

Alexandra Kivinen

Kauran beetaglukaanin muokkaaminen geelien ja kalvojen tuottamiseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Insinööri (AMK)
Bio- ja elintarviketekniikka
Insinöörityö
15.04.2011

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Alexandra Kivinen Beetaglukaanin muokkaaminen geelien ja kalvojen tuottamiseen 58 sivua 15.4.2011
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Elintarviketieteiden maisteri, Reetta Kivelä Koulutuspäällikkö, Riitta Lehtinen
<p>Insinööriyön tarkoituksena oli tutustua kauran kuidun, beetaglukaanin, geeliytymiseen pilkkoutumisen yhteydessä ja luoda rutiinomainen geelienvalmistusmenetelmä laboratorioon. Pilkkomisen tarkoituksena oli saada beetaglukaanin molekyylipaino laskemaan geeliytymisen helpottomiseksi.</p> <p>Työssä tutkittiin, saadaanko kauran beetaglukaanista muodostumaan geelejä, kun sen molekyylirakennetta pilkotaan erilaisin menetelmin. Pilkkomismenetelmissä keskityttiin erityisesti hapetusmenetelmiin. Käytettyjä hapettimia olivat askorbiinihapponi, vetyperoksidi ja 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni. Lisäksi kauran beetaglukaania pilkkottiin korkeapainehomogenisaattorilla. Pilkkomismenetelmiä vertailtiin suolahapolla pilkkomiseen, sillä happohydrolysoitujen beetaglukaanien tiedettiin entuudestaan geeliytävän.</p> <p>Toisena tutkimuskohteena olivat biopolymeereistä valmistetut kalvot. Kalvoja valmistettiin aiemmissa kokeissa pilkkomiskäsittelystä kauran beetaglukaanista. Koska beetaglukaanin korkeapainehomogenointi vaikutti lupaavalta menetelmältä, päätettiin kalvoja valmistaa lisäksi vehnän ja ohran korkeapainehomogenisaattorilla pilkotusta tärkkelyksestä.</p> <p>Insinööriyössä saatiin onnistuneita geelejä aikaan happohydrolysoidulla ja homogenoidulla kauran beetaglukaanilla. Muulla tavoin pilkottuja näytteitä ei saatu onnistuneesti geeliyttämään. Vahvin geeli happohydrolysoinnin osalta saavutettiin geeliyttämällä beetaglukaania 7 %:n liuosvahvuudella 7 päivää. Homogenointikäsittely tuotti onnistuneita geelejä samalla beetaglukaanipitoisuudella ja geeliytymisajalla kuin happohydrolysoidut näytteet. Tällöin beetaglukaaniuutetta oli homogenoitu 1000 baarin paineessa 5 minuuttia.</p> <p>Kalvokokeissa saatiin tuotettua homogeenimalla käsitellyistä näytteistä läpinäkyviä kirkkaita kalvoja, jotka olivat rakenteeltaan melko voimakkaita ja näin ollen potentiaalisia biohajoavia kalvoja erilaisiin sovelluksiin. Myös askorbiinihapolla ja vetyperoksidilla käsitellyistä kalvoista saatiin onnistuneita mittaustuloksia.</p>	
Avainsanat	geeliytyminen, kaurakuitu, β -glukaani, luonnonpolymeerit

Author Title	Alexandra Kivinen Modifying β -glucan to produce gels and films
Number of Pages Date	58 pages 15 April 2011
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Reetta Kivelä, Master of Food Science, Graduate student Riitta Lehtinen, Principal Lecturer
<p>The aim of this thesis project was to study oat bran β-glucan and its gelation mechanisms during cleavage and also to create a gel making routine for laboratories. The cleavage of β-glucan was intended to lower the molecule weight of β-glucan to ease the gelation.</p> <p>First, it was examined whether oat β-glucan could form gels when its molecular structure was cleaved by different methods. The focus was on different oxidation methods. Oxidants that were tested were ascorbic acid, hydrogen peroxide and 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidine oxoammonium ion. Oat β-glucan was also cleaved by a high pressure homogenizer. The results of different cleavage methods were compared with those received from acid hydrolysis by hydrochloric acid. It was also studied whether acid hydrolyzed β-glucan could form gels.</p> <p>Next, it was examined whether biodegradable films could be made by oat β-glucan that had been cleaved in the gelation experiments. Because the high pressure homogenized oat β-glucan extract seemed to be a promising raw material for biodegradable films, some films were also made from homogenized wheat and barley starch.</p> <p>The results of this project showed that gels can be successfully made from homogenized and acid hydrolyzed oat β-glucans. Samples cleaved by other methods did not form gels successfully. Strongest gel from acid hydrolyzed oat β-glucan was achieved with a 7 % solution concentration and with 7 days' gelation time. High pressure homogenization induced excellent gels with the same gelation time and concentration as acid hydrolysis. In this case, the β-glucan extract had been homogenized at a 1000 bar pressure for 5 minutes.</p> <p>The experiments with films resulted in bright and translucent films made of homogenized oat β-glucan samples. They had a relatively strong structure and were, therefore, potential biodegradable films for different applications. Also films made of ascorbic acid and hydrogen peroxide gave successful measurement results.</p>	
Keywords	gelation, oat fiber, β -glucan, natural polymers

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kaura	3
2.1	Kuitu	3
2.2	Kauran kuidut	3
2.3	Liukoinen kuitu	3
2.4	Beetaglukaani	4
3	Geelityminen	5
3.1	Geeli	5
3.2	Beetaglukaenin pilkkoutuminen ja geelityminen	6
3.3	Hydrogeelit	7
3.3.1	Veden vaikutus hydrogeeleissä	7
3.3.2	Luonnon hydrogeelien käyttömahdollisuudet	8
3.3.3	Beetaglukaanipohjaisten geelien käyttömahdollisuudet	8
4	Reologia	10
4.1	Reologiset mittaukset	10
4.2	Viskositeetin mittaaminen	12
	Molekyyliseen vaikutukseen beetaglukaanin viskositeettiin	13
5	Kalvot	13
6	Työn tarkoitus	16
7	Työvaiheet	17
8	Materiaalit ja menetelmät	18
8.1	Uuttaminen	18

8.2	Pilkkomiskäsittelyt	19
8.3	Puhdistus	21
8.4	Uudelleenliuotus	21
8.5	Geelimuottien valaminen	22
8.6	Mittaukset	22
9	Esikokeet	23
9.1	Beetaglukaaniuutteen valmistaminen	23
9.2	Uutteen pilkkominen	24
9.3	Pilkotun uutteen puhdistus	24
9.4	Puhdistetun beetaglukaanijauheen uudelleenliuotus	25
9.5	Geelimuottien valaminen	25
9.6	Homogenointi- ja iso-propanolikokeet	26
9.7	Liuotuskokeet	27
9.7.1	Happohydrolyysi	27
9.7.2	Homogenointi	27
9.8	Viskositeettikokeet	28
9.8.1	Alustavat viskositeettikokeet	28
9.8.2	Varsinaiset viskositeettikokeet	29
9.9	Uudet geelikokeet	30
	Käsittelyt	30
10	Esikokeiden tulokset	31
10.1	Happohydrolysoidut näytteet	31
10.2	Rautasulfaattikäsittely	31
10.3	Askorbiinihappokäsittely	31
10.4	Geelimuottien testaus	31
10.5	Homogenointikäsittely	32
10.6	Iso-propanoli	32
10.7	Liuotuskokeiden tulokset	32
10.7.1	Homogenoitu beetaglukaani	32
10.7.2	Happohydrolysoitu beetaglukaani	34
10.8	Viskositeettikokeiden tulokset	34
10.8.1	Alustavien viskositeettikokeiden tulokset	34
10.8.2	Varsinaisten viskositeettikokeiden tulokset	35
10.9	Uusien geelikokeiden tulokset	36
11	Vertailukelpoiset geelikokeet	38

11.1	Homogenoidut, happohydrolysoidut ja askorbiinihappokäsitellyt näytteet	39
11.2	Vetyperoksidikäsitely	39
11.3	2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni -käsitely	39
12	Vertailukelpoisten geelikokeiden tulokset	40
12.1	Homogenoidut näytteet	40
12.2	HCl-käsitellyt näytteet	42
12.3	Askorbiinihappokäsitellyt näytteet	44
12.4	2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni- ja H ₂ O ₂ -käsitellyt näytteet	45
13	Tulosten yhteenveto	48
14	Kalvokokeet	48
	Kalvojen valmistus- ja mittausmenetelmät	49
15	Kalvokokeiden tulokset	50
16	Yhteenveto	53
	Lähteet	55

Lyhenteet

SCFA	<i>Short Chain Fatty Acid</i> . Lyhytketjuisia rasvahappoja, jotka stimuloivat paksusuolen verenkiertoa ja elektrolyyttien vastaanottokykyä.
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> . Hyvä kolesteroli, joka kuljettaa kolesterolia pois kudoksista ja valtimoiden seinämistä.
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> . Haitallinen kolesteroli, joka kertyy valtimoiden seinämiin.
CTG	<i>Cereal technology group</i> . Helsingin Yliopistolla viljakasvien tutkimiseen erikoistunut tutkimusryhmä.
RheoStress®	Rheometri.
Speed Vac®	Laite, joka haihduuttamalla konsentroi näytteitä.
Microfluidizer®	Korkeapainehomogenisaattori.
Ultra-Turrax®	Homogenisaattori.
Roto Shake Geniel®	Magneettisekoittaja.
Instron®	Kalvojenmittauslaite.

1 Johdanto

Beetaglukaanit ovat viljakasvien pitkäketjuisia polysakkarideja eli sokereita, jotka sijaitsevat kasvien jyvien ytimien kalvo- ja seinämärakenteissa. Beetaglukaanit ovat vesiliukoisia kuituja. Niiden polysakkaridiketjut kietoutuvat keskenään veteen liuetessaan ja muodostavat verkkomaisia rakenteita. Mikäli polymeerien muodostama verkosto on sitonut sisäänsä nestettä, on syntynyt geeli.

Beetaglukaanit ovat ravitsemuksen kannalta merkityksellisiä, koska kuitujen on todettu vähentävän haitallisen kolesterolin määrää elimistössä. Lisäksi kauran kuiduilla on käyttömahdollisuuksia mm. keliakikoille valmistettavissa elintarvikkeissa, sillä monet keliakikot voivat käyttää ruokavaliossaan kauraa.

Insinööriyössä oli tarkoituksena valmistaa kauran beetaglukaanista geelejä. Geeliytymisen aikaansaamiseksi kokeiltiin erilaisia beetaglukaanin rakennetta pilkkovia menetelmiä. Aiemmin tehdyissä tutkimuksissa oli todettu pilkotun beetaglukaanin geeliytymän paremmin kuin pilkkomattoman. (Tosh ym. 2004b) Toisena tutkimuskohteena olivat eri tavoin pilkotun kauran beetaglukaanista sekä vehnän ja ohran tärkkelyksestä valmistetut kalvot.

Kauran beetaglukaanin sisältävien geelien valmistus oli monivaiheinen operaatio. Ensimmäisessä vaiheessa beetaglukaanin sisältävää jauhetta liuotettiin veteen, jotta saatiin aikaan uutetta. Uutetta puhdistettiin ylimääräisistä kauran ainesosista sakkaamalla etanolilla. Seuraavaksi uutetta käsiteltiin siten, että beetaglukaanin rakenne saatiin pilkotuksi. Työssä kokeiltiin useita eri pilkkomismenetelmiä. Pilkottu uute puhdistettiin ja kuivattiin jauheeksi. Jauheesta valmistettiin geelimuottien valamista varten liuos, yleensä veteen sekoittamalla. Geelimuotit valettiin ja niiden ominaisuuksia tarkasteltiin muutaman päivän kuluttua rheometri-mittalaitteella.

Kalvokokeita varten valettiin tutkittavasta biopolymeeristä liuoksia petrialjoille ja ne kuivattiin lämpökaapissa. Kalvot saivat asettua olosuhdehuoneessa viikon ja tämän jälkeen niiden vahvuudet testattiin Instron 4465 –mittalaitteella.

Koko Suomessa on parhaillaan meneillään laajamittainen kauran käytön edistämiprojekti elintarvikekäyttöön. Suomen kaurayhdistys on mm. käynnistänyt ”Lumoudu kaurasta” -kampanjan, jonka tarkoituksena on lisätä ihmisten kauratietoutta. [Kaura 2011]

Oma tutkimuskokonaisuuteni oli uusi innovatiivinen kokeilu kauran hyödyntämismahdollisuuksista. Insinööriyön pääasiallisena tavoitteena oli selvittää, onko pilkkoutumis-mekanismeilla vaikutusta kauran beetaglukaanista valmistettujen geelien ominaisuuksiin. Haluttiin myös hankkia tietoa beetaglukaanin eristämisestä ja luoda rutiininomainen geelienvalmistusmenetelmä laboratorioon. Työ tehtiin osana elintarviketieteiden maisterin ja väitöskirjatutkijan Reetta Kivelän (HY, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos) beetaglukaanin ei entsyymattista hajoamista ja hapettumisprosessia käsittelevää työtä. Väitöskirjan on tarkoitus valmistua vuoden 2011 aikana.

2 Kaura

2.1 Kuitu

Kuidulla tarkoitetaan ravitsemuksen yhteydessä puhuttaessa kasvikunnan tuotteista saatavaa ravintoainetta, joka ei imeydy ohutsuolessa eikä pilkkoudu ylemmän ruoansulatuskanavan entsyymien vaikutuksesta. Kuitupitoisella ruokavaliolla on todettu olevan positiivisia vaikutuksia ruoansulatuksessa. (Jaakonsaari 2009; Sontag-Strohm 2009)

Ravintokuidut voidaan jakaa vesiliukoisiin ja veteen liukenemattomiin kuituihin. Ravintokuitu on yhteisnimitys kasvikunnan tuotteista ravinnon mukana saatavista polysakkarideista (tärkkelys poissulkien) ja ligniinistä. Liukoinen kuitu vaikuttaa ruuan imeytymiseen ohutsuolessa ja liukenematon kuitu puolestaan paksusuolen toimintaan. (Jaakonsaari 2009)

2.2 Kauran kuidut

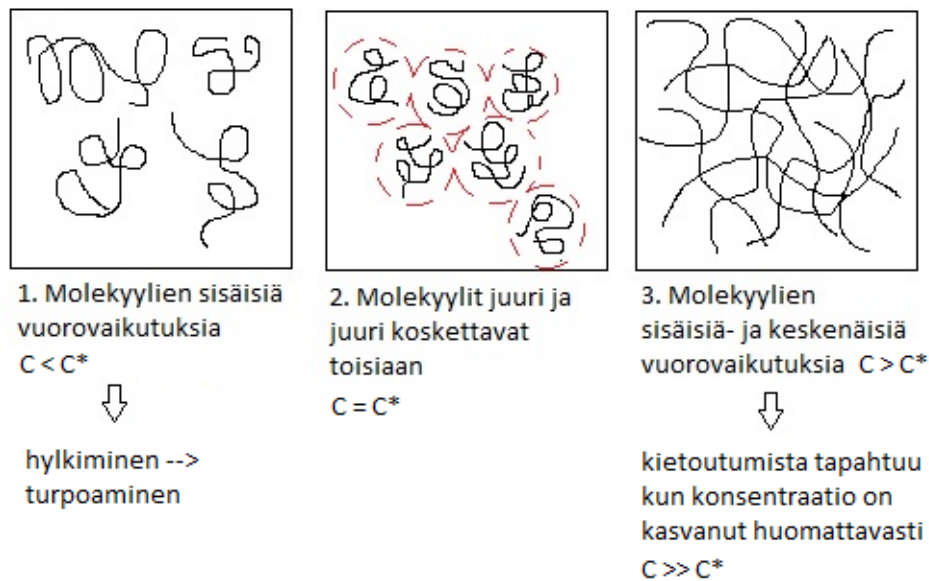
Kauran kuituja on kauran ytimessä sokeriketjuina eri rakenteissa ja tehtävissä. Kauran liukenemattomat kuidut, selluloosa ja pentosaani, muodostavat ytimen uloimman suojaeroksen, ja niitä on yhteensä neljä prosenttia kauran kuiduista. Liukoiseksi kuiduksi puolestaan kutsutaan ytimen soluseinissä olevaa beetaglukaania, jota on neljä prosenttia kauran kuiduista. Liukenematon ja liukoinen kuitu ovat kauran ravintokuituja. Kauran ytimen rakenteesta 70 % on tärkkelystä. Tärkkelys toimii kauran energiavarastona. (Sontag-Strohm 2009)

2.3 Liukoinen kuitu

Liukoiset polysakkaridit ovat sattumanvaraisesti muodostuneita lineaarisia ketjurakenteita ja yleensä rakenteeltaan joustavia. Polymeerin muoto vaihtuu jatkuvasti lämpöliikkeen eli Brownin liikkeen seurauksena. (Kivelä 2008)

Polymeeriliuoksen ollessa laimea liuoksen molekyyliden välillä tapahtuu vuorovaikutusta, joka johtaa molekyyliden turpoamiseen (kuva 1, kohta 1). Kun liuoksen pitoisuutta kasvatetaan, saavutetaan kriittinen pitoisuus (kuva 1, kohta 2), minkä jälkeen konsentraa-

tion kasvattaminen aiheuttaa polymeeriketjujen kietoutumista (kuva 1, kohta 3). Kun polymeeriketjut ovat kietoutuneet toisiinsa, ne vastustavat liuokseen kohdistuvaa leikkausvoimaa ja liuoksen viskositeetti kasvaa. Polysakkaridiliuoksen käyttäytymistä voidaan tutkia viskositeettimittauksella. (Kivelä 2008; Doublier & Cuvelier 2006)



Kuva 1: Konsentraation muutoksen vaikutus polymeeriketjuihin polymeeriliuoksessa. (Muokattu lähteestä Kivelä 2008)

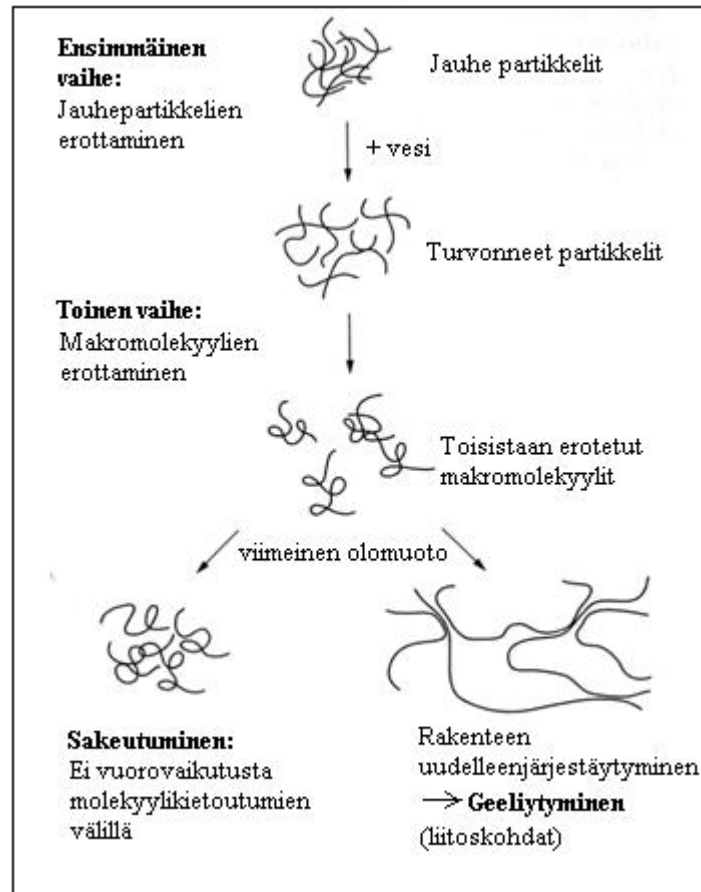
2.4 Beetaglukaani

Beetaglukaani muodostaa kauran, ohran, vehnän ja rukiin jyvien ytimen kalvo- ja seinämärakenteen [Izydorczyk & Bilianderis. 2000]. Viljakasvien beetaglukaanit muodostuvat lineaaristen homopolysakkaridien D-glukopyranosyyliyksiköistä, jotka ovat liittyneet toisiinsa joko erillisin $\beta(1-3)$ -sidoksin tai $\beta(1-4)$ -sidosryhmien avulla (Dais & Perlin 1982; Izydorczyk ym. 1998a; Wood ym. 1991, 1994; Woodward ym. 1983, 1988). Beetaglukaanien tri- ja tertameerien määrät ja $\beta(1-3)$: $\beta(1-4)$ -sidosten suhteet vaihtelevat suuresti viljakasveilla (Izydorczyk & Bilianderis 2000). Nämä rakenteelliset piirteet näyttävät olevan tärkeitä beetaglukaanin fysikaalisia ominaisuuksia, kuten vesiliukoisuutta, viskositeettia ja geeliytymisominaisuuksia, tutkittaessa (Cui ym. 2000; Doublier & Wood 1995; Izydorczyk ym. 1998a-c; Lazaridou & Bilianderis 2004; Lazaridou ym. 2003, 2004; Skendi ym. 2003; Storsley ym. 2003; Tosh ym. 2004a, b; Vaikousi ym. 2004).

3 Geeliytyminen

3.1 Geeli

Geelillä tarkoitetaan kolloidisysteemiä, jossa polymeerien muodostaman verkoston sisään on sitoutunut vettä tai muuta vastaavaa liuotinta. Kun geelin liuottimena on jokin hydrofiilinen aine (yleensä vesi), on kyseessä hydrogeeli. Geelissä kiinteä aine imee nestettä itseensä ja turpoaa. (Kivelä 2008; Geelit 2008) Geeliytymisen vaiheet on esitetty kuvassa 2. Kuvassa esitetään polysakkaridien kaksi vaihtoehtoista liukenemismekanismia, joista toisessa lopputuloksena muodostuu geeli ja toisessa liuos saostuu, mutta geeliä ei pääse muodostumaan. Geelejä valmistetaan useimmiten biopolymeeriliuoksista. Sama biopolymeeri voi muodostaa eri tavalla käsiteltäessä erityyppisen geelirakenteen. Geeliytymisen aikana muodostuneen verkoston rakenne vaikuttaa suuresti geelin ominaisuuksiin, kuten geelin elastiseen moduuliin. Elastinen moduuli kuvaa geelin venymiskykyä, kun siihen kohdistetaan paine tai pieni vääntö. Suuren rasituksen alaisena geeli, rakenteesta riippuen, joko repeää tai muuttuu juoksevaksi. Tätä romahduksen aikaansaavaa voimaa kutsutaan nimellä yield stress. (Kivelä 2008; Morris 2007)



Kuva 2: Kaaviokuva polysakkaridien liukenemisprosessin eri vaiheista. (Muokattu lähteestä Doublier & Cuvelier 2006)

3.2 Beetaglukaanin pilkkoutuminen ja geelityminen

Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että pienen molekyylikoon β -glukaaniliuokset geeliytyvät paremmin kuin liuokset, joiden molekyylipaino on suuri. Beetaglukaani on saatu tutkimuksissa pilkkoutumaan joko happohydrolyysin avulla, entsyymikäsittelyllä tai hapettamalla sitä erilaisin menetelmin. Entsyymikäsittelyillä saadaan pilkottua beetaglukaanin $\beta(1-4)$ -glukosididoksia, muttei lainkaan $\beta(1-3)$ -glukosididoksia. Happohydrolyysillä on saatu pilkottua molempia sidostyyppiä, mutta siitä, missä määrin kumpaakin sidostyyppiä pilkkoutuu, ei ole varmuutta. (Tosh ym. 2004b)

3.3 Hydrogeelit

Hydrogeelien geelipohjana on joko vettä, glyserolia tai propyleeniglykolia. (Geelit 2008). Hydrogeeli on aine, joka veteen liuotettaessa kykenee paisumaan nopeasti ja säilyttämään suuria määriä vettä rakenteessaan. Yleensä hydrogeelit muodostuvat hydrofiilisistä polymeereistä, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa joko kemiallisin sidoksin tai muilla koheesivoimilla, kuten vetysidoksin, ionisella tai hydrofobisella vuorovaikutuksella. (Park ym. 1993)

Hydrogeelien rakenteesta on tunnistettavissa kiinteä ja liukoinen osa. Hydrogeelien kiinteä osa muodostuu usein polymeeriketjuista tai niiden muodostamasta verkosta. Polymeerin hydrofiiliset eli vesihakuiset ominaisuudet aiheuttavat niiden kyvyn imeä huomattavia määriä vettä rakenteeseensa. Hydrogeelit kykenevät absorboimaan itseensä kuivapainoonsa nähden 0,2–1000-kertaisen määrän vettä. (Campoccia ym. 1998; Prestwich ym. 1998; Hoffman 2002)

Jos polymeerirakenne geelissä on kovalenttisten sidosten muodostama, kutsutaan geeliä pysyväksi geeliksi tai kemialliseksi geeliksi. Jos taas polymeerirakenteen sitoijina on vetysidoksia, ionisidoksia tai hydrofobisia voimia, kutsutaan geeliä fysikaaliseksi geeliksi. Fysikaalisen geelin rakenne ei ole kovin pysyvä, vaan geeli voi liueta ylimäärässä liuotinta tai olosuhteiden muutoksen aiheuttamana. Fysikaaliset geelit ovat yleensä rakenteeltaan homogeenisia. Kemialliset geelit saattavat geelistä riippuen sisältää voimakkaasti sitoutuneita ja vähän vettä absorboivia tai löysästi sitoutuneita ja paljon vettä absorboivia alueita. (Drumheller & Hubbell 1995; Hoffman 2002)

3.3.1 Veden vaikutus hydrogeeleissä

Kun kuiva hydrogeeli joutuu kosketuksiin veden kanssa, vettä absorboivat polymeerissä ensimmäiseksi kaikkein hydrofiilisimmät ryhmät. Tällä tavoin sitoutunutta vettä kutsutaan primäärisesti sitoutuneeksi vedeksi. Kun hydrofiiliset ryhmät ovat kosketuksissa veden kanssa, polymeerin rakenne turpoaa. Turpoamisen ansiosta myös hydrofobiset ryhmät pääsevät vuorovaikuttamaan vesimolekyylien kanssa. Tätä hydrofobisesti sitoutunutta vettä kutsutaan sekundäärisesti sitoutuneeksi vedeksi. Yhdessä hydrofiilisesti ja hydrofobisesti sitoutunut vesi muodostavat kokonaissidosveden. (Hoffman 2002)

Kokonaissidosveden lisäksi polymeeriverkon rakenteeseen sitoutuu vettä osmoottisten voimien ansiosta. Sitoutuminen jatkuu, kunnes geeli saavuttaa tasapainon kovalenttisten ja fysikaalisten sidosvoimien kanssa. Osmoosin avulla polymeeriverkon rakenteeseen imeytyntä vettä kutsutaan vapaaksi vedeksi. Vapaa vesi täyttää polymeeriketjujen välissä olevan tilan ja muodostaa huokosia geelin rakenteeseen. (Hoffman 2002)

3.3.2 Luonnon hydrogeelien käyttömahdollisuudet

Hydrogeelejä valmistetaan sekä synteettisesti että luonnon polymeereistä. Hydrogeeleissä käytettyjä biopolymeerejä eli luonnon polymeerejä ovat esimerkiksi kollageeni, gelatiini, agaroozi ja agaropektiini. Kollageeniä löytyy ihmisen elimistöstä esim. ihosta, luista, jänteistä ja erilaisista kalvorakenteista. Se on elimistön runsain proteiini. (Heino & Vuento 2004) Gelatiini eli liivate koostuu myös kollageenista. Liivatetta käytetään mm. ruoanlaitossa, leivonnassa ja erilaisissa elintarvikkeissa hyvän sakeuttamiskykynsä ansiosta. Gelatiini muodostaa geelifaasin veden kanssa lämpötilaa laskettaessa. (Cole) Agaroozi ja agaropektiini ovat punaleivistä eristettyjä biopolymeerejä. Kaupoissa niitä myydään yhteisnimikkeellä agar-agar. Agar-agaria käytetään laboratorioissa viljelyalustana bakteereille ja mikrobeille ja lisäksi kasviperäisenä sakeutusaineena ruoan valmistuksessa. Agar-agaria käytetään sekä jauheena, hiutaleena, tankona että nauhana. Se liukenee kiehuvaan veteen ja muodostaa geelin jäähtyessään. (Porto 2003)

3.3.3 Beetaglukaanipohjaisten geelien käyttömahdollisuudet

Työssäni oli tarkoituksena valmistaa geelejä eri tavoin pilkkomiskäsitellystä kauran beetaglukaanista. Kauran beetaglukaanilla on useissa tutkimuksissa todettu olevan monia terveysvaikutuksia ihmiselimistössä. Beetaglukaanin on todettu laskevan kolesterolia ja näin ollen vähentävän sydäntautien riskiä. (Belhall ym. 2004) Lisäksi säännöllinen beetaglukaanin nauttiminen osana ruokavaliota saattaa parantaa paksusuolen hyvinvointia. Kuuden gramman annos konsentroitua beetaglukaania päivässä nostaa suurella todennäköisyydellä ihmisen paksusuolen lyhytketjuisten rasvahappojen (SCFA) määrää. [Queenan ym. 2007] Hyödyllisiä lyhytketjuisia rasvahappoja muodostuu, kun aerobiset bakteerit pilkkovat käymisen avulla ihmisen ravintoa. Mitä hitaammin kuitu fermentoi-

tuu, sitä paremmin se ylläpitää sopivan alhaista suoliston pH-tasapainoa ja kohottaa SCFA-pitoisuuksia (erityisesti butyraatin osalta) koko paksusuolen alueella. (Ruuansulatus 2009)

Useiden keliaakikoiden on todettu sietävän kauraa ruokavaliiossaan (Julkunen 2007; Suositus 2007). Niinpä kaurapohjaisille tuotteille olisi kasvava kysyntä elintarvikemarkkinoilla. Lisäksi kaurapohjaisista geeleistä voisi löytyä käyttömahdollisuuksia erilaisiin laboratorioiden tutkimusmenetelmiin ja esim. lääke- ja elintarviketeollisuuden tarpeisiin. Esimerkkisovelluksia voisivat olla vaikkapa geelipohjaiset kasvisliemivalmisteet sekä erilaiset kaurapohjaiset juomat ja jogurtit. Beetaglukaanista valmistettuun geeliin voisi esimerkiksi istuttaa vitamiineja tai lääkeaineita ja makuaineita, jolloin ne olisivat kaikkien ikäryhmien ihmisille helposti nautittavassa muodossa. Kauran käyttöä ja erityisesti sen tämän bioaktiivisen molekyylin käyttöä pyritään kaikin keinoin edistämään. Jos beetaglukaanipohjaisia geelejä saataisiin onnistumaan, niillä voisi korvata vaikka liivatea. Liivate ei eläinperäisen lähteensä takia ole välttämättä suositeltava aine, mutta sillä on aivan erityiset käyttöominaisuudet.

Tärkkelys on yleisin elintarviketeollisuudessa käytetty paksunnosaine (Daniells 2006). Beetaglukaanilla voisi mahdollisesti olla samankaltaiset ominaisuudet, jos sitä kyettäisiin hallitusti geeliyttämään. Silloin se tarjoaisi mm. energiavapaan vaihtoehdon ravintokuituna tärkkelykselle, joka hajoaa ruoansulatuksessa. (Ravitsemus)

Maastricht Universityn tutkijat ovat selvittäneet kauran beetaglukaania sisältävän leivän ja keksien vaikutusta haitallisen LDL-kolesterolin määrään ihmisen elimistössä (Kerckhoffs ym. 2003). LDL-kolesteroli kertyy valtimoiden seinämiin ja kasvattaa näin sydäntautien riskiä. Toisessa saman tutkijaryhmän tutkimuksessa seurattiin liukoista kauran beetaglukaania sisältävän appelsiinimehun vaikutuksia. Tutkimusten mukaan leivät ja keksit eivät alentaneet LDL-kolesterolia merkittävästi, toisin kuin beetaglukaanipitoinen appelsiinimehu, jonka vaikutukset LDL-kolesterolin määrän laskuun normaaliin mehuun verrattuna, olivat merkittäviä. Beetaglukaania sisältävä appelsiinimehu nosti lisäksi hyvän HDL-kolesterolin pitoisuutta elimistössä. HDL kuljettaa kolesterolia pois kudoksista ja valtimoiden seinämistä ja näin ollen alentaa sydäntautien riskiä. (Mustajoki & Kaukua 2008a ja 2008b)

4 Reologia

Reologialla tarkoitetaan oppia fluidin muodonmuutoksista ja virtauksesta. Geeleihin reologia liitetään sen vuoksi, että geelisivokset eivät ole puhtaasti pelkästään geelejä, vaan niitä kuvaa paremmin termi viskoelastinen systeemi. Tämä tarkoittaa sitä, että geelin rakenne muodostuu virtaavasta viskoosista osasta ja kiinteästä elastisesta osasta. (Kivelä 2008)

4.1 Reologiset mittaukset

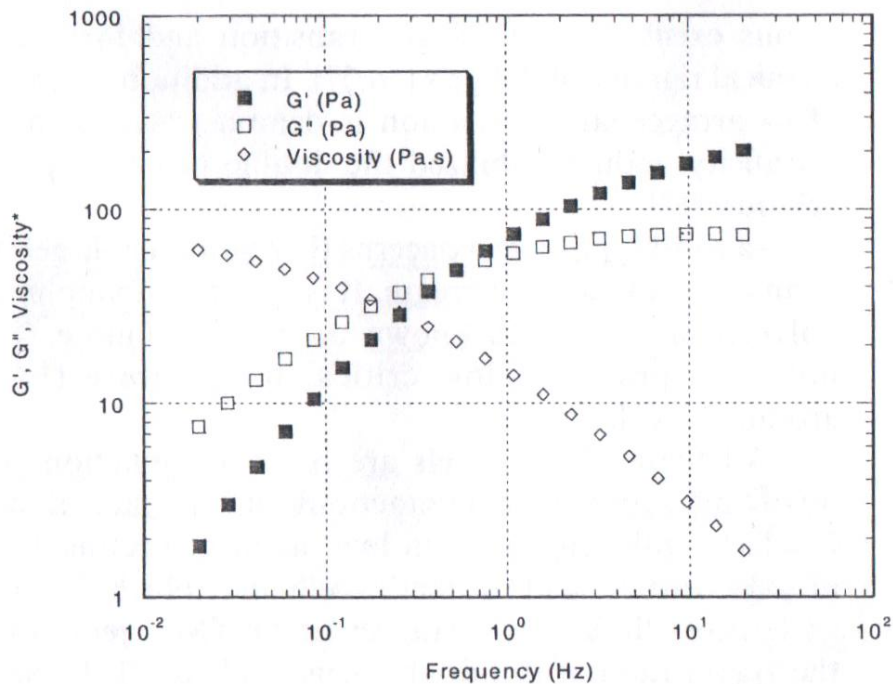
Geelitymisen yhteydessä tapahtuu asteittaista ristisidosten muodostumista. Yhä suurempia kimppuja ja kasaumia muodostuu, kunnes on saavutettu kriittinen piste, jolloin geeli on muodostunut. Geelitympisteessä systeemin reologia muuttuu viskoelastisesta fluidista viskoelastiseksi kiinteäksi aineeksi. (Winter & Chambon 1986)

Viskoelastisuutta määritettäessä näytteeseen kohdistetaan rheometri-mittalaitteessa ollessaan sinusoidinen (eli sinimuotoinen) jännite, ja voima (stress) mitataan samanaikaisesti. Tuloksena saadaan kaksi käyrää. Toinen käyrä G' (storage modulus) kuvaa syklistä hajoamisessa säilyvää energiaa ja näytteen elastista osuutta. G'' (loss modulus) kuvaa näytteestä lämpöenergiana poistuvaa energiaa ja näytteen viskoosia osuutta. G' :n ollessa nolla ja faasikulman 90° on liuos täysin newtoninen. Kun G'' puolestaan on nolla, on kyseessä täysin elastinen systeemi. Mikäli G' :n arvot ovat suurempia kuin G'' :n on muodostunut kiinteä rakenne, geeli. Tällöin mitä kauempana saadussa kuvajassa G' -arvot ovat G'' -arvoista, sitä voimakkaampi geelin rakenne on. (Kivelä 2008; Rinaudo 2005)

Geelirakenteita tutkitaan oskilloivien frekvenssi -mittauksin. Oskilloivalla tarkoitetaan sitä, että mittausta tehdessä työskennellään sellaisella alueella, että liuokseen kohdistettu voima ei riko sen rakennetta. (Kivelä 2008)

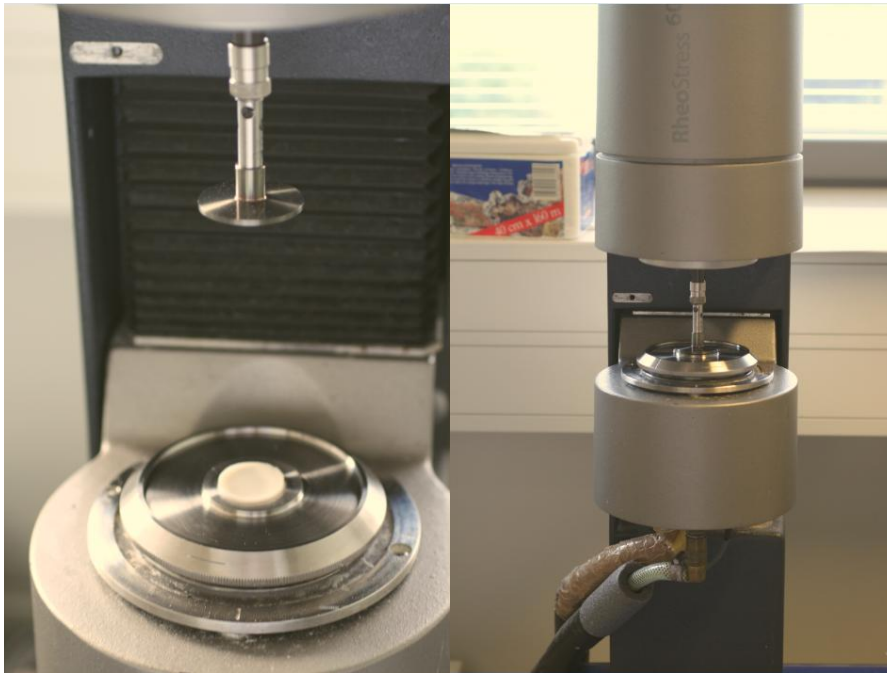
Polymeeriliuosten tapauksessa saatu kuvaaja poikkeaa geeleistä saatavista kuvaajista. Kuvassa 3 alhaisen frekvenssin polymeeriliuoksella G'' :n arvo on aluksi suurempi kuin G' :n, mutta kun lopulta kriittisen frekvenssin ω_0 saavutettuaan, G' :sta tulee suurempi kuin G'' :sta, johtuen polymeeriketjujen yhteenkietoutumisesta. Konsentraation kasva-

essa hetkellisen ristisidoskohdan ω_0 frekvenssi laskee ja G' :n arvo kasvaa. Hyvässä polymeeriliuoksessa muodostunut kuvaaja kahden akselin välillä on kaari, jossa kaikki pisteet sijoittuvat samalle referenssikäyrälle. (Rinaudo 2005)



Kuva 3: Hyaluronihappoliuoksen dynaaminen reologia 0,1 M NaCl:ssa 37 celsiusasteessa. (Muokattu lähteestä Rinaudo 2005)

Geelimitoituksia ja viskositeettimitoituksia tehtiin työssä Thermo Haaken RheoStress 600 -mittalaitteella (kuva 4) eli rheometrillä.



Kuva 4: Rheometrimittalaite ja työssä käytetty mittapää.

4.2 Viskositeetin mittaaminen

Viskositeetilla tarkoitetaan sisäistä kitkaa, joka syntyy, kun nestekerroksia liikutetaan eri nopeuksilla. Liuoksen viskositeettia mittaamalla saadaan selville, kuinka paljon liuos vastustaa hajoamista. Viskositeettiin vaikuttavat polymeeriliuoksen konsentraatio, interaktiot, molekyylien koko ja muoto sekä liuoksen lämpötila. (Kivelä 2008)

Viskositeettia kuvataan useimmiten leikkausnopeuden funktiona saatavina virtauskäyriä. Polymeeriliuoksen sisäinen kitka pienenee, kun siihen kohdistetaan leikkausvoimia viskositeettia mitattaessa, ja toisiinsa kietoutuneet polymeeriketjut suoristuvat. Kun fluidin viskositeetti on leikkausnopeudesta riippumaton, sitä kutsutaan newtoniseksi. Kun taas viskositeetti laskee leikkausnopeuden kasvaessa, liuos on viskositeettiominaisuuksiltaan leikkausoheneva. (Kivelä 2008)

Molekyyliseen vaikutus beetaglukaanin viskositeettiin

Molekyyliseen pieneneminen heikentää polymeeriketjujen kietoutumista keskenään liuoksessa. Kun polymeeriliuosta käsitellään jollakin molekyylisuurta pilkkovalla menetelmällä, liuoksesta tulee viskoosia. (Kivelä 2008)

5 Kalvot

Miksi biomateriaaleista halutaan kehittää kalvoja?

Viime aikoina pakkauksia ja pakkausmateriaaleja kehitettäessä on alettu yhä enemmän huomioida ympäristön kuormitusta. On kehitetty pakkauksia, joissa on käytetty mahdollisimman vähän materiaalia ja lisäksi on tähdätty pakkausten kierrätettävyyteen ja pakkausmateriaalien biohajoavuuteen. (Tharanathan 2003)

Biopohjaisten kalvojen etuna pakkausmateriaalina on niiden ympäristöystävällisyys. Lisäksi useimmat biopohjaiset kalvot ovat syömäkelpoisia, jolloin niitä on mahdollista hyödyntää myös elintarviketeollisuudessa. Haittapuolena on, että biomateriaaleista valmistettavat kalvot eivät suojaa elintarvikkeita hapettumiselta ja mikrobiologiselta pilaantumiselta. (Tharanathan 2003)

Biomateriaaleista valmistettuja kalvoja on tähän mennessä hyödynnetty esimerkiksi hedelmien päällystämiseen. Suojaava vahamainen kalvo pitää hedelmän pidempään tuoreena, ylläpitää hedelmälle sopivaa kosteustasapainoa. Lisäksi kalvoja on hyödynnetty makkaroiden ja muiden lihatuotteiden päällisinä ja kuorina. (Tharanathan 2003)

Potentiaalisia biomateriaalien käyttömahdollisuuksia pakkausmateriaaleina on lueteltu seuraavassa (Tharanathan 2003):

- biohajoavia pakkausmateriaaleja
- kuluttajille jokapäiväiseen käyttöön tarkoitettuja valmisteita, kuten lautasia, kuppeja, erilaisia rasioita ja säilytysastioita, munakoteloita yms.
- biohajoavia nenäliinoja ja puhdistusliinoja, vaippoja ym.

- laminoimalla päällystämistä (esim. hedelmiä)
- pusseja maakatteeksi maanviljelykyttöön

Kalvoilla päällystämisen eri menetelmät

Biohajoavat kalvot on useimmiten valmistettu valamalla liuos sopivan materiaalin pinnalle ja kuivattamalla valmiiksi kalvoksi. Pinnan, jolle kalvot valetaan, tulisi olla sellainen, että kuivatetut kalvot saadaan irrotettua ilman että ne repeävät tai kurtistuvat. Kalvon kosteuspitoisuuden olisi hyvä olla 5–8 %, sillä silloin kalvojen irrottaminen alustasta ehjänä on helpointa. (Tharanathan 2003)

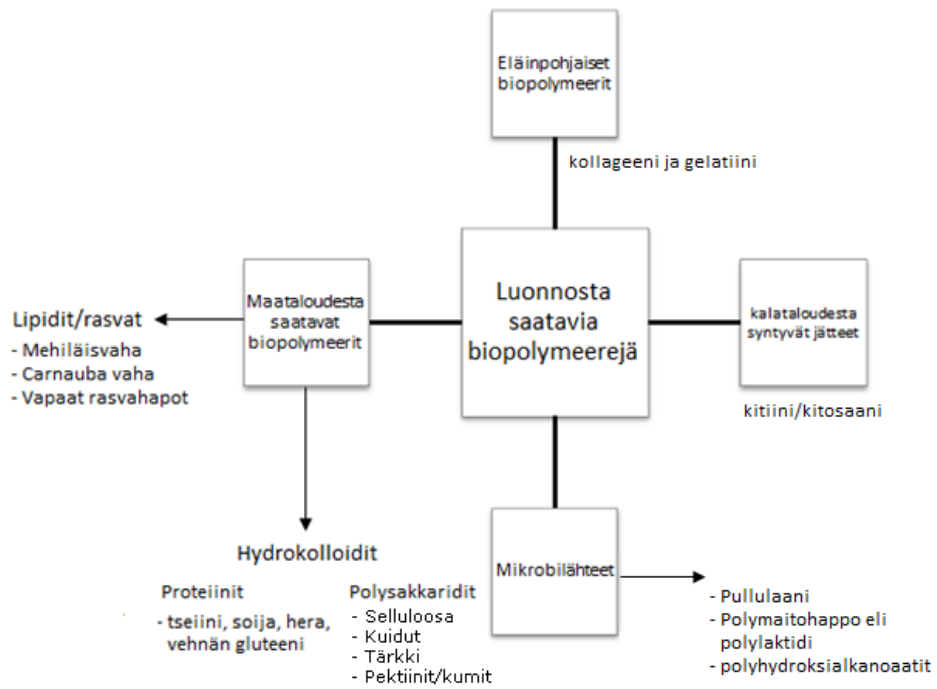
Eräs vaihtoehto kalvopinnoitteen aikaansaamiseksi, jota usein käytetään esimerkiksi hedelmien päällysteissä ja joissakin lihatuotteissa, on upottaminen. Käsiteltävä tuote upotetaan kalvopinnoitteeseen ja pinnoite kuivatetaan ilmapuhalluksen avulla. (Tharanathan 2003)

Toinen mahdollinen tapa on valmistaa pinnoitteesta vaahtoa. Tätä menetelmää sovelletaan usein emulsioita valmistettaessa. (Tharanathan 2003)

Kolmas pinnoituskeino on suihkuttaa suuttimen avulla pinnoite halutulle pinnalle. Tämä menetelmä on useimmiten käytetty, sillä näin saadaan pinnalle muodostumaan mahdollisimman tasainen kalvo. (Tharanathan 2003)

Minkälaisia biomateriaaleja kalvoissa hyödynnetään?

Esimerkkejä polysakkarideista, joita hyödynnetään kalvoissa, ovat selluloosa, amyloosi ja kitosaani. Niiden lineaarinen rakenne tekee niistä kestäviä ja joustavia, ja ne ovat lisäksi läpikuultavia. Niistä valmistetut kalvot hylkivät rasvoja ja öljyjä. Muita kalvojen valmistuksessa hyödynnettäviä biopolymeerejä on luokiteltu kuvassa 5. Biomateriaaleista valmistettujen kalvojen ominaisuuksia voidaan koettaa parantaa esimerkiksi kemiallisesti tai entsyymaattisesti aikaansaatujen ristsidosten avulla. Valmistamalla kalvoja, joissa esimerkiksi kitosaanin ja aldehydien annettaisiin muodostaa keskenään ristsidoksia, saataisiin kalvoista vielä vahvempia ja lisäksi vedenkestäviä. (Tharanathan 2003)



Kuva 5: Luonnosta saatavia biopolymeerejä kalvojen valmistukseen ja biohajoaviin pakkauksiin, jotka on valmistettu biomateriaalipohjaisista yhdisteistä. (Muokattu lähteestä Tharanathan 2003)

6 Työn tarkoitus

Tutkimus tehtiin Helsingin yliopistolla Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella, CTG eli Cereal Technology Groupissa. Työni prosessointi-ideat perustuivat Reetta Kivelän vuonna 2011 valmistuvaan väitöskirjatyöhön, jossa tutkitaan beetaglukaanin ei-entsyymaattista hajoamista ja hapettumisprosessia.

Tutkimukseni tarkoituksena oli tutustua kauran kuidun, beetaglukaanin, geelitymiseen pilkkoutumisen yhteydessä. Aiemmin tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että beetaglukaani pilkkoutuu, kun se on hydrolysoitunut eli pilkkoutunut esimerkiksi hapon tai entsyymien vaikutuksesta. Tässä työssä oli tarkoitus pilkkoa beetaglukaania erilaisin menetelmin ja tarkastella tuloksia aiemmin tehtyjen tutkimusten valossa. Lisäksi haluttiin selvittää, onko esimerkiksi reaktioajalla tai käytetyllä liuottimella vaikutusta geelitymiseen ja geelin ominaisuuksiin. Haluttiin myös hankkia tietoa beetaglukaanin eristämisestä erilaisista utteista ja luoda rutiinomainen geelienvalmistuksen menetelmä laboratorioon.

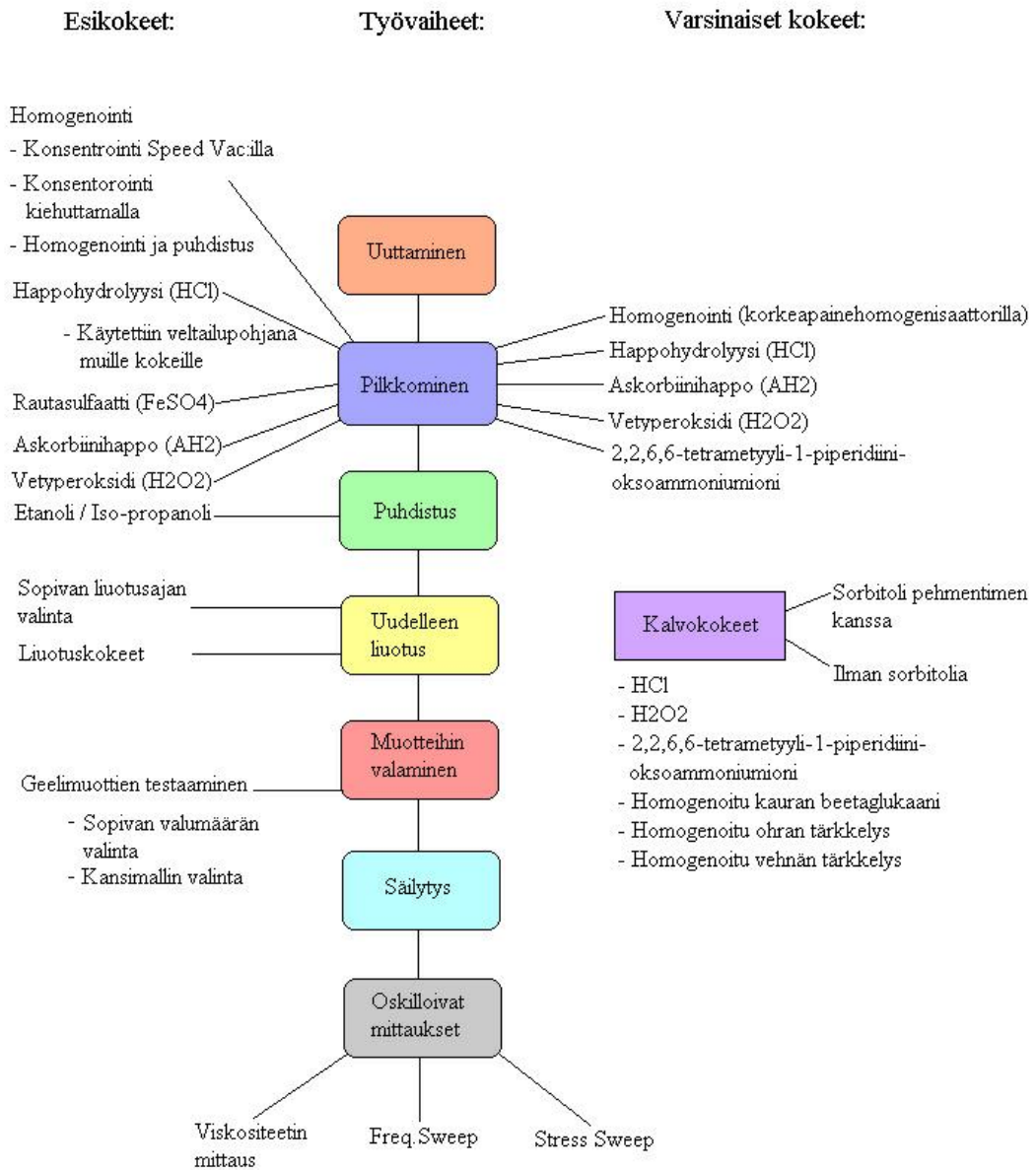
Geelikokeiden ohessa perehdyttiin polysakkaridipohjaisten kalvojen valmistukseen ja tehtiin alustavia kalvokokeita eri pilkkomismenetelmin käsitelystä kauran beetaglukaanista ja lisäksi vehnän ja ohran tärkkelyksestä.

7 Työvaiheet

Pohjana tehdyssä töissä oli Toshin ym. happohydrolyysiä käsittelevä artikkeli "Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolyzed oat β -glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis method". Artikkelissa kerrottiin muun muassa beetaglukaanin pilkkoutumisesta happohydrolyysin avulla ja molekyylipainon vaikutuksesta geeliytymisominaisuuksiin.

Artikkelissa julkaistut tutkimustulokset olivat varsin lupaavan oloisia. Tutkimusryhmä oli onnistunut muodostamaan geelejä. Pilkkomisvaiheessa saatu geeliytymisen kannalta parhaimmalta vaikuttanut molekyylipaino oli artikkelin mukaan 150 000 g/mol. Koska tutkimusryhmä sai happohydrolyysin avulla aikaan lupaavan oloisia geelejä, päätettiin happohydrolyysi ja sen avulla aikaansaadut geelit ottaa vertailukohteeksi omista tutkimuksistani.

Esikokeiden tarkoituksena oli selvittää, millä eri menetelmillä beetaglukaania saataisiin muokattua parhaiten geelien ja kalvojen valmistusta varten. Jatkotutkimuksia tehtiin aiempien beetaglukaanin eri pilkkoutumismenetelmiin liittyvien artikkelien pohjalta. Tutkimuksen eri vaiheet on esitetty tiivistetysti kuvassa 6.



Kuva 6: Esikokeiden ja varsinaisten kokeiden työvaiheet.

8 Materiaalit ja menetelmät

8.1 Uttaminen

Materiaalit:

- Kauralese (OatWell® 22%, CreaNutrition AG, Sveitsi) (proteiinia 19–22 %, β-glukaania 21–23 %) tai kauralese (14 %, homogenointia varten)
- Milli-Q-vesi

Välineet ja laitteistot:

- Sentifuugi (Eppendorf - 5810-R Centrifuge)
- Sentrifuugi (RC-5C, Sorvall®, Du Pont company, Yhdysvallat)

Työvaiheet lähtivät liikkeelle uutosta, jossa sekoitettiin oat extract 22-prosenttista jauhetta veteen. Uutetta fuugattiin useaan kertaan, jotta betaglukaaniuute ja sakka saataisiin erotettua toisistaan.

8.2 Pilkkomiskäsittelyt

Materiaalit:

- Milli-Q-vesi
- Kauran kuidusta uutettu beetaglukaani
- Happohydrolyysiin
 - 0,1 M suolahappo
 - 4 M NaOH
- Askorbiinihappokäsittelyyn
 - 0,01 M askorbiinihappo
- Rautasulfaattikäsittelyyn
 - 0,001 M rautasulfaatti
- Vetyperoksidikäsittelyyn
 - 100 μ M- 10000 μ M vetyperoksidia (+ 0,1 M rautasulfaattia osaan näytteistä)

Välineet ja laitteistot:

- STERIS Finn Aqua -autoklaavi
- Ultra Turrax ® T 25 Basic -homogenisaattori
- Mikrofluidics 110Y -korkeapainehomogenisaattori
- Speed Vac -vakuumikonsentraattori
- Roto Shake Geniel -magneettisekoittaja
- Viskosimetri (ThermoHaake Rheostress 600, Thermo Electron GmbH, Saksa)

Uutteen valmistuksen jälkeen beetaglukaania lähdettiin pilkkomaan eri menetelmin. Esikoevaiheessa pilkkomiskäsittelyksi valittiin askorbiinihappokäsittely, rautasulfaatti-

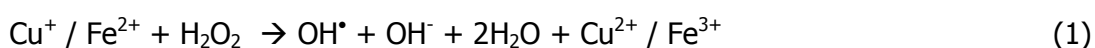
käsittely ja happohydrolyysi. Esikokeissa käytetty näytemäärä oli 10 ml uutetta käsitte- lyä kohden. Helsingin Yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen Vilja-ryhmä oli aiemmissa tutkimuksissaan todennut askorbiinihappokäsittelyn pilkkovan beetaglu- kaanin rakennetta hapettamalla. (Kivelä ym. 2009b) Kokeissa oli käytetty rautasulfaat- tia katalyyttinä, ja niinpä rautasulfaatti otettiin mukaan yhdeksi esikoevaiheen käsitte- lyksi. Myöhemmässä vaiheessa pilkkomista tehtiin lisäksi hapettamalla vetyperoksidilla ja homogenoimalla uutetta korkeapainehomogenisaattorilla.

Beetaglukaanin hydrolyysi hapon avulla vaatii toimiakseen erittäin alhaisen pH:n (1-2) ja korkean lämpötilan (70 °C). Suorittamissani tutkimuksissa beetaglukaanin happohyd- rolyysi saatiin aikaan suolahapon avulla. Reaktio tapahtui kuumassa vesihauteessa, ja se keskeytettiin lopuksi natriumhydroksidilla neutraloimalla. (Johansson ym. 2006)

Aiemmissa tutkimuksissa askorbiinihapon avulla rautaionien läsnä ollessa oli todistettu beetaglukaanin molekyyliarakenteen pilkkoutuvan ja viskositeetin laskevan (Kivelä ym. 2009a). Tässä insinööriyössä oli tarkoitus selvittää, saataisiinko askorbiinihapolla hape- tettu beetaglukaani muodostamaan geelejä.

Aiemmissa askorbiinihapolla suoritetuissa tutkimuksissa oli lisäksi käytetty katalyyttinä rautasulfaattia. (Kivelä ym. 2009a). Tutkimuksia oli tehty myös käyttämällä pelkkää rautasulfaattia beetaglukaanin pilkkomiseen, ja näin oli saatu uutteen viskositeetti las- kemaan jopa 50 %:iin alkuperäisestä (Kivelä ym. 2009b). Esikokeissa rautasulfaatti päätettiin ottaa omaksi itsenäiseksi tutkimusvaihtoehtokseen, jolloin haluttiin selvittää, saataisiinko rautaionien avulla pilkotusta beetaglukaanista muodostettua geelejä.

Vetyperoksidikäsitte- ly otettiin mukaan pilkkomiskäsittelyynä Fryn ym. vuonna 2002 jul- kaiseman artikkelin "A proposed role for copper ions in cell wall loosening" perusteella. Artikkelissa kerrotaan siitä, kuinka Fenton-reaktion (1) avulla saadaan vetyperoksidilla muodostettua hydroksyyli- radikaaleja, jotka mahdollisesti saavat aikaan polysakkaridien seinämien pilkkoutumista ja sitä kautta soluseinämien heikkenemistä. Katalyyttinä re- aktiossa toimivat joko kupari- tai rautaionit. (Fry ym. 2002)



Homogenointikäsitteilyn aikana uutetta homogenoitiin korkeapainehomogenisaattorilla 1000 baarin paineella noin viiden minuutin ajan, jotta molekyylipaino saatiin laskemaan riittävästi. Tarvittaessa uutetta esihomogenoitiin Ultra Thurrax -laitteella.

8.3 Puhdistus

Materiaalit:

- Pilkkottu uute
- 96 % etanoli
- 99 % etanoli

Välineet ja laitteistot:

- Sentrifuugi (RC-5C, Sorvall®, Du Pont company, Yhdysvallat)
- Lämpökaappi

Pilkotuille näytteille tehtiin seuraavassa vaiheessa puhdistus. Puhdistuksessa liuoksia käsiteltiin vahvoilla etanoliliuoksilla, jolloin beetaglukaani saatiin sakkautumaan ja tarpeettomat kauran rakenneosat saatiin liukenemaan etanoliin. Tarkoituksena puhdistuksessa oli saada mahdollisimman paljon pelkkää beetaglukaania sisältävä näyte, joka olisi puhdas muista aineista.

8.4 Uudelleenliuotus

Materiaalit:

- 99 % etanoli
- Milli-Q-vesi

Välineet ja laitteistot:

- Vesihaude (80 °C)
- Sentrifuugi (Eppendorf - 5810-R Centrifuge)

Uudelleenliuotusvaiheessa kuivatut näytteet saatiin uudestaan liukoiseen muotoon etanoliin ja veteen liuottamalla kuumassa vedessä sekoittaen.

8.5 Geelimuottien valaminen

Materiaalit:

- Uudelleenliuotetut näytteet

Välineet ja laitteistot:

- Geelimuotit

Uudelleenliuotetuista näytteistä valettiin muotit, jotka laitettiin kylmäkaappiin geelitymään 5 celsiusasteeseen.

8.6 Mittaukset

Materiaalit:

- Viskosimetri (ThermoHaake Rheostress 600, Thermo Electron GmbH, Germany)

Välineet ja laitteistot:

- Geelityneet näytteet
tai viskositeettimittaukseen menevät näytteet

Viskosimetrillä mittaamalla tutkittiin geelitymisen onnistumista ja lisäksi saatiin viskositeettimittausten avulla testattua pilkkomiskäsittelyjen tehokkuutta.

Esikoevaiheen viskositeettikokeissa mitattiin rheometrillä uutteen viskositeettia. Tällöin selvitettiin, kuinka hyvin eri pilkkomiskäsittelyissä saatiin pudotettua käsiteltävän uutteen viskositeettia. Viskositeetin laskeminen kertoi molekyylien pilkkoutuneen käsittelyn seurauksena. Vertailuarvona käytettiin happohydrolyysikäsittelyn aikana mitattua viskositeettia, sillä happohydrolyysikäsittelyn tiedettiin aiemmin saatujen tulosten ja aiempien tutkimusten perusteella toimivan geelikokeissa hyvin.

Esikoevaiheessa tehtiin lisäksi liuotuskokeita homogeenointi- ja suolahappokäsitellyille näytteille. Niiden tarkoituksena oli selvittää, kuinka hyvin puhdistetut ja kuivatut jauheet liukenevat uudelleenliuotettaessa ja kuinka suuri osa jää liukenematta.

9 Esikokeet

9.1 Beetaglukaaniuutteen valmistaminen

Esikoevaiheessa uutetta valmistettiin yhteensä 900 ml, ja fuugausten jälkeen saatiin noin 550 ml valmista uutetta.

Ensimmäiseksi fuugiputkissa olevaa uutetta sekoitettiin ravistelijassa 37 °C:n lämpötilassa nopeudella 300 kierrosta minuutissa (rounds per minute, rpm) 20 minuutin ajan. Tämän jälkeen putket siirrettiin sentrifugiin (Eppendorf - Centrifuge 5810R), jossa liuos sentrifugoitiin 19 celsiusasteessa kierrosnopeudella 10000 rpm 10 minuutin ajan.

Sentrifugoinnissa saatiin erottumaan toisistaan vesiliukoinen beetaglukaaniuute ja sakka. Sakka sisälsi kokeissa tarpeettomia kauran rakenneosia, kuten proteiinia. Beetaglukaaniuute otettiin talteen jatkokäsittelyjä varten. Seuraavaksi uutetta kuumennettiin 80-celsiusasteisessa vesihauteessa 15 minuuttia, jotta uutteen proteiinit saatiin denaturoitumaan.

Haudutuksen jälkeen uutetta sentrifugoitiin jälleen (Sorvall Instruments RC5C) 19 celsiusasteessa kierrosnopeudella 10000 rpm 10 minuutin ajan. Sentrifugoiduista näytteistä poistettiin sakka ja beetaglukaani otettiin talteen mittapulloon. Mittapulloa uutteen säilytettiin kylmässä 5 °C:n lämpötilassa.

9.2 Uutteen pilkkominen

Happohydrolyysi

Esikoevaiheen happohydrolyysikäsitteily tehtiin sekoittamalla 0,1 M suolahappoa beeta-glukaanuuutteeseen. Näytteitä tehtiin kolme fuugiputkellista. Näytteet sekoitettiin huolellisesti ja laitettiin 70-celsiusasteiseen vesihauteeseen. Yhden näytteistä annettiin vaikuttaa hauteessa 30 minuutin, toisen 60 minuutin ja kolmannen 120 minuutin ajan välillä sekoittaen. Lämpökäsittelyn jälkeen näytteiden pH:t säädettiin välille 6-7, 4 M NaOH:lla.

Askorbiinihappokäsittely

0,01 M askorbiinihappoa lisättiin kahteen uutetta sisältävään fuugiputkeen. Näytteitä sekoitettiin ja niiden annettiin seistä huoneenlämmössä. Toinen näytteistä sai vaikuttaa viiden tunnin ajan ja toinen sai vaikuttaa yön yli eli noin 20 tunnin ajan.

Rautasulfaattikäsitteily

Beetaglukaanuuutteesta tehtiin kolme näytettä joihin kuhunkin lisättiin 0,001 M rautasulfaattia. Putket sekoitettiin koeputkisekoittajalla ja autoklavoitiin (STERIS Finn Aqua - autoklaavissa) tämän jälkeen 120 celsiusasteessa. Autoklavoinnin alussa oli 5 minuutin esilämmitys, sitten 30 minuutin autoklavointi ja lopuksi vielä 15 minuutin jäähdytys. Autoklavoinnin jälkeen näytteen viskositeetti oli laskenut, eli molekyylit olivat pilkkoutuneet.

9.3 Pilkotun uutteen puhdistus

Näytteiden päälle kaadettiin ensin 96-prosenttista etanolia kaksinkertainen määrä näytteeseen verrattuna. Tämän jälkeen näytteitä ravisteltiin voimakkaasti, ja ne laitettiin sentrifugiin. Näytteitä sentrifugoitiin 2 minuutin ajan 2 celsiusasteen lämpötilassa kierrosnopeudella 800 rpm. Sentrifugoinnin jälkeen sakka erotettiin jatkokäsittelyyn. Käsitteily toistettiin lisäämällä tällä kertaa näytteiden päälle näytemäärään verrattuna reilun puolet 99-prosenttista etanolia. Putket sentrifugoitiin uudelleen ja sakka otettiin jälleen talteen. Lopuksi sakkojen päälle kaadettiin noin kaksi kolmasosaa alkuperäisestä näy-

temäärästä 99-prosenttista etanolia, ja ne jätettiin kuivumaan lämpökaappiin 60 °C:een, jotta etanoli saatiin haihtumaan näytteistä pois.

9.4 Puhdistetun beetaglukaanijauheen uudelleenliuotus

Lämpökaapissa kuivatetut näytteet jauhettiin mahdollisimman hienojakoiseksi. Kutakin näytettä punnittiin fuugiputkiin ja kostutettiin 99-prosenttisella etanolilla. Sitten joukkoon lisättiin vettä. Putkia sekoitettiin ja näyteliuokset vietiin 80-celsiusasteiseen vesihauteeseen sekoittumaan. Näytteiden liukenemista testattiin tietyin väliajoin sentrifugoimalla näytteet. Tällöin nähtiin, paljonko jauheesta oli jäänyt liukenematta. Kun liuotus oli saatu onnistumaan riittävän hyvin, olivat liuokset valmiita muottien valamista varten.

Esikokeissa eri pilkkomismenetelmistä syntynyttä kuivattua jauhetta saatiin riittämään kuhunkin fuugiputkeen 0,05 g ja uudelleenliuotus tehtiin 5 millilitraan vettä. Puhdistuksesta saadut jauhemäärät olivat kovin pieniä, joten myöhemmissä tutkimuksissa uudemmiä päätettiin kasvattaa.

9.5 Geelimuottien valaminen

Koemuotit C-gel-jauheesta ja tärkkelyksestä

Tärkkelyksestä ja C-gel-jauheesta valmistettiin kokeissa käytettyä kauran beetaglukaaniuutetta vastaavat liuokset tärkkelys- ja C-gel-jauhetta veteen sekoittamalla. Jauheet saatiin liuotettua geelimäiseksi puuroksi kuumentamalla kattilassa. Liuoksia käytettiin geelimuottien valamisen testauksessa.

Muotit valmistettiin kiinnittämällä pyöreisiin muovikehiköihin pohja parafilmin palasesta. Parafilmiä leikattiin myös kannet muotteihin. Koemuoteissa päätettiin kokeilla kahden tyyppisiä kansimalleja: suoraan geelin pintaan tulevaa kantta ja muotin pintaan laitettavaa kantta.

Kun liuokset oli saatu valmiiksi, niistä valettiin muotteja. Valuja tehtiin eri liuosmäärillä ja eri kansimalleilla ja kahdella eri liuosmateriaalilla. Muotteihin valettiin joko 1, 2 tai 3 ml liuosta ja levitettiin tasaiseksi kerrokseksi muotin pohjalle.

Puhdistettujen näytteiden valaminen muotteihin

Jokaisesta uudelleenliuotetusta näytteestä valettiin 2 ml:n muotit ja valetut muotit jätettiin 5 °C:n lämpötilaan geelitymään usean päivän ajaksi.

9.6 Homogenointi- ja iso-propanolikokeet

Homogenointi

Uuttovaiheessa valmistetusta uutteesta otettiin noin 100 ml liuosta homogenointia varten. Uutteen homogenointi tapahtui korkeapainehomogenisaattorilla (Microfluidics M-110Y Microfluidizer®). Esikokeissa homogenointia varten uutetta laimennettiin 1/3:aan alkuperäisestä, jottei homogenisaattori tukkeutuisi. Homogenointi suoritettiin 1000 bar paineella viiden minuutin ajan.

Homogenoitua liuosta yritettiin konsentroida geelimuottien valamista varten keittolevyllä kuumentamalla ja vaihtoehtoisesti Speed Vac -laitteen avulla haihduttamalla 60 °C:n lämpötilassa. Keittolevyllä näytemäärä saatiin konsentroitumaan noin 7 %:iin alkuperäisestä ja Speed Vacilla noin 12 %:iin alkuperäisestä. Konsentroiduista näytteistä valettiin muotit.

Puhdistus 2-propanolilla

Etanolin sijasta päätettiin kokeilla 2-propanolin toimivuutta beetaglukaanin puhdistuksessa. Testit tehtiin 10 ml:lla homogenoitua β -glukaaniuutetta ja 10 ml:lla alkuperäistä β -glukaaniuutetta. Puhdistus suoritettiin kuten aiemmissakin kokeissa, mutta viimeisessä puhdistuksen vaiheessa etanoli korvattiin 2-propanolilla. Homogenoidun kaurauutteen kohdalla viimeisessä vaiheessa sakka jaettiin kahteen osaan, joista toinen jätettiin kuivumaan lämpökaappiin 2-propanoliliuottimen ja toinen etanolin kanssa. Näin saatiin vertailtua eri liuottimien toimivuutta.

Uudelleenliuotuksessa 2-propanolinäytteissä käytettiin liuottimena jälleen propanolia. Jauheita punnittiin 0,05 g. Liuottimella kostutuksen jälkeen lisättiin 5 ml milli-Q-vettä ja näytteet laitettiin 80-celsiusaiseeseen vesihauteeseen liukenemaan muutamaksi tunniksi. Näytteitä sekoitettiin samalla magneettisekoittajalla. Liuotuksen jälkeen näytteistä valettiin 2 ml:n muotit, jotka jätettiin kylmäkaappiin 5 °C:een geelytymään useaksi päiväksi.

9.7 Liuotuskokeet

Liuotuskokeita varten tehtiin 22 prosenttia beetaglukaania sisältävästä kauraleseestä uutetta happohydrolyysiä varten ja 14 prosenttia beetaglukaania sisältävästä kauraleseestä uutetta homogenointia varten.

9.7.1 Happohydrolyysi

Happohydrolyysiä varten uutetta valmistettiin noin litra. Pilkkomista varten valmistettiin utteesta neljä 100 ml:n näytettä, joihin lisättiin 4 ml HCl:a. Näytteiden annettiin seistä lämpöhauteessa 60 min, minkä jälkeen pH säädettiin 7:ään. Tämän jälkeen näytteet puhdistettiin etanolilla ja sentrifugoimalla aiempien kokeiden tapaan, ja jätettiin kuivumaan lämpökaappiin.

Uudelleenliuotukseen valmistettiin kahdeksan näytettä, neljä varsinaista näytettä ja neljä rinnakkaista. Näytteet olivat erivahvuisia: tehtiin 3 %:n, 5 %:n, 7 %:n ja 10 %:n näytteet. Uudelleenliuotus tapahtui 90 °C:n lämpöhauteessa sekoittamalla kuuden tunnin ajan ja lisäksi sekoittamalla näytteitä Roto Shake Geniel -magneettisekoittajalla yön yli. Seuraavana päivänä sakka poistettiin fuugaamalla ja liuennesta osasta valettiin muotit. Liukenematon sakka kuivattiin ja punnittiin, jotta saatiin selvitettyä liukoisuus.

9.7.2 Homogenointi

Homogenointia varten valmistettiin noin 2,5 l uutetta. Homogenisaattori tukkeutui käsittelyn aikana, jolloin osa utteesta valui hukkaan. Lisäksi käsittelyaika oli epämääräinen, sillä uute jouduttiin kierrättämään uudelleen homogenisaattorissa. Seuraavalla

kerralla päätettiin käyttää Ultra Thurrax -laitetta uutteen hienontamiseen ennen homogenointia.

Homogenoitu uute puhdistettiin etanolisakkauksen ja fuugauksen avulla, kuten aiemmissa kokeissa ja kuivattiin lopuksi lämpökaapissa. Uudelleenliuotuksessa valmistettiin neljä 5-prosenttista liuosta, joita liuotettiin lämpöhauteessa 6 h ajan ja lisäksi sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli magneettisekoittajalla.

Seuraavana päivänä sakka poistettiin fuugaamalla ja liuenneesta osasta valettiin muotit, aivan kuten happohydrolysoiduille näytteille oli tehty. Liukenematon sakka kuivattiin ja punnittiin liukoisuuden määrittystä varten.

9.8 Viskositeettikokeet

9.8.1 Alustavat viskositeettikokeet

Viskositeetit mitattiin kahteen kertaan fuugatusta 14-prosenttisesta beetaglukaaniuutteesta sekä homogenoidusta käsittelemättömästä beetaglukaaniuutteesta. Lisäksi viskositeetti mitattiin HCl-kokeita varten valmistetusta 22-prosenttisestä beetaglukaaniuutteesta ja 60 min HCl-käsittelyn jälkeisistä uutteista. HCl-käsitellyillä uutteilla viskositeetteja tulkittaessa verrattiin lisäksi pH:n vaikutusta viskositeettiin. Toinen näyte oli käsitelty pH:ssa 6,2 ja toinen pH:ssa 7,56. pH:ssa 6,2 viskositeetti saatiin laskemaan 8,94 mPas:iin, ja tätä arvoa päätettiin käyttää tavoitearvona tulevilla mittauksilla.

Viskositeettikokeiden yhtenä osana tutkittiin myös puhdistettujen uutteen viskositeetin muutoksia askorbiinihappokäsittelyn ja vetyperoksidikäsittelyn aikana. Nämä mittaukset suoritettiin jatkuvana mittauksena rheometrillä.

Askorbiinihapolla uutetta käsiteltiin viskositeettia mitattaessa kahden tunnin ajan. Olosuhteet olivat samat kuin happohydrolyysimittauksessa, eli uutteeeseen lisättiin vastaava määrä vettä kuin happohydrolyysissä lisättiin suolahappoa.

Vetyperoksidilla käsiteltäessä uutteeeseen lisättiin ensimmäisellä kerralla pitoisuudella 100 μ M vetyperoksidia (5 μ l / 14 ml uutetta). Toisella kerralla päätettiin lisätä vetyper-

oksidin määrää. Uutteeseen lisättiin ensin 6 μl vetyperoksidia ja tarkkailtiin viskositeetin laskua ja sitten kokeiltiin vielä 1 μl :n lisäystä.

9.8.2 Varsinaiset viskositeettikokeet

Viskositeetin muutoksia eri käsittelyin lähdettiin tutkimaan tarkemmin. Tarkkailtiin vetyperoksidilisäyksen vaikutusta ja lisäksi uusittiin askorbiinihappokoe ja HCl-käsittely. Tavoitearvona käytettiin HCl-käsittelyllä aiemmin saatua viskositeetin arvoa 8,94 mPas (mittauspisteessä 50 1/s).

Askorbiinihappokäsittely uutelle toistettiin ja tuolloin käsittelyaikaa kokeiltiin kasvat-
taa aiemmasta kahdesta tunnista, jotta viskositeetti saataisiin laskemaan lähelle hap-
pohydrolyysikäsitelyllä saavutettua arvoa. Tällä kerralla käsittelyaika oli 3 h 40 min.
Askorbiinihappokäsittelyn vaikutusta tutkittiin mittaamalla viskositeetit ajanhetkillä: 0
min, 1 h, 2 h, 2h 35 min, 3 h sekä 3 h 40 min kuluttua käsittelyn aloituksesta.

Vetyperoksidikokeissa 200 ml:aan uutetta lisättiin vetyperoksidia. Näytteisiin lisättiin
vetyperoksidia eri pitoisuuksina. Osaan 100 μM :n ja 1000 μM :n näytteistä lisättiin
myös rautasulfaattia katalyytiksi. Vetyperoksidia lisättiin siten, että näytteiden vetyper-
oksidipitoisuudet olivat seuraavanlaisia:

200 ml uutetta +

100 μM vetyperoksidia

100 μM vetyperoksidia + 0,1 M rautasulfaattia 2 ml

1000 μM vetyperoksidia

1000 μM vetyperoksidia + 0,1 M rautasulfaattia 2 ml

10000 μM vetyperoksidia

Viskositeettimittaukset otettiin ajanhetkillä 0 min, 30 min, 60 min, 90 min ja 120 min.
Happohydrolyysikäsitelyn aikana viskositeetit mitattiin 0 min, 30 min ja 60 min jäl-
keen.

9.9 Uudet geelikokeet

Geelikokeita jatkettiin esikoevaiheessa onnistuneiden käsittelyjen osalta. Uusilla geelikokeilla haluttiin saada varmuus aiempien kokeiden tulosten oikeellisuudesta. Valmiiksi puhdistetuille ja kuivatuille jauheille tehtiin uudelleenliuotuksia. Osassa liuotuksista käytettiin sukki-naattipuskuria (100 μ M) veden sijasta ja iso-propanolia liuotinaaineena etanolin sijaan. Homogenoitua uutetta ja siitä puhdistettua jauhetta valmistettiin lisää geelikokeita varten.

Käsittelyt

Homogenoiduista jauheista valmistettiin 7- ja 8-prosenttisia liuoksia. Näytteet tehtiin rinnakkaisina. Liuotus tapahtui joko veteen tai sukki-naattipuskuriin. Etanolin sijasta yksi näyte tehtiin 2-propanolilla. Näytteitä liuotettiin kuumassa yön yli ja huoneenlämmössä seuraava päivä ennen valamista muottiin. Poikkeuksena tehtiin yksi näyte, joka valettiin suoraan rheometrin mittausalustalle, ja toinen, josta muotti valettiin samana päivänä kuin liuotus tehtiin.

Happohydrolysoiduista jauheista tehtiin myös rinnakkaiset näytteet sekä vesi- että sukki-naattipuskurilla. Happohydrolyysikokeissa tehtiin 8-prosenttisia liuoksia. Näytteitä liuotettiin kuumassa yön yli ja huoneenlämmössä seuraava päivä ennen valamista.

Askorbiinihappokäsittelystä jauheesta tehtiin samaan tapaan uudelleen liuotus sukki-naattipuskuriin ja veteen. Liuokset olivat 8-prosenttisia, ja niistä tehtiin rinnakkaiset näytteet. Näytteitä liuotettiin myös kuumassa yön yli ja huoneenlämmössä seuraava päivä. Sukki-naattipuskuri vaikutti askorbiinihapon tapauksessa toimivan vettä parempana liuottimena uudelleenliuotusvaiheessa.

10 Esikokeiden tulokset

10.1 Happohydrolysoidut näytteet

HCl-näytteistä oli tehty muotit, joissa uutetta oli käsitelty eri aikoja (30, 60 ja 120 min). Ainoastaan 30 min ja 60 min vaikutusajan näytteet muodostivat geelin. Esikokeiden seurauksena todettiin 60 minuutin vaikutusajan olleen vaihtoehtoista sopivin. Nämä näytteet olivat geelityneet muita paremmin. 60 minuutin näytteistä tehtiin vielä onnistuneet toistokokeet. Niinpä jatkotutkimuksia päätettiin suorittaa 60 minuutin vaikutusajalla.

10.2 Rautasulfaattikäsittely

FeSO₄:lla saatiin uutteen viskositeetti laskemaan, mutta valetut muotit eivät geelityneet laisinkaan. Niinpä FeSO₄ sellaisenaan päätettiin jättää pois jatkotutkimuksista. Sen yhteisvaikutusta vetyperoksidin kanssa kuitenkin tutkittiin vielä myöhemmissä vaiheissa.

10.3 Askorbiinihappokäsittely

Askorbiinihapon tapauksessa viiden tunnin näytteen tuloksien todettiin olleen parempia kuin 20 tunnin näytteen. 20 tunnin näytteet eivät geelityneet, toisin kuin viiden tunnin näytteet. AH₂ otettiin mukaan jatkotutkimuksiin.

10.4 Geelimuottien testaus

Tärkkelyksestä ja C-Gel:stä valmistettiin 1 ml:n, 2 ml:n ja 3 ml:n näytteet muotteihin. Osaan näytteistä oli laitettu kannet (parafilmiä) kiinni näytteiden pintaan ja osaan muotin päälle.

Parhaaksi muottivaihtoehdoksi valittiin 2 ml:n näyte ja kansi muotin päällä. 1 ml:n näyte ei tahtonut irrota muotista ja 3 ml:n hajosi irrotettaessa suuremman massansa vuoksi. Kansimalleista geelin pinnalla ollut kansi päästi ilmaa sivuilta sisään, jolloin näyte kuivui. Näytemääriä vaihdeltiin vielä myöhemmissä vaiheissa tapauskohtaisesti.

10.5 Homogenointikäsitteily

Ensimmäiset homogenointikokeet eivät onnistuneet kovin hyvin. Konsentroidin sijaan päätettiin myöhemmissä kokeissa suorittaa pelkkä uutteen homogenointi korkeapaine-homogenisaattorin avulla. Tämän jälkeen homogenoidulle uutteelle suoritettiin muiden käsittelyjen tavoin puhdistus, kuivaus ja uudelleenliuotus ennen geelimuottien valamista. Näissä uusissa homogenointikokeissa uutetta ei laimennettu homogenisaattoria varten vaan homogenoitava uute valmistettiin 14 prosenttia beetaglukaania sisältävää kauraleseestä ja esikäsiteltiin Ultra Thurrax -laitteella ennen homogenointia.

10.6 Iso-propanoli

Iso-propanolinäyte oli määrältään niin vähäinen, että sitä ei kannattanut ottaa huomioon tulosten tarkastelussa. Iso-propanolia päätettiin testata uudelleen vielä myöhemmissä kokeissa.

10.7 Liuotuskokeiden tulokset

Liuotuskokeet suoritettiin happohydrolysoituilla ja homogenoiduilla uutteilla. Uutteista valmistettiin lisäksi geelimuotit. Kokeissa haluttiin liukoisuuden lisäksi selvittää oliko happohydrolysoitujen liuosten vahvuudella merkitystä liukoisuuteen uudelleen liuotettaessa eli miten suuri osa beetaglukaanista saataisiin erivahvaisilla näytteillä liukenemaan. Myös homogenoitujen näytteiden liukoisuutta selvitettiin.

10.7.1 Homogenoitu beetaglukaani

Homogenoiduista kuivatuista jauheista oli valettu neljä muottia geelejä varten, ja yhtä näytteistä tutkittiin viiden päivän jälkeen. Tällöin muotti ei ollut vielä geelinytynyt. Loput näytteet mitattiin vasta kahden viikon kuluttua valamisesta. Kaksi näytteistä oli tuolloin edelleen liuksina ja yksi oli geelinytynyt raemaisesti. Homogenoidun uutteen käyttöä päätettiin kuitenkin vielä kokeilla uudestaan, sillä ensimmäisellä homogenointikerralla uute oli kiertänyt liian kauan (15 min) korkeapainehomogenisaattorissa.

Uudelleenliuotusvaiheessa tutkittiin myös, miten hyvin kuivattu ja puhdistettu jauhe saatiin liukenemaan veteen ja etanolin kanssa. Saatiin siis selville näytteiden liukoisuus.

Tulokset ovat nähtävillä taulukossa 1. Myöhempien kokeiden perusteella homogenoituista näytteistä 3 ja 4 saadut liukoisuustulokset vaikuttivat parhaiten paikkansa pitäviltä, sillä homogenoidut jauheet liukenivat yleensä varsin hyvin uudelleenliuotettaessa.

Taulukko 1: Liuotuskokeiden tulokset

Näyte	ka ennen uud.liuot. (g)	ka liukenemat. + eppari (g)	eppari (g)	liukenematon ka (g)	Liukoisuus
Homog. 1	0,078	1,096	1,070	0,025	68 %
Homog. 2	0,075	1,113	1,089	0,025	67 %
Homog. 3	0,076	1,079	1,072	0,007	90 %
Homog. 4	0,076	1,086	1,079	0,006	92 %
HCl 60, 3% (1)	0,045	1,092	1,084	0,008	83 %
HCl 60, 3% (2)	0,046	1,085	1,077	0,008	83 %
HCl 60, 5% (1)	0,079	1,087	1,067	0,019	75 %
HCl 60, 5% (2)	0,076	1,094	1,078	0,017	78 %
HCl 60, 7 % (1)	0,105	1,123	1,078	0,045	57 %
HCl 60, 7 % (2)	0,107	1,124	1,074	0,051	52 %
HCL 60,10 % (1)	0,151	1,160	1,074	0,086	43 %
HCL 60,10 % (2)	0,153	1,168	1,084	0,084	45 %

10.7.2 Happohydrolysoitu beetaglukaani

Kuivatuista happohydrolysoinnista saaduista jauheista valmistettiin 8 erivahvuista näytettä: 3 %, 5 %, 7 % ja 10 % (rinnakkaiset kustakin). Näytteistä valmistettiin geeli-muotit. Yhdet näytteet ajettiin 5 päivän geeliytymisajan jälkeen rheometrillä. 3-prosenttinen näyte oli vielä melko liuosmainen, 5-prosenttisessä oli jo selviä geeliytymisen merkkejä ja koostumus oli tasainen, 7-prosenttinen näyte oli geeliytynyt hyvin ja 10-prosenttinen näyte oli rakeista eikä tahtonut irrota maljasta. 11 päivän kuluttua mitattiin rinnakkaiset näytteet 3 % ja 5 %. Tuolloin näytteet olivat geeliytyneet. Rinnakkaiset 7 % ja 10 % näytteet mitattiin tasan kahden viikon kuluttua valmistamisesta ja näistä saadut tulokset olivat erinomaisia. Näytteet olivat geeliytyneet selvästi. 7-prosenttinen geeli oli keräytynyt muotin keskelle ja 10-prosenttinen oli jämäkkä, lähes kuivan oloinen geeli. 7-prosenttista vahvuutta päätettiin käyttää liuosvahvuutena jatkotutkimuksissa. Liukoisuuden perusteella kuitenkin laimeammat liuosvahvuudet olivat paremmin liuenneita (taulukko 1).

10.8 Viskositeettikokeiden tulokset

10.8.1 Alustavien viskosteettikokeiden tulokset

Askorbiinihapolla saatiin viskositeetti laskemaan lineaarisesti, mutta kahden tunnin vaikutusajalla päästiin ainoastaan 212 mPas:iin. Niinpä askorbiinihappokokeet päätettiin uusia myöhemmin.

Vetyperoksidilla saatiin ristiriitaisia tuloksia. Ensimmäisessä kokeessa oli lisätty 5 μl vetyperoksidia 14 ml:aan uutetta, ja tämän tuloksena viskositeetti saatiin laskemaan 112 mPas:iin. 6 μl :n H_2O_2 -lisäyksellä 14 ml:aan beetaglukaaniuutetta viskositeetti saatiin laskemaan 14,7 mPas:iin, mutta kun lisättiin 1 μl lisää, se nousi 41,5 mPas:iin. Myös vetyperoksidin vaikutusta lähdettiin tutkimaan tarkemmin myöhemmissä kokeissa. Kaikilla käsittelyillä viskositeetti saatiin putoamaan reippaasti alkuperäisen uutteen viskositeettiin nähden.

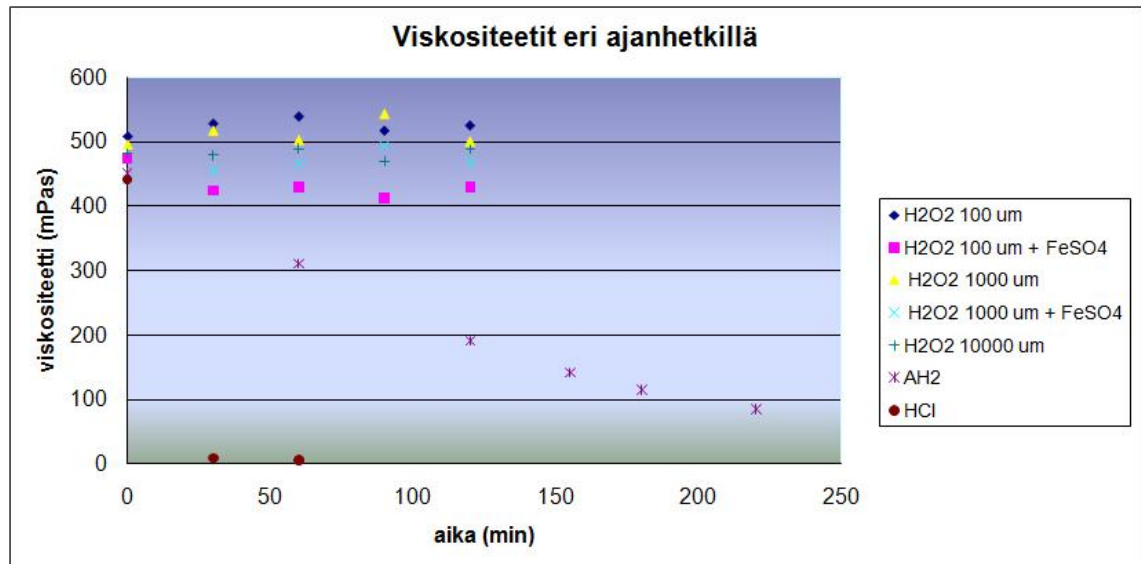
10.8.2 Varsinaisten viskositeettikokeiden tulokset

Askorbiinihapon avulla viskositeetti saatiin laskemaan arvoon 84,4 mPas (mittauspisteessä 50 1/s). Viskositeetin lasku oli askorbiinihapolla erittäin hidasta, eikä käsittelyaika ollut riittävä.

Vetyperoksidilla oli suoritettu useita kokeita sekä rautasulfaattilisäyksen kanssa että ilman. Mittauksia otettiin 30 min välein ajalla 0–120 min. Vetyperoksidin määrää lisäksi vaihdeltiin. H₂O₂-lisäykset olivat 100 µM, 1000 µM tai 10000 µM. Saadut tulokset olivat melko huonoja. Viskositeetti laski aluksi reaktioaineiden lisäyksen jälkeen jonkin verran, mutta yhdessäkään kokeessa ei päästy lähelle tavoitearvoa 8,94 mPas. Kaikki viskositeetin arvot jäivät välille 400–600 mPas (mittauspisteessä 50 1/s).

HCl-käsittelyn seurauksena viskositeetti laski tasaisesti koko käsittelyn ajan. 60 minuutin kohdalla oli jo päästy viskositeetin arvoon 5,78 mPas (mittauspisteessä 50 1/s). Tämä tulos vahvisti happohydrolysointikäsittelyllä aiemmissä tutkimuksissa saadun tuloksen paikkansapitävyyden, koska saatu arvo oli suuruusluokaltaan sama kuin aiemmin.

Saaduista tuloksista piirrettiin kuvaaja (kuva 7). Kuvaajasta voidaan päätellä, ettei vetyperoksidilla saatu viskositeettia laskemaan kuten haluttiin. Askorbiinihapolla viskositeetti laski tasaisesti ajan funktiona, mutta käsittelyaika ei ollut riittävä, jotta olisi päästy haluttuun arvoon 8,94 mPas. HCl-käsittely puolestaan toimi oletetulla tavalla ja viskositeetti saatiin laskemaan halutussa ajassa tavoitearvoon.



Kuva 7: Eri pilkkomismenetelmien vaikutus viskositeettiin.

10.9 Uusien geelikokeiden tulokset

Homogenoidut näytteet olivat mittausten perusteella muodostaneet erittäin vahvan oloisia rakenteita (kuva 8). 2-propanolia sisältänyt näyte oli geeliytynyt jo putkessa, ja sitä oli huomattavan vaikea mitata rheometrillä. Mitään varsinaista eroa ei ollut huomattavissa vesi ja sukkinäytteen välillä, sillä kaikki näytteet olivat vetäytyneet muottien keskelle tiiviiksi kasoiksi ja niissä käytetty neste (vesi tai sukkinäyte) oli erottunut. Homogenoidut näytteet vaikuttivat siis hylkivän vettä. Geelien ominaisuuksiin kuuluu hyvä vedensitomiskyky, joten ilmeisesti kyseiset hyytymät eivät olleet laisinkaan geelejä, mutta niissä oli syntynyt tiukkoja sidoksia. Kyseessä saattoi olla jokin rakenteeltaan kalvoa tai muovia muistuttava. Homogenoituja jauheita päätettiin lähteä tutkimaan vielä lisää.

Happohydrolysoidut näytteet antoivat kaikki onnistuneen käyrän rheometrillä mitatesa. Osa näytteistä oli jauhoisia ja paakkuisia, ja niitä joutui levittämään spatelin avulla rheometrin mittausalustalle. Näytteet, joissa oli käytetty vettä liuottimena, vaikuttivat ulkoisesti paremmin onnistuneilta kuin sukkinäytteen pohjaiset näytteet. Kuvassa 3 on nähtävillä esimerkki onnistuneesta happohydrolysointikäsitteilyn avulla aikaan saadusta vesipohjaisesta geelistä (kuva 3, vasen alareuna). Vesipohjaisten näytteen ulkomuoto muistutti geeliä ja mittaustulokset olivat onnistuneita. Erityisesti yksi etanolia ja vettä sisältävä näyte oli muodostanut samettimaisen geelirakenteen. Yhdessä näytteistä

oli kokeiltu käyttää liuotinauaineena 2-propanolia. Näyte ei ollut onnistunut, sillä muotti oli vielä osin liuksena ja syntyneen hyytymän joutui levittämään spaattelin avulla. Tästä ja aiemmin tehdyistä kokeiluista voitiin päätellä, että iso-propanolin käyttäminen liuotinauaineena etanolin sijaan ei tarjonnut mitään merkittävää hyötyä. Kaliumin hintansakin puolesta sitä päätettiin olla käyttämättä tulevissa tutkimuksissa.

Askorbiinihapponäytteet eivät tahtoneet millään geelityä. Osa niistä pysyikin liuksina, kuten kuvasta 8 (oik. alareunassa) nähdään, eikä niistä saatu tehtyä geelimittauksia. Kaksi näytteistä saatiin kuitenkin mitattua. Molemmat mitatuista geeleistä olivat sukkinnaattipohjaisia. Toinen mittaus tehtiin 8 päivän jälkeen valamisesta ja toinen 15 päivän jälkeen. 8 päivän näyte vaikutti hyvältä geeliltä mitatun käyrän perusteella, mutta näyte oli saattanut päästä kuivumaan muotissa ollessaan. 15 päivän jälkeinen näyte myös muodosti melko hyvän käyrän, mutta pitkän säilytysajan vuoksi mittaus ei ollut kovin luotettava.



Homogenoidusta kaura-uutteesta valetut muotit



Happohydrolysoitu vesipohjainen geeli Askorbiinihappokäsitelty geeliytymätön näyte

Kuva 8: Esimerkkejä muodostuneista geeleistä.

11 Vertailukelpoiset geelikokeet

Jotta kokeita voitaisiin verrata toisiinsa ja jotta saadut tulokset olisivat luotettavia, tuli kaikki kokeet suorittaa samalla tavoin. Tämä tarkoitti sitä, että näytemäärien ja vaikutusaikojen oli oltava samoja kaikilla näytteillä ja lisäksi oli tehtävä rinnakkaisia kokeita. Vertailua varten tehtiin muotteja eri tavoin käsitellyillä beetaglukaaniliuksilla: HCl:lla, AH_2 :lla, homogenoidulla uutteella ja lisäksi vetyperoksidilla ja 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumionilla. Muotteihin käytetty näytemäärä oli jokaisessa kokeessa 4 ml ja geeliyttämisaika oli 7 päivää.

11.1 Homogenoidut, happohydrolysoidut ja askorbiinihappokäsitellyt näytteet

Homogenoidusta, askorbiinihappokäsitelystä ja happohydrolysoidusta beetaglukaanista oli valmistettu valmiiksi suuret määrät puhdistettuja ja kuivattuja jauheita. Niistä valmistettiin geelinäytteitä uudelleenliuottamalla hienojakoiseksi jauhetuista näytteistä 7-prosenttisia liuoksia. Homogenoidut geelimuotit valettiin samana päivänä niiden nopean liukenemisen vuoksi ja muut näytteet seuraavana päivänä.

11.2 Vetyperoksidikäsitely

200 ml:aa beetaglukaaniuutetta käsiteltiin vetyperoksidilla ja rautasulfaattilla. Vetyperoksidia tuli uutteen sekaan pitoisuutena 10 mM ja rautasulfaattia 50 μ M. Pilkkomisen aikana näyteliuoksen viskositeettia tarkkailtiin. Koska pilkkoutuminen ei ollut tarpeeksi tehokasta, jouduttiin sitä jatkamaan aina seuraavaan päivään. Reaktio keskeytettiin puhdistamalla näyteliuosta etanolilla ja sentrifugoinneilla aiempaan tapaan.

Puhdistuksen jälkeen näyteliuos kuivattiin lämpökaapissa ja saadusta jauheesta valmistettiin uudelleenliuottamalla 7-prosenttiset liuokset geelimuotteja varten. Geelilyttämisaika oli 7 päivää.

11.3 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni -käsitely

2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni on TEMPO nimisen yhdisteen ja natriumhypokloriitin reagoitessa muodostuva oksoammoniumioni. 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-käsitelyssä ohjeena käytettiin de Nooyn ym. artikkelia "Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans". Toisena lähdeartikkelina käytettiin Parkin ym. artikkelia "Physicochemical and Hypocholesterolic Characterization of Oxidized Oat β -Glucan". 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-käsitely otettiin mukaan tutkimukseen, koska käsittelyllä syntyvien nitrosoniumionien avulla saadaan aikaan poikkeuksellisen stabiili hapettumisreaktio [Barriga, S. 2001]. Uusia polysakkaridiketjuja ei pilkkoutumisen jälkeen juuri pääse syntymään.

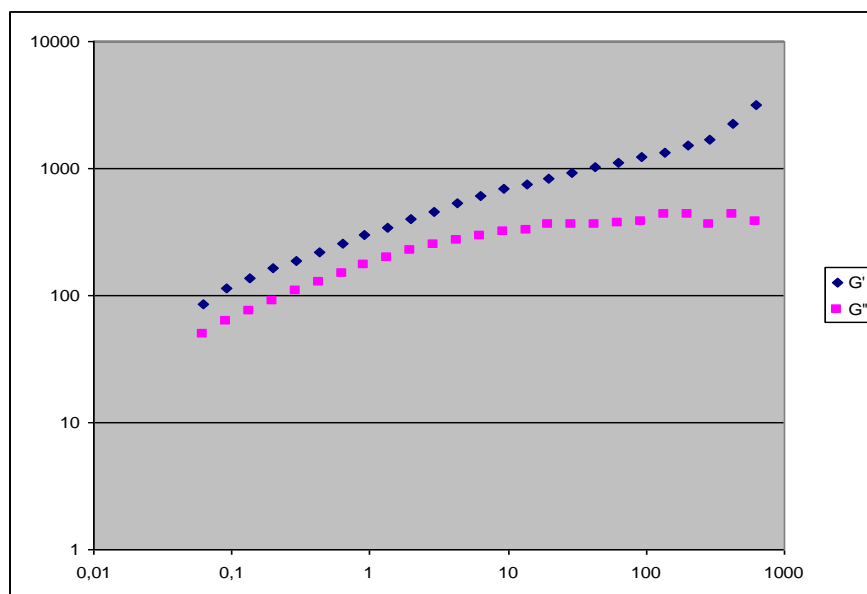
Valmistettu näytemäärä oli 200 ml. Uutteeseen lisättiin 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumionia ja natriumbromaattia. Joukkoon lisättiin vielä 10-prosenttista NaOCl:a ja tämän jälkeen liuoksen pH säädettiin 10:een HCl:lla. Liuoksen annettiin reagoida tunnin ajan 21 °C:ssa ja pH pidettiin tänä aikana 10:ssä NaOH:n avulla. Reaktio lopetettiin neutraloimalla liuos suolahapolla ja lisäämällä 10 ml 96-prosenttista etanolia.

Pilkkomisen jälkeen suoritettiin puhdistus aiempaan tapaan etanolin ja fuugausten yhdistelmällä. Puhdistetut liuokset kuivattiin lämpökaapissa ja kuivatuista jauheista valmistettiin 7-prosenttiset liuokset geelimuotteja varten. Muottien annettiin geeliytyä kylmässä 5 °C:n lämpötilassa viikon ajan.

12 Vertailukelpoisten geelikokeiden tulokset

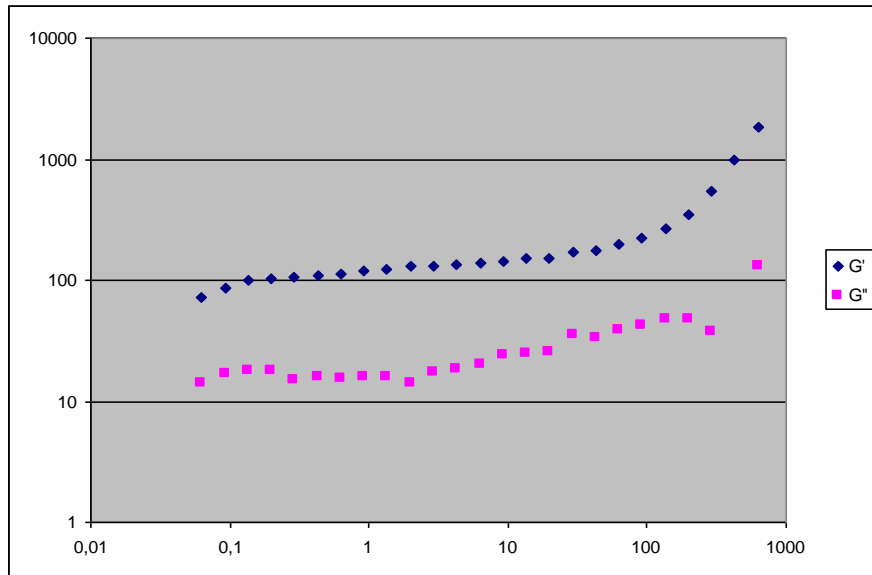
12.1 Homogenoidut näytteet

Molemmat rinnakkaiset näytteet olivat 7 päivän kuluessa muodostaneet geeliä muistuttavan rakenteen. (Kuvat 9 ja 10 sekä 11 ja 12)



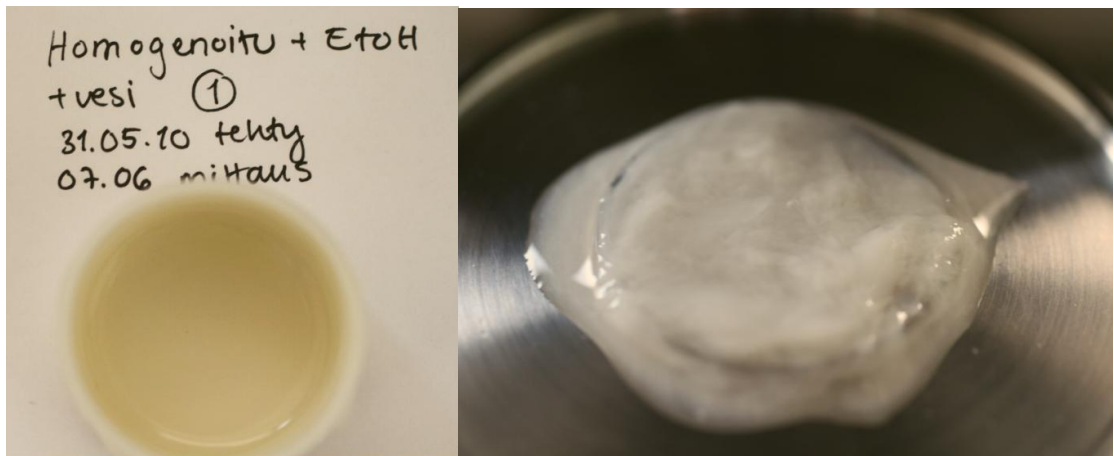
Kuva 9: Näyte 1; Homogenointi + etanoli + vesi.

Kuvan 10 käyrän perusteella geeli onnistui erittäin hyvin. Käyrä muistuttaa happohydrolysoinneista aikaansaatuja käyriä.



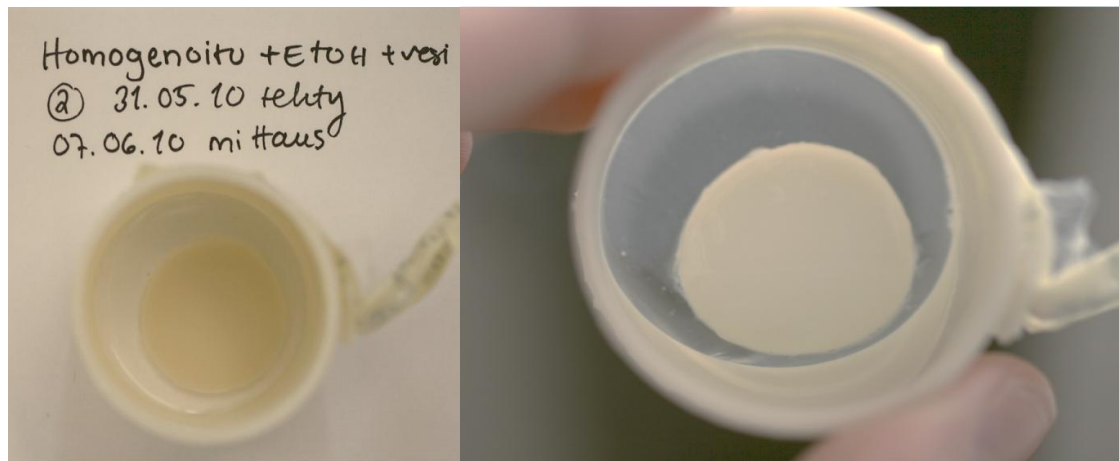
Kuva 10: Näyte 2: homogointi + etanoli + vesi.

Kuvasta 11 nähdään, että homogoinoitu 1 näyte on hieman poikkeavan näköinen 2 näytteeseen (kuva 12) verrattuna. Tyypillisesti homogoinoidut näytteet geelivät kuvan 12 tapaan vetäytymällä muotin keskelle. Näyte 1 sen sijaan on jäänyt hieman litkuiseksi ja säikeiseksi, mikä myös selittää kuvien 9 ja 10 käyrien poikkeavuudet.



Kuva 11: Homogoinimalla pilkottu kauran beeta-glukaanin, 1. rinnakkaisnäyte.

Kuvassa 12 homogoinimalla pilkottu kauran beeta-glukaanin on muodostanut vahvan oloisen rakenteen ja on vetäytynyt muotin keskelle. Lisäksi se rakenne vaikuttaa hylkivän nestettä.



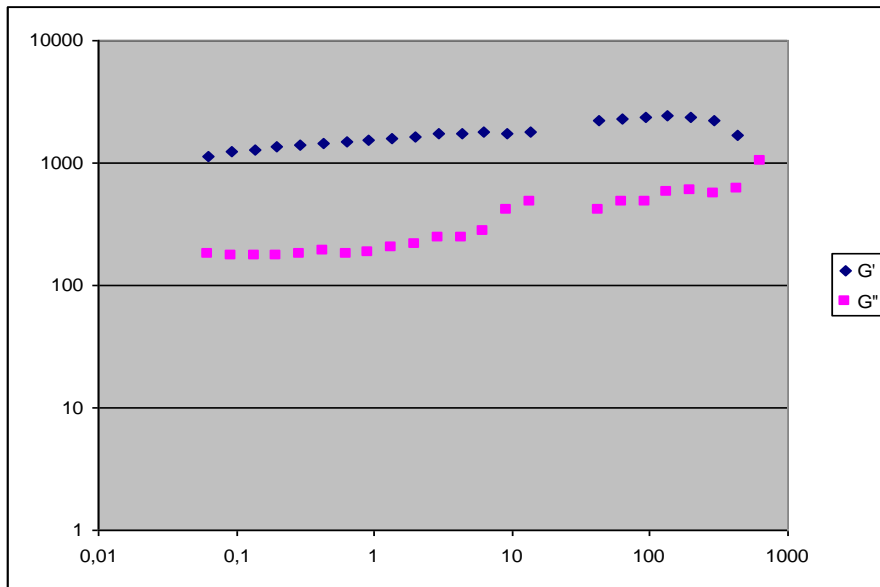
Kuva 12: Homogenoimalla pilkottu kauran beeta-glukaani, 2. rinnakkaisnäyte.

12.2 HCl-käsitellyt näytteet



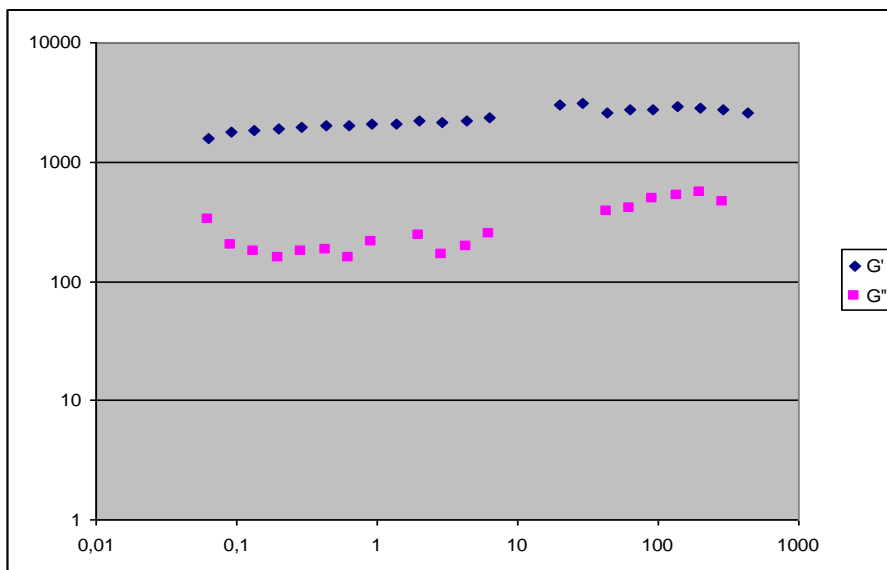
Kuva 13: Happohydrolysoimalla pilkotut kauran beeta-glukaaninäytteet (ensimmäiset kaksi kuvaa: rinnakkaisnäyte 1. Viimeinen kuva: rinnakkaisnäyte 2).

7 päivän jälkeen HCl:lla 60 minuutin ajan käsitellyt näytteet olivat muodostaneet hienon geelin. Molemmista rinnakkaisista näytteistä saadut kuvaajat muistuttivat toisiaan, kuten nähdään kuvista 14 ja 15. Muodostuneet geelit vaikuttivat onnistuneilta (kuva 13).



Kuva 14: Näyte 1; HCl 60 min + etanoli + vesi.

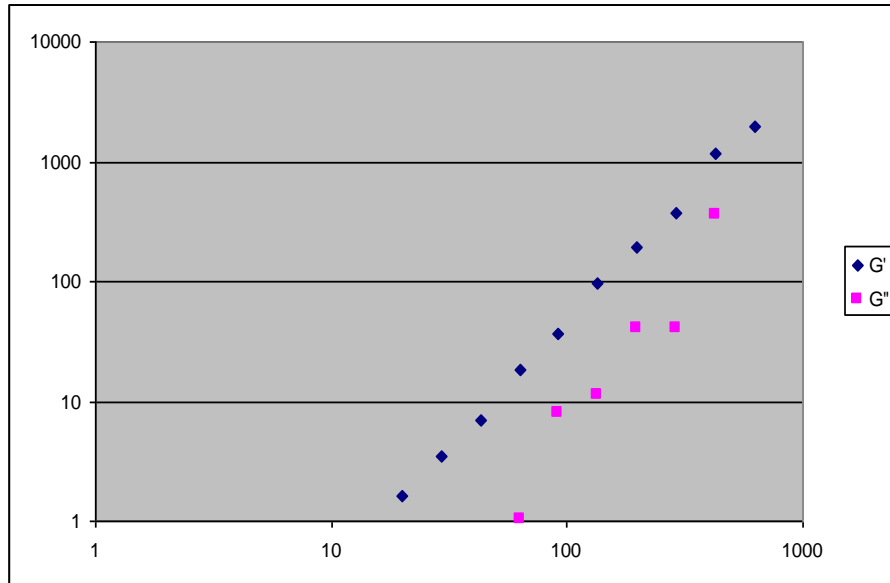
Aiemmissa tutkimuksissani sain happohydrolysoinnista vastaavan näköisiä käyriä kuin vertailukokeissa aikaansaadut kuvien 14 ja 15 käyrät. Myös muut tutkijat ovat [Tosh ym. 2004b] saaneet happohydrolysoimalla aikaan hyvänolaisia geelejä, ja nyt saadut tulokset tukevat näitä tuloksia.



Kuva 15: Näyte 2; HCl 60 min + etanoli + vesi.

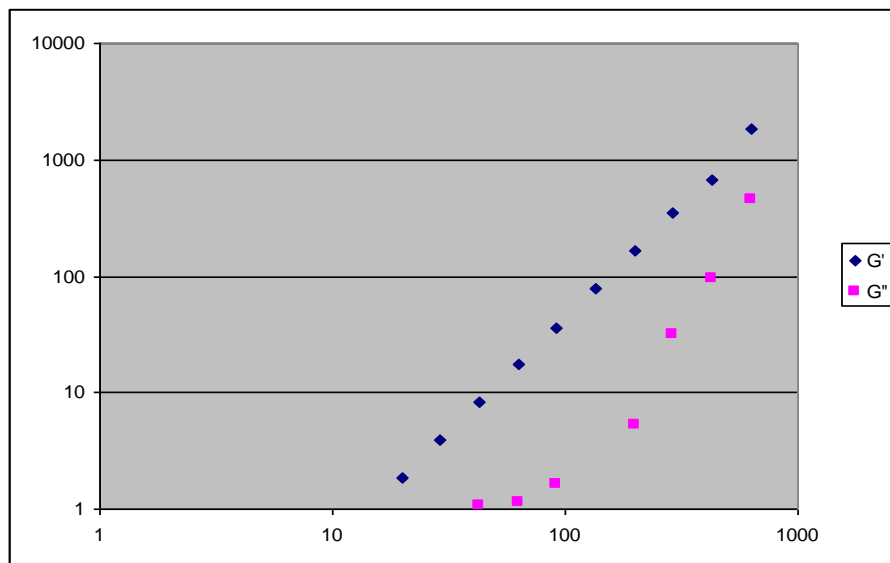
12.3 Askorbiinihappokäsittellyt näytteet

Askorbiinihappokäsittellyille näytteille 7 päivän vaikutusaika ei vaikuttanut olevan riittävä, vaan niistä jäi rakenteeltaan melko löysiä (kuvat 16, 17 sekä kuvat 18 ja 19).

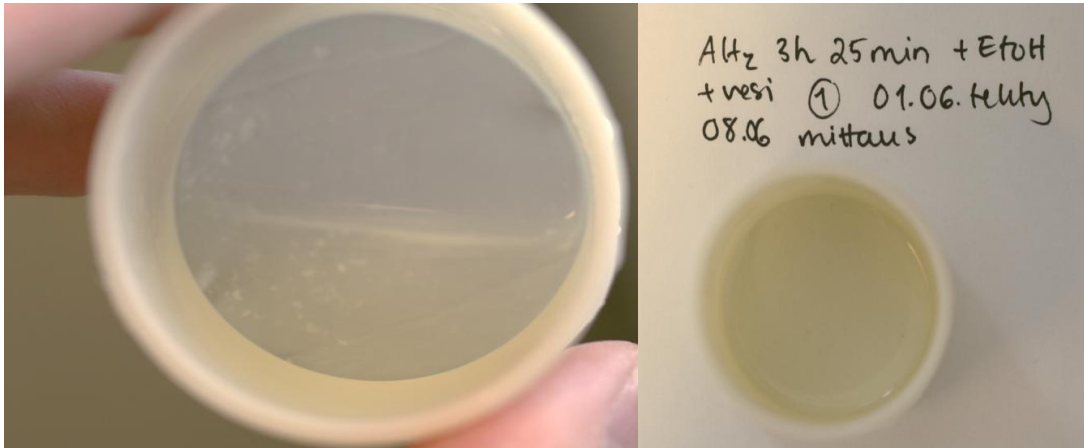


Kuva 16: Näyte 1; AH2 3 h 25 min + etanoli + vesi.

Geelimuoteissa olleet näytteet olivat niin litkuisia, ettei rheometrillä mitatessa saatu aikaan mitään varsinaista käyrää (kuvat 16 ja 17).



Kuva 17: Näyte 2; AH2 3 h 25 min + etanoli + vesi.



Kuva 18: Askorbiinihapolla pilkottu beetaglukaani, 1. rinnakaisnäyte.

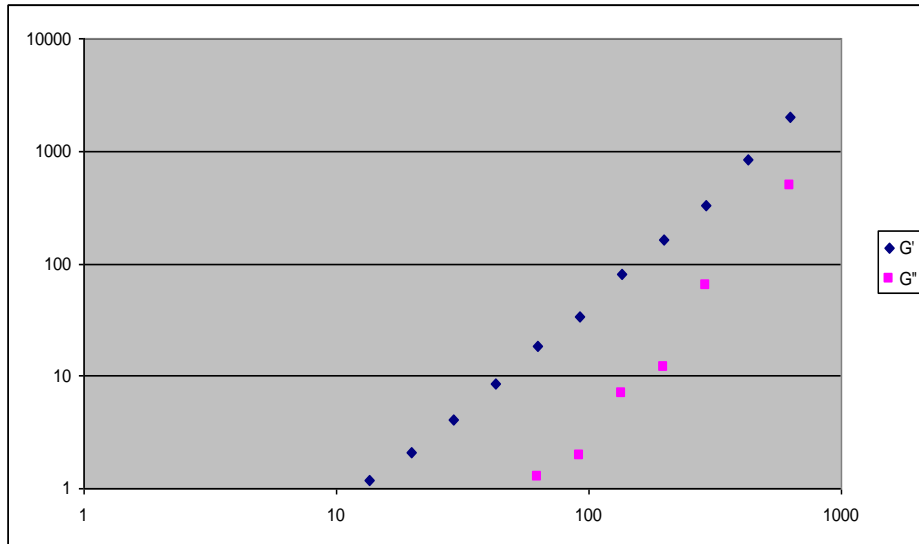
Kuvissa 18 ja 19 molempien rinnakkaisten näytteiden geelimuottien pohjalle on muodostunut hieman hyytymää, mutta mitään varsinaista geeliytymistä ei ole tapahtunut, kuten kuvien 16 ja 17 käyrät osoittavat.



Kuva 19: Askorbiinihapolla pilkottu beetaglukaani, 2. rinnakaisnäyte.

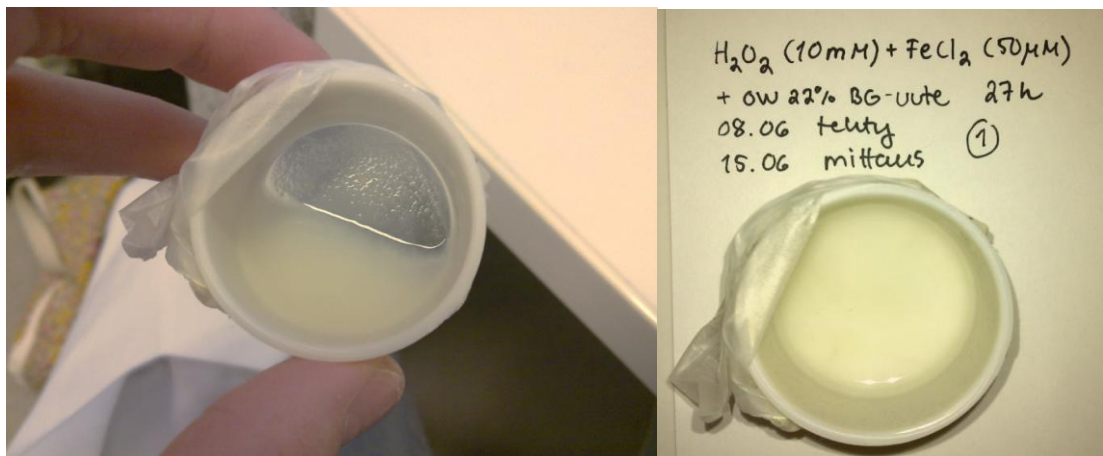
12.4 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni- ja H_2O_2 -käsittellyt näytteet

2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni- ja vetyperoksidinäytteet olivat molemmat 7 päivän jälkeen aivan litkuisia. Niistä ei saanut hyviä tuloksia rheometrillä (kuvat 20–23). 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni- ja vetyperoksidikäsitellyt olivat liian voimakkaita ja rikkoivat beetaglukaenin rakenteen palautumattomasti.



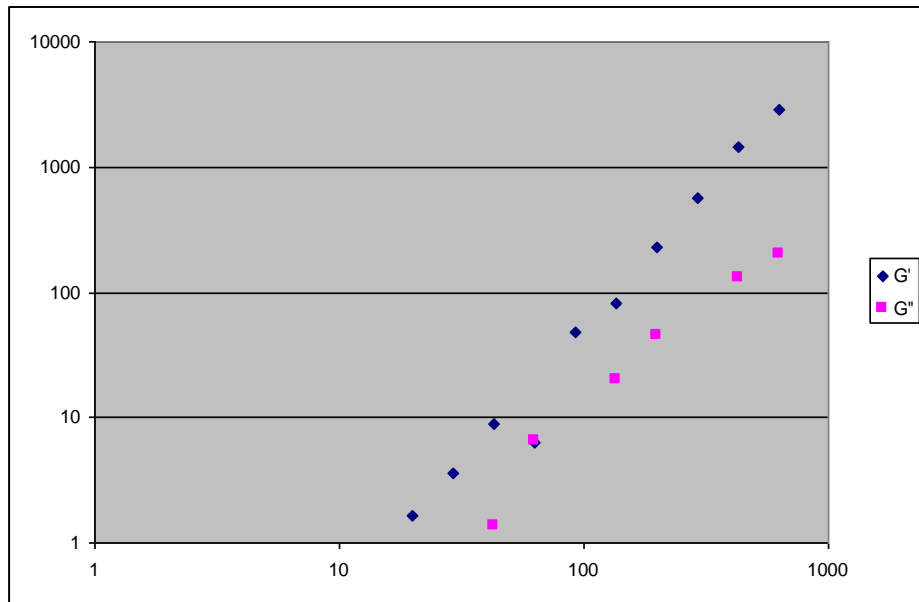
Kuva 20: H_2O_2 -käsitelty geeli.

Vetyperoksidilla ei askorbiinihapon tapaan saatu aikaan käyrää rheometrillä mitattaessa (kuva 20). Näyte ei ollut geilyttämisvaiheen aikana kiinteytynyt laisinkaan, kuten kuvasta 21 nähdään. Rinnakkainen näyte oli samankaltainen liuos, joten mittaus tehtiin ainoastaan toisesta rinnakkaisesta näytteestä.



Kuva 21: Vetyperoksidikäsitelty näyte (rinnakkaisnäyte 1).

2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-käsittely oli ollut liian voimakas eikä liuos ollut muodostanut geeliä. Kuvan 22 käyrä on epäonnistunut vetyperoksidilla ja askorbiinihappolla tehtyjen mittauksien tavoin.



Kuva 22: 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-käsitelty geeli.

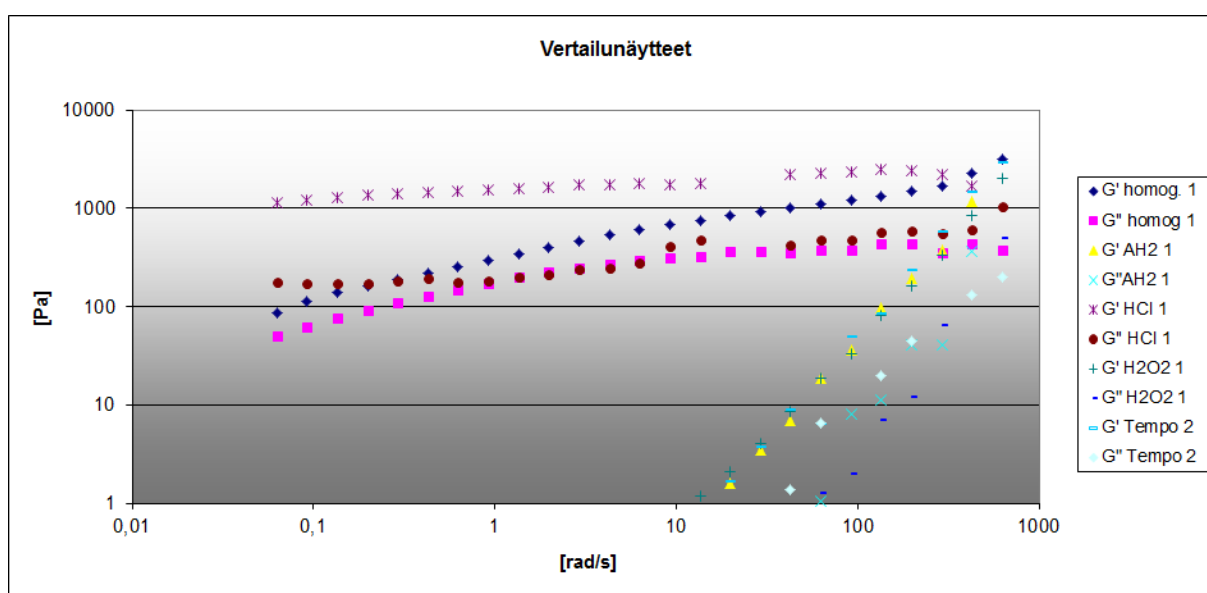
Kuvan 23 näytteen poikkeuksellinen väri on 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-rakeiden aikaansaama. Rakeet ovat väritään oranssinpunaisia. Kumpikaan rinnakkaisista 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-näytteistä ei ollut geeliytynyt, joten reologiset mittaukset päätettiin tehdä ainoastaan toisella näytteellä.



Kuva 23: 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-käsitelty näyte (rinnakkaisnäyte 2).

13 Tulosten yhteenveto

Kuvaan 24 on koottu vertailukelpoisten kokeiden geeleistä otettujen mittausten tulokset. Kuvasta voidaan päätellä että 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni (kuvassa 24 nimellä Tempo), H_2O_2 - ja AH_2 -käsittelyjen kohdalla geeliytymistä ei juuri tapahtunut, sillä kiinteä elastinen osuus G' on näillä geeleillä hyvin pieni verrattuna onnistuneisiin happohydrolysointi- ja homogointikokeisiin ja viskoosin virtaavan aineksen osuus G'' on suuri. Homogoidut kauran beetaglukaaninäytteet vaikuttivat melko kestäville rakenteilta ja happohydrolysoidut näytteet olivat onnistuneet odotetusti erittäin hyvin.



Kuva 24: Vertailukelpoisten kokeiden mittaustulokset yhteen koottuna.

14 Kalvokokeet

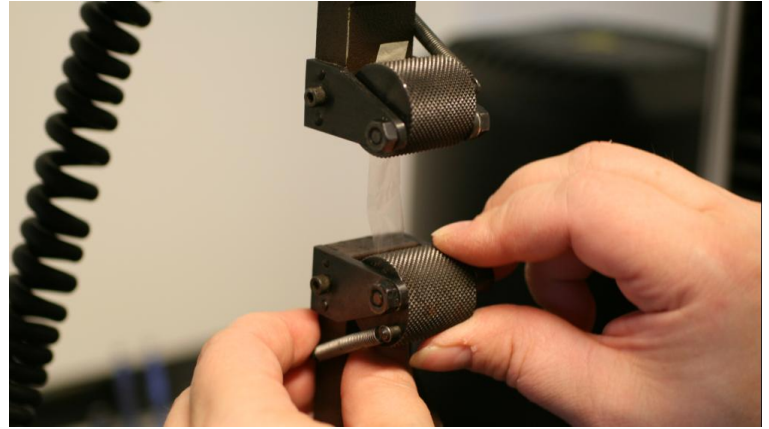
Kauran beetaglukaaniuutteelle tehdyissä homogointikokeissa saatiin aikaan niin voimakkaita rakenteita, että päätettiin lähteä kokeilemaan homogoinnalla käsiteltyjä uutteita kalvojen valmistuksessa. Samalla päätettiin valmistaa kalvoja myös eri tavoin kemiallisesti pilkkomiskäsittelyistä jauheista. Homogoinnalla valmistettuja kalvoja valmistettiin kauran beetaglukaaniuutteesta sekä vehnän ja ohran tärkkelyksistä valmistetuista uutteista. Kemiallisista pilkkomiskäsittelyistä mukana olivat askorbiinihappokäsittely, happohydrolysointi, vetyperoksidikäsittely ja 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoam-

moniumioni-käsittely. Vehnä- ja ohrautteen valmistettiin vehnä- ja ohratärkkelyksestä. Jokaisesta eri käsittelystä valmistettiin kaksi kalvoa, joista toisessa käytettiin pehmentimenä sorbitolia.

Kalvojen valmistus- ja mittausmenetelmät

Kalvoja varten valmistettiin liuoksia, joissa oli 0,25 g jauhetta 24 ml:ssa vettä, ja sorbitolinäytteissä oli 0,1 g sorbitolia pehmentimenä. Liuokset valettiin petrimaljalle ja levitettiin mahdollisimman tasaiseksi kerrokseksi maljan pinnalle. Homogenoiduista uutetta tehtiin vastaavanlaiset maljat 24 ml:sta uutetta. Maljoja kuivattiin aluksi lämpökaapissa 30 °C:ssa yön yli. Maljat kuivuneine kalvoineen siirrettiin olosuhdehuoneeseen viikon ajaksi asettumaan. Olosuhdehuoneessa lämpötila oli 23 °C ja kosteusprosentti 50 %.

Viikon kuluttua kalvot irrotettiin maljoilta varoen repeytymistä, ja ne pilkottiin 1 cm:n paksuisiksi suikaleiksi. Jokaisesta kalvosta oli tarkoitus saada vähintään viisi suikaletta mittausta varten. Kalvojen paksuus mitattiin ennen varsinaista mittausta viidestä eri kohtaa ja määritettiin niistä keskiarvo. Kalvojen kestävyttä testattiin Instron 4465 -laitteella venyttämällä (kuvat 25 ja 26). Mittalaite säädettiin jokaiselle suikaleelle erikseen niiden keskimääräisen paksuuden perusteella, ja suikaleita venytettiin laitteessa, kunnes ne lakkasivat vastustamasta vetoa ja katkesivat.



Kuva 25: Instron 4465 -kalvomittalaite Kuva 26: Instron-kalvomittalaitteen mittapäät

15 Kalvokokeiden tulokset

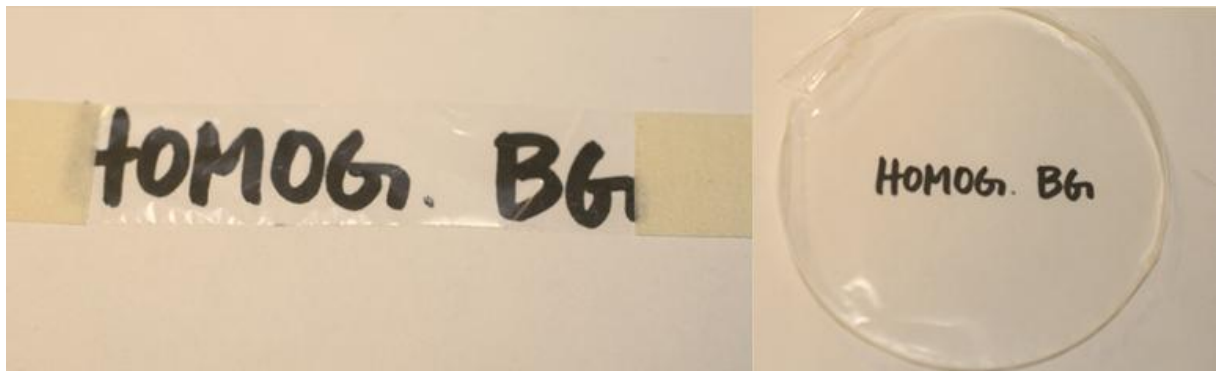
Sorbitolia sisältäneet näytteet epäonnistuivat. Sorbitolikalvoista tuli hauraita, ja ne olivat täynnä halkeamia. 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-käsitellyt kalvot eivät irronneet laisinkaan petrialjalta, ja ne olivat pinnaltaan tahmeita. Suolahaposta valmistettua kalvoa ei voinut ottaa mukaan vertailuun, sillä jauhetta ei ollut riittänyt tarpeeksi 24 ml:n näytteeseen. Askorbiinihaposta, vetyperoksidista ja homogenoituista kalvoista saatiin onnistuneita mittaustuloksia. Parhaimmalta kalvolta tulosten perusteella vaikutti vehnän homogenoidusta tärkkelysuutteesta valmistettu kalvo. Kalvokokeiden tulokset ovat taulukossa 2 ja kalvoista on otettu myös muutamia kuvia (kuvat 27–31).

Taulukko 2: Kalvojen vetolujuudet

Kalvo:	vetolujuuksien ka (MPa)	hajonta
Homogenoitu vehnän tärkkelys	42,481	4,753
Askorbiinihappo	33,691	8,223
Vetyperoksidi	13,803	8,311
Homogenoitu kauran beetaglu-kaani	30,956	7,139

Homogenoitu ohran tärkkelys	28,120	1,906
-----------------------------	--------	-------

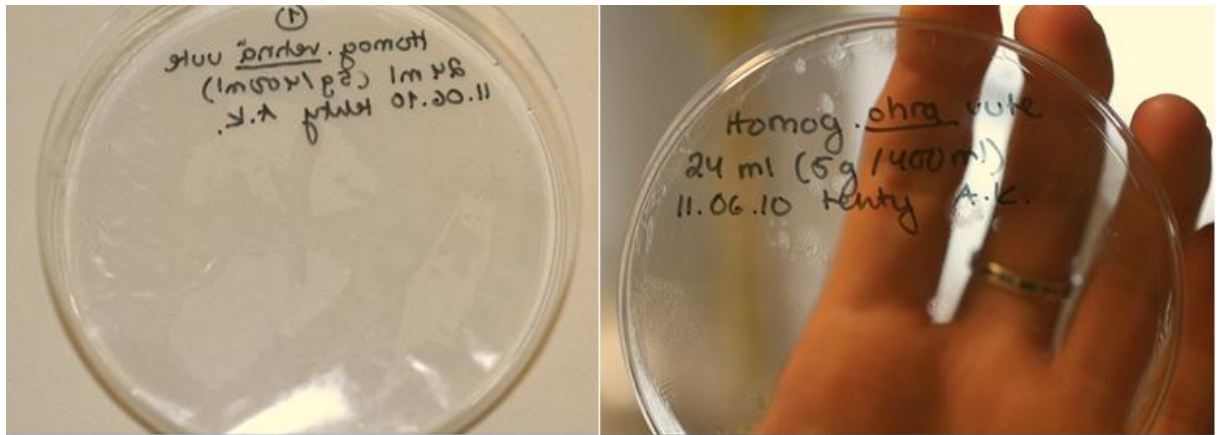
Kalvokokeet olivat alustavia ja suuntaa antavia, eikä niiden antamia tuloksia voida vielä pitää yleispätevinä. Kalvoista riittää vielä paljon tutkittavaa ja uutta selvitettävää tulevaisuutta ajatellen. Vertailun vuoksi todettakoon, että kotitalouksien käytössä olevan Elmu Tuorekelmun vetolujuus on 50–120 Mpa ja että molekyylipainoltaan samaa suuruusluokkaa kalvokokeissa pilkotuista näytteistä valmistettujen kalvojen kanssa on hydroksipropyyliselluloosa, jonka vetolujuus on 15,32 MPa. Näihin arvoihin verrattaessa, valmistetut kalvot vaikuttivat olevan varsin kestäviä, joten kalvokokeista saadut tulokset vaikuttivat lupaavilta.



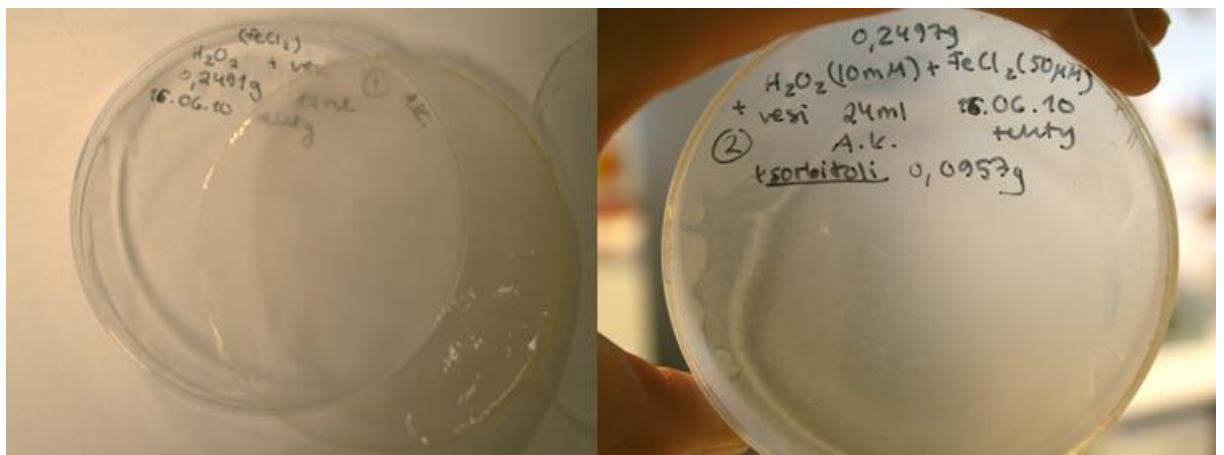
Kuva 27: Homogenoidusta kauran beetaglukaanista valmistetut ensimmäiset kalvokelut.



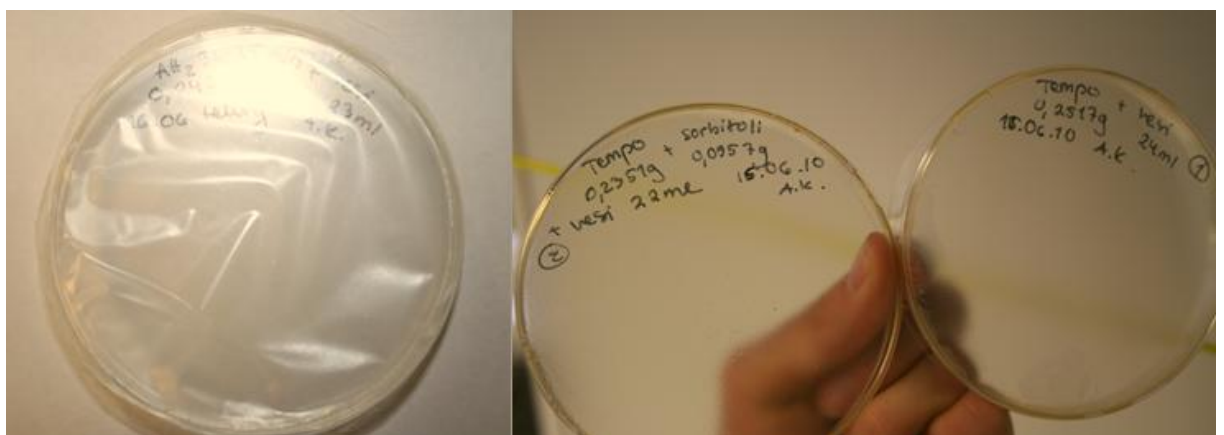
Kuva 28: Homogenoidut kauran beetaglukaanikalvot (ilman sorbitolia tehty vasemmalla ja sorbitolin kanssa valmistettu oikealla).



Kuva 29: Homogenointikäsitellyt vehnän ja ohran tärkkelyksestä valmistetut kalvot (vehnä vasemmalla ja kaura oikealla).



Kuva 30: Vetyperoksidikäsitellyistä beeta-glukaanijauheista valmistetut kalvot (vasemmalla ilman sorbitolia ja oikealla sorbitolilla).



Kuva 31: Askorbiinihappo- ja 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumionikäsitellyistä beeta-glukaanijauheista valmistetut kalvot (askorbiinihappokäsitellyt vasemmalla ja 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumionikäsitellyt oikealla).

16 Yhteenveto

Esikokeissa tulivat tutuiksi kauran beetaglukaanin eri käsittelyvaiheet, joita olivat uutteen pilkkominen ja puhdistus, puhdistetun beetaglukaanijauheen uudelleenliuotus ja geelimuottien valaminen. Esikokeiden tuloksena valittiin myöhempiä tutkimuksia varten pilkkomiskäsittelyiksi happohydrolysointi, askorbiinihappokäsittely ja homogenisointi korkeapainehomogenisaattorilla.

Liuotuskokeissa selvitettiin, kuinka hyvin puhdistetut kuivatut homogenointikäsitellyt ja erivahvuiset happohydrolysoidut jauheet liukenevat uudelleen liuotettaessa ja kuinka suuri osa niistä jää liukenematta. Homogenoidut jauheet liukenivat lähes kokonaan, ja happohydrolysointikäsitellyistä paras tulos saatiin liuosvahvuudella 7 %.

Viskositeetikokeissa selvitettiin, kuinka hyvin eri pilkkomiskäsittelyillä saatiin pudotettua käsiteltävän uutteen viskositeettia. Laskeva viskositeetti kertoi molekyylien pilkkoutumisesta, ja molekyylien pilkkoutuminen ja näin ollen molekyylipainon putoaminen puolestaan edesauttoi geelitymisen onnistumista. Uutena käsittelynä otettiin mukaan vetyperoksidikäsitely. Vertailuarvona käytettiin happohydrolyysikäsitelyn aikana mitattua viskositeettia. Vetyperoksidilla ei saatu viskositeettia laskemaan toivotulla tavalla. HCl-käsittely puolestaan toimi erittäin hyvin, ja viskositeetti saatiin laskemaan tavoitearvoon. Askorbiinihapolla viskositeetti laski tasaisesti ajan funktiona, mutta käsittelyllä ei saavutettu tavoitearvoa.

Geelikokeita tehtiin lisää onnistuneiden käsittelyjen osalta. Osassa näytteitä käytettiin liuottimena veden sijasta sukkiniaattipuskuria. Vesi vaikutti kuitenkin tulosten perusteella parhaalta liuottimelta. Esikoevaiheen geelikokeiden perusteella havaittiin homogenoitujen näytteiden muodostavan tiukkoja sidoksia. Happohydrolysoidut geelit onnistuivat myös melko hyvin.

Vertailtavuuden vuoksi kaikki kokeet toistettiin samoissa olosuhteissa, ja mukaan pilkkomiskäsittelyiksi otettiin vielä vetyperoksidikäsitely ja 2,2,6,6-tetrametyyli-1-piperidiinioksoammoniumioni-käsittely. Onnistuneen oloisia geelejä saatiin aikaan happohydrolysoiduista ja homogenoimalla käsitellyistä näytteistä.

Geelikokeissa tutkituista pilkkomiskäsitellyistä näytteistä kokeiltiin kalvojen valmistamista. Lisäksi kalvoja valmistettiin korkeapainehomogenisaattorilla käsitellyistä ohran ja vehnän täkkelysuutteista. Lupaavia tuloksia saatiin kaikkien homogenoitujen näytteiden osalta.

Alustavien kalvokokeitten innostamina tutkijat Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen Vilja-tutkimusryhmässä eli CTG:ssä (cereal technology group) ovat jatkaneet kalvojen tutkimusta tavoitteenaan osoittaa yksinkertaisen prosessin tuoma huikea parannus kalvoihin.

Lähteet

Barriga, S. 2001. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-Oxyl (TEMPO). *Synlett*, 4, 563.

Behall, Kay M., Scholfield, Daniel J. & Hallfrisch, Judith. 2004. Lipids Significantly Reduced by Diets Containing Barley in Moderately Hypercholesterolemic Men. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 23, No. 1, s. 55–62.

Campoccia, D., Doherty, P., Radice, M., Brun, P., Abatangelo, G. & Williams D.F. 1998. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, Vol. 19 s. 2101–2127.

Cole Bernard. Gelatine - Consumer Information. WWW-dokumentti. <http://www.gelatin.co.za/gelatine-consumer.html>. Luettu 18.02.2011.

Cui W., Wood, P.j., Blacwell, B. & Nikiforuk, J. 2000. Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat β -D-glucan—comparison with other cereal β -D-glucans. *Carbohydrates Polymers*, Vol. 41, s. 249–258.

Dais, P. & Perlin, A.S., 1982. High-field, C-N.M.R. spectroscopy of b-Dglucans, amylopectin, and glycogen. *Carbohydrate Research*, Vol. 100, s. 103–116.

Daniells Stephen. 2006. Choose optimal thickening agent to boost flavour, lower salt. WWW-dokumentti. Decision News Media SAS. <http://www.foodnavigator.com/Science-Nutrition/Choose-optimal-thickening-agent-to-boost-flavour-lower-salt>. Luettu 24.02.2011.

Doublier, J.L. & Cuvelier, G. 2006. Gums and Hydrocolloids: Funktional Aspects, Vol. 7, s. 233–271.

Doublier, J.L. & Wood, P.J. 1995. Rheological Properties of Aqueous Solutions of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan from Oats (*Avena sativa* L.). *Cereal Chemistry*, Vol. 72, s. 335–340.

Drumheller P. & Hubbell J.A. 1995. Densely crosslinked polymer networks of PEG in trimethylolpropane triacrylate for cell adhesion-resistant surfaces. *Journal of Biomedical Material Research*, Vol. 29 s. 207–215.

Fry S.C., Miller J.G. & Dumville J.C. 2002. A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil*, Vol. 247, s. 57–67.

Geelit. 2008. WWW-dokumentti. http://www.pharmtech.helsinki.fi/kurssit/590016/luennot/geelit_2008.pdf. Luettu 10.01.11.

Heino, Jyrki & Vuento, Matti. 2004. *Solubiologia*. Luku 8, s. 192. Porvoo: WSOY.

Hoffman, Allan S. 2002. Hydrogels for biomedical applications. Elsevier science. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 54, s. 3–12.

Izydorczyk, M.S., Macri, L.J. & MacGregor, A.W. 1998a. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides -II. Alkali-extractable β -glucans and arabinoxylans. Carbohydrate polymers, Vol. 35, s. 259–269.

Izydorczyk, M.S., Bilianderis, C.G., Macri, L.J. & MacGregor, A.W. 1998b. Fraction of oat (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucans and characterization of the fractions. Journal of Cereal Science, Vol. 27, s. 321–325.

Izydorczyk, M.S., Macri, L.J. & MacGregor, A.W. 1998c. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides -I. Water -extractable β -glucans and arabinoxylans. Carbohydrate Polymers, Vol. 35, s. 249–258.

Izydorczyk, M.S. & Bilianderis, C.G. 2000. Structural and functional aspects of cereal arabinoxylans and β -glucans. Novel Macromolecules in Food Systems. Elsevier Science B.V. Amsterdam. s. 361–384.

Jaakonsaari, Tiina. 2009. Kuidun määritys elintarvikkeesta. Elintarvikeanalytiikan kurssi. Luentomoniste. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Johansson, L., Virkki, L., Anttila, H., Esseltröm, H. Tuomainen, P. & Sontag-Strohm, T. 2006. Hydrolysis of β -glucan. Food Chemistry, Vol. 262, s. 11647–11650.

Julkunen Risto. 2007. Keliakia. WWW-dokumentti. Kauraa keliakikon ruokavaliossa. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=kel00041 Kustannus: Oy Duodecim 2009. Luettu 06.02.2011.

Kaura 2011= WWW-dokumentti. <http://www.lumoudukaurasta.fi/>. Luettu 24.02.2011. Park, Kinam, Shalaby, Waleed, S.W. & Park, Haesun. 1993. Biodegradable hydrogels for drug delivery. Lancaster, USA: Technomic Pub. Co.

Kerckhoffs, Daniëlle A.J.M., Hornstra, Gerard & Mensink, Ronald P. 2003. Cholesterol-lowering effect of β -glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when β -glucan is incorporated into bread and cookies^{1,2,3}. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 78, s. 221–227.

Kivelä, R. 2008. Polymeeriliuokset. Viljan kemia ja biokemia kurssi. Luentomoniste. Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos.

Kivelä R., Gates F. & Sontag-Strohm, T. 2009a. Degradation of cereal beta-glucan by ascorbic acid induced oxygen radicals. Journal of Cereal Science, Vol. 49, s. 1–3.

Kivelä, R., Nyström L., Salovaara, H. & Sontag-Strohm T. 2009b. Role of oxidative cleavage and acid hydrolysis of beta-glucan in modelled beverage conditions. Journal of Cereal Science, Vol. 50, s. 190–197.

Lazaridou, A. & Bilianderis, C.G. 2004. Cryogelation of cereal β -glucans: structure and molecular size effects. Food Hydrocolloids, Vol. 18, s. 933–947.

- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. & Izydorczyk, M.S., 2003. Molecular size effects and on rheological properties of oat β -glucans in solution and gels. *Food Hydrocolloids*, Vol. 17, s. 693–712.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Micha-Scerettas, M. & Steele, B.R., 2004. A comparative study on structure-funktion relationship of mixed linkage (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) linear β -D-glucans. *Food hydrocolloids*, Vol. 18, s. 837–855.
- Morris, Viktor J. 2007. Gels. Peter Beltonin teoksessa: *The Chemical Physics of food*. Oxford. Blackwell Publishing Ltd.
- Mustajoki Pertti & Kaukua Jarmo. 2008a. LDL-kolesteroli eli paha kolesteroli (fP-Kol-LDL)HDL). WWW-dokumentti. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03082. Luettu 18.02.2011.
- Mustajoki Pertti & Kaukua Jarmo. 2008a. HDL-kolesteroli eli hyvä kolesteroli (fP-Kol-HDL). WWW-dokumentti. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03083, Luettu 18.02.2011.
- Porto Samuel. 2003. Agar-agar. WWW-dokumentti. <http://www.agargel.com.br/agar-tec-en.html>. Luettu 18.02.2011.
- Prestwich, G.D., Marecak, D.M., Marecak, J.F., Vercruysee, K.P & Ziebell, M.R. 1998. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives *Journal of Controlled Release*. Vol. 53 s. 93–103.
- Queenan, Katie M., Stewart, Maria L., Smith, Kristen N., Thomas, William, Fulcher R. Gary & Slavin, Joanne L. 2007. Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, Vol. 6:6. WWW-dokumentti. <http://www.nutritionj.com/content/6/1/6>. Luettu 21.02.2011.
- Ravitsemus = Ravitsemustieteen perusteita – Ruuansulatus ja sokeristuminen http://www.avoin.helsinki.fi/oppimateriaalit/ravitsemustieteen_perusteet/04_hiilarit_ruoansulatus.shtml. Luettu 03.04.2011.
- Rinaudo, Marguerite. 2005. *Advances in Characterization of Polysaccharides in Aqueous Solution and Gel State*. Teoksessa. Dimitriu S. *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. New York, NY. s. 237–252.
- Ruuansulatus. 2009. MDD Terveyspalvelut Oy. WWW-dokumentti. http://www.mdd.fi/Laboratoriotestit_tekstit/Ruuansulatus.html. Luettu 21.02.2011.
- Skendi, A. Biliaderis, C.G., Lazaridou, A. & Izydorczyk, M.S. 2003. Structure and rheological properties of water soluble β -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena byzantina*. *Journal of Cereal Science*, Vol. 38, s. 15–31.
- Sontag-Strohm, T. 2009. Miksi kaura on terveyden lähde? Monipuolinen kaura- seminaari. Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos.

Storsley, J.M., Izydorczyk, M.S., You, S., Biliaderis, C.G. & Rosnagel, B. 2003. Structure and physicochemical properties of β -glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley. *Food Hydrocolloids*, Vol. 17, s. 831–844.

Suositus. 2007 = Suositus kauran käytöstä 1/2007. WWW-dokumentti.
http://www.keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/asiantuntijaneuvoston_suositukset/suositus_kauran_kaytosta/. Luettu 06.02.2011.

Tosh, S.M., Brummer, Y., Wood, P.J., Wang, Q. & Weisz, J. 2004a. Evaluation of structure in the formation of gels by structurally diverse (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -d-glucans from four cereal and one lichen species. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 57, s. 249–259

Tosh, S.M., Wood, P.J., Wang, Q. & Weisz, J. 2004b. Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolyzed oat β -glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis method. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 55, s. 425–436.

Vaikousi, H., Biliaderis, C.G. & Izydorczyk, M.S. 2004. Solution flow behavior and gelling properties of water-soluble barley (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -glucans varying in molecular size. *Journal of Cereal Science*, Vol. 39, s.119–137.

Winter, H.H. & Chambon, F. 1986. Analysis of viskoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, Vol. 30, s. 367–382.

Wood, P.J., Weisz, J. & Blackwell, B.A. 1991. Molecular characterization of cereal b-D-glucans. Structural analysis of oat b-D-glucan and rapid structural evaluation of b-D-glucans from different sources by highperformance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry*, Vol. 68, s. 31–39.

Wood, P.J., Weisz, J. & Blackwell, B.A.1994. Structural studies of (1-3)(1-4)-b-D-glucans by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry*, Vol. 71, s. 301–307.

Woodward, J.R., Phillips, D.R. & Fincher, G.B. 1983. Water-soluble (1-3), (1-4)-b-D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. I. Physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 3, s. 143–156.

Woodward, J.R., Phillips, D.R. & Fincher, G.B. 1988. Water-soluble (1-3,1-4)-b-D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. IV. Comparison of 40 and 65 1C soluble fractions. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 8, s. 85–97.

