

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja Elintarviketekniikan koulutusohjelma

Laboratoriotekniikka

2013

Mikko Tammisto

GLUTEENIANALYYSI JA GLUTEENITTOMAN KAURAN TUOTANTO



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Laboratoriotekniikka

Toukokuu 2012 | Sivumäärä 46

Ohjaaja(t): Kari Haajanen, Jukka Kaitaranta

Mikko Tammisto

GLUTEENIANALYYSI JA GLUTEENITTOMAN KAURAN TUOTANTO

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa käyttöön gluteenipitoisuusanalyysi ja mitata toimeksiantajan mylly-yrityksen viljatuotteiden gluteenipitoisuuksia. Työssä paneudutaan pintapuolisesti keliakiaan ja keliakikkojen ruokavalioon, jotka ovat perustana gluteenittomien elintarvikkeiden tarpeellisuudelle.

Aihe opinnäytetyölle tuli suomalaiselta mylly-yritykseltä, jonka kiinnostuksena on tuoda markkinoille kotimaisia gluteenittomia kauratuotteita. Toimeksiantaja halusi varmistua raaka-aineen gluteenittomuudesta koko tuotantoketjun varrelta. Gluteenittomien tuotteiden myyntivalttina on kotimaisuuden tuoma turvallisuus ja soveltuvuus keliakikoille.

Toteutettu tutkielma on osa kansainvälistä projektihanketta, jossa selvitetään kauraan perustuvien elintarvikkeiden markkinoita Euroopassa ja kehitetään gluteenittoman kauran tuotantotapoja gluteenittomuuden varmistamiseksi. Projekti kehittää myös tavanomaisia kauratuotteita ja tuo esille kauran terveydellisiä ominaisuuksia.

Gluteenittomille elintarvikkeille on kysyntää, koska Suomessa on 31 000 diagnosoitua keliakikkoa (2011) ja luku kasvaa koko ajan. Keliakikkojen määrän kasvu johtuu muutoksista ruokailutottumuksissa ja diagnoosimenetelmien kehittymisestä. Keliakiaan ei ole lääkinnällistä parannuskeinoa ja ainoa keino hoitaa oireita on omaksua gluteeniton ruokavalio.

Projektin lopputuloksena saatiin toimiva analyysimenetelmä gluteenipitoisuuden määrittämiseen Turun Ammattikorkeakoulun laboratorioon ja onnistunut gluteenittoman kaurahiutaleen koeajo toimeksiantajan myllyllä. Analyysimenetelmänä käytettiin R-Biopharmin valmistamaa Ridascreen gliadin analyysikittiä, jonka käyttöönotto on kuvattu tarkasti tässä opinnäytetyössä. Gluteenittoman kaurahiutaleen koeajossa analysoitiin näytteitä koko tuotantoketjun varrelta ja tulokset olivat pääsääntöisesti gluteenittoman tuotteen raja-arvon alapuolella. Gluteenipitoisuudet olivat, kahta näytettä lukuun ottamatta, niin pieniä että niiden tarkkaa pitoisuutta ei pystytty määrittämään.

ASIASANAT:

Gluteeni, gliadiini, Elisa, R5, keliakia, kaura, kaurahiutaleet

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

May 2013 | Total number of pages 46

Instructors: Head of Laboratory Kari Haajanen, Principal Lecturer Jukka Kaitaranta

Mikko Tammisto

GLUTEN ANALYSIS AND PRODUCTION OF GLUTEN FREE OAT FLAKES

The goal of this thesis was to introduce an analysis method for determining the gluten content of foodstuffs and to measure the gluten content of the commissioner's grain products. The thesis also generally introduces coeliac disease and gluten free diet which are the basis for the need of gluten free foodstuffs.

The commissioner has a grain mill and is interested in bringing domestic gluten free oat products to the market. The purpose was to confirm the absence of gluten throughout the entire production chain. The sales appeal of these gluten free products is their domestic origin and suitability for coeliac patients.

This thesis is part of an international project where new gluten-free and conventional oat-based foodstuffs are developed and the market in Europe is researched. The agenda of the project also includes highlighting the health benefits of eating oat based products.

The demand for gluten free products is on the rise because in 2011 Finland alone had 31 000 diagnosed coeliac patients. The group of diagnosed coeliac patients is constantly growing because of the changes in eating habits and development of diagnostic methods. Currently coeliac disease is an incurable condition that can only be treated by adopting a gluten free diet.

The results of this thesis are a working analysis method for determining the gluten content of foodstuffs and a successful gluten-free oat flake trial run in the commissioner's mill. The method of analysis was to use an analysis kit manufactured by R-Biopharm. The brand name of the analysis is Ridascreen Gliadin and it is specifically used to determine gluten content in various food matrices. Samples analysed from the production chain contained next to no gluten and were labeled as gluten-free. Only two samples in the trial run had a large enough gluten content to be accurately measured. These gluten contents were, however, well below the gluten-free content limit. Other samples in the trial run had such low gluten content that it could not be quantified accurately.

KEYWORDS:

Gluten, gliadin, Elisa, R5, coeliac disease, oat, oat flakes

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 KELIAKIA JA GLUTEENI	8
2.1 Keliakia	8
2.1.1 Keliakian oireet ja diagnoosi	8
2.1.2 Keliakian hoito	9
2.2 Gluteeni ja prolamiinit	10
2.2.1 Gluteenin merkitys elintarvikeprosessissa	11
2.2.2 Gluteenittomien tuotteiden lainsäädäntö	12
3 GLUTEENITTOMAN KAURAN TUOTANTO	13
3.1 Gluteenittoman kauran kylväminen	13
3.2 Sadonkorjuu ja kuljetus	14
3.3 Hiutaloitintprosessi	15
4 GLUTEENIANALYTIKKA	18
4.1 Testikitin ominaisuudet	19
4.2 Toimintaperiaate	19
4.3 Käyttöönotto	20
4.3.1 Laboratoriovälineet	20
4.3.2 Kustannukset ja ajankäyttö	22
4.3.3 Ongelmatilanteet käyttöönotossa	23
4.4 Gluteenianalyysin koejärjestely	25
4.4.1 Näytteenotto ja käsittely	26
4.4.2 Analyysin suorittaminen	27
4.4.3 Tulosten laskenta	29
4.4.4 Ongelmat tulosten laskennassa	29
5 TULOKSET	34
5.1 Lähtötasomääritykset	34
5.2 Tavanomainen kauran hiutalointi	35
5.3 Luomukaura	35
5.4 Gluteenittoman kauran koeajo	36
5.4.1 Siemenkaura	36

5.4.2 Puidun kauran esinäytteet	36
5.4.3 Hiutaloitintuotteen näytteet	37
5.5 Päivittäiskaupan tuotteita	38
6 TULOSTEN TARKASTELU JA MERKITYS	39
6.1 Gluteenittoman kaurahiutaleen koeajon onnistuminen	40
6.2 Vertailututkimuksia	40
6.2.1 Eviran Elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden valvontatutkimus 2003	41
6.2.2 Gluteenittomuuden selvitys elintarvikkeista Jyväskylän alueen elintarvikelaitoksista ja -yrityksistä	41
6.2.3 Selvitys elintarvikkeiden gluteenittomuudesta Keski-Pohjanmaan alueen yrityksissä	42
6.2.4 Analyysimenetelmien vertailu	42
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	44
7.1 Gluteenianalyysin käyttöönotto	44
7.2 Gluteenittoman kaurahiutaleen koeajo	45
LÄHTEET	46

KUVAT

Kuva 1. Laskuesimerkki.	14
Kuva 2. Ridascreen Gliadin kitin sisältö.	18
Kuva 3. Kuoppalevyjen vertailu.	21
Kuva 4. Hidex Chameleon monileimalaskin.	22
Kuva 5. Kauran ulkonäkö raaka-aineesta tuotteeksi.	26
Kuva 6. Kuopat valmiina absorbanttimittaukseen.	28
Kuva 7. T-testin taulukoidut arvot.	32

KUVIOT

Kuvio 1. Heinäkasvien heimojen sukupuu.	11
Kuvio 2. Kaurahiutaleen tuotannon prosessikaavio.	17
Kuvio 3. Pesun vaikutus standardikuvaajaan.	24
Kuvio 4. Lineaarinen standardikuvaaja.	30
Kuvio 5. Cubic Spline standardikuvaaja.	30
Kuvio 6. Päivittäiskaupan tuotteiden vertailu.	38

TAULUKOT

Taulukko 1. Elintarvikkeen määrittely gluteenin määrän perusteella.	12
Taulukko 2. Standardiliuosten absorbanssilukemat	25
Taulukko 3. Näytteen laimennuskoe	25
Taulukko 4. Lineaarisen ja Cubic spline laskennan tulokset	31
Taulukko 5. Excelin T-testin tulokset.	33
Taulukko 6. Lähtötasoanalyysi kauratuotteesta.	34
Taulukko 7. Gluteenipitoisuus tavanomaisesta kaurahiutaleesta tuotantokokeessa.	35
Taulukko 8. Luomu kauranjyvän gluteenipitoisuus.	35
Taulukko 9. Siemenkauran gluteenipitoisuus.	36
Taulukko 10. Gluteenittoman kauran jyvän esinäytteiden gluteenipitoisuus.	36
Taulukko 11. Hiutaloitiprosessin näytteiden gluteenipitoisuus.	37
Taulukko 12. Päivittäistavarakaupan tuotteiden gluteenipitoisuuksia.	38
Taulukko 13. Elisa menetelmien eroja.	43

1 JOHDANTO

Keliakia on eräiden viljojen proteiinien eli gluteenin aiheuttama sairaus, joka oireillaan aiheuttaa haittaa kasvavalle joukolle ihmisiä ympäri maailmaa. Keliakia on elinikäinen sairaus, johon ei ole lääkinnällistä parannuskeinoa, mutta oireet saadaan pysymään kurissa noudattamalla täysin gluteenitonta ruokavaliota. (Keliakialiitto 2011, 2-3)

Toteutettu tutkielma on osa kansainvälistä projektihanketta, jossa kehitetään gluteenittoman kauran tuotantotapoja gluteenittomuuden varmistamiseksi ja kehitetään kauraan perustuvia elintarvikkeita (gluteenittomia ja tavanomaisia) sekä selvitetään näiden tuoteryhmien markkinoita.

Tutkielman toimeksiantaja halusi selvittää sopimusviljelijöiltä tulevan kauran ja gluteenittoman kauran raaka-ainelaadun gluteenipitoisuuden suhteen. Lisäksi haluttiin selvittää millä toimenpiteillä voidaan hiutaloitoprosessissa tuottaa gluteenitonta kaurahiutaletta gluteenia sisältävän raaka-aineajon (vehnä, ohra, ruis) ja tavallisen kaurahiutaletuotannon jälkeen. Prosessin eri vaiheille tehtiin myös kontaminaatoriskin kartoitus ja arvioitiin erityisten puhdistusoperaatioiden tarpeellisuus raaka-aineesta toiseen siirryttäessä.

Gluteenianalyysit gluteenittoman kauran hiutaletuotannon prosessinäytteistä tehtiin Turun Ammattikorkeakoulun Lemminkäisenkadun toimipisteen laboratorioiloissa, Codex Alimentarius-standardin mukaista R5-Elisa testikittiä käyttäen. Tavanomaisille gluteenipitoisille tuotteille tehtiin perustasomääritykset samalla menetelmällä.

2 KELIAKIA JA GLUTEENI

Keliakia ja muut allergiset reaktiot ihmisten keskuudessa ovat kasvussa. Kasvun syinä ovat mm. muutokset ruokailutottumuksissa ja diagnoosimenetelmien kehittyminen. Keliakian diagnoosien määrän on ennustettu kasvavan noin kymmenkertaiseksi seuraavien vuosien aikana ja tämä on johtanut kysynnän nousuun korkealaatuisille gluteenittomille elintarvikkeille. Toisaalta gluteenin poisto asettaa suuria haasteita maataloustuotannolle ja elintarviketeollisuudelle. Gluteenittomien tuotteiden asettamia haasteita ovat mm. osittain keho maku, hauras koostumus ja huonompi säilyvyys tavanomaisiin tuotteisiin verrattuna. (Gallagher 2009, 7)

2.1 Keliakia

Keliakian aiheuttavat viljojen sisältämät valkuaisaineet, joita yleisesti kutsutaan gluteeniksi. Keliakia on elinikäinen ja perinnöllinen sairaus, joka perimältään alttiille henkilölle aiheuttaa ohutsuolen limakalvolle tulehdusreaktion ja suolinukan vaurioitumista. Suolinukka voi madaltua tai hävitä kokonaan, joka aiheuttaa häiriöitä ravintoaineiden imeytymiseen. Ravintoaineiden imeytymishäiriöt voivat johtaa puutostiloihin, kuten anemiaan. (Keliakialiitto 2011, 2-3)

Keliakia voi puhjeta minkä ikäisenä tahansa, mutta suurin osa keliakikoista diagnosoidaan aikuisiällä. Jos lähisuvussa esiintyy keliakiaa, mahdollisuus sairastua on noin 10–15 %. Tarkkaa syntymekanismia keliakialle ei vielä tunneta, mutta siihen vaikuttavat perinnölliset tekijät ja gluteeni. Vuonna 2011 suomessa oli 31 000 diagnosoitua keliakikkoa. (Keliakialiitto 2011, 2)

2.1.1 Keliakian oireet ja diagnoosi

Keliakia voi ilmetä monella eri tavalla. Tavallisimpia oireita ovat erilaiset vatsavaivat, mutta myös väsymys, ruokahaluttomuus ja anemia voivat olla keliakian

aiheuttamia oireita. Joillekin keliakasta kärsiville voi esiintyä myös voimakkaasti kutisevaa ihottumaa hiuspohjaan, pakaroihin, polviin, kyynärpäihin tai hartioihin. (Keliakialiitto 2011, 2-3)

Keliakialla voi olla myös muita vaikutuksia elimistöön. Nykytiedon mukaan keliakia on niin sanottu autoimmuunityyppinen yleissairaus, joka voi aiheuttaa vaurioita suun pinnoille, hammaskiilteelle ja kalsiumaineenvaihdunnan häiriintyessä osteoporoosia. Keliakia voi hoitamattomana vaikuttaa erityisen vakavasti naisen lisääntymisterveyteen. Naiselle voi aiheutua esimerkiksi puberteetin viivästyminen, toistuvia keskenmenoja, lapsettomuutta tai menopaussin aikaistuminen. (Keliakialiitto 2011, 3)

Kilpirauhasen liika- tai vajaatoiminta, tyypin 1 diabetes ja Sjögrenin oireyhtymä lisäävät mahdollisuutta sairastua keliakiaan. (Keliakialiitto 2011, 3)

Keliakia voidaan todeta ohutsuolesta, tai ihokeliakian tapauksessa iholta otetusta koepalasta. Ohutsuolen koepalasta voidaan todeta suolinukan madaltuminen tai kokonaan poistuminen. Keliakia voidaan todeta myös alustavasti verikokeella, jossa veriseerumille suoritetaan vasta-ainetestit. Apteekeista on saatavilla pikatestejä, joilla keliakian oireista kärsiville voidaan suorittaa testaus kotioloissa. Lopullinen diagnoosi tehdään kuitenkin aina ohutsuolen tai ihon koepalasta. (Keliakialiitto 2011, 4)

2.1.2 Keliakian hoito

Keliakiaan ei ole lääkinällistä parannuskeinoa, mutta oireet ja taudin eteneminen voidaan estää tarkalla gluteenittomalla ruokavaliolla. Ihokeliakiaan voidaan tarvita oireiden ilmetessä myös lääkehoitoa. Ruokavalion noudattaminen on keliakiasta kärsivälle ehdottoman tärkeää, koska jokainen gluteeniannos vaurioittaa ohutsuolen pintaa aiheuttaen pysyvää vahinkoa. (Keliakialiitto 2011, 6)

Keliakikon ruokavaliosta jää pois vehnää, ohraa ja ruista sisältävät elintarvikkeet. Nämä viljat tulisi kuitenkin korvata ruokavalioon gluteenittomilla viljavalmisteilla, koska viljat ovat tärkeitä kuidun, B-vitamiinien ja hivenaineiden lähteitä.

tä. Ihanteellisessa tilanteessa keliakikon viljan syönti ei vähene vaan haitalliset viljat korvataan gluteenittomilla viljavalmisteilla. (Keliakialiitto 2011, 6-7)

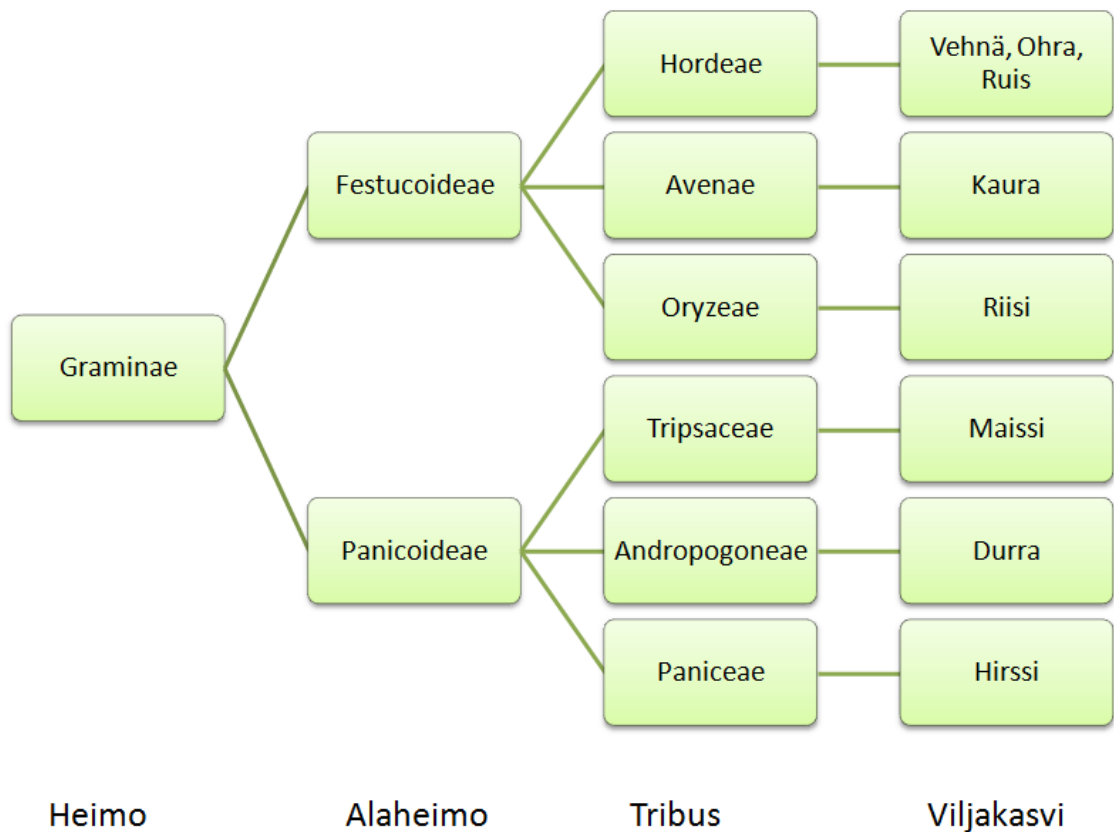
2.2 Gluteeni ja prolamiinit

Viljojen jyvät muodostuvat kolmesta osasta, jotka ovat kuorikerros, ydinosa ja alkio. Jyvien ydinosien sisältämät valkuaisaineet toimivat keliakian aiheuttajina. Näitä valkuaisaineita ei kuitenkaan ole jyvien kuorikerroksessa tai alkioidissa. Nämä valkuaisaineet toimivat viljan varastovalkuaisaineina, joiden osuus jyväsä on noin 10–15 % ja jyvän loppu koostuu pääasiassa tärkkelyksestä. (Mäki ym. 2006, 18–19)

Kun esimerkiksi vehnän jyvästä poistetaan veteen liukeneva tärkkelys, jäljelle jäävää sitkomassaa kutsutaan gluteeniksi. Gluteenimassa sisältää keliakian pääasialliset aiheuttajat, jotka ovat vehnän varastoproteiinit gliadiini ja gluteniini. Gliadiini ja gluteniini ovat vehnän prolamiineja. Prolamiini on yleisnimitys viljojen etanoliliukoisille proteiineille, jotka ovat saaneet nimensä oman aminohappokoostumuksensa perusteella. Eri viljojen prolamiineilla on siis omat nimensä, kuten vehnän gliadiini, ohran hordeiini, rukiin sekaliini ja kauran aveniini. Kaikki edellä mainitut viljat siis sisältävät gluteenia, jonka rakenne poikkeaa siirryttäessä viljalajista toiseen. (Mäki ym. 2006, 19)

Kauran siedettävyys keliakikolle todennäköisesti johtuu aveniinin erilaisesta aminohappojärjestyksestä gliadiiniin, hordeiiniin ja sekaliiniin verrattuna. Kauran sisältämän aveniinin määrä on myös suhteellisesti vähäisempi muihin viljoihin nähden. (Mäki ym. 2006, 83)

Keliakiaa aiheuttavat vehnä, ruis ja ohra kuuluvat heinäkasvien heimon alaheimoon muodostaen *Hordeae tribuksen*. Riisi ja kaura kuuluvat myös samaan alaheimoon, mutta kuuluvat eri tribuksiin *Oryzae* ja *Avenae* (Kuvio 1). (Mäki ym. 2006, 18)



Kuvio 1. Heinäkasvien heimojen sukupuu. (Mäki ym. 2006, 19)

2.2.1 Gluteenin merkitys elintarvikeprosessissa

Kun vehnä jauho ja vettä sekoitetaan keskenään, muodostuu koossapysyvä elastinen taikina. Toisten viljalajien jauhot eivät toimi aivan samalla tavalla, kuin vehnä jauho. Gluteeni antaa taikinalle nämä viskoelastiset ominaisuudet, jotka mahdollistavat taikinan kohoamisen ja kestävyuden vaivaamisen aikana. (Hoseney 1986, 197)

Gluteenin korvaaminen muilla ainesosilla aiheuttaa suuria haasteita elintarvike-teollisuudelle, koska se on keskeinen rakenteenmuodostajaproteiini. Gluteenilla on vaikutusta myös leivontatuotteen ulkonäköön, murenevuuteen ja makuun. Gluteenin antamia ominaisuuksia voidaan korvata muilla ainesosilla, kuten tärkelyksillä, munalla tai maitoproteiineilla, jolloin gluteenin ominaisuuksia matki-

malla saadaan aikaan parempi rakenne, maku ja säilöntäaika gluteenittomaan tuotteeseen. (Gallagher 2009, 100-101)

2.2.2 Gluteenittomien tuotteiden lainsäädäntö

Vuonna 2005 Euroopan Unioni sääti uudet päällymerkintämääräykset allergeeneja sisältäville tuotteille. Säädös vaati elintarvikkeiden päällyksiin merkintöjä kahdestatoista tavallisimmasta allergeenistä. Näihin allergeeneihin kuuluivat mm. gluteeni, kala, muna, pähkinä, soijapapu ja maito (Gallagher 2009, 101–102). EU:n nykyinen lainsäädäntö (EY) N:o 41/2009 määrittelee keliaakikoille sopivat tuotteet seuraavasti taulukossa 1.

Taulukko 1. Elintarvikkeen määrittely gluteenin määrän perusteella. (KOMISSI-ON ASETUS (EY) N:o 41/2009)

Gluteeniton	Gluteenia enintään 20 mg/kg (20 ppm). Tuote voi sisältää luontaisesti gluteenittomia viljoja (riisi, maissi, hirssi, tattari) tai puhdistettua vehnätärkkelystä tai gluteenitonta kauraa.
Erittäin vähägluteeninen	Tuotteessa on gluteenia enintään 100 mg/kg (100 ppm)

Gluteenin pitoisuutta ilmaistaan yleensä pitoisuusyksiköllä ppm, joka vastaa miljoonasosaa. Esimerkiksi 1 ppm vastaa yhden milligramman määrää yhdessä kilogrammassa (1 mg/kg). Myös pienempää pitoisuusyksikköä ppb käytetään ja se vastaa yhtä miljardisosaa. Esimerkiksi 1 ppb vastaa yhtä mikrogrammaa yhdessä kilogrammassa (1 µg/kg).

3 GLUTEENITTOMAN KAURAN TUOTANTO

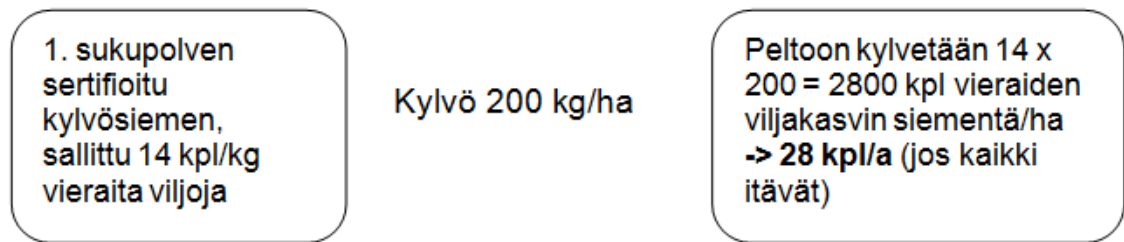
Gluteenipitoisuuden rajat ovat tiukkoja, koska keliakiaa sairastavan keho reagoi epämiellyttävästi jopa hyvin pieneen gluteenin määrään. Gluteenittoman tuotteen tulee olla ehdottomasti pitoisuusrajan alapuolella, koska keliakiaa sairastavalle gluteenipitoisesta tuotteesta muodostuva terveydellinen haitta on pysyvä ja pahenee aina gluteenia syötäessä. (Kilpivuori 2012)

Tiukat rajat tekevät gluteenittoman kauran tuottamisesta hyvin haastavaa, koska puhtaudesta tulee olla täysi varmuus koko tuotantoketjun matkalta ja kontaminaatio raaka-aineessa saattaa kontaminoida koko prosessiketjun.

3.1 Gluteenittoman kauran kylväminen

Tiloilla viljellään usein muitakin viljalajeja kauran lisäksi, kuten ruista, ohraa tai vehnää. Gluteenipitoisten viljojen viljely samalla palstalla aiheuttaa suuren ristikontaminaatoriskin gluteenittomalle kauralle, koska pellolle voi jäädä itämään vieraita viljoja. Kauran esipuhdistus tilalla ja käsittelyt ennen prosessia ovat yleensä riittämättömiä poistamaan vieraat viljat kauran joukosta. Tämän takia tärkein ja ainoa keino kauran puhtauden takaamiseksi on hallita vieraiden viljojen määrää viljelyn, puinnin ja varastoinnin aikana. (Kilpivuori 2012)

Yleisesti kauraa kylvetään 500 kpl itävää siementä peltoneliötä kohden, joka vastaa noin 200 kilogrammaa siemeniä hehtaarilla. Ruotsalaisen ohjeistuksen mukaan yhdessä kilossa gluteenitonta kauraa saa olla korkeintaan 4 kpl vieraan viljan jyviä, jolloin tuotteen pitoisuus pysyy 20 mg/kg gluteenia raja-arvossa (Jafner 2011, 14–15). Tämä tarkoittaa, että yhden aarin peltoalalla saa olla korkeintaan 12 vierasta viljakasvia. Tähän tavoitteeseen pääsemiseksi on käytettävä sertifioituja siemenlaatuja, joissa vieraiden jyvien määrä on pienin mahdollinen (Kilpivuori 2012). Kuvassa 1 on esitetty laskuesimerkki viljelyssä sallittavista vieraista jyivistä.



Kuva 1. Laskuesimerkki. (Kilpivuori 2012)

Pelloille tulee aina vieraita viljan jyviä esimerkiksi siemenviljan joukossa tai lintujen kantamana. Jos vieraita kasveja on pellolla vähän, ne voidaan poistaa käsin nyppimällä. Tämä tapa on kuitenkin tehoton jos vieraiden kasvien määrä riistyy käsistä. (Kilpivuori 2012)

Kylvötyössä käytettävä maatalouskalusto on myös suuri ristikontaminaation riski, kun sitä käytetään myös muiden viljalajien työstämisessä. Koneet, säiliöt ja vaunut tulee puhdistaa huolellisesti paineilmalla ja harjaamalla. Ihanteellisessa tilanteessa puhdaskaura on pellolla ainoa viljeltävä lajike, ja viljelyssä käytetään vain siihen tarkoitettuja koneita ja säiliöitä. (Kilpivuori 2012)

3.2 Sadonkorjuu ja kuljetus

Ennen korjuuta tulee varmistua, että pellolla tai pellon osalla ei kasva vieraita viljoja. Jos pelto tai peltolohko ei ole enää puhdistettavissa käsin, lohko hylätään kauran gluteenittomuuden takaamiseksi. Gluteeniton kaura tulee puida puhdistetuilla laitteilla ja säilyttää hyvin merkattuna puhdistetulla alueella. Hylätty lohko puidaan ja säilytetään erillään gluteenittomasta kauraerästä, jotta sitä ei missään vaiheessa sekoitu gluteenittoman kauran joukkoon. Sekoittuminen todennäköisesti aiheuttaa koko puhdaskauraerän hylkäämisen. Gluteenittomaan tuotantoon kelpaamaton kaura kelpaa myllyille tavanomaiseen tuotantoon, jos muut laatuvaatimukset täyttyvät. (Kilpivuori 2012)

Gluteenittomasta kaurasta toimitetaan ennakkonäyte myllylle, josta määritetään gluteenipitoisuus ja muita laadullisia ominaisuuksia. Viljelijä voi myös itse mää-

rittää kauran gluteenipitoisuutta kemiallisella pikatestillä, tai laskemalla vieraat jyvät yhdestä kilosta jyviä. Jos vieraita jyviä on enemmän kuin 6 kpl, erä ei kelpaa gluteenittoman kauran tuotantoon. (Kilpivuori 2012)

Kuorman kuljetuksessa myllylle tulee kiinnittää huomiota kuorman huolelliseen peittämiseen. Kuljetukseen käytettävän lavan tulee olla huolellisesti puhdistettu vieraista jyivistä. (Kilpivuori 2012)

Sadon puhtauden varmistus on hyvin tärkeää, koska puhdaskaura on tuote erityisruokavalioihin. Keliakikot tuntevat nopeasti kehostaan, mitä elintarvikkeita he voivat turvallisesti syödä. Kuluttajien luottamuksen kannalta gluteenittomuuden varmistaminen on ehdottomuus, ja raja-arvoista ei voida joustaa. Gluteenin pitoisuuden raja-arvon ylittävät erät joudutaan ohjaamaan muuhun tuotantoon, kuten suurimokauraksi tai rehuksi. (Kilpivuori 2012)

3.3 Hiutaloitintprosessi

Gluteenittoman kauran prosessointi jyivistä hiutaleeksi ei eroa tavanomaisen kaurahiutaleen tuotannosta.

Kun erä käsittelemätöntä kauran jyvää saapuu tuotantoon, se puhdistetaan kaikesta vieraasta aineksesta. Vieraita aineita voivat olla esimerkiksi heinäkorret, hiekka tai pikkukivet. Erotteluun voidaan käyttää esimerkiksi taso- tai rum-puseulaa ja kivenpoistajaa. Kivenpoistaja poistaa myös muun painavan aineksen, kuten lasin. Seuloilla poistetaan myös sellaiset jyvät, jotka ovat tuotantoon sopimattomia koon tai painon suhteen. (Hoseney 1986, 170–171; Bühler AG 2007, 3)

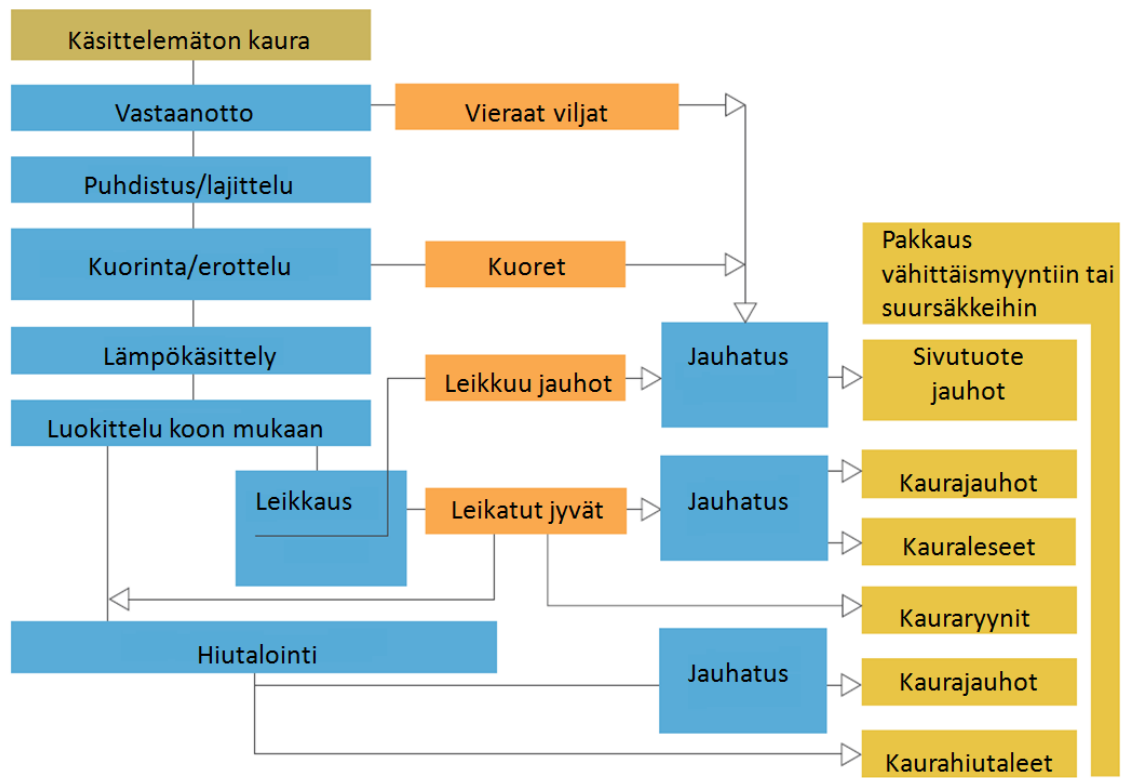
Puhdistuksen jälkeen kauran jyvät eritellään eri kokoluokkiin ja niistä poistetaan kuoret. Kuorinta tapahtuu syöttämällä jyvät linkokuorijaan. Jyvät linkoavat säiliön laitoihin ja törmäyksen voima poistaa kuoren jyvän keskustan ympäriltä. Kevyt kuori puhalletaan pois paineilmalla ja kuorittu jyvä jatkaa matkaa tasoseulalle. Kaikki jyvät eivät kuoriudu heti ensimmäisellä kuorinnalla, mutta tasoseula erottelee kuorimattomat jyvät kuorituista, ja kuorimattomat toimitetaan kuorin-

taan uudelle kierrokselle. Eri kokoluokan kuorituista jyvistä voidaan valmistaa erilaisia lopputuotteita. (Hoseney 1986, 171–172; Bühler AG 2007, 3)

Kuorinnan jälkeen jyvät menevät lämpökäsittelyyn. Lämpökäsittely tapahtuu yleensä höyryn avulla, jolla jyvät lämmitetään noin 90 °C lämpötilaan. Kuumuus poistaa jyvistä kosteutta ja inaktivoi kauran jyvissä olevia lipolyttisiä entsyymejä parantaen lopputuotteen säilyvyyttä. Lämpökäsittely antaa kauralle paahdetun maun, jota yleensä pidetään toivottavana lopputuotteessa. (Hoseney 1986, 171–172; Bühler AG 2007, 3)

Jos kuoritut jyvät ovat riittävän suuria, ne voidaan leikata pienemmiksi. Leikkaamiseen voidaan käyttää esimerkiksi rei'itettyä seulalinkoa, jossa yhdestä jyvistä saadaan kolme tai neljä yhtä suurta leikettä. Jyvien leikkaamisesta syntyy sivutuotteena jauhoa, joka voidaan käyttää muihin tuotteisiin. (Hoseney 1986, 171–173; Bühler AG 2007, 4)

Leikatut ja leikkaamattomat jyvät hiutaloidaan erikokoisiksi hiutaleiksi. Ennen hiutaloitua jyviä kuumennetaan höyryllä, jolloin niistä tulee muokattavampia ja ne eivät hajoa puristuksessa. Kuumennuksella saadaan aikaan myös haluttu kypsyysaste lopputuotteelle. Kuumennetut jyvät litistetään valsseilla hiutaleiksi ja jäähdytetään kylmällä ilmalla. Leikkaamattomista jyvistä valmistetaan suuri-kokoisia kaurahiutaleita ja leikatuista esimerkiksi nopeasti valmistettavia pienempiä kaurahiutaleita. Hiutaloinnin jälkeen tuote on valmis pakkaukseen, joko pieniin pakkauksiin vähittäismyyntiin tai muuhun tuotantoon suursäkkeihin (Hoseney 1986, 171–173; Bühler AG 2007, 4). Kuvio 2 esittelee esimerkin tavanomaisesta kaurahiutaleen valmistuksen prosessikaaviosta.



Kuvio 2. Kaurahiutaleen tuotannon prosessikaavio. (Bühler AG 2007, 5)

4 GLUTEENIANALYTIKKA

Gluteenipitoisuuden analysointiin näytteistä käytettiin R-Biopharmin Ridascreen gliadin analyysikittiä (kuva 2).

Analyysimenetelmä perustuu Codex Alimentariuksen hyväksymään *Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) R5 Mendez Method* -menetelmään. Codex Alimentarius on WHO:n (World Health Organization) ja FAO:n (Food and Agriculture Organization of the United Nations) perustama kansainvälinen organisaatio, joka valvoo ja kehittää turvallisia tuotantotapoja, analyysimenetelmiä ja standardeja elintarvikesektorilla. (R-Biopharm 2010, 12)



Kuva 2. Ridascreen Gliadin kitin sisältö.

4.1 Testikitin ominaisuudet

Ridascreen Gliadin testikitillä voidaan mitata gluteenin määrää erilaisista elintarvikenäytteistä. Kiinteät näytteet jauhetaan täysin homogeeniseksi jauheeksi, josta uutetaan ja mitataan gliadiinin pitoisuus. Nestemäinen näyte vaatii vain gliadiinin uuton. (R-Biopharm 2010, 12)

Monoklonaalinen R5 vasta-aine reagoi vehnän gliadiinin kanssa, ja vastaaviin prolamiineihin rukiissa ja ohrassa. Soija, kaura, maissi, riisi, hirssi ja tattari eivät aiheuta ristireaktioita. (R-Biopharm 2010, 12)

Testikitin detektoriraja gluteenin pitoisuudelle on 3 ppm ja kvantitointiraja on 5 ppm (R-Biopharm 2010, 12). Detektorirajalla tarkoitetaan pienintä gluteenin määrää, jonka analyysi havaitsee näytteestä, mutta tarkkaa määrää ei voida selvittää. Kvantitointirajalla tarkoitetaan pienintä mahdollista gluteenipitoisuutta, joka voidaan tarkasti määrittää lukuarvolla. Analyysiin kuluva aika ohjeen mukaan on 3,5 h kymmenelle näytteelle.

4.2 Toimintaperiaate

Analyysi perustuu antigeenin ja vasta-aineen väliseen reaktioon. Kuoppalevyn kuopat ovat pinnoitettu gliadiinille spesifisellä vasta-aineella. Kun kuoppaan lisätään standardiliuosta tai näytettä, lioksen gliadiini sitoutuu spesifiseen vasta-aineeseen. Tuloksena on vasta-aineen ja antigeenin muodostama kompleksiyhdiste. (R-Biopharm 2010, 13)

Näytteen tai standardin sitoutumattomat komponentit poistetaan kuopista huuhtomalla ne pois pesuliuksella. Kuoppiin lisätään pesun jälkeen vasta-ainekonjugaattia, joka sitoutuu aiemmin muodostuneeseen antigeeni-vasta-aine kompleksiin muodostaen niin sanotun sandwich rakenteen. Reagoimaton konjugaatti poistetaan uudella pesuvaiheella. (R-Biopharm 2010, 13)

Kuoppiin lisätään entsyymisubstraattia sekä värin kehittävää liuosta ja inkuboidaan. Inkuboinnin aikana sitoutunut entsyymikonjugaatti muuntaa värinkehitys-

liuksen sinisen väriseksi. Inkuboinnin jälkeen kuoppiin lisätään viimeiseksi reaktion lopettavaa pysäytysliuosta, joka antaa lopullisen keltaisen värin. Kuopille suoritetaan absorbanssimittaus 450 nm aallonpituudella ja absorbanssin määrä on suoraan verrannollinen näytteessä olevaan gliadiinin määrään. (R-Biopharm 2010, 13)

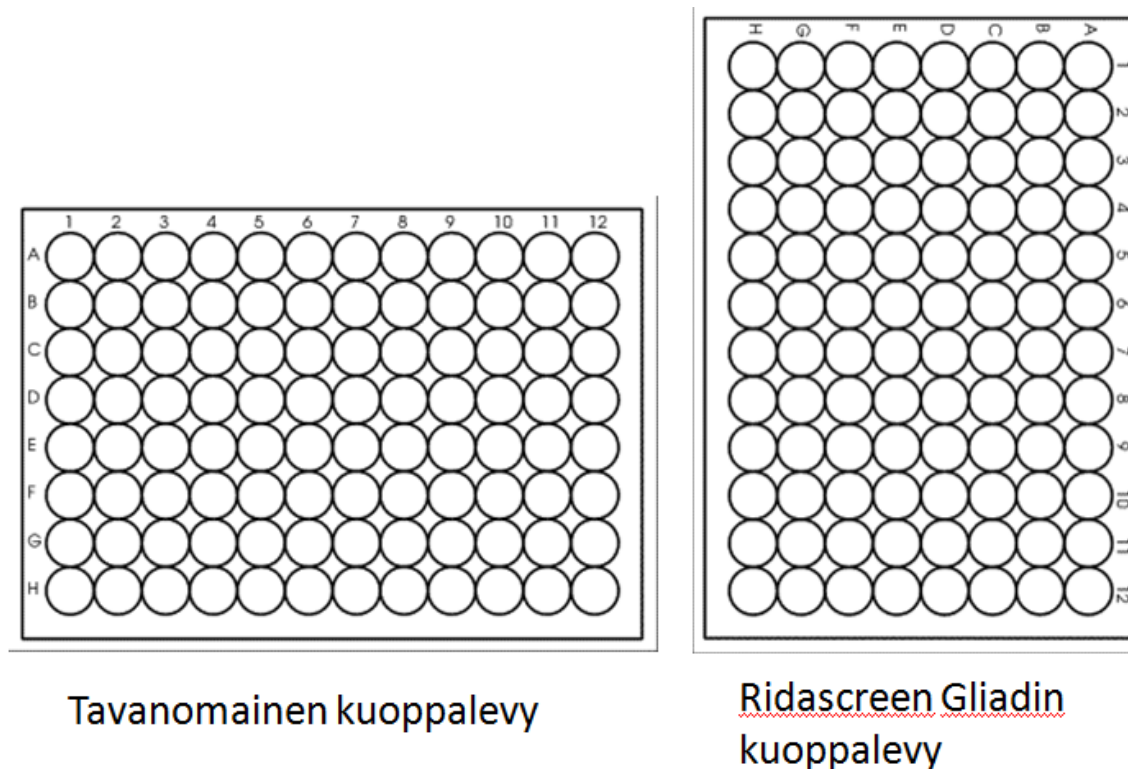
4.3 Käyttöönotto

Analyysin käyttöönotossa oli paljon huomioitavaa ja opittavaa. Vaikka oppilaitoksen laboratoriohenkilöstöltä löytyi paljon kokemusta samankaltaisten analyysien suorittamisesta, ei pulmatilanteilta vältytty.

Analyysin suorittaja on laboratoriotekniikan insinööriopiskelija, jolla oli aikaisempaa kokemusta peruslaboratoriotöistä, mutta ei bioteknisistä vasta-aineanalyyseistä. Tämän takia vasta-aineanalytiikkaa harjoiteltiin ensin tutumalla analyysillä. Harjoituksena tehtiin mm. progesteronin määrittäminen, jossa käytettiin Wallac Oy:n valmistamaa Delfia Progesterone analyysikitteä. Progesteronianalyysi ei merkittävästi eroa mekaanisilta työvaiheiltaan Ridascreen Gliadin analyysikitillä tehtävästä gluteenianalyyseistä.

4.3.1 Laboratoriovälineet

Tavanomainen kuoppalevy koostuu kahdeksasta rivistä (a-h) ja kahdestatoista sarakkeesta (1-12), muodostaen yhteensä 96 testikuoppaa. Tämä on yleinen käytäntö kittivalmistajien keskuudessa. Ridascreen Gliadin kitin kuoppalevy koostuu kuitenkin päinvastoin kahdestatoista rivistä, joissa on kaikissa kahdeksan testikuoppaa. Rivit ovat irrotettavissa kehyksestä, jolloin analyysiin voidaan ottaa tietty määrä kuoppia. Kuoppien määrä riippuu näytteiden lukumäärästä. Kuvasta 3 voidaan nähdä konkreettinen ero tavanomaisen kuoppalevyn ja Ridascreen Gliadin kuoppalevyn välillä, kun molempia työstetään vasemmalta oikealle ja ylhäältä alas.



Kuva 3. Kuoppalevyjen vertailu. (Piirtänyt: Haajanen 5.2.2013)

Kuoppalevyn rakenteesta johtuen päädyttiin tiettyihin välinevalintoihin analyysin suorittamisessa. Laboratoriossa oli haravapipettejä ja automaattinen kuoppalevypesuri, jotka olivat suunniteltuja kahdentoista kuopan yhtäaikaiseen käsittelyyn. Näitä ei kuitenkaan voitu käyttää. Tarvittiin välineitä, joilla kykenisi käsittelemään kahdeksaa kuoppaa kerrallaan kahdentoista kuopan sijasta.

Pipetoinnissa päädyttiin sähkökäyttöisiin pipetteihin, joilla voitiin pipetoida useamman kerran pieniä tilavuuksia ilman uudelleen täyttöä. Näillä pipeteillä työ oli toistettavaa ja ne nopeuttivat työskentelyä verrattuna kerta-annosteleviin pipetteihin.

Viljanäytteiden jauhamisessa käytettiin tavanomaista sähkökäyttöistä Krups GVX 241 kahvimyllyä. Gliadiinin uuttovaiheessa tarvittiin lämpökaappia, koeputkipyörittäjää ja sentrifugia. Gluteenianalyysi suoritettiin laminaarivirtauskaapissa, jotta ulkopuolisilta kontaminaatioilta vältyttäisiin. Absorbanssien mittaamiseen käytettiin Hidex Chameleon monileimalaskinta (Kuva 4).



Kuva 4. Hidex Chameleon monileimalaskin.

4.3.2 Kustannukset ja ajankäyttö

Ridascreen Gliadin-kitti ja gliadiinin uutossa käytettävä Rida Coctail Solution maksavat yhteensä noin 450 euroa (Alv 0 %). Niiden avulla voidaan suorittaa yhteensä 42 kappaletta gluteenianalysejä.

Yksi analyysikitti sisältää 96 testikuoppaa, joista standardiliuoksiin kuluu 12 kuoppaa yhtä analyysikertaa kohden. Näytteen analysointiin kuluu kaksi kuoppaa, koska jokaisesta on tehtävä rinnakkaismittaus. Yhtä näytettä kohden kuluu 2,5 ml Coctail Solution liuosta. Ideaalitulanteessa analysoitaisiin siis 42 näytettä yhdellä kertaa, jolloin kitistä saadaan korkein hyöty rahaa vasten.

Yhtä näytettä kohden analyysin hinnaksi muodostuu pelkistä reagensseista noin 10,50 euroa (Alv. 0 %). Hinta kuitenkin nousee, jos yhdestä kitistä suoritetaan analyysi useamman kerran, koska standardiliuokset on aina mitattava uudestaan jokaisella eri mittauskerralla. Kaupallisessa laboratoriossa on myös otettava huomioon kustannukset tarvikkeista, lukijalaitteesta, tiloista sekä työntekijän palkkakulut.

Turun AMK:n laboratoriotiloista löytyvät kaikki tarvittavat välineet ja laitteet kittianalyysin suorittamiseen, joten niistä ei koostunut lisäkuluja projektiin.

Työohjeessa mainittu arvio analyysiin kuluva ajasta kymmenelle näytteelle on 3,5 h. Analyysin suorittaminen kymmenelle näytteelle vei kuitenkin suorittavalta opiskelijalta noin 1,5 työpäivää. Tämä johtunee siitä, että analyysi ja työtavat eivät olleet tuttuja. Analyysejä suoritettiin kuitenkin useita kertoja, kahden tekijän toimesta, mutta 3,5 h keston ei koskaan päästy.

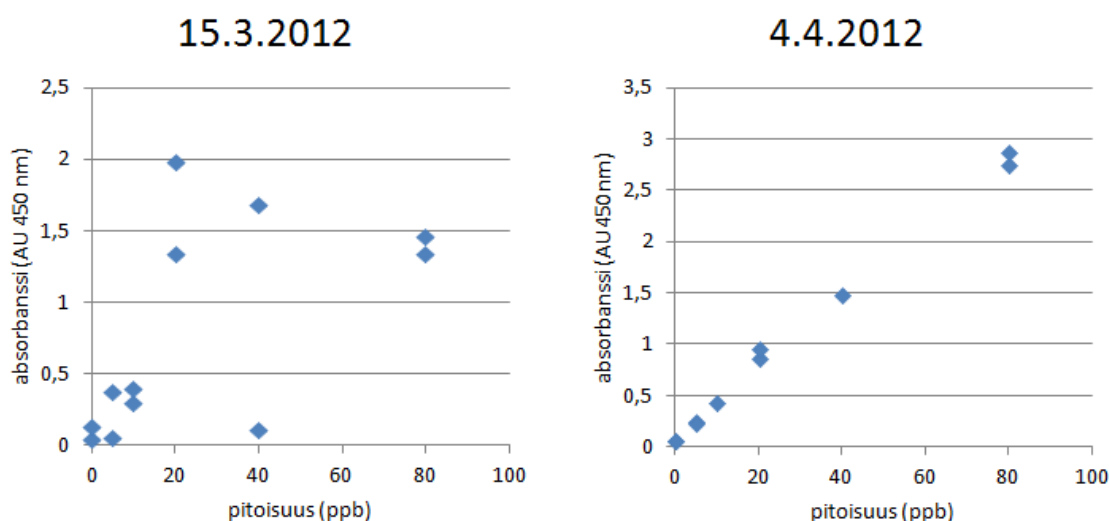
4.3.3 Ongelmatilanteet käyttöönotossa

Testikittiä käyttöönotettaessa törmättiin alussa ongelmaan, jossa absorbanssimittauksien tulokset eivät olleet toistettavia. Standardiliuoksista ei saatu muodostetuksi standardikuvaajaa, koska rinnakkaismittausten toistettavuus oli huono. Myös näytteiden rinnakkaismittaukset erosivat toisistaan. Rinnakkaismittausten CV % oli pahimmillaan jopa satoja prosentteja. Hyvällä tasolla se on noin 10 % suuruusluokassa. CV % on mittaustulosten keskihajonnan ja keskiarvon välinen suhdeluku, jolla mitataan analyysin toistettavuutta.

Toistettavuusongelman oletettiin johtuvan pipetoinnista, mutta se mahdollisuus suljettiin pois tarkastamalla pipetit pipetoimalla laboratoriovetä analyysiväälle tarkkoja tilavuuksia.

Kitin maahantuojalta saatiin tuotetukea ja myyntiedustaja tuli valvomaan analyysin suorittamista. Kuoppalevyn rakenteesta johtuen, automaattista kuoppalevypesuria ei voitu käyttää analyysin pesuvaiheissa. Analyysiohjeissa kuvaillaan pesuvaiheen suoritus, mutta kuvaus ei ole riittävän tarkka. Vika oli analyysin pesuvaiheessa, jossa analyysiohje ei kerro riittävän selkeästi pesuliuoksen poistoon käytettävän napautuksen voimaa. Pesuliuoksen poistamiseksi testi-kuopista, kuoppalevyä piti iskeä ylösalaisin imupaperin päälle oletettua kovemmin. Kuoppalevyä oli käsitelty hellävaraisemmin, koska kuoppalevyn muovirakenne tulkittiin hennoksi. Kuoppalevy kuitenkin kesti riittävän kovan iskun paperia vasten nesteen poistamiseksi kuopista.

Kuviosta 3 voi päätellä, että oikeaoppisen kuoppien tyhjennyksen jälkeen toistettavuusongelma poistui ja standardipitoisuuksista voitiin muodostaa standardikuvaaja.



Kuvio 3. Pesun vaikutus standardikuvaajaan.

Projektin alussa näytteitä analysoitiin ohjeenmukaisella laimennussuhteella 1:500, mutta useimpien näytteiden absorbanssilukemat menivät reilusti mitta-alueen ylitse. Yhdestä näytteestä tehtiin laimennussarja, oikean laimennussuhteen löytämiseksi. Kokeilu tehtiin laimennuskertoimilla 1:500, 1:5000, 1:10 000, 1:20 000, 1:40 000, 1:80 000 ja 1:160 000. Kokeiluista parhaiten mittaualueelle osuivat 1:5000 ja 1:10 000. Seuraavissa analyysissä päädyttiin käyttämään 1:10 000 laimennuskertoimta, koska se osui paremmin mitta-alueen lineaariselle osuudelle. Eniten laimennetuissa näytteissä näkyy myös virheellisiä tuloksia, koska monta laimennuspipetointia aiheuttaa suuremman systemaattisen virheen ja kontaminaatoriskin.

Taulukoissa 2 ja 3 nähdään standardiliuosten ja laimennettujen näytteiden absorbanssilukemat. Mittaukset tehtiin ohjeen mukaan kahteen rinnakkaiskuoppaan, joista laskettiin CV %. Pieni CV % ilmaisee hyvää mittauksen toistettavuutta. CV % lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$CV \% = \left(\frac{\text{tulosten keskihajonta}}{\text{tulosten keskiarvo}} \right) * 100 \%$$

Taulukko 2. Standardiliuosten absorbanssilukemat

Standardiliuokset		
pitoisuus (ppb)	absorbanssi	CV %
80	2,417	6,4 %
80	2,646	
40	1,831	1,6 %
40	1,874	
20	1,023	3,7 %
20	1,079	
10	0,566	1,5 %
10	0,554	
5	0,23	6,7 %
5	0,253	
0	0,034	8,8 %
0	0,03	

Taulukko 3. Näytteen laimennuskoe

Laimennettu näyte	absorbanssi	CV %
1:5000	1,354	0,9 %
1:5000	1,336	
1:10 000	0,696	3,6 %
1:10 000	0,733	
1:20 000	0,327	1,5 %
1:20 000	0,334	
1:40 000	0,113	1,2 %
1:40 000	0,111	
1:80 000	0,047	20,5 %
1:80 000	0,063	
1:160 000	0,342	2,2 %
1:160 000	0,353	

4.4 Gluteenianalyysin koejärjestely

Toimeksiantaja halusi selvittää gluteenin määrän perustason omista myllytuotteistaan ja suorittaa koeajon, jossa tarkoituksena oli tuottaa gluteenitonta kaurahiutaletta. Gluteenipitoisuuden perustasot määritettiin tavanomaisesta kaura-

hiutaleen tuotannosta ja luomukaurahiutaleen raaka-aineesta. Lisäksi analysoitiin päivittäiskaupan tuotteita vertailutuloksiksi.

Gluteenittoman kauran näytteitä kerättiin koko tuotantoketjun varrelta. Sertifioidusta siemenestä saatiin näyte ennen viljelyä ja viljelijältä saatiin esinäyte sadonkorjuun ajalta. Puhdaskauran hiutaloitiprosessista otettiin koeajosta näytteitä yhden tuotantopäivän aikana eri kellonaikoina prosessin kriittisistä kohdista. Näytteitä otettiin vastaanottosiilosta, kuorinnasta, leikkauksesta, hiutaloinnista ja pakkaamosta. Näytteet toimitettiin myllyltä Turun Ammattikorkeakoulun Lemminkäisenkadun toimipisteen laboratorioon gluteenin pitoisuusanalyysiä varten.

4.4.1 Näytteenotto ja käsittely

Näytteitä kerättiin kaikkiaan seitsemästä gluteenittoman kauran tuotantoketjun kohdasta. Kuvassa 5 voidaan nähdä, millä tavalla raaka-aine muuttuu eri kohdissa prosessia. Tuotantoketjun varrelta kerätyt näytteet kerättiin kontaminaatiota välttämiseksi puhtaisiin suljettaviin muovipusseihin, jotka sinetöitiin teipillä varmistukseksi.



Käsitlemätön

Kuorittu

Leikattu

Hiutale

Kuva 5. Kauran ulkonäkö raaka-aineesta tuotteeksi.

Yhden näytteen määrä oli noin kaksi litraa, josta jauhettiin analyysiä varten noin kolme desilitraa. Analyysiohje suosittelee homogenoimaan vähintään viisi grammaa näytettä analyysiä varten. Tässä tapauksessa homogenoitiin kuitenkin merkittävästi enemmän, jotta näytteet olisivat mahdollisimman edustavia koko tuotantoerään nähden.

Jauhetusta näytteestä punnittiin analysoitavaksi 0,25 grammaa. Määrä on hyvin pieni, joten tarkka homogenointi on välttämätöntä hyvän edustavuuden säilyttämiseksi. Pahimmassa tapauksessa epätasainen näyte antaa väärän kuvan koko tuotantoerästä. Jos gluteenin määrä analysoidaan virheellisesti liian korkeaksi, mylly ei voi käyttää kauraa gluteenittomien tuotteiden valmistukseen ja maanviljelijälle koituu rahallista tappiota. Jos analyysi antaa virheellisesti liian pienen gluteenin määrän, saattaa lopputuote aiheuttaa vaivoja keliakasta kärsiville. Näytteen kunnollinen homogenointi ja edustavuus ovat siis ehdottoman tärkeitä.

Punnitusta jauhönäytteestä uutetaan gliadiini, käyttäen R-Biopharmin Coctail solution uuttoliuosta. Liuosta pipetoidaan 2,5 ml koeputkeen johon on punnittu edellä mainittu jauhettu näyte ja sekoitetaan hyvin. Tämän jälkeen näyteputkia inkuboidaan lämpökaapissa 50 °C lämpötilassa 40 minuutin ajan. Näytteen annetaan jäähtyä ja siihen lisätään 7,5 ml:aa etanolia (80 %). Tätä seosta pyöritellään koeputkipyörittäjällä tunnin ajan, jolloin gliadiini liukenee nesteeseen.

Putket sentrifugoidaan 2500 G voimalla ja jauheen päällä oleva liuos (supernatantti) otetaan talteen. Kitin ohjeen mukaan supernatantti säilyy tiukasti suljettuna pimeässä tilassa kahdeksan viikon ajan. Supernatantti sisältää näytteessä olevan gliadiinin, jonka pitoisuus voidaan mitata RidaScreen Gliadin analyysikitillä. Supernatanttia laimennetaan kitin mukana tulevalla laimennusliuoksella. Lopullinen ohjeenmukainen laimennussuhde on 1:500. Ohjeen mukainen laimennussuhde sopii näytteille, joiden arvioitu gluteenipitoisuus on ≤ 20 mg/kg. Laimennuskerrointa voidaan suurentaa, jos näyte sisältää paljon gluteenia (≥ 100 mg/kg). Näytteiden laimennuskerroin on säädettävä sopivaksi, jotta tulos voidaan lukea standardikuvaajan lineaariselta osalta.

4.4.2 Analyysin suorittaminen

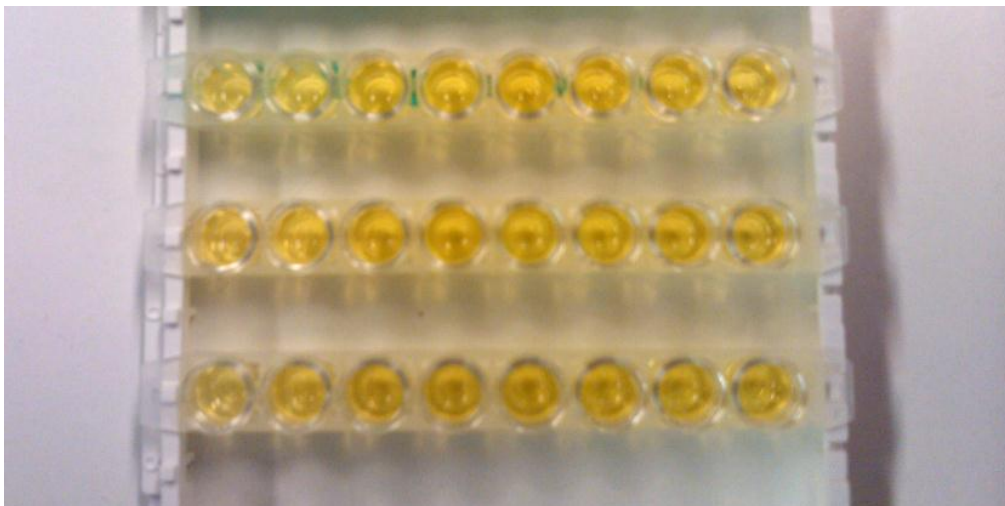
Testikittiä käytettäessä on otettava huomioon näytteiden määrä. Kuoppalevyn testistripeissä on jokaisessa kahdeksan testikuoppaa. Standardiliuoksiin kuluu yhteensä kaksitoista kuoppaa yhtä analyysiä kohden. Näytteiden määrä on

suunniteltava siten, että kaikkiin kuoppiin tulee näytettä. Esimerkiksi kuuden näytteen analysointi vie kolme testikuoppariviä ja jos otetaan uusi kuopparivi, on näytemäärää lisättävä neljällä kappaleella. Näin saadaan korkein hyöty kitistä ja tyhjät testikuopat eivät mene hukkaan.

Testikuopparivejä otetaan tarvittava määrä ja asetellaan ne kiinni muoviseen aihioon. Kuoppiin pipetoidaan standardiliuokset ja näytteet, joita inkuboidaan 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. Tänä aikana näytteen ja standardien gliadiini tarttuu testikuoppien vasta-ainepinnoitteeseen. Kun inkubointi on valmis, huuhdellaan kuopat pesuliuksella.

Ensimmäisen pesuvaiheen jälkeen kuoppiin pipetoidaan entsyymikonjugaatti liuosta ja inkuboidaan samalla tavoin 30 minuutin ajan. Toinen pesuvaihe tulee tämän jälkeen ja kuoppiin pipetoidaan värinkehittävät substraatti- ja värinkehittämisliuokset. Viimeinen inkubointi tapahtuu värinkehittämis- reagenssien lisäyksen jälkeen ja se kestää 30 minuutin ajan pimeässä tilassa.

Viimeiseksi kuoppiin pipetoidaan reaktion pysäyttävää pysäytysliuosta, joka muuttaa liuosten värin keltaiseksi. Keltaisen värin korkea vahvuus kertoo korkeasta gliadiinipitoisuudesta (Kuva 6).



Kuva 6. Kuopat valmiina absorbanssimittaukseen.

Viimeiseksi kuopista mitataan absorbanssilukemat monileimalaskimella 450 nm aallonpituudella. Mittaus on suoritettava 30 minuutin aikana pysäytysliuoksen

lisäämisestä. Monileimalaskimeen kiinnitetty tietokone muodostaa standardikuvaajan ja laskee näytteessä olevan gliadiinin pitoisuuden. Standardikuvaaja noudattaa cubic spline-yhtälöä, jonka lineaarisesta aluetta on käytetty tulosten laskemiseen.

4.4.3 Tulosten laskenta

Monileimalaskin antaa tulokseksi gliadiinipitoisuuden testikaivossa olevalle näytteelle yksikössä ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Jotta saataisiin alkuperäisessä näytteessä oleva gluteenipitoisuus selville, on käytettävä seuraavaa laskukaavaa.

$$\text{gluteenipitoisuus näytteessä } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = x * z * 2$$

Jossa: x = standardisuoralta luettu pitoisuus (ppb)

z = laimennuskerroin (oletuksena 500)

Gliadiinin määrä näytteessä on puolet näytteessä olevan gluteenin määrästä, josta johtuu kerroin 2.

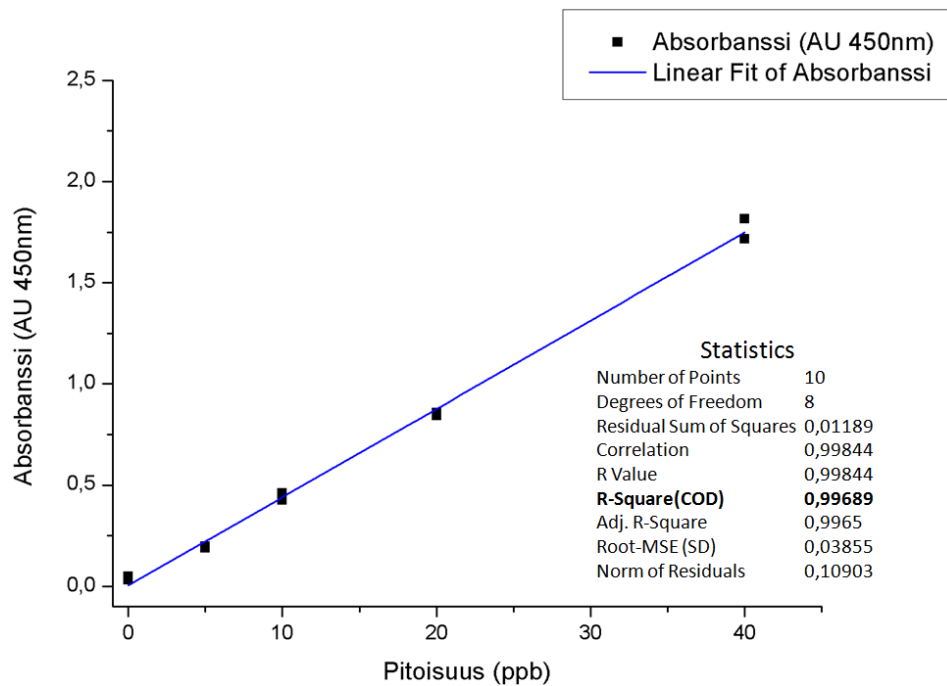
Esimerkki:

Näytteen antama absorbanssi vastaa 10 ppb gliadiinia standardikuvaajalta luettuna. Tämä kerrotaan laimennuskertoimella 500, josta tulokseksi saadaan 5000 ppb (= 5 ppm) gliadiinia. Gliadiinin määrä vastaa kaksinkertaista gluteenin määrää, joten pitoisuudeksi tulee 10 ppm gluteenia.

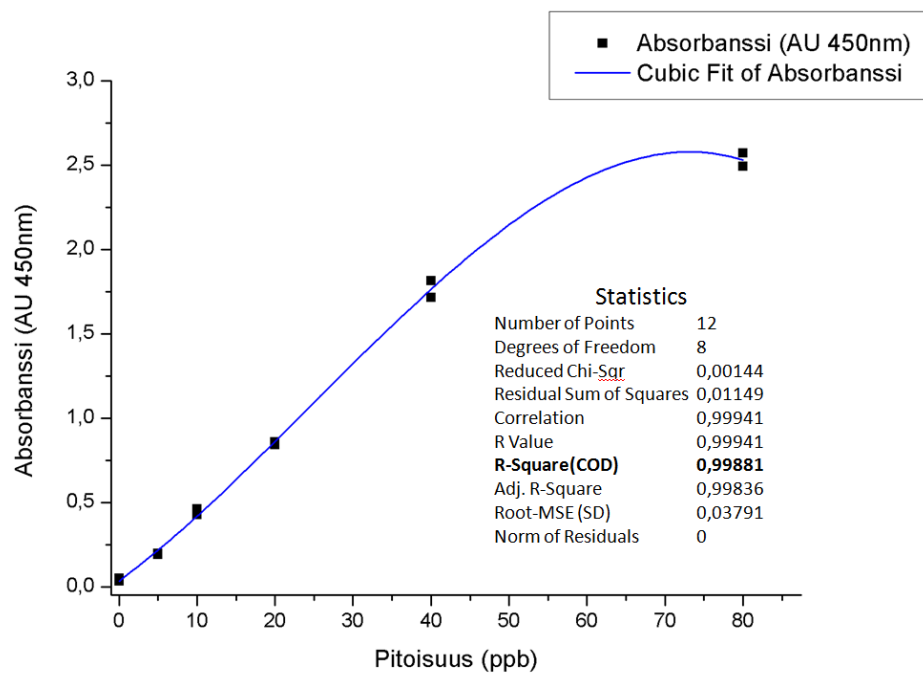
4.4.4 Ongelmat tulosten laskennassa

Absorbanssimittausten yhteydessä, ei heti osattu muodostaa standardipitoisuuksista cubic spline yhtälön kuvaajaa. Tuloksia laskettiin standardikuvaajan lineaariselta osalta, johon voitiin Excel ohjelmistolla määrittää kuvaajan lineaarisen osan yhtälö. Eri yhtälöiden käytöllä ei ole merkitystä saatuun tulokseen, koska tulokset luettiin kuvaajan lineaariselta osalta (0-40 ppb). Kuvioista 4 ja 5 voidaan nähdä lineaarisen ja cubic spline kuvaajien erot. Kuvaajan selityksaste

R^2 (R Square (COD)) kertoo, että kuvaajan sovitus sopii pisteisiin kun R^2 lähestyy arvoa 1.



Kuvio 4. Lineaarinen standardikuvaaja.



Kuvio 5. Cubic Spline standardikuvaaja.

Cubic spline standardikuvaajassa (Kuvio 5) lineaarinen osa loppuu, kun 80 ppm standardipiste "kaataa" kuvaajan. Tämä johtuu laitteen valmistajan mukaan siitä, että Hidex Chameleon monileimalukijan dynaaminen mittausalue 450 nm aallonpituudella päättyy absorbanssiyksikköön 2,1. Tämä oli peruste 80 ppm standardipisteen poisjäämiselle standardikuvaajasta ja lineaarisen laskutavan käyttämiselle.

Tulosten eroavuutta erilaisten laskentatapojen välillä verrattiin parittaisella kaksisuuntaisella T-testillä. Parittaiseen kaksisuuntaiseen T-testiin päädyttiin, koska rinnakkaisen testidatan määrä rajoittaa muiden statististen analyysien käyttöä.

Taulukko 4. Lineaarisen ja Cubic spline laskennan tulokset

Näyte	Linear (ppb)	Cubic spline (ppb)	erotus	
1	3,701	3,736	-0,035	
2	2,260	2,332	-0,072	
3	17,959	17,438	0,521	
4	4,766	4,768	-0,002	
5	2,637	2,699	-0,062	
6	1,712	1,796	-0,084	
			0,044	Keskiarvo
			0,235	Keskihajonta

Parittaisessa T-testissä lasketaan keskiarvo kummankin menetelmän tuloksien erotuksista ja testataan eroaako erotuksien keskiarvo nolasta. Näytteet (1-6) eivät ole keskenään rinnakkaisnäytteitä, vaan samasta absorbanssimittauksesta saatuja gliadiinin pitoisuuksia eri näytteille, eri laskumenetelmillä. T-testin laskukaava on seuraavanlainen.

$$\pm t = x(\sqrt{n}/s)$$

Jossa: x = keskiarvo
 s = keskihajonta
 n = näytteiden lukumäärä

Luvuille suoritetaan laskukaavan mukainen laskutoimitus:

$$\pm t = 0,044(\sqrt{6}/0,235) \approx 0,460$$

Kuvasta 7 voidaan taulukosta selvittää arvo, jota testin tulos ei saa ylittää. Taulukon lukema on tässä tapauksessa 2,571, kun halutaan 95 % luottamustasolla selvittää eroaako tuloksien erotus nolasta vapausasteen ollessa 5. Laskun tuloksesta 0,460 (< 2,571) voidaan päätellä, että erotuksen tulos ei eroa nolasta 95 % varmuudella. Tuloksesta voidaan todeta, että laskentamenetelmillä saadaan samanlaisia tuloksia. Kaikki tulokset analyyseistä laskettiin käyttäen lineaarista standardikuvaajaa pitoisuusvälillä 0-40 ppb.

Critical Values for the Student t – test								
2T	80	90	95	98	99	99.8	99.9	2T
1T	90	95	97.5	99	99.5	99.9	99.95	1T
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289	636.578	1
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328	31.600	2
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	12.924	3
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610	4
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	6.869	5
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959	6
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408	7
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041	8
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781	9
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587	10
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437	11
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318	12
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221	13
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140	14
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073	15

Kuva 7. T-testin taulukoidut arvot.

Samaan tulokseen päädytään suorittamalla Excel taulukkolaskentaohjelman data-analyysityökalulla parittainen kaksisuuntainen T-testi. Testi antaa tulokseksi seuraavanlaisen taulukon (Taulukko 5).

Taulukko 5. Excelin T-testin tulokset.

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	$\alpha = 0,05$	
	<i>Linear (ppb)</i>	<i>Cubic spline (ppb)</i>
Mean	5,505734767	5,4615
Variance	38,4102401	35,5511823
Observations	6	6
Pearson Correlation	0,99999782	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	5	
t Stat	0,460172717	
P(T<=t) one-tail	0,332355636	
t Critical one-tail	2,015048372	
P(T<=t) two-tail	0,664711271	
t Critical two-tail	2,570581835	

Testauksen avulla halutaan todistaa väite, etteivät kahden laskentatavan tulokset eroa toisistaan. Tämän väittämän kannalta oleelliset Excelin laskemat arvot ovat **t Stat** ja **P(T<=t) two-tail**. Testin luottamustason osoittaa arvo α , jonka arvo 0,05 vastaa 95 % luottamustasoa. Arvo **t Critical two-tail** on taulukosta haettu lukuarvo, jota **t Stat** ei saa ylittää.

Väittäjä osoitetaan todeksi silloin, kun **P(T<=t) two-tail** on suurempi kuin luottamustaso α ja **t Stat** pienempi kuin **t Critical two-tail**. Lukuarvojen perusteella voidaan todeta 95 % varmuudella, että laskentatapojen tulokset eivät eroa toisistaan.

5 TULOKSET

EU-lainsäädännön säätämät gluteenin pitoisuusrajat ovat ≤ 20 ppm gluteenittomille tuotteille ja ≤ 100 ppm vähägluteenisille tuotteille. (KOMMISSION ASETUS (EY) N:o 41/2009)

5.1 Lähtötasomäärittelyt

Toimeksiantajan myllytuotteista tehtiin gluteenin pitoisuudelle lähtötasomäärittelyt. Määrittelysten avulla selvitettiin, kuinka paljon gluteenia tavanomaisessa kauran lopputuotteessa on. Näytteet laimennettiin 1:10 000 suhteella, koska niiden epäiltiin sisältävän paljon gluteenia.

Taulukko 6. Lähtötasoanalyysi kauratuotteesta.

Näyte	Gluteenipitoisuus (ppm)
Kaurahiutale 1	499
Kaurahiutale 2	839
Kuorittu kauran jyvä	247

5.2 Tavanomainen kauran hiutalointi

Prosessista analysoitiin valmistuotteen gluteenipitoisuutta eri kellonaikoina otetuista näytteistä. Näytteiden laimennuskerroin oli 1:10 000.

Taulukko 7. Gluteenipitoisuus tavanomaisesta kaurahiutaleesta tuotantoko-
keessa.

Aika (klo)	Gluteiinipitoisuus (ppm)
9:00	133
10:00	229
11:00	719
13:00	243
15:00	29

5.3 Luomukaura

Luomukauran käsittelemättömästä jyvästä suoritettiin analyysi kahdesta erillisestä rinnakkaisnäytteestä laimennussuhteella 1:10 000

Taulukko 8. Luomu kauranjyvän gluteenipitoisuus.

Tuote	Gluteiinipitoisuus (ppm)
Luomukauran jyvä	295
Luomukauran jyvä	298

5.4 Gluteenittoman kauran koeajo

Gluteenittoman kauran koko tuotantoketjusta analysoitiin gluteenipitoisuus siemenviljasta lopputuotteeseen. Gluteenittoman tuotannon näytteet analysoitiin ohjeenmukaisella laimennussuhteella 1:500.

5.4.1 Siemenkaura

Siemenviljalajikkeina olivat Venla ja Steinar, joista näytteet saatiin Boreal Kasvinjalostus Oy:ltä. Näytteet analysoitiin kahtena rinnakkaisnäytteenä, joille suoritettiin erillinen näytteenkäsittely.

Taulukko 9. Siemenkauran gluteenipitoisuus.

Lajike	Gluteenipitoisuus (ppm)
Steinar	< 5
Steinar	< 5
Venla	< 5
Venla	< 5

5.4.2 Puidun kauran esinäytteet

Esinäytteet saatiin viljelijältä ennen hiutalointikoeajon aloittamista. Näytteestä määritettiin gluteenipitoisuuden lisäksi muita laadullisia arvoja. Esinäytteistä oli kaksi rinnakkaisnäytettä, jotka käsiteltiin ja analysoitiin erikseen.

Taulukko 10. Gluteenittoman kauran jyvän esinäytteiden gluteenipitoisuus.

Näyte	Gluteenipitoisuus (ppm)
Esinäyte 1	< 5
Esinäyte 2	< 5

5.4.3 Hiutalointiprosessin näytteet

Hiutalointiprosessin näytteet otettiin yhden tuotantopäivän aikana prosessin viidestä eri kohdasta, eri kellonaikoina. Kohdat olivat vastaanottosiilo, kuorinta, leikkaus, hiutalointi ja pakkaus.

Taulukko 11. Hiutalointiprosessin näytteiden gluteenipitoisuus.

Aika (klo)	Näyte	Gluteenipitoisuus (ppm)
8:48	Vastaanottosiilo	< 5
9:45	Vastaanottosiilo	8,6
11:18	Vastaanottosiilo	< 5
11:45	Vastaanottosiilo	< 5
12:45	Vastaanottosiilo	< 5
13:45	Vastaanottosiilo	< 5
8:50	Kuorinta	< 5
9:45	Kuorinta	< 5
11:30	Kuorinta	< 5
11:45	Kuorinta	< 5
12:45	Kuorinta	< 5
13:45	Kuorinta	< 5
8:45	Leikkaus	< 5
9:45	Leikkaus	< 5
10:47	Leikkaus	< 5
11:45	Leikkaus	< 5
12:45	Leikkaus	< 5
13:45	Leikkaus	< 5
8:40	Hiutalointi	8,2
9:45	Hiutalointi	< 5
10:47	Hiutalointi	< 5
11:45	Hiutalointi	< 5
12:45	Hiutalointi	< 5
13:45	Hiutalointi	< 5
10:55	Pakkaus	< 5
12:00	Pakkaus	< 5
12:52	Pakkaus	< 5
13.45	Pakkaus	< 5

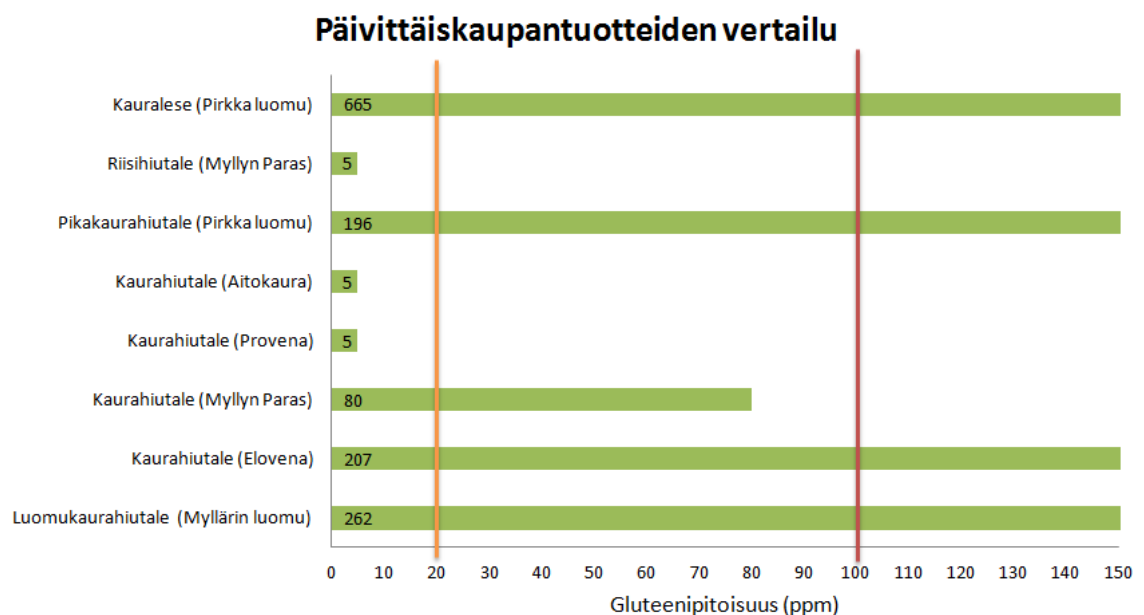
5.5 Päivittäiskaupan tuotteita

Vertailuna analysoiduille näytteille, analysoitiin tavanomaisesta ruokakaupasta löytyviä viljatuotteita.

Taulukko 12. Päivittäistavarakaupan tuotteiden gluteenipitoisuuksia.

Tuote	Gluteenipitoisuus (ppm)
Luomukaurahiutale (Myllärin Luomu)	262
Kaurahiutale (Elovena)	207
Kaurahiutale (Myllyn Paras)	80
Kaurahiutale (Provena)	< 5
Kaurahiutale (Aitokaura)	< 5
Pikakaurahiutale (Pirkka luomu)	196
Riisihutale (Myllyn Paras)	< 5
Kauralese (Pirkka luomu)	665

Päivittäiskaupan tuotteiden erot ja rajan ylitykset voi kätevästi nähdä kuvioista 6, johon on merkitty oranssilla gluteenittoman tuotteen raja (20 ppm) ja punaisella vähägluteenisen tuotteen raja (100 ppm).



Kuvio 6. Päivittäiskaupan tuotteiden vertailu.

6 TULOSTEN TARKASTELU JA MERKITYS

Näytteitä analysoidessa liikuttiin johdonmukaisesti gluteenittomampaan suuntaan. Alkupään perustasonäytteissä oli luonnollisesti suurempia gluteenipitoisuuksia ja tuotteet eivät olleet lähelläkään gluteenittoman tuotteen raja-arvoa. Tämä johtui siitä, että tuotantoa ei ollut vielä valmisteltu gluteenittoman lopputuotteen valmistamiseen. Myöskään raaka-aineena käytettyä kauraa ei viljelty gluteenittoman kauran viljelyohjeita noudattaen. Alkupäässä analysoitiin myös päivittäiskaupan tuotteita, joiden joukossa oli gluteenittomia tuotteita. Näin saatiin tuloksia korkeista ja matalista gluteenipitoisuuksista.

Mielenkiintoisena tuloksena on kauraleseen antama korkein gluteenipitoisuus päivittäiskaupan tuotteista (Kuvio 6). Tavallisessa kuoritussa kaurassa ei ole suurta gluteenipitoisuutta, mutta kun joukkoon lisätään leseitä gluteenin määrä kasvaa. Duodecimin ja keliakialiiton julkaisemassa Keliakia kirjassa mainitaan, että jyvän kuoriosia ja alkio eivät sisältäisi gluteenia. Kuitenkin Leseitä sisältävät tuotteet antavat järjestäen korkeampia gluteenipitoisuuksia. Tämän tuloksen perusteella, teoria ja käytäntö eivät kohta.

Korkeat gluteenipitoisuudet tavanomaisessa kaurahiutaleessa johtuvat muiden viljojen aiheuttamasta kontaminaatiosta. Vieraiden viljojen jäämät viljelyssä ja prosessikoneistossa voivat näin aiheuttaa hyvinkin suuren gluteenipitoisuuden luonnostaan gluteenittomalle kauratuotteelle.

Luomukaura kuuluu gluteenipitoisiin tuotteisiin tulosten perusteella. Luomukaura näytteet ylittävät lähes kolminkertaisesti vähägluteenisen tuotteen rajan ja yli kymmenkertaisesti gluteenittoman tuotteen rajan. Tästä voidaan päätellä, että tavanomainen luomuviljely sellaisenaan ei tuota gluteenitonta lopputuotetta. Luomuviljelytapaa voidaan kuitenkin muokata gluteenittomaksi noudattamalla gluteenittoman kauran viljelyohjeita.

6.1 Gluteenittoman kaurahiutaleen koeajon onnistuminen

Tuloksien perusteella gluteenittoman kaurahiutaleen koeajo onnistui tarkoituksenmukaisella tavalla. Tulokset olivat pääsääntöisesti alle kvantitointirajan (< 5 ppm), jolloin tarkkaa pitoisuutta ei voitu määrittää.

Tulokset tuotantoketjun alkupäässä olivat huippuluokkaa. Siemenkaurasta saadut näytteet ja viljelijältä saadut esinäytteet sadosta olivat tulosten mukaan lähes täysin gluteenittomia. Tulokset olivat kvantitointirajan alapuolella, jolloin tarkkaa pitoisuutta ei voitu määrittää.

Hiutaloitiprosessin eri kohdista otetuista näytteistä saadut tulokset olivat myös hyviä. Gluteenia ei löytynyt tuotteista ja puolivalmisteista ollenkaan kahta poikkeusta lukuun ottamatta. Kaikki muut paitsi klo 9.45 vastaanottosiilon ja klo 8.45 pakkaamon näytteet olivat kvantitointirajan alapuolella. Kyseisistä vastaanottosiilon ja pakkaamon näytteistä saatiin analysoiduksi tarkka määrä gluteenia, mutta pitoisuudet olivat kuitenkin reilusti gluteenittoman tuotteen raja-arvon alapuolella.

Suurempi gluteenin määrä edellä mainituissa kahdessa näytteessä johtuu todennäköisesti muiden viljojen aiheuttamasta kontaminaatiosta. Erityisesti pakkaamon tulos on selitettävissä sillä, että gluteenittoman tuotannon alkaessa, tuotannon loppupäässä oli vielä aiemmin valmistettua tavanomaista kaurahiutalletta. Mitattu gluteenin määrä oli kuitenkin reilusti alle lainsäädännön raja-arvon, jolloin tuote on turvallinen keliakikolle.

6.2 Vertailututkimuksia

Tähän kappaleeseen on kerätty eräitä vertailututkimuksia, joissa esiintyy joidenkin kauratuotteiden gluteenimääriä. Viimeisessä vertailututkimuksessa esitetään tutkimus kahdesta eri gluteenianalyysimenetelmästä ja niiden eroista.

6.2.1 Eviran Elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden valvontatutkimus 2003

Elintarvikevirasto tutki 80 elintarvikkeen gluteenipitoisuuden. Näiden elintarvikkeiden ilmoitettiin olevan gluteenittomia tai luontaisesti gluteenittomia. Tutkimuksessa kiinnitettiin erityisesti huomiota kauratuotteisiin, joista määritettiin paljonko niiden sekaan on joutunut vehnän, ohran tai rukiin gluteenia. Tutkimuksen tulokset on ilmoitettu grammoina gluteenia sataa grammaa tuotetta kohden (g / 100 g) ja sallittu ylin arvo oli 0,02 g/100g (200 ppm) gluteenia, mutta mittaus-epävarmuuden ollessa 37 % se nousi arvoon 0,027 g/100g (270 ppm). Tutkimus noudattaa nykyään vanhentunutta Codex Alimentariuksen ohjeistusta gluteenittomille tuotteille. Gluteenianalyysit suoritettiin AnalyCenin SWEDAC-akkreditoidussa Lidköpingin laboratoriossa ja analyysimenetelmänä käytettiin AOAC-menetelmää 991:19. (Elintarvikevirasto 2004)

Tutkimuksessa kaksi kauratuotetta ylitti mainitun 0,027 g/100 g (270 ppm) raja-arvon. Näiden kauratuotteiden korkeat tulokset johtuivat todennäköisesti muiden viljojen gluteenin aiheuttamasta kontaminaatiosta. (Elintarvikevirasto 2004)

6.2.2 Gluteenittomuuden selvitys elintarvikkeista Jyväskylän alueen elintarvikelaitoksista ja -yrityksistä

Vuonna 2010 Mikkelin Ammattikorkeakoulun ympäristötekniikan opiskelijat tekivät opinnäytetyönä tutkielman gluteenittomuudesta elintarvikkeista Jyväskylän alueen yrityksistä. Tutkielmassa oli mitattu gluteenipitoisuuksia eri ravintoloiden ja ruokaloiden annoksista R5 Elisa-menetelmää käyttäen (Heinonen & Turunen 2010, 2). Samaa menetelmää käytetään myös tässä tutkielmassa.

Näytteitä oli yhteensä 40 kappaletta, joista suurimmassa osassa gluteenin pitoisuudeksi saatiin alle 5 ppm. Poikkeuksia oli viidessä näytteessä, joissa gluteenin määrä oli kuitenkin alle 20 ppm. Ainoa rajan ylittävä mittaustulos saatiin makaronilaatikosta, jonka gluteenipitoisuudeksi saatiin yli 80 ppm. (Heinonen & Turunen 2010, 37–42)

6.2.3 Selvitys elintarvikkeiden gluteenittomuudesta Keski-Pohjanmaan alueen yrityksissä

Vuonna 2011 Mikkelin Ammattikorkeakoulusta valmistui toinen gluteenittomuuteen liittyvä opinnäytetyö. Työssä tutkittiin elintarvikkeiden gluteenipitoisuutta Keski-Pohjanmaan alueen elintarvikeyrityksistä ja laitoksista. Erityisesti kiinnitettiin huomiota elintarvikeyritysten omavalvonnan tasoon gluteenittomuuden suhteen. Analyysit suoritti Netfoodlab Oy ja analyysimenetelmä oli myös tässä tutkielmassa käytetty R5 Elisa-menetelmä. (Laamanen 2011, 2)

Tutkielmassa oli mukana 40 näytettä Keski-Pohjanmaan yhteistoiminta-alueelta eri elintarvikeyrityksistä ja -laitoksista. Tutkimuksessa on esimerkiksi mitattu kaurapuuron gluteenipitoisuus, joka oli alle 5 ppm. Suurimmassa osassa näytteistä gluteenin pitoisuus oli alle 5 ppm. Poikkeuksia oli seitsemän kappaletta, joista neljässä gluteenin määrä alitti 20 ppm ja lopuissa se ylitettiin. Korkeimman lukeman sai possupata yli 80 ppm gluteenipitoisuudella. (Laamanen 2011, 39–41)

6.2.4 Analyysimenetelmien vertailu

Tricia Thompson ja Enrique Mendéz julkaisivat vuonna 2008 tutkimuksensa "Commercial assays to Assess Gluten Content of Gluten free Foods: Why they are not created equal" Journal of the American Dietetic Associationin julkaisussa. Tutkimuksen aiheena oli verrata kahta erilaisia Elisa menetelmää gluteenin määrän analysointiin. Verrattavina menetelminä olivat ω -Elisa ja R5 Elisa. Taulukossa 13 on lueteltu menetelmien eroja. (Thompson & Méndez 2008)

Taulukko 13. Elisa menetelmien eroja. (Thompson & Méndez 2008)

	ω -Elisa	R5 Elisa
Mitä mitataan?	Monoklonaalinen vasta-aine ω -gliadiini fraktiolle vehnän gliadiinista.	Vasta-ainetta, jota esiintyy gliadiinissa, hordeiinissa ja sekaliinissa.
Kvantitointiraja	150 ppm gluteenia	5 ppm gluteenia
Käyttötarkoitus	Arvioidaan gluteenipitoisuutta kuumista ja kylmistä ruoista.	Arvioidaan gluteenipitoisuutta kuumista ja kylmistä ruoista.
Uuttomenetelmä	40 % etanoli	Coctail liuos, joka on seos erilaisia uuttokomponentteja.
Vahvuudet	ω -gliadiini ei denaturoidu kuumennettaessa. Voidaan käyttää kuumiin ja normaaleihin elintarvikkeisiin.	Vasta-aine kestää lämpöä ja tunnistaa kaikki prolamiinit.
Heikkoudet	Aliarvioi ohran proteiinin pitoisuuden ohrapitoisista tuotteista ja ei pysty kvanttoimaan hydrolysoitunutta gliadiinia.	Yliarvioi ohran proteiinipitoisuuden, kun gliadiinistandardeja käytetään ja ei pysty kvanttoimaan hydrolysoitunutta gliadiinia.

Tutkimuksen johtopäätös oli, että R5 Elisa-menetelmä on parempi kuin ω -Elisa-menetelmä gluteenin määrän analysointiin. R5 Elisa-menetelmää käytettiin myös tämän tutkielman gluteinipitoisuuksien analysointiin.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyössä keskityttiin kahteen asiaan, gluteenianalyysiin ja gluteenittoman kaurahiutaleen tuotantoon. Näiden kahden tutkielman osa-alueen liittymäkohtana toimi gluteenittomuus elintarvikkeessa. Tämä tutkielma keskittyy vahvemmin gluteenianalyysin käyttöönottoon liittyviin asioihin ja pintapuolisesti gluteenittoman kaurahiutaleen tuotantoon.

Tässä kappaleessa käydään läpi projektin kumpikin osa-alue onnistumisineen ja katsotaan kehityksen suuntaa tulevaisuudessa.

7.1 Gluteenianalyysin käyttöönotto

Opinnäytetyön päämääränä oli ottaa käyttöön gluteenianalyysikitti, jossa piti olla selvät käyttöohjeet ja muutoin kivuton käyttöönottoprosessi. Käyttöönotossa onnistuttiin ongelmista huolimatta hyvin. Tänä päivänä analyysejä suoritetaan varmalla taidolla ja laboratoriotyöskentely kehittyy joka kerralla.

Välinevalinnat kehittyvät parempaan suuntaan, aina kun löydetään uusia tarkoitukseen sopivia välineitä. Hyvänä kehitysideana analyyseille voidaan pitää automaattisen kuoppalevypesurin hankintaa. Pesuri poistaisi ihmisen aiheuttaman mahdollisen virheen ja nopeuttaisi analyyysin suorittamista.

Tuloksien laskemiseen käytetään lineaarista laskentatapaa, mutta ohjelmistot cubic spline laskentaan ovat käytettävissä. Laskennan käyttöönotto ja tulosten varmennus pitää kuitenkin suorittaa ensin kouluttamalla henkilöt käyttämään kyseisiä ohjelmistoja.

Laskentaan perehdyttiin syvällisesti, lineaarisen laskentatavan oikeellisuuden osoittamiseksi. Tästä huolimatta, kun vertaillaan lineaarisen ja cubic spline kuvaajien sopivuutta pisteisiin, voidaan todeta että cubic spline kuvaaja sopii paremmin standardipitoisuuksien antamiin absorbansseihin. Tämän osoittaa esimerkiksi cubic spline sovituksen parempi selitysaste (Kuvio 5), joka on lähem-

pänä arvoa yksi kuin lineaarisen kuvaajan selitysaste (Kuvio 4). Ero lukujen välillä on kuitenkin hyvin marginaalinen. Jos cubic spline laskentatapa otettaisiin käyttöön, voitaisiin analysoida tarkasti näytteitä koko standardikuvaajan alueella eikä pelkästään lineaarisella osalla.

7.2 Gluteenittoman kaurahiutaleen koeajo

Tutkielman toimeksiantajan tavoitteena oli valmistaa gluteenitonta kaurahiutaleta ja selvittää tavanomaisien tuotteiden gluteenipitoisuuksia. Koeajo järjestettiin huolellisesti ja mittaustulosten perusteella koeajo oli erittäin onnistunut. Koeajopäivänä gluteenia ei löytynyt tuotteesta eikä puolivalmisteista merkittäviä määriä. Vain kaksi näytettä sisälsi gluteenia kvantitoitavan määrän ja nekin olivat reilusti raja-arvon alapuolella.

Näytteitä analysoitiin koko tuotantoketjun varrelta ja kaikki näytteet olivat järjestelmällisesti gluteenittoman tuotteen raja-arvon alapuolella. Tästä voidaan päätellä, että gluteeniton menettely viljelyssä ja huolellinen puhdistus hiutaloitiprosessissa, toimii suunnitellulla tavalla.

Toimeksiantaja aikoo todennäköisesti tulevaisuudessa tuottaa gluteenittomia tuotteita, joihin ei ole monia kotimaisia raaka-aineen tuottajia. Näin voidaan odottaa uusia tuotteita, jotka vetoavat kotimaisuudesta innostuneisiin kuluttajiin. Ennen kaikkea, nämä tuotteet tulevat olemaan turvallisia keliakikoilla ja kiinnostavia gluteenittoman tai vähägluteenisen ruokavalion omaaville.

Turvallisuuden takaa toimeksiantajan aikomus suorittaa myllyn laboratoriossa gluteenipitoisuuden omavalvontaa. Omavalvonnassa tullaan todennäköisesti käyttämään tämän tutkielman menetelmiä ja samaa analyysikittiä.

LÄHTEET

Bühler AG, 2007. Oats - a high quality product. Viitattu 28.3.2013.
http://www.buhlergroup.com/global/downloads/Oats_MU16006_en.pdf

Bühler AG, 2013. Oats: From kernel to flake. Viitattu 28.3.2013.
<http://www.buhlergroup.com/global/en/industry-solutions/commodity-food/grain/oats.htm>

CODEX STAN 118 - 1979. Codex Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten.

Elintarvikevirasto, 2004. Elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden valvontatutkimus 2003. Viitattu 8.5.2013.

http://www.evira.fi/attachments/elintarvikkeet/valvonta_ja_yrittajat/tutkimukset_ja_projektit/arkisto/gluteenipitoisuuden_valvontatutkimus_2003.pdf

Elintarvikevirasto, 2004. Elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden valvontatutkimus 2003 tulokset. Viitattu 8.5.2013.

http://www.evira.fi/attachments/elintarvikkeet/valvonta_ja_yrittajat/tutkimukset_ja_projektit/arkisto/elintarvikkeiden_gluteenipitoisuuden_valvontatutkimuksen__2003__tulostaulukko.pdf

Gallagher, E. 2009. Gluten-Free Food Science and Technology. West Sussex: Wiley-Blackwell.

Heinonen, R.; Turunen E. 2010. Gluteenittomuus elintarvikkeissa: Gluteenittomuuden selvitys elintarvikkeista Jyväskylän alueen elintarvikelaitoksista ja -yrityksistä. Opinnäytetyö. Ympäristötekniologia koulutusohjelma. Mikkeli: Mikkelin ammattikorkeakoulu.

Hoseney, R. C. 1986. Principles of cereal science and technology. Toinen painos. St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc.

Jafner, B-M. 2011. Stor efterfrågan på ren havre. Cerealien-lehti 2/2011, 14-15.

Keliakialiitto ry. 2011. Tunnistatko keliakian?. Viitattu 28.3.2013
http://www.keliakialiitto.fi/document.php?DOC_ID=482&SEC=06774d4fa4c0b52238827b2dbf968b4f&SID=1#tunnistatko_keliakian_esite.pdf

Kilpivuori, M. 2012. Henkilökohtainen tiedonanto 30.04.2012.

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 41/2009.

Laamanen, E. 2011. Gluteenittomat elintarvikkeet: Selvitys elintarvikkeiden gluteenittomuudesta Keski-Pohjanmaan alueen yrityksissä. Opinnäytetyö. Ympäristötekniologia koulutusohjelma. Mikkeli: Mikkelin ammattikorkeakoulu.

Mäki, M.; Collin, P.; Kekkonen, L.; Visakorpi, J.; Vuoristo, M (toim.). 2006. Keliakia. Duodecim, Keliakialiitto. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

R-Biopharm, 2010. Ridascreen Gliadin 10-05-10, Analyysiohje.

Saarela, A-M.; Määttä, S.; Hyvönen, P.; von Wright, A. 2005. Elintarvikeprosessit. 2. uudistettu painos. Tampereen Yliopistopaino Oy Juvenes Print, Savonia-ammattikorkeakoulu, Kehittämisen ja palvelukeskus.

Thompson, T.; Méndez, E. 2008. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. Journal of the American Dietetic Association 10/2008, 1682-1687.