



Suhkru ja ligniini määramine õlle- ja seenerabas

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Anastasia Karpenko

Üliõpilaskood: 206518LAAB

Juhendaja: Toomas Paalme, vanemteadur
(LK - keemia ja biotehnoloogia instituut)

Kaasjuhendaja: Allan Oltspert

Õppekava: LAAB17/20 –
Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

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: Anastasia Karpenko

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Toomas Paalme

[allkiri ja kuupäev]

SISUKORD

Sisukord.....	3
Lühendid	5
Sissejuhatus	6
Kirjanduse ülevaade.....	7
Õlleraba.....	7
Kulturseened / Seenekultuurid.....	11
Austerservik	11
Shiitake.....	11
Lõvilakk	12
Lakkvaabik.....	13
Seente kultiveerimine	14
Õlle- ja seeneraba keemiline analüüs.....	15
Suhkrute sisaldus	15
Valgu sisaldus.....	15
Tselluloosi ja hemitselluloosi sisaldus.....	15
Ligniini sisaldus	16
Tööülesanne.....	17
Materjalid ja meetodid	18
Organismid.....	18
Materjalid ja reagentid	18
Meetodid	19
Suhkrute sisalduse määramine.....	19
Tselluloosi ja hemitselluloosi sisalduse määramine	19
Ligniini määramine kaalanalüüsil.....	21
Valgu määramine CHN analüüsil	21
Tulemused ja arutelu	22
Seente kasv	22
Lahustunud suhkrute sisaldus seene- ja õllerabas	25
Seene- ja õlleraba hüdrolüsaadi HPLC analüüs.....	2
Suhkrute tarbimine fermentatsioonil	4

Ligniini sisaldus	4
Valgu analüüs.....	5
Koondtulemused.....	7
Järeldused	9
Kokkuvõte	10
Summary	11
Tänuavaldused	12
Kasutatud kirjandus	13
Lisa	15

LÜHENDID

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

TFF – Tahkefaasiline fermentatsioon

MEA- (malt extract agar)- linnaseekstrakti agar

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

C - süsinik

H - vesinik

N – lämmastik

SISSEJUHATUS

Seened, kui väikese energia ja suure valguse ja kiudainete sisaldusega toiduaine omab üha suuremat tähtsust meie toidulaul. Kuna loodusest nende korjamise mahud on piiratud kogub üha enam jõudu seente kultiveerimine. Tavaliselt on substraadiks ligno-tselluloossed materjalid, mis otseselt ei ole toiduna kasutatavad: näiteks õled, saepuru ja -laastud. Seetõttu pakuvad huvi vaid kultiveerimisel saadud viljakehad ja seeneniidistik, mis moodustab kuni pool seenemassist jääb kasutamata. Samas tekib õlletööstuses suures koguses õlleraba – 39 miljoni tonni aastas kogu maailmas, mis võiks potentsiaalse kasutust leida inimtoiduna. Arvestades õlle tarbimismahtu tekib ühe elaniku kohta 10 kilogrammi õlleraba aastas (FAO).

Õlleraba sisaldab palju valku (20%), mõningal määral ka inimese poolt omastatavaid suhkruid ja polüglükaane, põhiosa aga moodustavad tselluloos (17%), hemitselluloosid (35%) ja ligniin (28%). Kõrge valguse ja hemitselluloosi sisalduse tõttu on õlleraba väärtuslik loomasööda allikas, seda eriti mäletsejate toidus.

Mingil määral lisatakse õlleraba ka kiuaine allikana inimese toidule. Erinevalt inimest on seened võimelised omastama õllerabas leiduvaid beta-glükaane: tselluloosi ja hemitselluloosi ja mõned liigid ka ligniini. Kuigi tööstuslikul rakendusel on palju probleeme sobib õlleraba pigem seenemütseeli kui seente kasvatamiseks.

Selleks, et uurida mida üks või teine seeneliik kasvul õllerabast omastab on vaja mõõta: valguse, ligniini, suhkrute, tselluloosi, hemitselluloosi kontsentratsiooni õllerabas. See on keeruline ülesanne, millel kirjanduses puudub efektiivne lahendus.

Seetõttu, antud töö ülesandeks oli kombineerides kaal- ja kromatograafilist analüüsi töötada välja ja valideerida valguse, suhkrute, tselluloosi, hemitselluloosi ning ligniini määramismeetod õlle- ja seenerabas, ja rakendada seda seente mütseeli kasvu uurimisel.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Selles osas käsitleme seene mütseeli kasvatamise potentsiaalse substraadi õlleraba saamist ja omadusi, kasvatamisel kasutatud seeneliike, seente kultiveerimist kui ka meetodeid mis sobivad õlle- ja ka seeneraba analüüsiks.

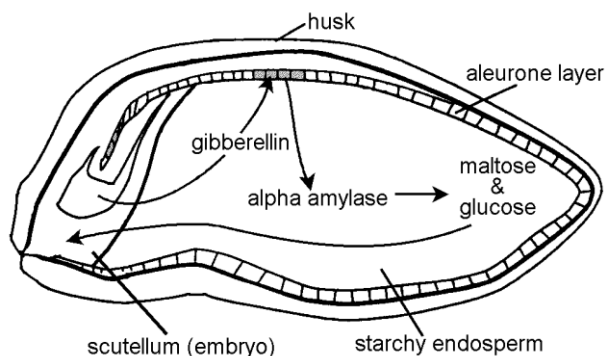
ÕLLERABA

Õlleraba on õlle tootmise kaasprodukt, mis saadakse virde eemaldamisel meskist.

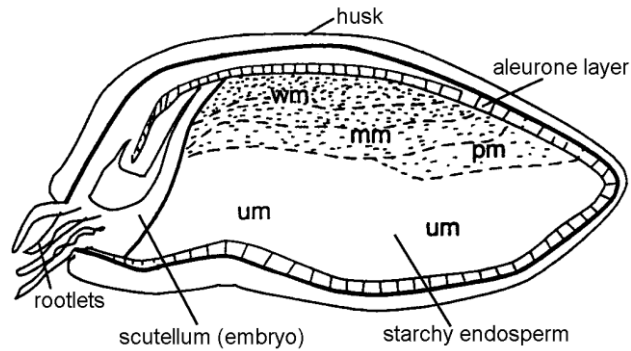
SAAMINE

Õlle valmistamine on mitmeetapiline protsess, mis hõlmab linnaste valmistamist teraviljast, meskimist ja virde eemaldamist ja keetmist koos humala lisamisega. Kõigepealt läbib koristatud oder puhastamise ja suuruse järgi sorteerimise etapid. Pärast 4–6-nädalast puhke perioodi teravilja terad idandatakse kontrollitud tingimustes. Idanemisprotsessi käigus suureneb teravilja ensüümatiline aktiivsus ja sisaldus. Linnas saadakse 4 - 5 päeva idandatud teradest peale nende kuivatamist ja idujuurte eemaldamist.

Oder (*Hordeum vulgare L.*) on peamine teravili, mida kasutatakse õlletootmises nii linnase kui terade kujul. Odralinnas tagab õlle valmistamise protsessiks vajaliku tärglise ja selle lagundamiseks vajalikud ensüümid, mille tulemusel tekivad meskimisel kääritatavad suhkrud: maltotriosis, maltoos ja glükoos (Paynter ja Young, 1996). Lisaks sisaldab oder fütokeemilisi ained — fenoolhapped, flavonoidid, lignaanid, E-vitamiin (tokoferoolid), steroolid ja folaadid — mis suuremal või väiksemal määral jõuavad õllesse. Fenoolsed ained mängivad olulist rolli taime arengus ja paljunemises, toimivad tõkkena viiruste, parasiitide ja kiskjate vastu ning mõjutavad taime värvust. Odra tera on rikas tärglise ja valkude poolest ning koosneb kolmest põhiosast: idust (*scutellum*), endospermist, mis on ümbritsetud aleuroonikihiga ja terakestadega (Joonis 1).



Joonis 1. Odra tera struktuur



Joonis 2. Linnase struktuur

Esimene etapp õlle tootmisel on linnase ettevalmistamine. Lisaks põhilinnastele, mis vastutavad ensümaatilise aktiivsuse ja suhkrute tekke eest kasutatakse eri linnaseid, mis annavad õllesordile omased erilised maitse- ja värviomadused. Neid lisatakse õllepruulimisel väiksemates kogustes, sõltuvalt sellistest aspektidest nagu värvusnäitajad ja maitseomadused (Narziß, Back, Gastl & Zarnkow, 2017).

Idandamiseks asetatakse puhastatud odraterad ligikaudu 2 päevaks veepaakidesse, mille temperatuur on 5–18°C likku. Vesi siseneb embrüosse läbi mikropüüli ja lõpuks jõuab tera niiskus 42–48% -ni. Leotusvett vahetatakse iga 6–8 tunni järel, ja seda ei kasutata uuesti. Leotamisest tulenev hüdratsioon käivitab idanemise ja viib aleurooni rakukihi metabolismi aktiveerumiseni.

Pärast leotamist transporditakse oder idandamismahutisse, kus seda keeratakse kruvirotaatoritega ja hoitakse kontaktis teraviljakihti läbiva niiske õhuvooluga, hoides temperatuuri 15–21°C. Idanemise staadium soodustab aleurooni ja tärkliserikaste endospermi ensüümide, sealhulgas amülaaside, proteaaside, β -glükanaaside jt sünteesi ja aktivatsiooni. Nende ensüümide toime muudab tärkliserikka endospermi struktuuri. Tavaliselt 6 või 7 päeva kestva idandamisemisprotsessi lõpus on endosperm täielikult ja ühtlaselt modifitseeritud.

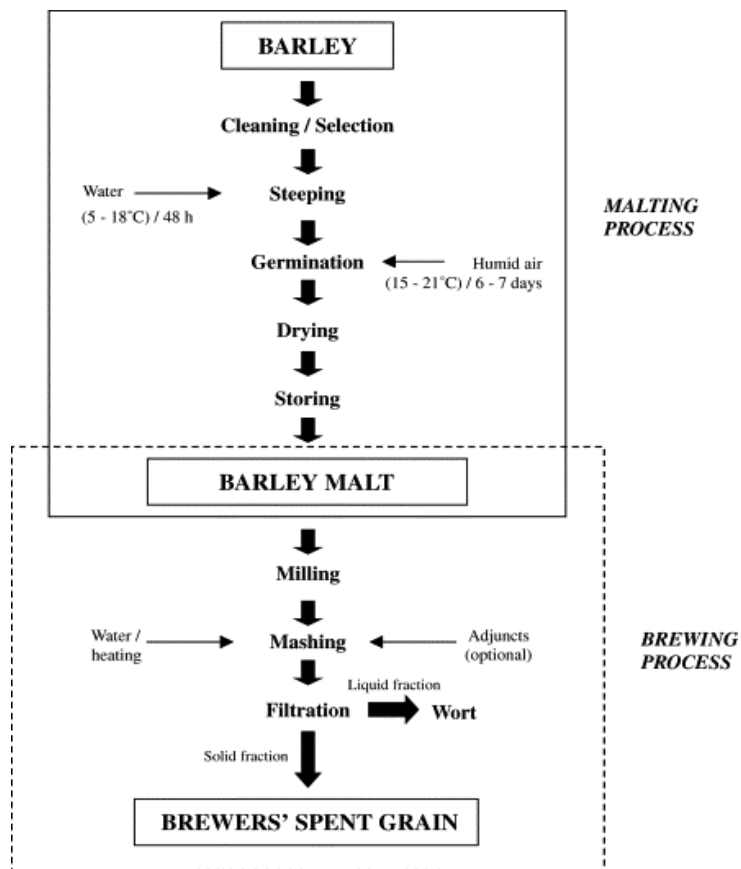
Linnaseoder kuivatatakse (põletatakse) temperatuuril 40–60°C niiskusesisalduseni 4–5%, et vältida mikroobset saastumist ja moodustada maitsekomponente. Pärast seda etappi hoitakse kuivatatud linnaseid 3 või 4 nädalat, et saavutada ühtlus ja tasakaal (Kendal, 1994, Chope, 2001, Venturini Filho ja Sereda, 2001).

Õlletehases linnaseoder jahvatakse, segatakse meski veega ja temperatuuri tõstetakse vahemikus 37–78°C, astmeliselt, saavutada õllesordile omane meski koostis.

Meskimise käigus muudetakse tärklis valdavalt käärivatateks suhkruteks (peamiselt maltoos ja maltotriios) ja väiksemal määral mittekäärivatateks suhkruteks (dekstriinid). Valgud lagundatakse osaliselt peptiidideks ja aminohapeteks, mis on pärimi kasvulämmastiku allikaks. Meskimisel toimuvate ensümaatiliste protsesside tulemusel saadakse magusa vedeliku, mida peale tahke faasi (õlleraba) eemaldamist nimetatakse virdeks. Õlleraba eemaldamiseks lastakse linnase odra tera lahustumatul, lagunemata

osal settida sõelale, kus see moodustab filterkihi, ja ülejäänud meski filtreeritakse läbi selle.

Virret kasutatakse õlletootmises käärituskeskkonnana (Dragone et al., 2002, Linko et al., 1998). Tahke jääkfraktsioon – õlleraba leiab kasutamist põhiliselt loomasöödana. Odraterast õlletera valmistamise protsess on skemaatiliselt kujutatud Joonisel 3.



Joonis 3. Õlleraba moodustumine õllevalmistamise protsessis

KEEMILINE KOOSTIS

Õlleraba keemiline koostis varieerub olenevalt odrasordist, koristusajast, linnase- ja meskimistingimustest ning pruulimisprotsessi käigus lisatud lisandite kvaliteedist ja tüübist (Huige, 1994, Santos et al., 2003). Mikroskoopiline uuring näitab kiuliste rakukudede olemasolu odratera pinnakihtides. Nende kudede põhikomponendid on arabinoksülaan, ligniin (polüfenoolne makromolekul) ja tselluloos (glükoosiühikute lineaarne homopolümeer) moodustavad maatriksi koerakkude vahel. (Santos jt, 2003) leidsid, et kuivatatud õlleraba sisaldas lisaks kiudainetele 24,2% valku, 3,9% lipiide ja 3,4% tuhka. Valgud ja kiudained on õllerabas väga kontsentreeritud, kuna suurem osa odratärklisest hüdrolyüsitakse ja eemaldatakse meskimise käigus (Kisel ja Prentice, 1979).

Õlleraba sisaldab ka mineraalaineid, vitamiine ja aminohappeid. Mineraalelementide hulka kuuluvad kaltsium, koobalt, vask, raud, magneesium, mangaan, fosfor, kaalium, seleen, naatrium ja väävel, kõik kontsentratsioonis alla 0,5% (Huige, 1994, Pomeranz ja Dikeman, 1976). Vitamiinide hulka kuuluvad (ppm): biotiin (0,1), koliin (1800), foolhape (0,2), niatsiin (44), pantoteenhape (8,5), riboflaviin (1,5), tiamiin (0,7) ja püridoksiin (0,7); Valkudega seotud aminohapete hulka kuuluvad suurtes kogustes leutsiin, valiin,alaniin, seriin, glütsiin, glutamiinhape ja asparagiinhape ning väiksemates kogustes türosiin, proliin, treoniin, arginiin ja lüsiin. Samuti võivad esineda tsüstiin, histidiin, isoleutsiin, metioniin, fenüülalaniin ja trüptofaan (Huige, 1994, Mariani, 1953). Tuleb mainida, et ka osa virdes lahustunud suhkrud ja happeid jääb õllerappa.

KULTUURSEENED / SEENEKULTUURID

AUSTERSERVIK

Viimastel aastatel on seeni laialdaselt kasutatud lisaks toidule ka meditsiinis ja tervisetoodetes. *Pleurotus ostreatus* kuulub *Basidiomycota* hõimkonda ja on kõige laiemalt kasvatatud ja kasutatud seen Hiinas. Meditsiinilised uuringud näitavad, et *P. ostreatus* omab mitmesuguseid farmakoloogilisi omadusi, sealhulgas immuunregulatsioon, hüpoglükeemia, hüpolipideemia, kasvajavastane, antioksidant, antibakteriaalne ja põletikuvastane toime (Qingchun Zhao, Xiaopeng Liu, Lili Cu, Changyang Ma, 2023). *P. ostreatus* on samuti tervislikuks toiduks, kuna see on rikas mitmesuguste bioaktiivsete ühendite, sealhulgas polüsahhariidide, valkude, aminohapete, polüfenoolide, vitamiinide ja rasvhapete poolest. Ekstraktsioonimeetoditeks on lahustiekstraktsioon, ensümaatiline meetod ja ultraheliekstraktsioon. Madala energiatarbimise ja madala rasvasisaldusega ravim- ja söödava ressursina on söödavad seened pälvinud üha rohkem tähelepanu.



Joonis 4. Austerservik

SHIITAKE

Lentinula edodes, üldtuntud kui shiitake-seen, on maailma populaarsuselt teine söögiseen oma meelitava maitse ja kvaliteedi tõttu (Ozcelik ja Peksen, 2007). Lisaks on *Lentinula edodes* üks tuntumaid ja põhjalikumalt uuritud meditsiinilistel eesmärkidel kasutatavaid seeni (Ooi ja Liu, 2000), millel on kasvajavastane (Minato et al., 1999), antioksidantne (Choi et al., 2006), viirusevastane (Rincão et al., 2012), antibakteriaalne (Hatvani, 2001) toime ning madal kolesteroolisisaldus (Fukushima et al., 2001). *L. edodes* on samuti valgemädaniku puidulagundaja seen, mida peetakse looduses kõige tõhusamaks ligniini lagundajaks. See elab looduslikult paljude surnud puuliikide tüvedes ja kasutab kasvu substraadina looduslikke palke, kuid viljakehade tootmine võtab kaua aega.



Joonis 5. Shiitake

LÕVILAKK

Hericium erinaceus on söödav seen, mida kasvatatakse peamiselt Aasias, kuid ka mõnes Euroopa osas (Sokót et al., 2015). Edukas kasvatamine sõltub mitmest tegurist, nagu niiskus, temperatuur, pH ja substraadi koostis. Nagu teiste kasvatatavate seente puhul, on substraadi niiskusesisaldus üks olulisemaid parameetreid eduka saagi jaoks (Imtiaj et al., 2008). *H. erinaceus*'e kasvatamiseks võib kasutada erinevaid lignotselluloosijäätmeid, nagu saepuru, puuvillajäätmed, maisitõlvikud, riisikõrred ja teraviljad. *H. erinaceus* on valgemädaniku seen, mis toodab laia spektrit ensüüme substraadi lagundamiseks, ja see aktiivsus on tihedalt seotud mütseeli kasvuga. Need seenensüümid hõlmavad tsellulaasi, hemitsellulaasi, ligniini peroksüdaasi, lakkaasi ja mangaani peroksüdaasi (Atila, 2019; Sokót et al., 2015).



Joonis 6. Lõvilakk

LAKKVAABIK

Ganoderma lucidum kuulub kandseente hulka, omab puidulaadset tekstuuri ja on laialt levinud troopilistes ja parasvöötme piirkondades Euroopas, Põhja-Ameerikas ja Aasias. See seen on nii toiduks kui ka ravimiks ja omab pikka ajalugu Hiinas, Jaapanis, Koreas ja teistes Aasia riikides. Hiina farmakopöa järgi on sellel et tugevdav ja vaimu rahustav toime, köha ja astma leevendav ning seda saab kasutada rahutuse, unetuse, südamepekslemise, kopsupuudulikkuse, köha ja astma, kurnatuse ja hingeldamise ning isukaotuse korral. Uuringud näitavad, et *G. lucidum* sisaldab polüsahhariide, triterpenoide, steroide, stereoole, nukleotiide, rasvhappeid ja teisi aktiivseid aineid. Paljud uuringud on kinnitanud, et *G. lucidum* omab laia farmakoloogilist toimet, sealhulgas kasvajakvastast, immuunmoduleerivat, antioksidantset, antimikroobset, diabeedivastast, südant kaitsvat, põletikuvastast, antiandrogeenset, mutatsioonivastast ja neurokaitsvat toimet (Sijia Wu, Siyuan Zhang, Bo Peng, Dechao Tan, Mingyue Wu, Jinchao Wei, Yitao Wang, Hua Luo, 2023).



Joonis 7. Lakkvaabik

SEENTE KULTIVEERIMINE

Seeni on laborites kunstlikes tingimustes kasvatatud kauem kui sajand (Ainsworth, 1986). Traditsiooniliselt alustatakse kasvatamist tahkel agaril Petri tassidel, harvem vedelas keskkonnas. Vedelkultuuris on ühtlase kasvu saavutamine keeruline, kuna seen võib kolbide külgedele tekitada seeneniidistiku või moodustada seeneniidistiku tükke. Agar vajab toitainete lisamist kuna koosneb põhiliselt kahest polüsahhariidist, agarist ja agaropektiinist (Araki, 1937), mis on suhteliselt stabiilsed seeneensüümide toimele.

Tahkefaasiline fermentatsioon on bioloogiline protsess, mis hõlmab tihti tahke matriksi lagunemist ja mikroobide kasvu. See on olnud aastatuhandeid kasutusel toitide valmistamisel idamaades. Viimastel aastatel on nendele tehnoloogiatele üha enam pööratud tähelepanu ka läänemaises toiduainetööstuses.

“Tahkefaasilised fermentatsioonid on perspektiivsed toidusaaduste väärindamisel väikeettevõtetes ja ka munitsipaalsete toidujäätmete komposteerimisel. See võimaldab aidata kaasa põllumajandussaaduste tootmise ja toidusüsteemide jätkusuutlikusele, aidates utiliseerida toidu kaassaadusi võimalikult efektiivselt ja keskkonnasõbralikult. TFF on suurepärane lahendus kõrgekvaliteetsete suure lisaväärtusega toodete tootmiseks kasutades erinevaid toormaterjale ja põllumajandustööstuse jääke substraadidena. Jäätmed saab lisaks biokontrolli agentidele ümber töödelda bioväetisteks ja ka loomasöötakts. TFF ja selle alane oskusteave on laialdlaselt rakendatav just maapiirkondades, kus oluliseks majandusvaldkonnaks on põllumajandus. Lisaks võimaldab TFF väikesemahulist tootmist ja seeläbi vähendab transpordi kulusid. TFF üheks võimalikuks ja potentsiaali omavaks edasiarenduseks on ka tööstusensüümide tootmine, kaasa arvatud puidu- ja tselluloosi tööstuse jääkide jätkusuutlikuks kasutamiseks bioetanooli ja orgaaniliste lahustite tootmisel, s.o. laiemalt biomajanduses.” (RESTA13 materjalid)

TFF on mikroorganismide poolt kasutatav protsess, kus kasv toimub madala veesisaldusega substraadidel. See protsess sobib hästi biokonversiooniprotsesside arendamiseks läbi tahkefaasilise fermentatsiooni. Tööstustoodete valik, mida saab toota seente TFF abil, hõlmab ensüüme, orgaanilisi happeid, biokütuseid ning mitmeid aktiivseid ühendeid ja metaboliite, nagu antibiootikumid, pigmendid ja bioloogilise kontrolli ained. Neid tooteid kasutatakse erinevates tööstusharudes, sealhulgas toidu-, sööda-, farmaatsia-, kosmeetika- ja biokütusetööstuses.

Mütseeli läbikasvamise kiirust mõjutab peale temperatuuri ka oluliselt õhu O₂ sisaldus. Seene elutegevuse käigus hapnik neelatakse keskkonnast ja eraldub süsihappe gaas ja ka vesi. Mütseeli läbikasvamine kasvusubstraadist võtab umbes kaks nädalat ning sel hetkel peaks substraadi pinnal olema näha valkjad seeneniidistiku ringid, mis omavahel kokku puutuvad.

ÕLLE- JA SEENERABA KEEMILINE ANALÜÜS

SUHKRUTE SISALDUS

Õlleraba keemiline koostis erineb, olenevalt sellest, millisest toormest ja missugust protsessi kasutades õlu valmistatakse. Kuigi põhimõtteliselt on õlle valmistamisel kasutatud erinevaid teravilju, domineerib tänapäeval siiski oder. Uuringud on näidanud, et õlleraba proovidest leiti suures koguses suhkruid – maltoos 4,8% kuivmassist, glükoos 2,3% kuivmassist, maltotriios 0,7% kuivmassist ja fruktoos 0,4% kuivmassist (Zhao Jin , Yang Lan, Jae-Bom Ohm, James Gillespie, Paul Schwarz, Bingcan Chen, 2022). Suhkru sisalduse määramiseks õlle- ja seenerabas kasutatakse HPLC analüüsi.

VALGU SISALDUS

Kuna odralinnase kest on lignotselluloosne materjal, on õlleraba tselluloosi-, hemitselluloosi- ja ligniinirikkad jäägid, mis sisaldavad ka valku. Valgu sisaldus õllerabas on keskmiselt 21,3% kuivmassist.

Toorvalgu sisaldust toiduainetes määratakse Kjeldahl'i meetodi abil. Meetodi põhineb uuritava aine põletamises kontsentreeritud väävelhappes viimase keemistemperatuuril (330°C) spetsiaalses kuumuskindlas kolvis. Põletamisel orgaanilises aines olev süsinik oksüdeerub CO₂-ks, vesinik H₂O-ks, lämmastik moodustab ammoniumsulfaadi. Orgaanilise aine põletamine H₂SO₄-ga kulgeb aeglaselt ning protsessi kiirendamiseks kasutatakse erinevaid katalüsaatoreid, mis aitavad üle kanda hapnikku väävelhappelt orgaanilise aine süsinikule. Katalüsaatorina kasutatakse metallilist elevhõbedat, elavhõbeoksiidi, vaske, vaskoksiidi, seleeni jt. Tekkinud segule lisatakse leelis ja ammoniaagi kontsentratsioon määratakse peale veeauru destillatsiooni tiitrimisel. Alternatiiv on CHN analüüs. Mõlema protsessi tulemusena saadaks lämmastiku sisaldus proovis, mis korrutades läbi vastava koefitsiendiga annab valgu sisalduse.

TSELLULOOSI JA HEMITSELLULOOSI SISALDUS

Tselluloos ja hemitselluloos moodustavad koos peaaegu 50% kuivmassist kasutatud terade koostisest. Keskmiselt tselluloosi ja hemitselluloosi on vastavalt 22,4% ja 30,43% kuivmassist („Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation“,2009). Tselluloos koosneb glükoosimolekulidest (β-D-glükopüraanoosi monomeeridest mis on omavahel seotud β-1,4-glükosiidsete sidemete kaudu). Tselluloos koosneb 3000 või rohkemast glükoosiühikust.

Tselluloosi ja hemitselluloosi määramiseks kasutatakse Klasoni meetodi (Ana B. Ibáñez, Stefan Bauer, 2014). Tselluloosi sisaldust arvutatakse glükoosi sisalduse järgi. Hemitselluloosi sisaldust arvutatakse arabiinooosi ja ksüloosi summa sisalduse järgi.

LIGNIINI SISALDUS

Varasemad analüüsid näitavad, et õllerabas olev ligniin moodustab õllerabas keskmiselt 19,6% kuivmassist („Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation“,2009).

Ligniini määramiseks kasutatakse Klasoni meetodi. Saadud hüdrolüsaat filtreeritakse läbi filtri, pestakse destilleeritud veega ning kuivatatakse 105°C juures konstantse kaalu saavutamiseni.

TÖÖÜLESANNE

Töötada välja happelisel hüdrolüüsil, HPLC-I , CHN ja mahtanalüüsil põhinev protokoll õlle- ja seeneraba keemilise koostise kvantitatiivseks analüüsiks.

MATERJALID JA MEETODID

ORGANISMID

Uuringus kasutati Maaülikooli seenekollektsioonist saadud seenekultuure, mis on toodud Tabelis 1. Seenekultuure hoiti alal külvates seente originaalkultuuri Petri tassidele, linnaseekstrakt-agar (MEA) söötmele. Petri tase kultuuridega hoiti temperatuuril 4°C kuni ümberkülvmiseni.

Katseteks külvati kultuurid (Austerservik, Shiitake, Lõvilakk, Lakkvaabik) ümber samuti agari MEA söötmel.

Kasvatuskatsete teostamiseks õllerabal jaotati võrdselt autoklaavis „Systec horizontal bench-top autoclave DX-90“ T = 121°C steriliseeritud õlleraba aseptiliselt Petri tassidele. Iga seenekultuuri jaoks valmistati ette 4 Petri tassi, lisaks 4 Petri tassi kontrolliks. Aseptilise noa abil lõigati iga ettekasvatuskultuuri tassi pealt mõõtudega 24 x 1 x 1 cm seeneniidisikuga läbi kasvanud söötmetükk ning asetati need aseptiliselt õllerabale (Joonis 5). Külv toimus aseptilistes tingimustes laminaarkapis „Aura Vertical S.D.4 Laminar Flow Cabinet Class 100“. Petri tassid keeratakse ümber spetsiaalse teibiga, et õhk ei sattuks sisse ja proov ei saastuks. Ümberkülvamine viidi läbi steriilses keskkonnas laminaarkapi all. Seened Petri tassidel kasvatati 24°C juures inkubaatoris „BMT Friocell 222“.

Tabel 1. Töös kasutatud seenekultuurid

Eesti keeles	Liik	Puidulagundajad
Austerservik	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Valgemädanikseen
Shiitake	<i>Lentinula edodes</i>	Valgemädanikseen
Lõvilakk	<i>Hericium erinaceus</i>	Valgemädanikseen
Lakkvaabik	<i>Ganoderma lucidum</i>	Valgemädanikseen

MATERJALID JA REAGENDID

Töös kasutati Leffe retsepti järgi valmistatud õlle õlleraba, mille veesisalduse pärast filterpressimist ja autoklaavimist oli 61%.

MEA sööde valmistati kasutades 30 g/l linnaseekstrakti, 3 g/l sojapeptooni, 15 g/l agarit.

Sisestandardina kasutati 1% sipelghapet, mille kontsentratsioon $c = 11,7603 \text{ g/kg}$ määrati tiitrimisel.

Proovide hüdrolüüsiks kasutati 72% H₂SO₄.

MEETODID

SUHKRUTE SISALDUSE MÄÄRAMINE

Suhkrute sisalduse määramiseks kaaluti 10 ml katseklaasi ca 1 g proovi täpsusega 0,0001, lisati ca 6 ml 1% sipelghapet, segati vortexil ja kaaluti. Proovid hoiti kuivatuskapis 50°C juures 60 minutit. Seejärel segu segati veelkord vortexil ning tsentrifugeeriti tsentrifuugil 2000 rpm 10 minutit (Joonis 8). Ülemisest kihist võeti süstla abil 2 ml supernatanti ja filtreeritise läbi filtri kromatograafilistesse viaalidesse.



Joonis 8. Õlleraba ja shiitake proovid peale tsentrifugeerimist jagatud kaheks kihiks

TSELLULOOSI JA HEMITSELLULOOSI SISALDUSE MÄÄRAMINE

HÜDROLÜÜS

Hüdrolüüs teostati Saemani hüdrolüüsi protokollil alusel. Kuivatatud õlleraba või seeneraba Proov (ca 300 mg) viidi eelkaalutud katseklaasi ja kaaluti. Lisati automaatpipeti abil ca 3 g 72% H₂SO₄ ja kaaluti uuesti Proovi segati toatemperatuuril iga 10 minuti järel klaaspulgaga ühe tunni jooksul (Joonis 10). Proov viidi 60 ml destilleeritud veega kvantitatiivselt üle 100 ml eelkaalutud klaaspudelitesse ja hüdrolüüsiti autoklaavis (Systec horizontal bench-top autoclave DX-90) programmiga „11 liquids 121C“ juures 60 minutit (Joonis 11). Proov kaaluti enne ja peale autoklaavi. Kui hüdrolüüsi proovid on jahtunud, valmistatakse neid kromatograafiliseks analüüsiks. Automaatpipeti abil viiakse üle katseklaasi ca 5 ml filtraati, kaalutakse, lisatakse ca 5 ml 1% FA (11.7603 g/kg) ja kaalutakse. Hüdrolüüsitud proovid segati vortexil. Süstla ja filtri abil filtreeriti proovid kromatograafilistesse küvettidesse.

KROMATOGRAAFILINE ANALÜÜS

Kromatograafiline analüüs viidi läbi kasutades Saksamaalt pärit SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH vedelik-kromatograafilist süsteemi, mis sisaldab degasaatorit Degasys Populaire (1), HPLC Pump Sun Flow 100 (2), kolonnisoojendit SunTherm 100 (3), automaatset injektorit Basil Marathon (4), UV-detektorit

Spectraflow 501 (5), RI detektorit Refractroflow (6). 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% H₂SO₄-ga temperatuuril 35°C, kiirusega 0,6 ml/min. UV-detektor seadistati 210 nm peale.

Õlle- ja seeneraba komponentide kontsentratsioonid arvutati järgmiselt:

$$C_i^o = k_{j/i} * C_j * M_j / M_{SMP} * A_i / A_j$$

Kus: $k_{j/i}$ - kalibreerimiskoeffitsient sipelghape suhtes (g/g)

C_j - sipelghape sisestandardi kontsentratsioon (g/kg)

M_j – proovile lisatud sipelghape sisestandardi mass (g)

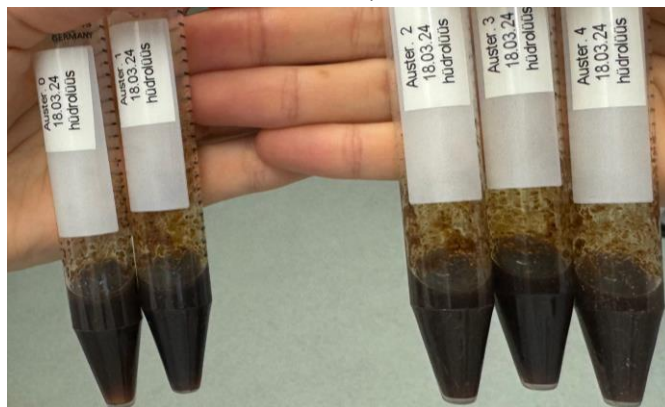
M_{SMP} – analüüsiks võetud proovi mass (g)

A_i – komponendi piigi pindala kromatogrammil

A_j – sipelghape piigi pindala kromatogrammil



Joonis 9. HPLC aparatuur



Joonis 10. Õlleraba ja austerserviku proovide hüdroliis katseklaasides. Õlleraba on vasakul



Joonis 11. Õlleraba, austerserviku ja shiitake proovide hüdrolüüs autoklaavis

LIGNIINI MÄÄRAMINE KAALANALÜÜSIL

Ligniini määramiseks kasutati Klasoni meetodi. Ligniini määramiseks tiigid kuumutati 575°C juures 4 tundi. Seejärel viidi tiigelfiltrid eksikaatorisse kuni konstantse kaalu saavutamiseni, iga 24 tunni järel tiigid kaaluti. Pärast konstantse kaalu saavutamist viidi hüdrolüsaadid kvantitiivselt üle tiigelfiltrile, vaakumfiltreeriti ja pesti deioniseeritud veega. Ligniini määramiseks filtrid kuivatati 105°C juures ja kaaluti.



Joonis 12. Vaakumpumba süsteem

VALGU MÄÄRAMINE CHN ANALÜÜSIL

CHNS analüüs teostati teenustööna TTÜ Energiatehnoloogia instituudi katselaboris Vario MACRO CHNS Cube seadmel.

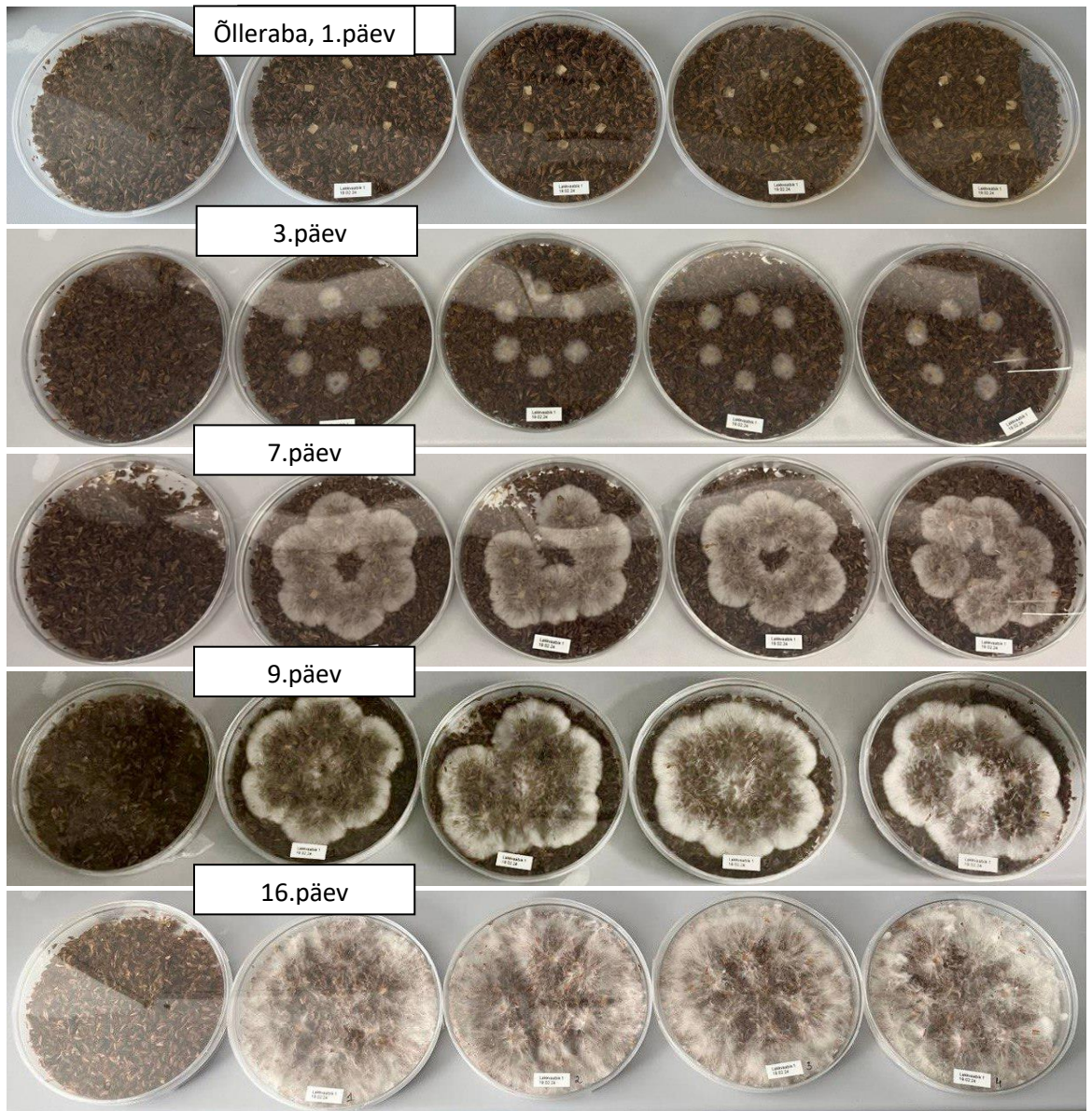
TULEMUSED JA ARUTELU

SEENTE KASV

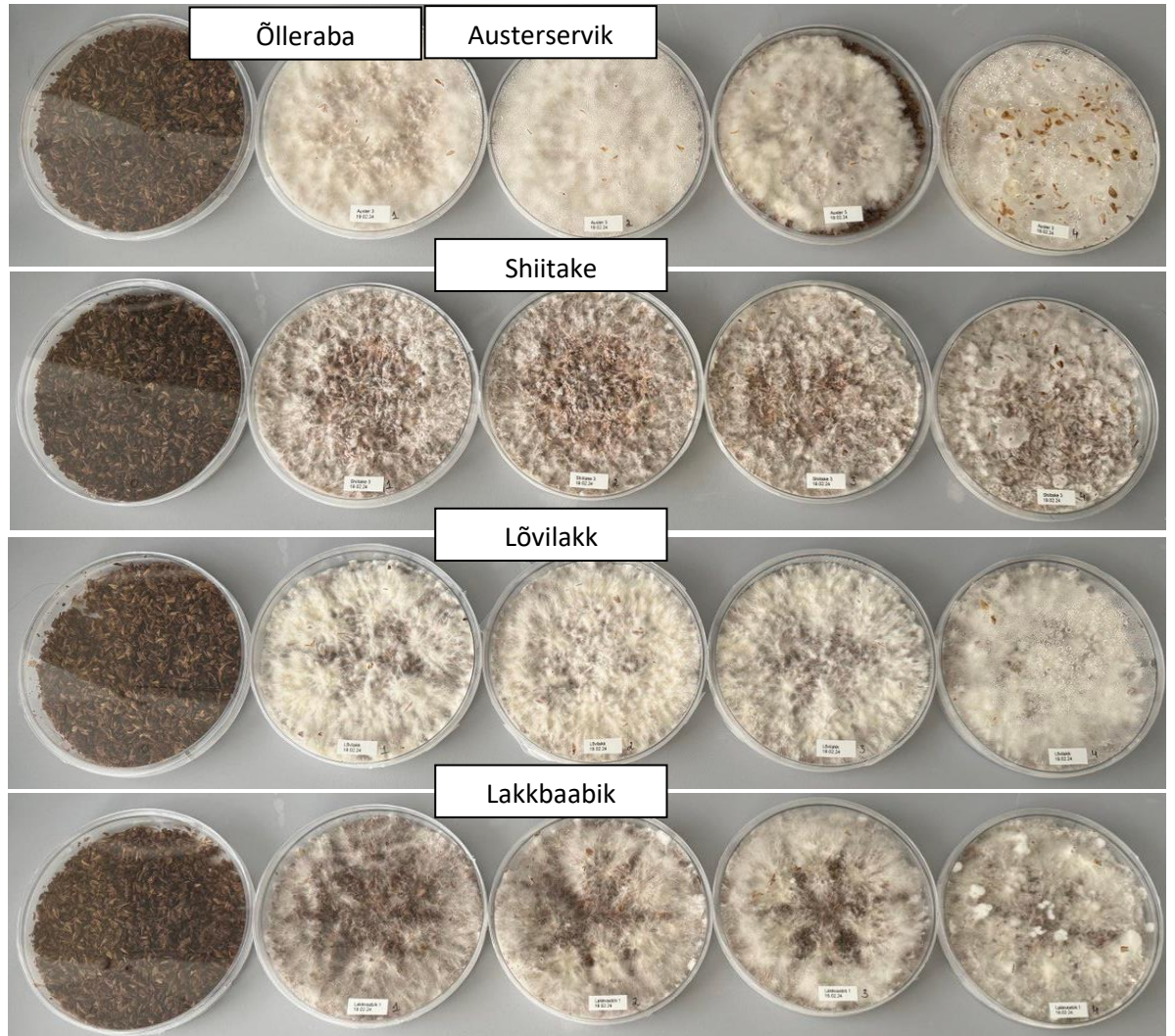
Aseptilise noa abil lõigati iga tassi pealt mõõtudega 1x1 cm seeneniidisikuga läbi kasvanud seenekultuuri ning asetati õllerabale ning inkubeeriti 24°C juures. Joonisel 13 on näidatud lakkvaabiku kasv esimesel, kolmandal, seitsmendal, üheksandal ja kuueteistkümnendal päeval. Joonisel 14 on pildistatud kõik seenekultuurid 21. päeval.

Joonistelt tuleneb, et seenekultuuride paralleelide väljakasv on väga sarnane. Väikeseid visuaalseid erinevusi võis näha paralleelide vahel pärast nende kuivatamist 80°C juures, Austerserviku korral oli 3 tass teistest kolmest oluliselt erinev.

Peale 21 päeva seenekultuuride kasvamist õllerabal kõik proovid pandi kuivatuskappi 80°C juurde. Konstantne kaal saavutati kõigis proovides 96h jooksul. Jägnevalt iga Petri tassi sisu kaaluti ja jahvatati nugaveskis. Jahvatud õlleraba ja seeneraba 20 pulbris määrati kõigis suhkrute, ligniini, valgu, tselluloosi ja hemitselluloosi sisaldus. Viimaste määramiseks kombineeriti rabade ekstrakti ja hüdroolüsaadi andmeid eeldates, et hüdroolüsaadis määratakse kõik suhkrujäägid ja ekstraktis ainult lahustuvate suhkrute jäägid. Tselluloos defineeriti kui seotud glükoosijääkide summa ja hemitselluloos kui arabinoosi ja ksüloosi summa. Suhkrute tarbimine määrati õlleraba ja seeneraba kontsentratsioonide vahest võttes arvesse biomassi kadu kultiveerimisel.



Joonis 13. Lakkvaabiku seenekultuuri kasv, päev 1,3,7,9,16



Joonis 14. Austerserviku, shiitake, lõvilakki ja lakkvaabiku 21 päeva kasvanud seenemütseelid



Joonis 15. Õlleraba ja seenerabad peale kuivatamist

LAHUSTUNUD SUHKRUTE SISALDUS SEENE- JA ÕLLERABAS

Õlleraba ja seeneraba HPLC analüüsi tulemused on toodud Tabelis 2 ja 3, kust on näha, et õlleraba proovid sisaldavad polüsahhariide, maltotriiosi, maltoosi, glükoosi, fruktoosi. Erinevad seeneraba proovid lisaks sisaldavad erineval määral ksüloosi ja erütroosi. Võrreldes õlleraba ja seentega fermenteeritud õlleraba on näha, et kasvul väheneb seentega fermenteeritud õlleraba proovide polüsahhariidide, maltotriiosi ja maltoosi sisaldus kuid fruktoosi ja erütroosi sisaldus mõnel juhul tõuseb. Erütroosi kontsentratsioon kasvab oluliselt Shiitake, Lõvilakal ja Lakkvaabikul ja fruktoosi kontsentratsioon Austerservikul. Samuti võib märgata, et Shiitake ja Lõvilaka seenerabadel tekkis ksüloos. Suhkrute sisaldus langes oluliselt Austerservikul ja Lõvilakal ning vähemal määral Lakkvaabiku korral. Dekstriinide ja maltotriiosi jääksisaldus oli kõikide kulruuride korral pea võrdne, maltoosi sisaldus aga langes Shiitakel võrreldes teiste kultuuridega vähe. Glükoosi sisaldus kasvas oluliselt Shiitakel ja Lakkvaabikul.

Tabel 2. Lahustunud suhkrute sisaldus õllerabas ja erinevate seentega fermenteeritud õllerabas g/kg

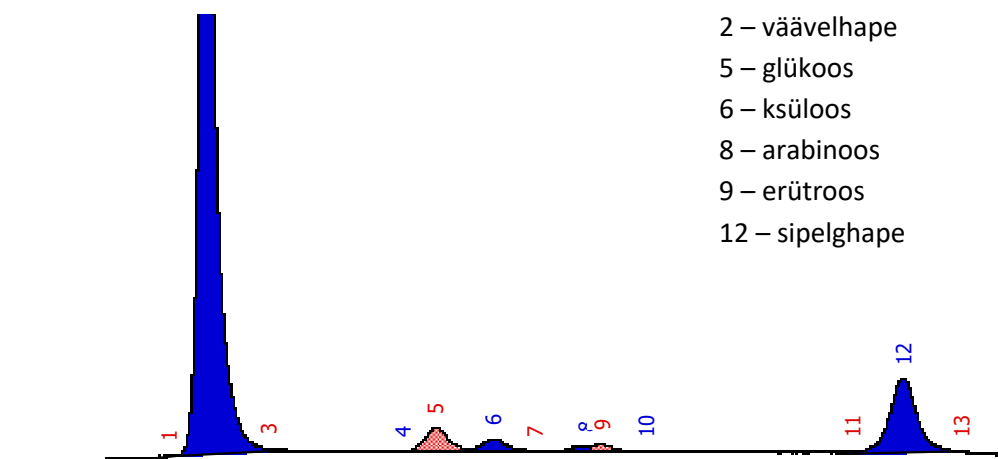
	Õlleraba (g/kg)	Austerservik (g/kg)	Shiitake (g/kg)	Lõvilakk (g/kg)	Lakkvaabik (g/kg)
Dekstriinid	128,18 ± 1,94	32,15 ± 7,87	38,03 ± 2,47	34,84 ± 0	34,84 ± 0
Maltotriios	40,14 ± 0,56	14,18 ± 2,49	18,96 ± 0,83	10,67 ± 2,18	16,59 ± 0,47
Maltoos	84,85 ± 1,96	37,71 ± 5	64,06 ± 2,36	18,55 ± 3,96	36,67 ± 1,33
Glükoos	26,11 ± 0,89	20,38 ± 9,86	133,43 ± 5,89	25,7 ± 7,04	103,41 ± 4,4
Ksüloos	0	0	13,64 ± 1,17	4,39 ± 0,9	0
Fruktoos	10,46 ± 0,2	28,61 ± 7,84	16,31 ± 1,54	10,75 ± 1,32	10,64 ± 1,26
Erütroos	1,64 ± 0,15	0	45,33 ± 2,95	68,7 ± 11,76	54,19 ± 3,11
Glükoosi sisaldavad suhkrud	279,2	104,42	254,48	89,76	191,51
Summa	291,39	133,02	329,97	173,63	256,33

Tabel 3. Lahustunud suhkrute sisaldus õllerabas ja erinevate seentega fermenteeritud õllerabas protsentides kogu suhkrutest

	Õlleraba (%)	Austerservik (%)	Shiitake (%)	Lõvilakk (%)	Lakkvaabik (%)
Dekstriinid	43,99 ± 0,67	11,03 ± 2,7	13,05 ± 0,85	11,96 ± 0	11,96 ± 0
Maltotriios	13,78 ± 0,19	4,87 ± 0,85	6,51 ± 0,29	3,66 ± 0,75	5,69 ± 0,16
Maltoos	29,12 ± 0,67	12,94 ± 1,71	21,98 ± 0,81	6,37 ± 1,36	12,58 ± 0,46
Glükoos	8,96 ± 0,31	6,99 ± 3,38	45,86 ± 2,02	8,82 ± 2,42	35,49 ± 1,51
Ksüloos	0	0	4,68 ± 0,4	1,51 ± 0,31	0
Fruktoos	3,59 ± 0,07	9,82 ± 2,69	5,6 ± 0,53	3,69 ± 0,45	3,65 ± 0,43
Erütroos	0,56 ± 0,05	0	15,56 ± 1,01	23,58 ± 4,04	18,6 ± 1,07
Summa	100	100	100	100	100

SEENE- JA ÖLLERABA HÜDROLÜSAADI HPLC ANALÜÜS

Hüdrolüsaadi suhkrute HPLC analüüsi tulemused on toodud Tabelis 4, kus sisestandardina kasutati sipelghapet ja Tabelis 5, kus sisestandardina kasutati väävelhapet. Tulemuste võrdlus näitab, et tulemused on suhteliselt sarnased, ehk hüdrolüüsi sisestandardina saab kasutada nii sipelghapet ja väävelhapet (Tabel 6).



Joonis 16. Lövilaka hüdrolüsaadi kromatogramm, sisestandardina kasutati väävelhapet ja sipelghapet

Peale hüdrolüüsi fermenteerimata ja seentega fermenteeritud proovides esinevad glükoos, ksüloos ja arabinoos ning Shiitake, Lövilaka ja Lakkvaabikuga fermenteeritud proovides esineb ka erütroos. Glükoosi, ksüloosi ja arabinoosi sisaldus on suurenenud seentega fermenteeritud ölleraba proovides võrreldes fermenteerimata ölleraba proovide sisaldusega. Tulemuste alusel saab öelda, et Austerserviku suhkrute sisaldus võrreldes teiste seenekultuuridega oluliselt madalam.

Tabel 4. Hüdrolüüsil tekkinud suhkrute sisaldus õllerabas ja erinevate seentega fermenteeritud õllerabas, arvutades sipelghape sisestandardi järgi g/kg

	Õlleraba (g/kg)	Austerservik (g/kg)	Shiitake (g/kg)	Lõvilakk (g/kg)	Lakkvaabik (g/kg)
Glükoos	423,65 ± 55,83	200,38 ± 20,58	329,53 ± 5,65	256,18 ± 18,32	253,05 ± 11,59
Ksüloos	137 ± 10,28	149,95 ± 12,54	154,68 ± 3,96	138,48 ± 5,48	134,03 ± 10,31
Arabinoos	42,68 ± 3,82	41,73 ± 3,7	39,48 ± 1,69	35,23 ± 5,26	27,9 ± 2,21
Erütroos	0	0	34,53 ± 0,98	57,15 ± 10,72	46,83 ± 4,6
Summa	603,33	392,06	558,22	487,04	461,81

Tabel 5. Hüdrolüüsil tekkinud suhkrute sisaldus õllerabas ja erinevate seentega fermenteeritud õllerabas, arvutades väävelhape sisestandardi järgi g/kg

	Õlleraba (g/kg)	Austerservik (g/kg)	Shiitake (g/kg)	Lõvilakk (g/kg)	Lakkvaabik (g/kg)
Glükoos	410,18 ± 46,04	210,4 ± 21,71	309,5 ± 5,62	244,68 ± 15,47	241,55 ± 9,17
Ksüloos	133,78 ± 10,28	157,45 ± 13,42	145,25 ± 2,47	132,38 ± 5,47	127,95 ± 9,45
Arabinoos	41,45 ± 3,14	43,78 ± 3,93	37,08 ± 1,65	33,7 ± 5,13	26,68 ± 2,55
Erütroos	0	0	32,45 ± 1,31	54,6 ± 10,31	44,65 ± 3,86
Summa	585,41	411,63	524,28	465,36	440,83

Tabel 6. Hüdrolüüsil tekkinud suhkru sisalduse erinevus protsentides, kasutades sisestandardina sipelghapet ja väävelhapet

	Õlleraba (%)	Austerservik (%)	Shiitake (%)	Lõvilakk (%)	Lakkvaabik (%)
Glükoos	3,28	5	6,47	4,7	4,76
Ksüloos	2,41	5	6,49	4,61	4,75
Arabinoos	2,97	4,91	6,47	4,54	4,57
Erütroos	0	0	6,41	4,67	4,88
Summa	3,06	4,99	6,47	4,66	4,76

SUHKRUTE TARBIMINE FERMENTATSIOONIL

Tabeli 2 ja 3, ning kaalukao põhjal arvutati välja suhkrute tarbimine (Tabel 7). Tulemused näitavad, et dekstriinine ja maltotriooosi tarbimine erinevatel seenekultuuridel oluliselt ei erinenud. Võimalik, et õllerabast tarvitati ära kogu seente poolt assimileeritav dekstriinide ja triooside fraktsioon. Maltoosi tarbimine oli Shiitakel võrreldes teiste seentega üllatavalt madal, võimalik et Shiitakel on maltoosi assimilatsiooniga seotud ensüümid või transpordisüsteem nõrgalt ekspresseeritud. Glükoosi tarbimine on Shiitakel ja Lakkvaabikul negatiivne, mis viitab glükoosi tekkele glükaanide või tselluloosi hüdroolüüsil. Erütroos sünteesitakse Shiitake, Lõvilaka ja Lakkvaabiku kuid mitte Austerserviku kasvu. Viimasel juhul aga täheldati fruktoosi piigi kasvu. Erinevus kogusuhkru tarbimisel oli väike, kõige enam tarbis Shiitake.

Tabel 7. Suhkrute tarbimine (g/kg) ja tselluloosi ja hemitselluloosi solubilisatsioon hüdroolüüsil (g/kg)

	Austerservik	Shiitake	Lõvilakk	Lakkvaabik
Suhkrute tarbimine (g/kg)				
Dekstriinid	101,5 ± 7,5	96,6 ± 2	99,3 ± 0	99,3 ± 0
Maltotriooos	28,4 ± 2,4	24,4 ± 0,7	31,3 ± 1,8	26,4 ± 0,4
Maltoos	53,6 ± 4,8	31,7 ± 2	69,5 ± 3,3	54,4 ± 1,1
Glükoos	9,2 ± 9,5	-84 ± 4,9	4,8 ± 5,8	-59,7 ± 3,7
Fruktoos	-13,28 ± 7,5	-3,1 ± 1,3	1,5 ± 1,1	1,6 ± 1
Erütroos	1,64 ± 0	-27,6 ± 8,7	-50,6 ± 8,1	-40,1 ± 2,4
Summa	194,34	152,7	206,4	181,7
Tselluloosi ja hemitselluloosi solubilisatsioon hüdroolüüsil (g/kg)				
Tselluloos	21,4 ± 12,2	44,8 ± 10,8	-35,6 ± 17,9	56,9 ± 12,5
Hemitselluloos	-18,7 ± 16,4	-17,5 ± 10,4	-9,5 ± 12,8	4,4 ± 10,3

LIGNIINI SISALDUS

Ligniini sisaldus mõõdeti neljas paralleelis. Tabelis x on toodud ligniini sisaldus ja solubilisatsioon õlle- ja seenerabas. Ligniini sisaldus oli Austerservikul sisuliselt võrdne õllerabaga, mis näitab et Austerservik ligniini ei solubiliseerinud.

Tabel 8. Ligniini sisaldus (g/kg) ja ligniini solubilisatsioon (%)

	Õlleraba	Austerservik	Shiitake	Lõvilakk	Lakkvaabik
Ligniini sisaldus (g/kg)					
Paralleel 1	226,78	247,93	138,81	204,12	199,02
Paralleel 2	194,44	241,77	135,68	199,04	182,57
Paralleel 3	180,68	262,75	123,17	194,3	206,32
Paralleel 4	193,35	236,72	142,95	181,84	194,73
Keskmine	198,81 ± 17,03	247,3 ± 9,77	135,5 ± 7,38	194,83 ± 8,26	197,24 ± 8,62
Lahustuv ligniin	198,75	246,5	134,5	204	195,25
Ligniini solubilisatsioon (%)					
Ligniin	24,7 ± 6,4	-3,3 ± 4,7	49,1 ± 2,7	14 ± 1,7	14,2 ± 3,8

VALGU ANALÜÜS

Valgu sisaldus õlle- ja seenerabas leiti CHN analüüsi alusel, kusjuures oletati et valgusisaldus nagu enamuse toiduainete korral võrdub:

Valgusisaldus = 6.2 * N,

Kus N - lämmastiku sisaldus % proovi kohta.

Tabel 9. CNH koostise analüüs õllerabas ja seenerabas ning valgu sisaldus g/kg

	C (%)	H (%)	N (%)	Valk (g/kg)
Õlleraba 1	52.75	6.41	2.10	13.02
Õlleraba 2	54.40	6.54	2.94	18.23
Õlleraba 3	54.88	6.57	3.20	19.84
Keskmine	54.01	6.51	2.75	17.03
STDEV	0.91	0.07	0.47	2.91
Austerservik 1	45.15	5.09	2.13	13.21
Austerservik 2	46.99	5.66	2.19	13.58
Austerservik 4	45.90	5.52	2.27	14.07
Keskmine	46.01	5.42	2.20	13.62
SDTEV	0.76	0.24	0.06	0.36
Shiitake 2	49.41	5.75	3.22	19.96
Shiitake 3	41.42	5.21	2.71	16.80
Shiitake 4	38.13	5.22	2.51	15.56
Keskmine	42.99	5.39	2.81	17.44
STDEV	4.74	0.25	0.30	1.85
Lõvilakk 1	45.95	5.72	2.84	17.61
Lõvilakk 2	46.50	5.73	2.92	18.10
Lõvilakk 3	48.12	6.09	3.02	18.72
Keskmine	46.86	5.85	2.93	18.15
STDEV	0.92	0.17	0.07	0.46
Lakkvaabik 1	45.65	5.71	2.92	18.10
Lakkvaabik 2	47.14	5.64	3.19	19.78
Lakkvaabik 3	43.21	5.53	2.90	17.98
Keskmine	45.33	5.63	3.00	18.62
STDEV	1.62	0.07	0.13	0.82

KOONDTULEMUSED

Ülaltoodud tabelite andmete alusel koostati koondtabel õlleraba ja seenerabade koostise kohta. Kõige väiksem oli jääsuhkrute sisaldus Lõvilakal 32% õllerabast. Shiitakel oli suhkrute kontsentratsioon isegi kõrgem kui õllerabal. See võis olla tingitud glükoosi moodustuse tõttu kasvul. Shiitake, Lõvilaka ja Lakkvaabiku kasvul toimus erütroosi süntees.

Tselluloosi kontsentratsioon oli kõige madalam Lakkvaabiku seenerabal, moodustades vaid 1/3 õlleraba tselluloosi sisaldusest. Hemitselluloosi korral olid proovide vahelised erinevused väiksed, ilmselt selle olulist hemitselluloosi lagunemist antud kasvutingimuste korral ei esinenud. Märkimisväärset ligniini tarbimist täheldati vaid Shiitakel, mis on ka kirjandusest teada. Lõvilakal ja Lakkvaabikul oli see oluliselt madalam kui Shiitakel, Austerservikul aga ligniini lagundamist ei täheldatud. N sisalduse korral täheldati kõikidel juhtudel võrreldes õllerabaga langust, mis iseenesest on üllatav – võimalik, et tekkisid lenduvad lämmastiku ühendid või ühendid mida ei õnnestunud määrata kromatograafilisel analüüsil.

Analüütilised kaod moodustasid seenerabadel alla 20%, mis on seotud sellega et mineraalhappeid, rasvu ja kindlasti ka mõningiaid muid keemilisi ühendeid ei analüüsitud.

Tabel 10. Õlle- ja seenerabade koostis g/kg

	Õlleraba (g/kg)	Austerservik (g/kg)	Shiitake (g/kg)	Lõvilakk (g/kg)	Lakkvaabik (g/kg)
Suhkrud kokku	291,39	133,02	329,97	173,62	256,33
Dekstriinid	128,18	32,15	38,03	34,84	34,84
Maltotriios	40,14	14,18	18,96	10,67	16,59
Maltoos	84,85	37,71	64,06	18,55	36,67
Glükoos	26,11	20,38	133,63	25,7	103,41
Ksüloos	0	0	13,64	4,39	0
Fruktoos	10,46	28,61	16,31	10,75	10,64
Erütroos	0	0	45,33	68,7	54,19
Tselluloos	156,39	100,98	64,82	160,66	55,8
Hemitselluloos	177,19	196,45	172,68	146,31	139,68
Ligniin	198,81	247,3	135,15	194,83	195,66
Valk	170,3	136,2	174,4	181,5	186,2
Summa	981,52	799,78	851,72	829,73	827,03
Analüütilised kaod	18,48	200,22	148,28	170,27	172,97

JÄRELDUSED

- 1) Väljatöötatud metoodika võimaldab määrata komplekselt õlle- ja seeneraba keemilist koostist
- 2) Sisestandardina, ja ühtlasi ka ainukese analüütilise standardina saab kasutada hüdrolüüsiks lisatud väävelhapet ja sipelghapet
- 3) Kasvul õllerabal on peamiseks süsiniku allikaks õllerabas leiduva vees lahustunud ühendid: dekstriinid, maltotriios, maltoos
- 4) Mõningatel juhtudel toimub kasvu kaigus glükoosi ja erütroosi kontsentratsiooni suurenemine.

KOKKUVÕTE

Antud bakalaauruse töö eesmärk oli töötada välja happelisel hüdrolüüsil, HPLC-I , CHN ja mahtanalüüsil põhinev protokoll õlle- ja seeneraba keemilise koostise kvantitatiivseks analüüsiks. Määrati valgu, ligniini, suhkrute, tsellulosi, hemitselluloosi kontsentratsiooni õllerabas ja seenerabas kasutades erinevaid meetodeid. Töö eesmärk sai täidetud, väljatöötatud metoodika võimaldab määrata komplekselt õlle- ja seeneraba keemilist koostist.

Tuginedes töö tulemustele, saab öelda, et kõige väiksem oli jääsuhkrute sisaldus Lõvilakal. Õlleraba proovid sisaldavad polüsahhariide, maltotrioose, maltoosi, glükoosi, fruktoosi. Erinevad seeneraba proovid lisaks sisaldavad erineval määral ksüloosi ja erütroosi. Võrreldes õlleraba ja seentega fermenteeritud õlleraba on näha, et kasvul väheneb seentega fermenteeritud õlleraba proovide polüsahhariidide, maltotrioose ja maltoosi sisaldus kuid fruktoosi ja erütroosi sisaldus mõnel juhul tõuseb. Suhkrute sisaldus langes oluliselt Austerservikul ja Lõvilakal ning vähemal määral Lakkvaabiku korral.

Erinevus kogusuhkru tarbimisel oli väike, kõige enam tarbis Shiitake. Maltoosi tarbimine oli Shiitakel võrreldes teiste seentega üllatavalt madal, võimalik et Shiitakel on maltoosi assimilatsiooniga seotud ensüümid või transpordisüsteem nõrgalt ekspresseeritud. Glükoosi tarbimine on Shiitakel ja Lakkvaabikul negatiivne, mis viitab glükoosi tekkele glükaanide või tselluloosi hüdrolüüsil.

Ligniini sisalduse korral oli märgatud, et Austerservikul on sisuliselt võrdne õllerabaga, mis näitab et Austerservik ligniini ei solubiliseerinud. Tulemuste põhjal Lõvilakk ja Lakkvaabik on kõige valgurikkad seemed.

Analüütilised kaod moodustasid seenerabadel alla 20%.

SUMMARY

The aim of this bachelors work was to develop a protocol based on acid hydrolysis, HPLC, CHN and volumetric analysis for the quantitative analysis of the chemical composition of spent grain and fermented spent grain. The concentration of protein, lignin, sugars, cellulose, hemicellulose in the spent grain and fermented spent grain was determined using different methods. The purpose of the work was fulfilled, the developed methodology makes it possible to determine the chemical composition of spent grain and fermented spent grain in a complex manner.

Based on the results of the work, it can be said that the content of residual sugars was the lowest in *Hericium erinaceus*. Spent grain samples contain polysaccharides, maltotriose, maltose, glucose, fructose. Different fermented spent grain samples additionally contain varying degrees of xylose and erythrosis. Compared to spent grain and spent grain fermented with mushrooms, it can be seen that the content of polysaccharides, maltotriose and maltose in samples of fermented spent grain decreases during growth, but the content of fructose and erythrosis increases in some cases. The content of sugars decreased significantly in *Pleurotus ostreatus* and *Hericium erinaceus*, and to a lesser extent in the case of *Ganoderma lucidum*.

The difference in total sugar consumption was small, with *Lentinula edodes* consuming the most. Maltose consumption was surprisingly low in *Lentinula edodes* compared to other fungi, possibly *Lentinula edodes* has weakly expressed enzymes involved in maltose assimilation or a transport system. Glucose intake is negative for *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum*, which indicates the formation of glucose during the hydrolysis of glycans or cellulose.

At the lignin content, it had been noticed that *Pleurotus ostreatus* essentially equals beer bog, indicating that *Pleurotus ostreatus* did not solubilize lignin. Based on the results, *Hericium erinaceus* and *Ganoderma lucidum* are the most protein-rich mushrooms. Analytical losses were less than 20% in fermented spent grain.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma igalt poolt toetavat juhendajat Toomas Paalmet. Ta oli alati hea meelega andnud tagasisidet ja soovitusi, mis olid suureks abiks nii töö teoreetiliste kui praktiliste osade juures.

Samuti tänaksin kaasjuhendajat Allan Oltspert, kelle juhendamisel õppisin fermenteerima ning ta oli alati abiks küsimuste lahendamisel.

Tänaksin ka oma perekonda ja sõpru kes olid alati toetavad minu bakarauruse teekonnal.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*. 2006;43(1):1-14. doi:10.1016/j.jcs.2005.06.001
2. Stojceska V. Dietary Fiber from Brewer's Spent Grain as a Functional Ingredient in Bread Making Technology. In: Elsevier eBooks. ; 2011:171-181. doi:10.1016/b978-0-12-380886-8.10016-9
3. Sayre-Chavez B, Bettenhausen H, Windes S, et al. Genetic basis of barley contributions to beer flavor. *Journal of Cereal Science*. 2022;104:103430. doi:10.1016/j.jcs.2022.103430
4. Singh K, Gupta JK, Kumar S, et al. Pharmacological and therapeutic potential of *Hordeum vulgare*. *Pharmacological Research Modern Chinese Medicine*. 2023;8:100300. doi:10.1016/j.prmcm.2023.100300
5. Prado R, Gastl M, Becker T. Formation response of kilned specialty malt odorant markers to controlled malting process parameters. *Food Chemistry*. 2023;424:136298. doi:10.1016/j.foodchem.2023.136298
6. Kong Z, Quan R, Fan B, et al. Stereoselective behaviors of the fungicide triadimefon and its metabolite triadimenol during malt storage and beer brewing. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;400:123238. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123238
7. Buchmaier J, Krampfl S, Eibinger M, Kaira GS, Nidetzky B, -Slawitsch BM. Continuous oscillatory flow as process intensification strategy in protein extraction from brewer's spent grain. *Chemical Engineering and Processing*. 2024;200:109772. doi:10.1016/j.cep.2024.109772
8. Hejna A, Barczewski M, Kosmela P, et al. More than just a beer – Brewers' spent grain, spent hops, and spent yeast as potential functional fillers for polymer composites. *Waste Management*. 2024;180:23-35. doi:10.1016/j.wasman.2024.03.023
9. Droce A, Sørensen JL, Giese H, Sondergaard TE. Glass bead cultivation of fungi: Combining the best of liquid and agar media. *Journal of Microbiological Methods*. 2013;94(3):343-346. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.005
10. Cebrián M, Ibarruri J. Filamentous fungi processing by solid-state fermentation. In: Elsevier eBooks. ; 2023:251-292. doi:10.1016/b978-0-323-91872-5.00003-
11. Zhao Q, Liu X, Cui L, Ma C. Extraction and bioactivities of the chemical composition from *Pleurotus ostreatus*: a review. *Journal of Future Foods*. 2024;4(2):111-118. doi:10.1016/j.jfutfo.2023.06.001

12. Desisa B, Muleta D, Jida M, et al. Improvement of nutritional composition of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using formulated substrates of plant and animal origins. *Future Foods*. 2024;9:100302. doi:10.1016/j.fufo.2024.100302
13. Hřebečková T, Wiesnerová L, Hanč A, Koudela M. Effect of substrate moisture content during cultivation of *Herichium erinaceus* and subsequent vermicomposting of spent mushroom substrate in a continuous feeding system. *Scientia Horticulturae*. 2024;334:113310. doi:10.1016/j.scienta.2024.113310
14. Wu S, Zhang S, Peng B, et al. *Ganoderma lucidum*: a comprehensive review of phytochemistry, efficacy, safety and clinical study. *Deleted Journal*. 2024;13(2):568-596. doi:10.26599/fshw.2022.9250051
15. Jin Z, Lan Y, Ohm JB, Gillespie J, Schwarz P, Chen B. Physicochemical composition, fermentable sugars, free amino acids, phenolics, and minerals in brewers' spent grains obtained from craft brewing operations. *Journal of Cereal Science*. 2022;104:103413. doi:10.1016/j.jcs.2022.103413
16. De Almeida FS, De Andrade Silva CA, Lima SM, Suarez YR, Da Cunha Andrade LH. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. *Food Chemistry*. 2018;263:112-118. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.109
17. Nigam PSN, Pandey A. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues utilisation.*; 2009. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7
18. Ibáñez AB, Bauer S. Downscaled method using glass microfiber filters for the determination of Klason lignin and structural carbohydrates. *Biomass & Bioenergy*. 2014;68:75-81. doi:10.1016/j.biombioe.2014.06.013
19. Õlle tarbimismahtu andmed. Loetud aadressil <https://www.fao.org/common-pages/search/en/?q=beer+consumption>
20. Austerserviku joonis. Võetud aadressil <https://www.hansaplant.ee/austerserviku-mutseel-1-kg-93432>
21. Shiitake joonis. Võetud aadressil <https://lamycosphere.com/en/products/mycelium-de-shiitakes>
22. Lõvilaka joonis. Võetud aadressil <https://mindfoodbaltic.ee/toode/lions-mane-eesti/>
23. Lakkvaabiku joonis. Võetud aadressil <https://www.looduskalender.ee/n/node/8022>
24. Tahkefaasiline fermentatsioon. Võetud RESTA13 materjalidest.

LISA

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Anastasia Karpenko

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose
Suhkru ja ligniini määramine õlle- ja seenerabas,

mille juhendaja on Toomas Paalme

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

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

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

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

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

_____ (kuupäev)