



Keemia ja biotehnoloogia instituut

**JÄÄGA SEONDUVATE VALKUDE MÕJU KÜLMUTATUD
NISUJAHUTAIGNA JA SELLEST VALMISTATUD SAIA OMADUSTELE**

Magistritöö

Üliõpilane: Kairit Kruusimägi, 204154KATM

Juhendaja: Õnnela Luhila, Taltech, doktorant

Kaasjuhendajad: Katrin Laos, Taltech, dotsent ja

Anna Traksmaa, Taltech, vanemlektor

Õpperekava: Toidutehnoloogia ja -arendus

Tallinn 2022

Autorideklaratsioon

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

Autor: Kairit Kruusimägi

.....

(allkiri ja kuupäev)

Juhendaja: Õnnela Luhila, Keemia ja biotehnoloogia instituut, doktorant.

Kaasjuhendajad: Katrin Laos, PhD, Keemia ja biotehnoloogia instituut, dotsent.

Anna Traksmaa, PhD, Keemia ja biotehnoloogia instituut, vanemlektor

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

.....

(allkiri ja kuupäev)

.....

(allkiri ja kuupäev)

Kaitsmiskomisjoni esimees: prof. Toomas Paalme
Lubatud kaitsmissele

.....

(allkiri, kuupäev)

Sisukord

Annotatsioon.....	5
Abstract	6
Lühendite loetelu	7
Sissejuhatus.....	8
1 Kirjanduse ülevaade	9
1.1 Külmutamine	9
1.2 Külmutamisega kaasnevad probleemid	10
1.3 Jääga seonduvad valgud (IBP)	11
1.3.1 Külmumisvastased valgud (AFP).....	11
1.3.2 Jäätuuma valgud (INP).....	12
1.3.3 Ensüümiga modifitseeritud külmumisvastased valgud (EMAFP).....	12
1.3.4 Struktuur	12
1.3.5 Toimimise mehhanism	14
1.3.6 Leidumine.....	16
1.3.7 Toidus kasutamine	16
2 Töö eesmärk.....	19
3 Eksperimentaalne osa	20
3.1 Materjalid	20
3.2 Meetodid.....	20
3.2.1 Kultiveerimine	20
3.2.2 Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse määramine.....	21
3.2.3 Taigna ettevalmistamine	22
3.2.4 Pärmi elujõulisuse määramine	23
3.2.5 Pärmi ellu jäämise määramine	23
3.2.6 Saia küpsetamis- ja jahtumiskao leidmine	24
3.2.7 Saia mahu ja erimahu leidmine	24
3.2.8 Taigna ja saia tekstuuri mõõtmine	24
3.2.9 Veeaktiivsuse määramine	24
3.2.10 Saia sensoorne analüüs	24
3.2.11 Statistiline analüüs	25

3.3	Tulemused ja arutelu.....	26
3.3.1	Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse määramine.....	26
3.3.2	Pärmi elujõulitus	27
3.3.3	Pärmi ellujäämine.....	29
3.3.4	Saia küpsetamiskadu	29
3.3.5	Saia jahtumiskadu	31
3.3.6	Saia erimaht.....	31
3.3.7	Taigna tekstuur.....	32
3.3.8	Saia tekstuur	35
3.3.9	Saia vee aktiivsus.....	37
3.3.10	Saia sensoorne analüüs	38
3.4	Järeldused.....	42
	Kokkuvõte.....	44
	Kasutatud kirjandus.....	46
	Lisa 1. Sensoorse analüüsi hindamisleht	50
	Lisa 2. Sensoorsel analüüsил kasutatud värviskaala	53

Annotatsioon

Külmutamisega kaasneva soovimatu kvaliteedi languse ühe potentsiaalse lahendusena uuritakse jääga seonduva valgu kasutamist erinevates külmutatud toiduainetes.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida, kas ja kuidas mõjutab bakteri *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav jääga seonduv valk külmutatud nisujahutaigna kvaliteeti pärast ülessulatamist ja saia küpsetamist. Samuti oli eesmärgiks tuvastada, millised on olulisemad muutused, mida IBP-de kasutamine nisutaignast valmistatud pagaritoote puhul parandab. Sel viisil saab teada, kas *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav jääga seonduv valk sobib kasutamiseks külmutatud pagaritoodetes ja millises kontsentratsioonis, andes eelise ka kvaliteediomadustele parandamiseks.

Antud töö koosneb kirjanduse ülevaatest, kus käsitleti külmutamist ja sellega kaasnevaid probleeme ning anti ülevaade jääga seonduvatest valkudest, nende struktuurist, toimimise mehhanismist, leidumisest ja toidus kasutamisest. Eksperimentaalses osas analüüsiti kultiveeritud supernatandi jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsust, pärmi elujõulisust ja ellujäämist, taigna tekstuuri, saia küpsetamis- ja jahtumiskadu, erimahtu, saia tekstuuri, vee aktiivsust ja teostati sensoorne analüüs.

Tulemustena leiti, et kõrgema kui 1/16 IBP lahuse kontsentratsiooni lisamine taignapartiisse aitas kaheksa nädala jooksul säilitada pärmi elujõulisust, küpsetamiskadu oli madalam ning erimaht langes vähem, taigen ja sellest küpsetatud saiad püsisi pehmemed, taigna elastsus püsisi ühtlane ning säilis poorsus. IBP lahuse kasutamine taignapartiides ei mõjutanud oluliselt jahtumiskadu, saiade elastsust, taastuvust, kohesiooni ja vee aktiivsust. Enamus saadud tulemusi ühtis ka kirjanduses leiduvaga. Seega võib öelda, et bakteri *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav IBP sobib nisujahutaignast valmistatud pagaritoodete omaduste parandamiseks, kui selle kontsentratsioon on kõrgem kui 1/16.

Töö koosneb 49 leheküljest, 32 joonisest, 2 tabelist ja 2 lisast.

Abstract

Effect of ice-binding proteins on the characteristics of frozen wheat dough and bread

Freezing can extend the shelf life of foods, reducing food waste and food shortages to feed a growing population. However, freezing can cause an undesirable loss of quality. One potential solution to this is the use of ice-binding proteins. They can be added to various frozen foods and have the potential to improve quality properties.

This master's thesis aimed to investigate whether and to what extent the ice-binding protein produced by *Pseudomonas fluorescens* affects the quality of frozen wheat flour dough after thawing and baking. The aim was also to identify the most important changes that the use of IBPs in a bakery products made from wheat dough will improve. In this way, it is known whether the ice-binding protein produced by *Pseudomonas fluorescens* is suitable for use in frozen bakery products to improve their quality properties.

In the experimental part, the effect of the ice-binding protein produced by *Pseudomonas fluorescens* on frozen wheat flour dough and bread made from it in different concentrations (1x, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) was studied. Dough batches were stored at -18 °C for eight weeks, analyzes were performed every two weeks, and the results were compared to the control batch. Ice recrystallization inhibition activity of the IBP solution, yeast viability and survival, dough texture, bread baking and cooling loss, specific volume, texture, and water activity were analyzed and sensory analysis was performed.

Based on the results, the addition of IBP solution with a concentration higher than 1/16 to the dough batch helped to maintain the viability of the yeast, the baking loss was lower, the dough and the baked bread were softer, and the elasticity and the porosity of baked bread remained. The use of IBP solution in the dough batches did not significantly affect the cooling loss, specific volume, bread elasticity, recoverability, cohesion and water activity. On the downside, sensory bitterness and saltiness were observed, probably due to the yeast extract which was used in cultivation. In addition, breads with 1x and 1/2 IBP concentrations were found to have an unpleasant intense off-flavor.

In the course of this work, it was found that IBP produced by the bacterium *Pseudomonas fluorescens* is suitable for improving the properties of bakery products made from wheat flour dough if its IBP concentration is higher than 1/16. In the future, it would be interesting to examine whether the results obtained remain the same over a longer period or whether any other trends can be seen.

Lühendite loetelu

AFGP (*antifreeze glycoproteins*)- külmumisvastased glükoproteiinid

AFP (*antifreeze proteins*)- külmumisvastased valgud

EMAFP (*enzyme modified antifreeze proteins*)- ensüümiga modifitseeritud külmumisvastased valgud

IBP (*ice-binding proteins*)- jääga seonduvad valgud

INA (*Ice nucleation activator*)- jäätumuma aktivaator

INP (*ice nucleation proteins*)- jäätumuma valgud

IRI (*ice recrystallization inhibition*) – jää rekristalliseerumise inhibeerimine

Sissejuhatus

Toidu nappus on üks peamisi süvenevaid probleeme, mis on seotud üha kasvava rahvastikuarvuga. ÜRO Keskkonnaprogrammi andmetel raisatakse aastas umbes 1,3 miljardit tonni toitu, mis moodustab ligikaudu kolmandiku toodetud toidust (UNEP, 2021). Isagi, kui vaid neljandiku praegu maailmas raisatud toidust õnnestuks päästa, piisaks sellest 870 miljoni nälgiva inimese toitmiseks (UNEP, 2021). Selleks, et vähendada toidu räiskamist otsitakse viise, kuidas pikendada toitude säilivust. Üheks populaarseks variandiks on toitude külmutamine ja sügavkülmas säilitamine. Sel viisil on võimalik toite tarbida aastaid hiljem, kui tavapärane säilitamine seda võimaldaks.

Samas kaasnevad külmutamisega ka mitmed probleemid, näiteks lipiidide oksüdatsioon, valkude denaturatsioon, vitamiinide ja pigmentide lagunemine ning vee kadu ja migratsioon, mis võivad muuta nii toote füüsikalisi kui ka sensoorseid omadusi. Suurte muutuste korral on lõpptoode vastuvõetamatu kvaliteediga. Selleks, et seda ei juhtuks, otsitakse alternatiive, mis aitaksid vähendada kvaliteedi langust põhjustavate probleemide esile kerkimist. Üheks variandiks on jääga seonduvate valkude kasutamine toiduainetes, mida soovitakse külmutatuna säilitada. Tegemist on üsna uue teemaga ning on alles uurimisjärgus, kuidas erinevate elusorganismide poolt ekspressoeritavad jääga seonduvad valgud käituvald külmutatuna säilitamisel.

Antud magistritöö eesmärgiks on uurida, kas ja kuidas mõjutab bakteri *Pseudomonas fluorescens* poolt produtseeritav jääga seonduv valk külmutatud nisutaigna kvaliteeti pärast ülessulatamist ja saia küpsetamist. Samuti on eesmärgiks tuvastada, millised on olulisemad muutused, mida IBP-de kasutamine nisutaignast valmistatud pagaritoote puhul parandab. Sel viisil saab teada, kas *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav jääga seonduv valk sobib kasutamiseks külmutatud pagaritoodetes, andes eelise ka kvaliteediomaduste parandamiseks.

Töö kirjanduse ülevaate osas käsitletakse külmutamise protsessi ja sellega kaasnevaid probleeme. Lisaks antakse ülevaade jääga seonduvatest valkudest, nende struktuuridest, toimimise mehhanismist, leidumisest ja toidus kasutamisest.

Eksperimentaalses osas kultiveeriti antud bakterit, mille tulemusena saadi lahused, mis sisaldasid IBP-sid. Määratigi nende lahuste jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsused, mille alusel leiti suurim lahjendusaste, mille kasutamine nisutaignas võiks jää rekristalliseerumist takistada. Lisaks uuriti kahekso nädala jooksul külmutatuna säilitamisel elus ja surnud pärmirakkude osakaalu, elujõulust, mõõdeti taignate ja saiade tekstuure, saiade küpsetamis- ja jahtumiskadusid, erimahtu, vee aktiivsust ning teostati senoorsed analüüsides. Saadud tulemusi analüüsiti ning arutleti nende põhjuseid.

1 Kirjanduse ülevaade

Järgnevas kirjanduse ülevaate osas käsitletakse külmutamise protsessi ja sellega kaasnevaid probleeme. Lisaks antakse ülevaade jääga seonduvatest valkudest, nende struktuuridest, toimimise mehhanismist, leidumisest ja toidus kasutamisest.

1.1 Külmutamine

Vett esineb laialdaselt enamikes toiduainetes ning see on tihedalt seotud toidu säilivusaja, kvaliteediomaduste ja bioloogiliste funktsioonidega (Zhu et al., 2019). Toiduainete pikaajaliseks säilitamiseks on üks levinumaid ja tõhusamaid meetodeid krüosäilitustehnoloogia, mis kasutab madalaid temperatuure, et aeglustada keemilisi reaktsioone ja mikroobide kasvu (Chen et al., 2020). Mikroobide kasvu takistab külmutamise käigus veeaktiivsuse vähenemine, mis on tingitud jääkristallide tekkest vaba vee arvelt (Sun, 2011). Siiski jätkuvad mitmed protsessid ka külmutatuna säilitamisel (Sun, 2011). Peamisteks keemilisteks reaktsioonideks, mis külmutamisel ja külmutatuna säilitamisel esinevad on ensümaatilised reaktsioonid; valkude denaturatsioon ja oksüdatsioon; liipiidide, pigmentide, maitse- ja lõhnauhendite lagunemine ning vitamiinide kadu (Sun, 2011).

Vee külmumine ja jääkristallide moodustumine on loodus universaalne nähtus, mis koosneb kahest protsessist: tuuma moodustumine ja jääkristallide kasv (Sun, 2011). Temperatuuri langemisel külmumispunktini, hakkavad veemolekulid ühinema, moodustades korrapäraseid jääosakesi ehk jäätuma (Liu et al., 2016). Tavaliselt toimub toidu külmutamisel heterogeense tuuma moodustumine, mis tähendab, et külmumisprotsessi jooksul agregeeruvad vee molekulid kristallideks heljuva pinnakihi, võõrosakeste või tuuma moodustavate ainete peal (Zhu et al., 2005). Jääkristallide kasvufaasis tuumaosakeste suurus kasvab veemolekulide korrapärase lisandumise teel (Liu et al., 2016). Lõplik jääkristalli morfoloogia sõltub lahustunud ainest, temperatuurist, lahuse jääkristallide kasvukiirusest ning kasvukiirusest erinevate jääkristallide pindadel (Sun, 2011). Näiteks kiirkülmutamisel tekib rohkem väikseid jääkristalle, kuna jääkristallide kasvust vabanev latentne soojus eemaldatakse tõhusamalt (Chen et al., 2020). Peamiselt mõjutab jääkristallide suurust vaba vee sisaldus toidus ja jää rekristalliseerumine (Sun, 2011). Jää rekristalliseerumine on põhjustatud temperatuuriköikumisest külmutamise ja sulatamise ajal (Kong et al., 2016). Selle tulemusena moodustuvad väiksemate liitumisel suuremad jääkristallid, väheneb jääkristallide arv ja nende kogupind (Kong et al., 2016).

Jääkristallide kuju, suurus ning nende paiknemine rakus või väljaspool rakku mõjutab oluliselt külmutatud toiduainete füüsikalisi ja tekstuurseid omadusi (Chen, Cai, et al., 2019). Seega on sobivate tehnikate ja koostisosade väljatöötamine külmutatud toiduainete tootjate jaoks üks peamisi väljakutseid (Chen et al., 2020). Näiteks alates 1960-ndatest aastatest on pagaritoodete säilivusaja pikendamiseks kasutatud erinevad külmutamistehnikaid, mis on muutumas üha populaarsemaks (Ustun, Turhan, 2015; Poikalainen et al., 2017). Nende abil on võimalik optimeerida tootmist, logistikat, tagada toodete stabiilne kvaliteet ning vähendada kulusid ja prakki (Poikalainen et al., 2017). Samas tuleb külmutatud toodete puhul arvestada ka madalate temperatuuride mõjuga toote kvaliteedile (Poikalainen et al., 2017).

1.2 Külmutamisega kaasnevad probleemid

Külmutatud toidu tekstuuri ja sensoorsete omaduste säilitamine toote kvaliteedi tagamiseks on väljakutse, millega toiduainetööstused ning teadlased pidevalt tegelevad (Kong et al., 2016). Külmutatud toidu füüsikalised muutused avalduvad säilitamise ajal peamiselt pragunemise, rekristalliseerumise, vee kao ja migratsioonina (Zhu et al., 2019). Keemilised muutused hõlmavad maitse halvenemist, lipiidide oksüdatsiooni, valkude denaturatsiooni ning vitamiinide ja pigmentide lagunemist (Kashyap et al., 2020).

Üheks probleemiks, mis külmutamisega kaasneb on jää rekristalliseerumine, mistõttu moodustuvad suured jäärakkud. Need põhjustavad füüsikalisi kahjustusi kudedes ja rakustruktuurides, sealhulgas rakuseina kokkuvarisemist. Selle tulemusena halveneb lõppootoote kvaliteet, tekstuur, vähendab veehoidmisvõime ja suureneb veekadu sulamise ajal. (Elliott et al., 2017)

Tuntuimaks külmutatud piimatooteks on jäätis, mille puhul on eelistatud ühtlane tekstuur, kus jäaosakeste suurus on 15-20 μm . Üldjuhul kõigub nii transportimiseks kui ka kodumajapidamises kasutatavate sügavkülmikute temperatuur, mistõttu tekivad jää rekristalliseerumisel üle 40 μm suurused jäärakkud. Need halvendavad tekstuuri ja annavad tarbimisel ebameeldiva teralise suutunde. (Damodaran, Wang, 2017)

Kudedest koosnevate toiduainete, puu- ja köögiviljade, külmutamisel põhjustab suurte rakuväliste jäärakkide moodustumine kudedele olulisi kahjustusi (Kiani, Sun, 2011). Seevastu peenete kristallide moodustumine, mis on ühtlaselt jaotunud nii rakkude sees kui ka väljaspool, tagab toote kvaliteedi parema säilimise tänu väiksematele kudedele kahjustustele (Kiani, Sun, 2011). Külmumiskiirus ja temperatuurikõikumised on kaks peamist tegurit, mis mõjutavad puu- ja köögiviljades jäärakkide moodustumist ja rekristallatsiooni (Ramlov, Friis, 2020). Temperatuurivahemikus -7 °C kuni 0 °C (maksimaalne jäärakkide moodustumise tsoon) on rekristalliseerumiskiirus kõige suurem, mistõttu ei ole see külmutamiseks eelistatav temperatuurivahemik (Ramlov, Friis, 2020). Üldiselt on puu- ja köögiviljade külmutamisel suurimaks probleemiks tilkumiskadu, struktuuri halvenemine ja toitainete kadu (Ramlov, Friis, 2020).

Pagaritoodete külmutatuna säilitamise, ladustamise ning transportimise ajal toimub samuti temperatuurikõikumine, mis põhjustab kvaliteedi langust. Näiteks toimub taignas vee migratsioon, jäärakkide teke ja rekristallisatsioon (Cao et al. 2020). Need protsessid mõjutavad negatiivselt pärmirakkude eluvõimet ja aktiivsust, taigna reoloogilisi omadusi ning valmistoodete kvaliteeti (Poikalainen et al., 2017; Wang et al., 2017). Pärmirakkude hukkumise töltu suurendatakse taigna tegemisel pärmi kogust 4-10 %, mis tõstab toote kulusid ning mõjutab negatiivselt sensoorseid omadusi ja tekstuuri (Jørgensen et al. 2008). Kasvavad jäärakkid kahjustavad gluteenivõrgustiku struktuuri ning häirivad veemolekulide ja valkude vahelisi vastastikmõjusid, mille tulemusena vabaneb valkudega seotud vesi (Ding et al., 2015). Pärmirakkude aktiivsuse vähenedes ei teki kääritamisprotsessis piisavalt gaasi ning gluteenivõrgustiku kahjustumisega ei säili gaasi hoidmisvõime, mille tulemuseks on küpsetiste ebasoovitav lame kuju, vähnenud maht ja tihenened tekstuur (Baier-Schenk et al., 2005; Yi et al., 2009). Kvaliteedi langust aitab ennetada kiirkülmutamine, sest see soodustab väiksemate jäärakkide teket, mis kahjustavad vähem toote

mikrostruktuuri (Poikalainen et al., 2017). Seetõttu tekib külmutatud toote sulatamisel väiksem veekadu, säilivad konsistents ja organoleptilised omadused (Poikalainen et al., 2017).

Lisaks kiirkülmutamisele on jää rekristalliseerumise pärssimine oluline tegur, mis võib aidata säilitada külmutatud toiduainete tekstuuri ja sensoorseid omadusi (Kong et al., 2016). Seetõttu on rekristalliseerumiskiirust vähendava aine lisamine atraktiivne võimalus toidutööstusele (Kontogiorgos et al., 2008). Põhjalikult on uuritud krüoprotektantide (etüleenglükool, glütserool ja dimetüülsulfoksiid) kasutamist nii rakkude külmsäilitamiseks meditsiinivaldkonnas kui ka bioloogilistes süsteemides (Yu, Quinn, 1994; Taylor et al., 1983). Nende krüoprotektantide kasutamine toiduainetööstuses on piiratud, sest neid kasutatakse kontsentratsioonides, mis toiduainetes kasutamisel võivad olla toksilised, muuta toidu loomulikku värvust, maitset ja tekstuuri (Kong et al., 2016). Üheks alternatiiviks on eeltöötlemine jääga seonduvate valkudega, milles on võime pidurdada jääkristallide kasvu ja vähendada vee külmumistemperatuuri juba väga madalates kontsentratsioonides (Kong et al., 2016). Näiteks kalaveres langetavad AFP-d juba millimolaarsetes kontsentratsioonides ($>10-20 \text{ mg/ml}$) külmumistemperatuuri umbes $0,5-1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ võrra ning pinnale adsorptsiooni töttu on jääkristallide kasv pääsitud (Scotter et al., 2006). Seega saaks need kasutada loodusliku jääkonditsioneerina mitmesugustes külmutatud toodetes ning neil on suur kasutuspotentsiaal külmutatud toiduainete säilitamisel (Chen et al., 2020).

1.3 Jääga seonduvad valgud (IBP)

Jääga seonduvad valgud on aktiivsed valgud, mis on laialt levinud kõigis bioloogilistes süsteemides (Davies 2014). Jääga seonduvaid valke leidub erinevates organismides, mistõttu jagatakse neid sõltuvalt päritolust kala, putukate, taimede, bakterite ja seente IBP-deks (Davies, 2014; Liu et al. 2016). Jääga seonduvate valkude erinevatele toimimise viiside alusel võib need omakorda jagada ka külmumisvastasteks valkudeks (AFP), jäätuma valkudeks (INP) ja ensüümiga modifitseeritud külmumisvastasteks valkudeks (EMAFP), milles on edaspidi täpsemalt juttu (Chen et al., 2020).

1.3.1 Külmumisvastased valgud (AFP)

Külmumisvastased valgud avastati esmakordselt Antarktikas elavate kalade vereseerumist, kui vereanalüüs käigus selgus, et naatriumkloriidi ja teiste elektrolüütide mõju kalaplasma külmumistemperatuuri alandamisele moodustas vaid umbes 40–50% (DeVries, Wohlschlag, 1969). Ülejäänud külmumistemperatuuri languse põhjustasid väikesed seerumis olevad valgud (DeVries, Wohlschlag, 1969; Cao et al. 2016). Need valgud võivad märkimisväärsest alandada kalavere külmumispunkti merevee külmumispunktist madalamale ilma plasma osmootset röhku oluliselt muutmata (Cao et al., 2016; Liu et al., 2016). Sellest ajast alates on tuvastatud külmadest piirkondadest pärinevatest kaladest, putukatest, mikroorganismidest ja taimedest erineva struktuuriga külmumisvastaseid valke, mis kõik vähendavad kehavedelike külmumistemperatuuri ilma sulamistemperatuuri mõjutamata (Cao et al. 2016; Raymond et al., 2007). Külmumisvastaseid valke võib jagada glükoproteiinideks (AFGP) ja mitteglükoproteiinideks (kutsutakse AFP) sõltuvalt sellest, kas need on seotud süsivesikutega või mitte (Chen et al., 2020). AFGP peamiseks aminohappeks on leitud olevat alaniin, mida on leitud ligikaudu 67 % ulatuses AFP perekondades (Chen et al., 2020).

1.3.2 Jäätuuma valgud (INP)

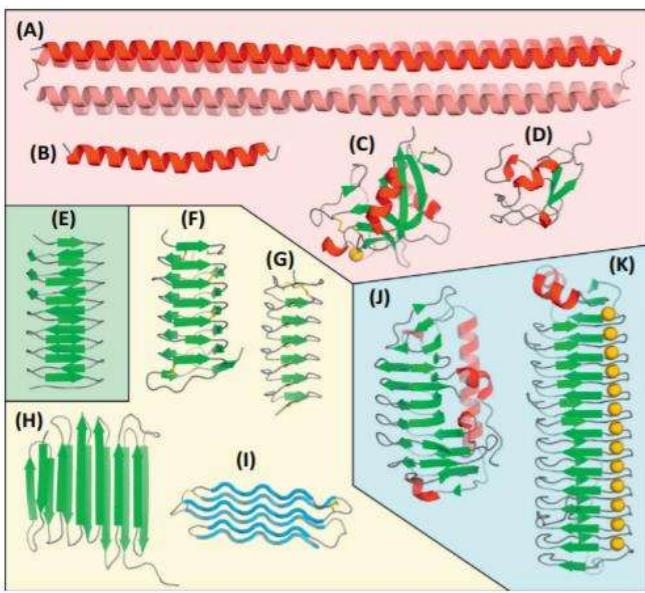
Jää tuuma aktivaator (INA) on võõrosake, mis soodustab jäätuuma teket külmumise ajal. See on vajalik esimeseks sammuks jäärakkristallide moodustumiseks. Tavaliselt eritavad jäätuuma valke jäätuuma aktivaatoriga bakterid. Jäätuuma moodustumine saavutatakse veemolekulide paigutamisega piki aminohapetest koosnevat korduvat domeeni. Jää tuuma aktivaatoritega bakterite ülesandeks on vähendada ülejahutuspunkti ja katalüüsida jäätuuma teket. Kõige levinumad jäätuuma aktivaatoriga bakteriteks on *Erwinia*, *Pseudomonas* ja *Xanthomonas* perekonnad. Esindajaid on leitud ka seentes ja hallitustes (Rubiolo 2000). Need valgud soodustavad jäärakkristallide teket temperatuuril -2...-3 °C, põhjustades paljudele pöllukultuuridele külmumiskahjustusi. Jäätuuma aktivaatoriga bakteritel on potentsiaalseid rakendusi külmutatud toiduainetööstuses ja näitena saab tuua jäätuuma aktivaatoriga bakterite lisamise tahketele mudeltoitudele (Zhang et al., 2010). Seeläbi on võimalik vähendada külmumisaega ja parandada külmutatud toodete kvaliteeti (Zhang et al., 2010). (Kawahara, 2002)

1.3.3 Ensüümiga modifitseeritud külmumisvastased valgud (EMAFP)

Želatiini ensüümaatilisel modifitseerimisel proteaasiga spetsiifilises ensüümi lõikamiskohas saadakse hüdrolüüsi teel külmumisvastaste omadustega valgud (Damodaran 2007). Želatiin on ainulaadne looduslike rikkalikult leiduv valk, mis on vees lahustuv ja mitmefaasiline segu kõrge molekulmassiga valkudest. Seda hüdrolüüsita kollageenist ning koosneb peamiselt glütsiinist (33%) ja proliinist/hüdroksüproliinist (33%). Enamikel teadaolevatel ensüümiga modifitseeritud külmumisvastastel valkudel on spetsiifiline aminohappejärjestuse pikkus ja nende molekulmass on üldiselt väiksem kui 3000 Da. Neid iseloomustab kõrgem külmumisvastane aktiivsus tõenäoliselt seetõttu, et väiksemate molekulaarsete ahelatega EMAFP võivad moodustada tugevama kolloidse heeliksi, mis seostub tõenäolisemalt jäätuuma hapnikuaatomitega jäätuuma prisma küljel. Lühidalt öeldes moodustab spetsiifilise aminohappe pikkuse ja struktuuriga kollageeniga külmumisvastane peptiid jäärakkristalli prisma pealispinna veemolekulidega vesiniksidemeid, mille kaudu seonduvad peptiidid jäätuuma pinnaga. Samal ajal võivad külmumisvastased peptiidid, mis on rikkad alküük-kõrvalahelate proliini ja alaniini jäärakkidega, pakkuda osalist mittepolaarset keskkonda (Wu et al. 2015). Need stabiliseerivad vesiniksidemete vahelist interaktsiooni ja võitlevad vesiniksideme vastasmõjude konkurentsiga jäärakkristallide ja vee vahel, avaldades märkimisväärset mõju jäärekristalliseerumise inhibeerimise (IRI) aktiivsusele (Wu et al. 2015). (Chen et al., 2020)

1.3.4 Struktuur

Jääga seonduvaid valke iseloomustab lai strukturaalne mitmekesisus (Davies, 2014; Voets, 2017). IBP-de kristallstruktuurid hõlmavad α -heelikseid (punane), nelja-heeliksi kimpe (roheline), erineva ristlõikega üksikuid β -solenoide (hall), II tüüpi polüproliini spiraalseid kimpe (sinine) ja Ca^{2+} -ioone (kollane) (joonis 1).



Joonis 1. Jääga seonduvate valkude struktuurid (Davies, 2014)

Joonisel 1 A-D struktuurid on iseloomulikud kaladele, E taimedele, F-I putukatele ja J-K mikroorganismidele. Üksikud α - ja β - heeliksid on stabiliseeritud suure hulga ahelasisestest vesiniksidemetega, mis kulgevad paralleelselt spiraalse teljega. Bakteriaalseid IBP-sid stabiliseerivad Ca^{2+} -ionide sisemine rida südamiku ühel küljel (joonis 1 K). (Davies, 2014)

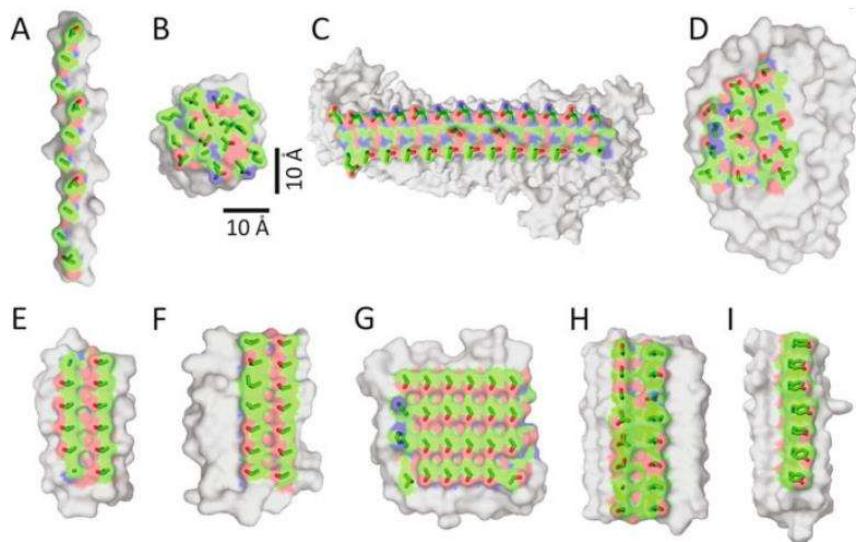
Bakterite, putukate, taimede ja seente jääga seonduvate valkude struktuurid on sageli rikkad β -solenoidide ja siiditaoliste solenoidide poolest. Putukate IBP-del on oluliselt kõrgem termilise hüstereesi väärus (5°C või kõrgem) ja külmumisvastane aktiivsus (10-100 korda kõrgem kui kalade AFP-del). Suurem aktiivsus võib olla seotud putukate IBP-des esinevate disulfiidsidemetega, mis aitavad vältida struktuurset kokkuvoltimist madalatel temperatuuridel. (Voets, 2017)

Külmumisvastaseid glükoproteiine (AFGP) liigitatakse suuruse järgi 8 klassi, milles suurim on 33,7 kDa ja väikseim 2,6 kDa. AFGP-d sisaldavad 4 kuni 50 tripeptiidi kordust (Ala-Ala-Thr, mõnel juhul on asendatud Pro-Ala-Thr-iga AFGP-des 6-8 korda), mille iga treoniini külge on kinnitatud galaktoos-N-atsetülgalaktosamiin. Kirjeldatud ühikus moodustab süsivesikute osa umbes 60% massist. Kõikides 8 klassis sisaldub ka mitu isovormi. Üldist sekundaarset struktuuri on kirjeldatud kui II tüüpi polüproliini heeliksi, kuid ainult madalatel temperatuuridel. Sellises konfiguratsioonis teeb iga kolmik (Ala-Ala-Thr) spiraalis ühe pöörde ja süsivesikute ühikute tulemuseks on korrapärasne paigutus molekuli ühel küljel. See annab molekulile üldise amfipaatilise iseloomu, kus valgu karkass koos alaniin-metüürühmaga on hüdrofoobsem ja süsivesikute pool on hüdrofiilsem. Samuti on teatatud erakordsest suurest (150 kDa) AFGP-st *Pleuragramma antarcticum*'is. See on ka ainus AFGP, mis teadaolevalt on hüperaktiivne. (Voets, 2017)

Hiljuti on ilmnenedud, et AFP-d erinevates organismides võivad täita erinevaid rolle, mis hõlmavad külmumiskindlust, jää struktureerimist ja jää adhesiooni, mis lähevad kaugemale organismi külmumise välimise algsest funktsioonist. IBP-de funktsionaalne osa on jääga seondumie koht, mis on tavaselt tasane, ulatuslik ja suhteliselt hüdrofoobne. IBP-de äärmusliku mitmekesisuse tõttu on raske tuvastada, millised struktuurilised tunnused on neil jääga seondumiseks ühised. Üldiselt

on IBP-del üks kuni kaks jääga seondumiskoha. Samuti on jõutud järeldusele, et jää kasvu inhibeerimise võti on treoniini (Thr) jäälkide hea joondumine intervallidega, mis sobivad jäavõrega. (Davies, 2014)

IBP-de jäale kinnitumise mehhanism põhineb veemolekulide organiseerimisel jäätalolisesse mustrisse jääga-seondumiskoha läheosal. Erinevad seondumiskohad on kujutatud joonisel 2, kus süsiniku aatomid on rohelised, hapniku aatomid punased, lämmastiku aatomid sinised ja ülejäänud osakesed, mis ei ole seotud jää seondumiskohaga, hallid. (Ramlov, Friis, 2020)



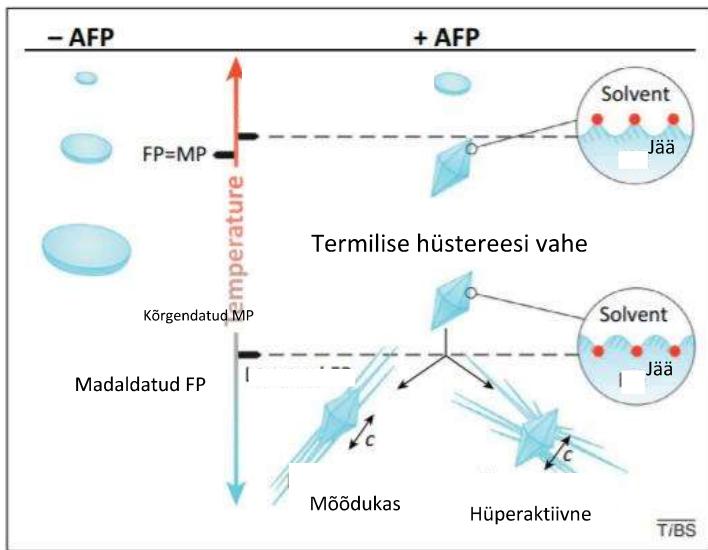
Joonis 2. Jääga seondumiskohadsaidid IBP-del (Ramlov, Friis, 2020)

Tekkiv jäätaloeline muster meenutab jääpinna kõrval olevat kvaasivee kihti. Kui need kaks kihti ühinevad, külmuvad IBP-d jääpinnale sulamistemperatuurist madalamal temperatuuril. Teised tegurid, mis võivad IBP jääga adhesioonis osaleda on van der Waalsi interaktsionid, vesiniksidemed ja hüdrofoobsed jõud. (Davies, 2014)

1.3.5 Toimimise mehhanism

IBP-d on pälvinud palju tähelepanu nende pärssiva mõju töttu jääkristallide kasvule ja rekristalliseerumisele ning nende rollile organismi ellujäämis, sealhulgas tüvirakkude ja vererakkude kaitses külmas keskkonnas (Lee et al., 2018). Üheks külmumistaluvuse mehhanismiks on jää rekristalliseerumise inhibeerimise (IRI) aktiivsus, mis takistab suuremate jääkristallide kasvu väiksemate arvelt ning kaitseb kudesid dehüdratsiooni ja struktuursete kahjustuste eest (Raymond et al., 2007; Davies, 2014). Jää rekristalliseerumise inhibeerimiseks on vaja kõigest mikromolaarset kontsentratsiooni (Davies, 2014). IRI aktiivsust on leitud paljudes külmuvate muldade ja Antarktika vete bakterites (Raymond et al., 2007).

Jääga seonduvate valkude adsorbeerumisel jääkristallide pinnale suureneb jääpind, mistöttu lahuse külmumistemperatuur langeb, kuid sulamistemperatuur tõuseb veidi (Knight, 2000). Seda nähtust kutsutakse termiliseks hüstereesiks. Joonisel 3 on näidatud jääkristallide kasv ja sulamine.

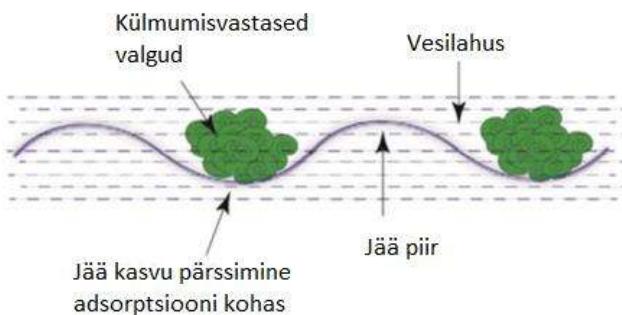


Joonis 3. Termiline hüstrees (modifitseeritud Davies, 2014)

Joonisel 3 vertikaalsest temperatuuriskaalast vasakul on näidatud olukord, kus külmumisvastased valgud (AFP) puuduvad ja külmumistemperatuur (FP) on sama, mis sulamistemperatuur (MP). Jääkristallid (helesinised kettad) kahanevad või kasvavad üle selle tasakaalutemperatuuri. Parempoolne külg illustreerib AFP-de (punaste punktide) võimet langetada külmumistemperatuuri ja tõsta sulamistemperatuuri pinnale adsorbeerumise teel. Jää kasvu suund FP-st allpool on näidatud mõõdukate ja hüperaktiivsete AFP-de juuresolekul nende kristallide c-telje suhtes. (Davies, 2014)

Jää aururöhk on madalam kui vee aururöhk. Seetõttu kanduvad veemolekulid sulamistemperatuurist madalamal temperatuuril kasvavale jääle. IBP-de juuresolekul on aga jää ja vee vaheline aururöhk tasakaalus. On näidatud, et IBP-d ei muuda vee aururöhku rohkem kui teised lahustuvad ained. Seega IBP-d töostavad jää aururöhku tasemele, mis vastab ümbritseva lahusse aururöhule. Aururöhu erinevus jää ja vee vahel suureneb, kui temperatuur langeb alla tasakaalulise sulamistemperatuuri, mistöttu peab IBP-de mõju jää aururöhule temperatuuri langedes suurenema. (Ramlov, Friis, 2020)

Jääkristallide kasvu pärssimise üldtunnustatud mehhanism ja sellega kaasnev termiline hüstrees põhineb Kelvini efektil (Knight, 2000). Prof William Thomson (kellest hiljem sai parun Kelvin I) tõi välja, vedelite töusu ja langust kapillaartorus arvesse võttes, et vee aururöhk nõgusal pinnal peab olema madalam ja kumeral pinnal kõrgem kui tasasel veepinnal (Ramlov, Friis, 2020). See on tingitud sellest, et köverale jääpinnale on termodünaamiliselt raskem lisada vett kui tasasele pinnale (Knight, 2000). Arvatakse, et jääga seonduvate valkude molekulaarsed agregaadid seonduvad tihedalt jääpinnaga, mistöttu saab jäävõre kasvada ainult jääga seonduvate valgumolekulide vahelises ruumis (joonis 4) (Liu et al., 2016).



Joonis 4. Külmumisvastaste valkude adsorbeerumine jääpinnaga ja jäärakkide kasvu pärssimine (modifitseeritud Kar and Bhunia 2015)

Nende tsoonide kasv peatub, kui nad saavutavad kumeruse, mille raadius vastab sellel temperatuuril kriitilisele raadiusele, mille puhul säilib veel aururõhu tasakaal (Ramlov, Friis, 2020). Seega ei saa ükski pind muutuda kumeramaks kui poolkera (Ramlov, Friis, 2020). Lisaks adsorbeeruvad jääga seonduvad valgud spetsiifiliselt jää prismaatilistele pindadele, mis muudab jää kasvu ja morfoloogiat (Hudait et al., 2019). Seetõttu kutsutakse neid ka jääd struktureerivateks valkudeks (Raymond et al., 2007). Teadlased on arvamusel, et külmumisvastaste valkude sidumine jäärakkidega toimub kahes etapis: AFP molekulid seotakse jääpinnaga üksikult madalatel kontsentratsioonidel ning nende maksimaalne külmumisvastane funksioon avaldub molekulidevahelises koostöös suurtes kontsentratsioonides (Bayer-Giraldi et al. 2018).

1.3.6 Leidumine

Looduses toodavad teatud kalaliigid (polaarkalad), putukad, seened, taimed ja bakterid külmumisvastaseid glükoproteiine ja polüpeptiide, mis võimaldavad neil oma looduslikus elupaigas külmumistemperatuuri üle elada (Kong et al., 2016). Samas on ka leitud erinevaid jää sees elavaid mikroorganisme (diatomid, vetikad, seened, pärmid, bakterid), mis sekreterivad IBP-sid, et hoida ümbritsevas jääs veekanalid avatuna ning sealbi võimaldades neil hingata, toitaineid omastada, jaguneda ja elada (Raymond, 2011). Üle 50 aasta tagasi avastati esmakordselt jääga seonduvad valgud polaarkaladest: antarktika notothenioidist ja talvisest lestast (DeVries, Wohlschlag, 1969). Kaladele on oluline jää kasvu pärssimine, mitte tuuma moodustumise takistamine, kuna on leitud, et osa kaladest sisaldab jäärakkide, mis vaatamata ülejahtumisele ei kasva (DeVries, Cheng, 1992). Nüüdseks on teada palju erinevaid taimi ja elusorganisme, kes toodavad IBP-sid. Näiteks erinevad mardikalised, enamus maismaa lüljalgseid (ämblikud, lestad, putukad), palju mitmeaastased talvituvad taimeliigid (Ustun, Turhan, 2015). Taimeliikide puhul on leitud IBP-sid erinevates osades, nagu seemnetes, vartes, koortes, oksades, pungades, lehtedes, lilledes, marjades, juurtes ja mugulates (Ustun, Turhan, 2015).

1.3.7 Toidus kasutamine

Jääga seonduvatele valkudele on pikka aega otsitud võimalusi, kuidas neid saaks kasutada külmutatud toiduainete töötlemisel ja säilitamisel toiduainetööstustes. IBP-de jäärakkide kasvu inhibeering ja jää rekristalliseerumise vähendamise tõttu on need muutunud populaarseks, kuna võimaldavad parandada toiduainete toiteväärust ja kvaliteeti. (Chen et al., 2020)

Tänu sellele, et jääga seonduvad valgud paiknevad rakuvälistes kudedes, saab neid mehaaniliste meetoditega, näiteks segamise, leotamise, sukeldumise, süstimise, vaakumi infiltratsiooni kaudu kanda otse toitu (Zhang et al. 2016). See võimaldab IBP-sid lisada erinevatesse rakupõhistesse ja mitterakupõhistesse toiduainetesse (Liu et al., 2018). Lisaks võib IBP-sid rakku viia geeni ülekandega, sünteesida geneetiliste või keemiliste meetoditega ja lisada toidule (Liu et al., 2018). Näiteks puu- ja köögiviljade puhul on geeniülekanne kõige sobivam rakendus IBP-de rakku viimiseks, sest omadus pärandub transgeensete taimede järglastele, mis vähendavad kulusid vörreledes teiste meetoditega (Ramlov, Friis, 2020).

Jääga seonduvate valkude kasutamine külmutatud toiduainetes on töenäoliselt tarbijate poolt heaks kiidetav, kuna need koosnevad looduslikest aminohapetest, mis on ka osa inimese normaalsetest toitumisest (Chen et al., 2020). Lisaks on USA Toidu- ja Ravimiamet ning Euroopa Toiduohutusamet kinnitanud, et arktilisest kaladest pärit IBP-d on allergiavabad ja mittetoksilised toidu lisained (European Food Safety A., 2008).

Kirjanduses leidub mitmeid paljutõotavaid näited jääga seonduvate valkude kasutamisest külmutatud toiduainetes kvaliteedi parandamiseks ja säilivusaja pikendamiseks. Näiteks jääga seonduvate valkudega töödeldud lihas tekkisid külmutamisel väiksemad jäärakkid ja vähenesid koekahjustused ülessulatamisel, mille tagajärjeks oli väiksem toitainete kadu (Payne et al., 1994). Cai ja kolleegid (2019) uurisid nanoosakestega kombineeritud jääga seonduvate valkude mõju latika kvaliteedile ning tulemused näitasid, et latika leotamine IBP lahuses enne külmutamist aitas vähendada tilkumiskadu ja säilitada latikaliha kiu mikrostrukturi.

Külmutatud piimatoodetes nagu jäätises on jäärakkid moodustumise ja rekristalliseerumise kontrollimine väga oluline stabiilsuse säilitamiseks (Soukoulis, Fisk, 2014). Jäärakkid moodustumine määrab jäärakkidide kasvu külmutatud piimatoodete tahanemise ja säilitamise ajal, mis mõjutab jäätise tekstuuriseid omadusi nagu kreemitus, karedus, niiskus ja kõvadus (Soukoulis, Fisk, 2014). Jääga seonduvate valkude lisamine võimaldab kontrollida jäätuma suurust, pärssida jäärakkidide kasvu sahharoosilahuses ja parandada toote stabiilsust ebastabiilsetes säilitustingimustes (Soukoulis, Fisk, 2014). Kaleda ja kolleegid (2018) leidsid, et kõigest 3 mg/mL IBPde lisamisel jäätisesse suureneb oluliselt jäätise kõvadus ja stabiilsus sulamise ajal. Lisaks leidsid Damodaran ja Wang (2017), et ensüümiga modifitseeritud külmmisvastaste valkude lisamisel jäätisesse toimub märkimisväärne jäärakkid moodustumise pärrsimine. Teostatud uuringutele tuginedes võiks IBP-sid kasutada jäätise loodusliku jäärakkid moodustumiseks, et vähendada külmmisest ja temperatuurikõikumistest põhjustatud kvaliteedi halvenemist ja parandada külmutatud piimatoodete stabiilsust (Chen et al., 2020).

Samuti on IBP-de kasutamine puu- ja köögiviljades näidanud paljutõotavaid tulemusi. Näiteks jääga seonduvate valkude kasutamine köögiviljades võimaldab ennetada jäärakkidide kasvu ja rekristallisatsiooni, mis märkimisväärsest vähendavad kiirkülmutamisega kaasnevaid kulusid ning säilitavad miinuskraadidel toidu kvaliteedi ja toitainelisuse (Jørgensen et al. 2008). Kong koos teadlastega (2016) leidsid, et porgandiproovide kastmine AFP lahusesse enne külmutamist aitas säilitada külmutatud porgandil värske porgandi sarnase maitse, vähenes tilkumiskadu ja külmmiskahjustused olid minimeeritud. Selle põhjuseks on AFP-de võime takistada suure rakusiseste jäärakkidide tekke, mille tulemuseks on porgandi rakulise struktuuri säilimine külmutamise ajal. Sukeldusaja piknenemine võimaldas AFP-del paremini porgandiproovidesse

hajutada, suurendades oluliselt AFP rakenduse kasulikku mõju, kuid pikk sukeldumisaeg võib suurendada toidu oksüdatsiooni, lagunemise ja bakterite kasvu riski (Kong et al., 2016). Kong kolleegidega (2017) uurisid, kuidas mõjutab kirsside puhul AFP-de kasutamine. Tulemusena leidsid nad, et AFP eeltöötlus vähendas tilkumiskadu ja säilitas külmutatud kirsside värvust, struktuuri, tekstuuri, antotsüaniini, fenoolsete ühendite ja antioksüdantide sisaldust.

Pagaritoodetes hävitavad kasvavad jäälakkid külmutamise käigus gluteenivõrgustiku struktuuri, mis toob kaasa külmutatud taigna kvaliteedi halvenemise (Chen et al., 2020). IBP-sid võib kasutada külmutatud taignates kasuliku lisandina (Chen et al., 2020). IBP-de kasutamisel külmutatuna säilitatud taignas paranes märgatavalt taigna küpsetuskvaliteet, muutes nende füüsikalisi-keemilisi (Liu et al., 2018), tekstuurilisi (Zhang et al., 2008) ja veejaotusomadusi (Xin et al., 2018). Näiteks suurennes erimaht ning vähenes kooriku tugevus (Xu et al., 2009). Hiina teadlased (Zhang et al., 2008) leidsid, et jäätga seonduvate valkude kasutamisel paranes säilitamisel leiva maht ning taigen oli kõvaduselt ühtlasem ja pehmem kui kontrollrühmal, mis võis olla tingitud madalamast külmmisvee sisaldusest. Samas leiva sensoorse kvaliteedi ja tekstuurprofiil analüüs tulemused pärast jäätga seonduvate valkude lisamist olid sarnased kontrollrühma omadega (Zhang et al., 2008). Chen ja kolleegid (2017) leidisid, et jäätga seonduvate valkude lisamine vähendab külmutamisel-sulatamisel vee liikuvust, mõjutab vee jaotumist külmutatud taignas ja parandab taigna veehoidmis võimet. Jia ja kolleegid (2014) leidsid, et IBP-de lisamisel paranes fermentatsioonivõime, gaasi tootmine ja gaasi hoidmisvõime ning aeglustus elastsusmoodulite ja viskoossusmoodulite vähinemine külmutatuna säilitamisel.

Siiski on jäätga seonduvate valkude laialdane kasutamine külmutatud toiduainetes piiratud. Selleks on mitmeid põhjuseid, esiteks on looduslikult esinevate jäätga seonduvate valkude hulk väga piiratud ja nende puastamine äärmiselt kulukas protsess. Teiseks keemiliselt sünteesitud jäätga seonduvate valkude probleemiks on kõrge hind ja toiduohutus, mis on põhjustatud endotoksiini sisaldamisest. Kolmandaks, sarnaselt enamikule valkudele, seisavad geenitehnoloogia abil valmistatud jäätga seonduvad valgud silmitsi madala ekspressiooni ja aktiivsuse kadumise probleemidega. (Chen et al., 2020)

2 Töö eesmärk

Antud töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutab laboritingimustes kultiveeritud bakteri *Pseudomonas fluorescens* poolt ekspresseritav jääga seonduv valk külmutatud nisutaigna kvaliteeti pärast ülessulatamist ja saia küpsetamist. Saadud tulemuste põhjal on näha, kuidas ning millises kontsentratsioonis mõjutab jääga seonduv valk nisujahutaigna ja sellest küpsetatud saiade omadusi võrreldes kontrollpartiiga, mis sisaldas ainsa vedelikuna vett. Saadud tulemuste põhjal selgub, mis viisil antud töö käigus saadud tulemused ühtivad kirjanduses leiduvaga ning kas antud bakterist eraldatud jääga seonduv valk sobib kasutamiseks külmutatud nisutaignast valmistatud saia omaduste parandamiseks.

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Materjalid

Bakterikultuur *Pseudomonas fluorescens* saadi säilituskultuurina ettevõttelt Lallemand. Ettevõte oli eelnevalt kogunud 60 psührofiilset bakterikultuuri Antarktika vetest, millest isoleeriti üks, mille kultuurivedelikust tuvastati jäädrekristallisatsiooni inhibeeriv toime.

Saiataigna tegemiseks kasutati nisujahu Kalew T550 (Tartu Mill), Vilma küpsetusmargariini (Orkla), presspärmi (Jästbolaget AB), soola Ekstra (Mozörsol) ja suhkrut (Dan Sukker). Toorained olid soetatud Eesti jaeketipoodidest.

Kultiveerimisel kasutati lüsogeenpuljungi agarsöödet (LabM), trüptilist sojapuljungi söödet (Neogen), pulbrilist pärmiestrakti (LabM) ja glütserooli (Lach-Ner). Analüüsides kasutati veel vedelat lämmastikku (AGA) ja metüleensinist.

3.2 Meetodid

3.2.1 Kultiveerimine

Jääga seonduva valgu saamiseks kasvatati esmalt üles sügavkülmutatud bakterite säilituskultuur. Selleks valmistati lüsogeenpuljungi agarsööde vastavalt tootja juhendile (40 g pulberkontsentraati lahustati 1 L destilleeritud vees), autoklaaviti 121 °C 15 min. Lüsogeenpuljong valiti, kuna see sobib hästi bakterite kiireks kasvatamiseks. Säilituskultuur külvtati tardunud lüsogeenpuljungi söötmeaga tassile ning kasvati inkubaatoris 30 °C juures üks ööpäev. Seejärel võeti tassilt üks koloonia ja viidi aseptiliselt 20 ml vedelasse autoklaavitud trüptilisse sojapuljungi (TSB- *Tryptic Soy Broth*, 30 g/L) söötmesse. Bakterikultuuri kasvatati inkubaatoris 30 °C juures 24 tundi. Peale kasvatamist asetati proovid külmkappi 4 °C juurde kuni kasutamiseni.

Edasiseks kultiveerimiseks võeti neli 2 L koonelist kolbi ja valmistati köikidesse 400 ml söödet. Selleks kaaluti pärmiestrakti kontsentratsiooniga 20 g/L, glütserooli 20 g/L ja lisati 400ml destilleeritud vett. Söötmed steriliseeriti Systec DX-90 autoklaavis 15 min 121 °C juures. Seejärel jahutati söötmed toatemperatuurini ning lisati 20 ml TSB söötmetes üleskasvatatud bakterikultuurid.

Inokuleeritud söötmed kasvatati loksutil Innova 43 Incubator Shaker Series 25 °C juures 72-96 h, pööretel 120 rpm. Peale kasvatamist tsentrifuugiti lahused Beckman J6-HC tsentrifuugiga pööretel 4000 rpm 10 min 10 °C juures. Peale tsentrifuugimist dekanteriti pealt lahus ära ilma põhjas olevate rakkude kaasa kandmiseta. Alles jäänud rakud resuspendeeriti, kas 200 ml eelnevalt 121 °C 15 min autoklaavitud söötmes (pärmiestrakt 20 g/L + glütserool 20 g/L+ dest. vesi) või madalama pärmiestrakti kontsentratsiooniga samadel tingimustel autoklaavitud söötmes (pärmiestrakt 10 g/L + glütserool 20 g/L+ dest. vesi). Seejärel kasvatati loksutil Innova 43 5 °C juures 72 h ning tsentrifuugiti pööretel 4000 rpm 10 min 10 °C juures. Peale tsentrifuugimist dekanteriti pealt lahus ja kasutati edasistes katsetes saadud supernatanti.

3.2.2 Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse määramine

Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse määramiseks kasutati kiirjahutusplaadiga (Linkam PE 120) mikroskoopi Nikon Eclipse E 200. Proovi ettevalmistamiseks tehti alustuseks 70 %-line sahharoosi lahus. Edasise lahjendamise jaoks tehti ka 35 %-line sahharoosi lahus. Valmis lahuseid hoiti jää peal külmas. Proovi jaoks pipeteeriti 1,5 ml-sesse eppendorfi 25 µl 70 %-list sahharoosi lahust ja 25 µl uritavat proovi ning segati Vortexiga. Seejärel pipeteeriti 3,5 µl valmis lahust mikroskoobi klaasile, asetati tilgale katteklaas ja vajutati kergelt puhta pipetiotsaga ühtlase kihisaamiseks. Katteklaasi ääred kaeti silikoonõliga, vältimaks proovi aurustumist. Proov kiirkülmutati 5 sekundit vedelas lämmastikus ja asetati mikroskoobi kiirjahutusplaadile. Seade oli eelnevalt programmeeritud kuuest intervallist koosnevale režiimile, mille parameetrid on nähtavad tabelis 1.

Tabel 1. Kiirjahutusplaadi režiim

Intervall	Hoidmise temperatuur, °C	Hoidmise aeg, s	Temperatuuri muutumise 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

Tabelist 1 on näha, et režiimi välitel toimus korduvalt temperatuuri muutus jää rekristalliseerumise tekitamiseks. Neljanda ja kuuenda intervalli lõpus tehti programmiga Motic Images 3.0 pildid. Edasiste lahjendatud proovide jaoks võeti eelmisest lahjendatud proovist pipetiga 25 µl proovi uude eppendorfi, lisati sellele 25 µl 35 %-list sahharoosi lahust ja segati. Saadi kaks korda suurema lahjendusega uus proov. Lahjendamist korrati kuni rekristallatsiooni pärssimist enam ei toimunud. Pilditöötlusprogrammiga Image J mõõdeti piltidelt jäÄkristallide suurused ja arvutati Ostwald'i valemi (valem 1) alusel jää kristallide kasvukiirus (Rahman et al. 2019). Saadud andmed kanti joonisele, kus x-teljel oli lahjenduse aste ja y- teljel kasvukiirus. Joonise põhjal saadud ruutvõrand lahendati ning selle kaudu leiti lahjenduse aste, kus 50% maksimum kasvukiirusest oli jää rekristalliseerimine inhibeeritud.

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

kus r = keskmise jää kristallide raadius katse lõpus, µm

r_0 = jää kristallide raadius katse alguses, µm

k = jää kristallide kasvukiirus, µm³/min

t = aeg, min.

3.2.3 Taigna ettevalmistamine

Taigna retseptuur on võetud juhendist Laos, Traksmaa (2016) ning need valmistati vastavalt tabelis 2 välja toodud retseptidele. Taignate külmutamise osa teostati väikese modifikatsioonidega Zhao et al. (2008) artikli põhjal.

Tabel 2. Retseptuurid

Tooraine	Kontroll (veega)	1x valgulahuse kontsentra- tsioon	1/2 valgulahuse kontsentra- tsioon	1/4 valgulahuse kontsentra- tsioon	1/8 valgulahuse kontsentra- tsioon	1/16 valgulahuse kontsentra- tsioon
Nisujahu, g	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Pärm, g	33	33	33	33	33	33
Sool, g	17	17	17	17	17	17
Suhkur, g	47	47	47	47	47	47
Küpsetus- margariin, g	33	33	33	33	33	33
Vesi, g	527	0	263	395	461	494
Valgulahus, g	0	527	263	132	66	33

Toorainena tabelis 2 nimetatud valgulahus oli kultiveerimisel saadud supernatant, mis sisaldas jääga seonduvaid valke. Veena kasutati kraanivett. Kokku oli 6 erinevat taignapartiid ja ühest partiist valmistati 45 taignapallid. Jooniselt 5 on näha ühe partii kogus.



Joonis 5. Taignapartii enne kiirkülmutamist

Alustuseks segati pärm suhkruga ning 2/3 taigna valmistamiseks ettenähtud toasooja vedelikuga. Taigna valmistamiseks lisati väljakaalutud nisujahule eelnevalt valmistatud pärimi-suhkru-vedeliku segu, sool, toasoe vedel küpsetusmargariin ja ülejäänud vedelik. Taignamass segati taignasegajaga Kitchen Aid Heavy Duty 5KPM5 esimesel kiirusel (60 rpm) 2 minutit ja seejärel teisel kiirusel (90 rpm) 3 minutit. Järgnevalt jagati taigen $80 \pm 0,2$ g pätsideks, vormiti pallikesteks, pakendati toidukileesse ja külmutati kiirkülmutis Foster Surf Navigation -18 °C juures 3 tundi. Seejärel tösteti taignapallid -18 °C sügavkülma ja säilitati seal kuni analüüsimiseni. Katse kestvus oli 56 päeva ja

proove analüüsiti iga kahe nädala tagant. Enne analüüsimist sulatati taignapallid 4 °C -ses külmkapis 15 tundi.

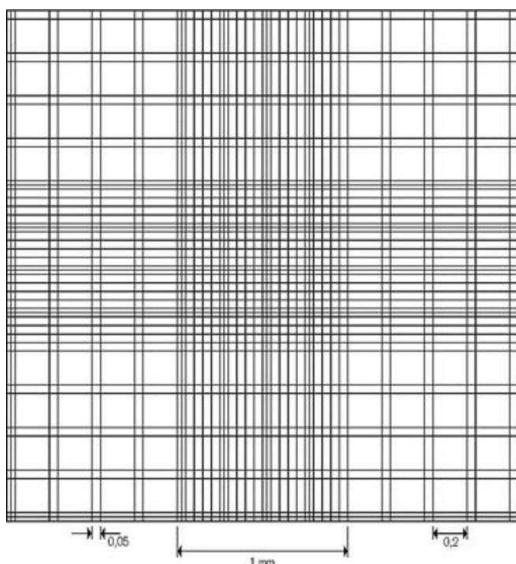
3.2.4 Pärmi elujõulisse määramine

Taigna kerkimise parameetrid pärmi elujõulisse määramiseks võeti artiklist Zhao et al. (2022). 80-grammne ülessulatatud taignatükk pandi vormi ning asetati ahju Metos System Rational HCPC 32 °C ja 80 % õhuniiskuse juurde 45 minutiks kerkima. Pärmi elujõulisse määramiseks mõõdeti vormides taigna körgus joonlauaga enne ahju kerkima panekut ja pärast kerkimist. Iga partii mõõtmise ajapunkti kohta teostati 6 paralleeli.

3.2.5 Pärmi ellu jäämise määramine

Taigna ettevalmistus pärmi ellu jäämise määramiseks teostati artikli Zhao et al. (2022) alusel. 20,0 g ülessulatatud taignale lisati 180 ml destilleeritud vett ja segati magnetsegajaga минприбор cccp MM3M ja MM-5 30 minutit. Seejärel lasti segul 15 minutit settida. Eelnevalt lahjendati metüleensinise kontsentsraat destilleeritud veega vahekorras 1:5. Järgnevalt pipeteeriti 1 ml eppendorfi 0,4 ml taignasuspensiooni ja 0,4 ml lahjendatud metüleensinist ning segati Vortexiga 10 minutit. Iga taignapartii mõõtmise kohta teostati 3 paralleeli.

Mikroskoobiga vaatlemiseks kasutati Bürkeri kambrit, kus 10 µl eelnevalt valmistatud lahus pipeteeriti katteklaasiga kaetud Bürkeri kambrisse nii, et lahus voolas Bürkeri kambri ja katteklaasi vahelle. Saadud lahus vaadeldi mikroskoobis 10x suurendusega. Mikroskoobis vaadeldes otsiti üles selline koht, kus asus Bürkeri kambri keskmine ruudustik (joonis 6).



Joonis 6. Bürkeri kamber (Thermo Fisher Scientific, 2022)

Motic Images 3.0 programmi abil tehti pildid, mis prinditi värviliselt. Käsitsi loendati suure ruudustiku sees oleva kolmes väikeses ruudustikus elus ja surnud rakud. Surnud rakud olid sinised ja elusad värvitud.

3.2.6 Saia küpsetamis- ja jahtumiskao leidmine

Peale taignapallide kerkimist ahjus Metos System Rational HCPC 32 °C 80 %-se õhuniiskuse juures 45 minutit, kaaluti kerkinud taignapallid koos vormiga kaaluga Radwag WLC 6/A2 0,01 g täpsusega. Seejärel küpsetati neid samades vormides Metos ahjus 12 minutit 210 °C ja 50 % õhuniiskuse juures. Koheselt pärast küpsetamist kaaluti saiad uuesti 0,01g täpsusega koos vormiga. Peale kaalumist lasti saia jahtuda vormis 1,5 h ja korrati kaalumist. Eelnevalt kaaluti ära ka vorm eraldi ning fikseeriti tulemused. Iga saia partii kohta mõõdeti mõõtmispäeval 4 paralleeli.

3.2.7 Saia mahu ja erimahu leidmine

Saiade erimaht määratati vastavalt Sharadanant ja Khan (2003) artiklile. Enne mõõtmist lasti 1,5 tundi saiadel jahtuda. Saiad kaaluti kaaluga Radwag WLC 6/A2 täpsusega 0,01 g. Saia mahu määramiseks kasutati spetsiaalseid 0,5 cm diameetriga silikageeli graanuleid. Mahu määramiseks täideti 1-liitrine keeduklaas graanulitega kriipsuni ja tasandati. Seejärel kallati $\frac{3}{4}$ graanulitest teise anumassee. Allesjääenud graanulitele asetati mõõdetav sai, valati peale graanulid ja tasandati kuni kriipsuni. Ülejääenud graanulid kallati 1-liitrisesse mõõtsilindrisse ja leiti nende maht, mis näitabki saia mahtu. Iga saia partii kohta mõõdeti mõõtmispäeval 5 paralleeli.

3.2.8 Taigna ja saia tekstuuri mõõtmine

Taigna ja saia tekstuuri mõõdeti tekstuuranalüsaatoriga TA-XT2i Stable Micro Systems ning tulemusi analüüsiti programmiga Texture Expert Exceed. Taigna mõõtmise parameetrid võeti artiklist Rodríguez-Sandoval et al. (2008). Taigna tekstuuri määramiseks vormiti ülessulanud taignast 10 mm läbimõõdu ja kõrgusega silindrikujuline taignatükk. Tekstuuranalüsaatoriga mõõtmiseks kasutati 25 mm läbimõõduga silindrikujulist mõõtepead P25. Taignatükki deformeeriti 30 %, kahe deformatsioonivaheline aeg oli 10 s ja testi kiirus oli 1 mm/s. Iga taignapartii kohta mõõtmispäeval teostati 5 paralleeli.

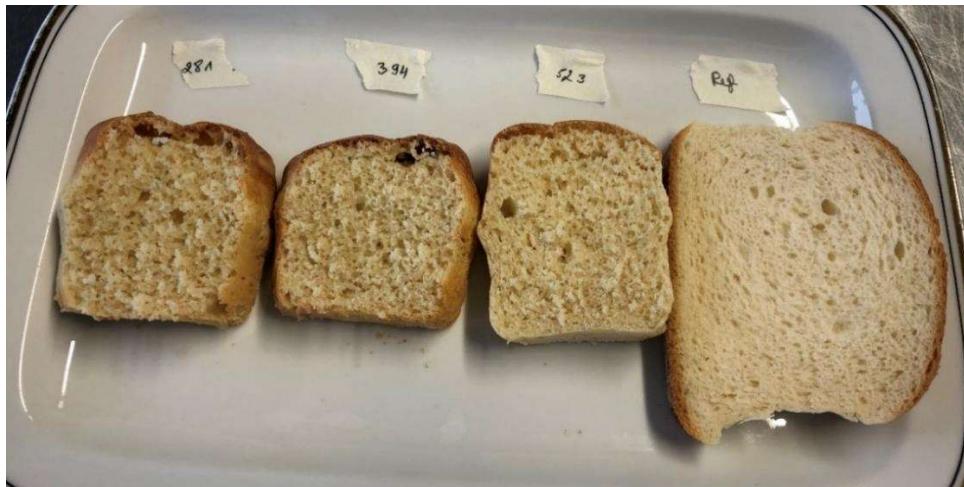
Saia mõõtmise parameetrid võeti artiklist Zhao et al. (2022). Saia tekstuuri määramiseks lõigati sama päeval küpsetatud ning eelnevalt 1,5 h jahtunud saiakukli keskmisest osast 25 mm paksune viil. Tekstuuranalüsaatoriga mõõtmiseks kasutati 36 mm läbimõõduga silindrikujulist mõõtepead P36R. Saitükki deformeeriti 40 %, kahe deformatsiooni vaheline aeg oli 5 sekundit ja testi kiirus 1 mm/s. Iga saia partii kohta teostati mõõtmispäeval 5 paralleeli.

3.2.9 Veeaktiivsuse määramine

Veeaktiivsuse määramise aluseks oli AACC (2000) metoodika. Saia veeaktiivsust määratati veeaktiivsus analüsaatoriga AquaLab S3 (Mettler Toledo) toatemperatuuril. Pool analüüsitsikust täideti samal päeval küpsetatud ja eelnevalt 1,5 h jahtunud uuritava saiaga ning asetati seadmesse mõõtmiseks. Iga saia partii kohta teostati mõõtmispäeval 5 paralleeli.

3.2.10 Saia sensoorne analüüs

Saiade sensoorseks analüüsiks lõigati samal päeval küpsetatud ja eelnevalt 1,5 h jahtunud saia keskmisest osast 1,5 cm paksune saiavil. Referentsiks kasutati eelneval päeval kaubandusketist ostetud Leiburi Kirde saia. Sensoorse analüüs taldrik on kujutatud joonisel 7, kus uuritavad saia partiid on märgitud kolmekohalise koodiga ja kõige parempoolne on referents sai.



Joonis 7. Sensoorse analüüsni taldrik

Sensoorse analüüsni käigus hindasid assessorid proovide välimust (sisu värvust, poorsust), aroomi (aroomi intensiivsust, haput, pärmiaroomi), struktuuri (elastsust, pudenevust, pehmust, kleepuvust, niiskust) ning maitset (maitse intensiivsust, haput, mõrut, soolast). Proove hinnati individuaalselt 10 palli skaalal. Hindamisleht on toodud lisas 1 ja värviskaala lisas 2. Assessoriteks olid Tallinna Tehnikaülikooli Toidutehnoloogia osakonna tudengid ja õppejõud. Assessoreid oli 6-8, need olid iganädalaselt samad ja saiade sensoorne analüüs toimus iganädalaselt samal kellaajal.

3.2.11 Statistiline analüüs

Eksperimentaalse töö käigus saadud tulemusi töödeldi Excelis ning arvutati tulemuste aritmeetiline keskmise ja standardhälve. Tulemuste piltlikustamiseks on need esitatud töös graafikutena. Graafikute tegemisel kasutati trendline'i, et visualiseerida paremini tendentsi, kuhu poole saadud tulemused liiguvad.

Pärmi ellu jäämise määramiseks leiti loendatud andmete alusel Excelis surnud ja elusate rakkude osakaalud protsentuaalselt. Koostati graafik, kus vaadeldi elusrakkude osakaalu muutumist mõõtmisperioodi jooksul, kus 0-punktiks võeti 80 %. Saia erimaht leiti saia mahu (cm^3) ja massi (g) suhte kaudu.

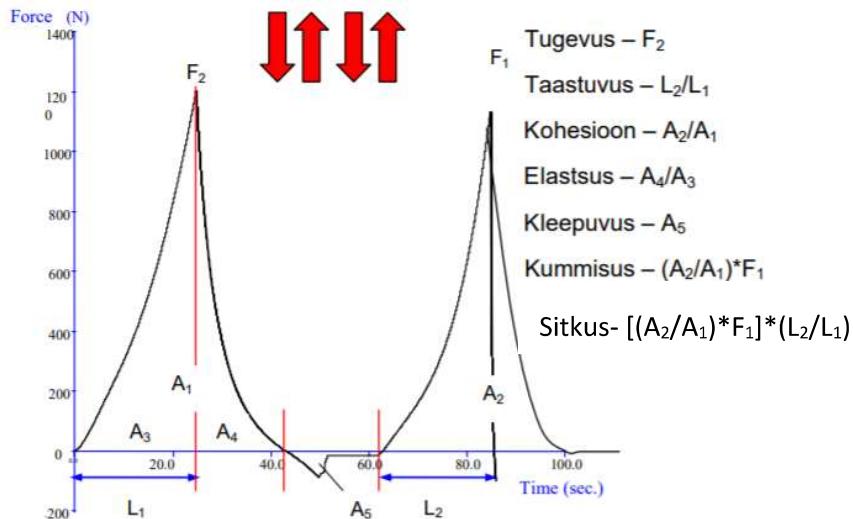
Küpsetamiskadu leiti valemi 2 abil, kus $K_{küps}$ – küpsetuskadu, %; G_{taigen} – taignatüki kaal vahetult enne ahju panemist, kg; G_{leib} – valmisseiva kaal peale küpsetust, kg. (Poikalainen et al., 2017)

$$K_{küps} = \frac{(G_{taigen} - G_{leib})}{G_{taigen}} \cdot 100\% \quad (\text{Valem 2})$$

Jahtumiskadu leiti valemi 3 abil, kus $K_{jahtumis}$ – jahtumiskadu, %; G_{kuum} – kuuma toote kaal, kg; $G_{jahtunud}$ – jahtunud toote kaal, kg. (Poikalainen et al., 2017)

$$K_{jahtumis} = \frac{(G_{kuum} - G_{jahtunud})}{G_{kuum}} \cdot 100\% \quad (\text{Valem 3})$$

Tekstuuri mõõtmisel arvutas programm Texture Expert Exceed välja piikide suurused. Saadud andmete alusel arvutati Excelis joonisel 8 välja toodud valemite põhjal uuritavad parameetrid: tugevus, taastuvus, kohesioon, elastsus, kleepuvus, kummisus ja sitkus. Elastsuse ja taastuvuse tulemused tehti ümber protsentideks.

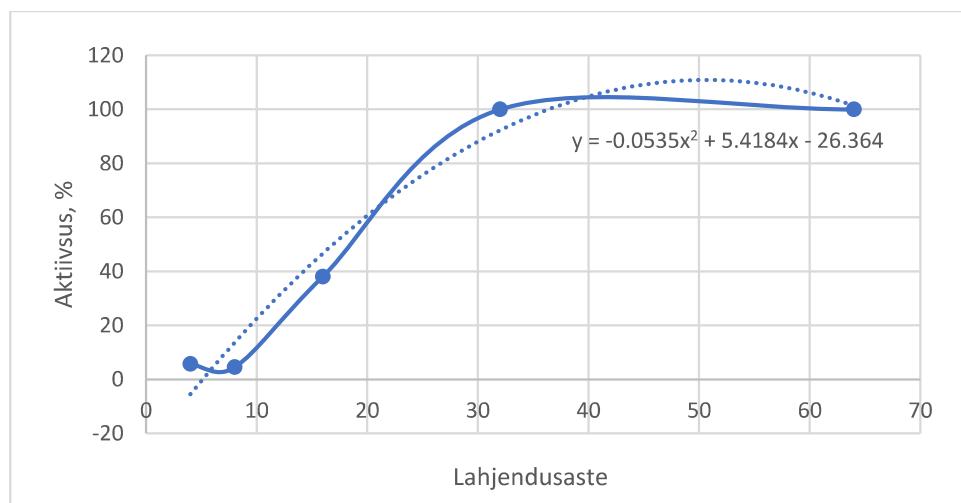


Joonis 8. Tekstuuri tulemuste mõõtmise joonis ja arvutamise valemid

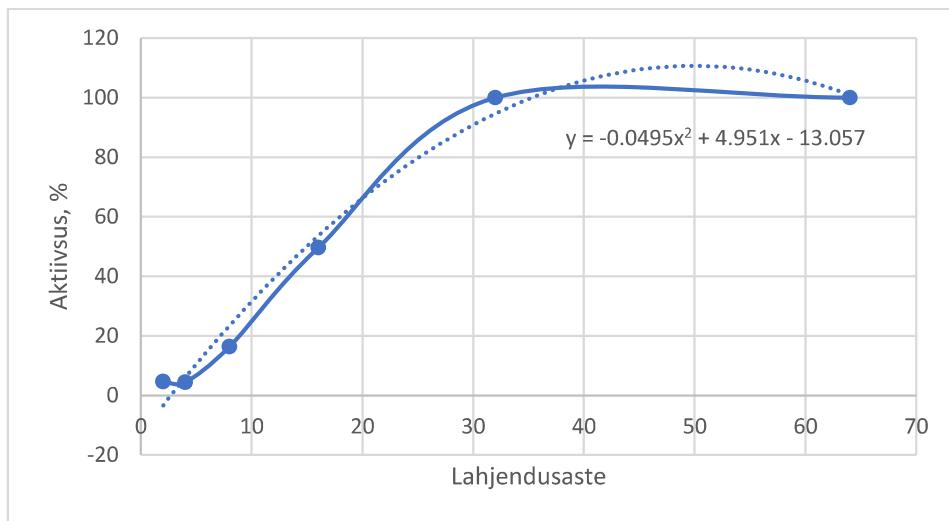
3.3 Tulemused ja arutelu

3.3.1 Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse määramine

Jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsuse leidmiseks joonestati saadud tulemuste alusel joonised 9 ja 10. Lahendati ruutvörrandid, kus leiti, et 10 g/L pärmiekstraktiga lahuse jäää rekristallatsioon oli inhibeeritud 50 % ulatuses 17 kordse lahjenduse korral (näha joonisel 9) ja 20 g/L pärmiekstrakti puhul 15 kordse lahjenduse korral (näha joonisel 10).



Joonis 9. 10 g/L pärmiekstraktiga jäää rekristallisatsiooni aktiivsus



Joonis 10. 20 g/L pärmeiekstraktiga jää rekristallisatsiooni aktiivsus

Kultiveerimisel saadud lahused segati kokku, kuna suurt erinevust lahuste vahel ei täheldatud. Taignapartiis kasutamisel otsustati saadud tulemuste põhjal, et 16-kordne valgulahjendus on maksimaalne, mis nisujahutaina ja küpsetatud saiade puhul võib veel jää kristalliseerumist inhibeerida.

3.3.2 Pärmi elujõulisus

Pärmi elujõulisuse määramisel mõõdeti vormides olevate taignapallide kõrgus enne ja peale kerkimist (joonis 11 ja 12) ning arvutati nende vahe. Jooniselt 11 on näha, et enne kerkimist olid taignapallid vormi asetades madalamad vormi servast ja pärast kerkimist (joonis 12) vormi servast kõrgemad.

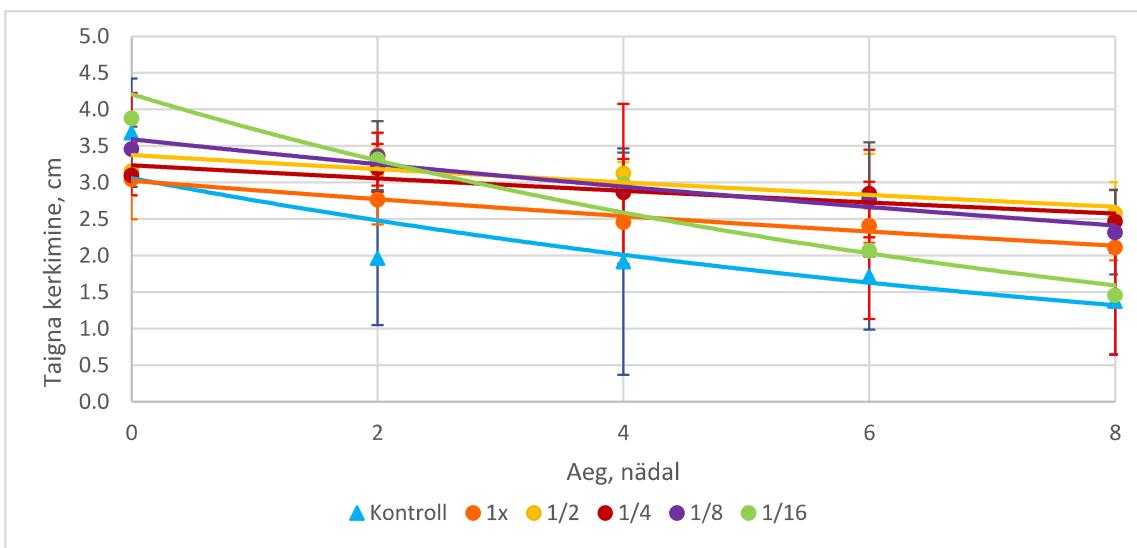


Joonis 11. Vormides olev taigen enne kerkimist



Joonis 12. Vormides olev taigen pärist kerkimist

Saadud tulemused kanti joonisele 13, kus on näha, et kõikide proovide kerkimisvõime langeb kaheksa nädala jooksul.

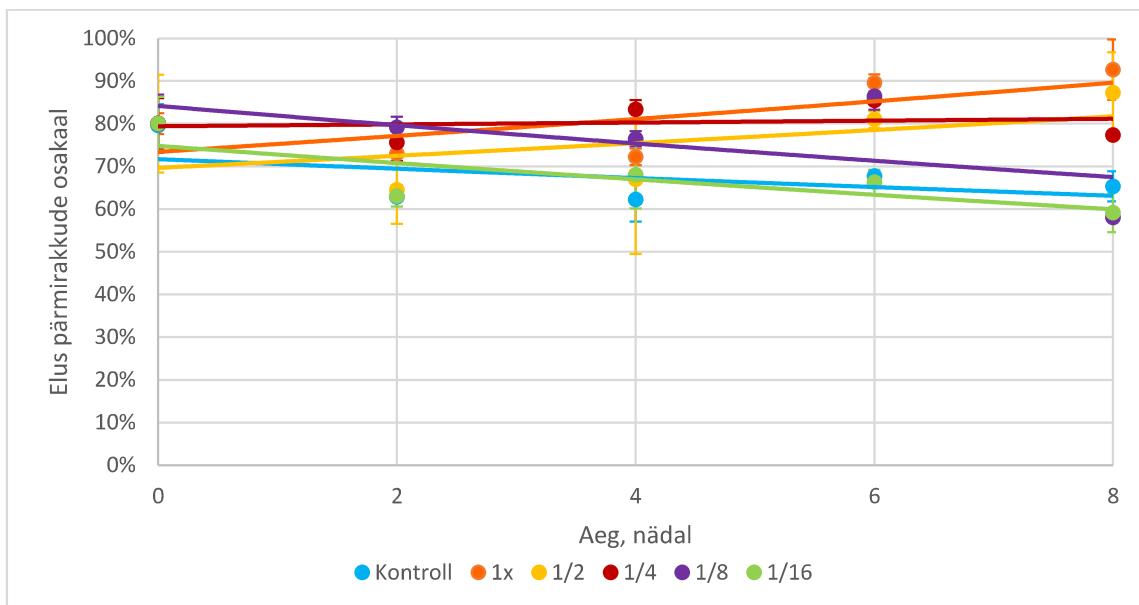


Joonis 13. IBP kontsentratsiooni mõju saiataigna kerkimisele säilimisel

Suurimad langused kaheksa nädala jooksul toimusid kontrollproovil ($3,68 \pm 0,74$ cm-lt $1,38 \pm 0,74$ cm-ni) ja kõige väiksema (1/16) valgulahuse kontsentratsiooniga proovil ($3,88 \pm 0,34$ cm-lt $1,46 \pm 1,38$ cm-ni). Ülejää nud valgukontsentratsioonidega proovid kerkisid sarnaselt ning nende vahel suuri erinevusi ei tähetdatud. 1x valgulahuse kontsentratsiooniga proovi puhul oli näha 0,2-0,6 cm võrra madalamat kerkimist võrreldes 1/2, 1/4, 1/8 valgulahuse kontsentratsioonide puhul, mis võis olla tingitud 1x valgupartiiga taigna kleepuvusest ja toidukile külge kinni jäämisest. Vaadates tulemusi on näha, et kõrgemate valgukontsentratsioonide puhul on kaheksa nädala jooksul kerkimise langus väiksem ning alates 1/16 valgulahuse kontsentratsioonist saiataignas on tulemused sarnasemad kontrollproovile. Seega saab öelda, et kõrgema kui 1/16 IBP lahuse kontsentratsiooni kasutamine taignapartiis aitab säilitada pärm elujõulisust säilimisel.

3.3.3 Pärmi ellujäämine

Pärmi elus ja surnud rakkude määramisel loendati rakud manuaalselt ning elus pärmirakkude osakaal kogu pärmirakkude hulgast on nähtav joonisel 14.



Joonis 14. IBP kontsentratsiooni mõju saiataigna elus pärmirakkude osakaalule säilimisel

Jooniselt on näha, et suurimad elus pärmirakkude osakaalu langused kaheksa nädala jooksul toimusid kontrollpartiil ($14 \pm 7\%$), 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga partiil ($21 \pm 8\%$) ja 1/8 valgulahuse kontsentratsiooniga partiil ($22 \pm 11\%$). Arvestades muutuste standardhälvetega saab öelda, et teiste taignapartiide elus pärmirakkude osakaal jäi kaheksa nädala jooksul samaks. Saadud tulemused näitavad, et suurem kui 1/8 valgulahuse kontsentratsioon taignapartiides kaitseb pärmirakke külmumise eest ja seetõttu jäab külmununa säilitamisel rohkem rakke ellu.

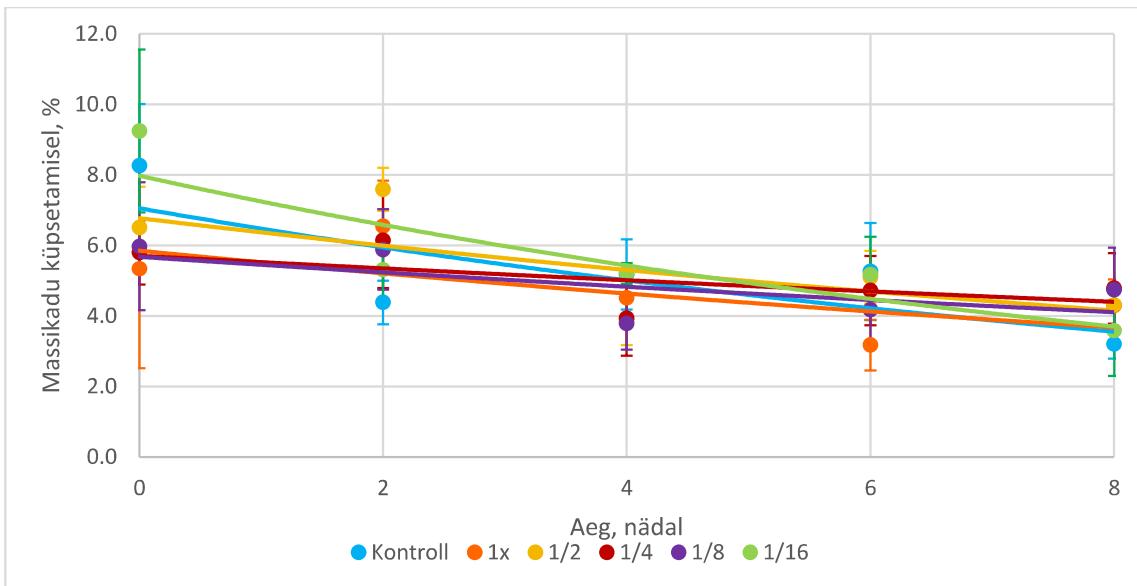
3.3.4 Saia küpsetamiskadu

Saia küpsetamiskadu on tingitud vee väljaaurumisest, CO_2 ja lenduvate orgaaniliste ühendite (aldehydid, lenduvad orgaanilised happed jt.) eraldumisest küpsetamisel (Poikalainen et al., 2017). Optimaalseks küpsetuskaoks loetakse 6-14%, mis on seotud aurustumise pindala suurusega (Poikalainen et al., 2017). Küpsetatud saiad on kujutatud joonisel 15, kus on näha 1/2, 1/4 ja 1/8 valgulahuse kontsentratsiooniga saiasid. Pildilt on näha, et saiad on kerkinud üsna ühtlaselt, kuid esineb ka paar kehvemalt kerkinud saia, mis põhjustavad tulemustes suurema standardhälbe.



Joonis 15. Küpsetatud saiakesed

Jooniselt 16 on näha, et kahekse nädala jooksul jäid küpsetamiskao tulemused vahemikku $3,20 \pm 0,41\%$ kuni $9,24 \pm 2,31\%$. Saadud tulemused on optimaalses vahemikus või madalamad ning selle põhjuseks võis olla väike aurustumise pind või kõrgem küpsetuskambri suhteline õhuniiskus (50%).



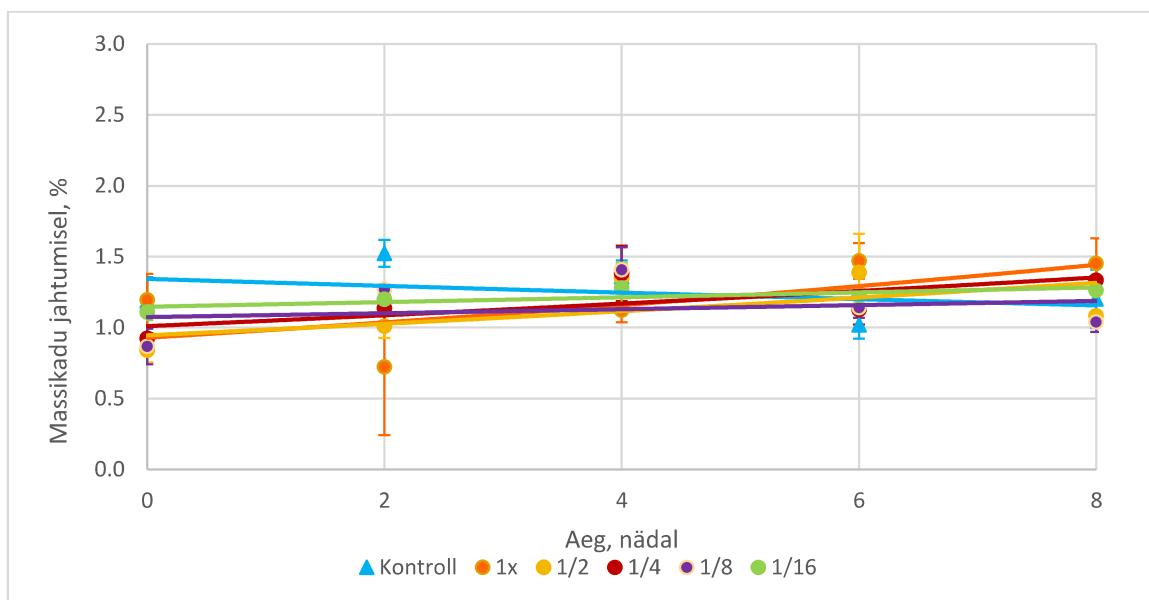
Joonis 16. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide massikaole küpsetamisel säilimise jooksul

Jooniselt 16 on näha, et algsest oli suurim massikadu 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga partiil ($9,24 \pm 2,31\%$) ja kontrollpartiil ($8,26 \pm 1,75\%$). See võis olla tingitud asjaolust, et külmutamisel kasvasid jääkristallid, mis põhjustasid gluteenivõrgustiku rebenemine, mistõttu sulatamisel ei liigu vesi tagasi oma algsesse kohta gluteenivõrgustikus, vaid eraldub küpsetamisel (Hua-Neng et al. 2009). 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga partii algne suurem massikadu võib olla seotud ka 0-punktis suurema kerkimisega (joonis 13), mistõttu oli suurem pind aurustumiseks. See pole siiski põhililine massikao põhjus, kuna sel juhul oleks ka kaheksanda nädala mõõtmisel 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga partiil ja kontrollproovil tunduvalt väiksem massikadu võrreldes teiste proovidega, aga nii see polnud. Üldiselt toimus köökide saiapartiide puhul kahekse nädala jooksul massikao vähenemine, mis võis olla tingitud madalamast kerkimisest (joonis 13) ja seetõttu oli

väiksem pind aurustumiseks. Vaadates joonis 16 tulemusi võib järelidata, et jääga seonduva valguga proovid, kus on kõrgem kui 1/16 valgulahuse kontsentratsioon tekivad väiksemad jäärakkid, mis ei kahjusta gluteenivõrgustikku ja seetõttu aurustub nende puhul küpsetamisel vähem vett.

3.3.5 Saia jahtumiskadu

Saia jahtumiskadu näitab jahtumisel vee ja muude ühendite eraldumist. Seda mõjutavad mitmed faktorid nagu toote niiskus, toote pind, kooriku paksus, mahajahutamise kiirus (Poikalainen et al., 2017). Mida suurem on toote niiskus ja pind, seda suurem on jahtumiskadu (Poikalainen et al., 2017). Samas, mida paksem on koorik ja kiirem mahajahutamine, seda väiksem jahtumiskadu (Poikalainen et al., 2017). Joonisel 17 on kujutatud saiapartiide massikadu jahtumisel, kus on näha, et erinevate partiide vahel suuri erinevusi ei ole.

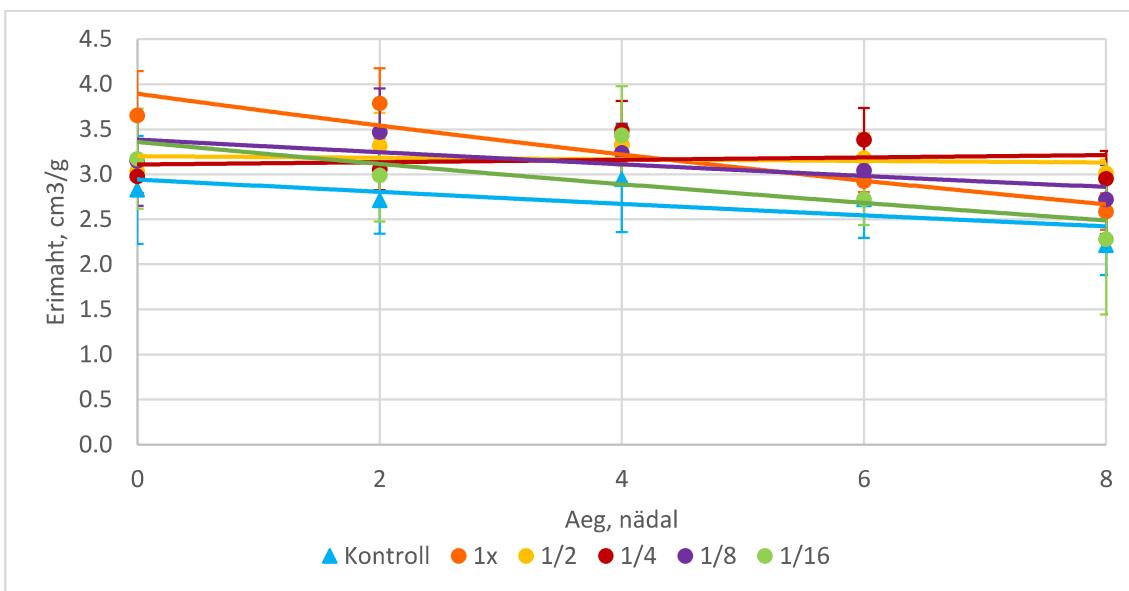


Joonis 17. IBP kontsentraatsiooni mõju saiapartiide massikaole jahtumisel säilimise jooksul

Jooniselt 17 on näha, et väikseim massikadu jahtumisel oli $0,72 \pm 0,48\%$ ja suurim massikadu $1,52 \pm 0,10\%$. Seega jääga seonduva valguga lahuse lisamine saiataignasse ei mõjuta oluliselt saia massikadu jahtumisel.

3.3.6 Saia erimaht

Saia erimahtu tulemused on leitavad joonisel 18, kust on näha, et 1/2 ja 1/4 valgulahuse kontsentraatsioonidega saiapartiide puhul ei toiminud ajas erimahtu vähenemist (vastavalt $3,00 \pm 0,11\text{ cm}^3/\text{g-lt}$ $3,00 \pm 0,15\text{ cm}^3/\text{g-ni}$ ja $2,98 \pm 0,19\text{ cm}^3/\text{g-lt}$ $2,95 \pm 0,31\text{ cm}^3/\text{g-ni}$). Teiste puhul on näha mõningast erimahtu vähenemist kaheksta nädala jooksul.



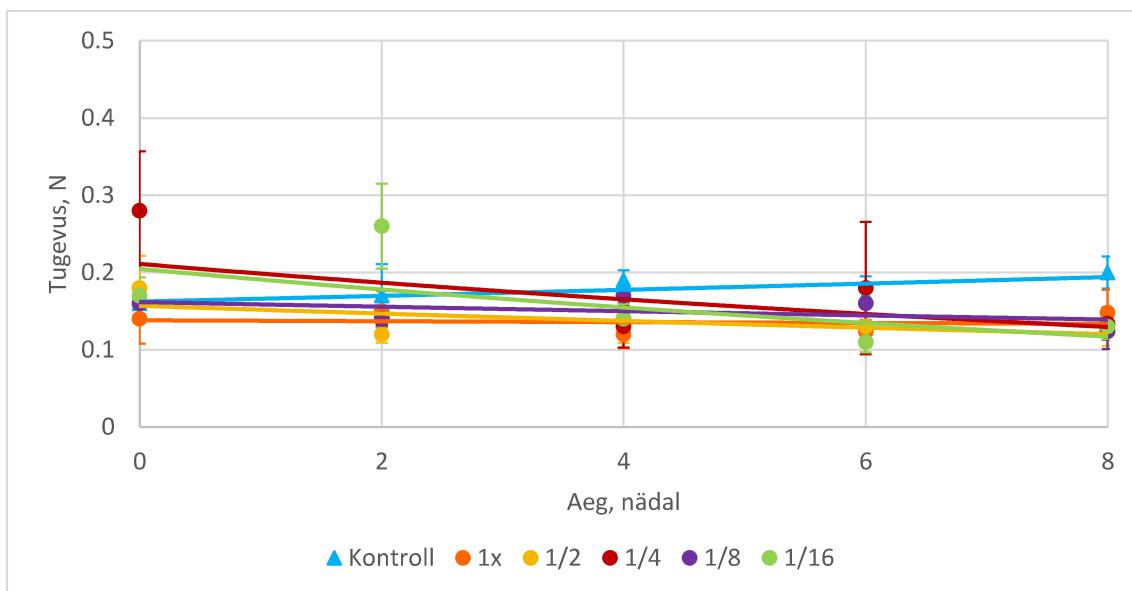
Joonis 18. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide erimahule säilimise jooksul

Tulemustest selgub, et kaheksanda nädala lõpuks on kontrollproovil ja 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga proovil võrreldes teistega madalam erimaht, olles vastavalt $2,21 \pm 0,33$ cm³/g ning $2,28 \pm 0,84$ cm³/g. Teiste jääga seonduva valguga saiapartiide erimaht jäab vahemikku $2,60 \pm 0,20$ cm³/g... $3,00 \pm 0,15$ cm³/g. Küpsetatud proovide erimahu vähenemine on tingitud kasvavate jäärakkide nõrgendavast mõjust gluteenivõrgustikule, mistõttu ei toimu piisav gaasi kinni hoidmine (Hua-Neng et al. 2009). Kokkuvõttes on näha, et kontrollproovil ja 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga proovil on veidi madalam erimaht võrreldes kõrgema valgulahuse kontsentratsiooni saiapartiidega, kuid suuri muutusi välja ei tulnud.

3.3.7 Taigna tekstuur

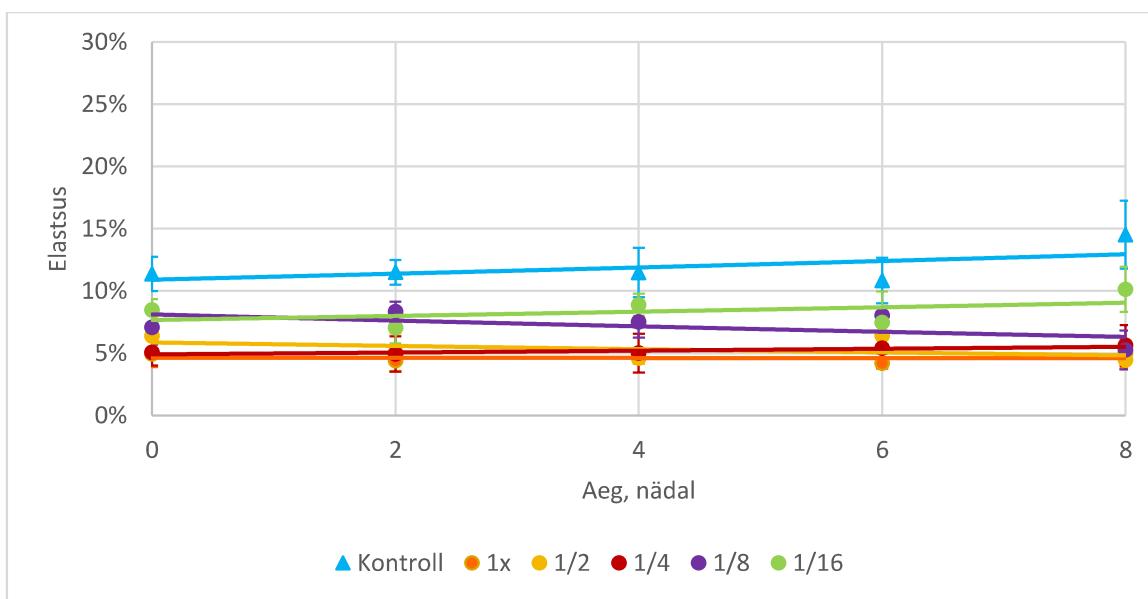
Taigna tekstuuri mõõtmise üheks probleemiks oli taigna kleepuvus. Seetõttu kasutati taignasilindrite valmistamisel lisajahu, mis mõjutas kleepuvuse andmeid. Siiski saab öelda, et mida suurem valgulahuse kontsentratsioon oli taignapartiis, seda kleepuvam see oli. Seega vajavad jääga seonduva valguga taignapartiid retsepti kohandamist, millesse tuleks lisada suurem kogus jahu.

Taigna tekstuuri mõõtmise tulemused on välja toodud joonistel 19-22. Joonisel 19 on näha, et esimesel mõõtmisel olid taigna tugevused vahemikus $0,14 \pm 0,03$... $0,28 \pm 0,08$ N ning kaheksanda nädala mõõtmisel vahemikus $0,12 \pm 0,02$... $0,20 \pm 0,02$ N. Seega võib öelda, et taigna tugevused aja jooksul oluliselt ei muutunud. Ainuke erinevus on see, et valgulahuse kontsentratsiooniga taignapartiide tugevus kahekste nädala jooksul püsib ühtlasena või langes näiteks 1/4 valgulahuse kontsentratsiooniga partii puhul $0,28 \pm 0,08$ N-lt $0,13 \pm 0,02$ N-nini, kuid kontrollpartiil taigna tugevus tõusis $0,16 \pm 0,02$ N-lt $0,20 \pm 0,02$ N-nini. Antud tulemused näitavad, et jääga seonduva valgu lisamine taignasse aitab hoida säilimisel tainast pehmemana, mistõttu on seda kergem hiljem vormida.



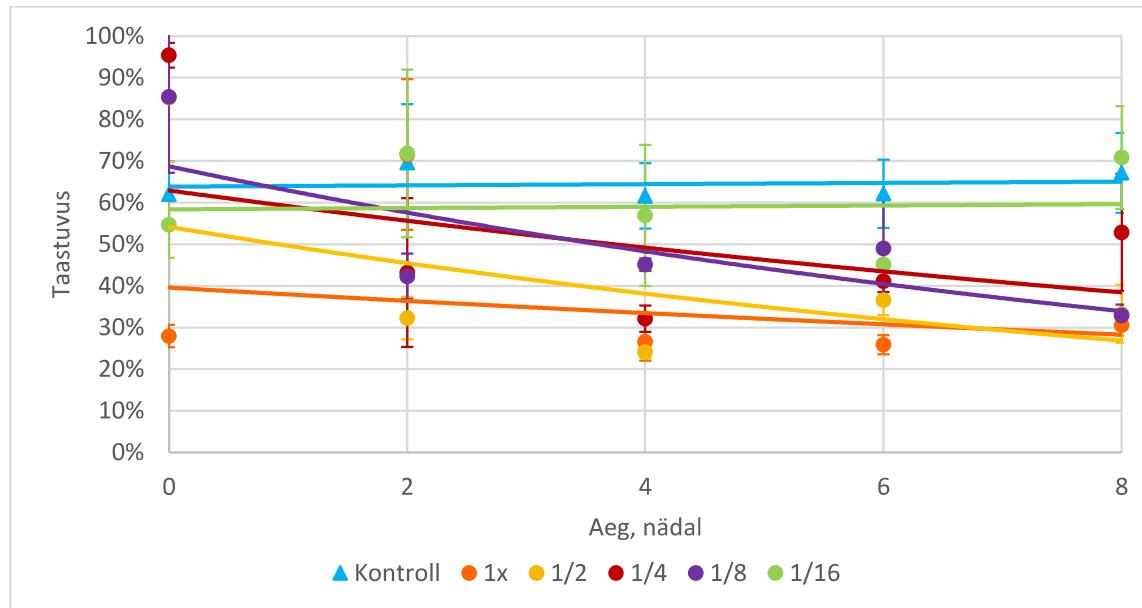
Joonis 19. IBP kontsentratsiooni mõju taignapartiide tugevusele säilimise jooksul

Joonisel 20 on kujutatud taina elastsust, kus on näha üldiselt, mida suurem oli jääga seonduva valgulahuse kontsentratsioon taignapartiis, seda vähem elastsem tainas oli. 1/16 valgulahuse kontsentratsiooni ja kontrollproovi puhul on näha kaheksa nädala jooksul väikest elastuse tõusu vastavalt $8 \pm 1\%$ -lt $10 \pm 2\%$ -ni ja $11 \pm 1\%$ -lt $15 \pm 3\%$ -ni. Teiste puhul jäab elastsus kaheksa nädala jooksul samaks või langeb. Tainaste puhul on kõrgem elastsus pigem hea omadus, sest see kergendab vormimist ja vähendab aukude tekke rullimisel. Antud IBP taignapartiide puhul, kus on kõrgem kui 1/16 valgulahuse kontsentratsioon, saaks elastust parandada algsesse taignapartiisse lisajahu lisamisega. Sel viisil oleks tekkiv gluteenivõrgustik tugevam ning ka tainas elastsem. Suurema kui 1/8 valgulahuse kontsentratsiooniga taignapartiide eeliseks oli elastuse ühtlane püsivus kaheksa nädala jooksul.

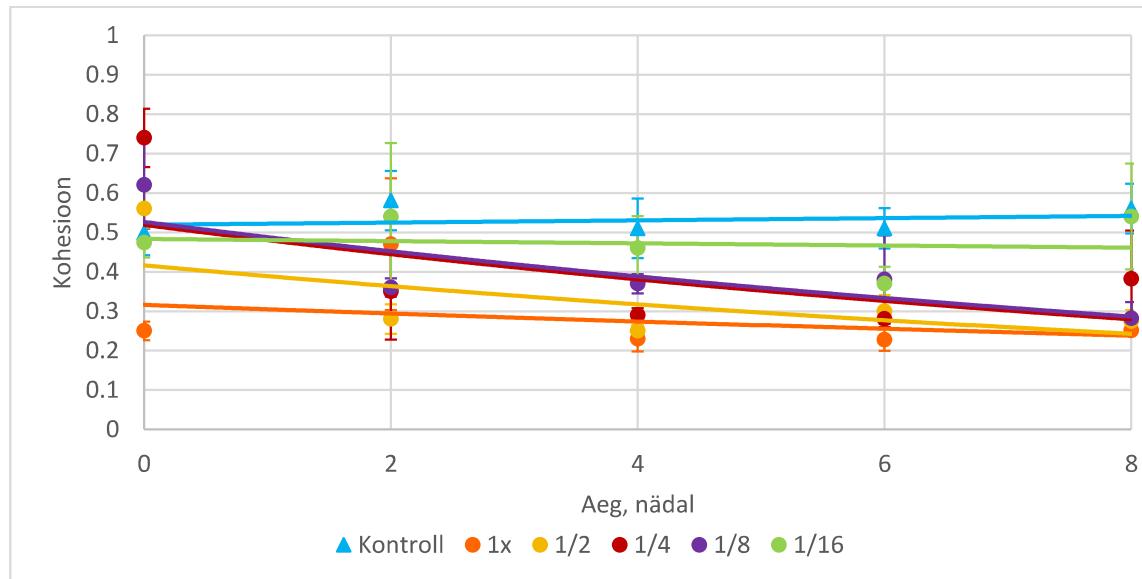


Joonis 20. IBP kontsentratsiooni mõju taignapartiide elastsusele säilimise jooksul

Joonisel 21 ja 22 on näha taigna taastuvuse ja kohesiooni tulemused kahekra nädala jooksul. Taastuvus näitab katsekeha võimet taastada oma esialgset kuju ja ruumala pärast esimest deformatsiooni ja kohesioon näitab sisemiste sidemete tugevust.



Joonis 21. IBP kontsentratsiooni mõju taignapartiide taastuvusele säilimise jooksul



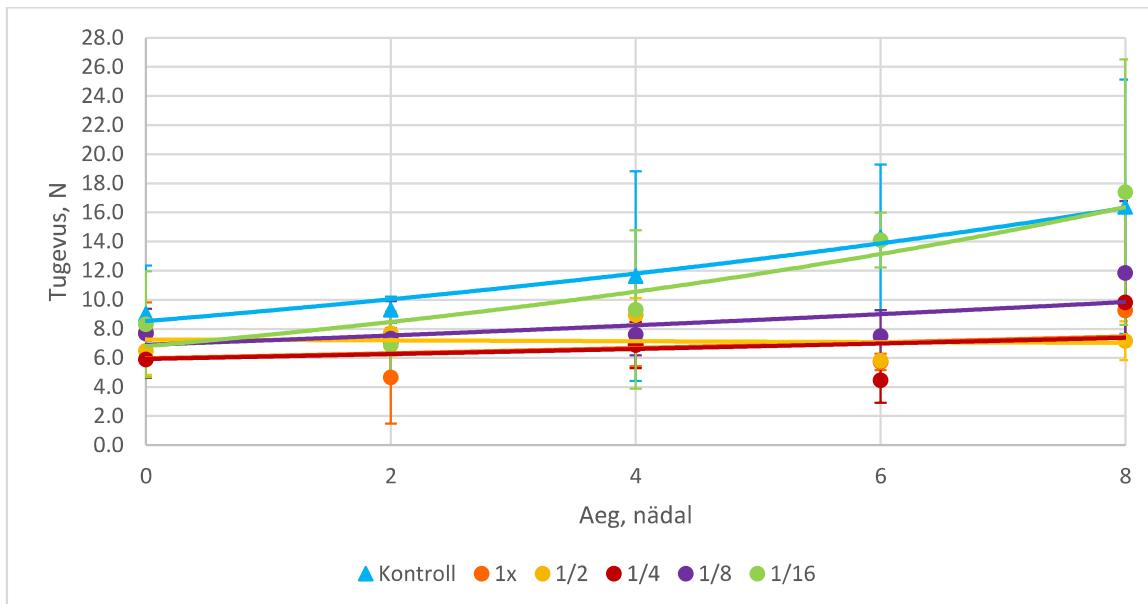
Joonis 22. IBP kontsentratsiooni mõju taignapartiide kohesioonile säilimise jooksul

Taastuvuse ja kohesiooni tulemustest on näha, et kontrollproov ja 1/16 valgulahusega proov käituvad sarnaselt, jäädnes kahekra nädala jooksul samaks või töustes veidi ning suurema IBP kontsentratsiooni puhul tulemused langevad. 0-punkti mõõtmisel oli 1x valgulahuse kontsentratsiooniga taignapartii madalam taastuvus, olles kõigest $28 \pm 3\%$ ja kohesioon $0,25 \pm 0,02$. Teiste taignapartiide tulemused olid 0-punktis suhteliselt sarnased. Kaheksanda nädala mõõtmisel selgus, mida suurem on IBP lahuse kontsentratsioon taignapartiis, seda madalam taastuvus ja kohesioon. Suurema IBP lahuse kontsentratsiooniga taignapartiide madalamate ja

kehvemate tulemuste põhjuseks võis olla kleepuvam tainas ning taigna tegemisel kehvem gluteenivõrgustiku tekkimine.

3.3.8 Saia tekstuur

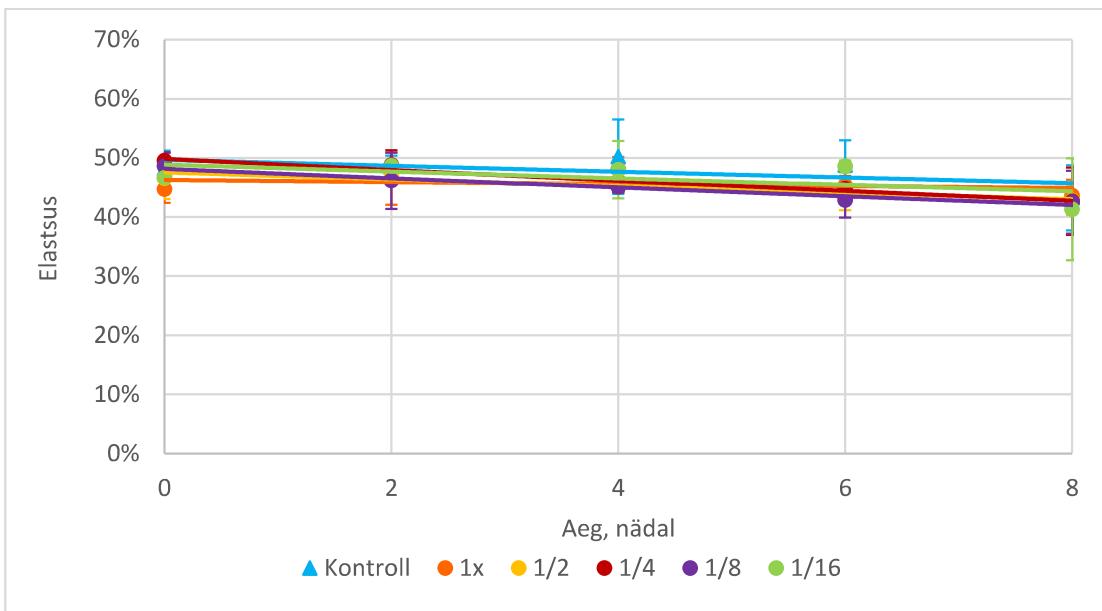
Saiapartiide tekstuuri mõõtmise tulemused on nähtavad joonistel 23-26. Suurimad erinevused olid tugevuses (joonis 23).



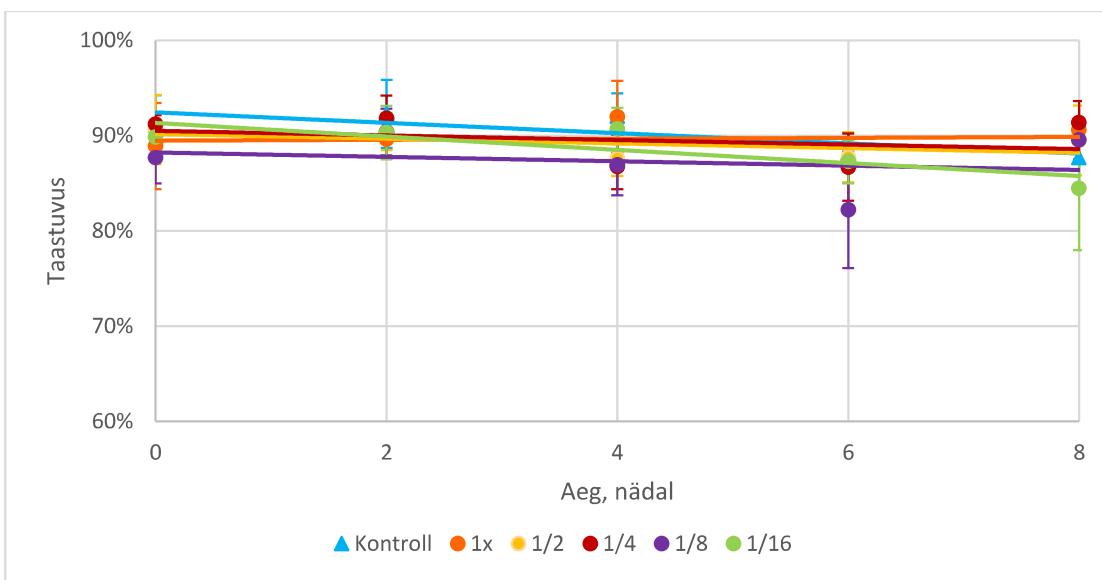
Joonis 23. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide tugevusele säilimise jooksul

Tugevuse puhul on näha, et esimesel mõõtmisel olid tulemused sarnased, kuid teistest veidi tugevama tekstuuriga olid kontrollpartii saiad ($9,04 \pm 3,32$ N) ja 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga saiad ($8,32 \pm 3,64$ N). Kaheksa nädala jooksul nende saiapartiide tugevused tõusid tunduvalt vörreldes ülejäänud partiidega. Kontrollpartii saiade tugevus oli katse lõpuks $16,40 \pm 8,74$ N ja 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga partii $17,40 \pm 9,12$ N. Teiste kõrgema valgulahuse kontsentratsiooniga saiapartiide tulemused tõusid kaheksa nädala jooksul väga vähe. Seega üldiselt, mida kõrgem IBP lahuse sisaldus saiapartiis, seda pehmemed püsivad saiad säilivusel. Selle põhjuseks võib olla jääriskallide kasvu takistamine IBP-de poolt, mistõttu säilib gluteenivõrgustik ja paraneb gaasihindmisvõime.

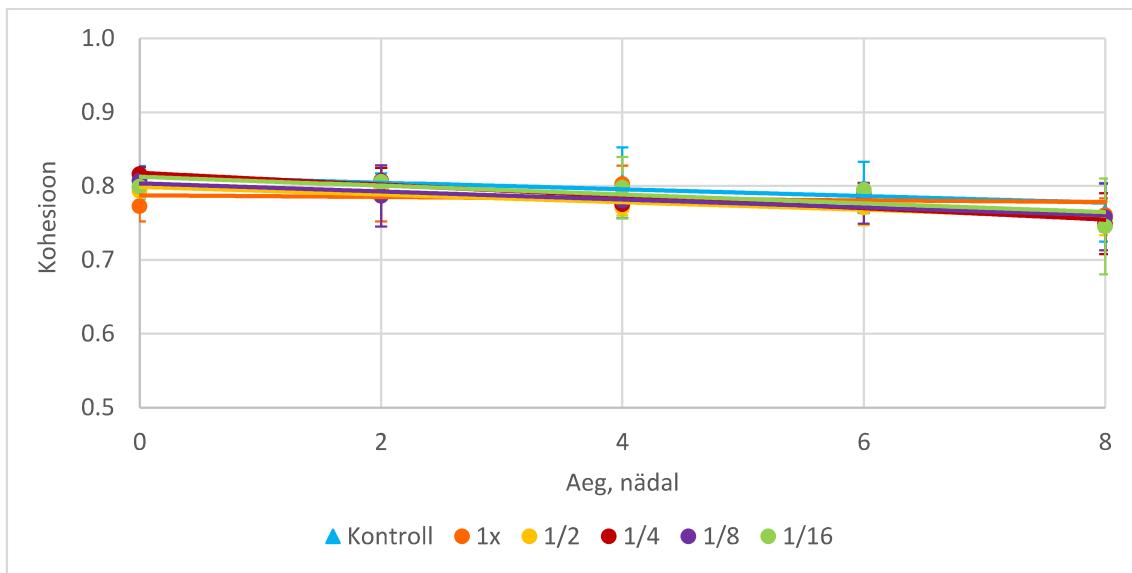
Saia elastuse, taastuvuse ja kohesiooni tulemused on kujutatud joonistel 24-26, kus on näha, et kõikide partiide 0-punkti tulemused on sarnased. Kaheksa nädala jooksul toimub saiapartiide elastuse, taastuvuse ja kohesiooni tulemistes väike langus, kuid tulemused püsivad ühtlased kõigi partiide puhul. Seega IBP lahuse lisamine taignapartiisse saiade elastusele, taastuvusele ja kohesioonile mõju ei avalda.



Joonis 24. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide elastsusele säilimise jooksul



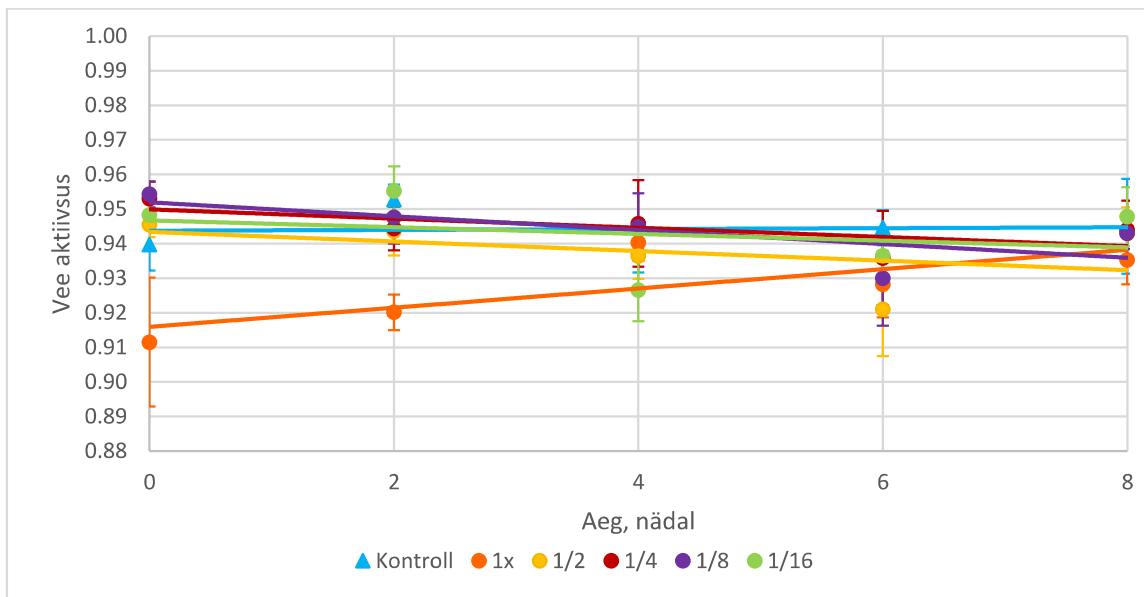
Joonis 25. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide taastuvusele säilimise jooksul



Joonis 26. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide kohesoonile säilimise jooksul

3.3.9 Saia vee aktiivsus

Kaheksa nädala jooksul mõõdetud saiade vee aktiivsuse tulemused on näha joonisel 27.



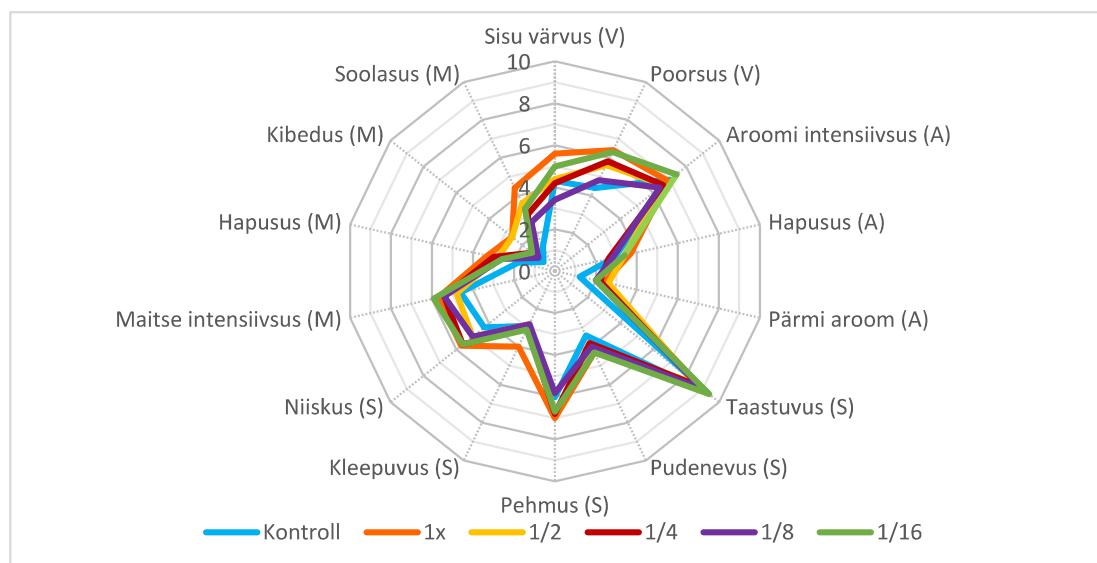
Joonis 27. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide vee aktiivsusele säilimise jooksul

Nullpunktis oli 1x valgulahuse kontsentratsiooniga saiapartii vee aktiivsus teistest tunduvalt madalam ($0,91 \pm 0,02$). Algne madalam vee aktiivsus võis olla tingitud asjaolust, et jääga seonduv valk seob paremini vett, mistõttu ei ole suurema valgulahuse kontsentratsiooniga partiis vesi nii kätesaadav. Samas madalamate valgulahuse kontsentratsioonide puhul sellist tendentsi ei täheldanud. Kaheksa nädala jooksul toimub 1x valgulahuse kontsentratsiooniga saiapartii puhul vee aktiivsuse kasv ja teiste puhul väike langus. Kaheksandal nädalal oli tulemused partiide lõikes väga sarnased, jäädES vahemikku $0,94 \pm 0,01$ kuni $0,95 \pm 0,01$. Saadud vee aktiivsuse tulemused on

kõrged ning toatemperatuuril säilitades on sobilikud mikroorganismide arenguks, sest enamus baktereid eelistavad kasvamiseks vee aktiivsust üle 0,91 ja hallitused üle 0,70 (FSMA, i.a).

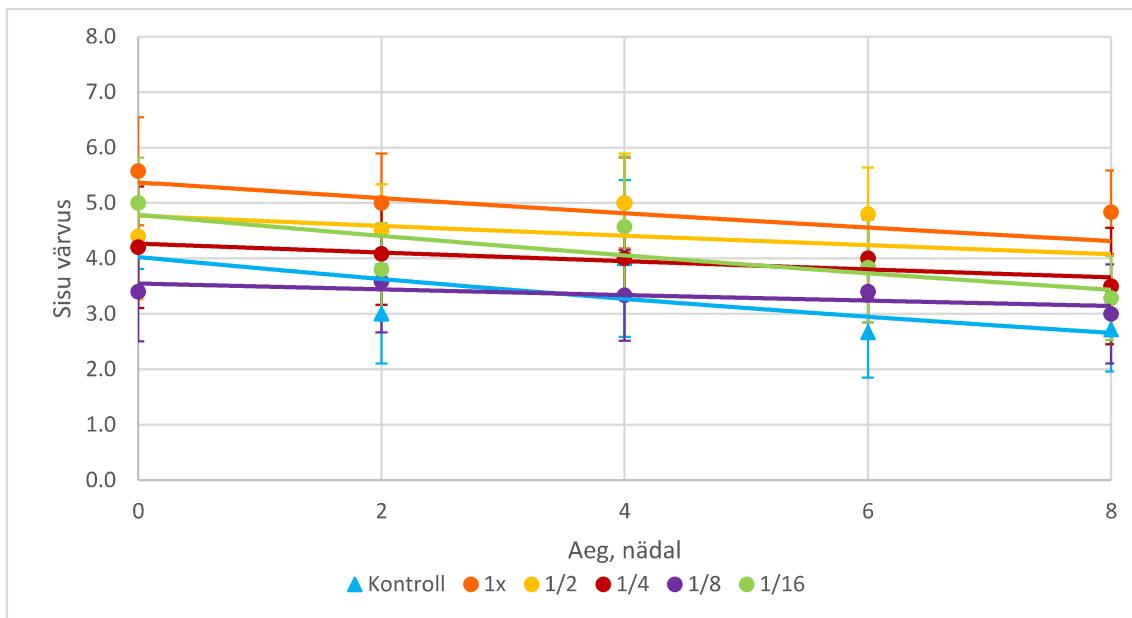
3.3.10 Saia sensoorne analüüs

Saiade sensoorse analüüsi hindamisleht on välja toodud lisas 1 ja saadud tulemused on kujutatud joonistel 28-32. Joonisel 28 on kujutatud kõik hinnatud sensoorse analüüsi parameetrid ning erinevate saiapartiide tulemused 0-punktis. Parameetrite taha on sulgudesse pandud, kas on hinnatud välimust (V), aroomi (A), struktuuri (S) või maitset (M). Jooniselt 28 on näha, et valgu lahuste lisamine taignapartiidesse mõjutas enim saiade sisu värvust, poorsust, kibedust ja soolasust.



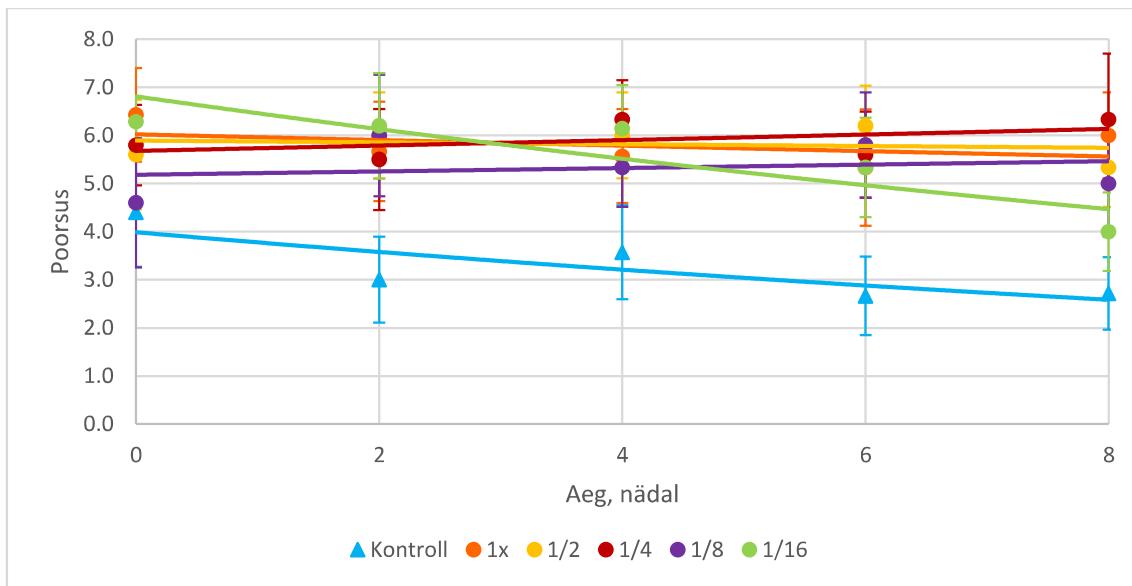
Joonis 28. Ämblikdiagramm IBP kontsentratsiooni mõjust sensoorse analüüsi parameetritele 0-punkti hindamisel

Joonisel 29 on näha assessorite poolt hinnatud sisu värvuse tulemusi. Sisu värvuse hindamiseks oli kasutusel värviskaala (lisa 2). Üldiselt on näha kõikide saiapartiide puhul, et kaheksta nädala jooksul muutus sisu värvus heledamaks. Selle põhjuseks võis olla järjestikustel nädalatel vähenenud kerkimisvõime (joonis 13), mistõttu küpsetamisel Maillard'i reaktsioon ei olnud nii tõhus. Üldiselt võib ka välja tuua, et mida suurema valgulahuse kontsentraatsiooniga olid saiapartiid, seda tumedam oli nende sisu värvus. Selle põhjuseks võis olla valguga lahuse enda tumedam värvus või ka küpsetamisel intensiivsem Maillard'i reaktsioon.



Joonis 29. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide sisu värvusele säilimise jooksul

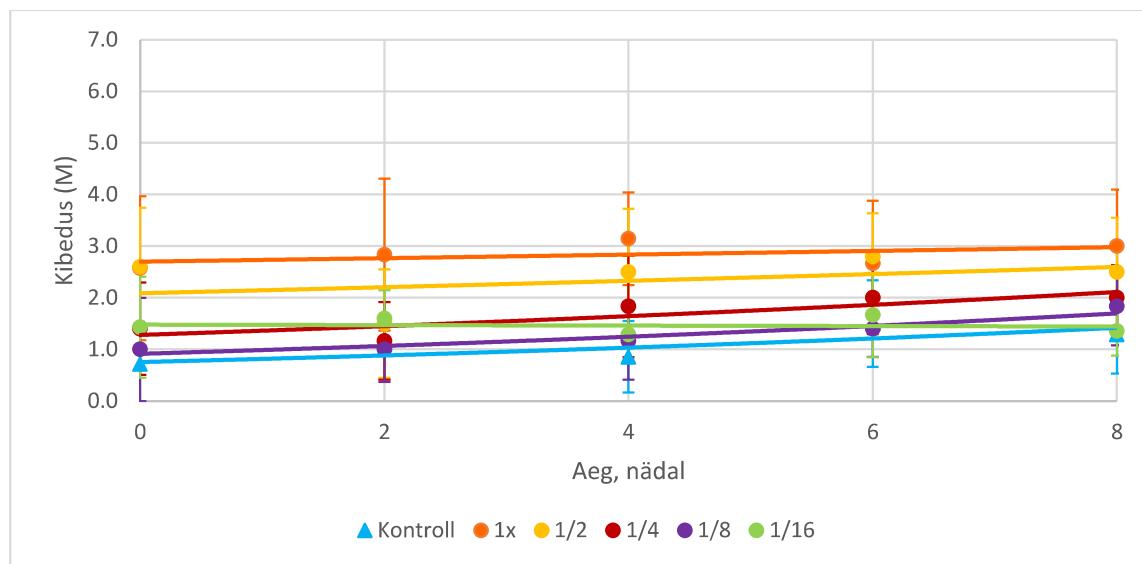
Joonisel 30 on kujutatud saiapartiide poorsuse muutus kaheksa nädala jooksul.



Joonis 30. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide poorsusele säilimise jooksul

Jooniselt 30 on näha, et kontrollpartii ja 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga saiapartii puhul langeb kaheksa nädala jooksul poorsus kõige rohkem. Kontrollpartii puhul 4.4 ± 1.1 -st 2.7 ± 0.8 -ni ja 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga partii puhul 6.3 ± 0.5 -st 4.0 ± 0.8 -ni. Selle põhjuseks võis olla järgestikustel nädalatel vähenenud kerkimisvõime (joonis 13), mis oli põhjustatud gluteenivõrgustiku rikkumisest kasvavate jäärakkide töltu. Kõrgemate kui 1/16 valgulahuse kontsentratsioonide puhul oli kaheksa nädala jooksul näha poorsuse stabiilsust. See näitab, et kõrgem kui 1/16 IBP lahuse kontsentratsioon aitab säilitada kaheksa nädala jooksul külmutatuna säilitamisel gluteenivõrgustikku, mistöttu püsib parem gaasi kinnihoidmine saiapartiides.

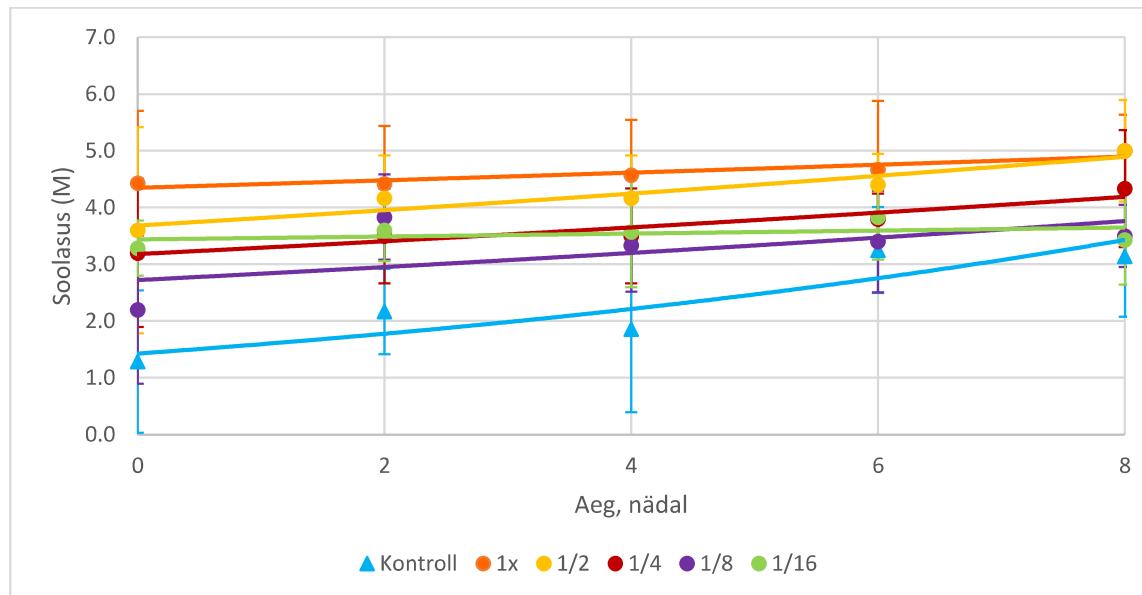
Joonisel 31 on kujutatud saiapartiide kibedus kaheksa nädalase säilivuse jooksul.



Joonis 31. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide kibedusele säilimise jooksul

Üldiselt püsivad kibeduse tulemused kaheksa nädala jooksul ühtlased. Väike tõus võib olla põhjustatud tajutava soolasuse kasvust, mis võimendab kibedust. Üldiselt on kibeduse tulemused madalad, jäädes kaheksa nädala välitel vahemikku $0,7 \pm 0,8$ kuni $3,0 \pm 1,1$. Kõrgema valgulahuse kontsentratsiooniga partiidel olid kõrgemad kibeduse tulemused, mis võis olla põhjustatud pärmiekstraktist, mida kasutati bakteri kultiveerimisel.

Joonisel 32 on kujutatud saiapartiide soolasuse tulemused.



Joonis 32. IBP kontsentratsiooni mõju saiapartiide soolasusele säilimise jooksul

Kaheksa nädala jooksul on näha kõikide saiapartiide puhul mõningast soolasuse kasvu. Suurimat soolasuse kasvu täheldati kontrollproovi puhul, kus soolasus tõusis $1,3 \pm 1,3$ -lt $3,1 \pm 1,1$ -ni. Tajutava

soolasuse tõus võis olla tingitud asjaolust, et järgestikustel nädalatel vähenes kerkimisvõime, mistõttu sama soola kogus jagunes väiksema pindala peale. Üldiselt tajuti kõrgema valgulahuse kontsentratsiooniga saiapartiide puhul kõrgemat soolasust, mis oli põhjustatud pärmiekstraktist, mida bakteri kultiveerimisel kasutati.

Lisaks kommentaaridena toodi välja, et 1x ja 1/2 valgulahuse kontsentratsiooniga saiade puhul täheldati intensiivset kõrvallõhna ja -maitset, mis ei ole nisujahust saiale omane, vaid pigem ebameeldiv.

3.4 Järeldused

Antud eksperimentaalse töö käigus selgus, et *Pseudomonas fluorescens* poolt produtseeritud jääga seonduv valk mõjutas külmutatud nisujahutaigna ja sellest valmistatud saia tulemusi kui taignapartiis kasutatava valgulahuse kontsentratsioon oli suurem kui 1/16. 1/16 valgulahuse kontsentratsioon taignapartiis käitus väga sarnaselt kontrollpartiiga ehk nende puhul suuri erinevusi ei täheldatud. Pärmi ellujäämise tulemustes oli näha, et pärmi elusrakkude osakaal kaheksa nädala jooksul säilis alates 1/4 valgulahuse kontsentratsiooniga taignapartii puhul.

Suurema kui 1/16 IBP lahuse kontsentratsioon taignapartiides aitas säilitada kaheksa nädala jooksul külmutatuna säilimisel pärmi elujõulisust ja ellujäämist, küpsetamiskadu oli madalam, saiade erimaht langes vähem, taigen ja sellest küpsetatud saiad püsised pehmemad, taina elastsus püsib ühtlasena ning säilis poorsus.

IBP lahuse kasutamine taignapartiides ei mõjutanud oluliselt jahtumiskadu, saiade elastsust, taastuvust, kohesiooni ja vee aktiivsust. Negatiivse poolena tähdeldati sensoorikas kibedust ja soolasust, mis oli ilmselt tingitud kultiveerimisel kasutatud pärmiekstraktist. Lisaks toodi välja, et 1x ja 1/2 valgulahuse kontsentratsiooniga saiadel oli ebameeldiv intensiivne körvallõhn ja -maitse. Kibedust, soolasust ja körvallõhna ning -maitset saaks minimeerida IBP lahusest väljapuhastamise teel.

Saadud tulemused osaliselt ühtsid kirjanduses leiduvaga, näiteks Zhang kolleegidega (2007 ja 2008) ning Liu kolleegidega (2018) leidsid samuti, et IBP lisamine taignapartiisse parandas taina kärimisvõimet, suurendas pärmi ellujäämist, langetas vähem saiade erimahtu ning küpsetatud saiad olid säilimisel pehmemad ja ühtlasemad. Zhao kolleegidega (2022) leidsid lisaks veel, et saiad olid poorsemad võrreldes kontrollpartiiga, mis ka antud töö puhul tuli senoorses analüüsits välja. Lisaks Liu kolleegidega (2018) tõid oma tulemustes välja, et saiade kohesioon ja elastsus olid kontrollpartiist kõrgemad, kuid antud töö raames saadud tulemustes IBP lahuse mõju saiade elastsusele ja kohesioonile ei olnud märgata.

Antud töö tulemusi võis mõjutada see, et ühte taignapartiid ei saadud teha korraga, vaid pidi kolmes osas. Seetõttu hakkasid esimese portsuna tehtud taignapallikesed kerkima juba teise portsu tegemise ajal. Kontrollproovi ja 1/16 valgulahuse kontsentratsiooniga taignapallid olid terve aja laua peal kuni kogu partii sai valmis (umbes 1 h), ülejäänud partiide taignapallid asetati vahepeal +4 °C-sesse külmkappi, kus sellele vaatamata oli näha kerkimist. See ilmselt mõjutas ka pärmi ellujäämise tulemusi, kuna tulemuste köikumine oli väga suur, mis oli tingitud eelkõige erinevast loetud pärmirakkude arvust. Paremad tulemused oleks saanud ilmselt, kui ühe taignapartii oleks saanud teha korraga ning igast mikroskoobis vaadeldud paralleelist oleks võetud ühe pildi asemel kolm pilti erinevast kohast.

Samuti oli probleemiks saiade küpsetamisel saiade kooriku alla tekkiv õhuvahe. See tekkis just eelkõige jääga seonduva valgulahusega saiapartiide puhul. Üldjuhul võis täheldada tendentsi, et mida suurem valgulahuse kontsentratsioon, seda suurem õhuvahe tekkis. Suurem õhuvahe tekkis ka esimestel nädalatel, kui kerkimine oli suurem. Üheks õhuvahe tekkimise põhjuseks võis olla kerkimisel või küpsetamisel liiga vähene õhuniiskus ahjus (Hawkins, 2016). Pealmine koorik moodustab tavalisest paksema kooriku, kuna see on paigale kinni jäänenud ja alumine tainas ei suuda

selleni jõudmiseks piisavalt üles kerkida, mistõttu tekibki ülejää nud taigna ja kooriku vahelle õhutasku (Hawkins, 2016). Samas võis ka kerkimisel taigen pealt ära kuivada, mistõttu ei saanud gaas seal välja, vaid jäi kinni ja tekitas õhutasku (Hawkins, 2016). Üheks põhjuseks võib olla liiga vähene sõtkumine või ebapiisav pinge vormimisel, mille tulemuseks on nõrk gluteenivõrgustik, mis ei hoia piisavalt süsihappegaasi kinni (The Bread Guide, 2022). Kokkuvõttes saab siiski öelda, et väikeste parenlustega retseptis, on *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav jääga seonduv valk sobiv külmutatud nisutaigna ja sellest valmistatud saia kvaliteedi parandamiseks.

Kokkuvõte

Külmutamise kaudu on võimalik toiduainete säilivusaega pikendada, mis võimaldab vähendada toidu raiskamist ja toidunappust kasvava rahvastiku toitmiseks. Seevastu külmutamisega kaasneb teatav ebasoovitav kvaliteedi langus. Üheks alternatiivseks lahenduseks on leitud jääga seonduva valgu kasutamine erinevates külmutatud toiduainetes, mis on näidanud potentsiaali kvaliteediomaduste parandamiseks.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida, kas ja kuidas mõjutab bakteri *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav jääga seonduv valk külmutatud nisujahutaigna kvaliteeti pärast ülessulatamist ja saia küpsetamist. Samuti oli eesmärgiks tuvastada, millised on olulisemad muutused, mida IBP-de kasutamine nisutaignast valmistatud pagaritootete puhul parandab. Sel viisil saab teada, kas *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav jääga seonduv valk sobib kasutamiseks külmutatud pagaritoodetes, andes eelise ka kvaliteediomaduste parandamiseks.

Antud eksperimentaalses osas uuriti *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetava jääga seonduva valgu mõju külmutatud nisujahutaignale ja sellest valmistatud saiadele erinevates kontsentratsioonides (1x, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16). Taignapartiisid säilitati -18 °C juures kaheksa nädalat, analüüse teostati iga kahe nädala tagant ning tulemusi võrreldi kontrollpartiiga. Analüüsiti kultiveeritud proovi jää rekristallatsiooni inhibitsiooni aktiivsust, pärmi elujõulisust ja ellujäämist, taina tekstuuri, saia küpsetamis- ja jahtumiskadu, erimahtu, tekstuuri, vee aktiivsust ja teostati senoorne analüüs.

Tulemustena leiti, et kõrgema kui 1/16 kontsentratsiooniga IBP lahuse lisamine taignapartiisse aitas kaheksa nädala jooksul säilitada pärmi elujõulisust, küpsetamiskadu oli madalam, erimaht langes vähem, taigen ja sellest küpsetatud saiad püsisiid pehmemed, taina elastsus püsisiid ühtlane ning säilis poorsus. IBP lahuse kasutamine taignapartiides ei mõjutanud oluliselt jahtumiskadu, saiade elastsust, taastuvust, kohesiooni ja vee aktiivsust. Negatiivse poolena täheldati senoorikas kibedust ja soolasust, mis oli ilmselt tingitud kultiveerimisel kasutatud pärmi ekstraktist. Lisaks toodi välja, et 1x ja 1/2 valgulahuse kontsentratsiooniga saiadel oli ebameeldiv intensiivne kõrvallõhn ja -maitse.

Antud töö käigus selgus, et bakteri *Pseudomonas fluorescens* poolt toodetav IBP sobib nisujahutaignast valmistatud pagaritoodete omaduste parandamiseks, kui selle kontsentratsioon on kõrgem kui 1/16. Edaspidi oleks põnev uurida, kas saadud tulemused pikemal säilimisel jäädavad samaks või on näha mingeid teisi tendentse.

Tänuavalused

Tahaksin tänada töö juhendajat Õnnela Luhilat eksperimentaalse osa juhendamise ning osavõtmise ja abistamise eest. Lisaks kommentaaride ja keelelise korrektsiooni teostamise eest.

Veel tahaksin tänada kaasjuhendajat Katrin Laost eksperimentaalse osa meetodite kokku panemise, lõputöö struktuuri ja keelelise korrektsiooni teostamise eest. Samuti nõuannete eest, mida antud töö puhul muuta ning täiustada. Lisaks tahaksin tänada oma teist kaasjuhendajat Anna Traksmaad eksperimentaalse osa nõuannete ja lõputöö keelelise korrektsiooni eest.

Samuti ei saa jäätta avaldamata tänu töö sensoorse analüüsiga assessoritele korraliku osavõtmise eest ning oma perele toetuse ja abipakkumise eest.

Kasutatud kirjandus

- American Association of Cereal Chemists (2000). Approved Methods of the AACC, 10th ed. Methods 08-01, 38-12, 44-15A, 46-16, 54-10, 54-28A, 54-40A, 55-21, 56-81B, 62-05, 74-09. The Association: St. Paul, MN.
- Bayer-Giraldi, M., Sazaki, G., Nagashima, K., Kipfstuhl, S., Vorontsov, D. A., Furukawa, Y. (2018). Growth suppression of ice crystal basal face in the presence of a moderate ice-binding protein does not confer hyperactivity. *National Academy of Sciences of the USA*, 115, (29), lk. 7479–7484.
- Baier-Schenk, A., Handschin, S., Conde-Petit, B. (2005). Ice in prefermented frozen bread dough—an investigation based on calorimetry and microscopy. *Cereal Chemistry*, 82, (3), lk. 251–255.
- Cai, L., Nian, L., Zhao, G., Zhang, Y., Sha, L., Li, J. (2019). Effect of herring antifreeze protein combined with chitosan magnetic nanoparticles on quality attributes in red sea bream (*Pagrosomus major*). *Food and Bioprocess Technology*, 12, (3), lk. 409-421.
- Cao, H., Zheng, X., Liu, H., Yuan, M., Ye, T., Wu, X., Yin, F., Li, Y., Yu, J., Xu, F. (2020). Cryo-protective effect of ice-binding peptides derived from collagen hydrolysates on the frozen dough and its ice-binding mechanisms. *LWT*, 109678.
- Cao, L., Huang, Q. et al. (2016). Neofunctionalization of zona pellucida proteins enhances freeze-prevention in the eggs of Antarctic notothenioids. *Nature Communications*, 7, (1), 12987.
- Chen, X., Cai, X., Wang, S., Wu, J., Yang, F. (2019). Recent progress and application prospects of antifreeze peptides in food industry. *Food Science*, 40, (17), lk. 337.
- 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. *Crit. Rev in Food Sci and Nutr*, 61, (20), lk. 3436-3449.
- Chen, X., Wu, J. H., Li, L., Wang, S. Y. (2017). 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 and Technology*, 243, (7), lk. 1149-1156.
- Damodaran, S., Wang, S. (2017). Ice crystal growth inhibition by peptides from fish gelatin hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 70, lk. 46–56.
- Davies, P. L. (2014). Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends in BioChem. Sciences*, 39, (11), lk. 548-555.
- DeVries, A. L., Cheng, C.-H. C. (1992). The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the survival of cold-water fishes. *Water and Life*, lk. 301–315.
- DeVries, A.L., Wohlschlag, D.E. (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 163, lk. 1073–1075.
- Ding, X. L., Zhang, H., Liu, W. H., Wang, L., Qian, H. F., Qi, X. G. (2014). Extraction of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen white salted noodles. *Food and Bioprocess Technology*, 7, (3), lk. 842-852.
- Ding, X. L., Zhang, H., Wang, L., Qian, H. F., Qi, X. G., Xiao, J. H. (2015). Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles. *Food Hydrocolloids*, 47, lk. 32-40.
- Elliott, G. D., Wang, S., Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, lk. 74–91.

- European Food Safety A. (2008). Safety of 'Ice structuring protein (ISP)-scientific opinion of the panel on dietetic products, nutrition and allergies and of the panel on genetically modified organisms. *Efsa J.*, 6, lk. 768.
- FSMA. (i.a). How water activity controls microbial growth.
<https://www.metergroup.com/en/meter-food/expertise-library/microbial-growth>
(23.05.2022)
- Hawkins, K. (2016). *Breadmaking: Essential Guide for Beginners*. IMM lifestyle books, 128.
- Hua-Neng, X., Weining, H., Chunli, J., Yangsoo, K., Huiping, L. (2009). Evaluation of water holding capacity and breadmaking properties for frozen dough containing ice structuring proteins from winter wheat. *J Cereal Sci*, 49, lk. 250–253.
- Hudait, A., Qiu, Y., Odendahl, N., Molinero, V. (2019). Hydrogenbonding and hydrophobic groups contribute equally to the binding of hyperactive antifreeze and ice-nucleating proteins to ice. *J. of the American Chemical Society*, 141, (19), lk. 7887–7898.
- Jia, C. L., Huang, W. N., Rayas-Duarte, P., Zou, Q. B., Zhang, L., Li, Y. Y. (2014). Hydration, polymerization and rheological properties of frozen gluten-water dough as influenced by thermostable ice structuring protein extract from Chinese privet (*Ligustrum vulgare*) leaves. *J. of Cereal Science*, 59, lk. 132-136.
- Jørgensen, S. K. K., Keskin, S., Kitsios, D., Commerou, P. W., Nilsson, B. (2008). *Antifreeze proteins: the applications of antifreeze proteins in the food industries*. Roskilde University, 54.
- Kaleda, A., Tsanев, R., Klesment, T., Vilu, R., Laos, K. (2018). Ice cream structure modification by ice-binding proteins. *Food Chemistry*, 246, lk. 164–171.
- Kashyap, P., Kumar, S., Singh, D. (2020). Performance of antifreeze protein HrCHI4 from *Hippophae rhamnoides* in improving the structure and freshness of green beans upon cryopreservation. *Food Chemistry*, 320, 126599.
- Kar, R. K., Bhunia, A. (2015). Biophysical and biochemical aspects of antifreeze proteins: Using computational tools to extract atomistic information. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 119, (2), lk. 194–204.
- Kawahara, H. (2002). The structures and functions of ice crystalcontrolling proteins from bacteria. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 94, (6), lk. 492–496.
- Kiani, H., Sun, D.-W. (2011). Water crystallization and its importance to freezing of foods: a review. *Trends Food Sci Technol*, 22, lk. 407–426.
- Knight, C.A. (2000). Structural biology. Adding to the antifreeze agenda. *Nature*, 406, lk. 249-251.
- Kong, C. H. Z., Hamid, N., Liu, T., Sarojini, V. (2016). Effect of Antifreeze Peptide Pretreatment on Ice Crystal Size, Drip Loss, Texture, and Volatile Compounds of Frozen Carrots. *J. Of Agricult. and Food Chemistry*, 64, (21), lk. 4327–4335.
- Kong, C. H. Z., Hamid, N., Ma, Q., Lu, J., Wang, B.-G., Sarojini, V. (2017). Antifreeze peptide pretreatment minimizes freeze-thaw damage to cherries: An in-depth investigation. *LWT*, 84, lk. 441–448.
- Kontogiorgos, V., Goff, H. D., Kasapis, S. (2008). Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical properties of frozen flour-water mixtures. *Food Hydrocolloids*, 22, (6), lk. 1135-1147.
- Laos, K., Traksmaa, A. (2016). Taimse toorme töötlemine. Juhend. Tallinna Tehnikaülikool, Keemia ja biotehnoloogia instituut, lk 46.

- Lee, S., Lee, J. H., Kim, H. W., Hong, J. W. (2018). Properties of phase transition of ice binding protein from Arctic yeast (LeIBP) utilizing differential scanning calorimetry (DSC) and Raman spectroscopy. *Cryobiology*, 85, lk. 33–38.
- Li, S., Dickinson, L. C., Chinachoti, P. (1998). Mobility of “unfreezable” and “freezable” water in waxy corn starch by ^2H and ^1H NMR. *J. of Agricult. and Food Chemistry*, 46, (1), lk. 62-71.
- Liu, K., Wang, C., Ma, J., Shi, G., Yao, X., Fang, H., Song, Y., Wang, J. (2016). Janus effect of antifreeze proteins on ice nucleation. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sci-s*, 113, (51), lk. 14739–14744.
- 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-Food Sci. and Tech.*, 96, lk. 543–550.
- Payne, S. R., Sandford, D., Harris, A., Young, O. A. (1994). The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. *Meat Sci.*, 37, lk. 429–438.
- Poikalainen, V., Tatar, V., Laikoja, K., Traksmaa, A., Laos, K., Lepasalu, L., Soidla, R., Andreson, H., Veri, K., Mahla, T. (2017). *Toiduainete tehnoloogia*. Tartu: Audiomeister OÜ, 821.
- 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).
- Ramlov, H., Friis, D. S. (2020). *Antifreeze proteins volume 2, biochemistry, molecular biology and applications*. Šveits: Springer, 364.
- Raymond, J.A. (2011). Algal ice-binding proteins change the structure of sea ice. *Proc. Natl. Acad. Sci .U.S.A.*, 108, lk. 198.
- Raymond, J. A., Fritsen, C., Shen, K. (2007). An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 61, (2), lk. 214–221.
- 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), lk. 713–722.
- Rubiolo, A. C. (2000). Evaluation of freezing and thawing processes using experimental and mathematical determinations. In *Trends in food engineering*, eds. A. Lozano, E. Parada-Arias, and G. V. Barbosa-Canovas, 179–190. Lancaster, UK: Technomic Publishing Company.
- Scotter, A. J., Marshall, C. B., Graham, L. A., Gilbert, J. A., Garnham, C. P., Davies, P. L. (2006). The basis for hyperactivity of antifreeze proteins. *Cryobiology*, 53(2), lk. 229–239.
- Sharadanant, R., Khan, K. (2003). Effect of Hydrophilic Gums on the Quality of Frozen Dough: II. Bread Characteristics. *Cereal Chemistry Journal*, 80, (6), lk. 773–780.
- Soukoulis, C., Fisk, I. (2014). Innovative Ingredients and Emerging Technologies for Controlling Ice Recrystallization, Texture, and Structure Stability in Frozen Dairy Desserts: A Review. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*, 56, (15), lk. 2543–2559.
- Sun, D. W. (2011). *Handbook of frozen food processing and packaging*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis., 936.
- Zhang, C., Zhang, H., Wang, L. (2007). Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. *Food Res Int*, 40, lk. 763–779.
- Zhang, C., Zhang, H., Wang, L., Guo, X. (2008). Effect of carrot (*Daucus carota*) anti-freeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. *LWT-Food Sci. and Tech.*, 41, (6), lk. 1029–1036.

- Zhang, S., Wang H., Chen, G. (2010). Addition of ice-nucleation active bacteria: *Pseudomonas syringae* pv. *panici* on freezing of solid model food. *LWT - Food Sci. and Tech.*, 43, (9), lk. 1414–1418.
- Zhang, Y., Zhang, H., Ding, X., Cheng, L., Wang, L., Qian, H., Qi, X., Song, C. (2016). Purification and identification of antifreeze protein from cold-acclimated oat (*Avena sativa L.*) and the cryoprotective activities in ice cream. *Food and Bioprocess Tech.*, 9, (10), lk. 1746–1755.
- 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.
- Zhu, S., Ramaswamy, H. S., Le Bail, A. (2005). Ice-crystal formation in gelatin gel during pressure shift versus conventional freezing. *J. of Food Engineering*, 66, (1), lk. 69–76.
- Zhu, Z.a, Zhou, Q., Sun, D.-W. (2019). Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments. *Trends in Food Sci. & Tech.*, 90, lk. 13–25.
- Taylor, M. J., Duffy, T., Hunt, C., Morgan, S., Davisson, P. (1983). Transplantation and in vitro perfusion of rat islets of Langerhans after slow cooling and warming in the presence of either glycerol or dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 20, lk. 185–204.
- The Bread Guide, 2022, Why Do I Have Big Holes In My Bread and How To Prevent It, <https://thebreadguide.com/large-holes/> (05.05.2022).
- Thermo Fisher Scientific, 2022, Brand™ Bürker-Türk Counting Chambers, <https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-tuerk-counting-chambers-2/10297390> (03.05.2022).
- UNEP, 2021, Worldwide food waste, <https://www.unep.org/thinkeatssave/get-informed/worldwide-food-waste> (21.05.2022).
- Ustun, N. S., Turhan, N. (2015). Antifreeze Proteins: Characteristics, Function, Mechanism of Action, Sources and Application to Foods. *J. Food Process Preserv*, 39, (6), lk. 3189–97.
- Voets, I. K. (2017). From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter*, 13(28), lk. 4808–4823.
- Wang, P., Yang, R., Gu, Z., Xu, X., Jin, Z. (2017). Comparative study on the freeze stability of yeast and chemical leavened steamed bread dough. *Food Chemistry*, 221, lk. 482–488.
- Wu, J., Rong, Y., Wang, Z., Zhou, Y., Wang, S., Zhao, B. (2015). Isolation and characterisation of sericin antifreeze peptides and molecular dynamics modelling of their ice-binding interaction. *Food Chemistry*, 174, lk. 621–629.
- Xin, C., Nie, L., Chen, H., Li, J., Li, B. (2018). Effect of degree of substitution of carboxymethyl cellulose sodium on the state of water, rheological and baking performance of frozen bread dough. *Food Hydrocolloids*, 80, lk. 8–14.
- Xu, H. N., Huang, W. N., Wang, Z. P., & Rayas-Duarte, P. (2009). Effect of ice structuring proteins from winter wheat on thermophysical properties of dough during freezing. *J. of Cereal Sci.*, 50, (3), lk. 410-413.
- Yi, J., Kerr, W. L., & Johnson, J. W. (2009). Effects of waxy wheat flour and water on frozen dough and bread properties. *J. of Food Sci.*, 74, (5), lk. 278–284.
- Yu, Z., Quinn, P. (1994). Dimethyl sulfoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci. Rep.*, 14, lk. 259–281.

Lisa 1. Sensoorse analüüs hindamisleht

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 = color scale

175	728	027

Porosity

Assess the porosity on the scale, dense – porous.

- Reference= 5

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= 2

175	728	027

Yeast aroma

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

- Reference= 1

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= 9

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= 1

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= 4

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= 2

175	728	027

Bitter taste

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

- Reference= 1

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. Sensoorsel analüüsил kasutatud värviskaala



Lihlitsentsi lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ja reproduutseerimiseks

Mina Kairit Kruusimägi (sünnikuupäev: 13.05.1996)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose Jääga seonduvate valkude mõju külmutatud nisujahutaina ja sellest valmistatud saia omadustele,

mille juhendaja on: Õnnela Luhila ja kaasjuhendajateks: Katrin Laos, Anna Traksmaa

1.1 reproduutseerimiseks säilitamise ja elektroonilise avaldamise eesmärgil, sealhulgas TTÜ raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

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

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

3. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta kolmandate isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ja teistest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

allkiri

kuupäev