



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Evi Tiilikainen

# Apuaineiden vaikutus probiootti- valmisteiden stabiiliuteen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

5.5.2021

Tekijä Otsikko	Evi Tiilikainen Apuaineiden vaikutus probioottivalmisteiden stabiiliuteen
Sivumäärä Aika	35 sivua + 1 liite 5.5.2021
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	tuotekehitysasiantuntija FaT Sari Airaksinen, Pharmia Oy lehtori Carola Fortelius-Sarén
<p>Insinööriyön tavoitteena oli tutkia miten tietyt apuaineet vaikuttavat probioottivalmisteiden stabiiliuteen valituissa olosuhteissa. Apuaineiden lisäksi tutkittiin kolmen eri olosuhteen vaikutusta valmisteeseen. Insinööriyö tehtiin yhteistyössä Pharmia Oy:n tuotekehityksen kanssa.</p> <p>Tutkimuksessa käytettiin viittä eri apuainetta: sorbitolia, mikrokiteistä selluloosaa, dikalsiumfosfaattia, glukoosia ja dekstriiniä. Probiooteiksi valittiin A ja B, sillä kyseisiä probioottikantoja on tutkittu paljon, ja ne ovat laajalti käytössä useissa maitohappobakteerivalmisteissa.</p> <p>Insinööriyössä valmistettiin kahdeksan jauhemassaa. Jokaisessa massassa oli erilainen apuaine- ja maitohappobakteeriyhdistelmä. Kolmessa massassa käytettiin molempia bakteerikantoja. Massat kapseloitiin käsin kapselilautaa käyttäen. Näytteet sijoitettiin useampaan olosuhteeseen, sillä haluttiin selvittää miten ravintolisien tuotanto- ja säilytysolosuhteet voivat vaikuttaa lopputuotteen stabiiliuteen ja probioottien elävyyteen. Näytteille tehtiin bakteerianalyysi, infrapunakosteusanalyysi, lähi-infrapunaskopio ja vesiaktiivisuusmittaus tutkimuksen alussa, puolelta välissä sekä lopussa.</p> <p>Tutkimuksen perusteella voidaan havaita, että kosteuspitoisuus näytteissä kasvaa eniten ensimmäisen kuukauden aikana, minkä jälkeen kasvu hidastuu. Bakteerianalyysin perusteella on vaikea todeta, kuinka paljon kosteuspitoisuuden nousu vaikuttaa probioottien elävyyteen, sillä suurimmassa osassa näytteistä bakteerisolujen kuolleisuus oli suurta jo tutkimuksen alussa. Tuloksista voidaan havaita myös, että näytteiden elävyys on korkeampi silloin, kun käytetään kahden probiootin seosta. Tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella kapselin sisältö pysyy koostumukseltaan stabiilimpana, kun apuaineena käytetään mikrokiteistä selluloosaa tai dikalsiumfosfaattia. NIR-mittausta voisi käyttää probioottivalmisteiden valmistusprosessissa tulevaisuudessa kosteuden seurannassa, sillä liian korkea kosteuspitoisuus voi vaikuttaa bakteerisolujen elävyyteen epäedullisesti.</p>	
Avainsanat	probiootti, maitohappobakteeri, apuaine, stabiilius

Author Title	Evi Tiilikainen Effect of Excipients on the Stability of Probiotic Preparations
Number of Pages Date	35 pages + 1 appendices 5 May 2021
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Sari Airaksinen, Development specialist, Ph.D. (Pharm), Pharmia Oy Carola Fortelius-Sarén, Principal Lecturer
<p>The aim of this thesis was to study how specific excipients and different conditions affect stability of the probiotic products. In addition to excipients, the effect of three different conditions on products was studied. This thesis was done in collaboration with research and product development apartment of Pharmia Oy.</p> <p>Five different excipients were used in this study: sorbitol, microcrystalline cellulose, dibasic calcium phosphate, glucose and dextrin. A and B were chosen as probiotics, because these strains have been studied more comprehensively and used in several lactic acid bacteria products.</p> <p>In this thesis eight powder bulks were prepared with different excipient and lactic acid bacteria combinations. Both bacteria strains were used in three bulks. The bulks were encapsulated manually using capsule board. To study how production and storage conditions of food supplements can affect to stability of final product and viability of probiotics, the samples were placed in several conditions. Bacterial analysis, infrared humidity analysis, near infrared (NIR) spectroscopy and water activity measurement were performed on the samples in the beginning, in the middle and in the end of the study.</p> <p>The results showed that the moisture content increased the most during the first month. The bacterial analysis did not reveal any correlation between moisture content and probiotic viability, since the mortality of the bacterial cells was already high in most of the samples at the beginning of the study. Furthermore, the viability of the samples was higher when a mixture of two probiotics was used. Finally, the results revealed that the texture of the capsule content stayed more stable when microcrystalline cellulose or dibasic calcium phosphate is used as an excipient. In future NIR spectroscopy could be used in the production of probiotic products for monitoring moisture content, because too high moisture content can affect the viability of the bacteria cells unfavorably.</p>	
Keywords	probiotic, lactic acid bacteria, excipient, stability

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Probiootit ja probioottivalmisteet	2
2.1	Probioottikanta A	3
2.2	Probioottikanta B	3
2.3	Elävyyden analysointi	4
3	Apuaineet	5
3.1	Sorbitoli apuaineena	6
3.2	Mikrokiteinen selluloosa apuaineena	7
3.3	Dikalsiumfosfaatti apuaineena	8
3.4	Glukoosi apuaineena	8
3.5	Dekstriini apuaineena	9
4	Kapselointi	10
5	Analyysimenetelmät	12
5.1	Bakteerianalyysi	12
5.2	Infrapuna (IR) -kosteusanalyysi	13
5.3	Lähi-infrapunaskpektroskopia (NIRS)	13
5.4	Vesiaktiivisuusmittaus ( $a_w$ )	14
6	Materiaalit ja menetelmät	15
6.1	Materiaalit	15
6.2	Menetelmät	15
7	Tulokset	19
7.1	Bakteerianalyysi	19
7.2	Infrapuna (IR) -kosteusanalyysi	22
7.3	Lähi-infrapunaskpektroskopia (NIRS)	23

7.4	Vesiaktiivisuusmittaus ( $a_w$ )	27
7.5	Painon vaihtelu ja tiheys	28
8	Tulosten tarkastelu	29
8.1	Bakteerianalyysi	29
8.2	Infrapuna (IR) -kosteusanalyysi	30
8.3	Lähi-infrapunaspektroskopia (NIRS)	30
8.4	Vesiaktiivisuusmittaus ( $a_w$ )	31
8.5	Painon vaihtelu	32
9	Yhteenveto	32
	Lähteet	34
	Liitteet	
	Liite 1. Näytteiden NIR-spektrit	

## Lyhenteet

$a_w$	veden aktiivisuus, joka kertoo vapaan veden määrän aineessa.
CE	<i>Conformité Européenne</i> . Merkintä, joka vakuuttaa tuotteen täyttävän Euroopan unionin direktiivien vaatimukset.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> . Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö.
IR	<i>Infrared</i> . Infrapunasäteily.
NIRS	<i>Near Infrared Spectroscopy</i> . Lähi-infrapunaspektroskopia.
RH	<i>Relative Humidity</i> . Suhteellinen kosteus.
WHO	<i>World Health Organization</i> . Yhdistyneiden kansakuntien perustama Maailman terveysjärjestö.

## 1 Johdanto

Tämän insinööriyön tarkoituksena oli tutkia, miten tietyt apuaineet vaikuttavat probioottivalmisteiden stabiiliuteen valituissa olosuhteissa. Insinööriyö tehtiin yhteistyössä Pharmia Oy:n tuotekehityksen kanssa.

Pharmia Oy oli Suomen ensimmäinen lääkkeiden sekä ravintolisien sopimuspalveluja tarjoava yritys. Nykyään perheyritys keskittyy ravintolisien ja CE-merkittyjen tuotteiden kehittämiseen, valmistamiseen sekä kaupallistamiseen. [1.] Pharmian asiakkaisiin kuuluu tunnetut ravintolisä- ja lääkealan yritykset, apteekit sekä tukkuliikkeet Suomessa ja ulkomailla. Yrityksen toimisto- ja tuotantotilat sijaitsevat Tuusulassa. Sopimusvalmistettaviin tuotteisiin kuuluu muun muassa vitamiini-, kivennäisaine-, melatoniini- ja probioottivalmisteet sekä CE-merkityt flunssan hoitotuotteet. Vuonna 1993 perustettu yritys on kehittänyt 2 000 erilaista tuotetta ja työllistää tällä hetkellä noin 90 henkilöä. Pharmia panostaa innovatiivisuuteen, valmistamiensa tuotteiden tuotekehitykseen ja laatuun asiakkaiden toiveet huomioiden. [2.]

Työn tavoitteena oli selvittää, mitkä apuaineet formulaatioissa suojaavat probiootteja parhaiten. Apuaineiden lisäksi tutkittiin kolmen eri olosuhteen vaikutusta valmisteeseen. Tutkimuksessa valmistettiin kahdeksan jauhemassaa. Jokaisessa massassa oli erilainen apuaine- ja maitohappobakteeriyhdistelmä. Kolmessa massassa käytettiin kahden maitohappobakteerin seosta. Massat kapseloitiin käsin kapselilaudalla käyttäen standardikokoisia selluloosakapseleita. Näytteet sijoitettiin useampaan olosuhteeseen, sillä haluttiin selvittää, miten ravintolisien tuotanto- ja säilytysolosuhteet voivat vaikuttaa lopputuotteen stabiiliuteen ja probioottien elävyyteen.

## 2 Probiotit ja probioottivalmisteet

Aikojen saatossa tutkijat ovat määritelleet probiotit monilla eri tavoin, kuten elinkelpoisina mikro-organismien yksittäis- tai sekaviljelminä, jotka parantavat ihmisen tai eläimen oman mikroflooran ominaisuuksia tai elävinä mikro-organismeina, jotka tiettyinä määrinä nautittuina vaikuttavat perusravinnon ohella terveydelle hyödyllisinä [3; 4; 5]. Yhdistyneiden kansakuntien Elintarvike- ja maatalousjärjestö FAO ja Maailman terveysjärjestö WHO ovat kuitenkin määritelleet probiotit eläviksi organismeiksi, jotka riittävässä määrin nautittuina antavat isännälle terveyshyötyjä [4; 6, s. 690].

Nykyisessä määritelmässä painotetaan probioottisten mikro-organismien elävyyttä, joka on usein tulkittu synonyyminä viljelykelpoisuudelle. Mikro-organismit voivat kuitenkin olla sellaisessa fysiologisessa tilassa, jossa ne ovat elinkykyisiä, lisääntymiskyvyttömiä ja viljelykelvottomia. Suurin osa suoliston mikro-organismeista säilyy elinkykyisinä ja lisääntymiskykyisinä suolistossa, mutta ei voi kasvaa standardiolosuhteissa laboratoriossa. Tämän takia probioottien tulee olla elinkykyisiä eikä viljelykelpoisia, sillä viljelykelpoisuuteen vaikuttaa oleellisesti käytetty kasvatusalusta sekä kasvatusolosuhteet. [6, s. 690, 699.]

Probiootteja käytetään laajasti erilaisissa funktionaalisissa elintarvikkeissa kuten erilaisissa meijerituotteissa ja mehuissa. Näiden lisäksi probioottivalmisteita on saatavilla tabletteina, jauheina, kapseleina sekä suihkeina. Teollisen tuotannon tavoitteena on tuottaa kohtuuhintaisesti laadukkaita ja turvallisia lopputuotteita pitkällä säilyvyysajalla. Laadukkaiden probioottivalmisteiden onnistunut tuotanto edellyttää bakteerikantojen spesifisten ominaisuuksien hyvää tietämystä. Probioottisten mikrobien elinkelpoisuutta menetetään väistämättä prosessoinnin ja formuloinnin aikana. Mikrobit, jotka selviytyvät ja menestyvät ruoansulatuskanavassa, voivat olla vaikeita kasvattaa ja jatkojalostaa pienessä sekä suuressa mittakaavassa. [7, s. 391–392.]

Bifidobakteerit ja maitohappobakteereihin kuuluvat laktobasillit ovat yleisimmin käytettyjä probioottikantoja. Kyseiset kannat ovat oleellinen osa ihmisen suoliston normaaliflooraa, eikä niiden ole todettu aiheuttavan tauteja. [6, s. 423, 691.] Kliinisissä tutkimuksissa on havaittu, että probiotit vaikuttavat hyödyllisesti suoliston normaaliflooraan ja saattavat myös suojata suolistoinfektioilta ja tulehdusperäisiltä suolistosairauksilta. Lisäksi



probioottien on todettu muun muassa vaikuttavan tautia aiheuttavien bakteereiden aineenvaihduntaan ja entsyymiaktiivisuuteen, parantavan suoliston immunologista toimintaa ja edistävän laktoosin pilkkoutumista henkilöillä, joilla on laktoosi-intoleranssi. [7, s. 896–898.]

Tutkimukseen valittiin probioottikannat A ja B, sillä kyseisiä probioottikantoja on tutkittu paljon, ja ne ovat laajalti käytössä useissa maitohappobakteerivalmisteissa.

## 2.1 Probioottikanta A

Laktobasilleja löytyy laajasti niin ympäristöstä kuin ihmisten ja eläinten ruuansulatusjärjestelmästä. Laktobasilleihin kuuluva A on fakultatiivinen heterofermentatiivinen bakteeri, joka tuottaa maitohappoa ja etikkahappoa. Fermentoitavia hiilihydraatteja ovat muun muassa riboosi, sorbitoli ja sakkaroosi. [8; 9.] Orgaaniset hapot laskevat ympäristön pH-arvoa. Tämä mahdollistaa laktobasilleille edullisen kilpailutilanteen muihin tautia aiheuttaviin bakteereihin nähden, sillä ne sietävät paremmin happamia olosuhteita. Lisäksi laktobasillit tuottavat monia antimikrobisia aineita, kuten vetyperoksidia ja bakterisidejä. [8.]

Probiootti A on liikkumiskyvytön, anaerobinen maitohappobakteeri, joka ei muodosta itiöitä [11]. Muodoltaan sauvamaiset bakteerisolut esiintyvät yksittäin tai muodostavat lyhyitä ketjuja ja kasvavat lämpötilan ollessa 15–45 °C [9].

## 2.2 Probioottikanta B

Probiootti B on kaksijakoinen sauvamainen bakteeri, joka elää ihmisen ja eläinten suolistossa sekä jätevesissä. Se kuuluu aktinobakteereihin, joille on ominaista sienimäinen ulkonäkö. Bakteerit ovat gram-positiivisia anaerobeja, jotka tuottavat käymisreaktioissa enemmän etikkahappoa kuin maitohappoa (3:2). [11.] Optimikasvuolosuhteet B-probiootille ovat 25–45 °C pH:n ollessa 6,5–7,0 [12].

Merkittävänä erona laktobasillien ja bifidobakteerien välillä on fruktoosi-6-fosfaatti-fosfoketolaasi-entsyymi, jota bifidobakteerit käyttävät hiilihydraattiaineenvaihdunnassa.

Toinen merkittävä ero bakteerien välillä on DNA:ssa. Bifidobakteereilla guaniini-sytosiinipitoisuus on 58 mol-%, kun taas laktobasilleilla pitoisuus on 37 mol-%. Laktobasilleista poiketen bifidobakteerit eivät siedä yhtä hyvin happamia olosuhteita. Probiotikanta B on yksi parhaiten kylmäsäilytyksessä elävänä säilyvistä bifidobakteereista. [11.]

### 2.3 Elävyyden analysointi

Bakteerien elävyyttä voidaan tutkia viljelyyn tai fluoresoivaan värjäykseen perustuvalla tekniikalla. Maljaviljelytekniikkaa on perinteisesti käytetty probioottisten tuotteiden laadunvarmistuksessa. Menetelmä perustuu agarmaljalla viljeltyjen bakteerisolujen lisääntymiseen ja pesäkemäärän laskemiseen. Analyysi mahdollistaa bakteerisolujen lukumäärän määrittämisen sekä niiden tunnistamisen. [7, s. 392.]

Fluoresenssivärjäyksellä saadaan tietoa solujen fysiologisen tilasta (esimerkiksi solukalvon läpäisevyydestä) sekä aineenvaihdunnan aktiivisuudesta. Menetelmä mahdollistaa elinkykyisten, vaurioituneiden ja kuolleiden bakteerisolujen määrittämisen. Värjäyksessä voidaan käyttää tuoreita soluja, kuivattuja solupreparaatteja tai probioottisia elintarvikkeita. Solujen kokonaismäärän selvittämiseksi elävät ja kuolleet solut värjätään eri väreillä. Vastavärjäystä voidaan käyttää joko kuolleiden solujen tai näytteen koko solumäärän määrittämiseen, jolloin kuolleiden solujen määrä saadaan selville elävien solujen avulla. Fluoresoivat solut detektoidaan fluoresoivalla mikroskoopilla, fluorometrillä tai virtaussytometrillä (FCM). Fluoresoiva mikroskooppi on fluorometriä ja virtaussytometriä hitaampi menetelmä, mutta sen avulla voidaan tutkia solujen morfologiaa sekä kasautumista. Fluorometri on nopea ja tehokas menetelmä muun muassa rutiininomaisiin elävyytustutkimuksiin, sillä sen avulla voidaan analysoida 96 näytettä samanaikaisesti. [7, s. 392–393; 13.]

Fluoresoivien analyysien ja pesäkelaskennan tuloksia ei kuitenkaan voida suoraan verrata toisiinsa, sillä ne perustuvat eri tekniikoihin. Solujen stressin tai vaurioitumisen takia elinkyvyttömässä tilassa olevat bakteerit voivat vääristää pesäkelaskennasta saatavaa tulosta. Elävien solujen määrä on tällöin pienempi kuin niiden todellinen määrä on. Fluoresoivilla menetelmillä ei voida tunnistaa bakteereita eikä niitä voida käyttää kaikille näytemateriaaleille, jotka sisältävät eri bakteerilajeja tai aiheuttavat voimakasta

taustavärjäytymistä. Lisäksi probioottien värjäytyvyys vaihtelee eri menetelmien välillä. Fluoresoivia tekniikoita ei voida pitää yleispätevinä menetelminä bakteerien elinkykyisyyttä arvioitaessa, sillä niitä pitää muokata bakteerilajin tai tuotetyypin mukaan. [7, s. 393.]

### 3 Apuaineet

Kaupallisesti saatavilla olevat probioottivalmisteet sisältävät probioottien lisäksi apuaineita. Apuaineita käytetään lähes kaikissa ravintolisävalmisteissa, sillä ne ovat välttämättömiä tuotteen valmistuksen kannalta. Tuotteen toimivuus valmistuksessa riippuu laajasti käytettyjen apuaineiden fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista. Apuaineet toimivat valmisteissa esimerkiksi täyte-, hajotus-, liuku-, väri- ja paakkuuntumisenestoaineina. Probioottivalmisteissa yleisimmin käytettyjä apuaineita ovat muun muassa mikrokiteinen selluloosa (täyteaine), maltodekstriini (täyteaine) ja magnesiumstearaatti (liukuaine). [14.]

Probioottien kerta-annos on niin pieni, että kapselien koneellinen täyttö vaatii täyteaineen käyttöä. Täyteaine parantaa valuvuutta sekä kohesiivisuutta. Täyteainetta valittaessa tulee huomioida jauheseoksen homogeenisena pysyminen valmistusprosessin aikana. Vedessä turpoavat polymeerit, kuten maissitärkkelys tai karboksimeetyyliselluloosa, edistävät probioottien vapautumista. Jauheseoksessa voidaan käyttää kostutusaineita seoksen huonon veteen liukenevuuden tai hydrofobisuuden takia. Liukenemiseen vaikuttaa jauheen huono vedenläpäisevyyskyky. Ongelman ratkaisemiseksi jauheseokseen voidaan sekoittaa pinta-aktiivisia aineita tai se voidaan käsitellä hydrofiilisellä apuaineliuoksella. Apuaine muodostaa seoksen partikkeleiden pinnalle kerroksen, joka helpottaa kapselin jauhemaisen sisällön kostumista ja liukenemista. Automaattisten täyttölaitteiden osien voitelemiseksi kapseloitavaan jauheseokseen lisätään liukuaineita. Liukuaineet, kuten piidioksidi tai talkki, parantavat myös seoksen valuvuutta. [15, s. 200–202.]

Kapselikuoria voidaan värjätä eri väreillä, jolloin lukuisat väriyhdistelmät pohja- ja kansiosissa ovat mahdollisia. Väriaineiden avulla voidaan muun muassa parantaa tuotteen säilyvyyttä, esteettisyyttä sekä tunnistamista. Tunnistamisen helpottamisesta

on hyötyä muun muassa deklaraatioiden todentamisessa sekä maissa, joissa esiintyy lukutaidottomuutta. Kaikki väriaineet eivät ole sallittuja joka maassa. Sallittuja väriaineita ovat esimerkiksi riboflaviini, beetakaroteeni ja punajuuri. [15, s. 202–203.]

### 3.1 Sorbitoli apuaineena

Sorbitoli on hajuton, kiteinen ja hygroskooppinen jauhe. Väriltään jauhe on valkoista tai melkein väritöntä. Maultaan sorbitoli on miellyttävän viileä ja makea. Makeus on noin 50–60 % sakkaroosin eli pöytäsokeerin makeudesta. Sorbitolilla on neljä kiteistä polymorfista ja yksi amorfinen muoto. Jokaisen muodon fysikaaliset ominaisuudet vaihtelevat hieman toisiinsa nähden. Kemiallisilta ominaisuuksiltaan sorbitoli on kohtuullisen inertti, joten sitä voidaan käyttää yhdessä lähes kaikkien apuaineiden kanssa. Sorbitolia on saatavilla eri polymorfeina rakeina, hiutaleina tai pelletteinä. Näillä muodoilla on paremmat puristuvuusominaisuudet ja ne paakkuuntuvat vähemmän kuin jauhemuodossa oleva sorbitoli. Sorbitolin valumisominaisuudet vaihtelevat pääosin partikkelikoosta riippuen. Hienojakoinen jauhe valuu huonommin kuin rakeet. Hienojakoisen jauheen partikkelikoko on tyypillisesti alle 125 µm, kun taas suurin osa rakeista on kooltaan 125–250 µm (kuva 1). [16, s. 679–680.]



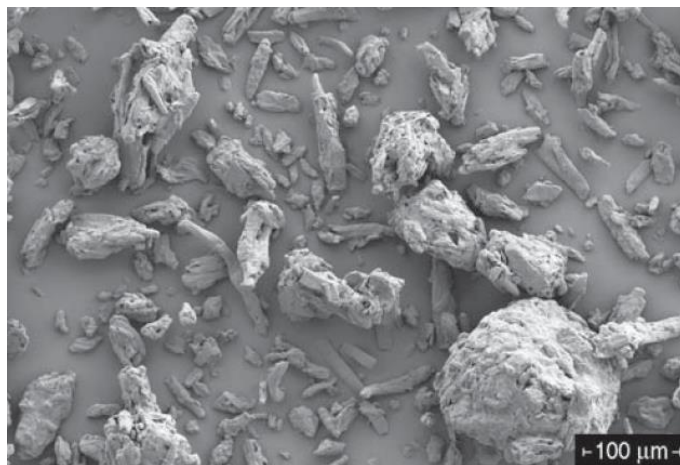
Kuva 1. Sorbitolin 100-kertainen suurennos. Kuva otettu pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. [16, s. 679.]

Kapseleissa sorbitolia käytetään kosteudensäätöaineena ja täyteaineena sekä kapselikuoressa gelatiinin pehmentimenä. Sorbitoli on laajasti käytetty apuaine

lääkevalmisteissa, mutta sitä käytetään myös kosmetiikassa sekä elintarvikkeissa lisäaineena. Luonnosta sorbitolia löytyy muun muassa monista hedelmistä ja marjoista. [16, s. 679.]

### 3.2 Mikrokiteinen selluloosa apuaineena

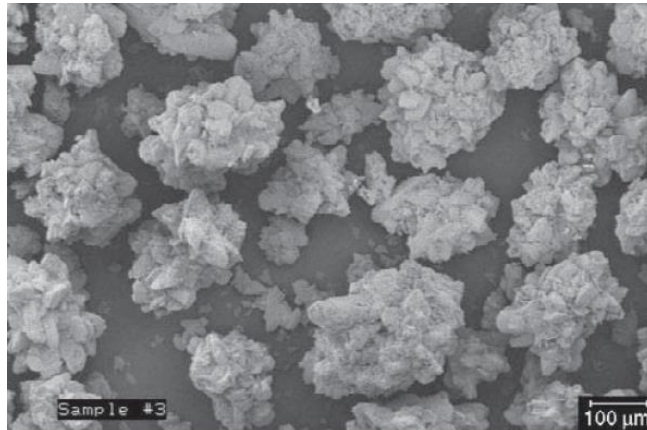
Mikrokiteinen selluloosa on puhdistettua, osittain depolymeroitunutta selluloosaa. Mikrokiteinen selluloosa on hajuton ja mauton osittain kiteinen jauhe. Valkoinen jauhe koostuu pienistä huokoisista partikkeleista, joiden koko on keskimäärin 20–200 nm (kuva 2). Jauheen kosteuspitoisuus on tyypillisesti alle 5 %. Jauheiden ominaisuudet ja käyttösovellukset vaihtelevat hiukkaskoon ja kosteuspitoisuuden mukaan. Mikrokiteinen selluloosa on hygroskooppisesta luonteestaan huolimatta stabiili varastointiolosuhteissa. Mikrokiteinen selluloosa on yleisesti käytetty apuaine lääkevalmisteissa, mutta sitä käytetään myös kosmetiikassa sekä elintarvikkeissa. [16, s. 130–131.] Kapseleissa mikrokiteistä selluloosaa käytetään täyteaineena sekä hajotusaineena [15, s. 201; 16, s. 130–131].



Kuva 2. Mikrokiteinen selluloosan 200-kertainen suurennos. Kuva otettu pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. [16, s. 130.]

### 3.3 Dikalsiumfosfaatti apuaineena

Dikalsiumfosfaatti on kidevedetön ja kiderakenteeltaan on trikliininen. Dikalsiumfosfaatti ei ole hygroskooppinen, joten korkeassakaan kosteuspitoisuudessa se ei hydratoidu dihydraatiksi eli liitä itseensä vettä. Dikalsiumfosfaatti on valkoista, hajutonta ja mautonta kiteistä jauhetta tai kiinteää ainetta. Partikkeleiden keskimääräinen halkaisija on 94 nm (kuva 3). [16, s. 94–95.]



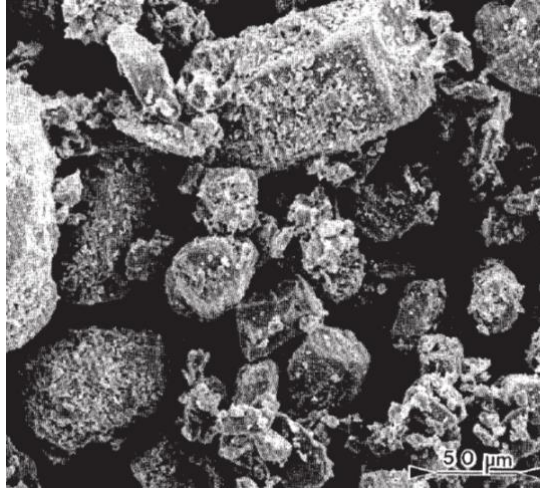
Kuva 3. Dikalsiumfosfaatin 200-kertainen suurennos. Kuva otettu pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. [16, s. 95.]

Dikalsiumfosfaattia käytetään niin apuaineena lääkevalmisteissa kuin kalsiumin lähteenä ja täyteaineena ravintolisissä [15, s. 200; 16, s. 94]. Lääkevalmisteissa sitä käytetään sen hyvien puristusominaisuuksien takia. Jauhettua dikalsiumfosfaattia käytetään yleensä märkärakeistuksessa. Jauhamatonta tai karkeaa materiaalia käytetään taas suorapuristusvalmisteissa. Huoneenlämpötilassa dikalsiumfosfaatti pysyy stabiilina. [16, s. 94.]

### 3.4 Glukoosi apuaineena

Glukoosi on hajutonta, makeaa, väritöntä tai valkoista kiteistä jauhetta (kuva 4). Se pysyy hyvin stabiilina kuivissa ja viileissä varastointiolosuhteissa, mutta absorboi kosteutta itseensä lämpötilan ylittäessä 25 °C ja suhteellisen kosteuden ollessa 85 %. Se voi olla anhydraattina tai monohydraattina. Glukoosia käytetään liuoksissa makeutusaineena ja

pureskeltavissa tableteissa sideaineena. Monoydraattimuodossa oleva glukoosi vaatii enemmän liukuainetta tabletointiprosessissa. Tällöin tabletit mahdollisesti kovettuvat eivätkä murene niin helposti. [16, s. 222–223.] Tutkimuksessa käytettiin monohydraattimuodossa olevaa glukoosia.

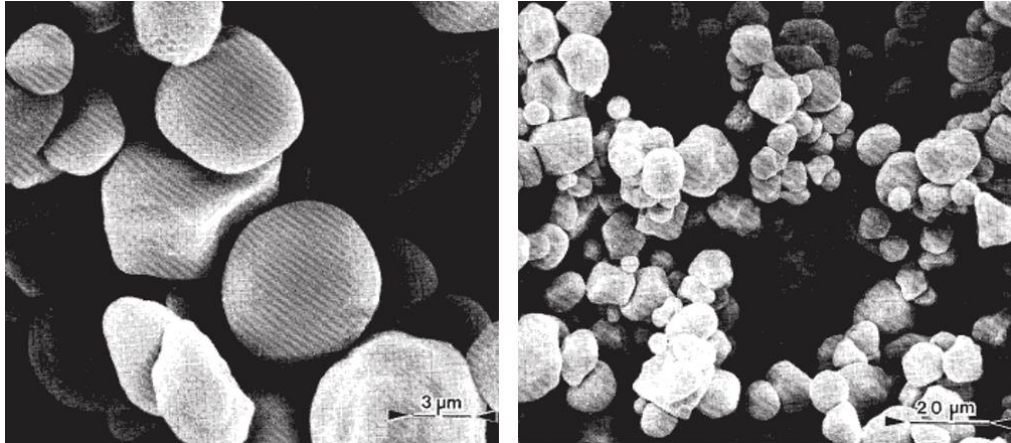


Kuva 4. Glukoosin 180-kertainen suurennos. Kuva otettu pyyhkäisyelektronimikroskoopilla [16, s. 223.]

### 3.5 Dekstriini apuaineena

Dekstriini on osittain hydrolysoitua maissi-, riisi-, peruna- tai kassavatärkkelystä. Se on valkoista, vaaleankeltaista tai ruskeaa jauhetta, jolla voi olla lievä ominaishaju. Muodoltaan dekstriinipartikkelit ovat pallomaisia (kuva 5). Dekstriiniä käytetään kapsleissa täyteaineena, rakeistuksen sideaineena, suspensioiden sakeuttamisaineena sekä sokeripinnoitteen ainesosana. Dekstriinin fysikaaliset ominaisuudet vaihtelevat valmistustavasta ja -materiaalista riippuen. Vesiliuoksissa dekstriinimolekyylit voivat aggregoitua lämpötilan, pH:n, tiheyden tai jonkin muun ominaisuuden muuttuessa. [16, s. 220–221.] Dekstriinin kosteuspitoisuus vaihtelee 5–10 % [16, s. 220; 17].





Kuva 5. Dekstriinin 2400-kertainen suurennos (vasemmalla) ja 600-kertainen suurennos (oikealla). Kuvat otettu pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. [16, s. 221.]

#### 4 Kapselointi

Kapseleilla on tutkitusti ollut positiivinen vaikutus potilaiden hoitomyöntyvyyteen tableteilla tapahtuvaan lääkkitykseen verrattuna [15, s. 188]. Kuluttajat ovat yhä kiinnostuneempia kapselivalmisteista, sillä ne ovat hajuttomia, mauttomia ja helpommin nieltäviä. Kapselit voidaan myös avata, jolloin jauhemaisen sisällön voi esimerkiksi sekoittaa nesteen joukkoon. Useimmat kapselit hajoavat 5–10 minuutissa, jonka jälkeen aineiden liukeneminen voi olla nopeampaa kuin tableteilla. [18, s. 38.]

Kapselivalmisteet ovat suhteellisesti stabiilimpia kuin muut suun kautta nautittavat valmisteet, sillä kapselikuori suojaa raaka-aineita hapelta, hiilidioksidilta ja kosteudelta [15, s. 187; 18, s. 38]. Sameat kapselikuoret voivat myös suojata yhdisteitä valolta. Kapselointi on hellävaraisempi prosessimuoto kuin tabletointi, sillä se ei aiheuta materiaaleille korkeaa lämpötilaa tai painetta. Tämän takia kyseinen valmistusmenetelmä soveltuu hyvin muun muassa lämpöherkille aineille ja bakteereille. [18, s. 38.]

Tabletteihin verrattuna kapselivalmisteita on helpompi ja nopeampi kehittää sekä valmistaa. Tämä johtuu siitä, että valmistusprosessi on yksinkertaisempi eikä apuaineita tarvita niin paljon. Käsittelyvaiheiden vähäisyyden takia työntekijät altistuvat raaka-aineille vähemmän ja ilmassa kulkevan pölyn määrä vähenee, jolloin ristikontaminaation



riskit ovat pienemmät. Apuaineiden vähäisemmän määrän takia kapselointia voidaan hyödyntää aineille, jotka ovat herkkiä muille kemikaaleille tai erittäin reaktiivisia muiden kemikaalien kanssa. Kapseleita voidaan hyödyntää myös huonosti puristuviin raaka-aineisiin, joita ei voida valmistaa tablettimuodossa. Jauheiden ja rakeiden lisäksi kapselit voidaan täyttää esimerkiksi pelleteillä, tableteilla ja nestemäisellä tai puolikiinteällä seoksella, mikä mahdollistaa uusien yhdistelmätuotteiden kehittämisen. [15, s.187 ja 189; 18, s. 38.]

Kapselivalmisteilla on myös heikkoutensa. Kovat kapselit eivät sovellu erittäin vesiliukoisten tai hygroskooppisten raaka-aineiden kapselointiin, sillä kapselit voivat muuttua tahmeiksi ja tarttua toisiinsa kosteuden vaikutuksesta. Kapseli voi myös tarttua ruokatorven tai mahan limakalvoon tyhjän mahaan tai ilman nestettä nautittaessa. Tällöin kapselin hajoaminen on hitaampaa ja mahdollista paikallista limakalvon ärsytystä voidaan havaita. Kaksiosainen kapseli on helppo avata ja sen sisältö vaihtaa, jolloin kapselikuoria voidaan käyttää esimerkiksi rikollisessa toiminnassa. [15, s. 189–190.]

Kapselivalmisteita varten tehdas yleensä ostaa tyhjät kapselikuoret ulkopuoliselta valmistajalta, mutta täyttää kapselit ja pakkaa valmisteet itse. Täyttöprosessissa suoritetaan kapseleiden oikein päin asettaminen, avaaminen sekä täyttö sisältäen mahdollisen tiivistyksen. Täytön jälkeen kapselit suljetaan ja poistetaan laitteesta. Täyttölaite voi olla käsikäyttöinen, puoliautomaatti tai automaatti. Laitteet voidaan myös jakaa kahteen ryhmään täyttötavan perusteella. Laite voi käyttää kapselin pohjaosan tilavuutta annoksen suuruuden mittana tai annoksen suuruus voidaan määrittää ennen täyttöprosessin aloittamista, mikä mahdollistaa kapseleiden vajaatäytön. Automaattisissa kapseleiden täyttökoneissa voidaan käyttää ruuvi-, puriste- tai mäntäannostinta. [15, s. 193–196.]

Jauheseoksia kapseloitaessa on tärkeää kiinnittää huomiota seoksen valuvuusominaisuuksiin. Valuvuusominaisuudet riippuvat monista tekijöistä, kuten kidekoosta ja -muodosta, hiukkaskokojakaumasta, sähköstaattisista ilmiöistä, kosteudesta sekä käytetystä liukuaineesta. Valuvuuden lisäksi seoksen on oltava homogeenistä, sillä raaka-aineiden erottuminen vaikuttaa probioottien määrään yhdessä kapselissa. Näitä kahta tekijää voidaan tarvittaessa parantaa jauheseoksen rakeistamisella, mutta probiootit eivät kestä rakeistusta. Myös kapselikokoon tulee

kiinnittää huomiota, sillä jakelutarkkuus on epätarkempi pienissä kapsелеissa. Hyvä jakelutarkkuus saadaan käytettäessä kapselin tilavuuteen perustuvia täyttölaitteita. Alhaisen tehon takia niitä käytetään kuitenkin lähinnä vain pienten erien valmistuksessa esimerkiksi tuotekehityksessä. [15, s. 194 ja 199.]

## 5 Analyysimenetelmät

### 5.1 Bakterianalyysi

Näytteiden bakteerien elävyyttä (eng. viability) sekä absoluuttista konsentraatiota tutkittiin virtaussytometrian avulla. Menetelmä on nopeampi kuin viljelytekniikat ja pesäkelaskenta, sillä se ei ole riippuvainen bakteerien jakautumisesta tai pesäkkeitä muodostavan yksikön muodostumisesta. Tämän takia tuloksissa ei myöskään esiinny suurta pesäkelaskennasta johtuvaa vaihtelua.

Näytteet lähetettiin ulkopuoliseen yritykseen virtaussytometria-analyysiin. Analyysiä varten kapseliin pakatut jauhemaiset näytteet avataan ja jauheen tasalaatuisuus varmistetaan silmämääräisesti sekä spaattelilla sekoittaen. Menetelmässä analysoidavan näytteen määrä selvitetään ottamalla tunnetusta jauhemäärästä näyte, jolloin näytteen massa on alkuperäisen jauhemäärän vähenemä. Näyte sekoitetaan tunnettuun määrään suolaliuosta. Tämän jälkeen liuosta sekoitetaan vakioitu aika koneellisesti. Jotta kaikki bakteerit saadaan irtoamaan kiintoaineesta sekä toisistaan, liuos suodatetaan ja käsitellään ultraäänellä. Homogenoitua liuosta pipetoidaan tunnettu määrä koeputkeen, jossa on standardoitu määrä fluoresoivia mikrohelmiä. Helmet toimivat mittauksen sisäisinä kontrolleina ja niiden avulla selvitetään bakteerien absoluuttiset konsentraatiot. Pipetoinnin jälkeen näyte käsitellään kahdella erilaisella fluorokromilla ja annetaan inkuboitua vakioitu aika. Inkubaation jälkeen näytteille suoritetaan sytometrinen analyysi. Mittaukset tehdään nestevirrassa, jossa bakteerit ohittavat laserilla valaistun mittauspaikan. Fluorokromeilla on erilaiset fluoresenssiominaisuudet, minkä takia ne emittoivat joko punaista tai vihreää valoa. Nämä merkkiaineet sitoutuvat solun perintöaineeseen. Punaista valoa säteilevä merkkiaine kiinnittyy vain vaurioituneeseen soluseinään tai solukalvoon. Jos molemmat merkkiaineet sitoutuvat samaan bakteeriin, punainen merkkiaine sammuttaa vihreää

merkkivaloa emittoineen merkkivalon fluoresenssin. Tämän vuoksi elävät bakteerisolut fluoresoivat vihreinä ja kuolleet solut punaisina. Mittauksista saadaan kuvaaja, josta nähdään bakteri- ja standardihelmipopulaatioiden esiintyminen. Analysointityökalun avulla kuvaajasta saadaan selville elävien ja kuolleiden bakteerien osuudet sekä kappalemäärät painoyksikköä tai kapselia kohti. [13.]

## 5.2 Infrapuna (IR) -kosteusanalyysi

Infrapunakosteusanalysaattori mittaa kosteuspitoisuuden termogravimetrisesti. Laite punnitsee näytteen ennen lämmittämistä ja sen jälkeen. Materiaalin kosteuspitoisuus määritetään saatujen punnitustulosten erotuksesta. Näytettä lämmitetään halogeenilampun infrapunasäteilyllä, jolloin kosteutta poistuu näytteestä. Lämmittäminen tapahtuu ennalta määrättyssä lämpötilassa ja pysähtyy, kun näytteen paino pysyy samana 30 sekunnin ajan eli haihtumista ei enää tapahdu. Suurin osa käytetystä säteilystä tunkeutuu näytteeseen ja muuttaa säteilyn sisältämän energian lämpöenergiaksi, joka lämmittää näytettä sisältäpäin. Osa säteilystä heijastuu näytteen pinnasta takaisin tai menee näytteen läpi. Heijastuma on suurempi vaaleissa kuin tummissa näytteissä. Säteilyn läpäisevyyden voimakkuus riippuu myös näytteen läpäisevyydestä. Näytteissä, joissa on matala säteilyn läpäisevyys, säteily tunkeutuu vain näytteen uloimpiin kerroksiin. Tämä voi mahdollisesti aiheuttaa näytteen puutteellisen kuivauksen, kuortumisen tai palamisen. [19, s. 75.]

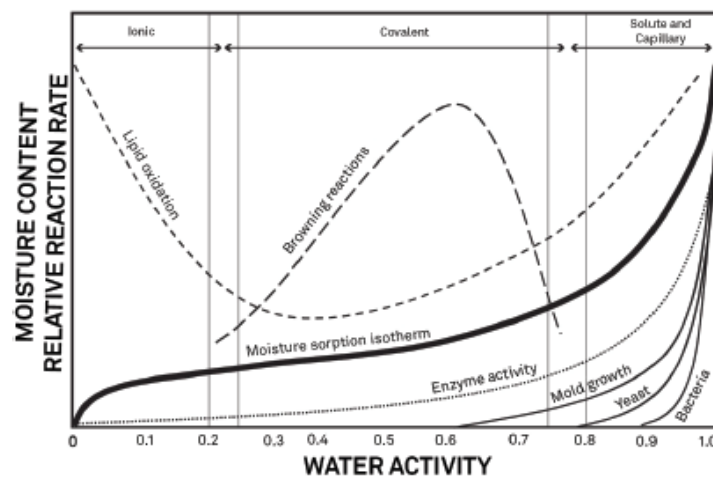
## 5.3 Lähi-infrapunaspektroskopia (NIRS)

Lähi-infrapunaspektroskopiaa (Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIRS) käytetään näytteiden kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien mittaamiseen. NIR-menetelmää käytetään laajasti eri aloilla, sen helppouden ja toistettavuuden takia. Mittausta voidaan soveltaa suuriin näytemääriin eikä se vaadi näytteiden monimutkaista esikäsittelyä tai tuhoa niitä käsittelyn aikana. Menetelmä perustuu näytteen sähkömagneettisen säteilyn absorptio-ominaisuuksiin lähi-infrapuna-alueella (750–2500 nm). Näytteeseen kohdistettaessa lähi-infrapunavaloa, osa säteilystä absorboituu näytteen pintaan ja osa emittoituu näytteen pinnasta detektoreille. Laite mittaa absorboituneen ja heijastuneen säteilyn suhteellista intensiteettiä eri aallonpituuksilla.

Kyseen absorboituminen johtuu orgaanisissa yhdisteissä esiintyvistä C–H-, O–H- ja N–H-sidoksista. Absorboituneen valon määrään vaikuttaa näytteen kemialliset ominaisuudet, kuten absorboivien sidosten määrä sekä fysikaaliset ominaisuudet, kuten näytteen rakenteen kosteuspitoisuus ja partikkelikoko. [20.]

#### 5.4 Vesiaktiivisuusmittaus ( $a_w$ )

Veden aktiivisuudella ( $a_w$ ) tarkoitetaan aineessa olevan vapaan veden määrää. Analyysistä saatu arvo kertoo, kuinka tiiviisti vesi on sitoutunut aineeseen. Sitoutuminen voi olla kemiallista tai rakenteellista. Mitä matalampi arvo on, sitä sitoutuneempaa vesi on. Labuzan veden aktiivisuuden kuvaajasta (kuva 7) nähdään miten aktiivisen veden määrä vaikuttaa mikro-organismeihin. Homeiden, hiivojen ja bakteereiden määrä kasvaa eksponentiaalisesti, kun veden aktiivisuus ylittää arvon 0,9. Veden aktiivisuus on tärkeä käsite tuotteen laadun ja turvallisuuden määrittämisessä, sillä hiivat ja homeet alkavat kasvaa näytteissä  $a_w$ -arvon ollessa  $\geq 0,6$ . Veden aktiivisuudessa otetaan huomioon mikrobien kasvu, kemikaalien reaktionopeus sekä tuotteen fysikaaliset ominaisuudet. [21, s. 38.]



Kuva 6. Labuzan veden aktiivisuuden kuvaaja (1976) [21, s. 38]

## 6 Materiaalit ja menetelmät

### 6.1 Materiaalit

Tutkimuksessa käytettiin viittä apuainetta ja kahta probioottia (taulukko 1). Kapseleina käytettiin läpinäkyviä 0-koon Lonzan Vcaps® Plus Hypromellosekapseleita, joista osa oli sinisiä ja osa oli kirkkaita.

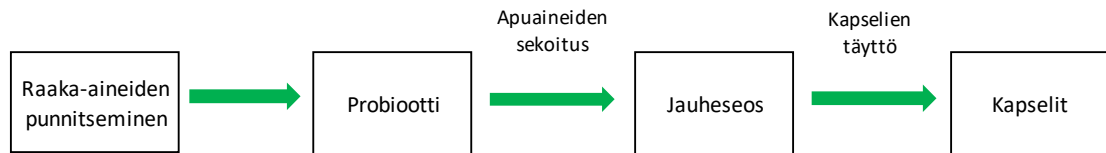
Taulukko 1. Tutkimuksessa käytettyjen raaka-aineiden tuotetiedot

Nimi	Raaka-ainenumero	Eränumero	Valmistaja
Sorbitoli	R3080	20120217	Ecogreen Oleochemicals
Mikrokiteinen selluloosa	R625	20122901	J. RETTENMAIER & SÖHNE Group (JRS)
Dikalsiumfosfaatti	R3333	19120403	Fuji Chemical Ind Co, Ltd
Glukoosi	R138	18050903	Cargill
Dekstroosi	N20108	EKH346	Ingredion
Probiootti A	R3346	–	Probioottivalmistaja
Probiootti B	R3347	–	Probioottivalmistaja

Bakteeriraaka-aineissa oli probioottien lisäksi kantoaineena maissitärkkelystä.

### 6.2 Menetelmät

Kapselinäytteiden valmistusprosessi on esitetty vuokaaviossa (kuva 7). Kapseleiden valmistus aloitettiin punnitsemalla oikeat määrät apuaineita ja maitohappobakteereita astiaan. Jauheet sekoitettiin geometrisessa sarjassa, jolloin sekoituskulhoon punnitaan aina saman verran apuainetta, mitä kulhossa jo on. Massaa sekoitettiin ensin kulhossa ja tämän jälkeen vielä ilmastavasti muovipussissa. Näin massa saatiin sekoitettua hellävaraisesti, mutta tehokkaasti.



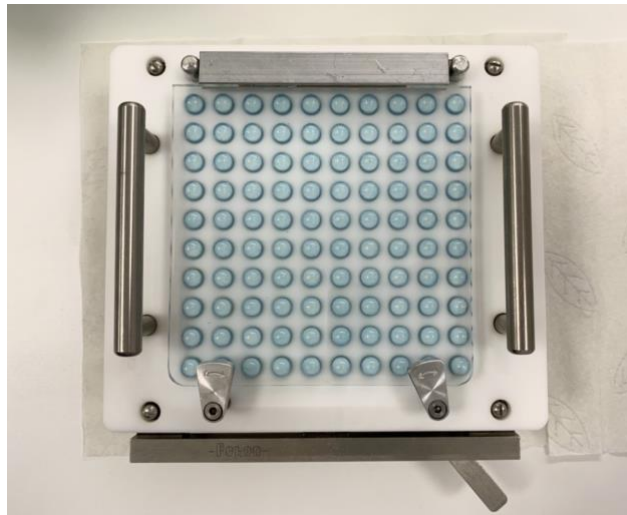
Kuva 7. Vuokaavio kapselinäytteiden valmistuksesta

Tutkimuksessa valmistettiin kahdeksan erilaista massaa (taulukko 2). Jokaisessa massassa oli 95 % apuainetta ja 5 % maitohappobakteereita. Kolmessa massassa (M2, M4 ja M6) käytettiin kahta probioottia: A:ta ja B:tä. Tällöin bakteerien osuudet olivat 2,5 % ja 2,5 % jauheseoksesta.

Taulukko 2. Tutkimuksessa valmistettujen jauhemassojen raaka-aineyhdistelmät.

Massa	Apuaine	Bakteeri
M1	Sorbitoli	A
M2	Sorbitoli	A + B
M3	Mikrokiteinen selluloosa	A
M4	Mikrokiteinen selluloosa	A + B
M5	Dikalsiumfosfaatti	A
M6	Dikalsiumfosfaatti	A + B
M7	Glukoosi	A
M8	Tärkkelys	A

Massoista mitattiin kaatotilavuudet European farmakopean -menetelmällä [23, s. 6328]. Menetelmässä mittalasi asetetaan yläkuppivaa'an päälle ja jauheseosta kaadetaan lasiin, jonka jälkeen kaadetun määrän massa luetaan vaa'asta ja tilavuus mittalasisista. Mittaus toistettiin jokaiselle massalle kolme kertaa. Mittauksen perusteella määritettiin tiheydet jokaiselle massalle. Tämän jälkeen valmistetut massat kapseloitiin käsikäyttöisellä kapselilaudalla (kuva 8). Kapselointi suoritettiin yhdellä tiivistyksellä. Tiivistyksessä kapselin pohjaosassa olevaa massaa painettiin, jolloin kapselisiin mahtui enemmän jauheseosta. Tutkimuserät olivat suuruudeltaan 100 kapselia.



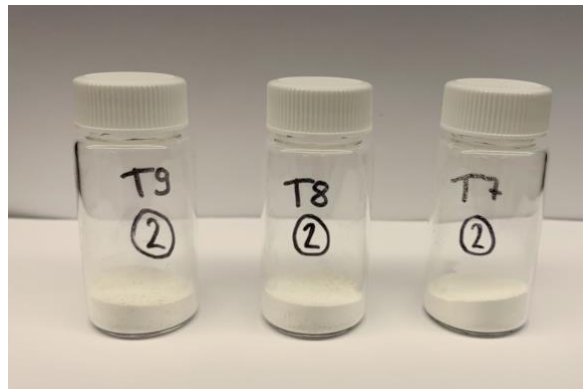
Kuva 8. Tutkimuksessa käytetty käsikäyttöinen kapselilauta, jonka sisällä on jauhemassalla täytetyt kapselit.

Kapseloinnin jälkeen jokaiselle näytteelle (taulukko 3) tehtiin infrapunakosteusanalyysi (IR), lähi-infrapuna (NIR)- ja aktiivisen veden ( $a_w$ ) mittaus laboratorioissa sekä bakteerien elävyyssanalyysi ulkopuolisen yrityksen toimesta.

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden raaka-aine- ja olosuohdeyhdistelmät.

Näyte	Bakteeri	Apuaine	Olosuhde
N1	A	Sorbitoli	21,0 °C / 14,4 %
N2	A	Sorbitoli	25,0 °C / 63,0 %
N3	A	Sorbitoli	20,1 °C / 75,8 %
N4	A	Mikrokiteinen selluloosa	21,0 °C / 14,4 %
N5	A	Mikrokiteinen selluloosa	25,0 °C / 63,0 %
N6	A	Mikrokiteinen selluloosa	20,1 °C / 75,8 %
N7	A	Dikalsiumfosfaatti	21,0 °C / 14,4 %
N8	A	Dikalsiumfosfaatti	25,0 °C / 63,0 %
N9	A	Dikalsiumfosfaatti	20,1 °C / 75,8 %
N10	A	Glukoosi	25,0 °C / 63,0 %
N11	A	Dekstriini	25,0 °C / 63,0 %
N12	A + B	Sorbitoli	25,0 °C / 63,0 %
N13	A + B	Mikrokiteinen selluloosa	25,0 °C / 63,0 %
N14	A + B	Dikalsiumfosfaatti	25,0 °C / 63,0 %

NIR-,  $a_w$ - ja IR-mittauksia varten jokaisesta näyte-erästä otettiin viisi kapselia, jotka avattiin ja tyhjennettiin lasipulloon (kuva 9). Viiden kapselin (1,3–2,2 g) arvioitiin olevan riittävä näytemäärä analyysistä varten. Tämän jälkeen NIR-mittaukset tehtiin Q-Interlinen UniQuant-B (Tanska) -laitteella käyttäen InfraQuant-ohjelmaa [22]. NIR-mittausten jälkeen jauhemassat kaadettiin pieniin astioihin  $a_w$ -mittausta varten.  $a_w$ -mittaukset suoritettiin Meter Groupin AQUALAB® 4TE (USA) -laitteella käyttöohjeen mukaan. Laitteen mittausepävarmuus oli  $\pm 0,003$ . [21, s. 7–8.] Mittausten jälkeen jauhemassat siirrettiin folioastioihin ja asetettiin infrapunakosteusanalyysiaattoriin (KERN DBS 60-3, Saksa) yksi kerrallaan analyysia varten. IR-kosteusanalyysiaattorilla lämmitettiin näytteitä 105 °C:ssa, kunnes näytteistä ei enää haihtunut kosteutta.



Kuva 9. Esimerkki näytteiden N9, N8 ja N7 lasipulloista. Jokaiseen pulloon on tyhjennetty viiden kapselin sisältö loppumittauksia varten.

Näytteet asetettiin kolmeen eri olosuhteeseen; laboratorioon, olosuhdehuoneeseen ja eksikaattoriin (taulukko 3). Laboratorion keskilämpötila oli 21,0 °C (min. 16,7 °C ja max. 23,6 °C) ja suhteellisen kosteuden keskiarvo oli 14,4 %RH (min. 1,0 %RH ja max. 34,6 %RH). Laboratorio-olosuhteisiin asetettiin näytteet N1, N4 ja N7. Olosuhdehuoneen keskilämpötila oli 25,0 °C (min. 24,8 °C ja max. 25,6 °C) ja suhteellisten kosteuden keskiarvo oli 63,0 %RH (min. 33,2 %RH ja max. 93,9 %RH). Olosuhdehuoneeseen asetettiin näytteet N2, N5, N8, N10, N11, N12, N13 ja N14. Korkean suhteellisen kosteuden olosuhde saatiin laittamalla eksikaattorin pohjalle vettä. Eksikaattorin keskilämpötila oli 20,1 °C (min. 18 °C ja max. 22,3 °C) ja suhteellisen kosteuden



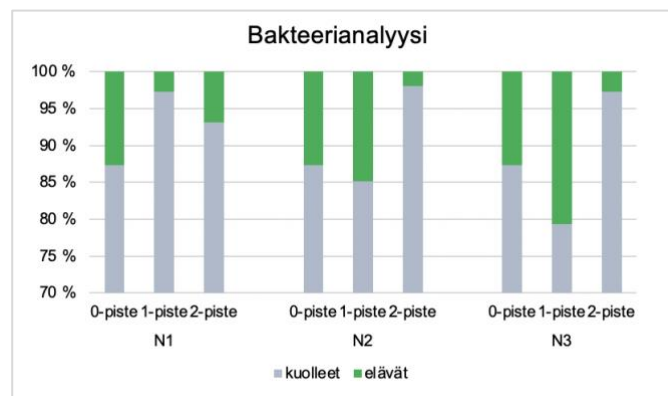
keskiarvo oli 75,8 %RH (tutkimuksen alussa min. 30,3 %RH ja max. 90,0 %RH). Eksikaattoriin asetettiin näytteet N3, N6 ja N9.

Jokaisessa olosuhteissa inkuboitiin myös puhtaita raaka-aineita. Laboratorio-olosuhteessa ja eksikaattorissa inkuboitiin sorbitolia, mikrokiteinen selluloosaa, dikalsiumfosfaattia ja A:ta. Olosuhdehuoneessa inkuboitiin sorbitolia, mikrokiteinen selluloosaa, dikalsiumfosfaattia, glukoosia, dekstriiniä, A:ta ja B:tä.

## 7 Tulokset

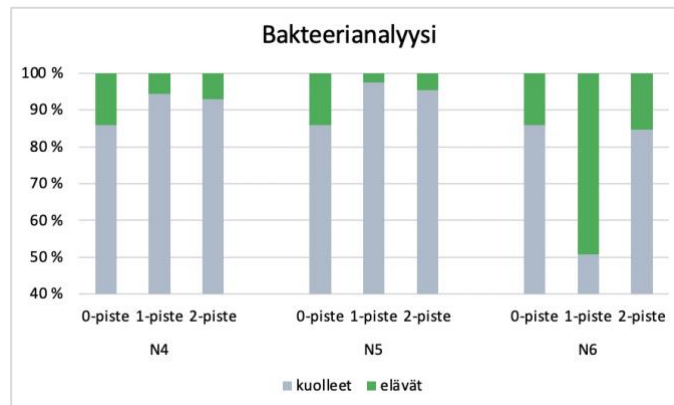
### 7.1 Bakterianalyysi

Virtausytometrillä tehtävään bakterianalyyysiin lähetettiin näytteet N1–N14 sekä näytteet bakteriraaka-aineista R3346 (A) ja R3347 (B). Näytteiden N1–N3 tulokset on esitetty kuvassa 10. N1-N3 sisältävät A (5 %) ja sorbitolia (95 %).



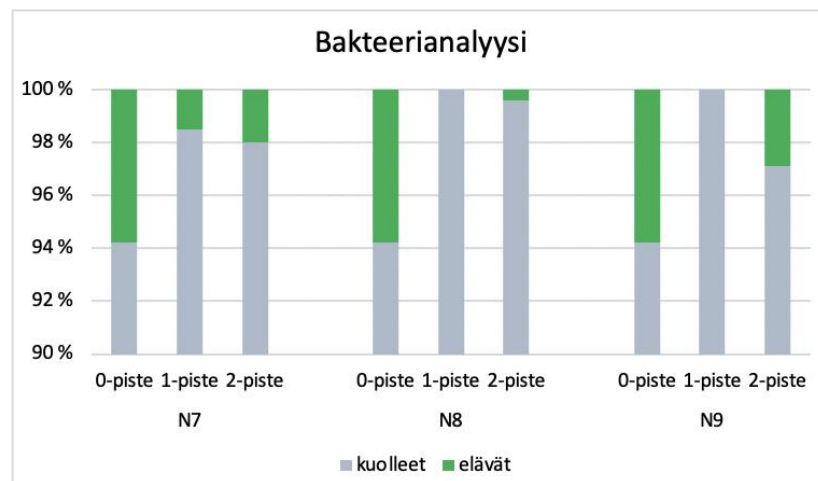
Kuva 10. Elävien ja kuolleiden solujen prosenttiosuudet näytteissä N1, N2 ja N3. Huom. y-akseli 70–100 %

Näytteiden N4–N6 (A 5 % ja mikrokiteinen selluloosa 95 %) tulokset on esitetty kuvassa 11.



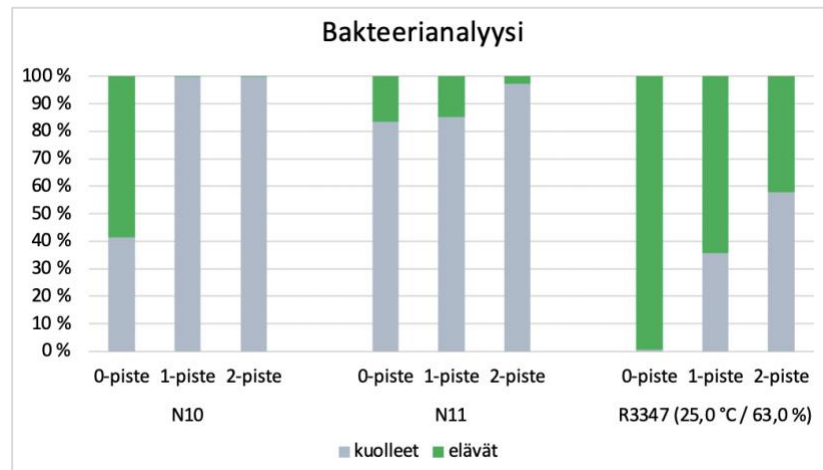
Kuva 11. Elävien ja kuolleiden solujen prosenttiosuudet näytteissä N4, N5 ja N6. Huom. y-akseli 40–100 %

Näytteiden N7–N9 (A 5 % ja dikalsiumfosfaatti 95 %) tulokset on esitetty kuvassa 12.



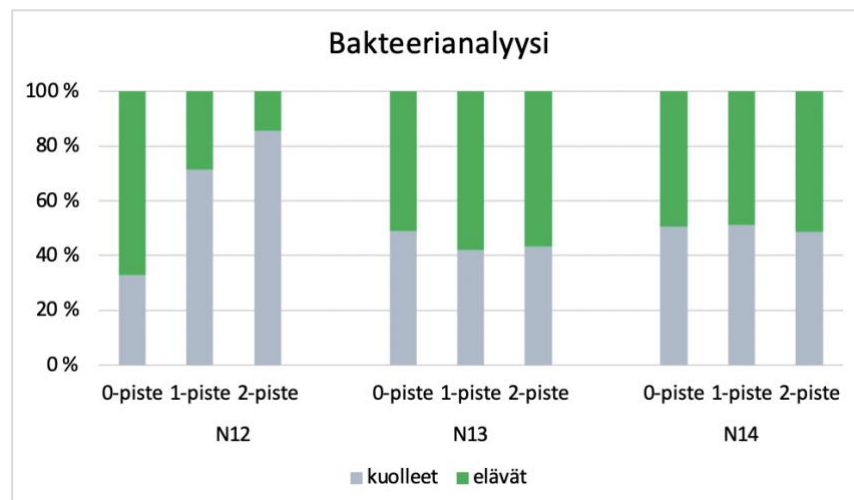
Kuva 12. Elävien ja kuolleiden solujen prosenttiosuudet näytteissä N7, N8 ja N9. Huom. y-akseli 90–100 %

Näytteiden N10 (A 5 % ja glukoosi 95 %), N11 (A 5 % ja dekstriini 95 %) ja R3347 (B) tulokset on esitetty kuvassa 13. B-raaka-ainenäyte asetettiin olosuhdehuoneeseen (25,0 °C / 63,0 %RH), koska kyseistä probioottia sisältävät kapselit olivat vain tässä olosuhteessa tutkimuksen ajan.



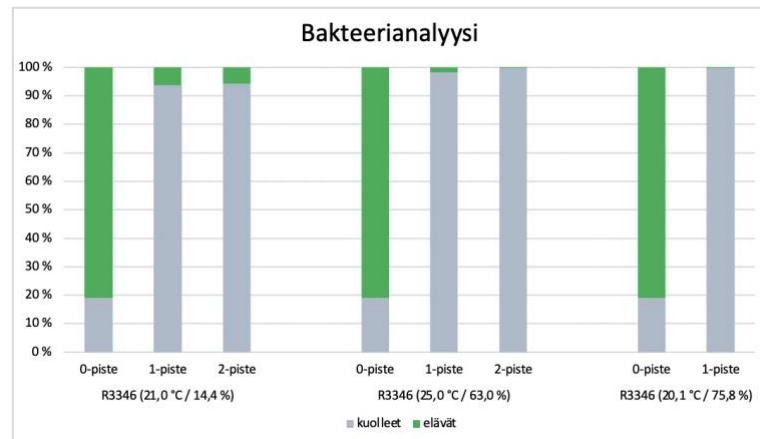
Kuva 13. Elävien ja kuolleiden solujen prosenttiosuudet näytteissä N10 ja N11 sekä bakteerinäytteessä R3347 (25,0 °C / 63,0 %RH)

Näytteiden N12 (sorbitoli 95 %, A 2,5 % ja B 2,5 %), N13 (mikrokiteinen selluloosa 95 %, A 2,5 % ja B 2,5 %) ja N14 (dikalsiumfosfaatti 95 %, A 2,5 % ja B 2,5 %) tulokset on esitetty kuvassa 14.



Kuva 14. Elävien ja kuolleiden solujen prosenttiosuudet näytteissä N12 (apuaineena sorbitoli), N13 (apuaineena mikrokiteinen selluloosa) ja N14 (apuaineena dikalsiumfosfaatti)

Kuvassa 15 on esitetty A:n tulokset jokaisessa olosuhteessa. Näytettä R3346 (20,1 °C / 75,8 %RH) ei lähetetty 2-pisteessä analyysiin, sillä näyte oli muuttunut kosteuden vaikutuksesta kiinteäksi ja tahmeaksi palaksi eikä sitä tämän takia voitu analysoida.



Kuva 15. Elävien ja kuolleiden solujen prosenttiosuudet bakteerinäytteissä R3346 (21,0 °C / 14,4 %RH), R3346 (25,0 °C / 63,0 %RH) ja R3346 (20,1 °C / 75,8 %RH)

## 7.2 Infrapuna (IR) -kosteusanalyysi

IR-kosteusanalyysi suoritettiin jokaisessa mittauspisteessä kapselinäytteille N1–N14. Taulukossa 4 on esitetty mittauksista saadut tulokset massaprosentteina.

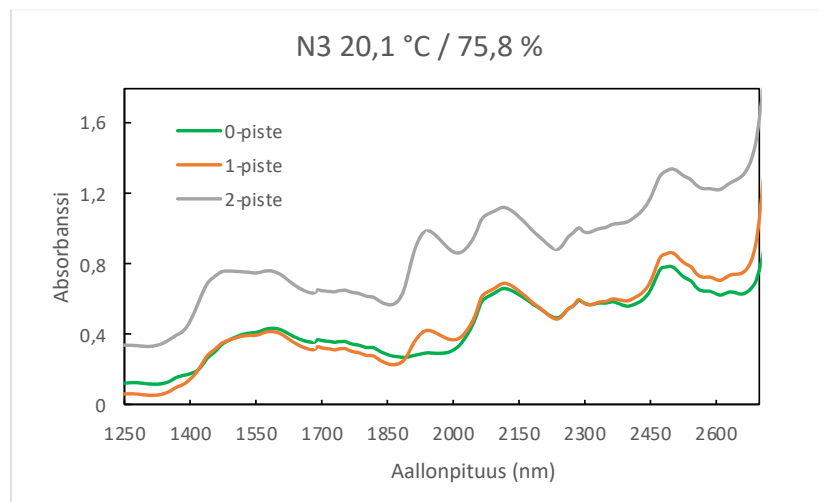
Taulukko 4. Kapselinäytteiden infrapunakosteusanalyysin tulokset massaprosentteina

Näyte	0-piste (m-%)	1-piste (m-%)	2-piste (m-%)
N1	0,68	0,41	0,93
N2	0,68	3,06	2,28
N3	0,68	5,12	6,64
N4	6,04	3,11	3,67
N5	6,04	5,80	5,65
N6	6,04	6,60	8,24
N7	0,99	1,00	0,66
N8	0,99	1,40	0,89
N9	0,99	1,07	3,11
N10	8,63	9,12	9,06
N11	4,72	7,90	10,28
N12	0,60	0,98	2,25
N13	3,54	3,93	5,96
N14	0,98	1,08	0,92

### 7.3 Lähi-infrapunaspektroskopia (NIRS)

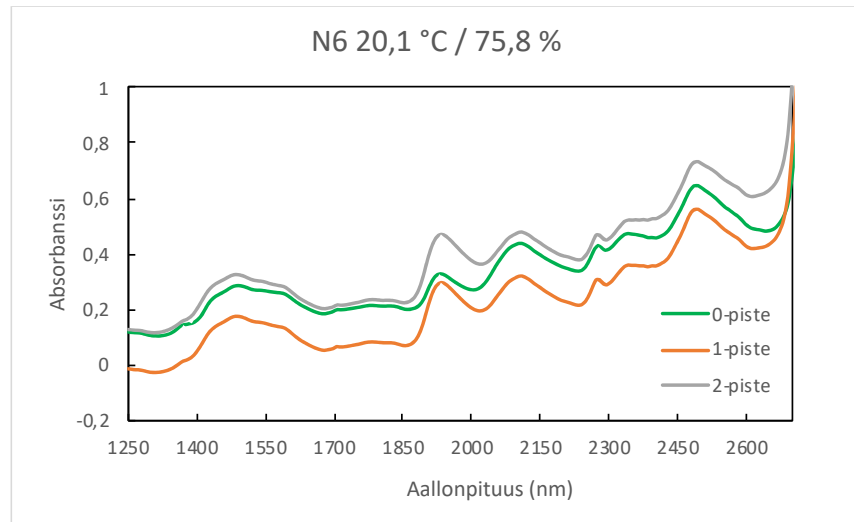
Jokaiselle kapselinäytteelle (N1–N14) ja puhtaalle raaka-aineelle suoritettiin NIR-mittaukset tutkimuksen alku-, puoliväli- ja loppupisteessä. Tässä luvussa on esitetty seitsemän NIR-spektrin kuvaajaa, joissa havaittiin suurimmat muutokset mittauspisteiden välillä. Loput NIR-kuvaajat on esitetty liitteessä 1.

Kuvassa 16 on esitetty näytteen N3 NIR-spektrin käyrät.



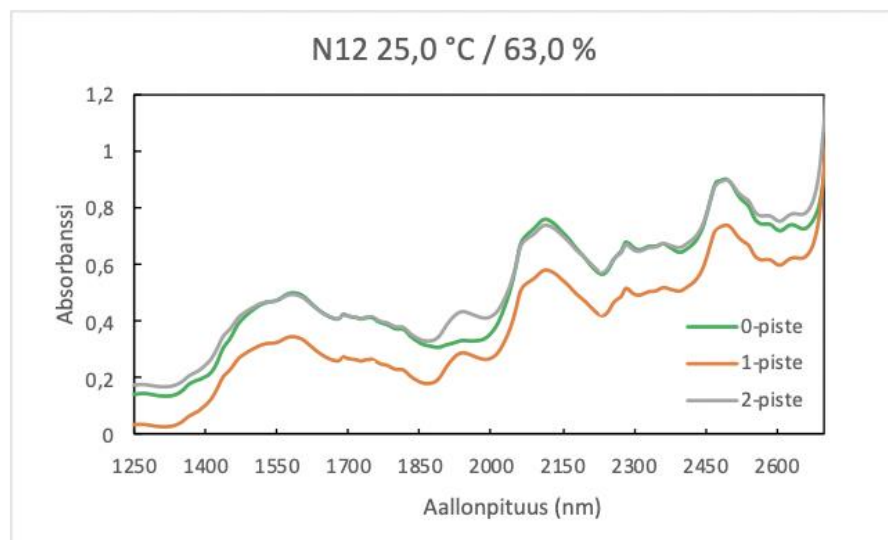
Kuva 16. Näytteen N3 (A ja sorbitoli) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

Kuvassa 17 on esitetty näytteen N6 NIR-käyrät.



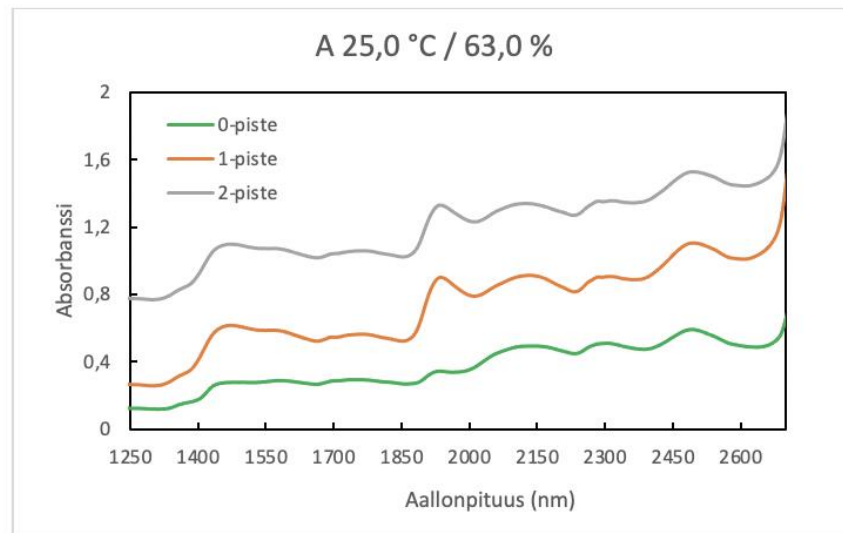
Kuva 17. Näytteen N6 (A ja mikrokiteinen selluloosa) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

Kuvassa 18 on esitetty näytteen N12 NIR-käyrät.



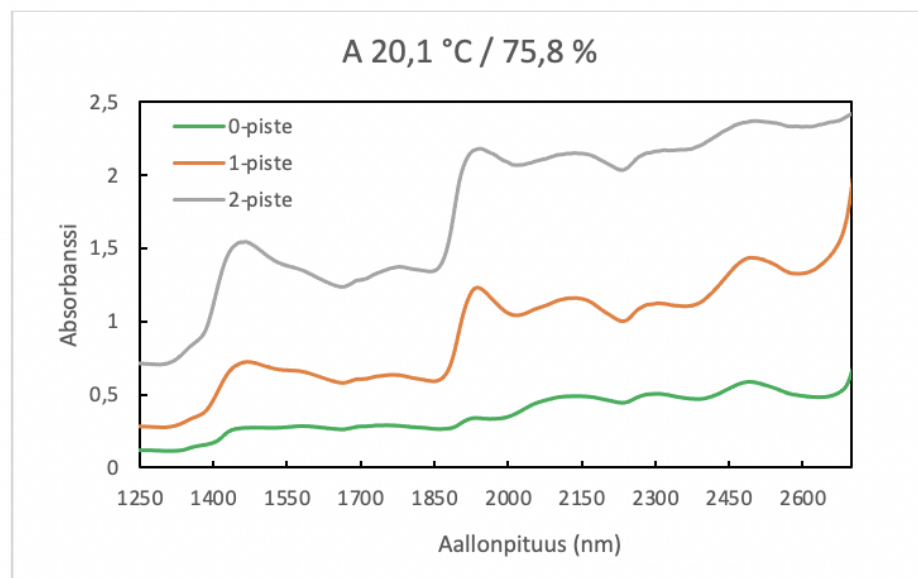
Kuva 18. Näytteen N12 (probioottiseos ja sorbitoli) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

Kuvassa 19 on esitetty A:n (25,0 °C / 63,0 %RH) puhtasnäytteen NIR-käyrät.



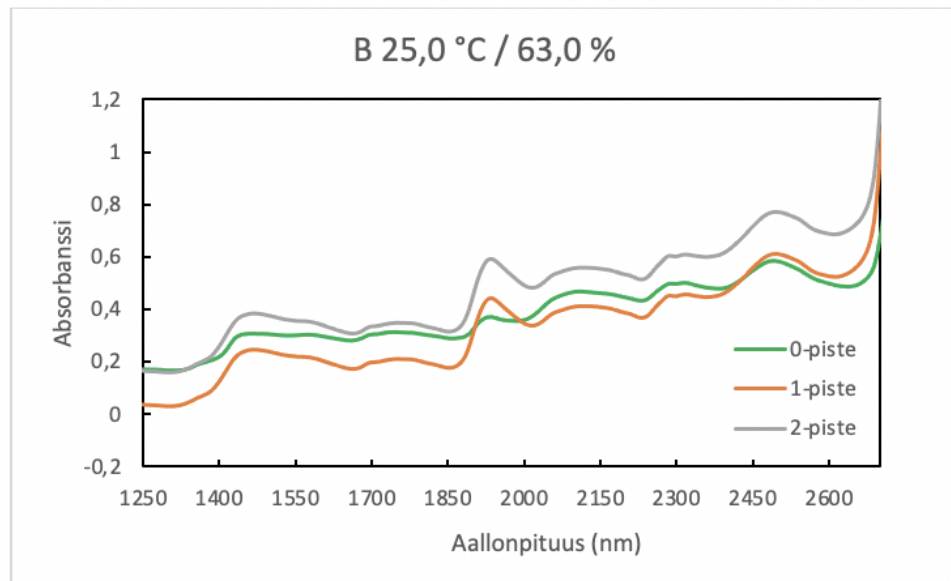
Kuva 19. Olosuhdehuoneessa säilytetyn A:n (R3346) puhtasnäytteen NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

Kuvassa 20 on esitetty A:n (20,1 °C / 75,8 %RH) puhtasnäytteen NIR-käyrät.



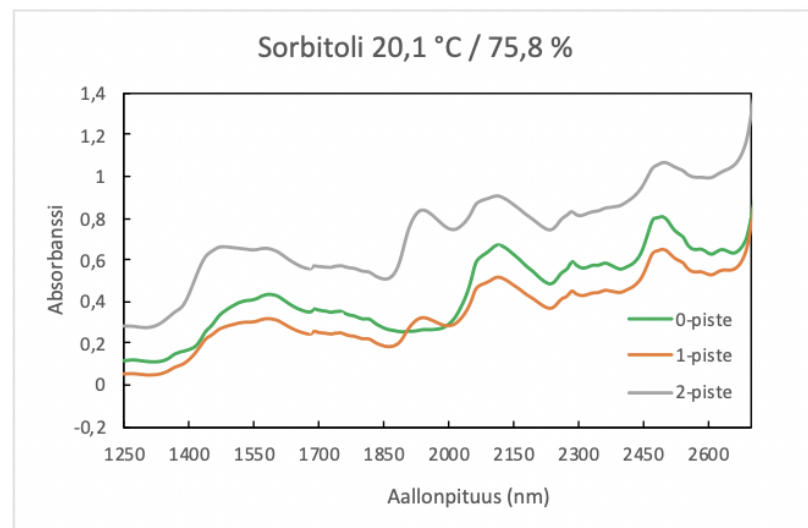
Kuva 20. Eksikaattorissa säilytetyn A:n (R3346) puhtasnäytteen NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

Kuvassa 21 on esitetty B:n (25,0 °C / 63,0 %RH) puhtasnäytteen NIR-käyrät.



Kuva 21. Olosuhdehuoneessa säilytetyn B:n (R3347) puhtasnäytteen NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

Kuvassa 22 on esitetty sorbitolin (20,1 °C / 75,8 %RH) puhtasnäytteen NIR-käyrät.



Kuva 22. Eksikaattorissa säilytetyn sorbitolin (R3080) puhtasnäytteen NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



#### 7.4 Vesiaktiivisuusmittaus ( $a_w$ )

Veden aktiivisuus mitattiin kapselinäytteistä sekä puhtaista raaka-aineista 0-, 1- ja 2-pisteissä. Kapselinäytteiden  $a_w$ -mittausten tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Kapselinäytteiden  $a_w$ -mittausten tulokset alku-, puoliväli- ja loppupisteessä

Näyte	0-piste	1-piste	2-piste
N1	0,169	0,167	0,207
N2	0,169	0,598	0,587
N3	0,169	0,677	0,721
N4	0,253	0,167	0,224
N5	0,253	0,433	0,539
N6	0,253	0,552	0,820
N7	0,258	0,179	0,208
N8	0,258	0,192	0,505
N9	0,258	0,271	0,846
N10	0,255	0,332	0,500
N11	0,254	0,278	0,525
N12	0,166	0,308	0,596
N13	0,259	0,222	0,537
N14	0,248	0,205	0,533

Taulukossa 6 on esitetty puhtaiden apuaineiden  $a_w$ -mittausten tulokset alku-, puoliväli- ja loppupisteessä.

Taulukko 6. Apuaineiden  $a_w$ -mittausten tulokset alku-, puoliväli- ja loppupisteessä

Näyte	Olosuhde	0-piste	1-piste	2-piste
R3080	21,0 °C / 14,4 %	0,223	0,163	0,194
R3080	25,0 °C / 63,0 %	0,223	0,473	0,467
R3080	20,1 °C / 75,8 %	0,223	0,717	0,733
R625	21,0 °C / 14,4 %	0,241	0,136	0,206
R625	25,0 °C / 63,0 %	0,241	0,488	0,478
R625	20,1 °C / 75,8 %	0,241	0,797	0,851
R3333	21,0 °C / 14,4 %	0,272	0,163	0,203
R3333	25,0 °C / 63,0 %	0,272	0,341	0,311
R3333	20,1 °C / 75,8 %	0,272	0,793	0,864
R138	25,0 °C / 63,0 %	0,136	0,180	0,161
N20108	25,0 °C / 63,0 %	0,202	0,450	0,454

## 7.5 Painon vaihtelu ja tiheys

Kapselinäytteet punnittiin alku-, puoliväli- ja loppupisteessä. Taulukossa 7 on esitetty keskimääräinen massa yhdelle kapselille milligrammoina.

Taulukko 7. Näytteiden massat alku-, puoliväli- ja loppupisteessä. Arvot kuvastavat yhden kapselin sisällön keskimääräistä massaa milligrammoina

Näyte	0-piste (mg)	1-piste (mg)	2-piste (mg)
<b>N1</b>	438,5	437,1	438,8
<b>N2</b>	438,5	452,4	454,7
<b>N3</b>	438,5	482,5	549,2
<b>N4</b>	254,9	251,9	254,8
<b>N5</b>	254,9	266,0	266,4
<b>N6</b>	254,9	281,4	294,4
<b>N7</b>	369,8	335,9	380,9
<b>N8</b>	369,8	372,2	371,9
<b>N9</b>	369,8	386,7	398,4
<b>N10</b>	429,4	437,4	437,1
<b>N11</b>	391,4	421,2	421,8
<b>N12</b>	435,0	450,2	451,7
<b>N13</b>	257,7	268,9	269,4
<b>N14</b>	369,8	375,2	376,0

Maitohappobakteerinäytteiden A (R3346) ja B (R3347) massat mitattiin kaikissa aikapisteissä (taulukko 8).

Taulukko 8. Maitohappobakteerien massat eri olosuhteissa ja eri aikapisteissä.

Näyte	Olosuhde	0-piste (g)	1-piste (g)	2-piste (g)
<b>R3346</b>	21,0 °C / 14,4 %	10,0	10,2	10,3
<b>R3346</b>	25,0 °C / 63,0 %	10,0	11,5	12,2
<b>R3346</b>	20,1 °C / 75,8 %	5,0	7,9	8,5
<b>R3347</b>	25,0 °C / 63,0 %	10,0	9,3	11,4

Apuaineiden puhtaat raaka-ainenäytteet punnittiin 0- ja 2 pisteissä (taulukko 9).

Taulukko 9. Puhtaiden apuaineiden massat 0- ja 2-pisteissä punnituina.

Näyte	Olosuhde	0-piste (g)	2-piste (g)
R3080	21,0 °C / 14,4 %	5,0	4,6
R3080	25,0 °C / 63,0 %	5,0	4,5
R3080	20,1 °C / 75,8 %	5,0	5,8
R625	21,0 °C / 14,4 %	5,0	4,6
R625	25,0 °C / 63,0 %	5,0	5,0
R625	20,1 °C / 75,8 %	5,0	5,0
R3333	21,0 °C / 14,4 %	5,0	4,8
R3333	25,0 °C / 63,0 %	5,0	4,8
R3333	20,1 °C / 75,8 %	5,0	5,0
R138	25,0 °C / 63,0 %	5,0	4,8
N20108	25,0 °C / 63,0 %	5,0	5,6

Valmistetuille massoille määritettiin myös kaatotiheydet ennen kapselointia. Mittausten avulla saatiin seuraavat tiheydet: 0,63 g/ml (M1), 0,61 g/ml (M2), 0,36 g/ml (M5 ja M6), 0,58 g/ml (M7) ja 0,55 g/ml (M8).

## 8 Tulosten tarkastelu

### 8.1 Bakterianalyysi

Bakterianalyysin perusteella näytteet N13 (mikrokiteinen selluloosa ja probioottiseos) ja N14 (dikalsiumfosfaatti ja probioottiseos) säilyttivät elävyyden melko tasaisena tutkimuksen ajan, ja niissä oli eniten eläviä soluja tutkimuksen lopussa (kuva 14). Näytteessä N12 (sorbitoli ja probioottiseos) oli kolmanneksi eniten eläviä soluja tutkimuksen loppuvaiheessa. Suuriin elävyydsprosentteihin saattaa vaikuttaa näytteissä käytetty maitohappobakteeriseos, sillä käytetyistä raaka-aineista B oli solumäärältään vahvempaa kuin A.

Näytteissä N6 ja N10 havaittiin myös selkeitä eroavaisuuksia mittauspisteiden välillä. Kuvasta 9 nähdään, että 1-pisteen mittauksessa näytteen N6 soluista noin 50 % on eläviä vaikka 0- ja 2-pisteessä elävyydsprosentti on noin 15 %. Solumäärän kasvu 0- ja

1-pisteen välillä voi johtua eksikaattorin pienemmästä kosteuspitoisuudesta tutkimuksen alussa. Näytteessä N10 elävyys oli alussa yli 55 %, mutta jo toisessa analyysissä melkein kaikki solut olivat kuolleet (kuva 13).

Maitohappobakteerien puhtasnäytteistä näytteessä R3347 (B) elävyys säilyi tutkimuksen ajan parhaiten, vaikka elävien solujen osuus laski yli 99 %:sta 42 %:iin (kuva 13). Puhtasnäytteiden, jotka sisälsivät vain raaka-ainetta R3346 (A), elävyysprosentti laski merkittävästi mittauspisteiden 0 ja 1 välillä olosuhteesta riippumatta (kuva 15).

Näytteissä N1–N5, N7–N9 ja N11 ei havaittu merkittävää muutosta elävyydessä mittauspisteiden välillä. Yli 80 % kyseisten näytteiden bakteerisolusta oli kuolleita jo ensimmäisen mittauksen jälkeen 0-pisteessä, mikä voi vaikuttaa 1- ja 2-pisteen tuloksiin.

Kaikkiin bakteerianalyysin mittaustuloksiin voi vaikuttaa muun muassa solujen vaurioituminen, mikä saattaa vääristää näytteiden elävien bakteerisolujen määrää.

## 8.2 Infrapuna (IR) -kosteusanalyysi

Kosteusanalyysistä saatujen tulosten perusteella eksikaattorissa olleet näytteet N3, N6 ja N9 sekä olosuhdehuoneessa olleet näytteet N11–N13 adsorboivat kosteutta eniten (taulukko 4). Näytteessä N11 (dekstriini ja A) voidaan havaita suurin muutos 0- ja 2-pisteiden välillä. Näytteiden N1, N2 ja N10 kosteuspitoisuus kasvaa mittausten välillä, mutta kasvu ei ole niin merkittävää. Osalla näytteistä, kuten N4–N6 ja N10, on jo alussa korkeampi kosteuspitoisuus, apuaineen sisältämän veden takia. Tämän vuoksi ero 2-pisteen mittauksiin ei ole niin suuri. Adsorptioon voi vaikuttaa myös käytetyn apuaineen partikkelikoko.

## 8.3 Lähi-infrapunaspektroskopia (NIRS)

NIR-spektrissä veden absorptio näkyy mahdollisena piikkinä aallonpituusalueella 1900–2000 nm. Suurimmat piikit havaittiin näytteissä N3, N6, N12, R3347, R3080 (20,1 °C / 75,8 %RH), R3346 (25,0 °C / 63,0 %RH) ja R3346 (20,1 °C / 75,8 %RH). Näytteet N3, N6, R3080 (20,1 °C / 75,8 %RH) ja R3346 (20,1 °C / 75,8 %RH) olivat

tutkimuksen ajan korkeimmassa suhteellisessa kosteuspitoisuudessa, minkä takia kosteuspiikeissä havaittiin kasvua mittausten välillä. Kuvasta 16 nähdään miten näytteen N3 vesipiikki kasvaa tasaisesti ajan kuluessa. Näytteissä N6 (kuva 17) ja N12 (kuva 18) kosteuden absorptio on ollut suurinta pisteiden 0 ja 1 välillä, minkä jälkeen absorptio on hidastunut.

Maitohappobakteerien puhdasnäytteistä näytteillä R3346 (kuvat 19 ja 20) ja R3347 (kuva 11) kosteus lisääntyi merkittävästi 0- ja 1-pisteen välillä. Tämä voi johtua maissitärkkelyksestä, joka toimii kantoaineena kyseisissä raaka-aineissa. Apuaineista sorbitoli (R3080) absorboi eniten kosteutta tutkimuksen aikana (kuva 22).

Näytteiden N2, N5, N9, N11, N13, N20108, R625 (25,0 °C / 63,0 % ja 20,1 °C / 75,8 %), R3333 (20,1 °C / 75,8 %) ja R3346 (21,0 °C / 14,4 %) NIR-kuvaajissa havaittiin pieni muutos 0- ja 1-pisteen välillä (liite 1). 1- ja 2-pisteen välillä kosteuspiikki pysyi kuitenkin lähes samana. Näytteiden N1, N4, N7, N8, N10, N14, R3080 (21,0 °C / 14,4 % ja 25,0 °C / 63,0 %), R625 (21,0 °C / 14,4 %), R3333 (21,0 °C / 14,4 % ja 25,0 °C / 63,0 %) ja R138 NIR-kuvaajissa ei havaittu merkittävää muutosta eri mittauspisteiden välillä (liite 1).

#### 8.4 Vesiaktiivisuusmittaus ( $a_w$ )

Taulukosta 5 havaitaan, että laboratorio-olosuhteissa säilytettyjen näytteiden  $a_w$ -arvoissa ei esiinny suurta vaihtelua. Tähän vaikuttaa oleellisesti laboratorion matala suhteellinen kosteus tarkkailun aikana (1–35 %RH). Suurimmat vaihtelut veden aktiivisuudessa voidaan havaita näytteillä N2, N3, N6, N9, N12, R3080 (20,1 °C / 75,8 %RH), R625 (20,1 °C / 75,8 %RH) ja R3333 (20,1 °C / 75,8 %RH). Suurinta osaa näistä näytteistä säilytettiin eksikaattorissa tarkkailun aikana, mikä selittää suuret vaihtelut arvoissa 0- ja 2-pisteen välillä. Lopuissa näytteissä veden aktiivisuus kaksinkertaistui säilytyksen aikana. Poikkeuksina olosuhdehuoneessa säilytetyt näytteet R3333 ja R138, joiden veden aktiivisuus pysyi suunnilleen samana koko tutkimuksen ajan.

## 8.5 Painon vaihtelu

Kapseleiden alkupainojen vaihtelut eri koostumusten välillä johtuivat kyseisessä näytteessä käytetyn apuaineen partikkelikoosta sekä tiheydestä. Suurin painon vaihtelu on tapahtunut näytteessä N7 (taulukko 7). Näytteissä N1, N2, N5, N8 ja N10–N14 kapseleiden sisällön paino on noussut mittauspisteiden 0 ja 1 välillä, mutta tasaantunut ennen 2-pisteen mittauksia. Näytteissä N3, N6 ja N9 voidaan havaita merkittävää kasvua painossa mittauspisteiden 0 ja 2 välillä. Tämä voi johtua säilytysolosuhteiden korkeasta suhteellisesta kosteudesta. Näytteen N4 painossa ei ole havaittavissa suurta vaihtelua. Tutkimuksessa käytetyt apuaineet olisi voinut kuivata uunissa ennen kapselointia, jolloin jäännöskosteus olisi saatu haihdutettua ja näin painon vaihtelussa olisi voitu havaita suurempia muutoksia.

## 9 Yhteenveto

Tutkimuksessa haluttiin selvittää, minkä apuaineen avulla probioottivalmiste pysyy stabiilina muuttuvissa olosuhteissa. Olosuhteet valittiin kuvastamaan tuotanto-olosuhteita sekä olosuhteita, joissa kuluttaja todennäköisesti säilyttää valmista tuotetta. Näihin olosuhteisiin vaikuttaa esimerkiksi vuodenaika. Työssä valmistettiin kahdeksan eri jauhemassaa, jotka kapseloitiin ja asetettiin olosuhteisiin kahden kuukauden ajaksi. Olosuhteita oli kolme ja ne poikkesivat toisistaan lähinnä suhteellisen kosteuden osalta. Kyseisiin olosuhteisiin asetettiin myös puhdasnäytteet käytetyistä raaka-aineista. Kapselinäytteille suoritettiin bakteerianalyysi sekä NIR-, IR- ja  $a_w$ -mittaukset tutkimuksen alussa, puolivälissä sekä lopussa. Puhtaille apuaineille suoritettiin NIR- ja  $a_w$ -mittaukset. Puhtaille maitohappobakteerinäytteille suoritettiin bakteerianalyysi sekä NIR-mittaus.

Tutkimuksen perusteella voidaan havaita, että kosteuspitoisuus näytteissä kasvaa eniten ensimmäisen kuukauden aikana, minkä jälkeen kasvu hidastuu. Bakteerianalyysin perusteella on vaikea todeta, kuinka paljon kosteuspitoisuuden nousu

vaikuttaa probioottien elävyyteen, sillä suurimmassa osassa näytteistä bakteerisolujen kuolleisuus oli suurta jo 0-pisteessä. Tuloksista voidaan havaita myös, että probioottien elävyys oli korkeampi silloin, kun käytettiin kahden probiootin seosta. Korkea kosteuspitoisuus heikentää sorbitolin sekä maitohappobakteereiden kantoaineen stabiiliutta. Tämä johtuu siitä, että sorbitoli on hygroskooppinen sokerialkoholi, joka pidättää kosteutta itseensä. Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella kapselin sisältö pysyy koostumukseltaan stabiilimpana, kun apuaineena käytetään mikrokiteistä selluloosaa tai dikalsiumfosfaattia. Tähän vaikuttaa apuaineiden hygroskooppisuus. Glukoosi ja dekstriini pysyvät kosteuden osalta stabiileina, mutta bakteerianalyysin perusteella elävyyssprosentti ei ollut kovin korkea. Valmistusolosuhteiden kosteuspitoisuus tulisi olla matala, mutta liian kuivat olosuhteetkin voivat olla haitallisia solujen aineenvaihdunnalle. Liian kuivat olosuhteet voivat vaikuttaa myös kapselointiprosessiin, jolloin jauhe voi leijaila ilmassa ja sitä on vaikeampi hallita.

Tutkimusta voisi jatkaa suorittamalla samat mittaukset kuuden kuukauden ja vuoden kuluttua ensimmäisistä mittauksista, sillä säilyvyyskokeet ovat yleensä paljon pidempiä. Näin saataisiin luotettavampaa tietoa probioottien stabiiliudesta pidemmältä aikaväliltä. NIR-mittausta voisi käyttää probioottivalmisteiden valmistusprosessissa tulevaisuudessa kosteuden seurannassa, sillä liian korkea kosteuspitoisuus voi vaikuttaa bakteerisolujen elävyyteen epäedullisesti.

## Lähteet

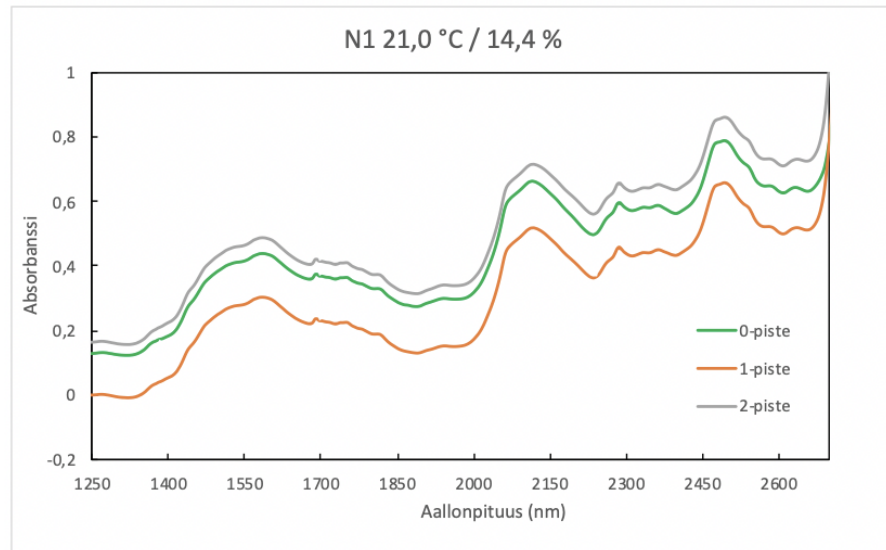
- 1 Yritys. Verkkoaineisto. Pharmia Oy. <<https://pharmia.fi/yritys/>>. Luettu 4.3.2021.
- 2 Pharmia Company Presentation. 2021. Yrityksen sisäinen dokumentti. Pharmia Oy.
- 3 Havenaar, Robert; Ten Brink, Bart & Huis In 't Veld, Jos H. J. 1992. Verkkoaineisto. Selection of strains for probiotic use. Springer, Dordrecht. <[https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-011-2364-8\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-011-2364-8_9)>. Luettu 3.2.2021.
- 4 Petraitytė, Sigita & Šipailienė, Aušra. 2018. Enhancing encapsulation efficiency of alginate capsules containing lactic acid bacteria by using different divalent cross-linkers sources. *LWT - Food Science and Technology*, s. 307–315. Elsevier Ltd.
- 5 G.J Schaafsma & LABIP Workshop participants. 1998. *International Journal of Food Microbiology* 39, s. 237–238.
- 6 Lahtinen, Sampo; Ouwehand, Arthur C.; Salminen, Seppo; Wright, Atte von. 2012. *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. CRC Press. Taylor & Francis Group.
- 7 Saarela, Maria. 2007. Methods to improve the viability and stability of probiotics. *Teoksessa Functional Dairy Products*. Vol. 2, s. 391–403. VTT Biotechnology. Woodhead Publishing.
- 8 Ahn, C.; Fremaux, C.; Milton, K. & Klaenhammer, T.R. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Molecular Biology of Bacteriocins Produced by Lactobacillus*, s. 151–180.
- 9 Calasso, M. & Gobbetti, M. 2011. Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. Academic Press.
- 10 Feiner, Gerhard. 2006. The microbiology of specific bacteria. *Meat Products Handbook*. Woodhead Publishing.
- 11 Hoover, D.G. 2014. Bifidobacterium. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. Academic Press.
- 12 Roy, D. 2011. Agricultural and Related Biotechnologies. *Comprehensive Biotechnology*. 2nd ed, s. 591–602. Pergamon.



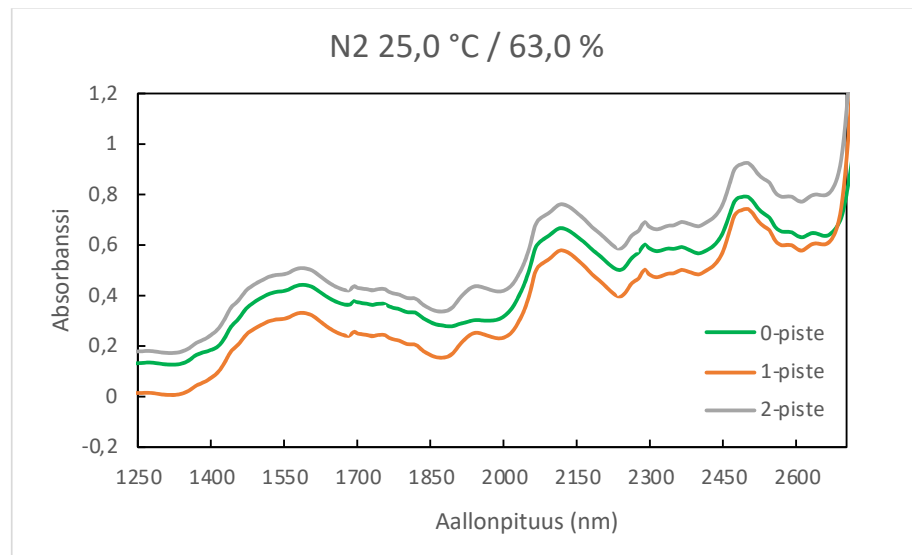
- 13 Virtaussytometrin analyysikuvaus. 2018. Yrityksen sisäinen dokumentti. Pharmia Oy.
- 14 Prajapati, Jashbhai B. & Sreeja, V. 2013. Probiotic Formulations: Application and Status as Pharmaceuticals—A Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Vol. 5, s. 81–91.
- 15 Ilkka, Jukka; Juslin, Markku; Marvola, Martti; Paronen, Petteri; Turakka, Liisa & Urtti, Arto. 1990. Kapselointi. *Farmasian teknologia*. Kuopio: FOY Fortis ry.
- 16 Rowe, Raymond C.; Sheskey, Paul J. & Quinn, Marian E. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. London: RPS Publishing.
- 17 Product data sheet CRYSTAL TEX. Verkkoaineisto. Ingredion. <[https://emea.ingredion.com/content/dam/ingredion/technical-documents/emea/CRYSTAL\\_TEX\\_626\\_EN.pdf](https://emea.ingredion.com/content/dam/ingredion/technical-documents/emea/CRYSTAL_TEX_626_EN.pdf)>. Luettu 14.2.2021.
- 18 Biyani, Milind K. 2017. Choosing Capsules: A Primer. *Pharmaceutical Technology*. Vol. 41, No. 10, s. 36–41.
- 19 General information concerning moisture analysis. 2016. Operating instructions electronic moisture analyser. KERN & Sohn GmbH.
- 20 Nousiainen, Juha & Sipilä, Anna. 2006. NIRS-tekniikka nurmirehun laadun arvioinnissa. Verkkoaineisto. Suomen Nurmijhdistyksen ja MTT:n julkaisusarja. <[http://www.nurmijhdistys.fi/Nurmitieto/NT\\_4-2-2.pdf](http://www.nurmijhdistys.fi/Nurmitieto/NT_4-2-2.pdf)>. Luettu 22.2.2021.
- 21 Manual. 2018. AQUALAB 4. METER Group, Inc. USA.
- 22 InfraQuant-käyttöohje. 2014. Yrityksen sisäinen materiaali. Pharmia Oy.
- 23 Bulk Density and Tapped Density of Powders. 2019. *European Pharmacopoeia* 9.7 ed. EDQM Publications.

## Näytteiden NIR-spektrit

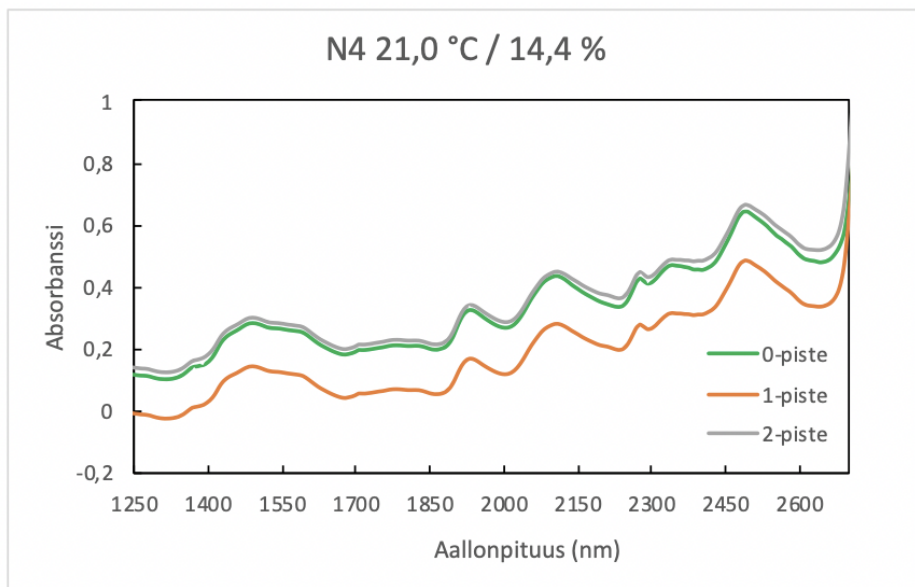
Näytteiden N1, N2, N4, N5, N7–N11, N13 ja N14 sekä raaka-aineiden R3346, R3080, R3333, R625, N20108 ja R138 NIR-kuvaajat.



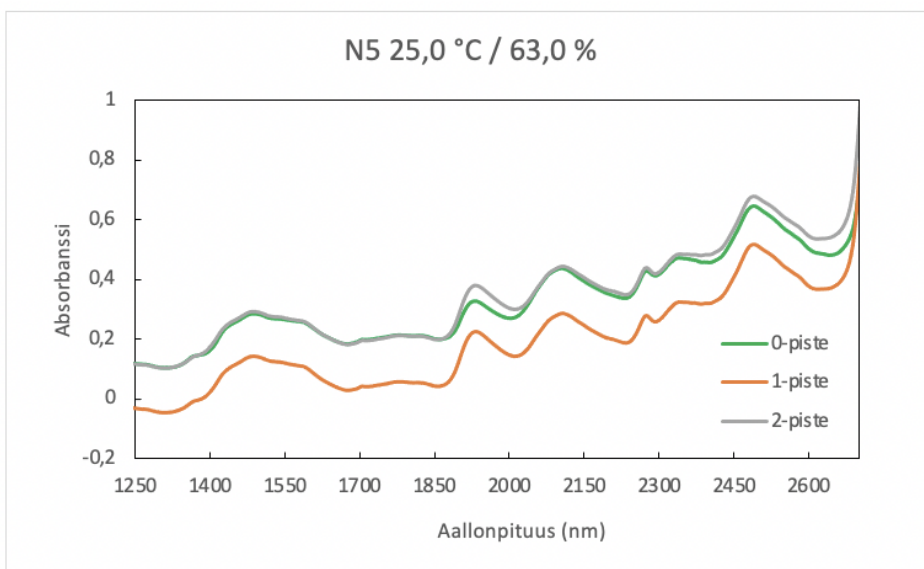
Kuva 23. Näytteen N1 (A ja sorbitoli) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



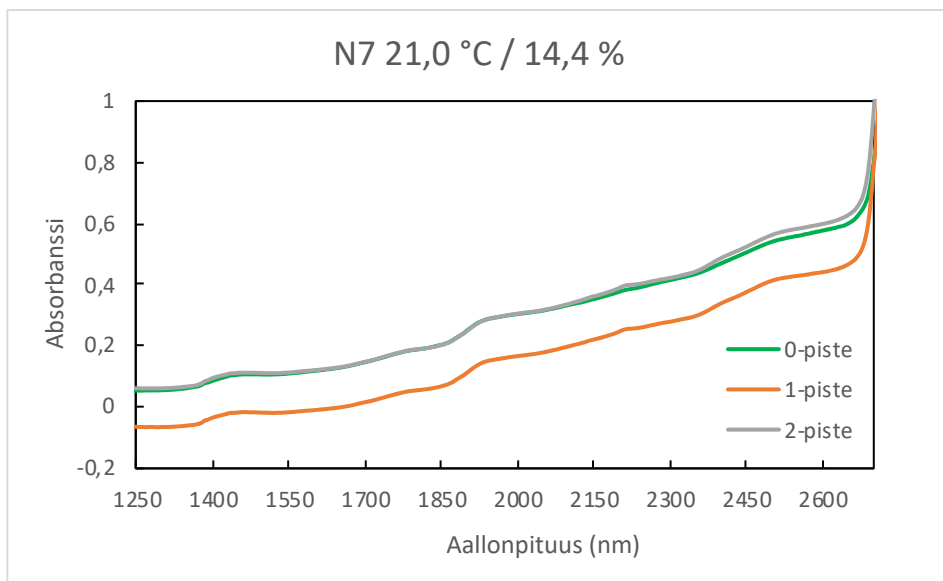
Kuva 24. Näytteen N2 (A ja sorbitoli) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



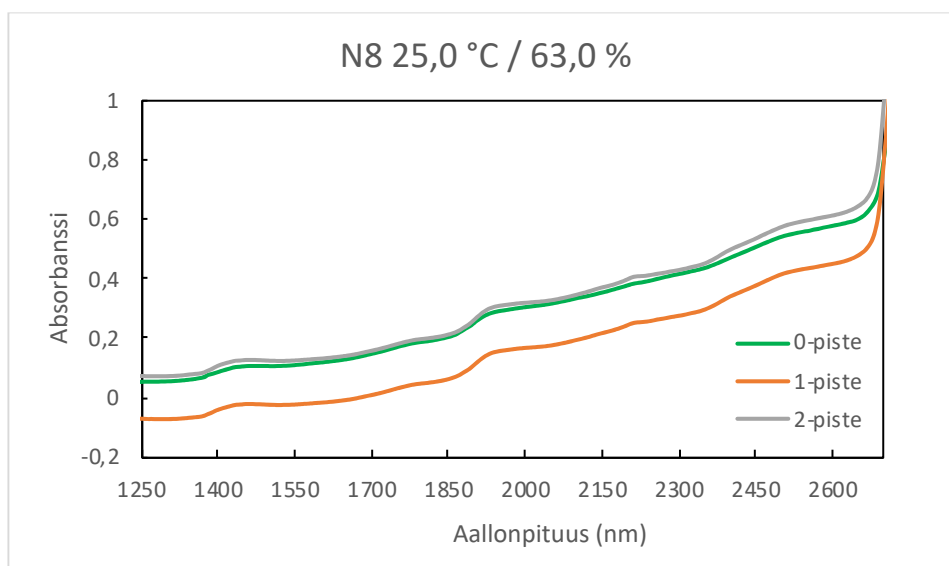
Kuva 25. Näytteen N4 (A ja mikrokiteinen selluloosa) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



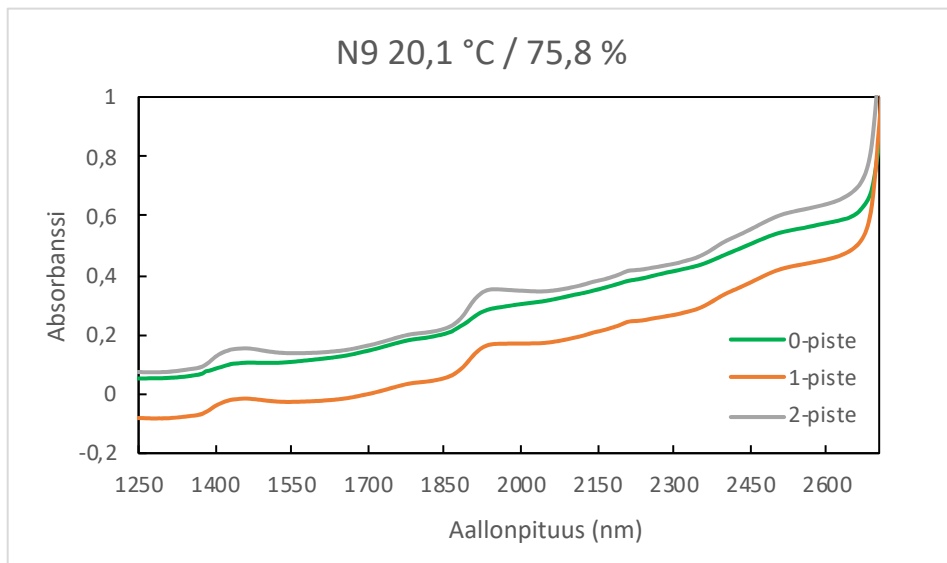
Kuva 26. Näytteen N5 (A ja mikrokiteinen selluloosa) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



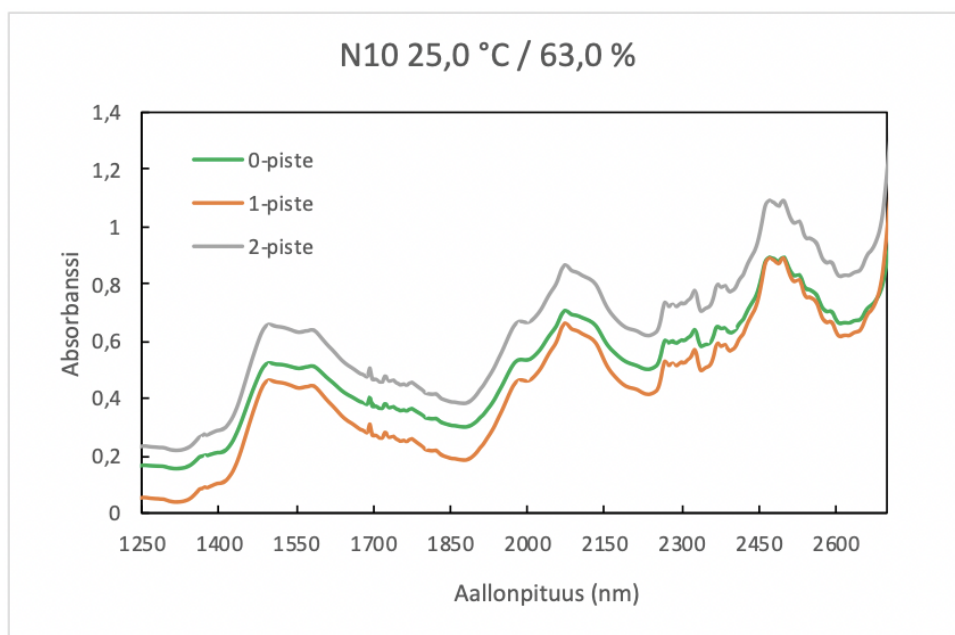
Kuva 27. Näytteen N7 (A ja dikalsiumfosfaatti) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



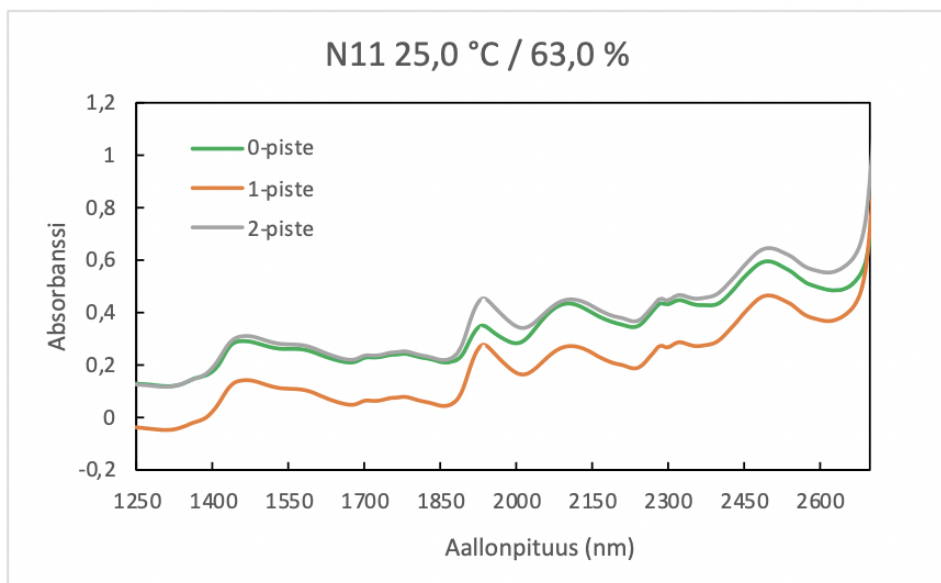
Kuva 28. Näytteen N8 (A ja dikalsiumfosfaatti) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



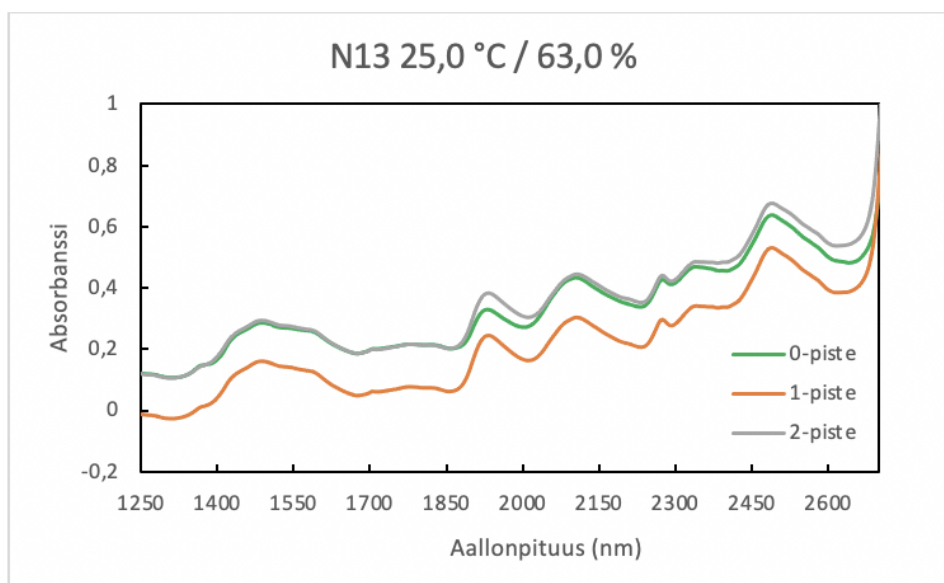
Kuva 29. Näytteen N9 (A ja dikalsiumfosfaatti) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



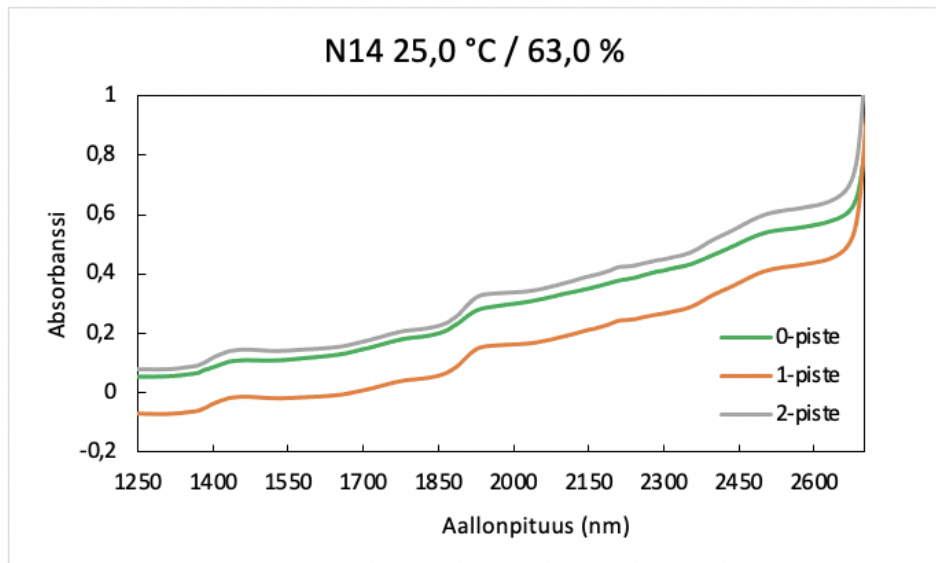
Kuva 30. Näytteen N10 (A ja glukoosi) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



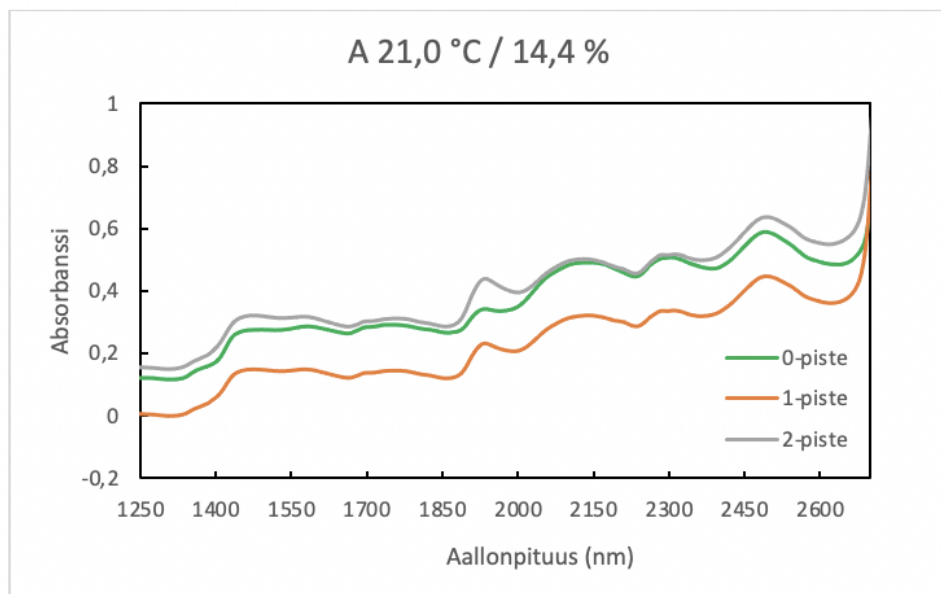
Kuva 31. Näytteen N11 (A ja dekstriini) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



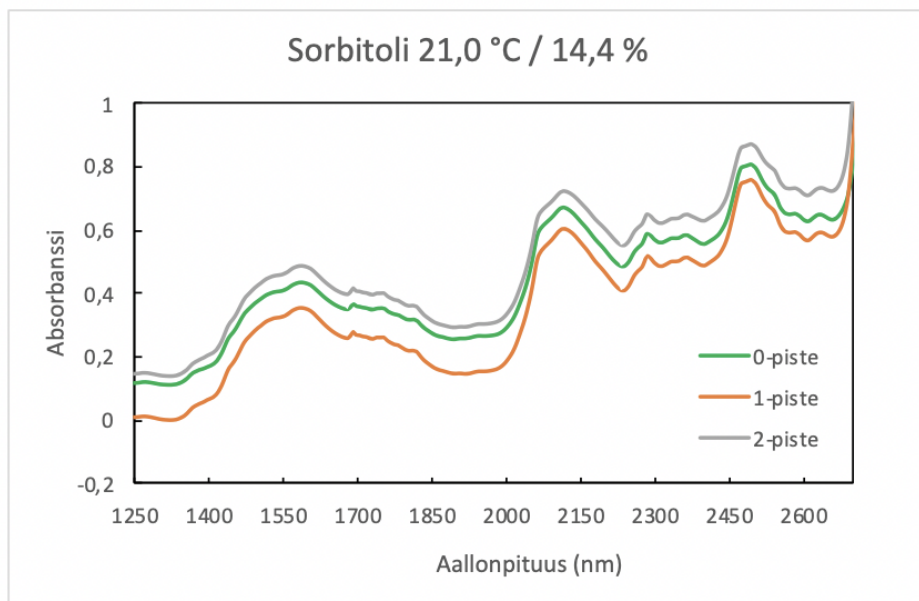
Kuva 32. Näytteen N13 (probioottiseos ja mikrokiteinen selluloosa) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



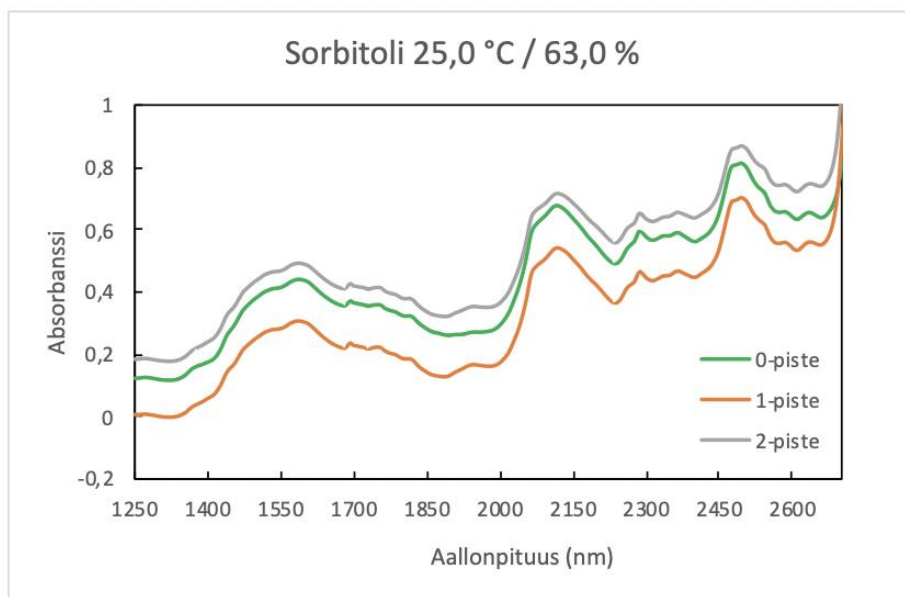
Kuva 33. Näytteen N14 (probioottiseos ja dikalsiumfosfaatti) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



Kuva 34. Laboratorio-olosuhteessa säilytetyn A:n (R3346) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

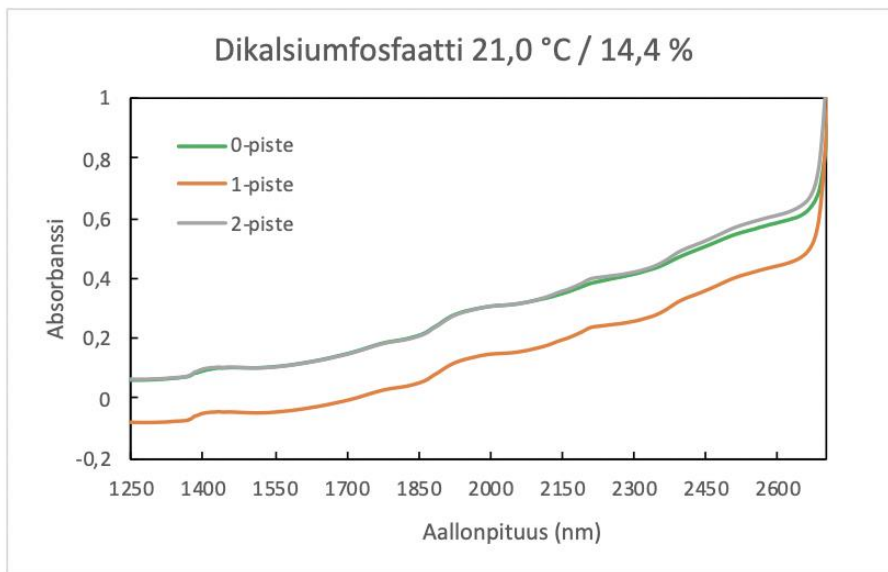


Kuva 35. Laboratorio-olosuhteessa säilytetyn sorbitolin (R3080) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

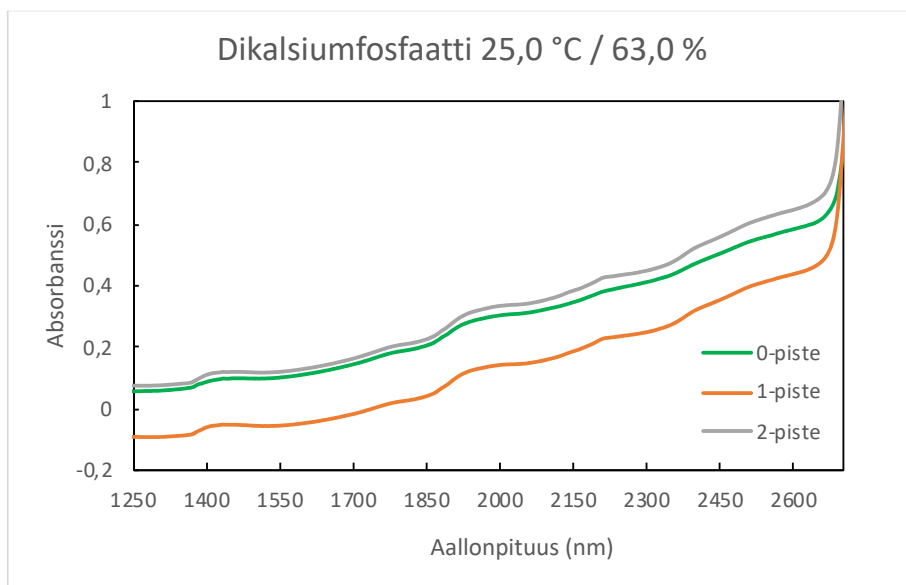


Kuva 36. Olosuhdehuoneessa säilytetyn sorbitolin (R3080) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä

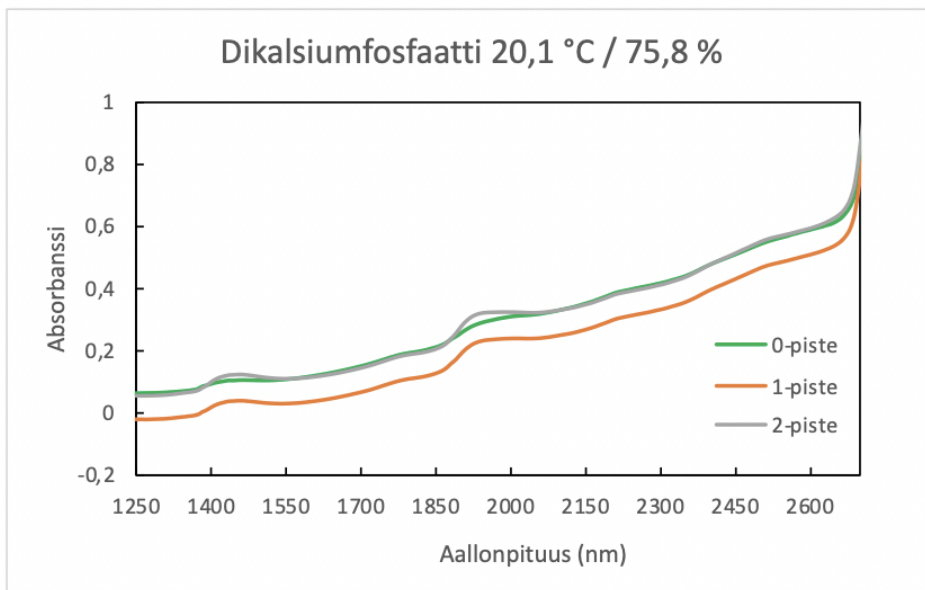




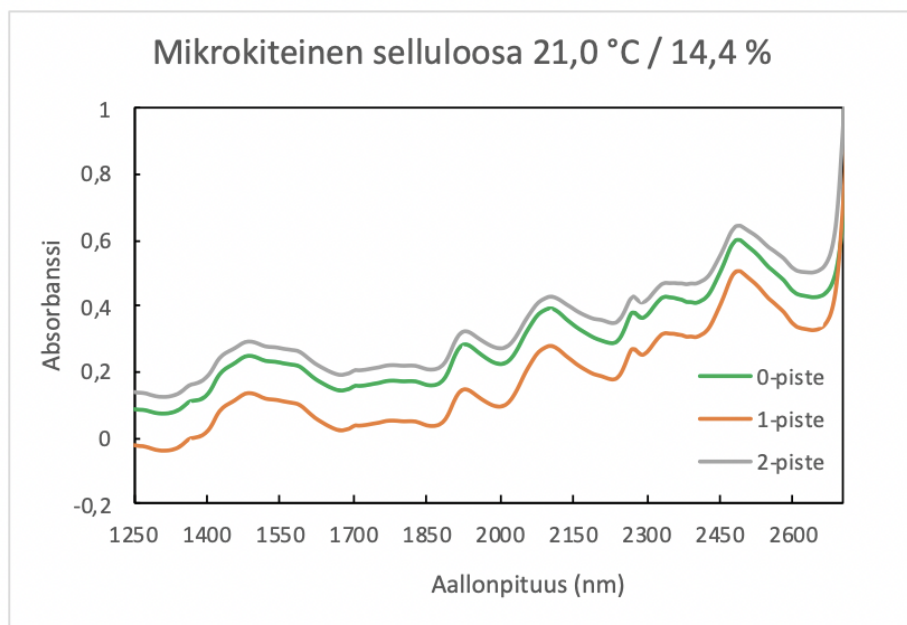
Kuva 37. Laboratorio-olosuhteessa säilytetyn dikalsiumfosfaatin (R3333) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



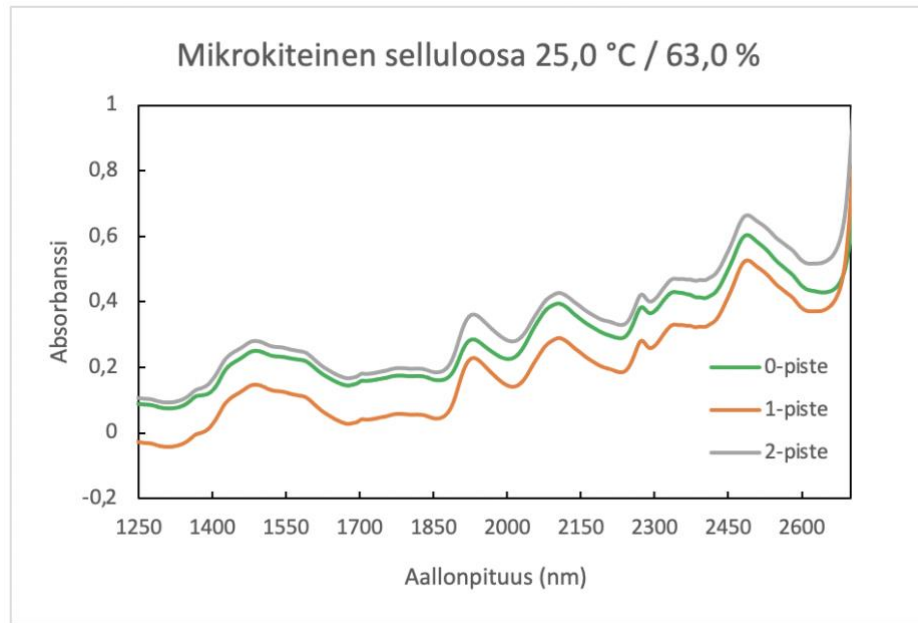
Kuva 38. Olosuhdehuoneessa säilytetyn dikalsiumfosfaatin (R3333) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



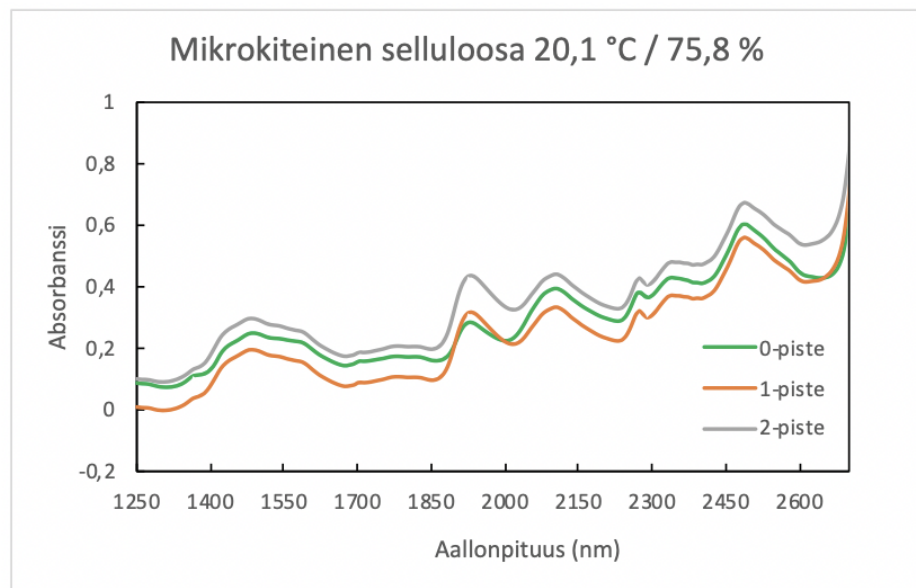
Kuva 39. Eksikaattorissa säilytetyn dikalsiumfosfaatin (R3333) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



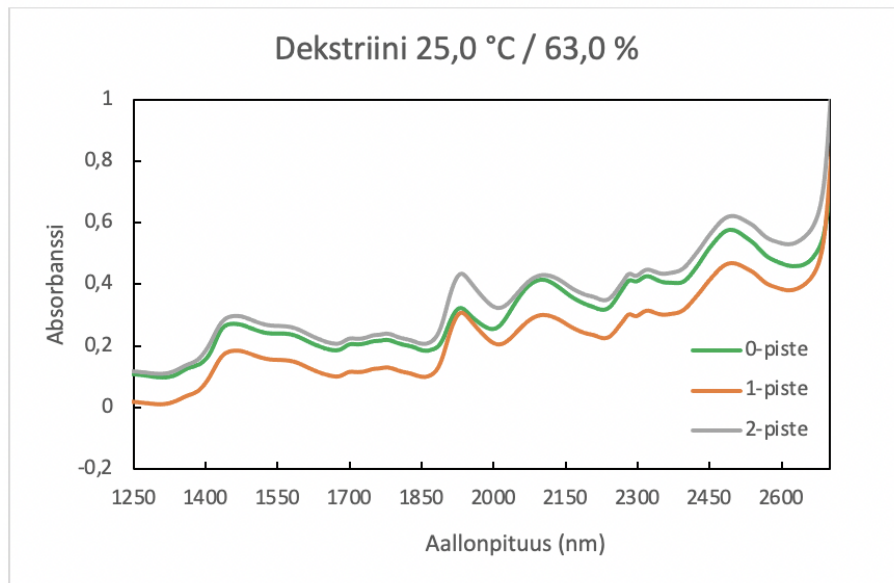
Kuva 40. Laboratorio-olosuhteessa säilytetyn mikrokiteisen selluloosan (R625) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



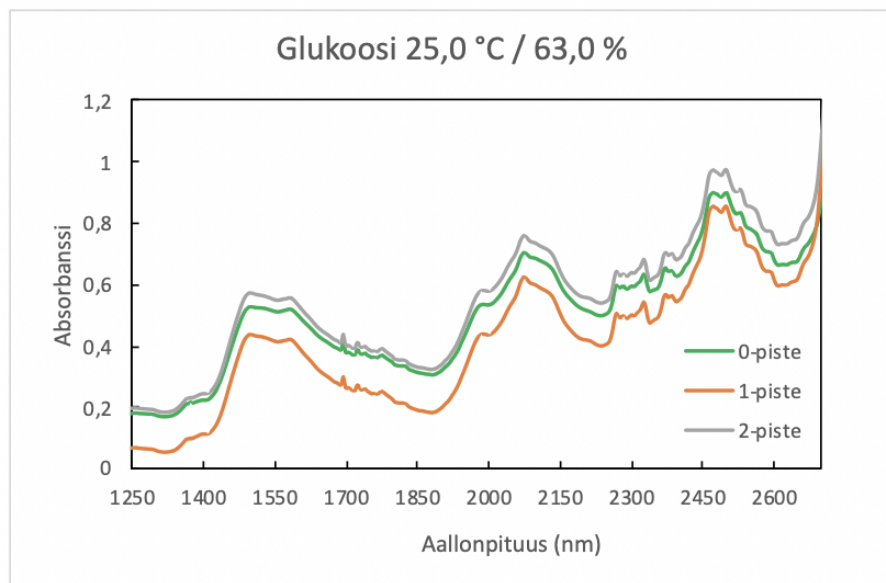
Kuva 41. Olosuhdehuoneessa säilytetyn mikrokiteisen selluloosan (R625) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



Kuva 42. Eksikaattorissa säilytetyn mikrokiteisen selluloosan (R625) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



Kuva 43. Olosuhdehuoneessa säilytetyn dekstriinin (N20108) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä



Kuva 44. Olosuhdehuoneessa säilytetyn glukoosin (R138) NIR-spektrin käyrät 0-, 1- ja 2-pisteessä