, F., Espitalier, F., Le Floch-Fouere, C., Schuck, P., Jeantet, R. Effects of the addition of various minerals, proteins and salts of organic acids on the principal steps of α -lactose monohydrate crystallisation. – *International Dairy Journal*, **2013**, 30, 88-95.

Goff, H., Hartel, R. *Ice Cream. 7th Edition.* New York: Springer, **2013**. Lk. 45-85.

Goff, H., Caldwell, K., Stanley, D., Maurice, T. The Influence of Polysaccharides on the Glass Transition in Frozen Sucrose Solutions and Ice Cream. – *Journal of Dairy Science*, **1993**, 76 (5), 1268-1277.

Hartel, R. Phase Transitions in Ice Cream. – Rao, M. A., Hartel, R. W. *Phase/State Transitions in Foods: Chemical, Structural and Rheological Changes.* New York: Marcel Dekker Inc, **1998**.

Hartel, R. – Aguilera, J., Lillford, P. *Food Materials Science: Principles and Practice.* New York: Springer, **2008**. Lk. 62.

Herrington, B. L. Some Physico-Chemical Properties of Lactose: II. Factors Influencing the Crystalline Habit of Lactose – *Journal of Dairy Science*, **1934**, 17(8), 533-542.

Ibach, A., Kind, M. Crystallization kinetics of amorphous lactose, whey-permeate and whey powders. – *Carbohydrate Research*, **2007**, 342, 1357-1365.

Johnson, J., Conforti, F. Lactose. – Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. *2nd Edition*. Oxford: Academic Press, **2003**. Lk. 3472.

McLeod, J., Paterson, A., Jones, J., Bronlund, J. Primary nucleation of alpha-lactose monohydrate: The effect of supersaturation and temperature. – *International Dairy Journal*, **2011**, *21*, 455-461.

McSweeney, P. L., Fox, P. Advanced Dairy Chemistry. Lactose, water, salts and minor constituents. *3rd Edition*, *3*. New York: Springer, **2009**.

Mimouni, A., Schuck, P., Bouhallab, S. Kinetics of lactose crystallization and crystal size as monitored by refractometry and laser light scattering: effect of proteins. – *Lait*, **2005**, *85*, 253-260.

Morr, C. Functionality of Heated Milk Proteins in Dairy and Related Foods. – *Journal of Dairy Science*, **1985**, *68(10)*.

Nickerson, T. Lactose Crystallization in Ice Cream. I. Control of Crystal Size by Seeding. – *Journal of Dairy Science*, **1954**, *37(9)*, 1099-1105.

Nickerson, T. Lactose Crystallization in Ice Cream. II. Factors affecting Rate and Quantity. – *Journal of Dairy Science*, **1956**, *39(10)*, 1342-1450.

Nickerson, T. Crystallization in Ice Cream. III. Mode of Action of Milk Powder in Preventing Sandiness. – *Journal of Dairy Science*, **1957**, *40(3)*, 309-313.

Nickerson, T. Lactose Crystallization in Ice Cream. IV. Factors Responsible for Reduced Incidence of Sandiness. – *Journal of Dairy Science*, **1962**, *45(3)*, 354-359.

Nickerson, T. Use of Milk Derivative, Lactose, in Other Foods. – *Journal of Dairy Science*, **1976**, *59(3)*, 581-587.

Nickerson, T., Moore, E. Alpha Lactose and Crystallization Rate. – *Journal of Dairy Science*, **1974**, *57(2)*, 160-164.

Patel, K., Nickerson, T. Influence of Sucrose on the Mutarotation Velocity of Lactose. – *Journal of Dairy Science*, **1970**, *53(12)*, 1654-1658.

Pisponen, A., Pajumägi, S., Mootse, H., Sats, A., Poikalainen, V., Karus, A. Effect of cooling rates and low crystallization temperatures on morphology of lactose crystals obtained from Ricotta cheese whey. – *Agronomy Research*, **2014**, *12(3)*, 787-792.

Raghavan, S., Ristic, R., Sheen, D., Sherwood, J., Trowbridge, L., York, P. Morphology of Crystals of α -Lactose Hydrate Grown from Aqueous Solution. – *J. Phys. Chem*, **2000**, 12256-12262.

Whitaker, R. Some factors influencing the crystallization of lactose in ice cream. – *Journal of Dairy Science*, **1933**, *16(3)*, 177-202.

Williams, O., Peter, P. A New Form of Lactose Crystal Found in Sandy Ice Cream. – Journal of Dairy Science, **1930**, *13(6)*, 471-477.

Zoller, H., Williams, O. Sandy crystals in ice cream: their separation and identification. – Journal of Agricultural Research, **1921**, *21(10)*, 791-800.