

Mira Falck

# Ensyymien käyttömahdollisuudet kasvi- ja eläinrasvojen puhdistamisessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Insinööri AMK  
Bio- ja elintarviketekniikka  
Opinnäytetyö  
7.5.2013

Tekijä(t) Otsikko	Mira Falck Entsyymien käyttömahdollisuudet kasvi- ja eläinrasvojen puhdistamisessa
Sivumäärä Aika	47 sivua + 4 liitettä 7.5.2013
Tutkinto	Insinööritutkinto
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioprosessitekniikka
Ohjaajat	Tutkija Pia Bergström Lehtori Mikko Halsas
<p>Työn tarkoituksena oli tutkia fosfolipaasi-entsyymien käyttömahdollisuuksia kasviöljyjen ja eläinrasvojen puhdistuksessa. Haluttiin selvittää niiden tehokkuutta fosforin poistamisessa perinteisiin puhdistusmenetelmiin verrattuna. Kirjallisessa osuudessa keskityttiin lipidien ja entsyymien kemiaan sekä perinteisiin puhdistusmenetelmiin ja selvitettiin, mitä tutkimuksia entsyymien käytöstä rasvojen ja öljyjen puhdistuksessa on aiemmin tehty. Selvisi, että tutkimuksia on tehty lähinnä kasvisrasvojen puhdistamisesta fosfolipaasi-entsyymeillä ja että on olemassa useita erilaisia kaupallisia fosfolipaaseja.</p> <p>Kokeellisessa osuudessa tutkittiin rypsiöljyn ja eläinrasvan puhdistamista fosfolipaaseilla. Entsyymeinä käytettiin Rohalase PL-Xtra PLA2 -entsyymiä ja Sigman eläinperäistä fosfolipaasi C -entsyymiä ja substraatteina rypsiöljyä sekä eläinrasvaa. Aluksi etsittiin olosuhteita, joissa entsyymi saatiin toimimaan eli poistamaan fosforia ja testattiin, missä olosuhteissa entsyymi toimii parhaiten. Parhaiten fosforia poistui, kun rypsiöljyä käsiteltiin Rohalase PL-Xtralla; entsyymi toimi jossain määrin myös eläinrasvaan. Sen sijaan Sigman fosfolipaasi C -entsyymillä ei ollut vaikutusta kumpaankaan rasvaan.</p>	
Avainsanat	rasva, öljy, puhdistus, entsyymi, fosfolipidi, fosfolipaasi

Author(s) Title	Mira Falck Possibilities of using enzymes in oil and fat purification
Number of Pages Date	47 pages + 4 appendices 7 May 2013
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio Technology and Food Engineering
Specialisation option	Bioprocess Technology
Instructors	Pia Bergström, Researcher Mikko Halsas, Senior Lecturer
<p>The aim of this research was to investigate the possibilities of using enzymes in purification of plant oils and animal fats. The purpose was to find out their effectiveness to remove phospholipids compared to traditional purification methods. In the written part the focus was on the chemistry of lipids and enzymes and traditional purification methods and examining studies that have been made on enzymatic purification of fats and oils. It was found that there has been done research on purification of plant oils with phospholipase enzymes and there are several commercial phospholipases.</p> <p>In the experimental part the purification of rapeseed oil and animal fat with phospholipases was researched. The enzymes that were used were the Rohalase PL-Xtra PLA2 – enzyme and the phospholipase C –enzyme from Sigma and the substrates were rapeseed oil and animal fat. First the circumstances where the enzyme works and then which circumstances it works the best was searched. Phosphorus was removed the best when rapeseed oil was treated with Rohalase PL-Xtra and the enzyme worked somewhat also on animal fat. However the phospholipase C –enzyme from Sigma didn't work with either of the substrates.</p>	
Keywords	oil, fat, purification, enzyme, phospholipid, phospholipase

## Sisällys

Lyhenteet	1
1 Johdanto	2
KIRJALLINEN OSA	2
2 Kemia	2
2.1 Rasvat ja öljyt	2
2.2 Fosfolipidit	4
2.3 Entsyymit	6
2.3.1 Yleistä entsyymeistä	6
2.3.2 Fosfolipaasit	7
3 Esikäsittely	10
3.1 Tarkoitus	10
3.2 Vesipesu	10
3.3 Happopuhdistus	11
3.4 Adsorptio valkaisumaalla	11
3.5 Öljyjen ja rasvojen entsyymaattinen käsittely	13
3.5.1 Aiemmat tutkimukset	13
3.5.2 Käyttö	17
3.5.3 Kannattavuuden huomioiminen	19
3.6 Muita entsyymaattisia prosesseja	19
KOKEELLINEN OSA	22
4 Materiaalit	22
4.1 Syöttöaineet	22
4.2 Entsyymit	22
5 Menetelmät ja työn suoritus	23
5.1 Fosfolipaasiaktiivisuuden määrittäminen	23
5.2 Happokäsittely	24
5.3 Savikäsittely	24
5.4 Entsyymaattinen käsittely	24

5.4.1	Rohalase PL-Xtra	24
5.4.2	Sigma PLC	27
5.5	Eläinrasva	28
6	Tulokset	30
6.1	Rypsiöljy	30
6.1.1	Rohalase PL-Xtra	30
6.1.2	Sigma PLC	33
6.2	Eläinrasva	34
7	Tulosten analysointi	36
7.1	Rypsiöljy	36
7.2	Eläinrasva	40
8	Yhteenveto	42
	Lähteet	44
	Liitteet	
	Liite 1. Kaupallisia ja saatavilla olevia entsyymejä	
	Liite 2. Laskuja	
	Liite 3. Entsyymien aktiivisuuden testaus	
	Liite 4. Tuloksia	

## Lyhenteet

DAG	diasyglyserol, diasyyli glyseroli
ENK	entsymaattinen käsittely
EK	esikäsittely
FFA	free fatty acid, vapaat rasvahapot
HK	happokäsittely
HP	hydratable phosphatides, hydratoituvat fosfatidit
K	käsittelemätön rypsiöljy
NHP	non-hydratable phosphatides, ei-hydratoituvat fosfatidit
LPA	lysophosphatidic acid, lysofosfatidihappo
LPC	lysophosphatidylcholine, lysofosfatidyylikoliini
PA	phosphatidic acid, fosfatidihappo
PC	phosphatidylcholine, fosfatidyylikoliini
PE	phosphatidylethanolamine, fosfatidyylietanolamiini
PGLY	phosphatidylglyserol, fosfatidyyli glyseroli
PI	phosphatidylinositol, fosfatidyyliinositoli
PL	phospholipase, fosfolipaasi
SK	savikäsittely

# 1 Johdanto

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia entsyymäattisen käsittelyn soveltumista erityisesti ongelmalliseksi koettujen fosforiyhdisteiden poistamiseen öljyistä ja rasvoista. Työssä verrattiin entsyymikäsittelyn tehokkuutta perinteisiin menetelmiin joko sellaisenaan tai niihin yhdistettynä. Lisäksi arvioitiin entsyymikäsittelyn kustannuksia.

Kasviöljyjä ja eläinrasvoja käytetään öljyteollisuudessa biopolttoaineiden valmistukseen. Ennen jatkokäyttöä öljyjä ja rasvoja täytyy kuitenkin esikäsitellä, jolloin tarkoituksena on poistaa niistä ei-toivottuja komponentteja, jotta saadaan mahdollisimman puhdasta lopputuotetta ja vältetään prosessilaitteita tukkivilta saostumilta. Puhdistusmenetelmiä on useita erilaisia ja niitä valitessa täytyy pyrkiä siihen, ettei valittu menetelmä vahingoita öljyä tai rasvaa itseään eikä aiheuta merkittäviä hävikkejä. Kokonais-tehokkuutta arvioitaessa täytyy huomioida myös eri puhdistusmenetelmien kustannukset.

## KIRJALLINEN OSA

### 2 Kemia

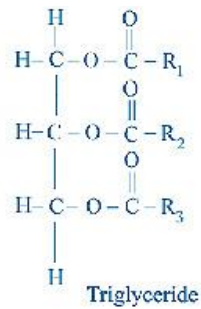
#### 2.1 Rasvat ja öljyt

Rasvat ja öljyt ovat orgaanisia yhdisteitä, jotka liukenevat vain pienissä määrin veteen. Niiden perusyksikkö on triglyseridi, jossa glyseroliin on liittynyt kolme rasvahappoa esterisidoksella. Näitä yhdisteitä kutsutaan myös glyserolin rasvahappoestereiksi. Rasvoiksi kutsutaan huoneenlämmössä kiinteinä olevia triglyseridejä ja öljyiksi vastaavasti huoneenlämmössä nestemäisinä olevia triglyseridejä. [3, s. 159, 164; 4s. 96–97, 110; 6, s.166 ]

Yleisesti kaikkia rasvoja ja rasvamaisia yhdisteitä kutsutaan lipideiksi. Lipideihin kuuluvat rasvan ja öljyn lisäksi niissä esiintyvät muut yhdisteet, kuten vahat, kolesteroli, steroidit, rasvaliukoiset vitamiinit (A-, D-, E- ja K-vitamiinit), glykolipidit ja niiden johdannaiset (joihin kuuluu mm. sfingosiiini), monoglyseridit, diglyseridit ja fosfolipidit ja niiden johdannaiset. Lipidien lisäksi rasva sisältää yleensä muita ei-rasvamaisia yhdisteitä, kuten vapaita rasvahappoja, pigmenttejä sekä metalli-, typpi- ja rikkiyhdisteitä. Eläin-

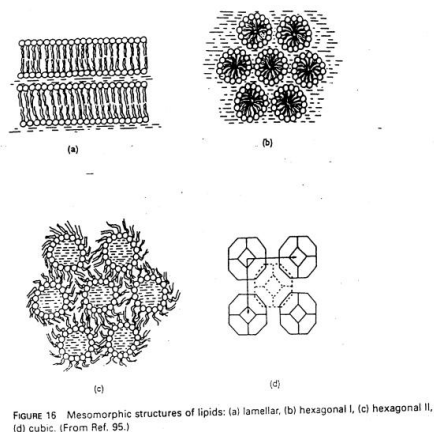
rasvassa esiintyvistä typpiyhdisteistä osa on peräisin lihaskudoksessa olevista proteiineista. [1, s.10, 13; 5, s. 60–61]

Glyseroliin sitoutuneiden rasvahappojen määrän perusteella glyserolin rasvahappoesteiteitä kutsutaan mono-, di- tai triglyserideiksi (kuva 1). Rasvahapot ovat rakenteeltaan monokarboxyylihappoja eli alifaattiseen hiiliketjuun on liittynyt karboxyyliiryhmä. [3, s. 159, 164; 4, s. 96–97, 110; 6, s.166 ]



Kuva 1. Rasvamolekyylä. [2]

Rasvamolekyyläin rakenne ja ominaisuudet määräytyvät rasvamolekyyläin järjestäytymisestä. Osa rasvoista muodostaa erittäin järjestäytyneitä kideytimiä. Kiteytyminen on kemiallisesti monimutkainen prosessi, jossa rasvamolekyylit ensin pakkautuvat toistensa lähelle ja järjestäytyvät kideytimiksi. Osa rasvoista muodostaa mesomorfisen faasin eli faasin, joka muodostuu niin kutsuttujen nestekiteiden ympärille. Tämän faasin ominaisuudet ovat nesteen ja kiteisen muodon välillä. Mesomorfiseen rakenteeseen vaikuttaa rasvan kemiallinen rakenne, sen konsentraatio, lämpötila, vesipitoisuus sekä muiden yhdisteiden pitoisuus. Mesomorfisten rakenteiden muotoja ovat lamelli, miselli, käänteinen miselli sekä kuutio (kuva 2). [3, s. 169–170]

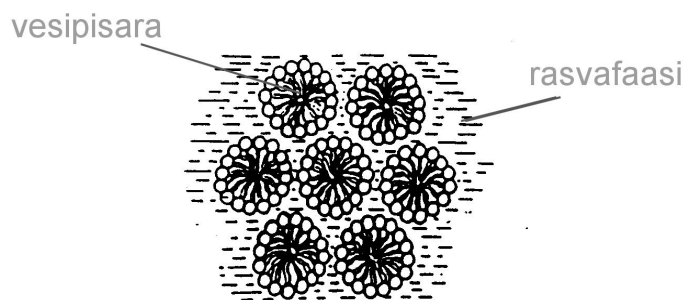


Kuva 2. Lipidin lamellimuoto (a), miselli (b), käänteinen miselli (c) ja kuutio (d). [3]



Lamelli muodostuu kahdesta rasvamolekyylikerroksesta, joita ympäröi vesi. Molekyylien hydrofobiset päät ovat vastakkain ja polaariset päät ovat veden suuntaan. Tätä kaksikerrosrakennetta esiintyy yleisimmin biologisissa membraaneissa. Misellimuotoa esiintyy yleensä emulsioissa veden kanssa, joissa rasva muodostaa kuusikulmaisen sylinterirakenteen. Misellimuodossa rasvamolekyylien polaarittomat hydrofobiset päät osoittavat sylinterin sisälle ja polaariset hydrofiiliset päät ulospäin veden suuntaan. Tätä muotoa esiintyy yleensä emulsiossa, jossa rasva on sekoitettu veteen. [3]

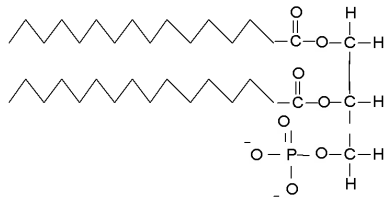
Käänteistä misellimuotoa esiintyy yleensä emulsiossa, jossa vesi on sekoitettu rasvaan (kuva 3). Tällöin molekyylit ovat asettuneet päinvastoin ja sylintereidensä sisälle jää vesipisara. Näin ollen vesi ei pääse muodostamaan omaa faasiaan eikä tällaista rakennetta voida laimentaa vedellä. Kuutiomuotoa esiintyy monoglyseridi-vesisysteemissä. Tällainen faasi on yleensä läpinäkyvä ja hyvin viskoosi, mutta tätä muotoa ei vielä tunneta niin hyvin kuin kolmea muuta muotoa. [3]



Kuva 3. Vesi rasvassa -emulsio. [3]

## 2.2 Fosfolipidit

Myös fosfolipidit ovat glyserolin rasvahappoestereitä (kuva 4), mutta niissä kolmanteen hiileen on liittynyt esterisidoksella rasvahapon sijaan fosforihappo, johon on yleensä lisäksi toisella esterisidoksella liittynyt vielä toinen alkoholi, kuten koliini, etanolamiini, inositoli tai pelkkä vety. Fosforihapon ja siihen sitoutuneen alkoholin tai vedyn muodostamaa molekyyliä kutsutaan fosfatidiksi. Neljä yleisintä fosfatidia ovat fosfatidihappo, fosfatidyylikoliini, fosfatidyyli-inositoli ja fosfatidyylietanolamiini. Fosfatidit sisältävät yleensä fosforin lisäksi myös muita alkuaineita, kuten typpeä tai metalli-ioneja. [7; 8]



Kuva 4. Fosfolipidi. [8]

Fosfolipideistä puhuttaessa törmätään usein lesitiiniin. Alkujaan lesitiini on tarkoittanut ainoastaan fosfatidyylikoliinia, mutta nykyään kaupallisella lesitiinillä tarkoitetaan yleisesti fosfolipidien seosta öljyssä. Lesitiiniä käytetään mm. elintarviketeollisuudessa luonnollisena emulgaattorina ja sitä saadaan lähinnä soijapavuista eristämällä. [9, 10]

Fosfolipideihin kuuluvat myös lysofosfolipidit, jotka ovat rakenteeltaan normaalien fosfolipidien kaltaisia, mutta niissä toinen rasvahapporyhmä on korvautunut hydroksyyli-ryhmällä. Yleensä lysofosfolipidit ovat seurausta fosfolipaasi A -entsyymin aktiivisuudesta normaaleissa fosfolipideissä, kuten fosfatidyylikoliinissa tai fosfatidihapossa, jolloin entsyymi katkaisee sidoksen rasvahapon ja glyserolin väliltä, mutta ne voivat olla myös seurausta fosfolipidien asyylaatiosta tai monoglyseridin fosforylaatiosta. [11]

Vesikäsittelyn vaikutus öljyn fosfolipidipitoisuuteen riippuu fosfatidin hydrofiilisyydestä. On olemassa hydratoituvia eli vettä sitovia fosfolipidejä (HP) ja ei-hydratoituvia eli ei vettä sitovia fosfolipidejä (NHP). Mitä suurempi veden sidontakyky eli mitä hydrofiilisempi fosfolipidi on, sitä suuremmat emulgoivat voimat sillä on. Vesikäsittelyllä voidaan poistaa hydrofiilisiä yhdisteitä, sillä ne muodostavat sidoksen veden kanssa ja poistuvat vesifaasin mukana. Esimerkiksi fosfatidyyli-inositoli (PI) on hyvin hydrofiilinen, sillä sen inositolipuolella on viisi vapaata hydroksyyli-ryhmää, mikä tekee siitä poolisen. Onnistuneen vesikäsittelyn jälkeen fosfatidyyli-inositolin määrä lopputuotteessa on pieni. [7]

Fosfolipidien hydratoitumisasteesta on julkaistu tutkimustietoa (taulukko 1), jossa niiden suhteellisesta hydratoitumisesta kertoo niiden vaatima hydratoitumisaika. Esimerkiksi fosfatidyyli-inositoli tarvitsee noin kaksi kertaa pidemmän ajan hydratoituakseen kuin fosfatidyylikoliini. Kokeet osoittavat, että fosfatidihapon ja fosfatidyylietanolamiinin kalsiumsuolojen hydratoitumisaika on yli 150 kertaa pitempi kuin fosfatidyylikoliinilla, jolloin voidaan sanoa, että ne ovat käytännössä ei-hydratoituvia normaaleissa vesipesuolosuhteissa. [12]

Taulukko 1. Fosfolipidien suhteellinen hydratoituvuus. [12]

**Table 1: Relative rates of phospholipid hydration - adapted from [1] after [4].**

Phospholipid	Relative Rate of Hydration
phosphatidylcholine	100
phosphatidylinositol	44
phosphatidylinositol (Calcium salt)	24
phosphatidylethanolamine	16
phosphatidic acid	8.5
phosphatidylethanolamine (Calcium salt)	0.9
phosphatidic acid (Calcium salt)	0.6

Vesipesussa fosfatidihapon ja fosfatidyylietanolamiinin kalsium-, magnesium- ja rautasuolat eivät hydratoidu normaaleissa pesuolosuhteissa, jolloin ne jäävät öljyyn. Kemiallisella käsittelyllä edellä mainitut metalli-ionit saadaan kuitenkin poistettua, ja kun öljy vielä sentrifugoidaan, fosfatidihapon ja fosfatidyylietanolamiinin happomuodot poistuvat muiden epäpuhtauksien mukana vesifaasissa. Tällä käsittelyllä saadaan öljyä, jossa on hyvin alhainen fosforipitoisuus ja jossa öljyhävikki on pienempi kuin pelkkää vesipesua käytettäessä. [12]

Fosfolipidien määrä käsittelemättömissä öljyissä ja rasvoissa ei ole vakio, ja fosfolipidien laadussa on myös havaittavissa suuria eroja esimerkiksi riippuen fosfatidyylikoliinin ja fosfatidihapon määristä. Kasviöljyistä puhuttaessa eri fosfolipidien pitoisuus riippuu öljyn lähteenä käytettyjen papujen laadusta sekä öljyn eristysmenetelmästä, kuten siitä, onko käytössä painepuristus ja/tai uutto. Vesipestyssä kasviöljyssä 60–100 % fosfolipideistä on yleensä fosfatidihapon suolamuotoa. Fosfatidihapon kalsium- ja magnesiumsuolat ovat osittain vaikeasti poistettavia niiden hyvin alhaisen polaarisuuden takia, mikä tekee niistä öljyyn liukenevia. [12]

## 2.3 Entsyymit

### 2.3.1 Yleistä entsyymeistä

Entsyymit ovat luonnon omia katalyyttejä, eli ne nopeuttavat kemiallisia reaktioita itse kulumatta. Lähes kaikki tunnetut entsyymit ovat rakenteeltaan proteiineja. Entsyymit katalysoivat useita eri reaktiotyyppejä, ja tämä luo perustan niiden luokittelulle. Entsyymit ovat hyvin substraattispesifisiä, ja ne nimetään niiden katalysoiman reaktion ja substraatin mukaan; esimerkiksi fosfolipidien hydrolysoitumista katalysoivat entsyymit

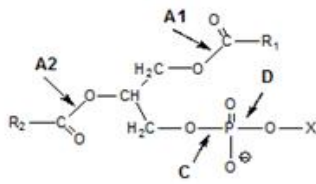
ovat fosfolipaaseja. Substraatiksi kutsutaan molekyyliä, johon entsyymin toiminta kohdistuu. [13, s. 67; 14]

Yleensä entsyymi sisältää aktiivisen ryhmän, joka ei välttämättä ole aminohappo, vaan se voi olla esimerkiksi yksi tai useampi aminohappoon liittynyt metalli-ioni tai orgaaninen molekyyli. Tällaista entsyymin toimintaa auttavaa ryhmää kutsutaan kofaktoriksi, tai jos kyseessä on orgaaninen molekyyli, koentsyymiksi. Entsyymiin kiinnittynyttä kofaktoria tai koentsyymiä kutsutaan prosteettiseksi ryhmäksi. Entsyymi sitoutuu aktiivisesta kohdastaan substraattiin heikkojen sidosten, kuten vetysidosten ja ionisidosten avulla. [13, s. 67; 14]

### 2.3.2 Fosfolipaasit

Fosfolipaasit katalysoivat fosfolipidien estereiden hydrolysoitumista. Toiset fosfolipaasit ovat substraattispesifisempiä tietyille fosfolipidityypeille, mutta osa pystyy katalysoimaan myös muita lipofiilisiä yhdisteitä, kuten triasyyliglyserolia, jos niitä on lisätty fosfolipidien sekaan. Fosfolipaasit jaetaan neljään päätyyppiin: A1, A2, C, D. Näiden neljän fosfolipaasityypin lisäksi puhutaan myös tyypistä B, joka sisältää sekä A1- että A2-aktiivisuutta. Eri fosfolipaasityypit katalysoivat substraatissa eri sidoksia. Fosfolipaaseista käytetään lyhennettä PL, eli jos kyseessä on esimerkiksi fosfolipaasi A1, käytetään lyhennettä PLA1. [15]

Fosfolipaasityypit on jaettu alaryhmiin, jotka sisältävät saman entsyymin isotsyymejä eli toisistaan rakenteeltaan hyvin vähän eroavia entsyymejä, jotka kuitenkin katalysoivat samaa reaktiota. Eri isotsyymit on jaettu ryhmiin niiden toiminnallisuuden mukaan, ja jokainen isotsyymi on nimetty sen spesifisyyden mukaan. Eri alatyypit voivat katalysoida eri fosfolipaasityyppejä, esimerkiksi osa PLA1:n isotsyymeistä on fosfatidihappospesifisiä, mutta osa vaatii tämän lisäksi lysofosfatidin läsnäolon. Kuvassa 5 on esitetty eri fosfolipaasityyppien katalysoimat reaktiokohdat. [7; 15]



X = choline (phosphatidylcholine or PC)

X = ethanolamine (phosphatidylethanolamine, PE)

X = inositol (phosphatidylinositol or PI)

X = hydrogen (phosphatidic acid or PA)

Kuva 5. Fosfolipaasien katalysoimat sidosten katkeamiskohtat. [7]

Fosfolipaaseja voidaan eristää nisäkkäiden kudoksista (enimmäkseen haimasta ja munuaisista), myrkyistä (käärmeen, mehiläisen ja ampiaisen) sekä bakteereista ja homeista (prokaryootiset fosfolipaasit). [16]

PLA1 ja PLA2 poistavat fosfolipidistä rasvahapporyhmän ja korvaavat sen vedyllä muodostaen hydroksyyliiryhmän, jolloin fosfolipidistä tulee hydrofiilinen ja se poistuu vesifaasin mukana. PLA on jaettu kahteen luokkaan, 1 ja 2, jotka määrittävät, kumman rasvahappoketjun entsyymi poistaa. PLA1 irrottaa fosfolipidin ensimmäisessä hiilessä olevan rasvahapon ja PLA2 fosfolipidin keskimmaisessä hiilessä olevan rasvahapon. [12; 15]

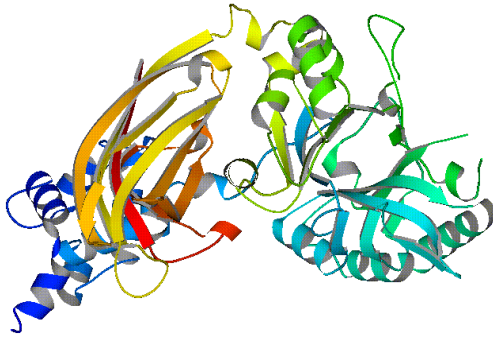
PLA1-entsyymistä on löydetty muun muassa sekä fosfatidihappo- että fosfatidyyliiseriinispesifistä muotoa. Fosfatidyyliiseriini on fosfatidihapon lailla fosfolipideihin kuuluva yhdiste. PLA1 on jaettu kahteen alaryhmään: solunsisäisiin ja solunulkoisiin. Solunsisäisiä muotoja on löydetty kolmea eri tyyppiä ja solunulkoisia ainakin kymmentä eri tyyppiä. [12; 15]

Tällä hetkellä PLA2:sta on tunnistettu 15 ryhmää, jotka ovat jaettu viideksi kategoriaksi: erittyvä PLA2 (sPLA2),  $\text{Ca}^{2+}$ -riippuvainen sytosolinen PLA2 (cPLA2),  $\text{Ca}^{2+}$ -riippumaton PLA2, lipoproteiiniin liittyvä PLA2 (lp-PLA2) sekä lysosomaalinen PLA2. [12; 15]

Erittävää PLA2-entsyymiä on eristetty käärmeen, ampiaisen ja mehiläisen myrkyistä, nisäkkäiden kudoksista (esimerkiksi haimasta ja munuaisista) sekä bakteereista. Erittävät PLA2-muodot ovat yleensä myös  $\text{Ca}^{2+}$ -riippuvaisia. [12; 15; 18, s. 213–220]

PLC (kuva 6) katkaisee esterisidoksen, joka sitoo fosfatidiketjun rasvamolekyylisiin. Tämän ryhmän korvautuessa vedyllä jäljelle jää diglyseridi, jonka kolmannessa hiilessä

on hydroksyyliiryhmä. PLC poistaa teoriassa ainoastaan fosfatidiryhmän eikä näin ollen aiheuta koko rasvamolekyylin poistumista, kuten muut fosfolipaasit. [12; 15]



Kuva 6. Mikrobiaalisen fosfolipaasi C -entsyymin kolmiulotteinen rakenne. [17]

Nisäkkäistä eristetty PLC on yleensä fosfatidyyli-inositolispesifinen, joten sen teho rasvoja ja öljyjä puhdistettaessa saattaa jäädä vähäiseksi. Nisäkkäistä löytyvä PLC sisältää 13 isotsyymiä, jotka on jaettu kuuteen alaryhmään [15]. Sinkkiriippuvainen PLC, joka kuuluu bakteriaaliseen PLC ryhmään, on enimmäkseen fosfatidyylikoliini-spesifisyyteen taipuvainen, mutta siinä on havaittu myös heikosti katalysoivaa aktiivisuutta sfingomyeliiniin sekä fosfatidyyli-inositoliin. Sfingomyeliini on sfingosiniin ja koliinin johdannainen ja kuuluu glykolipideihin. [18, s. 213–220]

PLD katalysoi fosfatidyylikoliinin hydrolysoitumista fosfatidihapoksi vapauttaen samalla koliiniryhmän. PLD-aktiivisuutta on löydetty viruksista, kasveista ja nisäkkäistä. Nisäkkäistä löytyvä PLD-entsyymi on edelleen jaettu kahteen pääryhmään: PLD1 ja PLD2. [15]

## 3 Esikäsittely

### 3.1 Tarkoitus

Kasviöljyistä ja eläinrasvoista voidaan valmistaa biopolttoaineita, mutta ne täytyy ensin puhdistaa, jotta voidaan tuottaa mahdollisimman puhdasta polttoainetta ja välttää prosessilaitteita tukkivilta saostumilta. Epäpuhtaudet voivat aiheuttaa muun muassa emulsifioivia, pilaantumista aiheuttavia sekä lämmönvaihtelun kestävyttä heikentäviä ominaisuuksia. Kasviöljyjä saadaan puristamalla öljykasvien siemenistä ja eläinrasvoja elintarviketeollisuuden sivutuotteena. Kumpaakin on voitu käyttää aiemmin esimerkiksi paistoöljynä tai muussa teollisessa käytössä, ja tästä syystä biopolttoaineiden valmistukseen käytettävät rasvat ja öljyt sisältävät suuriakin määriä epäpuhtauksia. Öljyt ovat kompleksinen seos triasyyliglyseroleja, fosfolipidejä, steroleita, tokofenoleita, vapaita rasvahappoja, metalli-ioneja ja muita pienimolekyylisiä yhdisteitä [11].

Öljyjen ja rasvojen puhdistusta kutsutaan biopolttoaineen valmistuksen yhteydessä esikäsittelyksi ja se sisältää useita vaiheita ja menetelmiä. Esikäsittelyllä pyritään erottamaan öljy ja rasva prosessia haittaavista yhdisteistä, kuten fosfolipideistä, vapaista rasvahapoista ja metalli-ioneista [11].

### 3.2 Vesipesu

Vesipesu on vanhin ja yleisin öljyjen ja rasvojen puhdistusmenetelmä, ja se myös muodostaa kaupallisen lesitiinin tuotannon pohjan. Sitä käytetään erityisesti öljyille, jotka sisältävät hyvin paljon hydratoituvia fosfolipidejä [11]. Vesipesussa öljyyn sekoitetaan noin 1–4 painoprosenttia vettä, jonka määrä pohjautuu yleensä oletettuun fosfolipidimäärään. Öljyt ja rasvat ovat hydrofobisia, jolloin ne eivät liukene veteen juuri ollenkaan. Sen sijaan epäpuhtauksina esiintyvät hydrofiiliset yhdisteet liukenevat veteen hyvin ja muodostavat sen kanssa muita yhdisteitä. Öljy-vesiseos emulgoidaan homogenisaattorilla ja emulsiota sekoitetaan niin kauan, että liukeneminen ja reagoiminen ehtivät tapahtua. Sekoituksen jälkeen liuos sentrifugoidaan, jolloin vesi ja öljy erottuvat omiksi faaseikseen ja voidaan erottaa toisistaan. [12]

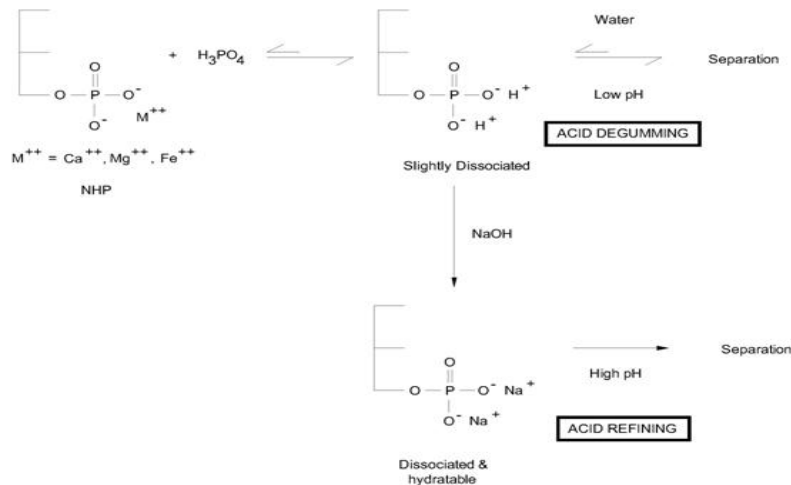
Vesipesussa hydrofiiliset yhdisteet sitovat siis vettä, ja tällöin niistä tulee öljyyn liukenemattomia ja erottuvat eri faasiin. Tällaisia yhdisteitä ovat esimerkiksi hydratoituvat fosfolipidit, jotka kerääntyvät öljyn ja veden rajapintaan ottaen samalla joitain ei-

hydratoituvia fosfolipidejä mukaansa. Myös muita öljyn seassa olevia epäpuhtauksia sitoutuu veden kanssa ja ne voidaan poistaa vesifaasin mukana. Kasviöljyille, kuten oliivi- ja palmuöljyille, vesikäsitelyä ei yleensä tehdä, sillä ne ovat kosketuksissa veden kanssa jo tuotannossaan. [7]

### 3.3 Happopuhdistus

Vesipesun jälkeen tai sen sijaan raakaöljyä tai -rasvaa voidaan puhdistaa happokäsittelyllä, missä raakaöljy tai -rasva käsitellään happo-vesiseoksella. Yleisimmin käytetään sitruuna- tai fosforihappoa. Ei-hydratoituvat fosfatidit (NHP) muuttuvat happokäsittelyssä fosfatidihapoksi sekä kalsium- ja magnesiumbifosfaattisuolaksi. [7; 20]

Happokäsittelyn jälkeen seokseen lisätään natriumhydroksidia, jonka vaikutuksesta fosfatidihapon hydroksyyliyhdistelmä vety korvautuu natriumionilla ja samalla muodostuu vettä. Vesiliukoiset komponentit liukenevat veteen, ja ne on helppo poistaa veden muodostaessa jälleen erillisen faasin. Öljy- ja vesifaasit saadaan erotettua toisistaan sentrifugoimalla. Kuvassa 7 on esitetty happo- ja emäskäsittelyn kemialliset reaktiot. [19; 20]



Kuva 7. Happokäsittelyn kemia. [19]

### 3.4 Adsorptio valkaisumaalla

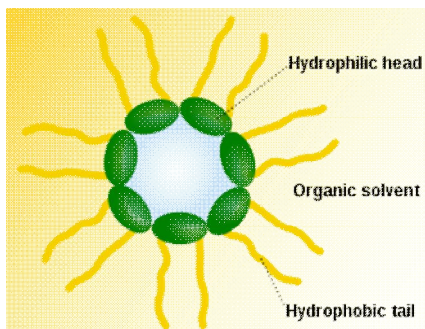
Happokäsittelyn jälkeen jäljellä olevat epäpuhtaudet poistetaan valkaisukäsittelyllä, jossa öljy ja rasva käsitellään adsorptiomaalla. Öljyä käsitellään savella tai hiilellä, johon fosfatidihappo ja metallisuolat adsorboituvat. Tehokkaan adsorption aikaansaamiseksi



tarvitaan huokoista ainesta, mikä lisää adsorptiopinta-alaa. Pinnan täytyy pystyä muodostamaan kemiallisia ja fysikaalisia sidoksia adsorboituvan aineen kanssa. Pigmentit ja muut komponentit jäävät huokoiseen materiaaliin valikoidusti, ja triglyseridit pysyvät liuoksessa. Vaiheittain pigmenttien konsentraatio adsorbenttin pinnan ja öljyn välillä tulee tasapainoon, minkä jälkeen molekyylien vaihtuminen on vähäistä. [21, s. 35-37]

Öljyn ja adsorptiomaan kontaktille täytyy valita optimaalinen lämpötila ja aika. Liian korkea lämpötila tai liian pitkä reaktioaika saattavat aiheuttaa ei-haluttavia sivuvaikutuksia. Reaktiota edesauttaa, kun öljystä on etukäteen poistettu epäpuhtauksia, kuten fosfolipidejä tai saippua-aineita, jotka myös voivat tarttua saven pintaan. Tämä parantaa adsorbenttin vaikutusta jäljellä oleviin epäpuhtauksiin, kuten pigmentteihin ja vaikeasti poistettaviin fosfolipideihin sekä saippuihin, jotka ovat syntyneet natriumhydroksidin ja vapaiden rasvahappojen reagoitessa. [21, s. 35-37]

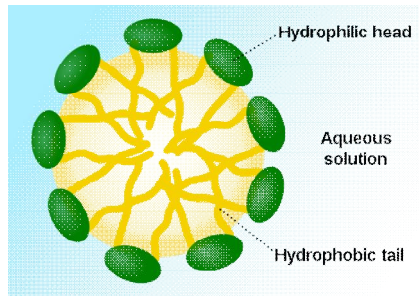
Pieni määrä vettä (n. 0,1 %) parantaa adsorption tehoa, mutta liiallinen vesi saattaa kuitenkin heikentää sitä. Erään tutkimuksen mukaan yhden painoprosentin vesilisäys savimaan kanssa tehostaa adsorptiota, mutta jos savi korvataan muulla maa-aineksella, on mahdollista, että adsorption teho heikkenee. Tutkija Sen Guptan mukaan vedettömät saippuat muodostavat pallomaisia käänteisiä misellejä öljyssä (kuva 8), jossa niiden polaarinen ryhmä on kääntynyt sisäänpäin ja näin ollen ne ovat vaikeammin adsorboituvia. [12; 21, s. 35-37]



Kuva 8. Käänteinen miselli, jossa lipidien polaarinen pää on kääntynyt sisäänpäin, vangiten vesipisaran sisäänsä. [22]

Vettä sisältävät saippuat (0,2–0,4 %) muodostavat lamellaarisia misellejä, joissa polaarinen pää on kääntynyt ulospäin, jolloin ne ovat helpommin adsorboituvia (kuva 9). Lamellaariset misellit ovat yleensä liittyneenä muihin polaarisiin yhdisteisiin ja poistuvat silloin saippuan mukana. Täytyy ottaa huomioon, että savessa on normaalisti luonnos-

taan noin 10 % vettä ja pitoisuus voi olla vielä korkeampi, jopa 20 %, jos adsorptiomaata on säilytetty kosteissa olosuhteissa. [21, s. 35-37]



Kuva 9. Miselli, jossa lipidien polaarinen pää on kääntynään ulospäin. [23]

## 3.5 Öljyjen ja rasvojen entsymaattinen käsittely

### 3.5.1 Aiemmat tutkimukset

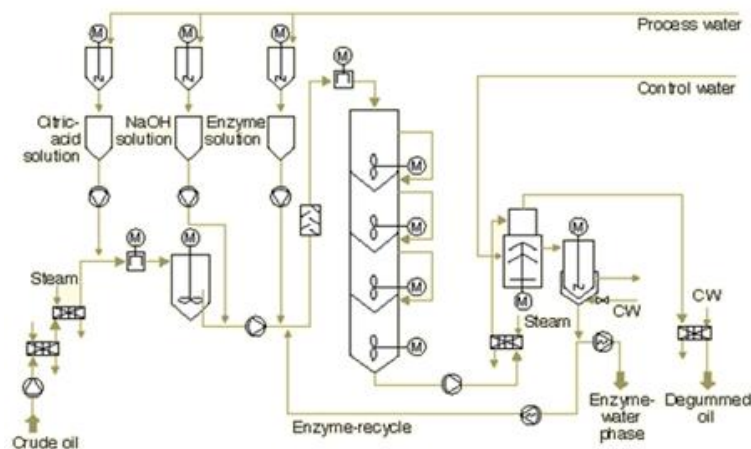
Entsyaattisesta puhdistuskäsittelystä raportoi ensimmäisen kerran 1990-luvulla saksalainen insinööriyhtiö Röhm (myöhemmin nimi on muuttunut muotoon Lurgi). Raportti koski kaupallista Erik Aalrustin patentoimaa EnzyMax®-prosessia, missä fosfolipaasia käytettiin muuntamaan ei-hydratoituvia fosfolipidejä hydratoituvään muotoon, jolloin ne saatiin poistettua sentrifugoinnin avulla. [12; 24]

Aluksi entsyyminä käytettiin fosfolipaasi A2 -entsyymiä, jota yhtiö tuotti eristämällä sitä sian haimasta. Aalrustin patentoimassa prosessissa entsyymi liuotettiin veteen natriumsitraatin ja vahvan emulgaattorin, natriumdodekyylisulfaatin kanssa. Tämän jälkeen entsyymi-vesiseos lisättiin öljyyn, joka oli lämmitetty 50–70 °C:seen. Haimasta eristetty entsyymi on hyvin lämmön kestävä, minkä takia lämpötilaa pystyttiin nostamaan optimiolosuhteita korkeampaan lämpötilaan. Homogenoinnin jälkeen entsyymiin annettiin reagoida fosfolipidien kanssa kolmesta neljään tuntiin, minkä jälkeen näyte sentrifugoitiin faasien erottamiseksi ja lopulliseksi fosforipitoisuudeksi saatiin 3 ppm. [12; 24]

Korkean fosforipitoisuuden omaavia kasviöljyjä ei käytetty, vaan keskityttiin kasviöljyyn, joka sisälsi paljon ei-hydratoituvia fosfolipidejä ja alle 250 ppm fosforia. Prosessissa käytettyä fosfolipaasi A2 -entsyymiä oli saatavilla hyvin rajoitetusti, ja se oli kallista, joten entsyymiä alettiin kierrättää niin, että koko edellisessä erässä poistettu faasi lisättiin seuraavaan puhdistettavaan erään. Entsyymien kierrättämisellä ei kuitenkaan ole koskaan osoitettu olevan suurta hyötyä, sillä entsyymien mukana

seuraavaan erään lisättiin myös edellisessä erässä poistetut epäpuhtaudet. Reaktion ja erottamisen jälkeen saatujen fosfolipidien koostumuksesta ei julkaistu tietoja, joten taloudellista hyötyä EnzyMax® -prosessista ei ole voitu arvioida. [12; 24]

Klaus Dahlken tutkimukset EnzyMax® -prosessista (kuva 10) vahvistivat aiempaa olettamusta, että prosessilla kyettiin poistamaan vain ei-hydratoituvia fosfolipidejä öljystä, ja että vain fosfolipaasi A2:lla saatiin niin hyviä tuloksia, että prosessi oli myös taloudellisesti kannattavaa. Hän havaitsi, että entsyymireaktiosta saatu lysofosfatidihappo on öljyyn liukenematon, ja näin ollen se on poistettavissa vesifaasin mukana vapaan rasvahapon jäädessä öljyyn. [12; 25, s.55-57; 26, s. 278-281]



Kuva 10. Klaus Dahlken muokkaama EnzyMax®-prosessi. [12]

Dahlken muokkaamassa prosessissa säädetään ensin lämpötila entsyymille optimaaliseksi ja lisätään sitruunahappo, homogenisoidaan seos ja annetaan hapon reagoida öljyn kanssa. Tämän jälkeen lisätään natriumhydroksidia, jotta seokseen saadaan entsyymille optimaalinen pH, ja tämän jälkeen lisätään entsyymi ja vesi. Seos homogenisoidaan ja entsyymien annetaan reagoida ei-hydratoituvien fosfolipidien kanssa reaktioastiassa jopa 6 tuntia. Lopuksi lysofosfatidit erotetaan öljystä sentrifugoimalla. [12; 25, s.55-57; 26, s. 278-281]

Aalrustin ja Dahlken tutkimuksissa huomattiin, että on tärkeää emulgoida seos hyvin entsyymien ja veden lisäyksen jälkeen, sillä entsyymaattinen reaktio tapahtuu öljyn ja veden rajapinnassa ja homogenointi lisää reaktiopinta-alaa. [12; 25, s.55-57; 26, s. 278-281]

Kim Clausenin työryhmä kehitti ensimmäisen mikrobiaalisen fosfolipaasi-entsyymin, joka saadaan eristämällä *Fusarium oxysporum* -bakteerista. Fermentoimalla tuotettu fosfolipaasi A1 -entsyymi, Lecitase® Novo, avasi mahdollisuudet suuremman mittakaavan entsyymituotannolle. Tämä mahdollisti sen, että entsyymiä ei tarvinnut kierrättää ja prosessiolosuhteita voitiin optimoida tehokkaammiksi. [12; 27]

Bo Yangin työryhmän julkaisemassa raportissa optimoitiin olosuhteita uuden kaupallisen fosfolipaasi A1 -entsyymin, Lecitase® Ultran, käyttöönottoa varten. Lecitase® Ultra -entsyymiä saadaan eristämällä *Thermomyces lanuginosea* / *Fusarium oxysporum* -mikrobeista, joita voidaan kasvattaa fermentoimalla. Prosessin optimoinnissa käytettiin rypsiöljyä, joka oli aiemmin vesipesty ja jonka fosforipitoisuus ennen entsyymikäsittelyä oli 120,5 ppm. Prosessi toteutettiin teollisessa mittakaavassa tuotantolinjalla, jossa öljyn virtaus oli 400 tonnia vuorokaudessa. Entsyymin optimaaliseksi pH:ksi oli aiemmin määritetty 4,9, joten pH säädettiin lisäämällä öljyyn ensin sitruunahappoa, jonka annettiin reagoida 30 minuuttia, ja tämän jälkeen lisättiin niin paljon emästä, että pH asettui 4,6 ja 5,1 välille. Tässä vaiheessa fosforipitoisuus oli jo laskenut sitruunahapon vaikutuksesta noin puoleen (63 ppm). Entsyymiä lisättiin 40 ppm öljyn määrästä ja itse reaktio tapahtui 48 °C lämpötilassa kuuden tunnin ajan. Reagoanut öljy käsiteltiin lisäksi savella ja hapolla. Entsyymikäsittelyllä fosforipitoisuus laski arvoon alle 10 ppm, mutta kun entsyymaattisesti käsitelty öljy käsiteltiin vielä savella, niin lopulliseksi fosforipitoisuudeksi saatiin 3 ppm. [12; 29, s. 653-658]

Mikrobiperäistä fosfolipaasi A1 -entsyymi Lecitase® Novoa on tutkittu riisileseöljyn ollessa substraattina ja pH oli säädetty optimaaliseksi happo-emäs puskurin avulla ja reaktioaika entsyymin kanssa oli 110 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen käsitelty öljy käsiteltiin 2–4-prosentilla savea ja 0–1 prosentilla aktiivihiltä. Tämän jälkeen öljy käsiteltiin fysikaalisesti, jotta saavutettiin fosforipitoisuus 1–3 ppm. Sentrifugoinnin jälkeistä fosforimäärää ei raportoitu, joten pelkän entsyymaattisen käsittelyn tehoa ei voida verrata muihin tutkimuksiin tai perinteisiin puhdistusmenetelmiin. [12; 30]

Fosfolipaasi C -entsyymiä sisältävän kaupallisen Purifine™ PLC:n käytöstä raportoi ensimmäisenä Svetlana Gramatikova. Entsyymin havaittiin olevan spesifinen fosfatidyylikoliinille ja fosfatidyylietanolamiinille, jotka muodostavat jopa 70 % käsittelemättömän soijaöljyn fosfolipideistä. Käsittelyajaksi patentissa mainittiin kaksi tuntia. [12; 31]

Dayton ja Galhardo ovat julkaisseet patentin, jossa kuvaillaan fosfolipaasi C- ja fosfolipaasi A-entsyymien käyttöä yhdessä. Tällä menetelmällä saadaan täydennettyä fosfolipidien reaktio puhdistusprosessissa. Kahden fosfolipaasityypin yhteisvaikutus saatiin aikaiseksi, vaikka olosuhteet eivät olleet kummallekaan täysin optimaaliset. Reaktioaikaakin pystyttiin pienentämään, niin että sen kesto oli enää 30 minuutista yhteen tuntiin. [11; 12]

Öljyn saannosta on julkaistu tutkimustuloksia soijaöljyn puhdistamisen yhteydessä. Tutkimuksissa on testattu eri entsyymien käyttöä, kun öljyn alkuperäinen fosforipitoisuus oli 720 ppm ja 1000 ppm ja entsyymattista puhdistusta on verrattu muihin puhdistusmenetelmiin (taulukko 2). Yhdessä kokeessa Purifine™ PLC -entsyymiä käytettiin ilman pH:n säätöä ja toisessa testattiin kolmea tapaa saada fosforipitoisuus mahdollisimman alhaiseksi. Yksi tapa oli käyttää Lecitace Ultra® PLA1 -entsyymiä pH:n säädöllä ja toinen oli käyttää Purifine® PLC -entsyymiä pH:n säädöllä ja vesilisäyksellä. Kolmas tapa oli käyttää kumpaakin entsyymiä yhdessä ja säätää pH. [12]

Taulukko 2. Öljyn saanto soijaöljyllä, PLA1 ja PLC entsyymeinä. [12]

<b>Raakaöljy, 720 ppm P, 1,8 % PL, 0,4 % FFA ja 0,3 % DAG</b>	<b>Reaktio pH</b>	<b>Reaktioaika (h)</b>	<b>P lopussa</b>	<b>PL lopussa</b>	<b>FFA lopussa</b>	<b>DAG lopussa</b>	<b>Kuiva-aine pit.</b>
Vesi, ei entsyymiä	7	0,5	120	0,29 %	0,3 %	0,3 %	2,7 %
Vesi + Purifine PLC	7	2	120	0,29 %	0,4 %	1,10 %	1,9 %
Happokäsittely + vesi	hapan tai emäksinen	1-2	<20	0,02 %	0,3 %	0,3 %	3,6 %
Lecitace Ultra PLA1	hapan (pH 4,5)	4-6	<10	0,02 %	0,7 %	0,3 %	1,9 %
PLA1 + PLC	hapan (pH 4,5-7)	2	<10	0,02 %	0,6 %	1,20 %	1,2 %
<b>Raakaöljy, 1000 ppm P, 2,5 % PL, 0,4 % FFA ja 0,3 % DAG</b>	<b>Reaktio pH</b>	<b>Reaktioaika (h)</b>	<b>P lopussa</b>	<b>PL lopussa</b>	<b>FFA lopussa</b>	<b>DAG lopussa</b>	<b>Kuiva-aine pit.</b>
Vesi, ei entsyymiä	7	0,5	120	0,29 %	0,4 %	0,3 %	3,7 %
Vesi + Purifine PLC	7	2	65	0,16 %	0,4 %	1,3 %	1,5 %
Happokäsittely + vesi	hapan (pH 4,5-7)	6-8	10	0,02 %	0,4 %	0,3 %	4,9 %
Lecitace Ultra PLA1	hapan (pH 4,5)	2	10	0,02 %	0,8 %	0,3 %	2,3 %
Vesi + Purifine PLC, muokattu puhdistus	hapan (pH 5,5-7)	1-2	10	0,02 %	0,4 %	1,4 %	2,2 %
PLA1 + PLC	hapan (pH 4,5-7)	2	10	0,02 %	0,9 %	0,9 %	1,1 %

Öljyhävikkiä mitattiin jokaisessa prosessivaihtoehdossa, paitsi happokäsittelyssä myös käyttäen säiliön asteikkoa ja massavirtausmittaria reaktiotuotteille. Öljyhävikkiä pystyttiin arvioimaan myös reaktiotuotteessa olevan glyserolipitoisuuden perusteella. [12]

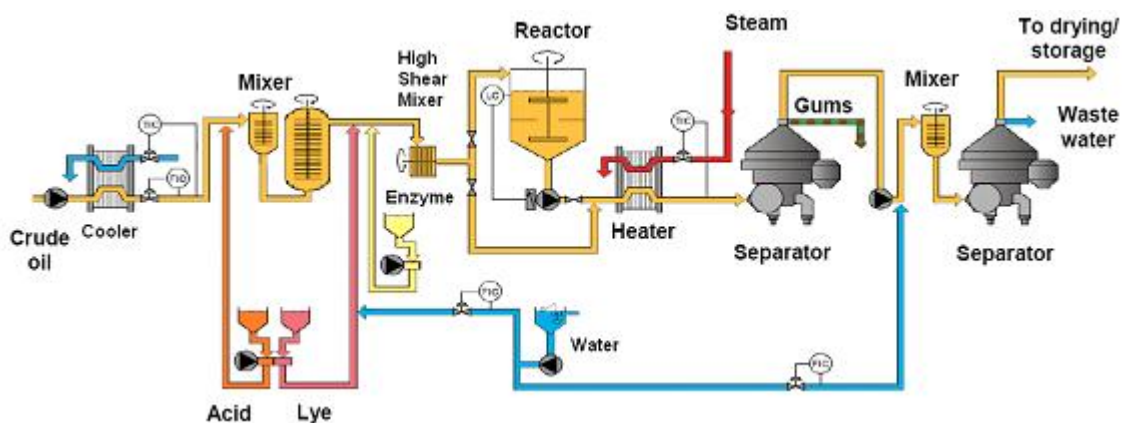
Johtopäätös tästä oli, että öljyn hävikki ei ole verrannollinen fosfolipidien määrään käsittelemättömässä öljyssä ja hävikki voi olla jopa vähäisempää kuin fosfolipidien

alkuperäinen määrä käsittelemättömässä öljyssä, etenkin PLC-entsyymiä käytettäessä. Perinteisillä puhdistusmenetelmillä sen sijaan hävikin määrä kasvaa ja sen määrä on yleensä moninkertainen käsittelemättömässä syötössä olevaan fosfolipidin määrään verrattuna. [12]

### 3.5.2 Käyttö

Entsyymien käyttöä on tutkittu pääasiassa kasviperäisten öljyjen, kuten rypsin ja soijaöljyn puhdistamisessa. Entsyymaattisella käsittelyllä halutaan poistaa öljyssä olevia epäpuhtauksia, kuten fosforia, typpeä ja metalleja. Erityisesti fosfolipideissä olevaa fosforia halutaan vähentää sen emulgoivien ominaisuuksiensa vuoksi. Aiemmin tehtyjen tutkimusten perusteella kasviöljyn fosforin poistamiseen sopivat parhaiten fosfolipaasit. [12; 29]

Yksi tapa vähentää fosfolipidien emulgoivia ominaisuuksia on erottaa niiden pooliset ja poolittomat osat toisistaan, ja tähän fosfolipaasi -entsyymit sopivat hyvin. Ne ovat luonnollisia selektiivisiä katalyyttejä, jotka reagoivat kohtuullisessa lämpötilassa ja pH:ssa. Kemialliseen puhdistukseen verrattuna entsyymikatalysoidut reaktiot ovat selektiivisempiä ja vähentävät paremmin ei-toivottujen sivuyhdisteiden syntyä. Kuvassa 11 on yksinkertaistettu kaavio öljyn entsyymaattisesta puhdistusprosessista.



Kuva 11. Yksinkertaistettu kaavio öljyn entsyymaattisesta puhdistusprosessista. [12]

Öljyn ja rasvan puhdistuksessa käytettävät entsyymit vaativat tietyt olosuhteet aktivoituaakseen. Aktiivisuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat lämpötila, pH, entsyymin ja substraatin määrä, veden määrä sekä reaktioaika [11]. Lämpötilan ollessa liian korkea

entsyymiproteiini denaturoituu, jolloin entsyymi tuhoutuu. Kaupalliset fosfolipaasit toimivat yleensä lämpötilan ollessa 40–70 °C. Lämpötilan ollessa liian matala entsyymin toiminta hidastuu, ja tästä syystä entsyymejä säilytetään yleensä kylmässä tai pakastimessa, jolloin niiden käyttöikä pitenee huomattavasti. [12]

Sitruunahapon ja natriumhydroksidin lisäys vaikuttaa entsyymaattisen puhdistusprosessin yhteydessä kahdella tavalla. Oikeassa suhteessa lisättyinä pH asetuu arvoon, jossa entsyymi toimii parhaiten, ja osa fosfolipideistä muuttuu hydratoituvaan muotoon. Entsyymien toimintalämpötilat ovat tarpeeksi matalia, jolloin emäksen lisäyksestä johtuvaa saippuoitumista ei pääse tapahtumaan ja toisaalta tarpeeksi korkeita, jotta emulsio pysyy stabiilina. Entsyymien määrä riippuu valmistajan ohjeesta, ja annostus on tyypillisesti välillä n. 30–200 ppm. [12]

Öljyn, veden ja entsyymin seos täytyy homogenoida, jotta syntyy stabiili emulsio, sillä entsyymaattinen reaktio tapahtuu öljyn ja veden rajapinnassa. Emulsiota sekoitetaan koko reaktion ajan. Kun reaktio on edennyt tarpeeksi, seos lämmitetään vielä 75–85 °C:seen ja faasit separoidaan erilleen. [12]

Lopullinen fosforipitoisuus riippuu siitä, kuinka tehokkaasti PA:sta ja PE:sta on saatu poistettua metalleja, mutta myös entsyymin spesifisyydestä ja fosfolipidien muuntumisesta reagoineeseen muotoon, joko polaariseksi (kuten lysofosfolipidit ja fosforiesterit) tai erittäin epäpolaariseksi (rasvahapot ja diglyseridit). [12]

Perinteisiin puhdistusmenetelmiin verrattuna entsyymaattisella käsittelyllä on monia etuja: sillä voidaan saada vähennettyä tarvittavien kemikaalien ja syntyvän jäteveden määrää sekä öljyhävikkiä; lisäksi entsyymeillä (kuten muillakin katalyyteillä) saavutetaan myös energiasäästöä. [32]

Öljyn ja rasvan entsyymaattinen käsittely muuttaa fosfolipidien rakennetta enemmän kuin verrattuna perinteiset puhdistusmenetelmät. Hydrolysoituneet fosfolipidit ovat vähemmän viskooseja ja tiheämpiä nesteessä esiintyessään, ja lisäksi ne ovat vähemmän emulgoivia. Hydrolysoidut fosfolipidit liukenevat hyvin lämpimään veteen. [12]

Entsyymaattista ja perinteistä menetelmää voidaan vertailla kolmella tavalla: analyttiset mittaukset reaktiotuotteista (fosforimäärän ja fosfolipidijakauman muutokset), kuiva-aineen massavirtauksen mittaaminen reaktiotuotteista (entsyymikäsittelyn tehoa

voidaan epäsuorasti mitata reaktiotuotteiden massan vähenemisestä) sekä varastotappion laskeminen (öljymassan mittaaminen ennen käsittelyä ja sen jälkeen). [12]

### 3.5.3 Kannattavuuden huomioiminen

Entsyymien käyttö eloperäisten öljyjen puhdistuksen apuaineena auttaa vähentämään puhdistusprosessin öljyhävikkiä. Jotta entsyymien käyttö olisi kannattavaa, täytyy ottaa huomioon, että öljyhävikin pienenemisestä syntyvien säästöjen on oltava suurempia kuin entsyymien käytöstä aiheutuvat kustannukset. Kannattavuuslaskelmissa täytyy ottaa huomioon kemikaalien (entsyymi, happo, emäs ja adsorbentti) hinnan lisäksi energiakustannukset. [12]

Fosfolipaasi-entsyymejä on mikrobi-, kasvi- ja eläinperäisiä. Kaupalliset fosfolipaasit ovat yleensä kasvi- tai mikrobiperäisiä. Tällöin ne ovat kohtuuhintaisia ja niiden saatavuus on hyvä. Fermentoimalla tuotetut fosfolipaasit soveltuvat myös teollisen mittakaavan prosesseihin. Eläinperäiset fosfolipaasit ovat yleensä kalliita ja vaikeasti saatavia, sillä niitä eristetään esimerkiksi sian haimasta. Ne eivät sovellu ison mittakaavan prosesseihin, vaan niitä käytetään lähinnä erilaisissa lääketieteellisissä tutkimustarkoituksissa. [12]

Eri lähteistä saatavat fosfolipaasit toimivat eri olosuhteissa, sillä esimerkiksi eläinperäiset fosfolipaasit ovat erittäin spesifisiä lämpötilan ja pH:n suhteen, kun taas kaupalliset fermentoimalla saadut fosfolipaasit sallivat suuremman vaihtelun. Kaupallisten entsyymien taloudellinen hyöty riippuu siitä, kuinka selektiivinen kyseessä oleva entsyymi on ja mikä on sen annoshinta. [12]

## 3.6 Muita entsyymaattisia prosesseja

Entsyymejä käytetään teollisuudessa moniin eri tarkoituksiin. Yleisimpiä teollisuuden aloja, joissa entsyymejä käytetään, ovat elintarviketeollisuus, pesuaineteollisuus, metsäteollisuus, lääketeollisuus ja öljynjalostus. Entsyymejä käytetään paljon myös geenitekniikan tutkimuksessa. Entsyymejä voidaan saada mikrobituotteina tai niitä voidaan eristää kasvi- tai eläinmateriaalista. [33]

Suomessa teollisia entsyymejä on käytetty 1950-luvulta asti. Maltaat olivat ensimmäisiä teollisesti merkittäviä entsyymituotteita. Niitä käytetään muun muassa polttimoissa, panimoissa ja leipomoissa, ja ne sisältävät muun muassa amylaasia, joka pilkkoo tärk-



kelystä, jolloin muodostuu maltoosia ja muita käymiskelpoisia yhdisteitä sekä proteaaseja ja peptidaaseja, jotka pilkkovat proteiineja peptideiksi ja aminohapoiksi. Lisäksi niissä esiintyy viljapohjaisten raaka-aineiden viskositeettia alentavaa beta-glukanaasia ja rasvapitoisuutta alentavaa lipaasia. [34]

Amylaasi on yleisnimitys kaikille tärkkelystä pienemmiksi hiilihydraattiyhdisteiksi pilkkoville entsyymeille ja ne on jaettu eri tyyppeihin. Alfa-amylaasia, joka pilkkoo tärkkelystä oligosakkarideiksi, saadaan mikrobittuotona ja beta-amylaasia, joka pilkkoo tärkkelystä maltoosiksi, saadaan ohrasta. Glukoamylaasin (tai gamma-amylaasi) pilkkomistuotteena syntyy glukoosia. Isoamylaasi eli pullulanaasi pilkkoo tärkkelystä amyloosiksi ja amylopektiiniksi. Amylaasi-entsyymejä käytetään paljon leipomoteollisuudessa ja monesti ne sisältävät myös muita aktiivisuuksia, kuten ksylanaasi- tai proteaasiaktiivisuuksia. [13; 34]

Proteaasi on yleisnimitys entsyymeille, jotka pilkkovat tai muokkaavat proteiineja ja peptidejä. Proteaasit on jaettu kuuteen luokkaan: seriini-, treoniini-, kysteiini-, aspartaatti-, metallo- ja glutamiinihappoproteaasi. Leipomoteollisuuden lisäksi niitä käytetään muussa elintarviketeollisuudessa esimerkiksi aromin muokkaajana, parantamaan liha- ja kalatuotteiden rakennetta tai olutteollisuudessa lisäaineena. Proteaaseja on hyvin paljon erilaisia, ja niille löytyy elintarviketeollisuuden lisäksi sovelluksia ainakin tekstiiliteollisuudesta ja pesuaineteollisuudesta. Esimerkiksi substilisiini on pesuaineentsyymi, joka pilkkoo veren ja kanamunan proteiinien aiheuttamia tahroja. Pesuaineentsyymit eivät saa olla kovin substraattispesifisiä, sillä niiden täytyy pilkkoa monenlaisia proteiineja. Pesuaineentsyymien täytyy olla myös melko kestäviä ja sietää erilaisia olosuhteita. Parhaiten pesuaineisiin soveltuvia proteaasi-entsyymejä on löydetty *Bacillus*-suvun mikrobeista. Esimerkiksi *Bacillus licheniformis* tuottaa haluttuja ominaisuuksia sisältäviä entsyymejä, joten sitä käytetään tuottamaan entsyymejä pyykinpesuaineisiin. [33; 34]

Ksylanaasi kuuluu hemisellulaaseihin, ja se hydrolysoi polysakkaridi beta-1,4-xylaanin hajoamista ksyloosiksi. Se irrottaa polysakkaridin hemisellulosamolekyylistä, mikä on kasvisoluseinien päärakennusaineita. Hemisellulaaseja käytetään leipomoteollisuuden lisäksi puu- ja paperiteollisuudessa, alkoholiteollisuudessa ja hedelmämeijerijä ja rehun tuotannossa. Ksylanaasin lisäksi muita hemisellulaaseja ovat (beta-)glukanaasit, galak-

tosidaasit, mannanaasit ja pentonaasit, jotka kaikki katalysoivat hemiselluloosan hajottamista. [35; 36]

Ei-märehtivien eläinten elimistö ei kykene pilkkomaan rehussa olevaa fosforia sisältävää fytiiniä. Siksi näiden eläinten rehujen ruokinnassa käytetään fytaasia, joka vapauttaa fosfaattia fytiinihaposta (toiselta nimeltään inositoli-heksakisfosfaatti), jolloin eläimen elimistö pystyy hyödyntämään fosfaatin. Fytaasi on yksi Suomen eniten tuotetuista entsyymeistä. [34; 37]

Pektinaasit pilkkovat pektiinejä, jotka ovat suurimolekyylisiä hiilihydraatteja. Pekiinejä on erityisen paljon esimerkiksi raaissa kuorimarjoissa, omenoissa ja sitrushedelmissä. Marjojen kypsyessä niiden pektiinipitoisuus laskee. Pekiiniä on marjojen ja hedelmien soluseinissä, ja pektinaasi pilkkoo sitä, jolloin soluseinät pehmenevät. Pektinaasia käytetään esimerkiksi viinien ja mehujen valmistuksen mehustusvaiheessa, jotta saadaan parempi mehu- ja värisaanto. [33; 38]

## KOKEELLINEN OSA

### 4 Materiaalit

Kokeellinen osuus koostui useasta vaiheesta. Ennen kokeita tehtiin koesarjasuunnitelma käsiteltäville öljyille. Käsittelyssä on yksi entsyymi kerrallaan ja ennen varsinaisia kokeita määritettiin entsyymin aktiivisuus titrimetrisesti. Ennen isompia koesarjoja testattiin entsyymin tehoa pienempään määrään raakaa öljyä ja edettiin koesarjassa niistä saatavien tulosten perusteella. Kaikkien kokeissa käytettyjen liuosten valmistuslaskut ovat liitteessä 2.

#### 4.1 Syöttöaineet

(A) Rypsiöljy RSO 758

- Fosforipitoisuus n. 220 ppm

(B) Eläinrasva AF 417

- Fosforipitoisuus n. 123 ppm. Vaikeasti puhdistuva.

#### 4.2 Entsyymit

Tutkimuksessa käytettiin entsyymeinä fosfolipaaseja, jotka on esitelty alla olevassa taulukossa 3. Taulukossa on myös valmistajien ilmoittamat entsyymien pH- ja lämpötilaoptimi ja toiminta-alueet. Liitteessä 1 on esitetty vertailu entsyymeistä, joita oli saatavilla tai jotka ovat kaupallisia.

Taulukko 3. Kokeissa käytetyt entsyymivalmisteet.

Entsyymi	Valmistaja	Tuotenimi	Tuotto-organismi	pH- optimi	pH-alue	T- optimi (°C)	T-alue (°C)
PLA2	AB Enzymes	Rohalase PL-Xtra	<i>Trichoderma reesei</i>	3,5–5,5	3,0–6,0	50–55	50–58
PLC	Sigma-Aldrich	Phospholipase C	<i>Bacillus cereus</i>	7,3	6,6–8,0	37	ei tiedossa

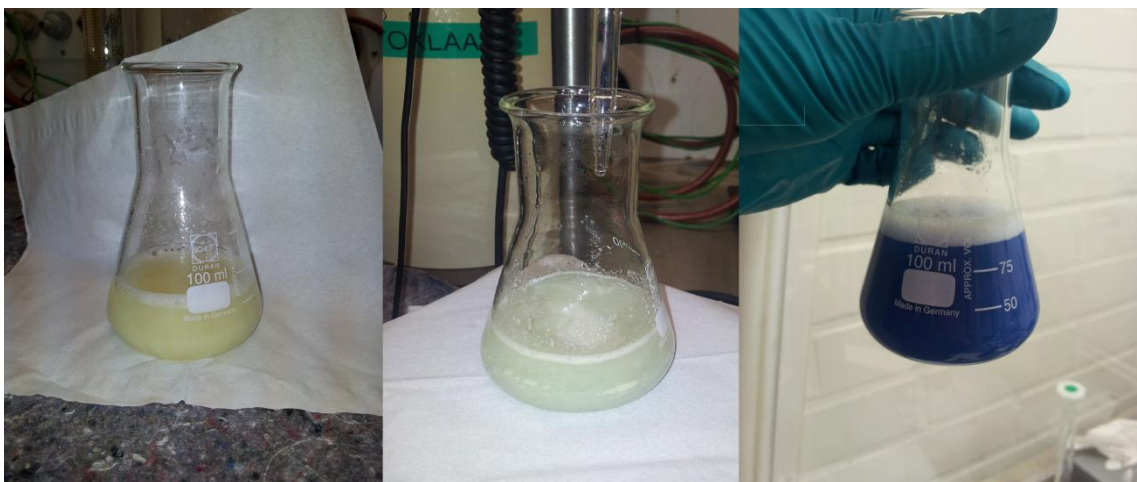
## 5 Menetelmät ja työn suoritus

### 5.1 Fosfolipaasiaktiivisuuden määrittäminen

Fosfolipaasin aktiivisuutta kuvaa lipaasiyksikkö (U). Yksi lipaasiyksikkö on se määrä entsyymiä, joka vapauttaa yhden mikromoolin titrattavia vapaita rasvahappoja minuutissa tietyissä olosuhteissa. [39]

Aktiivisuus määritettiin titrimetrisesti. Määrittämisessä käytettiin substraattina L- $\alpha$ -fosfatidyylikoliinia (Sigma P3556) eli lesitiiniä. Substraattiliuos valmistettiin sekoittamalla lesitiiniä veteen, niin että lesitiinipitoisuus liuoksessa oli n. 60 g/l. Liuokseen lisättiin kalsiumkloridia ( $\text{CaCl}_2$ ) 20 millimoolia litraa kohden ja pH säädettiin arvoon 4,5 0,1 M suolahapolla (HCl) tai arvoon 8,0 0,1 M natriumhydroksidilla (NaOH). Substraattiliuosta homogenisoitiin yhden minuutin ajan.

Lesitiinin hydrolysoitumisreaktiota varten mitattiin 25 ml substraattiliuosta ja 1 ml entsyymilaimennosta. Ennen entsyymin lisäystä substraatti termostoitettiin reaktiolämpötilaan 15 minuutin ajan. Reaktio tehtiin joko 40 °C:ssa tai 45 °C:ssa entsyymistä riippuen ja liuosta sekoitettiin koko inkuboinnin ajan. Inkubointiaika oli 15 minuuttia, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin 20 ml laimentamattomalla etanolisäyksellä. Vapautuneet rasvahapot titrattiin 0,05 M natriumhydroksidilla tymoliftaleiini indikaattorina. Kuvassa 12 on liuoksen väri eri vaiheissa titrausta. Laskut ja ohjeet liuosten valmistukseen löytyvät liitteestä 3.



Kuva 12. Liuoksen väri ennen titrausta, titrauksen lopussa ja reilusti yli titrattuna.

## 5.2 Happokäsittely

Öljy lämmitettiin haluttuun lämpötilaan ja siihen lisättiin sitruunahappo. Seos homogenisoitiin, minkä jälkeen seokseen lisättiin vettä sekä tarpeen vaatiessa natriumhydroksidia. Seos homogenisoitiin uudelleen ja sen annettiin reagoida tietty aika. Reaktion lopuksi seos sentrifugoitiin, jotta saatiin poistettua epäpuhtaudet sisältävä vesifaasi.

## 5.3 Savikäsittely

Öljy lämmitettiin haluttuun lämpötilaan ja siihen lisättiin sitruunahappo ja vesi. Seos homogenisoitiin, minkä jälkeen se siirrettiin reaktiokolveihin ja termostoinnin jälkeen siihen lisättiin adsorptiomaan. Adsorptiomaan annettiin reagoida tietyssä paineessa tietty aika, minkä jälkeen seos kuivattiin nostamalla lämpötilaa. Tämän jälkeen seos suodatettiin kiintoaineen ja epäpuhtauksien erottamiseksi öljystä.

## 5.4 Entsymaattinen käsittely

### 5.4.1 Rohalase PL-Xtra

Ennen kokeiden aloitusta testattiin entsyymin aktiivisuus titrimetrisesti. Ennen koesuunnitelman mukaisia testejä tehtiin aluksi haarukoivia kokeita, joilla etsittiin entsyymin toiminnalle sopivia olosuhteita. Ensimmäiseksi kokeiltiin PLA2-entsyymiä (Rohalase PL-Xtra). Aikaisempien tutkimuksien perusteella sitä oli käytetty kasviöljyjen puhdistamisessa menestyksekkäästi, joten aluksi otettiin kohteeksi tämän entsyymin testaaminen rypsiöljyyn [11]. Haarukoivien kokeiden olosuhteet on esitetty kuvassa 13.

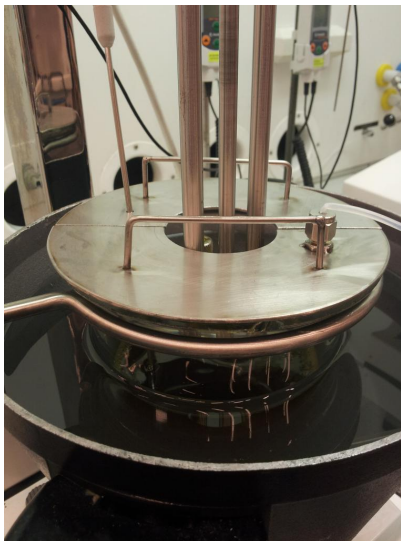
#### Haarukoivat kokeet:

RSO 320 g  
 Y ppm CA + X ppm NaOH  
 + Z % H<sub>2</sub>O +30 tai 60 ppm PLA2  
 T = 50-58 °C  
 T = 2,5 - 6 h

Kuva 13. Haarukoivien kokeiden suoritusolosuhteet.

Haarukoivissa kokeissa entsyymiä kokeiltiin käsittelemättömään rypsiöljyyn, niin että öljy lämmitettiin lasisessa reaktioastiassa öljyhautteessa noin 50 °C:seen (entsyymin optimilämpötila-alue on 50–58 °C) ja lisättiin 3 p-% ionivaihdettua vettä, mahdollisesti happoa ja emästä pH:n säätämiseksi, sekä entsyymiä valmistajan suositusten

mukaisesti. Seosta homogenoitiin minuutti, minkä jälkeen näytettä inkuboitiin öljyhautteessa tietty aika (kuva 14). Inkuboinnin päätteeksi entsyymi lämpödenaturoitiin ja näyte käsiteltiin samoin kuin edellä mainituissa kokeissa.



Kuva 14. Näyte öljyhautteessa.

Taulukossa 4 on esitetty kaikki haarukoivien kokeiden parametrit. Haarukoivia kokeita tehtiin seitsemän, ja niissä muutettiin aina yhtä parametria kerrallaan. Muuttujia olivat inkubointiaika, entsyymin määrä, veden määrä ja kemikaalilisäykset. Ensimmäisessä kokeessa vettä lisättiin niin, että vettä punnittiin tasan 3 p-% öljyn määrästä, mutta muissa kokeissa vettä punnittiin niin, että näytteen kokonaisvesimäärä oli taulukossa mainittu prosenttimäärä. Kokonaisvesimäärään vaikutti käsiteltävän öljyn vesipitoisuus, sekä muiden kemikaalien ja entsyymin mukana tuleva vesi.

Taulukko 4. Haarukoivien kokeiden parametrit.

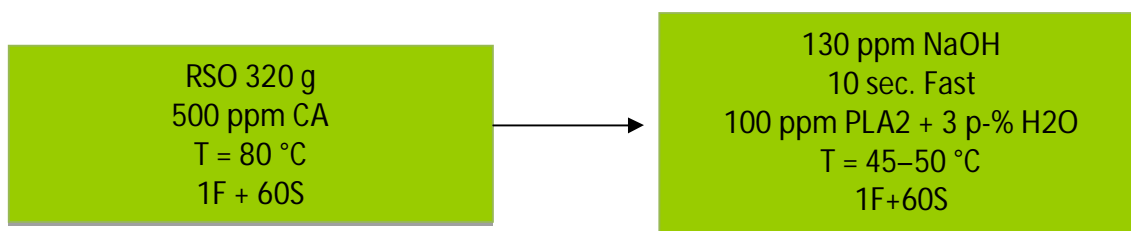
Koenumero	Y =CA	X =NaOH	Z =H2O	Entsyymi	Aika
1			3 %	30 ppm / 100 U	2,5 h
2			3 %	30 ppm / 100 U	4 h
3			3 %	30 ppm / 100 U	6 h
4			3 %	60 ppm / 200 U	2,5 h
5	1400 ppm		2 %	30 ppm / 100 U	2,5 h
6	1400 ppm		2 %	30 ppm / 100 U	6 h
7	125 ppm	25 ppm	2 %	30 ppm / 100 U	2,5 h

Todettiin, että haarukoivilla kokeilla testattavaa entsyymiä ei saatu toimimaan, joten etsittiin parempia parametreja, kunnes löydettiin olosuhteet, joissa entsyymi saatiin toimimaan eli saatiin kokonaisfosforin määrää pienennettyä lopputuotteessa.

Kokeissa, joissa entsyymi toimi, punnittiin ensin öljy reaktioastiaan ja lämmitettiin 80 °C:seen. Joukkoon lisättiin 500 ppm sitruunahappoa, homogenoitiin seosta yhden minuutin ajan ja sekoitettiin 60 minuutin ajan. 60 minuutin sekoituksen aikana lämpötilan annettiin laskea 45 °C:seen. Lämpötila laskettiin alle inkubointilämpötilan, koska homogenointi nostaa lämpötilaa muutamalla asteella, joten tällä toimenpiteellä pyrittiin estämään entsyymin lämpödenaturoituminen.

Jäähdyttämisen jälkeen lisättiin 130 ppm natriumhydroksidia ja seosta homogenisoitiin 10 sekuntia. Sitruunahappo ja natriumhydroksidi muodostivat tällöin heikon puskurin, jonka pH oli 4,5, ja tämä oli käytettävän entsyymin optimialueella. Seokseen lisättiin entsyymi sekä 3 p-% ionivaihdettua vettä, homogenisoitiin minuutti ja inkuboitiin 60 minuutin ajan 50 °C:ssa (sekoitusnopeus 250 rpm).

Inkuboinnin päätteeksi entsyymi denaturoitiin nostamalla lämpötila 90 °C:seen 15 minuutiksi. Denaturoinnin jälkeen näytettä sentrifugoitiin 30 minuuttia, 4430 rpm nopeudella, 70 °C:ssa. Tämän jälkeen öljy suodatettiin vielä 2 µm suodatinpaperin läpi, niin että kaadettaessa otettiin vesifaasi talteen pH:n tarkistusta varten. Suodatettu öljy pulloitettiin ja lähetettiin analysoitaviksi. Kuvassa 15 on parametrit olosuhteista, joissa entsyymi saatiin toimimaan.

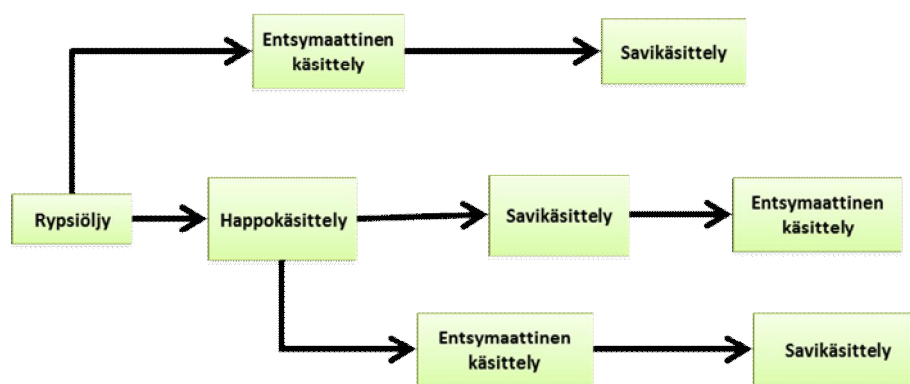


Kuva 15. Parametrit olosuhteille, joissa entsyymi toimi.

Jokaiselle entsyymikokeelle tehtiin myös nollakoe, joka toistettiin muuten täysin samalla tavalla kuin entsyymikoe, mutta ilman entsyymiä. Myös lämpödenaturointi tehtiin, vaikka entsyymiä ei ollut lisättyä. Nollakoe tehtiin, jotta saatiin tietää, onko mahdollisesti vähentynyt fosfori poistunut entsyymin ansiosta vai lämpötilan tai pH:n säätökemikaalien ansiosta.

Kun entsyymin todettiin toimivan käsittelemättömälle rypsisyötölle, voitiin kokeita alkaa tehdä järjestelmällisesti myös eri tavoin käsitellyille rypsiöljylle. Rypsiä oltiin esimerkiksi happo- ja savikäsitelty ennen entsyymikäsitelyä tai sen jälkeen. Kuvassa 16 on esitetty

kokonaisuudessaan kaavio, jonka mukaan entsyymattista käsittelyä kokeiltiin eri tavoin käsitellyille rypsiöljyille. Koesuunnitelman mukaisia kokeita tehtiin 11 kappaletta ja niiden koenumerot ovat 8-18.



Kuva 16. Koesuunnitelma rypsiöljyn käsittelystä.

#### 5.4.2 Sigma PLC

Toiseksi testattavaksi entsyymiksi oli valittu Sigma-Aldrichin fosfolipaasi C -entsyymi (PLC), jota testattiin käsittelemättömään rypsiöljyyn. Entsyymi oli jauhemainen, joten ensimmäiseksi se liuotettiin 10 ml:ksi. Liuos pakastettiin 1 ml:n erissä säilyvyyden takaamiseksi. Ennen varsinaisia kokeita testattiin entsyymin aktiivisuus. Ensimmäisessä kokeessa öljyyn (320 g) lisättiin 1 ml entsyymiliuosta, 370 ppm sitruunahappoa, 350 ppm natriumhydroksidia ja 2 p-% vettä. Näytettä inkuboitin 2,5 h valmistajan ilmoittamassa optimilämpötilassa (37 °C). Reaktion lopuksi entsyymi lämpödenaturoitiin ja näyte käsiteltiin samalla tavalla kuin aiemmissa kokeissa.

Haarukoivia kokeita jatkettiin niin, että vesifaasin pH säädettiin puskuriliuksen avulla entsyymin valmistajan ilmoittamaan optimiin 7,3. Puskuriliuos tehtiin niin, että valmistettiin ensin 0,1 mol/l kaliumdivetyfosfaatti (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) -liuos sekä 0,1 mol/l natriumhydroksidi (NaOH) -liuos. Puskuriliuosta varten mitattiin 100 ml 0,1 mol/l kaliumdivetyfosfaattiliuosta ja siihen lisättiin 74 ml 0,1 mol/l natriumhydroksidiliuosta.

Tätä puskuriliuosta lisättiin 10 ml 80 °C:seen lämmitettyä rypsiöljyä. Seosta homogenisoitiin yhden minuutin ajan, ja se jäähdytettiin normaalsekoituksella noin 35 °C:seen. Jäähdytyksessä kului aikaa noin 1,5 h. Kun näyte oli jäähtynyt, siihen lisättiin 2 ml entsyymiliuosta ja seosta homogenisoitiin jälleen minuutin ajan ja säädettiin lämpötila 37 °C:seen. Vettä ei lisätty erikseen, sillä puskuriliuksessa oleva vesi laskujen mukaan riitti kattamaan 3 p-% vesilisäyksen (liite 2).



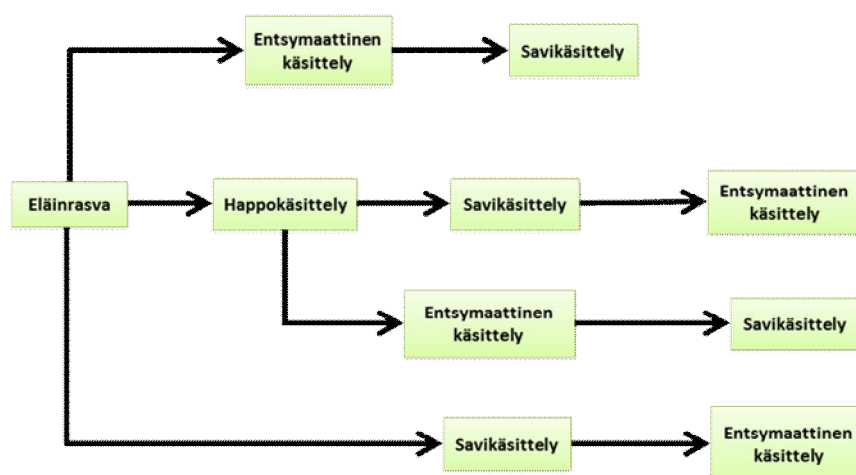
Seuraavassa haarukoivassa kokeessa tehtiin ensin kymmenkertaisesti vahvempaa puskuriliuosta, jotta oikea pH saataisiin pidettyä koko reaktion ajan. Valmistettiin 1 mol/l olevat liuokset samoista kemikaaleista ja sekoitettiin niitä samassa suhteessa kuin aiemmin. Koe toistettiin muuten samalla tavalla kuin edellä, mutta puskuriliuosta lisättiin 5 ml ja entsyymiä 5 ml. Vettä ei lisätty tämän lisäksi ollenkaan, sillä lisätyt entsyymi- ja puskuriliuokset sisälsivät niin paljon vettä, että veden määrä öljyssä lisäysten jälkeen oli 3,5 p-%. Taulukossa 5 on PLC-kokeiden parametrit.

Taulukko 5. Haarukoivien kokeiden parametrit PLC-entsyymiä käyttäen.

Koenumero	Ents. annostus	Ents. aktiivisuus	Lisäykset	Aika
20	1 ml	62,5 U/ml	370 ppm CA, 350 ppm NaOH, 2 p-% H <sub>2</sub> O	2,5 h
21	2 ml	10 U/ml	10 ml 0,1 mol/l puskuriliuos	1 h
22	5 ml	10 U/ml	5 ml 1 mol/l puskuriliuos	1 h
23	5 ml	10 U/ml	5 ml 1 mol/l puskuriliuos	2,5 h
24	5 ml	10 U/ml	5 ml 1 mol/l puskuriliuos	6 h
25	nollakoe	-	20 ml 0,1 mol/l puskuriliuos	1 h
26	nollakoe	-	5 ml 1 mol/l puskuriliuos	1 h

## 5.5 Eläinrasva

Eläinrasvalle tehtiin ainoastaan haarukoivia kokeita Rohalase PL-Xtra PLA2 -entsyymillä. Eläinrasvallekin tehtiin koesuunnitelmakaavio, mutta aikataulun ja käsiteltävyyden puitteissa tehtiin pelkkiä haarukoivia kokeita käsittelemättömälle eläinrasvalle, joilla pyrittiin löytämään olosuhteet, joissa entsyymi toimisi. Kuvassa 17 on alkuperäinen koesuunnitelma eläinrasvalle.



Kuva 17. Alkuperäinen koesuunnitelma eläinrasvan käsittelystä.

Ensimmäisessä kokeessa rasva kuumennettiin entsyymien valmistajan ilmoittamaan entsyymien optimilämpötilaan ja lisättiin sekaan 3 p-% ionivaihdettua vettä sekä 30 ppm entsyymiä. Seos homogenisoitiin ja sen annettiin reagoida tunnin ajan sekoituksen ollessa koko ajan päällä. Loput kokeet suoritettiin samalla tavalla kuin rypsiöljylle tehdyt kokeet, joissa entsyymi oli saatu toimimaan. Entsyymikäsittelyä testattiin myös suuremmalla entsyymipitoisuudella ja pidemmällä reaktioajalla. Tarkemmat parametrit ovat taulukossa 6.

Taulukko 6. Eläinrasvalle tehtyjen kokeiden parametrit

Koenumero	Entsyymien määrä	CA	NaOH	Vesi	Reaktioaika
27	Nollakoe	500 ppm	130 ppm	3 %	1 h
28	30 ppm / 100 U	-	-	3 %	2,5 h
29	300 ppm / 1000 U	500 ppm	130 ppm	3 %	1 h
30	300 ppm / 1000 U	500 ppm	130 ppm	3 %	1 h
31	6250 ppm / 20 000 U	500 ppm	130 ppm	3 %	1 h
32	6250 ppm / 20 000 U	500 ppm	130 ppm	3 %	2,5 h
33	6250 ppm / 20 000 U	500 ppm	130 ppm	3 %	6 h

## 6 Tulokset

### 6.1 Rypsiöljy

#### 6.1.1 Rohalase PL-Xtra

Kaikista käsitellyistä ja käsittelemättömistä näytteistä mitattiin metallipitoisuudet, fosfolipidijakauma, glyseridit, vesi ja typpi.

Näytteet analysoitiin Neste Oilin analytiikan laboratoriossa, asiaankuuluvilla laitteistoilla. Fosfolipidit ja fosfolipidijakauma analysoitiin nestekromatografilla (LC), jolla pystyttiin määrittämään yleisimmät fosfolipidit. Veden määrä analysoitiin itse kulometrisellä menetelmällä. Taulukossa 7 on esitetty lähtötilanne eli tulokset kaikista analyyseistä käsittelemättömälle rypsiöljylle.

Taulukko 7. Lähtöarvot rypsiöljylle.

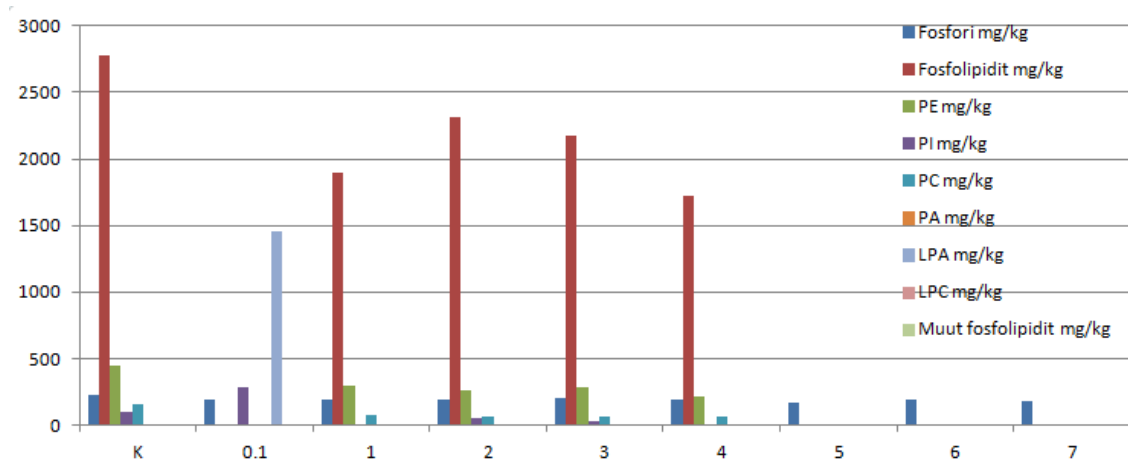
		Rypsiöljy
Vesi	mg/kg	450
Typpi	mg/kg	29
Monoglyseridit	area-%	0,2
Diglyseridit	area-%	2,4
Triglyseridit	area-%	95,9
Oligomeerit	area-%	<0,1
Rasvahapot	area-%	1,5
Öljypitoisuus	%	100
PGLY	mg/kg	<0,5
PE	mg/kg	450
PI	mg/kg	100
PC	mg/kg	155
PA	mg/kg	2070
LPA	mg/kg	<0,5
LPC	mg/kg	<0,5
PHO	mg/kg	2775
Muu PHO	mg/kg	<0,5
FFA	wt-%	0,8
Rauta (Fe)	mg/kg	1
Natrium (Na)	mg/kg	<1,0
Kalsium (Ca)	mg/kg	166
Magnesium (Mg)	mg/kg	45,2
Fosfori (P)	mg/kg	232

Eri puhdistusmenetelmien toimivuutta seurattiin vertailemalla kokonaisfosforin ja fosfolipidien määrää lähtöaineessa ja tuotteessa. Taulukossa 8 on kokonaisfosforipitoisuudet ja fosfolipidien jakauma haarukoivista kokeista, joissa fosforipitoisuus ei syöttöön nähden ole juuri muuttunut. Haarukoivissa kokeissa lisättävä entsyymimäärä laskettiin

valmistajan suosituksen mukaisesti. Tämän lisäksi kokeiltiin entsyymien kaksinkertaista annostusta, pidempää reaktioaikaa sekä happo- ja emälsisäyksiä. Taulukon lisäksi tulokset on esitetty kuvassa 18 pylväsdiagrammina.

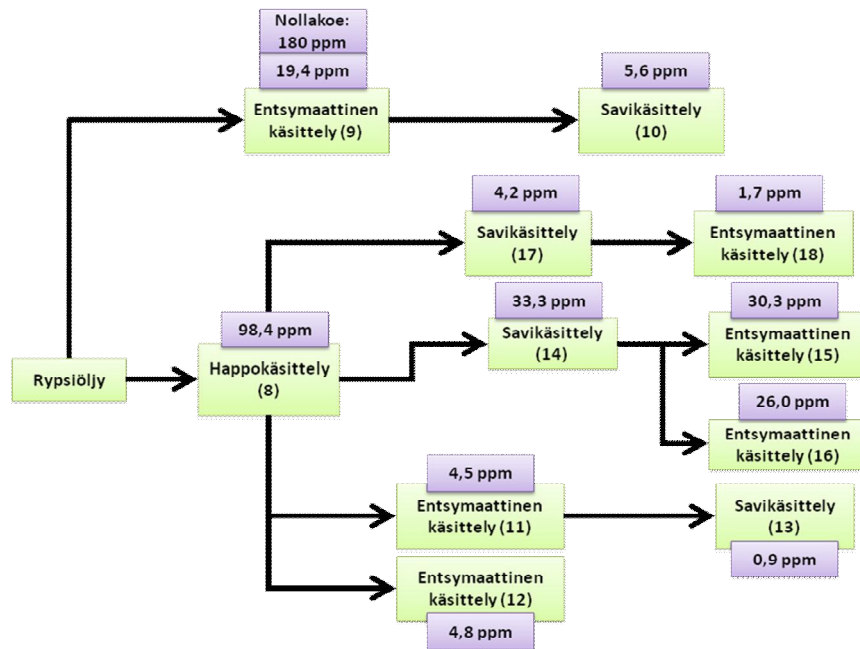
Taulukko 8. Kokonaisfosfori- ja fosfolipidipitoisuudet haarukoivissa kokeissa.

Haarukoivat kokeet:		Fosfori mg/kg	Fosfolipidit mg/kg	PE mg/kg	PI mg/kg	PC mg/kg	PA mg/kg	LPA mg/kg	LPC mg/kg	Muut fosfolipidit mg/kg
Käsittämätön rypsiöljy	K	232	2775	450	100	155	2070	<0,5	<0,5	<0,5
Nollakoe	0.1	194	<0,5	<0,5	290	<0,5	83	1460	<0,5	<0,5
30 ppm entsyymiä 2.5h	1	196	1900	300	<0,5	80	1520	<0,5	<0,5	<0,5
30 ppm entsyymiä 4 h	2	194	2314	260	56	68	1930	<0,5	<0,5	
30 ppm entsyymiä 6 h	3	209	2172	280	30	62	1800	<0,5	<0,5	<0,5
60 ppm entsyymiä 2.5h	4	191	1720	220	<0,5	60	1440	<0,5	<0,5	
30 ppm entsyymiä, 2 w t-% H <sub>2</sub> O, 1400 ppm CA, 2.5 h	5	174								
30 ppm entsyymiä, 2 w t-% H <sub>2</sub> O, 125 ppm CA, 63 ppm NaOH, 2,5 h	6	193								
30 ppm entsyymiä, 2 w t-% H <sub>2</sub> O, 125 ppm CA, 63 ppm NaOH, 6h	7	179								



Kuva 18. Haarukoivien kokeiden tulokset pylväsdiagrammina.

Kuvassa 19 näkyy lopullinen koejärjestys sekä kokeiden järjestysnumerot. Kuvasta selviää myös toistokokeet ja se, mitkä vaiheet kokeesta on toistettu. Koe numero 12 poikkeaa muista kokeista niin, että siinä on käytetty kolminkertaista entsyymiannostusta muihin entsyymikokeisiin nähden.

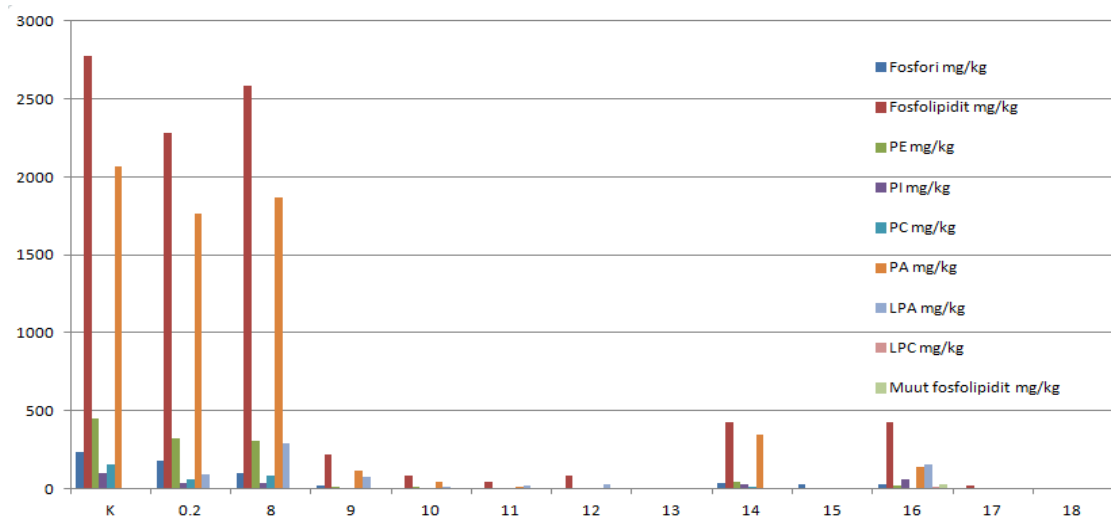


Kuva 19. Tehdyt kokeet, niiden fosforipitoisuustulokset ja koenumerot.

Taulukossa 9 ja kuvassa 20 on esitetty kokonaisfosforipitoisuus ja fosfolipidien jakauma käsittelemättömälle ja eri tavoin käsitellylle rypsiöljylle. Kokeet tehtiin koesuunnitelmassa esitetystä järjestyksestä, joista osalle tehtiin toistokokeita kuvan 19 mukaisesti.

Taulukko 9. Kokonaisfosforin ja fosfolipidien määrä rypsiöljykokeissa.

		Fosfori	Fosfolipidi	PE	PI	PC	PA	LPA	LPC	Muut fosfolipidit
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Rypsiöljy	K	232	2775	450	100	155	2070	<0,5	<0,5	<0,5
Nollakoe	0.2	180	2278	326	36	60	1765	91	<0,5	<0,5
HK	8	98,4	2586	305	34	87	1870	290	<0,5	<0,5
EK	9	19,5	216	16	<0,5	4	118	74	<0,5	4
EK + SK	10	5,6	81	11	4	3	43	13	3	4
HK + EK	11	4,5	43	1	2	1	15	20	2	2
HK + EK	12	4,8	86	0,7	<0,5	1,3	8	29	2	2,4
HK + EK + SK	13	0,9	<0,5							
HK + SK	14	33,3	429	43	27	13	346	<0,5	<0,5	<0,5
HK + SK + EK	15	30,3								
HK + SK + EK	16	26,0	423	21	61	5	138	159	10	29
HK + SK	17	4,2	18	2,5	3,1	<0,5	7,2	4	1	<0,5
HK + SK + EK	18	1,7	4,9	0,5	<0,5	<0,5	3,3	1,1	<0,5	<0,5



Kuva 20. Rypsiöljykokeiden tulokset pylväsdiagrammina.

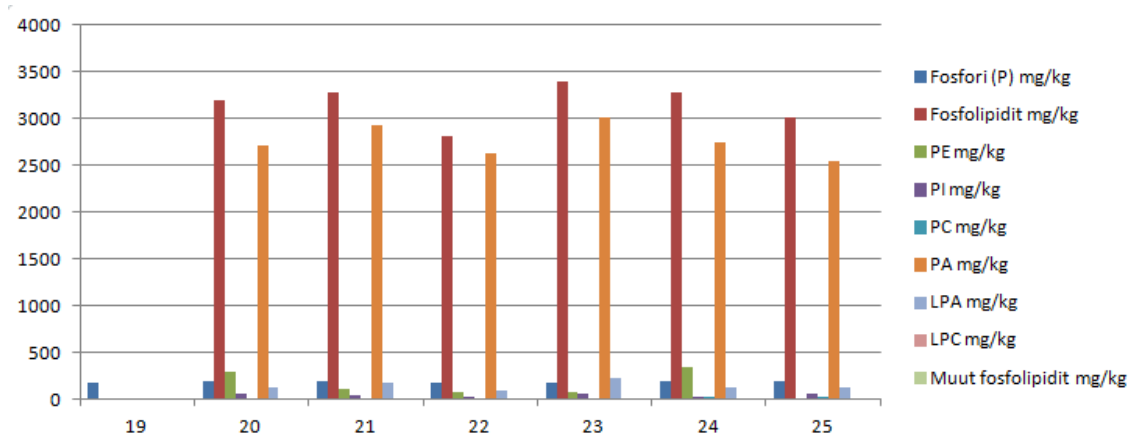
Liitteestä 4 löytyy muiden analyysien tulokset kaikille rypsiöljykokeille. Muihin analyysihin kuuluivat vesi, typpi, metallit, rasvan rakenteet, kuten mono-, di- ja triglyseridit, sekä vapaat rasvahapot.

#### 6.1.2 Sigma PLC

Kokeille, joissa käytettiin PLC-entsyymiä, tehtiin samat analyysit kuin kokeille, joissa käytettiin Rohalase PL-Xtra -entsyymiä. Syöttönä oli myös sama rypsiöljy. Kaikki testit toteutettiin 37 °C lämpötilassa. Taulukossa 10 on esitetty kokonaisfosforin määrä ja fosfolipidijakauma eri näytteille ja kuvassa 21 tulokset on esitetty pylväsdiagrammeina. Loput analyysitulokset PLC-entsyymillä käsitellyille näytteille löytyvät liitteestä 4. Muihin analyysihin kuuluivat vesi, typpi, metallit, rasvan rakenteet, kuten mono-, di- ja triglyseridit, sekä vapaat rasvahapot.

Taulukko 10. Kokonaisfosfori ja fosfolipidit rypsiöljykokeissa PLC-entsyymiä käyttäen.

		Fosfori (P)	Fosfolipidit	PE	PI	PC	PA	LPA	LPC	Muut fosfolipidit
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
EK 1 ml PLC + 370 ppm CA + 350 ppm NaOH + 2 % H <sub>2</sub> O	19	183								
EK 2 ml PLC, 0,1 M puskuriliuos 10 ml	20	200	3200	290	60	<0,5	2720	130	<0,5	<0,5
EK 5 ml PLC, 1 M puskuriliuos 5 ml, 1h	21	189	3273	106	51	<0,5	2933	183	<0,5	<0,5
EK 5 ml PLC, 1 M puskuriliuos 5 ml, 2,5h	22	184	2813	71	30	<0,5	2625	87	<0,5	<0,5
EK 5 ml PLC, 1 M puskuriliuos 5 ml, 6h	23	183	3390	81	59	<0,5	3020	230	<0,5	<0,5
Nollakoe, 0,1 M puskuriliuos 20 ml	24	186	3274	336	24	28	2752	134	<0,5	<0,5
Nollakoe, 1 M puskuriliuos 5 ml, 1h	25	189	3013	248	57	27	2548	133	<0,5	<0,5



Kuva 21. PLC-kokeiden tulokset rypsiöljylle pylväsdiagrammina.

## 6.2 Eläinrasva

Käsitlemättömälle ja käsitellylle eläinrasvalle tehtiin samat analyysit kuin rypsiöljylle. Näiden lisäksi eläinrasvasta analysoitiin myös sfingomyeliinin määrä. Taulukossa 11 on esitetty tulokset kaikista käsitlemättömälle eläinrasvalle tehdyistä analyyseistä.

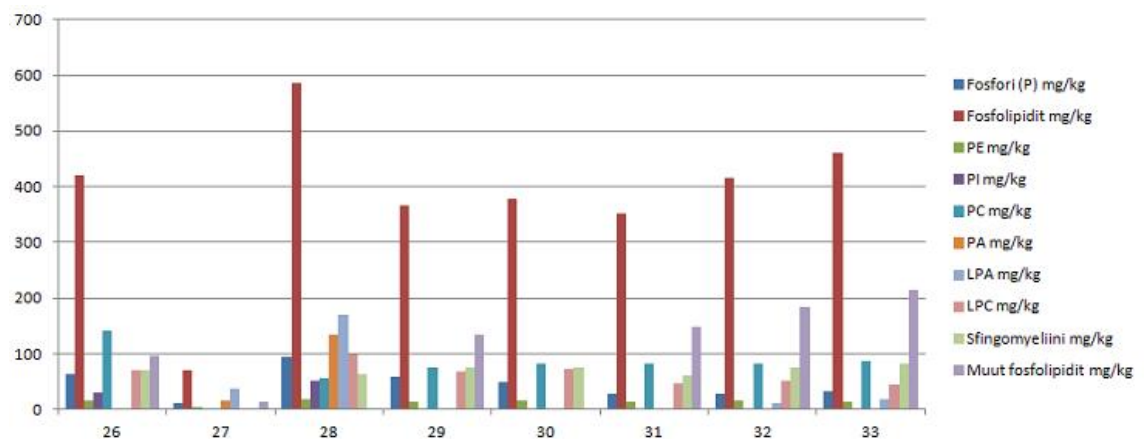
Taulukko 11. Lähtöarvot eläinrasvalle.

		Feed: AF417
Vesi	mg/kg	2800
Typpi	mg/kg	630
Monoglyseridit	area-%	2
Diglyseridit	area-%	18,5
Triglyseridit	area-%	62,7
Oligomeerit	area-%	0,2
Rasvahapot	area-%	16,7
Öljypitoisuus	%	86
PGLY	mg/kg	<0,5
PE	mg/kg	22
PI	mg/kg	75
PC	mg/kg	74
PA	mg/kg	100
LPA	mg/kg	230
LPC	mg/kg	130
Sfingomyeliini	mg/kg	96
Fosfolipidit	mg/kg	727
Muut fosfolipidit	mg/kg	
FFA	wt-%	18,8
Rauta (Fe)	mg/kg	64,1
Natrium (Na)	mg/kg	17,2
Kalsium (Ca)	mg/kg	102
Magnesium (Mg)	mg/kg	26,2
Fosfori (P)	mg/kg	123

Taulukossa 12 on esitetty kokonaisfosforin määrä, fosfolipidijakauma sekä sfingomyeliinin määrä käsitellyssä eläinrasvassa ja kuvassa 22 tulokset on esitetty pylväsdia-grammina. Nollakoe tehtiin kokeiden 29–33 mukaan, eli säädettiin pH entsyymille sopi-vaksi sitruunahapon ja natriumhydroksidin avulla, mutta ei lisätty lainkaan entsyymiä. Tarkempi kuvaus suoritetuista kokeista löytyy edellisestä luvusta.

Taulukko 12. Kokonaisfosfori ja fosfolipidit eläinrasvalle tehtyjen kokeiden jälkeen.

		Fosfori (P)	Fosfolipidit	PE	PI	PC	PA	LPA	LPC	Sfingomyeliini	Muut fosfolipidit
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Nollakoe	26	63,1	421	15	29	140	<0,5	<0,5	70	70	97
HK + SK	27	11	71	3	<0,5	2	15	38	<0,5	<0,5	13
EK 30 ppm PLA2	28	93,3	587	17	50	57	133	170	98	62	
EK 310 ppm PLA2	29	58,4	366	13	<0,5	75	<0,5	<0,5	68	75	135
EK 300 ppm PLA2	30	49,1	378	15		83	<0,5	<0,5	73	75	
EK 6900 ppm PLA2 1h	31	26,5	351	14	<0,5	83	<0,5	<0,5	46	61	147
EK 6900 ppm PLA2 2,5 h	32	28,5	416	15	<0,5	82	<0,5	11	50	75	183
EK 6900 ppm PLA2 6h	33	32,1	461	14	<0,5	87	<0,5	18	45	82	215



Kuva 22. Eläinrasvakokeiden tulokset pylväsdia-grammina.

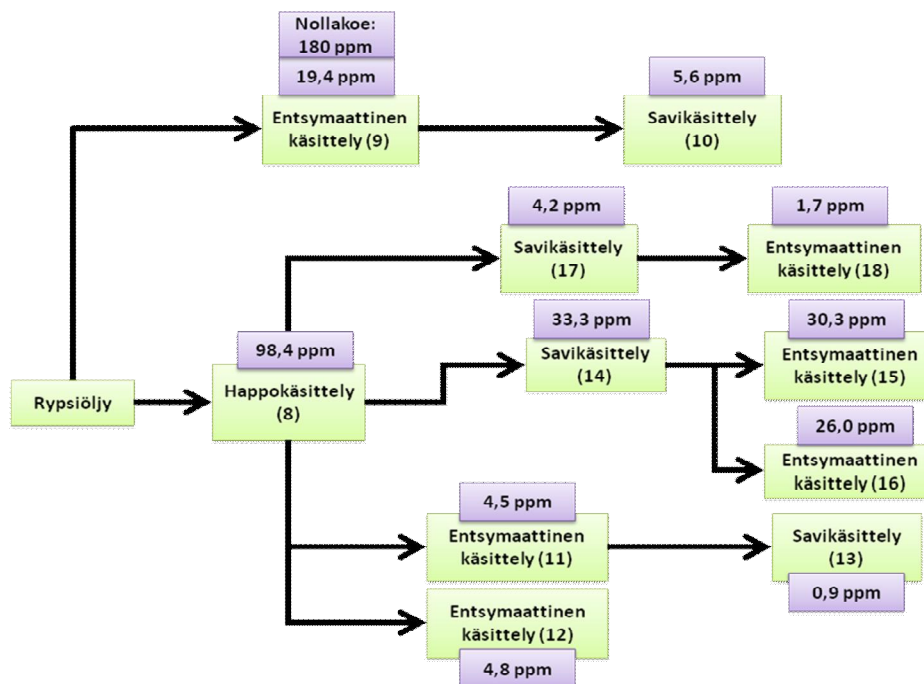
Liitteessä 4 on loput analyysitulokset käsittelemättömälle ja käsitellylle eläinrasvalle. Muihin analyyseihin kuuluivat vesi, typpi, metallit, rasvan koostumus, kuten mono-, di- ja triglyseridit, sekä vapaat rasvahapot.



## 7 Tulosten analysointi

### 7.1 Rypsiöljy

PLA2-entsyymin nollakokeessa rypsiöljylle kokonaisfosforin määräksi saatiin 180 ppm ja entsyymaattisella käsittelyllä kokonaisfosforin määräksi saatiin 19,5 ppm. Tavanomaisella happokäsittelyllä kokonaisfosforipitoisuudeksi saatiin 98,4 ppm. Tästä voi päätellä, että entsyymi on ilmeisesti toiminut ja sen avulla päästiin alhaisempaan fosforipitoisuuteen kuin perinteisillä puhdistusmenetelmillä, mutta tulokseen saattoi vaikuttaa myös hapon ja emäksen lisäys. Kuvasta 23 nähdään fosforipitoisuus eri käsittelyvaiheissa.



Kuva 23. Kokonaisfosforin määrä rypsiöljyssä eri käsittelyvaiheissa. Kokeen numero on sulussa oleva numero.

Tehokkaimmaksi puhdistusmenetelmäksi osoittautui yhdistelmä, jossa rypsiöljy ensin happokäsiteltiin, sen jälkeen puhdistettiin entsyymaattisesti ja tämän lisäksi vielä savikäsiteltiin. Happokäsiteltyyn rypsiin tehdyllä entsyymaattisella puhdistuksella päästiin 4,5 ppm fosforipitoisuuteen, ja kun käsittelyä jatkettiin vielä saviadsorptiolla, päästiin alle 1 ppm fosforipitoisuuteen.

Entsyaattisella menetelmällä saatiin fosforipitoisuus rypsiöljyssä alhaisemmaksi kuin happokäsittelyllä. Olosuhteita ei kuitenkaan ollut optimoitu, joten selkeitä johtopäätöksiä menetelmien välillä ei voi tehdä. Entsyymikäsittelyä kokeiltiin myös kolminkertaisella entsyymiannostuksella, mutta sillä ei todettu olevan merkitystä. Taulukosta 13 nähdään eroavaisuusprosentti, joka kertoo, kuinka monta prosenttia ko. pitoisuus on muuttunut happokäsittelyn ja entsyaattisesti käsitellyn rypsiöljyn välillä.

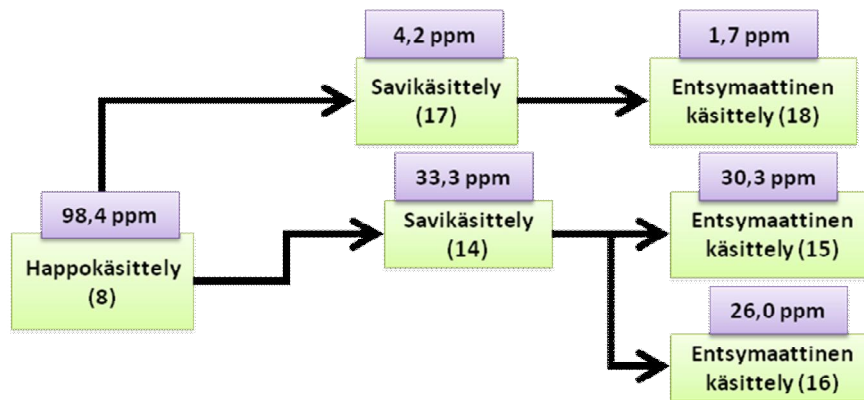
Taulukko 13. Entsyaattisesti käsitellyn ja happokäsittelyn rypsiöljyn fosfolipidipitoisuuksien ero prosentit. Positiivinen arvo kuvaa sitä, että entsyaattisessa käsittelyssä on poistunut enemmän fosfolipidejä, ja negatiivinen sitä, että happokäsittelyssä on poistunut enemmän fosfolipidejä.

		HK (koe 8)	EK (koe 9)	Ero -%
Fosfori	mg/kg	98,4	19,5	80 %
Fosfolipidit	mg/kg	2586	216	92 %
PE	mg/kg	305	16	95 %
PI	mg/kg	34	<0,5	99 %
PC	mg/kg	87	4	95 %
PA	mg/kg	1870	118	94 %
LPA	mg/kg	290	74	74 %
LPC	mg/kg	<0,5	<0,5	0 %
Muut fosfolipidit	mg/kg	<0,5	4	-700 %
Rasvahapot	p-%	1,5	2,4	-60 %
LPA	mg/kg	290	74	74 %
LPC	mg/kg	<0,5	<0,5	0 %

Yleisimmät fosfolipidit olivat poistuneet entsyaattisella käsittelyllä keskimäärin yli kymmenkertaisesti paremmin kuin happokäsittelyllä. Parhaiten entsyaattisella käsittelyllä saatiin poistettua fosfatidyyli-inositolia (PI), jota oli jäänyt öljyyn niin pieni pitoisuus, ettei sitä pystytty tarkasti määrittämään. Muita fosfolipidejä oli entsyaattisesti käsitellyssä rypsiöljyssä enemmän kuin happokäsittelyssä, mutta kummassakin määrät ovat melko pieniä.

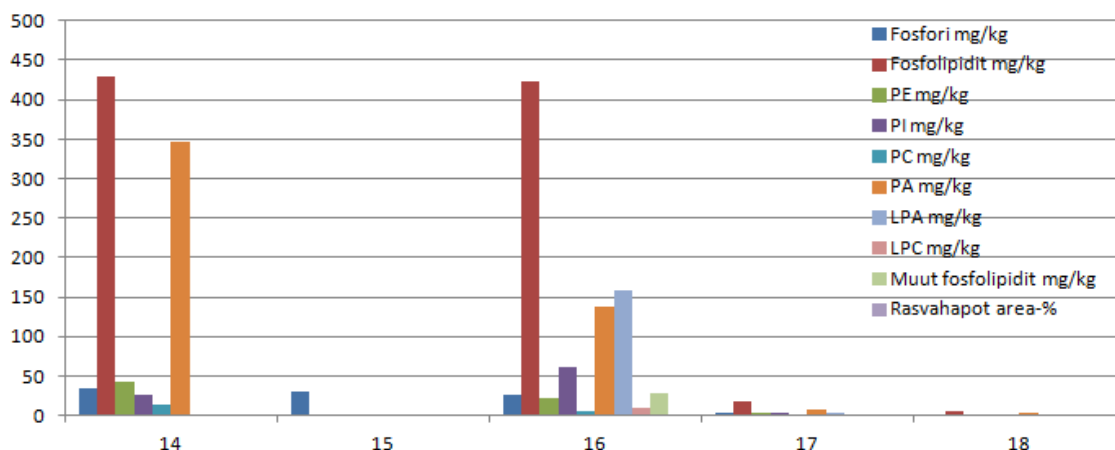
PLA2-entsyymi vapauttaa rasvahappoja, jotka eivät ole vesiliukoisia, jolloin vapaiden rasvahappojen suurempi määrä entsyaattisesti käsitellyssä öljyssä voi teoriassa tarkoittaa sitä, että entsyymi on toiminut. Rasvahappojen vapautuessa syntyy myös lysofosfatideja. Lysofosfatidyylikoliinia on kummallakin tavalla käsitellyssä öljyssä hyvin vähäistä, mutta entsyaattisesti puhdistetussa öljyssä lysofosfatidihapon määrä on hieman alhaisempi. Entsyaattisella käsittelyllä syntynyt lysofosfatidihappo on helposti hydratoituva ja näin ollen se poistuu helposti muiden epäpuhtauksien kanssa vesifaasin mukana.

Toistokokeita tehtiin osalle alkuperäistä koesuunnitelmaa. Osa toistokokeiden tuloksista erosi toisistaan selkeästi. Savikäsitteily toistettiin kaksi kertaa samasta erästä saadulle happokäsitellylle öljylle, ja savikäsitteilyn jälkeen öljy käsiteltiin vielä entsymaattisesti (kuva 24). Fosforipitoisuudet savikäsitteilyn jälkeen olivat toistokokeissa erisuuruisia. Ensimmäisellä toistokerralla (koe 14) fosforipitoisuudeksi saatiin 33,3 ppm ja toisella toistokerralla (koe 17) 4,2 ppm. Ensimmäinen koe tehtiin heti sen jälkeen, kun öljy oli happokäsitelty, ja toistokoe vasta noin neljä kuukautta myöhemmin samasta erästä happokäsiteltyä öljyä. Aikaero kokeiden välillä saattaa selittää eron myös tuloksissa, sillä näyte ei todennäköisesti ollut enää edustava neljän kuukauden jälkeen. Happokäsiteltyä öljyä säilytettiin huoneenlämmössä, kuivassa ja pimeässä, mutta ennen toistokoea öljyssä oli silmin nähden havaittavia hyytymiä. Näytettä lämmitettiin ja ravisteltiin hyvin, mutta siitä huolimatta näyte ei ollut enää täysin homogeeninen.



Kuva 24. Toistokokeet reitille, jossa happokäsitelty öljy savi- ja entsyymikäsiteltiin.

Myös vanhentuneelle happo- ja savikäsitellylle rypsiöljylle tehtiin kuitenkin entsymaattinen käsittely, vaikkakin näiden kokeiden osalta tuloksia voidaan arvioida vain siltä kannalta, että onko entsyymi lainkaan toiminut. Kokonaisfosforipitoisuus ja fosfolipidien määrä on alentunut kokeiden 17 ja 18 välillä suhteessa enemmän kuin kokeiden 14 ja 16 välillä. Entsyymi on siis toiminut myös vanhentuneeseen rypsiöljynäytteeseen. Kuvasta 25 nähdään, että kummassakin tapauksessa entsymaattinen käsittely on poistanut fosfatidihappoa (PA) ja fosfatidyylietanolamiinia (PE) ja kokeiden 14 ja 16 välillä myös fosfatidyylikoliinia (PC), mutta lysofosfatidihapon (LPA), lysofosfatidikoliinin (LPC) ja fosfatidyyli-inositolin (PI) määrä on lisääntynyt kokeiden 14 ja 16 välillä. Lysofosfatidien lisääntyminen on merkki siitä, että entsyymi on toiminut, mutta se, että kokonaisfosforipitoisuus ei ole laskenut paljoa on merkki siitä, että entsyymi ei ole toiminut kovin tehokkaasti.



Kuva 25. Fosfolipidien määrä kokeissa 14–18. Kokeesta 15 on määritetty ainoastaan kokonaisfosforipitoisuus.

Tuloksien perusteella entsyymi ei toiminut niin hyvin happo- ja savikäsittelyllä puhdistettuun rypsiöljyyn, kuin pelkästään happokäsittelyllä puhdistettuun rypsiöljyyn. Syitä sille, että entsyymi ei enää toiminut niin hyvin, voi olla monia. Syynä voi olla esimerkiksi se, että öljyssä ei ole enää entsyymiä aktivoivia partikkeleita, tai se, että entsyymiä ei lisätty tarpeeksi jäljellä oleviin epäpuhtauksiin eli substraattiin nähden. Toisaalta sama määrä entsyymiä toimi hyvin pelkästään happokäsitellyn rypsiöljyyn, joka sisälsi enemmän epäpuhtautta. Syynä voi olla myös se, että vesifaasin pH on entsyymilisäyksen jälkeen ollut liian alhainen (kahden kokeen keskiarvo oli 4,2) ja tästä syystä entsyymi ei ole toiminut. Alhainen pH voi johtua siitä, että pH on ollut muita syöttöjä alhaisempi jo ennen puskurin lisäystä ja näin ollen puskurin teho ei ole ollut riittävä säätämään pH:ta. Toisaalta valmistaja on ilmoittanut, että entsyymien pitäisi toimia pH:n ollessa 3–6, joten tämäkään ei täysin selitä, miksi entsyymi ei ole toiminut hyvin.

Kokeissa käytetylle rypsiöljylle ei ollut aiemmin tehty kokeita happo- ja savikäsittelyllä. Korkeammalla happo- ja emäsmäärällä ja alhaisemmalla lämpötilalla olisi voitu päästä alhaisempiin fosforipitoisuuksiin happokäsittelyssä tai käyttämällä korkeampaa savimäärää savikäsittelyssä.

Sigma-Aldrichin PLC-entsyymillä ei saatu aikaan näkyviä muutoksia fosforipitoisuudessa tai fosfolipidien pitoisuudessa. Entsyymi ei ollut kaupallinen suurissa erissä valmistettava entsyymi, vaan tarkoitettu lähinnä pienen mittakaavan kokeisiin. Entsyymi oli tuotettu sian haimasta eristämällä, joten se olisi vaatinut toimiakseen olosuhteita, jotka mu-

kailevat elimistön olosuhteita, mitä ei onnistuttu saamaan aikaiseksi lämpötilan säädöstä ja puskuriliuoksen lisäämisestä huolimatta.

Aiemmissa tutkimuksissa on todettu fosfolipaasi A- ja fosfolipaasi C -entsyymien yhteiskäytön olevan tehokkaampaa kuin kummankin käyttö yksinään. On olemassa kaupallinen fosfolipaasi C -entsyymi, Purifine™ PLC, jota voitaisiin kokeilla joko yhteiskäytössä Rohalase PL-Xtran kanssa tai sellaisenaan. PLC poistaa fosfolipidistä vain fosforin sisältävän ryhmän, joten voidaan tutkia, saadaanko sillä puhdistettua öljyä niin, että käyttökelpoista rasvaa menisi hukkaan vähemmän.

Rohalase PL-Xtra -entsyymiä testattaessa käytettiin yleensä 100 ppm entsyymiannostusta ja yhden tunnin reaktioaikaa. Käsittelyä voitaisiin testata myös pidemmällä reaktioajalla, jotta nähtäisiin, onko pidemmällä reaktioajalla merkitystä eli päästäisiinkö sillä alhaisempaan fosforipitoisuuteen rypsiöljyssä.

## 7.2 Eläinrasva

Eläinrasvalle tehtiin haarukoivia kokeita, joiden tavoitteena oli saada entsyymi toimimaan. Entsyyminä käytettiin Rohalase PL-Xtra PLA2 -entsyymiä. Entsyymikokeita verrattiin nollakokeeseen, joka oli suoritettu samalla tavalla kuin entsyymittömä käsittely, mutta entsyymi oli jätetty pois. Haarukoivien kokeiden perusteella entsyymi toimii, kun sitä lisätään rasvaan reilusti yli valmistajan suositusten. Pidemmällä reaktioajalla ei ollut merkitystä. Nollanäytteen fosforipitoisuus oli 63,1 ppm, ja siihen verrattuna entsyymi näyttäisi toimivan jonkin verran eri annosmäärillä, mutta ei niin tehokkaasti kuin rypsiöljyä käsiteltäessä (taulukko 14).

Taulukko 14. Eläinrasvalle tehdyt entsyymikäsittelykokeet ja fosforin määrä käsittelyn lopussa.

Entsyymin määrä (ppm)	Fosforin määrä (ppm)
0 (1 h)	63,1
300 (1 h)	49,1
6900 (1 h)	26,5
6900 (2,5 h)	28,5
6900 (6 h)	32,1

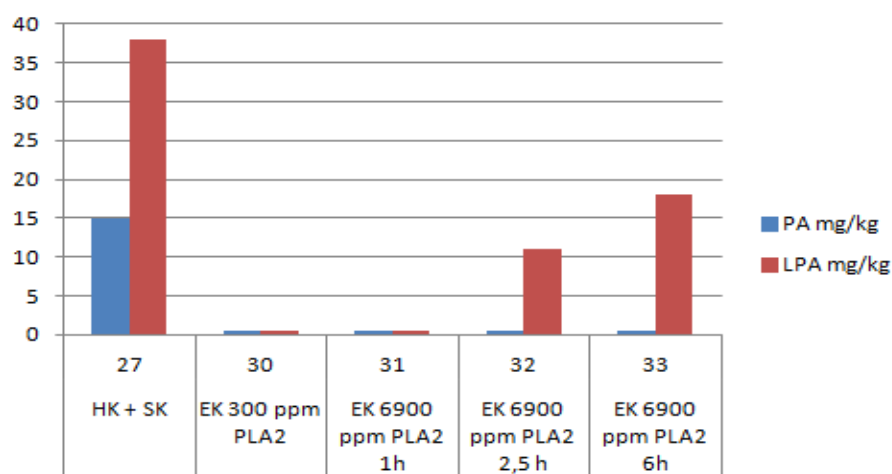
Tavallisella happokäsittelyllä fosforipitoisuudeksi saatiin 55,3 ppm, ja kun rasva vielä savikäsiteltiin, pitoisuudeksi saatiin 11 ppm. Pelkällä savikäsitelyllä fosforipitoisuudeksi saatiin 10,6 ppm. Käsittelemättömässä eläinrasvassa fosforipitoisuus oli 123 ppm. Happokäsittelyyn verrattuna entsyymittömä käsittely poisti fosforia jonkin verran

enemmän, mutta käytettäessä samaa entsyymiannostusta kuin rypsiöljylle käytettiin fosforipitoisuudet olivat samaa luokkaa kuin happokäsitellyssä rasvassa. Parhaiten fosforia saatiin poistettua savikäsitteilyllä.

Entsyymikäsitteily tehtiin ensin samalla annostuksella, mitä käytettiin rypsiöljyn käsitteilyssä, ja reaktioaika oli yksi tunti. Tuloksista ei voinut päätellä, oliko fosforia poistunut entsyymin ansiosta, joten käsitteily tehtiin isommalla entsyymiannostuksella ja eri reaktioajoilla. Ensimmäinen näyte tässä kokeessa otettiin tunnin reaktioajan jälkeen, toinen 2,5 tunnin kuluttua ja viimeinen kuuden tunnin kuluttua kokeen aloittamisesta. Kaikki näytteet denaturoitiin välittömästi ja poistettiin vesifaasi samalla tavalla kuin kaikissa muissakin kokeissa.

Käsitteilyajalla ei ollut merkitystä fosforin poistumisessa, sillä ensimmäisen tunnin jälkeen otetussa näytteessä fosforipitoisuus oli samalla tasolla kuin myöhemmin otetuissa. Fosfolipidijakauma pysyi enimmäkseen suunnilleen samana, mutta lysofosfatidihapon ja sfingomyeliinin määrä nousi kokeen edetessä. Myös fosfolipidien määrä kasvoi kokeen edetessä, mikä oli odotettavaa, sillä myös fosforin määrä kasvoi.

Tuloksista havaittiin, että fosfatidihapon ja lysofosfatidihapon määrä oli suurempi happo- ja savikäsitellyssä eläinrasvassa, kuin entsyymikäsitellyssä rasvassa (kuva 26). Entsyymikäsitellyssä lysofosfatidihapon määrä kuitenkin kasvoi kokeen edetessä, mikä on merkki entsyymin toiminnasta. Fosforipitoisuus ei kuitenkaan enää laskenut, vaan se nousi, mikä aiheuttaa ristiriidan, sillä entsyymin toimiessa myös fosforin määrän pitäisi alentua. Verrattuna happo- ja savikäsitellyyn rasvaan, entsyymikäsitteily kuitenkin poistaa fosfatidihappoa paremmin.



Kuva 26. Fosfatidihapon ja lysofosfatidihapon määrät eri kokeissa.

Entsyymiä voitaisiin kokeilla saada toimimaan happokäsittelyssä eläinrasvassa, jolloin osa epäpuhtauksista, jotka saattavat häiritä entsyymin toimintaa, olisi jo saatu poistettua. Entsyymiä voitaisiin kokeilla myös rypsiöljyn ja eläinrasvan seoksessa, jolloin eläinrasvan haittavaikutukset entsyymiin olisivat pienemmät. Lisäksi aiemmin on jo todettu, että PLA2-entsyymi toimii rypsiöljyssä.

Eläinrasva sisältää kasvirasvoja enemmän tyyppiyhdisteitä, joihin myös proteiinit kuuluvat, joten eläinrasvojen puhdistamiseen voi suunnitella kokeiltavan proteiineja hajottavia entsyymejä eli proteaaseja. Proteaaseja on kuitenkin olemassa laaja kirjo, eikä tiedetä tarkalleen, minkälaisia tyyppiyhdisteitä rasva sisältää, joten tämä vaatisi suurempaa paneutumista asiaan.

## 8 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli tutkia entsyymien käyttömahdollisuuksia kasviöljyjen ja eläinrasvojen puhdistamisessa. Haluttiin tutkia, pystyttäisiinkö entsyymaattisella käsittelyllä korvaamaan perinteisiä puhdistusmenetelmiä osittain tai kokonaan ja olisiko se taloudellisesti kannattavaa. Tutkittiin aiempia tutkimuksia aiheesta ja tehtiin itse kokeita.

Työn teoreettisessa osuudessa selvisi, että fosfolipaasi-entsyymeillä on onnistuttu aiemmissa tutkimuksissa poistamaan fosforia kasviöljyistä menestyksekkäästi. Tutkimustietoa eläinrasvalle tehdystä entsyymaattisesta käsittelystä fosfolipaaseilla ei löytynyt. Kasviöljyjen puhdistamisessa on käytetty enimmäkseen PLA- ja PLC-entsyymejä ja parhaisiin tuloksiin on päästy, kun näitä on käytetty yhdessä. Tutkimustietoa muiden entsyymien käytöstä kasviöljyjen ja eläinrasvojen puhdistamisessa ei löytynyt.

Työn kokeellisessa osuudessa ei ollut tarkoitus tehdä täydellistä vertailua perinteisen puhdistuksen ja entsyymaattisen puhdistusmenetelmän välillä, koska käytössä ei ollut optimoituja olosuhteita kummallekaan menetelmälle. Työssä keskityttiin tutkimaan entsyymejä ja niiden toimivuutta sekä soveltuvuutta kasviöljyn ja eläinrasva puhdistamiseen.

Kokeiden perusteella selvisi, että ainakin Rohalase PL-Xtra fosfolipaasi A2 -entsyymi toimii ja sillä saadaan alennettua fosforipitoisuutta rypsiöljyssä. Kokeessa käytetyissä

olosuhteissa entsyymaattinen puhdistusmenetelmä vaikuttaa tehokkaammalta fosforinpoistomenetelmältä kuin happopuhdistus. Olosuhteet eivät kuitenkaan olleet optimoidut kummallekaan menetelmälle, joten täysin pitäviä johtopäätöksiä ei voida tehdä.

Työn alussa keskityttiin etsimään sellaiset olosuhteet, joissa entsyymi toimi tyydyttävästi, mutta siitä huolimatta kokeiden toistettavuus ei ollut kovin hyvä. Entsyymi toimisi varmemmin, mikäli olosuhteet sen käytölle optimoitaisiin.

Kokeissa käytettiin myös Sigma-Aldrichin toimittamaa fosfolipaasi C -entsyymiä, jota ei saatu selvästi toimimaan missään olosuhteissa rypsiöljylle eikä eläinrasvalle. Tätä entsyymiä ei ole saatavilla teollisen mittakaavan vaatimissa määrissä, joten tällä entsyymillä ei ole kannattavaa jatkaa tutkimusta. Entsyymi on eläinperäinen, minkä takia se on vaikeasti saatavaa ja kallista. Eläinperäiset entsyymit myös toimivat eri olosuhteissa kuin fermentoimalla tuotetut, joten näitä kahta ei voi verrata keskenään, vaikka kyseessä olisi sama entsyymi.

Rohalase PL-Xtra -entsyymi toimi myös eläinrasvaan, mutta ei niin tehokkaasti kuin rypsiöljylle ja entsyymiä täytyi lisätä moninkertainen määrä valmistajan suositukseen nähden. Pidempää reaktioaikaa kokeiltiin, mutta sillä ei todettu olevan merkitystä fosforipitoisuuden alenemisen kannalta. Sigma-Aldrichin PLC-entsyymiä ei testattu eläinrasvaan laisinkaan.



## Lähteet

- 1 Koivisto, Elina. 2012. Parameters affecting purification of rendered animal fat. Aalto-yliopisto, Espoo.
- 2 Triglyseridi. Verkkodokumentti. Inhabitat.  
<<http://inhabitat.com/images/triglyceride.jpg>> Luettu 18.6.2012
- 3 Srinivasan Damodaran, Kirk Parkin ja Owen R. Fennema. 2007. Fennema's Food Chemistry. Lontoo, New York: CRC Press.
- 4 Pirjo Mattila, Vieno Piironen ja Velimatti Ollilainen. 2001. Elintarvikekemia ja –analytiikka. Helsinki: Yliopistopaino.
- 5 Ockerman, H. W. 1996. Chemistry of meat tissue. Department of animal sciences the Ohio state university and the Ohio agricultural research and development center.
- 6 Anna-Maria Saarela, Paula Hyvönen, Sinikka Määttä ja Atte von Wright. 2010. Elintarvikeprosessit. Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu.
- 7 Degumming - Introduction. Verkkodokumentti. AOCS.  
<<http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-intro/index.htm>> Luettu 28.3.2012
- 8 Phospholipids. Verkkodokumentti. Red River College.  
<<http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/phospholipids.htm>> Luettu 28.3.2012
- 9 Soy Lecithin: From Sludge to Profit. Verkkodokumentti. Weston A. Price Foundation.  
<<http://web.archive.org/web/20080605055550/http://www.westonaprice.org/soy/lecithin.html>> Luettu 6.3.2013
- 10 Lesitiini. Verkkodokumentti. Tohtori.  
<<http://www.tohtori.fi/?page=5530281&id=4355676>> Luettu 6.3.2013

- 11 Dayton, C.L.G. and Galhardo, F. 2008. Enzymatic degumming utilizing a mixture of PLA and PLC phospholipases. US Patent Application Publication 2008/0182322: Bunge Foods Corporation.
- 12 Enzymatic degumming. Verkkodokumentti. AOCS.  
<<http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-enz/index.htm>> Luettu
- 13 Heino J, Vuento M. 2010. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: WSOY
- 14 Entsyymitietoa. Verkkodokumentti. Enzymedica.  
<<http://www.enzymedica.fi/index.php/entsyymitietoa/usein-kysyttya>> Luettu 15.3.2013
- 15 Phospholipases. Verkkodokumentti. AOCS.  
<<http://lipidlibrary.aocs.org/animbio/phospholipases/index.htm>> Luettu 22.4.2013
- 16 Katsube Y, Sugiyama M, Matoba Y. 2002. The crystal structure of prokaryotic phospholipase A2. J. Biol. Chem.
- 17 Fosfolipaasi C:n kolmiulotteinen rakenne. Verkkodokumentti. MRC Laboratory of Molecular Biology. <<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1dix.html>> Luettu 26.9.2012
- 18 Nakamura S, Yamada A, Tsukagoshi N, Udaka S, Sasaki T, Makino S, Little C, Tomita M, Ikezawa H. 1988. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus cereus*. Eur. J. Biochem.
- 19 Chemical degumming. Verkkodokumentti. AOCS.  
<<http://lipidlibrary.aocs.org/processing/chem-degum/index.htm>> Luettu 22.4.2013
- 20 Zufarov, Oybek, Schmidt, Štefan, Sekretár, Stanislav. 2008. Degumming of rapeseed and sunflower oils. Slovak Republic: Slovak University of Technology.

- 21 List, Gary L. 2009. Bleaching and purifying fats and oils. Unites States of America: AOCS.
- 22 Miselli. Verkkodokumentti. Wikipedia.  
<[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1a/Micelle\\_scheme2-en.svg/300px-Micelle\\_scheme2-en.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1a/Micelle_scheme2-en.svg/300px-Micelle_scheme2-en.svg.png)> Luettu 25.4.2012
- 23 Käänteinen miselli. Verkkodokumentti. Wikipedia.  
<[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4d/Micelle\\_scheme-en.svg/532px-Micelle\\_scheme-en.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4d/Micelle_scheme-en.svg/532px-Micelle_scheme-en.svg.png)> Luettu 25.4.2012
- 24 Aalrust, E., Beyer, W., Ottofrickenstein, H., Penk, G., Plainer, H. and Reiner, R. 1993. Enzymatic treatment of edible oils. US Patent 5,264,367: Röhm GmbH and Metallgesellschaft AG
- 25 Dahlke, Klaus. 1997. The enzymatic degumming - EnzyMax. Oléagineux Corps Gras Lipides/OCL.
- 26 Dahlke, K. 1998. An enzymatic process for the physical refining of seed oils. Chem. Eng. Technol.
- 27 Clausen, I.G., Patkar, S.A., Borch, K., Barfoed, M., Clausen, K., Fuglsang, C.C., Dybdal, L. and Halkier, T. Method for reducing phosphorus content of edible oils. US Patent 6,103,505: Novo Nordisk A/S
- 28 Münch, E-W. 2001. Proceedings of the World Conference on Oilseed Processing and Utilization: Practical experience of enzymatic degumming. Champaign, IL: AOCS Press
- 29 Yang, B., Wang, Y.-H. and Yang, J.-G. 2006. Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. JAOCS.
- 30 Chakrabarti, P.P., Rao, B.V.S.K., Roy, S.K., Bethala, L.A.P.D., Narayana, P.R.K., Vemulapalli, V., Chelimi, K., Karthika, G., Kale, V. and Prasad, R.B.N. 2009. Process for the pre-treatment of vegetable oils for physical refining. US Patent 7,494,676: Council of Scientific and Industrial Research.

- 31 Gramatikova, S., Hazlewood, G., Lam, D., Barton, N.R., Sturgis, B.G., Robertson, D.E., Li, J., Kreps, J., Fielding, R., Brown, R.C., Vasavada, A., Tan, X., Badillo, A., Van Hoek, W.P., Janssen, G., Isaac, C. and Burk, M.J. 2011. Phospholipases, nucleic acids encoding them and methods for making and using them. US Patent 7,977,080: Verenum Corporation.
- 32 Jiang, F., Wang, J., Kaleem, I., Dai, D., Zhou, X., Li, C. 2011. Degumming of vegetable oils by a novel phospholipase B from *Pseudomonas fluorescens*. Elsevier Ltd.
- 33 Heiskanen, Piia, Mankinen, Sini-Tuulia. 2004. Entsyymit teollisuudessa. Verkkodokumentti. Helsingin yliopisto.  
<<http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/aineistot/entsyymit/teollisuus.htm>  
|> Luettu 27.3.2012
- 34 Korhola, Matti, Uusikylä, Marjo. 2012. Teollisuusentsyymeisterä kansainvälisesti verkostoitunutta liiketoimintaa. Tekesin katsaus 287/2012.
- 35 Collins, T., Gerday, C., Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. Verkkodokumentti. Laboratory of Biochemistry, University of Liège, Liège, Belgium.  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652973>> Luettu 9.10.2012
- 36 Xylanase. Verkkodokumentti. GMO Compass. <<http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/96.xylanase.html>> Luettu 9.10.2012
- 37 Fytaasin vaikutus kasviperäisten rehujen fosforin sulavuuteen sioilla. Verkkodokumentti. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.  
<<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/Rehutaulukot/laske-ntaperusteet/8ED0C38DD297C32DE040A8C0023C4308>> Luettu 6.3.2013
- 38 Pectinase Database. Verkkodokumentti. MSRIT.  
<<http://pec.biodbs.info/index.html>> Luettu 6.3.2013
- 39 Yang, J., Wang, Y., Yang, B., Mainda, G., Guo, Y. 2005. Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase. China: South China University of Technology.

1 (1)

Kaupallisia ja saatavilla olevia entsyymejä

Entsyymi	Valmistaja	Tuote	Aktiivisuus	Aktiivisuus U/g	pH-alue	pH-optimi	T-alue	T-optimi	R-aika optimiolo suhteissa	CAS/EC	Lisätietoja
PLA1	Sigma	A1	10 KLU/g	10 000		5		50-55		EC 3.1.1.32	<b>Thermomyces lanuginosus (Lecitase is a trademark of Novozymes Corp. Lecitase Ultra )</b>
PLA1	Novozymes	Lecitase® Ultra	10 KLU/g	10 000 U/g		5		50-55		EC 3.1.1.3	<i>Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum</i> , suositellaan käytettävän 3 kk sisällä toimituksesta
PLA1	Novozymes	Lecitase® Novo	10400 LEU/g	10 400 U/g		5		45			<i>Fusarium oxysporum</i> ,
PLA2	AB Enzymes	Rohalase PL-Xtra	10000 PLU/g	10 000 U/g	3,5-5,5	3-6	50-58	50-55	60 min	CAS 9001-84-7	<i>Trichoderma reesei</i>
PLA2	Sigma	Phospholipase A2	20 U/mg	20 000 U/g	-	8	-	37		CAS 9001-84-7 /EC 3.1.1.4	from bovine pancreatic
PLA2	Danisco	LysoMax® Oil	1100 LATU/g		5-10	~8	55-65	55	30 min		<i>Bacillus licheniformis</i> , säilyy 12 kk
PLA2	DSM	Gumzyme™	-	-							<i>Aspergillus niger</i>
PLA2	Novozymes	Lecitase® 10L	10190 LEU/g	10 190 U/g		5,5		65			from porcine pancreas
PLC	Verenium	Purifine PLC	-	-							<i>Pichia pastoris</i>
PLC	Sigma	Phospholipase C	200 U/mg	200 000 U/g	6,6-8,0	7,3		37		CAS 9001-86-9	<i>Bacillus cereus</i> , määrä arviolta 2 mg (pakastimessa) - jauhe
PLD	Sigma	Phospholipase D	100 U/mg	100 000 U/g		5,6		30		CAS 9001-87-0	Type IV from cabbage, määrä 1,5 mg (pakastimessa) - jauhe

## Laskuja

Peruskaavat:  $c = n/V$      $m = n * M$      $n = c * V \rightarrow m = c * M * V$   
 $c_1 * V_1 = c_2 * V_2$      $V_1 = c_2 * V_2 / c_1$

Natriumhydroksidi -liuokset:Rohalase PL-Xtra, happo- ja savikäsitelyssä tarvittavat:

20 p-% NaOH:            NaOH massa / (NaOH massa + veden massa) = 0,2 = 20 %  
 $15 \text{ g} / (15 + 60 \text{ g}) = 0,2$

4 mol/l NaOH:             $c = 4 \text{ mol/l}$      $M = 40 \text{ g/mol}$      $V = 200 \text{ ml}$   
 $m = 4 \text{ mol/l} * 40 \text{ g/mol} * 0,2 \text{ l} = 32 \text{ g}$   
 (%-osuus:     $(32 \text{ g} / 200 \text{ g}) * 100 \% = 16 \%$ )

1 mol/l NaOH:             $c = 1 \text{ mol/l}$      $M = 40 \text{ g/mol}$      $V = 100 \text{ ml}$   
 $m = 1 \text{ mol} * 40 \text{ g/mol} * 0,1 \text{ l} = 4 \text{ g}$

PLC-kokeissa tarvittavat:Kaliumdivetyhydroksidi 1 mol/l:

$c = 1 \text{ mol/l}$      $M = 136,09 \text{ g/mol}$      $V = 100 \text{ ml}$   
 $m = 1 \text{ mol} * 136,09 \text{ g/mol} * 0,1 \text{ l} = 13,09 \text{ g}$

Kaliumdivetyhydroksidi 0,1 mol/l:

$c = 0,1 \text{ mol/l}$      $M = 136,09 \text{ g/mol}$      $V = 250 \text{ ml}$   
 $m = 0,1 \text{ mol} * 136,09 \text{ g/mol} * 0,25 \text{ l} = 3,4 \text{ g}$

Puskuriliuos pH = 7,3:

100 ml 0,1 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 74 ml 0,1 mol/l NaOH  
 tai  
 100 ml 1 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 74 ml 1 mol/l NaOH

Entsyymilaimennokset kokeissa:

Rohalase PI-Xtra:

100 ppm = n. 330 U, kun öljyä on 320 g

Koska 1 ml laimentamatonta entsyymiä sisältää n. 10000 U, tehdään laimennos 1:10

→1000 U/ml (1ml PLA2 + 9 ml H<sub>2</sub>O)

→330 U/ml \* 10 ml = 1000 U/ml \* x

→x = 330 U/ml \* 10 ml / 1000 U/ml = 3,3 ml

→330 U/ml (3,3 ml 1:10 laimennosta + 6,7 ml H<sub>2</sub>O)

→Pipetoidaan 1 ml entsyymilaimennosta 320 g öljyä.

## Entsyymien aktiivisuuden testaus

Varastoliuos NaOH 0,5 mol/l:

$$c = 0,5 \text{ mol/l} \quad M = 40 \text{ g/mol} \quad V = 250 \text{ ml}$$

$$m = 0,5 \text{ mol/l} * 40 \text{ g/mol} * 0,25 \text{ l} = 5 \text{ g}$$

Työliuos NaOH 0,05 mol/l:

$$c_1 = 0,5 \text{ mol/l} \quad c_2 = 0,05 \text{ mol/l} \quad V_2 = 250 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ mol/l} * 250 \text{ ml} / 0,5 \text{ mol/l} = 25 \text{ ml}$$

→ Mitataan 25 ml 0,5 mol/l NaOH:a 250 ml:n mittapulloon ja täytetään pullo merkkiin asti.

pH:n säätö NaOH 0,1 mol/l:

$$c = 0,1 \text{ mol/l} \quad M = 40 \text{ g/mol} \quad V = 250 \text{ ml}$$

$$m = 0,1 \text{ mol/l} * 40 \text{ g/mol} * 0,25 \text{ l} = 1 \text{ g}$$

pH: säätö, suolahappo 0,1 mol/l:

$$P = 1,18 \text{ g/ml} = 1180,0 \text{ g/l}$$

$$n = 1180 \text{ g/l} / 36,46 \text{ g/mol} = 32,36 \text{ mol}$$

$$c = 32,36 \text{ mol/l}$$

$$c_1 = 32,36 \text{ mol/l} \quad c_2 = 0,1 \text{ mol/l} \quad V_2 = 250 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mol/l} * 250 \text{ ml} / 32,36 \text{ mol/l} = 0,77 \text{ ml}$$

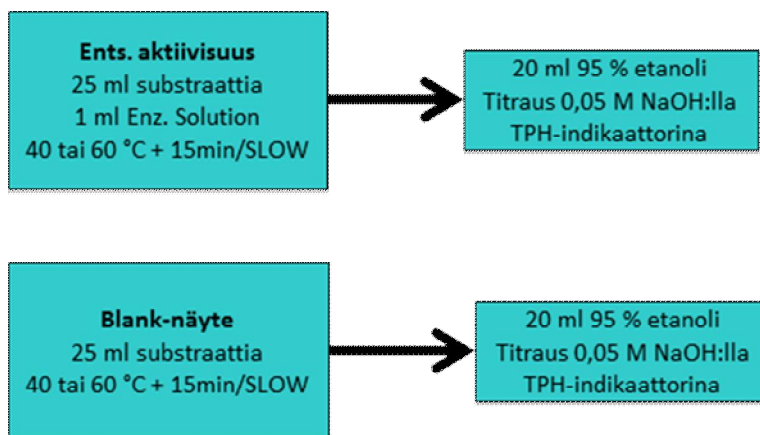
→ Mitataan 0,77 ml laimentamatonta suolahappoa 250 ml:n mittapulloon ja täytetään pullo merkkiin asti.

- Substraatti
  - Lesitiini (fosfatidyylikoliini) 20-100 g / l
  - 20 mM CaCl<sub>2</sub>
  - pH 4,5 säädetään 0,1 M HCl:illa
  - Tai
  - pH 8 säädetään 0,1 mM NaOH:illa
- Homogenisointi 1 min



Entsyymilaimennos:

- Niin, että NaOH kulutus on n. 10-20 ml
- Rohalase PL-Xtraa laimennetaan 1:1000 tai 1:10000
- Sigma-Aldrichi PLC -entsyymiliuosta ei tarvitse laimentaa



$$\frac{(V1-V0)*c(NaOH)*1000}{t*laim.kerroin} = U/ml$$

V1 = NaOH kulutus (ml)

V0 = NaOH kulutus nollanäytteessä (ml)

c = NaOH konsentraatio

t = aika (min)

1 (2)

## Tuloksia

Taulukko 1. Loput analyysit, jotka tehtiin käsitellylle rypsiöljylle.

	Vesi	Typpi	Monoglyseridit	Diglyseridit	Triglyseridit	Oligomeerit	Rasvahapot	Öljypitoisuus	Fosfatidyyli glyseroli	FFA	Rauta (Fe)	Natrium (Na)	Kalsium (Ca)	Magnesium (Mg)	pH
	mg/kg	mg/kg	area-%	area-%	area-%	area-%	area-%	%	mg/kg	wt-%	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
Nollakoe	220	14	0,2	2,4	95,4	0,3	1,7	103	<0,5	1,5	0,7	6,8	141	23,3	5,3
EK	230	8,3	0,3	2,5	94,3	0,4	2,4	103	<0,5	1	0,1	<1,0	18,5	2	4,6
EK + SK	160	3	0,2	2,5	95,3	0,1	1,9	101	<0,5	0,9	0,1	<1,0	8,5	1,5	
HK	1600	14	0,2	2,4	95,9	<0,1	1,5	100	<0,5	0,9	0,6	10,8	43,7	8,1	
HK +EK	450	5,8	0,3	2,6	93,3	0,1	3,6	104	<0,5	0,9	<0,1	<1,0	1	<0,3	
HK + EK (3 kert. Annostus)		5	0,2	2,5	95,5	<0,1	1,8	103	<0,5	0,9	<0,1	2,2	1,1	0,3	4,6
HK + EK + SK	250	2,1	0,1	2,4	95	0,4	2,1	101		0,9	<0,1	<1,0	<0,3	<0,3	
HK + SK		4,1	0,2	2,6	95,4	0,1	1,7	107	<0,5	1	0,9	<1,0	6,8	1,9	
HK + SK + EK	140	2,7	0,2	2,7	95,2	0,2	1,7	103	<0,5	0,9	0,7	7	3,7	0,6	4,1
HK + SK	360	3,5	0,2	2,6	95,2	0,2	1,8	102		1,1	0,3	<1,0	2,1	0,4	
HK + SK + EK	220	2,6	0,1	2,6	95,6	0,2	1,6	101		1,1	<0,1	<1,0	0,4	<0,3	
Haarukoivat kokeet:															
Nollakoe		16	<0,1	2,3	96,3	<0,1	1,3	103	<0,5	1,1	0,7	<1,0	160	42,3	
30 ppm entsyymiä 2.5h	180	16	0,2	2,4	95,9	<0,1	1,5	104	<0,5	0,9	0,7	<1,0	167	42,5	
30 ppm entsyymiä 4 h		16	<0,1	2,3	96,3	<0,1	1,3	103	<0,5	1,1	0,7	<1,0	160	42,3	
30 ppm entsyymiä 6 h	200	18	0,2	2,4	95,6	0,3	1,5	105	<0,5	0,9	0,8	<1,0	166	43,8	
60 ppm entsyymiä 2.5h	180	16	0,1	2,4	95,5	0,2	1,8	106	<0,5	0,9	0,7	<1,0	155	40,5	4
30 ppm entsyymiä, 2 w t-% H <sub>2</sub> O, 1400 ppm CA, 2,5 h		17	0,3	2,6	95,2	<0,1	1,9	92		4,3	0,9	<1,0	45,8	13	4
30 ppm entsyymiä, 2 w t-% H <sub>2</sub> O, 125 ppm CA, 63 ppm NaOH, 2,5 h	200	17	0,3	2,6	95	0,3	1,8	94		0,8	0,7	<1,0	163	36,5	4
30 ppm entsyymiä, 2 w t-% H <sub>2</sub> O, 125 ppm CA, 63 ppm NaOH, 6h	260	19	0,2	2,5	95,6	<0,1	1,7	95		1,1	0,9	1	46,1	15,3	4

Taulukko 2. Loput analyysit, jotka tehtiin PLC -entsyymillä käsitellyille näytteille.

2 (2)

	Vesi	Typpi	Monoglyseridit	Diglyseridit	Triglyseridit	Oligomeerit	Rasvahapot	Öljypitoisuus	Fosfatidyyli glyseroli
	mg/kg	mg/kg	area-%	area-%	area-%	area-%	area-%	%	mg/kg
EK 10 U + 370 ppm CA + 81 ppm NaOH + 2% H2O	190	13	0,3	2,6	94,5	0,1	2,6	94	
Nollakoe, 1 M puskuriliuos 5 ml, 1h	240	12	0,2	2,4	95,8	<0,1	1,6	102	<0,5
EK 5 ml PLC, 1 M puskuriliuos 5 ml, 1h		9,6	0,2	2,5	95,7	<0,1	1,7	101	<0,5
EK 5 ml PLC, 1 M puskuriliuos 5 ml, 2,5h		8,6	0,2	2,4	95,9	<0,1	1,6	105	<0,5
EK 5 ml PLC, 1 M puskuriliuos 5 ml, 6h		9,5	0,1	2,5	95,6	0,1	1,6	101	<0,5
Nollakoe, 0,1 M puskuriliuos 20 ml	260	13	0,3	2,5	95,3	<0,1	1,9	101	<0,5
EK 2 ml PLC, 0,1 M puskuriliuos 10 ml	290	13	0,1	2,3	96,1	<0,1	1,5	101	<0,5

Taulukko 3. Tulokset muista analyyseista jotka tehtiin käsitellylle eläinrasvalle.

	Vesi	Typpi	Monoglyseridit	Diglyseridit	Triglyseridit	Oligomeerit	Rasvahapot	Öljypitoisuus	Fosfatidyyli glyseroli	FFA	Rauta (Fe)	Natrium (Na)	Kalsium (Ca)	Magnesium (Mg)
HK	5300	620	1,9	18,7	62,1	0,2	17,1	88	<0,5	17,8	4,2	2,8	2	0,5
SK	460	590	1,8	18,6	61,2	0,5	18	91	<0,5	18,7	0,7	<1,0	0,7	0,4
HK + SK		510	2,1	19,4	59,2	0,2	19,2	73	<0,5	17	0,4	<1,0	<0,3	<0,3
Nollakoe	540	700	1,8	18,9	60,8	0,3	18,2	92	<0,5	18,7	9,7	13,7	42,2	4,5
EK 6900 ppm PLA2 1h		710	1,3	12,9	58	0,6	27,2	92	<0,5	26,2	2,1	14,3	9,5	0,9
EK 6900 ppm PLA2 2,5 h		710	1,5	12,7	56	0,2	29,5	90	<0,5	30	1,6	18,3	8,8	0,9
EK 6900 ppm PLA2 6h	360	690	4,4	17,1	51,6	0,3	26,6	99	<0,5	25,4	1	34,3	3,6	0,6
EK 310 ppm PLA2	560	690	1,6	18,3	60,3	0,3	19,5	90	<0,5	17	10,6	13,7	44,4	4,4
EK 300 ppm PLA2	790	690	1,3	18,4	60,6	0,2	19,5	89	<0,5	18,9	8,4	15,6	34,3	3,8
Nollakoe	440	620	1,9	18,8	61,3	0,4	17,7	97	<0,5	18,4	41,9	17,9	69	19,4
EK 30 ppm PLA2	450	623	1,9	18,8	61,5	0,2	17,5	94	<0,5	20,5	44,2	15,9	72	20,5