



# **ÕLLERABA VÄÄRINDAMINE TAHKEFAASILISEL FERMENTATSIOONIL**

**Magistritöö**

Üliõpilane: Linda Aasma  
Juhendaja: Toomas Paalme  
Kaasjuhendaja: Tiina Randla  
Õppekava: KATM 02/18 –  
Toidutehnoloogia ja -arendus

Tallinn  
2022

# 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: Linda Aasma

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendajad:

Toomas Paalme

[allkiri ja kuupäev]

Tiina Randla

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Toomas Paalme

[allkiri ja kuupäev]

# ANNOTATSIOON

Õlleraba on lämmastiku- ja kiudainerikas õlletööstuse kaassaadus, millel on tänu oma suurele kättesaadavusele ja odavale hinnale suur potentsiaal biotehnoloogias ja toidutööstuses. Õlleraba kasutamine toidus on aga raskendatud tänu selle jäigale tekstuurile, mida põhjustab ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi kolmikstruktuur. Antud töös kasutati erinevaid *Basidiomycota* sugukonda hulka kuuluvaid kandseeni õlleraba tahkefaasiliseks fermenteerimiseks. Läbi selle protsessi väheneb õlleraba ligniini sisaldus ning suureneb valkude sisaldus, andes õllerabale lisaväärtust.

Töö ülesandeks oli uurida seente kasvu õllerabal. Seente kasvu analüüsi läbi mütseeli diameetri kasvu jälgimise ning õlleraba, kui substraadi, koostise muutuse jälgimise. Substraadi muutuse tuvastamiseks mõõdeti ligniini sisaldust gravimeetriliselt; glükoosi, arabiinose ja ksüloosi sisaldust vedelik-kromatograafiaga ja üldlämmastiku ning valkude sisaldust CHNS analüsaatoriga.

Töös on tehtud kirjanduse ülevaade, kus tuuakse välja töösse puutuv informatsioon õlleraba formuleerimisest läbi õlle tootmise, õlleraba koostisest, töötlemise ja väärindamise võimalustest. Samuti on toodud ülevaade seente kultiveerimisest ja seentega õlleraba tahkefaasilisest fermentatsioonist ning saadustest. Eksperimentaalne osa koosneb materjalidest ja kasutatud mikroorganismidest ning töös kasutatud meetoditest. Tulemustes on välja toodud seente kasv õllerabal 2 nädala jooksul, suhkrute sisalduse muutumine, ligniini tarbimine ning valgusisalduse suurenemine protsessis. Lisaks on toodud õlleraba ja fermenteeritud õlleraba lisandiga küpsetatud saiaide tekstuuri- ja värviomadused, kolorimeetria tulemused ja sensoorse analüüsi tulemused.

Substraadi muutuse jälgimisel täheldati, et seenemütseeli kasvuga tõusis õlleraba monosahhariidide ja valkude sisaldus märgatavalt ja ligniini sisaldus langes. Leiti, et kõige efektiivsemad ligniini lagundajad olid šiiitake (*Lentinula edodes*), lakkvaabik (*Ganoderma lucidum*) ja läikvaabik (*Ganoderma resinaceum*). Samade seente poolt fermenteeritud õlleraba proovides leiti ka suurim valgu juurdekasv. Õlleraba ja fermenteeritud õlleraba lisati osaliselt (10%) nisujahu asendamiseks saia retsepti ning hinnati saadud toodete tekstuuriomadusi, värvust ja sensoorseid omadusi. Katsest selgus, et fermenteeritud õlleraba kasutamine saias toob tootes kaasa ebasoovitavad sensoorseid omadusi.

Töö on esitatud 45 leheküljest, 10 joonisest, 9 tabelist ja 1 lisast.

# ABSTRACT

Title: Valorization of brewer's spent grain through solid- state fermentation

Brewer's spent grain is nitrogen and fiber-rich by-product of the beer industry. Due to its high availability and low cost, it has great potential for use in the biotechnology and food industry. However, the use of brewer's spent grain in food is hampered by its rigid texture, which is caused by the triple structure of lignin, cellulose, and hemicellulose. Different species of Basidiomycota fungi phylum were used in this work for solid-state fermentation of the brewer's spent grain. Through solid-state fermentation, the lignin and polysaccharide content of the brewer's spent grain decreases, and the protein content increases, giving added value to brewer's spent grain.

The aim of the work was to study the growth of fungi in the brewer's spent grain. Fungal growth was analyzed by monitoring the increase in mycelium diameter and the change in composition of the brewer's spent grain as a substrate. The lignin content was measured quantitatively; glucose, arabinose, and xylose by liquid chromatography and total nitrogen and protein content by CHNS analyzer. Brewer's spent grain and the fermented brewer's spent grain were partially (10%) added to the bread recipe to replace the wheat flour. and the texture, color, and sensory properties of the resulting products were evaluated.

A review of relevant literature is provided in the work, which provides information on the formulation of brewer's spent grain through the production of beer, the composition of brewer's spent grain, the possibilities of processing and valorizing it, and the cultivation of mushrooms and solid-state fermentation and products. The experimental part consists of the materials and microorganisms used in the work and methods used to carry out the experiments. The results show the growth of fungi on brewer's spent grain over 2 weeks, the concentration of sugars, consumption of lignin by the fungi, and the increase in protein content of the spent grain. In addition, the texture parameters of the baked breads, the results of colorimetry and the results of sensory analysis are presented.

Monitoring the change in the substrate showed that with the growth of the fungal mycelium, the content of monosaccharides in the brewer's spent grain increased significantly and the lignin content decreased. The most effective lignin degraders were found to be *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma resinaceum*. The highest protein growth was found in the samples of the brewer's spent grain fermented by the same fungi. The texture, color, and sensory properties of the baked enriched breads were evaluated. The experiment showed that the use of fermented brewer's spent grain in the pastry results in undesirable properties in the product.

The work consists of 45 pages, 9 tables, 10 illustrations, and 1 appendix.



# LÜHENDID

ÜRO- Ühinenud Rahvaste Organisatsioon

FAO- (Food and Agriculture Organization of the United Nations)- ÜRO toidu ja põllumajanduse organisatsioon

SD- (standard deviation)- standardhälve

MEA- (malt extract agar)- linnaseekstrakti agar

PDA- (potato dextrose agar)- kartuli dekstroosagar

MEP- (malt extract powder)- linnaseekstrakti pulber

N- lämmastik

TPA- tekstuuri profiili analüüs

AIR- (alcohol insoluble residue)- alkoholis lahustumatu jääk

HPLC- (High-performance liquid chromatography)- kõrg-efektiivne vedelikkromatograafia

Rpm- (revolutions per minute)- pööret minutis

GF/C filter- (Glass microfiber filters)- klaas-mikrokiust filter

# SISUKORD

Autorideklaratsioon .....	2
ANNOTATSIOON.....	3
ABSTRACT.....	4
LÜHENDID.....	5
SISUKORD .....	6
SISSEJUHATUS .....	9
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	10
1.1. Õlleraba moodustumine õlle tootmisel .....	10
1.1.1. Oder.....	10
1.1.2. Linnastamine .....	11
1.1.3. Idandamine.....	11
1.1.4. Kuivatamine.....	12
1.1.5. Meskimine ja filtreerimine .....	12
1.2. Õlleraba iseloomustus.....	12
1.2.1. Õlleraba struktuur ja keemiline koostis .....	13
1.3. Õlleraba säilitamine .....	15
1.4. Õlleraba kasutamine toidus .....	15
1.5. Õlleraba väärindamine .....	16
1.5.1. Keemilis-füüsikaline käitlemine.....	17
1.5.2. Bioloogiline töötlemine .....	18
1.6. Seenemütseeli (tahkefaasiline) fermentatsioon .....	18
1.6.1. Laboratoorne kultiveerimine .....	19
1.6.2. Seente kultiveerimissaadused õllerabal.....	20

2.	Eesmärk .....	22
3.	Materjalid ja meetodid .....	23
3.1.	Organismid .....	23
3.2.	Materjalid ja reagensid .....	23
3.2.1.	Materjalid .....	23
3.2.2	Reagensid .....	23
3.3	Seente kasvatamine õllerabal .....	25
3.4	Analüütilised meetodid .....	25
3.4.1.	Värvi analüüs .....	25
3.4.2.	Tekstuuri analüüs .....	25
3.4.3.	Statistiline analüüs .....	26
3.5.	Õlleraba ja fermenteeritud õlleraba koostise analüüs .....	26
3.5.1.	Alkoholis lahustumatu fraktsiooni (AIR) valmistamine .....	26
3.5.2.	Ligniini määramine AIR-is .....	26
3.5.3.	Suhkrute määramine .....	26
3.5.4.	Üldlämmastiku määramine .....	27
3.6.	Saia küpsetamine .....	27
3.7.	Sensoorne analüüs .....	28
4.	Tulemused ja arutelu .....	29
4.1.	Erinevate söögiseente kasv õllerabal .....	29
4.2.	Seenemütseeli kasvu mõju õlleraba koostisele .....	31
4.2.1.	Seente kasvul vabanenud suhkrute sisaldus .....	31
4.2.2.	Ligniini tarbimine .....	31
4.2.3.	Valgusisalduse suurenemine õllerabas .....	32
4.3.	Õlleraba ja fermenteeritud õllerabaga rikastatud saiade omadused .....	33

4.3.1. Tekstuuranalüüsi tulemused .....	33
4.3.2. Kolorimeetria tulemused .....	34
4.3.3. Sensoorse analüüsi tulemused.....	35
5. JÄRELDUSED .....	37
KOKKUVÕTE .....	38
SUMMARY .....	39
KASUTATUD KIRJANDUS.....	40
Tänuavaldused .....	45
LISAD .....	46

## SISSEJUHATUS

Toidutööstuse kaassaadused on oma kasvava tootmismahu ja nende kõrvaldamisega kaasneva olulise keskkonnamõju tõttu üks keerulisemaid jäätmeid, mida käidelda. Nende väärindamine on muutumas üha populaarsemaks, eriti kui neid kasutatakse toidu koostisosana, sest toidupuudus ja jäätmetega seotud keskkonnamõjud on globaalsed probleemid. Õlletööstus tekitab tohututes kogustes kõrvalsaadusi ja jäätmeid; õlleraba, kasutatud humal ja pärm on kõige tavalisemad. Õlleraba on kõige arvukam õlletootmise kõrvalsaadus, mis moodustab keskmiselt 31% esialgsest linnase massist, ehk umbes 20 kg 100 liitri toodetud õlle kohta (Reinold et al., 1997). Õlleraba on saadaval kogu aasta vältel madalate hindadega või tasuta suurtes kogustes. Viimaste ÜRO Toidu ja Põllumajandus organisatsiooni FAO andmete järgi toodeti 2019 aastal maailmas 189 miljonit tonni odraõlut, seal hulgas Eestis toodeti 129500 tonni (FAOSTAT, 2022).

Õlleraba käitlemine on õlletööstuse jaoks üks suuremaid probleeme, kuna kogused on tohutud, turuväärtus on madal ning kõrge niiskusesisalduse tõttu on selle ladustamine probleemne. Viimastel aastatel on ringmajanduse põhialuseid järgides uuritud mitmeid viise õlleraba taaskasutamiseks (Assandri et al., 2020). Enamus õllerabast kasutatakse täna loomasöödana või komposteeritakse. Viimastel aastatel on hakatud rohkem uurima ka biotehnoloogias õlleraba substraadina kasutamist ning ka toidutehnoloogia kasutusvaldkondi tänu õllerabas sisalduvatele toitainetele, nagu valgud ja kiudained (Puligundla et al., 2021; Naibaho et al., 2021). Õlleraba koostist ja selle potentsiaali tervisliku toidu koostisosana on laialdaselt uuritud. Kuigi selle lisamine toitu tõstab toidu toitainelist väärtust, on leitud, et see mõjutab negatiivselt lõpptoote omaduste, eriti värvi ja tekstuuri vastuvõetavust (Nocente et al., 2021).

Selles töös uuritakse õlleraba väärindamist tahkefaasilisel fermentatsioonil filamentsete seentega. Seente kasutamine õlleraba väärindamisel võimaldab vähendada lahustumatu ligniini sisaldust ning suurendada valkude sisaldust õllerabas. Ligniin on seedumatu polüfenoolne makromolekul, ballastaine, mille lagundamine seente abil enne toidus kasutamist parandab selle toitainelist koostist (Aura et al., 2013). Filamentsetel seentel on madal substraadi spetsiifilisus ja nad toodavad laia valikut potentsiaalseid kõrge lisandväärtusegaprodukte. Nende kõrge valgu ja asendamatute aminohapete sisaldus ning madal rasvasisaldus muudavad filamentssed seemed heaks toidu lisandiks (Parchami et al., 2021).

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Õlleraba moodustumine õlle tootmisel

Õlleraba on õlletööstuses virde tootmisel tekkiv lahustumatu jääk (Joonis 1). See taimne kõrvalsaadus sisaldab teadaolevalt märkimisväärses koguses väärtuslikke komponente, mis jäävad pruulimisel kasutamata (Färcaş et al., 2016). Õlle meskimisel ekstraheeritakse linnastest enamik kääritatavaid suhkruid, mis jätab järele teravilja välimise seemnekestakihi (Arauzo, 2019).



Joonis 1. Õlleraba tööstuses (Miller et al, 2016)

Õlleraba iseloomu ja koostist mõjutab õlle valmistamise protsess (Joonisel 2). Õlle valmistamiseks puhastatakse koristatud oder ja liigitatakse suuruse järgi. Pärast vähemalt 4–6 nädalast puhkeperioodi, oder linnastatakse kontrollitud idanemisprotsessis, mis suurendab teravilja ensümaatilist aktiivsust ja nende sisaldust. Linnastamine toimub kolmes etapis: leotamine, idandamine ja kuivatamine, seejärel toimub linnaste jahvatamine, meskimine ja tahke faasi, õlleraba, välja filtreerimine (Lynch et al, 2016).

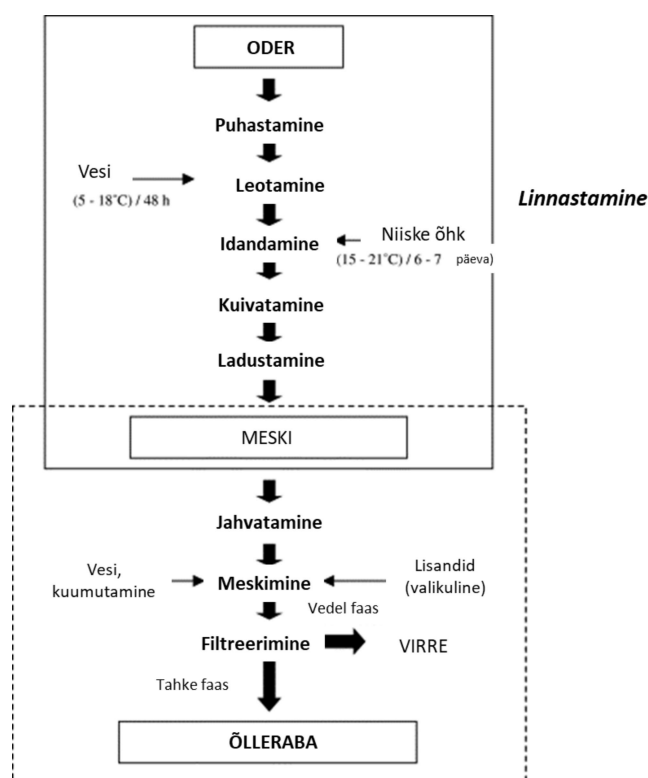
### 1.1.1. Oder

Oder on nisu, maisi ja riisi järel maailma kõige olulisem teravili ning seda kasutatakse peamiselt loomasöödana või toorainena õlle tootmiseks (Kendal et al., 1994). Oder on peamine õlle tootmiseks kasutatav tooraine. Odra tera võib jagada kolmeks põhiosaks: idu (embrüo), endosperm ja kest. Pruulimisprotsessi käigus lagundatakse linnase tärkliserikas endosperm ensümaatilisel, mille tulemusel vabanevad maltoos ja maltotriios ja dekstriinid, lahustuvad valgud, polüpeptiidid ja aminohapped. Saadud vedelik on tuntud kui õllevirre ning lahustumatud teraviljakomponendid (mis hõlmavad peamiselt teraviljakestasid) moodustavad õlleraba (Lynch et al., 2016).

## 1.1.2. Linnastamine

Õllepruulimine on olemuslikult biotehnoloogiline protsess: tooraine muundamine õlleks sõltub paljudest erinevatest ensümaatilistest reaktsioonidest ja mikroobide aktiivsusest. Õlu valmistatakse traditsiooniliselt neljast põhikomponendist: linnaste teraviljad (oder või muu), vesi, humal ja pärm. Kõik need koostisosad aitavad kaasa õlle lõplikule maitsele ja aroomile (Bartolomé et al., 2016). Linnas on õlle valmistamise üks põhikomponente, sisaldades tärklisi ja ensüüme, mis on vajalikud kääritatavate suhkrute saamiseks, mille pärmseened muudavad kääritamise käigus alkoholiks. Linnas annab ka värvi- ja maitseühendeid, mis aitavad kaasa õlle lõplikule iseloomule. (Färçaş et al., 2016). Õlle tootmine algab odra (või muude teraviljade, nagu nisu, sorgo, rukis või kaer) linnastamisest. Linnastamise peamine eesmärk on ensümaatilise aktiivsuse suurendamine teraviljas. Need ensüümid hüdrolüüsivad tärklise ja muud teras olevad ühendid meskimise ajal.

Linnastamise ajal leotatakse terad vees ja perioodiliselt õhutatakse, nn. leotamis- ja idanemisfaas. Linnastamise käigus lagunevad odravalgud endogeensete peptidaaside toimel osaliselt aminohapeteks ja väikesteks peptiidideks (Robertson et al., 2010).



Joonis 2. Õllevirde ja -raba tootmine (Lynch et al, 2016)

## 1.1.3. Idandamine

Leotamise ajal pannakse puhastatud odra terad umbes 5–18°C-lisse vette kaheks päevaks. Tera niiskusesisaldus jõuab vahemikku 42 kuni 48%. Leotusvett vahetatakse iga 6–8 tunni järel. Niisutus käivitab idanemise ja viib aleurooni aktiveerumiseni. Pärast leotamist suunatakse oder

idanemisnõusse, kus seda hoitakse kontaktis voolava niiske õhuvooluga, hoides temperatuuri 15 ja 21°C vahel (Mussatto et al., 2005).

Idanemise ajal aktiveeruvad kolm olulist ensüümide rühma: amülaasid, proteaasid / peptidaasid ja beeta-glükanaasid. Kõigil neil ensüümidel on linnastamise ja järgneva õlleprotsessi ajal oluline funktsioon: amülaasid muudavad odras sisalduva tärglise kääritatavateks suhkruteks; proteaasid ja peptidaasid lagundavad valke ja vabastavad vaba lämmastikku, beeta-glükanaasid lagundavad endospermi rakuseina, võimaldades teistel ensüümidel pääseda endospermile (Hesseling et al., 2019). Idandamisprotsessi kestab tavaliselt 6 või 7 päeva.

#### **1.1.4. Kuivatamine**

Järgmisena terad kuivatatakse. See peatab idanemise, inaktiveerib enamuse mikroorganisme ja vähendab rikkemisohtu ning määrab linnase mõju õlle lõplikule aroomile ja värvusele (Hesseling et al., 2019). Linnase oder kuivatatakse 40–60 °C juures niiskusesisalduseni 4–5%. Osa linnaseid kuivatatakse kõrgmatel temperatuuridel, mille juures ensüümid inaktiveeruvad. Pärast seda etappi säilitatakse kuivatatud linnased 3 või 4 nädalat, et saavutada homogeensus ja tasakaal (Mussatto et al., 2005).

#### **1.1.5. Meskimine ja filtreerimine**

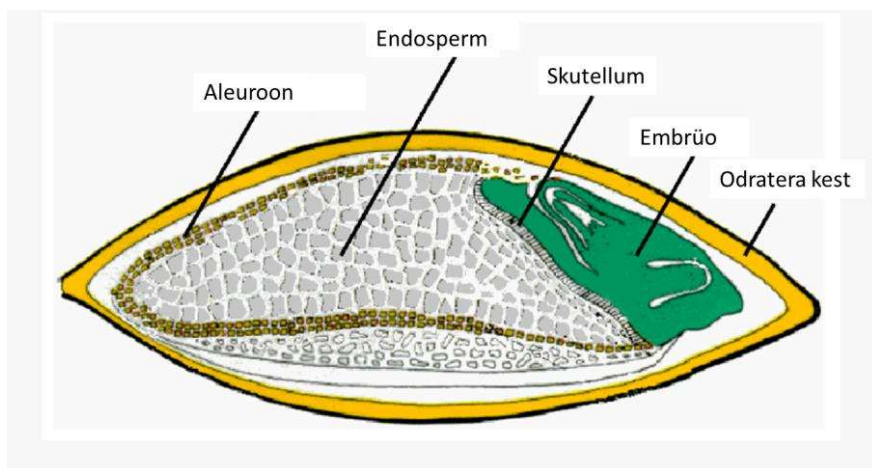
Linnastatud odraterad jahvatatakse ning segatakse kuuma veega. Temperatuuri tõstetakse retseptipõhiselt (alates 63°C kuni 78 °C-ni), et soodustada linnaste ensümaatilist hüdrolyüsi. Peamiselt laguneb tärglis, aga ka muud komponendid nagu valgud, (1-3, 1-4)- β-glükaanid ja arabinoksülaanid. Tärglis muudetakse kääritatavateks suhkruteks (peamiselt maltoos, maltotriios ja glükoos) ja mittekääritatavateks suhkruteks (dekstriinid) ning valgud lagunevad osaliselt polüpeptiidideks ja aminohapeteks. Selle ensümaatilise muundamise faasis (meskimine) tekib magus vedelik, mida tuntakse virdena. Lahustumatul osal lastakse settida ning virre filtreeritakse sellest läbi. Saadud virre kääritatakse õlleks ja järele jäänud tahke jääkfraktsioon on õlleraba (Mussatto et al., 2006).

### **1.2. Õlleraba iseloomustus**

Õlleraba võib pakkuda toidu-, keemia- ja energeetikatööstusele olulisi lähteaineid. Odra seemnekesta kihid sisaldavad rohkesti tselluloosi ja mittetselluloosid polüsahhariide ja ligniini, valke ning veidi lipiide. Kest sisaldab ka polüfenoolseid komponente (Mussatto et al., 2006). Valk ja kiudained on õllerabas kontsentreeritud, kuna suurem osa odratärglist eemaldatakse purustamise käigus.

Odratera koosneb kolmest põhiosast: idu (embrüo), endosperm ja kest (Joonis 3). Välja arvatud valgusisalduse erinevused erinevate teraviljade linnastes, on õlletehaste vahel õlleraba koostises vähe erinevusi (Robertson et al., 2011). Õlleraba keemiline koostis (Tabel 1) varieerub vastavalt odrasordile, koristusajale, linnastamise ja meskimise tingimustele ning meskimisprotsessis lisatud lisandite kvaliteedile ja tüübile (Martin-Garcia et al., 2020).





Joonis 3. Odratera ehitus (Chetrariu et al., 2020)

### 1.2.1. Õlleraba struktuur ja keemiline koostis

Õlleraba sisaldab tselluloosi, hemtselluloosi, mittetselluloosseid süsivesikuid, valke ja ligniini, ning väiksemas koguses lipiide ja tuhka (del Río et al., 2013). Tabelis 1 on toodud tähtsamate komponentide sisaldused õllerabas kuivkaalu järgi. Õllerabade koostis varieerub.

Tabel 1. Õlleraba koostis (Ikram et al, 2017)

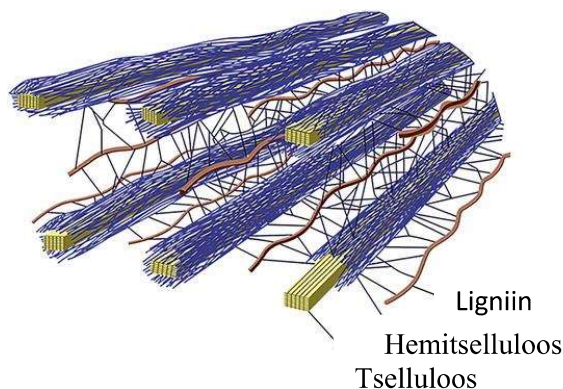
#### Koostis (g/kg) kuivkaalu põhjal

		Tselluloos		Hemitselluloos	
Valk	Ligniin	(Glükoos)	(Ksüloos)	(Arabinoos)	Tuhk
153-247	119-278	168-254	136-206	56-90	12-46

Linnastamise käigus lagunevad odravalgud endogeensete peptidaaside toimel osaliselt aminohapeteks ja väikesteks peptiidideks (Robertson et al., 2010), suur osa jääb aga meskimisel mittelaustuvaks. Õllerabas sisalduvat valku on võimalik kasutada inimese ja loomade toiduvalgu allikana, kui seda õnnestub isoleerida ilma selle funktsionaalsete omaduste liigse halvenemiseta (Niemi et al., 2013). Kõige sagedamini õllerabas esinevad valgud on hordeiinid, gluteliinid, globuliinid ja albumiinid (Metri et al., 2022). Asendamatud aminohapped moodustavad ~ 30% kogu valgusisaldusest (Lynch et al., 2016). Õllerabas enamlevinute aminohapete hulka kuuluvad leutsiin, valiin,alaniin, seriin, glütsiin, glutamiinhape ja asparagiinhape. Väiksemates kogustes leidub ka türosiin, proliin, treoniin, arginiin ja lüsiin ning ka tsüstiin, histidiin, isoleutsiin, metioniin, fenüülalaniin ja trüptofaan (Huige et al., 1994).

Süsivesikud moodustavad kuivmassi järgi umbes poole õlleraba koostisest. Süsivesikutest esineb: hemitselluloos mis koosneb peamiselt arabinoksülaanist - kuni 40% kuivainest; tselluloos [ $\beta$ - (1,4) - seotud glükoosijäägid] ning võib esineda ka veidi (1,-3 ja,1,-4) - $\beta$  -D - glükaani ja tärklis. Monosahhariididest on kõige rohkem ksüloosi, glükoosi ja arabinoosi, samas on leitud ka ramnoosi

ja galaktoosi järgi (Lynch et al., 2016). Ligniin, mis moodustab 10–28% kogu kuivmassist on keeruka struktuuriga polüfenoolne makromolekul, mis on oluline taimerakkude seinte struktuurilise jäikuse ja terviklikkuse säilitamisel (Ezeonu et al., 2004). Õllerabas moodustab ligniin koos tselluloosi ja hemitselluloosiga jäiga, raskesti laguneva struktuuri (Joonis 4).



Joonis 4. Tselluloosi-hemitselluloosi-ligniini kolmekomponendiline mudelstruktuur (Tao et al., 2019)

Õllerabas sisalduvad lipiidid pakuvad märkimisväärset huvi, kuna neil on mitmeid tööstuslikke rakendusi. Lipiidid moodustavad õllerabas 9 - 11% kuivmassist. (del Río et al., 2013). Domineerivad lipiidid on triglütseriidid (55–67% kõigist tuvastatud lipiidühenditest), millele järgnevad vabad rasvhapped (18–30%), kokku 26 rasvhapet, neist kõige rohkem linool-, palmitiin- ja oleiinhappeid (Färçaş et al., 2015).

Lisaks sisaldab õlleraba ka mitmesuguseid vitamiine ja mineraale, mille hulgas on kõige rohkem kaaliumit, fosforit, kaltsiumi ja magneesiumi (Niemi et al., 2013). Mineraalide ja ka vitamiinide sisaldus õllerabas on toodud Tabelis 2.

Tabel 2. Mineraalainete (Murugan et al., 2015) ja vitamiinide sisaldus õllerabas (Huige et al., 1994)

Mineraalained	Sisaldus	Vitamiinid	Sisaldus (ppm)
Kaltsium (%)	0,57	Biotiin (B7) (ppm)	0,1
Fosfor (%)	1,01	Koliin (B4) (ppm)	1800
Magneesium (%)	0,37	Foolhape (ppm)	0,2
Väävel (%)	0,33	Niatsiin (B3) (ppm)	44
Vask (ppm)	50,72	Pantoteenhape (B5) (ppm)	8,5
Tsink (ppm)	187,12	Riboflaviin (B2) (ppm)	1,5
Mangaan (ppm)	139,78	Tiamiin (B1) (ppm)	0,7
Raud (ppm)	1895	Püridoksiin(B6) (ppm)	0,7
Koobalt (ppm)	1,36		
Naatrium (%)	0,157		
Kaalium (%)	1,24		

### 1.3. Õlleraba säilitamine

Kuigi õllerabal on mitmeid võimalikke kasutusviise, on selle kasutamise suurimaks takistuseks kiire riknemine ja selle vältimiseks kuluv energia. Rohkem jõupingutusi tuleb suunata alternatiivsete, majanduslikult jätkusuutlike kuivatamismeetodite leidmisele. Õlleraba rikneb kiiresti kõrge lämmastiku- ja fosforisisalduse tõttu, mis soodustab mikroobset saastumist (He et al., 2019). Ka rikkalik polüsahhariidide ja valgusisaldus ning kõrge niiskusesisaldus muudavad õlleraba mikroobide paljunemisele ja riknemisele vastuvõtlikuks. Selle pärast tuleb see materjal pärast tootmist stabiliseerida ja ladustada sobivates tingimustes. Säilitamisaja pikendamiseks on soovitatav vähendada niiskusesisaldust ~ 10% -ni (Lynch et al., 2016).

Õlleraba säilitamiseks on uuritud mitmeid meetodeid. Keemiliseks säilitamiseks on kasutatud happelahuseid nagu piim-, äädik-, sipelghape ja bensoehapped, eriti tõhusad on bensoehape ja sipelghape. Selliste kemikaalide kasutamine võib olla vastuolus tarbijate sooviga saada looduslikumaid toidu koostisosi (Mussatto et al., 2006). Kaaliumsorbaat on ka efektiivne aine isegi pressitud õlleraba säilitamisel (Kuntzel et al., 1997).

Õlleraba säilitamiseks kasutatav kuivatamine vähendab toote mahtu ning seetõttu ka transpordi- ja ladustamiskulusid, kuid seda peetakse väga energiamahukaks (Santos et al., 2003). Õlleraba kuivatamine ahjus tuleb läbi viia temperatuuril alla 60°C, sest kõrgematel temperatuuridel tekivad ebameeldivad maitsed (Lynch et al., 2016). Ahikuivatamisel on oht kuivatatud terade röstimiseks või põletamiseks. Lisaks põhjustab kuivati virnadest eralduv suits lõhnareostuse probleeme (Huige et al., 1994). Alternatiiviks on ülekuumendatud auru kasutamine, millel on täiendavaid eeliseid, sealhulgas keskkonnamõju vähendamine, kuivatamise efektiivsuse parandamine, tule- või plahvatusohtu kõrvaldamine ja väärtuslike orgaaniliste ühendite parem taastumine (Mussatto et al., 2006). Säilitamine ahjus kuivatamise või külmuivatamise teel ei muuda ka õlleraba koostist. Külmuivatamine on siiski majanduslikult vastuvõetamatu. Ka külmutamine on osutunud sobimatuks, kuna hoiustada tuleb suuri koguseid. Autoklaavimine on efektiivne moodus aeglustada õlleraba riknemist, aga ka see on väga energiakulukas (Lynch et al., 2016).

### 1.4. Õlleraba kasutamine toidus

Õlleraba on väga vastuvõtlik mikroobsele saastumisele ja seetõttu on selle eluiga väga lühike (7–10 päeva). See piirab õlleraba kasutusvõimalusi toidutööstuses. Praegu kasutatakse maailmas suurem enamus õllerabast loomasöödaks, osa biogaasi tootmiseks ning osa ladestatakse prügilas. Loomasöödana võib seda kasutada kas märja jäägina, vahetult pärast virdest eraldamist või kuivatatud materjalina (Öztürk et al., 2002). Lisaks kõrgele toiteväärtusele soodustab õlleraba piimatoodangu suurenemist loomade viljakust mõjutamata (Belibasakis et al., 1996).

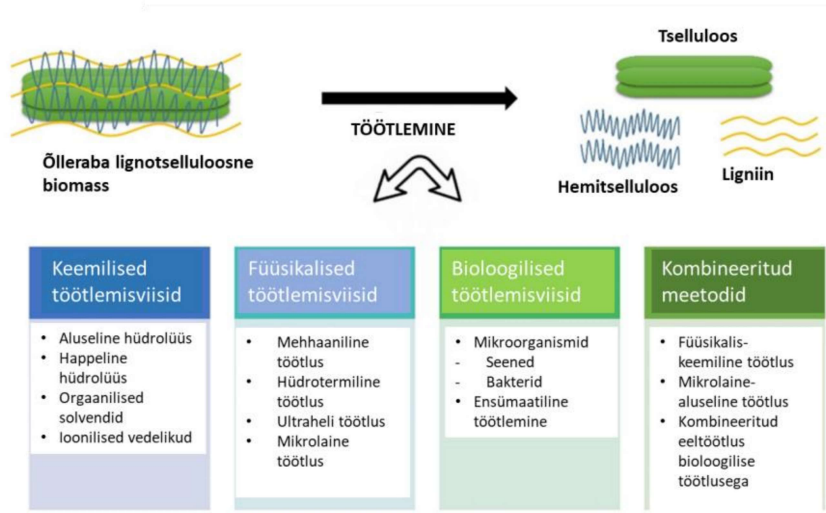
Õlleraba kõrge toiteväärtuse pärast on hiljutised uuringud soovitanud lisada seda ka inimeste toidulauale. Piiratud kogus õlleraba, umbes 5–10%, on proovitud lisada erinevatele toiduainetele, sh leivale, kookidele, küpsistele. Väikseid koguseid on kasutatud, et vältida lõpptoote omaduste, nagu maitse, värvuse ja tekstuuri mõjutamist (Amoriello et al., 2020). Kõrge kiudainete ja

valgusisaldus teeb õlleraba huvitavaks inimeste toiduainete rikastamiseks, eriti arvestades selle madalat hinda ja suurtes kogustes kättesaadavust. Lisaks on hakatud tunnustama õlleraba olulisust tervist edendavate bioaktiivsete komponentide pärast. Õlleraba sisaldab näiteks fenoolseid ühendeid, mida eraldatakse, et kasutada funktsionaalsete koostisosadena toiduainetööstuses (Martín-García et al., 2020, Ktenioudaki et al., 2013; Lynch et al., 2016). Mitmed õlleraba koostisosad, näiteks arabinoksülaanid, valgu hüdroolüsaadid ja fenoolühendid on pälvinud üha suuremat tähelepanu nende võimaliku kasu tõtu tervisele (Lynch et al., 2006). Hiljuti on õlleraba püütud kasutada biotehnoloogilistes protsessides, näiteks seente ja aktinobakterite kasvatamisel ja ainete nagu feruliin- ja p-kumarahapped, ksüloos ja arabinoos eraldamisel õllerabast. Samuti on õlleraba kasutatud substraadina ksülitooli ja arabitooli tootmisel (Ktenioudaki et al., 2013).

Õlleraba on hinnatud helveste, täisteraleiva, küpsiste ja aperitiivisnakkide valmistamiseks. See on aga toitu otseseks lisamiseks liiga jäik ja tuleb kõigepealt muuta jahuks. Õllerabast tehtud jahu kasutamine valgulisandina või praegu kasutatavate jahude osalise asendajana on selle värvi ja maitse tõttu piiratud. Saias 10% nisujahu õllerabaga asendamine suurendab valgu- ja asendamatute aminohapete sisaldust vastavalt 50 ja 10% võrra ning kahekordistab kiudainesisaldust võrreldes traditsioonilise saiaga. Lisaks on õllerabaga saias umbes 7% vähem kaloreid kui traditsioonilises saias (Huige et al., 1994). Kõrgema õlleraba kontsentratsiooniga küpsetatud toodete kvaliteedi parandamiseks saab kasutada biotehnoloogilist käitlemist (Ktenioudaki et al., 2013). Õlleraba lisamine muudab toitude lõhnaprofiili kuid eelnevad uuringutulemused on näidanud, et 10% õlleraba asendusega toidud on olnud vastuvõetavad (Lynch et al., 2006). Ka õllerabaga rikastatud pasta tegemist on uuritud ning leiti, et 10%-line asendus õllerabaga nisujahu vastu pakkus parimat kompromissi toiteväärtuse tõusu ja tehnoloogiliste ja sensorsete omaduste muutumise poolest (Nocente et al., 2019).

## 1.5. Õlleraba väärindamine

Õlleraba väärindamiseks on kasutatud selle koostisosade separeerimist, et saada mitmeid lisaväärtusega komponente, nagu süsivesikud, valgud ja fenoolsed ühendid ning ka selle kasutamist substraadina biotehnoloogias (Robertson et al., 2011). Lignotselluloossed materjalid on jäiga struktuuriga ning see võib pärssida ensüümi toimet ja seetõttu on paljudes uuringutes kasutatud eeltöötlemist (nt. füüsikaline või keemiline), et muuta polüsahhariidide struktuur ensümaatilise hüdrolüüsi jaoks paremini kättesaadavaks. Et õlleraba täielikult osadeks lahutada oleks ideaalne ühildada selektiivne mehaaniline või keemiline fraksioneerimine ensüümidega töötlemisega (Bartolomé et al., 2002). Tuntumad lignotselluloosse massi eeltötlusmeetodid on toodud Joonisel 5.



Joonis 5. Lignotseeluloosse biomassi eeltöötlusmeetodid (Mitri et al., 2022)

### 1.5.1. Keemilis-füüsikaline käitlemine

Valgu ekstraktsioon on üks paljulubavamaid lähenemisi õlleraba väärtustamisel. Seda ekstraheerimist pole aga tööstuslikus plaanis rakendatud, kuna tehnoloogiad hõlmavad väljakutseid nagu märja õlleraba kõrget kuivatamiskulu, suuri kemikaalide koguseid ja suurt hulka sekundaarseid jäätmeid pärast valgu ekstraheerimist (He et al., 2019). Leeliselise ekstraheerimise ja happesadestamise teel on võimalik saada valgurikas toode. Ekstraheerimine ei mõjuta asendamatu aminohappeid (Arauzo et al., 2019). Aluselised, happelised või hüdrotermilised eeltöötused viiakse tavaliselt läbi lignotselluloosse maatriksi dekonstrueerimiseks ja tselluloosi fraktsiooni suhkrutele juurdepääsu võimaldamiseks (Pinheiro et al., 2019).

Et terasid pehendada ja vähendada osakeste suurust, tuleks õlleraba enne töötlemist jahvatada. See avab rakuseina struktuurid ja vähendab tselluloosi osakeste suurust (Arauzo et al., 2019). Teised füüsilised meetodid, mida on kasutatud õlleraba komponentide ekstraheerimise ja kestade lagundamise hõlbustamiseks, hõlmavad mikrolainetemperatuuril töötlemist ja ekstrusiooni. Selliseid meetodeid kasutatakse tavaliselt enne ensümaatilist töötlemist. Et saada õllerabast monosahhariide, toimivad füüsilised eeltöötusmeetodid vähesel määral. Tõhusam eeltöötus oleks mikrolainekiirguse kasutamine happe ja leelise lahuste juuresolekul. Kiiremaid meetodeid, näiteks ultraheli abil ekstraheerimist, on testitud ja kasutatud ka arabinoksülaani-rikka fraktsiooni eraldamiseks ning need võimaldasid märkimisväärselt vähendada aega ja energiat võrreldes ainult leeliselise ekstraheerimisega. Kemikaalide kasutamist sisaldavad eeltöötused ei ole sobivad toodetele, mis võivad olla ette nähtud kasutamiseks toidus. Seega oleks sellistel juhtudel kõige sobivam füüsiline või termiline eeltöötus enne ensümaatilist hüdroolüüsi (Robertson et al., 2011). Tööstuses on ka ekstraktsiooni eeltöötlusena kasutatud impulss-elektrivälja (Martín-García et al., 2020).

## 1.5.2. Bioloogiline töötlemine

Ensümaatiline töötlemine võimaldab täpsemat kontrolli protsessi ja saadud komponentide olemuse üle (Robertson et al., 2011). On tõestatud, et õlleraba saab ensümaatilisel eraldada süsivesikurikasteks ja valgurikasteks lahustuvateks fraktsioonideks (Lynch et al., 2016). Polüsahhariidide lõhustamiseks on kasutatud kaubanduslikke multiensüümseid kokteile.

Hiljuti on ka valkude hüdroolüsaatide tootmiseks õllerabast uuritud ensümaatilisi meetodeid, kasutades proteaase (He et al., 2011). Ensümaatilisel toodetud fraktsioonid säilitavad tõenäoliselt bioaktiivsuse ja nende kasutamist toidutoodetes eelistatakse keemiliste vahenditega ekstraheeritud ühenditele. Täiendav eelis on see, et need ei tekita potentsiaalselt toksilisi jääke, seetõttu peetakse neid keskkonnasõbralikumaks. Õllerabas sisalduvate polümeeride (nt. hemitselluloosi fraktsioon) keerukuse tõttu on täieliku hüdroolüüsi jaoks vajalik suur hulk ensüümide aktiivsusi, kuna polümeeril on palju erinevaid asendatud rühmi ja sidemete tüüpe. Näiteks ksülanaasid,  $\beta$ -ksülosidaasid, feruloülesterolaasid, atsetülesterasaasid, glükuronidaasid, glükuronooülesterasaasid ja  $\alpha$ -L-arabinofuranosidaasid on peamised ensüümide tüübid, mis on vajalikud hemitselluloosi täielikuks lagundamiseks. Erinevate spetsiifikatega ensüüme saab valida sõltuvalt sellest, milliseid komponente või tooteid soovitakse, ja vajalikust hüdroolüüsi ulatusest. On tõestatud, et perekondade *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* ja *Neospora* seeneliikide toorekstraktides sisalduvad polüsahhariid-hüdroolüsaatide segud on võimelised lagundama õlleraba, mille tulemuseks on kõrge monosahhariidide saagis (Robertson et al., 2011). Samuti on leitud, et ka proteaasi ensüümid on olulised õlleraba täielikuks dekonstruktsiooniks, sest selles esinevad lahustumatud valgud võivad kinni hoida muidu lahustuvaid süsivesikute komponente. Valkude lagundamine võib toimuda mitte ainult täpse jäägi paljastamiseks, vaid see varustab ka peptiide ja aminohappeid mikroobide kasvu jaoks. Õlleraba otsest ensümaatilist töötlemist kommertsiaalsete bakteriaalsete proteaasidega on kasutatud edukalt (Niemi et al., 2013).

## 1.6. Seenemütseeli (tahkefaasiline) fermentatsioon

Tahkefaasiline fermentatsioon on alternatiiv bioloogiliste jääkide väärimiseks, mis võimaldab mikroorganismide kasvuks kasutada tahkeid substraate. See protsess toimub tahkel substraadil, mis sisaldab piisavalt niiskust mikroorganismide kasvuks. Erinevad autorid on tõestanud selle tehnoloogia tõhusust jäätmete biokonversioonil väärtuslikeks toodeteks nagu hüdroolüütilised ensüümid, biokütused, aroomiained ja biopestitsiidid. Peamised väljakutsed tahkefaasilise fermentatsiooni tootmisprotsessi arendamisel on mahu suurendamine ja reaktori projekteerimine. On täheldatud tootlikkuse vähenemist soojus- ja massiülekanne tõttu vedel-, tahke- ja gaasifaaside vahel. See muutub üha olulisemaks, kui fermentatsiooni maht suureneb. (Rodriguez et al., 2019)

Tahkefaasiline fermentatsioon on rohkelt kasutatud meetod mikroobide metaboliitide tootmiseks (Srivastava et al., 2019). See on kolmeefaasiline heterogeenne protsess, mis sisaldab tahket, vedelat ja gaasi faasi (Jorge et al., 2018). Tahkefaasiline fermentatsioon hõlmab mikroorganismide kasvu tahkete materjalide niisketel osakestel, milles osakeste vahelised ruumid on ideaalis täidetud pideva gaasifaasiga. Tuleb märkida, et sõna „fermentatsioon” terminis „tahkefaasiline

fermentatsioon” kasutatakse tavaliselt laiemas tähenduses: „mistahes kontrollitud mikrobioloogiline protsess” ega tähenda, et mikroorganism kasutab põhiliselt fermentatiivseid ainevahetusradasid. Suurem osa seni uuritud protsessidest hõlmavad filamentseid seeni, kuigi on protsesse, mis hõlmavad kas baktereid või pärmes (Mitchell et al., 2011). Substraadina (süsinikuallikana) kasutatakse enamasti tahkeid agrotööstusjäätmeid, näiteks riisikõrred, nisuõled, riisikoored ja maisitõlvikuid ja ka õlleraba (Droce et al., 2013).

Tahkel substraadil kasvatamine soodustab madala veeaktiivsuse tõttu seene ja kasvusubstraadi vahelist otsest vastasmõju, mis pakub seente kasvuks sobivaid tingimusi. Enamik seeni kasvab substraadi pindadel seeneniidistiku kaudu, hüüfid tungivad ja otsad pikenevad läbi substraadi. Üldiselt on niiskusesisaldus 60% - 80% vahemikus kõige soodsam, olenemata seeneliigist. Aeglaselt kasvavate seente puhul võivad olla protsessis kitsaskohad saastumine ja kultuuri dehüdratsioon (Bentil et al., 2018).

### 1.6.1. Laboratoorne kultiveerimine

Seeni on kunstlikes tingimustes laborites kasvatatud üle 100 aasta (Ainsworth et al., 1996). Neid kasvatatakse traditsiooniliselt tahkel agaril Petri tassides või vedelas söötmes Erlenmeyeri kolvides, fermentatsioonipaakides või muudes reservuaarides. Eksperimentaalsetes süsteemides on vedelkultuuris ühtlast seente kasvu keeruline saavutada, kuna seen võib kolvi külgedel moodustada seeneniidistikku (Wilkinson et al., 1988).

Tahkefaasilise fermentatsiooni käigus on aga seene kasvu hindamine keeruline, kuna seeneniidistik on kinnitunud tahkele faasile ja substraadi sisse on raske näha ja ka mütseeli on kasvukeskkonnast raske eraldada (Droce et al., 2013). Kuna otseste analüütiliste meetodite (nt. kuivmassi kaalumise) kasutamine on pole võimalik või on ebatäpne, peetakse kaudsete meetodite kasutamist ainsaks alternatiiviks (Manan et al., 2018). Kasvukeskkonna koostis ja struktuur on kõige olulisemad kultiveerimisparameetrid, kuna keskkonna komponendid annavad kasvavale organismile toitaineid ja energiat. Seened, nagu ka teised organismid, sõltuvad kasvu jaoks peamiselt söötimest saadud süsiniku- ja lämmastikuallikatest (Bentil et al., 2018).

Spetsiifiliste sekundaarsete metaboliitide ja ensüümide tootmiseks on kasutatud looduslike materjale nagu täisteratooteid ja seemned või inertseid tugimaterjale koos vedelate söötmetega (Droce et al., 2013). Ensüümide, nagu tsellulaasi, tootmiseks sisaldab kasvukeskkond tavaliselt tsellulooseid substraate, mida seen kasutab süsinikuallikana ja käivitab seega tselluloosi lagundavate ensüümide ekspressiooni (Grünberger 2017). Seente kasvuks on vaja ka lämmastikuallikat, kas anorgaaniliste allikate kujul, nagu nitraat või ammoniumsulfaat, või orgaaniliste allikate nagu pärm, linnaseekstraktide või valgu hüdrolysaatide kujul. Lämmastiku lisamine ei suurenda mitte ainult rakkude kasvu, vaid ka ensüümide ekspressiooni. Väärib märkimist, et mikrotoitainete, näiteks anorgaaniliste soolade lisamine aitab kompenseerida pH varieerumist kasvu ajal (Bentil et al., 2018).

## 1.6.2. Seente kultiveerimissaadused õllerabal

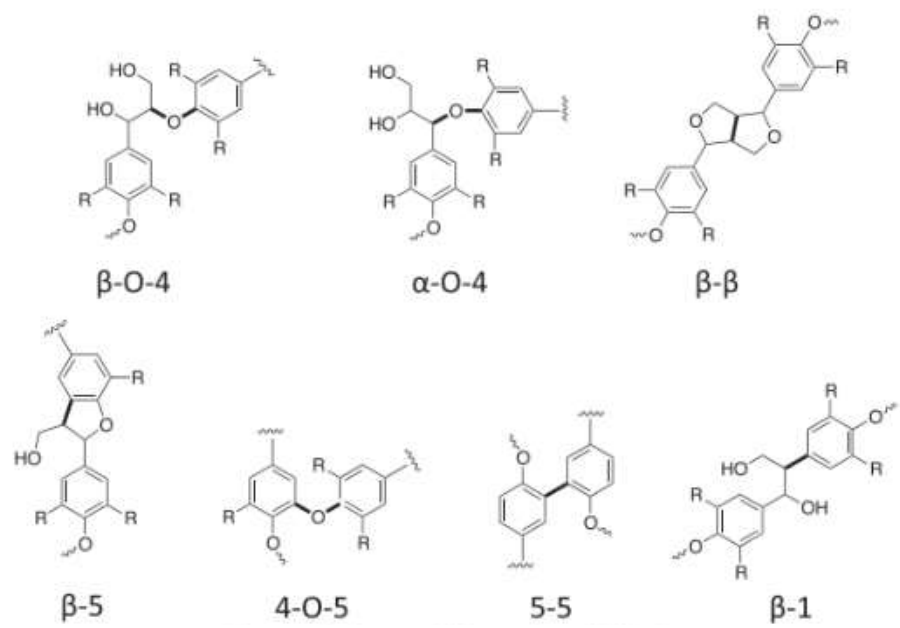
Enamusel seentest on vegetatiivne osa, mis koosneb hüüfidest, mis on pikad torujad rakud ja nende kogumikku nimetatakse mütseeliks ehk seeneniidistikuks. Seente hüüfid on kohastunud kasvamiseks tahketel pindadel ning substraatidesse ja kudedesse tungimiseks. Kuna seened ei ole suutelised tootma energiat ei foto- ega kemotroofselt, on nende kasvuks vajalikud orgaanilised ained. Sarnaselt loomadele on seened heterotroofid; nad saavad oma toitu lahustunud molekulide imendumisega, kuid erinevalt loomadest seedeensüümide sekreteerimisega keskkonda (McConnaughey et al., 2014).

Seenekasvatuseks kasutatakse mitmesuguseid lignotselluloosseid jääkmaterjale (Albertó et al., 2019). Ligniini on oma keerulise struktuuri tõttu raske lagundada enamiku organismide poolt. Sidemete heterogeensuse tõttu ei saa hüdrolyüütilised ensüümid ligniini lõhustada, nagu teisi rakuseinte komponente. Ligniini lagundamist on põhjalikult uuritud puitu mädandavates organismides, eriti valgemädanik-seentes. Valgemädanik-seened, nagu *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor*, *Cyathus stercoreus* ja *Ceriporiopsis subvermispora*, on lignolüütiliste ekstratsellulaarsete oksüdatiivsete ensüümide tootmise tõttu kõige tõhusamad delignifitseerimiseks. Valgemädaniku seened lagundavad ligniini, jättes lagunenuid puidu värvuselt valkjaks ja tekstuurilt kiuliseks. Mõned valgemädaniku seened, nagu *C. subvermispora*, *Phellinus pini*, *Phlebia spp.* ja *Pleurotus spp.* delignifitseerivad puitu, rünnates eelistatavalt ligniini, jättes alles rikastatud hemitselluloosi ja tselluloosi. Teised valgemädaniku seened, nagu näiteks *Trametes versicolor*, *Heterobasidion annosum* ja *Irpex lacteus*, lagundavad rakuseina komponente samaaegselt. (Abdel-Hamid et al., 2013)

Valgemädaniku seened on pigem füsioloogiline kui taksonoomiline rühmitus, kuhu kuuluvad need seened, mis on võimelised toituma lignotselluloossetes substraatides ulatuslikult ligniinist. Tuntuimad valgemädaniku seened on basidiomütseedid, kuigi ka mõned *Xylariaceae ascomycete* perekonnad on võimelised ligniini lagundama. Valgemädaniku seened eritavad keskkonda ühte või mitut kolmest rakuvälisest ensüümist: kahte glükosüülitud heemi sisaldavat peroksidaasi: ligniini peroksidaasi ja Mn-sõltuvat peroksidaasi ja vaske sisaldav fenoloksidaas ning laktaas. Ensüümid LiP, MnP ja Lac, mis osalevad ligniini lagundamisel, on nende substraadivahemiku osas väga mittespetsiifilised. Joonisel 6 on toodud levinumad ligniini struktuuriüksused. (Zhao et al., 2020)

Õlleraba tahkefaasilise fermentatsiooniga saab toota olenevalt organismist erinevaidprodukte. Näiteks tsellulaasi ja ksülanaasi hüdrolyüsivaid ensüüme saab toota *A. nigeri*-ga. *A. fumigatus'e* ja *Penicillium sp.* pärit ensüüme on kasutatud tsellulaasi tootmiseks., *Penicillium janczewskii* abil saab toota ksülanaasi,  $\beta$ -ksülosidaasi ja  $\alpha$ -L-arabinofuranosidaasi. Lakaasi ensüümi saab toota ka kasutades *Trametes versicolori* ja *Aspergillus oryzae* võib toota  $\alpha$ -amülaasi (Mitri et al., 2022).





Joonis 6. Levinumad ligniini struktuuriüksused (Mitri et al., 2022).

## 2. Eesmärk

Antud magistritöö peaeesmärgiks on uurida kuidas kasvavad erinevad söögiks kasutatavad kandseened õllerabal ning kaardistada substraadis tekkinud muutused ja toiteväärtuse võimalik tõus. Samuti on eesmärgiks uurida fermenteeritud õlleraba kasutamise võimalusi toiduks ja leida, kas seda õnnestub edukalt kasutada toidus ilma selle omadusi liigselt muutmata.

Hüpoteesid:

1. Kandseened kasvavad hästi õllerabal ja mõned neist tarvitavad eelistatult ligniini.
2. Kandseente mütseeli kasvu on võimalik edukalt mõõta läbi substraadi muutuse
3. Tänu seente võimele lagundada tselluloosi- hemitselluloosi- ligniini kolmikstruktuuri, valgusisaldus õllerabas kasvab, andes sellele toiduainena lisaväärtust.
4. Fermenteeritud õlleraba õnnestub edukalt kasutada toidus ilma toidu sensoorseid, tekstuuri ja värvi omadusi liigselt muutmata.

## 3. Materjalid ja meetodid

### 3.1. Organismid

Õlleraba fermentatsioonil kasutati Eesti Maaülikooli eluskultuuride kogust saadud seenekultuure. Seente originaalkultuurid saadi külvatuna Petri tassidele MEA (linnaseekstrakt-agar) ja PDA (kartuli-dekstroosagar) söötmetele. Neid hoiti kuni ümberkülvamiseni 4°C juures. Töös kasutatud seeneliigid on toodud Tabelis 3. Kultuuride saabudes külvati nad ümber Petri tassidele vastavale agarile.

Seente ümberkülvamiseks võeti külvinõelaga umbes 1x1 cm suurune tükk seeneniidisikuga läbi kasvanud söödet ning asetati värsele söötmele. Protseduur toimus steriilses keskkonnas laminarkapi all kõiki aseptika võtteid järgides. Ümberkülvid toimusid kolmes paralleelis. Tassid inkubeeriti pimedas 24° juures kuni seenemütseel kattis kogu söötme. Seenemütseeli täis kasvanud ümberkülve hoiustati külmkapis 4° juures. Söötmete valik seentele on toodud Tabelis 3. Järgnevad ümberkülvid tehti vahetult enne kasutusvajadust ning katsed tehti värsketest ümberkülvidest.

### 3.2. Materjalid ja reagentid

#### 3.2.1. Materjalid

Töös kasutatud õlleraba valmistati kohapeal poolt odralinnaste (Pale Malt, Pruulimeistrid) meskimisel. Õlleraba autoklaaviti 121°C juures 15 minutit niiskuskindlas kotis, jahutati toatemperatuurile ja külmutati koheselt edasiseks kasutuseks. Õlleraba niiskusesisaldus oli 0,85 g/g märgkaalu kohta.

#### 3.2.2 Reagentid

Kromatograafilisel analüüsil kasutati standardite valmistamiseks glükoosi (99%), ksüloosi (99%), arabinoosi (99%). Voolutina kasutati 0,2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ja sisestandardina 2% sipelghapet. Õlleraba kuivatamiseks ja suhkrute ekstraktiooniks kasutati etanooli (96%), ning õlleraba hüdroolüüsiks 72% ning 4% väävelhapet. Kõik lahuste valmistamiseks vajalikud reaktiivid hangiti Sigma Aldrich-ilt.

Söötmed valmistati deioniseeritud vees vastavalt tootjapoolsele soovitusel:

MEA - 30 g/l linnaseekstrakti, 3 g/l sojapeptooni, 15 g/l agarit

PDA - 4g/l kartuli peptooni, 20g/l glükoosi ja 15 g/l agarit

Söötmed olid toodetud VWR Chemicals poolt.

Steriliseerimine viidi läbi Systech DX-90 autoklaavis: 121°C 15 min.

Tabel 3. Töös kasutatud seeneliigid, mütseeli kasvu optimaalsed tingimused kirjandusest ja nende kasvatamiseks kasutatud söötmed

<b>Liik</b>	<b>Eesti keeles</b>	<b>Mütseeli optimaalsed kasvutingimused</b>	<b>Puidulagundajad</b>	<b>Sööde</b>
<i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	Roosa servik	26-35°C, õhuniiskus: >80% (Jegadeesh, 2018)	Valgemädanikseen, eelistab ligniini	MEA/MEP/PDA
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Austerservik	28°C, õhuniiskus: 80-90% (Hoa, 2015)	Valgemädanikseen, eelistab ligniini	MEA/MEP/PDA
<i>Lentinus Tigrinus</i>	Tiiger-hammasteleht	25-32°C, õhuniiskus 80-90% (Shahtahmasebi, 2017)	Valgemädanikseen, eelistab ligniini	MEA /MEP
<i>Trametes versicolor</i>	Libliktagel	25-30°C, õhuniiskus: >80% (Reyes, 2021)	Valgemädanikseen, mis ei eelista ligniini	MEA /MEP
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Kollane servik	25-30°C, õhuniiskus: >80% (Klomklung, 2014)	Valgemädanikseen	MEA/MEP/PDA
<i>Agaricus bisp. Var. bisporus</i>	Šampinjon	26°C, õhuniiskus: 85-90% (ten Have, 2003)	Võimeline ligniini lagundama, ei ole valgemädanikseen	PDA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Vääveltõrik	25-30°C, õhuniiskus 80- 90% (Luangharn, 2014)	Pruunmädanikseen, ei eelista ligniini	MEA /MEP
<i>Lentinula edodes</i>	Šiitake	25°C, õhuniiskus 80- 90% (Hassegawa, 2005)	Valgemädanikseen, eelistab ligniini ja hemitselluloosi	MEA /MEP
<i>Ganoderma lucidum</i>	Lakkvaabik	25-30°C, õhuniiskus 80-90% (Bajwa, 2005)	Valgemädanikseen	PDA
<i>Ganoderma resinaceum</i>	Läikvaabik	25-30°C, õhuniiskus 80-90% (Bajwa, 2005)	Valgemädanikseen	PDA
<i>Hericium coralloides</i>	Harunev korallnarmik	25°C, õhuniiskus >80% (Imtiaj, 2008)	Valgemädanikseen	MEA /MEP
<i>Hericium erinaceus</i>	Lõvilakk	24°C, õhuniiskus >80% (Zhao, 2020)	Valgemädanikseen	MEA /MEP
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Hiidvärvik	25°C, õhuniiskus >80% (Buta, 1989)	Valgemädanikseen	PDA
<i>Cordyceps militaris</i>	Kedristõlvik	25°C, õhuniiskus >80%(Dang, 2018)	Valgemädanikseen	Vedelkultuur

### 3.3 Seente kasvatamine õllerabal

On teada, et valgemädanikseened kasvavad hästi lignotselluloosel materjalil, mille niiskustase on 60–80%. Õlleraba niisusesisalduseks mõõdeti 79-83%. Raba pH oli 5,6 ning seda ei modifitseeritud kuna erinevate kirjandusandmete kohaselt on mütseeli kasvuks sobiv pH vahemik 5-8ni. Seenemütseeli kasvatamiseks täideti Petri tass 10 g autoklaavitud õllerabaga. Õlleraba laotati ühtlaselt Petri tassidele, mille diameeter oli 9 cm. Kasvama pandi kõik Tabelis 3 nimetatud 14 seeneliiki kolmes paralleelis. Selleks lõigati seenemütseeliga läbi kasvanud säilitustassidelt umbes 1 cm suurune tükk ning see asetati õlleraba keskele. Kõiki seeneliike inkubeeriti pimedas ja 24°C juures. Õllerabale ei lisatud mineraalsöödet. Tassidel kasvava seenemütseeli diameetrit mõõdeti iga päev ning mõõtetulemustest moodustati võrdlev graafik (vaata Tabel 4.).

Petri tasse hoiti koos kaaliumnitraadi lahusega hermeetilises kambris (10 g vett + 3,5 g soola) (Dang, 2018) 90% vee aktiivsuse hoidmiseks.

### 3.4 Analüütilised meetodid

pH mõõtmine toimus Metler Toledo Seven Easy seadmega. Kaalumiseks kasutati Mettler Toledo AB204 analüütilisi kaale täpsusega 0,1 mg.

Niiskuse sisaldust mõõdeti Mettler Toledo HR83 Halogen niiskuseanalüsaatoriga ja vee aktiivsust Aqua Lab seadmega. Tekstuuranalüsaator, mida kasutati oli Stable Micro systems TA-XT2i Texture analyser. CHNS analüüs tehti elementanalüsaator Elementar analyser system rapid Oxy Cube-ga. Küpsetatud saiade värvust hinnati kolorimeetriga: Chroma Meter CR-400.

#### 3.4.1. Värv analüüs

Küpsetatud saiade värvust hinnati kolorimeetriga, kasutades värviruumi koordinaate L (heledus), a\* (punane-roheline värvilisus) ja b\*( kollane- sinine värvus). Teraviljatoodete puhul kasutatakse sageli tumedust, mida väljendatakse tavaliselt 100-L.

#### 3.4.2. Tekstuuri analüüs

Tekstuuri profiilanalüüs (TPA) on sensoorse analüüsi objektiivne meetod, mis põhineb hammustamiseks vajaliku suurusega toiduproovi kahel järjestikusel kokkusurumisel, imiteerides lõua liikumist. Saadakse kaksiprofiil, millest arvutatakse välja tekstuursed omadused. TPA kõverat interpreteeriti 7 tekstuurse parameetriga: tugevus, kohesioon, adhesioon, taastuvus, elastsus, kummissus, sitkus. Antud töös uuriti küpsetatud saia sisemist struktuuri. Kontrollsaiaist, õllerabaga ja fermenteeritud õllerabaga rikastatud saiadest lõigati 2 cm suurused viilud ning tekstuuranalüüs viidi läbi nende peal.

### 3.4.3. Statistiline analüüs

Kõik analüüsid viidi läbi kolmes korduses ja tulemused väljendati keskmistena, millele lisaks arvutati positiivne ja negatiivne standardhälve ( $\pm$  SD).

## 3.5. Õlleraba ja fermenteeritud õlleraba koostise analüüs

### 3.5.1. Alkoholis lahustumatu fraktsiooni (AIR) valmistamine

AIR valmistati peale seente kasvu analüüsi välja valitud 8-st seeneliigist (vääveltorik, lakkvaabik, roosa servik, austerservik, korallnarmik, läikvaabik, šiiitake ja libliktagel) 4nädalat läbi kasvanud õlleraba proovidest ning võrdlevalt märjast, autoklaavitud õllerabast (10 g; säilitusaeg kuni 24 h, 4 °C juures). Proovid peenestati uhmriga, seejärel sukeldati 1 tunniks keevasse absoluutsesse etanooli (30 ml: 80% etanooli lõppkontsentratsioon). Segu tsentrifugeeriti 3000 rpm 10 min ning tsentrifugaat kallati pealt ära. Sadet pesti 2 korda keevas 70% etanoolis (maht/maht) (igauks 300 ml; 2 tundi) ning tsentrifugeerimist ekstraheeriti sade (2) keevas absoluutses etanoolis (300 ml; 5 min), seejärel pesti külma absoluutse etanooliga (150 ml). Lahustumatut jääki (AIR) pesti 2 mahuosas (25 ml) atsetoonis, pesuveselik eemaldati vaakum-filtreerimisega. Lahustumatu jääk koguti filtrimisega (GF/C paber, kasutades Buchneri lehitrit) ja kuivatati konstantse kaaluni 40° C juures. (Berchem et al., 2020)

### 3.5.2. Ligniini määramine AIR-is

Tahkete jääkide ligniinisaldus määrati Klasoni protseduuriga vastavalt varem avaldatud protokollidele (Berchem et al., 2020). Täpne kogus (ca 300 mg) AIR-i kaaluti ja lisati ca 3 ml 72%-list H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ning määrati proovi täpne kaalutis. Proovi hüdrolüüsi Saemani hüdrolüüsi protokoll järgi 30°C juures 1 tunni jooksul. Seejärel viidi väävelhappe kontsentratsioon segus destilleeritud veega 4%-ini ja hüdrolüüsi jätkati autoklaavis 121°C juures 60 minutit.

Segu filtriti läbi eelkuumutatud ja –kaalutud kaasfiltrit, pesti deioniseeritud veega ning , kuivatati 105°C juures 24 tundi ja kaaluti ligniini kogusisalduse gravimeetriliseks määramiseks. Klasoni ligniin määrati kaalutõusuna igas filtris. Ühendatud filtraat kaaluti ja kasutati suhkrute analüüsiks.

### 3.5.3. Suhkrute määramine

Glükoosi, arabinoosi ja ksüloosi sisaldus leiti kromatograafilise analüüsi alusel. Kromatograafilise analüüsi viidi läbi kasutades SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH (Saksamaa) vedelik-kromatograafilist süsteemi, mis sisaldab degasaatorit Degasys Populaire, HPLC Pump Sun Flow 100, kolonnisoojendit SunTherm 100, automaatset injektorit Basil Marathon, UV-detektorit Spectraflow 501, RI detektorit Refractroflow. Andmete salvestamiseks ja analüüsimiseks kasutati eDAQ PowerChrom v2 süsteemi. Automaatse injektori silmuse suurus oli 1,1 µl. Agilent Hi-Plex H kolonn 300 mm eelkolonniga CCCCC elueeriti 0,18% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga temperatuuril 22 °C kiirusega 0,6 ml/min. UV-detektor seadistati 210 nm peale ja RI mõõdeti 40°C juures.

Kõigepealt lisati 900 µL Klasoni hüdroolüsaadile 100 µL sisestandardi lahust (sipelghape) ja seejärel süstiti segu vedelikromatograafi. Glükoosi sisalduse järgi arvutati tselluloosi ning arabinoosi ja ksüloosi, summa järgi hemitselluloosi sisaldus (Berchem et al., 2020).

### 3.5.4. Üldlämmastiku määramine

Analüüsiks võeti 8 seenega fermenteeritud õlleraba kuivatatud proovid ja samade seentega fermenteeritud AIR proovid ning võrdlusprooviks fermenteerimata õlleraba proov. Proovid peenestati uhmriga ja kuivatati täiendavalt 60° juures 24h õhukesel kihil. Peale kuivatamist mõõdeti niiskusesisaldus: 8%. Valkude (N) määramiseks kasutati CHNS analüsaatorit. Seade koosneb kõrge temperatuuriga põlemisseadmest ja puhastus- ja lõkskromatograafist. Proovid ( $2\pm 0,3$  mg) pandi põletamiseks plaattina laevukestesse.

Valkude määramiseks kasutati CHNS analüsaatorist saadud lämmastiku kontsentratsiooni ja korrutati see konstandiga 6,25. Väärtust 6,25 rakendatakse valgusisalduse mõõtmisel enamikus toiduainetes ja toidu koostisosad, tuginedes kahele eeldusele: et valgud sisaldavad umbes 16% lämmastikku massi järgi (st valgu kogumassist moodustab lämmastik 16%) ja kogu toidus sisalduv lämmastik on saadud valgust (WHO, 2020).

## 3.6. Saia küpsetamine

Saia valmistamiseks oli vajalik õlleraba ja fermenteeritud õlleraba jahvatamine. Materjal jahvatati löikeveskiga 0,1 mm sõelaga (nisujahu osakese suurus on tavaliselt umbes 0,025 mm).

Valmistati 3 varianti saia, igaüht kolmes paralleelis: sai, mida on rikastatud õllerabaga- 10% jahust asendatud; sai mida on rikastatud austerserviku mütseeliga läbi kasvanud (2 nädalat) õllerabaga-10% jahust asendatud, kontroll-sai originaalretsepti järgi. 10% valiti asendamiseks, kuna eelnevalt on leitud, et see on sensoorselt aktsepteeritud omadustega (Fărcaş et al., 2015). Seeneks valiti austerservik, kuna see oli õllerabal kiireima kasvuga ning on tunnustatud söögiseen ning 2 nädalat inkubatsiooniaeg valiti kuna selles staadiumis ei olnud tekkinud tuntavaid ebameeldivaid lõhnaomadusi kuid näiteks peale 4 nädalat inkubatsiooni oli tunda mõrkjat lõhna ning näha tumedat vedelikku läbikasvanud rabas.

Saia küpsetati järgneva retsepti järgi.

Koostisosad: 300 g nisujahu (tüüp 550, Kalew, Tartu Mill), 10 g Presspärm, 5 g soola, 14 g suhkrut, 10 g margariini (Tere, küpsetusmargariin), 150 g Vesi

Valmistamine:

Pärm segatakse suhkruga ning osaga (100 ml) taigna valmistamiseks ettenähtud toasooja veega. Jahule lisatakse pärmivee segu, sool ja ülejäänud vesi ning segatakse taignasegajaga Kitchen Aid aeglasel kiirusel (1) 2 minutit ja seejärel kiirema kiirusega (3) 3 minutit. Seejärel jagatakse taigen 80

g pätsideks, vormitakse kuulikesteks ning jäetakse 32°C juurde kerkima 45 minutiks. Peale seda saiad küpsetatakse vormides 12 minutit 210°C juures.

Ühes paralleelis asendati 10% jahu hulgast õllerabaga ja teises paralleelis 10 % austerserviku mütseeliga läbi kasvanud õllerabaga. Kuna õlleraba ja fermenteeritud õlleraba kiudainetesisaldus oli suurem kui jahul oli vee sidumise võime suurem ning sama konsistentsi saamiseks lisati veel 10 ml vett mõlemale retseptile.

Enne edasisi analüüse jahutati saiad 1,5 tundi toatemperatuuril (22°C). Saiad küpsetati kolmes paralleelis.

### 3.7. Sensoorne analüüs

8 hindajat hindasid erinevaid omadusi võrdlevalt kontrollprooviks küpsetatud nisujahusaia ja õlleraba ning fermenteeritud õllerabaga rikastatud saia vahel. Hindajad ei saanud spetsiifilist koolitust enne hindamist. Kirjandusest on näiteid, kus õllerabaga rikastatud toodetel on happeline aroom ja mõru maitse kuid seentega fermenteeritud õlleraba sisaldavaid pagaritooteid ei ole kirjeldatud (Waters et al., 2012).

Sensoorne hinnang põhines valmis saiade välimuse, maitse, lõhna ja tekstuuri omadustel: tumedus, poorsus, aroomi intensiivsus, hapu aroom, elastsus, murenevus, pehmus, kleepuvus, niiskus, maitse intensiivsus, hapu maitse, mõru maitse ja soolane maitse. Saadud tulemused analüüsiti MS Excelis tehtud Radari graafiku kaudu.



## 4. Tulemused ja arutelu

### 4.1. Erinevate söögiseente kasv õllerabal

Seente kasvu hinnati iga päev mõõtes seenemütseeli diameetrit Petri tassil. Joonisel 8 on toodud iseloomustav pilt erinevatest mütseeli kasvuetappidest. Seeneliigi maksimaalne kasv saavutati, kui terve tass oli täis kasvanud ehk kui seenemütseeli diameeter oli 9 cm. Leiti, et enamus seeni hakkasid õlleraba peal kasvama. Kedristõlvik ja šampinjon ei hakanud 2 nädala jooksul kasvama. Läkvaabik, šitake, korallnarmik ja hiidvärvik olid liigid, mille kasv õllerabal oli aeglasem ning nad ei täitnud inkubatsiooni aja jooksul kogu tassi (Tabel 4). Kuigi ka lõvilakk ei täitnud kogu tassis olevat õlleraba, algas selle kasvamise varem. Kõige paremini kasvasid austerservik ja roosa servik, mis katsid kogu Petri tassi juba kümnendaks päevaks. Vääveltorik, lakkvaabik, tiiger-hammasteleht, libliktagel, roosa servik, austerservik, kollane servik ja lõvilakk alustasid kasvu juba neljandal päeval ning nad kõik peale lõvilaka ka täitsid inkubatsiooniperioodi lõpuks mütseeliga tassisid.

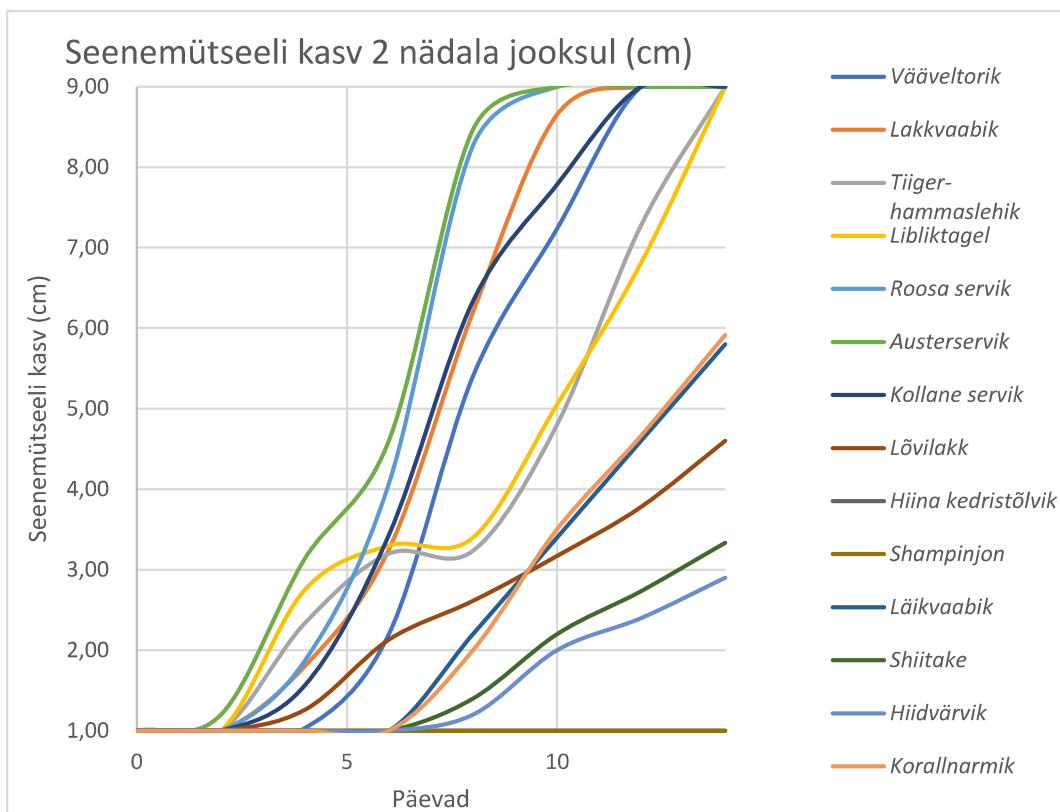
Tulemused on visualiseeritud Joonisel 7, mis iseloomustab hästi erinevate seente kasvukiirust. Roosa servik, austerservik ja kollane servik kuuluvad *Pleurotus* sugukonda ja on valgemädanikseened, mis eelistatult tarbivad ligniini (Abdel-Hamid et al., 2013). Vääveltorik on pruunmädanikseen ning libliktagel on valgemädanikseen, mis ei eelista ligniini. Šampinjon on võimeline puitu lagundama kuid ei ole valgemädanikseen ning kedristõlvik eelistab vedelsubstraati. Kõik teised kuuluvad valgemädanikseente kategooriasse.

Tabel 4. Seenemütseeli kasv õllerabal 3 nädala jooksul. Mõõdeti mütseeli diameeter (mm)

		Seenemütseeli kasv, diameeter (mm)							
Seeneliigid	Päevad	0	2	4	6	8	10	12	14
<i>Vääveltorik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,03 ± 0,12	2,20 ± 0,07	5,40 ± 0,06	7,23 ± 0,09	<b>9,00 ±</b> <b>0,03</b>	9,00 ± 0,00
<i>Lakkvaabik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,81 ± 0,23	3,25 ± 0,09	6,20 ± 0,11	8,65 ± 0,18	<b>9,00 ±</b> <b>0,12</b>	9,00 ± 0,00
<i>Tiiger-hammasteleht</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,33 ± 0,23	3,24 ± 0,10	3,23 ± 0,15	4,80 ± 0,09	7,28 ± 0,06	<b>9,00 ±</b> <b>0,00</b>
<i>Libliktagel</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,75 ± 0,24	3,30 ± 0,11	3,40 ± 0,05	5,05 ± 0,14	6,81 ± 0,01	<b>9,00 ±</b> <b>0,00</b>
<i>Roosa servik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,87 ± 0,31	4,07 ± 0,07	8,27 ± 0,07	<b>9,00 ±</b> <b>0,19</b>	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00
<i>Austerservik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	3,13 ± 0,11	4,60 ± 0,15	8,47 ± 0,04	<b>9,00 ±</b> <b>0,12</b>	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00
<i>Kollane servik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,56 ± 0,32	3,43 ± 0,11	6,33 ± 0,04	7,78 ± 0,13	<b>9,00 ±</b> <b>0,00</b>	9,00 ± 0,00
<i>Lõvilakk</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,26 ± 0,16	2,13 ± 0,09	2,61 ± 0,06	3,17 ± 0,14	3,78 ± 0,12	4,60 ± 0,15
<i>Kedristõlvik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>Šampinjon</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>Läkvaabik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,20 ± 0,11	3,40 ± 0,13	4,60 ± 0,07	5,80 ± 0,04
<i>Šitake</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,40 ± 0,07	2,2 ± 0,08	2,73 ± 0,11	3,33 ± 0,10
<i>Hiidvärvik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,20 ± 0,09	2,00 ± 0,01	2,40 ± 0,16	2,90 ± 0,09

### Seenemütseeli kasv, diameeter (mm)

Seeneliigid	Päevad	0	2	4	6	8	10	12	14
<i>Korallnarmik</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,18	3,50 ± 0,02	4,67 ± 0,09	5,92 ± 0,04



Joonis 7. Seenemütseeli kasv õllerabal 2 nädala jooksul (cm)



Joonis 8. Austerserviku seenemütseeli kasv inokulatsioonist (vasakul) tassi täis kasvamiseni (paremal).

## 4.2. Seenemütseeli kasvu mõju õlleraba koostisele

### 4.2.1. Seente kasvul vabanenud suhkrute sisaldus

Õllerabas on mitmesuguseid monosahhariide, oligosahhariide ja polüsahhariide. Enim leiduvad monosahhariidid on tselluloosist vabanev glükoos ja hemitselluloosist vabanevad ksüloos ja arabinoos (Mitri, 2022)

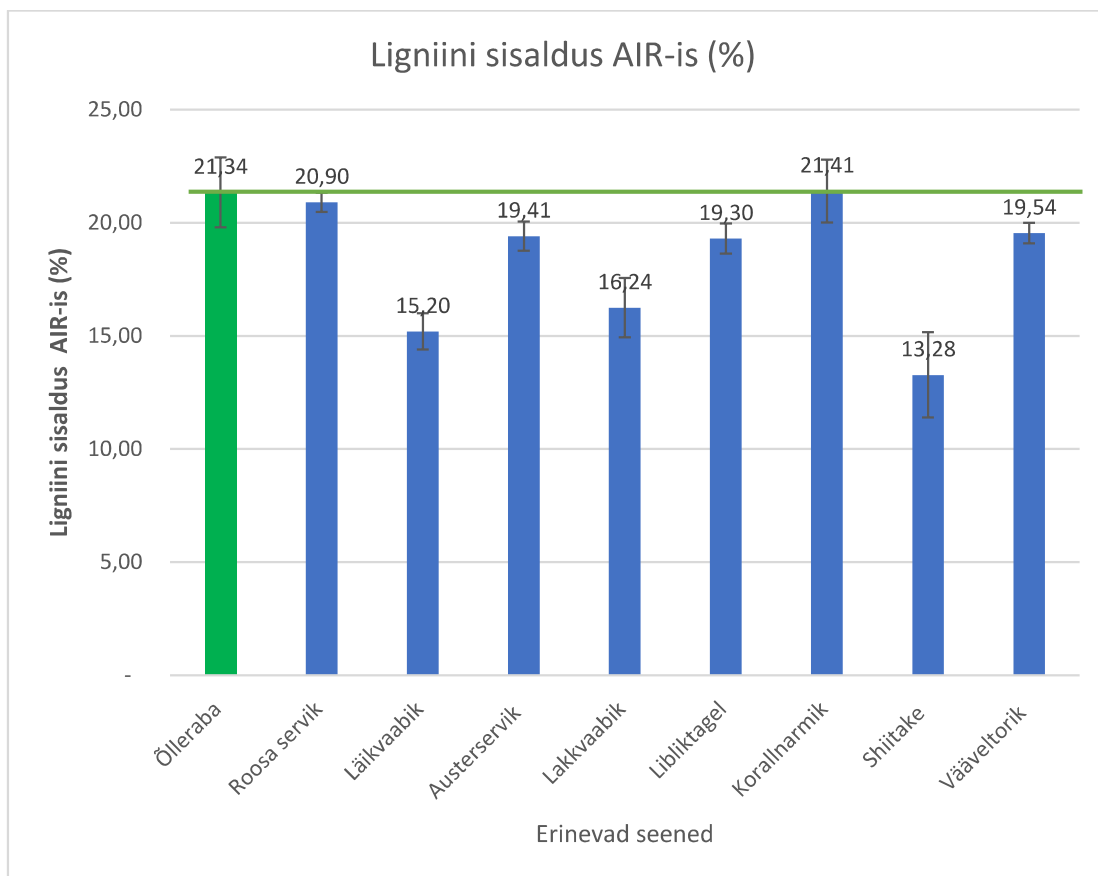
HPLC-ga mõõdetud nende suhkrute sisaldus AIR-is on toodud Tabelis 5. Võrreldes seentega fermenteeritud õlleraba fermenteerimata õllerabaga, on näha, et ksüloosi sisaldus on fermenteerimisega suurenenud, arabinoosi sisaldus on aga vähenenud. See võib olla selle tõttu, et seened eelistavad arabinoosi. Arabinoosi ja ksüloosi summa fermenteeritud rabades on ikkagi suurem kui nende summa fermenteerimata õllerabas. Antud suhkrute kogusisaldus tõusis kõikide seentega fermenteeritud õllerabadel peale läikvaabiku ja šiiitake. Ilmselt on see tingitud ligniini ning õllerabas leiduvate suhkrute ja teiste lahustunud substraatide eelistatud kasutamisest nende kahe seene poolt.

Tabel 5. Hüdrolüüsil tekkinud suhkrute sisaldus õllerabas ja erinevate seentega 6 nädalat fermenteeritud õllerabas protsentides (g/100 g)

	Glükoos %	Ksüloos %	Arabinoos %
Õlleraba	27,27 ± 0,50	19,32 ± 0,55	8,26 ± 0,12
<b>Fermenteeriv seeneliik</b>			
<i>Roosa servik</i>	28,53 ± 0,35	24,63 ± 0,42	7,84 ± 0,02
<i>Läikvaabik</i>	24,98 ± 1,14	21,05 ± 0,80	7,15 ± 0,06
<i>Austerservik</i>	29,25 ± 1,32	21,03 ± 0,37	7,14 ± 0,12
<i>Lakkvaabik</i>	26,38 ± 0,57	24,05 ± 0,16	7,81 ± 0,27
<i>Libliktagel</i>	26,55 ± 1,15	22,64 ± 0,92	7,38 ± 0,16
<i>Korallnarmik</i>	27,57 ± 0,49	21,91 ± 0,87	8,10 ± 0,19
<i>Šiiitake</i>	25,21 ± 0,37	22,41 ± 0,33	6,86 ± 0,06
<i>Vääveltorik</i>	28,96 ± 0,55	22,23 ± 0,27	7,00 ± 0,09

### 4.2.2. Ligniini tarbimine

Jooniselt 9 on näha, et fermenteeritud õllerabade ligniinisaldus võrreldes fermenteerimata õllerabaga vähenes, seega antud seened tarbisid õllerabas olevat ligniini. Kõige rohkem ligniini tarbis ülekaalukalt šiiitake. Samuti lakkvaabik ja läikvaabik. Kui vaadata šiiitake ja läikvaabiku polüsahhariidide tarbimist eelnevast tabelist, tuleb välja, et see oli väiksem kui teistel seentel, ehk nad võisid eelistada ligniini tarbimist polüsahhariididele. Mõned valgemädaniku seened, nagu *C. subvermispora*, *Phellinus pini*, *Phlebia spp.* ja *Pleurotus spp.* (*austerservikud*) delignifitseerivad puitu, rünnates eelistatavalt ligniini hemitselluloosi ja tselluloosi asemel, jättes alles rikastatud tselluloosi. Teised valgemädaniku seened, nagu *Trametes versicolor* (*libliktagel*), *Heterobasidion annosum* ja *Irpex lacteus*, lagundavad rakuseina komponente aga samaaegselt (Abdel-Hamid et al., 2013).



Joonis 9. Ligniini sisaldus AIR-is (%) ja ligniini tarbimine erinevate seeneliikide poolt.

#### 4.2.3. Valgusisalduse suurenemine öllerabas

Valgusisalduse tulemused CHNS analüsaatorist on toodud Tabelis 6. Tabelis on toodud nii valgusisaldus kuivatatud proovides kui AIR-is. Võrreldes töötlemata ölleraba erinevate seenekultuuridega läbikasvanud öllerabade proovidega, on selgelt näha, et valgusisaldus on seente kasvuga suurenenud. Kõrgem valkude sisaldus tuleneb seente biomassi suurenemisest ja ölleraba hulga vähenemisest. Seened sekreteerivad keskkonda ekstratsellulaarseid ensüüme, mis lagundavad ölleraba. Kõikide kuivatatud proovide valgusisaldus võrreldes fermenteerminata prooviga oli 9-15% suurem ning AIR proovide valgusisaldus suurenes kuni 5%, kusjuures korallnarmiku ja vääveltoriku puhul pole valgusisalduse suurenemist näha. Kuivatatud proovides on valgu protsent fermenteeritud öllerabades suurem, sest seened toodavad proteaase, mis on lõhkunud valke alkoholis lahustuvateks peptiidideks. AIR-i tegemisel lahustuvad need peptiidid etanoolis ja see fraktsioon eraldati proovist. Kõige enam suurenes valgusisaldus lækivaabiku ja šiitake proovides, mis toetab ülal toodud hüpoteesi, et nad tarbivad eelistatult ligniini, mida kasutatakse energeetilisel eesmärgil ja ka valgu sünteesiks.

Tabel 6. Valgusisaldus õllerabas ja seentega fermenteeritud õllerabas kuivatatud ja AIR proovides ja valgu juurdekasv

		Valk (%)	SD		
Õlleraba	Kuiv	21,09	±1,10		
	AIR	22,69	±0,62		
<b>Fermenteeritud õllerabad</b>		<b>Valgu juurdekasv</b>			
<i>Roosa servik</i>	Kuiv	35,00	±0,80	13,91	
	AIR	23,94	±1,59	1,25	
<i>Läikvaabik</i>	Kuiv	36,25	±0,88	15,16	
	AIR	37,22	±0,04	14,53	
<i>Austerservik</i>	Kuiv	32,41	±0,22	11,31	
	AIR	25,44	±0,88	2,75	
<i>Lakkvaabik</i>	Kuiv	35,06	±2,39	13,97	
	AIR	23,53	±0,34	0,84	
<i>Libliktagel</i>	Kuiv	34,31	±2,56	13,22	
	AIR	24,41	±1,69	1,72	
<i>Korallnarmik</i>	Kuiv	31,38	±1,41	10,28	
	AIR	20,31	±1,06	-	2,38
<i>Šiitake</i>	Kuiv	36,44	±0,18	15,34	
	AIR	27,53	±2,78	4,84	
<i>Vääveltorik</i>	Kuiv	30,31	±0,27	9,22	
	AIR	22,50	±2,47	-	0,19

### 4.3. Õlleraba ja fermenteeritud õllerabaga rikastatud saiade omadused

Nagu on näidanud varasemad uuringud (Nacente et al., 2019; Amoriello et al., 2020), on õlleraba lisamine pagaritoodetesse (kuni 20% tase) mõjutanud positiivselt kiudainete, valkude ja aminohapete taset ning vähendab lõpptoodete kalorisisaldus. Lisaks võimaldab see suuremat veeimavust. Siiski on sellel negatiivne mõju lõpptoote struktuurile, tekstuurile, mahule, värvile, sensorsetele omadustele ja tarbija aktsepteerimisele. Seetõttu lisatakse seda väikestes kogustes. On näha, et ka selles töös mõjutab õlleraba ja fermenteeritud õlleraba lisamine oluliselt saiade tekstuuri- ja värviomadusi (Tabelid 7 ja 8).

#### 4.3.1. Tekstuuranalüüsi tulemused

Õlleraba lisamine muutis saia 9,4% sitkemaks, 13,9% kummisemaks ja 14,2% tugevamaks ning vähendas taastuvust 4,3%. Võrreldes kontrollproovi fermenteeritud õllerabaga rikastatud saia,ga,

muutis raba lisamine saia 19,4%, sitkemaks, 32,4% tugevamaks ja 25,19% kummisemaks ning vähendas kohesiooni, taastuvust ja elastsust vastavalt 6%, 5,7% ja 8%.

Tekstuuri muutused õlleraba lisamisel tekivad tänu kiudainete sisalduse suurenemisele ning fermenteeritud õlleraba puhul on muutused veel suuremad tänu suuremale valgusisaldusele.

Tabel 7. Saiade tekstuuriomadused ja muutus võrreldes kontrollprooviga (%)<sup>2</sup>




	<b>Tugevus</b>	<b>Kohesioon</b>	<b>Taastuvus</b>	<b>Elastsus</b>	<b>Kummisus</b>	<b>Sitkus</b>
100% nisujahu sai	5,54±0,13	0,83±0,01	0,92±0,01	0,49±0,02	4,6±0,09	4,24±0,05
Õllerabaga (10%) rikastatud sai	6,33±0,74	0,83±0,00	0,88±0,01	0,5±0,00	5,24±0,63	4,64±0,59
<b>Muutus (%)</b>	<b>14,26</b>	<b>-</b>	<b>-4,35</b>	<b>2,04</b>	<b>13,91</b>	<b>9,43</b>
Fermenteeritud õllerabaga (10%) rikastatud sai	7,59±0,98	0,78±0,01	0,87±0,02	0,45±0,01	5,92±0,74	5,14±0,74
<b>Muutus (%)</b>	<b>32,39</b>	<b>-6,02</b>	<b>-5,68</b>	<b>-8</b>	<b>25,19</b>	<b>19,4</b>

#### 4.3.2. Kolorimeetria tulemused

Saiade värvi ja tumedus hindamiseks võeti proov saia sisemusest. Õlleraba ja fermenteeritud õllerabaga rikastatud saiade värviomadused (heledus, punasus ja kollasus) on toodud Tabelis 8. Rikastamine põhjustas olulise muutuse värvi tumeduses (100-L). Mõlemas saias muutis lisand saia oluliselt tumedamaks, kusjuures fermenteeritud õllerabaga sai oli tumedam kui õllerabaga sai. Tumedus tõusis 27,51 pealt kontrollsaia 49,03 ja 51,82-le vastavalt õlleraba lisandiga saias ja fermenteeritud õllerabaga rikastatud saias. Lisandid mõjutasid tugevalt ka punetust (a\*), mis tõusis 0,82-lt vastavalt 5,02-le ja 6,05-le. Kollasus muutus saiaades vähe.

Õlleraba lisamisest tingitud suurem aminohapete kogus tähtsisesegus võis soodustada Maillardi reaktsiooni, mille tulemuseks on heleduse vähenemine ja punetuse suurenemine. Tulemused on kooskõlas varasemate uuringutega (Nocente et al., 2019).

Tabel 8. Saiade sisemuse kolorimeetrilised näitajad: kontrollproov, õllerabaga rikastatud sai (10g/100g), fermenteeritud õllerabaga rikastatud sai (10g/100g). Värvindeksid: Kollane (b\*), pruun, tumedus (100-L) ja punane (a\*) ± standardhälve. Paremal on fotod antud saiadest.

	b*		100-L		a*		
100% nisujahu sai	18,51	±0,21	27,51	±0,11	0,82	±0,09	
Õllerabaga (10%) rikastatud sai	19,88	±0,17	49,03	±0,17	5,05	±0,12	
Fermenteeritud õllerabaga (10%) rikastatud sai	22,29	±0,18	51,82	±0,13	6,05	±0,18	

### 4.3.3. Sensoorse analüüsi tulemused

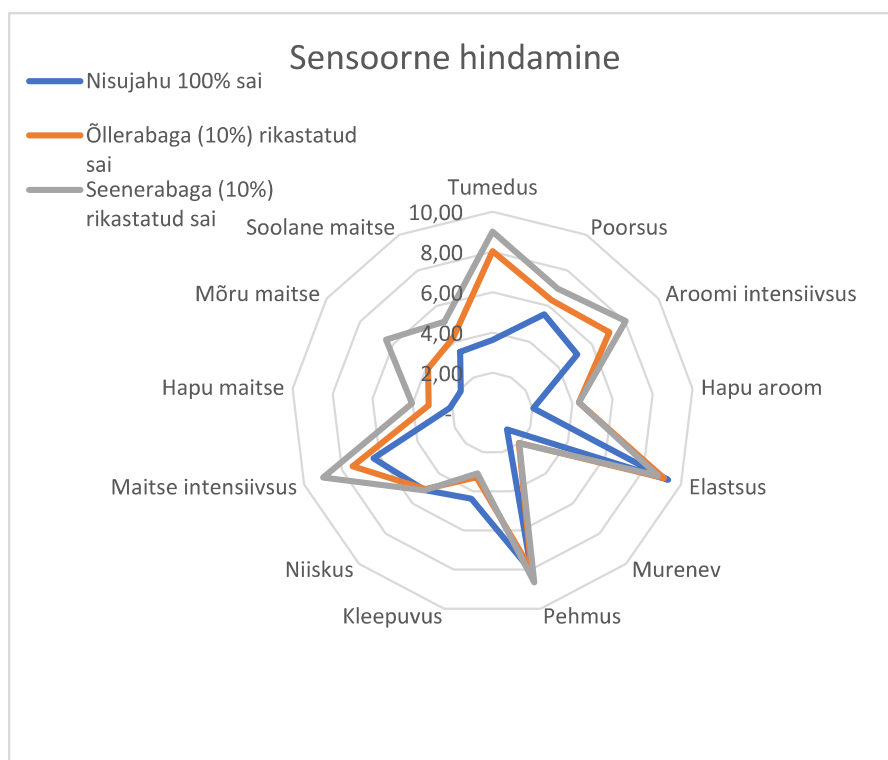
Sensoorse analüüsi tulemused on toodud Tabelis 9 ning on näha Jooniselt 10 radari graafikul näidatuna. Nii õlleraba kui fermenteeritud õlleraba lisamine saiale põhjustas olulisi erinevusi nii väljanägemises, aroomis, kui maitstes. Eelkõige muutus tumedus (kontrollproovi väärtus: 3,63 ja õlleraba ning fermenteeritud õllerabaga saiade väärtused vastavalt 8,04 ning 9,01), aroomi intensiivsus (kontrollproovi väärtus: 5,12 ja õlleraba ning fermenteeritud õllerabaga saiade väärtused vastavalt 7,05 ning 8,04), ning maitse intensiivsus (kontrollproovi väärtus: 6,32 ja õlleraba ning fermenteeritud õllerabaga saiade väärtused vastavalt 7,43 ning 9). Samuti just fermenteeritud õlleraba puhul mõru maitse suurenes (kontrollproovi väärtus: 1,91 ja õlleraba ning fermenteeritud õllerabaga saiade väärtused vastavalt 3,89 ning 6,43). Tekstuuri osas hinnati elastsust, murenevust, pehmust, kleepuvust ning niiskust. On näha, et need omadused ei hinnatud väga erinevateks võrreldes kontrollsaiaiga. Poorsusest tuleks välja tuua, et see suurenes lisades õlleraba ja fermenteeritud õllerabaga veelgi ning ka Tabelis 8 näidatud piltide pealt on näha, et küpsetamisel tekkis fermenteeritud õllerabaga saia sisse suur õhutasku. Selle põhjuseks võib olla suurem valgusisaldus fermenteeritud õllerabas.

Sensoorse hindamise paneeli osalejatelt paluti ka hinnata saiade üldist meeldivust ning 7 hindajat 8st pidas õllerabaga rikastatud saia aktsepteeritavaks ja 5 hindajat nimetasid seda meeldivaks. Lisatud märksõnadest kirjeldasid hindajad seda kui huvitavat, head ning mainisid, et lõhn ja maitse meenutab seemneid ning heina.

Fermenteeritud õllerabaga saia peeti pigem ebameeldivaks, ükski hindajatest ei tarbiks seda ning lõhna ja maitset kirjeldati kui mõru, intensiivne, ebameeldiv ning teistsugune.

Tabel 9. Valmistatud saiade sensoorsed omadused hinnatud võrdlevalt

		100% nisujahu sai	Õllerabaga (10%) rikastatud sai	Fermenteeritud õllerabaga (10%) rikastatud sai
Väljanägemine	Tumedus	3,63 ±0,74	8,04 ±0,90	9,01 ±1,45
	Poorsus	5,54 ±0,34	6,33 ±0,11	6,98 ±0,43
Aroom	Aroomi intensiivsus	5,12 ±0,56	7,05 ±0,34	8,04 ±1,91
	Hapu aroom	2,05 ±0,90	4,32 ±0,56	4,32 ±2,06
Tekstuur	Elastsus	9,32 ±0,43	9,10 ±0,92	8,78 ±0,43
	Murenev	1,09 ±1,23	1,98 ±0,33	2,00 ±1,23
	Pehmus	8,09 ±2,32	8,04 ±1,01	8,66 ±1,01
	Kleepuvus	4,37 ±0,90	3,28 ±0,03	3,08 ±0,03
	Niiskus	5,11 ±0,11	5,03 ±0,34	5,12 ±0,34
Maitse	Maitse intensiivsus	6,32 ±0,09	7,43 ±1,10	9,00 ±0,56
	Hapu maitse	2,12 ±0,80	3,20 ±1,04	4,04 ±0,03
	Mõru maitse	1,91 ±1,01	3,89 ±0,96	6,43 ±0,34
	Soolane maitse	3,43 ±0,03	4,21 ±2,03	5,12 ±1,10



Joonis 10. Sensoorne hindamine- radari graafik iseloomustab saiade erinevust kontrollproovist



## 5. JÄRELDUSED

Tööst võib välja tuua järgmised järeldused:

1. Seente kasvukiirust saab hinnata mütseeli diameetri ning substraadi monosahhariidide ja ligniini sisalduse mõõtmisega.
2. Seenemütseeli kasvatamine õllerabal tõstab selle valgusisaldust (kuni 15% kuivkaalust) ja vähendab ligniini (kuni 7% kuivkaalust) sisaldust olenevalt seeneliigist.
3. Töös välja töötatud retsepti sensoorsel hindamisel ja analüüsil ilmnes, et fermenteeritud õlleraba lisamisel ilmnevad tarbijatele ebasoositud sensoorsed omadused.
4. Edaspidisel teema uurimisel soovitaks võrrelda ligniini ning polüsahhariidide tarbimist erinevate inkubeerimisaegadega fermenteerimisel (2, 4, 6 nädalat). Samuti pakuks huvi edasi uurimine, miks peale fermentatsiooni arabinoosi sisaldus õllerabas väheneb, kui glükoosi ja ksüloosi kontsentratsioon suureneb.
5. Töö tulemustest lähtuvalt püstitaksin ka küsimuse: kas seda kauem fermenteerides paraneb õlleraba tekstuur ilma ebameeldivate kõrvalmaitsete, -lõhnade tekkimiseta. Siinkohal oleks ka huvitav sobitada fermenteeritud õlleraba erinevatesse retseptidesse.

Asjakohast kirjandus uurides ilmnes, et eelnevalt on uuritud seente kasvu õllerabal kuid ei ole teada, et oleks uuritud nii laia valikut seeneliike läbi mitme kasvuparameetri. Lisaks ei ole teada eelnevatest töödest, mis kajastaksid seentega fermenteeritud õlleraba kasutamist toidus. Seega antud töö annab aluse edaspidisteks uurimusteks.

# KOKKUVÕTE

Antud magistritöö peaesmärk oli uurida kuidas kasvavad erinevad söögiks kasutatavad kandseened õllerabal ning kaardistada substraadis tekkinud muutused ja toiteväärtuse võimalik tõus. Selleks uuriti kui palju seente kasvuga tõuseb õlleraba valkude sisaldus ja ka kui palju laguneb ligniini, mis õllerabas tekitab toidus mittesobivat tekstuuri. Lisaks sellele hinnati töös õlleraba ja fermenteeritud õlleraba lisamise mõju saia retseptuuri läbi tekstuuri, värvi ja sensoorse analüüsi. Eesmärk sai täidetud, seente kasvu õnnestus uurida ning tulemustest sai järeldada, et seentega õlleraba fermenteerimine tõstis selle valgusisaldust. Lisaks sai tulemustest välja lugeda, et osad valitud seentest eelistavad ligniini tarbimist.

Tähtsamad tulemused:

- Kõik valitud seeneliigid peale kedristõlviku ja šampinjoni kasvasid õllerabal. Kõige kiiremat kasvu näitasid läikvaabik, roosa servik, austerservik ja kollane servik.

- Glükoosi ja ksüloosi kontsentratsiooni tõus kõikide seentega fermenteeritud õllerebades tuvastati HPLC analüüsiga. Huvitav oli, et arabinoosi hulk õllerabas ei suurenenud. Ligniini tarbimine oli näha kõikidel valitud seentel, kõige suurem tarbimine toimus läikvaabikul, lakkvaabikul ning šiiitakel. Seente kasvuga õllerabal tõusis selle valgusisaldus. Jällegi oli kõige suurem juurdekasv lakkvaabikul, šiiitakel ja läikvaabikul, lisaks ka roosa serviku ja libliktageli puhul.

- Õlleraba ja austerserviku mütseeliga läbikasvanud õlleraba jahvatati ning neid jahusid kasutati saia küpsetamiseks 10% asendusena nisujahust. Valmistatud saiadele tehti võrdlev sensoorne analüüs, kolorimeetria ja tekstuuranalüüs. Leiti, et mõlemad saiad erinesid 100%-lise nisujahuga kontrollproovist nii värvi kui tekstuuri osas. Tugevus, situs ja kummissus tõusid nii õlleraba kui fermenteeritud õlleraba saiades, viimases pea kaks korda rohkem kui õlleraba proovis. Saiade värv tumenes samuti õlleraba lisamisega ning veelgi fermenteeritud õlleraba lisamisega. Sensoorsed omadused olid saiadel kontrollproovist väga erinevad, eriti maitse ja lõhna intensiivsus ning sensorsete hindajate paneel hindas fermenteeritud õllerabaga saia pigem ebameeldivaks.

Õlleraba on oma kõrge kiudainete ja valkude sisalduse tõttu potentsiaalne koostisaine toidutööstuses kuid tänu selle kõrgele ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi sisaldusele on tugeva struktuuri tõttu selle kasutuselevõtt piiratud. Selles töös näidati, et seente tahkefaasilise fermentatsiooniga õllerabal, saab selle toiteväärtust veelgi tõsta valgusisalduse suurenemisega ning tekstuuri parandada ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi lagundamise kaudu. Kuigi fermenteeritud õllerabaga rikastatud sensoorsed omadused olid selles töös üldiselt ebasoovitavad, arvab töö autor, et selle kasutamisel toiduainetes on suur potentsiaal ning edaspidi tuleks uurida erinevaid töötlusviise ning toiduaineid, millesse see sobiks ning võimalusi kuidas vältida ebasoovitav omadusi.

## SUMMARY

The main goal of this master's thesis was to study how different edible mushrooms grow on brewer's spent grain and to map the changes in the substrate and the possible increase in nutritional value. The goal was achieved, measuring the growth of the mushrooms was successful, and the results showed that the fermentation of the brewer's spent grain with mushrooms increased its protein content. In addition, the results showed that some of the selected fungi prefer to consume lignin.

Key results:

- All selected mushroom species except *Cordyceps militaris* and *Agaricus bisp. Var. bisporus* grew on brewer's spent grain. The fastest growth was shown by *Agaricus bisp. Var. bisporus*, *Pleurotus salmoneo-stramineus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus citrinopileatus*.

- The increase in the concentration of glyucose and xylose was noted by HPLC analysis. Interestingly, the arabinose concentration of the the brewer's spent grain decreased. Consumption of lignin was seen in all selected fungi, with the highest intake occurring on *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma resinaceum*. The protein content of brewer's spent grain was increased by fungal fermentation. Again, *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma resinaceum* had the biggest increase in protein content but *Pleurotus salmoneo-stramineus* and *Trametes versicolor* also showed a considerable increase in protein content of the fermented brewer's spent grain.

- Unfermented brewer's spent grain and brewer's spent grain fermented with oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) mycelium were ground and used to replace 10% of wheat flour in bread. The prepared breads were subjected to comparative sensory analysis, colorimetry and texture analysis. Both breads were found to differ in both color and texture from the 100% wheat flour bread. The strength, smoothness and rubberiness increased in the bread of both the unfermented brewer's spent grain and the fermented brewer's spent grain and the fermented spent grain, the difference compared to the unfermented version was two-fold. The color of the bread also darkened with the addition of a brewer's spent grain and even more with the fermented spent grain. The sensory properties of the breads were very different from the control sample, especially the intensity of the taste and aroma, and a panel of sensory evaluators judged the bread with fermented brewer's spent grain to be unpleasable.

Due to its high content of fiber and protein, brewer's spent grain is a potential ingredient in the food industry but due to its high content of lignin, cellulose and hemicellulose, its use is limited because of its rigid structure. In this work, it was shown that solid-phase fermentation of mushrooms in brewer's spent grain can further increase its nutritional value by increasing the protein content and bettering the texture by degrading lignin, cellulose and hemicellulose. Although the sensory properties of the bread, enriched with fermented brewer's spent grain, were generally undesirable in this work, there is eason to believe that there is great potential in the food industry for fungi-fermented brewer's spent grain and that in the future treatment options and foods for which it would be suitable should be explored further.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Abdel-Hamid, A.M., Solbiati J.O., Cann I.K. (2013). Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. - *Adv Appl Microbiol*, vol. 82, pp. 1-28.
2. Amoriello, T.; Mellara, F.; Galli, V.; Amoriello, M.; Ciccoritti, R.(2021). Technological Properties and Consumer Acceptability of Bakery Products Enriched with Brewers' Spent Grains. - *Foods*, vol. 9, no 10, pp. 1492.
3. Arauzo, P.J., Du, L., Olszewski, M. P., Meza Zavala, M. F., Alhnidi, M. J., Kruse, A. (2019). Effect of protein during hydrothermal carbonization of brewer's spent grain.- *Bioresource Technology*, vol 293, no. 122117.
4. Assandri, D., Pampuro, N., Zara, G. (2020). Suitability of Composting Process for the Disposal and Valorization of Brewer's Spent Grain.- *Agriculture*, vol. 11, no. 1.
5. Aura, A.M, Niemi, P., Mattila, I., Niemelä, K., Smeds, A., Tamminen, T., Faulds, C., Buchert, J., Poutanen, K. (2013). Release of Small Phenolic Compounds from Brewer's Spent Grain and Its Lignin Fractions by Human Intestinal Microbiota in Vitro.- *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 40, pp. 9744-9753.
6. Bajwa, R., Kausar, T., Nadeem, M., Nasreen, Z. (2005). Study of different growth parameters in ganoderma lucidum.- *Micología Aplicada Internacional*, vol. 17.
7. Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Sancho, A. I., Díez, N., Ferreira, P., Soliveri, J., Copa-Patiño, J. L. (2016). Growth and release of hydroxycinnamic acids from Brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339.- *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, no. 1, pp. 140-144.
8. Bartolomé, B., Santos, M., Jiménez, J. J., del Nozal, M. J., Cómez-Cordovés, C. (2002). Pentoses and Hydroxycinnamic Acids in Brewer's Spent Grain.- *Journal of Cereal Science*, vol. 36, no. 1, pp. 51-58.
9. Bentil, J.A., Thygesen, A., Mensah, M. (2018). Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation.- *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 102, pp. 5827–5839.
10. Buta, J. G., Zadrazil, F., Galletti, G. C. (1989). FT-IR determination of lignin degradation in wheat straw by white rot fungus *Stropharia rugosoannulata* with different oxygen concentrations.- *J. Agric. Food Chem*, vol. 37, no. 5, pp. 1382–1384.
11. Chetrariu, A., Dabija, A. (2020). Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review.- *Appl. Sci*, vol. 10, no. 16. pp. 5619.

12. Dang, H. N., Wang, C., Lay, H. (2018). Effect of nutrition, vitamin, grains, and temperature on the mycelium growth and antioxidant capacity of *Cordyceps militaris* (strains AG-1 and PSJ-1). - *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, vol. 11, no. 2, pp. 130-138
13. del Río, J. C., Prinsen, P., Gutiérrez, A. (2013). Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals.- *Journal of Cereal Science*, vol. 58, no. 2, pp. 248-254.
14. Droce, A., Sørensen, J. L., Giese, H., Sondergaard, T. E. (2013). Glass bead cultivation of fungi: Combining the best of liquid and agar media. -*Journal of Microbiological Methods*, vol. 94, issue. 3, pp. 343-346.
15. Ezeonu, F.C., Okaka, A. N. C. (1996). Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (ÖLLERABA).- *Process Biochemistry*, vol. 31, no. 1, pp. 7-12.
16. Fărcaș, A. C., Socaci, S. A., Dulf, F. V., Tofană, M., Mudura, E., Diaconeasa, Z. (2015). Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods.- *Journal of Cereal Science*, vol. 64, pp. 34-42.
17. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. (2022). Faostat Crops and livestock products. (21.05.2022)- <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
18. Gomes, E., da Silva, R., de Cassia Pereira, J., Ladino-Orjuela, G. (2018). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier: pp. 31-56.
19. Grünberger, A., Schöler, K., Probst, C., Kornfeld, G., Hardiman, T. Wiechert, W., Kohlheyer, D., Noack, S. (2017). *Emerging Biotechnologies Viewed by Emerging Bioengineers*, vol. 17, no. 1, pp. 86-92.
20. Hasegawa, R., Kasuya, M. C., Vanetti, M. (2005). Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. - *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 8, no. 2.
21. He, Y., Kuhn, D.D, Ogejo, J. A., O'Keefe, S. F., Fraguas, C. F., Wiersema, B. D., Jin, Q., Yu, D., Huang, H. (2019). Wet fractionation process to produce high protein and high fiber products from brewer's spent grain.- *Food and Bioproducts Processing*, vol. 117, pp. 266-274.
22. Hesseling, F. A., Bircham, P. W., Mertens, S., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). A hands-on guide to brewing and analyzing beer in the laboratory. *Current Protocols in Microbiology*, 54, no. 1.
23. Hoa, H.T., Wang C.L. (2015). The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). – *Mycobiology*, vol. 43, no. 1, pp. 14-23.

24. Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J., Yin, M. (2017). Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain.- *Journal of Food Science*, vol. 82, no. 10, pp. 2232-2242.
25. Imtiaj, A., Jayasinghe, C., Lee, G. W., Shim, M. J., Rho, H. S., Lee, H. S., Hur, H., Lee, M. W., Lee, U. Y., Lee, T. S. (2008). Vegetative Growth of Four Strains of *Hericium erinaceus* Collected from Different Habitats. - *Mycobiology*, vol. 36, no. 2, pp. 88–92.
26. Jegadeesh, P., Lakshmanan, H., Kab-yeul, J., Sabaratnam, V., Raaman, N., (2018). Cultivation of pink Oyster mushroom *Pleurotus djamor* var. *roseus* on various agro-residues by low cost technique,- *Journal of Mycopathological Research*, vol. 56, pp. 213-220.
27. Jorge, A.V., Costa, Treichel, H., Kumar, V., Pandey, A. (2018). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 1-17.
28. Klomklung, N., Karunaratna, S., Hyde, K., Chukeatirote, E. (2014). Optimal conditions of mycelial growth of three wild edible mushrooms from northern Thailand.- *Acta Biologica Szegediensis*, vol. 58. pp. 39-43.
29. Ktenioudaki, A. Crofton, E., Scannell, A. G. M., Hannon, J. A., Kilcawley, K. N., Gallagher, E. (2013). Sensory properties and aromatic composition of baked snacks containing brewer's spent grain.- *Journal of Cereal Science*, vol. 57, no. 3, pp. 384-390.
30. Luangharn, T., Karunaratna, S. C., Hyde, K. D., & Chukeatirote, E. (2014). Optimal conditions of mycelia growth of *Laetiporus sulphureus* sensu lato. - *Mycology*, vol. 5, no. 4, pp.221–227.
31. Lynch, K. M., Steffen, E. J., Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health.- *Journal of the institute of brewing*, vol. 122, no. 4, pp. 553-568.
32. Manan, M. A., Webb, C. (2018). Estimating fungal growth in submerged fermentation in the presence of solid particles based on colour development.- *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 32, no. 3, pp. 618-627.
33. Martín-García, B., Tylewicz, U., Verardo, V., Pasini, F., Gómez-Caravaca, A. M., Caboni, M. F., Rosa, M. D. (2020). Pulsed electric field (PEF) as pre-treatment to improve the phenolic compounds recovery from brewers' spent grains.- *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 64.
34. McConnaughey, M. (2014). *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, pp. 231.
35. Miller, D. (2016). Using Spent Grain in Your Brewpub's Kitchen.- *Brewers association.org*, used 26/04/2022. <https://www.brewersassociation.org/brewing-industry-updates/using-spent-grain-brewpubs-kitchen/>
36. Mitchell, D.A., de Lima Luz, L.F., Krieger, N., Berovič, M. (2011). *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Academic Press, pp. 347-360,

37. Mitri, S., Salameh, S-J., Khelfa, A., Leonard, E., Maroun, R., Louka, N., Koubaa, M., (2022). Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. - *Fermentation*, vol. 8, pp. 50.
38. Mussatto, S.I. (2014). Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications.- *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94,
39. Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications.- *Journal of Cereal Science*, vol. 43, no. 1, pp. 1-14.
40. Naibaho, J., Korzeniowska, M. (2021). Brewers' spent grain in food systems: Processing and final products quality as a function of fiber modification treatment .- *Journal of Food Science*, vol 86, no. 5 pp. 1532-1551.
41. Niemi, P., Martins, T., Buchert, J., Faulds, C. B. (2013). Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain.- *Bioresource Technology*, vol. 136, pp. 529-534.
42. Niemi, P., Tamminen, T., Smeds, A., Viljanen, K., Ohra-aho, T., Holopainen-Mantila, U., Faulds, C. B., Poutanen, K., Buchert, J. (2012). Characterization of Lipids and Lignans in Brewer's Spent Grain and Its Enzymatically Extracted Fraction.- *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 39, pp. 9910-9917.
43. Nocente, F., Natale, C., Galassi, E., Taddei, F., Gazza, L. (2021). Using Einkorn and Triticum Brewers' Spent Grain to Increase the Nutritional Potential of Durum Wheat Pasta. -*Foods*, vol. 10, pp. 502.
44. Nocente, F., Taddei, F., Galassi, E., Gazza, L. (2019). Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential.- *LWT*, vol. 114.
45. Parchami, M., Ferreira, J., Taherzadeh, M. (2021). Brewing process development by integration of edible filamentous fungi to upgrade the quality of Brewer's spent grain (ÖLLERABA). *BioResources*, vol. 16, no. 1, pp. 1686-1701.
46. Puligundla, P., Mok, C. (2021). Recent advances in biotechnological valorization of brewers' spent grain.- *Food Science and Biotechnology*, vol. 30, pp. 341–353.
47. Reyes, C., Poulin, A., Nyström, G., Schwarze, F.W.M.R., Ribera, J. (2021). Enzyme Activities of Five Valgämädanikseen in the Presence of Nanocellulose.- *J Fungi (Basel)*, vol. 18, no 7, pp. 222.
48. Robertson, J. A., Castro-Mariñas, L. R., Collins, S. B., Faulds, C. W., & Waldron, K. (2011). Enzymatic and chemical treatment limits on the controlled solubilization of brewers' spent grain.- *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 20, pp. 11019-11025.

49. Santos, M., Jiménez, J. J., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., del Nozal, M. J. (2003). Variability of brewer's spent grain within a brewery.- *Food Chemistry*, vol. 80, no. 1, pp. 17-21.
50. Shahtahmasebi, S., Pourianfar, H. R., Rezaeian, S., Janpoor, J. (2017). A preliminary study on cultivation of Iranian wildgrowing medicinal mushroom *Lentinus tigrinus*.- *International Journal of Farming and Allied Sciences*, vol. 6-6, no. 31, pp. 149-153.
51. Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., Mishra, P. K. (2019). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Cambridge: Elsevier, pp. 345-354.
52. Zhao, X. Wang, F., Fang, W., Zhou, D., Wang, S., Wu, D., Wang, L., Zhong, R., (2020). High-potency white-rot fungal strains and duration of fermentation to optimize corn straw as ruminant feed.- *Bioresource Technology*, vol. 312.
53. Tao, J., Li, S., Ye, F., Zhou, Y., Lei, L., Zhao, G. (2020). Lignin – An underutilized, renewable and valuable material for food industry, - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 60, no. 12, pp. 2011-2033.
54. ten Have, R., Wijngaard, H., Ariës-Kronenburg, N.A., Straatsma, G., Schaap, P.J. (2003). Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost.- *J Agric Food Chem*, vol. 9, pp. 51.
55. Waters, D.M., Jacob, F., Titze, J., Zannini, E. (2012). Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment.- *European Food Research and Technology*, vol. 235, no. 5, pp. 767-778.
56. Wilkinson L. (1988). Introduction to the history of medical and veterinary mycology.- *Medical History*, vol. 31. no. 1, pp. 102–103.
57. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). Nitrogen and protein content measurement and nitrogen to protein conversion factors for dairy and soy protein-based foods: a systematic review and modelling analysis, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516983>
58. Öztürk, S., Özboy, Ö., Cavidoğlu, İ. (2002). Effects of Brewer's Spent Grain on the Quality and Dietary Fibre Content of Cookies.- *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 108, no. 1, pp. 23-27.



## Tänuavaldused

Antud töö valmis Eesti Teadusagentuuri rahastusel „ResTA – teadus- ja arendustegevuse toetamine ressursside väärindamisel“ uurimisprojekti: „Tahkefaasi fermentatsiooni protsessid toidu tootmise kaassaaduste väärindamisel“ raames.

Sooviksin tänada oma igast küljest toetavat juhendajat Toomas Paalmet. Ta oli alati suureks abiks nii töö teoreetiliste kui praktiliste osade juures. Samuti tänaksin kaasjuhendajat Tiina Randlat, kelle juhendamisel õppisin laboritehnikat kasutama ning mikrobioloogilisi protokolle tundma ning Allan Osperti, kes aitas praktiliste küsimuste lahendamisel.

Tänaksin ka oma kursusekaaslast Karin Veidet, kellega sai ideid vahetada ning kellelt sai alati abi. Tänaksin ka oma perekonda ja sõpru kes olid alati toetavad ning edasilükkavaks jõuks minu magistriõppe teekonnal.

# LISAD

## LISA 1

Sensoorse hindamise leht  
Õllerabaga rikastatud sai-1  
Fermenteeritud õllerabaga rikastatud sai-2

Name:

Date:

SENSORY ANALYSIS

Scale: 0...10

APPEARANCE

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

Reference = 5

1	2

**Porosity**

Assess the porosity on the scale, dense – porous.

Reference= 5

1	2

AROMA

**Intensity of aroma**

Intensity of aroma, low intensity – high intensity.

Reference= 7

1	2

**Sour aroma**

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

Reference= 2

1	2

**Yeast aroma**

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

Reference= 1

1	2

STRUCTURE

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

Reference= 9

1	2

**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

1	2

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

Reference= 8

1	2

**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

1	2

**Moisture**

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

Reference= 5

1	2

**TASTE**

**Intensity of taste**

Taste intensity – high intensity.

Reference= 6

1	2

**Sour taste**

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

Reference= 2

1	2

**Bitter taste**

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

Reference= 1

1	2

**Salty taste**

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

Reference= 3

1	2

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

## **Lihtlitsents lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ja reprodutseerimiseks**

Mina Linda Aasma (sünnikuupäev: 19.02.1993)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
ÕLLERABA VÄÄRINDAMINE TAHKEFAASILISEL FERMENTATSIOONIL,

mille juhendaja on: Toomas Paalme

1.1 reprodutseerimiseks 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 lihtlitsentsi andmisega ei rikuta kolmandate isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ja teistest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

allkiri

---

kuupäev