

Merja Kyntäjä

Elintarvikkeiden kuvaaminen

VP-ESEM:lla

Opinnäytetyö
Kevät 2014
Elintarvike ja maatalous
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Elintarvike ja maatalous

Koulutusohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketekniikka

Tekijä: Merja Kyntäjä

Työn nimi: Elintarvikkeiden kuvaaminen VP-ESEM:lla

Ohjaaja: Pasi Junell

Vuosi: 2014

Sivumäärä: 50

Liitteiden lukumäärä: 0

Seinäjoen ammattikorkeakoululle on hankittu pyyhkäisyelektronimikroskooppiin (SEM) lisälaitteisto, VP-ESEM. Laitteisto mahdollistaa huokoisen materiaalin ja orgaanisten näytteiden kuvaamisen alipaineellisessa ympäristössä.

Tässä opinnäytetyössä tutustuttiin SEM:n toimintaperiaatteisiin, paineen vaikutukseen ja mahdollisuuksiin kuvata elintarvikkeita eri VP-ESEM -olosuhteissa. Painealueena käytettiin 500–900 Pa, elektronivirralla 10–20 kV. Tutkimuksessa käytettiin pääosin takaisinsirontadetektoreita EPSE Ring, EPSE Needle ja CZ BSE ja näytteenä päällystämätöntä ohran jyvää.

Työssä tarkastellaan elintarvikkeiden rakenteisiin vaikuttavia komponentteja, kuten vettä, hiilihydraattia, proteiinia ja rasvaa. Työn lopussa tutkitaan mahdollisuuksia havainnoida elintarvikkeiden rakenteissa tapahtuvia muutoksia VP-ESEM -kuvien avulla. Tutkimukseen valittiin tärkkelyksen liisteröityminen, proteiinivaahdon muodostuminen ja pikkuleivän valmistus.

Työssä käytetyt tutkimusalueet ovat vain pintaraapaisu mahdollisuuksista, johon VP-ESEM pystyy. Tässä työssä saatujen tuloksien ja kokemusten pohjalta on kuitenkin hyvä jatkaa elintarvikkeiden elektronimikroskooppitutkimuksia.

Avainsanat: pyyhkäisyelektronimikroskopia, elintarvikekemia

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: Seinäjoki University of Applied Sciences

Degree programme: Biotechnology and Food Processing

Specialisation: Food Technology

Author: Merja Kyntäjä

Title of thesis: Imaging Food by VP-ESEM

Supervisor: Pasi Junell

Year: 2014

Number of pages: 50

Number of appendices: 0

Seinäjoki University of Applied Sciences has updated its accessories to Scanning Electron Microscopy in order to image organic samples. Now it is possible to investigate cellular samples under variable pressures. VP -microscope system is a typical environmental scanning electron microscope.

In the thesis the principle of the SEM, the influence of pressure and the opportunities to image food in different circumstances of the VP-ESEM were clarified. The variation of pressure was 500–900 Pa and the primary beam energy was 10–20 kV. The main images were taken by using backscattered electron detectors EPSE Ring, EPSE Needle and CZ BSE. Uncoated grain of barley was used as a sample.

The active components of food structure, such as water, carbohydrate, protein and fat were examined. Possibilities to image food structure with the VP-ESEM were tested. Processes, such as starch gelation, protein formation, and cookie baking were selected as objects for the study.

The thesis is a beginning to utilizing VP-ESEM investigation. However now it is easier to continue examining microscopic details of organic samples by using the VP-ESEM.

Keywords: Scanning electron microscope, Food chemistry

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ	4
Kuvio- ja taulukkoluetelo.....	6
Kaavaluettelo	8
Käytetyt termit ja lyhenteet	9
1 JOHDANTO	10
2 ELINTARVIKKEIDEN MIKRORAKENTEET	11
2.1 Vesi	12
2.2 Hiilihydraatit	13
2.3 Proteiini	15
2.4 Rasva.....	17
3 PYYHKÄISYELEKTRONIMIKROSKOOPPI	19
3.1 Pyyhkäisyelektronimikroskoopin (SEM) toimintaperiaate.....	20
3.2 Paineen vaikutus.....	25
3.3 VP-ESEM	26
3.4 ZEISS EVO MA10.....	28
4 OLOSUHTEIDEN VAIKUTUS KUVAN LAATUUN	31
4.1 Jännitteen muutoksen vaikutus eri detektoreilla.....	31
4.2 Paineen muutoksen vaikutus EPSE Ring -detektorilla	33
4.3 Näytekammion kosteusolosuhteen muutos.....	35
4.4 Muita haasteita.....	36
4.4.1 Paineen muodostuminen näytekammioon	36
4.4.2 Aika	37
5 ESIMERKKEJÄ PROSESSOINNIN VAIKUTUKSESTA	
ELINTARVIKKEEN RAKENTEESEEN.....	38
5.1 Tärkkelyksen liisteröityminen	38
5.2 Proteiinin vaahtoutuminen.....	40
5.3 Raaka-aineiden sekoitus ja paisto.....	41

6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	44
LÄHTEET	48

Kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuvio 1. Elintarvikkeiden rakenteiden mittakaava Aguilera mukaan (Pray & Yaktine 2009, 28).....	12
Kuvio 2. Tärkkelysgeelin viskositeetti kuumennettaessa ja jäädytettäessä Delcourin ja Hoseneyn mukaan (Männistö 2012, 21).	15
Kuvio 3. Proteiinin neljä rakennetta.....	16
Kuvio 4. Kristallisoituneiden verkkojen prosessi ja muodostuminen (Hernandez & Kamal-Eldin 2013, 35).	18
Kuvio 5. Ihmissilmän ja mikroskooppien tarkkuusmittakaava.	19
Kuvio 6. Pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate (Atteberry 2009).	21
Kuvio 7. Signaaleja, joita muodostuu elektronivirran osuessa näytteeseen (Stokes 2008, 18).....	22
Kuvio 8. Elektronisuihkun ja näytteen pinnan välinen vuorovaikutus maksimisyvyyksillä (Stokes 2008, 33; Pelttari 2007, 36).....	22
Kuvio 9. Veden olomuoto eri höyrynpaineessa lämpötilafunktiona näytteen eri a_w – arvoilla.	27
Kuvio 10. Zeiss EVO MA10 näytekammio 1) EDS -detektori 2) SE1 -detektori 3) CZ BSD –detektori 4) VPSE G3 -detektori 5a) EPSE Ring ja 5b) EPSE Needle – detektorit 6) alin apertuuri 7) näytekuppi ja 8) jäädytettävä näytealusta.	28
Kuvio 11. Kaurahiutale kuvattuna SE1-detektorilla +0,5 °C:ssa a) 465 Pa, 74 % kosteus b) 650 Pa, 100 % kosteus.....	35
Kuvio 12 Lämpökäsitelty perunatärkkelys kuvattuna a) 20 kV:n, b) 15 kV:n ja c) 10 kV:n jännitteillä EPSE Ring -detektorilla.	37
Kuvio 13. a) Rikkonainen perunatärkkelys 20 °C lämpökäsittely, valomikroskooppi b) Rikkonainen perunatärkkelys 20 °C lämpökäsittely, VP-ESEM c) Perunatärkkelys 60 °C lämpökäsittely, valomikroskooppi d) Perunatärkkelys 60 °C lämpökäsittely, VP-ESEM.	39
Kuvio 14. 60 °C:ssa lämpökäsitelty perunatärkkelys 12000x-suurennoksella.....	39
Kuvio 15. Kananmunan valkuaisvaahto eri vaahdotusajoilla a) kevyt vaahto b) kiiltävä vaahto c) kokkareinen vaahto.	40

Kuvio 16. Pikkuleivän valmistusprosessi kuvattuna EPSE Ring -detektorilla a) huoneen lämpöinen voi b) voi-sokerivaaho c) pikkuleipätaikina d) paistettu pikkuleipä..... 42

Taulukko 1. Kaasumolekyylien lukumäärä 1,0 cm³:ssä jäännöskaasua eri painealueilla lämpötilassa 20 °C (Fontell ym. 1986, 28)..... 26

Taulukko 2. Jännitteen vaikutus eri detektoreilla otettuihin poikkileikatun ohranjyväkuviin. Paine 500 Pa, lämpötila: +1,5 °C, kosteus: 73,6 %. 32

Taulukko 3. Paineen ja jännitteen vaikutus EPSE Ring -detektorilla otettuihin poikkileikatun ohranjyväkuviin..... 34

Taulukko 4. Näytekammion alin mahdollinen paine verrattuna tavoitepaineeseen eri Purge Control -asetuksilla..... 36

Taulukko 5. Veden aktiivisuusarvot pikkuleipäprosessin eri vaiheissa..... 42

Kaavaluettelo

Kaava (1) Veden aktiivisuus.....	13
----------------------------------	----

Käytetyt termit ja lyhenteet

a_w	Water activity, veden aktiivisuus.
Adsorptio	Atomien, molekyylien, hiukkasten tms. tarttuminen aineen pintaan.
Detektori	Ilmaisin.
Emissio	Atomin tai molekyylin siirtyessä korkeammasta energiatilasta alempaan, sen energia pienenee ja syntyvä säteily kuljettaa vapautuneen energian pois.
Faasi	Aineen tila, jonka kemiallinen koostumus ja fysikaalinen ominaisuudet ovat homogeeniset koko näytteessä.
Fokus	Polttopiste, johon elektronivirta kohdistetaan.
Kontrasti	Kuvan tummuus–valoisuusero.
kV	Kilovoltti.
Miselli	Lipidien muodostama järjestynyt rakenne.
Ostwald ripening	Elintarvikkeiden vesi–rasva -emulsioissa pisaroiden kasvuprosessi. Suuret rasvapisarat kasvavat pienistä pisaroista liuenneista molekyyleistä.
Pa	Pascal, SI-järjestelmässä paineen yksikkö.
Reologia	Kuvaa muodon muuttumista siihen kohdistuvan voiman vaikutuksesta esim. viskositeetti ja elastisuus.
SEM	Scanning Electron Microscopy, pyyhkäisyelektronimikroskooppi.
VP-ESEM	Variable Pressure - Environmental Scanning Electron Microscope.

1 JOHDANTO

Yleisesti ruuan tai elintarvikkeen valmistusta havainnoidaan omin aistein; näkemällä, tuntemalla, maistelemalla tai jopa kuuntelemalla. Kun kastike sakeutuu, kananmunan valkuaisvaahto kovenee, vehnätaikina irtoaa kädestä tai popcorn poksahtaa, todetaan prosessivaiheen tavoite saavutetuksi. Useinkaan ei kiinnitetä huomiota, mikä tai mitkä asiat muuttuvat itse raaka-aineen sisällä.

Ihmissilmän kyky ei riitä havaitsemaan näitä pieniä elintarvikkeen valmistuksen kannalta välttämättömiä mikrotason muutoksia. Pienen mittakaavan tutkimukseen tarvitaan mikroskooppeja.

Seinäjoen ammattikorkeakoulun pyyhkäisyelektronimikroskoopille hankittiin orgaanisen materiaalin kuvaamisen mahdollistavat lisälaitteet. Lisälaittehankinnan tavoitteena oli lisätä elektronimikroskoopin hyödynnettävyyttä niin opetuksessa kuin tutkimus- ja kehitystyössä. Tämän opinnäytetyön tavoitteiksi asetettiin VP-ESEM -laitteiston toimivuuden testaus ja elintarvikenäytteiden kuvaamisen mahdollisuuksien tutkiminen.

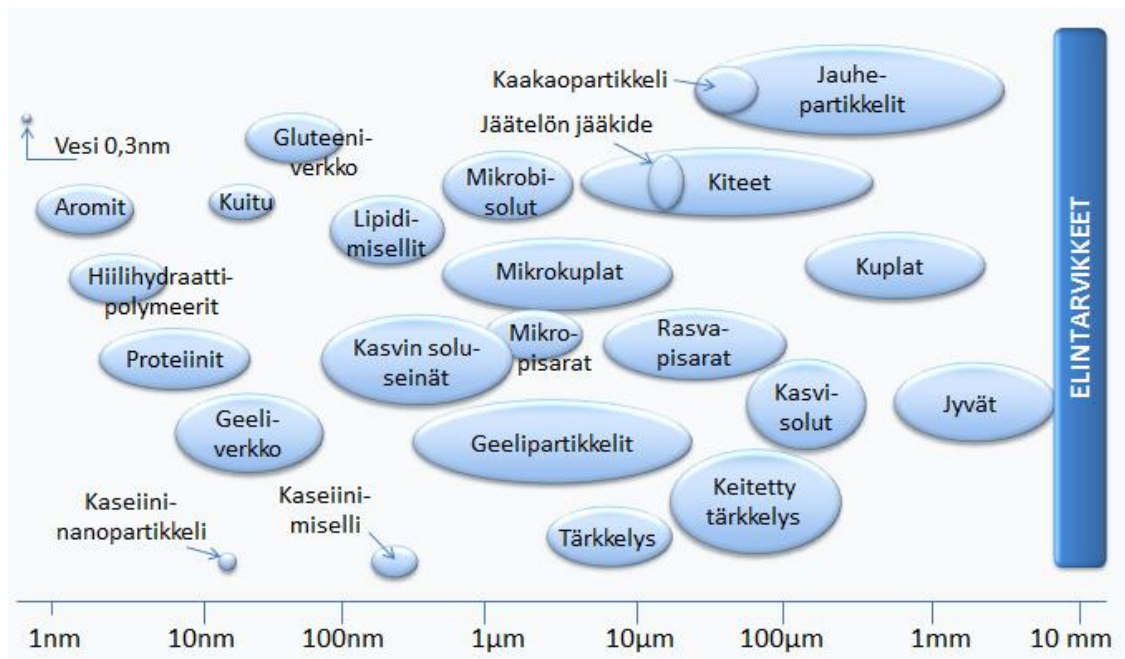
Teoriaosassa käsitellään veden, proteiinin, hiilihydraatin ja rasvan vaikutuksia elintarvikkeiden rakenteisiin ja pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaatetta. Tutkimusosassa on katsaus olosuhteisiin, joissa elintarvikkeesta on mahdollista ottaa elektronimikroskooppikuvia. Lopuksi havainnollistetaan mikroskooppikuvien hyödynnettävyyttä elintarvikkeiden mikrotason rakenteiden tutkimuksessa.

2 ELINTARVIKKEIDEN MIKRORAKENTEET

Elintarviketieteet muodostuvat osista biokemiaa, biologiaa, bakteriologiaa, fysiikkaa ja tekniikkaa. Kemia on tärkeässä osassa sillä elintarvikkeet koostuvat useista kemiallisista yhdisteistä. Ruuassa tapahtuu kemiallisia muutoksia niin prosessoinnin, varastoinnin kuin valmistuksen aikana. (Meenakshi 2007, 2.) Merkittävimmät elintarvikkeiden komponentit muodostuvat vedestä, rasvoista, proteiineista, hiilihydraateista ja ilmasta sekä niiden yhdistelmistä (Heertje 2014, 21).

Monet elintarvikkeiden rakenteisiin vaikuttavista elementeistä ovat niin pieniä, ettei niitä näe paljain silmin (Pray & Yaktine 2009, 27). Elintarvikkeissa on pisaroita, ilmakuplia, rakeita, kiteitä, säikeitä, misellejä ja niiden rajapintoja. Elintarvikkeen käyttäytymisen ymmärtämiseksi tarvitaan tietoa myös sen rakenteesta ja rakenteellisten elementtien vuorovaikutuksesta. Vuorovaikutusvoimat määrittävät koostumuksen ja rakenteen pysyvyyden. Elintarvikkeiden mikrorakenteita ja eri komponenttien vuorovaikutusta voidaan tutkia valo- tai elektronimikroskoopilla. (Heertje 2014, 3.)

Prosessoinnin aikana elintarvikkeiden proteiinit, tärkkelys ja rasvat käyvät läpi nano- ja mikrometri -mittakaavassa useita rakenteellisia muutoksia. Mittakaava on yksi tapa tarkastella elintarviketta. Toinen on aika. Prosessin onnistumiseksi tietyt elintarvikkeen rakenteen komponentit tulee tulla tietyssä järjestyksessä tiettyyn paikkaan oikeaan aikaan. Esimerkiksi vaahdon rakenteen muodostuminen tapahtuu tiettyjen rakenteellisten komponenttien läsnä ollessa tietyn prosessitapahtuman vaikutuksesta, tietyssä mittakaavassa ja tietyssä ajassa. Vaahdotuksen alussa emulgointiainemolekyylit adsorboituvat ilma-vesi-rajapintaan nanometrimittakaavassa millisekunneissa. Sitä vastoin myöhäisempi prosessivaihe tapahtuu suuremmalla pituus- ja aikaskaalalla, kun nestevirtaukset kuplan ympärillä vaativat mikrometrimittakaavan ja se vie aikaa muutaman minuutin. Kuvioon 1 on piirretty elintarvikkeiden rakenteiden mittakaava Aguilera mukaan. (Pray & Yaktine 2009, 27–28.)



Kuvio 1. Elintarvikkeiden rakenteiden mittakaava Aguilera mukaan (Pray & Yaktine 2009, 28).

2.1 Vesi

Useimmat elintarvikkeet sisältävät montaa eri faasia, joissa vesi on tärkeä komponentti. Vettä esiintyy kaikissa elintarvikkeissa. Suurimmillaan keskimääräinen kosteuspitoisuus on kasviksissa ja hedelmissä noin 90 %. Kuivaksi mielletyssä kidesokerissakin on vettä 0,04 %. Vesi vaikuttaa elintarvikkeiden valmistukseen, prosessointiin, mikrobiologiseen säilyvyyteen sekä kemiallisiin ja fysikaalisiin ominaisuuksiin. (Barbosa-Cánovas ym. 2008, 47.)

Vesi on polaarinen yhdiste, jossa kaksi vetyatomia on sitoutunut kovalenttisesti happiatomiin. Vaikka vesimolekyyli on sähköisesti neutraali, positiiviset ja negatiiviset varaukset ovat jakautuneet epäsymmetrisesti. Veden dipolaarinen luonne mahdollistaa vetysidosten muodostumisen muiden polaaristen molekyylien välillä. (Barbosa-Cánovas ym. 2008, 48.)

Lämpötilan noustessa vesimolekyylien väliset sidokset heikkenevät ja vesi höyrystyy. Veden haihtumista tapahtuu, vaikka lämpötila ei nousisi kiehumispisteeseen. Elintarvikkeella on taipumus kuivua ympäröivän olosuhteen tasapainotilaan saakka. Lämpötilan laskiessa veden kyky sitoa kaasua kasvaa.

Poolisista ominaisuuksista johtuen vedellä on kyky liuottaa nestemäisiä ja kiinteitä aineista sekä kaasuja. (Dahlgren 1997, 22–34.) Veden kulkeutuminen elintarvikkeessa on lämpötilan lisäksi riippuvainen paineesta ja elintarvikkeen koostumuksesta. Veden olomuodon (kaasu, neste, kiinteä) muutokset vaikuttavat elintarvikkeen rakenteellisiin ominaisuuksiin. (Barbosa-Cánovas ym. 2008, 50.)

1950-luvulla yhdistettiin ruuan suhteellinen höyrynpaine termodynaamiseen veden aktiivisuuteen käyttäen määritelmää:

$$a_w = p / p_o$$

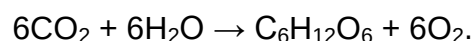
Kaava (1) Veden aktiivisuus

missä a_w on vedenaktiivisuus, p on näytteen höyrynpaine ja p_o on puhtaan veden höyrynpaine samassa lämpötilassa ja paineessa. (Barbosa-Cánovas ym. 2008, 51.) Veden aktiivisuusarvo vaihtelee a_w 0–1 välillä. Veden muodostaessa dipoli-dipoli-, ioni-, van der Waals- tai vetysidoksia esimerkiksi tärkkelyksen tai proteiinin kanssa, vedenaktiivisuus pienenee. Vedenaktiivisuus on riippuvainen lämpötilasta, sillä veden aktiivisuus kasvaa lämpötilan noustessa. (Meenakshi 2007, 202.)

Elintarvikkeen huokoskoko vaikuttaa veden aktiivisuuteen, vaikka tuotteiden vesipitoisuus olisi sama. Elintarvikkeessa, jossa on paljon pieniä huokosia, veden aktiivisuus on pienempi kuin suurihuokoisessa elintarvikkeessa. (Jouppila 2006). Mittaamalla ja kontrolloimalla elintarvikkeen veden aktiivisuutta on mahdollista ennustaa, mitkä mikro-organismit mahdollisesti pilaavat tuotetta, ylläpitävät elintarvikkeen kemiallista stabiiliutta, vähentävät entsyymaattista ruskistumista ja rasvojen hapettumista, pitkittävät entsyymien aktiivisuutta ja vitamiineja sekä optimoida elintarvikkeiden fysikaalisia rakenteita. (Meenakshi 2007, 203.)

2.2 Hiilihydraatit

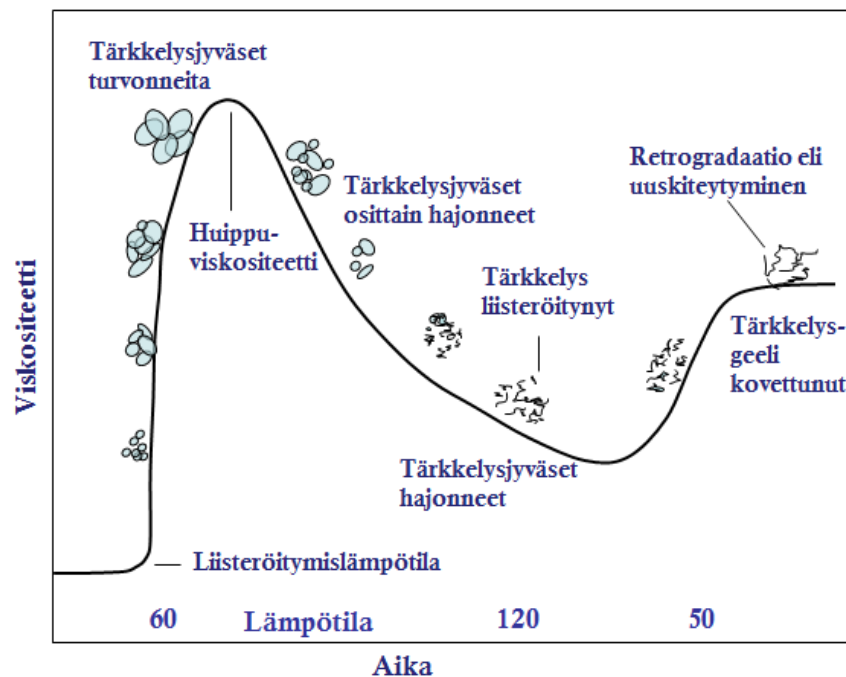
Kasvit ovat tärkein ravinnon hiilihydraattilähde. Kasvit tuottavat glukoosia yhteyttämällä auringon energian avulla hiilidioksidista ja vedestä:



Kasvit pystyvät muodostamaan suuren määrän erilaisia hiilihydraatteja. Yksinkertaiset sokerit kuten glukoosi ja fruktoosi ovat monosakkarideja. Disakkareita ovat maltoosi, laktoosi ja sakkaroosi. Polysakkarit, kuten tärkkelys ja selluloosa, ovat pitkiä glukoosiyksiköistä koostuvia polymeerejä. Sokerit ovat kiteisiä ja liukenevat veteen muodostaen makean liuoksen. (Meenakshi 2007, 11.) Mitä alhaisemmassa lämpötilassa sokeri liukenee, sitä helpommin se kiteytyy. Sokerin kiteisyydellä on vaikutusta tuotteen rakenteeseen, hienokiteinen liukenee nopeammin kuin karkea. (Heinonen 1993, 27–30.)

Tärkkelys on kasvin tärkein energiavarasto. Tärkkelysjiyvän alkuperä voidaan tunnistaa tutkimalla jyvän kokoa ja muotoa mikroskoopilla. (Meenakshi 2007, 11–14.) Tärkkelys koostuu kahdesta glukoosipolymeeristä: lineaarisesta amyloosista ja haaroittuneesta amylopektiinistä. Tärkkelysjiyvän sisällä ne järjestäytyvät vuorotellen muodostaen kasvurenkaat. Suuremman raekoon tärkkelysjiyvä turpoaa enemmän prosessoinnin aikana ja näin vaikuttaa elintarvikkeen rakenteeseen. (Wrolstad 2011, 110–113.)

Veden läsnä ollessa tärkkelystä lämmitettäessä tärkkelysjiyvä turpoaa moninkertaiseksi, rakenne hajoaa ja amyloosi valuu ulos jyvästä. Geeliytymislämpötila on riippuvainen tärkkelyslähteestä ja tärkkelyksen molekyylitason koostumuksesta. Geeliytyminen on havaittavissa elintarvikkeessa tilavuuden ja viskositeetin kasvuna. Kun kuumen tärkkelysgeelin lämpötila laskee, geelin viskositeetti kasvaa. Tällöin tärkkelys pyrkii kiteytymään uudelleen. Uudelleenkiteytymisessä amyloosimolekyylit järjestäytyvät uudelleen. (Wrolstad 2011, 113.) Tärkkelysgeelin viskositeettia lämpötilan ja ajan suhteen on kuvattu kuviossa 2. Useat elintarvikkeiden laatuvirheistä johtuvat tärkkelyksen uuskiteytymisestä, geelin sameutumisesta, viskositeetin noususta, ei-liukenevien kalvojen muodostumisesta tai nesteen erottumisesta (Männistö 2012, 24).



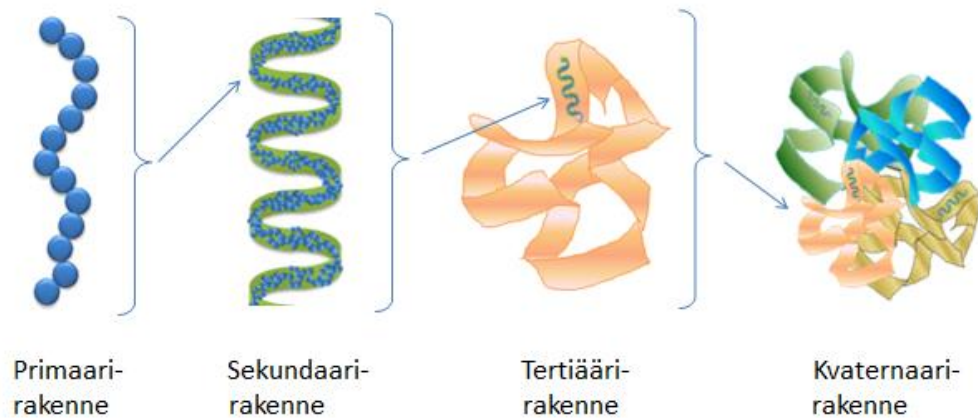
Kuvio 2. Tärkkelysgeelin viskositeetti kuumennettaessa ja jäähdytettäessä Delcourin ja Hoseneyn mukaan (Männistö 2012, 21).

2.3 Proteiini

Proteiinit eli valkuaisaineet muodostuvat aminohapoista. Aminohapot muodostavat pitkiä ketjuja aminohapporyhmän reagoidessa toisen aminohapon karboksyylihapporyhmän kanssa. Yksinkertaisissa proteiineissa on vain aminohappoja. Konjugoituneissa proteiineissa on mukana muitakin ryhmiä. (Vilhunen 2012, 3.) Yksinkertaisia proteiineja ovat kananmunan valkuaisen albumiini, vehnän gliadiini ja gluteiini ja sidekudosten kollageeni. Konjugoituneita proteiineja ovat esimerkiksi fosforihappoon yhdistynyt maidon kaseiini ja lipidiin yhdistynyt kolesteroli tai munankeltuaisen lesitiini. (Dahlgren 1997, 60.)

Proteiinit muodostavat primaari-, sekundaari-, tertiääri ja kvaternaarirakenteita. Kuvioon 3 on piirretty proteiinin neljä eri rakennetta. Proteiinien aminohappojärjestystä kutsutaan primaarirakenteeksi. Sekundäärirakenne muodostuu tietyllä tavalla suuntautuneista primaarirakenteista ja on muodoltaan kierteinen primaarirakenteen tilan tarpeen ja molekyylien välisten voimien vaikutuksesta. Rakenne voi olla joko poimuttunut tai serpentiinimäinen. Serpentiinimäinen sekundäärirakenne sisältää runsaasti vetysidoksia.

Sekundäärirakenteista muodostunutta proteiinin kolmiulotteista muotoa kutsutaan tertiäärirakenteeksi. Tertiäärirakenteessa proteiinien sivuryhmien välille muodostuu vetysidoksia, rikkisiltoja, van der Waalsin voimia ja ionivuorovaikutuksia. Proteiinien denaturoitumisessa tertiäärirakenteella on suuri merkitys. Kahden tai useamman aminohappoketjun toisiinsa sitoutunutta ryhmittymää kutsutaan kvaternaarirakenteeksi. (Vilhunen 2012, 3–4.)



Kuvio 3. Proteiinin neljä rakennetta.

Proteiinien vedensidonta-, vaahtoutumis- ja emulgoitumiskyky, denaturoituminen ja koaguloituminen vaikuttavat elintarvikkeen rakenteeseen. Kun elintarviketta kuumennetaan tai vaivataan tai lasketaan pH:ta tai lisätään suolaa, proteiinit denaturoituvat. Proteiinikerän denaturoituessa sen sisäiset sidokset rikkoutuvat ja kerä suoristuu. Samalla proteiinin kyky sitoa vettä heikkenee. Proteiinien kyky sitoa vettä vaikuttaa merkittävästi esimerkiksi kypsän lihan ja kalan herkullisuuteen. Kypsennettäessä lihan solujen proteiiniverkkoon sitoutunutta vettä vapautuu lämpötilan noustessa. (Dahlgren 1997, 61–63.)

Proteiinien vaahtoutumista tapahtuu vatkaessa esimerkiksi kananmunan valkuaista. Vатkaaminen rikkoo proteiinien rakenteen, jolloin proteiini denaturoituu. Hydrofobiset proteiinien osat hakeutuvat ilmakuplien ympärille, kuplaan päin ja hydrofiiliset proteiinien osat hakeutuvat kohti vettä. Ilmakuplien ympärillä tapahtuva proteiinien saostuminen ja liukoisuuden pieneneminen mahdollistavat uusien ilmakupla–proteiini-rajapintojen syntymisen. Kun vatkaamista jatketaan, proteiini juoksettuu eli neste ja kiinteä aine erottuvat toisistaan. (Vilhunen 2012, 9–12.)

Kun avautuneet proteiiniketjut reagoivat keskenään, tapahtuu hyytymistä tai jähmettymistä (Vilhunen 2012, 6). Runsaan veden läsnä ollessa jähmettyneet eli koaguloituneet proteiiniketjut muodostavat hyytelön, leivän tai makkaran rakenteiden rungon. Proteiinien emulgoitumiskyky mahdollistaa vesi-rasva-emulsioiden syntymisen ja säilymisen. (Dahlgren 1997, 44–63.)

2.4 Rasva

Kemiallisessa jaottelussa rasvat kuuluvat lipideihin. Rasvat eivät liukene veteen ja niiden tiheys on veden tiheyttä pienempi. (Heinonen ym. 1993, 19.) Rasvat muodostuvat glyserolista ja siihen kiinnittyneistä rasvahapoista. Kun glyserolin jokaiseen kolmeen OH-ryhmään on esterisidoksella kiinnittynyt joko tyydyttynyt, tyydyttymätön tai monitydyttymätön rasvahappo, yhdistettä sanotaan triglyseridiksi. Tyydyttyneen rasvahapon hiilivetyrungossa ei ole ainuttakaan kaksoissidosta hiiliatomien välillä, kun tyydyttämätön rasvahappo sisältää yhden kaksoissidoksen ja monitydyttämätön useamman. (Dahlgren 1997, 50–52.)

Kiinteä eläinrasva sisältää paljon tyydyttyneitä rasvahappoja, kuten palmitiini- ja öljyhappoa. Juoksevassa kasviöljyissä on tyydyttymättömiä linoli- ja öljyhappoja. (Heinonen ym. 1993, 19.) Ennen vuotta 1910 95 % rasvan kulutuksesta oli eläinrasvaa. Kun opittiin kovettamaan tyydyttämättömiä rasvoja lisäämällä vetyä rasvahapon kaksoissidoksiin, kasviöljyjen käyttö lisääntyi. (Meenakshi 2007, 7.)

Paljon rasvaa sisältävien tuotteiden valmistuksessa rasvojen koostumuksella ja kylläisyysasteella on suuri merkitys. Rasvan kiderakenne vaikuttaa elintarvikkeen reologisiin, mekaanisiin ja aistittaviin ominaisuuksiin. Rasvat voivat pilata tuotteen kiteytymällä tai sulamalla. Rasvahappojen pituus ja tyydyttyneisyysaste vaikuttavat kiteytymisen muotoon ja käyttäytymiseen. Kiteytymiskäyttäytymiseen vaikuttaa myös muiden rasvojen läsnäolo. Rasvahappokoostumus ja kiderakenne määrittävät rasvan fyysiset ominaisuudet, kuten sulamiskäyttäytymisen, ominaispainon, viskositeetin ja savuamis- ja leimahduspisteet. Kuviossa 4 on havainnollistettu rasvan rakenteen muutokset ajan suhteen nano-, mikro- ja makrotasolla prosessoinnin, jäähdtyksen ja varastoinnin aikana. (Hernandez & Kamal-Eldin 2013, 34–35.)

	PROSESSOINTI		JÄÄHDYTYS - VARASTOINTI
	Sekunneista minuuttiin	1 - 10 minuuttia	Minuuteista kuukausiin
	NANO 0,4 - 250 nm	MIKRO 0,25 - 200 µm	MAKRO < 0,2 mm
PROSESSI	Nestemäinen rasva	Pilkkoutuminen	Kiteytyminen
RAKENNE			
		Kiteytyminen	Uudelleen kiteytyminen
		Kiinteä rakenne	Verkon tiivistyminen
		Ryhmittäytyminen	Geelin muodostuminen
			Verkon tiivistyminen
			Uudelleen kiteytyminen
			Verkon tiivistyminen
			Geelin muodostuminen
			Ryhmittäytyminen
			Kiinteä rakenne
			Kiteytyminen
			Pilkkoutuminen
			Nestemäinen rasva

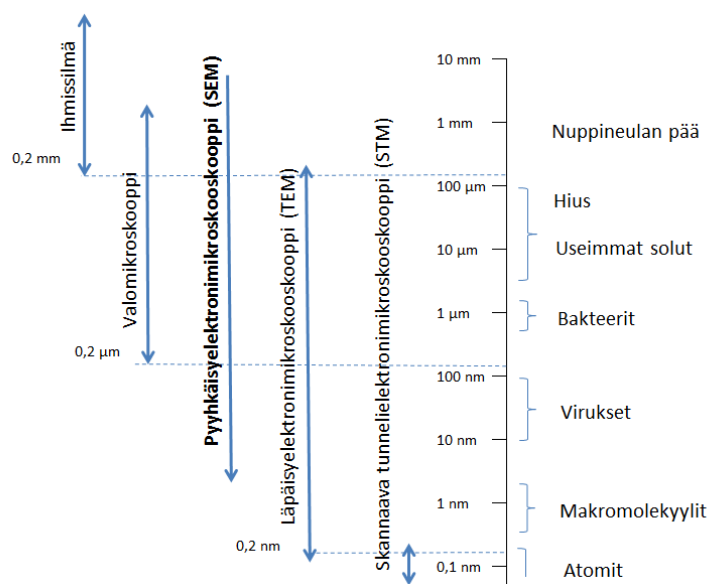
Kuvio 4. Kristallisoituneiden verkkojen prosessi ja muodostuminen (Hernandez & Kamal-Eldin 2013, 35).

Elintarviketeollisuudelle on kehitetty useita eri rasvalaatuja riippuen rasvalle asetetuista teknologisista vaatimuksista, rasvan roolista tuotteen valmistuksen yhteydessä, rasvan antamasta mausta ja suutuntumasta sekä tuotteen energiatavoitteesta. Tuotteissa rasva antaa joustavuutta, parantaa tilavuutta ja hidastaa kuivumista. (Heinonen ym. 1993, 18–23.) Rasvoilla, joita käytetään elintarvikkeiden valmistuksessa, ei ole tiettyä sulamispistettä. Sulamispiste ja lämpötila-alue, jossa rasva pehmenee, ovat elintarvikkeiden valmistuksen ja suutuntuman kannalta rasvojen tärkeimpiä ominaisuuksia. (Dahlgren, 51–56.)

3 PYYHKÄISYELEKTRONIMIKROSKOOPPI

Ranskalainen fyysikko, Luis de Broglie, oletti vuonna 1924 hiukkasilla olevan aalto-ominaisuutta, aineaaltoa. Elektronimikroskoopeissa käytetäänkin valon asemasta elektronisuihkua. Elektronimikroskoopilla voidaan tutkia pienten materiaalinäytteiden kokoa ja muotoa. (Peltonen ym. 2007, 364–366.) 1930 -luvulla tehtiin ensimmäiset yritykset rakentaa toimiva pyyhkäisyelektronimikroskooppi. Tutkimustyötä jatkettiin ja ensimmäisen kaupallisesti saatavan pyyhkäisyelektronimikroskoopin prototyyppi syntyi vuonna 1963. (Pelttari 2007, 36.)

Kuvion 5 mittakaavapiirros havainnollistaa eri mikroskooppien tarkkuusrajat verrattuna ihmissilmän kykyyn erottaa pientä mittakaavaa. Valomikroskoopilla päästään 0,2 μm :n tarkkuuteen, jolla voidaan havaita bakteereja ja useimpia soluja. Valomikroskoopin erotuskyky riippuu valon aallonpituudesta. Elektronimikroskooppien elektronien pieni aallonpituus mahdollistaa vielä pienempien partikkeleiden havainnollistamisen. Elektronimikroskoopeista pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM) päästään 1,25 nm:n tarkkuuteen ja läpäisyelektronimikroskoopilla (TEM) 0,14 nm:n tarkkuuteen. Skannaavalla tunnelimikroskoopilla (STM) päästään kuvaamaan jopa atomitasolle 0,08 nm:n tarkkuuteen (Jaksch & Vermeulen 2005, 22.)



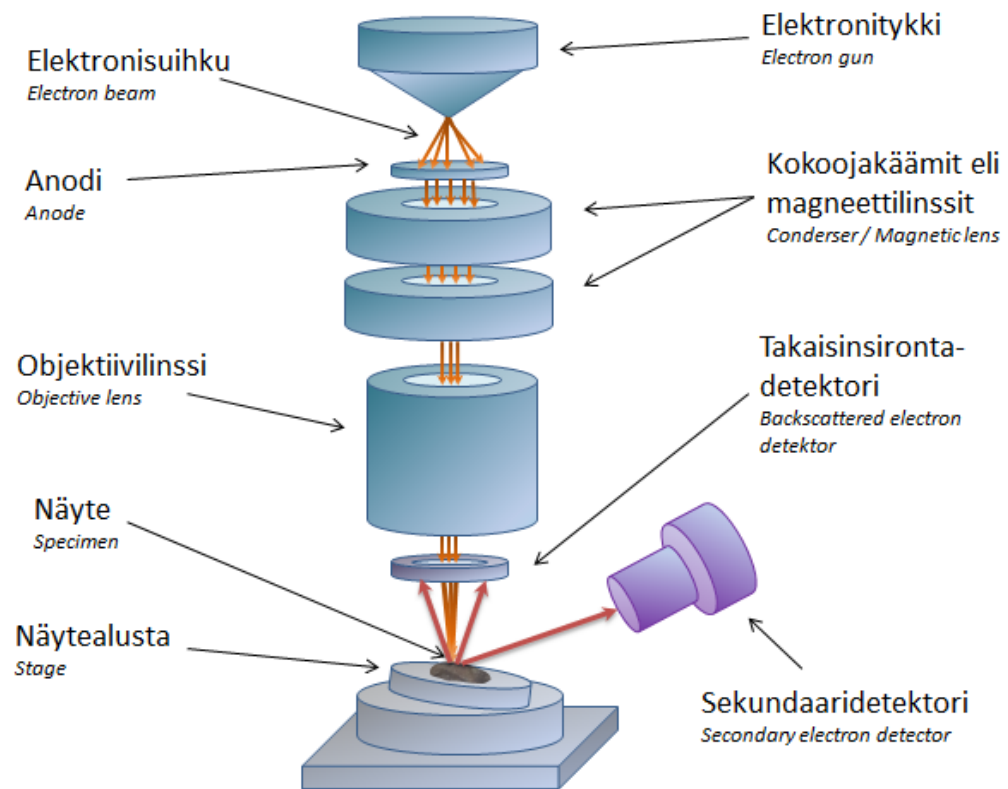
Kuvio 5. Ihmissilmän ja mikroskooppien tarkkuusmittakaava.

Elektroniopiiikkaa verrattaessa valo-optiikkaan on toimintaperiaate monella tapaa sama. Mikroskopoinnissa hyödynnetään valon tai elektronin aallonpituutta. Valon kulkua on mahdollista hallita normaalissa ilmanpaineessa, kun taas elektronisuihku tarvitsee alipaineellisen ympäristön. Kuvaamisen onnistumiseksi kummallakin menetelmällä fokus eli polttopiste ja polttoväli tulee säätää oikeaksi näytteen suhteen. Kummallakin menetelmällä kuvattaessa joko valon säde tai elektronisuihku kohdistetaan haluttuun näytekohtaan. Kuvan tarkkuus on keskellä terävimmillään ja heikkenee ulkoreunoille mentäessä. Elektronimikroskoopilla kuvattaessa näyte voi varautua, jos elektroneja pommitetaan yhteen kohtaan liian pitkään. Näytteen varautuminen vaikuttaa kuvan laatuun heikentävästi. Valomikroskopoinnissa ei vastaavaa haastetta ole. (Goodhew ym. 2000.)

3.1 Pyyhkäisyelektronimikroskoopin (SEM) toimintaperiaate

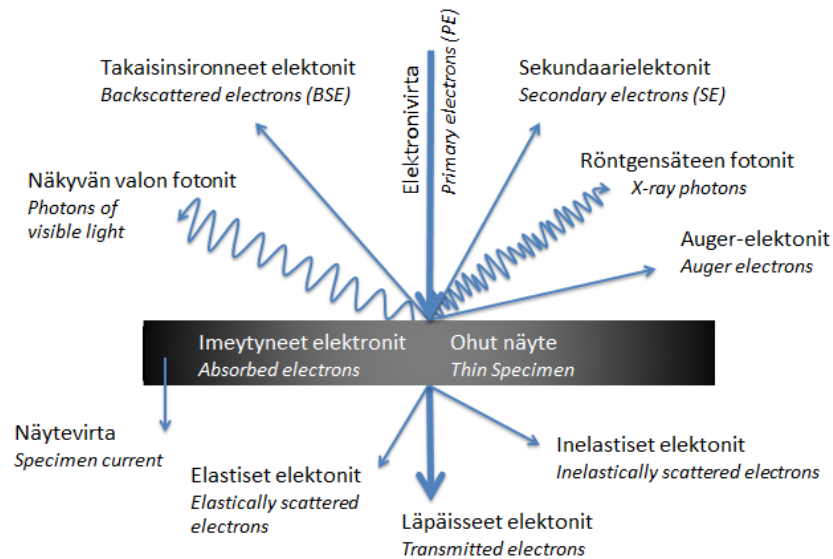
Pyyhkäisyelektronimikroskoopin (Scanning Electron Microscopy) toiminta muodostuu: 1) elektroniopisesta järjestelmästä eli elektronilähteestä eli filamentista ja useista käämeistä, jotka ohjaavat elektronisuihkun näytteeseen 2) näytepöydästä ja näytteestä 3) detektointijärjestelmästä, jossa detektorit keräävät ja vahvistavat muodostuneet signaalit 4) kuvanmuodostusjärjestelmästä, jossa detektoreiden kautta kerätty data analysoidaan tietojärjestelmässä ja kuva piirtyy tietokoneen ruudulle. (Gabriel 1987, 166–178; Peltari 2007, 38.) Kuvioon 6 on havainnollistettu pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate.

Elektronitykin tuottamat elektronit ohjataan samansuuntaisesti olevien magneettisten linssien kautta näytteelle. Elektronitykissä katodina toimivaa volframihehkulankaa kuumennetaan. Muodostuneet elektronit kiihdytetään ja ohjataan magneettilinssien eli kokoojakäämien läpi. (Gabriel 1987, 166–178.) Magneettilinssit ovat kondensorilinssijä, joiden tehtävä on pienentää näytteelle tulevan elektronisuihkun halkaisija mahdollisimman kapeaksi. Alimman linssin yhteydessä on poikkeutuskelat, joilla saadaan aikaan pyyhkivä liike. (Peltari 2007, 37–38.)



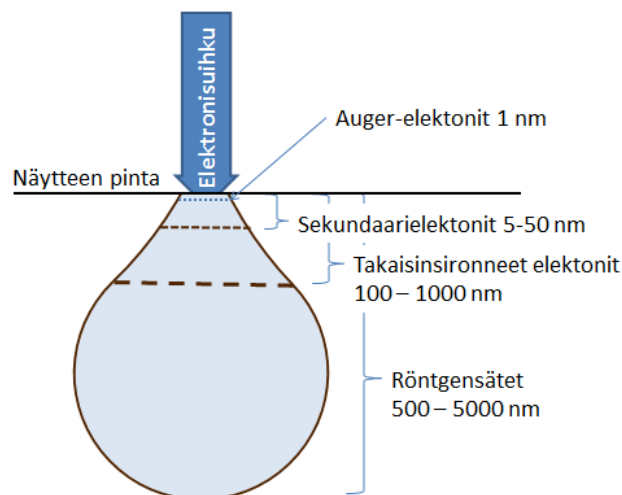
Kuvio 6. Pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate (Atteberry 2009).

Elektronisuihkun osuessa näytteeseen pinnassa tapahtuu energiamuutoksia (Pelttari 2007, 36). Säteilytetystä näytteestä vapautuneet elektronisignaalit voidaan analysoida, kun läsnä on sopivia ilmaisimia, detektoreita. Datasignaalit syntyvät joko elastisista tai inelastisista törmäyksistä. Elastiset törmäykset synnyttävät takaisinsironneita elektroneja (backscattered electrons), joiden perusteella muodostetaan kuvaa näytteen pinnan muodosta. Inelastiset törmäykset tunkeutuvat näytteeseen ja vapauttavat sekundaarielektroneja (secondary electrons), röntgensäteitä (x-rays) ja lämpöfotoneja. (Gabriel 1987, 166–178.) Sekundaari- ja takaisinsironneiden elektroneiden lisäksi näytteestä emittoituu röntgen- ja näkyvän valon fotoneja sekä Auger-elektroneja (Stokes 2008, 18). Kuvioon 7 on piirretty signaaleja, joita muodostuu elektronivirran osuessa näytteeseen.



Kuvio 7. Signaaleja, joita muodostuu elektronivirran osuessa näytteeseen (Stokes 2008, 18).

Kuviossa 8 on havainnollistettu näytteen ja elektronisuihkun välinen vuorovaikutus. Auger-elektroneja emittoituu aivan näytteen pinnassa. Sekundaarielektronit, joita käytetään tavallisimmin elektronimikroskopian kuvan muodostamiseen, emittoituvat 5–50 nm pinnasta. Takaisinsirontaelektronit ja röntgensäteet emittoituvat syvemmältä näytteestä (Peltari 2007, 36). Netistä löytyvästä Monte Carlo -ohjelmistosta saadaan ennusteita näytteeseen osuvan elektroniratojen tunkeutumissyvyyksistä eri materiaaleilla. (Gabriel 1987, 166–178; Stokes 2008, 152.)



Kuvio 8. Elektronisuihkun ja näytteen pinnan välinen vuorovaikutus maksimisyvyyksillä (Stokes 2008, 33; Peltari 2007, 36).

Takaisinsironneet elektronit säilyttävät noin 80 % säteen energiasta. Detektorit kykenevät havaitsemaan takaisinsironneet elektronit vain, jos ne leikkaavat detektorin. Detektorit sijoitetaankin kohtisuoraan optiseen akseliin nähden, ”napakengän” alapuolelle. Sekundäärielektronien energiamäärä on vähäinen, noin 4 eV. Sekundääridetektori on sijoitettu 90°:n kulmaan optiseen akseliin nähden. Näytteen kallistaminen 10–30° parantaa elektronien keräystä. (Gabriel 1987, 166–178.)

Onnistuneen kuvan saamiseen vaikuttaa laitteen suorituskky; kiihdytysjännite, elektronisuihkun säteen halkaisija ja tekninen resoluutio. Kiihdytysjännite vaihtelee yleensä 5–30 kV:n välillä. Johtavia metallinäytteitä kuvataan suurilla, 25–30 kV:n jännitteellä, päällystettyjä ei-johtavia näytteitä noin 15 kV:n jännitteellä ja ei-johtavia, päällystämättömiä näytteitä pienellä, noin 5 kV:n jännitteellä. (Gabriel 1987, 166–178.)

Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla kuvattavat näytteet yleensä johtavat sähköä. Jos sähkönjohtokyky on alhainen, suositellaan näytteen peittämistä ohuella kulta- tai kromipinnoitteella. Höyrykaapissa pinnoitetulle näytteelle voidaan käyttää suurempia jännitteitä, 15–20 kV, ja näin saada tarkempia kuvia. Höyrypinnoitemenetelmää käytettäessä pinnoitemateriaali ei välttämättä kiinnity tasaisesti epätasaiseen näytteeseen. (Gabriel 1987, 166–178.)

Mitä pienemmän halkaisijan elektronisuihku kohdistetaan näytteen pinnalle, sitä korkealaatuisempaa kuvaa näytteestä voidaan saada. Toisaalta elektronisuihkun pieni halkaisija voi aiheuttaa kuvaan kohinaa ja näin heikentää resoluutiota. Kuvan fokusta ja suurennosta ohjataan magneettilinssillä. Fokus saavutetaan vaihtelemalla objektiivin läpi kulkevaa elektronivirtaa. Koska suurennos liittyy oleellisesti kuvattavaan pinta-alaan, kannattaa kuva aluksi fokusoida ainakin kaksi kertaa suuremmalla suurennoksella. Näin otettu kuva pysyy selkeänä. (Gabriel 1987, 166–178.)

Hajataitto eli optinen poikkeama voi johtua magneettilinssin pienestä virheestä. Tämä ilmenee vääristymänä, kuten fokuksen vaihteluna. Esimerkiksi elektronisuihku ei ole pyöreä, vaan jompaankumpaan suuntaan ellipsi. Tätä poikkeamaa kompensoidaan stigmasoijalinssillä. (Gabriel, 166–178.)

Sähkömagneettinen kenttä on elektronisuihkun keskustassa voimakkain ja se heikkenee reunoille mentäessä. Tätä kutsutaan pallopoikkeamaksi. Elektronit kulkevat näille eri vyöhykkeille erisuuruisesti. Reunaelektroneja vähennetään pysäyttämällä niitä aperuureilla. Yleisesti pienemmällä aukolla varustetut aperuurit asennetaan lähelle näytettä ja suuremmat aperuurit asennetaan lähemmäs elektronitykkiä. Apertuureja käyttämällä kuvaa saadaan selkeämmäksi ja syvemmäksi. Apertuurit on keskitettävä tarkasti optiselle akselille. (Gabriel 1987, 166–178.)

Apertuureja käytettäessä menetetään suurin osa elektroneista. Mitä parempi erotuskyky näytteestä halutaan, sitä kapeammaksi elektronisuihku tehdään ja sitä enemmän elektroneja menetetään. Esimerkiksi elektronilähteellä elektronien suihkuvirta on 100000 nA ja näytteellä suihkuvirta on pienentynyt jopa 0,1 nA:n tasolle. (Pelttari 2007, 38.)

Detektorin vastaanottama signaali vahvistetaan elektronisella vahvistimella. Riippuen näytteestä emittoituvien elektronien määrästä kuvapisteen signaalin voimakkuus vaihtelee. Muodostunut kuva voidaan tallentaa digitaalisessa muodossa tietokoneen muistiin. (Pelttari 2007, 39.)

Käyttäjän kokemattomuus voi olla suurin yksittäinen syy kuvan heikkoon laatuun. Muita virhetekijöitä Cheney mukaan voivat olla virheellinen kiihdytysjännite, elektronitykillä tapahtuva filamentin lämmityksestä johtuva emission epävakaas, elektronikoettimen virheellinen halkaisija, väärin asennettu ja keskitetty aperutuuri, riittämätön hajataiton korjaus, väärä polttoväli, liian suuri suurennos, näytteen varautuminen ja magneettisuus tai huono kameran fokus. Kuvan huonoa laatua voivat aiheuttaa virheellinen kiihdytysjännitteen asetus, väärä anturi valituille asetuksille, virheellinen hajataittokorjaus, liiallinen virta, väärä kontrasti ja kirkkaus, näytteen väärä valmistusprosessi, näytteen ja detektorin väärä sijainti tai näytteen kallistus. Kuvan kohinaa voivat aiheuttaa kiihdytysjännitteen tai detektorin epävakaas, näytteen tai näytteen pinnan varautuminen, magneettikentän hajoaminen tai mekaaninen tärinä. Kuvan vääristymistä ja epämuodostumaa voivat aiheuttaa näytteen varautuminen tai liikkuminen, ulkoinen magneettikenttä, elektronisuihkun vaurio, näytteen vaurioituminen valmistuksen aikana, kolumnin

sisäisestä varautumisesta johtuva kuvan vaeltaminen tai näytevirtaus lämmityksen tai jäähtymisen aikana. (Cheney, [viitattu 16.2.2014].)

3.2 Paineen vaikutus

Paineen yksikkönä käytetään pascalia (Pa) tai baaria (bar), $1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$. Ilmakehän normaali paine on noin $101300 \text{ Pa} = 101,3 \text{ kPa} = 1013 \text{ bar}$. Paine voidaan ilmaista mittayksiköissä: $\text{Pa} = \text{N/m}^2 = \text{N} \cdot \text{m/m}^3 = \text{J/m}^3$. (Fontell ym. 1986, 17)

Elektronimikroskooppi tarvitsee toimiakseen alipaineellisen ympäristön. Elektronimikroskoopin näytekammion paine on matalassa paineessa (HV) 10–400 Pa (Carl Zeiss 2008, 17) eli n. 1/10000 ilmakehän paineesta.

Ilmakehä koostuu pääosin typestä (78,084 %), hapesta (20,946 %), argonista (0,934 %) ja hiilidioksidista (n. 0,033 %). Kullakin komponenttikaasulla on tietty osapaine, joiden summasta ilmakehän paine koostuu. Kun ilmatilasta kammion pumpataan kaasuja pois, puhutaan tyhjiöstä. Tyhjiökammioon yleensä jää jonkin verran kaasuja. Kammion jäännöskaasujen molekyylit törmäilevät toisiinsa ja kammion seinämiin. Lämpötilan laskiessa törmäykset vähenevät. Tyhjiökammion kaasujen kokonaispaine on tietyssä lämpötilassa tiettyyn pinta-alayksikköön kohdistuvaa molekyylitörmäyksistä johtuvaa voimaa. (Fontell ym. 1986, 15–18)

Tyhjiön tasoja on useita. Taulukkoon 1 on koottu eri tyhjiöalueet, kussakin tyhjiössä oleva kaasumolekyylien lukumäärä ja paine (Pa) $1,0 \text{ cm}^3$:ssä jäännöskaasua eri painealueilla lämpötilassa 20°C . (Fontell ym. 1986, 28)

Tyhjiöalueluokittelun perusteella pyyhkäisyelektronimikroskooppi ylittää 20°C :ssa välityhjiöalueelle, jolloin törmäileviä kaasumolekyyliä olisi yli $2,5 \cdot 10^{12}$ kpl / $1,0 \text{ cm}^3$. Näytekammion paineen ollessa liian korkea elektronit siroavat herkemmin eivätkä kohdennu näytteeseen (Stokes 2008, 66).

Taulukko 1. Kaasumolekyylien lukumäärä 1,0 cm³:ssä jäännöskaasua eri painealueilla lämpötilassa 20 °C (Fontell ym. 1986, 28).

Tyhjiöalue	Kaasumolekyylien lukumäärä (kpl)	Paine (Pa)
Karkeatyhjiö	$2,5 \cdot 10^{19} - 2,5 \cdot 10^{16}$	$10^5 - 10^2$
Välityhjiö	$2,5 \cdot 10^{16} - 2,5 \cdot 10^{13}$	$10^2 - 10^{-1}$
Suurtyhjiö	$2,5 \cdot 10^{13} - 2,5 \cdot 10^{10}$	$10^{-1} - 10^{-4}$
Hyvä suurtyhjiö	$2,5 \cdot 10^{10} - 2,5 \cdot 10^7$	$10^{-4} - 10^{-7}$
Ultratyhjiö	$2,5 \cdot 10^7 - 2,5 \cdot 10^4$	$10^{-7} - 10^{-10}$
Hyvä ultratyhjiö	$2,5 \cdot 10^4 -$	$10^{-10} -$

3.3 VP-ESEM

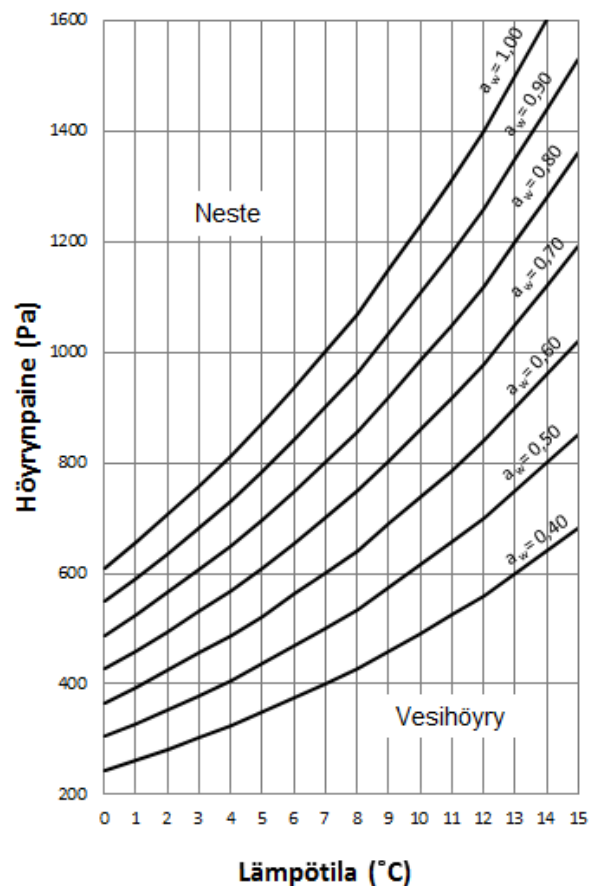
Elektronimikroskoopin näytekammion alipaineessa orgaanisen näytteen sisältämä vesi alkaa kiehua ja näyte tuhoutuu. Jotta biologista näytettä voidaan kuvata elektronimikroskoopilla, näyte voidaan kuivata, jäädyttää tai päällystää. Kuivaaminen kuitenkin kutistaa näytettä ja voi muuttaa sen pintarakennetta, jäädytetyn näytteen säilytettävyyys on huono ja päällystämisen haasteena ovat päällysteeseen mahdollisesti jäävät aukkopaidat. Käsittelyt voivat muuttaa tai jopa tuhota tutkittavan näytteen. (Peltari, 2007, 40–44.)

ESEM- (enviromental scanning electron microscope) laitteessa näytekammion painetta voidaan säätää laajemmalla painealueella perinteiseen SEM:iin verrattuna. Paineen säätöön käytetty kaasua on yleensä vesihöyry. Näytekammion paineensäädön mahdollistaa pieni aukko, apertuuri. Apertuuri ylläpitää paine-eroa kolumnin eri osien välillä. (Peltari 2007, 45.) Tällä VP- (variable pressure) pyyhkäisyelektronimikroskopiolla on mahdollista tutkia näytteitä, joita ei tavanomaisella pyyhkäisyelektronimikroskoopilla voida kuvata, kuten kosteita, ei-johtavia tai päällystämättömiä näytteitä. Näytekammion ja näytteen välillä tulee vallita termodynaaminen tasapaino. (Neděla, 2007)

Elektronimikroskoopin näytekammion paine on VP-ESEM:lla <3000 Pa (Carl Zeiss 2008, 17). Tyhjiöalueluokittelun perusteella näytekammion paine putoaa

karkeatyhjiöalueelle 20 °C:ssa. Näytekammiossa näytteeseen kohdistettu elektronisuihku kohtaa jäännöskaasun lisäksi paineensäätöön käytettyä vesihöyryä. Molekyyli törmäysten seurauksena elektronisuihku vaimenee. (Fontell ym. 1986, 44.)

Näytekammion vesihöyryn tulee olla tasapainossa näytteen veden aktiivisuuden kanssa. Epätasapainotilassa näyte voi höyrystyä tai kondensoitua. Näytteen höyrystyessä vettä siirtyy näytteestä näytekammioon ja näyte kuivuu. Tällöin kammion painetta tulee vähentää ja/tai näytteen lämpötilaa nostaa. Näytteen kondensoituessa näyte kostuu, kun näytekammion vesihöyryä siirtyy näytteeseen. Näytekammion painetta tulee lisätä ja/tai vähentää näytteen lämpötilaa. Tutkimuslämpötila suositellaan säädettävän välille 2–6 °C, jolloin kosteuden haihtuminen näytteestä on vähäisintä. (Stokes 2008, 84–87.)

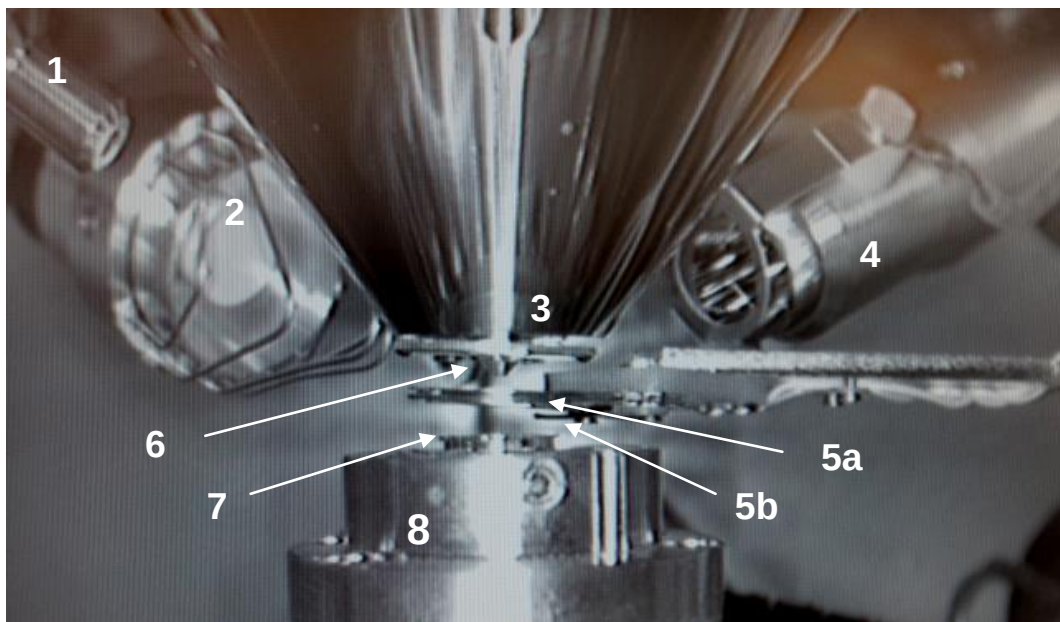


Kuvio 9. Veden olomuoto eri höyrinpaineessa lämpötilafunktiona näytteen eri a_w – arvoilla.

Orgaanisten materiaalien höyrystyminen riippuu materiaalin kosteudesta ja sitoutuneen veden määrästä, a_w . Kuviossa 9 on kuvattu lämpötilan funktiona, missä höyrystyksen paineessa vesihöyryn olomuoto muuttuu nesteeksi eri näytteen a_w arvolla. (Stokes 2008, 86.)

3.4 ZEISS EVO MA10

Seinäjoen ammattikorkeakoulun materiaalilaboratoriossa on pyyhkäiselektronimikroskooppi Zeiss EVO MA10. Laitteella on kuvattu pääosin metallinäytteitä. Laitteen kiihdytysjännite vaihtelee 0,2–30 kV:n välillä, erottelukyky on parhaimmillaan 2 nm ja suurennoskyky 1,000,000 x. Vuonna 2012 SeAMK:lle hankittiin VP-ESEM-lisälaitteet: jäähdytettävä näytealusta, vesihöyryn tuottojärjestelmä, korkeapainekuvaamisen mahdollistavat apertuurit, EPSE-Ring ja -Needle -detektorit ja diffuusiopumppu. Näytekammion paineväli saatiin nostettua 400 Pa:sta 3000 Pa:iin.



Kuvio 10. Zeiss EVO MA10 näytekammio 1) EDS -detektori 2) SE1 -detektori 3) CZ BSD -detektori 4) VPSE G3 -detektori 5a) EPSE Ring ja 5b) EPSE Needle -detektorit 6) alin apertuuri 7) näytekuppi ja 8) jäähdytettävä näytealusta.

Zeiss EVO MA10 -elektronimikroskoopille voidaan asentaa useita eri detektoreita. Kuvioon 10 on numeroitu SeAMK:n SEM:n detektorit, alin apertuuri, näytekuppi ja jäähdytettävä näytealusta.

EDS-detektori (Energy Dispersive Spectrometry) on kammioon katsottaessa vasemmalla. Detektori havainnoi näytteestä kimmonneet röntgensäteitä. Detektoria käytetään metallinäytteiden alkuainejakauman kvalitatiiviseen eli laadulliseen ja kvantitatiiviseen eli määrälliseen määrittämiseen.

SE1-detektori sijaitsee EDS-detektorin vieressä, kammioon katsottuna 2. vasemmalta. **VPSE G3-detektori** sijaitsee oikealla, takana. Detektorit havainnoivat näytteestä kimmonneita sekundäärielektroneja. Detektoreilla kuvataan korkeassa paineessa (HV).

CZ BSD -takaisinsirontadetektori sijaitsee suoraan näytteen yläpuolella ja tulee poistaa asennettaessa alempia aperuureja. Metallinäytteiden kuvista näkyy atomien kontrastit, missä happi on tumma ja rauta vaalea. Laitevalmistaja lupaa resoluutioksi 4,5 nm 30 kV:n jännitteellä, kun kammiossa on 10–400 Pa:n paine (VP mode).

EPSE–sekundääridetektori on kammioon katsottaessa oikealla. Detektoria käytetään yhdessä alempien apertuurien kanssa <3000 Pa:n paineessa. Kuvattaessa korkeissa paineissa orgaanista näytettä detektori tuodaan manuaalisesti näytteen ja takaisinsirontadetektorin, CZ BSD, väliin. SEM:n ulkopuolella olevasta kahvasta pidetään tiukasti kiinni, vapautetaan lukko ja varmistetaan TV-näytöltä, ettei detektori osu apertuuriin tai näytteeseen viettäessä detektoria syvemmälle kammioon. EPSE-detektoriin kuuluu rengasmaisen Ring-detektori ja neulamainen Needle-detektori. Detektoria käytetään Water Vapour -toiminnon yhteydessä.

Water vapour -toiminnolla mahdollistetaan huokoisten ja orgaanisten näytteiden kuvaaminen Zeiss EVO MA10 -elektronimikroskoopilla. Toiminnon ansiosta näytekammioon muodostuu olosuhdeasetusten mukainen määrä vesihöyryä. Nestejäähdytteinen näytealusta tulee olla kiinnitettynä ja päällä sekä vesisäiliöissä tulee olla tislattua vettä.

Apertuurien ja EPSE-detektoreiden asentamiset vaikuttavat ratkaisevasti kuvan laatuun, joten työ tulee tehdä huolellisesti. Näytekammion ilmaus, näytekupin ja näytteen asettaminen, kammion sulkeminen, oikeiden kammio-olosuhteiden valinta ja alipaineen muodostuminen ovat työvaiheita, jotka edeltävät

mikroskopointia. Ennen kuvaamista tulee näyte kohdistaa x-, y- ja z-koordinaatein lähelle elektronivirran ulostuloaukkoa. Elektronisuihkun käynnistyksen jälkeen voidaan aloittaa oikean näytekorkeuden ja fokuksen etsintä.

4 OLOSUHTEIDEN VAIKUTUS KUVAN LAATUUN

Päällystämättömiä elintarvikkeita kuvattaessa VP-ESEM:lla näytteen veden aktiivisuus tulee tuntea. Kun tiedetään näytteen ominaisuudet, voidaan valita oikeat näytekammion olosuhteet. Oikeiden paineolosuhteiden ja lämpötilan valinnalla varmistetaan näytteen säilyminen tutkittavassa kunnossa. Kuvaolosuhteiden määrittämiseksi tutkimuksessa käytettyjen näytteiden a_w mitattiin LabMaster-analysaattorilla. a_w -mittausten jälkeen näytekammio-olosuhteet valittiin kuviosta 9.

Tutkimuksessa käytettiin kahta alemmaa apertuuria. Ylemmäs asennettiin 100 μ VP -apertuuri ja alemmas 500 μ Lower Aper Assy -apertuuri. Olosuhdetutkimukseen valittiin muuttuviksi parametreiksi jännite, paine ja kosteus.

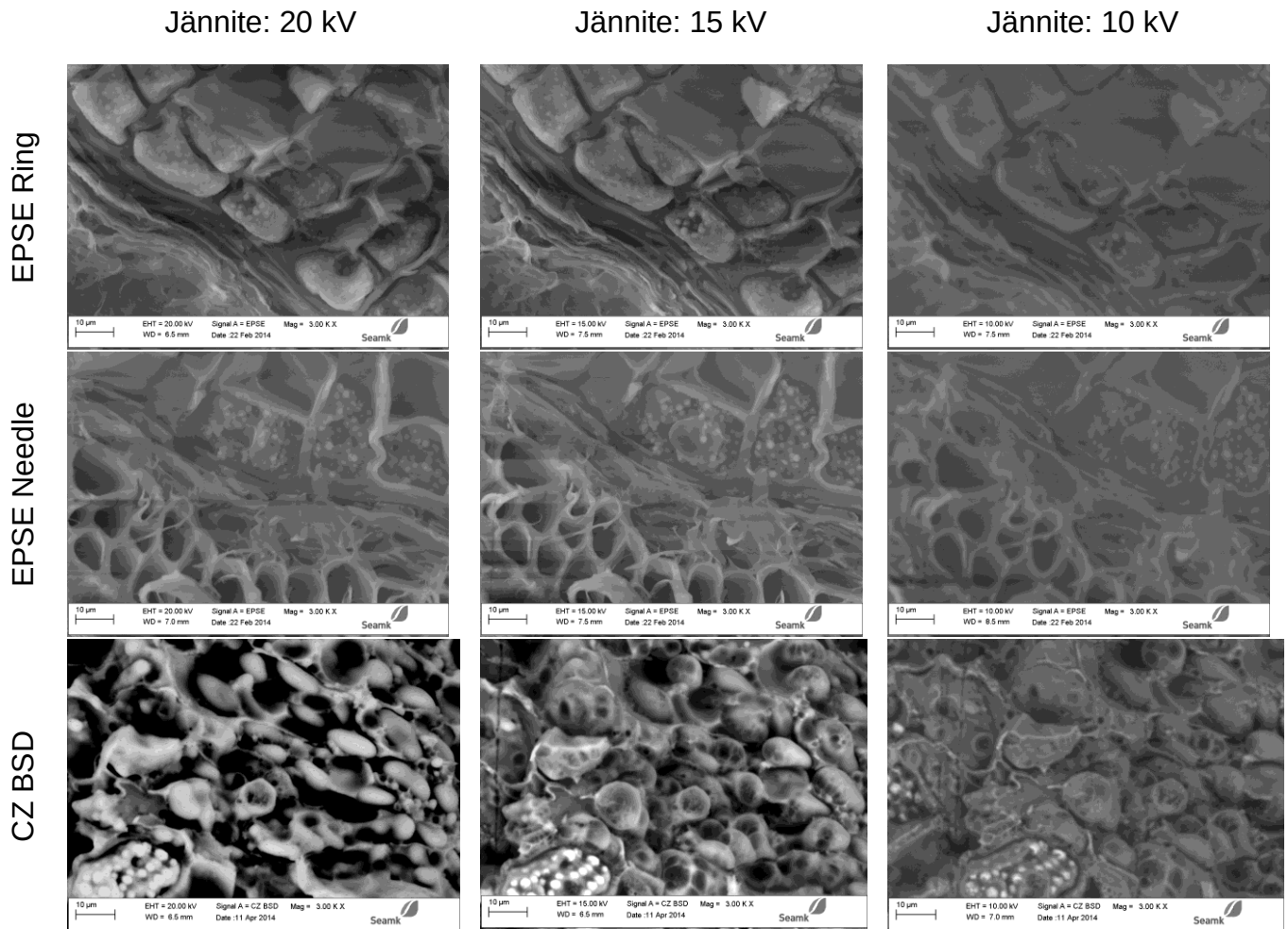
4.1 Jännitteen muutoksen vaikutus eri detektoreilla

Elektronisuihkun jännitteen vaikutusta kuvaustulokseen tutkittiin 20 kV:n, 15 kV:n ja 10 kV:n jännitteillä. Detektoreiksi valittiin matalissa paineissa toimivat, elintarvikenäytteiden kuvaamiseen soveltuvat EPSE Ring ja EPSE Needle sekä CZ BSD -takaisinsirontadetektorit. Näytteenä käytettiin poikkileikattua ohran jyvää. Jyvien a_w oli 0,446.

Halkaistua ohran jyvää kuvattiin olosuhteissa 500 Pa, 73,6 % kosteus ja +1,5 °C. Detektoria vaihdettaessa näytettä siirrettiin niin, että elektronisuihku kohdistui näytteen eri kohtaan. Tällä haluttiin eliminoida näytteen varautumisen vaikutus kuvaustulokseen. Vertailu tehtiin 3000x-suurennoksella otettujen kuvien avulla. Kuvat koottiin taulukkoon 2.

Valitulla detektorilla kuvattaessa näytteen paikkaa ei muutettu lainkaan. Jännitteen muuttaminen teki kuvasta epätarkan ja kuva oli fokusoitava uudelleen. Kun elektronisuihkun jännitettä kasvatti, työskentelyetäisyys (WD) pieneni.

Taulukko 2. Jännitteen vaikutus eri detektoreilla otettuihin poikkileikatun ohranjyväkuviin. Paine 500 Pa, lämpötila: +1,5 °C, kosteus: 73,6 %.



EPSE Ring -detektorilla saatiin hyviä kuvia 20 kV:n ja 15 kV:n jännitteillä. EPSE Needel -detektorin kuvista parhaiten onnistui 15 kV:n jännitteellä otettu kuva. CZ BSD -detektorilla paras kuva saatiin 10 kV:n jännitteellä. 20 kV:lla tuotetta ikään kuin häviää kuvasta ja mustia aukkoja tulee enemmän.

Yhteenvedona voidaan todeta, että EPSE-detektoreilla on mahdollista saada onnistuneita SEM-kuvia 500 Pa:ssa kaikilla valituilla jännitteillä (10, 15 ja 20 kV). CZ BSD -detektorilla otettuihin kuviin riittää 20 kV:a pienemmät jännitteet (10 ja 15 kV).

4.2 Paineen muutoksen vaikutus EPSE Ring -detektorilla

Paineen vaikutuksen tutkimiseen valittiin EPSE Ring -detektori. Tutkittaviksi paineiksi valittiin 500, 600, 700, 800 ja 900 Pa elektronisuihkun jännitteillä 10, 15 ja 20 kV. Näytteenä käytettiin poikkileikattua ohran jyvää.

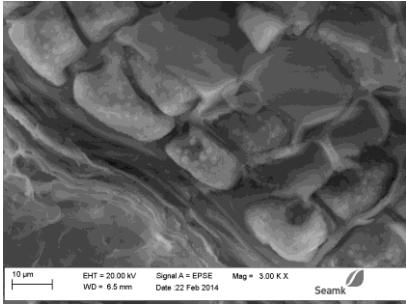
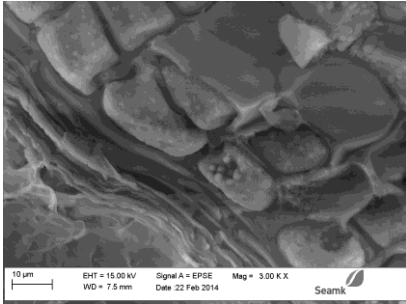
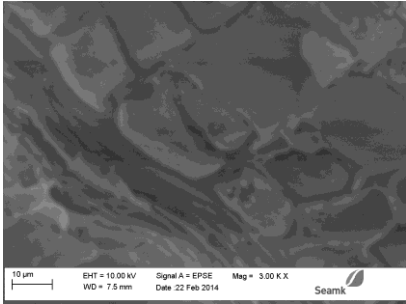
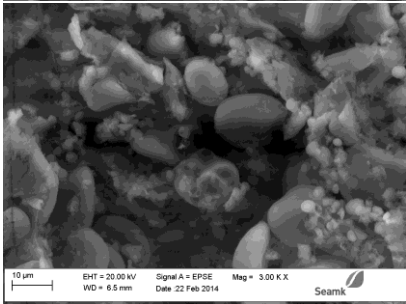
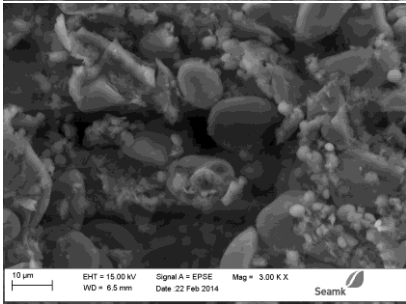
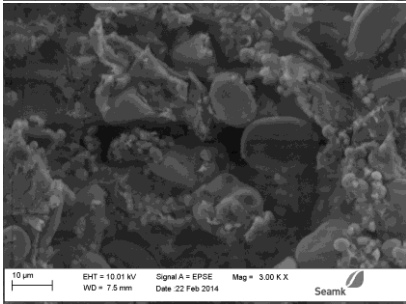
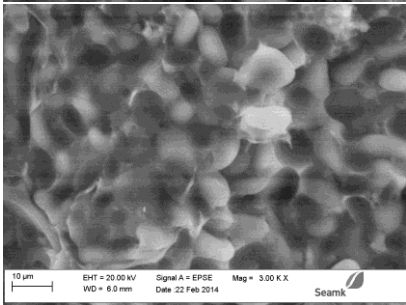
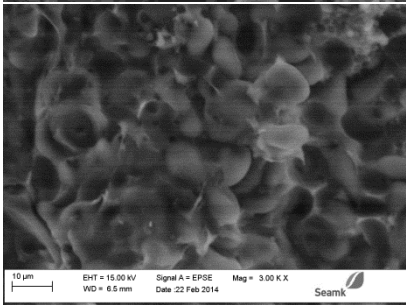
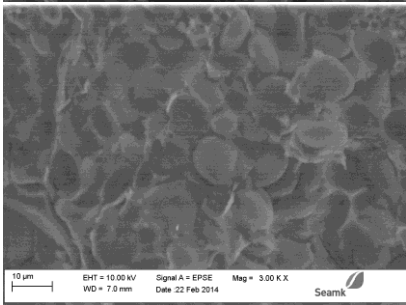
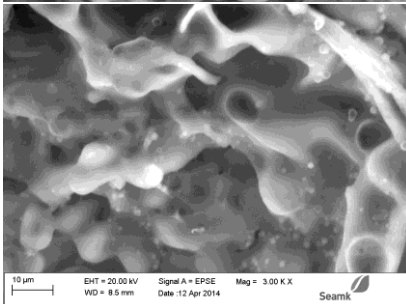
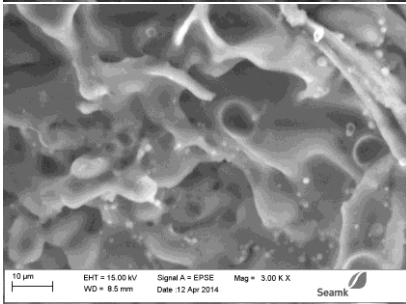
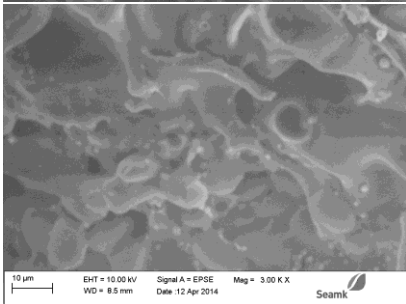
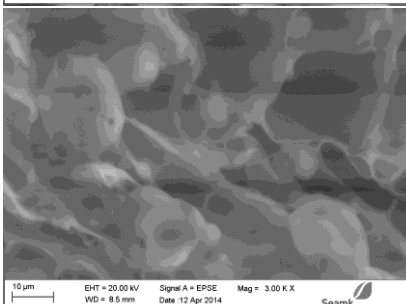
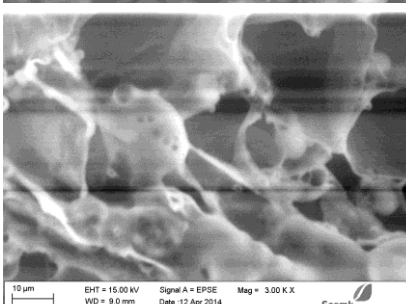
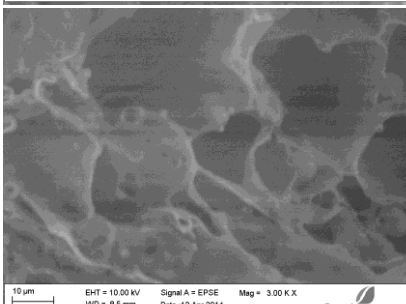
Valitussa paineolosuhteessa näytettä ei liikuteltu, kun jännitettä muutettiin. Tällä pyrittiin helpottamaan kuvien tulkintaa. 3000x-suurennoksella otetut kuvat koottiin taulukkoon 3. Taulukkoon on merkitty näytekammion paine, lämpötila ja kosteus sekä elektronisuihkun jännite tutkimuksen aikana.

Verrattaessa EPSE Ring -detektorilla otettuja kuvia 500, 600, 700, 800 ja 900 Pa:n paineessa, 10, 15 ja 20 kV:n jännitteellä, voidaan todeta kuvaamisen olevan mahdollista kaikissa valituissa olosuhteissa. Vertailtavuuteen tuo haastetta kuvien erilaiset kontrastit ja kirkkausasteet.

500–900 Pa:ssa elektronisuihkun jännitettä ei ole syytä nostaa yli 15 kV:n. Jatkossa tutkimus kannattaa aloittaa vieläkin pienemmällä elektronivirralla. Etenkin, jos paine on ≥ 1000 Pa. Näin pienennetään jännitteen aiheuttamaa näytteen vaurioitumisen mahdollisuutta.

Jännitteen muutos ja siitä johtunut kuvan uudelleen fokusointi ei mainittavasti vaikuttanut näytteen kuvattavuuteen. Kuvasarjan edetessä kuvat liikkuvat hieman ylös ja oikealle. Kuiva ohranjyvä soveltui mainiosti detektoritutkimuksen näytteeksi. 3000x-suurennoksella saatiin informatiivista kuvaa jyvän eri osista.

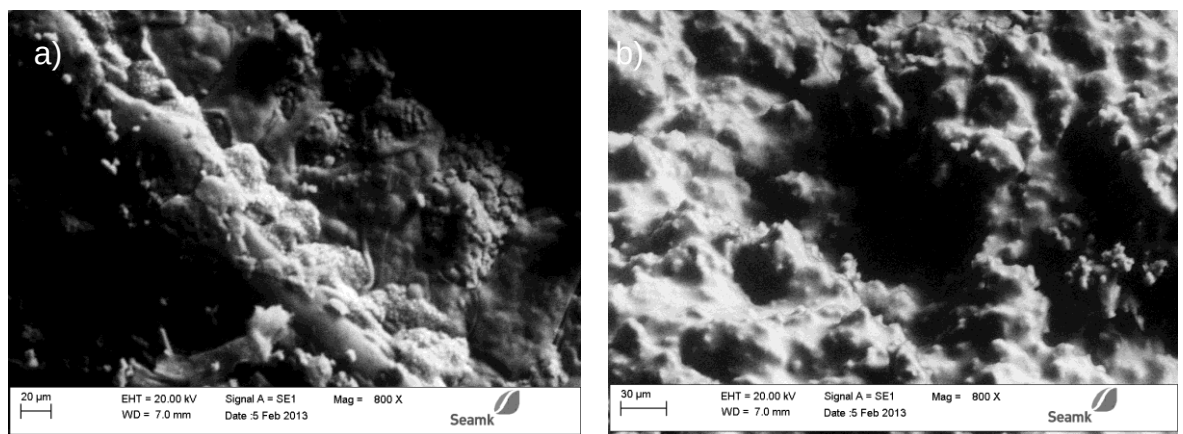
Taulukko 3. Paineen ja jännitteen vaikutus EPSE Ring -detektorilla otettuihin poikkileikatun ohranjyväkuviin.

	Jännite: 20 kV	Jännite: 15 kV	Jännite: 10 kV
Paine: 500 Pa Lämpötila: +1,5 °C Kosteus 73,6%			
Paine: 600 Pa Lämpötila: +5 °C Kosteus: 68,7%			
Paine: 700 Pa Lämpötila: +1,5 °C Kosteus 73,6%			
Paine: 800 Pa Lämpötila: +6,5 °C Kosteus 82,6%			
Paine: 900 Pa Lämpötila: +9,0 °C Kosteus 78,3%			

4.3 Näytekammion kosteusolosuhteen muutos

Näytekammion kosteusolosuhteen vaikutusta elintarvikenäytteen käyttäytymiseen tutkittiin kaurahiutaleen avulla. Kuivan kaurahiutaleen a_w oli 0,354. Kuvaus tehtiin sekundaaridetektorilla, SE1. Kuvaus aloitettiin SEM-olosuhteissa 465 Pa, +0,5 °C ja 74 %:n kosteudella. Näytekammion paine muutettiin 640 Pa:iin ja lämpötila pidettiin +0,5 °C:ssa, jolloin kammion kosteus nousi 100 %:iin.

Kuivassa kaurahiutaleessa, kuvio 11a, on havaittavissa litistyneitä soluseinien rakenteita sekä tärkkelysjiäviä. Näytekammion kosteuden noustessa kuiva kaurahiutale adsorboi itseensä kosteutta, kuvio 11b. Kaurahiutaleen pinta on tasaista massaa ja soluseinät ovat hävinneet näkyvistä kokonaan. Tärkkelysjiäviä näkyy siellä täällä.



Kuvio 11. Kaurahiutale kuvattuna SE1-detektorilla +0,5 °C:ssa a) 465 Pa, 74 % kosteus b) 650 Pa, 100 % kosteus.

Kuvat osoittavat, että näytteen veden aktiivisuus on syytä selvittää ennen tutkimusta. Näyte voidaan pilata valitsemalla väärä lämpötila/höyrynpaine -suhde ennen kuin ainuttakaan kuvaa on otettu. Toisaalta näytekammion olosuhteita muuttamalla voidaan tutkia näytteen käyttäytymistä poistamalla tai lisäämällä kosteutta.

4.4 Muita haasteita

4.4.1 Paineen muodostuminen näytekammioon

Näytevaihdon jälkeen kammion suljetaan ja vakuumipumppu käynnistetään. Kuvaamiseen valittu paine tulee huomioida SEM:n Purge Control -asetuksista. Jos Purge Max ja Min -arvot ovat liian pienet tavoitepaineeseen verrattuna vakuumpumppattaessa näytekammioon, paine käy huomattavasti alempana ja voi pilata näytteen. Taulukkoon 4 on koottu ESEM 700 Pa:n tavoitepaineella alimmat painelukemat eri Purge Max ja Min -testiasetuksilla.

Taulukko 4. Näytekammion alin mahdollinen paine verrattuna tavoitepaineeseen eri Purge Control -asetuksilla.

Testi	Purge Cycles	Purge Max (Pa)	Purge Min (Pa)	Kammion tavoitepaine (Pa)	Kammionpaine alimmillaan (Pa)	Alin paine tavoitepaineesta (%)
1	4	115	10	700	98	14
2	7	400	200	700	150	21
3	7	500	400	700	293	42
4	10	800	700	700	474	68

Purge Min on syytä asettaa näytekammion tavoitepaineeseen ja Purge Max korkeampaan paineeseen. Näin vältetään näytteeseen kohdistuva alipaine ja näyte säilyy ehjänä. Purge Cycles'in kasvattaminen lisää tavoiteolosuhteen saavuttamisaikaa.

4.4.2 Aika

Elektronisuihkun käynnistyksen jälkeen voidaan aloittaa kuvan fokusointi. Erityisesti aloittelijalta kuvan fokusointi voi vedä aikaa. Kuviossa 13 on kuvattu 55 °C:ssa vedessä lämpökäsiteltyä perunatärkkelystä 484 Pa:n paineessa. Näytteen a_w oli 0,982. Kuvasarjasta havaitaan näytteen muutokset tutkimuksen aikana.



Kuvio 12 Lämpökäsitelty perunatärkkelys kuvattuna a) 20 kV:n, b) 15 kV:n ja c) 10 kV:n jännitteillä EPSE Ring -detektorilla.

Kuviossa 12a näytteeseen kohdistettiin elektroneja 20 kV:n jännitteellä. Näytteen pinnalla esiintyy vain muutamia poimuja. Kuviossa 12b jännite pudotettiin 15 kV:iin ja näyte on alkanut "kuplia". Kuviossa 12c näytteen pinnalla on runsaasti kuplia, vaikka jännite oli vain 10 kV. Näytettä ei liikutettu tutkimuksen aikana lainkaan. Jännitteen muutoksen jälkeen kuvan fokus tuli tarkentaa uudelleen. Kuvasarjasta on havaittavissa, että tutkimuksen aikana näyte on vaeltanut oikealle ylös ja näytteen pinta on vaurioitunut.

Mitä kauemmin elektronisuihkua kohdistetaan näytteen pintaan, sitä suuremmalla todennäköisyydellä näyte varautuu. Varautuminen johtaa kuvattavan kohteen muutokseen ja kuvan laadun heikkenemiseen. Näytettä siirrettäessä elintarvikenäytteen epätasaisuus muuttaa kuvattavan näytepinnan korkeutta ja fokus tulee säätää uudelleen. Kuvaajan taitojen karttuessa kuvan fokusointi nopeutuu ja näyte pysyy kelvollisena pidempään.

5 ESIMERKKEJÄ PROSESSOINNIN VAIKUTUKSESTA ELINTARVIKKEEN RAKENTEESEEN

Työssä selvitettiin, kuinka elektronimikroskoopilla pystytään havainnoimaan elintarvikkeiden prosessointiin liittyviä mikrotason muutoksia. Prosessointivaiheista tutkimukseen valikoitui tärkkelyksen liisteröityminen, proteiinin vaahtoutuminen ja raaka-aineiden sekoitus ja paisto. Tutkimuksessa verrattiin elektronimikroskooppikuvia valomikroskoopilla otettuihin kuviin.

5.1 Tärkkelyksen liisteröityminen

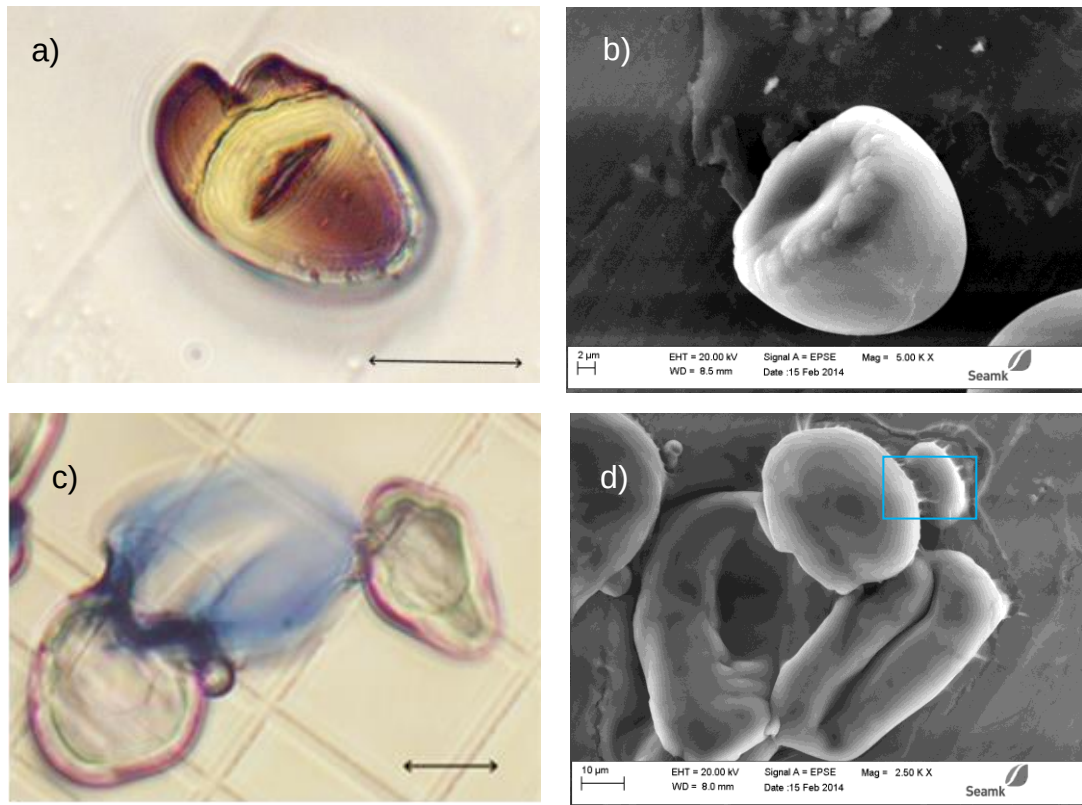
Tärkkelyksen liisteröitymistä eli gelatinoitumista tutkittiin sekoittamalla modifioimattomia Kolmenkonstin Perunajauhoja veteen ja samalla nostettiin liuoksen lämpötilaa. Tutkimuslämpötiloiksi valittiin 20 °C ja 60 °C. Tärkkelysliuoksen a_w :ksi mitattiin 0,982. Kuvausolosuhteiksi valittiin 700 Pa, 3,0 °C, 92,4 % kosteus ja detektoriksi valittiin EPSE Ring -detektori.

Tutkimuksen yhteydessä verrattiin VP-ESEM -kuvia Olympus-valomikroskoopilla otettuihin kuviin. Valomikroskooppikuvat ovat Jenni Ahlholm ja Tiina Riipin SeAMK:lla suoritetun harjoittelun aikana ottamasta mikroskopointikuvasarjasta. Valomikroskoopilla tutkitut tärkkelysnäytteet on jodivärjätty. Jodi on värjännyt amyloosiketjut siniseksi ja haarautuneet amylopekteiniketjut punaisiksi.

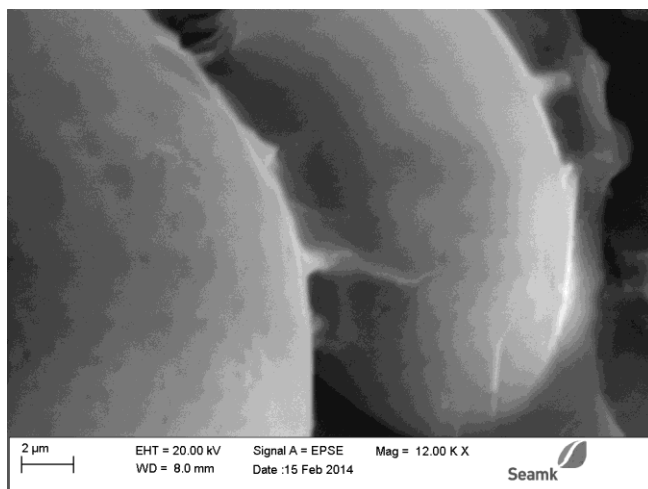
20 °C:ssa vedessä käsitellyn tärkkelyksen valomikroskooppikuvassa, kuvio 13a, on jodivärjäyksen ansiosta havaittavissa rikkoutuneen perunatärkkelyksen kasvurenkaat. Kuviossa 13b rikottu perunatärkkelys on sitonut vettä ja turvonnut niin, ettei sipulimainen rakenne pääse elektronimikroskooppikuvassa esiin.

Valomikroskooppikuvassa, kuvio 13c, 60 °C:ssa vedessä käsitelty perunatärkkelyksen kuori on hajonnut ja siniseksi värjäytynyt amyloosi on purkautunut tärkkelysjuvään sisältä ympäröivään vesiliuokseen. Kuviossa 13d on kuvattu sama tapahtuma VP-ESEM:llä. Elektronimikroskooppikuvasta ei voida suoraan päätellä, mikä polymeeriketju kuvassa näkyy. Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla kuvattaessa elektronisuihku heijastuu

detektoreille näytteen pinnasta, joten valomikroskoopilla kuvattu jyvän sisustan kerroksellisuus jää havaitsematta. Samoin ulos pursuava amyloosi jää tunnistamatta ilman värjättyjen näytteiden valomikroskooppikuvia tai kirjallisuusviitteitä.



Kuvio 13. a) Rikkonainen perunatärkkelys 20 °C lämpökäsittely, valomikroskooppi b) Rikkonainen perunatärkkelys 20 °C lämpökäsittely, VP-ESEM c) Perunatärkkelys 60 °C lämpökäsittely, valomikroskooppi d) Perunatärkkelys 60 °C lämpökäsittely, VP-ESEM.

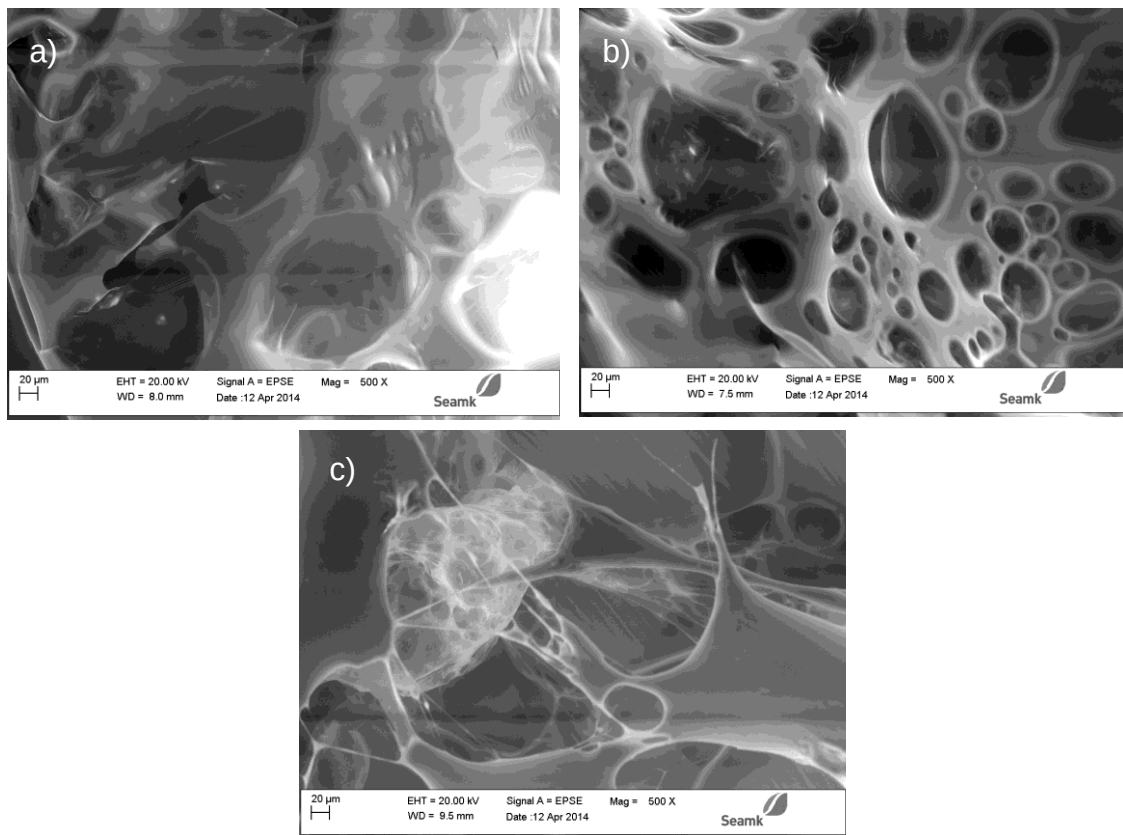


Kuvio 14. 60 °C:ssa lämpökäsittely perunatärkkelys 12000x-suurennoksella.

Riippuen näytteestä kuvan suurennoksen kokoluokkaa voidaan kasvattaa. Kuvion 13d näytettä on suurennettu kuvioon 14. 12000x-suurennoksella otetusta 60 °C:ssa lämpökäsitellystä tärkkelyksestä voidaan havaita jyvien välillä muodostuneen verkostoa. Tärkkelysten pinnalla oleva proteiini näyttäisi sitovan jyviä toisiinsa.

5.2 Proteiinin vaahtoutuminen

Proteiinin vaahtoutumisen tutkimukseen valittiin kananmunan valkuainen. Valkuainen sisältää proteiineja 10,1 % ja se on helposti vaahtoutuvaa. Kananmunan valkuaista vaahdotettiin niin kauan, että a) valkuainen vaahtoutui ja pysyi kulhossa kulhoa käännettäessä ylösalaisin, b) valkuaisvaahdon tilavuus kasvoi ja siitä tuli kiiltävän valkoista ja c) valkuaisvaahdon tilavuus pieneni ja siitä tuli kokkareista. Kananmunan valkuaisen a_w :ksi mitattiin 0,980. Kuvausolosuhteiksi valittiin 700 Pa, 3 °C, 92,4 % kosteus ja detektoriksi valittiin EPSE Ring -detektori.



Kuvio 15. Kananmunan valkuaisvaahdo eri vaahdotusajoilla a) kevyt vaahdo b) kiiltävä vaahdo c) kokkareinen vaahdo.

Kuvion 15 kuvista havaitaan kananmunan valkuaisen vaahdotusaikojen vaikutus proteiinikalvon muodostumiseen, stabiloitumiseen ja rikkoutumiseen. Kuviossa 15a vaahdotuksen alussa tapahtuneen ilmakuplien ympärille muodostunut proteiiniverkko ei ole ehtinyt vahvistua. Kun vaahdotusta jatkettiin useampia minuutteja, proteiiniverkko vahvistui ja ilmakuplia muodostui lisää, kuvio 15b. Kuviossa 15c proteiiniverkko on menettänyt vahvuutensa ja on repeillyt liiallisen prosessoinnin seurauksena.

Valkuaisvaahtojen ohuet proteiinikalvot ovat todennäköisesti menneet rikki näyteolosuhteiden muodostumisen yhteydessä. Liian kova alipaine on mahdollisesti hajottanut näytteitä. Jatkossa herkkien näytteiden tutkimusta kannattaa jatkaa pienemmällä alipaineella ja pienemmällä elektronivirralla.

5.3 Raaka-aineiden sekoitus ja paisto

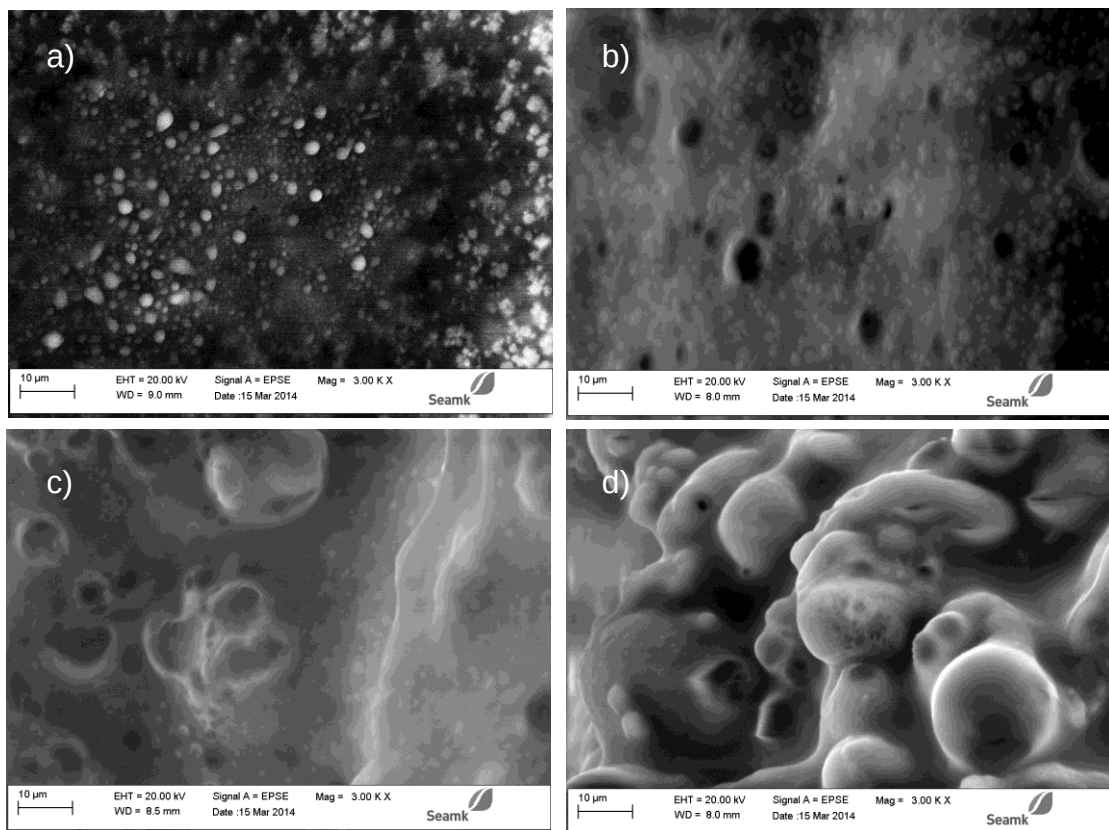
Raaka-aineiden sekoitusvaiheiden ja paiston kuvattavuutta tutkittiin pursotettavan pikkuleipäreseptin avulla. Pikkuleivän taikinamassan valmistus aloitettiin vaahdottamalla huoneenlämpöinen (+20 °C) rasva ja pienikiteinen sokeri. Rasva-sokerivaahtoon sekoitettiin vehnä- ja perunajauho. Pursotuksen ja paiston jälkeen tuloksena saatiin ilmava ja suussa sulava Strassburgilainen - pikkuleipä. (Rasmusson 2011, 196.)

Pursotettavien pikkuleipien raaka-aineina oli: Valion voi (100 g), Dan Suckerin tomusokeri (30 g), Kolmen Konstin perunajauho (80 g) ja Myllyn Paras kakkuvehnä jauho (80 g). Elektronimikroskooppikuvat otettiin huoneenlämpöisestä voista, jokaisen raaka-ainelisäyksen tapahtuneen vaahdotuksen jälkeen ja paiston jälkeen. Kuvattavien komponenttien vedenaktiivisuus laski jokaisen raaka-ainelisäyksen jälkeen voion 0,925:sta paistetun pikkuleivän 0,380:een, a_w :t taulukossa 5. VP-ESEM -olosuhteiksi valittiin: 20 kV, 650 Pa, 2 °C, kosteus 92,2 % ja detektoriksi EPSE Ring.

Taulukko 5. Veden aktiivisuusarvot pikkuleipäprosessin eri vaiheissa.

Pikkuleipä	a_w
Voi	0,925
Voi + tomusokeri (100 g + 30 g)	0,839
Voi + tomusokeri + perunajauho ja vehnäjauho (100 g + 30 g + 80 g + 80 g)	0,710
Paistettu pikkuleipä	0,380

Kuviossa 16a nähdään huoneenlämpöisen voin rakenne. Voi sisältää kiteistä ja nestemäistä rasvaa. Kuviossa 16b voi ja sokeri on vaahdotettu. Vaahdotuksen aikana rasvan sisään on muodostunut pieniä ilmakuplia ja sokeri on sekoittunut massa. Valmis vaahto on kevyttä ja pehmeää.



Kuvio 16. Pikkuleivän valmistusprosessi kuvattuna EPSE Ring -detektorilla a) huoneen lämpöinen voi b) voi–sokerivaahdo c) pikkuleipätaikina d) paistettu pikkuleipä.

Vatkaamista jatkettiin ja jauho lisättiin vähitellen, kuvio 16c. Jauho on sekoittunut tasaisesti rasvan vesiosaan. Tärkkelysjyväsiä on erotettavissa voi–sokerivaahdon seasta. Paistettu pikkuleipä nähdään kuviossa 16d. Paiston aikana kosteutta on

haihtunut. Koska taikinamassa sisältää vain vähän vettä, vehnä- ja perunatärkkelys ovat säilyttäneet osittain muotonsa.

Elintarvikkeiden eri faasien rajapintojen erottaminen mikroskopoimalla voi olla haastavaa. Kaikkia ilmiöitä ei välttämättä saada kuvattua. Kuvat kuitenkin havainnollistavat ja auttavat ymmärtämään elintarvikkeiden mikromaailmaa ja siinä tapahtuvia muutoksia.

6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Elintarvikkeiden rakenteisiin vaikuttavat komponentit ovat vesi, hiilihydraatit, proteiinit, rasvat ja kaasut. Prosessoinnin, varastoinnin tai valmistuksen aikana rakenteissa tapahtuvat muutokset voivat tapahtua millisekunnista kuukauteen, nanometristä millimetriin. Kaikkia tapahtumia ei voida ihmissilmin havaita. Näitä tapahtumia voidaan kuvata ja havainnoida mikroskoopeilla. Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (**Scanning Electron Microscopy**) päästään parhaimmillaan noin 2 nm:n tarkkuuteen.

SEM:ssä näyte asetetaan näytekammioon ja siihen kohdistetaan elektronisuihku. Näytekammiossa olevat detektorit havaitsevat näytteestä emittoituneet signaalit ja laite muodostaa niistä kuvan tietokoneen ruudulle. Detektoreiden keräämät signaalit ovat yleensä sekundaari- ja takaisinsirontaelektroneja sekä valo- ja röntgensäteitä.

Elektronisuihku tarvitsee toimiakseen alipaineen. Alipaine mahdollistaa hyvän kuvalaadun, mutta se voi vaurioittaa näytettä. Pyyhkäisyelektronimikroskooppia, johon on liitetty näytekammion paineensäätömahdollisuus ja jäähdytettävä näytealusta, kutsutaan lyhenteellä VP-ESEM (**V**ariable **P**ressure - **E**nvironmental **S**canning **E**lectron **M**icroscope). Päälystämättömiä orgaanisia näytteitä kuvattaessa näytekammion painetta voidaan säätää vesihöyryllä. Kammion ja näytteen välillä tulee vallita termodynaaminen tasapaino, ettei näyte kostu tai kuivu mikroskopoinnin aikana. Tässä työssä tutkittiin SeAMK:lle hankitun VP-ESEM:n toimivuutta, kun näytteenä oli päälystämätön elintarvike.

Aluksi tutkittiin jännitteen vaikutusta eri detektoreilla. Testiolosuhteiksi valittiin 500 Pa, 10–20 kV:n elektronivirta ja takaisinsirontadetektorit EPSE Ring, EPSE Needle ja CZ BSE. Kuvavertailussa käytettiin 3000x-suurennoksella otettuja kuvia. Näytteinä oli poikkileikattu ohran jyvä, jonka a_w oli 0,446. Kuvaaminen onnistui hyvin, etenkin VP-ESEM -olosuhteisiin tarkoitettulla EPSE -detektoreilla. Tässä tutkimuksessa Ring toimi paremmin kuin Needle. EPSE Ring -detektorilla otetut kuvat saatiin vaivatta säädettyä sopivaan kirkkauteen ja kontrastiin. 20 ja 15 kV:n elektronivirtasäädöillä saatiin hyvät kuvaustulokset. CZ BSD -detektorilla paras

kuva saatiin 10 kV:n jännitteellä. Mitä suurempi jännitevirta oli, sitä enemmän kuvassa oli mustia aukkoja.

Tarkempaan detektoritarkasteluun valittiin edellisten tulosten perusteella EPSE Ring. Tutkimusalueeksi valittiin 500–900 Pa ja 10–20 kV. Kuvavertailussa käytettiin 3000x-suurennoksella otettuja kuvia ja näytteenä oli edelleen poikkileikattu ohranjyvä. Tutkimuksessa saatiin hyviä kuvia koko tutkimusalueella. Ainoastaan kuvaan harjaantumattomuus kontrastin ja valoisuuden säädössä heikensi kuvaustuloksia. Verrattaessa 500 Pa:ssa otettuja kuvia 900 Pa:ssa otettuun kuviin pienempi elektronivirta riittää hyvään kuvaustulokseen.

Näytteen ja näytekammion termodynaamisen tasapainotilan merkitys kuvaustulokseen todennettiin kaurahiutaleen avulla. Näytekammion kosteus säädettiin aluksi 74 %:iin ja nostettiin 100 %:iin. Kaurahiutale adsorboi nopeasti kosteutta näytekammioista itseensä, jolloin soluseinät ja tärkkelysjyvät turposivat. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää tutkittaessa veden lisäyksen tai kuivumisen vaikutuksia näytteeseen.

Tutkimuksen aikana havaittiin päällystämättömän elintarvikenäytteen kuvaamiseen liittyviä haasteita, kuten paineen muodostuminen näytekammioon ja mikroskopointiin kuluva aika. Näyte voidaan pilata jo ennen kuin ensimmäistäkään kuvaa on otettu. Jos näytekammion paineenmuodostusasetukset eivät ole kohdallaan, liian suuri alipaine voi pilata tutkittavan näytteen. Näyte voi vaurioitua myös liiallisesta elektronivirran vaikutuksesta. Fokusoinnin aikana näytepisteeseen kohdistetaan elektronivirtaa koko ajan ja varsinkin aloittelijalla kuvan fokusointi vie aikaa.

Tässä työssä haluttiin tarkastella myös prosesseiden vaikutusta elintarvikkeen mikrorakenteisiin. Prosesseiksi valittiin tärkkelyksen liisteröityminen, valkuaisen vaahtoutuminen ja pikkuleivän valmistus.

Lämpökäsitellyn tärkkelyksen VP-ESEM-kuvia verrattiin valomikroskoopilla otettuihin vastaaviin kuviin. Valomikroskoopilla otetut kuvat kertovat enemmän jyvistä ja geeliytymistapahtumasta kuin elektronimikroskooppikuvat. Valomikroskooppikuvissa värjäytyneet amyloosi ja amylopektiini ovat helpommin tunnistettavissa kuin mustavalkokuva VP-ESEM:llä. Elintarvikkeita tutkittaessa

kannattaakin yhdistää kummallakin mikroskooppityypillä otettujen kuvien informaatio.

VP-ESEM:n kuvasarja kananmunan valkuaisen vaahtoutumisesta eri vatkausajalla kertoo havainnollisesti rakenteesta tapahtuvista muutoksista. Kuvista on selkeästi havaittavissa rakenteelliset erot: kevyt vaahto, jolloin ilmakuplat ovat suuria ja proteiiniverkko ei ole ehtinyt vielä kunnolla muodostua, kiinteä vaahto, jolloin ilmakuplia on jakautunut tasaisemmin tiiviiseen verkkoon ja yli mennyt vaahto, jolloin ilmakuplia on kasautunut sinne tänne ja proteiiniverkko on mennyt osittain jo rikki.

Tutkimukseen otettiin mukaan yksi koko tuotteen valmistusprosessi, jossa jokaisen raaka-ainelisäyksen ja paiston jälkeen otettiin VP-ESEM-kuva, pikkuleivän valmistus. Kuvasarja on sinänsä mielenkiintoinen, mutta kaipaisi rinnalleen eri raaka-aineiden vaikutusten vertailua. Voi/margariini, tomosokeri/kidesokeri, vehnä jauho + perunajauho/vehnä jauho -kuvien vertailuilla saataisiin lisäinformaatiota rakenteiden eroista ja vaikutuksista. Tutkimus kuitenkin osoittaa, että VP-ESEM on hyvä menetelmä tutkittaessa niin yksittäisen elintarvikkeen rakennetta kuin prosessoinnin vaikutusta rakenteeseen.

Tässä työssä yhdistyy laitteen toimintaperiaatteisiin tutustuminen ja perustutkimus kuvausolosuhteista. Ennen työn aloitusta VP-ESEM:lle tehtiin suomenkieliset käyttöohjeet. Ohjetta tullaan päivittämään sitä mukaa, kun kokemus laitteesta lisääntyy. Kuvausolosuhteiden tutkimus jää vajaaksi verrattuna laitteen antamiin mahdollisuuksiin. Opinnäytetyön tavoitteeksi asetettu VP-ESEM:n toimivuuden testaus toteutui vain osittain. Laitteisto mahdollistaa mikroskooppikuvien ottamisen 3000 Pa:in saakka alhaisella, 3 kV, elektronivirralla. Tässä työ kuitenkin rajattiin 500–900 Pa:n paineeseen ja 10–20 kV:n elektronivirralla.

Tutkimus osoittaa, että päällystämättömien elintarvikkeiden kuvaaminen VP-ESEM:lla on mahdollista 500 Pa:n paineessa. Tutkimuksessa saatiin hyviä mikroskooppikuvia painealueella 500–900 Pa. Jatkossa tutkimusta voisi keskittää korkeammille painealueille käyttäen pienempää elektronien jännitevirtaa. Näytteeksi voisi valita korkeita veden aktiivisuusarvoja omaavia elintarvikkeita. Myös muiden detektoreiden kuvantamiskykyä kannattaisi tutkia.

Tässä työssä ei esitelty SEM:n hyödynnettävyyttä alkuainemäärityksissä. SeAMK:n EVO MA10 on kytketty ohjelmistoon, jolla määrittäminen on mahdollista. Tämä aihealue olisi oman tutkimustyön arvoinen.

Opinnäytetyön haasteena oli työn rajaus. Työn edetessä halu tutkia mikroskaalassa eri prosessoinnin vaikutuksia eri elintarvikkeisiin vain kasvoi. Kuvamateriaalia saatiin runsaasti 500x–12 000x-suurennoilla. Kuvista valittiin tähän työhön vain osa. VP-ESEM:n käyttömahdollisuudet niin opetuksessa kuin hankkeissa ovat suuret. Tämä työ antoi arvokasta käyttökokemusta ja materiaalia SeAMK:n elintarvikkeiden mikroskopointitutkimuksiin.

LÄHTEET

Ahlholm, J. & Riippi, T. 2013. Perunatärkkelyksen mikroskopointikuvasarja. SeAMK Bio- ja elintarviketekniikan laboratorio.

Atteberry, J. 2009. How Scanning Electron Microscopes Work [Verkkosivu]. [Viitattu 14.11.2013]. Saatavana: <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm>

Barbosa-Cánovas, G. V., Schmidt, S. & Fontana, A. 2008. Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell. 47–51.

Cheney, B. Introduction to Scanning Electron Microscopy. [Verkkojulkaisu]. A Senior Project in the Materials Engineering. Department at San Jose State University. [Viitattu 16.2.2014]. Saatavana: http://www.sjsu.edu/people/anastasia.micheals/courses/MatE143/s1/SEM_GUI_DE.pdf

Carl Zeiss SMT Ltd. 2008. ZEISS EVO MA and LS Series Scanning Electron Microscopes Operator User Guide, Version 1, Englanti. 16–38.

Dahlgren, Ö. 1997. Elintarvikekemia. Helsinki. WSOY. 22–61.

Fontell, A., Maula, J., Nieminen, T., Söderlund, C., Valli, K., Vehanen, A., Vulli, M. & Ylilampi, M. 1986. Tyhjiötekniikka. Helsinki. Suomen tyhjiöseura. 15–44.

Gabriel, B.L. 1987. Scanning Electron Microscopy. [Verkkokirja]. Fractography, Vol 12, ASM Handbook, ASM International, 166–178. [Viitattu 5.12.2013] Saatavana: <http://products.asminternational.org/hbk/do/navigate?scope=EVERYTHING&volumes=0&search=sem>

Goodhew, P. J., Humphreys, F. J. & Beanland, R. 2000. Electron Microscopy and Analysis. University of Liverpool, UK John Humphreys Manchester Materials Science Centre, UK Richard Beanland Marconi Materials Technology, Towcester, UK.

Heinonen, J., Jouppila, K. & Salovaara, H. (toim.) 1993. Kondiittorin käsikirja. Helsinki. Leipomoalan edistämissektori. 18–30.

Heertje, I. 2014. Structure and function of food products: A review. [Verkkoartikkeli]. Food Structure. 3, 21. [Viitattu 18.3.2014]. Saatavana: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/22133291>

- Hernandez, E.M. & Kamal-Eldin, A. 2013. Processing and Nutrition of Fats and Oils. [Verkkokirja]. Institute of Food Technologists Series. Somerset, NJ, USA. 34–35. [Viitattu 18.3.2014]. Saatavana: <http://site.ebrary.com/lib/seamkebrary/Doc?id=10748642&ppg=47>
- Jaksch, H. & Vermeulen, J. P. 2005. [pdf-tiedosto]. A Novel STEM Detector System. Imaging & Microscopy. GIT VERLAG GmbH & Co. 22. [Viitattu 4.5.2014]. Saatavana: [http://www.smt.zeiss.com/C1256E4600307C70/EmbedTitelIntern/ANnovelSTEMDetectorSystem/\\$File/a_novel_stem_detector_system.pdf](http://www.smt.zeiss.com/C1256E4600307C70/EmbedTitelIntern/ANnovelSTEMDetectorSystem/$File/a_novel_stem_detector_system.pdf)
- Jouppila, K. 2006. Veden aktiivisuus on oleellinen tekijä elintarvikkeiden säilyvyydelle. [Verkkosivu]. Kehittyvä elintarvike. [Viitattu 6.2.2014] Saatavana: <http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/38-veden-aktiivisuus-on-oleellinen-tekija-elintarvikkeiden-sailyvyydelle>
- Meenakshi, P. 2007. Experimental Food Chemistry. [Verkkokirja]. Delhi, IND: Global Media. 2–20, 202. [Viitattu 4.3.2014]. Saatavana: <http://site.ebrary.com/lib/seamkebrary/Doc?id=10416577&ppg=165>. Vaatii käyttöoikeuden.
- Männistö, L. 2012. Ohratärkkelyksen elintarvikekäyttö. [Verkojulkaisu]. EKT-sarja 1571. Helsingin yliopisto. Elintarvike- ja ympäristöteknologian laitos. Maisterin tutkielma. Helsinki. 21–24. [Viitattu 4.3.2014]. Saatavana: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/37063/Maisterin%20tutkielma%20c%20Laura%20M%C3%A4nnist%C3%B6.pdf?sequence=1>
- Neděla, V. 2007. Dynamical “in situ” observation of biological samples using variable pressure scanning electron microscope. [pdf-tiedosto]. Electron Microscopy and Analysis Group Conference 2007. IOP Publishing. [Viitattu 8.4.2014]. Saatavana: http://iopscience.iop.org/1742-6596/126/1/012046/pdf/1742-6596_126_1_012046.pdf
- Peltonen, H., Perkkiö, J. & Vierinen, K. 2007. Insinöörin (AMK) Fysiikka, osa II, Lahden Teho-Opetus Oy. 364–366.
- Pelttari, A. 2007. Biologisen elektronimikroskopian perusteet. Kuopion yliopisto Biomater-keskus, Mikroskopian laboratorio. Kuopio. 36–45.
- Pray, L. & Yaktine, A. 2009. Nanotechnology in Food Products: Workshop Summary. Institute of Medicine. National Academy of Sciences, Washington, DC. 26–28.
- Rasmusson, B. (toim.) 2011. Kotileipuri. Helsinki. Kustannusosakeyhtiö Otava. 196.

Stokes, D.J. 2008. Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM). John Wiley & Sons Ltd. 2–33, 66–87.

Vilhunen, A-S. 2012. Tutkimuksellinen proteiinien opiskelu molekyyligastronomian kontekstissa. [Verkkojulkaisu]. Helsingin yliopisto. 3–12. [Viitattu 20.4.2014]. Saatavana: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/34537/kehittam.pdf?sequence=1>

Wrolstad, R. Institute of Food Technologists Series : Food Carbohydrate Chemistry. [Verkkokirja]. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell. 110–113. [Viitattu 5.12.2013]. Saatavana: <http://site.ebrary.com/lib/seamkebrary/Doc?id=10518661&ppg=130>