

**SKANEERIVA ELEKTRONMIKROSKOOPIA RAKENDAMINE TAIMSETE
VALGUPULBRITE UURIMISEKS**

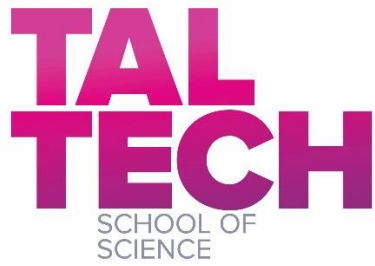
Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Erko Lehtsaar

Juhendaja: Kadi Jakobson, TFTAK, tööstusdoktorant/ teadur- taimsete valkude uurimisgrupp

Kaasjuhendaja: Katrin Laos, kaasprofessor, Tallinna Tehnikaülikool

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



UTILIZATION OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY TO STUDY PLANT-BASED PROTEIN POWDERS

Bachelor thesis

Student: Erko Lehtsaar

Supervisor: Kadi Jakobson, TFTAk, industrial doctoral student, scientist- plant protein research
group

Co-supervisor: Katrin Laos, associate professor, Tallinn University of Technology

Study program: Applied chemistry, food and genetic technology

Tallinn 2023

Autorideklaratsioon

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

Autor: Erko Lehtsaar

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Kadi Jakobson

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Katrin Laos

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Kasutatud lühendid ja terminid.....	2
Sissejuhatus.....	3
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1 SEM.....	5
1.2 Proovi ettevalmistus vedelate proovide jaoks.....	6
1.2.1 Külmuivatus	6
1.4 Valgud.....	7
1.4.1 Taimsed valgud piima alternatiivides	7
1.4.2 Valkude lahustuvus.....	8
1.5 Osakese suuruse määramine instrumentaalselt	9
1.6 Mittelahustuvate osakeste morfoloogia ja sensoorne tunnetus.....	10
1.7 Taimsed analoogid loomsetele toitudele	11
1.7.1 Taimsete toitude trend ja kasu	11
1.8. Töö eesmärk	12
2. Eksperimentaalne osa	13
2.1. Materjalid	13
2.2. Meetodid	13
2.2.1 SEM-iga analüüs ja meetodiarendus	13
2.3. Tulemused ja arutelu	14
2.4 SEM piltide analüüs	16
2.4.1 Meetodiarenduse proovide SEM piltide analüüs.....	16
2.4.2 Natiivse pH ja pH 4,5 juures olevate osakeste iseloomustus	18
2.4.3 Korrelatsioonide analüüs ja arutelu	22
Kokkuvõte.....	25
Abstract	26
Tänuavaldused.....	27
Kasutatud kirjanduse loetelu.....	28
Lisad.....	31

Kasutatud lühendid ja terminid

SEM- Skaneeriv elektronmikroskoop(ia)

OM- Optiline mikroskoopia

VAS- visuaal analoogskaala

CMC- karboksümetüütselluloos

PDCAAS- seeduvuse järgi korrigeeritud aminohapete skoor (protein digestibility-corrected amino acid score)

SLS- Staatilise valguse hajumine (static light scattering)

Sissejuhatus

Käesolevas bakalaureusetöös uuritakse taimseid valgupulbreid, et leida sobivaid alternatiive loomsetele valkudele. Loomseid valke on energia ja ressursside mõttes kulukas toota ning sellega tulevad esile erinevad jätkusuutlikkusega seotud probleemid ja kasvuhoone gaaside tootmine. Lisandub populatsiooni kasvust tingitud nõudlus alternatiivsete valguallikate järgi.

Põllumajanduslik tootmine, loomakasvatus kaasaarvatud, tarbib rohkem vett kui mõni muu tegevus. 85% mageveest kasutatakse põldude kastmiseks. Erinevate taimsete toitade kasvatamiseks kulub 500 kuni 2000 L, et saada kilogramm viljasaaki. 1 kg loomse valgu tootmiseks kulub 100 korda rohkem vett kui toota 1 kg viljavalku. Näiteks, et toota 1 kg veiseliha, on vaja umbes 13 kg vilja ja 30 kg heina - see suurendab vee ja energiakulusid. Populatsiooni kasv mõjutab otseselt piiratud koguses vett, maad ja saadaval olevat energiat. (Pimentel & Pimentel, 2003)

Põllumajandustoodangute mõju keskkonnale on süvenenud aja jooksul ka Euroopa Liidus. Arvatakse, et peale 2030. aastat süvenevad negatiivsed mõjud keskkonnale veelgi. 28% EL maa-alast kasutatakse loomakasvatuseks. Loomakasvatusest tuleneb suur osa maailma kasvuhoone gaaside tootmisest, mis osade uuringute kohaselt on 18%, kuid mõnede uuringute järgi võib ulatuda aga isegi kuni 51%-ni globaalsest kasvuhoonegaaside toodangust. (Maria Fanelli, 2018)

Globaalne populatsiooni kasv on otseselt seotud suurenenud toidunõudlusega. Suurenenud valguvajaduse rahuldamine on omakorda murekoht, kuna paljude tarbijate poolt eelistatud ja heade funktsionaalsete omadustega valgud on praegusel hetkel peamiselt loomset päritolu. Valgud on väga olulised makrotoitained toidus, et keha saaks uueneda ja säilitada metaboolset aktiivsust. Valkude tootmine on vajaminevate ressursside mõttes kulukas ja seotud negatiivselt keskkonna jätkusuutlikkusega. Jätkusuutlikkuse säilitamiseks on vaja leida alternatiivseid valguallikaid. Toiduteadlased ja -tehnoloogid on alustanud inimese toitumisele sobilike alternatiivide otsimise ja kasutamisega. Uudsete alternatiivsete valkude kaasamine on aga seotud erinevate tehnofunktsionaalsete ja organoleptiliste probleemidega nagu lahustuvus, geelistumine, vahutamine, maitse, suutunnetus ja toote välimus. Probleemide lahendamiseks on vajalik välja töötada uusi meetodeid, et toota sobivaid tooteid. (Grossmann & Weiss, 2021)

Käesoleva töö teemaks on taimsete valgupulbrite uurimine ning fookuses on taimsete valgupulbrite osakeste kuju ja morfoloogia seos sensoorse tunnetusega, mis on oluline taimsete valgupulbrite kasutamisel vedelates piimalternatiivides.

Üha enam tarbijaid on huvitatud loomsete toitade tarbimise vähendamisest, kas tervislikel, jätkusuutlikel või eetilistel põhjustel. Toidutööstus arendab tooteid taimsetest saadustest, mis peaksid jäljendama loomsete toitade toiteväärtusi ja sensoorseid omadusi, näiteks soja- või mandli piimajook. Potentsiaalne probleem aga, mis võib tekkida taimse dieediga, on B12, B2 ja kaltsiumi puudulikkus. Teine probleem on sensoorsed omadused, milleks on kõrvalmaitse ja tekstuur. Tekstuuri ebameeldiva tunde võib anda kõrge tärklisesisaldus. (Pointke et al., 2022)

Eelnevalt on uuritud porgandi rakuseina osakeste dispersiooni, millel on kindel osakese suurus. Assessorid tundsid kõige sömerana ja krõmpsuvana proove, milles olid rakuseinte klastrid. Proovid, milles olid individuaalsed rakud või rakufragmendid omasid positiivseid sensoorseid omadusi (Appelqvist et al., 2015). Lisaks on leitud, et sömeruse tundlikkus sõltub osakese suuruselt,

kontsentratsioonist ja lahuse viskoossusest. Mida suurem osake ja kõrgem osakeste kontsentratsioon oli, seda sõmeramana osakesi tunti ning mida vedelam oli lahus, seda rohkem tunti osakesi lahuses (Imai et al., 1995). Veelgi enam, Lopez et al. (2016) on SEMiga näidanud, et siledaid ja ümaraid osakesi tuntakse sensoorselt, kuid seal uuriti hüdroksüpropüülmetüülselluloosi osakesi. (Lopez et al., 2016).

Lisaks eelnevale, varasemad TFTAK'i laboris tehtud katsed näitasid, et väiksemate osakeste puhul ei korreleeru instrumentaalselt ning sensoorselt mõõdetud osakeste suurus. Sellest tulenevalt on antud töö eesmärgiks rakendada SEM meetodit taimsete valgupulbrite morfoloogia uurimiseks, et teha kindlaks, kas osakeste kuju ja pind on seotud sensoorse tunnetusega.

Hüpoteesiks on: osakeste kuju ja pinnakaredus mõjutab osakese sensoorset tajumist sõmerana/teralisena.

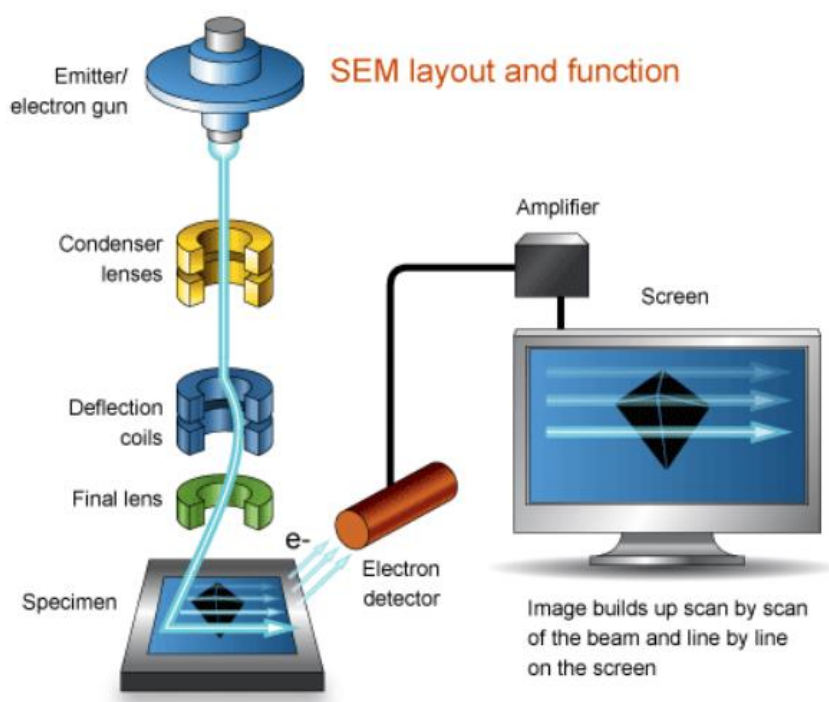
Töö tulemusena leiti, et osakeste pinnakaredusel ja kujul on tugev positiivne korrelatsioon osakese sensoorselt sõmerana tajumisega natiivsetes proovides. Happelises keskkonnas olevaid proove tunti sõmerana ehk seal esines tugev korrelatsioon osakese suuruse ja sensoorse tunnetuse vahel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 SEM

Üldistavalt on olemas kahte tüüpi mikroskoopiat: optiline mikroskoopia (OM) ja skaneeriv elektronmikroskoopia (SEM). OM erineb SEMist oluliselt. OM töötab valguse põhjal ja SEM elektron emissiooni põhjal. Modernsed valgusmikroskoobid töötavad suurendusvahemikus 400-1000 korda, kui SEMi suurendus ulatub 300 000x ning mõningate modernsete SEMide puhul on suurendus kuni 1 000 000 kordne. Optiliste mikroskoopidega näeb uuritavate objektide tõelist värvi, samas kui SEMiga näeb pilti hallskaalal (Mohammed & Abdullah, 2018).

SEMi põhimõte seisneb selles, et kasutatakse kõrge energiaga (100-30000 eV) elektronikiirt. Selle tekitamiseks kasutatakse termilist allikat elektron emissiooniks (elektronpüss). Elektronikiire fokuseerimiseks kasutatakse kondensorläätsesid ning elektronikiir muutub väiksemaks kui 10 nm. Elektronid tungivad proovi umbes ühe μm sügavusele. Elektron detektor tuvastab eraldunud elektronid proovist. Selle tulemusel genereeritakse signaal, millest tekib pilt (joonis 1.) (Mohammed & Abdullah, 2018).



Joonis 1. Joonisel on SEMi komponentide loetelu ja lihtsustatud töö skeem. (Mohammed & Abdullah, 2018) Electron gun – elektronpüss, condenser lens – kondensorläätsed, deflection coil – vasest pool, mis suunab elektrone, final lens – fokuseeriv lääts, specimen – proov, electron detector – elektrondetektor, amplifier – võimendi, screen – ekraan

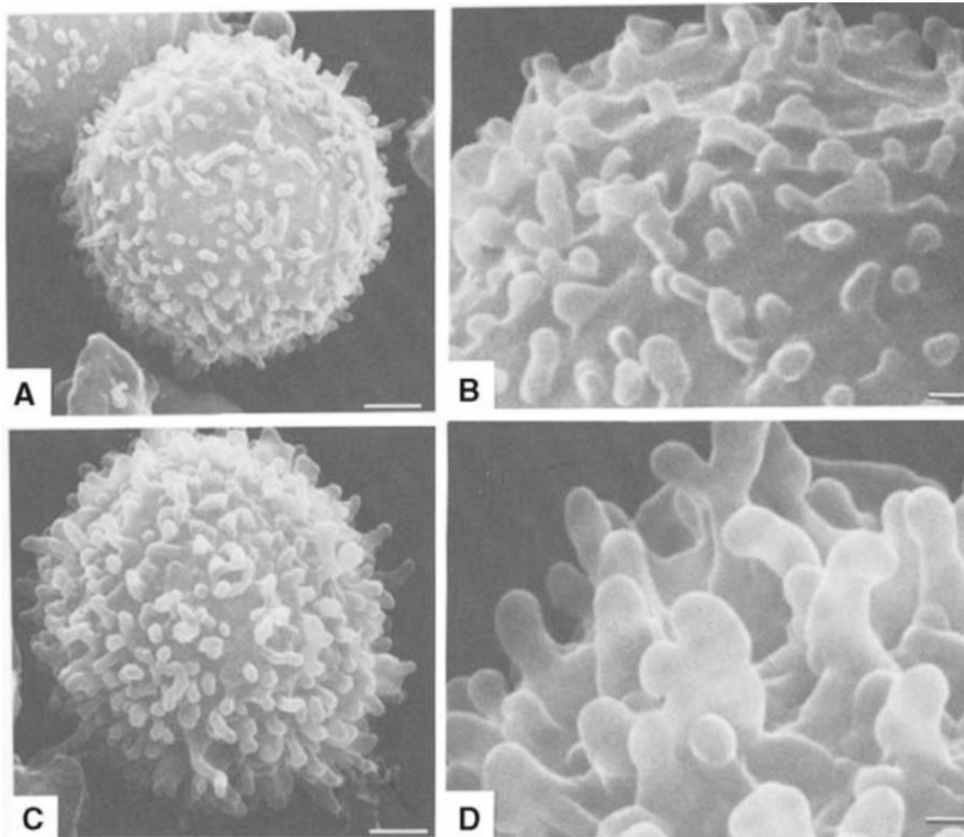
SEM on töövahend, millega saab täpset infot uuritavate objektide morfoloogia, struktuuri ja suuruse kohta. Seda tehnikat kasutatakse laialdaselt taimsete valkude struktuuri, kuju, suuruse ja pinna morfoloogia uurimiseks. (Kumar et al., 2022)

1.2 Proovi ettevalmistus vedelate proovide jaoks

Oluliseks osaks ettevalmistusel on määrata proovile unikaalne tunnusmärk, mis kandub prooviga edasi algusest lõpuni. Oluline on teada, mis staadiumis proov on kui seda uuritakse. Tihtipeale võivad proovid alustel sarnased välja näha, seega on oluline, et proovid sassi ei läheks. Teiseks on vaja mõelda, mis tööriistu on vaja proovide ettevalmistuseks. Selleks võivad olla kas tangid proovi hoidmiseks või külmuivatusvahendid. Proove saab kinnitada SEMi alusele üldjuhul kahepoolse süsinikteibiga. Erandjuhtudel peab proovi kinnitama spetsiaalsetele alustele või vaigulaadse ainega. Analüüsiks valmis proovide jaoks on üldjuhul eraldi karp. (Echlin, 2009)

1.2.1 Külmuivatus

Külmuivatus on füüsikaline kuivatamismeetod, jää eemaldatakse madaltemperatuuril sublimatsiooni teel kõrges vaakumis. Peab ka arvestama aine koguse ja tüübiga, kuna see võib tõsta oluliselt kuivatamisega. Külmuivatusel on eelis kriitilise punkti kuivatusega kuna külmuivatus avaldab vähem struktuurset ja keemilist stressi tundlikele ainetele, kuid külmuivatusel võivad osakesed agregeerida (joonis 2). (Echlin, 2009)



Joonis 2. A ja B on kriitilise punkti kuivatusmeetodiga külmutatud lümfotsüüt, C ja D on külmuivatatud lümfotsüüt. Külmuivatatud lümfotsüüdil on paremini säilinud mikrovillid. (Echlin, 2009)

Vett sisaldavad bioloogiliste proovide struktuur peab olema stabiliseeritud enne kui neid asetatakse elektronmikroskoopi kõrgesse vaakumisse. Sukelduskülmutamisega saab proovi säilitada natiivse struktuuri, mistõttu on see eelistatud, kui see on võimalik. (Dobro et al., 2010)

Külmkuivatus on üks efektiivsemaid meetodeid, kuna on võimalik eemaldada palju vett ja säilitada värsketele toidule iseloomulikud jooned. Protsess põhineb produkti külmutamisel, millele järgneb sublimatsioon madalal rõhul. (Prosapio et al., 2017)

Sublimatsioon on faasivahetus, kus tahke aine muutub otse gaasiliseks aineks. Sublimatsioon juhtub, kui vee jää muundub otse veeauruks järsu rõhu languse või temperatuuri tõusu tõttu. See kehtib ka teiste jääde puhul nagu CO₂ jää (Mangold, 2011).

1.4 Valgud

Valgud on eluks vajalikud tähtsad makrotoitained, mis aitavad keharakkudel paraneda ja uusi rakke teha. Valgud koosnevad aminohapetest ja neid saab loomsetest toodetest nagu liha, piim ja muna. Inimene ei pea tarbima loomseid toite, et saada piisavalt valke. Valke leidub ka taimsetes allikates nagu sojaubades, ubades, pähklites ja teraviljades. Aminohapped jaotatakse kolme gruppi: asendamatud, asendatavad ja tingimuslikud aminohapped. Asendamatuid aminohappeid ei suuda keha ise sünteesida, asendatavaid aminohappeid suudab keha ise toota ja tingimuslikke läheb kehal vaja haiguste või stressi korral. (Protein in diet, 2009)

Taimsetel valkudel on erinevad eelised ja puudused. Joonis 3 kirjeldab eri valkude positiivseid ja negatiivseid omadusi. Punasega on märgitud halvad omadused, näiteks sojavalkudel on kõrge allergeeni risk. Kollane näitab keskpärast omadust, nagu nisu valgu seeduvuse järgi korrigeeritud aminohapete skoor (PDCAAS). Rohelisega on näidatud head omadused, näiteks riisi madal allergeeni risk. (*Plant Protein Primer*, 2020)

Plant Protein Sources Summary

Protein	Protein Concentration	PDCAAS	Allergen Risk	Commercial Stage	Flavor	Functionality	Cost (/kg protein)	Global Crop Volume (MMT)
Soy	●	●	●	●	●	●	●	●
Pea	●	●	●	●	●	●	●	●
Wheat	●	●	●	●	●	●	●	●
Canola	●	●	●	●	●	●	●	●
Chickpea	●	●	●	●	●	●	●	●
Fava Bean	●	●	●	●	●	●	●	●
Lentil	●	●	●	●	●	●	●	●
Lupin	●	●	●	●	●	●	●	●
Mung Bean	●	●	●	●	●	●	●	●
Navy Bean	●	●	●	●	●	●	●	●
Peanut	●	●	●	●	●	●	●	●
Sunflower	●	●	●	●	●	●	●	●
Almond	●	●	●	●	●	●	●	●
Corn	●	●	●	●	●	●	●	●
Oat	●	●	●	●	●	●	●	●
Potato	●	●	●	●	●	●	●	●
Quinoa	●	●	●	●	●	●	●	●
Rice	●	●	●	●	●	●	●	●
Sorghum	●	●	●	●	●	●	●	●

Joonis 3. Taimsete valkude allikad ning nende omadused. (*Plant Protein Primer*, 2020)

1.4.1 Taimsed valgud piima alternatiivides

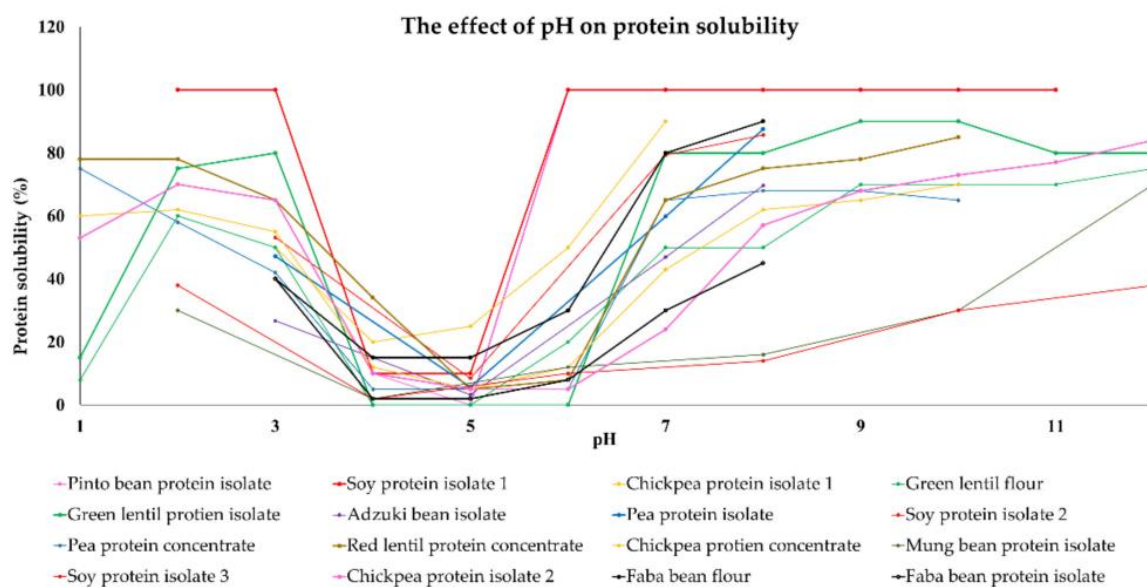
Tänapäeval on taimsel baasil piima alternatiivid kiiresti kasvav segment uues toiduarenduse kategoorias. Piima allergiad ja laktoositalumatus on soodustav faktor, miks inimesed valivad vegan dieete ja eelistavad piima alternatiive lehma piimale. Taimsetel jookidel esinevad mõned tehnoloogilised probleemid, mis on seotud töötlemise või säilitamisega. Enamikel piima

alternatiividel on puudulik toitainesisaldus võrreldes lehmapiimaga, kuid nad sisaldavad funktsionaalselt aktiivseid ühendeid, mis on tervislikule eluviisile head. Kaunviljade baasil piima alternatiividel on sensoorne aktsepteeritavus suuresti piirav faktor maailmas. (Sethi et al., 2016)

1.4.2 Valkude lahustuvus

Valgu lahustuvusel on oluline roll, et määrata valgu füüsikalisi-keemilisi omadusi, töötlemist, sensoorseid atribuute, säilivust ja toiteväärtuse profiili. Praegusel ajal on uuesti esile tõusnud valgu lahustuvuse uurimine, kuna on tekkinud nõudlus toitide järgi, mis ei baseeru loomsetel valkudel. Need uued valkude allikad pärinevad taimedest, bakteritest, putukatest, seentest ja fermentatsiooni protsessidest. Erinevad lahustuvuse omadused teevad raskeks toodete arendamise, mis vastavad toidu tootjate ja tarbijate kvaliteedi nõudlustele. (Grossmann & McClements, 2023)

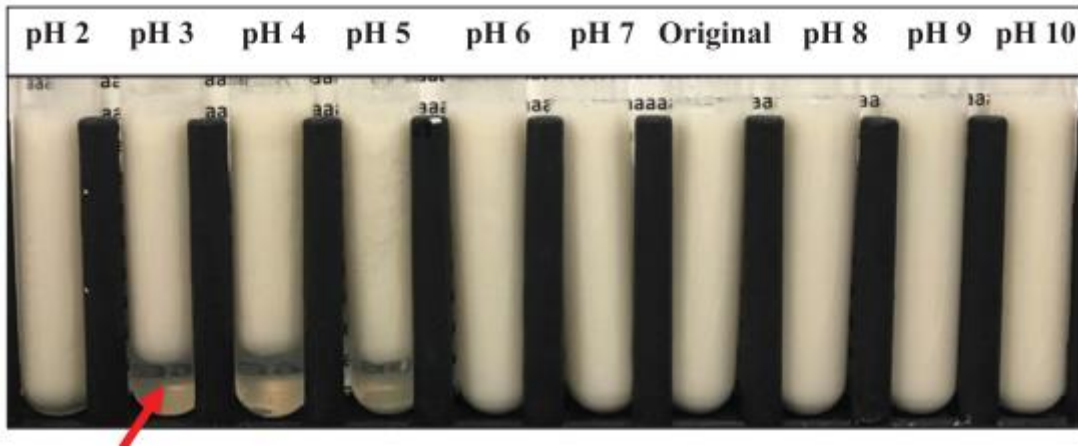
Joonisel 4 on näidatud taimsete valkude lahustuvus erinevate pH-de juures. Väga happelises pH juures käituvad valgud erinevalt, osad lahustuvad hästi, kuid osad halvasti. Üldjuhul paraneb enamuse valkude lahustuvus pH 6-7 juures. Aluseliste pH väärtuste juures enamjaolt lahustuvus paraneb veelgi või jääb stabiilseks mingi lahustuvuse protsendi määra juurde (Ma et al., 2022).



Joonis 4. Graafik, mis kirjeldab erinevate taimsete valkude lahustuvus vastvalt pH-le (Ma et al., 2022).

Enamus energia talletamiseks mõeldud taimsetel valkudel (reservvalkudel) on kompaktne struktuur, mis koosneb mitmest alaühikust ja suuresti hüdrofoobsetest osadest ning elektrostaatiliste laengute jõududest. Selline struktuurne kompleksus takistab lahustuvust ja funktsionaalset käitumist taimsetel valkudel toiduks kasutamisel. Kui viia valgu lahustuvuse pH tingimuste juurde, toob see esile laengute tõukumist, millele järgneb neutralisatsioon. Selle tulemusel valgu kvaternaarne struktuur on häiritud ning individuaalsed monomeerid omandavad sulanud oleku. Seda protsessi tuntakse kui pH nihet, mis on võimeline tekitama kõrgesti lahustuvaid monomeere ja agregate, millel on väga head emulsiooni ja vahtu tekitavad omadused pindaktiivsete aminohapete ja kõrvalgruppide ümberpaiknemise tõttu. (Jiang et al., 2018)

On vajalik teada osakese suurusest, et saada infot taimsete piimade stabiilsusest ning osakese suurus ja stabiilsus on mõjutatud erinevatest faktoritest nagu pH, temperatuur ja koostis. pH-l on mõju osakestele, mis asuvad lahuses. Sojapiima osakesed on väga stabiilsed kõrgetel pH väärtustel aga agregeerub kindlal pH väärtusel. Joonisel 5 on näha soja piimajoogid pH vahemikus 2 – 10. Pildil on näha, kuidas pH 3-5 juures on valgud agregeerunud ja pinna poole kogunenud ning tuubi põhja on tekkinud läbipaistev osa. (Grossmann et al., 2021)

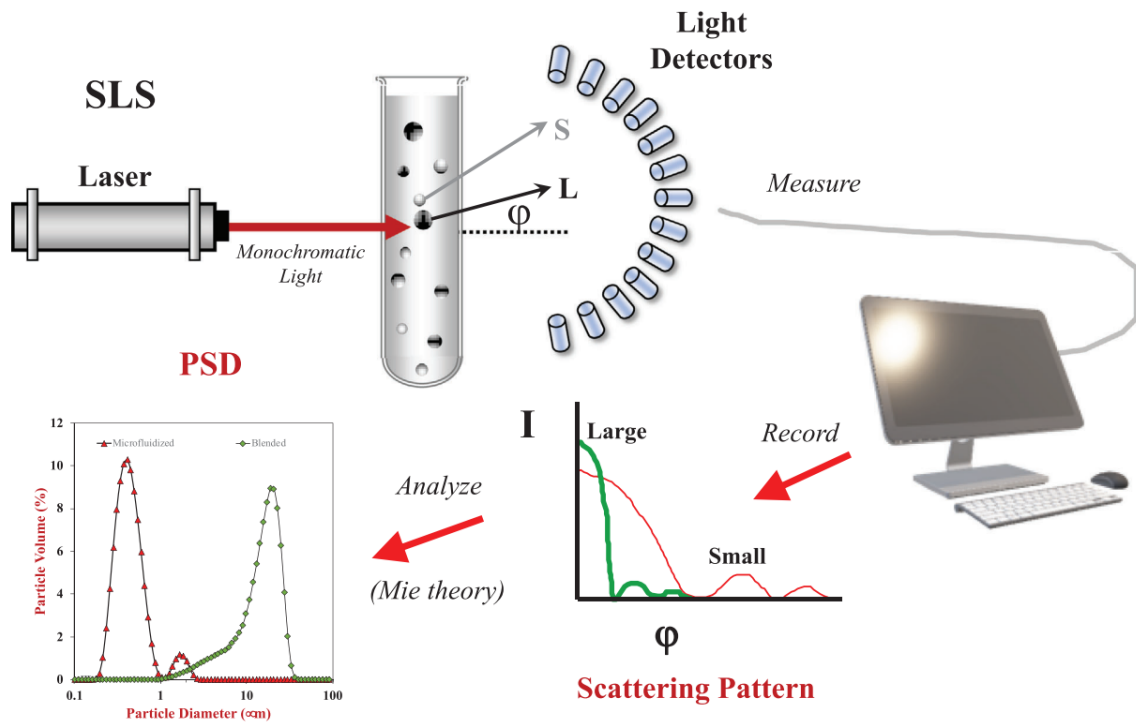


Joonis 5. Soja piimajoogi lahustuvus erinevatel pH-del. Eriti agregeerunud pH 3-5 juures (Grossmann et al., 2021).

1.5 Osakese suuruse määramine instrumentaalselt

Staatilise valguse hajumine (static light scattering ehk SLS) ehk laser difraktsiooni analüüs on viis, kuidas instrumentaalselt mõõta lahuses olevate osakeste suurust, mida mõõdetakse osakese suuruse analüsaatoriga. Põhimõtte seisneb selles, et valguse hajumine sõltub osakese suuruse omadustest. Väikesed osakesed annavad teistsuguse hajuvuse mustri kui suuremad osakesed. Meetodi puuduseks on see, et on vaja teada vedeliku refraktsiooni omadusi ja analüsaator põhineb matemaatilisel mudelil „Mie“ teorial, mis eeldab seda, et osakesed on mitte interakteeruvad ja ühtlaselt sfäärilised. (Grossmann et al., 2021)

Joonisel 6 on näha SLS analüüsi põhimõtet. Selle tehnoloogia printsiip seisneb valguse hajumise muustril, mis sõltub osakese suurusest. Monokromaatiline (monochromatic light) laser laseb kiire läbi lahuse ning valgus murdub vastavalt osakese suurusele ning vastavad detektorid (light detectors) mõõdavad (measure) seda. Seejärel arvuti talletab andmed ning tekitab graafiku intensiivsus (I) versus nurk (φ), mida saab „Mie“ teooria põhjal analüüsida, mis annab osakese suuruse jaotumise graafiku (PSD) (Grossmann et al., 2021).



Joonis 6. Joonisel on lihtsustatud skeem, kuidas töötab SLS (Grossmann et al., 2021).

1.6 Mittelahustuvate osakeste morfoloogia ja sensoorne tunnetus

Arusaam rakuseina osakeste mõjust sensoorsele tunnetusele võib tekitada uusi strateegiaid, mida saaks kasutada taimsete materjalide kasutamiseks, et toota tervislikke toite, millel on soovitud sensoorsed omadused. Eesmärk on hinnata raku seina osakeste suhet nende tekstuuri ja suutunde sensoorsete omadustega. Märgatavad sensoorsed erinevused leiti porgandi rakulises süsteemis, millel olid erinev osakese kuju, suurus, suuruse jaotus ja reoloogia. Dispersioone, milles olid raku seina klastrid, tunti sõmerana, krõmpsunava ja kurku kinnijäävana. Dispersioone, kus olid individuaalsed rakud või raku fragmendid, tunti kreemisena ja suud täitvana ning ei olnud sõmerust. Biopolümeerid, nagu ksantaan ja pektiin, vähendasid sõmeruse tunnetust suus ja suurendasid kreemisuse taju. (Appelqvist et al., 2015)

Uuritud on ka kuidas erinevad parameetrid mõjutavad oraalset tunnetust. Selleks kasutati väikeseid silikoon dioksiidi osakesi ja polüstüreeni osakesi suurusevahemikus 2-230 μm . Hinnati olulisust suuruse ja osakese tüübi vahel. Katsealused hindasid osakese suurust, hõõrudes proovi keele ja suulae vahel. Kasutati pinnatuimestust suulael, et määrata keele ja suulae suhtelist olulisust, kuid ei leitud erinevust. Sama suurusega kõvasid ja ebaregulaarseid osakesi tunti suuremana, kui pehmeid ja ümaraid. Kahel erineval meetodil uuritud osakeste suuruse mõju andsid sarnase tulemuse oraalset tundmisel. (Engelen, Van Der Bilt, et al., 2005)

Paljudes toitudes on väikesed osakesed, mida on sensoorselt tunda. Erineva suuruse, kujuga ja kõvadusega silikoon dioksiidi ja polüstüreeni osakesed suuruses 2-230 μm lisati karboksümetüülselluloosi (CMC) baasil valmistatud vanillikreemist magustoidu sisse. 18 treenitud täiskasvanut osalesid uuringus. Nad hindasid 17 sensoorse maitse ja tekstuuri omadusi 100 punkti visuaalanaloogi skaalal (VAS). Tulemused näitasid, et lisatud osakesed suurendasid sõmeruse

tundmist toidus ning vähendasid positiivseid tekstuuri omadusi oluliselt, nagu siledust, kreemisust ja libedust. Sõmeruse tundlikkus suurenes osakese suuruse tõustes kuni 80 µm juurde. Üllatavalt ka osakesed suurusega 2 µm omasid olulist sensorset rolli, nad suurendasid huultel ja hammastel sõmerat tunnetust ning vähendasid libedat tunnetust. (Engelen, De Wijk, et al., 2005)

1.7 Taimsed analoogid loomsetele toitudele

Tarbijatel on suurenenud nõudlus eetilistelt toodetud, jätkusuutlike ja toitvatele toitude järgi, et parandada iseenda ja oma planeedi tervist. Nii väikesed kui ka suured toidutööstused läbivad praegu revolutsiooni, et pöörata ennast rohkem uue generatsiooni taimsete toitude suunas ja rahuldada tõusvat trendi. Eriti on huvi taimsete toitude järgi, mis imiteerivad neid toite, millega omnivoorid on tuttavad, nagu kala, liha, muna ja piim. Peamine väljakutse selles vallas on seotud soovitud välimuse, tekstuuri, maitse ja suutunde simuleerimisega ning nende produktide funktsionaalsusega, kasutades ainult koostisaineid, nagu valgud, süsivesikud ning lipiidid, mis on isoleeritud täielikult botaanilistest allikatest. Molekulaarsed, keemilised ja füüsikalised omadused taimedest derivatiseeritud koostisainetel erinevad suuresti loomsetest. Sellepärast on kriitilise tähtsusega mõista taimsete koostisosade fundamentaalseid omadusi ja kuidas neid kokku panna nii, et need meenutaksid loomseid tooteid. (McClements & Grossmann, 2021)

Valgud, mis on saadud alternatiivsetest allikatest, nagu taimed, mikroorganismid ja putukad, pakuvad huvi väiksema keskkonna jalajäljega uute toitude väljatöötamisel, et toita kasvavat maailma populatsiooni. (Grossmann & Weiss, 2021)

1.7.1 Taimsete toitude trend ja kasu

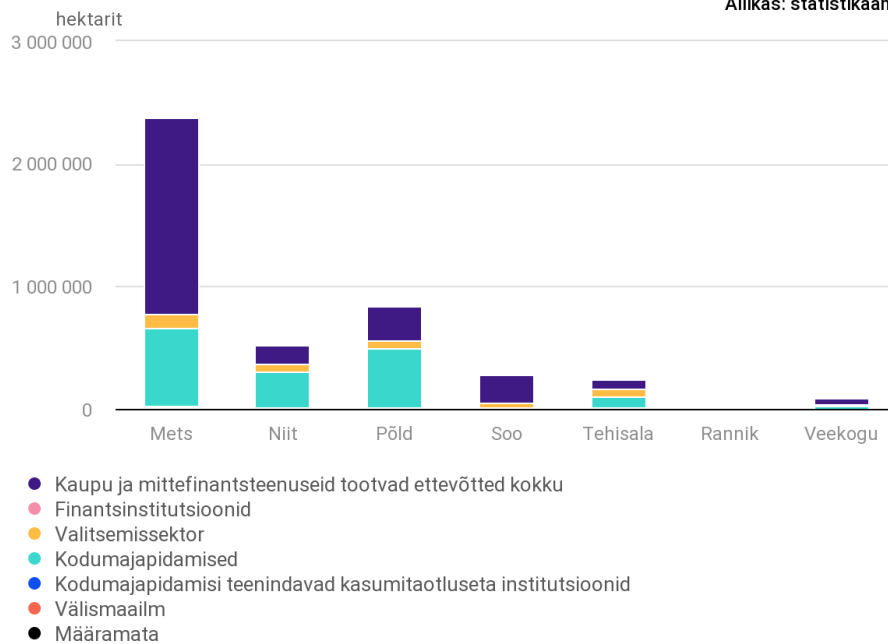
Keskkonna aspektist peaks suurendama taimsete toitude osakaalu ja vähendama loomsete toitude osakaalu, kuna see on jätkusuutlikum ja keskkonnasõbralikum. 18% kasvuhoonegaasidest tuleb loomakasvatusest globaalsel tasemel. Seda saab võrrelda Prantsusmaaga, kus loomaliha ja piima tootmine vastutab vastavalt 41 ja 20% emissioonidest loomakasvatuses. Loomakasvatus vajab märkimisväärset energiat nagu näiteks sööda tootmine, elekter, paljunemine ja farmihoonete kulud. Intensiivne loomakasvatus vähendab ka biomitmekülgsust, kuna on vaja rohkem maapinda. Uuringud on näidanud, et vähendades loomse toidu tarbimist ja kasvatust, mõjutab see biomitmekülgsust märkimisväärselt. (Lacour et al., 2018)

Kui asendada Hollandis loomsed valgu allikad taimsete vastu siis saaks vähendada maakasutust ja kasvuhoonegaaside tootmist. Kasvuhoonegaaside vähenemine sõltuks taimse alternatiivi valikust. Kui eeldada, et kogu Hollandi populatsioon tarbiks ainult taimseid toite siis väheneks emissioon 4% ja tarbimisest tingitud emissioon 4%. Samuti vähendaks kasutatavat maapinda 12500km²*aasta, mis on 37% kogu riigi pindalast. Sarnase tulemuse saaks ka siis kui vahetada loomne liha kanaliha vastu. (Guinée, 2002). Madalmaades kulub 54% kogu riigi pindalast põllumajandusele 2020 andmete järgi. (Nederland in Cijfers, 2020)

2020 statistikaameti andmete järgi kulub Eestil umbes 22% kogupindalast põllumajandusele, seega ei saa samalaadset järeltust Eesti kohta teha. Joonisel 7 on näidatud Eesti ökosüsteemi tüüpide järgi pindala jaotust. Üle poole Eesti pindalast on mets, umbes 30% jääb põldude ja niitude alla, ülejäänud maa-alast jäävad sood, tehisalad, rannikud ja veekogud. (Statistikaamet, 2020)

Ökosüsteemi pindala jaotus omaniku liigi ja ökosüsteemi tüübi järgi | 2020

Allikas: statistikaamet



* Kaupu ja mittefinantsteenuseid tootvad ettevõtted kokku sisaldab ka Riigimetsa Majandamise Keskuse majandatavaid piirkondi.

Joonis 7. Statistikaameti andmed Eesti maakasutuse kohta (Statistikaamet, 2020)

1.8. Töö eesmärk

Tänapäeval on erinevatel põhjustel tekkinud suurenenud nõudlus, et leida alternatiive loomsetele toidutoodetele. Sellega on seotud loomade masskasvatusest tulenevad eetikaprobleemid, maailma kasvav populatsioon, keda on vaja ära toita ja toiduga seotud jätkusuutlikkuse parandamine. Sellest tulenevalt uuritakse käesolevas töös taimseid valke, mis on potentsiaalseteks allikateks ja populaarseteks alternatiivideks loomsetele valkudele.

Töö eesmärgiks on taimsete valgupulbrite uurimiseks kasutada SEMi meetodit, et visualiseerida taimsete valgupulbrite vesilahustesse jäävate lahustumatute osakeste morfoloogiat. Osakeste kuju säilitamiseks kasutati vitrifitseerimist ning vee eraldamiseks lüofiliseerimist.

Uurimisküsimuseks on katsetada, kas valgupulbrite vesilahuste sademe pesemine aitab kaasa osakeste eraldamisele ning visualiseerimisele.

Püstitatud hüpotees: Osakeste kuju ja pinnakaredus mõjutab, kuidas neid sensoorselt tajutakse.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Materjalid

Töös uuriti 10 erinevat valgupulbrit (Kaer 6, Hernes 7, Hernes 12, Hernes 15, Hernes 19, Hernes 29, Hernes 31, Hernes 37, Soja 39, Nisu 44). Proovid valiti käesolevasse töösse olemasolevate instrumentaalsete ning sensoorsete osakeste suuruse tulemuste põhjal. Proove analüüsiti kahel eritingimusel: 1) nende natiivse pH juures ning 2) hapustatud pH 4.5 juures.

Natiivse pH juures uuriti järgmiseid proove: Oat 6, Hernes 7, Hernes 12, Hernes 19, Hernes 29, Hernes 31, Hernes 37 ning pH 4,5 juures uuriti: Kaer 6, Hernes 7, Hernes 12, Hernes 15, Hernes 29, Hernes 31, Hernes 37, Soja 39, Nisu 44.

Meetodiarenduseks valiti proovid Kaer 6, Hernes 29 ja Hernes 37. Kaer pakkus huvi, kuna selle toote valgusisaldus oli teistega võrreldes väiksem (~50%). Hernes 29 ja 37, valiti välja nende eelnevalt hinnatud sobilike sensoorsete omaduste põhjal. Meetodiarenduse katsed viidi läbi natiivse pH juures.

Soja 39 ja Nisu 44 proove uuriti ainult hapustatud pH juures, kuna nendel proovidel olid väga suured instrumentaal ja sensoorselt mõõdetud osakeste suuruse väärtused ning oli huvipakkuv selliste osakeste morfoloogiat visualiseerida.

Natiivsete ja hapustatud pH proovide ettevalmistus (dispersioonide valmistamine, kuumtöötlus, vitrifitseerimine ja lüofiliseerimine) teostati TFTAK'i füüsikaliste analüüside meeskonna poolt.

2.2. Meetodid

2.2.1 SEM-iga analüüs ja meetodiarendus

2.2.1.1 Proovi ettevalmistus ja kuumtöötlus

Valgupulbrit ja destilleeritud veest valmistati 6% (w/w) dispersioon (1,5 g pulbrit ja 23,5 g vett) ja segati vortexil 2 minutit. Seejärel asetati proovid vesivanni (Julabo PURA 10) 85°C juurde. Kui proovi temperatuur saavutas etteantud temperatuuri, hoiti neid veel vesivannis 15 minutit. Seejärel proovid jahutati jää-vesivannis.

2.2.1.2 Meetodiarendus

See etapp kehtib ainult meetodiarenduseks valitud proovide puhul. Teisi proove nii ei töödeldud. Taimse valgupulbri dispersioonid tsentrifugiti (Hettich rotanta 460R) 5 minutit kiirusel 1000 pööret minutis. Edasi eemaldati ettevaatlikult supernatant pasteuri pipetiga ning proovile lisati 25 ml filtreeritud vett. Proov segati vortexil ja tsentrifugiti uuesti 5 minutit 1000 pööret minutis. Pesemist jätkati kuni supernatant muutus läbipaistvaks. Viimasel korral supernatanti ei eemaldatud. Edasi valati 40 ml proovitopsi ca 1 cm proovi ning tops prooviga pandi vedelasse lämmastikku. Peale proovi jäätumist pandi see lüofilisaatorisse (Scanvac coolsafe). Järgmisel päeval eemaldati kuivanud proovid lüofilisaatorist, topsid kaeti koheselt kaane ja parafilmiga, et proov õhust niiskust ei imaks.

2.2.1.3 Proovide analüüs SEM-iga

SEM-i (SEM ZEISS EVO LS 15) proovialustele kleebiti süsinikust kahepoolne teip, millele saab proove kanda. Seejärel raputati spaatliga õhuke kiht pulbrilist proovi teibitud kleepuva proovi alusele.

Üleliigne lahtine pulber koputati proovialuselt ära, et vältida SEM aparadi mõõtekambri ja teiste proovide saastumist. Proovide uurimiseks peavad olema valgupulbrid elektriliselt konduktiivsed. Proovid kaeti katoodtolmustamise teel (Quorum, Q1508S) 2nm kuld:palladium seguga (Au:Pd=80:20), et muuta proovid elektriliselt konduktiivseks. SEM proovialused koos proovidega paigaldati SEM aparadi proovikambrisse, proovikamber suleti ning alustati mõõtmisega.

Proovid analüüsiti laiendatud rõhuga sekundaarne elektrondetektor (extended pressure secondary electron detectoriga EPSE) ja kõrgepingeline elektronvoog (electron high tension EHT) 15kV, suurendusega x200 või x500

2.2.1.4. SEM piltide visuaalne analüüs

Iga proovi SEM piltidel olevate osakeste morfoloogiat hinnati visuaalsel 10 punkti skaalal. Hinnati kahte erinevat osakeste parameetrit: 1) karedust ning 2) kuju. Kareduse puhul 0 tähendab, et proovis olevad osakesed olid siledad ning 10 tähendab, et proovis olevad osakesed näisid välja karedad. Kuju puhul 0 tähendab, et proovis olevad osakesed olid ümarad ning 10 tähendab, et proovis olevad osakesed näisid välja kägarad (mitte ümarad).

2.2.1.5. Osakeste suuruse sensoorne analüüs

Proovid olid eelnevalt hinnatud TFTAK'i 8-liikmelisele sensorika assessorite grupil poolt. Proovides olevate osakeste suurust oli hinnatud 9 punkti skaalal, kus 0 tähendas, et proovis ei tuntud osakesi ja 9 tähendas, et proovis oli tunda peamiselt osakesi.

2.2.1.6. Osakeste suuruse instrumentaalne analüüs

Osakeste suurust mõõdeti laser difraktsiooni osakeste suuruse analüsaatoriga (Mastersizer 3000) (Particle Size Analyser (PSA)). Osakeste suurused on väljendatud D90 väärtustega (μm), mis tähendab seda, et 90% osakestest on alla antud väärtust.

2.2.1.7. Statistiline analüüs

Meetodi arenduse puhul tehti igale proovile kaks paralleeli. Arvandmeid analüüsiti Excelis ning korrelatsiooni hindamiseks kasutati CORREL funktsiooni. Statistilise analüüsi käigus üritati leida, kas esineb korrelatsiooni osakeste suuruse, sensoorse osakeste suuruse, kuju ja kareduse vahel. Osakeste instrumentaalset suurust mainides peetakse silmas D90 väärtust.

2.3. Tulemused ja arutelu

Tabelis 1 on esitatud instrumentaalsed ning sensoorsed osakeste suuruse tulemused. Osakeste suurused on väljendatud D90 väärtustega (μm), mis tähendab seda, et 90% osakestest on alla antud väärtust. Sensoorne osakese suurus kirjeldab väärtust, mida andsid assessorid proovidele. 0 tähendab sealjuures seda, et osake ei tuntud sensoorselt ning 9 tähendab, et osake oli suur ja väga hästi tuntav.

Tabel 1. Tabelis on kirjeldatud instrumentaalselt mõõdetud osakeste suurus D90 ja assessorite poolt hinnatud sensoorne osakese suurus. Tabelis on esitatud nii natiivsete kui ka pH 4,5 juures olevad proovid.

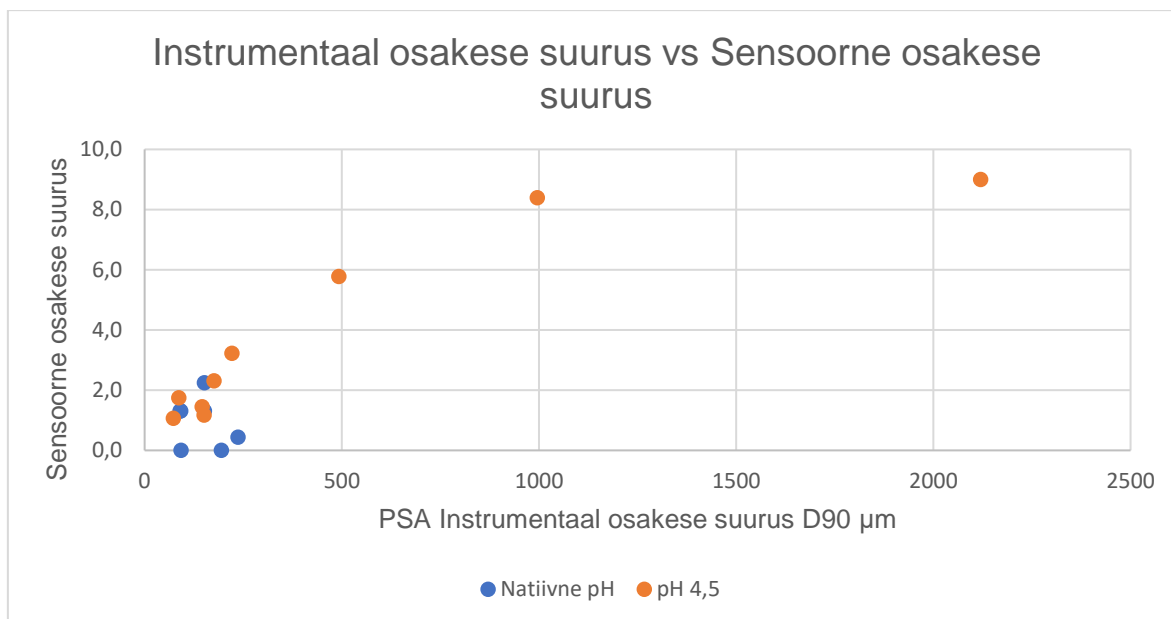
Natiivne proov	Natiivse pH osakese suurus D90 μm	Natiivne pH Sensoorne osakeste suurus
Hernes 12	90	1,3
Hernes 31	92	1,3
Hernes 37	92	0,0
Kaer 6	151	1,3
Hernes 7	152	2,3
Hernes 29	195	0,0
Hernes 19	237	0,44
Proov pH 4,5 juures	pH 4,5 Instrumentaal osakese suurus D90	pH 4,5 Sensoorne osakeste suurus
Hernes 12	73	1,1
Hernes 31	86	1,8
Hernes 7	146	1,4
Kaer 6	151	1,2
Hernes 29	176	2,3
Hernes 37	222	3,2
Hernes 15	493	5,8
Soja 39	996	8,4
Nisu 44	2120	9,0

Tabelis 2 on toodud tabeli 1 põhjal arvatud korrelatsioonid.

Tabel 2. Natiivse pH ja pH 4,5 juures olevate proovide instrumentaalse ja sensoorse osakeste suuruse tulemuste vaheline korrelatsioon.

	Korrelatsiooni koefitsent
Instrumentaalne osakeste suurus D90 (μm) vs Sensoorne osakeste suurus- natiivne pH	-0,25
Osakeste suurus D90 (μm) vs Sensoorne osakeste suurus- pH 4,5	0,89

Tugev korrelatsioon esineb pH 4,5 osakeste suuruse ja sensoorse osakeste suuruse vahel 0,89 (tabel 2). Seevastu puudub korrelatsioon natiivsetel proovidel osakeste suuruse ja sensoorse osakeste suuruse vahel -0,25 (tabel 2). Joonisel 8 on hajuvusdiagrammina illustreeritud x teljel instrumentaalselt mõõdetud osakeste suuruse tulemused (D90, μm) ja y teljel sensoorselt mõõdetud osakeste suuruse tulemused. Oranžid andmepunktid esindavad pH 4,5 proove ja sinised natiivse pH proove. Jooniselt on näha, et natiivse pH proovide puhul ei esine instrumentaalselt mõõdetud osakeste suurusel ja sensoorsel osakeste suurusel korrelatsiooni. See annab indikatsiooni, et muud osakeste parameetrid (kuju ja pinnakaredus) võivad mõjutada seda, kuidas väikemaid osakesi sensoorselt tajutakse ning just seda SEM meetodi abil uurida soovitaksegi.



Joonis 8. Instrumentaalselt ja sensoorselt mõõdetud osakese suuruse tulemuste sõltuvus

2.4 SEM piltide analüüs

2.4.1 Meetodiarenduse proovide SEM piltide analüüs

SEM meetodi puhul on oluline, et proovid oleksid puhtad, kuna see võib segada proovide tulemust, näiteks muud osakesed, mis ei pärine valgupulbrist. Seetõttu sai ka pestud valgupulbreid. Sademe pesu katsetati, kuna taimsetest valgupulbritest valmistatud dispersioonides võib lisaks valgule esineda ka muid taimsete maatriksi osakesi, mis võivad takistada valguosakeste visualiseerimist. Kaer 6 valgupulbril oli valgu sisaldus umbes 50%. Kaer 6 puhul oli vajalik pesta 3 korda kuni supernatant oli puhas. Herne valgupulbri 29 ja 37 puhul tehti pesu 5 korda. 29 oli püsivalt hägune ja seetõttu otsustati pesu lõpetada peale 5 korda. 37 ilmselt lahustub hästi, kuna sadet jäi iga pesuga vähemaks ning pesu lõpetati, et sade täiesti otsa ei saaks.

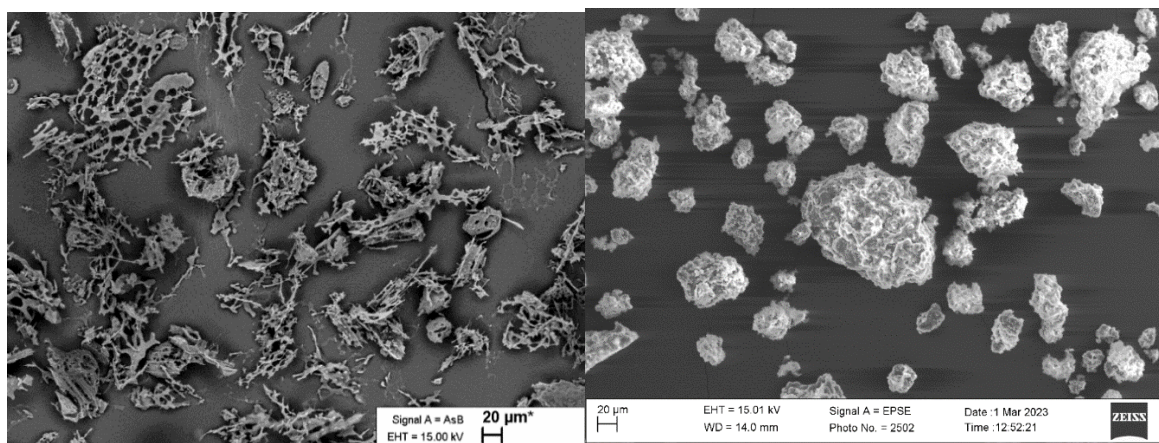
Edaspidi töö käigus nimetatakse pestud proove töödeldud proovideks.

Meetodi arenduseks valiti pulbrid hernes 29 ja hernes 37 ja kaer 6. Kaer 6 valiti seetõttu, kuna selles oli valgusisaldus väike ning oli soov teada, kas on võimalik muudest osakekestest lahti saada. Valgupulbritele hernes 29 ja hernes 37 oli omane see, et neid ei tuntud sensoorselt (tabel 1), kuigi osakese suurus oli erinev, vastavalt 195μm ja 92μm. Valgupulbri 6 puhul tunti sensoorselt (tabel 1) ja osakese suurus oli 151 μm.

Joonisel 9 on esitletud töötlemata ning joonisel 10 töödeldud kaerapulbri Kaer 6 SEM pilt.

Kaer 6 SEM piltidelt (joonised 9 ja 10) paistab, et sademe pesemine töötab antud valgupulbri puhastamisel taimsest maatriksist või muudest lahustunud ühenditest. Meetodiarenduse käigus töödeldud proovis on suuremad ja eristatavad agregeerunud või paisunud ja vett imanud ühendid, seevastu töötlemata proovis on muud osakesed, mis võib olla taimne maatriks. Kaer 6 puhul oli valgusisaldus umbes 50% kui muudel valgupulbritel oli >80%. Kaer 6 4,5 pH juures oleva proovi

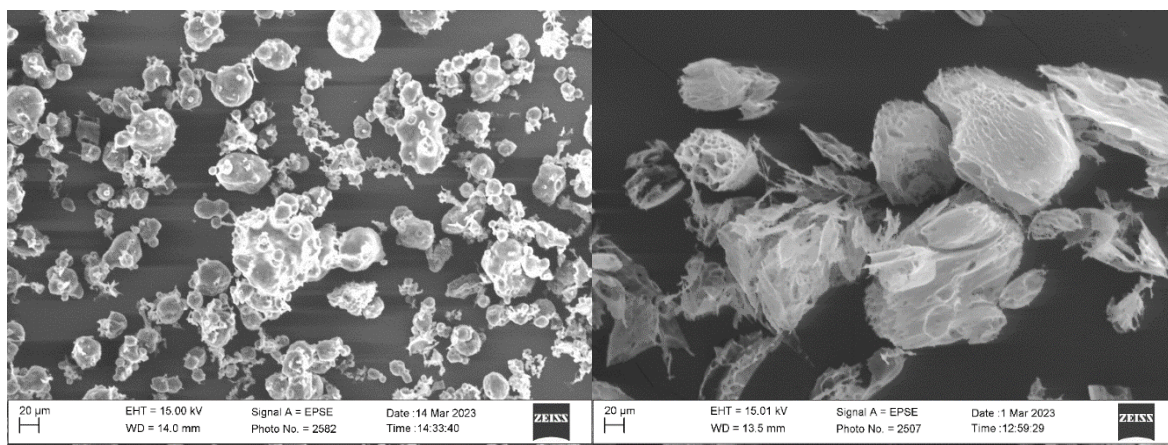
osakesed olid sarnased töödeldud kaer 6 valgupulbriga ning lisaks ka taimne maatriks või muud lahustunud ühendid (lisa 1).



Joonis 9. Kaer 6 töötlemata valgupulbri SEM pilt **Joonis 10.** Kaer 6 töödeldud valgupulbri SEM pilt

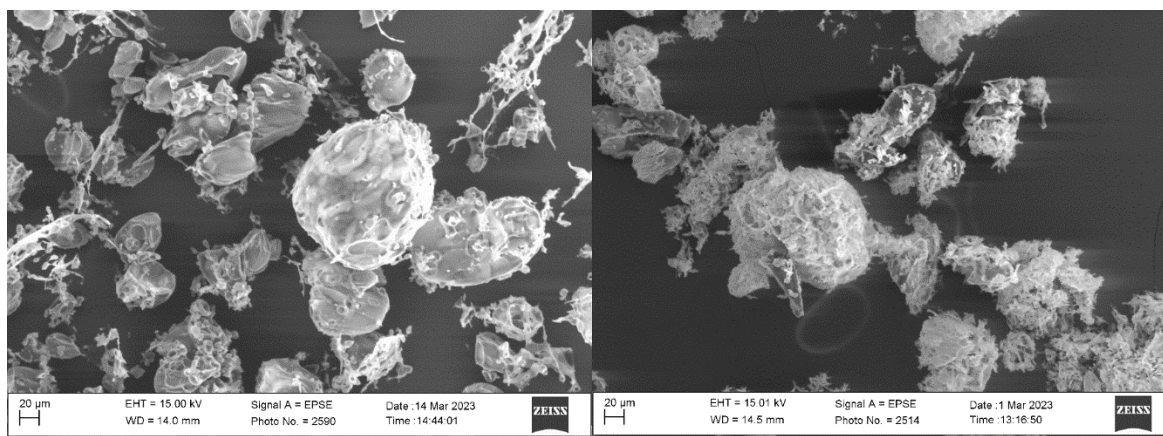
Joonisel 11 on esitletud töötlemata ning joonisel 12 töödeldud hernepulbri 29 SEM pilt.

Herne valgupulbri 29 (joonised 11 ja 12) puhul töötlemata proovis oli näha palju väikeseid osakesi eraldiseisvana, kuid mõned väiksemad olid suuremate osakeste külge kinnitunud. Töötlemise käigus on osakesed nähtavasti muutunud ja samuti väiksemaid osakesi väga ei esine. Töötlemise käigus võisid ilmselt väiksemad osakesed lahti tulla ja lahustuda vette, mille käigus need eemaldusid proovist. Pildil on ka näha, et osakesed on muutunud õhulisemaks ja auklikuks ning vett imanud ja paisunud.



Joonis 11. Hernes 29 töötlemata valgupulbri SEM pilt **Joonis 12.** Hernes 29 töödeldud valgupulbri SEM pilt

Joonisel 13 on esitletud töötlemata ning joonisel 14 töödeldud hernepulbri 37 SEM pilt. Herne valgupulbri 37 (joonised 13 ja 14) puhul see meetod kõige paremini ei töötanud. Korduva pesu korral jäi supernatant endiselt häguseks ja peale igat pesu jäi sadet vähemaks. Sarnaselt valgupulbrile 29 muutus pulber 37 töötlemise käigus poorseks ja hapraks. Piltidel on näha, et osakesed on laiali lagunenud, kui töötlemata proovil on kindel struktuur ja osakesed on terviklikud.



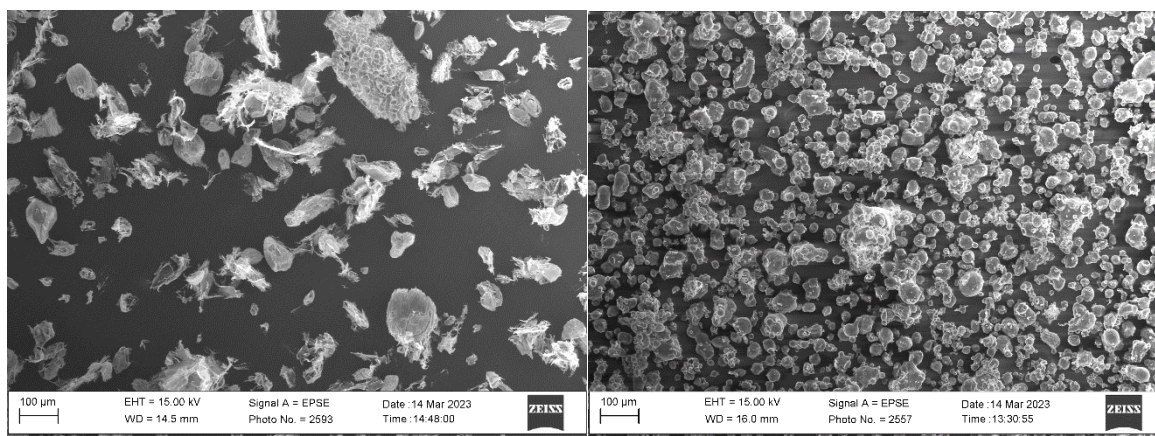
Joonis 13. Hernes 37 töötlemata valgupulbri SEM pilt **Joonis 14.** Hernes 37 töödeldud valgupulbri SEM pilt

Antud töö käigus selgus, et sademe pesemine sobib osade taimsetest valgupulbritest valmistatud dispersioonide töötlemiseks, et neist eemaldada taimset maatriksit ning väga väikesi või osaliselt lahustunud osakesi. Aga sellel meetodil on omad piirangud. Kui valgupulber jääb sademe korduval pesemisel lahustuma või jääb suspensiooni püsima, siis pideva pesemise käigus võib tekkida algselt dispersioonis eksisteerinud osakeste, mille morfoloogiat sooviti uurida, kadu.

2.4.2 Natiivse pH ja pH 4,5 juures olevate osakeste iseloomustus

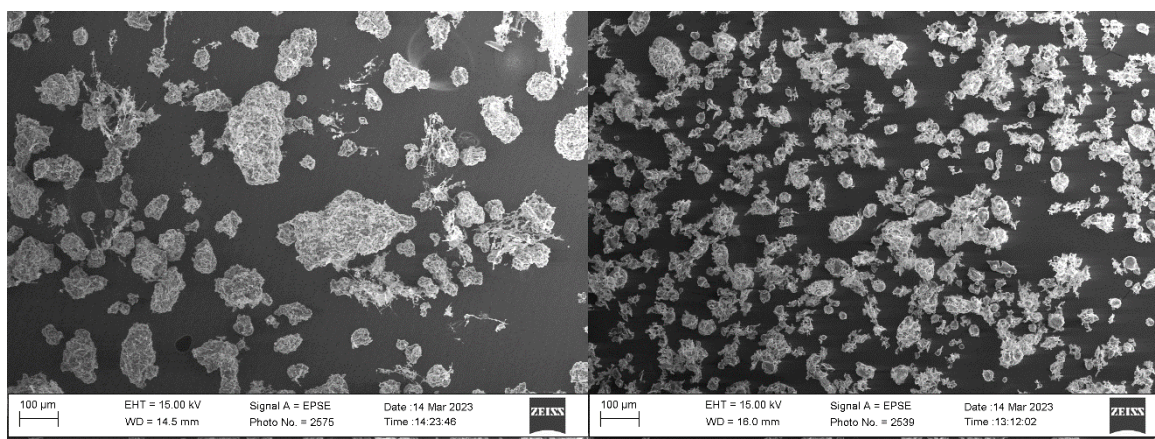
Kuna meetodiarenduse käigus katsetatud töötlemine ei andnud kõikide proovide puhul sarnast tulemust ning vajasis erineva arvu kordi töötlemist, siis otsustati kõik proovid analüüsida töötlemiseta. Kuna pH mõjutab taimsete valkude lahustuvust, viidi katse läbi kahel pH-l 1) taimsete valgupulbrite natiivsel pH-l, 2) 4,5 pH-l, mis annab indikatsiooni, kuidas need tooted võiksid käituda fermenteeritud vedelates piimaanalooogides.

Joonisel 15 on esitletud natiivsel pH-l ning joonisel 16 pH 4,5 hernepulbri 7 SEM pilt. Herne valgupulbri 7 (joonised 15 ja 16) natiivse proovi puhul on näha palju erinevaid osakesi. Esineb suuremaid sopilisi osakesi, ümaraid ja siledaid kuid ka väikseid ja nurkjaid. Esineb ka muid fiibrilaadseid osakesi. pH 4,5 olevatel osakestel on täiesti teistsugune osakeste struktuur ning näiliselt näevad kõik osakesed samalaadi välja. Suuresti on osakesed sarnased valgupulbrile 29 natiivses pH-s (joonis 11), kuid valgupulbri 7 puhul on osakesed palju rohkem agregeerunud. Herne valgupulbri 7 olid osakesed siiski sensoorselt tunda (tabel 1) aga valgupulbri 29 puhul mitte. Osakesed on pinna poolest siledad.



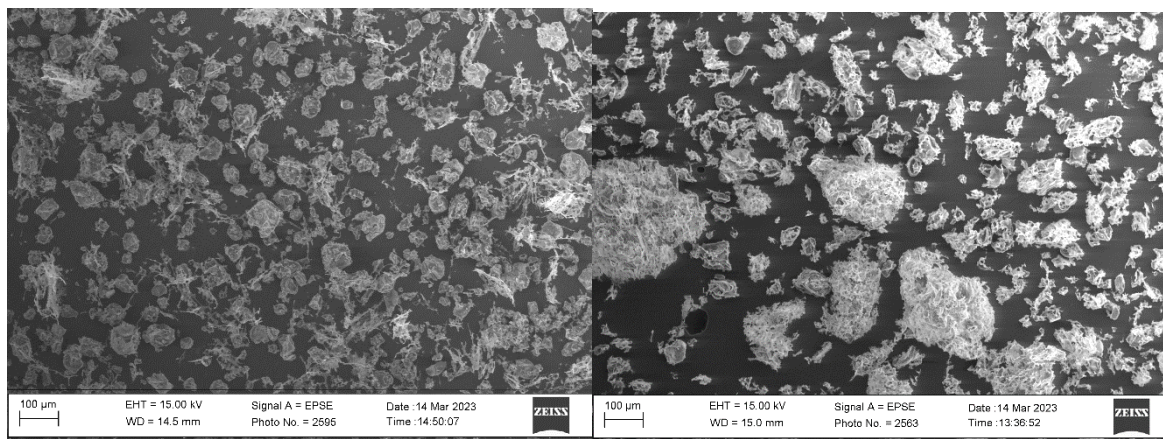
Joonis 15. Hernes 7 valgupulbri SEM pilt natiivne pH **Joonis 16.** Hernes 7 valgupulbri SEM pilt pH4,5

Joonisel 17 on esitletud natiivsel pH-l ning joonisel 18 4,5 pH hernepulbri 12 SEM pilt. Herne valgupulbri 12 (joonised 17 ja 18) natiivsel pH proovi SEM pildil on näha piklikke agregeerunud osakesi, mille pind on kare. Osakeste kuju ja tüüp on üksteisele sarnane, kuid nende suurus varieerub. pH 4,5 juures esinevad läbivalt ühtlase suurusega osakesed, mis on vähesel määral agregeerunud. Osakeste kuju varieerub palju ning pind on sopiline ja kare.



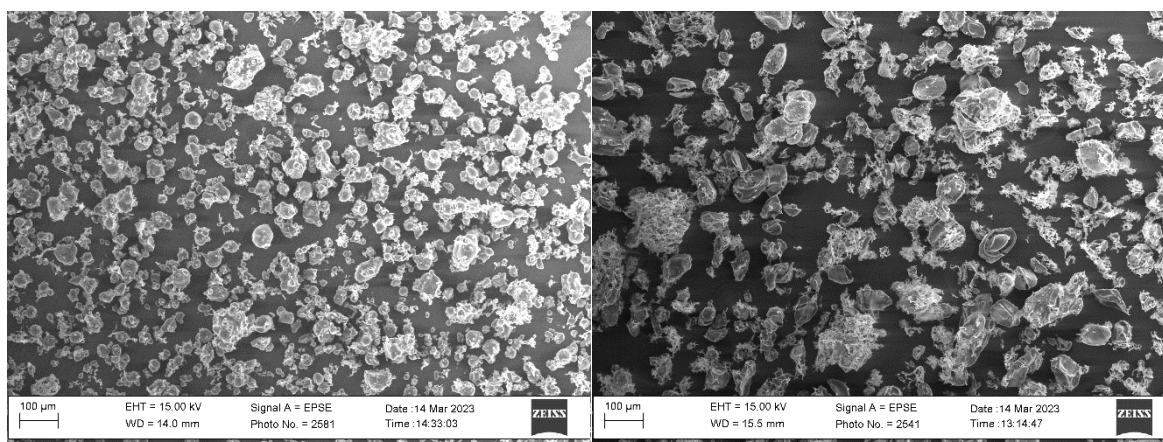
Joonis 17. Hernes 12 valgupulbri SEM pilt natiivne pH **Joonis 18.** Hernes 12 valgupulbri SEM pilt pH 4,5

Joonisel 19 on esitletud natiivsel pH-l hernepulber 19 ning joonisel 20 4,5 pH hernepulbri 15 SEM pilt. Herne valgupulbri 15 (joonis 20) pH 4,5 juures olevate vasakul all osakeste suurus varieerub tugevalt ja osakeste pind on kare ja sopiline. Herne valgupulbri 19 (joonis 19) natiivse pH juures oleva proovi suurus varieerub vähe. Osakeste kuju on enamjaolt ümar või ovaalne. Sopilisust esineb osade osakeste puhul ning nende pind on sileda poolsem. Esineb ka palju fiibrilaadset materjali.



Joonis 19. Hernes 19 valgupulbri SEM pilt natiivne pH **Joonis 20.** Hernes 15 valgupulbri SEM pilt pH 4,5

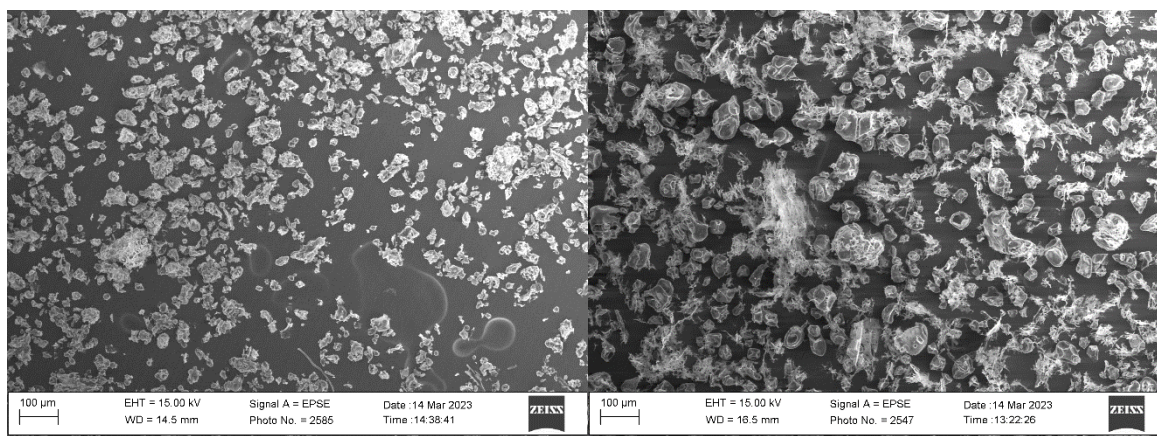
Joonisel 21 on esitletud natiivsel pH-l ning joonisel 22 4,5 pH hernepulbri 29 SEM pilt. Herne valgupulbri 29 (joonised 21 ja 22) natiivse pH proovi puhul on osakesed üldiselt ümarad ja siledad ning omavahel võrdlemisi vähe agregeerunud võrreldes hapustatud pH prooviga. Natiivse pH proovi osakeste suurus ei erine omavahel palju. Hapustatud proovi SEM pildil on seevastu näha väga palju erineva kuju ja morfoloogiaga osakesi. On suuremaid sopilisi ja karedaid osakesi, samal ajal leidub väiksemaid osakesi, mis on sileda pinnaga, kuid väga omapärase kujuga. Selles proovis esineb piklikke, ümaraid, kandilisi ja üldises mõttes kuju poolest keerulisema struktuuriga osakesi.



Joonis 21. Hernes 29 valgupulbri SEM pilt natiivne pH **Joonis 22.** Hernes 29 valgupulbri SEM pilt pH 4,5

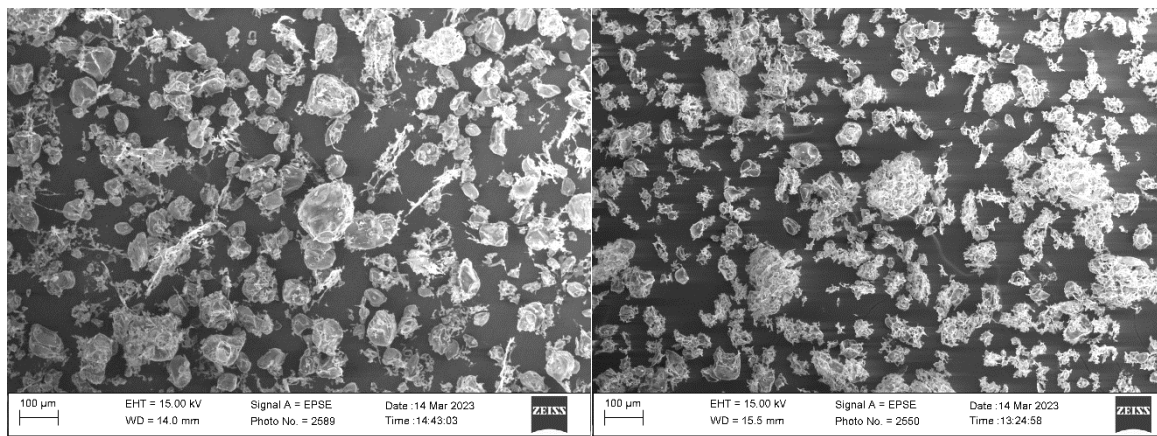
Joonisel 23 on esitletud natiivsel pH-l ning joonisel 24 4,5 pH hernepulbri 31 SEM pilt. Herne valgupulbri 31 (joonis 23) natiivse valgupulbri kohta on mõningad osakesed pisut agregeerunud. Osakeste suurus varieerub oluliselt. Suuremad osakesed on sopilised. Sellest väiksemad osakesed on karedalaadsed ja esinevad pinnal kääunud. Siledaid osakesi sisuliselt ei leidu. Kuju poolest ümaraid osakesi ei leidu, pealmiselt ainult keerulisemad käägarad.

Hernes 31 (joonis 24) happelise proovi osakesed ei ole nii agregeerunud, kui natiivse pH proovi osakesed. Leidub suuremaid fibrilaadseid osakesi. Muude osakeste pind on sile ja sopilisust esineb vähe, kuid leidub terava, ümara ja kandilise kujuga osakesi.



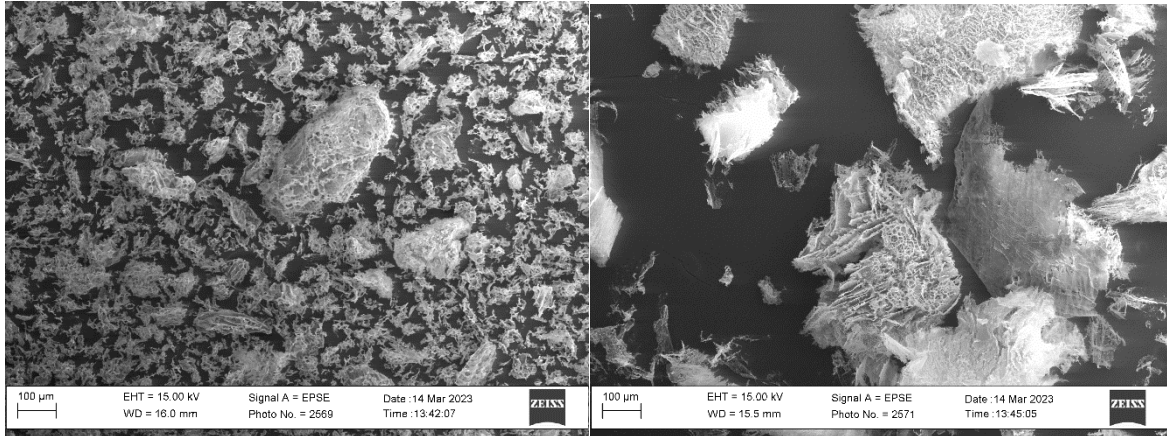
Joonis 23. Hernes 31 valgupulbri SEM pilt natiivne pH **Joonis 24.** Hernes 31 valgupulbri SEM pilt pH 4,5

Joonisel 25 on esitletud natiivsel pH-l ning joonisel 26 4,5 pH hernepulbri 37 SEM pilt. Herne valgupulbril 37 (joonis 25 ja 26) natiivse pH proovi SEM pildil on mõne osakese puhul näha agregeerumist või sopilisust, teised osakesed on siledad ja ümarad ja mõned osakesed on kandilised. Osakeste suurus ei varieeru väga palju. Hapustatud proovi osakeste puhul on märgata suuremat agregeerumise astet ja sopilisust, siledaid ja ümaraid osakesi esineb väga vähe ning osakeste suurus varieerub rohkem.



Joonis 25. Hernes 37 valgupulbri SEM pilt natiivne pH **Joonis 26.** Hernes 37 valgupulbri SEM pilt pH 4,5

Joonise 27 on toodud Soja 39 ja joonisel 28 Nisu 44 SEM pildid. Soja valgupulbri 39 (joonis 27) pH 4,5 puhul on näha suuri agregaatide ning väikseid tükikesi. Osakesed on üksteisele sarnaselt sopilised ja karedad. Kuju poolest on osakesed pigem piklikud. Siledaid ja ümaraid osakesi ei leidu. Nisu valgupulbri 44 (joonis 28) pH 4,5 puhul on märgata väga suuri osakesi, mille pind on sopiline, kareda ja kihiline. Osakesed kuju on kandiline ja piklik. Väikeseid, siledaid ja ümaraid osakesi ei leidu.



Joonis 27. Soja 39 valgupulbri SEM pilt pH 4,5 **Joonis 28.** Nisu 44 valgupulbri SEM pilt pH4,5

Tabel 2. Tabel 2 kirjeldab hinnanguid, mis anti natiivsetele kui ka pH 4,5 proovidele. Kuju puhul 0 tähendab sfäärilist osakest ning 10 tähendab käärat ehk ei ole üldse sfäärile sarnane. Kareduse puhul 0 kirjeldab siledat osakese pinda ning 10 krobelist või sopilist pinda.

Natiivne proov	Kuju	Karedus
Hernes 12	10	10
Hernes 31	9	9
Hernes 37	3	1
Kaer 6	8	10
Hernes 7	7	7
Hernes 29	3	2
Hernes 19	5	2
Proov pH 4,5	Kuju	Karedus
Hernes 12	10	8
Hernes 31	8	4
Hernes 7	7	2
Kaer 6	8	10
Hernes 29	6	4
Hernes 37	10	10
Hernes 15	8	10
Soja 39	10	10
Nisu 44	10	10

Tabel 2 väärtustega arvatati korrelatsioone, mis on esitatud järgmises peatükis

2.4.3 Korrelatsioonide analüüs ja arutelu

Siin peatükis on esitatud korrelatsioonid eelnevatest peatükkidest tulenevatest andmetest ning tehti järeldused nendest.

Kui vaadata joonist 8, siis saab järeldada, et pH 4,5 juures on selge seos sensoorsel tunnetusel ja instrumentaalselt mõõdetud osakeste suurusel ning seda toetab ka korrelatsioon 0,89 (tabel 3). Natiivse pH puhul puudub seos instrumentaalsel osakese suurusel ja sensoorsel tunnetusel (negatiivne korrelatsioon -0,25 (tabel 3)). See tuleneb sellest, et valgupulbri hernes 31 ja 37 on osakeste suurus 92µm, kuid hernes 31. tundi sensoorselt (1,3) ja hernes 37. ei tuntud. Sama olukord

on valgupulbri 6, 7, ja 29 puhul. 29. valgupulbrit ei tuntud sensoorselt, kuigi osakeste suurus oli suurem, kui pulbril 6 ja 7, kuid 6. (1,3) ja 7. (2,3) tunnetati sensoorselt. 6. 7. ja 29. valgupulbrid jäid sarnasesse vahemikku suuruse poolest vastavalt 151 µm, 152 µm, 195 µm.

Tabel 3. Erinevad korrelatsioonid instrumentaal osakeste suuruse, sensoorsete osakeste suuruse ja kuju ning kareduse suhtes (Excel CORREL)

	Korrelatsiooni koefitsent
Osakeste suurus D90 (µm) vs Sensoorne osakese suurus- natiivne pH	-0,25
Osakeste suurus D90 (µm) vs Sensoorne osakese suurus- pH 4,5	0,89
Osakeste suurus D90 (µm) vs SEM kuju- natiivne pH	-0,45
Osakeste suurus D90 (µm) vs SEM kuju- pH 4,5	0,47
Osakeste suurus D90 (µm) vs SEM karedus- natiivne pH	-0,47
Osakeste suurus D90 (µm) vs SEM karedus- pH 4,5	0,45
Sensoorne osakese suurus vs SEM kuju- natiivne pH	0,77
Sensoorne osakese suurus vs SEM kuju- pH 4,5	0,48
Sensoorne osakese suurus vs SEM karedus- natiivne pH	0,78
Sensoorne osakese suurus vs SEM karedus- pH 4,5	0,55

Kui võrrelda valgupulbrite osakeste suurust D90 SEM visuaalsel skaalal antud kuju või pinnakareduse väärtustega, siis pH 4,5 proovide juures esines korrelatsioon kuju ja kareduse puhul. Natiivsetes proovides puudub korrelatsioon osakese suuruse D90 ja SEM visuaalse kuju, kareduse ning sensoorse tunnetuse vahel. Küll aga esineb tugev korrelatsioon natiivsetel proovidel sensoorse tunnetuse vahel ja SEM visuaalse kuju ja kareduse skaala vahel, mis selgitaks seda, miks osasid osakesi tunti sensoorselt. Korrelatsioon esineb pH 4,5 proovide sensoorse tunnetuse vahel ja SEM visuaalse kuju ja kareduse skaala vahel, kuid mitte nii tugev (tabel 3).

Töös läbiviidud katsed kinnitasid hüpoteesi osaliselt. Natiivsete valgupulbrite puhul esines tugevam korrelatsioon pinnakareduse ja kuju suhtes kui pH 4,5 juures olevate valgupulbrite puhul.

pH 4,5 juures oli selge korrelatsioon osakese suuruse ja sensoorse tunnetuse vahel- seda kinnitab ka varasemalt uuritud tööde tulemustest.

Oluline järeldus, mida saab teha on, et osakese kuju ja karedus mängib rolli osakese tundmist sõmerana. Selle poolest vajaks uurimist osakesed, mis langeksid sarnasesse suurusjärku ning nendest osad peaksid olema sensoorselt tuntavad ja teised mitte. Selle puhul saaks leida olulise morfoloogilise erisuse, mis teeb ühest sensoorselt tuntavaks ja teist mitte. Selline soovitus sellepärast, kuna praegu esines ainult kaks proovi hernes 29 ja hernes 37, mida sensoorselt ei tuntud. Samuti saab ka lisaks uurida, kuidas proovide töötlemine mõjutaks sensorset tajuvust ning kas saab meetodi arendust optimeerida

Teised uuringud on näidanud, et sõmeruse tundlikkus sõltub suureneb kui suureneb keskmise osakese suurus ja kontsentratsioon. Imai et al. (1995) töös võrreldi kontrolllahust, kus oli keskmise osakese suurus 43 µm ja lahuse kontsentratsioon oli 2.4% lahusega, kus oli osakese suurus 78 µm ja kontsentratsioon 1.2%. 78 µm osakeste lahuses tunti sama astmega sõmerust kui 43 µm osakeste lahuses. Samuti võrreldi lahusega kus oli osakese suurus 11 µm ja lahuse kontsentratsioon 4,8% ning samuti tunti sõmerust samal tasemel, kui lahuses, mille osakese suurus oli 43 µm. Seega võib öelda,

et sõmeruse aste sõltub nii kontsentratsioonist kui ka osakese suurusest. Samuti sõltub sõmeruse tundlikkus ka lahuse viskoossusest. Mida viskoossem oli lahus, seda vähem tunti sõmeraid osakesi. (Imai et al., 1995)

Leiti SEMiga, et siledaid ja ümaraid hüdroksüpropüülmetüülselluloosi osakesi tuntakse sensoorselt. Osakese suurused, mida mõõdeti olid kuivana 90, 127, 263 ja 500 μm . Kõiki osakesi tunti sensoorselt, kuid üldiselt vähesel määral ning, mida suurem oli osake seda rohkem seda tunti. Samuti osakese suurus muutus umbes 10% suuremaks, kui neid pandi vesilahusesse võrreldes, kui neid mõõdeti kuivana. Samuti oli katsetes näha, et viskoossemates lahustes on osakeste sõmerust vähem tunda. (Lopez et al., 2016)

Kokkuvõte

Käesolevas bakalaureuse töös uuritakse taimseid valke, et hinnata nende sobivust loomsete valkude alternatiivideks. Vajadus loomsete valkude alternatiivide järgi tuleneb erinevatest põhjustest.

Loomse valgu tootmiseks kulub palju rohkem vee ja energiakulusid kui taimsete valkude tootmiseks. Loomakasvatusega on seotud ka suur kasvahoone gaaside tootmine globaalsel tasandil. Populatsiooni kasvuga tuleneb suurenenud toidunõudlus. Praegusel hetkel on heade funktsionaalsete omadustega valgud pealmiselt loomset päritolu. Kuna loomseid valke on kulukas toota, on tekkinud huvi jätkusuutlikuse mõttes leida alternatiivseid valguallikaid nagu taimsed valgud.

Vedelad piimaalternatiivid on tänapäeval kiiresti kasvav segment toiduarenduses. Piima allergiad ja laktoosi talumatus on soodustav faktor, miks aretada alternatiivseid taimseid jooke. Taimsetel jookidel esinevad probleemid säilimise ja töötlemisega ning toitainete sisaldusega võrreldes lehmapiimaga. Piima alternatiividel on sensoorne aktsepteeritavus suuresti piirav faktor maailmas, mistõttu on oluline uurida ja parandada neid omadusi.

Eesmärgiks on kasutada SEM-i, et uurida taimseid valgupulbreid, et määrata nende morfoloogilisi omadusi. Morfoloogilised omadused, mida visuaalselt uuriti on osakese kuju ja pinnakaredus. Kuju säilitamiseks vesilahuses kasutati külmuivatust. Teisejärguliseks uurimisküsimuseks jäi meetodiarendus. Meetodiarenduseks katsetati sademe pesu, millega töödeldi valgupulbreid, et eemaldada soovimatuid või lahustuvaid osakesi pulbritest.

Bakalaureuse töös tehtud analüüsid kinnitasid hüpoteesi, et osakese kujul ja karedusel on mõju sensoorsele tunnetusele. Seda tõestab katsetulemuste ja analüüsi põhjal saadud tugev korrelatsioon sensoorse osakese suuruse tunnetuse ja SEM visuaalse kuju ja kareduse hinnangu vahel. Küll aga vajaks täpsemat uurimist valgupulbrid, mille sensoorne tunnetus on nullilähedane, et määrata kindlaks omadused, miks neid ei tunta sensoorselt. Meetodi arenduse seisukohalt saab öelda, et õnnestus osaliselt. Mõnede proovide puhul saab valgupulbreid töödelda, kuid teiste puhul võib see kahjustada osakesi. Saaks uurida, kuidas mõjutab valkude töötlemine sensoorset tajuvust ning kas töötlemist saab kuidagi optimeerida nii, et osakesi võimalikult vähe kahjustada.

Töös läbiviidud katsed kinnitavad osaliselt varasemaid uuringuid nagu pH 4,5 proovide analüütilise osakeste suuruse ja sensoorse osakeste suuruse tunnetuse tugev korrelatsioon. Osakese suuruse kasvuga suureneb ka osakeste sensoorne taju. Natiivse pH proovide puhul ei saanud kinnitust.

Abstract

In this bachelor's thesis, plant proteins are studied in order to evaluate their suitability as alternatives to animal proteins. The need for animal protein alternatives stems from a variety of reasons.

Animal protein production requires much more water and energy than plant protein. Animal husbandry is also associated with a large production of greenhouse gases on a global scale. With population growth comes increased food demand. Currently, proteins with good functional properties are mainly of animal origin. Since animal proteins are expensive to produce, interest has arisen in terms of sustainability to find alternative protein sources such as plant proteins.

Liquid milk alternatives are a rapidly growing segment in food development today. Milk allergies and lactose intolerance are a contributing factor for breeding alternative plant-based drinks. Plant-based drinks have problems with preservation, processing and nutrient content compared to cow's milk. Sensory acceptability of milk alternatives is a major limiting factor in the world, so it is important to study and improve these properties.

The aim is to use SEM to study plant protein powders to determine their morphological characteristics. Morphological properties that were visually examined are particle shape and surface roughness. Freeze drying was used to preserve the shape in the aqueous solution. Method development remained a secondary research question. For method development, a precipitation wash was tested to treat protein powders to remove unwanted or soluble particles from the powders.

The analyzes carried out in the bachelor's thesis confirmed the hypothesis that the shape and roughness of the particle have an effect on sensory perception. This is proven by the strong correlation between sensory particle size perception and SEM visual shape and roughness estimation obtained from the experimental results and analysis. However, protein powders with near-zero sensory perception would require more detailed investigation to determine the properties why they are not sensory-perceptible. From the point of view of the development of the method, it can be said that it was partially successful. For some samples, protein powders can be processed, but for others, this can damage the particles. It would be possible to investigate how the processing of proteins affects sensory perception and whether the processing can somehow be optimized in such a way as to damage the particles as little as possible.

The experiments carried out in this work partially confirm previous studies such as the strong correlation between the analytical particle size and the sensory particle size perception of pH 4.5 samples. As the particle size increases, the sensory perception of the particles also increases. No confirmation was obtained for native pH samples.

Tänuavaldused

Autor soovib tänada lõputöö juhendajat Kadi Jakobsoni ning kaasjuhendajat Katrin Laost, kes olid suureks abiks lõputöö vormistamisel. Eraldi soovin tänada Aleksei Kaledat SEM-i mõõtmiste juhendamise eest ning TFTAК-i meeskonda osade katsetulemuste eest.

Kasutatud kirjanduse loetelu

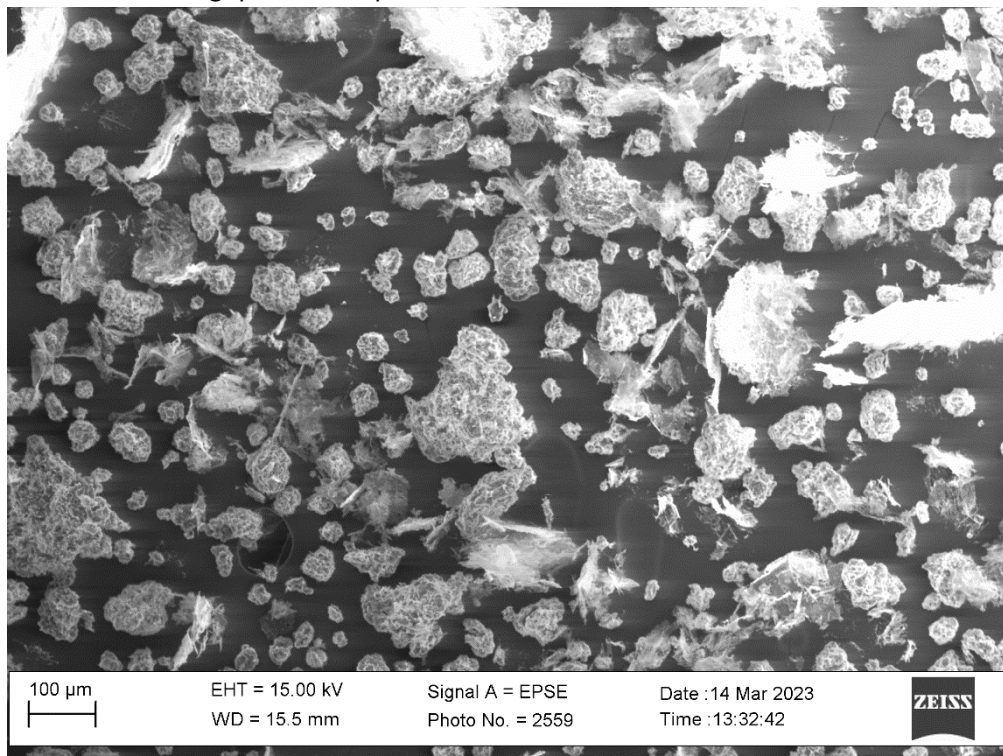
- Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3). Kasutamise kuupäev: 20. 4 2023. a., allikas <https://academic.oup.com/ajcn/article/78/3/660s/4690010>
- Protein in diet*. (2009). Kasutamise kuupäev: 20. 4 2023. a., allikas United States National Library of Medicine, National Institutes of Health:<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002467.htm>
- Appelqvist, I. A. M., Cochet-Broch, M., Poelman, A. A. M., & Day, L. (2015). Morphologies, volume fraction and viscosity of cell wall particle dispersions particle related to sensory perception. *Food Hydrocolloids*, 44, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.012>
- Dobro, M. J., Melanson, L. A., Jensen, G. J., & McDowall, A. W. (2010). Plunge Freezing for Electron Cryomicroscopy. *Methods in Enzymology*, 481(C), 63–82. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)81003-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)81003-1)
- Echlin, P. (2009). Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. In *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. 329lk. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-85731-2>
- Engelen, L., De Wijk, R. A., Van Der Bilt, A., Prinz, J. F., Janssen, A. M., & Bosman, F. (2005). Relating particles and texture perception. *Physiology and Behavior*, 86(1–2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.022>
- Engelen, L., Van Der Bilt, A., Schipper, M., & Bosman, F. (2005). *ORAL SIZE PERCEPTION OF PARTICLES: EFFECT OF SIZE, TYPE, VISCOSITY AND METHOD*.
- Grossmann, L., Kinchla, A. J., Nolden, A., & McClements, D. J. (2021). Standardized methods for testing the quality attributes of plant-based foods: Milk and cream alternatives. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 2, pp. 2206–2233). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12718>
- Grossmann, L., & McClements, D. J. (2023). Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins. *Food Hydrocolloids*, 137, 108416. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108416>
- Grossmann, L., & Weiss, J. (2021). *Alternative Protein Sources as Technofunctional Food Ingredients*. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-062520>
- Imai, E., Hatae, K., & Shimada, A. (1995). Degree of Grittiness Perceived as Mouth Feeling Effects of Particle Size, Concentration of Dispersed Particles and Dispersion. In *J. Home Econ. Jpn* (Vol. 46).

- Jiang, J., Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2018). A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins. *Current Opinion in Food Science*, *19*, 50–56.
<https://doi.org/10.1016/J.COFS.2018.01.002>
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Reetu, Punia, S., Dhakane-Lad, J., Singh, S., Dhupal, S., Chandra Pradhan, P., Bhushan, B., Anitha, T., Alajil, O., Alhariri, A., Amarowicz, R., & Kennedy, J. F. (2022). Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 123). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106986>
- Lopez, F. L., Bowles, A., Gul, M. O., Clapham, D., Ernest, T. B., & Tuleu, C. (2016). Effect of formulation variables on oral grittiness and preferences of multiparticulate formulations in adult volunteers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *92*, 156–162.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.07.006>
- Ma, K. K., Greis, M., Lu, J., Nolden, A. A., McClements, D. J., & Kinchla, A. J. (2022). Functional Performance of Plant Proteins. In *Foods* (Vol. 11, Issue 4). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/foods11040594>
- Mangold, N. (2011). Ice sublimation as a geomorphic process: A planetary perspective. *Geomorphology*, *126*(1–2), 1–17. <https://doi.org/10.1016/J.GEOMORPH.2010.11.009>
- Maria Fanelli, R. (2018). *The interactions between the structure of the food supply and the impact of livestock production on the environment. A multivariate analysis for understanding the differences and t The impact of new technologies on competitiveness and productivity of rural SMEs: a cross-country exploratory survey. View project Agricultural Economics and Sustainable Food Consumption" View project FOOD SAFETY MANAGEMENT 131.*
<http://www.fao.org>
- McClements, D. J., & Grossmann, L. (2021). The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 4, pp. 4049–4100). Blackwell Publishing Inc.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12771>
- Mohammed, A., & Abdullah, A. (2018). *SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM): A REVIEW.*
- Nederland in Cijfers 2020.* (n.d.). Retrieved May 22, 2023, from <https://longreads.cbs.nl/the-netherlands-in-numbers-2020/how-do-we-use-our-land/>
- Plant Protein Primer.* (2020). <https://gfi.org/resource/plant-protein-primer/>
- Pointke, M., Albrecht, E. H., Geburt, K., Gerken, M., Traulsen, I., & Pawelzik, E. (2022). A Comparative Analysis of Plant-Based Milk Alternatives Part 1: Composition, Sensory, and Nutritional Value. *Sustainability (Switzerland)*, *14*(13). <https://doi.org/10.3390/su14137996>

- Prosapio, V., Norton, I., & De Marco, I. (2017). Optimization of freeze-drying using a Life Cycle Assessment approach: Strawberries' case study. *Journal of Cleaner Production*, *168*, 1171–1179. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.125>
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 53, Issue 9, pp. 3408–3423). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>
- Statistikaamet. (2020). *Ökosüsteemi pindala jaotus omaniku liigi ja ökosüsteemi tüübi järgi _ 2020*. <https://www.stat.ee/et/avasta-statistikat/valdkonnad/keskkond/elurikkuse-kaitse-ja-maakasutus>

Lisad

LISA 1. Kaer 6 valgupulbri SEM pilt



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Erko Lehtsaar

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Skaneeriva elektronmikroskoopia rakendamine taimsete valgupulbrite uurimiseks,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Kadi Jakobson,

(juhendaja nimi)

- 1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

30.05.2023 (kuupäev)

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