

Jori Pehkonen

Akryyliamidipitoisuuden pienentäminen leivonnassa

Vaasan Oy

Opinnäytetyö

Syksy 2018

SeAMK Ruoka

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: SeAMK Ruoka

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Jori Pehkonen

Työn nimi: Akryyliamidipitoisuuden pienentäminen leivonnassa

Ohjaaja: Sarita Ventelä, Matti-Pekka Pasto

Vuosi: 2018

Sivumäärä: 38

Liitteiden lukumäärä: 2

Tämä opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Vaasan Oy:n kanssa. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka hyvin entsyymiperäinen akryyliamidin vähentäminen toimii leivonnassa ja pystytäänkö entsyymiä käyttämään Euroopan komission akryyliamidiasetukseen sopivana vähentämistoimenpiteenä (A 2017/2158).

Akryyliamidi on orgaaninen, valkoinen, hajuton ja kiteinen aine, jota muodostuu paiston yhteydessä Maillard-reaktiossa lämpötilan noustessa yli 120 °C:n. Viljatuotteissa asparagiiniaminohappo on pääosassa akryyliamidin syntymisessä, kun se reagoi pelkistävien sokereiden, kuten fruktoosin ja glukoosin kanssa.

Työssä käytettiin kahta eri valmistajan asparaginaasientsyymiä, joiden tehtävänä oli hajottaa asparagiinia ja näin vähentää akryyliamidin muodostumista leipään.

Tuloksena voidaan todeta että ensimmäisellä entsyymeistä ei ollut vaikutusta akryyliamidin määrään, johtuen todennäköisesti happamasta taikinasta. Toisella entsyymillä pystyttiin pudottamaan akryyliamidin määrää lähes 60 %.

Avainsanat: leivonta, leipä, akryyliamidi, entsyymit

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: SeAMK Food and Agriculture

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food Technology

Author/s: Jori Pehkonen

Title of thesis: Reducing Acrylamide in Baking

Supervisor(s): Sarita Ventelä, Matti-Pekka Pasto

Year: 2018

Number of pages: 38

Number of appendices: 2

This thesis was made in cooperation with Vaasan Oy/Ltd bakery. The purpose of the study was to find out how well the enzyme reduction of acrylamide functions in baking and whether the enzyme can be used as a reduction measure in accordance with the European Commission regulation on acrylamide (A 2017/2158).

Acrylamide is an organic, white, odorless and crystalline substance formed during baking in the Maillard reaction when the temperature rises above 120 ° C. In cereal products, the asparagine amino acid is predominant in the formation of acrylamide when it reacts with reducing sugars such as fructose and glucose.

Two asparaginase enzymes from two different manufacturers were used to break down asparagine and thus reduce the formation of acrylamide in bread.

As a result, the first enzymes did not affect the amount of acrylamide, probably due to the acidic dough. With another enzyme, the amount of acrylamide could be reduced by almost 60 %.

Keywords: baking, bread, acrylamide, enzymes

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluettelo	5
Käytetyt termit ja lyhenteet	6
1 JOHDANTO	7
2 LEIVONTAPROSESSI	8
2.1 Raaka-aineet.....	8
2.1.1 Jauhot ja hiilihydraatit	11
2.1.2 Taikinajuuri.....	16
2.1.3 Entsyymit	17
2.2 Prosessi	19
2.2.1 Taikinanteko ja taikinalepo.....	19
2.2.2 Ylöslyönti.....	20
2.2.3 Nostatus ja paisto	20
3 AKRYYLIAMIDI.....	22
3.1 Muodostuminen.....	22
3.2 Pitoisuuden pienentäminen	24
3.3 Asparaginaasi	25
3.4 Mittaaminen	26
4 KOELEIVONNAT	29
5 TULOKSET	31
6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	33
LÄHTEET	35

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. Jyvän perusrakenne.....	11
Kuva 2. Gluteenin koostumus.	13
Kuva 3. Entsyymien toiminta.....	17
Kuva 4. Leipomon toiminta.	19
Kuva 5. Ehdotettu mekanismi akryyliamidin muodostumiselle lämpökäsitellyissä elintarvikkeissa.....	24
Kuva 6. Asparagiinin hydrolyysi asparagiinihapoksi asparaginaasin avulla.	25
Kuva 7. Akryyliamidin määrittämisen tärkeimmät vaiheet.	26
 Kuvio 1. Akryyliamidia tuotteissa	32
 Taulukko 1. Ruis- ja vehnäjauhojen peruskoostumus.....	12
Taulukko 2. Vehnäjauhon laaturajoja	13
Taulukko 3. Vehnäjauhon tunnuslukuja farinogrammista.....	13
Taulukko 4. Vehnän tunnuslukuja ekstensogrammista	14
Taulukko 5. Ruisjauhon tunnuslukuja	15
Taulukko 6. Asparagiinin määrä jauhoissa	15
Taulukko 7. Entsyymejä ja reaktiokohteita.....	18

Käytetyt termit ja lyhenteet

Akryyliamidi	Yhdiste, jota syntyy tärkkelyspitoisen ruoan kypsennyksessä
Asparagiini	Aminohappo, joka on suuressa roolissa akryyliamidin syntymisessä
Asparaginaasi	Entsyymi, joka hajottaa asparagiinia
Ylöslyönti	Leivontavaihe, jossa taikina muotoillaan leiväksi
LC-MS/MS	Lyhenne nestekromatografia-tandem massaspektrometrille

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Vaasan Oy:n kanssa. Tuotekehitys, tutkimus ja laatu toimivat apuna ja tukena. Vaasan Oy on 1849 perustettu suomalainen leipomoalan yritys, joka on osa Lantmännen Unibakea. Omistaja ruotsalainen Lantmännen maatalousosuuskunta on Pohjoismaiden johtava maatalouden, koneiden, bioenergian ja elintarvikkeiden alalla toimija ja se työllistää 10 000 henkeä yli 20 maassa.

Akryyliamidi on orgaaninen, valkoinen, hajuton ja kiteinen aine, jonka ruotsalaiset tutkijat löysivät vuonna 2002 ruoasta. Akryyliamidia syntyy tärkkelyspitoisissa elintarvikkeissa, kuten leivässä kypsennyksen yhteydessä kun lämpötila nousee yli 120 °C. Akryyliamidin syntymiseen vaikuttavia asioita on monia, mutta pääroolissa ovat asparagiini aminohappo ja pelkistävät sokerit, jotka reagoivat keskenään kuumennuksen aikana Maillard-reaktion yhteydessä.

Akryyliamidilla voi olla haitallisia vaikutuksia terveyteen, joten elintarvikealalle on tulossa muutoksia omavalvontaan akryyliamidin suhteen ja toimijoilla täytyy olla heille soveltuvat keinot pienentää akryyliamidin määrää elintarvikkeissa. Tästä johtuen akryyliamidi on hyvin ajankohtainen asia tällä hetkellä elintarvikealalla ja keinoja sen pienentämiseen on monenlaisia. Kaikki toimenpiteet eivät kuitenkaan sovellu kaikkiin tuotteisiin tai leivontaprosesseihin. Tässä työssä tutkitaan entsyymien vaikutusta akryyliamidiin ja testataan kahta eri entsyymiä ja niiden vaikutusta leivontaprosessiin, tuotteen laatuun sekä akryyliamidipitoisuuteen. Työn tavoitteena on saada tietoa miten paljon entsyymit laskevat akryyliamidipitoisuutta leivässä.

Työssä kerrotaan myös leivontaprosessista, -raaka-aineista sekä niiden vaikutuksesta akryyliamidin syntymiseen.

2 LEIVONTAPROSESSI

Leivontaprosessin pääkohdat ovat taikinan teko, ylöslyönti, paisto ja pakkaus, joista jokainen kohta on tärkeässä roolissa leivottaessa laadukkaita tuotteita.

”Hyvän ammattileipurin pitää osata soveltaa teoreettista tietämystään käytännön tilanteissa. Leivonnan onnistumiseen ja lopputuotteen laatuun vaikuttavat fysikaaliset, kemialliset, mikrobiologiset ja hygieeniset tekijät. Lisäksi leipurin täytyy tuntea alan jatkuva ja nopeasti kehittyvä tekniikka, valmistusaineet ja niiden vaikutukset onnistuneeseen leivontaan.” (Peltomäki ym. 1997, Esipuhe)

2.1 Raaka-aineet

Leivonnassa käytettäviä perusraaka-aineita ovat jauhot, vesi, hiiva ja suola. Yleisimmät leivonnassa käytettävät jauhot ovat ruis ja vehnä, joita käsitellään erikseen myöhemmissä luvuissa. Seuraavassa on kerrottu leivonnan yleisimpien raaka-aineiden ominaisuuksia leivonnan kannalta ja niiden vaikutuksia akryyliamidin syntymiseen.

”**Vesi** vanhin voitehista”, kuten vanhassa sananlaskussa todetaan, on suuressa osassa leivontaa. Taikinan lämpötila pystytään säätämään veden avulla sopivaksi (Savola 1989, 30 - 31). Veden tehtävä on saada aineet vettymään eli hydratoitumaan. Poolisena yhdisteenä vesi toimii liuottimena leivonnassa muun muassa sokerille, suolalle ja jauhoissa oleville vesiliukoisille komponenteille. Ilman veden vaikutusta leivonnassa tapahtuvat tärkeät kemialliset ja biokemialliset reaktiot eivät toteutuisi, eikä hiiva pystyisi toimimaan. (Salovaara ym. 2017, 20.)

Yksi veden mittari on veden kovuus, eli kuinka paljon vesi sisältää kalsium- ja magnesiumsuoloja. Suomessa vedet ovat hyvin pehmeitä, eikä kovuudella ole juuri merkitystä leivontaan. (Salovaara ym. 2017.) Suomessa kovuus on luokkaa 0 - 6 H, mutta ulkomailla, jossa veden kovuus voi olla 20 - 30 H, kovuudella on jo merkitystä, koska kova vesi vahvistaa taikinan sitkoa (Savola 1989, 30 - 31).

Vedellä tiedetään olevan vaikutusta akryyliamidin syntyy. Kuivissa tuotteissa kuten näkkileivissä on enemmän akryyliamidia kuin pehmeissä leivissä. Tämä johtuu ve-

den haihtumisesta kuumennettavasta tuotteesta. Lämpötila, jonka yläpuolella akryyliamidin muodostuminen alkaa, riippuu elintarvikkeen sisältämästä kosteudesta. (EFSA 2015, 24, 42.) Akryyliamidin muodostuminen alkaa veden aktiivisuuden laskiessa alle 0,8 (Gökmen 2016, 147).

Hiivaa käytetään leivonnassa nostatukseen. Leivinihiiva (*Saccharomyces cerevisiae*) lisääntyy aerobisessa ympäristössä ja tuottaa etanolia ja hiilidioksidia anaerobisessa ympäristössä, kuten taikinassa. Hiiva käyttää sokereita ravinnokseen, tätä tapahtumaa kutsutaan käymiseksi. Käymisessä syntyy etanolia, aromiaineita ja hiilidioksidia, joka kaasuna nostattaa leipää. (Salovaara ym. 2017, 148.)

Hiivan tehtävät leivonnassa ovat siis leivän nostattaminen ja huokoisen rakenteen aikaansaaminen, aromiaineiden muodostuminen sekä taikinan käsiteltävyyden parantaminen sen pehmetessä (Savola 1989, 26).

Gökmen (2016, 140) kertoo kirjassaan *Acrylamide in Food*, että hiiva käyttää asparagiinia ravinnokseen fermentoinnin aikana. On kehitetty myös erikoishiivoja, joilla pystytään tehokkaammin vähentämään akryyliamidin muodostumista (Food Drink Europe 2013, 44).

Suola eli natriumkloridi vaikuttaa edistävästi maun lisäksi myös taikinan leipoutuvuuteen ja mikrobiologiseen säilyvyyteen sitomalla vettä. Suola pidentää taikinan muodostumisaikaa ja parantaa sekoituskestävyyttä, tekemällä taikinasta ”vahvempaa” vehnästä leivottaessa. Ruisleivonnassa, jossa ei ole sitkorakennetta, suola inhiboi alfa-amylaasin toimintaa ja vähentää leivän sisuksen murenevuutta. (Salovaara ym. 2017, 66 - 70.)

Suolan käytöstä havaittuja positiivisia vaikutuksia leivontaan: parantaa sitkoa, hidastaa taikinan kypsymistä, pidentää leivonta-aikaa, lisää tilavuutta, huokoisempi sisus, parantaa viipalekestävyyttä ja tuoreena säilymistä sekä stabiloi leivontaprosessia hidastamalla hiivan ja entsyymien toimintaa. (Savola 1989, 30 - 31.)

Leivissä suolapitoisuus on yleensä 0,9 - 1,3 % ja suolan määrä lasketaan natriumin mukaan, kertomalla Na 2,5:llä (Salovaara ym. 2017, 71). Voimakassuolaisen raja on 1,1 % tai yli. ”Vähennetty suolaa”-merkintä voidaan antaa tuotteelle, josta on vähennetty 25 % suolaa verrattuna vastaavan tuotteen suolapitoisuuteen, joka on

lähtökohtaisesti 1,1 %. Näin ollen 0,83 % tai vähemmän suolaa sisältävät tuotteet merkitään "Vähennetty suolaa". (Leipätiedotus, [viitattu 10.1.2018].)

Suolalla on akryyliamidin muodostumista estävä vaikutus, mutta suuret pitoisuudet taas lisäävät akryyliamidin määrää, johtuen todennäköisesti hiivan toiminnan heikentymisestä (Gökmen 2016, 141).

Muiden suolojen, kuten Ca^{2+} lisääminen 0,3 %:lla leivontaan, on tutkimusten mukaan huomattu voivan vähentää akryyliamidin muodostumista 30 % (Food Drink Europe 2013, 39).

Rasvat ovat tärkeä osa leivontaa ja erilaisiin leivontasovelluksiin on olemassa erilaisia leivontarasvoja ja öljyjä. Rasvat ovat kemiallisesti sanottuna lipidejä, yhdisteitä, jotka eivät liukene veteen, vaan orgaanisiin liuottimiin. Rasvojen perusrakenne on triasyyliglyseroli, joka koostuu glyserolista ja kolmesta siihen esterisidoksella liittyneestä rasvahaposta. Rasvahappojen määrä ja sijainti määrittävät rasvan ominaisuudet. Rasvahappokoostumus ja rasvan ominaisuudet vaikuttavat siihen, onko rasva kiinteää vai nestemäistä, runsaasti monitydyttyneitä rasvahappoja sisältävät rasvat ovat huoneen lämmössä nestemäisiä ja tyydyttyneet kiinteitä. (Heinonen, Jouppila & Salovaara 2003, 20 - 21.)

Rasva parantaa leivän käsiteltävyyttä ja rakennetta. Lipidit, kuten glykolipidit, vahvistavat taikinan kaasurakkuloiden seinämiä ja auttavat näin kaasunpidätyskyvyssä leivän noustessa. (Salovaara ym. 2017, 36 - 38.)

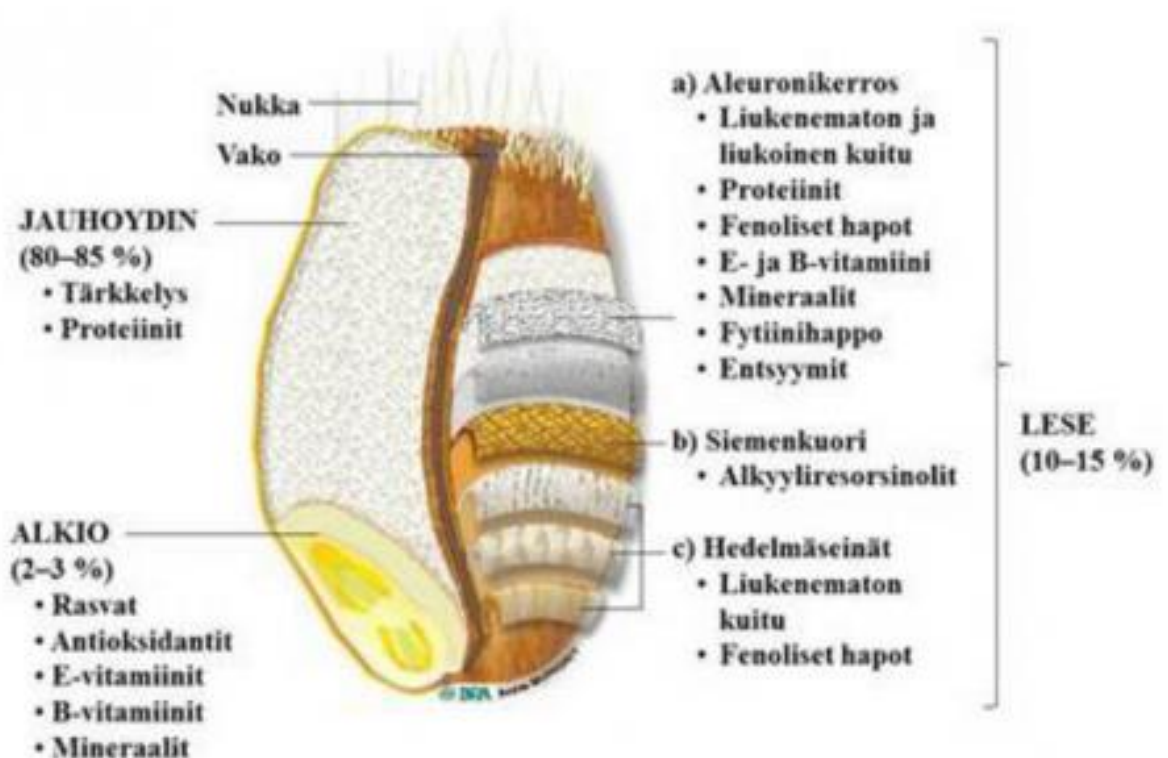
Auvinen (1990, 45) kertoo kirjassaan Minun leipäni, kuinka rasva monipuolisesti leivonnassa mukana olevana vaikuttaa massojen tasaiseen rakenteeseen, herkullisten makujen korostumiseen sekä valmiin tuotteen väriin.

Rasvojen on huomattu vaikuttavan akryyliamidin pitoisuuteen suurina määrinä esimerkiksi kekseissä, mutta tuoreleivonnassa käytettävä rasvan määrä on niin pieni ettei se juuri vaikuta akryyliamidin muodostumiseen (Gökmen 2016, 142).

2.1.1 Jauhot ja hiilihydraatit

Vehnä- ja ruisjauhot ovat yleisimpiä leivonnassa käytettyjä jauhoja, niiden lisäksi käytetään kauraa ja ohraa sekä erilaisia jyviä, rouheita, rakeita, hiutaleita, litisteitä, leseitä ja kuituja (Salovaara ym. 2017, 61 - 64).

Kuvassa 1 on esitetty perusrakenne jyvästä, joka on jaettu kolmeen osaan: leseeseen ja alkioon, jotka sisältävät runsaasti vitamiineja, kivennäisaineita sekä muita bioaktiivisia yhdisteitä. Leseessä ja alkiossa on myös paljon ravintokuituja. Kolmas ja suurin osa jyvässä on jauhoystin, joka koostuu tärkkelyksestä ja proteiineista. (Salovaara ym. 2017, 50.)



Kuva 1. Jyvän perusrakenne (Leipätiedotus, [viitattu 3.5.2018]).

Viljalajikkeilla ja viljelyssä käytetyllä maaperällä on vaikutusta viljaan luontaisesti kuuluvan asparagiinin muodostumiseen. Asparagiinin määrä taas on yhteydessä akryyliamidin määrään. Rikkiköyhä maaperä lisää asparagiinin muodostumista viljaan. (Food Drink Europe 2013, 37) Lannoitteissa käytettävä typpi myös lisää asparagiinin määrää viljassa. Vuosittaisen sadon asparagiinipitoisuuteen voivat vaikuttaa myös erilaiset sääolosuhteet, kuten lämpö ja kosteus. (Gökmen 2016, 139.)

Taulukko 1 esittelee erilaisten ruis- ja vehnäjauhojen ravintoarvojen peruskoostumuksen.

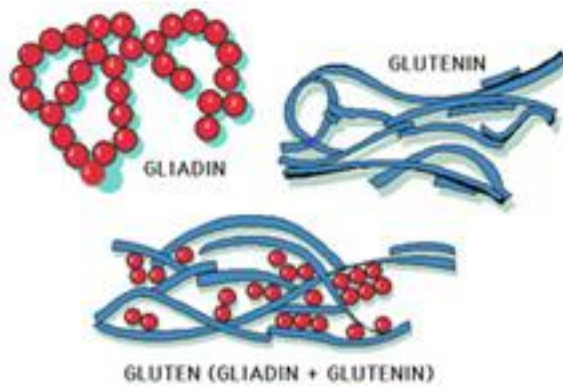
Taulukko 1. Ruis- ja vehnäjauhojen peruskoostumus (Salovaara ym. 2017, 51).

Peruskoostumus	Vehnä-jauho	Hiivaleipä-vehnäjauho	Erikois-vehnäjauho	Täysjyvä-vehnäjauho	Ruisjauho	Sihti-ruisjauho	Lesty-ruisjauho
Hiilihydraatteja	67	65	68.5	57	58	66	70
joista sokereita	0.4	0.4	0.4	0.8	1.3	0.5	0.5
Ravintokuitua	3.8	5.5	3.3	12.5	14.5	10	7
Proteiinia	13.3	13.5	12.7	13.8	10	8	8
Rasvaa	1.6	2.4	2	2.5	2	2	2
Kivennäisaineita (tuhka)	0.6 - 0.75	1.1 - 1.4	0.5 - 0.6	1.6 - 2.1	1.5 - 1.9	0.7 - 1	0.4 - 0.7
Kosteus (vesi)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Energiasisältö (kJ/100 g)	1500	1495	1500	1440	1395	1460	1500

Leivonnassa jauhojen tehtävä on sitoa taikinassa oleva vesi, muodostaa taikinan rakenne ja leivän runko. Jauhot koostuvat suurimmaksi osaksi pitkistä sokeriketjuista, tärkkelyksestä, joka toimii viljan jyvän energiavarastona. (Savola 1989, 9.)

Vehnäjauho eroaa muista jauhoista sen sitkoa muodostavan gluteeni-proteiinin ansiosta. Proteiinit muodostuvat aminohapoista. Aminohappoketjut määrittävät proteiinin ominaisuudet. Vehnässä olevassa gluteeni-proteiinissa on muun muassa gliadiini- ja gluteniini-aminohappoja, jotka tekevät taikinaan kimmoisan ja venyvän sitkoverkoston. (Häikiö & Paalanen 1986, 80 - 83.) Aminohappojen järjestys eli aminohapposekvenssi on avain sitkon syntymiseen, mutta todellista syytä sitkon syntymiseen ei vielä tiedetä. Vehnän proteiini ei nimittäin eroa juurikaan rukiista muilta ominaisuuksiltaan kuten aminohappokoostumukseltaan tai proteiinien liukoisuudeltaan. (Salovaara ym. 2017, 34.)

Kuvassa 2 on esitetty gliadiini ja gluteniini aminohappojen ryhmittäminen sitkoksi taikinan sekoituksen aikana klassisen Wallin ja Becwithin teorian mukaan.



Kuva 2. Gluteenin koostumus (Oregon State University, [Viitattu 13.6.2018]).

Vehnäjauhon laatua mitataan monin eri tavoin. Taulukoissa 2, 3, ja 4 on esitelty yleisimpiä jauhojen laadun mittareita sekä laaturajoja.

Taulukko 2. Vehnäjauhon laaturajoja (Salovaara ym. 2017, 53 [Helsingin mylly, Fazer Mylly]).

Laaturajat	
Kosteus (%)	12,5 - 14,5
Sakoluku (s)	250 - 350
Kostea sitko (%)	27 - 30
Proteiini (%)	12 - 13,5
Zelenyluku (ml)	40 - 60

Taulukko 3. Vehnäjauhon tunnuslukuja farinogrammista (Salovaara ym. 2017, 53 [Helsingin Mylly, Fazer Mylly]).

Farinogrammi	
Vedensidontakyky (%)	56 - 60
Sekoituskestävyys (min)	8 - 2
Taikinan pehmeneminen (BU)	40 - 70

Taulukko 4. Vehnän tunnuslukuja ekstensogrammista (Salovaara ym. 2017, 53 [Helsingin Mylly, Fazer Mylly]).

Ekstensogrammi	
Venytysvastus 45 min (BU)	400 - 600
Venytysvastus 90 min (BU)	700 - 900
Suhdeluku	3 - 7

Ruisjauhot eroavat vehnäjauhoista sitkoproteiinin puuttumisen osalta, kuten jo aikaisemmin todettiin. Ruisjauhoilla on kuitenkin muita mitattavia ominaisuuksia, kuten sakoluku, joka vaikuttaa leivontaan. Sakoluku kertoo jauhoista alfa-amylaasiaktiivisuuden, eli kuinka aktiivinen jyvässä tärkkelystä pilkkova alfa-amylaasi on. Mitä pienempi sakoluku, sitä suurempi entsyymiaktiivisuus jauhoilla on. Alfa-amylaasin aktiivisuuteen vaikuttaa se, onko jyvä itänyt tähkässä, jossa alfa-amylaasin tehtävänä on pilkkoa tärkkelystä sokereiksi itävälle jyvälle suotuisampaan muotoon. (Salovaara ym. 2017, 58 - 59.) Jyvän itämiseen vaikuttaa yleensä sateinen kesä, jolloin jyvä alkaa itää tähkässä ennen puintia (Ala-Kulju ym. 1981, 77).

Leivonnan kannalta liiallinen tärkkelyksen pilkkoutuminen sokereiksi on epäedullista, koska se tekee leivän sisuksesta kostean ja romahduttaa rakenteen. Liian matala entsyymiaktiivisuus taas vaikuttaa leivontaan tekemällä leivän sisuksesta kuivan. (Salovaara ym. 2017, 59.)

Normaaliin ruisleivontaan käytettävän ruisjauhon sakoluku on 110 – 130, joka on esitetty myös taulukossa 5. Sakoluvun pudotessa 80:een tai alle, voidaan jauhoja käyttää vähemmän valmistukseen. Suurempi sakoluku, kuten 140 tai sitä suurempi, on hyvä tuomaan näkkileivälle toivottua rapeutta. (Salovaara ym. 2017, 59.)

Sakoluvun (falling number) määrittäminen tapahtuu englanninkielisen nimensä mukaisesti laskemalla aikaa (s) kuinka pitkään koeputkessa olevan männän kestää painua seoksen pohjalle. Seos koostuu jauhetuista jyvistä ja vedestä, jota sekoitetaan männällä koeputkessa 1 min ajan samalla lämmittäen koeputkea + 100 °C:n lämpöisessä vesihauteessa. Tämän jälkeen männän annetaan laskeutua alas ja otetaan aika sekoituksen alusta siihen pisteeseen kun mäntä on vajonnut koeputken pohjalle, pienin mahdollinen sakoluku on siis 60. (Salovaara ym. 2017, 59.)

Taulukko 5. Ruisjauhon tunnuslukuja (Salovaara ym. 2017, 58 [Helsingin Mylly]).

Laaturajat	Ruisjauho	Sihtiruisjauho	Lestyruisjauho
Sakoluku	110 - 130	120 - 200	150 - 250
Huippuviskositeetti amylografissa (EA)	230 - 330	450	-
Liisteröitmisen alun LT amylografissa (°C)	63 - 67	-	-

Jauhot sisältävät luontaisesti asparagiinia ja vehnäjauhot sisältävät vapaata asparagiinia yli puolet vähemmän kuin ruisjauhot, kuten alla olevasta taulukosta 6 selviää.

Taulukko 6. Asparagiinin määrä jauhoissa (Gökmen 2016, 138).

Jauho	Asparagiini (mg/100 g)
Vehnä	1,74 - 19,05
Ruis	41,37 - 44,10

Täysjyvävilja, leseet ja itänyt vilja sisältävät enemmän asparagiinia, kuin viljan ydin-
osat. Leivonnassa käytettävien jauhojen valinnalla voidaanakin vaikuttaa akryyliami-
din muodostumiseen valitsemalla jauhoja, joissa on käytetty enemmän viljan ydin-
osia. Tämä kuitenkin vaikuttaa tuotteen ravitsemuksellisiin ja aistinvaraisiin ominai-
suuksiin heikentävästi, jolloin kuidun ja erilaisten ravinteiden saanti myös heikentyy.
(Food Drink Europe 2013, 38.)

Hiilihydraatteja tulee leivontaan jauhojen lisäksi joskus myös lisätystä sokerista, jolla
ei kuitenkaan tutkimuksien mukaan ole juurikaan merkitystä akryyliamidin muodos-
tumiseen, koska asparagiini on rajoittava tekijä akryyliamidin muodostumisessa
(Gökmen 2016, 137, 139). Viljassa olevat pelkistävät sokerit kuitenkin korreloivat
asparagiinin kanssa, jolloin sokerien mittausta voidaan mahdollisesti käyttää apuna
valittaessa sopivia jauhoja akryyliamidin vähentämiseen (Food Drink Europe 2013,
36).

Pelkistäviä sokereita ovat kaikki monosakkaridit, kuten fruktoosi ja glukoosi, sekä
jotkin disakkaridit, oligosakkaridit ja polysakkaridit. Pelkistävät sokerit jaetaan kah-
teen ryhmään, aldooseihin, joilla on vapaa aldehydyryhmä ja ketooseihin, joilla on
vapaa ketoniryhmä. Pelkistävät sokerit reagoivat aminohappojen kanssa Maillard-

reaktiossa, kun ruokaa kypsennetään, jonka seurauksena syntyy väriä ja aromeja sekä akryyliamidia. (Reducing sugar 2018, [viitattu 21.5.2018].)

On kuitenkin huomattu että glukoosista syntyy vähemmän akryyliamidia kuin fruktoosista, jonka voi selittää fruktoosin alhaisempi sulamislämpötila ja näin yhdisteiden esiasteiden nopeampi vuorovaikutus varhaisiksi Maillardin välituotteiksi (Gökmen 2016, 2).

2.1.2 Taikinajuuri

Taikinajuurta eli raskia käytetään varsinkin ruisleivonnassa hapattamaan leipää. Raskin teko on hallittua maitohappokäymistä, joka tapahtuu normaalisti puhtaissa raskisäiliöissä noin 28 - 30 °C:n lämpötilassa. Taikinajuuri sisältää vettä, ruisjauhoja ja siemenraskia edellisestä raskista. Raskituksen aikana syntyy maitohappobakteereja, etikkahappoa sekä villihiivoja, joilla pystytään nostattamaan leipää ilman lisättyä hiivaa. (Salovaara ym. 2017, 117 - 125.)

Käyttämällä raskia ja hapattamalla (ruis)taikinaa saavutetaan seuraavia hyötyjä;

- Ruisleivän maku ja haju, jotka syntyvät hapatusprosessissa
- Parantunut mikrobiologinen säilyvyys
- Ravintoarvojen kasvu
- Taikinan käsiteltävyys helpottuu
- Nostatusaste paranee ja samalla leivän sisuksesta tulee pehmeämpi
- Matalan pH:n ansiosta voidaan käyttää matalan sakoluvun jauhoja
- Pystytään leipomaan luonnollisesti, ilma lisäaineita

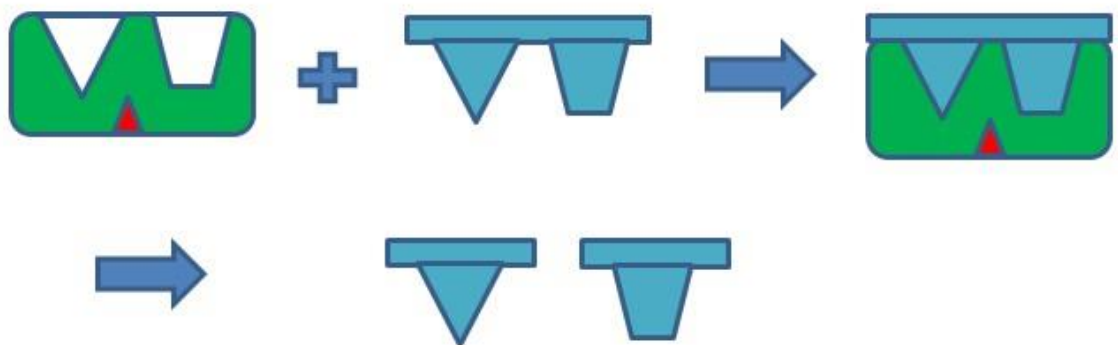
(Salovaara ym. 2017, 118.)

Taikinajuuren käytöllä on suotuisia vaikutuksia myös akryyliamidin suhteen, koska happamuus voi vähentää akryyliamidin muodostumista sekä lisätä muodostuneen

akryyliamidin hajoamista (Gökmen 2016, 144). Toisaalta matala pH voi hidastaa tai estää entsyymien, kuten asparaginaasin toiminnan (Kunkunberga ym. 2014).

2.1.3 Entsyymit

Kemiallisten reaktioiden biologiset katalyytit eli entsyymit ovat suuria valkuuaisi-nemolekyyliä, jotka toimivat hyvin spesifisti, eli osallistuvat vain tiettyyn kemialli-seen reaktioon. Entsyymien toimintaa onkin kuvattu kuvassa 1. "avain-lukko"-peri-aatteella, niiden tarkan toiminnan vuoksi. (Häikiö & Paalanen 1986, 85.)



Kuva 3. Entsyymien toiminta

Kuvassa edellä on esitetty entsyymien toimintaa, jossa vihreä osa on entsyymi, val-kea kolmionaukko entsyymissä sen aktiivinen osa ja punainen kolmio kofaktori. Ent-syymiin "istuva" sininen kolmio-puolisuunnikas on substraatti, joka hajoaa keskeltä.

Entsyymit jaotellaan kofaktorin tarpeen mukaan apoentsyymeihin ja holoentsyymeihin, joista viimeisessä on entsyymien lisäksi mukana kofaktori (Maijala 2016, 25). Kofaktori aktivoi entsyymien toimimaan ja niitä on sekä orgaanisia että epäorgaanisia. Kofaktorin ollessa epäorgaaninen, kuten vitamiini, puhutaan koentsyymistä.

Entsyymejä tunnetaan yli 3000 ja ne ovat jaoteltu kuuteen pääjoukkoon.

Entsyymien pääjoukot

1. Hapetus-pelkistys entsyymit, jotka katalysoivat hapetus-pelkistysreaktiota.
2. Transferaasit, jotka katalysoivat funktionaalisen, eli toiminnallisen ryhmän siirtoa.
3. Hydrolaasit, jotka katalysoivat erilaisten sidoksien hydrolyysiä, eli ryhmän siirtoa vedelle.
4. Lyaasit, jotka pilkkovat erilaisia sidoksia ilman hapetus-pelkistysreaktiota tai hydrolyysiä
5. Isomeraasit, jotka katalysoivat molekyylikaavan rakennetta molekyylissä, eli molekyylin sisäinen ryhmän siirto
6. Ligaasit, jotka yhdistävät kaksi molekyyliä kovalenttisesti ATP:n avulla.

(Pundir 2015, 4) & (Aittomäki ym. 2002, 55.)

Taulukossa 7 on esitetty eri entsyymien reaktiokohteita, eli mitä kyseiset entsyymit hajottavat.

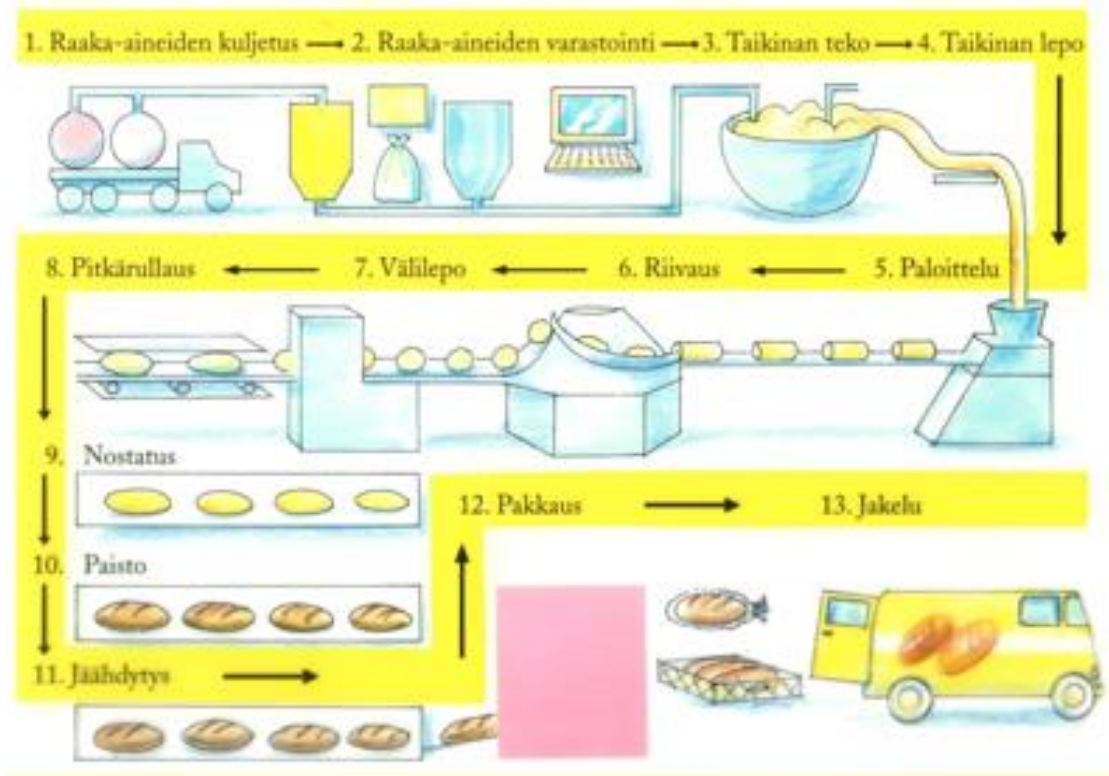
Taulukko 7. Entsyymejä ja reaktiokohteita (Häikiö & Paalanen 1986, 85 & Aittomäki ym. 2002, 93).

Entsyymi	Reaktio (hajottaa)
Laktaasi	Laktoosi
Lipaasi	Rasva (lipidi)
Maltaasi	Maltoosi
Sakkaraasi	Sakkaroosi
Proteaasi	Proteiini
Amylaasi	Tärkkelys
Glukoosioksidaasi	(hapettaa) glukoosi
Pullunalaasi	Tärkkelys
Glukoamylaasi	Tärkkelys

Leivonnassa mukana olevia entsyymejä on useita, joista eniten vaikuttavia ovat erilaiset tärkkelystä pilkkovat amylaasit.

2.2 Prosessi

Seuraavissa kappaleissa on kerrottu lyhyesti tuoreleivontaprosessista ja prosessin vaikutuksia akryyliamidin syntymiseen. Kuva 3 havainnollistaa prosessin kulkua.



Kuva 4. Leipomon toiminta (Leipätiedotus, [viitattu: 11.5.2018]).

2.2.1 Taikinanteko ja taikinaläpo

Raaka-aineiden mittaaminen sopivassa suhteessa keskenään tehdään reseptin avulla.

Raaka-aineet sekoitetaan keskenään taikinakoneessa tai käsin sekoittaen, jossa tavoitteena varsinkin vehnätaikinan suhteen on; a) aineiden sekoittuminen ja hydratoituminen, b) sitkon muodostuminen taikinaan ja c) kaasurakkuloiden muodostuminen taikinaan ilman sekoituksen yhteydessä. Ruistaikinaan riittää huomattavasti ”hellempi” sekoitus, jossa ainesosat käytännössä vain sekoitetaan keskenään. (Salovaara ym. 2017, 84.)

Taikinan sekoituksen jälkeen seuraa taikinaläpo. Levon aikana taikinan käsiteltävyys paranee ja taikinan vedensidonta saavuttaa optimaalisen asteen. Taikinaläpon

aikana hiivan tuottamat kaasut alkavat täyttämään ilmarakkuloita ja taikina alkaa nousta. Lepo auttaa seuraavaa vaihetta, koska varsinkin vehnätaikinoiden sitko rentoutuu jolloin muotoilu eli ylöslyönti helpottuu ilman taikinarakenteen rikkomista. Normaalisti vehnätaikinoiden taikinalepo on 10 - 20 minuuttia. (Saarela ym. 2004, 105.) Ruistaikinalla lepoaika on 45 - 60 minuuttia (Peltomäki ym. 1997, 65).

2.2.2 Ylöslyönti

Ylöslyönnissä taikina muotoillaan halutun muotoiseksi leiväksi. Vehnätaikinan ylöslyönti sisältää seuraavat vaiheet;

- **Paloittelu**, jossa taikina paloitellaan sopivan kokoisiksi paloiksi joko käsin tai koneella.
- **Riivaus**, jossa taikinapala ”pyöritetään” pallomaiseksi ja sen pinta kuivahdaa. Riivaus auttaa seuraavia vaiheita, kun pala ei tartu kiinni ja muotoilu on helpompaa pyöreästä taikinapalasta. Riivauksen aikana taikinaan muodostuneet kaasukuplat tasoittuvat ja taikinan rakenteesta tulee tasaisempi, myös sitkosäikeet ryhmittyvät tasaisemmin. (Saarela ym. 2004, 105.)
- **Välilepo** kestää noin 10 minuuttia, jona aikana taikinaan muodostunut sitko voipuu ja mahdollistaa taikinan muotoilun.
- **Taikinanmuotoilu**, joka voidaan tehdä esimerkiksi pitkärullaajalla tai käsin. (Salovaara ym. 2017, 101 -116).

2.2.3 Nostatus ja paisto

Kuten on todettu, nostatus ja varsinkin paisto ovat avain asemassa akryyliamidin syntymisen kannalta. Nostatuksella on akryyliamidin määrään laskeva vaikutus, joka johtuu hiivan kyvystä vähentää akryyliamidin syntymiseen vaikuttavia tekijöitä. Akryyliamidin muodostuminen tapahtuu paiston yhteydessä, jossa vaikuttavina tekijöinä ovat muun muassa lämpötila ja paistoaika.

Nostatuksessa taikinaan saadaan lisää tilavuutta ja kuohkeutta (Peltomäki ym. 1997, 8). Hiivan tuottamat kaasut saavat leivän nousemaan. Nostatukseen vaikuttavia tekijöitä ovat: nostatuskaapin lämpötila, suhteellinen kosteus, nostatusaika sekä taikinan rakenne ja hiivan määrä. (Saarela ym. 2004, 106.)

Paistossa leipä nousee vielä uunissa, koska hiivan muodostama hiilidioksidi ja etanoli sekä vesi laajenevat lämpötilan noustessa (Saarela ym. 2004, 106). Paiston alussa uuniin johdetaan höyryä, joka kostuttaa leivän pinnan ja tekee siitä joustavamman, edesauttaen uuninousua. Höyry auttaa myös kuoren värin ja aromien muodostumiseen. (Peltomäki ym. 1997, 8.)

Leipien paistolämpötila on yleensä 200 - 240 °C:sta ja paistoaika 15 - 45 minuuttia. Paiston aikana lämpötila siirtyy kuoresta kohti leivän sisusta, joka lämpenee noin 98 °C:n lämpötilaan. (Salovaara ym. 2017, 165 - 166.)

Paiston aikana taikinan proteiinit jähmettyvät, tämä denaturoituminen saa yhdessä liisteröityvän tärkkelyksen kanssa aikaan leivän rakenteen (Saarela ym. 2004, 106).

Akryyliamidi syntyy paiston yhteydessä, jossa lämpötilalla ja paistoajalla on suuri merkitys sen muodostumiseen. Tutkimuksissa on huomattu että pidempi paistoaika matalammassa lämpötilassa vähentää akryyliamidin muodostumista, sitä puoltaa Vaasan Oy:n tekemät akryyliamidin määritykset pidempään paistettaville leiville.

Skog (2007, 20) kirjoittaa kuinka eri paistotekniikoilla on pystytty vaikuttamaan akryyliamidin muodostumiseen. Höyryn lisääminen viimeiselle viidelle minuutille paistoa laski tutkimuksen mukaan akryyliamidin pitoisuutta 40 %. Infrapunasäteilyllä tehty paisto taas pudotti akryyliamidin pitoisuutta jopa 60 %.

3 AKRYYLIAMIDI

Akryyliamidi on orgaaninen, valkoinen, hajuton ja kiteinen aine, jonka kemiallinen kaava on C_3H_5NO . Akryyliamidi tunnetaan myös 2-propenamidina tai etyylikarboksamidina. Akryyliamidia käytetään apuna laastin ja maaperän stabiloinnissa, sekä polyakryyliamidina muun muassa jäteveden käsittelyssä. (Rogers 2018.)

Akryyliamidi löydettiin elintarvikkeista vuonna 2002 ruotsalaisen elintarvikeviraston (NFA) ja Tukholman yliopiston tutkijoiden toimesta (EFSA 2015). Akryyliamidi on kansainvälisen syöväntutkimuskeskuksen mukaan mahdollisesti ihmiselle syöpää aiheuttava aine ja sen tiedetään toimivan hermomyrkkynä ihmiselle (Duell 2013). Tutkimuksissa on huomattu että akryyliamidihöyryt ärsyttävät silmiä ja ihoa, sekä halvaannuttavat selkäydinnestejärjestelmää (Keramat ym. 2010). Todisteena tutkimukselle on vuonna 1997 sattunut akryyliamidivuoto ruotsalaisella tunnelirakennustyömaalla, jolloin lähettyviltä löydettiin huomattavia määriä kuolleita kaloja ja nautoja sekä halvaantuneita nautoja, myös työntekijät olivat kärsineet hermomyrkytyksestä johtuvasta tunnottomuudesta (Ingelmann-Sundberg 2002, 1). Akryyliamidia käsitellessä onkin suojauduttava tarkoin ja ehkäistävä kaiken tyyppinen kosketus aineeseen (Käyttöturvallisuustiedote 2018, 2).

Gökmen (2016, 132) kertoo kirjassaan, että leipomotuotteiden osuus ihmisten akryyliamidin päivittäisestä saannista voi olla 20 - 60 %. Tämä tarkoittaa 0,13 - 0,31 $\mu\text{g/kg}$ ruumiinpainosta aikuisilla ja 0,55 - 0,75 $\mu\text{g/kg}$ ruumiinpainosta lapsilla ja nuorilla.

Euroopan komissio on antanut akryyliamidiasetuksen (A 2017/2158, liite 4), jossa akryyliamidille asetetuissa vertailuarvoissa akryyliamidipitoisuus on vehnäleivälle 50 $\mu\text{g/kg}$ ja muille kuin vehnäpohjaisille leiville 100 $\mu\text{g/kg}$.

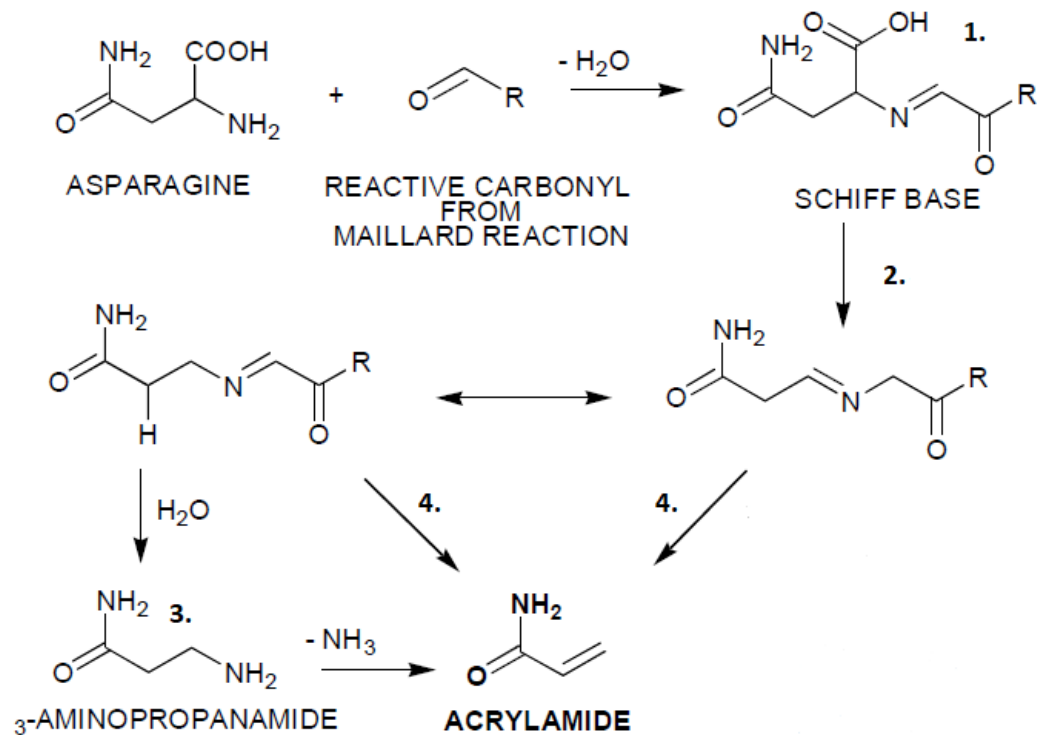
3.1 Muodostuminen

Akryyliamidia syntyy ruoan kypsennyksen aikana, jolloin aminohapot reagoivat sokereiden kanssa. Muodostuminen tapahtuu Maillardin-reaktion yhteydessä. (Food Drink Europe 2013, 7.)

Kuten edellä on kerrottu, akryyliamidin syntymiseen vaikuttavia asioita on monia, muun muassa: lämpötila, pH ja kosteus. Akryyliamidin syntymisen kannalta kuitenkin asparagiini on pääosassa.

Isotooppileimauksella pystytään merkitsemään asparagiinin tyyppi ja seuraamaan asparagiinin osuutta akryyliamidin muodostumisessa. Isotooppileimauksen avulla onkin selvitetty, että asparagiini on pääosassa akryyliamidin syntymisessä ja akryyliamidimolekyylin runko syntyy asparagiinistä. (Gökmen 2016, 1) On myös huomattu, että asparagiinin reagoidessa pelkistävän sokerin kanssa syntyy N-glykosididoksia jotka ovat tehokkaita esiasteita akryyliamidille (Zyzak ym. 2003, 4782), tuottaen yli 1,3 mmol akryyliamidia per mol N-glykosididoksia (Gökmen 2016, 1).

Kuvassa 4 on esitetty yksi ehdotus akryyliamidin muodostumiselle, jossa asparagiini reagoi pelkistävästä sokerista tulleen karbonyyliryhmän (aldehydit ja ketonit) kanssa, jolloin muodostuu niin sanottu Schiffin emäs (1.). Schiffin emäs voi edelleen dekarboksyloitua, eli siitä poistuu hiilidioksidia (2.). Tällöin syntyy epästabiili väliaine, josta voi syntyä akryyliamidi kahdella eri tavalla. Akryyliamidi muodostuu hydrolysoitumalla 3-aminopropanamidiksi (3.), josta ammoniakkin poistuttua muodostuu akryyliamidia. Toinen tapa akryyliamidin muodostumiseen on suoraan väliainesta, jos siitä poistuu imiini (4.). (Skog 2007, 9.)



Kuva 5. Ehdotettu mekanismi akryyliamidin muodostumiselle lämpökäsitellyissä elintarvikkeissa (Skog 2007, 9.)

3.2 Pitoisuuden pienentäminen

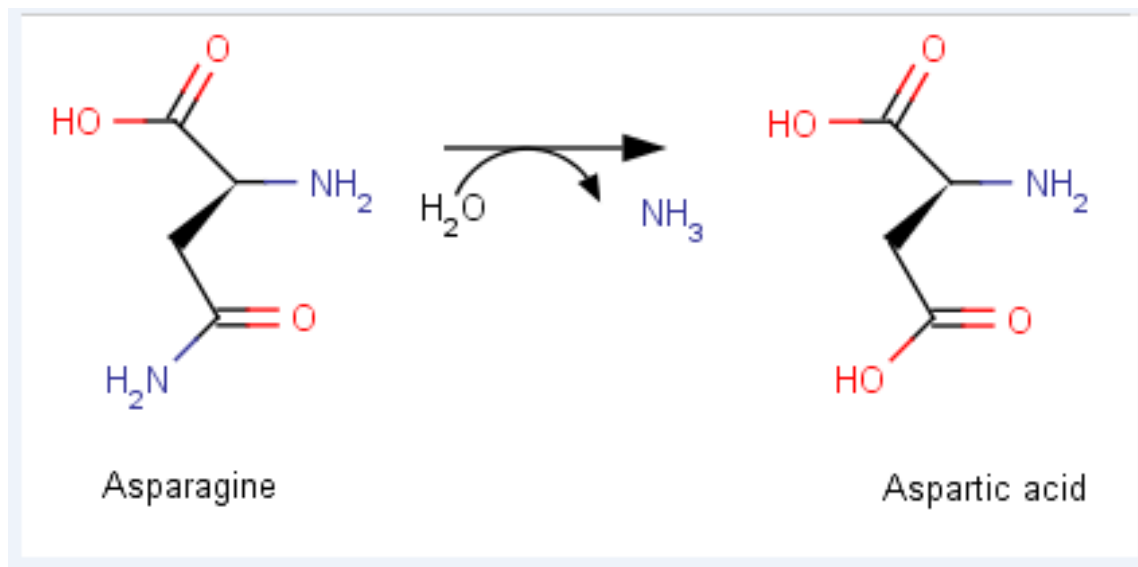
Akryyliamidi pitoisuuksille tiettyihin elintarvikkeisiin on annettu suositusarvoja Euroopan komission toimesta. Komission akryyliamidiasetus (A 2017/2158) velvoittaa elintarvikealan toimijoita vähentämään akryyliamidipitoisuuksia olemassa olevin toimenpitein. Euroopan komissio onkin antanut yhdessä Food Drink European kanssa ohjeita kuinka akryyliamidia voidaan vähentää elintarvikkeista. Suomessa Evira on tutkinut akryyliamidia ja jakanut tietoa kuinka pienentää akryyliamidia elintarvikkeissa. (Salovaara ym. 2017, 175.)

Akryyliamidi pitoisuuden pienentämiselle on annettu ALARA-ohje, joka on lyhenne sanoista **As Low As Reasonably Achievable**. Tämä tarkoittaa että elintarvikealan toimijan on käytössä olevin keinoin pienennettävä akryyliamidi pitoisuutta ottaen huomioon olemassa olevat riskit ja säilyttäen kuitenkin lopputuotteen laadun. (Food Drink Europe 2011, 8 - 9.)

3.3 Asparaginaasi

Asparaginaasi on entsyymi, joka katalysoi asparagiinin hajoamista asparagiinihapoksi ja ammoniakiksi, esitetty kuvassa 6 (Asparaginase [viitattu 21.6.2018]). Asparaginaasia käytetään muun muassa lääkityksenä leukemiaan, jossa sen tehtävänä on hajottaa asparagiinia ja estää kasvainsolun kasvamista. Pitkäaikaisella käytöllä voi kuitenkin olla haittavaikutuksena herkistyminen asparaginaasille, joka voi aiheuttaa allergisia reaktioita. (El-Ahmady El-Naggar ym. 2014, 182.)

Elintarvikkeissa käytettävä asparaginaasi on peräisin *Aspergillus niger* ja *Aspergillus oryzae* homesienistä (El-Ahmady El-Naggar, ym. 2014, 186 - 187). Molemmille asparaginaasityypeillä on GRAS-asema (Generally Recognized As Safe, pidetään yleisesti turvallisena), jonka on myöntänyt Yhdysvaltojen FDA (Food and Drug Administration). Lisäksi JEFCA:n (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 2007 tekemän arvioinnin perusteella asparaginaasi ei aiheuta vaaraa terveydelle. (Food Drink Europe 2013, 14.)



Kuva 6. Asparagiinin hydrolyysi asparagiinihapoksi asparaginaasin avulla (Asparagine Hydrolysis 2011 [viitattu 19.6.2018]).

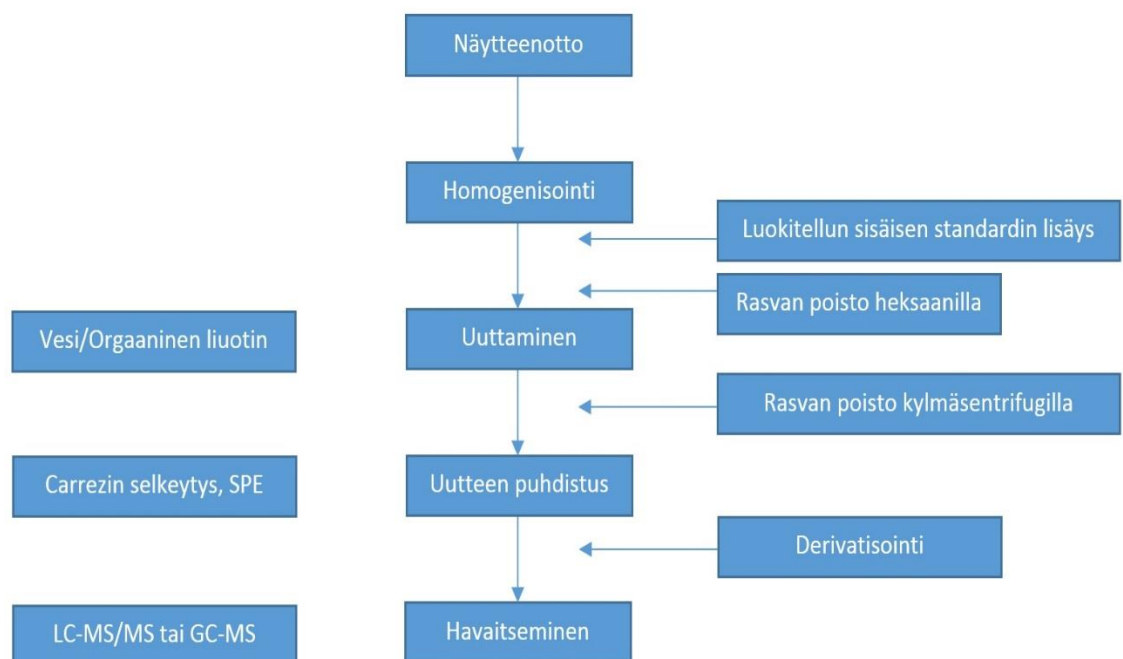
Kunkulbergan ym. (2014, 118, 121) käyttivät ruisleivän akryyliamidipitoisuuden vähentämiseen liittyvässä tutkimuksessaan asparaginaasi entsyymiä, jonka aktiivinen alue oli + 25 °C, pH 8,0. Entsyymillä ei kuitenkaan saatu pienennettyä akryyliamidin

määrää, joka johtunee happamasta ruistaikinasta. Tästä johtuen voidaan päätellä, että kaikki asparaginaasi entsyymit eivät sovellu kaikille taikinatyypeille.

3.4 Mittaaminen

Akryyliamidin tutkimukset omavalvontaan täytyy tehdä kansainvälisessä vertailulaboratoriossa, kuten Evirassa, Tullilaboratoriossa tai THL:ssa, myös Eviran hyväksymä laboratorio, johon on sovellettu elintarvikelakia (23/2006), käy tutkimukseen. (Evira 2018.)

Kuvassa 7 on esitetty tärkeimmät vaiheet akryyliamidin määrittämisessä.



Kuva 7. Akryyliamidin määrittäksen tärkeimmät vaiheet (Gökmen 2016, 446).

Otetaan mahdollisimman hyvin edustava elintarvikenäyte. Mikäli akryyliamidin määrittäminen tehdään leivästä, käytetään kokonaista leipää. Akryyliamidi muodostuu suurina pitoisuuksina leivän kuoreen, joten leivän palanen ei anna oikeaa kuvaa tuotteen akryyliamidipitoisuudesta. Näyte homogenisoidaan kokonaan laboratorio- tai keittiö tehosekoittimella taikka vastaavalla koneella ja siitä otetaan sopivan kokoinen näyte.

Standartin tarkoitus on toimia/käyttäytyä kuten akryyliamidi, joten sillä voidaan todeta analyysin täsmällisyys ja tarkkuus. Yleisesti käytettyjä standardeja ovat deuterium (raskas vety) isotooppi merkatut $^2\text{H}_3$ -akryyliamidi ja d_3 -akryyliamidi, sekä hiili merkattu $^{13}\text{C}_3$ -akryyliamidi. Merkkauksia voi tehdä myös ilman isotooppi merkintää meta-akryyliamidilla, N,N-dimeta-akryyliamidilla ja etikkahappoamidilla. Isotooppi-leimaus toimii parhaiten massaspektrometriassa. (Gökmen 2016, 447.)

Akryyliamidi liukenee hyvin veteen, joten uutamisessa voidaan käyttää tislattua vettä tai alkoholeja. Veteen sekoitetaan 0,5 - 1 g homogenoitua näytettä. Ennen varsinaista uuttua voidaan tehdä uutto heksaanilla, jolla poistetaan rasvaa näytteestä. (Gökmen 2016, 448.) Heksaani-uutto voidaan tehdä myös uutteen puhdistuksen jälkeen, kuten Biedermann ym. (2002) tekivät tutkimuksessaan. Rasvan voi poistaa myös uutamisen jälkeen kylmäseentrifugilla. Uuttamisen on huomattu olevan näytteen valmistelun kannalta kriittisin kohta, koska uuttoon vaikuttaa muun muassa näytteen partikkelikoko, liuotin sekä liuottimen ja näytteen suhde. (Gökmen 2016, 447 - 448.)

Uutteen puhdistuksessa käytetään yleensä Carrezin reagensseja, kaliumferrisyaniidia ja sinkkisulfaattia, saostamaan ja poistamaan proteiineja, sekä SPE:tä, kiinteäfaasiuuttoa (Gökmen 2016, 451). SPE eli Solid Phase Extraction on näytteen esikäsittelytekniikka, jolla voidaan puhdistaa näytteitä erottamalla aineita toisistaan (Solid phase extraction 2018, [viitattu 2.6.2018]).

Ennen akryyliamidipitoisuuden mittaamista näytteelle tehdään Derivatisointi, eli näytteen rakennetta muutetaan kemiallisesti siten, että mittaaminen helpottuu ja tulos on luettavissa selkeämmin (Spectroscopy 2010).

Itse akryyliamidin mittaamiseen voidaan käyttää useita eri menetelmiä, kuten kaasukromatografia (GC), massaspektrometriä (MS), tandem- massaspektrometriä (MS/MS), suuritarkkuus- massaspektrometriä (HRMS), ioniloukku massaspektrometri MS, high-resolution lentoaika massaspektrometriä (GC-TOF-MS). Suosituin mittaamismenetelmä on kuitenkin nestekromatografia-tandem massaspektrometri (LC-MS/MS). (Gökmen 2016, 453, 463.)

Vaikka menetelmiä mittaamiseen on monia, mittausepävarmuus on kuitenkin hyvin yleistä, joka selviää Food Drink European (2011) akryyliamidioppaasta.

Tässä työssä käytettiin Eviran hyväksymää Eurofins Scientific Finland Oy:tä laboratoriona, jota Vaasan Oy on käyttänyt jo aikaisemminkin muun muassa akryyliamidi-analyyseihin ja tutkimus tehtiin nestekromatografia-tandem massaspektrometrillä.

4 KOELEIVONNAT

Koeleivonnat tehtiin sekä Vaasan Oy:n koeleipomossa, että tuotantolinjalla, joissa testattiin kahta eri asparaginaasientsyymiä. Entsyymejä testattiin jo käytössä olevaan reseptiin, jolloin pystyttiin tietämään referenssiversion ominaisuudet ja vertaamaan koe-erien eri ominaisuuksia paremmin.

Koeleivonnat aloitettiin koeleipomossa, jossa entsyymejä annosteltiin valmistajien suosittelemat määrät, 150 ppm ja 200 ppm jauhojen painosta. Referenssitaukoina sekä entsyymilisätaukoina valmistettiin yhtä aikaa Diosnan tietokoneohjatuilla taikinakoneilla. Näin pystyttiin vertailemaan taikinoiden ominaisuuksia rintarinnan ja voitiin olla varmoja, ettei taikinakoneiden sekoituksissa ollut eroja.

Sekoituksessa ei ollut havaittavissa mitään eroa referenssitaukoina ja testitaukoina välillä, kuten ei myöskään taikinoiden konsistenssissa ja rakenteessa. Taukinat kestivät patalevon ja ylöslyönnin samalla tavalla.

Nostatus tapahtui vaihtolämpökaapissa ja nostatusolosuhteet oli säädetty referenssitaukoina ominaisuuksien mukaan. Nostatusvolyymi oli sama kaikissa taikinoissa. Pidemmän taikinalepotestauksen perusteella ei taikinoissa ollut eroja ja taikinoiden kehittyminen sekä leivonta-ajan ylittävä kestävyys oli tasaista.

Leivät paistettiin pinnavaunu-uunissa yhtä aikaa. Paistossa värin muodostuminen ja kypsyminen tapahtui myös tasaisesti kaikilla taikinoilla.

Aistinvaraisessa arvioinnissa ei valmiiden tuotteiden välillä huomattu eroa, myös säilyvyys oli samaa luokkaa.

Koska taikinoiden välillä ei ollut eroja, voitiin pienen mittakaavan koeleivonnin perusteella siirtyä linjakoeajoon.

Linjakoeajot tehdään tuotantolinjalla, jossa saadaan kattavampi kuva tuotteen toiminnasta leivontaprosessin aikana. Linjakoeajot voivat kuitenkin olla haastavia, koska vaikka koeleipomossa koeleivonnat onnistuisivatkin hyvin, ei tuotteita normaalisti voida viedä suoraan suuremman mittakaavan linjaleivontoihin ilman prosessin säätämistä. Tuotantolinjalla prosessi on erilainen, kuten esimerkiksi kukin

tuotantolinja ja lähinnä uuni. Koeleivontaan valittu resepti kuitenkin antoi mahdollisuuden testata tarvittavia ominaisuuksia koeleipomossa ja näin siirtyminen linjalle oli helppoa, koska tuotteen prosessiarvot linjastolla ovat hyvin hallussa.

Linjakoeajoon valittiin samat entsyymit ja annostelu tehtiin valmistajan suosituksen alarajan sekä ylärajan mukaan, jolloin ensimmäistä entsyymiä annosteltiin 50 ppm ja 150 ppm jauhojen painosta ja toista entsyymiä 100 ppm ja 250 ppm jauhojen painosta. Analyysiin lähteviä tuotteita oli referenssi mukaan laskettuna 5 kappaletta.

Linjakoeajo tehtiin normaalin tuotannon perään, jolloin prosessiarvot olivat samat kuin referenssituotteella ja hyvin stabiloituneet.

Testitaikinoissa ei huomattu eroa normaaleihin taikinoihin ja leivontaprosessi säilyi samana koko koeleivonnan ajan. Taikinat ajettiin linjalle ilman välejä, siten että ylös-ylönsyöntilaitteet olivat lähes tyhjentyneet edellisestä taikinasta, kun seuraavan taikinan ylös-ylönsyönti alkoi ja näytteet otettiin kunkin taikina-ajon keskeltä, jolloin edellisen taikinan sekoittuminen näytteeseen estettiin.

Tuotteiden paistoaste oli hieman normaalia tummempi, jolloin nähtiin kuinka entsyymi toimii, mikäli paisto olisi kovempi.

Linjakoeajo uusittiin toisella entsyymillä ensimmäisen kokeen tulosten perusteella. Menettelytapa oli sama kuin ensimmäisessä koeajossa.

Koeleivonnoista lähetetyt näytteet analysoitiin Eurofinnssin laboratoriossa, hyödyntäen nestekromatografia-tandem massaspektrometriä (LC-MS/MS) ja tuotteista tehtiin aistinvarainen arviointi, jossa oli mukana laadun henkilökunta.

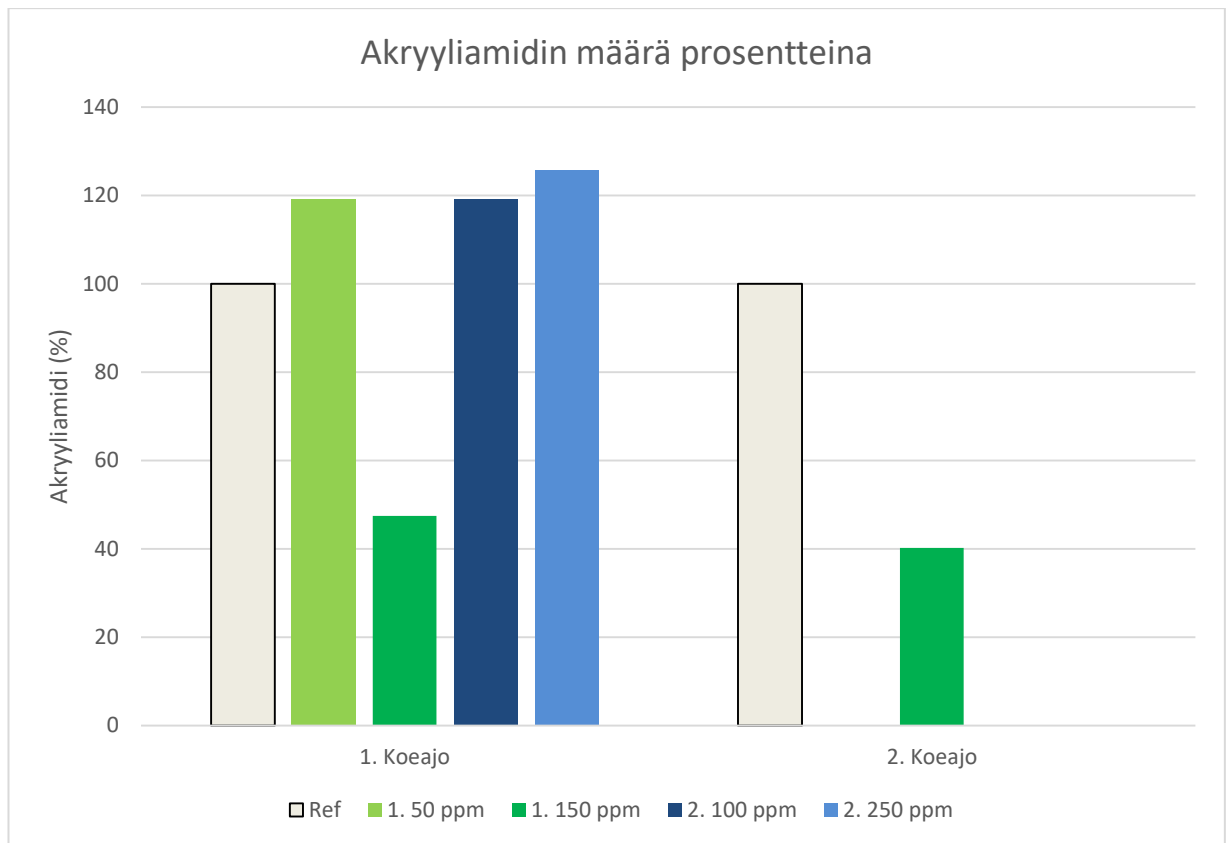
5 TULOKSET

Käsin tehdyissä leivonnoissa ei taikinoista löytynyt eroja entsyymilisien ja normaalin taikinan välillä. Myös linjakokeiden perusteella entsyymin lisäämisellä ei ollut vaikutusta taikinan valmistumiseen, rakenteeseen taikka leipoutuvuuteen. Leivontaprosessissa ei myöskään ollut eroja normaalin ja entsyymilisätaikinoiden välillä. Leivät nousivat ja paistuivat tasaisesti. Paistoväri oli sama, joten entsyymin lisäämisellä ei näiden kokeiden perusteella ole vaikutusta prosessiarvoihin. Aistinvaraisessa arvioinnissa ei leipien välillä ollut eroja ja säilyvyys oli samaa luokkaa.

Eurofinssiltä saaduista tuloksissa on heidän ilmoittama 12 %:n vaihteluväli. Tuloksista selvisi että toinen entsyymi (entsyymi 2) ei toiminut kummallakaan annostuksella (100 ppm ja 250 ppm). Tällä entsyymillä akryyliamidipitoisuudet olivat jopa hieman korkeammat kuin vertailutaikinan akryyliamidipitoisuus. Kuten Kunkunbergan ym. (2014) tutkimuksessa, entsyymin toimimattomuuteen syynä lienee hapan taikina, jolloin matala pH estii entsyymin toiminnan.

Ensimmäinen entsyymi (entsyymi 1) sen sijaan vaikutti toimivan suuremmalla annostuksella (150 ppm), muttei pienemmällä 50 ppm:n määrällä. Koe kuitenkin uusittiin 150 ppm:n annostuksella, käyttäen samoja prosessiarvoja kuin edellisessä kokeessa. Toisen koeleivonnan tulokset olivat samankaltaiset kuin ensimmäisestä kokeesta saadut.

Saaduista tuloksista voitiin päätellä, että ensimmäinen entsyymi toimi odotetun laisesti ja akryyliamidin määrää pystyttiin vähentämään lähes 60 %. Tulokset ovat luettavissa alla kuviosta 1, sekä liitteestä 1, joka on tarkoitettu vain yrityksen omaan käyttöön. Kuviossa akryyliamidin määrät ovat suhteutettuna referenssitaikinaan, jonka akryyliamidimäärä kummassakin koeajossa on 100 %. Entsyymit on merkitty 1 ja 2 jonka jälkeen on ilmoitettu, kuinka paljon entsyymiä on käytetty. Kuviossa 1 näkyy kummankin koeajon tulokset. Toisessa koeajossa käytettiin vain ensimmäisen entsyymin suurempaa 150 ppm:n annostelua.



Kuvio 1. Entsyymien vaikutus akryyliamidipitoisuuteen

6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä selvitettiin asparaginaasi entsyymien toimivuutta akryyliamidipitoisuuden vähentämisessä leivonnassa. Testattavia entsyymejä oli kaksi. Testit aloitettiin koeleipomossa pienessä mittakaavassa, josta siirryttiin lupaavien kokeiden jälkeen linjakoeajoihin. Linjalla isommassa mittakaavassa tehdystä koeajosta otettiin näytteet akryyliamidin mittaamiseen. Näytteitä oli kaksi kummastakin entsyymistä, pienellä ja isommalla annostuksella. Ensimmäisen entsyymien annostukset olivat 50 ppm ja 150 ppm jauhojen painosta ja toisen entsyymien annostukset 100 ppm ja 250 ppm jauhojen painosta. Näytteet analysoitiin nestekromatografia-tandem massaspektrometrialla Eviran hyväksymässä Eurofinssin laboratoriossa.

Entsyymillä ei ollut vaikutusta taikinan muodostumiseen taikka rakenteeseen eikä leivontaprosessin eri vaiheisiin. Huomattavaa oli myös se, ettei asparaginaasi vaikuttanut värin muodostumiseen paiston aikana. Entsyymien lisääminen ei myöskään vaikuttanut lopputuotteen aistinvaraisiin ominaisuuksiin, kuten makuun tai rakenteeseen. Säilyvyys leipien kesken oli samaa luokkaa. On hyvä asia, ettei entsyymillä ole vaikutusta kuin akryyliamidin määrään, mikäli entsyymiä jouduttaisiin käyttämään akryyliamidin vähennyskeinona tulevaisuudessa.

Eurofinssiltä tulleissa tuloksissa oli 12 %:n vaihteluväli, mutta tuloksista voitiin päätellä että toinen käytetyistä entsyymeistä toimi toivotunlaisesti ja akryyliamidin pitoisuutta leivissä saatiin pienennettyä lähes 60 %.

Toisen entsyymien vertailutaikinaa korkeammat akryyliamidipitoisuudet ihmetyttivät hieman. Mutta tämä selittynee mittausepävarmuudesta ja siitä että akryyliamidin muodostumisessa on paljon muuttuvia tekijöitä ja akryyliamidipitoisuus voi vaihdella samalla linjalla, samalla tuotteella suurestikin, kuten kirjallisuudestakin selviää. Entsyymien toimimattomuus, johtui todennäköisesti liian alhaisesta pH:sta, jossa entsyymi ei pystynyt toimimaan. Tieto siitä että osa entsyymeistä toimii heikosti hapanleivissä, oli tiedossa jo ennen kokeita ja loi hieman epävarmuutta tutkimuksen onnistumiselle. Lisäksi pienet annostelumäärät loivat omat haasteensa punnita ja käsitellä entsyymejä, mutta normaalissa tuotannossa entsyymi olisi todennäköisesti homogenisoituna joko nesteeseen tai jauhoihin, jolloin mittaaminen ja sekoittuminen taikinaan onnistuisivat helpommin.

Entsyymilisiä voi olla yksi vaihtoehto vähentää akryyliamidin määrää leivissä ja saatujen tuloksien valossa entsyymiä voitaneen ja tullaan kokeilemaan myös muihin taikinoihin. Olisi kiehtovaa nähdä kuinka entsyymi toimii eri akryyliamidimääriä omaavien leipien kanssa. Täytyy kuitenkin muistaa että entsyymit eivät ole ilmaisia ja vaikka annostus on hyvin pieni, niin suurella kapasiteetillä ja volyymillä leivottaessa hinta voi nousta vuositasolla huomattavan suureksi. Onneksi myös vertailutaikinan akryyliamidipitoisuus oli alle suositusrajan, joten entsyymille ei ole tarvetta tässä tuotteessa ja akryyliamidipitoisuus saadaan pysymään hallinnassa leivontaprosessilla, lähinnä oikealla paistotekniikalla. Leivontaprosessia säätämällä ja oikealla reseptiikalla pystytään varmasti vaikuttamaan akryyliamidin muodostumiseen myös muissa tuotteissa.

Akryyliamiditutkimukset elintarvikkeissa ovat vielä melko uusia ja haasteellisia. Akryyliamidin analysointi vie myös aikaa, eivätkä analyysit ole kovin halpoja. Onkin hyvä että tahtotilana olisi kehittää tuotanto-olosuhteissa toimiva nopea, edullinen ja luotettava analysointitapa. Akryyliamidipitoisuuksia on Vaasanilla kuitenkin seurattu jo useamman vuoden ajan, joten vertailukelpoista dataa on kertynyt hieman. Nyt tehdyt entsyymitestit olivat kuitenkin ensimmäiset. Tulevaisuudessa omavalvontana tehtävän akryyliamidin mittaamisen yhteydessä tullaan dokumentoimaan laajemmin erilaisia prosessiarvoja, jolloin saatua dataa pystytään hyödyntämään tehokkaammin ja opitaan tunnistamaan paremmin akryyliamidin muodostumiseen vaikuttavia asioita. Tässä tutkimuksessa saaduista tuloksista ei voi luoda luotettavaa tilastollista tietoa, koska mittaustuloksia ei ole vielä riittävästi. Riittävän kattavan datan keruu vie aikaa, jotta pystyttäisiin itse luomaan kuvaa akryyliamidin muodostumiseen vaikuttavista asioista leipomossa, mutta tämä työ antaa varmasti hyvän pohjan akryyliamidin tutkimiselle ja vähentämiselle jatkossa.

LÄHTEET

- A 2017/2158. Commission Regulation (EU) 2017/2158. [Verkkolähde]. Official Journal of the European Union. [Viitattu 8.6.2018]. Saatavana: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>
- Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. 2002. Bio prosessiteknikka. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- Ala-Kulju, M-L., Heiskanen, S., Koivurinta, J., Oksanen, K. & Salovaara, H., 1981. Elintarvikeoppi. Helsinki: Otava.
- Asparaginase. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Lakewood: Worthington Biochemical Corporation. [Viitattu 21.6.2018]. Saatavana: <http://www.worthington-biochem.com/aspr/default.html>
- Asparagine Hydrolysis. 2011. [Verkkosivu]. Wikimedia. [Viitattu 19.6.2018]. Saatavana: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Asparagine_hydrolysis.png
- Auvinen, S. 1990. Minun Leipäni. Helsinki: Leipomopalvelu Sulo & Vuokko Oy.
- Biedemann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A. Grob, K., Egli, P. & Mändli, H. 2002. Two GC-MS Methods for the Analysis of Acrylamide in Foodstuffs. [Verkkoartikkeli]. Zurich: Official Food Control Authority of the Canton of Zurich. [Viitattu 31.5.2018]. Saatavana: https://www.researchgate.net/publication/267778800_Two_GC-MS_Methods_for_the_Analysis_of_Acrylamide_in_Foodstuffs
- Duell, E J. IARC. 2013. Epic study. Acrylamide Working Group. [Verkkosivu]. Barcelona: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. [Viitattu 18.5.2018]. Saatavana: <http://epic.iarc.fr/research/acrylamide.php>
- EFSA. 2015. Scientific opinion on acrylamide in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2.3.2018]. Saatavana: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4104>
- El-Ahmady El-Naggar, N., El-Ewasy, S, M. & El-Shweihy, N, M. 2014. Microbial L-asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. [Verkkoartikkeli]. Department of Bioprocess Development, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, City of Scientific Research and Technological Applications. [Viitattu 21.6.2018]. Saatavana: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ijp/2014/182-199.pdf>
- Evira. 2018. Elintarvike tutkimukset. [Verkkosivu]. [Viitattu 23.5.2018]. Saatavana: <https://www.evira.fi/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/laboratoriopalvelut/eviran-hyvaksymat-laboratoriot/hyvaksytyt-laboratoriot/elintarvikkeet/>

- FoodDrinkEurope. 2013. Akryyliamidi-opas 2013. [Verkkojulkaisu]. Englannin kielestä alkuperäisoppaasta suomeksi käännettänyt: Elintarviketeollisuusliitto ry. [Viitattu 29.4.2018]. Saatavana: <http://www.etl.fi/aineistot/ohjeet.html>
- Food Drink Europe. 2011. Acrylamide Toolbox 2011. [Verkkoartikkeli]. [Viitattu 13.6.2018]. Saatavana: http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/Toolboxfinal260911.pdf
- Gökmen, V. 2016. Acrylamide in Food - Analysis, Content and Potential Health Effects. [Verkkokirja]. Academic Press. [Viitattu 30.4.2018] Saatavana: Knovel-tietokannasta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Häikiö, I. & Paalanen, L. 1986. KEMIAA elintarviketeollisuuden, koti- ja laitostalouden sekä ravitsemis- ja hotellipalvelujen aloille. Juva: WSOY.
- Heinonen, J., Jouppila, K. & Salovaara, H. 2003. Kondiittorin käsikirja. 2. Uudistettu painos. Helsinki: Suomen leipuriliitto.
- Ingelmann-Sundberg, M. 2002. Acrylamide and Cancer: Tunnel Leak in Sweden Prompted Studies. [Verkkojulkaisu]. Journal of the National Cancer Institute, Volume 94, Issue 12, 19 June 2002, Pages 876 - 878. Oxford University Press. [Viitattu 18.5.2018]. Saatavana: <https://academic.oup.com/jnci/article/94/12/876/2519770>
- Keramat, J., LeBail, A., Prost, C. & Jafari, M. 2010. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. [Verkkoartikkeli]. Isfahan University of Technology. [Viitattu 18.5.2018]. Saatavana: http://www.academia.edu/12712540/Acrylamide_in_Baking_Products_A_Review_Article
- Kunkunberga, D., Gedrovica, I., Ozolina, V., Ciprovica, I. & Sterna, V. 2014. Acrylamide reduction options in rye bread. [Verkkojulkaisu]. Latvia: University of Agriculture. [Viitattu 8.6.2018]. Saatavana: http://llufb.llu.lv/conference/foodbalt/2014/FoodBalt_Proceedings_2014-117-122.pdf
- Käyttöturvallisuustiedote. 2018. Akryyliamidi. [Verkkojulkaisu]. Helsinki: Sigma-Aldrich. [Viitattu: 6.6.2018]. Saatavana: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=FI&language=fi&productNumber=01700&brand=SI&PageToGo-ToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3Dacrylamide%26inter-face%3DAI%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partial-max%26lang%3Dfi%26region%3DFI%26focus%3Dproduct>
- Leipätiedotus. Ei päiväystä. Tietoa leivästä: Suola. [Verkkosivu]. [Viitattu 10.1.2018] Saatavana: <http://www.leipätiedotus.fi/tietoa-leivasta/leipa-elintarvikkeena/pakkausmerkinnat/suola.html>

- Maijala, P. 2016. Biokemia entsyymit. Luento dia. 2016. Seinäjoen ammattikorkeakoulu. SeAMK Ruoka, Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Julkaisematton.
- Oregon State University. 2012. Discuss gluten. [Verkkolähde]. [Viitattu 13.6.2018]. Saatavana: http://people.oregonstate.edu/~calverta/learn/faq/faq_flourmixture-gen8.html
- Peltomäki, S., Välimäki, P A., Minni, R. & Koponen, P. 1997. Leipomotekniikka ja ammattisanastot: Laatus Leivontaan. Jyväskylä: Gummerus.
- Pundir, C, P. 2015. Enzyme Nanoparticles: Presentation, Characterisation, Properties and Applications. Micro & Nano Technologies Series. [Verkkokirja]. Oxford: William Andrew [Viitattu 23.3.2018]. Saatavana: Knovel-tietokannasta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Reducing sugar. 2018. [Verkkolähde]. Wikipedia The Free Encyclopedia. [Viitattu 21.5.2018]. Saatavana: https://en.wikipedia.org/wiki/Reducing_sugar
- Rogers, K. 2018. Acrylamide. [Verkkoartikkeli]. Britannica Academic. [Viitattu: 15.5.2018]. Saatavana: Britannica Academic tietokannasta. Vaatii käyttöoikeuden
- Saarela, A-M., Hyvönen, P., Määttä, S. & von Wright, A. toim. Elintarvikeprosessit. Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu, Kehittämisen- ja palvelukeskus. 2004. Savonia-ammattikorkeakoulu sarja B 1/2004.
- Salovaara, H., Ignatius, A., Jussila, A. Hurri-Martikainen, M. 2017. Leivonnanteknologia - Ruokaleipä. Suomen Leipuri liitto ry. Helsinki: Bookwell Oy.
- Savola, P. 1989. Kahvileipää: käsikirja leipurille. Leipomoalan edistämissektori. 4. painos. Helsinki: Suomen leipuriliitto.
- Skog, K. 2007. Heatox, Heat-generation food toxicants: identification, characterisation and risk minimisation. Final report. [Verkkajulkaisu]. Lunds Universitet. [Viitattu: 14.5.2018]. Saatavana: http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo_EN266/Heatox_InforFINAL07.pdf
- Solid phase extraction. 2018. [Verkkolähde]. Wikipedia The Free Encyclopedia. [Viitattu 2.6.2018]. Saatavana: https://en.wikipedia.org/wiki/Solid_phase_extraction
- Spectroscopy. 2010. Derivatization in Mass Spectrometry. [Verkkosivu]. [Viitattu 2.6.2018]. Saatavilla: <http://www.spectroscopyonline.com/derivatization-mass-spectrometry>

Zyzak, D, V., Sanders, R, A., Stojanovic, M., Tallmadge, D, H., Eberhart, B, L., Ewald, D, K., Gruber, D, C., Morsch, T, R., Strothers, M, A., Rizzi, G, P. & Villagran, M, D. 2003. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. [Verkkojulkaisu]. Ohio: Journal of Agricultural and food chemistry. [Viitattu 6.6.2018]. Saatavana: https://www.courses.psu.edu/fd_sc/fd_sc400_jnc3/FDSC500/4-acrylamide%20-%20heated.pdf

