



# KOKONAISFOLAATTIPITOISUUDEN MÄÄRITYS HÄRKÄPAVUISTA, LINSSEISTÄ JA LUPIINEISTA SEKÄ SELVITYS NIIDEN VITAMEERIJAKAUMISTA

Kristiina Rekola

Opinnäytetyö  
Kesäkuu 2011  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Tampereen ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma

REKOLA, KRISTIINA: Kokonaisfolaatipitoisuuden määrittäminen härkäpavuista, linseistä ja lupiineista sekä selvitys niiden vitameerijakaumista

Opinnäytetyö 55 s, liitteet 4 s  
Kesäkuu 2011

---

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli saada lisää tietoa folaatien esiintymisestä palkokasveissa. Tutkimus oli osa Helsingin yliopiston elintarvikekemian osastolla toteutettavaa laajempaa folaatitutkimusta ja tuotti taustatietoa jatkotutkimuksille. Tarkoituksena oli analysoida kvantitatiivisella mikrobiologisella menetelmällä härkäpapu-, linssi- ja lupiinilajikkeiden kokonaisfolaatipitoisuuksia ja lisäksi selvittää valittujen näytteiden vitameerijakauma nestekromatografisesti UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) -menetelmällä. Kaikille näytteille tehtiin myös kosteus- ja kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen gravimetrisellä menetelmällä.

Folaatit kuuluvat vesiliukoisiin B-ryhmän vitamiineihin ja ovat ihmisen elimistölle välttämättömiä. Folaatit toimivat koentsyymeinä aminohappojen ja nukleotidien aineenvaihdunnassa sekä osallistuvat solujakautumiseen. Folaattien puute aiheuttaa megaloblastista anemiaa, hermostoputken sulkeutumishäiriötä sekä veren homokysteiniipitoisuuden kohoamista.

Mikrobiologinen menetelmä perustui testiorganismina käytetyn *Lactobacillus rhamnosus* -bakteerin (ATCC 7469) folaatille antamaan kasvuvasteeseen, jota verrattiin standardina käytettyyn 5-formyyli-tetrahydrofolaattiin (5 CHO-H<sub>4</sub>) vasteeseen. UPLC-määrittämisessä vitameeripitoisuus kuvattiin kromatogrammin piikin pinta-alan funktiona. Tulosten perusteella selvitettiin kuinka paljon härkäpavut, linssit ja lupiinit sisältävät folaatia, millaista vaihtelua eri lajikkeiden välillä esiintyi ja oliko kasvupaikalla vaikutusta folaatipitoisuuteen. Palkokasvien vitameerijakaumia analysoidaan tutkittiin niiden poikkeavuuksia toisiinsa sekä yhteyttä lajikkeen kokonaisfolaatipitoisuuteen.

Lupiinin folaatipitoisuus oli tutkituista lajeista suurin (3200-4100 ng/g). Lupiinilajikkeella ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa folaatipitoisuuteen, mutta kasvupaikan suhteen ero oli tilastollisesti merkitsevä. Härkäpavuilla pitoisuudet vaihtelivat välillä 1500-3000 ng/g ja tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan sekä kasvupaikan että -lajikkeen suhteen. Linssien folaatitaso oli tutkituista lajeista alhaisin (700-1700 ng/g) ja lajikkeiden väliset erot olivat tilastollisesti merkitsevät. Folaattipitoisuuksien vaihtelu lajikkeiden välillä oli erittäin suurta ja myös vitameerien suhteellisissa osuuksissa oli huomattavia eroja. Lupiinin vitameerijakauma oli poikkeuksellinen muihin lajeihin nähden. Tutkimus osoitti palkokasvien olevan erinomainen folaatien lähde.

---

Avainsanat: folaatit, mikrobiologinen menetelmä, härkäpapu, linssi, lupiini

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Sciences

REKOLA, KRISTIINA: Determination of total folate content in faba beans, lentils and lupins and a study on the distribution of folate vitamers

Bachelor's thesis 55 pp, attachment 4 pp  
June 2011

---

The aim of this thesis was to obtain more information about the presence of folate in pulses. The study was part of the folate research in the Food chemistry department of the University of Helsinki and it produced background information for further studies. The purpose of this study was to examine the total folate content of faba beans, lentils and lupins by quantitative microbiological method and to study the distribution of folate vitamers by UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) -method. Moisture and dry weight determination was also made to all samples by gravimetric method.

Folates are water soluble B group vitamins and essential to the human organism. Folates work as a coenzyme in amino acid and nucleotide metabolism and are involved in cell division. Folate deficiency causes megaloblastic anaemia, neural tube defects at the fetal stage and high serum homocysteine levels.

*Lactobacillus rhamnosus* -bacteria (ATCC 7469) was used as the growth indicator organism and 5-formyltetrahydrofolate (5-CHO-H<sub>4</sub>) as the standard in the microbiological method. In UPLC assay, chromatogram peak areas were plotted against the concentrations. Based on the results, folate contents of faba beans, lentils and lupins as well as variation between cultivars and growing sites were evaluated. In addition, the distribution of folate vitamers of the selected cultivars was determined and it was studied if there were differences between species or cultivars.

The folate content in lupins was the highest (3200-4100 ng/g). According to statistical analysis of blue lupins, there were no significant differences between cultivars in folate content, but there were significant differences between sites. Folate contents in faba beans were within 1500-3000 ng/g and there were significant differences between cultivars and site. The folate level of lentils was the lowest (700-1700 ng/g) and there were significant differences between cultivars. There was very high folate level variation between cultivars and the relative amount of folate vitamers also varied. Especially the distribution of folate vitamers in lupin was unusual compared to other species. According to the research, the pulses proved to be an excellent folate source.

---

Key words: Folates, microbiological method, faba bean, lentil, lupin

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	6
2 FOLAATTIEN OMINAISUUDET .....	7
2.1 Mitä folaatit ovat? .....	7
2.2 Kemiallinen rakenne ja stabiilisuus .....	8
2.3 Folaatin metabolia ja tehtävät elimistössä.....	9
2.4 Folaatit ja terveys .....	10
2.5 Folaatin keskimääräinen tarve sekä toksisuuden raja .....	12
3 PALKOKASVIT.....	15
3.1 Palkokasvien asema ravitsemuksessa ja ravinnontuotannossa .....	15
3.2 Härkäpavut .....	16
3.3 Linssit.....	17
3.4 Lupiinit.....	18
4 FOLAATTIANALYTIikka .....	20
4.1 Folaattianalytiikan haasteet .....	20
4.2 Mikrobiologinen menetelmä .....	21
4.3 Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografinen (UPLC) menetelmä.....	22
5 TYÖN SUORITUS .....	24
5.1 Käytetyt menetelmät ja laadunvarmistus .....	24
5.2 Näytteet .....	26
5.3 Reagenssien valmistus .....	26
5.3.1 HK:n (hog kidney conjugase) valmistus.....	26
5.3.2 Muut entsyymit .....	27
5.3.3 Kasvuvastebakteerin ( <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469) esikasvatus ja kryopreservointi .....	28
5.4 Näytteiden punnitus ja uutto .....	28
5.5 Trientsyymikäsittely.....	29
5.6 Näytteiden ja standardin laimentaminen.....	29

5.7 Kasvatusalustan valmistus .....	29
5.8 Levytys, inkubointi ja mittaus.....	30
5.9 Kosteus - kuivapainomääritys .....	31
5.10 Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografinen (UPLC) määrittely.....	31
5.10.1 Näytteiden uutto, trientsyymikäsittely ja puhdistus.....	31
5.10.2 UPLC-määrittely .....	32
5.10.3 Folaattivitameerien kvantitointi .....	32
5.11 Tilastollinen analysointi .....	33
6 TULOKSET .....	34
6.1 Härkäpapujen folaattipitoisuudet .....	34
6.2 Linssien folaattipitoisuudet .....	36
6.3 Lupiinien folaattipitoisuudet .....	37
6.4 Vitameerijakaumat .....	38
6.4.1 Härkäpapujen vitameerijakauma .....	39
6.4.2 Linssien vitameerijakauma .....	40
6.4.4 Lupiinien vitameerijakauma .....	41
7 POHDINTA .....	43
LÄHTEET .....	48
LIITTEET	

## 1 JOHDANTO

Folaatit ovat vesiliukoisia B-ryhmän vitamiineja ja toimivat ihmisen elimistössä koentsyymeinä aminohappojen aineenvaihdunnassa sekä nukleotidien synteesissä. Vitamiinin puutteesta aiheutuvia sairauksia ovat muun muassa anemia ja hermostoputken sulkeutumishäiriö. Tärkeimpiä folaatin lähteitä päivittäisessä ravinnossa ovat kokojyvävilja ja tuoreet kasvikset. Monista elintarvikkeista niiden tarkkaa folaattipitoisuutta ei kuitenkaan vielä tunneta. Esimerkiksi palkokasvit on jo kauan tunnettu suuresta proteiinipitoisuudestaan, mutta tuloksia niiden sisältämistä vitamiineista on julkaistu toistaiseksi vähän.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli saada lisää tietoa palkokasvien kokonaisfolaattipitoisuuksista käyttäen kvantitatiivista mikrobiologista menetelmää (Kariluoto ym 2004). Tutkimuskohteena käytettiin kesällä 2010 kasvatettuja härkäpapu-, linssi- ja lupiinilajikkeita. Työssä haluttiin selvittää, millaista folaattipitoisuuden vaihtelua eri palkokasvilajien ja -lajikkeiden välillä esiintyy ja onko kasvupaikalla merkitystä kasvin folaattipitoisuuteen. Tulosten välistä tilastollista merkitsevyyttä tutkittiin yksisuuntaisten varianssianalyysien avulla, ja tuloksista määritettiin jatkuville muuttujille ominaisia tunnuslukuja (keskiarvo, keskihajonta, keskivirhe). Lisäksi valituista näytteistä analysoitiin folaattivitameerien suhteelliset osuudet nestekromatografisesti. Tulosten perusteella tutkittiin, poikkeavatko palkokasvilajien vitameerijakaumat toisistaan, onko niillä yhteyttä lajin kokonaisfolaattipitoisuuteen ja esiintyykö joku folaattivitameeri muita kemiallisia rakenteita yleisemmin tutkitussa lajissa.

Tämä opinnäytetyö tehtiin syksyllä 2010 Helsingin yliopistossa elintarvikekemian osastolla. Projekti toimi osana osaston muuta folaattitutkimusta ja tuotti taustatietoa jatkotutkimuksille. Työn ohjaajana toimi yliopistonlehtori Susanna Kariluoto ja lisäksi asiantuntija-apua antoivat professori Vieno Piironen sekä tutkimusteknikko Minnamari Edelman.

## 2 FOLAATTIEN OMINAISUUDET

### 2.1 Mitä folaatit ovat?

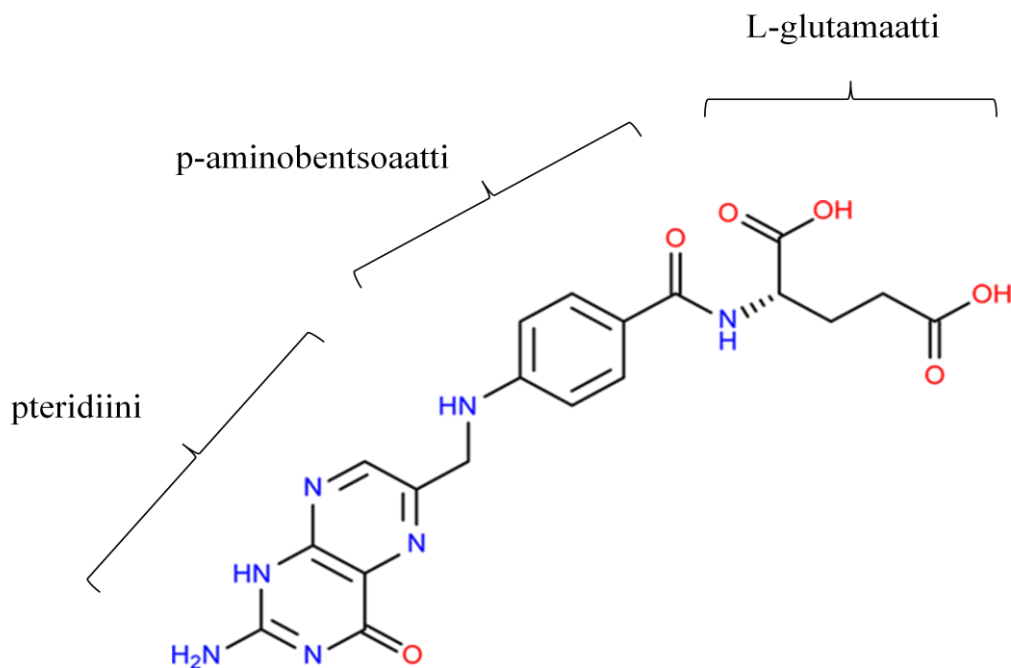
Folaatti on geneerinen nimi kaikille sellaisille yhdisteille, joiden kemiallinen rakenne ja ravitsemuksellinen vaikutus ovat samankaltaiset kuin vesiliukoisiin B-ryhmän vitamiineihin kuuluvalla foolihapolla. Ihmisen elimistö ei pysty itse tuottamaan tätä elintoinnille välttämätöntä vitamiinia, joten se on saatava ravinnosta. Luonnosta on eristetty noin sata molekyyli-rakenteeltaan erilaista folaattia, joita kutsutaan toistensa vitameereiksi. Foolihappo on synteettinen vitamiini, jota ei juuri esiinny vapaana luonnossa. Foolihappoa käytetään vitamiinivalmisteissa ja elintarvikkeiden vitaminoinnissa. Ihmisen elimistö pystyy muuntamaan foolihapon ja kaikki sen johdannaiset tarvitsemaansa muotoon. (Henry & Chapman 2002; Lin ym 2008.)

Folaattien tärkeys havaittiin ensimmäisen kerran 1930-luvulla, kun etsittiin syytä intialaisten naisten laajalle levinneeseen anemiaan. Havaittiin, että hiivauutteen antaminen naisille ehkäisee ja parantaa anemiaa. Uutta ravintotekijää alettiin kutsua M-vitamiiniksi, koska sen anemiaa ehkäisevää vaikutusta tutkittiin apinoilla (lyhenne tulee sanasta monkey, apina). 1940-luvulla yhdisteen tutkimista jatkettiin ja folaatteja löydettiin *Lactobacillus casei* ja *Streptococcus lactis* -bakteerien kasvutekijöistä. Pinaatti sisältää runsaasti folaattia ja siksi vitamiinia alettiin eristää tietoisesti kyseisestä kasvista. Pinaattiin liittyen folaatti on saanut nykyisen nimensä latinankielisestä sanasta *folium*, joka tarkoittaa lehteä. (Lin ym 2008.)

Vuonna 1945 folaattien puute yhdistettiin megaloblastisen anemian syntyyn ja siitä lähtien tietoisuus sen merkityksestä levisi kaikkialle maailmaan (Schweigert ym 2007). Vitamiinin vaikutukset elimistössä ovat kiinnostaneet myöhemmin vielä monia muita tutkijoita ja selvitystyötä sen ominaisuuksista jatketaan edelleen. Nykyisin esimerkiksi leipiä ja muita viljatuotteita täydennetään foolihapolla vitamiinin riittävän saannin takaamiseksi ja joissakin maissa foolihappolisän käyttö on jopa lakisäätteistä. Maailman väestöstä moni kärsii kuitenkin folaatin puutteesta ja se on syynä moniin vakaviin sairauksiin. (Henry & Chapman 2002.)

## 2.2 Kemiallinen rakenne ja stabiilisuus

Foolihappo eli pteroyyli-L-glutamiinihappo ( $C_{19}H_{19}N_7O_6$ ) koostuu kolmesta toisiinsa liittyneestä osasta. Kaksirenkaisessa aromaattisessa pteridiinissä on sitoutuneena *p*-aminobentsoaatti ja L-glutamaatti (kuvio 1). Tästä rakenteesta on teoriassa mahdollista muodostaa jopa 170 erilaista yhdistettä, joilla kaikilla on samankaltainen vitamiiniaktiivisuus. Foolihappoa ei löydy luonnosta muuten kuin hajoamistuotteena, mutta sen johdannaisia esiintyy monissa kasvi- ja eläinsoluissa. Folaattien yksilöllinen nimeäminen perustuu glutamaattiketjun pituuteen, pteridiinirenkään hapettumisasteeseen ja substituentteihin. Käytännössä yhdistejoukkoa kutsutaan aina geneerisellä nimellä folaatti tai folaatit. (deMan 1999; Kisliuk 2001.)



KUVIO 1. Foolihapon rakenne (Todd Helmenstine, muokattu)

Foolihappo on oranssinkeltainen, kiteinen ja veteen liukeneva aine. Se on kemiallisesti stabiili yhdiste, mutta ei omaa biologista aktiivisuutta. Pteridiinirengas on luonnossa lähes aina pelkistyneenä eli foolihapon vitameerinä, jolloin siitä tulee biologisesti aktiivinen ja se voi osallistua elimistön biokemiallisiin reaktioihin. Pelkistyessään vitamiini menettää kuitenkin kemiallisen stabiilisuutensa. Yhdisteen hajoaminen tapahtuu yleisimmin pteridiinin ja *p*-aminobentsoaatin välissä olevan metyleenisillan kohdalta. Foolihapon vitameerit ovat herkkiä happamille, emäksisille ja pelkistäville aineille sekä



valon fotokemiallisten reaktioiden vaikutukselle. Erityisesti ultraviolettisäteily on niille haitallista. (FAO/WHO 2002.)

Elintarvikkeissa esiintyvät luontaiset vitameerit ovat biologisesti aktiivisia, mutta kemiallisesti epästabiileja. Ruuan sadonkorjuu, säilytys, kuumentaminen ja muut kemialliset vaikutukset hajottavat folaatteja. Tuhoutuessaan vitamiini menettää biologisen aktiivisuutensa, eikä elimistö pysty hyödyntämään sitä. Toisaalta myöskään kemiallisesti stabiililla foolihapolla ei ole kykyä osallistua biokemiallisiin reaktioihin, vaikka säilyisikin hyvin ruuan prosessoinnin aikana. (Ball ym 2006; Lin ym 2008; Combs 1998, 68.)

### 2.3 Folaatin metabolia ja tehtävät elimistössä

Folaattien imeytyminen tapahtuu lähes aina ohutsuolessa. Absorboituakseen folaatin pitkät polyglutamaattiketjut on pilkottava ruuansulatuskanavassa pienemmiksi yksiköiksi haimanesteen ja suoliston seinämissä olevien gamma-glutamyylihydrolaasien toimesta. Monoglutamaatit pääsevät solukalvon läpi ohutsuolen loppuosassa sijaitsevassa tyhjäsuolella kantaja-avusteisen kuljetuksen avulla. Suurien konsentraatioerojen ollessa kyseessä kulkeutuminen tapahtuu diffuusion avulla. (Gregory 2001, Kariluoto 2008, 15 mukaan.) Päästyään solun sisälle folaatit pelkistyvät tetrahydrofolaatin johdannaisiksi ja metyloituvat aktiiviseen muotoon joko 5-metyyli- $H_4$ :ksi tai 10-formyyli- $H_4$ :ksi (Gregory 2001, Kinni 2010, 11 mukaan).

Combsin (1998) mukaan ravinnosta saatu folaatti kulkeutuu ensimmäisenä maksaan, jossa se metyloituu aktiiviseen muotoon ja jatkaa siitä matkaansa perifeerisen verenkierron kautta kudoksiin. Institute of Food Research (IFR) Iso-Britanniasta julkaisi vuonna 2007 tutkimuksen, jossa todettiin foolihapon metaboloituvan eri tavalla kuin luontaiset vitameerit. Tutkimusryhmän mukaan suurina annoksina saatu synteettinen foolihappo voi jäädä metaboloitumatta, jolloin se kiertää sellaisenaan elimistössä plasman mukana. (Wright ym 2007.)

Prokaryoottisissa (esitumallisissa) ja eukaryoottisissa (aitotumallisissa) soluissa folaatit toimivat koentsyyminä erilaisissa biokemiallisissa reaktioissa. Folaatit osallistuvat mm. aminohappojen aineenvaihduntaan, nukleotidien (DNA:n ja RNA:n) synteisiin, soluja-

kautumisiin sekä elimistölle vaarallisen formaatin myrkyttömäksi tekemiseen. Folaattien keskeisin tehtävä näissä kaikissa reaktioissa on toimia C1-metaboliassa eli yksihiilisten yksiköiden siirtämisessä. Folaattivitameereillä on kyky sekä luovuttaa että vastaanottaa yhden hiilen ryhmiä, jolloin hiilen hapetusaste vaihtuu tasolta toiselle. Folaatin aktiivisin muoto on täysin pelkistynyt tetrahydrofolaatti (H<sub>4</sub>folaatti), joka siirtää C1-metaboliassa hiilen joko metyylinä (-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>) tai formyylinä (-CHO-H<sub>4</sub>). Ihmisen kudoksissa tärkein hiilen lähde tetrahydrofolaatille on seriini (aminohappo), jolta se vastaanottaa metyleeniryhmän (-CH<sub>2</sub>). Reaktion seurauksena tetrahydrofolaatista muodostuu 5, 10-metenyyli-tetrahydrofolaatti. Folaatit toimivat C1-metaboliassa läheisesti niitä uudelleen aktivoivien B<sub>6</sub>- ja B<sub>12</sub>-vitamiinien kanssa. Ilman riittävää B<sub>12</sub>-vitamiinin määrää folaatti jää biologisesti tehottomaan muotoon. (Combs 1998, 386-388; Bright 2008.)

Nukleotidien synteesissä 5, 10-metenyyli-tetrahydrofolaatti osallistuu joko sellaisenaan tai hapettuneena adeniinin (A), guaniinin (G) ja tymiinin (T) erilaistumisvaiheeseen. Nukleotideista urasiilin (U) ja sytosiinin (C) muodostumiseen foolihapolla ei ole havaittu olevan vaikutusta. Tämä ilmiö saattaa aiheuttaa ravitsemuksesta riippuvaista nukleotidihappojen epätasapainoa elimistössä. Aminohapoista metioniinin määrä elimistössä on folaatista riippuvaista. Metioniini muodostuu tetrahydrofolaatin luovuttaessa metyyli-ryhmänsä homokysteiniinille (C1-metabolialla). (Combs 1998, 388-399.)

## 2.4 Folaatit ja terveys

Folaatti on ihmiselle elintärkeä vitamiini, jonka puutteen on todettu aiheuttavan useita vakavia sairauksia. Folaatin merkitys korostuu nopeasti jakaantuvissa soluissa, johtuen vitamiinin tärkeästä tehtävästä nukleotidien ja aminohappojen muodostuksessa. Folaatin puute aiheuttaa megaloblastista anemiaa. Siinä alhainen hemoglobiini johtuu suurentuneista ja epämuodostuneista punasoluista, joita syntyy luuytimen toiminnan häiriinnyttyä. Megaloblastiseen anemiaan liittyy myös hermoston ja ruuansulatuskanavan toiminnan heikkenemistä sekä poikkeavuuksia granylosyyttien (valkosolujen) ja trombosyyttien (verihituleiden) muodostuksessa. Folaattia uudelleen aktivoivan B<sub>12</sub>-vitamiinin puute altistaa myös megaloblastiselle anemialle. (Kisliuk 2001, 5.)

Raskauden aikaisella folaatin puutteella on todettu olevan yhteys sikiön hermostoputken sulkeutumishäiriöön (NTD, neural tube defect). Tämä usein erittäin vaikea kehityshäiriö ilmenee tavallisesti selkärankahalkiona tai aivottomuutena. Selkärankahalkio on seurausta epätäydellisestä selkärangan sulkeutumisesta ja aivottomuus johtuu epätäydellisestä kallon sulkeutumisesta. Jälkimmäistä sairastavat vauvat menehtyvät usein jo kohdussa tai vain muutaman elinpäivän jälkeen. Selkärankahalkio voi aiheuttaa liikuntakyvyttömyyttä. Puutteellisen ravitsemuksen lisäksi NTD:tä voivat aiheuttaa myös folaattiaineenvaihdunnan geneettiset poikkeavuudet. (Henry & Chapman 2002.)

Folaatin merkitystä NTD:n ilmenemiseen tutkittiin laajasti 1990-luvun alussa kansainvälisen vitamiinien tutkimusryhmän (MRC Vitamin Study Research Group) toimesta. Kahdeksan vuotta, seitsemän maata ja 1200 odottavaa äitiä käsittäneen tutkimuksen tuloksena todettiin riittävän folaatin saannin ehkäisevän 72 %:sti NTD:n esiintymistä. (Henry & Chapman 2002.) Suomessa hermostoputken sulkeutumishäiriö sikiöllä on harvinainen (Laitinen 2003). Vuosina 1993-2008 Suomessa NTD:n kokonaisesiintyvyys oli noin 7,6 tapausta 10 000 synnytystä kohden vuodessa ja näistä raskauksista keskimäärin 60 % keskeytettiin. Muissa Euroopan maissa esiintyvyys oli hiukan suurempi. (Stakes 2011). Epämuodostumien ehkäisemiseksi kaikki odottavat äidit voivat käyttää foolihappolisää 0,4 mg:a päivässä raskauden alkuvaiheessa (Laitinen 2003; NNC 2005).

Ajankohtaisin kysymys folaatin puutteen kliinisistä vaikutuksista on veren suuri homokysteiinipitoisuus, jolla on todettu olevan yhteys suomalaisten yleisimpään kuolinsyyhyyn eli sydän- ja verisuonisairauksiin. Tutkimustulosten perusteella liiallinen homokysteiini kerääntyy verisuonten kaarteisiin ja vaurioittaa verisuonten seinämiä lisäten kardiovaskulaarisen riskin todennäköisyyttä. Tutkimuksissa folaatin saannin on todettu vähentävän sydänsairaustapauksia ja vastaavasti seerumin suuren homokysteiinipitoisuuden lisäävän niitä (Voutilainen ym 2004; Virtanen ym 2005, Kariluoto 2008, 19 mukaan). On kuitenkin vielä kyseenalaista, lieneekö veren suuri homokysteiinipitoisuus sydän- ja verisuonisairauksien syy vai seuraus (Voutilainen 2005). Homokysteiinin ylimäärä johtuu folaatin, B<sub>6</sub>- ja B<sub>12</sub>-vitamiinien tärkeästä tehtävästä koentsyymeina ja katalyytteina homokysteiinin metyloinnissa metioniiniksi. Vähäisen folaatin saannin lisäksi homokysteiinin ja metioniinin epätasapaino voi johtua vitamiinin aineenvaihduntaan vaikuttavasta geenivirheestä. (Laitinen 2003.) Veren suurella homokysteiinipitoisuudel-

la epäillään olevan vaikutusta myös dementian ja Alzheimerin taudin kehitykseen (Ravaglia ym 2005, Kariluoto 2008, 20 mukaan).

Joidenkin lääkkeiden käyttö heikentää folaattien imeytymistä. Yksi merkittävimmistä folaattiaineenvaihduntaa häiritsevistä tekijöistä on autoimmuunisairauksien hoitoon käytetty metotreksaatti, joka toimii folaatin analogina. Aineet käyttävät solun sisään-pääsyyn samaa kuljetusmekanismia, jolloin folaatin todennäköisyys päästä soluun heikkenee. Metotreksaattihoitoa saaville henkilöille annetaan foolihappolisää lääkkeen ja folaatin puutteen aiheuttamien mahasuolikanavan ärsytysoireiden välttämiseksi. Foolihappolisän annostus tulee määrittellä potilaskohtaisesti, jottei se vastaavasti heikennä lääkkeen vaikutusta sairauden hoidossa. Metotreksaattia käytetään yleisimmin nivelreuman hoitoon, mutta se toimii myös joissakin syöpähoidoissa solunsalpaajana. (Laitinen 2003.)

## 2.5 Folaatin keskimääräinen tarve sekä toksisuuden raja

Ihmisen folaattivarastot ovat melko pienet eikä elimistö pysty syntetisoimaan vitamiinia itse, joten se on saatava ravinnosta, rikasteista tai ravintolisistä (Laitinen 2003). Aikuisen folaatin saannin puuterajaksi on määritetty 100 µg vuorokaudessa, mutta jotta seerumin folaattitaso säilyisi muuttumattomana, folaattia olisi saatava vähintään 200 µg vuorokaudessa (Average Requirement, AR). Folaatin saantisuosituksena (Recommended Intake, RI) pidetään 300 µg:a vuorokaudessa, jolloin myös elimistön pitkäaikaisvarastojen on mahdollista kehittyä. Taulukossa 1 on esitetty Pohjoismaisten ravitsemussuosituksen (Nordic Nutrition Recommendations, NNR) mukaiset folaatin vuorokautiset saantisuositukset ikäryhmittäin. (NNR 2004, 16.)

TAULUKKO 1. Pohjoismaiset saantisuositukset folaatille

Ikä	Folaattia µg/vrk
vauvat yli 2 kk	5 µg/ paino kg
2-5 v	80
6-9 v	130
10-13 v	200
14-17 v	300
naiset 18-30 v (hedelmöittymiskykyiset)	400
naiset yli 30v ja miehet yli 18 v	300
raskaana olevat ja imettävät	500 (Pohjoismaat) 400 (Suomi)

Finravinto 2007 -tutkimuksen mukaan suomalaisten vitamiinien saanti ravinnosta on riittävää lukuun ottamatta D-vitamiinia ja folaattia. Keinoja tämän ravitsemuksellisen puutteen poistamiseksi on lisätä runsaasti folaattia sisältävien raaka-aineiden kulutusta tai käyttää synteettistä foolihappolisää tai foolihapolla täydennettyjä elintarvikkeita (Henry & Chapman 2002). Luonnostaan hyviä folaatin lähteitä ovat esimerkiksi täysjyvävilja, tummanvihreät kasvikset, hiiva ja maksa (Laitinen 2003).

Tietyillä ihmisryhmillä folaatin tarve ilmenee normaalia suurempana. Raskauden ja imetyksen aikana folaattia tarvitaan enemmän (noin 500 µg/vrk), koska vitamiini on erityisen tärkeä sikiön hermoston ja selkärangan kehitykselle. Folaattien käyttöä tulisi lisätä jo niiden kuukautisten aikana, joiden jälkeen epäilee raskauden alkavan ja jatkaa ainakin kahdennelletoista raskausviikolle asti. Folaatin tarve lisääntyy myös elimistön korjatessa ihovaurioita esimerkiksi palovamman jäljiltä. Folaatinpuutokselle altistavat elimistön imeytymishäiriöt, kuten keliakia ja suolistosairaudet. Lääkkeistä aikaisemmin kuvatun metotreksaatin lisäksi muun muassa ehkäisytabletit, aspiriini ja epilepsialääkitys sekä pitkäaikainen sulfalääkitys heikentävät folaatin imeytymistä elimistössä. Lisäksi folaatin aineenvaihduntaa häiritsevät runsas alkoholin käyttö sekä tupakointi. (Henry & Chapman 2002.)

Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (Food and Drug Administration, FDA) asetti vuonna 1998 säädöksen foolihapon lisäämisestä tiettyihin elintarvikkeisiin. Tavoitteena oli vähentää hermostoputken sulkeutumishäiriön esiintymistä lisäämällä kuluttajien synteettisen foolihapon saantia ravinnosta. (Pfeiffer ym 2005, Kariluoto 2008, 23 mukaan). Nykyisin foolihappotäydennystä käytetään viljatuotteissa muun muassa Yhdysvalloissa, Kanadassa ja Chiessä. Kaikki tutkijat maailmalla eivät ole yksimielisiä lisäyksen hyödyistä, ja esimerkiksi Iso-Britannian tutkimuslaitoksen (Institute of Food Research, IFR) mukaan se saattaa johtaa jopa terveysongelmiin. (Wright ym 2007). Suomen elintarvikkeissa ei käytetä tai koeta tarvetta lakisääteiselle foolihappotäydennykselle, vaikka folaattien saanti perusravinnosta on niukkaa (Laitinen 2003).

Tavallisesta ravinnosta ei ole mahdollista saada folaatin yliannostusta eikä vitamiinin kliinisiä toksisuusoireita tunnetta. Liian suuren folaattiannoksen voi saada vain kohtuuttomasta ravintolisien tai foolihapolla täydennettyjen elintarvikkeiden käytöstä. Suurimpana hyväksyttynä saantina (Upper Intake level, UL) pidetään 1000 µg:a päivässä, mutta esimerkiksi lääkinnällisessä tarkoituksessa käytetään huomattavasti suurempia annoksia. Folaatin liikasaannin vaarana on, että se voi peittää alleen B<sub>12</sub>-vitamiinin puutostilan vaikeasti havaittavaksi tai estää sinkin imeytymistä elimistössä. (Henry & Chapman 2002; Voutilainen 2005.)

### 3 PALKOKASVIT

#### 3.1 Palkokasvien asema ravitsemuksessa ja ravinnontuotannossa

Palkokasvit sisältävät monia ihmisen kasvulle tärkeitä ravinto-aineita, joista suuri proteiinipitoisuus lienee tunnetuin ominaisuus. Palkokasveissa on myös paljon hitaita hiilihydraatteja, liukoisia kuituja, ja rasvahappokoostumukseltaan ne ovat lähes kokonaan tyydyttymättömiä. Energiaa vapauttavien makroravintoaineiden lisäksi palkokasveissa on monia bioaktiivisia aineita, mineraaleja ja vitamiineja, joilla on tärkeä merkitys ihmisen terveydelle. (Campos-Vega ym 2010.)

Erinomaisen ravitsemuksellisen arvon lisäksi palkokasvien viljely on maaperälle suotuisaa. Ne sitovat ilmasta typpeä maaperään tehden kasvumaasta näin ravinteikkaamman (Sharma & Gill 2010). Palkokasvien viljely lisää koko maaperän bakteerikantaa ja parantaa sen biologista aktiivisuutta. Tämä vähentää kemiallisten lannoitteiden tarvetta sekä kasvutautien esiintymistä. (Lindroos 2010.) Palkokasvien viljely on ympäristöystävällistä paitsi maaperän ekologian kannalta myös siksi, että se on kestävämpi vaihtoehto tuottaa valkuaisainepitoista ruokaa eläinproteiiniin verrattuna. (Sharma & Gill 2010.)

Palkokasvien monista eduista huolimatta niiden viljely etenkin Skandinaviassa on suhteellisen vähäistä. Monet lajit tarvitsevat pitkän kasvukauden tuottaakseen satoa ja niiden viljely onkin huomattavasti yleisempää Aasiassa ja Afrikassa (FAOSTAT 2009). Suomen viljelytuotannosta vain alle prosentti koostuu palkokasvilajeista, lähinnä herneestä. Palkokasvien käyttö on kuitenkin monipuolisempaa, ja esimerkiksi soijaa tuodaan ulkomailta Suomeen noin 300 000 tonnia vuosittain. Ihmisravinnon lisäksi palkokasvit ovat tärkeä valkuaisainepitoinen rehuraaka-aine eläimille. (Lindroos 2010.)

Euroopan Unionissa (EU) on käynnissä Legume Futures -projekti, jonka pyrkimyksenä on kehittää kasvien viljelyä Euroopan alueella. Tavoitteet liittyvät taloudellisiin ja viljelytekniisiin lähtökohtiin, mutta ennen kaikkea ympäristön kestäväan käyttöön ja maatalouden päästöjen vähentämiseen. Suomi on ollut mukana tässä EU:n puiteohjelmiin kuuluvassa hankkeessa, jonka osana seurataan muun muassa palkokasvien viljelyä.

Tutkimusten mukaan uudet eurooppalaisperäiset palkokasvilajikkeet ovat pärjänneet Suomen olosuhteissa ja sietäneet kylmää paremmin kuin muut aikaisemmin käytetyt lajikkeet. Palkokasvien viljelyn lisääminen kasvattaisi Suomen ruokaomavaraisuutta ja korostaisi lähiruuan arvoa. Tuontisoijan sijaan rehun raaka-aineeksi sopisivat hyvin ravintoarvoltaan laadukkaat kotimaiset palkokasvit. (Lindroos 2010; Smith 2010.)

### 3.2 Härkäpavut

Härkäpapu (*Vicia faba*) kuuluu hernekasvien (*Fabaceae*) heimoon ja virnojen (*Vicia*) sukuun (Voipio 2001, 285, Hietanen 2010, 9 mukaan). Niiden viljelyn arvellaan alkaneen joko Lähi-idän tai Itä-Aasian alueilla jo paljon ennen ajanlaskun alkua, ja esimerkiksi Kiinassa härkäpavut ovat olleet osana ruokakulttuuria vähintään 5000 vuoden ajan. Härkäpapu toimi muinaisina aikoina merkittävänä proteiininlähteenä ravinnossa, kun lihaa oli vähän saatavilla. Härkäpavulla on historiansa aikana ollut myös joissakin kulttuureissa uskonnollisia ja myyttisiä merkityksiä. (Altuntas ym 2005; Cubero 2005; Kalliola 2005, 89).

Härkäpapujen tulo Eurooppaan ajoittuu rautakauteen, ristiretkien yhteyteen lähtien 1100-luvulta. Suomessa härkäpapujen viljely on ollut vähäistä lukuun ottamatta 1800-lukua, jolloin sitä kasvatettiin jossain määrin lähinnä Karjalan alueella. 2000-luvulla Suomen eteläisissä ja kaakkoisissa osissa harrasteviljelijät ovat alkaneet kasvattaa lajia uudestaan, ja härkäpavun viljelyn on arvioitu lisääntyvän lähivuosina. (Lassila 2007, 18, Hietanen 2010, 9 mukaan; Kalliola 2005, 89; YLE Turku 2009.)

Härkäpavun alkuperäisestä villimuodosta ei ole selvyttä, mutta nykyisin kasvista on jalostettu monia erinäköisiä ja -muotoisia alalajeja (Altunas ym 2005). Härkäpapulajikkeista muotoutuu myös luonnostaan viljelijäkohtaisia variaatioita, koska kylvösiemenet kerätään maatalojen omasta edellisvuoden sadosta. Monivuotinen härkäpapu kasvaa noin metrin korkuiseksi ja sillä on suuret 1-3 -pariset kärhettömät lehdet. Kukkatertut ovat yleensä joko kokonaan valkoisia tai valkomustia ja yhdessä lehtihangassa on 2-5 kukkaa. Joissakin maatiaislajikkeissa kukat voivat olla poikkeuksellisesti myös punertavia tai violetteja. Syötäväksi tarkoitettut siemenet ovat 10-15 cm pitkässä käyrässä palossa ja, niiden väri vaihtelee lajikkeen mukaan. Valkokukkaisilla kasveilla siemenet ovat



yleensä keittämisen jälkeen valkoisia tai vihreitä ja kirjavakukkaisilla ruskeita. (Kalliola 2005, 88.)

Härkäpapujen jalostaminen erilaisiin kasvuolosuhteisiin sopiviksi on mahdollista, ja esimerkiksi suomalaisten kehittämä Kontu-lajike on suunniteltu selviämään lyhyen kasvukauden aikana. Kasvinjalostuksen avulla voitaisiin edelleen kehittää härkäpapuja poikkeuksellisiin olosuhteisiin soveltuvimmiksi. Monet härkäpavut ovat kuitenkin risti-pölytteisiä, mikä hankaloittaa jalostustyön onnistumista. Lisäksi kasvin ravitseuksellinen aminohappokoostumus on vaikea säilyttää luonnollisten lajikkeiden kaltaisena jalostustyön yhteydessä. (Stoddard ym 2009, Hietanen 2010, 15-17 mukaan.)

Härkäpavun keskimääräinen kasvuaika Suomessa on 111 vuorokautta. Siemenet voidaan kylvää aikaisin keväällä, sillä ne eivät ole hallanarkoja. Syksyllä sadonkorjuu täytyy kuitenkin suorittaa tarpeeksi aikaisin, sillä puolikypsät palot vaurioituvat kylmästä. Sato on valmis kerättäväksi, kun kaikki palot ovat tuleentuneet mustiksi ja osa lehdistä varissut maahan. Härkäpavun pystyn ja tanakan muodon vuoksi sen puinti onnistuu hyvin leikkuupuimurilla, mutta varret voidaan katkaista myös käsin, sitoa lyhteiksi ja irrottaa palot noin 1-2 viikon kuivumisen jälkeen. Säilyäkseen hyvin härkäpavut tulisi kuivattaa noin 14 prosentin kosteuspitoisuuteen. (Hankkija-Maatalous Oy 2009.)

Härkäpapua käytetään lypsykarjan ja muiden eläinten rehuna, mutta se on myös erittäin arvokas ravinto-aine kasvisruokavaliota noudattaville ihmisille sekä toimii hyvänä vaihtoehdona kalliille eläinproteiinille. Härkäpapuja käytetään kuivattuina, jauhettuina tai tuoreina erilaisissa padoissa, soseissa ja levitteissä. (Altuntas 2007.)

### 3.3 Linssit

Linssit (*Lens culinaris*) ovat kylvövirvilän siemeniä ja kuuluvat hernekasvien (*Fabaceae*) heimoon sekä linssien (*Lens*) sukuun. Linssi on yksi vanhimmista ruuan raaka-aineista ja on lähtöisin Lähi-idästä yli 8000 vuoden takaa ennen ajanlaskun alkua. Linsin viljely kehittyi yhdessä vehnän ja ohran kanssa neoliittisella aikakaudella, jolloin ihminen alkoi viljellä maata ja käyttää luonnossa olevia villikasveja kontrolloidusti hyödykseen. Linsin viljely levisi Lähi-idästä nopeasti muihinkin maanosiin, ja sen suo-

sio on säilynyt Lähi-idän lisäksi Pohjois-Afrikassa, Etelä-Aasiassa ja Pohjois-Amerikassa. Linssin kulutus on suurinta kehittyvissä maissa, missä väestönkasvu on nopeaa, mutta sen käyttö on kasvussa myös kehittyneissä maissa. (Muehlbauer ym 2005, 219.)

Kylvövirvilä kasvina on monelle tuntematon, koska usein linssillä tarkoitetaan sekä kasvia että sen siemeniä. Kylvövirvilä on yksivuotinen, hentorakenteinen ja kasvaa noin 20-45 cm korkeaksi. Sen kukissa on kuusi tylppäkärkistä ja pitkänomaista vaalean sinistä terälehteä. Kylvövirvilään muodostuu useita putkilonmuotoisia palkoja, joiden sisällä on yksi tai kaksi pientä, pyöreää ja kuperapintaista siementä eli linssiä. Ne voivat olla väriltään punaisia, vihreitä tai ruskeita. Kylvövirvilä viihtyy hyvin puolikuivassa tai kuivassa maaperässä ja sen kasvukierto on pitkälti samanlainen kuin viljoilla. (Yadav ym 2007; Erskine 2009.)

Linssit ovat suosittuja itämaisessä ruokakulttuurissa ja niitä käytetään erilaisissa keitoissa, padoissa ja kastikkeissa. Linssin ravintoarvo on hyvä suuren proteiinipitoisuuden, ja erityisesti sen sisältämien lysiinin ja tryptofaanin ansioista. Kyseisiä aminohappoja esiintyy vain harvoin kasvikunnantuotteissa. Linssiä viljellään ainakin 35 maassa ja viidellä eri mantereella. Pohjoisilla ilmastovyöhykkeillä sen kasvu on kuitenkin heikkoa. Linssistä on luonnon jalostamana syntynyt lukuisia eri lajikevariaatioita ja sen vuoksi sitä kutsutaankin modernin ajan muinaiseksi viljelyskasviksi. (Yadav ym 2007; Erskine 2009.)

### 3.4 Lupiinit

Lupiini kuuluu hernekasvien (*Fabaceae*) heimoon, mutta se tunnetaan vain harvoin palkokasvina. Tienpenkereillä kasvava komealupiini (*Lupinus polyphyllus*) on tuotu Suomeen Pohjois-Amerikasta jo 1800-luvulla viherlannoitteeksi. Myöhemmin kasvin todettiin sisältävän myrkyllisiä alkaloideja ja sen käyttö rajoittui koristetarkoitukseen. Nykyisin Suomessa komealupiinin lisääntyminen uhkaa tukahduttaa niittyjen ja laitumien luonnonvaraiset kukat alleen ja sen valtavaa leviämistä tienvarsilla yritetään torjua. (Kurlovitch ym 2007.)

Viime vuosina kiinnostus lupiiniin on kasvanut ja se on yksi tutkituimmista palkokasveista. Ristiinpölytyvästä lupiinista on onnistuttu jalostamaan sellaisia makealupiineiksi kutsuttuja lajikkeita, joissa alkaloidisynteesiä ei tapahdu. Myrkyttömät lupiinilajikkeet mahdollistavat niille aivan uudet hyöty- ja käyttökohteet ravintokasvina. Risteytetyjä lajikkeita kasvatetaan menestyksekkäästi jo ainakin Välimeren alueella, Etelä-Amerikassa ja Australiassa. Yleisimmin viljellään valkolupiinia (*Lupinus albus*), keltalupiinia (*Lupinus luteus*), sinilupiinia (*Lupinus angustifolius*) ja helmilupiinia (*Lupinus mutabilis*). Lupiinia viljellään lähinnä typensidontakyvyn takia lannoitustarkoituksiin sekä ravinnoksi rehuutuotantoon. (Martinez-Villaluenga ym 2005.)

Useimpiin muihin palkokasveihin verrattuna lupiinit kasvavat viileämmissä ja vaatimattomammassa olosuhteissa. Tästä johtuen lupiinin nähdään menestyvän viljelykasvina myös Suomen lyhyessä kesässä. Jalostetuista lajikkeista sinilupiinin on todettu kasvavan parhaiten Pohjoismaissa, ja sen viljelytekniisiä sekä satoisuutta määrittäviä tutkimuksia on tehty koetiloilla Suomessa. (Lizarazo 2011.) Keväällä 2010 Huittisissa keuhkoihin ensimmäistä kertaa sinilupiinin viljelyä isommassa mittakaavassa viiden hehtaarin alueella (Turun Sanomat 22.6.2010).

Lupiini on ollut tähän asti esimerkiksi Australiassa tärkeä märehtijöiden rehuraaka-aine, mutta uusimmat tavoitteet pyrkivät laajentamaan sen käyttöä myös ihmisravinnoksi. Muutamissa maissa lupiinijauhon käyttö elintarviketeollisuudessa sallittiin jo vuonna 1997, mutta sen käyttö on ollut vähäistä ja kiisteltyä. Lupiinin valkuaisainepitoisuus on huomattavan suuri (30-40 %) ja sisältää tärkeitä aminohappoja. Ravitsemuksellisten ominaisuuksien lisäksi lupiinin käyttö elintarvikkeissa parantaa muun muassa ruuan koostumusta, säilyvyyttä ja tuoksua. (Martinez-Villaluenga ym 2005.) Lupiinin laajempaa käyttöä osana ihmisravintoa jarruttavat kuitenkin epäilyt sen sisältämisestä allergeeneista. Lupiinin väitetään aiheuttaneen pähkinään herkistyneille ihmisille allergisia reaktioita ja jopa hengenvaarallisia anafylaktisia kohtauksia. Tutkimukset lupiinin allergeeneista ovat vielä puutteellisia ja vaativat lisäselvityksiä. (Radcliffe ym 2005.)

## 4 FOLAATTIANALYTIikka

Viimeisen neljän vuosikymmenen ajan folaattia on määritetty esimerkiksi mikrobiologisilla, radioimmuuni- ja fluorometrisillä menetelmillä, elektrokemiallisesti sekä ioninvaihto- ja nestekromatografisesti. Monia erilaisia menetelmiä käytettäessä huomattiin niistä saatujen tulosten vaihtelevan suuresti. Menetelmiä vertailtaessa todettiin mikrobiologisen määrittelyn olevan kaikkein todenmukaisin, vaikkakin aikaa vievä ja haastava. Mikrobiologinen menetelmä on nykyisin käytetyin ja toistaiseksi myös ainoa virallisesti hyväksytty menetelmä folaattianalytiikassa. (Han 2003; Tamura 1998.) Mikrobiologisella menetelmällä ei voida kuitenkaan tutkia näytteestä folaatin vitameerijakaumaa. Sen selvittämiseksi on käytettävä nestekromatografista menetelmää (high performance liquid chromatography, HPLC tai ultra performance liquid chromatography, UPLC). Aiempien tutkimusten mukaan HPLC- ja UPLC-menetelmillä analysoidut kokonaisfolaattipitoisuudet ovat olleet noin kolmanneksen pienempiä mikrobiologiseen menetelmään verrattuna. (Silvennoinen 2010, 11, 69.)

### 4.1 Folaattianalytiikan haasteet

Folaatit ovat labiileja yhdisteitä, mikä tarkoittaa niiden muuttavan muotoaan ja hajoavan helposti. Erityisen herkkiä folaatit ovat UV-valon, lämmön ja hapen vaikutukselle. Folaattien eristäminen elintarvikkeista on sitä hankalampaa, mitä suurempi tuotteen proteiini- tai tärkkelyspitoisuus on. Folaattien tuhoutumisen estämiseksi näytteenkäsittelyyn tulee tapahtua keltaisessa valossa (aallonpituudeltaan noin 550-600 nm) ja hapen pääsy näyteputkiin on estettävä. (Han 2003; Tamura 1998.)

Kunkin menetelmän soveltuvuus ja varsinkin entsyymikäsittelyn vaikutus riippuvat näytemateriaalin ominaisuuksista. Valittu menetelmä tulisi optimoida erilaisille elintarvikkeille yksilöllisesti ainakin käytettyjen entsyymien, säädettävien pH-arvojen ja inkubointiaikojen suhteen. Pitkiä analyysisarjoja tehtäessä ympäröivien olosuhteiden ja folaatteja tuhoavien tekijöiden, kuten valon, lämpötilan ja hapen määrän on pysyttävä vakiona. (Pandurangi & LaBorde 2004.)

Folaattianalytiikan menetelmiä on kehitetty ja sen myötä analysoidut tulokset elintarvikkeissa ovat tarkentuneet. Folaatin eristäminen näytematriisista on tehokkaampaa uuden trientsyymikäsittelyä hyödyntävän tekniikan ansiosta. Lisäksi mikrobiologisessa menetelmässä työn laatua parantavia muutoksia ovat olleet kasvuvastebakteerin säilöminen kylmäsuojattuna glyseroliin sekä 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn käyttöönotto mahdollistamaan laajemman ja nopeamman analysoinnin. (Tamura 1998.)

#### 4.2 Mikrobiologinen menetelmä

Kokonaisfolaattipitoisuuden mikrobiologiseen määrittämiseen käytetään AOAC:n (Association of Official Analytical Method) virallisesti hyväksymää menetelmää numero 2004.05. Sen kehitystyö tehtiin viljatuotteilla, mutta menetelmä soveltuu myös muiden elintarvikkeiden, esimerkiksi palkokasvien kokonaisfolaattipitoisuuden analysointiin. Menetelmän herkkyys riittää havaitsemaan folaattia tuotteista alkaen pitoisuudesta 7,6 µg folaattia/100 g. (Tamura 1998.)

Mikrobiologinen menetelmä perustuu testiorganismina käytettävän *L. rhamnosus* -bakteerin (ATCC 7469, American Type Culture Collection) antamaan kasvuvasteeseen folaatille. Vasteen suuruus laimennetuissa näytteissä mitatetaan turbidometrisesti 96-kuoppaiselta mikrotiitterilevyltä aallonpituudella 595 nm. Saatua absorbanssia verrataan standardina käytettävän 5-formyyli-tetrahydrofolaatin (5-CHO-H<sub>4</sub>) antamaan kasvuvasteeseen. (Kariluoto ym 2004.)

Folaatit eristetään näyttemateriaalista uuttamalla sekä entsyymaattisella käsittelyllä. Matriisista riippuen hajotus toimii parhaiten yhden, kahden tai kolmen entsyymin avulla. Tutkijoiden mukaan folaatin erottumisessa on fysiologisia eroja kasvi- ja eläinkudosten välillä. (Tamura 1998.) Ainakin viljatuotteista ja palkokasveista folaatin irtoamisen on todettu olevan tehokkainta trientsyymikäsittelyllä (proteaasi, α-amylaasi ja konjugaasi) (Han ym 2003). Proteaasi hajottaa folaatteihin kiinnittyneitä proteiineja, amylaasi pilkkoo tärkkelystä ja konjugaasi katkoo folaattien polyglutamaattiketjujen γ-karboksyylipeptididoksia. Mikrobiologisella menetelmällä voidaan tunnistaa vain mono- ja diglutamaattimuotoiset folaatit. (Tamura 1998.)

### 4.3 Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografinen (UPLC) menetelmä

Folaatin vitameerijakauman voi määrittää nestekromatografisesta HPLC (high performance liquid chromatography) -menetelmästä kehitetyllä UPLC (ultra performance liquid chromatography) -menetelmällä. Yleisimmin tutkittujen folaattivitameerien nimet ja lyhenteet on esitetty taulukossa 2. Kromatografiset menetelmät mahdollistavat useiden eri yhdisteiden samanaikaisen mittaamisen. UPLC:llä voi tutkia haastavia analyyttejä pieninäkin pitoisuuksina ja sen käyttö on yleisintä lääketeollisuudessa. Toistaiseksi UPLC:tä käytetään elintarvikeanalytiikassa vain vähän, lähinnä haitallisten yhdisteiden, kuten lääke- ja torjunta-ainejäämien jäljittämiseen. Elintarvikkeiden ja myös niiden luontaisten komponenttien tutkiminen UPLC:llä on kuitenkin lisääntymässä. Vuonna 2009 suoritettiin tähän mennessä laajin elintarvikkeita koskeva UPLC-tutkimus äidinmaidonvastikkeessa esiintyvistä vitamiineista ja vitamiinin kaltaisista yhdisteistä. (Silvennoinen 2010, 28-32.)

TAULUKKO 2. Folaattivitameerien nimet ja lyhenteet

Nimi	lyhenne
tetrahydrofolaatti	H <sub>4</sub>
5-metyylitetrahydrofolaatti	5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub>
5-formyylitetrahydrofolaatti	5-HCO-H <sub>4</sub>
5,10-metenyylitetrahydrofolaatti	5,10-CH+-H <sub>4</sub>
foolihappo	PGA
10-formyylifoolihappo	10-HCO-PGA

UPLC on yksi nestekromatografian (LC, liquid chromatography) lajeista ja sen toiminta perustuu näytekomponenttien aktiiviseen vuorovaikutukseen liikkuvan faasin ja stationäärifaasin välillä. Erittäin korkea paine työntää laitteistossa eluenttia (liikkuva faasi) hienojakoisella jauheella (stationäärifaasi) pakatun kolonnin läpi. Sykkeettömästi virtaavan eluentin mukaan injektoidaan näyte, joka jakaantuu komponenteikseen tietyn ajan kuluessa. Retentioaika riippuu stationäärifaasina käytettyjen partikkelien koosta sekä näytteen taipumuksesta sitoutua siihen. Näytteenä olevat komponentit saapuvat detektorille sitä nopeammin mitä heikommin ne ovat vuorovaikutuksessa stationäärifaasin kanssa. Detektori mittaa yhdisteen antamaa signaalia ajan funktiona muodostaen siitä kromatogrammin. Nestekromatografian tavallisimmat osat ovat injektor, pumppu,

kolonni ja detektori sekä niihin yhdistetty tiedonkeruu- ja tulostuslaitteisto. (Jaarinen ym 2005.)

UPLC-laitteiston sisään luotu korkea paine ja eluentin suuri virtausnopeus mahdollistavat HPLC:tä nopeamman analytiikan. Se lisää työskentelyn tehokkuutta ja säästää aikaa, mutta toisaalta vaativat olosuhteet altistavat laitteen herkemmin häiriöille ja kontaminaatioille. (Walles ym 2007, Silvennoinen 2010, 20 mukaan.)

## 5 TYÖN SUORITUS

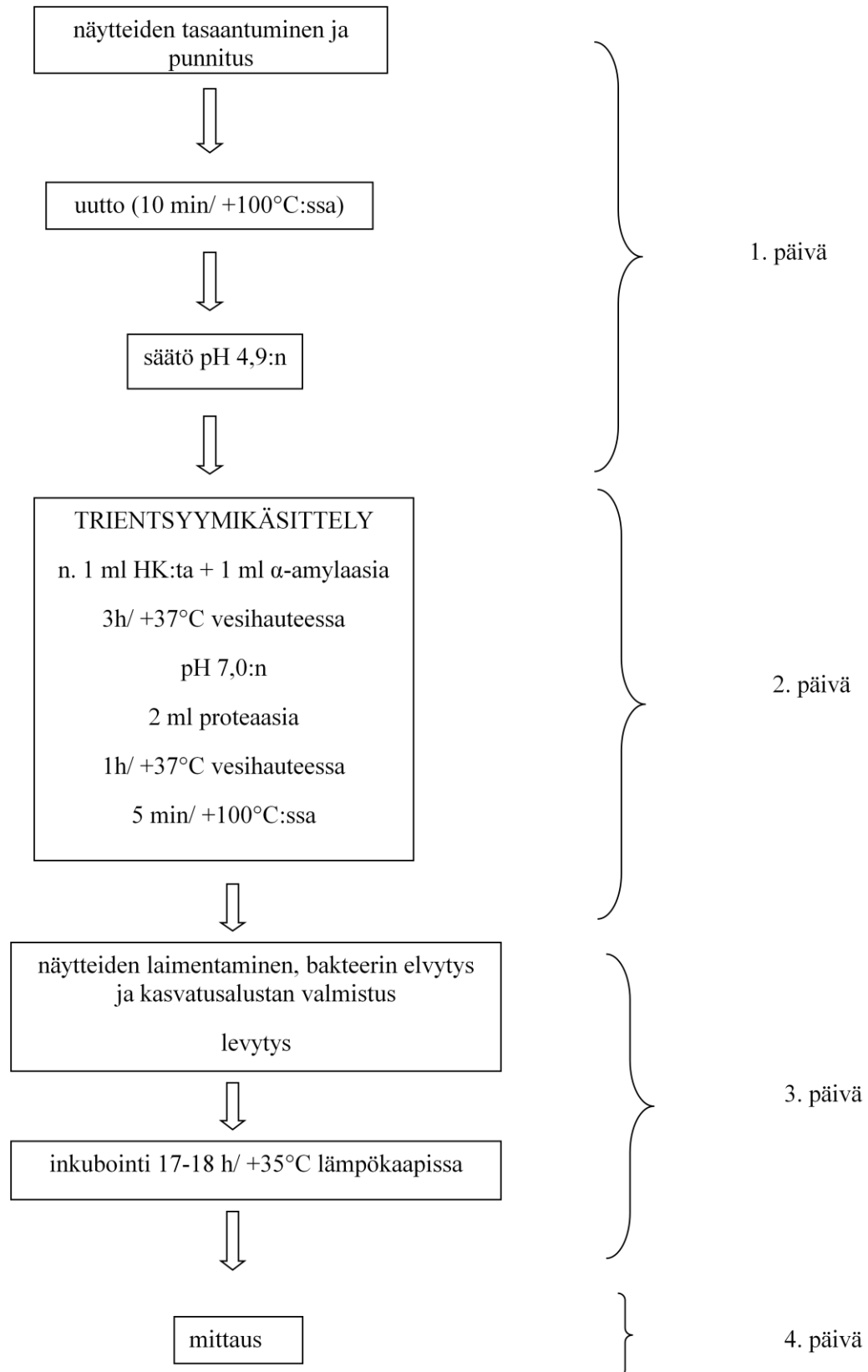
### 5.1 Käytetyt menetelmät ja laadunvarmistus

Tässä työssä analysoitiin 23 härkäpapu-, 12 linssi- ja 6 sinilupiininäytettä. Tulokset aineistosta kerättiin systemattisesti kokeellisin menetelmin. Lisäksi jokaisesta tutkitusta palkokasvilajista valittiin folaattipitoisuudeltaan suurin ja pienin lajike, joista selvitettiin folaattivitameerien suhteellinen jakauma UPLC (ultra performance liquid chromatography) -menetelmällä. Lisäksi jokaisesta näytteestä määritettiin kosteus- ja kuiva-ainepitoisuus gravimetrisellä haihdutusmenetelmällä.

Työn kokeellinen osio tehtiin Helsingin yliopiston Elintarvikekemian osaston Viikin tutkimuslaboratoriotiloissa syksyllä 2010. Mikrobiologinen työskentely tapahtui niin sanotussa pimeälaboratoriossa, missä valaistus oli aallonpituudeltaan noin 550-600 nm ja suojeli folaatteja fotokemiallisilta hajoamisreaktioilta. Näytteet tyytettiin folaattien hapettumisen estämiseksi ja työskentely tapahtui aseptisesti. Käytetyt levytysalustat ja muut kasvuvastebakteeria sisältävät välineet autoklavoitiin ennen jätteisiin siirtämistä.

Jokaisen näytesarjan yhteydessä tutkittiin referenssimateriaalit ja niistä saadut tulokset kerättiin valvontakorttiin. Referenssimateriaalien folaattipitoisuuden oli osuttava aiemmin elintarvikekemian osastolla määritettyihin raja-arvoihin, joka oli keskiarvo  $\pm 1,5$  keskihajontaa. Jos vaadittu ehto ei toteutunut, koko sarjan tulokset hylättiin ja näyteuutteen levytettiin uudelleen. Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaismäärittystä, joiden tulokset saivat erota toisistaan korkeintaan 10 %. Kuviossa 2 on esitetty mikrobiologisen menetelmän eteneminen kaaviokuvana.





KUVIO 2. Mikrobiologisen menetelmän eteneminen kokonaisfolaattipitoisuuden määrittämisessä

## 5.2 Näytteet

Kaikki tämän työn 41 näytettä olivat Suomessa tutkimuskäyttöön viljeltyjä palkokasveja. Näytteinä olivat Viikin koetilalla kesällä 2010 kasvatetut 15 härkäpapulajiketta, 12 linssilajiketta ja 3 sinilupiinilajiketta. Näiden lisäksi tutkimusaineistoon kuului Mikkelissä samana kesänä kasvatetut 8 härkäpapulajiketta ja 3 sinilupiinilajiketta. Suurin osa lajikkeista oli alkujaan jalostettu Keski-Euroopassa (esimerkiksi Saksassa, Ranskassa, Itävallassa), mutta joukossa oli myös joitakin pohjoisemmista maista peräisin olevia lajikkeita (Suomesta, Virosta, Kanadasta). Viikissä sadonkorjuun ja näytteiden kuivaamisen suoritti puutarhatieteiden laitoksen opiskelija Clara Lizarazo elo-syyskuun aikana. Näytteet kerättiin lajikekohtaisista kunkin viljelmän neljästä eri kasvatusruudusta. Paloista irrotettiin siemenet ja ne säilytettiin pienissä pusseissa ilmatiiviisti pakastettuna  $-20\text{ °C}$ :ssa. Mikkelissä kasvatetut näytteet käsiteltiin samoin ja lähetettiin Helsingin Viikkiin analysoitaviksi.

Laadunvarmistukseen käytettiin kaupallista varmennettua vertailunäytettä BCR n°121 (Wholemeal flour), (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgia), jolle oli ilmoitettu sertifioitu folaattipitoisuus. Referenssimateriaali oli tullut yliopistolle 1.8.2008, pakkaus oli avattu 1.10.2009 ja sitä oli säilytetty  $-70\text{ °C}$ :ssa. Lisäksi toisena vertailunäytteenä käytettiin Myllyn Paras -täysjyväjauhoa, jota kutsuttiin in house -referenssiksi (laboratorion sisäinen vertailunäyte). Näyte oli ostettu tammikuussa 2009 ja säilytetty pakastettuna  $-20\text{ °C}$ :ssa.

## 5.3 Reagenssien valmistus

### 5.3.1 HK:n (hog kidney conjugase) valmistus

Mikrobiologiseen menetelmään tarvittavaa entsyymiä eristettiin ja puhdistettiin tuoreista sian munuaisista. Noin 800 g munuaisia pilkottiin pieniksi kuutioiksi ja homogenoitiin tehosekoittimella 1700 millilitrassa 10 mM 2-merkaptetaanoli-liuosta. Kun kaikki kuutiot olivat soseutuneet, liuoksen pH säädettiin viiteen 2,5 M etikkahapolla.

Homogenaatti jaettiin kahteentoista 250 ml:n putkeen, jotka sentrifugoitiin kahdessa erässä +4 °C:ssa 20 minuutin ajan kierrosnopeudella 9 000 rpm. Supernatantit kerättiin kahden litran dekanterilasiin ja inkuboitiin +50 °C:ssa vesihauteessa kaksi tuntia välillä sekoittaen. Tämän jälkeen liuos sentrifugoitiin uudestaan, supernatantti kerättiin talteen, ja sen tilavuus mitattiin mittalasilla.

Supernatantista saostettiin proteiinit ammoniumsulfaatilla välisaostusten kautta (0-30 % ja 30-50 %) 75 %:iin asti. Viimeisen saostuksen jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja sakka liuotettiin puskuriliuokseen (0,05 M natriumasetaattia ja 10 mM 2-merkaptoetanolia, pH 5). Liuotettu sakka siirrettiin noin 50 cm pitkiin dialyysiletkuihin, jotka upotettiin puskuriliuoksella täytettyyn suureen dekanterilasiin. Letkujen annettiin dialysoitua kylmiössä yön yli ja aamulla entsyymi pakattiin muutaman millilitran annoksina pakastimeen. Lopuksi elintarvikekemian osaston työntekijä testasi HK:n aktiivisuuden HPLC:llä. Testissä tunnettuun määrään pteroyylitriglutamaattia lisättiin HK:ta ja seurattiin pteroyylitriglutamaatin pilkkoutumista foolihapoksi (pteroyylimonoglutamaatiksi). Tämän perusteella voitiin arvioida folaattianalysissä yhtä näytettä kohden tarvittava määrä konjugaasia.

### 5.3.2 Muut entsyymit

Muut tarvittavat entsyymit valmistettiin kaupallisista jauheista liuottamalla. Sigma-Aldrichin valmistama *Aspergillus oryzae* -homeesta eristetty  $\alpha$ -amylaasi (EC 3.2.1.1, A-6211) liuotettiin pitoisuuteen 20 mg/ml 1 %:lla natriumaskorbaatilla. Liuos sekoitettiin huolellisesti magneettisekoittajalla, pakattiin noin 14 ml:n annoksina muovipulloihin ja säilytettiin pakastimessa -20 °C:ssa.

Proteaasi (EC 3.4.24.31, P-5147) oli *Streptomyces griseus* -bakteerista eristetty valmiste (Sigma-Aldrich), ja se laimennettiin pitoisuuteen 2 mg/ml 1 %:lla natriumaskorbaatilla. Proteaasiliuos pakattiin noin 25 ml:n annospulloihin ja säilytettiin -20 °C:ssa.

### 5.3.3 Kasvuvastebakteerin (*L. rhamnosus* ATCC 7469) esikasvatus ja kryopreservointi

Bakteerin kasvatusalusta valmistettiin Folic Acid Casei Medium -jauheesta (Difco) veteen liuottamalla. Alustaa kiehautettiin sähkölevyllä minuutti tai kunnes jauhe oli liuenut kokonaan. Alusta jäähdytettiin jäällä ja siihen lisättiin natriumaskorbaattia ja foolihappoa (PGA-pitoisuus 50 ng/100 ml). Liuoksen pH säädettiin etikkahapolla 6,1:een ja steriloitiin 0,2 µm:n ruiskusuodattimen läpi. Bakterikantaa (*L. rhamnosus*, ATCC 7469) lisättiin edellisestä valmistuserästä noin 85 µl alustaan ja inkuboitiin lämpöhäuteessa (+37 °C) yön yli.

Pakastusta varten valmistettiin 80 % glyseroliliuos ja steriloitiin se autoklavoimalla (121 °C:ssa 20 minuuttia). Yön yli inkuboituun bakteeriviljelmään lisättiin glyseroliliuosta ja se annosteltiin pakastimeen (-70 °C) kryoputkissa. Glyseroli suojeli bakteerisolua hajoamasta pakastuksen yhteydessä.

### 5.4 Näytteiden punnitus ja uutto

Sama menetelmä toistettiin useita kertoja, koska yhteen näytesarjaan mahtui vain noin 6-8 lajiketta. Kaikki tutkimuskohteena olleet lajikkeet analysoitiin vähintään kahtena rinnakkaisena näytteenä ja tulokset saivat erota toisistaan korkeintaan 10 %. Monista lajikkeista tehtiin myös useampia analyyseja. Jokaisen näytesarjan yhteydessä työn luotettavuutta tarkasteltiin referenssimateriaalin perusteella.

Saman lajikkeen kasvatusruutujen osanäytteet (R1-R4) yhdistettiin ja niiden annettiin tasaantua eksikaattorissa vähintään puoli tuntia. Siemenet jauhettiin 0,5 mm:n Retsch-seulalla homogeenisen näytematriisin saamiseksi. Uuttoputkiin punnittiin analyysiväällä tarkasti noin 1 g jauhettua palkokasvia. Yksi putki jätettiin tyhjäksi nollanäytettä varten. Jokaiseen näytteeseen lisättiin 12 ml uuttopuskuria (liite 1), jonka pH oli säädetty 7,85:een. Putkia tyytettiin 10-20 sekunnin ajan ennen korkin sulkemista hapettomien olosuhteiden saavuttamiseksi. Uuttoputkia keitettiin 10 minuuttia vesihäuteessä välillä ravistellen, jonka jälkeen putket siirrettiin jäihin.

### 5.5 Trientsyymikäsittely

Uuton jälkeen näytteiden pH säädettiin suolahapolla 4,9:ään ja niille tehtiin trientsyymikäsittely, jossa folaatit saatettiin menetelmän kannalta vaadittavaan muotoon. Putkiin lisättiin 1 ml HK:ta ja 1 ml  $\alpha$ -amylaasia, typetettiin ja asetettiin ravistelevaan +37 °C:n vesihauteeseen. Kolmen tunnin kuluttua näytteet otettiin pois vesihauteesta ja niiden pH nostettiin 7,0:ään kaliumhydroksidilla. Putkiin lisättiin 2 ml proteaasia, typetettiin ja inkuboitiin +37 °C:ssa vesihauteessa yhden tunnin ajan. Lopuksi entsyymit inaktivoitiin keittämällä putkia 5 minuuttia kiehuvässä vesihauteessa ja jäädytettiin huoneenlämpöiseksi jäällä.

### 5.6 Näytteiden ja standardin laimentaminen

Näytteet siirrettiin 50 ml:n mittapulloihin ja täytettiin merkkiin asti 0,5 %:lla natriumaskorbaatilla (pH 6,1). Laimentamista jatkettiin 10 ml:n mittapulloihin siten, että arvioitu folaattimäärä 100  $\mu$ l:ssa oli noin 10-40 pg. Pipetoitavat tilavuudet arvioitiin aiempien testianalyysien perusteella sopiviksi. Kaikista näytteistä tehtiin kaksi erisuuruista laimennosta ja lisäksi valmistettiin nollanäytteestä vastaavat laimennokset. Uutteiden ylimäärät pakastettiin mahdollisia uusintamäärityksiä varten.

Standardi (5-formyyli-tetrahydrofolaatti) laimennettiin näytteiden tavoin 0,5 % natriumaskorbaatilla siten, että pitoisuudeksi saatiin tarkasti noin 1000 pg/ml. Pitoisuus tarkastettiin aina standardierän valmistuksen yhteydessä ja siitä laskettiin kyseisen erän laimennustarve. Tässä työssä käytetty standardi (valmistettu huhtikuussa 2010) saatiin haluttuun pitoisuuteen pipetoimalla sitä 74  $\mu$ l 50 ml:aan ja siitä edelleen 2,5 ml 25 ml:aan.

### 5.7 Kasvatusalustan valmistus

Kasvatusalusta valmistettiin samasta Folic Acid Casei Medium -jauheesta (Difco) kuin kasvuvastebakteerin esikasvatusalusta. Kasvatusalusta tehtiin 75 %:n vahvuiseksi valmistajan suosituksesta, jolloin jauhetta liuotettiin 3,5 g 50 ml:n vettä. Alusta kiehautet-

tiin sähkölevyllä ja jäädytettiin jäällä. Alustaan lisättiin 0,35 mg askorbiinihappoa ja pH säädettiin etikkahapolla 6,1:een. Lopuksi liuos steriloitiin 0,2 µm:n ruiskusuodattimella. Aiemmin kasvatettua bakteerikanta (*L. rhamnosus*, ATCC 7469) haettiin kryoputkellinen pakastimesta (-70 °C) ja siirrostettiin steriiliin kertakäyttöputkeen, jossa oli 2,5 ml autoklavoitua saliinia (0,9 % NaCl). Tätä kasvuvastebakteeria sisältävää liuosta lisättiin 150 µl alustaan juuri ennen levyille pipetoimista.

### 5.8 Levytys, inkubointi ja mittaus

Näytteiden mittaaminen tapahtui 96-kuoppaisilta mikrotiitterilevyiltä. Jokaista standarditasoa ja näytelaimennosta pipetoitiin sama tilavuus neljään peräkkäiseen kuoppaan. Standardit ja nollanäyte pipetoitiin aina molemmille levyille ja lisäksi vertailunäyte vähintään kerran jokaista levytyskertaa kohden. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin yhteensä 300 µl liuosta, josta 100 µl oli standardi-, laimennus- tai näyteliuosta ja loput 200 µl kasvatusalustaa. Standardisuora muodostettiin pipetoimalla standardiliuosta neljän kuopan välein suurenevina tilavuuksina 0 µl:sta 80 µl:aan siten, että kukin kuoppa täydennettiin 100 µl:n tilavuuteen 0,5 % natriumaskorbaattiliuoksella. Nollanäytteen ja varsinäytteen näytteiden laimennoksia pipetoitiin aina 100 µl neljään peräkkäiseen kuoppaan. Lopuksi levyille lisättiin kahdeksankanavaisella pipetillä *L. rhamnosus* -bakteeria sisältävää kasvatusalustaa 200 µl kuhunkin kuoppaan. Prosessin havainnollistettu versio löytyy levytyskaaviona työn perässä olevasta liitteestä 2. Mikrotiitterilevyjä inkuboitiin +35 °C:ssa lämpökaapissa 17-18 tuntia.

Seuraavana aamuna kuoppien absorbanssit mitattiin spektrofotometrisesti kuoppalevylukijalla (Labsystems, Original Multiskan EX) aallonpituudella 595 nm. Absorbanssin määrä riippui *L. rhamnosuksen* aiheuttamasta kasvuvasteesta folaatille ja sitä verrattiin standardisuoran 5-formyyli-tetrahydrofolaatin aiheuttamaan kasvuvasteeseen. Mitä enemmän näytteessä oli folaattia, sitä suuremman vasteen se muodosti *L. rhamnosuksen* kanssa ja täten myös absorbanssi kasvoi verrannollisesti. Standardisuoran perusteella voitiin laskea näytteissä oleva folaatin määrä pikogrammin ja vähentää nollanäytteen aiheuttama taustan suuruus. Laimennuskertoimia apuna käyttäen voitiin laskea näytteille niiden kokonaisfolaattipitoisuudet (ng/g tai µg/100 g).

## 5.9 Kosteus - kuivapainomääritys

Mikrobiologisten kokeiden jälkeen jokaisen palkokasvilajikkeen kosteus- ja kuiva-ainepitoisuus selvitettiin gravimetrisellä haihdutusmenetelmällä. Menetelmässä oletettiin, että kaikki painohäviö johtui biologisesti aktiivisesta vedestä. Palkokasveissa ei tiettävästi ole merkittäviä määriä muita haihtuvia yhdisteitä. Haihdutus tapahtui +103 °C:ssa lämpökaapissa ja punnitusastioita käsiteltiin aina pihdeillä ja kangaskäsineillä sormenjälkien välttämiseksi. Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaismääritystä.

Jauhetut palkokasvinäytteet haettiin pakastimesta eksikaattoriin tasaantumaan. Kaikille näytteille merkittiin kaksi lasista punnitusastiaa, joita pidettiin ensin kannet avonaisena lämpökaapissa (+103 °C) yksi tunti ja sen jälkeen eksikaattorissa tarkasti noin puoli tuntia kannet suljettuina. Astiat kansineen punnittiin analyysivaaalla ja taarattuihin astioihin lisättiin tarkasti noin 1,5 g näytettä. Punnitusastioita pidettiin +103 °C:ssa kannet avonaisina yön yli. Seuraavana aamuna lämpökaapissa olleiden astioiden kannet suljettiin ennen eksikaattoriin siirtämistä. Astioiden annettiin tasaantua yhtä kauan kuin tyhjinä ennen punnitsemista. Näytteistä laskettiin kuiva-ainepitoisuudet vähentämällä haihdutettujen näyteastioiden massa tyhjän astian ja siihen lisätyn näytteen massojen summasta. Kosteus-kuivapainomäärityksen jälkeen palkokasvien folaattipitoisuudet voitiin ilmoittaa tuorepainoa (FM) ja kuivapainoa (DM) kohden.

## 5.10 Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografinen (UPLC) määritys

### 5.10.1 Näytteiden uutto, trientsyymikäsittely ja puhdistus

Folaattien vitameerimääritykseen valitut linssi-, härkäpapu- ja lupiininäytteet uutettiin ja trientsyymikäsiteltiin samalla tavalla kuin mikrobiologisessa menetelmässä. Trientsyymikäsittelyn jälkeen näytteet sentrifugoitiin kahdesti (10 000 rpm, 10 min) ja supernatantti otettiin talteen. Supernatantin tilavuus säädettiin 25 ml:aan 0,5 % natriumaskorbaatilla, jonka pH oli 6,1. Tämän jälkeen 20 ml näytettä puhdistettiin ja konsentroidtiin affiniteettikromatografisesti käyttämällä agarosigeelipylväitä, joihin oli lisätty folaattia

sitovaa proteiinia. (Kariluoto ym 2001.) Osa puhdistetusta näytteestä suodatettiin 0,2 µm:n ruiskusuodattimen läpi ja analysoitiin UPLC:lla.

### 5.10.2 UPLC-määritys

Nestekromatografinen määritys tehtiin UPLC-laitteistolla (Waters Aquity Ultra Performance Liquid Chromatography), johon oli liitetty UV-diodirivi- ja fluoresenssidetektorit, kolonniuuni, näytteensyöttöyksikkö ja binaarinen liuotinyksikkö. UV-detektori mitasi aallonpituusalueilta 290 ja 360 nm ja fluoresenssidetektorin viritys-/emissioarvot olivat 290/356 ja 360/460 nm. Laitteistossa käytettiin HSS T3 -kolonnia (2,1 mm x 150 mm; 1,8 µm), jonka lämpötila analyysin aikana oli 30 °C. Ajoliuksina käytettiin 30 mM kaliumdivetyfosfaattipuskuria (pH 2,2) ja asetonitriliä. Näytteitä injektoidiin 15 µl ja virtausnopeus folaattivitameerien erottumisen aikana oli vakio 0,4 ml/min. Gradienttiohjelmassa käytetyt ajoliuosten suhteelliset osuudet on esitetty liitteessä 3. Laitteiston ohjaukseen, tulosten keräykseen ja käsittelyyn käytettiin Waters Empower 2 -ohjelmaa.

### 5.10.3 Folaattivitameerien kvantitointi

Vitameerien kvantitointiin käytettiin ulkoisen standardin menetelmää, jossa pitoisuutta tarkasteltiin kromatogrammin piikin pinta-alan funktiona. Standardeina käytettiin tetrahydrofolaattia (H<sub>4</sub>), 5-metyyli-tetrahydrofolaattia (5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>), 5-formyyli-tetrahydrofolaattia (5-HCO-H<sub>4</sub>), 10-formyyli-dihydrofolaattia (10-HCO-H<sub>2</sub>), 5,10-metenyyli-tetrahydrofolaatti (5,10 CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>), 10-formyyli-foolihappoa (10-HCO-PGA) ja foolihappoa (PGA). (Kariluoto 2008.) Vitameeristandardeista valmistettiin standardiseos, jota puhdistettiin eri pitoisuuksina affiniteettikromatografisesti ja injektoidiin eri tilavuuksina UPLC:iin. Kullekin vitameerille määritettiin oma standardisuora, jonka avulla laskettiin näytteiden vitameeripitoisuudet.



### 5.11 Tilastollinen analysointi

Tilastollisten varianssianalyysien (ANOVA) avulla verrattiin palkokasvilajikkeiden kokonaisfolaattipitoisuuksia toisiinsa sekä kasvulajikkeen että -paikan suhteen. Mikäli varianssianalyysissä käytetty F-testiin perustuva p-arvo jäi alle 0,05, voitiin hypoteesi samansuuruisista keskiarvoista hylätä. Tulosten analysoinnissa käytettiin apuna PASW Statistics 17.0 -ohjelmaa. Tuloksista määritettiin myös kasvupaikkakohtaisesti keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellisen keskihajonta, mikä kuvaa yksittäisten tulosten poikkeamaa koko joukon keskiarvosta.

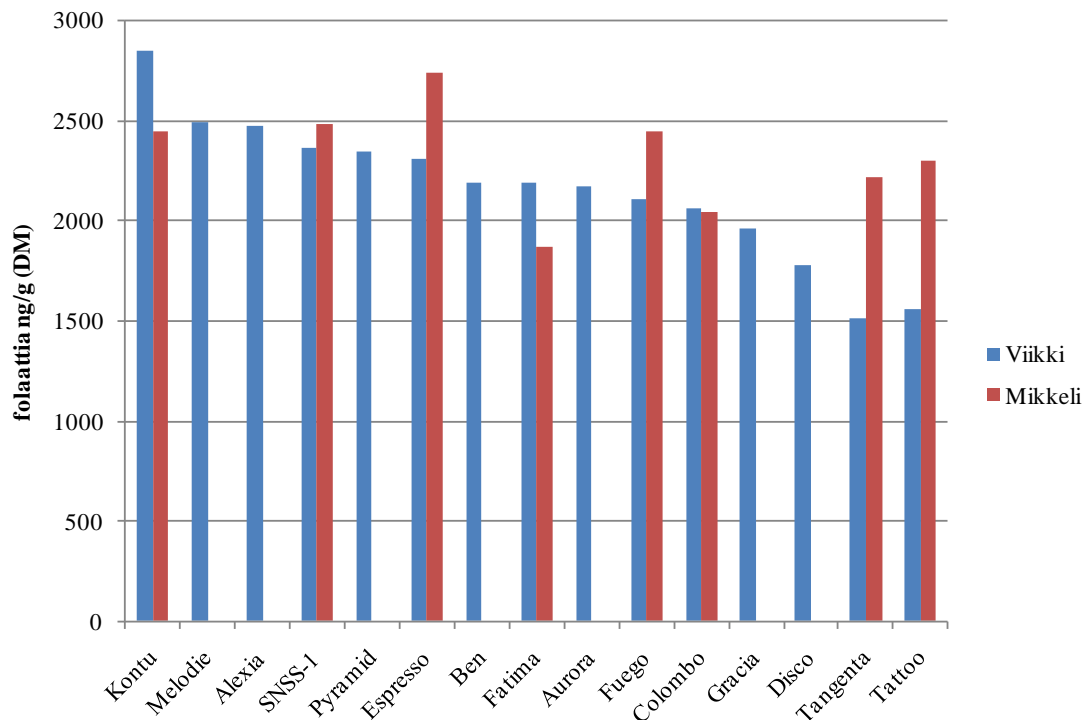
Yksisuuntaisten varianssianalyysien nollahypoteesina oletettiin, että valitussa joukossa kaikkien härkäpapu-, linssi- tai lupiinilajikkeiden folaattipitoisuudet ovat keskenään yhtä suuret. Tarkastelussa härkäpapu- ja lupiinilajikkeet jaettiin kahteen toisistaan riippumattomaan ryhmään kasvupaikan mukaan. Linssit muodostivat ainoastaan yhden ryhmän, koska niitä oli kasvatettu vain Viikissä.

Toisen varianssianalyysin nollahypoteesina oletettiin, että sekä Viikissä että Mikkelissä kasvatettujen härkäpapu- tai lupiinilajikkeiden folaattipitoisuudet ovat keskenään yhtä suuret. Tässä tarkastelussa huomioitiin härkäpavuista vain ne kahdeksan lajiketta (Kon-tu, SNSS-1, Espresso, Fatima, Fuego, Columbo, Tangenta ja Tattoo), jotka olivat kasvaneet molemmilla paikkakunnilla. Analyysissä verrattiin kahdeksaa Viikissä kasvatettua härkäpapulajiketta vastaaviin Mikkelissä kasvaneisiin lajikkeisiin ja tutkittiin lajikkeiden välistä yhdenvertaisuutta. Lupiineista kasvupaikan merkitystä voitiin tarkastella kaikista näytteistä, koska Viikissä ja Mikkelissä oli kasvatettu samat lajikkeet.

## 6 TULOKSET

### 6.1 Härkäpapujen folaattipitoisuudet

Tässä työssä tutkittiin yhteensä 23 härkäpapulajiketta, joista 15 oli kasvatettu Viikin koetilalla ja 8 Mikkeliissä. Tutkimuksen mukaan härkäpapujen folaattipitoisuus vaihteli välillä 1500-3000 ng/g kuivapainoa kohti (DM). Eniten folaattia oli Viikissä kasvatetussa Kontu-lajikkeessa (2848 ng/g DM). Folaattipitoisuudeltaan toiseksi suurin härkäpapulajike oli Mikkeliissä kasvatettu Espresso (2737 ng/g DM). Vähiten folaattia sisälsivät Viikissä kasvatetut Tattoo (1556 ng/g DM) ja Tangenta (1511 ng/g DM) -lajikkeet. Kaikkien tutkittujen härkäpapulajikkeiden folaattipitoisuudet kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvona on esitetty kuviossa 3. Työn liitteeseen 4 on lisäksi koottuna tulostaulukko yksittäisistä analyyseistä.



KUVIO 3. Viikissä ja Mikkeliissä kasvatettujen härkäpapujen kokonaisfolaattipitoisuudet (ng/g DM) lajikkeittain

Viikissä kasvatettujen härkäpapulajikkeiden folaattipitoisuudet erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ( $p < 0,05$ ). Viikin näytteistä suurin folaattipitoisuus (2848 ng/g DM) oli Kontu-lajikkeella ja pienin (1511 ng/g DM) Tangenta-lajikkeella. Näiden kes-

kinäinen ero oli lähes kaksinkertainen, mikä kertoi lajikkeiden välisestä erittäin suuresta vaihtelusta. Samoin myös Mikkelissä kasvatettujen lajikkeiden folaattipitoisuudet erosivat keskenään tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Siellä suurin folaattipitoisuus oli Espresso-lajikkeella (2737 ng/g DM) ja pienin Fatima-lajikkeella (1875 ng/g DM). Tämä osoitti Mikkelissä kasvaneilla härkäpavuilla olevan lähes yhtä suurta folaattipitoisuuden vaihtelua kuin Viikin näytteissä.

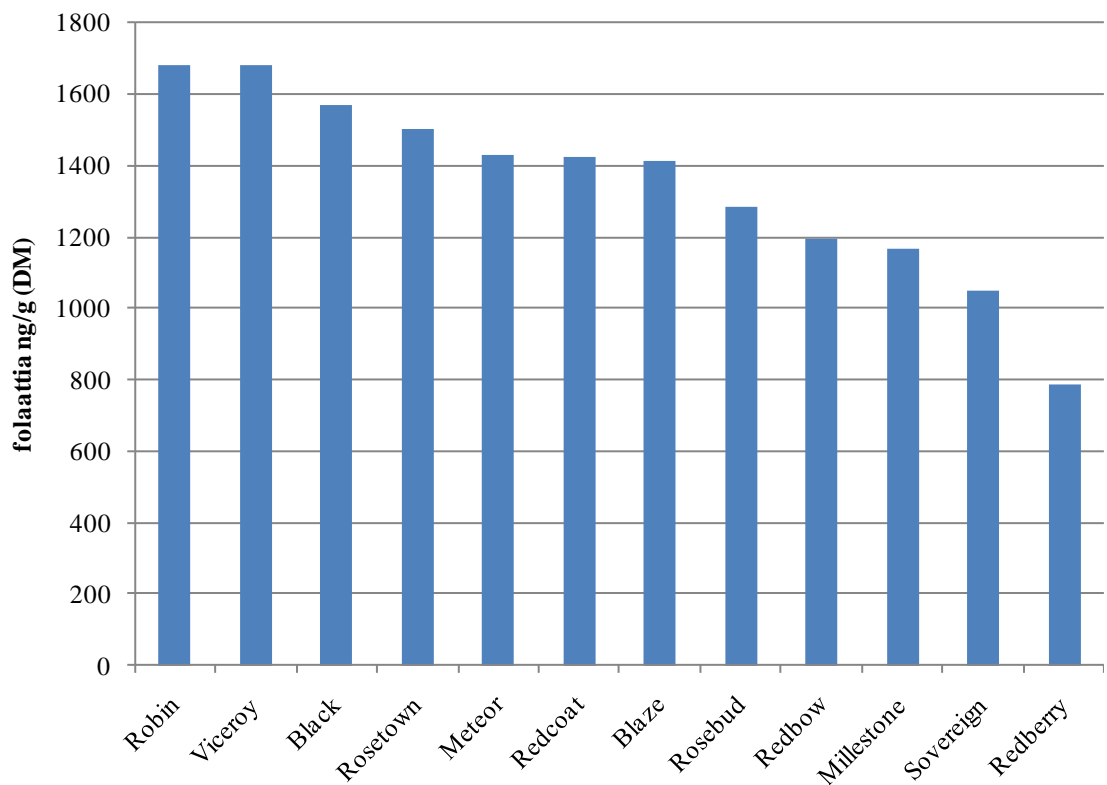
Tulosten perusteella voitiin todeta molemmissa paikoissa kasvatettujen härkäpapulajikkeiden folaattipitoisuuksien eroavan tilastollisesti merkitsevästi toisistaan sekä kasvu- paikan että -lajikkeen suhteen ( $p < 0,05$ ). Tutkimuksen mukaan ei siis voida olettaa, että saman lajikkeen folaattipitoisuus olisi yhtä suuri Viikissä ja Mikkelissä kasvatettuna. Esimerkiksi Viikissä kasvaneessa Tattoo-lajikkeessa oli folaattia vain 1556 ng/g (DM), kun saman lajikkeen pitoisuus Mikkelissä oli 2303 ng/g (DM). Tutkimuksen mukaan ei voida myöskään olettaa, että Viikissä ja Mikkelissä kasvaneiden kahdeksan härkäpapulajikkeen muodostamien ryhmien keskimääräiset folaattipitoisuudet olisivat yhtä suuret. Viikissä kahdeksan härkäpapulajikkeen keskiarvo oli 2120 ng/g (DM) ja keskihajonta 430 ng/g, josta edelleen suhteellinen keskihajonta 20 %. Vastaavasti Mikkelissä kasvaneiden lajikkeiden keskiarvo oli 2318 ng/g (DM), keskihajonta 270 ng/g ja suhteellinen keskihajonta 12 %. Härkäpapujen kokonaisfolaattipitoisuus oli keskimäärin 200 ng/g suurempi Mikkelissä ja siellä kasvaneiden lajikkeiden suhteellinen keskihajonta oli huomattavasti pienempi Viikin näytteisiin verrattuna. Taulukossa 3 on esitetty Viikissä ja Mikkelissä kasvaneiden kahdeksan lajikkeen kokonaisfolaattipitoisuudet.

TAULUKKO 3. Viikissä ja Mikkelissä kasvaneiden härkäpapulajikkeiden folaattipitoisuudet (ng/g DM)

Lajike	Viikki (ng/g DM)	Mikkeli (ng/g DM)
Kontu	2847,8	2444,5
SNSS-1	2369,4	2483,8
Espresso	2312,1	2736,7
Fatima	2187,2	1875,1
Fuego	2112,4	2443,7
Columbo	2065,3	2041,6
Tangenta	1510,8	2215,0
Tattoo	1556,0	2303,3

## 6.2 Linssien folaattipitoisuudet

Tutkimusaineisto koostui 12 Viikin koetilalla kasvaneesta linssilajikkeesta. Tulosten mukaan linssien folaattipitoisuus vaihteli välillä 700-1700 ng/g kuivapainoa kohden (DM). Folaattipitoisuudeltaan suurin linssi oli Robin-lajike (1682 ng/g DM) ja vähiten folaattia oli Redberry-lajikkeessa (785 ng/g DM). Tämän tutkimuksen kaikkien linssien kokonaisfolaattipitoisuuksien keskiarvo oli 1335 ng/g (DM), keskihajonta 258 ng/g ja suhteellinen keskihajonta 19 %. Tutkittujen linssien kokonaisfolaattipitoisuudet kuivapainoa kohden on esitetty lajikekohtaisesti kuviossa 4. Lisäksi työn liitteessä 4 on taulukoituna tulosaineisto yksittäisten analyysien osalta.



KUVIO 4. Linssilajikkeiden kokonaisfolaattipitoisuudet (ng/g DM)

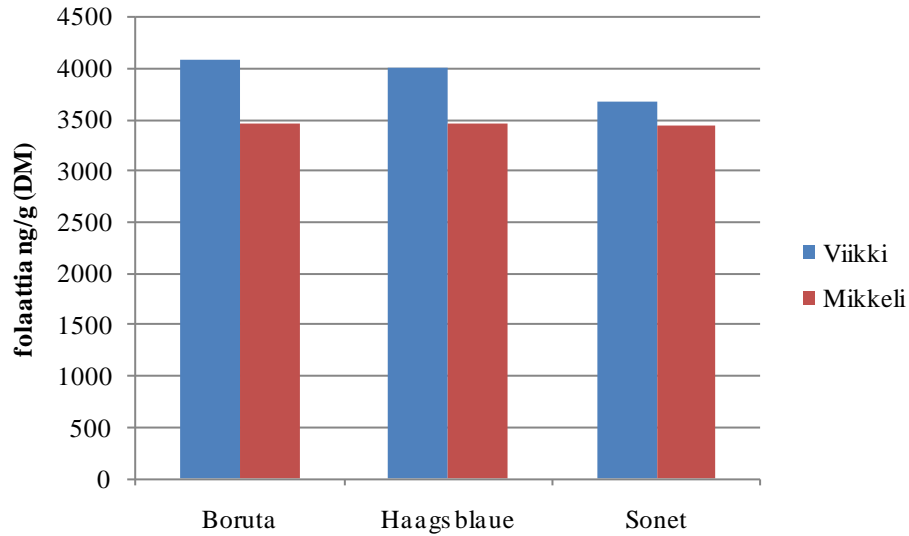
Tilastollisten analyysien perusteella linssilajikkeiden folaattipitoisuudet erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ( $p < 0,05$ ). Folaattipitoisuudeltaan suurimman ja pienimmän linssilajikkeen välillä oli lähes 2,5-kertainen ero. Tutkimuksen mukaan kasvulajikkeella on suuri merkitys linssin kokonaisfolaattipitoisuuteen.

### 6.3 Lupiinien folaattipitoisuudet

Tarkastelukohteena oli yhteensä kuusi sinilupiininäytettä, joista kolme oli kasvatettu Viikissä ja kolme Mikkelissä. Näytejoukossa oli kolme eri sinilupiinilajiketta (Haags blaue, Boruta, Sonet) ja ne kaikki olivat kasvaneet molemmilla paikkakunnilla. Folaattipitoisuus oli suurin Viikissä kasvatetussa Borutassa (4077 ng/g DM) ja vähiten folaattia oli saman lajikkeen Mikkelissä kasvatetussa näytteessä (3246 ng/g DM).

Viikissä kasvaneiden kolmen lupiinilajikkeen folaattipitoisuuksien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ( $p > 0,05$ ). Myöskään Mikkelissä kasvaneiden lupiinilajikkeiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ( $p > 0,05$ ). Voitiin siis todeta, että aina-kaan samalla alueella kasvatettujen lupiinilajikkeiden folaattipitoisuus ei riippunut juurikaan lajikkeesta.

Vertailtaessa Viikissä kasvaneita lupiininäytteitä Mikkelissä kasvaneisiin näytteisiin voitiin todeta kasvupaikan vaikuttavan tilastollisesti merkitsevästi folaattipitoisuuden suuruuteen ( $p < 0,05$ ). Viikissä kasvaneiden kolmen lajikkeen folaattipitoisuuksien keskiarvo oli 3985 ng/g (DM) ja keskihajonta 165 ng/g, josta suhteellinen keskihajonta oli 4 %. Mikkelissä kasvatettujen samojen lajikkeiden keskiarvo oli 3422 ng/g (DM), keskihajonta 169 ng/g ja suhteellinen keskihajonta 5 %. Samojen lupiinilajikkeiden kokonaisfolaattipitoisuus oli keskimäärin 560 ng/g suurempi Viikissä kasvatettuna. Kaikkien lupiinilajikkeiden keskinäinen hajonta oli pientä verrattuna linsseihin ja härkäpapuihin. Kaikkien tutkittujen näytteiden kokonaisfolaattipitoisuudet on esitetty kuviossa 5 ja lisäksi tulokset on taulukoituna työn liitteessä 4.



KUVIO 5. Viikissä ja Mikkeliissä kasvatettujen lupiinilajikkeiden kokonaisfolaattipitoisuudet (ng/g DM)

#### 6.4 Vitameerijakaumat

Mikrobiologisten määritysten jälkeen jokaisesta lajista valittiin folaattipitoisuudeltaan suurin ja pienin lajike vitameerijakauman analysointiin UPLC-menetelmällä (taulukko 4). Valintahetkellä härkäpavujen tuloksissa oli pieni laskuvirhe, jonka vuoksi edellä kuvatusta säännöstä poiketen vitameerijakauma tutkittiin Tattoo-lajikkeesta, vaikka Tangentan kokonaisfolaattipitoisuus olisi ollut 45 ng/g pienempi.

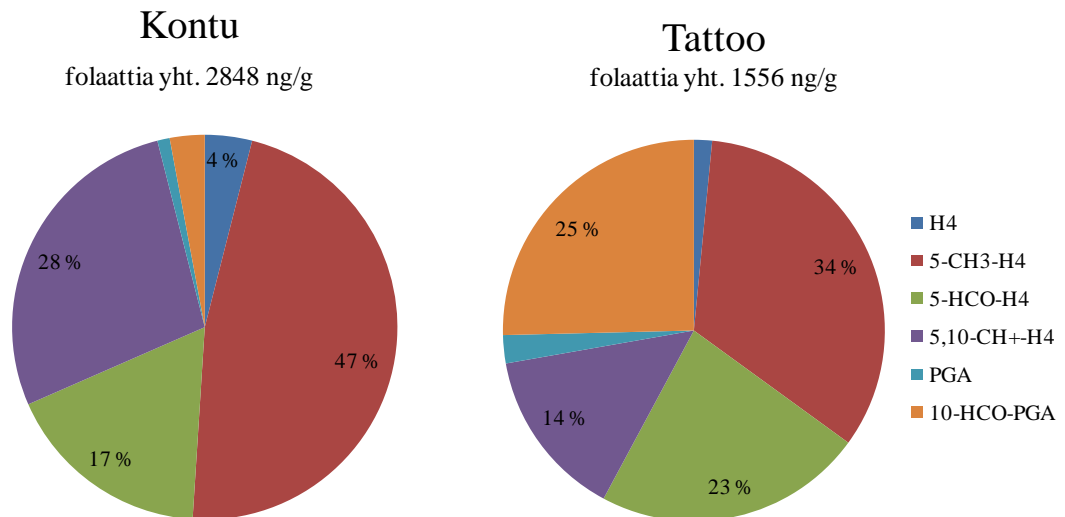
TAULUKKO 4. UPLC-analyysiin valitut palkokasvilajikkeet

Laji	Pienin folaattipitoisuus	Suurin folaattipitoisuus
Härkäpavut	Tattoo	Kontu
Linssit	Redberry	Robin
Lupiinit	Boruta (Viikki)	Boruta (Mikkeli)

#### 6.4.1 Härkäpapujen vitameerijakauma

UPLC-analyysin perusteella Kontu-lajikkeen folaattipitoisuus oli jakautunut lähinnä kolmen vitameerin kesken. Lähes puolet folaattikoostumuksesta (47 %) muodostui 5-metyylitetrahydrofolaatista, noin 28 % oli 5,10-metenyylitetrahydrofolaattia ja noin 17 % 5-formyylitetrahydrofolaattia. Muiden vitameerien osuudet olivat verrattain pieniä.

Tattoo-lajikkeen sisältämä folaatti jakautui pääosin neljän eri vitameerin kesken. Kontun tavoin Tattoo sisälsi eniten (33 %) 5-metyylitetrahydrofolaattia. Vitameerijakauma oli kuitenkin selvästi tasaisempi, sillä 10-formyylifoolihappoa (25 %) ja 5-formyylitetrahydrofolaattia (22 %) oli keskenään lähes saman verran ja lisäksi vielä 5,10-metenyylitetrahydrofolaattia oli noin 14 %. Huomattavin ero lajikkeiden vitameerijakaumassa oli 10-formyylifoolihapon esiintyminen. Kontu-lajikkeessa 10-formyylifoolihappoa oli vain noin 3 %, kun Tattoossa samaa vitameeria oli 25 %. Kuviossa 6 on esitetty molempien lajikkeiden vitameerijakaumat suhteellisina osuuksina kokonaisfolaattipitoisuudesta.



KUVIO 6. Vitameerien suhteelliset osuudet Kontu- ja Tattoo-lajikkeiden kokonaisfolaattipitoisuuksista (H4 tetrahydrofolaatti; 5-CH3-H4 5-metyylitetrahydrofolaatti; 5-HCO-H4 5-formyylitetrahydrofolaatti; 5,10-CH+-H4 5,10-metenyylitetrahydrofolaatti; PGA foolihappo; 10-HCO-PGA 10-formyylifoolihappo)

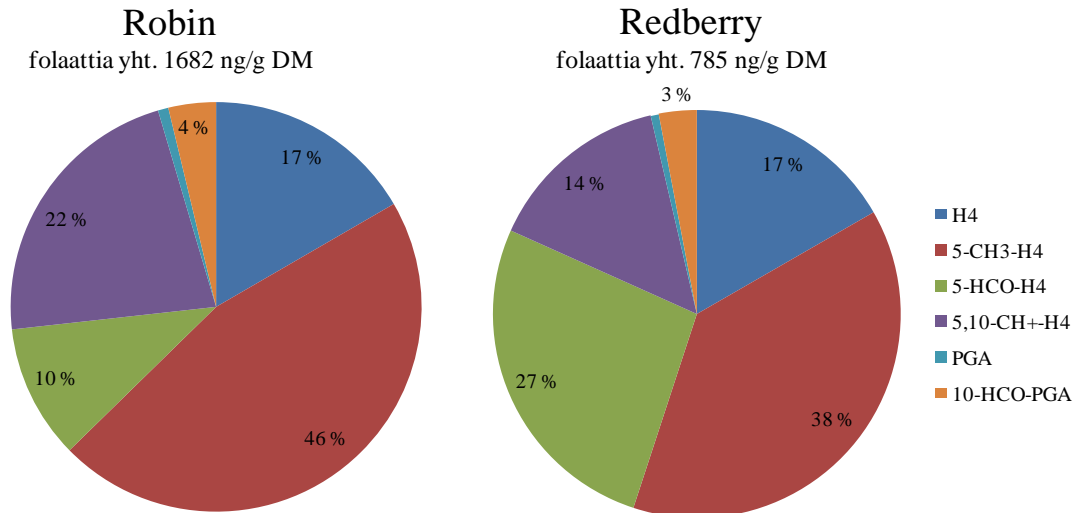
## 6.4.2 Linssien vitameerijakauma

Linssien vitameerijakaumien vertailuun valittiin Robin- ja Redberry-lajikkeet. UPLC-analyysin perusteella molemmat näytteet sisälsivät kaikkia tutkittuja vitameerejä. Robin-lajikkeen kokonaisfolaattipitoisuudesta lähes puolet (46 %) oli 5-metyylitetrahydrofolaattia. Lisäksi lajikkeen folaattikoostumuksesta 22 % oli 5,10-metenyylietrahydrofolaattia, 17 % tetrahydrofolaattia ja 11 % 5-formyylietrahydrofolaattia. Selvästi pienemmät osuudet Robin-lajikkeessa oli 10-formyylifoolihappoa (4 %) ja foolihappoa (alle 1 %).

Redberry-lajikkeen sisältämät suurimmat folaattiosuudet olivat jakautuneet Robin-lajikkeen kanssa samoihin vitameereihin. Prosentuaalisesti Redberry-lajikkeessa oli eniten (38 %) 5-metyylitetrahydrofolaattia ja toiseksi eniten 5-formyylietrahydrofolaattia (27 %). Tetrahydrofolaatin osuus (17 %) ja 5,10-metenyylietrahydrofolaatin osuus (15 %) olivat keskenään lähes yhtä suuret.

Linssilajikkeiden vitameerijakaumia vertailtaessa niistä löytyi joitakin yhtäläisyyksiä: molempien kohdalla tetrahydrofolaatin osuus lajikkeen kokonaisfolaattipitoisuudesta oli yhtä suuri (noin 17 %) ja 10-formyylifoolihappoa molemmissa oli erittäin vähän. Huomattavin ero lajikkeiden vitameerijakaumissa ilmeni 5-formyylietrahydrofolaatin ja 5,10-metenyylietrahydrofolaatin välillä. Robin-lajikkeen kokonaisfolaattipitoisuudesta 5,10-metenyylietrahydrofolaatin osuus oli kaksinkertainen verrattuna 5-formyylietrahydrofolaattiin ja Redberry-lajikkeessa taas 5-formyylietrahydrofolaatin osuus oli kaksinkertainen 5,10-metenyylietrahydrofolaattiin verrattuna. Molempien lajikkeiden vitameerijakaumat ovat havainnollistettuina kuviossa 7 suhteellisina osuuksina kokonaisfolaattipitoisuuksista.





KUVIO 7. Vitameerien suhteelliset osuudet Robin- ja Redberry-lajikkeiden kokonaisfolaatipitoisuuksista (H4 tetrahydrofolaatti; 5-CH3-H4 5-metyylitetrahydrofolaatti; 5-HCO-H4 5-formyyliitetrahydrofolaatti; 5,10-CH+-H4 5,10-metenyyliitetrahydrofolaatti; PGA foolihappo; 10-HCO-PGA 10-formyylifoolihappo)

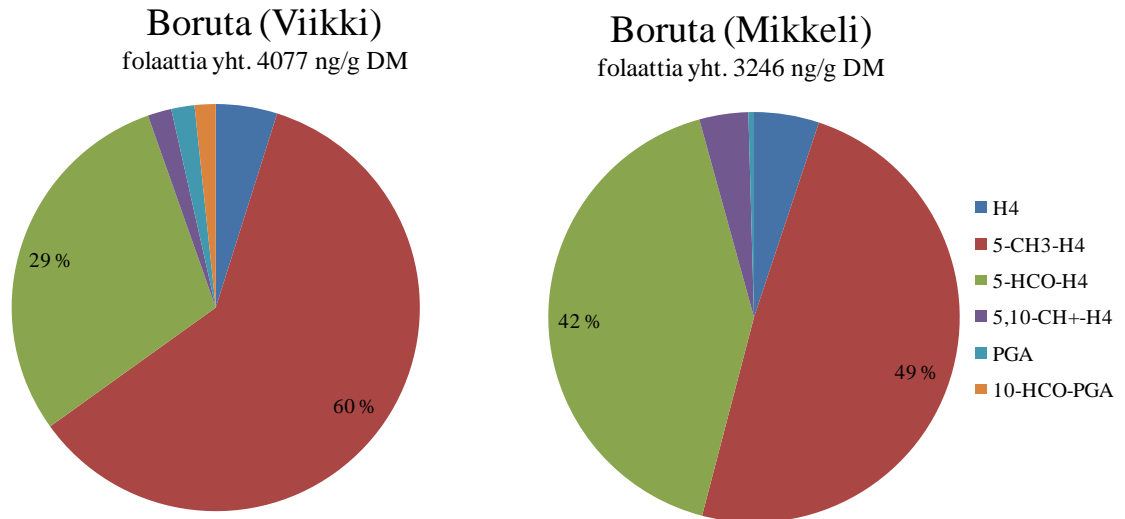
#### 6.4.4 Lupiinien vitameerijakauma

Lupiinien vitameerijakauma analysoitiin UPLC-menetelmällä sekä Viikissä että Mikkelissä kasvaneista Boruta-lajikkeista. Molemmissa folaatit jakautui pääosin kahden vitameerin kesken. Viikissä kasvaneen Boruta-lajikkeen kokonaisfolaatista yli puolet (60 %) oli 5-metyylitetrahydrofolaattia ja noin 30 % 5-formyyliitetrahydrofolaattia. Muista tutkituista vitameereistä tetrahydrofolaattia oli noin 5 % ja lopuilla suhteellinen osuus oli alle kaksi prosenttia.

Mikkelissä kasvaneessa Borutassa folaatit oli jakautunut samoihin vitameereihin kuin Viikin näytteessä, kuitenkin hiukan tasaisemmin. 5-metyylitetrahydrofolaattia oli kokonaisfolaatista 49 % ja 5-formyyliitetrahydrofolaatin osuus oli 42 %. Lisäksi tetrahydrofolaattia oli noin 5 % ja 5,10-metenyyliitetrahydrofolaattia 4 %. 10-formyylifoolihappoa tai foolihappoa ei Mikkelissä kasvaneessa näytteessä esiintynyt lainkaan.

Lupiineissa oli tutkimuksen mukaan havaittavissa kaksi selvästi dominoivaa vitameeriä: folaatit koostui lähes yksinomaan 5-metyylitetrahydrofolaatista ja 5-formyyliitetrahydrofolaatista. Viikissä kasvaneen näytteen kokonaisfolaatipitoisuus oli lähes 1000 ng/g suurempi verrattuna vastaavaan Mikkelissä kasvaneeseen. Viikin näyt-

teessä 5-metyylitetrahydrofolaatin suhteellinen osuus kokonaisfolaattipitoisuudesta oli kaksinkertainen verrattuna 5-formyyliitetrahydrofolaattiin, mutta Mikkelin näytteessä ero oli vain noin 1,2-kertainen 5-metyylitetrahydrofolaatin hyväksi. Kuviossa 8 on esitetty vitameerijakaumat suhteellisina osuuksina sekä Viikissä että Mikkelissä kasvatetuista Boruta-lajikkeista.



KUVIO 8. Folaattivitameerien suhteelliset osuudet Viikissä ja Mikkelissä kasvatetuissa Boruta-lajikkeissa (H4 tetrahydrofolaatti; 5-CH3-H4 5-metyylitetrahydrofolaatti; 5-HCO-H4 5-formyyliitetrahydrofolaatti; 5,10-CH+-H4 5,10-metenyyliitetrahydrofolaatti; PGA foolihappo; 10-HCO-PGA 10-formyyli foolihappo)

## 7 POHDINTA

Tässä tutkimuksessa haluttiin saada tietoa palkokasvien folaattipitoisuuksista. Tutkimus oli osa Helsingin Yliopiston elintarvikekemian osastolla toteutettavaa laajempaa folaattitutkimusta ja tämä opinnäytetyö toimi lähtökohtana jatkotutkimuksille. Tarkoituksena oli kvantitatiivisesti tutkia härkäpapu-, linssi- ja lupiinilajikkeiden kokonaisfolaattipitoisuuksia mikrobiologisella menetelmällä ja lisäksi selvittää erikseen valittujen näytteiden vitameerijakauma nestekromatografisella menetelmällä. Tämän tutkimuksen Viikin koetilalla kasvatetut näytteet oli ensisijaisesti tarkoitettu puutarhatieteiden laitoksen omaa tutkimuskäyttöä varten, mutta niistä syntyi samalla mielenkiintoinen ja sopiva aineisto myös folaattitutkimukseen elintarvikekemian osastolle.

Folaattipitoisuuden määrittäminen elintarvikkeista on tärkeää, koska folaatin saanti on yleisesti puutteellista ja sen tarkkaa saantia ravinnosta on ollut vaikea laskea vähäisten tutkimustulosten takia. Elintarvikkeiden folaattitutkimus auttaa selvittämään myös vitamiinin kliinisiä vaikutuksia elimistössä, kun ihmisten päivittäinen tarve ja saanti ravinnosta osataan määrittää tarkasti. Palkokasvien käyttö on runsasta tietyillä itäisillä ja eteläisillä alueilla, mutta niiden kulutusta lienee mahdollista ja toivottavaa lisätä myös esimerkiksi Skandinaviassa ja muissa kehittyneissä länsimaissa.

Palkokasveista härkäpapujen ja linssien folaattipitoisuuksia on aiemmin tutkittu vain vähän. Lupiinin sisältämistä B-vitamiineista on tutkittu vain tiamiinia (B<sub>1</sub>), riboflaviinia (B<sub>2</sub>) ja niasiinia (B<sub>3</sub>), mutta sen sisältämistä folaateista ei ole tietoa missään aikaisemmassa julkaisussa. (Ervas ym 2004). Palkokasveja on tutkittu aiemmin paljon esimerkiksi makroravintoaineiden osalta ja ne tunnetaan hyvänä kasviproteiininlähteenä. Tässä tutkimuksessa osoitettiin palkokasveissa esiintyvän myös muita tärkeitä ravinnonkomponentteja. Härkäpavut, linssit ja lupiinit sisälsivät merkittävän määrän folaattia.

Finelin (2010) mukaan säilöttyjen härkäpapujen folaattipitoisuus on 145 µg/100 g ja säilöttyjen linssien 110 µg/100 g HPLC-menetelmällä analysoituna. Odotukset tämän tutkimuksen härkäpapu- ja linssiaineiston sisältämästä folaatista perustuivat aikaisemmin julkaistuihin tilastoihin. Lupiinin folaattipitoisuudesta ei ollut aiempia tutkimustuloksia, joten siitä haluttiin saada uutta tietoa. Lupiinin odotettiin sisältävän muiden pal-

kokosvien tapaan runsaasti folaattia. Tulokset täyttivät odotukset ja kokonaisfolaattipitoisuudet osoittautuivat jopa arvioitua suuremmiksi.

Tässä työssä tutkituista lajeista lupiini sisälsi keskimäärin selvästi eniten folaattia (noin 370 µg/100 g). Toiseksi eniten folaattia oli härkäpavuissa (noin 222 µg/100 g) ja vähiten linsseissä (noin 134 µg/100 g). Lajien välisessä vertailussa on kuitenkin huomioitava erot näytteiden lukumäärissä. Esimerkiksi lupiineja oli yhteensä vain 6 lajikenäytettä, kun taas härkäpapuja oli 23 lajiketta. Tästä johtuen ryhmien väliset tulokset eivät ole vertailukelpoisia toistensa kanssa.

Finelin (2010) mukaan eniten folaattia sisältäviä elintarvikkeita ovat sian, broilerin, poron ja naudän maksa sekä hiiva, joissa kaikissa folaattia on noin 1000-1500 µg/100 g. Tuoreista kasviksista Finelin mukaan folaattia on eniten pinaatissa (194 µg/100 g), parsassa (175 µg/100 g) ja persiljassa (170 µg/100 g). Nykyisin kasviksia ja täysjyvätuotteita pidetään tärkeimpänä folaatin lähteenä ihmisen ravinnossa. Tämän työn perusteella lupiinin folaattipitoisuus (noin 134 µg/100 g) on kuitenkin varsin suuri verrattuna edellä mainittuihin tuotteisiin, joissa folaattia on noin 50-30 µg/100 g.

Härkäpavut ja linsit sisälsivät myös kasvikunnan tuotteiksi runsaasti folaattia. Tämän työn perusteella härkäpapujen keskimääräinen folaattipitoisuus oli 222 µg/100 g, eli 77 µg suurempi kuin Finelin (2010) ilmoittama vastaava arvo. Tämän tutkimuksen linsseissä keskimääräinen folaattipitoisuus (134 µg/100 g) oli 14 µg suurempi kuin Finelin ilmoittama arvo. Tässä työssä saadut suuremmat tulokset saattoivat johtua siitä, että Finelin taulukko oli laadittu HPLC-analytiikan perusteella ja tässä työssä kokonaisfolaattipitoisuus määritettiin mikrobiologisella menetelmällä. Nestekromatografisilla menetelmillä saadut tulokset ovat osoittautuneet myös muissa tutkimuksissa mikrobiologisesti analysoituja arvoja pienemmiksi (Silvennoinen 2010, 69). Lisäksi näytteiden säilytyksellä ja esikäsittelyllä on vaikutusta folaatin irtoamiseen matriisista sekä sen rakenteelliseen stabiilisuuteen.

Tässä työssä saatujen tulosten perusteella nähtiin härkäpavuilla ja linsseillä olevan lajikkeiden välistä suurta vaihtelua. Molempien kohdalla lajikkeella oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus kokonaisfolaattipitoisuuteen. Härkäpavuilla ero suurimman ja pienimmän lajikkeen välillä oli lähes kaksinkertainen ja linsseillä jopa 2,5-kertainen. Viikissä

kasvaneiden härkäpapulajikkeiden ja linssien suhteellinen keskihajonta oli molemmilla noin 20 %. Härkäpavuista kaikkein eniten folaattia sisälsi Kontu-lajike, joka oli alkupe-  
räisin jalostettu Suomessa. Tämä viittaisi kasvuolosuhteiden vaikuttavan kasvin vita-  
miinisisältöön, sillä suomalainen lajike oli jalostettu todennäköisesti viileään ilmastoon  
sopeutuvaksi. Jalostusalkuperältään ulkomaalaiset lajikkeet menestyivät kuitenkin myös  
hyvin suomalaisissa kasvuolosuhteissa, sillä esimerkiksi Mikkelin aineistosta Kontu-  
lajike oli folaattipitoisuudeltaan vasta neljänneksi suurin kahden Saksassa ja yhden Ka-  
nadassa jalostetun lajikkeen jälkeen.

Viikissä ja Mikkelissä kasvaneissa härkäpavuissa oli kahdeksan samaa lajiketta. Tilas-  
tollisten analyysien perusteella härkäpapujen kokonaisfolaattipitoisuudet näiden kesken  
erosivat tilastollisesti merkitsevästi sekä kasvupaikan että -lajikkeen suhteen. Mikkelis-  
sä tuotettujen näytteiden folaattipitoisuuksien keskiarvo oli 20 µg/100 g suurempi kuin  
Viikissä. Aineiston kahdeksasta härkäpapulajikkeesta viidellä oli suurempi folaattipi-  
toisuus Mikkelissä ja kolmella lajikkeella Viikissä. Kasvupaikan vaikutuksen syytä ei  
voida tämän tutkimuksen mukaan yhdistää suoraan esimerkiksi alueelliseen ilmastoon  
tai maaperän laatuun, koska kyseisistä muuttujista ei ollut tilastoituja tietoja. Erot ai-  
neiston folaattipitoisuuksissa saattoivat johtua esimerkiksi siementen laadusta, kasvin  
ikätyksestä tai sadonkorjuusta. Pyrkimyksenä oli tehdä viljely- ja kasvatustyö molem-  
milla paikkakunnilla samalla tavalla, mutta pieniä eroja on voinut tapahtua.

Mikkelissä kasvaneiden härkäpapulajikkeiden osalta suhteellinen keskihajonta oli 10 %,  
kun se Viikissä oli noin 20 %. Tämän aineiston mukaan Mikkelissä kasvaneiden härkä-  
papulajikkeiden folaattipitoisuuden vaihtelu oli siis selvästi pienempää. Viikissä kasva-  
neista lajikkeista Tattoo ja Tangenta olivat folaattipitoisuudeltaan muuta tasoa selvästi  
alhaisempia. Nämä alensivat Viikin aineiston folaattipitoisuuden keskiarvoa kokonai-  
suutena sekä lisäsivät keskihajontaa. Mikkelissä Tattooon ja Tangentan folaattipitoisuu-  
det eivät poikenneet muiden näytteiden tasosta samalla tavalla.

Tämän tutkimuksen mukaan lupiinit sisälsivät runsaasti folaattia (keskimäärin 370  
µg/100 g), mikä puoltaa niiden arvoa tulevaisuuden ravintokasvina. Kolmea eri lu-  
piinilajikkeita viljeltiin sekä Viikissä että Mikkelissä. Kummassakaan paikassa lajik-  
keella ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa näytteen kokonaisfolaattipitoisuuteen ja  
suhteellinen keskihajontakin jäi alle 5 %:n. Sen sijaan kasvupaikka vaikutti tilastollisesti

merkitsevästi lajikkeiden kokonaisfolaattipitoisuuteen. Kaikkien lajikkeiden folaattipitoisuus oli suurempi Viikissä ja ero Mikkelin näytteisiin oli keskimäärin 50 µg/100 g. Tarkkoja tilastoja ilmastollisista eroista tai kasvumaan koostumuksesta Viikin ja Mikkelin lupiiniviljelmien osalta ole tiedossa, mutta Viikin eteläisempi sijainti voi mahdollistaa pidemmän kasvukauden ja paremman kypsymisen. Syitä kasvupaikan vaikutuksesta lupiinin folaattipitoisuuteen tulisi vielä tutkia laajemmalla aineistolla ja useampana vuonna. Kesä 2010 oli koko Suomessa poikkeuksellisen lämmin ja kuiva, mikä aiheutti haasteita kasvinviljelylle.

Lupiinia tullaan mahdollisesti käyttämään tulevaisuudessa suomalaisena rehuraaka-aineena ja ihmisravintona. Lupiinijauho olisi ravintorikasta raaka-ainetta korvaamaan ulkomaalaista soijaa ja lupiini sopisi myös hyvin täydentämään gluteenittomia jauhoseoksia. Taulukkoon 5 olen laskenut esimerkkimallin lupiinijauholisän vaikutuksesta leipätaikinan folaattipitoisuuteen. Käytettyjen jauhotuotteiden folaattipitoisuudet perustuvat Finelin (2010) antamiin tietoihin sekä lisäksi 1 dl jauhoja on oletettu painavan 65 g ja taikinaerästä tulevan 25 sämpylää. Tietoa lupiinijauhon tiheydestä ei ollut saatavilla, mutta 20 %:n lisättävä osuus suhteutettiin varsinaisen leipäjauhon massaan. Esimerkin tapauksessa yhden sämpylän folaattipitoisuus voi nousta jopa viisi kertaa suuremmaksi lupiinijauholisän ansiosta.

TAULUKKO 5. Esimerkkejä lupiinijauhon vaikutuksesta leivän folaattipitoisuuteen, kun noin 20 % jauhoista korvataan lupiinilla (folaattia 370 µg/ 100 g)

FOLAATTIA	sämpyläjauho	vehnäjäuho	glut. jauhoseos
100g jauhoa	41,8µg	17µg	23,4µg
0,5 l:n leipätaikina (10 dl eli noin 650g jauhoja)	271,7µg	110,5µg	152,1µg
0,5 l:n leipätaikina (130 g jauhoista korvataan lupiinijauholla)	698,4µg	569,4µg	602,7µg
1 sämpylä normaalitaikinasta	10,9µg	4,4µg	6,1µg
1 sämpylä lupiinia sisältävästä taikinasta	27,9µg	22,8µg	24,1µg

Erinomaisesta ravintoarvosta huolimatta lupiinin käyttö elintarviketeollisuudessa pelottaa monia sen sisältämien mahdollisten allergeenien takia. Joissakin suomalaisissa leipomossa lupiinijauhon käyttömahdollisuuksia on jo harkittu, mutta sitä vastustetaan allergisoivien vaikutusten takia. Lupiinijauhon lisääminen tuotteeseen edellyttäisi merkintää pakkausselosteeseen ja sen olisi vaarana sekaantua leipomoissa koko tuotantoprosessiin. Monet leipomot käyttävät kuitenkin tuotannossaan pähkinää, jonka on arveltu olevan lupiinin kaltainen allergeeni.

Tässä tutkimuksessa tehtyjen vitameerijakaumaa koskevien analyysien perusteella kaikissa lajikkeissa 5-metyylitetrahydrofolaatti oli dominoivin vitameeri. Kokonaisuutena lupiinin vitameerijakauma poikkesi selvästi muista lajeista, sillä sen folaatti muodostui lähes pelkästään 5-metyyli- ja 5-formyylitetrahydrofolaatista. Härkäpavuilla ja linsseillä folaatti jakautui useamman vitameerin kesken ja niissä oli yhteisesti havaittavissa ainakin selvästi 5,10-metenyylitetrahydrofolaattia, jota lajikkeesta riippuen oli noin 14-28 %. Lisäksi linsseissä oli muita lajeja enemmän tetrahydrofolaattia, ja härkäpavuista Tattoo-lajikkeessa oli poikkeuksellisen paljon 10-formyylifoolihappoa. Tulosten mukaan kaikilla lajeilla 5-metyylitetrahydrofolaatin ja 5-formyylitetrahydrofolaatin määrät korreloivat kokonaisfolaattipitoisuuden kanssa. Folaattipitoisuuden ollessa suuri vitameereistä 5-metyylitetrahydrofolaattia oli paljon ja vähemmän folaattia sisältävissä lajikkeissa vastaavasti 5-formyylitetrahydrofolaatin osuus kasvoi.

Työn luotettavuus varmistettiin jokaisen näytesarjan yhteydessä analysoidulla sertifioidulla referenssimateriaalilla sekä laboratorion sisäisellä standardilla, joista laadittiin valvontakortit. Työskentelyolosuhteet oli optimoitu folaattien analysointiin suotuisiksi ja työ tehtiin tutkimuslaboratoriossa, jossa vitamiinanalytiikalla oli pitkät perinteet. Työ onnistui hyvin ja antoi tärkeää tietoa härkäpapujen, linssien ja lupiinien kokonaisfolaattipitoisuuksista sekä niiden vitameerien jakautumisesta. Folaatin puute on yleistä niin Suomessa kuin muualla maailmassa ja sen riittävä saanti olisi tärkeä turvata ihmisten terveyden säilyttämiseksi. Työ antoi lisätietoa Helsingin yliopiston elintarvikekemian osaston tuleviin folaattitutkimuksiin ja tuloksia voidaan käyttää hyväksi, kun käydään keskustelua lupiinin asemasta ravintokasvina.

## LÄHTEET

- Altuntas, E. ja Yildiz, M. 2005. Effect of moisture content on some physical and mechanical properties of faba bean (*Vicia faba* L.) grains. *Journal of food engineering*. 78 (2007): 174-183.
- Ball, G. 2006. *Vitamins in food: Analysis, bioavailability, and stability*. CRC Press, LLC.
- Bright, L. 2008. Foolihappo. Lisätty Ravinto- ja energia-aineet -blogiin 7.11.2008. Luettu 15.3.2011.  
<http://pikenruoka.blogspot.com/2008/11/vitamiini-foolihappo.html>
- Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G. ja Oomah, B.D. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43 (2), 461-482.
- Combs, G.F. Jr. 1998. *The Vitamins, Fundamental aspects in nutrition and health* (2. painos). Academic Press. San Diego, CA.
- Cubero, J. & Nadal, S. 2005. *Faba bean (Vicia faba L.)* CRC Press, LLC.
- de Man, J.M. 1999. *Principles of Food Chemistry* (3. painos). Springer - Verlag.
- Erbas, M., Certel, M. ja Uslu, M.K. 2004. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chemistry*. 89 (2005): 341-345.
- Erskine, W. 2009. *The lentil: Botany, production and uses*. CABI Publishing.
- FAO/WHO. 2007. *Human vitamin and mineral requirements: Folate and folic acid*. FAO/WHO expert consultation. United States.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. *Food supply*. Tilastotiedot vuodelta 2007. Luettu 11.2.2011.  
<http://faostat.fao.org/site/609/DesktopDefault.aspx?PageID=609#ancor>
- Fineli 2010. *Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, ravitsemusyksikkö*. Fineli, suomalaisten elintavikkeiden koostumustietopankki. Versio 11 (1.6.2010). Helsinki 2011. Luettu 15.3.2011. <http://www.thl.fi/fineli/>
- Gregory, J.F. 2001. Case study: folate bioavailability. *Journal of Nutrition*. 131: 1376S-1382S.
- Han, J-Y. ja Tyler, R.T. 2003. Determination of folate concentrations in pulses by a microbiological method employing trienzyme extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5315-5318.
- Henry, C.J.K. ja Chapman, C. 2002. *Nutrition handbook for food processors*. Cambridge, UK. Woodhead Publishing.



Hietanen, V. 2010. Härkäpavun (*Vicia faba*) viljely. Maaseutuelinkeinojen koulutusohjelma. Kasvintuotannon suuntautumisvaihtoehto. Seinäjoen ammattikorkeakoulu. Opinäytetyö.

Jaarinen S., Niiranen J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.  
Kalliola, I. 2005. Ruokakasvit. Helsinki: WSOY.

Kantti, M. 2006. Härkäpavun historia Suomessa. Julkaistu 9.3.2006. Luettu 9.4.2011.  
<http://www.amk.fi/opintojaksot/500/1110271904714/1111583188564/1141914824271/1141914846115.html>

Kantti, M. 2006. Härkäpavun viljely. Julkaistu 10.5.2006. Luettu 9.4.2011.  
<http://www.amk.fi/opintojaksot/500/1110271904714/1111583188564/1141914824271/1147269514459.html>

Kariluoto, S., Vahteristo, L. ja Piironen V. 2001. Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in studying folate contents in rye. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:938-942.

Kariluoto, S., Vahteristo, L., Salovaara, H., Katina, K., Liukkonen, K-H. ja Piironen, V. 2004. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Journal of Cereal Chemistry*. 81: 134-139.

Kariluoto, S. 2008. Folates in rye: Determination and enhancement by food processing. Helsinki: Helsingin yliopisto. Väitöskirja.

Kinni, M. 2010. Folaatit gluteenittomissa viljoissa ja viljaa korvaavissa valmisteissa. EKT-sarja 1481. Helsinki. Helsingin yliopisto: Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. Pro gradu -tutkielma.

Kisliuk, R.L. 2001, Folates, John Wiley & Sons, Ltd.

Kurlovich, B., Earnshaw, P. ja Varala, M. 2007. Perennial forms of Washington lupin (*L. polyphyllus* Lindl) for effective use in Finland. Artikkelin lisätty blogiin 17.1.2007. Luettu 14.3.2011.  
<http://lupin-fin.blogspot.com/2007/01/perennial-forms-of-washington-lupin-for.html>

Laitinen, K. 2003. Foolihappo - elintärkeä vitamiini? Kuopion lääkeinformaatiokeskus. *Apteekkari* 7/2003, 20-21.

Lassila, A. 2007. Härkäpapu luomuviljelyssä. Teoksessa: Koskimies, H. ym. (toim.) 2007. Luomutilan valkuaiskasviopas. Luomuliitto.

Lin, Y., Eitenmiller, R.R. ja Landen, W.O. 2008. Vitamin analysis for the health and food sciences (2. painos). CRC Press, LLC. s. 443-505.

Lindroos, S. 2010. Tutkimus seuraa uusien palkokasvilajikkeiden pärjäämistä Suomessa. Helsinki. Helsingin yliopisto, uutiset. Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. Julkaistu 20.7.2010.

Lizarazo, C.I., Rekola, K., Edelmann, M., Kariluoto, S., Lampi, A., Piironen, V. ja Stoddard, F.L. 2011. Nutritional quality of Finnish-grown lupin (*L. angustifolius*). Helsinki: Helsingin yliopisto.

Martinez-Villaluenga, C., Frias, J. ja Vidal-Valverde, C. 2005. Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of  $\alpha$ -galactosides. Food Chemistry. 98 (2006): 291-299.

Muehlbauer, F.J. ja McPhee, K.E. 2005. Lentil (*Lens culinaris* Medik.). CRC Press, LLC.

NNC (National Nutrition Council). 2005. Suomalaiset ravitsemussuositukset - ravinto ja liikunta tasapainoon. Valtion ravitsemusneuvottelukunta. Helsinki.

NNR (Nordic Nutrition Recommendations) 2004. Integrating nutrition and physical activity. Nord 2004: 13. Nordic Council of Ministers, Copenhagen.

Pandurangi, S. & LaBorde, L.F. 2004. Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach. International Journal of Food Science & Technology. 39 (5). 525-532.

Pfeiffer, C.M., Caudill, S.P., Gunter, E.W., Osterloh, J. ja Sampson, E.J. 2005. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. Journal of Clinical Nutrition. 82: 442-450.

Radcliffe, M., Scadding, G. ja Morrow Brown, H. 2005. Lupin flour anaphylaxis. Lancet. 365 (9467). 1360-1360.

Hankkija-Maatalous Oy, Agrimarket. 2009. Rajamäki, H. (päätoim.) Kasvuohjelmat: Härkäpapu Kontu<sup>BOR</sup>. Luettu 9.3.2011.  
[http://www.agrimarket.fi/Maatalous\\_ja\\_Elaimet/Kasvuohjelmat/Valkuiskasvit/?iLaID=1000002](http://www.agrimarket.fi/Maatalous_ja_Elaimet/Kasvuohjelmat/Valkuiskasvit/?iLaID=1000002)

Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Martelli, M., Servadei, L., Brunetti, N., Porcellini, E. ja Licastro, F. 2005. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer's disease. The American Journal of Clinical Nutrition. 82: 636-643.

Sanz, M.L., de, I.M., Fernández, J. ja Gamboa, P.M. 2010. Lupin allergy: a hidden killer in the home. Clinical & Experimental Allergy. 40 (10). 1461-1466.

Sharma, P. & Gill, R.K. 2010. Grain legumes (Pulses): Role in revitalizing soil health and human nutrition. Ecology, environment and conservation. 16 (3). 359-364.

Silvennoinen, M. 2010. Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia (UPLC) folaatianalytiikassa. EKT-sarja 1469. Helsingin yliopisto: Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. Pro gradu -tutkielma

Smith, M. 2010. Euroopan komissio (FP 7); Legume Futures –projekti (1.3.2009-28.2.2014). The James Hutton Institute. Päivitetty 18.4.2011. Luettu 24.4.2011. <http://www.legumefutures.eu/home>  
[http://cordis.europa.eu/fetch?CALLER=FP7\\_PROJ\\_EN&ACTION=D&DOC=1&CAT=PROJ&QUERY=012fad89e39f:4f18:06c4688c&RCN=94557](http://cordis.europa.eu/fetch?CALLER=FP7_PROJ_EN&ACTION=D&DOC=1&CAT=PROJ&QUERY=012fad89e39f:4f18:06c4688c&RCN=94557)

Stoddard, F., Mäkelä, P., Santanen, A. ja Seppänen, M. 2009. Härkäpapu – vanhasta viljelykasvista rehua ja ruokaa. *Maaseudun Tiede* 66 (2), 15-17.

Tamura, T. 1998. Determination of food folate. *Journal of nutritional biochemistry*. 9 (5). 285-293.

Terveyden ja hyvinvoinninlaitos, THL. 2008. Tilastot ja rekisterit: Epämuodostumat 1993-2006. Julkaistu 28.4.2006. Päivitetty 12.9.2008. Luettu 4.3.2011. <http://www.stakes.fi/FI/tilastot/aiheittain/Lisaantyminen/epamuodostumat/epamuodostumatluelisaa.htm>

Turun Sanomat (arkisto). 2010.. Lupiinia yritetään kesyttää hyötykasviksi Suomessakin. Kotimaa 22.6.2010. <http://www.ts.fi/online/kotimaa/140650.html>

Virtanen, J.K., Voutilainen, S., Happonen, P., Alfthan, G., Kaikkonen, J., Mursu, J., Rissanen, T.H., Kaplan, G.A., Korhonen, M.J., Sivenius, J. ja Salonen, J.T. 2005. Serum homocysteine, folate and risk of stroke: Kuopio Ischaemic Heart Disease Factor (KIHD) Study. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 12: 369-375.

Voipio, I. 2001. Vihannekset. Lajit, viljely, sato. Puutarhaliiton julkaisu nro 316.

Voutilainen, S., Virtanen, J.K., Rissanen, T.H., Alfthan, G., Laukkanen, J., Nyssönen, K., Mursu, J., Valkonen, V-P, Tuomainen, T-P, Kaplan, G.A. ja Salonen, J.T. 2004. Serum folate and homocysteine and incidence of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Disease Factor Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 317-323.

Wright, J., Dainty, J., Finglas, P. 2007. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *British Journal of Nutrition* 98 (2007): 667-675

Walles, M., Gauvin, C., Morin, P-E., Panetta, R. ja Ducharme, J. 2007. Comparison of sub-2 µm particle columns for fast metabolite. *Journal of Separation Science*. 30: 1191-1199.

YLE Turku, alueutiset. 2009. Härkäpapujen viljely lisääntyy. Julkaistu 9.7.2009 klo 06.52. Päivitetty 9.7.2009 klo 16.23. Luettu 15.3.2011. [http://yle.fi/alueet/turku/2009/07/harkapavun\\_viljely\\_lisaantyy\\_853520.html](http://yle.fi/alueet/turku/2009/07/harkapavun_viljely_lisaantyy_853520.html)

Yadav, S., McNeil, D., Stevenson, P. 2007. Lentil: an ancient crop for modern times. Springer Verlag

## LIITE 1

## KÄYTETYT REAGENSIT, LAITTEET JA VÄLINEET

## Mikrobiologinen menetelmä

## Uuttopuskuri:

50 mM CHES (N-(2-sykloheksyyliamino)etaanisulfohappo)

50 mM HEPES (N-(2-hydroksietyyli)-piperatsiini-N'-(2-etaanisulfohappo)

10 mM 2-merkaptoetanol

## Entsyymit:

$\alpha$ -amylaasi EC 3.2.1.1, A-6211, (*Aspergillus oryzae*)

proteaasi EC 3.4.24.31, P-5147 (*Streptomyces griseus*)

konjugaasi (eristetty sian munuaisista)

## Kasvatusalusta:

75 % Folic Acid Casei Medium, Difco

L-askorbiinihappo

*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

## Laimennusliuokset:

0,5 % L(+)-natriumaskorbaatti

0,9 % NaCl (saliini)

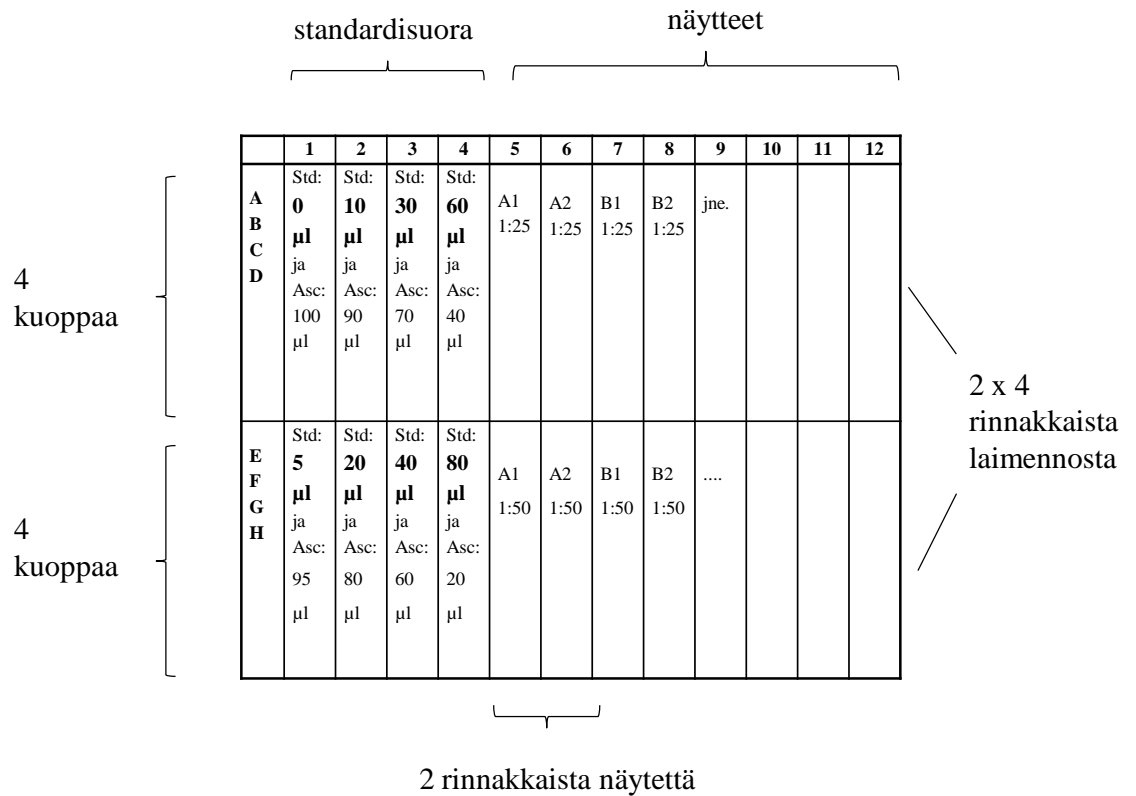
Standardi: 5-formyylietrahydrofolaatti (5-HCO-H<sub>4</sub>)

pH:n säätämisiin: Suolahappo, etikkahappo ja kaliumhydroksidi

## LIITE 2

## LEVYTYSKAAVIO

Mikrobiologinen menetelmä, 96-kuoppainen levy



Std. = standardi

Asc. = kasvatusalusta (sisälsi *L. rhamnosus* -bakteeria)

## LIITE 3

## GRADIENTTIOHJELMA UPLC-MENETELMÄLLE

Aika	Ajoliuos A (tilavuus-%)	Ajoliuos B (tilavuus-%)
0 - 2,2 min	95	5
2,2 - 4,7 min	93	7
4,7 - 7,5 min	84,5	15,5
7,5 - 7,9 min	84,5	15,5
7,9 - 8,3 min	95	5
8,3 - 12 min (tasapainotus)	95	5

Ajoliuos A = kaliumdivetyfosfaattipuskuri (30 mM)

Ajoliuos B = asetontriili

Virtausnopeus 0,4 ml/min

## LIITE 4

## KOKONAISFOLAATTI- JA KUIVA-AINEPITOISUUDET

Laji	Kasvupaikka	Lajike	Kuivapaino% (dry matter)	Kosteus % (moisture)	Folaatti tuorepainoa kohti (ng/g)	Folaatti kuivapainoa kohti (ng/g)
Faba bean	Viikki	Kontu	90,09 %	9,91 %	2565,6	2847,8
Faba bean	Viikki	Melodie	81,89 %	18,11 %	2041,5	2493,1
Faba bean	Viikki	Alexia	86,41 %	13,59 %	2137,0	2473,2
Faba bean	Viikki	SNSS-1	89,59 %	10,41 %	2122,7	2369,4
Faba bean	Viikki	Pyramid	87,58 %	12,42 %	2057,9	2349,9
Faba bean	Viikki	Espresso	81,73 %	18,27 %	1889,6	2312,1
Faba bean	Viikki	Ben	86,90 %	13,10 %	1908,2	2195,9
Faba bean	Viikki	Fatima	86,93 %	13,07 %	1901,2	2187,2
Faba bean	Viikki	Aurora	90,44 %	9,56 %	1961,7	2169,2
Faba bean	Viikki	Fuego	87,99 %	12,01 %	1858,7	2112,4
Faba bean	Viikki	Colombo	87,51 %	12,49 %	1807,3	2065,3
Faba bean	Viikki	Gracia	84,97 %	15,03 %	1668,3	1963,5
Faba bean	Viikki	Disco	88,92 %	11,08 %	1578,4	1775,2
Faba bean	Viikki	Tangentia	85,04 %	14,96 %	1284,7	1510,8
Faba bean	Viikki	Tattoo	87,23 %	12,72 %	1357,2	1556,9
Lentil	Viikki	Robin	90,88 %	9,12 %	1528,7	1682,2
Lentil	Viikki	Viceroy	91,00 %	9,00 %	1529,8	1681,1
Lentil	Viikki	Black	92,01 %	7,99 %	1446,6	1572,2
Lentil	Viikki	Rosetown	91,15 %	8,85 %	1371,9	1505,1
Lentil	Viikki	Meteor	91,92 %	8,08 %	1315,2	1430,9
Lentil	Viikki	Redcoat	91,82 %	8,18 %	1306,8	1423,2
Lentil	Viikki	Blaze	91,81 %	8,19 %	1299,2	1415,1
Lentil	Viikki	Rosebud	88,91 %	11,09 %	1143,8	1286,5
Lentil	Viikki	Redbow	91,51 %	8,49 %	1095,6	1197,3
Lentil	Viikki	Millestone	92,09 %	7,91 %	1076,6	1169,1
Lentil	Viikki	Sovereign	91,84 %	8,16 %	963,5	1049,1
Lentil	Viikki	Redberry	91,98 %	8,02 %	722,1	785,1
Blue lupin	Viikki	Boruta	90,15 %	9,85 %	3675,7	4077,5
Blue lupin	Viikki	Haags blaue	91,89 %	8,11 %	3684,4	4009,8
Blue lupin	Viikki	Sonet	92,21 %	7,79 %	3398,9	3686,2
Faba bean	Mikkeli	Espresso	90,00 %	10,00 %	2463,0	2736,7
Faba bean	Mikkeli	SSNS-1	90,03 %	9,97 %	2236,0	2483,8
Faba bean	Mikkeli	Kontu	90,21 %	9,79 %	2205,1	2444,5
Faba bean	Mikkeli	Fuego	89,95 %	10,05 %	2198,0	2443,7
Faba bean	Mikkeli	Tattoo	90,27 %	9,73 %	2079,2	2303,3
Faba bean	Mikkeli	Tangentia	90,18 %	9,82 %	1997,4	2215,0
Faba bean	Mikkeli	Colombo	90,20 %	9,80 %	1841,4	2041,6
Faba bean	Mikkeli	Fatima	90,14 %	9,86 %	1690,1	1875,1
Blue lupin	Mikkeli	Haags blaue	91,35 %	8,65 %	3165,3	3465,0
Blue lupin	Mikkeli	Sonet	91,44 %	8,56 %	3153,9	3449,2
Blue lupin	Mikkeli	Boruta	90,95 %	9,05 %	2939,0	3231,5