

ISSN 0355-1180

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

EKT-sarja 1558

IDÄTYKSEN JA FERMENTOINNIN VAIKUTUKSET SINILUPIININ
FOLAATTEIHIN

Noora Mäkelä

Helsinki 2012

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty		Laitos — Institution — Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Noora Mäkelä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Idätyksen ja fermentoinnin vaikutukset sinilupiinin folaatteihin			
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarvikekemia			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterin tutkielma		Aika — Datum — Month and year Toukokuu 2012	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 84
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Folaatti on vesiliukoinen B-vitamiinien ryhmään kuuluva vitamiini. Folaatin tärkein tehtävä elimistössä on osallistua C1-metaboliareaktioihin, ja folaatin puutos voi johtaa muun muassa megaloplastiseen anemiaan, sikiön hermostopotken sulkeutumishäiriöihin ja sydän- ja verisuonitauteihin. Suomessa elintarvikkeiden täydentäminen folaateilla ei ole pakollista, mutta folaattien saanti on kuitenkin liian vähäistä. Aiempien tutkimusten perusteella sinilupiini (<i>Lupinus angustifolius</i>) vaikuttaisi olevan hyvä folaatin lähde, ja etenkin Haags Blaue -sinilupiinilajikkeen on myös havaittu soveltuvan hyvin Suomen viljelyolosuhteisiin. Tutkimuksessa tavoitteena oli tutkia, voitaisiinko sinilupiinin folaattipitoisuutta suurentaa ennestään idätyksen ja fermentoinnin avulla. Lisäksi tarkoituksena oli tutkia kyseisten prosessointimenetelmien vaikutuksia sinilupiinin folaattivitameerijakaumaan, jotta saataisiin selville, ovatko prosessoinnin myötä muodostuvat folaatit stabiileja.</p> <p>Idätykskoikeita tehtiin yhteensä kolme. Kahdessa kokeessa siemenet liotettiin vedessä ennen varsinaista idätystä ja yhdessä kokeessa liotus tehtiin maitohappoliuoksessa. Idätyksen kesto oli neljä tai viisi vuorokautta, ja näytteet kerättiin päivittäin. Fermentointikoe tehtiin sekä kuorituista lupiinin siemenistä tehdyille jauholle että kaksi vuorokautta idätetyistä, kuorituista siemenistä tehdyille jauholle. Kummallakin matriisilla tutkittiin folaattien tuottoa kahdella eri mikrobilla, joita olivat <i>Streptococcus thermophilus</i> ja <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Fermentointi <i>S. cerevisiae</i> -hiivalla tehtiin lisäksi sekä glukoosilisällä että ilman lisättyä glukoosia. Fermentointikokeista otettiin näytteet aikapisteissä 0 h ja 24 h. Kokonaisfolaattipitoisuudet määritettiin mikrobiologisella menetelmällä ja vitameerijakaumat erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografiamenetelmällä (UPLC).</p> <p>Idätyksellä saatiin parhaimmillaan 2-kertaistettua kuoritun siemenen folaattipitoisuus. Idätettyjen kuorittujen siementen folaateista 77–88 % oli 5-metyylitetrahydrofolaattia, joka on verrattain stabiili vitameeri. Idättämättömässä ydinjauhossa kyseisen vitameerin osuus oli noin 60 %, joten osuus suurentui idätyksen myötä. Samalla myös hyvin epästabiilin tetrahydrofolaatin osuus pienentyi. <i>S. thermophilus</i> ei tuottanut folaattia lupiinijauhoihin. Hiivafermentoinnilla saatiin 1,8-kertaistettua glukoosilisällisen idättämättömän jauhon folaattipitoisuus verrattaessa kyseisen näytteen aikapisteiden 0 h ja 24 h folaattipitoisuuksia. Idätetty jauho puolestaan oli sellaisenaan riittävän ravinteikas kasvualusta hiivalle.</p> <p>Idätyksellä saatiin selvästi suurennettua lupiinin siementen folaattipitoisuutta ja suuri osa muodostuneista folaateista oli stabiileja vitameerejä. Stabiilien vitameerien muodostuminen on elintarvikekäytön kannalta olennaista, joten siltäkin osin idätys on lupaava prosessointimenetelmä. Fermentointikokeen perusteella <i>S. cerevisiae</i> vaikuttaisi lupaavalta folaattia lupiinijauhoon tuottavalta mikrobilta. Kuitenkin fermentointikoe tulisi toistaa ja suorittaa steriloidulla jauholla, jotta <i>S. cerevisiae</i> -hiivan todellista folaatin tuottoa voitaisiin tutkia.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Folaatti, lupiini, palkokasvi, idätys, fermentointi			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikin tiedekirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-sarja 1558			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä — Författare — Author Noora Mäkelä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Effects of germination and fermentation on folates of blue lupin			
Oppiaine — Läroämne — Subject Food Chemistry			
Työn laji — Arbetets art — Level M. Sc. Thesis		Aika — Datum — Month and year May 2012	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 84
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Folate is a water-soluble vitamin that belongs to the vitamin B group. The most important function of folate is to participate in C1 metabolism, and folate deficiency can lead to megaloblastic anaemia, neural-tube defects or coronary diseases. In Finland the folate fortification of food products is not mandatory and the intake of folate is still too low. Based on previous studies, blue lupin (<i>Lupinus angustifolius</i>) seems to be a good source of folate, especially the Haags Blaue variety, which has shown to be suitable for cultivation under Finnish environmental conditions. The aim of this research was to study if the folate concentration of blue lupin could be increased with germination and fermentation. In addition, the purpose was to examine how these bioprocessing methods would affect vitamer distribution of folates.</p> <p>Three germination experiments were performed, two with seeds that were soaked overnight in water and one with seeds that were soaked in lactic acid solution. The duration was four or five days and the samples were collected daily. The fermentation experiment was performed with kernel flour from non-germinated seeds and kernel flour from seeds that were germinated for two days. The synthesis of folate was studied using two microbes: <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. The fermentation with <i>S. cerevisiae</i> yeast was made both with and without glucose addition. Samples were taken at 0 and 24 h. Total folate concentrations of samples were analysed with a microbiological method and the vitamers were analysed with an ultra-high-performance liquid chromatography method (UPLC).</p> <p>The folate concentration of seeds increased 2-fold by germination. The proportion of 5-methyltetrahydrofolate increased significantly during germination, from 60 % in non-germinated kernel flour to 77–88 % in germinated dehulled seeds. <i>S. thermophilus</i> did not produce folates in lupin flours. The folate content of non-germinated flour was increased 1.8-fold by yeast fermentation between 0 and 24 h, and yeast needed the glucose addition. However, glucose addition did not have an impact on folate concentrations of kernel flour from germinated seeds.</p> <p>Germination significantly increased the folate content of lupin seeds, and the greatest proportion of folates were stable vitamers. Stability of vitamers is important for the folates of food products thus germination of lupin seeds appears to be an interesting processing method. On the basis of the fermentation experiment, <i>S. cerevisiae</i> is a promising folate producing microbe when using lupin flour as a matrix. The fermentation experiment should still be repeated and performed using sterilised flour so that the actual production of folate by <i>S. cerevisiae</i> could be studied.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Folate, lupin, legume, pulse, germination, fermentation			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikki Science Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT Series 1558			

ESIPUHE

Tein maisterin tutkielmani Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella elintarvikekemian osastolla. Tutkimus oli osa Viikin kampuksen eri tutkimusalojen kanssa yhteistyössä toteutettavaa *Grain legume quality for food purposes* -hanketta. Tutkimuksen rahoittajana toimi Raisio Oyj:n Tutkimussäätiö, ja työn pääohjaajana toimi tutkijatohtori Susanna Kariluoto.

Suuri kiitos etenkin Susanna Kariluodolle ja professori Vieno Piiroselle neuvoista käytännön osuutta tehdessäni ja avusta maisterin tutkielman tarkistamisessa. Haluan osoittaa heille myös kiitollisuuteni rakentavista kommenteista sekä kokeellista osaa että kirjoitustyötä tehdessäni. Lisäksi haluan kiittää elintarvikekemian osaston henkilökuntaa mukavasta ja kannustavasta ilmapiiristä. Kanssanne oli ilo työskennellä.

Helsingissä toukokuussa 2012

Noora Mäkelä

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ESIPUHE.....	4
SISÄLLYSLUETTELO	5
1 JOHDANTO.....	7
2 KIRJALLISUUSOSA	9
2.1 FOLAATIT.....	9
2.1.1 Rakenne	9
2.1.2 Biosynteesi	13
2.1.3 Hyväksikäytettävyys.....	16
2.1.4 Tehtävät elimistössä, tarve ja puutosoireet.....	18
2.2 PALKOKASVIT	20
2.2.1 Yleistä palkokasveista	20
2.2.2 Palkokasvien elintarvikekäytön hyödyt.....	21
2.2.3 Lupiini	23
2.3 FOLAATIT PALKOKASVEISSA	24
2.3.1 Folaattipitoisuudet	24
2.3.2 Prosessoinnin aiheuttama folaatin hävikki	27
2.3.3 Folaatin rikastus.....	28
2.4 FOLAATTIEN MÄÄRITTÄMINEN PALKOKASVEISTA	30
2.4.1 Esikäsittelyt	30
2.4.2 Folaattipitoisuuden määrittäminen	32
3 KOKEELLINEN TUTKIMUS	34
3.1 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET	34
3.2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	35
3.2.1 Käytetyt reagenssit, standardit ja laitteet.....	35
3.2.2 Näytteet ja koeasetelma	37
3.2.3 Kuiva-ainemääritykset.....	38
3.2.4 Bioprosessoimattomat lupiinin siemenet.....	38
3.2.5 Lupiinin idätys.....	40
3.2.6 Lupiinin fermentointi.....	41

3.2.7 Kokonaisfolaattipitoisuuden määrittäminen mikrobiologisesti.....	43
3.2.8 Folaattien vitameerijakauman määrittäminen nestekromatografisesti	47
3.2.9 Laadunvarmistus.....	50
3.3 TULOKSET	51
3.3.1 Bioprosessoimattomien lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet	51
3.3.2 Idätettyjen lupiinin siementen ja itujen kokonaisfolaattipitoisuudet.....	52
3.3.3 Fermentoitujen lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet.....	54
3.3.4 Bioprosessoimattomien lupiininsiemenjauhojen vitameerijakaumat	56
3.3.5 Idätettyjen lupiinin siementen folaattien vitameerijakaumat.....	58
3.4 POHDINTA.....	62
3.4.1 Bioprosessoimattomien lupiinin siementen folaatit	62
3.4.2 Idätyksen vaikutukset folaatteihin	65
3.4.3 Fermentoinnin vaikutukset kokonaisfolaattipitoisuuksiin.....	69
4 PÄÄTELMÄT	73
5 KIRJALLISUUSLÄHTEET	75
LIITE 1 Vitameerien injektioinnit standardisuoraa varten.....	80
LIITE 2 Idätettyjen lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet.....	81
LIITE 3 Fermentoitujen lupiinijauhojen kokonaisfolaattipitoisuudet	82
LIITE 4 Lupiinijauhojen vitameerijakaumat	83
LIITE 5 Idätysnäytteiden vitameerijakaumat	84

1 JOHDANTO

Folaatti löydettiin hiivasta vuonna 1931, mutta vasta myöhemmin folaateiksi käsitettiin kaikki foolihapon johdannaiset (Han ja Tyler 2003). Folaatti on vesiliukoinen yhdiste, joka kuuluu B-vitamiinien ryhmään, ja se voi esiintyä eri vitameerimuodoissa (Gregory 2008). Kasvit, homeet ja bakteerit voivat syntetisoida folaattia, ja useat kasvikunnan tuotteet ovatkin tärkeitä folaatin riittävän saannin kannalta (Cossins 2000). Eläimillä ei ole folaatin biosynteesiin tarvittavia entsyymejä, eivätkä ne näin ollen voi tuottaa näitä normaaliin kasvuun ja kehitykseen tarvittavia yhdisteitä.

Folaatti osallistuu C1-metaboliareaktioihin kuljettaen yksihiilisiä yksiköitä (Cossins 2000). Kyseisiä reaktioita tarvitaan muun muassa puriinien, pantotenaatin, tymidylaatin ja metioniinin muodostukseen, ja lisäksi reaktioita tarvitaan nukleiinihappojen ja aminohappojen syntetisointiin (Scott ym. 2000; Jabrin ym. 2003). Näin ollen folaatin puute voi vaikuttaa solujen kykyyn tuottaa DNA:ta, RNA:ta ja välttämättömiä aminohappoja. Folaatin puutos lisää megaloblastisen anemian, hermostoputken sulkeutumishäiriön ja sydän- ja verisuonisairauksien riskiä (Koehler ym. 1997). Etenkin raskaana oleville naisille suositellaan foolihappolisää, sillä useimmissa tapauksissa hermostoputken sulkeutumishäiriöt voidaan välttää takaamalla folaatin riittävä saanti (Czeizel ja Dudas 1992). Lisäksi folaattia tarvitaan muun muassa seerumin homokysteiinin muuttamiseksi metioniiniksi (Selhub ym. 2010). Seerumin homokysteiinipitoisuuden on havaittu suurentavan joidenkin sydän- ja verisuonitautien riskiä, joten riittävän folaatin saannin avulla voidaan ehkäistä näitä sairauksia (Koehler ym. 1997).

Kestävän kehityksen näkökulmasta elintarviketuotanto on yksi merkittävä ympäristöä kuormittava tekijä, ja siksi eläinkunnan tuotteita tulisi pyrkiä korvaamaan kasvikunnan tuotteilla (Sektoritutkimuksen neuvottelukunta 2010). Kasvisten osuutta ruokavaliossa tulisi lisätä myös siksi, että saataisiin turvattua riittävä ravinto maailman kasvavalle väestölle (Vadez ym. 2012). Eläinproteiinien lähteet sisältävät usein runsaasti tyydyttyneitä rasvoja ja kolesterolia, ja siten näiden vähentäminen ruokavaliossa auttaisi ehkäisemään useita sairauksia (Martínez-Villaluenga ym. 2006). Palkokasveilla voitaisiin korvata ainakin osa ruokavalion lihasta, sillä palkokasveissa on runsaasti proteiineja (Campos-Vega ym. 2010). Lisäksi palkokasvit ovat usein myös hyvä ravintokuidun ja monien bioaktiivisten yhdistei-

den lähde. Viljojen tavoin palkokasvit ovat myös hyviä folaatin lähteitä (Han ja Tyler 2003).

Suomessa kulutetaan vuosittain palkokasveja vain noin 4000 g/vuosi/henkilö (Sektoritutkimuksen neuvottelukunta 2010). Palkokasvien elintarvikekäytön lisäämiseksi on kiinnostuttu mahdollisuuksista viljellä palkokasveja Suomessa. Soijapapu on maailmanlaajuisesti merkittävin elintarvikekäytössä oleva palkokasvi, mutta se ei sovellu viljeltäväksi Suomen oloissa. Sen sijaan etenkin Haags Blaue -sinilupiinilajikkeen on tutkittu soveltuvan Suomen viljelyoloihin ja lyhyeen kasvukauteen (Stoddard ym. 2009). Rekola (2011) tutki opinnäytetyössään muun muassa sinilupiinin folaatteja, ja kokonaisfolaattipitoisuus oli parhaimmillaan jopa 4000 ng/g kuiva-ainetta. Näin ollen sinilupiini on kiinnostava palkokasvi sen luonnostaan suuren folaattipitoisuudenkin takia.

Useat käsittelyt – etenkin lämpökäsittelyt – aiheuttavat folaattipitoisuuden pienentymistä, mutta prosessoinnin avulla voidaan kuitenkin myös saada rikastettua folaatteja. Kariluoto ym. (2006b) tutkivat idätyksen vaikutuksia rukiin folaattipitoisuuksiin ja havaitsivat idätyksen voivan jopa nelinkertaistaa rukiin kokonaisfolaattipitoisuuden. Fermentoinnin vaikutuksia palkokasvien folaatteihin on tutkittu valmistettaessa tempeä soijapavuista (Pokela 2011). Valmistuksen alkuvaiheen liotuksen ja keiton aikana havaittiin folaattipitoisuuden pienentymistä, mutta aiheutunut hävikki saatiin kompensoitua fermentoinnin avulla. Parhaimmillaan fermentoinnin havaittiin 2,5-kertaistavan käsittelemättömien soijapapujen folaattipitoisuuden.

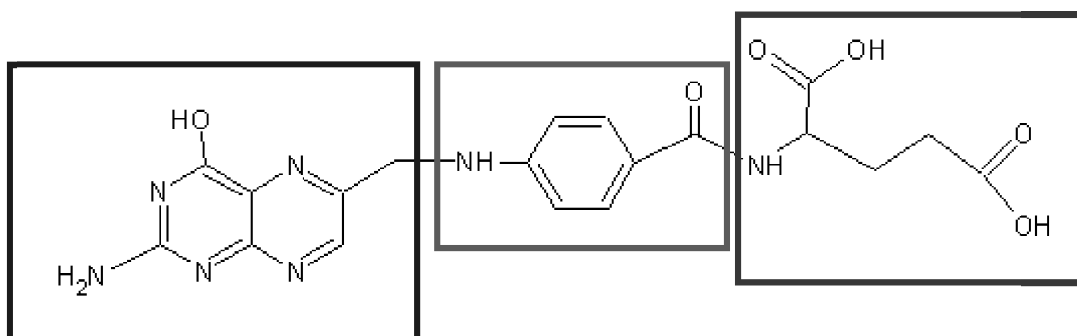
Tämän maisterin tutkielman kirjallisuusosassa tarkasteltiin folaattien ominaisuuksia, synteesiä, hyväksikäytettävyyttä, tarvetta ja saantia. Folaattien lisäksi tarkasteltiin palkokasveja – varsinkin lupiinia – etenkin niiden kulutuksen hyötyjen kannalta. Kirjallisuusosassa tutustuttiin myös sellaisiin bioprosessointimenetelmiin, joilla on saatu suurennettua muiden elintarvikematriisien folaattipitoisuutta. Kokeellisessa osassa tavoitteena oli tutkia mahdollisuutta kasvattaa sinilupiinin luonnostaan suurta folaattipitoisuutta idätyksen ja fermentoinnin avulla. Lisäksi tutkittiin prosessoinnin vaikutuksia folaattien vitameerijakaumaan, jotta saatiin selville, olivatko muodostuvat vitameerimuodot stabiileja, mikä olisi eduksi elintarvikekäytössä.

2 KIRJALLISUUSOSA

2.1 FOLAATIT

2.1.1 Rakenne

Folaatti on vesiliukoinen yhdiste, joka kuuluu B-vitamiinien ryhmään, ja se voi esiintyä eri vitameerimuodoissa (Gregory 2008). Foolihapon eli pteroyyliglutamiinihapon rakenne on esitetty kuvassa 1. Rakenne koostuu toisiinsa yhdistyneistä L-glutamiinihaposta, paraaminobentsoehaposta ja 2-amino-4-hydroksipteridiinistä (Blakley 1987). Kaikkien folaattien rakenteessa 4-[(pteridin-6-yylimetyyli)amino]-bentsoehappo muodostaa yhdisteen rungon, johon on kiinnittyneenä vaihteleva määrä L-glutamaattitähkeitä. Rakenteen glutamaattitähkeitä kiinnittyvät toisiinsa peptidisidoksin. Foolihapon rakenteessa on kiinnittyneenä yksi L-glutamaattitähde, ja näin ollen sitä kutsutaan pteroyyliglutamaatiksi. Mikäli glutamaattitähkeitä on useampia, nimetään yhdiste niiden määrän mukaisesti, ja esimerkiksi kaksi glutamaattitähdettä sisältävä yhdiste on pteroyylidiglutamaatti.

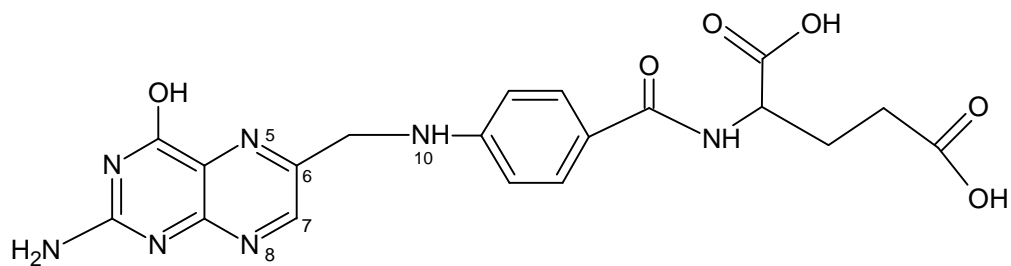


Kuva 1. Foolihapon rakenne, jossa vasemmalla neliöitynä 2-amino-4-hydroksipteridiiniosa, keskellä p-aminobentsoaattiosa ja oikealla L-glutamaattiosa.

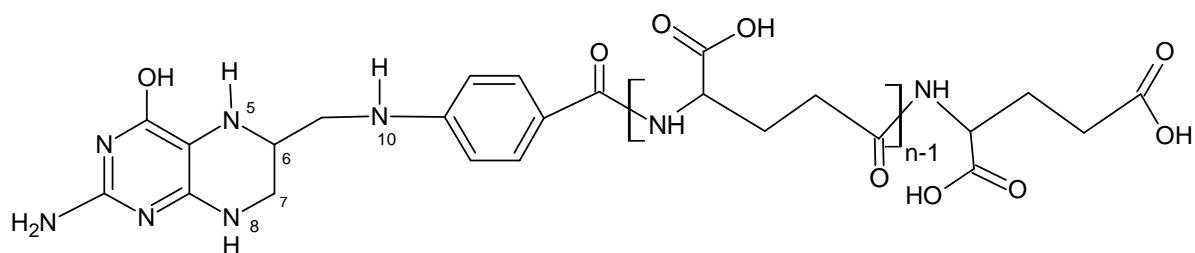
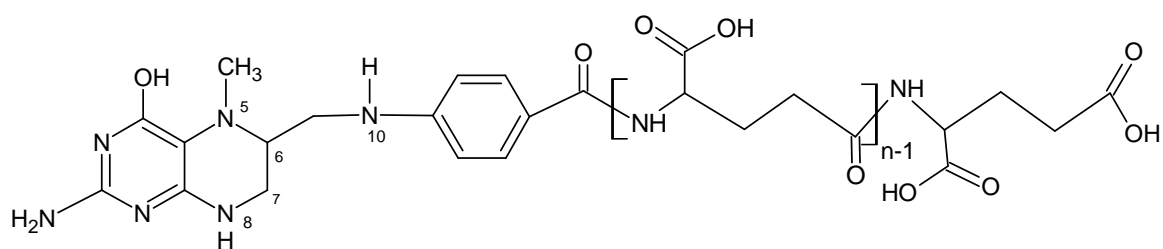
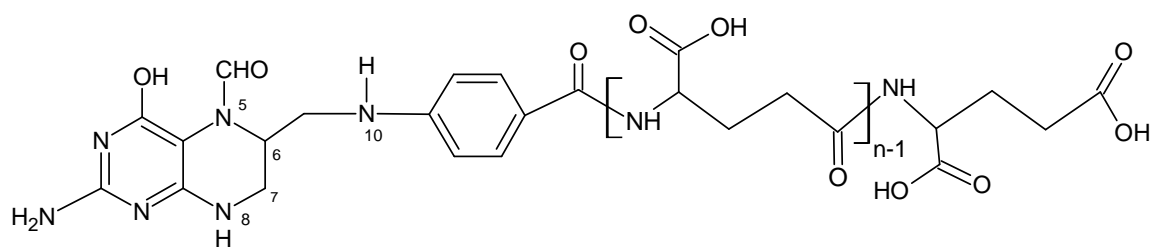
Foolihappo on folaattien täysin hapettunut muoto, mutta rakenne voi esiintyä myös pelkistyneenä (Johansson 2005). Folaatti voi olla osittain pelkistynyt dihydrofolaatti tai täysin pelkistynyt tetrahydrofolaatti. Dihydrofolaattimuodossa 7,8-paikassa oleva kaksoissidos on auennut samoin kuin tetrahydrofolaatissa, mutta tämän lisäksi tetrahydrofolaattimuodossa on auennut kaksoissidos myös 5,6-paikassa. Tetrahydrofolaattiin voi lisäksi olla kiinnittyneenä substituentteja, jolloin muodostuu metyyli-, formyyl- ja formiminojohdannaisia (Blakley 1987). Kyseiset substituentit liittyvät molekyyllissä typpi-atomeihin 5 ja 10, ja tällaiset substituentit esiintyvät kuvan 2a 5-metyylitetrahydrofolaatissa ja 5-formyylitetrahydrofolaatissa sekä kuvan 2b 10-formyylifoolihapossa ja 10-formyylidihydrofolaatissa. Folaattimolekyylisiin voi muodostua kyseisten typpi-atomien välille myös molekyylin sisäisiä metyleeni- ja metenyylisilloja. Esimerkiksi kuvan 2b 5,10-metenyylitetrahydrofolaatissa on esitetty metenyylisillan rakenne.

Tetrahydrofolaatit voivat esiintyä eri stereoisomeerimuodoissa (Johansson 2005). Tetrahydrofolaattien rakenteessa on kaksi kiraalista keskusta, joista toinen on glutamiinihapon α -hiili ja toinen on pteroyylirakenteen 6-paikassa oleva hiili. Näissä kummassakin paikassa stereoisomeerimuotona voi olla joko R- tai S-muoto, ja siten kaiken kaikkiaan stereoisomeerivaihtoehtoja on kullakin tetrahydrofolaatilla neljä: (6S, α S), (6S, α R), (6R, α S) ja (6R, α R). Tetrahydrofolaateilla on kullakin yksi luonnollinen stereoisomeerimuoto, joka vaihtelee vitameerista riippuen. Esimerkiksi tetrahydrofolaatin luonnollinen stereoisomeeri on (6S, α S).

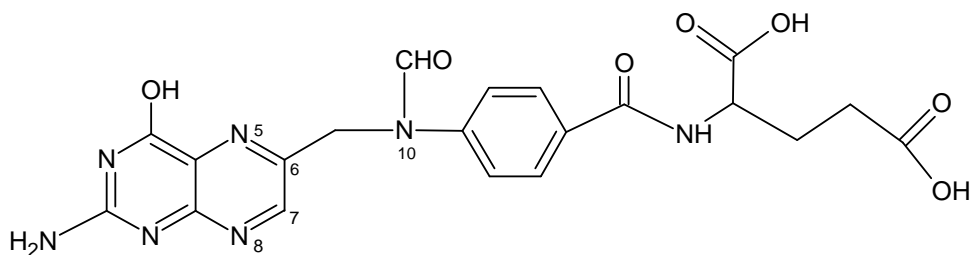
Työssä tutkittuja vitameereja olivat foolihappo, tetrahydrofolaatti, 5-metyylitetrahydrofolaatti, 5-formyylitetrahydrofolaatti, 10-formyylifoolihappo, 10-formyylidihydrofolaatti ja 5,10-metenyylitetrahydrofolaatti. Näiden vitameerien rakenteet on esitetty kuvissa 2a ja 2b.



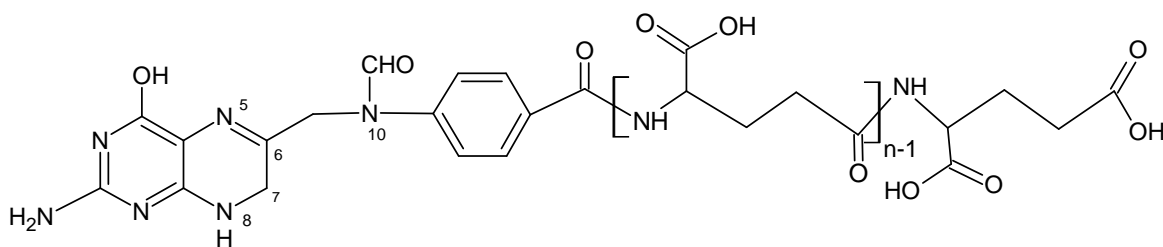
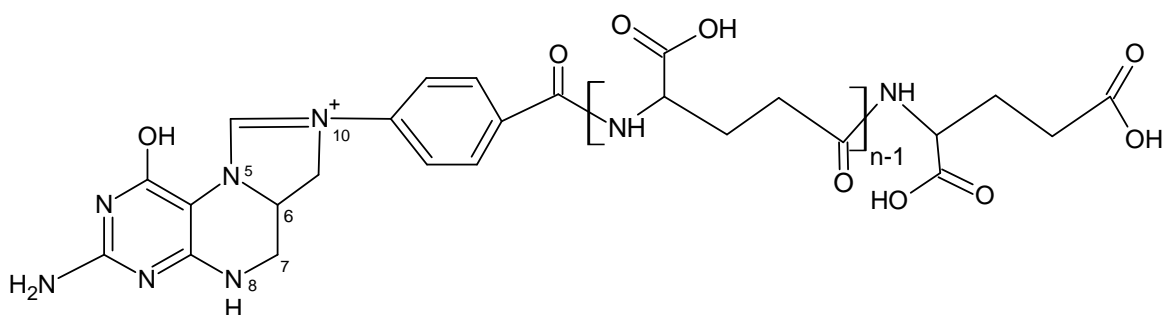
Foliyhappo (PGA)

Tetrahydrofolaatti (H₄)5-metyylitetrahydrofolaatti (5-CH₃-H₄)5-formyyilitetrahydrofolaatti (5-CHO-H₄)

Kuva 2a. Folaattivitameerien rakenteita: foolihappo, tetrahydrofolaatti, 5-metyylitetrahydrofolaatti ja 5-formyyilitetrahydrofolaatti.



10-formyylifoolihappo (10-CHO-PGA)

10-formyylidihydrofolaatti (10-CHO-H₂)5,10-metenyylitetrahydrofolaatti (5,10-CH⁺-H₄)

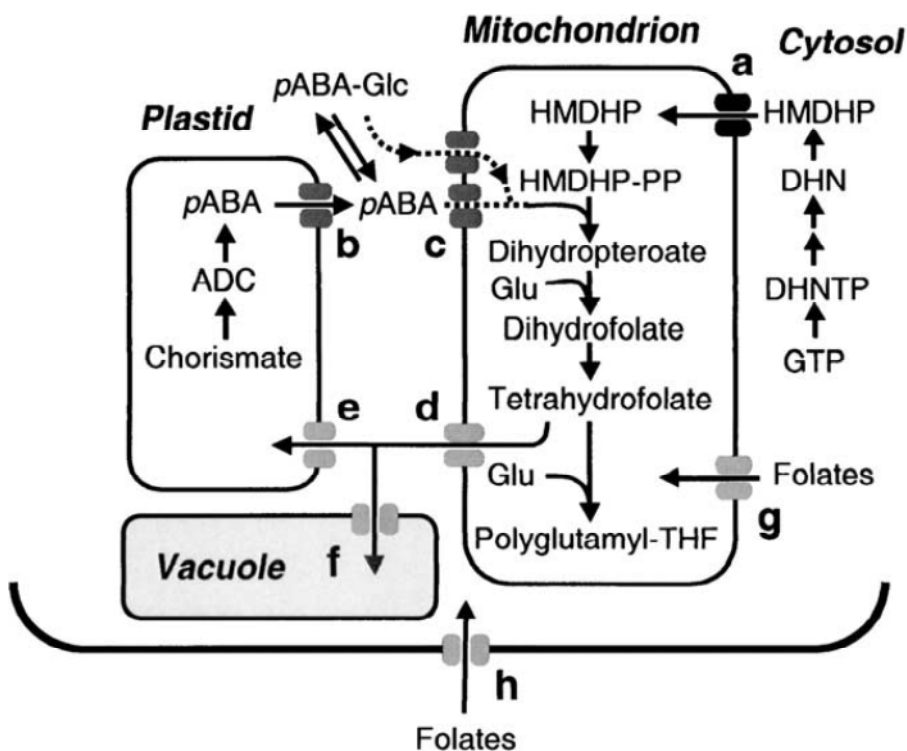
Kuva 2b. Folaattivitameerien rakenteita: 10-formyylifoolihappo, 10-formyylidihydrofolaatti ja 5,10-metenyylitetrahydrofolaatti.

2.1.2 Biosynteesi

Eläinten tavoin kasvit tarvitsevat folaatteja useisiin eri tehtäviin (Scott ym. 2000). Kasveissa tärkeitä tehtäviä ovat muun muassa osallistuminen aminohappojen synteesiin, glysiinin muuttamiseen seriiniksi ja fotorespiraatioreaktioketjuun. Toisin kuin eläimet, kasvit pystyvät syntetisoimaan tarvitsemansa folaatin itse.

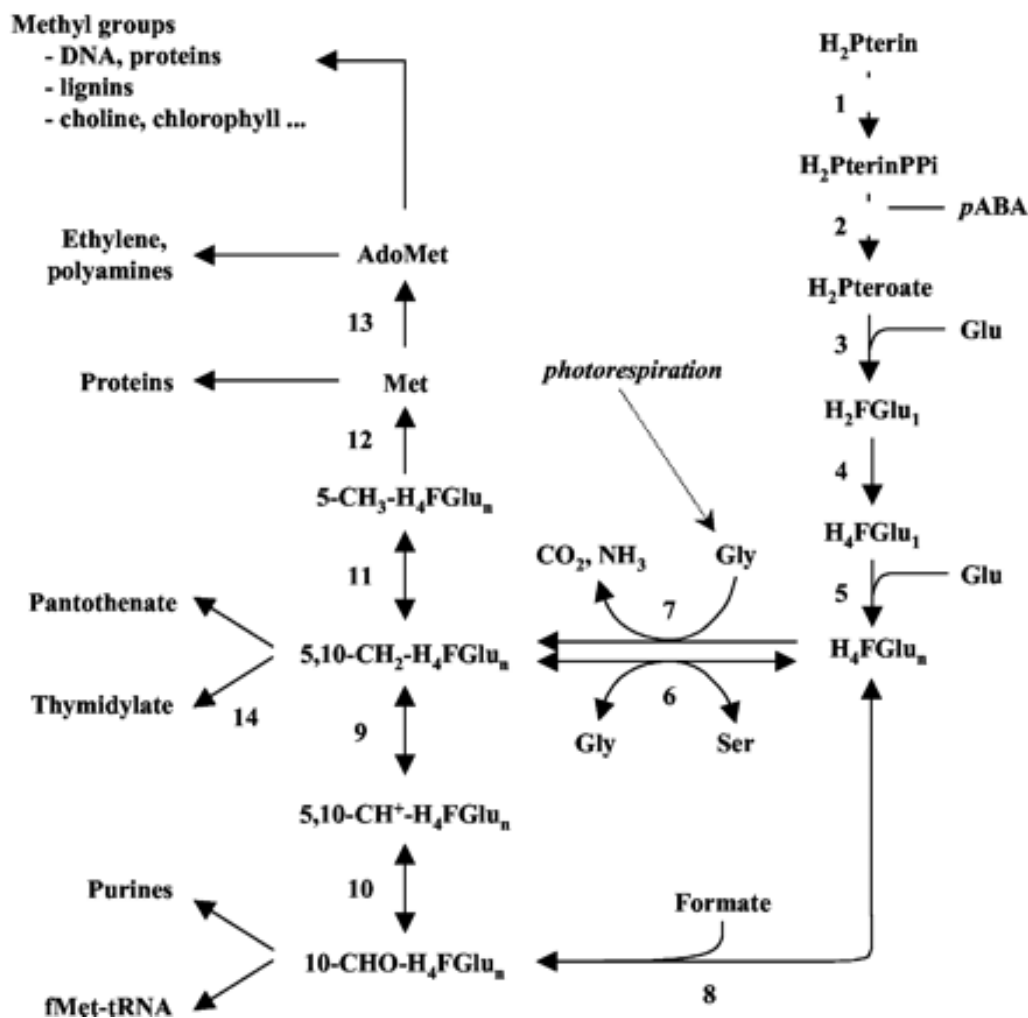
Folaattien synteesi tapahtuu kasveissa ja mikro-organismeissa samojen synteesivaiheiden kautta kymmenen entsyymin avulla (Basset ym. 2005). Folaattien synteesi alkaa pteridiiniosan muodostumisella GTP-syklohydraasi I -entsyymin katalysoimana. Kuvan 3 mukaisesti ensimmäinen välituote on dihydroneopteriidinitrifosfaatti (DHNTF), josta irtaantuu ensin pyrofosfaatti ja tämän jälkeen jäljellä oleva fosfaatti pilkotaan fosfataasientsyymin avulla. Näin muodostuvasta dihydroneopteriidiniä (DHN) pilkotaan lopuksi kolmehiilinen sivuketju, jolloin muodostuu folaatin pteridiiniosa (HMDHP). Pteridiiniosan jälkeen korismaatista syntetisoituu para-aminobentsoaattiosa aminodeoksikorismaattisyntaasin avulla. Reaktioketjussa muodostuu ensin aminodeoksikorismaatti (ADC), josta syntetisoituu edelleen aromaattinen para-aminobentsoaattirakenne (*p*ABA). Pteridiiniä, para-aminobentsoaattia ja glutamaattitähteistä muodostetaan lopulta mitokondriossa folaatti. Pteridiiniosa yhdistetään para-aminobentsoaattiin dihydropteroaattisyntaasin katalysoimana, ja tämän jälkeen glutamyylitähteet liitetään molekyyliin yksitellen.

Kasvien folaattisynteesin eri vaiheet tapahtuvat eri soluelimissä, kuten kuvassa 3 on esitettyä. Pteridiiniosa syntetisoituu sytosolissa, jonka jälkeen molekyyli kulkeutuu mitokondrioon (Basset ym. 2005). Mitokondriossa pteridiiniin liittyy kloroplastissa muodostunut *p*-aminobentsoaatti ja muodostuneet folaattivitameerit kulkeutuvat kloroplastiin tai vakuoleihin. Synteesireittien lisäksi folaatteja voidaan ottaa solun ulkopuolelta. Folaattien kuljetusta soluelinten välillä tapahtuu eri kuljetustavoin (Gregory 1995). Solukalvoilla esiintyy folaatteja kuljettavia mekanismeja, joiden affiniteetti eri folaattivitameereihin vaihtelee kuljettimesta riippuen. Mitokondrion kalvolla esiintyy folaattikuljettimia, jotka kuljettavat spesifisesti pelkistyneitä folaattimuotoja.



Kuva 3. Folaattisynteesin eri vaiheiden jakautuminen eri soluelimiin (Basset ym. 2005).

Folaattien biosynteesin myötä kasveissa muodostuu siis tetrahydrofolaatteja, joiden rakenne voi sisältää eri määrän glutamyyliyksiköitä. Näitä tetrahydrofolaatteja käytetään kasvis- ja eläin-erilaisissa C1-metaboliareaktioissa, joita on kuvattu kuvassa 4 (Jabrin ym. 2003). Reaktioketjun alussa glysiini tai seriini reagoi tetrahydrofolaatin kanssa, ja reaktiossa muodostuu 5,10-metyleenitetrahydrofolaattia. Muodostunutta 5,10-metyleenitetrahydrofolaattia voidaan käyttää pantotenaatin ja tymidylaatin muodostukseen tai sitten 5,10-metyleenitetrahydrofolaatista tehdään 5-metyylitetrahydrofolaattia. 5-metyylitetrahydrofolaatti voi reagoida edelleen muodostaen metioniinia, jota puolestaan käytetään muun muassa proteiinien, etyleenin, polyamiinien ja DNA:n syntetisointiin. Toisaalta 5,10-metyleenitetrahydrofolaatista voidaan muodostaa myös 10-formyyliitetrahydrofolaattia 5,10-metyylitetrahydrofolaatin kautta. 10-formyyliitetrahydrofolaattia voidaan puolestaan hyödyntää puriinien ja RNA:n syntetisointiin.



Kuva 4. C1-metaboliareaktioketjut, joissa kasvien syntetisoimista tetrahydrofolaateista muodostetaan eri folaattivitameereja (Jabrin ym. 2003). Eri folaattivitameereja voidaan käyttää edelleen muun muassa RNA:n, DNA:n, proteiinien, puriinien, pantotenaatin ja tymidylaatin syntetisointiin.

Kasvissa syntetisoituvan folaatin määrä vaihtelee riippuen kasvin osasta ja kasvin kasvuvaiheesta (Sahr ym. 2005). Solukkojen folaattipitoisuuksiin voidaan vaikuttaa folaattisynteesin säätelyn avulla, ja näin ollen kasvin folaattipitoisuus saadaan säilymään tietyissä rajoissa (Hanson ja Gregory 2011). Säätelyä tapahtuu muun muassa siten, että dihydropteroaattien, dihydrofolaattien ja tetrahydrofolaattien muodostuminen inhiboi dihydropteroaattisyntaasia, jolloin synteesi hidastuu. Tämän lisäksi dihydropteroaatti ja dihydrofolaatti inhiboivat myös *p*-aminobentsoaatin muodostumiseen tarvittavaa aminodeoksikorisomaattisyntaasia.

Luonnossa folaatit esiintyvät lähinnä polyglutamaattimuodoissa (Scott ym. 2000). Kasvisoluissa folaatit esiintyvät enimmäkseen polyglutamaaylitetrahydrofolaatteina, joissa glutamaattiketjut ovat usein pitkiä. Polyglutamaattimuodoilla tiedetään olevan yleisesti pa-

rempi affiniteetti entsyymeihin, jotka tarvitsevat folaatteja ollakseen aktiivisia. Ihmiselimestössä folaatit voivat esiintyä myös monoglutamaattimuodossa, ja tällaisia muotoja esiintyy esimerkiksi plasmassa, virtsassa ja folaattien imeytyessä suolistosta, jolloin ne pilkkotaan monoglutamaateiksi konjugaasin katalysoimana (Gregory 1995; Scott ym. 2000).

Kasveissa tapahtuu myös folaattien hajoamista, ja hajoamisnopeutta on tutkittu muun muassa hedelmissä korjuun jälkeen (Hanson ja Gregory 2011). Tutkimuksessa näytteeseen lisättiin synteisiä inhiboivia yhdisteitä, ja tällöin folaattipitoisuuden havaittiin pienenevän noin 10 % päivässä. Suurin osa luonnollisista folaateista on herkkiä hapettumiselle, jonka myötä sidos C9- ja N10-atomien välillä katkeaa. Reaktion myötä molekyylistä vapautuu pteridiiniosa ja jäljelle jää *p*-aminobentsoyyilglutamaatti. Vapautuvat molekyylit voidaan kasveissa kierrättää muodostaen niistä jälleen folaatteja. Hapettumisen myötä tapahtuvan hajoamisen lisäksi hajoamisreaktioita voi tapahtua kasveissa myös entsyymaattisesti, ja tällaiset reaktiot ovat usein ei-entsyymaattista hajoamista nopeampia. Folaattivitameereistä tetrahydrofolaatti ja dihydrofolaatti ovat herkimpiä pilkkoutumiselle ja 5- ja 10-formyylitetrahydrofolaatit ovat puolestaan stabiilimpia.

2.1.3 Hyväksikäytettävyys

Folaatin hyväksikäytettävyyteen vaikuttavat useat eri tekijät. Hyväksikäytettävyys vaihtelee elintarvikematriisien välillä, ja elintarvikkeissa voi olla folaattien hyväksikäytettävyyttä inhiboivia yhdisteitä (Gregory 1995). Jotta folaatti olisi elimistön hyväksikäytettävissä, tulee sen imeytyä suolistosta. Imeytymisen mahdollistamiseksi folaattien glutamaattiketju pilkkotaan ruoansulatuskanavassa (Brouwer ym. 2001). Lisäksi ravinnon foolihappo pelkistetään suolistossa tetrahydrofolaatiksi ja metyloidaan tai formyloidaan ennen verenkiertoon imeytymistä.

Folaatit ovat luonnostaan herkästi hajoavia yhdisteitä, ja hajoamista tapahtuu etenkin hapettumisen myötä (Scott ym. 2000). Hapettumisen myötä folaattimolekyyli voi pilkkoutua tai muuttua toiseksi isomeereiksi, jolloin seurauksena on inaktiivisia muotoja. Hapettumisherkkyys riippuu vitameerimuodosta, ja esimerkiksi tetrahydrofolaatti pilkkoutuu hapettumisen myötä herkemmin kuin foolihappo (Eitenmiller ym. 2008). Folaattien hapettumista estetään folaattimääryksiä tehtäessä esimerkiksi minimoimalla läsnä olevan vapaan mole-

kulaarisen hapen määrä ja käyttämällä pelkistimiä (Scott ym. 2000). Ruoansulatuskanavassa hapen määrään ei kuitenkaan pystytä vaikuttamaan, mutta folaattien hapettumista ruoansulatuskanavassa voitaisiin estää happea sitovien molekyylien, kuten C-vitamiinin, avulla.

Ravinnosta saatujen folaattien imeytyminen tapahtuu ohutsuolessa folaattikuljettimin, jotka kuljettavat folaatit monoglutamaattimuodossa. Näin ollen suolistossa tapahtuva glutamaattiketjujen pilkkoutuminen pteroyylipolyglutamaattihydrolaasin avulla on olennainen vaihe folaattien imeytymisessä (Gregory 1995; Brouwer ym. 2001). Glutamaattiketjun pituuden vaikutusta imeytymiseen ja sen myötä hyväksikäytettävyyteen on tutkittu, mutta tulokset eivät ole täysin yksiselitteisiä (Brouwer ym. 2001). Teoriassa entsyymien pitäisi pilkkoa pitkiä glutamaattiketjuja yhtä tehokkaasti kuin lyhyitä ketjuja, eikä näin ollen glutamaattiketjun pituudella pitäisi olla vaikutusta folaatin hyväksikäytettävyyteen. Kuitenkin tutkimuksissa on usein havaittu, että pitkän glutamaattiketjun omaavien folaattien imeytyvyys on heikompaa. Tämä voi kuitenkin johtua siitä, että pitkäketjuisten folaattimuotojen pilkkoutuminen kestää kauemmin, eikä näin ollen hyväksikäytettävyyksien välillä olisi merkittävää eroa pitkällä aikavälillä. Lisäksi syynä voi olla myös se, etteivät pitkäketjuiset folaatit pääse vapautumaan yhtä helposti elintarvikematriisista.

Folaattia imeytyy ravinnosta kahden eri kuljetusmekanismin avulla (Brouwer ym. 2001). Mekanismi, jolla folaatti imeytyy ohutsuoletta, riippuu ravinnon sisältämän folaatin määrästä. Suoliston luumenin folaattikonsentraation ollessa suuri kuljetus suolistosta verenkiertoon tapahtuu lähinnä folaattia sitovien proteiinien avulla. Tällaiset kuljetinproteiinit voivat kiinnittyä plasmakalvon ankkurimolekyyleihin ja kulkeutua niiden avulla kalvon yli (Gregory 1995). Proteiini vapautuu kalvosta myöhemmin spesifisen entsyymien avulla. Folaattikonsentraatioiden kasvaessa suolistossa kuljetukseen käytetään lähinnä diffuusiolla säädeltyä kuljetusta (Brouwer ym. 2001). Ilman ravintolisiä ei yleensä kuitenkaan saavuteta konsentraatioita, jolloin imeytyminen tapahtuisi diffuusion avulla.

Elintarvikematriisi voi heikentää folaatin imeytymistä estäen folaatin vapautumista (Brouwer ym. 2001). Folaatti voi olla elintarvikematriisissa sitoutuneina tai esimerkiksi soluseinämien eristämistä. Sekaruokavaliosta saatavan folaatin hyväksikäytettävyyden on tutkittu olevan vain noin 50 % foolihapon hyväksikäytettävyyteen verrattuna, kun taas vihanneksista ja sitrushedelmistä vastaava prosenttiosuus vaihtelee välillä 60–98%. Folaatin imeytymistä on tutkittu myös käyttämällä foolihappoa joko leipään lisättyinä tai veden kanssa ja vertaamalla hyväksikäytettävyyksiä näiden ryhmien välillä. Käytettäessä foolihappolisää

leipään lisättyä havaittiin hyväksikäytettävyyden olevan keskimäärin noin 60 % siitä hyväksikäytettävyydestä, joka määritettiin käytettäessä foolihappolisää veden kanssa. Vehnäleseellä on puolestaan havaittu folaatin imeytyvyyttä lisäävää vaikutusta. Folaatin hyväksikäytettävyyteen liittyviä tutkimustuloksia tarkasteltaessa on kuitenkin otettava huomioon, että foolihapon ja pelkistyneiden folaattien hyväksikäytettävyyksien välillä on eroja. Esimerkiksi pelkistyneiden folaattimuotojen on havaittu suurentavan seerumin folaattipitoisuutta enemmän kuin foolihapon, eikä siten foolihapolla ja pelkistyneillä folaattimuodoilla tehtyjen tutkimusten tulokset ole suoraan vertailtavissa.

2.1.4 Tehtävät elimistössä, tarve ja puutosoireet

Folaattia tarvitaan muun muassa nukleiinihappojen, aminohappojen ja pantoteenihapon biosyntetisointiin (Basset ym. 2005). Folaatin puute voi siis vaikuttaa solujen kykyyn tuottaa DNA:ta ja välttämättömiä proteiineja ja siten hidastaa solujen jakautumista (Scott ym. 2000). Folaatin liian vähäisellä saannilla on useita terveydellisiä vaikutuksia, ja puutos voi johtaa megaloblastiseen anemiaan, hermostoputken sulkeutumishäiriöön (NTD = neural tube defects) ja sydän- ja verisuonisairauksiin (Koehler ym. 1997). Puutosoireiden ja etenkin hermostoputken sulkeutumishäiriön välttämiseksi foolihappoa lisätään esimerkiksi Yhdysvalloissa lakisääteisesti muun muassa viljatuotteisiin.

Folaatin merkittävin tehtävä elimistössä on osallistua C1-metaboliareaktioihin kuljettaen yksihiihilisiä yksiköitä (Cossins 2000). Tällaisia folaattivälitteisiä reaktioita tarvitaan muun muassa puriinien, seriinin, tymidylaatin, pantotenaatin, metioniinin ja formyyylimetionyyli-tRNA:n muodostukseen. Reaktiot ovat vastaavia kuin kasveissa tapahtuvat C1-metaboliareaktiot, jotka on esitetty kuvassa 4. Glysiinin tai seriinin hiiliyksikkö reagoi tetrahydrofolaatin kanssa muodostaen metyleenitetrahydrofolaatin (Selhub ym. 2010). Muodostunutta metyleenitetrahydrofolaattia voidaan käyttää tymidylaatin tai nukleotidien valmistukseen tai molekyyli voidaan hapettaa 10-formyyilitetrahydrofolaatiksi, jonka avulla voidaan valmistaa puriinia tai formyyylimetionyyli-tRNA:ta (Cossins 2000; Selhub ym. 2010). Metyleenitetrahydrofolaatti voi myös pelkistyä 5-metyylitetrahydrofolaatiksi, ja tämä reaktio on palautumaton (Selhub ym. 2010). Metyylitetrahydrofolaattia käytetään elimistössä homokysteiniin metylointiin, jolloin muodostuu metioniinia.

Suomessa folaatin saantisuositus aikuisilla on 300 µg vuorokaudessa ja hedelmällisessä iässä oleville naisille suositellaan päivittäiseksi folaatin saanniksi 400 µg (Paturi ym. 2008). Finravinto 2007 -tutkimuksen mukaan suomalaisten miesten keskimääräinen folaatin saanti on noin 30 µg/MJ, kun saantisuositus sekä naisille että miehille samassa yksikössä on 45 µg/MJ. Naisilla folaatin saanti on hieman suurempaa – noin 35 µg/MJ – mutta kuitenkin sekä miesten että naisten folaatin saanti on liian vähäistä. Tutkimuksen mukaan suomalaisista naisista foolihappolisää käytti noin 25 %, ja tällaisten henkilöiden keskimääräinen folaatin saanti ravintolisistä oli noin 280 µg/vrk. Miehillä vastaava prosenttiosuus oli noin 17 %, ja tällöin päivittäinen folaatin saanti ravintolisistä oli keskimäärin noin 270 µg.

Folaatin puutos ennen raskausaikaa ja sen alkupuolella voi johtaa sikiön hermostoputken sulkeutumishäiriöihin (Molloy 2005). Hermostoputken sulkeutuminen tapahtuu sikiön kehityksen ensimmäisen kuukauden aikana. Tämän kehitysvaiheen häiriintyessä voi sikiölle kehittyä erilaisia hermostoputken kehityshäiriöitä, jotka liittyvät merkittävästi pienten lasten sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen. Hermostoputken kehityshäiriön muodostumiseen voidaan vaikuttaa muun muassa ravinnon avulla, ja 50–70 %:ssa tapauksista kyseinen kehityshäiriö voitaisiin ennaltaehkäistä takaamalla äidin riittävä folaatin saanti alkuraskauden aikana. Czeizel ja Dudas (1992) tutkivat folaattilisän vaikutusta synnyntäisiin kehityshäiriöihin ja havaitsivat, että folaattilisää saaneiden äitien lasten kohdalla tällaisia kehityshäiriöitä ilmeni 13,3 tapauksella tuhannesta. Vertailuryhmälle annettiin folaattilisän sijaan hivenainelisää, ja tällä ryhmällä vastaava määrä oli 22,9 tapausta tuhannesta.

Päivittäisen 400 µg foolihappoannoksen on todettu estävän yli puolet hermostoputken kehityshäiriöistä (Committee on Genetics 1999). Aiemmin ongelmana on ollut naisten tietämättömyys folaatin tarpeesta etenkin raskausajan alussa, mutta vaikka tietämys on viimeaikoina lisääntynyt, on folaattilisien käyttö edelleen vähäistä (Liu ym. 2004). Tämän vuoksi FDA hyväksyi jauhojen ja joidenkin muiden viljatuotteiden lakisäätöisen täydentämisen foolihapolla. Suomessa ei puolestaan toteuteta pakollista elintarvikkeiden täydennystä folaatilla, vaan monipuolisen ruokavalion katsotaan takaavan riittävä folaatin saanti (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2005).

Folaatilla on havaittu mahdollinen yhteys sydän- ja verisuonitautien riskin alentamiseen. Seerumin homokysteiniipitoisuuden on todettu liittyvän riskiin saada sydänkohtaus tai sairastua joihinkin sydän- ja verisuonitauteihin, kuten iskeemiseen sydänsairauteen (Koehler

ym. 1997; Wald ym. 2006). Homokystinurialla tarkoitetaan homokysteiniin erittymistä virtsaan (Koehler ym. 1997). Tämä on seurausta homokysteiniin normaalien aineenvaihduntareittien häiriintymisestä, ja homokystinurian myötä seerumin homokysteiniipitoisuus kasvaa. Folaattia tarvitaan muuttamaan homokysteiniä metioniiniksi, ja näin ollen folaatin liian vähäinen saanti voi johtaa veren homokysteiniipitoisuuden kasvuun (Selhub ym. 2010). Veren suuri homokysteiniipitoisuus on havaittu usein myös naisilla, joiden lapsilla on todettu hermostoputken kehityshäiriöitä (Ryan-Harshman ja Aldoori 2008). Veren suuri homokysteiniipitoisuus voi siten indikoida kasvanutta riskiä sekä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin että sikiön saada hermostoputken kehityshäiriöitä (Koehler ym. 1997; Ryan-Harshman ja Aldoori 2008). Folaatin avulla voidaan saada laskettua seerumin homokysteiniipitoisuutta, ja riittävästä folaatin saannista on siis hyötyä myös muille kuin hedelmällisessä iässä oleville naisille (Wald ym. 2006).

Folaatti voi ehkäistä myös syövän syntyä, ja folaatin liian vähäisellä saannilla on tutkimuksissa havaittu yhteys etenkin peräsuolen syöpään, mutta myös esimerkiksi rintasyöpään, kohdunkaulan syöpään ja keuhkosityöpään (Choi ja Mason 2000). DNA:n vaurioituminen on merkittävä syövän syntyyn vaikuttava tekijä. Folaatti osallistuu elimistössä nukleiinihappojen syntetisointiin, ja siten riittävä folaatin saanti on olennaista DNA:n ja RNA:n syntetisoinnin kannalta. Folaatin puutos voi johtaa DNA:n tai RNA:n metylointireaktioiden muutoksiin, joiden myötä geenien ilmentyminen muuttuu. Toisaalta kudosten liian vähäinen folaattipitoisuus voi johtaa myös DNA-vaurioiden korjaamisen häiriintymiseen. Nämä tekijät voivat lisätä karsinogeneesiä.

2.2 PALKOKASVIT

2.2.1 Yleistä palkokasveista

Palkokasvit kuuluvat *Leguminosae* -heimoon, ja kyseisen heimon kasveilla yhteistä on se, että niiden siemenet kasvavat paloissa (Legume Futures Resource Centre 2010). Palkokasvit kuuluvat maailman tärkeimpiin ravintokasveihin (Tiwari ym. 2011). Kestävän kehityksen näkökulmasta elintarviketuotanto on merkittävä ympäristöä kuormittava tekijä, ja siksi

eläinkunnan tuotteita tulisi pyrkiä korvaamaan kasvikunnan tuotteilla (Sektoritutkimuksen neuvottelukunta 2010). Eläinproteiinien lähteet sisältävät usein myös runsaasti tyydyttyneitä rasvoja ja kolesterolia, ja tämän vuoksi kasvikunnan tuotteiden osuuden lisäämistä ruokavaliosta suositellaan (Martínez-Villaluenga ym. 2006). Jo 50–100 g palkokasveja voi riittää korvaamaan päivittäisen liha-annoksen, ja näin ollen palkokasvi on kiinnostava elintarvikeraaka-aine (Sektoritutkimuksen neuvottelukunta 2010).

Palkokasvien käyttö osana ravintoa on saanut alkunsa jo noin 20 000 vuotta sitten idän kulttuureissa, mutta sittemmin kulutus ja viljely on levinnyt koko maailmaan (Tiwari ym. 2011). Yhä viljely on keskittynyt tiettyihin maihin, sillä 75 % kaikista maailman palkokasveista tuotetaan 15 maassa, joita ovat Intia, Kanada, Myanmar, Brasilia, Kiina, Nigeria, Yhdysvallat, Venäjä, Etiopia, Australia, Meksiko, Turkki, Nigeria, Pakistan ja Ranska. Palkokasvien kokonaiskulutus on kasvanut viime vuosikymmeninä merkittävästi lähinnä väestönkasvun myötä. Tästä huolimatta palkokasvien kulutus henkilöä kohden on alentunut, ja tämän myötä on havaittu muun muassa sydän- ja verisuonitautien ja diabeteksen määrän kasvua maissa, joissa aiemmin merkittävä osa ravinnosta koostui palkokasveista.

2.2.2 Palkokasvien elintarvikekäytön hyödyt

Palkokasvit ovat merkittäviä ravinnon lähteitä etenkin köyhissä maissa, joissa ne tarjoavat edullisen proteiinin, B-vitamiinien, kivennäisaineiden ja hiilihydraattien lähteen (Tiwari ym. 2011). Trooppisissa ja subtrooppisissa maissa palkokasvit ovatkin ravinnon toiseksi tärkeimpiä proteiinin lähteitä. Maailman väkiluku tulee tulevana vuosikymmeninä kasvaamaan runsaasti, mikä tuo mukanaan haasteen riittävästä ruoan tuotannosta (Vadez ym. 2012). Viljelykelpoisen maa-alan vähentyminen ja ilmastonmuutos ovat myös seikkoja, jotka tulee ottaa huomioon suunniteltaessa elintarviketuotantoa. Ilmastonmuutoksen myötä on odotettavissa lämpötilan nousua ja mahdollisesti myös kasvien käytettävissä olevan veden puutetta. Tämä vaikuttaisi kasvien fotosynteesin määrään niin, että kokonaiskasvu hidastuisi. Palkokasvien kasvukausi on kuitenkin epäsäännöllinen ja ne pystyvät sopeutumaan vaihteleviin kasvuoloihin. Sopeutuminen tapahtuu tuottamalla huonoina kausina enemmän kukkia ja muodostamalla siemenet vasta, kun olosuhteet ovat kasvukauden aikana paremmat.

Palkokasvit ovat tärkeitä myös sen vuoksi, että ne kykenevät sitomaan typpeä suoraan ilmasta ja muuttamaan sitä muotoon, joka parantaa maaperän ravinteikkuutta (Legume Futures Resource Centre 2010; Tiwari ym. 2011). Useat palkokasvit kykenevät toimimaan symbioosissa *Rhizobia*-bakteerien kanssa niin, että bakteeri muokkaa kasvin ilmasta ottamaa molekulaarista typpeä biologisesti aktiiviseen muotoon (Legume Futures Resource Centre 2010). Palkokasveja viljelemällä saadaan lisättyä maaperän ravinteikkuutta lisäämättä lannoitteita, ja tämä mahdollistaa kustannustehokkaan viljelyn myös alueilla, joilla maaperä on vähäravinteista.

Palkokasvit sisältävät runsaasti muun muassa proteiineja, hiilihydraatteja ja ravintokuitua, ja lisäksi ne ovat useiden bioaktiivisten yhdisteiden lähteitä (Campos-Vega ym. 2010). Tällaisia bioaktiivisia yhdisteitä ovat muun muassa antioksidanttiset fenoliset yhdisteet ja fytaatit, jotka voivat heikentää kivennäisaineiden hyväksikäytettävyyttä, mutta myös toimia antioksidanteina. Osalla palkokasvien bioaktiivisista yhdisteistä on negatiivisia vaikutuksia, ja tällaisia ovat esimerkiksi proteiinien imeytymistä heikentävät entsyymi-inhibiittorit. Palkokasvit ovat myös hyviä vitamiinien lähteitä, sillä 190 g palkokasvianoksen on tutkittu sisältävän yli 15 % päivittäin tarvittavasta folaatin, tiamiinin, niasiinin, B6-vitamiinin ja α -tokoferolin määrästä (Öhrvik ym. 2010). Palkokasvien säännöllisellä käytöllä on havaittu useita terveyttä edistäviä vaikutuksia, kuten sydän- ja verisuonisairauksien riskin aleneminen. Tämän lisäksi palkokasveilla on alhainen glykeeminen indeksi ja pieni rasvapitoisuus, minkä vuoksi palkokasvit voivat auttaa hallitsemaan veren sokeri- ja rasvapitoisuutta (Tiwari ym. 2011). Taulukossa 1 on esitetty papujen, kikherneiden, linsien ja soijapapujen makrokomponenttikoostumus. Taulukosta nähdään, että palkokasvien koostumus vaihtelee eri palkokasvien välillä suurestikin. Esimerkiksi kikherneissä ja linsseissä on huomattavasti papuja ja soijapapuja suurempi hiilihydraattipitoisuus, ja soijapapujen proteiinipitoisuus puolestaan on suuri verrattaessa muihin taulukossa esitettyihin palkokasveihin.

Taulukko 1. Yleisimpien palkokasvien makrokomponenttikoostumus (Tiwari ym. 2011).

Ravintoaine (g/100 g)	Pavut*	Kikherneet**	Linssit***	Soijapavut***
Energia (kcal)	69	121	105	141
Hiilihydraatti (g)	9,7	18,2	16,9	5,1
Proteiini (g)	6,0	8,4	8,8	14,0
Rasva (g)	0,9	2,1	0,7	7,3
Ravintokuitu (g)	5,1	4,3	3,8	6,1

*keitetty

**liotettu ja keitetty

***kuivattu ja keitetty

2.2.3 Lupiini

Lupiinien viljely on vielä melko vähäistä, ja vuonna 2008 lupiinin osuus kaikesta palkokasviviljelystä oli vain noin 1 % (Tiwari ym. 2011). Kuitenkin reilun neljän vuosikymmenen aikana lupiinin viljely on lisääntynyt 25 %. Suurin osa markkinoiden lupiineista (noin 60 %) tuotetaan Australiassa. Yhä valtaosa lupiineista käytetään eläinrehuna, sillä vain 5 % tuotetusta lupiinista hyödynnetään ihmisravintona.

Suomalaisten palkokasvien kulutus on verrattain vähäistä, sillä palkokasveja käytetään vain alle 4 kg/vuosi/henkilö (Sektoritutkimuksen neuvottelukunta 2010). Palkokasvien kulutusta voitaisiin lisätä tuomalla markkinoille kotimaisista palkokasviraaka-aineista valmistettuja prosessoituja tuotteita, kuten tempen kaltaisia fermentoituja elintarvikkeita. Elintarvikekäytössä olevista palkokasveista soijapapu on maailmanlaajuisesti merkittävin, mutta se ei sovellu viljeltäväksi Suomen viljelyoloissa. Helsingin yliopisto ja MTT ovat tutkineet joidenkin härkäpapu-, sinilupiini- ja linssilajikkeiden soveltuvuutta Suomen viljelyoloihin, ja näistä etenkin Haags Blaue -sinilupiinilajike oli vaikuttanut soveltuvalta Suomen oloihin ja lyhyeen kasvukauteen (Stoddard ym. 2009).

Palkokasvit voidaan jakaa suuren proteiini- ja tärkkelyspitoisuuden ja suuren proteiini- ja kuitupitoisuuden omaaviin palkokasveihin (Sektoritutkimuksen neuvottelukunta 2010). Lupiini kuuluu näistä suuren proteiini- ja kuitupitoisuuden omaaviin palkokasveihin. Lupiinin siementen proteiinipitoisuus on usein samaa suuruusluokkaa tai jopa suurempi kuin soijapapujen proteiinipitoisuus, ja parhaimmillaan lupiinin proteiinipitoisuus voi olla jopa 30–40 % riippuen lupiinin lajikkeesta, genotyypistä ja kasvupaikasta (Erbaas ym. 2005;

Martínez-Villaluenga ym. 2006). Lupiinin siementen proteiinit sisältävät runsaasti lysiiniä ja vain vähän rikkipitoisia aminohappoja (Erbas ym. 2005). Lupiinin siemenet sisältävät jopa 30–40 % ei-tärkkelys polysakkarideja, ja lisäksi niiden öljypitoisuus vaihtelee noin välillä 5–15 % (Erbas ym. 2005; Martínez-Villaluenga ym. 2006). Suuri osa öljystä koostuu monityydyttymättömistä rasvahapoista (Erbas ym. 2005).

Ei-toivotuista komponenteista lupiinissa on vain vähän muun muassa proteiinien pilkkoutumista ja imeytymistä estäviä lektiiniä ja proteaasi-inhibiittoreita verrattuna useisiin muihin palkokasveihin (Martínez-Villaluenga ym. 2006). Sen sijaan lupiinin siemenet sisältävät toksisia alkaloideja, kuten sparteiinia ja lupaniinia (Erbas ym. 2005). Pitoisuuden vähentämiseksi tasolle, joka ei ole toksinen, tulee lupiinin siemeniä ennen niiden elintarvikettä käyttöä liottaa, jolloin vesiliukoisten alkaloidien pitoisuus pienenee riittävästi.

Alkaloidien pitoisuuteen kasvissa vaikuttavat muun muassa ympäristöolosuhteet, kasvin kasvuvaihe ja maaperän ravinteikkaus (Maknickiene ja Asakaviciute 2008). Alkaloideja muodostuu kasveihin lähinnä kasvia suojaamaan eli toimiakseen esimerkiksi pestisideinä. Maknickiene ja Asakaviciute (2008) tutkivat keltalupiinin genotyypin vaikutusta alkaloidipitoisuuksiin. Vertailussa oli neljä eri genotyyppiä, ja näiden keskimääräisissä alkaloidipitoisuuksissa havaittiin eroja. Kahdella genotyypillä keskimääräinen alkaloidipitoisuus oli noin 0,06 % kuiva-aineesta, kun taas kahdella muulla genotyypillä pitoisuudet olivat selvästi korkeammat – 0,105 ja 0,127 % kuiva-aineesta. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin alkaloidipitoisuuden olevan suurimmillaan kasvin kukintavaiheessa, kun taas pienimmät alkaloidipitoisuudet havaittiin olevan kasvin kasvun alkuvaiheessa. Verrattaessa kasvin eri osia oli havaittavissa, että keltalupiinin siemenet sisälsivät vähiten alkaloideja.

2.3 FOLAATIT PALKOKASVEISSA

2.3.1 Folaattipitoisuudet

Folaatin riittävän saannin takaamiseksi suositellaan käyttämään ravintolisiä, folaatilla täydennettyjä tuotteita tai elintarvikkeita, joissa on luonnostaan suuri folaattipitoisuus (Rychlik ym. 2007). Suomalaisten suositusten mukaan riittävä folaattisaanti on mahdollista saada

monipuolisesta ravinnosta, eikä Suomessa toteutetakaan lakisääteistä elintarvikkeiden täydennystä folaatilla (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2005). Palkokasveissa on todettu olevan suuri kokonaisfolaattipitoisuus, ja esimerkiksi soijapapujen folaattipitoisuudeksi on määritetty jopa yli 300 µg folaattia/100 g tuorepainoa, kikherneiden folaattipitoisuudeksi lähes 300 µg folaattia/100 g tuorepainoa ja kidneypapujen folaattipitoisuudeksi noin 200 µg folaattia/100 g tuorepainoa (Rychlik ym. 2007). Taulukossa 2 on esitetty yleisimpien palkokasvien kokonaisfolaattipitoisuuksia. Lupiinin folaattipitoisuuksia on tutkittu vasta verrattain vähän, mutta lupiinin siementen on havaittu voivan sisältää myös suuria pitoisuuksia folaattia (Rekola 2011). Esimerkiksi sinilupiinilajikkeissa on tutkittu olevan folaattia noin 370 µg/100 g tuorepainoa, mikä vastaa suuruusluokaltaan muun muassa taulukossa 2 esitettyjen vihreiden linssien, vihreiden papujen, kidney-papujen ja mustien papujen folaattipitoisuuksia.

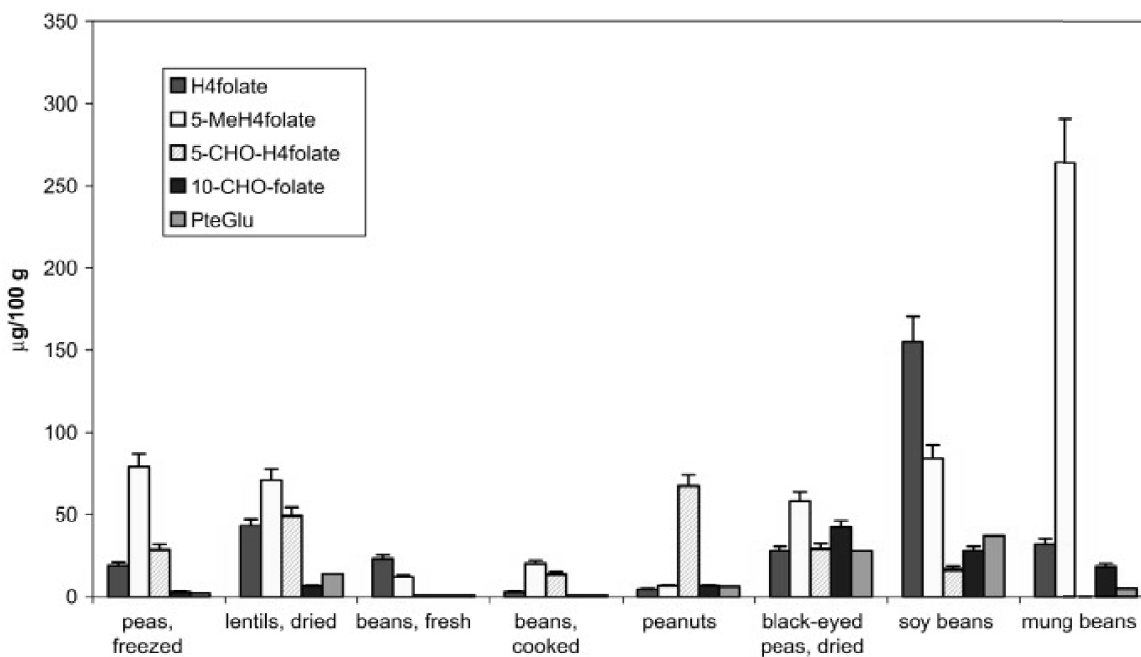
Taulukko 2. Yleisimpien palkokasvien kokonaisfolaattipitoisuuksia mikrobiologisella menetelmällä määritettynä (US Department of Agriculture 2011).

Kasvin tieteellinen nimi	Yleinen nimi	folaattipitoisuus (µg/100 g tuorepainoa)
<i>Pisum sativum</i>	vihreät herneet	274
<i>Lens culinaris</i>	vihreät linssit	479
<i>Phaseolus vulgaris</i>	vihreät pavut	33
<i>Phaseolus vulgaris</i>	kidney-pavut	394
<i>Phaseolus vulgaris</i>	mustat pavut	444
<i>Glycine max</i>	soijapavut	165

Eri palkokasvien folaattipitoisuuksien vertailun lisäksi on tehty tutkimuksia, joissa on verrattu esimerkiksi lajikkeen tai kasvuolosuhteiden vaikutusta palkokasvien folaattipitoisuuksiin. Han ja Tyler (2003) tutkivat palkokasvien kokonaisfolaattipitoisuuksien vaihtelua lajikkeen ja kasvupaikan mukaan. Tutkimuksissa käytettiin näytteinä eri kasvupaikoissa Kanadassa kasvaneita palkokasvilajeja ja -lajikkeita. Joistain lajikkeista oli otettu näyte kahdesta eri sadosta. Mikrobiologisten kokonaisfolaattipitoisuuden määritysten perusteella he totesivat, että kyseisillä palkokasveilla näytteinä olleiden lajikkeiden välillä ei havaittu merkittävää eroa kokonaisfolaattipitoisuudessa. Kasvupaikalla puolestaan näytti olevan merkitystä, sillä esimerkiksi vihreän pavun folaattipitoisuus oli eräällä kasvupaikalla jopa kaksinkertainen toiseen paikkaan verrattuna.

Rekola (2011) tutki opinnäytetyössään kasvupaikan ja lajikkeen vaikutuksia lupiinin folaattipitoisuuksiin. Työssä tutkittiin kolmen eri lupiinilajikkeen (Haags Blaue, Boruta, Sonet) kokonaisfolaattipitoisuuksia. Samassa paikassa viljeltyjen lajikkeiden välillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa kokonaisfolaattipitoisuuksissa. Kasvupaikalla puolestaan havaittiin olevan vaikutusta folaattipitoisuuksiin verrattaessa Viikissä ja Mikkelissä kasvatettuja lupiineja. Viikissä kasvaneiden kolmen lajikkeen kokonaisfolaattipitoisuuden keskiarvo oli 3985 ng/g kuiva-ainetta, kun vastaava keskiarvo Mikkelissä kasvaneilla kolmella lajikkeella oli 3422 ng/g kuiva-ainetta. Lisäksi esimerkiksi Boruta-lajikkeella havaittiin Helsingissä kasvaneiden lupiinien siementen folaattipitoisuuden olevan hieman yli 10 % suurempi kuin Mikkelissä kasvaneiden. Kaiken kaikkiaan lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet olivat välillä 3246–4077 ng/g kuiva-ainetta.

Kokonaisfolaattipitoisuuden lisäksi on tutkittu myös palkokasvien folaattivitameerien jakaumaa. Kuvassa 5 on esitetty kahdeksan palkokasvinäytteen vitameerijakaumat, ja kuvan perusteella voidaan todeta, että kokonaisfolaattipitoisuuksien lisäksi myös vitameerijakaumissa esiintyy suurta vaihtelua (Rychlik ym. 2007). Esimerkiksi herneissä, linsseissä ja mung-pavuissa suurin osa folaateista esiintyy 5-metyylitetrahydrofolaattina, kun taas soijapavuissa pääasiallinen vitameerimuoto on tetrahydrofolaatti ja esimerkiksi maapähkinöissä puolestaan 5-formyylitetrahydrofolaatti.



Kuva 5. Palkokasvien folaattien vitameerijakaumien eroja (Rychlik ym. 2007).

% . Myös rukiin folaattipitoisuuksien pienentymistä on tutkittu muun muassa autoklavoinnin, puffauskäsittelyn, infrapunakäsittelyn, paahtamisen ja ekstruusion seurauksena (Kari-luoto ym. 2006b). Kaikkien näiden käsittelyjen havaittiin pienentävän rukiin kokonaisfolaattipitoisuutta. Näin ollen todettiin, että folaattien säilymisen kannalta lämpökäsittelyt tulisi tehdä joko korkeassa lämpötilassa lyhyin käsittelyajoin tai alhaisessa lämpötilassa.

Stea ym. (2007) havaitsivat lämpökäsittelyillä olevan samankaltaisia vaikutuksia muun muassa vihreiden papujen folaattipitoisuuksiin. Vihreiden papujen folaattipitoisuuden hävikki oli esimerkiksi ryöppäyksen (98 °C, 2 min) seurauksena 64 % ja keittämisen ja höyrykeiton seurauksena jopa yli 80 %. Verrattaessa keittämisen ja painekeiton vaikutuksia papujen folaattipitoisuuksiin on havaittu, että keitettäessä folaattien siirtyminen veteen on suurempaa (Dang ym. 2000). Tämä johtuu käsittelyn pidemmästä kestosta, sillä painekäsittely kesti vain noin kuudesosan keittämisestä. Keittäessä havaittiin hieman yli 60 %:n hävikki, kun painekeitossa hävikki oli noin 50 %.

Soijapapujen folaatin hävikkiä on tutkittu tempen valmistuksen aikana (Arcot ym. 2002). Liotettaessa soijapapuja yön yli havaittiin folaatin hävikkiä veteen liukenemalla noin 30 %. Kuorittujen papujen keittämisen aikana hävikkiä tapahtui jopa 50 %, ja vain osa tästä hävikin folaattimäärästä oli liuennut veteen. Näin ollen liukenemisen lisäksi on luultavasti tapahtunut myös folaatin hajoamista. Pokela (2011) tutki folaattipitoisuuksien muutoksia tempen valmistuksen aikana ja havaitsi liotusnesteen pH:lla voivan olla suuri vaikutus folaatin hävikkiin. Toisella tutkitulla soijapapulajikkeella liotuksen ja keiton aikana tapahtui hävikkiä yhteensä 50 %, kun liotus tehtiin happamassa liuoksessa, ja hieman yli 60 %, kun liotus tehtiin neutraalissa liuoksessa. Toisella soijapapulajikkeella liotusnesteiden happamuudella ei ollut yhtä merkittävää vaikutusta.

2.3.3 Folaatin rikastus

Useat elintarvikeprosessit pienentävät elintarvikkeiden kokonaisfolaattipitoisuuksia, mutta prosessoinnin avulla voidaan saada myös suurennettua folaattipitoisuutta. Esimerkiksi maidon folaattipitoisuus on yleensä melko pieni, vain noin 5-7 µg/100 g, mutta maidon merkittävimmän vitameerin, 5-metyylitetrahydrofolaatin, pitoisuutta on onnistuttu maitotuotteita fermentoimalla suurentamaan jopa 200 % (Holasova ym. 2005).

Maitotuotteiden lisäksi myös esimerkiksi viljojen folaattipitoisuuksia on saatu suurennettua bioprosessoinnin avulla. Idätyksen ja lämpökäsittelyiden vaikutuksia rukiin kokonaisfolaattipitoisuuteen on tutkittu, ja tutkimuksissa havaittiin idätyksen voivan jopa lähes nelinkertaistaa jyvän folaattipitoisuuden (Kariluoto ym. 2006b). Tutkimuksessa havaittiin myös folaattipitoisuuden suurentuvan idätyslämpötilan kasvaessa 5 °C:sta 10 °C:een. Lämpötilan vaikutus folaattipitoisuuden suurentumiseen johtui kuitenkin enimmäkseen jyvien itämisnopeudesta, sillä 10 °C:ssa 100 %:n itävyys saavutettiin jo kahden vuorokauden jälkeen, kun 5 °C:ssa vastaava itävyys saavutettiin vuorokautta myöhemmin.

Hefni ja Witthöft (2011) tutkivat vehnän idättämistä ja leivän folaattipitoisuuden suurentamista lisäämällä jauhojen joukkoon idätetystä vehnästä tehtyä jauhoa. Idätyskokeet tehtiin neljässä eri lämpötilassa (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C), ja vehnän jyviä liotettiin idätyskokeissa ennen idätyksen alkua ja myös kesken idätyksen. Idätetyt jyvät kuivattiin ja niistä jauhettua jauhoa käytettiin leivän leivonnassa tavallisten jauhojen lisänä. Tutkimuksessa havaittiin, että suurin folaattipitoisuus saavutettiin, kun idätys suoritettiin 30 °C:ssa. Leivän leivonnan aikana tapahtui noin 15 % hävikkiä folaattipitoisuudessa riippumatta käytetystä leivontamenetelmästä. Kuitenkin idätetyn jauhон lisääminen leivontajauhojen joukkoon suurensi merkittävästi leivän folaattipitoisuutta.

Myös fermentoinnin vaikutuksia rukiin folaattipitoisuuksiin on tutkittu fermentoimalla ruisnäytteitä eri hiivoin ja maitohappobakteerein (Kariluoto ym. 2006a). Suurimmat folaattipitoisuudet saavutettiin hiivafermentoinnin, kun taas maitohappofermentointien aikana steriilien ruisnäytteiden folaattipitoisuus pienentyi. *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan avulla saavutettiin merkittävä folaattipitoisuuden suurentuminen – jopa yli 120 % – myös tutkittaessa folaattipitoisuuden muutoksia leivonnan aikana (Kariluoto ym. 2004). Leivonnassa käytettiin kahdesta eri ruislajikkeesta valmistettuja jauhoja, ja taikinan fermentoinnin aikana saavutetut folaattipitoisuuden suurentumiset erosivat näiden välillä selvästi. Ruislajikkeilla havaittiin olevan erilaiset sakoluvut ja tämän myötä myös taikinoiden fermentoinnin aikaiset happamuuden muutokset erosivat. Tämän uskottiin olevan merkittävin tekijä, joka vaikutti folaattipitoisuuden muutosten eroihin taikinoissa.

Fermentoinnin vaikutuksia palkokasvien folaattipitoisuuksille on tutkittu vielä melko suppeasti, mutta tutkimuksia on tehty erityisesti soijapavuista *Rhizopus oligosporus* -homeen avulla valmistetulla tempellä (Arcot ym. 2002). Soijapavut sisältävät melko runsaasti folaatteja, mutta soijapapujen hyväksikäytettävyys ja aistinvaraiset ominaisuudet ovat sellai-

senaan melko huonot. Ominaisuuksia on pyritty parantamaan erilaisin käsittelyin, mutta esimerkiksi keittämisen on havaittu aiheuttavan folaattipitoisuuden pienentymistä. Tempen valmistuksessa soijapavut liotetaan ja keitetään, ja nämä molemmat käsittelyt aiheuttavat folaattien hävikkiä (Pokela 2011). Liotuksen ja kuumennuksen aikainen folaattien hävikki saadaan kuitenkin korvattua fermentoimalla. Pokela (2011) havaitsi tutkimuksessaan, että fermentoinnin myötä folaattipitoisuus parhaimmillaan 2,5-kertaistui käsittelemättömiin soijapapuihin verrattuna. Tutkimuksessa havaittiin soijapapulajikkeella ja käytetyllä mikrobiviljelmällä olevan vaikutusta siihen, kuinka paljon folaattipitoisuus suurenee fermentoinnin aikana. Toisella tutkitusta papulajikkeesta folaattipitoisuus parhaimmillaan 2,5-kertaistui, ja toisella papulajikkeella folaattipitoisuus vain 1,5-kertaistui. Tutkimuksessa havaittiin myös, että käytetyllä mikrobiviljelmällä oli vaikutusta folaattipitoisuuden muutoksiin.

Tempeä valmistetaan lähinnä soijapavuista, mutta myös muiden palkokasvien soveltuvuutta tempen raaka-aineeksi on tutkittu (Nassar ym. 2008). Tutkimuksessa tempen valmistukseen käytettiin vihreitä papuja, härkäpapuja, kikherneitä ja lupiinia. Raaka-aineista lupiinilla havaittiin suurin proteiini-, rasva- ja kuitupitoisuus. Liotetuista siemenistä tehtiin erilaisia seoksia, joissa härkäpapuja oli joko 75 % tai 50 % ja loppuosa oli jotakin muuta palkokasvia. Härkäpavun kanssa sekoitettiin siis muita valittuja palkokasveja yksittäin niin, että kussakin seoksessa oli kahta palkokasvia. Kaikkien seosten proteiini- ja kuitupitoisuudet suurenvat fermentoinnin myötä, kun rasva- ja tuhkapitoisuus puolestaan pienenevät. Tämän epäiltiin johtuvan muun muassa siitä, että home käytti fermentoinnin aikana etenkin tärkkelystä ja rasvaa energianlähteenään ja tuotti kuitupitoista homerihmastoaa.

2.4 FOLAATTIEN MÄÄRITTÄMINEN PALKOKASVEISTA

2.4.1 Esikäsittelyt

Palkokasvien esikäsittelyt ennen varsinaista folaattipitoisuuden määrittämistä vaihtelevat tutkimuksesta riippuen jonkin verran. AACC on hyväksynyt menetelmän folaattien määrittämiseksi viljatuotteista käyttäen mikrobiologista menetelmää ja trientsyymikäsittelyä

(AACC 86-47.01). Han ja Tyler (2003) käyttivät tätä menetelmää tehden joitain muutoksia siihen. Punnittuihin näytteisiin lisättiin 75 mM kaliumfosfaattipuskuria (pH 6,0), jossa oli 52 mM natriumaskorbaattia ja 0,1 % (v/v) 2-merkptoetanolia. Näytteet homogenoitiin ennen 10 minuutin keittämistä. Trientsyymikäsittely tehtiin kolmessa osassa niin, että ensin lisättiin α -amylaasi, jota seurasi 4 tunnin inkubointi. Seuraavana lisättiin proteaasi ja tunnin inkuboinnin jälkeen lisättiin vielä kanan haiman konjugaasia. Viimeinen inkubointi kesti 4 tuntia. Määrittelyyn käytettiin *Lactobacillus rhamnosus* -bakteerin kantaa ATCC 7469.

Esikäsittelyissä eroja on esiintynyt muun muassa käytetyssä konjugaasissa sekä inkubointien kestossa. Han ja Tyler (2003) käyttivät tutkimuksissa yllä kuvatuksi kanan haiman konjugaasia, jota oli kaupallisesti tarjolla jauheena. Kaiken kaikkiaan inkuboinnit kestivät 9 tuntia. Dang ym. (2000) käyttivät uutokäsittelyissä puolestaan entsyymikäsittelyyn ihmisen plasman konjugaasia ja konjugaasi-inkuboinnin kestona oli 3 tuntia. Hefni ym. (2010) käyttivät eri näytteille erilaisia entsyymikäsittelyitä (mono-, di- tai trientsyymikäsittely), ja palkokasvinäytteille he olivat valinneet trientsyymikäsittelyn. Entsyymikäsittelyt poikkesivat kuitenkin muun muassa käsittelyjärjestyksen osalta hieman esimerkiksi Hanin ja Tylerin (2003) käyttämästä yllä kuvatusta entsyymikäsittelystä. Hefnin ym. (2010) tutkimuksessa näytteiden käsittely alkoi uuttopuskurin lisäyksellä ja homogenoinnilla, jonka jälkeen lisättiin α -amylaasi. Amylaasilisäyksen jälkeen näytteet uutettiin keittämällä niitä 12 minuuttia. Keittoa seurasi 1,5 tunnin proteaasi-inkubointi. Konjugaasientsyymi puolestaan lisättiin vasta sentrifugoinnin jälkeen, ja tähän käytettiin rotan seerumista eristettyä konjugaasia. Konjugaasi-inkubointi kesti 2 tunnin ajan, jonka jälkeen entsyymit inaktivoitiin ja näytteet sentrifugoitiin ja puhdistettiin.

Rychlik ym. (2007) käyttivät näytteiden puhdistukseen kiinteäfaasiuuttoa, jossa pylväässä oli vahva anioninvaihdin eli kyseessä oli SAX-puhdistus (engl. strong anion exchange). He testasivat SAX-puhdistusta sekä ennen entsyymikäsittelyitä että niiden jälkeen, ja vertailivat näiden välisiä tuloksia. Yleensä näytteiden puhdistus esimerkiksi kiinteäfaasiuutolla tehdään vasta trientsyymikäsittelyjen jälkeen, jolloin saadaan näytteestä poistettua epäpuhtauksia ennen nestekromatografista ajoa. Tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että kun puhdistus tehtiin jo ennen entsyymikäsittelyitä, olivat saannot parempia. Tämän esitettiin johtuvan siitä, että mahdolliset näytematriisin sisältämät entsyymi-inhibiittorit saadaan poistettua näytteestä ja siten entsyymikäsittelyt ovat tehokkaammat.

2.4.2 Folaattipitoisuuden määrittäminen

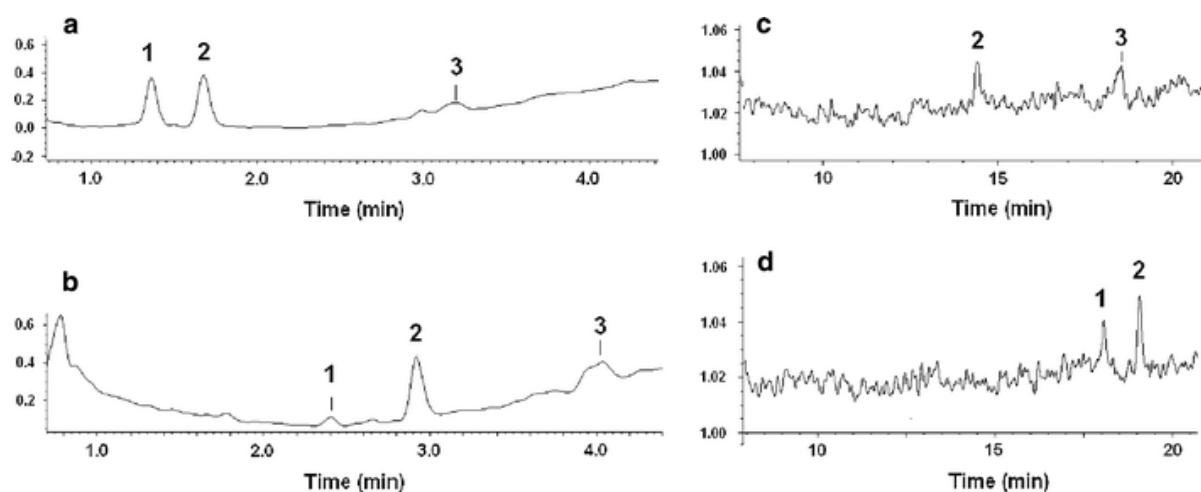
Folaattipitoisuuden määrittämiseen on käytetty erilaisia menetelmiä, joita ovat muun muassa mikrobiologinen menetelmä, nestekromatografinen menetelmä ja menetelmä, jossa määrittäminen perustuu leimatun folaatin sitoutumiseen folaattia sitovaan proteiiniin (Patring 2007). Näistä etenkin mikrobiologista ja nestekromatografista menetelmää käytetään laajasti elintarvikkeiden folaattipitoisuuksien määrittämiseen.

Mikrobiologinen menetelmä perustuu mikrobiin, joka vaatii folaattia kasvaakseen (Patring 2007). Mikrobin kasvu näytteessä on verrannollinen näytteen folaattipitoisuuteen, ja mikrobin kasvun myötä liuos samenee. Punnetun näytteen folaattimäärä voidaan määrittää liuoksen sameuden perusteella laimennokset huomioiden. Mikrobiologinen menetelmä on herkkä, mutta toisaalta haasteena on mahdollinen folaatti- tai mikrobikontaminaatio. Mikrobiologisella menetelmällä saadaan määritettyä kokonaisfolaattipitoisuus.

Nestekromatografisen menetelmän hyötynä on kyky erottaa eri folaattivitameerit, jolloin saadaan määritettyä näytteen sisältämien folaattien vitameerijakauma (Patring 2007). Yleisimmin käytettyjä detektoreita ovat UV- ja fluoresenssidetektorit, mutta määrittämiseen on käytetty myös esimerkiksi nestekromatografian ja massaspektrometrin LC-MS-yhdistelmää (Patring 2007; Rychlik ym. 2007). Esimerkiksi Rychlik ym. (2007) käyttivät LC-MS/MS-yhdistelmää määrittäessään eri palkokasvien folaattipitoisuuksia. Tutkimuksissaan he käyttivät nestekromatografia, jossa oli C18-käänteisfaasikolonne ja detektoreina sekä kolmoiskvadrupolimassaspektrometri että fotodiodirividetektorit. Folaattivitameerien määrittämiseen käytettiin sisäisenä standardina isotooppileimattuja folaattivitameereja, joiden avulla saatiin määritettyä folaattien hävikki määrityksen aikana.

Fazili ym. (2007) vertailivat kokonaisfolaattipitoisuuden määrittämiseen käytettävää mikrobiologista menetelmää ja folaattivitameerejä määrittävää LC-MS/MS-menetelmää. Tutkimuksessa LC-MS/MS-menetelmällä kyettiin määrittämään viisi folaattivitameeriä, joita olivat 5-metyylitetrahydrofolaatti, foolihappo, 5-formyyliitetrahydrofolaatti, tetrahydrofolaatti ja 5,10-metenyyliitetrahydrofolaatti. Tutkimuksessa havaittiin, että LC-MS/MS-menetelmällä saatiin hieman suurempia kokonaisfolaattipitoisuuksia kuin mikrobiologisella menetelmällä. Ero oli kuitenkin melko pieni ja tulosten välinen korrelaatiokerroin olikin 0,97, mikä tarkoittaa, että tulosten välillä oli suuri lineaarinen riippuvuus.

Tutkimusta on tehty myös suuren erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC) ja erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografian (UPLC) eroista elintarvikkeiden folaattimäärityksissä (Jastrebova ym. 2011). Kyseisten kromatografiatekniikkojen erona on se, että UPLC-kolonneissa stationäärifaasin partikkelikoko on pienempi, ja tämän myötä erottuminen on tehokkaampaa ja ajoaika lyhyempi. Kuvassa 6 on esitettyä neljä eri kromatogrammia, samasta näytteestä. Kromatogrammit a ja b on saatu ajamalla kahdella eri C18-kolonnilla UPLC-laitteistolla, kun taas kromatogrammit c ja d on peräisin kahdesta eri HPLC-ajosta C18-kolonnein. UPLC:n kromatogrammeissa signaalin suhde kohinaan on selvästi suurempi kuin HPLC:n kromatogrammeissa, ja siten myös toteamisraja on UPLC-laitteistolla pienempi.



Kuva 6. HPLC- ja UPLC-kromatogrammit samasta folaattinäytteestä (Jastrebova ym. 2011). Kromatogrammit a ja b on ajettu UPLC-laitteistolla kahta eri C18-kolonnilla käyttäen, kun taas kromatogrammit c ja d on ajettu HPLC-laitteistolla kahdella eri C18-kolonnilla.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

3.1 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

Tämä tutkimus oli osa Helsingin yliopiston Viikin kampuksella eri tutkimusalojen kanssa yhteistyössä toteutettavaa *Grain legume quality for food purposes* -hanketta. Hankkeen tavoitteena on kehittää kotimaisten palkokasvien elintarvikekäyttöä. Esimerkiksi kasvisyöjille palkokasvit ovat merkittävä proteiinien lähde, mutta maailmanlaajuisesti palkokasveista eniten ravinnoksi käytetty soijapapu ei sovellu viljeltäväksi Suomen oloissa (Sektoritutkimuksen neuvottelukunta 2010). Palkokasveista etenkin Haags Blaue -sinilupiinilajikkeeseen on havaittu soveltuvan hyvin Suomen viljelyoloihin (Stoddard ym. 2009). Sinilupiinia (*Lupinus angustifolius*) voitaisiin käyttää muun muassa osana gluteenitonta leivontaa lisäämällä lupiinia jauhoihin, ja lisäksi lupiinista voitaisiin tehdä fermentoimalla tofun kaltaisia tuotteita. Fermentoimalla voitaisiin valmistaa myös lupiinia sisältäviä maitopohjaisia tai maitoa korvaavia juomia.

Suomessa elintarvikkeita ei täydennetä folaatilla, mutta kuitenkin suomalaisten folaattien saanti on tutkimusten mukaan liian vähäistä (Paturi ym. 2008). Sinilupiini onkin folaattien saannin kannalta kiinnostava elintarvikeraaka-aine, sillä se sisältää luonnostaan suuria pitoisuuksia folaattia. Elintarvikkeiden folaattipitoisuuksia voidaan kasvattaa prosessoinnin avulla. Esimerkiksi Kariluoto ym. (2006b) ovat tutkineet idätyksen vaikutusta rukiin folaattipitoisuuteen, ja käsittelyn havaittiin kasvattavan folaattipitoisuutta jopa 4-kertaiseksi. Myös fermentoinnilla on tutkittu olevan vaikutusta rukiin folaattipitoisuuksiin (Kariluoto ym. 2006a).

Tässä tutkimuksessa haluttiin tutkia kyseisten käsittelyiden vaikutuksia sinilupiinin kokonaisfolaattipitoisuuteen. Työssä tavoitteena oli tutkia, saadaanko sinilupiinin luonnostaan suurta folaattipitoisuutta kasvatettua idätyksen ja fermentoinnin avulla. Lisäksi tutkittiin myös kyseisten prosessointimenetelmien vaikutuksia lupiinin folaattivitameerijakaumaan. Vitameereistä oltiin kiinnostuneita etenkin sen vuoksi, että eri vitameerien stabiiliudet vaihtelevat suurestikin. Näin ollen elintarvikekäytössä kiinnostavimpia olisivat sellaiset raaka-aineet, joiden folaattivitameerit eivät hajoaisi herkästi esimerkiksi hapen tai valon vaikutuksesta.

3.2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.2.1 Käytetyt reagenssit, standardit ja laitteet

Tässä luvussa on listattuna tutkimuksessa käytetyt reagenssit, standardit ja näytteiden käsittelyyn käytetyt laitteet. Kokonaisfolaattipitoisuuden ja vitameerijakauman määrittämiseen käytetyt laitteet on kuvattu erikseen tekstissä kyseisten määrittämenetelmien kuvauksen yhteydessä.

Reagenssit

Affi-Gel 10 Gel, Aktiivinen esteriagaroozi, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Yhdysvallat

α -amylaasi, EC 3.2.1.1, A-6211, tuottajaorganismi *Aspergillus oryzae*, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

L-askorbiinihappo, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

Borax, natriumtetraboraatti (99 %), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

CHES, 2-(sykloheksyyliamino)-etaanisulfonihappo (99,0 %), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

Dikaliumvetyfosfaatti, K_2HPO_4 , Avantor Performance Materials, Phillipsburg, New Jersey, Yhdysvallat

DL-ditiotreitoli, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

Etanolamiini, hydrokloridi, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

Folaattia sitova proteiini, FBP, Scripps Laboratories, San Diego, Yhdysvallat

Folic acid casei medium (kasvatusalusta), Difco, BD, Franklin Lakes, New Jersey, Yhdysvallat

D-glukoosi, Merck, Darmstadt, Saksa

Glyseroli (99,0 %), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

HEPES, 4-(2-hydroksietyyli)-piperatsiini-1-etaanisulfonihappo, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat

Kaliumdivetyfosfaatti, KH_2PO_4 , Merck, Darmstadt, Saksa
 2-merkaptetaanoli, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
 Natriumasetaatti, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
 (+)-natrium-L-askorbaatti, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
 Natriumatsidi, Merck, Darmstadt, Saksa
 Natriumvetykarbonaatti, NaHCO_3 , Merck, Darmstadt, Saksa
 Piperatsiini, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
 Proteaasi, EC 3.4.24.31, P-5147, tuottajaorganismi *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
 Trifluoroetikkahappo, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
 tris-(hydroksimetyyli)-aminometaani, Tris-emäs, Merck, Darmstadt, Saksa

Standardit

Foolihappo, PteGlu- Na_2 , Merck Eprova, Saksa
 5-formyyli-tetrahydrofolaatti, (6S)-5-HCO- H_4 PteGlu x Na_2 , Merck Eprova, Saksa
 10-formyyli-foolihappo, Schircks Laboratories, Jona, Sveitsi
 5,10-metenyyli-tetrahydrofolaatti, (6R,S)-5,10- CH^+H_4 PteGlu-Cl x HCl, Merck Eprova, Saksa (10-CHO- H_2 -standardin syntetisointia varten)
 5,10-metenyyli-tetrahydrofolaatti, (6R)-5,10- CH^+H_4 PteGlu-Cl x HCl, Merck Eprova, Saksa
 5-metyyli-tetrahydrofolaatti, (6S)-5- CH_3 - H_4 PteGlu-Ca, Merck Eprova, Saksa
 Pteroyylitriglutamaatti, TriGlu, Schircks Laboratories, Jona, Sveitsi
 Tetrahydrofolaatti, (6S)- H_4 PteGlu- Na_2 , Merck Eprova, Saksa

Näytteiden käsittelyssä käytettyjä laitteita

Analyysivaaka, Precisa XT 220A, Precisa Gravimetrics, Dietikon, Sveitsi
 Homogenisaattori, Ultra-Turrax, IKA-Labortechnik, Staufen, Saksa

Impact-kuorija, Rivakka, Nipere Oy, Teuva, Suomi

Lämpökaappi, Memmert, Schwabach, Saksa

Mikrotiitterilevyt, 96-kuoppaisia, Costar 3596, Corning Incorporated, Corning, New York, Yhdysvallat

Pakkaskuivuri, Heto Drywinner FD8, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat

pH-mittari, PHM220, MeterLab, Radiometer Analytical, Lyon, Ranska

Retsch-mylly, Ultra Centrifugal Mill ZM 200, Retsch, Haan, Saksa

Spektrofotometri, Lambda 25, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat

Vesihaude, Grant GLS400, Keison International, Chelmsford, Essex, Iso-Britannia

3.2.2 Näytteet ja koeasetelma

Näytteinä olleet lupiinin siemenet saatiin Helsingin yliopiston maataloustieteiden laitokselta. Tutkimuksessa käytettiin Haags Blaue -sinilupiinilajiketta, jonka siemenet olivat Viikissä kasvaneesta vuoden 2011 sadosta. Korjuun jälkeen siemenet oli kuivattu 45 °C:ssa ja siemeniä oli varastoitu valolta suojattuna. Varaston lämpötila oli vaihdellut ulkolämpötilan mukaan.

Kaikki tutkimuksissa käytetyt näytteet valmistettiin itse elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella. Lupiinin siemeniä säilytettiin +4 °C:ssa ennen siementen käsittelyä ja siemenistä valmistetut näytteet säilytettiin –20 °C:ssa. Näytteiden käsittely tehtiin valolta suojattuna. Työskentelylaboratorion valaistuksen aallonpituus oli 550–600 nm, ja työskenneltäessä muualla näyteastiat suojattiin valolta esimerkiksi alumiinifoliolla.

Alkuperäisille siemenille tehtiin muun muassa kuivaus-, kuorinta- ja jauhatuskäsittelyitä. Lupiinin siemenille tehtiin myös kaksi rinnakkaista idätyskoetta, joissa siemeniä liotettiin ennen idätystä vedessä. Näiden idätysten lisäksi kokeiltiin idätystä liottamalla siemeniä veden sijaan maitohappoliuoksessa. Fermentointikokeet tehtiin sekä idättämättömille että idätetyille lupiinin siemenille. Fermentointiin valittiin kaksi mikrobia: *Streptococcus thermophilus* -bakteeri ja *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva. Lupiinin tiedetään sisältävän vain vähän tärkkelystä, joten sen ajateltiin mahdollisesti olevan sellaisenaan liian vähäravinte-

nen kasvualusta *Saccharomyces cerevisiae* -hiivalle. Näin ollen hiivalla fermentointi kehitettiin sekä glukoosilisällä että ilman glukoosilisää.

Työssä käytettiin sertifioitua referenssimateriaalia laadunvarmistukseen. Referenssimateriaalina oli vitamiinimäärityksiin tarkoitettu täysjyväjauho BCR-121 (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgia). Vertailunäytteelle oli ilmoitettu varmennetuksi folaattipitoisuudeksi $0,50 \pm 0,07$ mg/kg. Jokaisen näytesarjan yhteydessä määritettiin myös vertailunäyte, jonka tuloksen tuli osua välille 0,43–0,57 mg/kg, jotta varsinaisten näytteiden tuloksia voitiin pitää luotettavina.

3.2.3 Kuiva-ainemääritykset

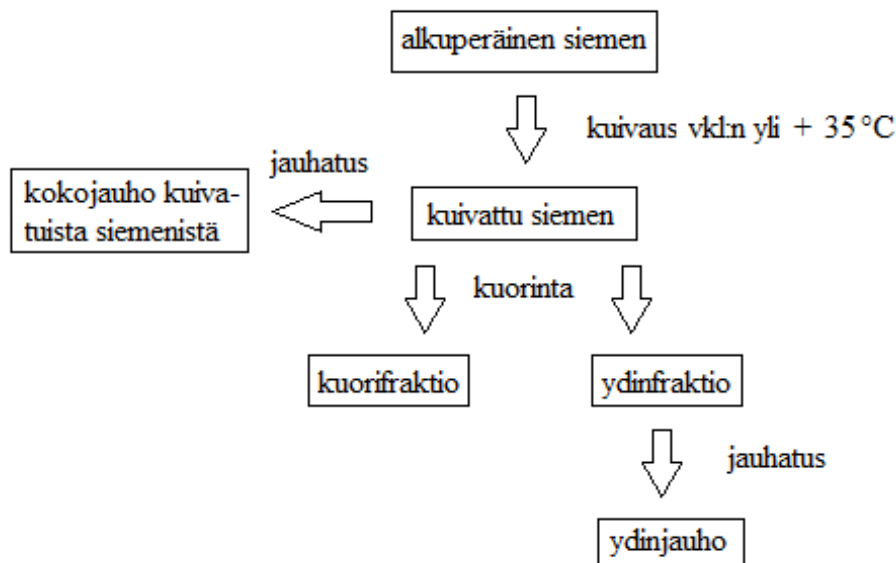
Näytteiden kuiva-ainemääritykset tehtiin gravimetristä menetelmää käyttäen ja kukin näyte määritettiin kahtena rinnakkaisena. Määrityksissä sovellettiin AACC:n menetelmää 44-15A (AACC American Association of Cereal Chemists 2000). Kannellisia lasisia punnitusastioita kuumennettiin lämpökaapissa 103 °C:ssa 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen astiat jäähdytettiin huoneenlämpöön eksikaattorissa, ja astioihin punnittiin näytettä noin 1 g. Näyteastiat asetettiin avonaisina lämpökaappiin 103 °C:een yön yli, jonka aikana näytteesä oleva kosteus ehti haihtua. Astiat jäähdytettiin, ja näyteastiat punnittiin. Näytteistä laskettiin kuiva-ainepitoisuudet haihtuneiden kosteusmäärien perusteella.

Idätyskokeiden itunäytteille tehty kuiva-ainemääritys poikkesi hieman yllä kuvatusta menetelmästä. Näytteiden vähäisen määrän vuoksi ituja punnittiin 1 g sijaan vain noin 0,5 g. Lisäksi itunäytteiden kohdalla havaittiin noin 18 tunnin haihdutusajan olevan liian pitkä, sillä tänä aikana näytteet ehtivät palaa. Sopivaksi haihdutusajaksi havaittiin kaksi tuntia.

3.2.4 Bioprosessoimattomat lupiinien siemenet

Kuvassa 7 on esitettyä kaaviona alkuperäisille siemenille tehdyt kuivaus-, kuorinta- ja jauhatuskäsittelyt, ja kokonaisfolaattipitoisuudet määritettiin kaikista kaaviossa esitetyistä näytteistä. Alkuperäisiä siemeniä kuivattiin viikonlopun ajan lämpökaapissa +35 °C:ssa,

jonka jälkeen kuivatuista siemenistä jauhettiin kokojauhoa. Kuivatuille kokonaisille siemenille tehtiin myös kuorintakäsittely, jossa erotettiin siemenen kuori- ja ydinfraktiot toisistaan Impact-kuorijalla. Molemmista fraktioista määritettiin kokonaisfolaattipitoisuus sellaisenaan, mutta lisäksi ydinfraktiosta jauhettiin ydinjauhoa, jonka folaattipitoisuus myös määritettiin.



Kuva 7. Lupiinin siemenille tehdyt kuivaus-, kuorinta- ja jauhatuskäsittelyt.

Lupiinjauhojen vitameerijakaumat määritettiin kuivatuista siemenistä tehdyistä kokojauhoista ja ydinjauhoista, ja jauhoista valmistettiin näytteet kahdella eri tavalla. Toinen tapa oli käsitellä näytteet samalla tavoin kuin kokonaisfolaattipitoisuuksien määrittämiseksi varten eli näytteeseen lisättiin uuttopuskuri kuumentamattomana. Tämän lisäksi vitameerijakauman määrittämiseksi varten valmistettiin myös kokojauho- ja ydinjauhonäytteet, joihin uuttopuskuri lisättiin kuumennettuna. Folaattivitameerimuotojen muuntumista toiseksi vitameerimuodoiksi voi tapahtua entsyymaattisesti uuton ja homogoinnin aikana (Vahteristo ym. 1998). Kuumennuksen tarkoituksena oli inaktivoida jauhon sellaiset entsyymit, jotka voisivat aktiivisina aiheuttaa juuri tällaista vitameerimuotojen muuntumista.

3.2.5 Lupiinin idätys

Idätyskokeet suoritettiin käyttäen nostatuskaappia, jonka lämpötila säädettiin +15 °C:een ja suhteellinen kosteus 100 %:iin. Idätystä varten lupiinin siemeniä liotettiin yön yli vesijohdovedessä +4 °C:ssa, ja tämän aikana siementen massa 2,4-kertaistui. Liotetut siemenet aseteltiin imupaperin päälle ja siemeniä suihkutettiin päivittäin. Näyte kerättiin vuorokauden välein, ja idätyksen kesto oli ensimmäisessä idätyskokeessa 5 vuorokautta ja toisessa idätyskokeessa 4 vuorokautta. Kuvassa 8 on esitettyä idätyskoe I:n kaksi vuorokautta idätettyjä siemeniä. Kuvasta voidaan nähdä, että itämättömät siemenet ovat jakaantuneet tasaisesti, eikä itäminen ole siis tapahtunut epätasaisesti. Näytteiden kerääminen tehtiin niin, että imupaperilla olevat siemenet sekoitettiin keskenään, ja tämän jälkeen näyte kerättiin mahdollisimman tasaisesti eri puolilta. Itämättömiä siemeniä ei poistettu näytteistä. Siemenet kuorittiin käsin mahdollisimman pian keräämisen jälkeen ja niistä otettiin idut erilleen. Jokaiselta idätyspäivältä otettiin talteen kuori-, ydin- ja itufraktiot.



Kuva 8. Idätyskoe I:n kaksi vuorokautta itäneitä siemeniä.

Vesiliotuksen lisäksi tehtiin yksi idätyskoe niin, että siemeniä liotettiin ennen idättämistä 0,1-prosenttisessa maitohappoliuoksessa, jonka pH oli noin 3. Suvi Vikstenin (2012) maisterin tutkielmassa kehitettiin idätysmenetelmä lupiineille, ja Viksten havaitsi tutkielmasaan siementen punertumista kahden vuorokauden idättämisen jälkeen. Punertumisen epäiltiin johtuvan mikrobien toiminnasta tai kemiallisista muutoksista siemenissä, ja maitohappoliotusta kokeiltiin nyt siementen mahdollisesti sisältämien mikrobien kasvun inhiboimiseksi.

Kokonaisfolaatipitoisuudet määritettiin mikrobiologisella menetelmällä kaikkien idätyskokeiden ydin-, itu- ja kuorifraktioista. Vitameerijakaumat määritettiin nestekromatografisesti myös kaikkien kolmen idätyskokeen ydinfraktioista. Koska liotusliuoksella ei havaittu olevan vaikutusta ydinten vitameerijakaumaan, määritettiin vitameerijakauma vain idätyskokeen I itunäytteille. Kuorifraktioiden vitameerijakaumia ei määritetty.

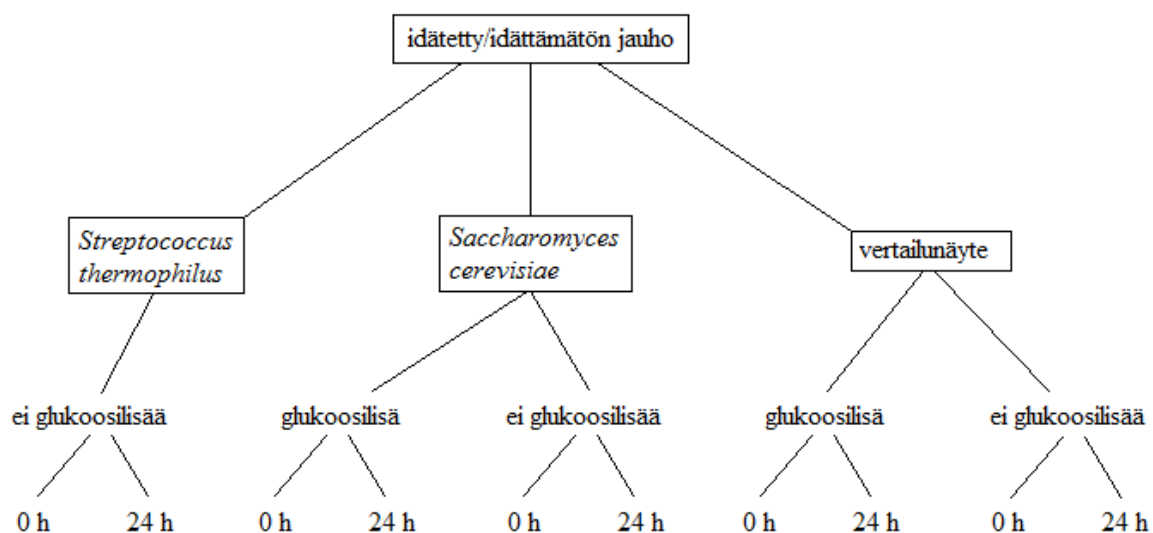
3.2.6 Lupiinin fermentointi

Fermentointikokeet tehtiin sekä idätetylle että idättämättömälle näytteelle. Idättämättömänä näytteenä oli kuivatuista kuorituista siemenistä jauhettu ydinjauho. Lisäksi fermentointia varten tehtiin idätetyistä siemenistä jauhettu ydinjauho. Tätä varten lupiinin siemeniä liotettiin yön yli, ja liotettuja siemeniä idätettiin kaksi vuorokautta samoissa oloissa kuin idätyskokeita tehtäessä. Idätetyt siemenet kuorittiin, ja ydinfraktiota eli kuorittuja siemeniä kuivattiin pakkaskuivurissa -80 °C :ssa kolmen vuorokauden ajan. Kuivatut ytimet jauhettiin Retsch-myllyllä.

Fermentointikokeeseen valittiin kaksi mikrobia: *Streptococcus thermophilus*-bakteeri (kanta ABM 5097) ja *Saccharomyces cerevisiae*-hiiva (kanta ALKO 743). Mikrobit saatiin elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen mikrobiologian osastolta YPD-liemessä. *Streptococcus thermophilus* oli esikasvatettu 37 °C :ssa kolmen vuorokauden ajan ja *Saccharomyces cerevisiae* puolestaan 28 °C :ssa neljän vuorokauden ajan.

Fermentointikoetta varten tehtiin jauho-vesiseos punnitsemalla 3 g jauhoa/30 ml MQ-vettä. Hiivafermentoinnit tehtiin sekä 1-prosenttisellä glukoosilisällä että ilman, ja fermentoinnit *Streptococcus thermophilus* -bakteerilla tehtiin ilman glukoosilisää. Näytteistä tehtiin ver-

tailunäytteet, joihin ei lisätty mikrobeja. Vertailunäytteiden avulla saatiin selville näytteiden mahdollisesti sisältämien mikrobien fermentoinnin aikana tuottaman folaatin määrä. Varsinaisiin fermentaationäytteisiin lisättiin mikrobi-YPD-lientä 0,6 ml/30 ml, ja vertaamalla näiden näytteiden folaattipitoisuuksia vastaavien vertailunäytteiden folaattipitoisuuteen saatiin laskettua *Streptococcus thermophilus* -bakteerin tai *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan tuottaman folaatin määrä kussakin näytteessä. Seoksista otettiin näytteet kahtena aikapisteenä niin, että ensimmäinen näyte otettiin ennen fermentointia (aikapiste 0 h) ja toinen näyte fermentoinnin kestänyttä vuorokauden (aikapiste 24 h). Fermentointikaavio on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9. Fermentointikaavio.

Fermentointikaavion mukainen koe ehdittiin suorittamaan vain kerran. Fermentointikoe tehtiin osana tämän maisterin tutkielman kokeellista osaa, mutta näytteiden kokonaisfolaattipitoisuudet määritettiin mikrobiologisella menetelmällä myöhemmin elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen elintarvikekemian osastolla. Fermentointinäytteiden uutot ja trientsyymikäsittelyt suoritti tutkimusapulainen Maheswor Gautam ja levytyksen tutkija-tohtori Susanna Kariluoto.

3.2.7 Kokonaisfolaattipitoisuuden määrittäminen mikrobiologisesti

Standardin valmistus

Kokonaisfolaattipitoisuuden määrittämisessä standardina käytettiin (6S)-5-formyyli-tetrahydrofolaattia. Standardiliuos valmistettiin liuottamalla 25 mg standardia 25 ml:n mittapullossa 0,05 M Borax / 0,4 % merkaptetaanoli -liuokseen ja täyttämällä mittapullo merkkiin. Tästä pipetoitiin 0,5 ml 50 ml:n mittapulloon ja täytettiin merkkiin 0,05 M Borax / 1 % askorbiinihappo -liuoksella. Tätä liuosta pakastettiin pienissä erissä käytettäväksi standardina mikrobiologisessa määrittäyksessä.

Standardiliuoksen pitoisuus tarkistettiin spektrofotometrisesti pipetoimalla 100 µl 0,05 M Borax / 0,4 % merkaptetaanoli -liuokseen liuotettua standardia 10 ml:n mittapulloon ja täyttämällä mittapullo merkkiin 0,1 M K_2HPO_4 -liuoksella, jonka pH oli 7. Spektri ajettiin aallonpituusalueella 200–400 nm, ja näin varmistettiin, että aallonpituusmaksimi oli 285–286 nm. Absorbanssi mitattiin maksimiaallonpituudella kahdesti ja absorbanssin avulla laskettiin standardiliuoksen pitoisuus. Pitoisuuden perusteella laskettiin, kuinka paljon standardia tuli laimentaa ennen levyille pipetoimista mikrobiologisessa määrittäyksessä. Lisäksi pitoisuuden perusteella laskettiin standardisuoran pisteiden tarkat folaattipitoisuudet.

Entsyymien valmistus

Näytteille tehtiin trientsyymikäsittely, jossa entsyymeinä käytettiin sian munuaisesta eristettyä konjugaasia HK:ta (hog kidney conjugase), α -amylaasia ja proteaasia. α -amylaasin tarkoituksena oli pilkkoa näytteiden tärkkelystä pienemmiksi sakkarideiksi, proteaasi pilkkoi proteiineja ja konjugaasia lisättiin, jotta folaattien polyglutamaattimuodot saataisiin pilkottua monoglutamaateiksi. Amylaasista valmistettiin liuos, jonka pitoisuus oli 20 mg/ml ja proteaasista liuos, jonka pitoisuus oli 2 mg/ml. Sekä amylaasi- että proteaasiluos valmistettiin 1-prosenttiseen Na-askorbaattiin ja ne pakastettiin ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pienissä erissä.

HK uutettiin tuoreista sian munuaisista Gregoryyn ym. (1984) kehittämällä menetelmällä. Munuaiset pilkottiin ja homogenoitiin tehosekoittimessa lisäämällä n. 1700 ml 10 mM merkaptoetanolia. Homogenaatin pH säädettiin 2,5 M etikkahapolla arvoon 5 ja sentrifugoitiin (2–4 °C, 20 min, 10 000 rpm). Supernatantteja inkuboitiin 2 tunnin ajan +50 °C:ssa ja inkuboinnin jälkeen sentrifugointi toistettiin. Proteiini saostettiin ammoniumsulfaattilla niin, että saostuneen proteiinin määrä suureni 0 %:sta 30 %:iin, ja tätä varten tarvittava ammoniumsulfaattimäärä lisättiin kolmessa osassa 10 minuutin välein. Seoksen annettiin seistä vielä 30 minuuttia. Seos sentrifugoitiin kuten aikaisemmin ja saadun supernatantin proteiinit saostettiin 30 %:sta 50 %:iin samalla tavoin kuin aiemmin. Seos sentrifugoitiin vielä kerran ja saostus uusittiin saostamalla proteiinit 50 %:sta 75 %:iin. Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen sakka liuotettiin 150 ml:aan dialyysipuskuria (0,05 M Na-asetaatti / 10 mM merkaptoetanolii; pH 5). Liuos siirrettiin dialyysiletkuihin (12 000–14 000 D, Mediacell, Iso-Britannia) ja dialysoitiin yön yli dialyysipuskurissa. Dialysoinnin jälkeen entsyymi pakastettiin (–20 °C) pienissä erissä.

Näytteiden esikäsittely

Mikrobiologinen kokonaisfoliaattipitoisuuden määrittäminen esikäsittelyineen tehtiin Kariluodon ym. (2001) kehittämällä menetelmällä. Eksikaattorissa tasaantuneita näytteitä punnittiin analyysivaa'alla kahtena rinnakkaisena sentrifugointiputkiin. Varsinaisten näytteiden lisäksi tehtiin myös vertailunäyte (CRM121, BCR Reference material n°121) ja nollanäyte. Näytteisiin lisättiin noin 10–15 ml uuttopuskuria (50 mM CHES / 50 mM HEPES, 10 mM 2-merkaptoetanolii, 2 % Na-askorbaattia), jonka pH oli säädetty arvoon 7,85. Typetettyjä näytteitä keitettiin 10 minuutin ajan vesihautessa, ja jäähtymisen jälkeen näytteet tarvittaessa homogenoitiin Ultra-Turrax -homogenisaattorilla.

Näytteille tehtiin trientsyymikäsittely kahdessa osassa. Ensimmäisessä vaiheessa näytteiden pH säädettiin arvoon 4,9 ja näytteisiin lisättiin 1,5 ml HK:ta ja 1 ml α -amylaasia. Näytteet typetettiin ja niitä inkuboitiin 3 tuntia +37 °C:ssa vesihautessa. Trientsyymikäsittelyn toisessa vaiheessa pH säädettiin arvoon 7 ja näytteisiin lisättiin 2 ml proteaasia. Typetettyjen näytteiden inkubointia jatkettiin vielä tunnin ajan, jonka jälkeen entsyymit inaktivoitiin keittämällä näytteitä vesihautessa 5 minuuttia.

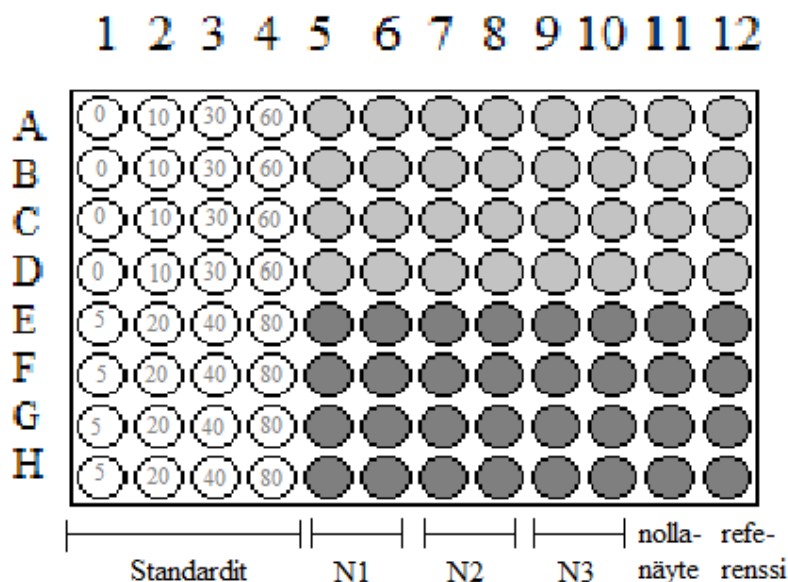
Entsyymikäsiteltyjä näytteitä sentrifugoitiin 10 minuutin ajan +4 °C:ssa kierrosnopeudella 15 000 rpm. Supernatantit siirrettiin 25 ml:n mittapulloihin ja sentrifugointiputkiin lisättiin 5 ml 0,5-prosenttista Na-askorbaattia (pH 6,1). Sentrifugointi toistettiin ja supernatantit lisättiin 25 ml:n mittapulloihin. Mittapullot täytettiin merkkiin 0,5-prosenttisella Na-askorbaatilla (pH 6,1), ja näistä liuoksista tehtiin 10 ml:n mittapulloihin kahdet eri laimennokset täyttämällä mittapullot merkkiin 0,5-prosenttisella Na-askorbaatilla (pH 6,1). Laimennokset laskettiin siten, että laimennosten arvioitu folaattipitoisuus oli 20–40 pg/100 µl. Standardista puolestaan valmistettiin välilaimennoksen kautta käyttöliuos, jonka pitoisuus oli noin 1000 pg/ml.

Mikrobiologinen määrittäminen

Näytteiden kokonaisfolaattipitoisuus määritettiin näytteistä Kariluodon ym. (2001) julkaisemalla menetelmällä. Määrittämisessä käytettiin *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 -bakteeria, joka oli säilytetty glyseroliin ja säilytetty -70 °C:ssa. Määrittämistä varten bakteeriliuos sulatettiin nopeasti ja siirrostettiin 1 ml bakteeriliuosta 2,5 ml:aan saliniä (0,9 % NaCl-liuos). Määrittämistä varten valmistettiin myös kasvatusalustaa, joka valmistettiin 75-prosentin vahvuuteen valmistajan suosittelemasta vahvuudesta. Kasvatusalustajauhetta punnittiin kahta mikrotiitterilevyä varten 3,575 g ja lisättiin 50 ml MQ-vettä. Seos kiehausutettiin, jotta kaikki jauhe saatiin liuotettua, ja tämän jälkeen liuokseen lisättiin 37,5 mg askorbiinihappoa. Liuoksen pH säädettiin arvoon 6,1 ja liuos suodatettiin autoklavoituun säilöpulloon steriilillä ruiskulla ja ruiskusuodattimella (0,2 µm).

Määrittämisessä käytettiin 96-kuoppaisia mikrotiitterilevyjä. Kuvassa 10 on esitetty malli pipetointikaaviosta. Levyille pipetoitiin jokainen pipetointi neljänä rinnakkaisena niin, että jokaisen sarakkeen (1–12) kuoppien A–D pipetoinnit olivat rinnakkaisia keskenään samoin kuin kuoppien E–H pipetoinnit. Sarakkeille 1–4 pipetoitiin standardia ja 0,5-prosenttista Na-askorbaattia (pH 6,1) niin, että näiden yhteistilavuus kussakin kuopassa oli 100 µl. Standardiliuosta pipetoitiin kuoppiin 1 A–D 0 µl, ja standardin pipetointimäärä kasvoi pipetointikaavion mukaisesti niin, että kuoppiin 4 E–H pipetoitiin standardiliuosta 80 µl. Jokaisesta näytteestä oli tehty kaksi rinnakkaista, joista molemmista pipetoitiin levyille kahda eri laimennosta. Lisäksi levyille pipetoitiin vertailunäyte ja näytteiden laimennoksia vas-

taavat nollanäytteet. Lopuksi kasvatusalustaan lisättiin 150 µl mikrobi-saliiniliuosta ja kasvatusalustaa pipetoitiin levyille 8-kanavaisella pipetillä 200 µl/kuoppa. Levyjä inkuboitiin 18 tunnin ajan lämpökaapissa +35 °C:ssa.



Kuva 10. Pipetointikaaviomalli. Standardisuoran kuoppiin on merkitty µl-määrä, joka kuhunkin kuoppaan on pipetoitu standardia. Kaavioon on merkitty eri tummuuksilla näytteiden eri laimennokset.

Inkuboinnin jälkeen kuoppien liuoksen sameudet mitattiin turbidometrisesti lukijalaitteella (Multiskan EX, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat) käyttäen mitta-osaallonpituutena aallonpituutta 595 nm. Kvantitoimiseen käytettiin ulkoisen standardin menetelmää, jossa kuoppien folaattimäärät (pg) kvantitoitiin vertaamalla näyteliuoksien sameuksia standardisuoran liuosten sameuksiin. Kunkin kuopan näyteliuokselle määrittäystä folaattimäärästä vähennettiin näytteen laimennosta vastaavan nollanäytteen folaattimäärä kuopassa. Tulosten perusteella saatiin laskettua laimennoskerrointen ja alkuperäisen näytteen punnitusmäärän avulla näytteen folaattipitoisuus tuorepainoa kohden. Tulokset laskettiin näytteille määritettyjen kuiva-ainepitoisuuksien perusteella kuiva-ainetta kohden ja ilmoitettiin yksikössä ng/g kuiva-ainetta. Poikkeuksena tästä olivat idätyskokeiden itu-näytteet, joilla kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen eivät täysin onnistuneet.

3.2.8 Folaattien vitameerijakauman määrittäminen nestekromatografisesti

Näytteiden esikäsittely

Näytteiden uutto-, trientsyymi- ja sentrifugointikäsittelyt folaattivitameerijakauman määrittämistä varten tehtiin Kariluodon ym. (2001) menetelmällä samoin kuin mikrobiologista menetelmää varten. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantit kerättiin 25 ml:n mittapulloon ja mittapullot täytettiin merkkiin 0,5-prosenttisella Na-askorbaatilla (pH 6,1).

Näytteet puhdistettiin vitameerijakauman määrittämistä varten affiniteetikromatografisesti (Kariluoto ym. 2001). Affiniteettipylväät valmistettiin pakkaamalla pylväisiin agarosigeeliä, johon oli sidottuna folaattia sitovaa proteiinia (FBP). Kariluoto ym. (2001) tutkivat pylväeseen laitettavan folaattimäärän vaikutusta folaattien sitoutumiseen ja havaitsivat, että pylväiden kapasiteetin vuoksi uutteista tuli valita affiniteetikromatografiseen puhdistukseen määrä, jossa arvioitu folaattimäärä oli noin 1,25–1,5 µg. Jos folaattimäärä oli tätä suurempi, 5-formyyli-tetrahydrofolaatin sitoutuminen pylväeseen oli heikkoa, sillä kyseisen vitameerin affiniteetti folaattia sitovaan proteiiniin on pienempi kuin muilla folaattivitameereilla.

Affiniteettipylväiden kapasiteetti testattiin pylväiden valmistuksen jälkeen foolihappoliuoksella ja samalla arvioitiin pylväiden kuolleeksi tilavuudeksi 1,4 ml. Näytteitä puhdistettaessa pylväät aktivoitiin pipetoimalla pylväisiin 10 ml 0,1 M K_2HPO_4 -liuosta (pH 7,0). Aktivoinnin jälkeen lisättiin näyte, joka oli suodatettu 0,45 µm:n suodattimella. Näytteen folaatit sitoutuivat pylvään folaattia sitovaan proteiiniin, ja epäpuhtauksia pestiin lisäämällä pylväeseen ensin 5 ml 0,025 M K_2HPO_4 / 1 M NaCl -liuosta (pH 7,0) ja sen jälkeen 5 ml 0,025 M K_2HPO_4 -liuosta (pH 7,0). Pesujen jälkeen pylväeseen lisättiin kuolleen tilavuuden verran eli 1,4 ml eluutioliuosta (0,02 M trifluoroetikkahappo / 0,01 M ditiotreitoli). Tämän avulla korvattiin pylvään geeliin jäänyt pesuliuos eluutioliuoksella. Kun pylvään geelin huokostilavuus oli täytetty eluutioliuoksella, vaihdettiin jäteastian tilalle pylväiden alle 5 ml:n mittapullot, joihin folaattifraktiot kerättiin. Mittapullojen pohjalle oli punnittu 10 mg Na-askorbaattia ja pipetoitu 30 µl 1 M piperatsiinia ja 5 µl 2-merkaptetanolia. Folaatit eluutiin mittapulloihin lisäämällä pylväisiin 4,85–4,95 ml eluutioliuosta. Folaattifraktioiden keräyksen jälkeen mittapullot täytettiin merkkiin eluutioliuoksella ja pylväitä

huuhdeltiin vielä 1,5 ml:lla eluutioliuosta, jotta kaikki folaatti varmasti eluoitui pylväistä. Lopuksi pylväät tasapainotettiin 10 ml:lla 0,1 M K_2HPO_4 -liuosta (pH 7,0) ja säilytettiin 0,2-prosenttisessa Na-atsidiliuoksessa. 5 ml:n folaattifraktiot suodatettiin vielä 0,2 μ m:n suodattimin ennen kromatografista määrittystä. Ylimääräiset folaattiuutteet pakastettiin ja säilytettiin -20 °C:ssa mahdollisia uusinta-ajoja varten.

Standardien valmistus

Folaattivitameerien kvantitointiin käytettiin ulkoisen standardin menetelmää, jossa standardeina käytettiin tetrahydrofolaattia (H_4), 5-metyylitetrahydrofolaattia (5- CH_3 - H_4), 5-formyyliitetrahydrofolaattia (5-CHO- H_4), 10-formyyliidihydrofolaattia (10-CHO- H_2), 5,10-metenyyliitetrahydrofolaattia (5,10- CH^+ - H_4), 10-formyylifoolihappoa (10-CHO-PGA) ja foolihappoa (PGA).

5-CHO- H_4 oli valmistettu jo mikrobiologista määrittystä varten, ja samalla tavoin valmistettiin myös PGA-, 10-CHO-PGA, H_4 -, 5,10- CH^+ - H_4 ja 5- CH_3 - H_4 -standardiliuokset. Ainoana erona 5-CHO- H_4 -standardiliuoksen valmistukseen näiden standardien kohdalla oli se, että viimeinen laimennos tehtiin pipetoimalla 50 ml:n mittapulloon standardiliuosta 0,5 ml:n sijaan 5 ml, ja näin ollen nämä standardit tehtiin pitoisuudeltaan noin kymmenkertaisiksi 5-CHO- H_4 -standardiin verrattuna. 10-CHO- H_2 -standardi syntetisoitiin 5,10- CH^+ - H_4 -standardista liuottamalla 10 mg 5,10- CH^+ - H_4 -standardia 25 ml:n mittapullossa 0,05 M TRIS / HCl -liuokseen (pH 8,3). Liuoksen annettiin hapettua ilman korkkia, kunnes UPLC:lla nähtiin kaiken 5,10- CH^+ - H_4 :n muuttuneen 10-CHO- H_2 :ksi. Kaikkien standardien pitoisuuden tarkistus tehtiin spektrofotometrisesti samalla tavoin kuin 5-CHO- H_4 -standardin, ja mittausaallonpituus valittiin kunkin yhdisteen aallonpituusmaksimin mukaan. Tarkistettujen pitoisuuksien perusteella laskettiin standardien tarkat pitoisuudet standardisuorien injektioissa.

Standardiliuoksista valmistettiin seos, jossa oli muita vitameeristandardeja paitsi 5,10- CH^+ - H_4 :a. Seos tehtiin 0,01 M Na-asetaatiliuokseen, jossa oli 1 % Na-askorbaattia ja 0,1 % merkptoetanolia ja jonka pH oli säädetty arvoon 4,9. Seoksessa kunkin vitameerin pitoisuus oli noin 0,2 ng/ μ l, ja poikkeuksena tästä oli 10-CHO- H_2 , jonka pitoisuus oli 0,4 ng/ μ l. Seokseen ei siis lisätty 5,10- CH^+ - H_4 :a, vaan siitä tehtiin oma standardiliuoksensa.

Liuos tehtiin samaan Na-asetaatiliuokseen kuin seoskin, ja liuoksen 5,10-CH⁺-H₄-pitoisuus oli 0,2 ng/μl. Sekä standardiseosta että 5,10-CH⁺-H₄-liuosta puhdistettiin affiniteettikromatografisesti eri määriä: 200 μl, 400 μl, 900 μl ja 1200 μl. Puhdistettuja fraktioita injektointiin nestekromatografille liitteen 1 mukaisesti niin, että saatiin muodostettua standardisuora.

Vitameerijakauman määrittäminen UPLC-menetelmällä

Folaattien vitameerijakauma määritettiin näytteistä erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia- eli UPLC-menetelmällä (Edelmann ym. 2012). Määrittäminen tehtiin UPLC-laitteistolla (Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters, Milford, Massachusetts, Yhdysvallat). Laitteistossa oli kiinnitettynä kolonniuuni, näytteenäytteenkäsittelykammio, binaarinen liuotinyksikkö ja detektorit, ja tulosten käsittelyyn käytettiin Empower 2 -ohjelmaa (Waters, Milford, Massachusetts, Yhdysvallat). Detektoreina käytettiin UV-diodirividetektoria, jolla mitattiin aallonpituuksilla 290 nm ja 360 nm, ja fluoresenssidetektoria, jonka viritys-/emissioarvoina käytettiin 290/356 nm ja 360/460 nm. Kolonnina käytettiin silikapohjaista C18- käänteisfaasikolonnia HSS T3 (2.1 x 30 mm, 1.8 μm) (Acquity HSS T3, Waters, Milford, Massachusetts, Yhdysvallat), ja kolonnin lämpötila ylläpidettiin +30 °C:ssa kolonniuunin avulla.

Ajoliuoksena käytettiin 30 mM kaliumdivetyfosfaattipuskuria (pH 2,2) ja asetonitriiliä, ja virtausnopeus ajon aikana oli 0,4 ml/min. Ajo suoritettiin 12 minuutin kestoisena gradienttina, jossa puskurin ja asetonitriilin suhde oli seuraavanlainen: KH₂PO₄-puskuri:ACN (v/v) 0–2,2 min 95:5; 2,2–4,7 min 93:7; 4,7–7,9 min 84,5:15,5; 7,9–8,3 min 95:5 ja lopuksi kolonnin tasapainotus 8,3–12,0 min 95:5. Näytteiden injektointimäärät vaihtelivat välillä 10–40 μl.

Vitameerien detektointi tehtiin sellaisella detektorilla ja aallonpituudella, että kyseiselle yhdisteelle saatiin mahdollisimman suuri vaste ja ettei kromatogrammissa ollut yhdisteen kohdalla häiritseviä piikkejä. 5-CH₃-H₄ ja H₄ detektoitiin fluoresenssidetektorilla viritys-/emissioaallonpituuksilla 290/356 nm ja 10-CHO-PGA fluoresenssidetektorilla viritys-/emissioaallonpituuksilla 360/460 nm. Muut vitameerit detektoitiin UV-detektorilla, ja

mittausaallonpituutena käytettiin 10-CHO-H₂:lla, 5-CHO-H₄:lla ja PGA:lla aallonpituutta 290 nm ja 5,10-CH⁺-H₄:lla aallonpituutta 360 nm.

Jokaiselle standardille tehtiin oma standardisuora, ja näyteinjektioiden sisältämät vitameerimäärät saatiin laskettua Empower 2-ohjelmalla (Waters, Milford, Massachusetts, Yhdysvallat) piikkien pinta-alojen perusteella vertaamalla niitä standardisuoriin. Alkuperäisten näytteiden vitameerimäärät saatiin laskettua ottamalla huomioon laimennokset ja alkuperäiset punnitustulokset. Tuloksia verrattiin vielä mikrobiologisesti määritettyihin kokonaisfolaattipitoisuuksiin.

3.2.9 Laadunvarmistus

Työssä laadunvarmistusta tehtiin eri tavoin. Näytteet määritettiin aina rinnakkaisineen, eikä rinnakkaisten näytteiden tulosten välinen ero saanut olla yli 10 %. Idätyskokeesta tehtiin toisto, sillä biologisissa kokeissa toistettavuus on usein huono, eikä näin ollen yksittäisen kokeen tuloksia voida tarkastella luotettavasti. Fermentointikoe ehdittiin tehdä vain kerran, mikä on otettava huomioon tuloksia tarkasteltaessa.

Jokaisen näytesarjan mukana määritettiin mikrobiologisessa määrittäyksessä myös sertifioitun vertailunäytteen folaattipitoisuus, ja tulokset merkittiin valvontakorttiin. Sertifioitulle vertailumateriaalille oli ilmoitettu folaattipitoisuudeksi $0,50 \pm 0,7$ ng/g kuiva-ainetta, joten vertailunäytteiden folaattipitoisuuksien tuli olla välillä 0,43–0,57 ng/g kuiva-ainetta. Lisäksi mikrobiologisessa menetelmässä laatua tarkkailtiin myös asettamalla standardien samuudelle nollassaolelle maksimiarvo ja 80 pg:n standarditasolle minimiarvo. Standardisuoran nollassaolella ei siis saanut tapahtua liuoksen samentumista, joka kertoisi esimerkiksi mikrobikontaminaatiosta. Standardisuora pipetoitiin jokaiselle levyille.

Kaikissa määrittäyksissä laimennokset tehtiin niin, että kvantitointi pystyttiin tekemään standardisuoran lineaariselta alueelta. Lisäksi mikrobiologisten määrittäysten tuloksia vertailtiin UPLC-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Mikrobiologisella määrittäyksellä määritetty kokonaisfolaattipitoisuus on yleensä suurempi kuin UPLC-menetelmällä määritettyjen vitameerien yhteispitoisuus. UPLC-menetelmällä pyrittiin kuitenkin saamaan vähintään 80 % mikrobiologisella menetelmällä saadusta pitoisuudesta.

3.3 TULOKSET

3.3.1 Bioprosessoimattomien lupiin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet

Bioprosessoimattomien näytteiden kokonaisfolaattipitoisuudet on esitetty taulukossa 4. Alkuperäisten lupiin siementen kokonaisfolaattipitoisuus oli 1230 ng/g kuiva-ainetta. Siementen kuivauksen aikana kuiva-ainepitoisuus suureni 84,0 %:sta 94,4 %:iin. Kokonaisfolaattipitoisuudessa ei tapahtunut merkittävää muutosta kuivauksen myötä, sillä kuivattujen siementen kokonaisfolaattipitoisuus oli 1170 ng/g kuiva-ainetta. Kuivatuista siemenistä jauhetun kokojauhon folaattipitoisuus 1220 ng/g kuiva-ainetta ei eronnut merkittävästi kuivattujen kokonaisten siementen folaattipitoisuudesta.

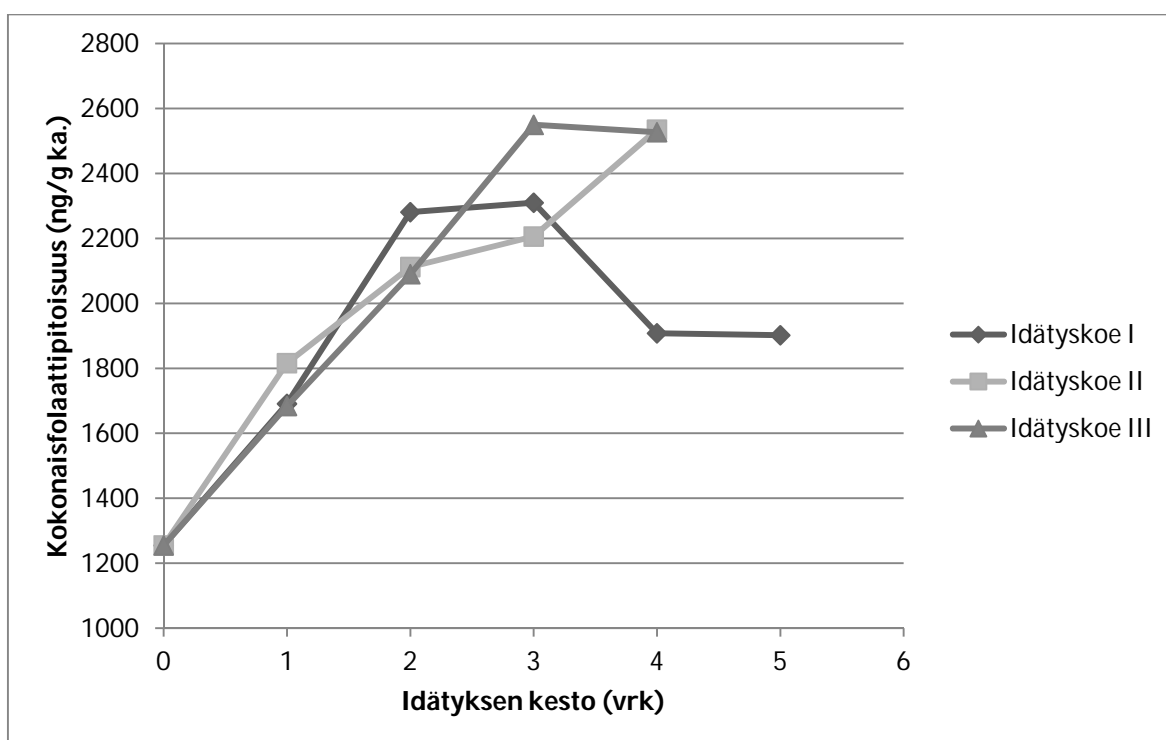
Taulukko 4. Käsittelemättömien siementen ja niistä tehtyjen eri fraktioiden ja jauhojen kokonaisfolaattipitoisuudet.

Näyte	Kokonaisfolaattipitoisuus (ng/g tp.)	Kuiva-ainepitoisuus (%)	Kokonaisfolaattipitoisuus (ng/g ka.)
Alkuperäinen siemen	1030	84,0	1230
Kuivattu siemen	1110	94,4	1170
Kokojauho, kuivatuista siemenistä	1130	92,7	1220
Kuorifraktio, kuivatut siemenet	701	92,5	758
Ydinfraktio, kuivatut siemenet	1160	92,5	1260
Ydinjauho, kuivatut siemenet	1390	92,8	1500

Kuivattujen siementen kuorimalla erotettujen ydin- ja kuorifraktioiden kokonaisfolaattipitoisuuksissa havaittiin selkeä ero, sillä kuorifraktion folaattipitoisuudeksi määritettiin 758 ng/g kuiva-ainetta ja ydinfraktion pitoisuudeksi puolestaan 1260 ng/g kuiva-ainetta. Ydinfraktion folaattipitoisuus oli siis noin 1,7-kertainen kuorifraktion folaattipitoisuuteen verrattuna. Ydinfraktiosta jauhetun ydinjauhon pitoisuus oli 1500 ng/g kuiva-ainetta eli hieinan suurempi kuin vastaavan jauhamattoman ydinfraktion folaattipitoisuus.

3.3.2 Idätettyjen lupiin siementen ja itujen kokonaisfolaattipitoisuudet

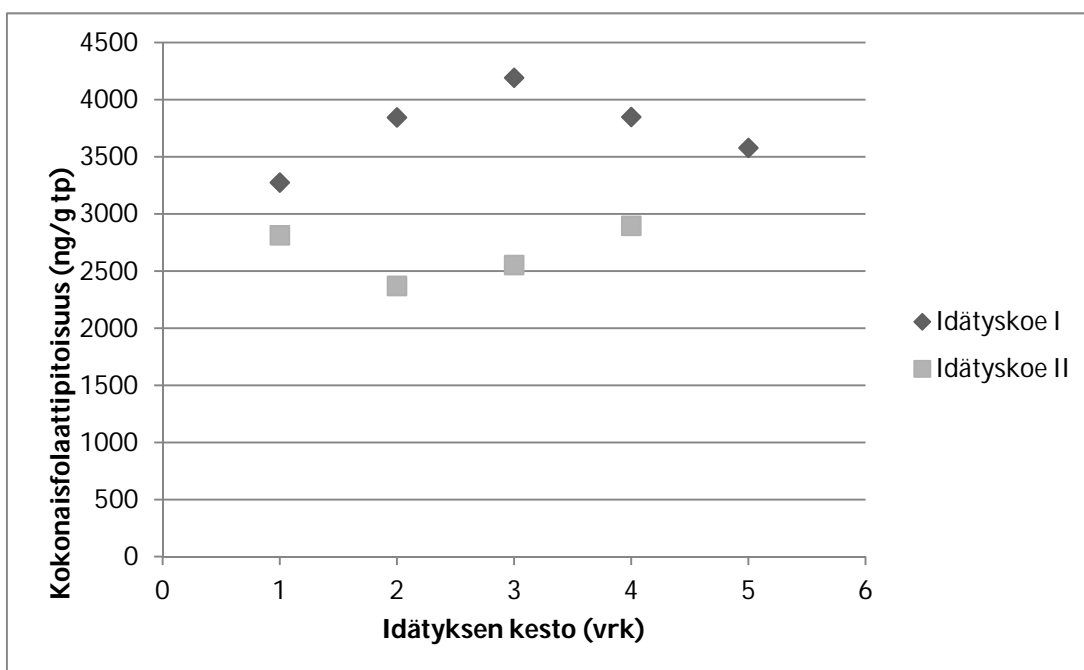
Kuvassa 11 ja liitteessä 2 on esitettyinä siementen ydinten kokonaisfolaattipitoisuuden muutokset (ng/g kuiva-ainetta) kunkin idätyskokeen aikana. Lähtöpitoisuutena kussakin idätyskokeessa on kuivattujen lupiin siementen ydinfraktion folaattipitoisuus 1260 ng/g kuiva-ainetta. Idätyskokeessa I folaattipitoisuus vuorokauden idätyksen jälkeen oli 1690 ng/g kuiva-ainetta ja pitoisuus suurentui kolmanteen vuorokauteen saakka, jolloin folaattipitoisuus oli 2310 ng/g kuiva-ainetta. Tämän jälkeen folaattipitoisuus pieneni, ja neljäntenä ja viidentenä vuorokautena folaattipitoisuus oli noin 1900 ng/g kuiva-ainetta. Idätyskokeen II aikana folaattipitoisuus suurentui neljän vuorokauden ajan niin, että ensimmäisenä vuorokautena pitoisuus oli 1820 ng/g kuiva-ainetta ja neljäntenä vuorokautena pitoisuus oli 2520 ng/g kuiva-ainetta. Idätyskokeessa III folaattipitoisuus suurentui kolmen vuorokauden ajan. Ensimmäisenä vuorokautena pitoisuus oli 1680 ng/g kuiva-ainetta ja kolmantena vuorokautena 2550 ng/g kuiva-ainetta. Viimeisenä idätysvuorokautena folaattipitoisuuden suurentuminen tasaantui ja neljäntenä vuorokautena pitoisuus oli 2530 ng/g kuiva-ainetta.



Kuva 11. Idätyksen vaikutus lupiin siementen ydinfraktioiden kokonaisfolaattipitoisuuksiin. Kuvassa esitettyinä sekä vesiliotettujen siementen (idätyskokeet I ja II) että maitohappoliotettujen siementen (idätyskoe III) folaattipitoisuudet (ng/g kuiva-ainetta).

Idätyskokeissa II ja III kokonaisfolaattipitoisuus suureni kaikkiaan pitoisuudesta 1260 ng/g kuiva-ainetta noin pitoisuuteen 2550 ng/g kuiva-ainetta (liite 2). Idätyskokeissa II ja III lupiin siementen ydinten folaattipitoisuus näin ollen noin 2-kertaistui. Idätyskokeessa I siementen ydinten folaattipitoisuus alkoi pienentyä jo kolmen päivän idätyksen jälkeen ja suurimmillaan pitoisuus oli kolmen vuorokauden idätyksen jälkeen, jolloin pitoisuus oli 2310 ng/g kuiva-ainetta. Idätyskokeessa I folaattipitoisuus noin 1,8-kertaistui.

Ydinfraktioiden lisäksi tutkittiin idätyskokeiden I ja II itunäytteiden kokonaisfolaattipitoisuuksien muutosta (kuva 12). Itujen folaattipitoisuudet on esitetty liitteessä 2 vain yksikössä ng/g tuorepainoa, koska kaikista itunäytteistä ei saatu määritettyä tarkkoja kuiva-ainepitoisuuksia. Kuiva-ainepitoisuus oli iduissa suuruusluokkaa 20 %, joten tämän perusteella voidaan todeta, että idätyskokeessa I folaattipitoisuus oli suurimmillaan 4190 ng/g tuorepainoa eli noin 20 000 ng/g kuiva-ainetta. Idätyskokeessa II folaattipitoisuudet olivat hieman pienemmät ja suurimmillaan folaattipitoisuus oli neljän vuorokauden idätyksen jälkeen. Tällöin folaattipitoisuudeksi määritettiin 2900 ng/g tuorepainoa eli noin 15 000 ng/g kuiva-ainetta. Verrattaessa lupiin itujen folaattipitoisuuksia vastaaviin idätettyihin kuorittuihin siemeniin voitiin todeta, että itujen folaattipitoisuus oli noin 5–7-kertainen. Verrattaessa itujen folaattipitoisuuksia puolestaan alkuperäisiin kuivattuihin siemeniin olivat itujen folaattipitoisuudet noin 8–14-kertaisia. Nämä ovat kuitenkin vain suuntaa antavia arvioita, koska itujen tarkkoja kuiva-ainepitoisuuksia ei tiedetty.



Kuva 12. Idätettyjen lupiin siementen itujen kokonaisfolaattipitoisuudet (ng/g tuorepainoa) idätyskokeissa I ja II.

Idätyskokeissa I ja II tutkittiin myös kuorifraktioiden kokonaisfolaattipitoisuuksia. Idätyskokeessa I pitoisuudet vaihtelivat välillä 170–230 ng/g kuiva-ainetta ja idätyskokeessa II välillä 70–170 ng/g kuiva-ainetta. Idätyskokeen I aikana pitoisuus suureni idätyksen aikana pitoisuudesta 170 ng/g kuiva-ainetta pitoisuuteen 230 ng/g kuiva-ainetta, kun idätyskokeessa II pitoisuus puolestaan pieneni pitoisuudesta 170 ng/g kuiva-ainetta pitoisuuteen 70 ng/g kuiva-ainetta.

3.3.3 Fermentoitujen lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet

Taulukossa 5 on esitetty kunkin fermentointinäytteen kokonaisfolaattipitoisuus määritettynä fermentoinnin aikapisteessä 24 h. Jauho-vesiseosten kuiva-ainepitoisuuksia ei määritetty, joten tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/g tuorepainoa. Lisäksi taulukossa on esitetty vastaavan vertailunäytteen kokonaisfolaattipitoisuus ja näitä pitoisuuksia on verrattu toisiinsa. Fermentointikokeen aikapisteen 0 h tulokset sekä näytteiden pH-arvot on esitetty liitteen 3 taulukossa 1. Liitteen 3 taulukossa 2 on vertailtu aikapisteiden 0 h ja 24 h välisiä tuloksia.

Taulukko 5. Idättämättömistä ja idätetyistä lupiinin siemenistä tehtyjen ydinjauhojen folaattipitoisuudet fermentointikokeen aikapisteessä 24 h, ja niiden vertailu vastaaviin vertailunäytteisiin.

Näyte	Mikrobi	Glukoosilisä	Folaattipitoisuus (ng/g tp)	Vertailunäytteen folaattipitoisuus (ng/g tp)	Ero vertailunäytteen sestä verrattuna (ng/g tp)
Idätetty ydinjauho	<i>S. thermophilus</i>	ei	159	250	-91
Idätetty ydinjauho	<i>S.cerevisiae</i>	kyllä	245	236	9
Idätetty ydinjauho	<i>S.cerevisiae</i>	ei	241	250	-9
Idättämätön ydinjauho	<i>S. thermophilus</i>	ei	149	139	10
Idättämätön ydinjauho	<i>S.cerevisiae</i>	kyllä	270	142	128
Idättämätön ydinjauho	<i>S.cerevisiae</i>	ei	178	139	38

Idätetyssä ydinjauhossa ei havaittu folaattipitoisuuden suurentumista fermentoinnin myötä verrattaessa fermentointinäytteitä vertailunäytteisiin. Hiivafermentoiduissa idätetyissä ydinjauhoissa folaattipitoisuudessa ei tapahtunut merkittävää muutosta vertailunäytteeseen verrattuna, eikä glukoosilisällä näyttänyt olevan merkittävää vaikutusta folaattipitoisuuteen. Sekä hiivafermentoitujen näytteiden että kontrollinäytteiden pitoisuudet olivat noin välillä 240–250 ng/g. *S. thermophilus* -bakteerilla fermentoidussa idätetyssä jauhossa kokonaisfolaattipitoisuus oli jopa vertailunäytettä merkittävästi pienempi. Bakteerifermentoidun jauhon kokonaisfolaattipitoisuus oli noin 160 ng/g, kun vastaavan kontrollinäytteen kokonaisfolaattipitoisuus oli 250 ng/g.

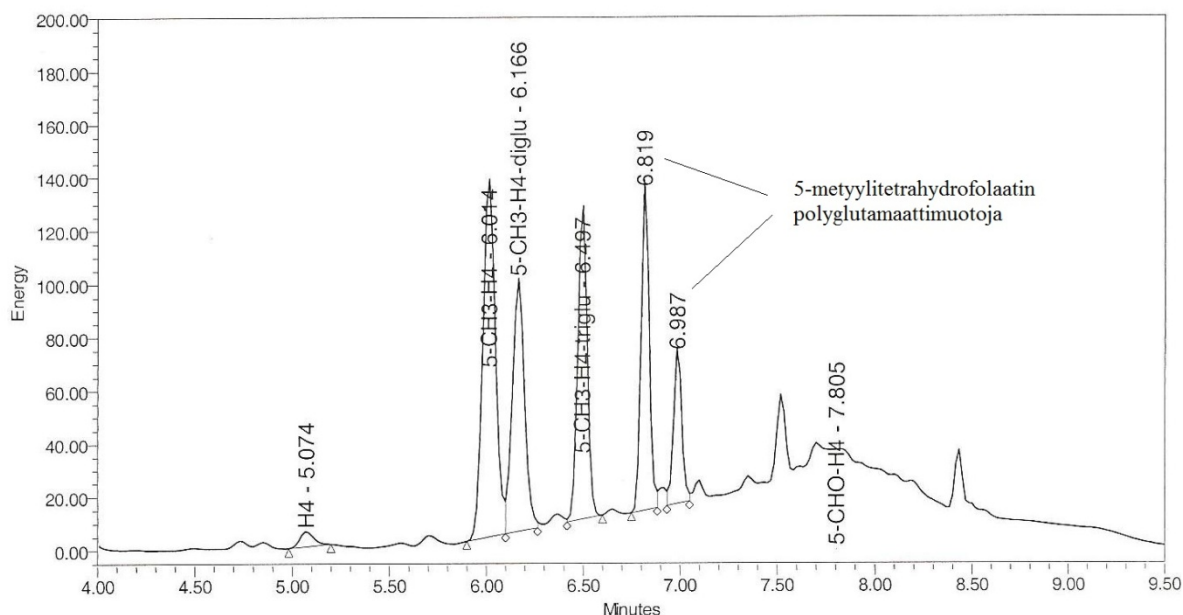
Idättämättömässä jauhossa hiivafermentoitujen näytteiden folaattipitoisuudet olivat vertailunäytteiden folaattipitoisuuksia suuremmat. Vertailunäytteiden folaattipitoisuudet olivat idättämättömällä jauholla noin 140 ng/g ja glukoosilisällä hiivafermentoidun idättämättömän jauhon folaattipitoisuus oli jopa 270 ng/g eli lähes 2-kertainen vertailunäytteeseen verrattuna. Ilman lisättyä glukoosia hiivafermentointi puolestaan suurensi folaattipitoisuutta vain vähän vertailunäytteeseen verrattuna, sillä folaattipitoisuus oli kyseisessä fermentointinäytteessä vain noin 180 ng/g. Glukoosilisällä oli siis vaikutus folaattipitoisuuksiin fermentoitaessa *S. cerevisiae* -hiivalla, kun näytematriisina oli idättämättömistä lupiin siemenistä tehty ydinjauho, muttei silloin, kun matriisina oli idätetyistä lupiin siemenistä tehty ydinjauho.

Liitteen 3 taulukoiden 1 ja 2 mukaisesti voidaan todeta, että verrattaessa näytteiden aikapistettä 0 h aikapisteeseen 24 h oli idätetyn hiivafermentoidun jauhon folaattipitoisuus noin 1,2-kertaistunut siitä huolimatta, oliko näytteeseen lisätty glukoosia vai ei. Glukoosilisällisen idättämättömän jauhon folaattipitoisuus puolestaan noin 1,8-kertaistui fermentoitaessa hiivalla, mutta vain hieman yli 1,1-kertaistui, jos glukoosia ei ollut lisätty. Fermentoitaessa *S. thermophilus* -bakteerilla idätetyn jauhon folaattipitoisuus jopa pienentyi fermentoinnin myötä.

Liitteen 3 taulukossa 1 näkyy myös fermentoinnin myötä tapahtuva pH:n pienentyminen. Kaikissa näytteissä pH oli ennen fermentointia noin välillä 5,9–6,2, ja fermentoinnin jälkeen mitattaessa pH-arvot olivat välillä 4,2–5,4. Suurin pH-arvon pienentyminen tapahtui fermentoitaessa *S. thermophilus* -bakteerilla.

3.3.4 Bioprosessoimattomien lupiininsiemenjauhojen vitameerijakaumat

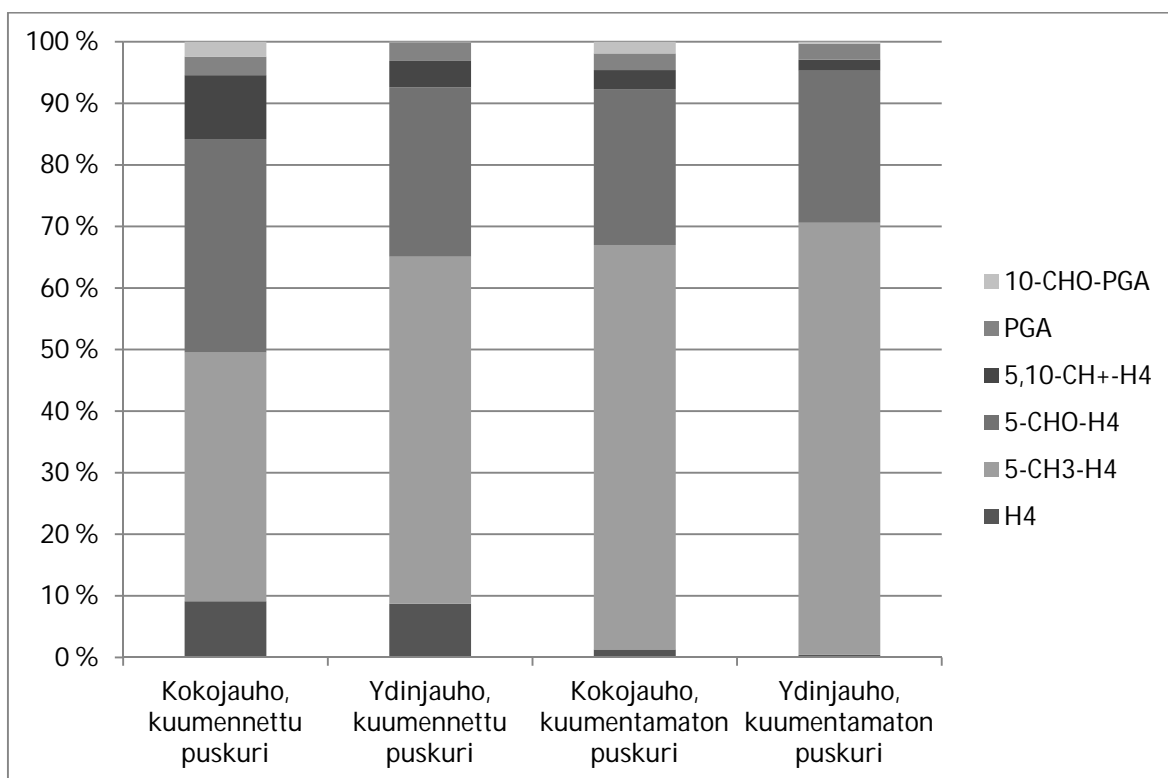
Jauhönäytteiden kromatogrammeissa havaittiin muita näytteitä enemmän häiriöpiikkejä etenkin mitattaessa UV-detektorilla aallonpituudella 290 nm. Tämän lisäksi jauhönäytteissä havaittiin fluoresenssidetektorilla (290/365 nm) 5-CH₃-H₄:n monoglutamaatti-, diglutamaatti- ja triglutamaattimuodon lisäksi myös kaksi muuta glutamaattimuotoa. Kuvassa 13 on esitettyä kuumentamattomalla puskurilla uutetun kokojauhön kromatogrammi, joka on detektoitu fluoresenssidetektorilla viritys-/emissioaallonpituuksilla 290/356 nm. Kromatogrammissa näkyy tunnistettuina 5-CH₃-H₄:n mono-, di- ja triglutamaattimuodot, mutta näiden lisäksi kromatogrammissa näkyy myös kaksi muuta 5-CH₃-H₄:n polyglutamaattimuotoa. Kyseiset yhdisteet tunnistettiin 5-CH₃-H₄:n eri glutamaattimuodoiksi vertaamalla yhdisteiden spektrejä 5-CH₃-H₄:n mono-, di- ja triglutamaattien spektreihin. Kyseisille glutamaattimuodoille ei ollut standardeja, joten niiden pitoisuudet määritettiin vertaamalla piikkien pinta-aloja 5-CH₃-H₄-monoglutamaatin piikin pinta-alaan. Jauhönäytteiden folaatipitoisuudet olivat vain noin 60 % mikrobiologisella määrittelyllä saaduista kokonaisfolaatipitoisuuksista, ja tämä tulee ottaa huomioon tulosten luotettavuutta tarkasteltaessa.



Kuva 13. Kuumentamattomalla puskurilla uutetun lupiinin kokojauhön kromatogrammi fluoresenssidetektorilla (290/356 nm) detektoituna.

Jauhönäytteiden folaattivitameerien osuudet on esitetty kuvassa 14 ja liitteessä 4. Kuumennetulla puskurilla uutetuissa näytteissä sekä kokojauhossa että ydinjauhossa valtaosa folaateista oli 5-CH₃-H₄:a ja 5-CHO-H₄:a. 5-CH₃-H₄:a oli kokojauhossa noin 40 % ja ydinjauhossa noin 56 %, ja 5-CHO-H₄:a oli puolestaan kokojauhossa noin 35 % ja ydinjauhossa noin 28 %. Lisäksi 5,10-CH⁺-H₄:a ja 10-CHO-PGA:a oli kokojauhossa ydinjauhoa enemmän, mutta muiden vitameerien osuuksissa ei ollut havaittavissa merkittävää eroa jauhönäytteiden välillä.

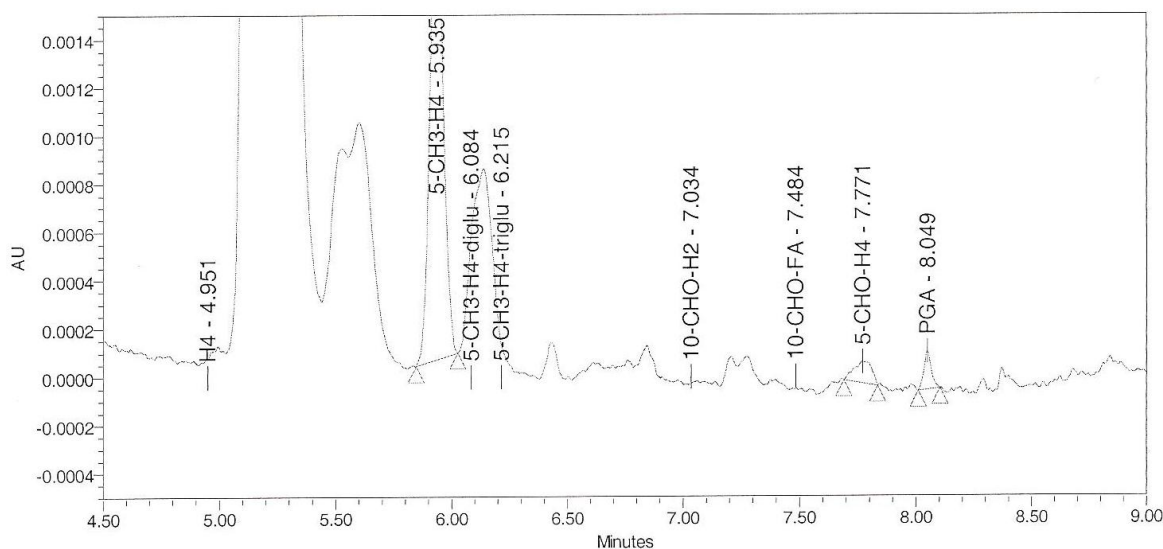
Kuumentamattomalla puskurilla uutetut jauhönäytteet sisälsivät enemmän 5-CH₃-H₄:a kuin vastaavat kuumennetulla puskurilla uutetut näytteet, ja kyseisen vitameerin osuus kaikista vitameereista olikin molemmilla jauhoilla 66–70 %. H₄:n osuus kaikista vitameereistä oli puolestaan pienempi kuumentamattomalla jauholla uutetuissa näytteissä. Kokojauhon ja ydinjauhon välillä ei havaittu kovin suuria eroja vitameerijakaumassa näytteissä, jotka oli uutettu kuumentamattomalla puskurilla.



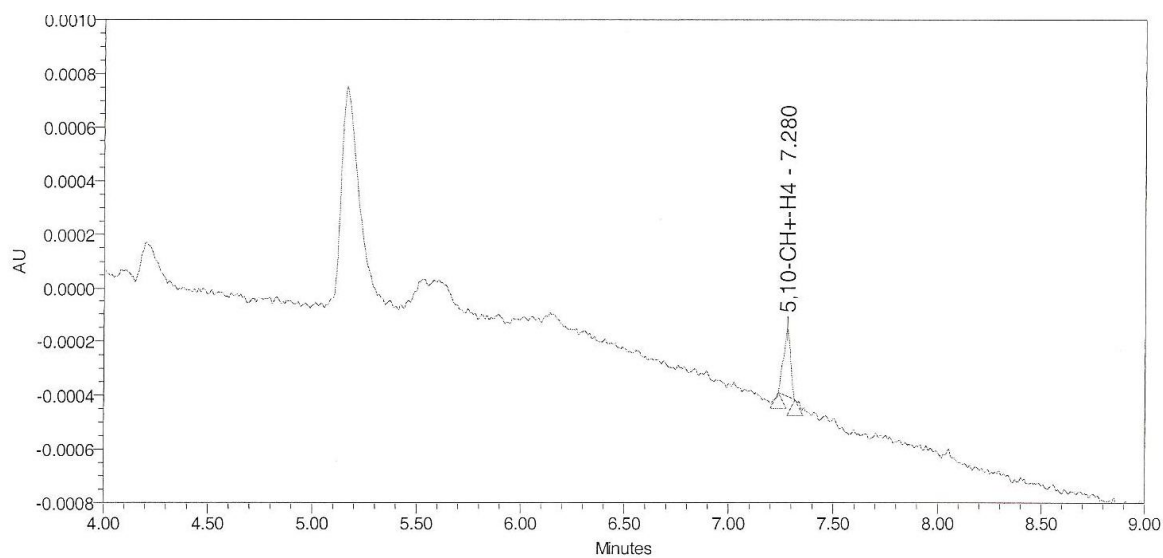
Kuva 14. Folaattivitameerien osuudet lupiin siemenistä jauhetuissa kokojauho- ja ydinjauhönäytteissä. Jauhoista uutettiin näytteet sekä kuumentamattomalla että kuumennetulla uuttopuskurilla.

3.3.5 Idätettyjen lupiin siementen folaattien vitameerijakaumat

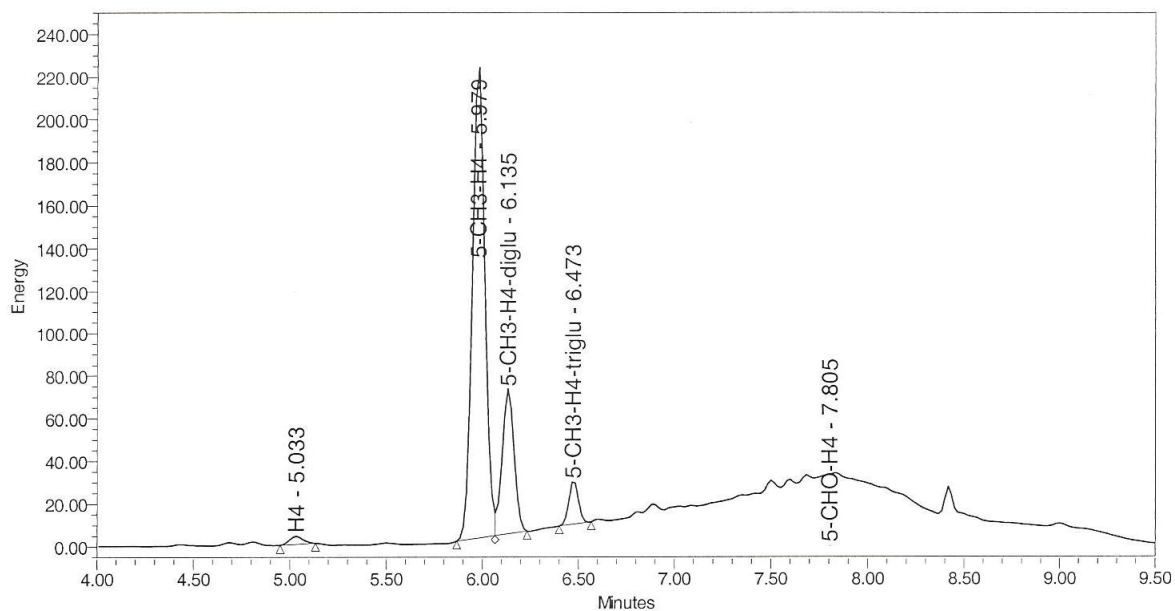
Idätetyistä lupiin siemenistä määritettiin vitameerijakaumat siementen ytimistä ja lisäksi idätyskoe I:n iduista. Idätyskoe II:n 1. vuorokauden ydinnäytteiden kromatogrammit on esitetty kuvissa 15 (UV, 290 nm), 16 (UV, 360 nm), 17 (fluoresenssi, 290/356 nm) ja 18 (fluoresenssi, 360/460 nm). Kuvassa 15 (UV, 290 nm) näkyy useita piikkejä, mutta kyseiset piikit eivät häirinneet 5-CHO-H₄:n tai PGA:n detektointia. Muita kromatogrammissa tunnistettuja yhdisteitä ei detektoitu UV-detektorilla aallonpituudella 290 nm. UV-detektorilla aallonpituudella 360 nm detektoidusta kromatogrammista kvantitoitiin ainoastaan 5,10-CH⁺-H₄, ja se erottui kromatogrammissa selkeästi ja oli siten helposti kvantitoitavissa. Fluoresenssidetektorilla detektoitaessa kvantitoitavien yhdisteiden piikit erottuivat myös selvästi sekä viritys-/emissioaallonpituuksilla 290/356 nm että 360/460 nm. Kuvassa 17 ainoa peittyvä piikki on 5-CHO-H₄:n piikki, mutta kyseinen piikki kvantitoitiin kromatogrammista, joka detektoitiin UV-detektorilla.



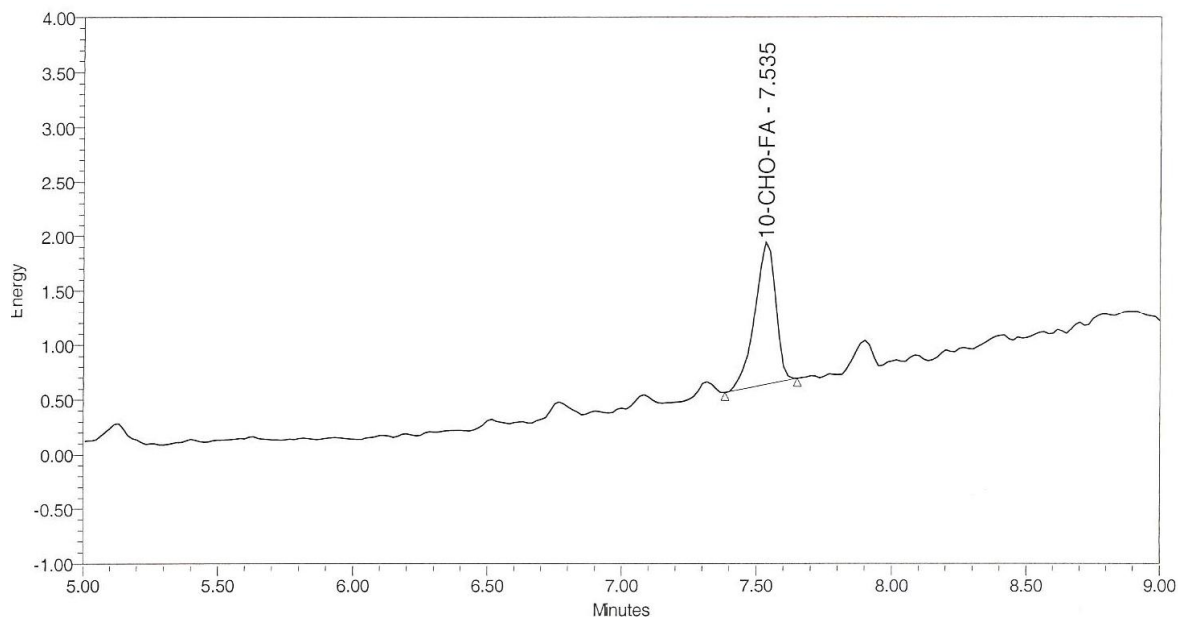
Kuva 15. Idätyskoe II:n 1.vuorokauden ydinfractionäytteen kromatogrammi UV-detektorilla (290 nm) detektoituna.



Kuva 16. Idätyskoe II:n 1.vuorokauden ydinfraktionäytteen kromatogrammi UV-detektorilla (360 nm) detektoituna.



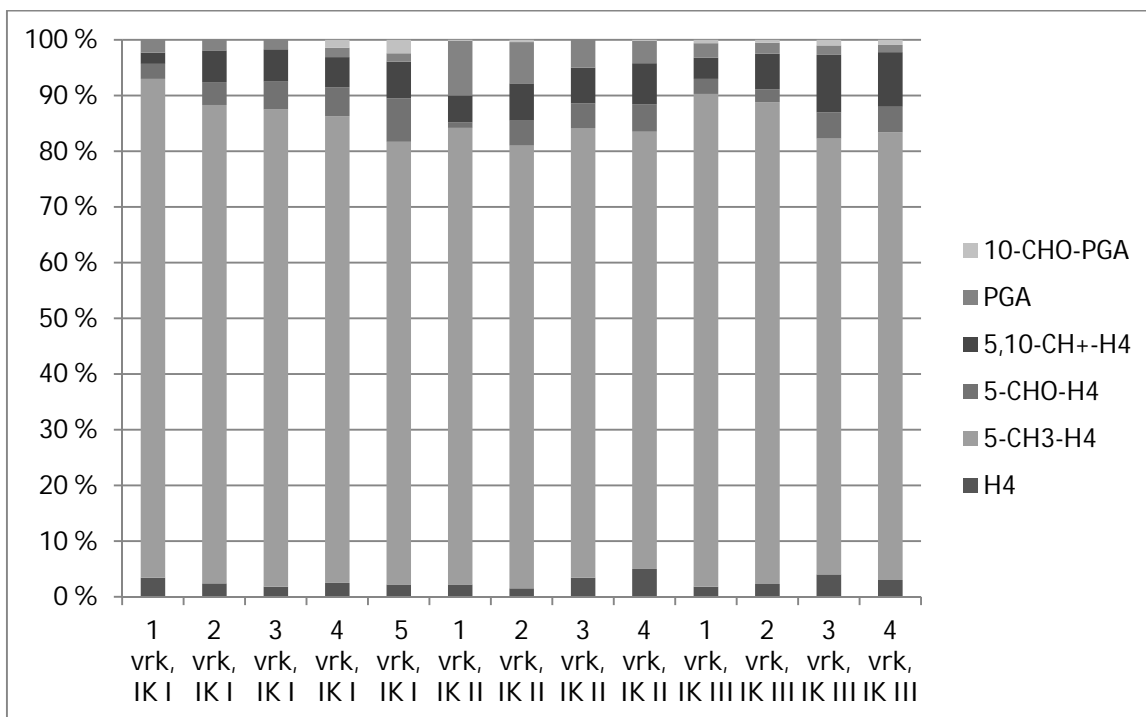
Kuva 17. Idätyskoe II:n 1.vuorokauden ydinfraktionäytteen kromatogrammi fluoresenssidetektorilla (290/356 nm) detektoituna.



Kuva 18. Idätyskoe II:n 1.vuorokauden ydinfraktionäytteen kromatogrammi fluoresenssidetektorilla (360/460 nm) detektoituna.

Idätyskokeiden I, II ja III ydinfraktioiden vitameerijakaumat määritettiin, ja tulokset on ilmoitettu vitameerien prosentiosuuksina kaikista folaateista (kuva 19 ja liitteen 5 taulukko 1). Kaikissa näytteissä suurin osa folaateista oli 5-CH₃-H₄:a. Idätyskokeissa I ja III yhden vuorokauden idätyksen jälkeen noin 90 % folaateista oli 5-CH₃-H₄:a ja idätyksen aikana sen osuus pieneni molemmissa idätyskokeissa noin 10 prosenttiyksikköä. Idätyskokeessa II muutos oli vähäisempää, sillä 5-CH₃-H₄:n osuus kaikista folaattivitameereista pieneni vain noin 3 prosenttiyksikköä 82 %:sta 78,5 %:iin. Myös PGA:n osuus kaikista folaateista pieneni idätyksen aikana. Idätyskokeessa II PGA:n osuus pieneni noin 10 %:sta noin 4 %:iin, mutta idätyskokeissa I ja III muutos oli vähäisempi – vain noin yhden prosenttiyksikön.

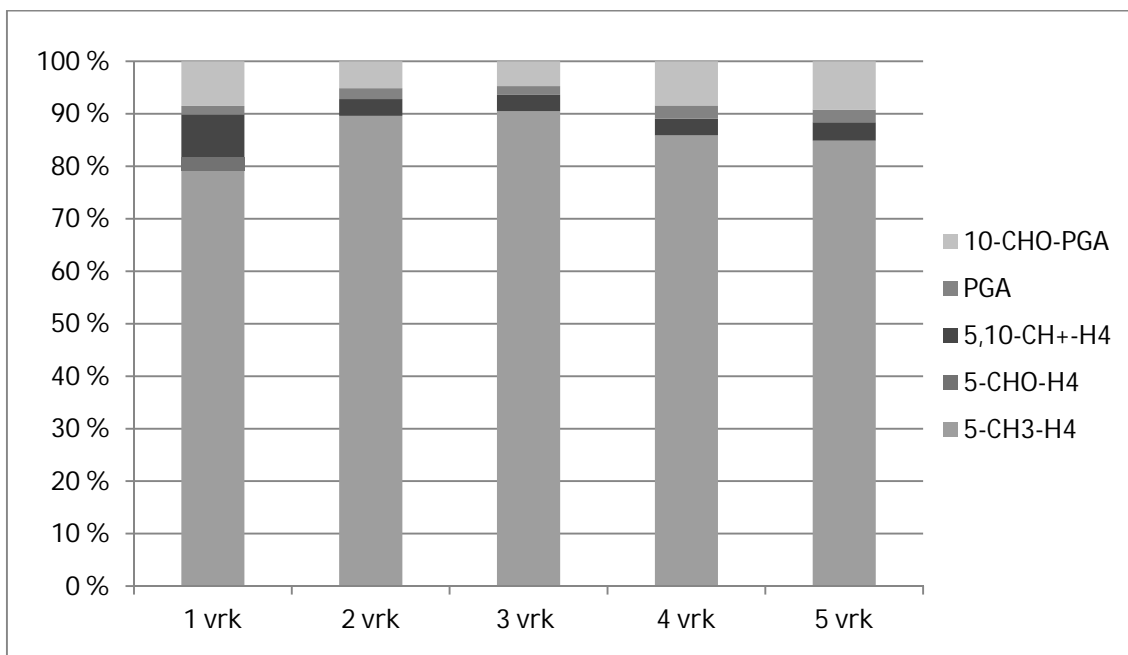
Kaikissa kolmessa idätyskokeessa ydinten 5,10-CH⁺-H₄-vitameerin osuus suureni idätyksen aikana. Idätyskokeessa I kyseisen vitameerin osuus suureni noin 2 %:sta noin 7 %:iin, idätyskokeessa II noin 5 %:sta noin 7,5 %:iin ja idätyskokeessa III noin 4 %:sta noin 10 %:iin. Lisäksi myös 5-CHO-H₄:n osuus suureni idätyksen aikana. Vuorokauden idätyksen jälkeen 5-CHO-H₄:a oli idätyskokeesta riippuen noin 1–3 % ja idätyksen aikana osuus suureni noin 5–8 %:iin. Muilla vitameereilla osuuksissa ei tapahtunut suuria muutoksia ja muutoksen suunta vaihteli näytteiden välillä.



Kuva 19. Idätettyjen lupiinin siementen ydinfraktioiden folaattivitameerijakaumat idätyskokeissa I, II ja III.

Itujen folaattivitameerijakaumat on esitetty kuvassa 20, ja lisäksi prosenttijakaumat on taulukoitu liitteessä 5 taulukossa 2. Vuorokauden idätyksen jälkeen 5-CH₃-H₄:a oli noin 80 % ja näin ollen tässä vaiheessa osuus oli hieman pienempi kuin vastaavassa ydinnäytteessä (idätyskoe I, 1. vuorokausi). 5-CH₃-H₄:n osuus kuitenkin suureni idätyksen aikana toisin kuin ytimissä. Osuus suureni 10 prosenttiyksikköä ensimmäisen ja kolmannen vuorokauden välillä ja alkoi sitten pienentyä. Viiden vuorokauden idätyksen jälkeen 5-CH₃-H₄:n osuus kaikista folaateista oli noin 85 %. 10-CHO-PGA:n osuus puolestaan ensin hieman pienentyi (noin 8,5 %:sta 5 %:iin) ja lähti sitten suurentumaan. Idätyskokeen lopulla osuus oli noin 9 %. 10-CHO-PGA:n osuus pienentyi 5-CH₃-H₄:n osuuden suurentuessa idätyksen toisena ja kolmantena vuorokautena ja suurentui tämän jälkeen, kun 5-CH₃-H₄:n osuus puolestaan pienentyi.

Vuorokauden idätyksen jälkeen iduissa oli 5-CHO-H₄:a 2,5 % kaikista folaateista. Idätyksen edetessä kyseisen vitameerin määrä väheni, eikä näytteissä ollut enää kahden vuorokauden idätyksen jälkeen lainkaan 5-CHO-H₄:a. Myös 5,10-CH⁺-H₄:n osuus pienentyi idätyksen myötä. Vuorokauden idätyksen jälkeen 5,10-CH⁺-H₄:n osuus kaikista folaattivitameereista oli noin 8 %, kun kahden vuorokauden idätyksen jälkeen osuus oli enää vain noin 3 %. Osuus ei muuttunut enää idätyksen jatkuessa.



Kuva 20. Idätettyjen lupiinin siementen itujen vitameerijakaumat idätyskokeessa I.

3.4 POHDINTA

3.4.1 Bioprosessoimattomien lupiinin siementen folaatit

Kokonaisfolaattipitoisuudet

Alkuperäisen lupiinin siemenen folaattipitoisuudeksi määritettiin noin 1200 ng/g kuiva-ainetta. Rekola (2011) tutki opinnäytetyössään muun muassa kolmen eri sinilupiinilajikkeen folaattipitoisuuksia. Näistä yksi oli Haags Blaue, ja kyseisen lajikkeen folaattipitoisuus oli tuolloin noin 4000 ng/g kuiva-ainetta. Verrattaessa näitä pitoisuuksia voidaan todeta, että nyt samalle lajikkeelle saatu folaattipitoisuus on merkittävästi pienempi. Lupiinit oli kasvatettu samassa paikassa, mutta siemenet olivat eri kasvukaudelta. Rekola (2011) määrittä tutkimuksissaan vuoden 2010 sadon folaattipitoisuuksia, kun nyt näytteet olivat vuoden 2011 sadosta. Näin ollen folaattipitoisuuden eroa voi olla aiheutunut erilaisesta kasvukaudesta muun muassa sääolosuhteiden ja kasvukauden pituuden osalta. Siemenet on voitu myös korjata eri vaiheissa kasvukautta. Näytteet saatiin valmiiksi kuivattuina, ja kui-

vauslämpötilana oli ollut +45 °C, mutta kuivauskäsittelyn kestosta ei ole tarkkaa tietoa. Myös Rekolan (2011) tutkimuksessa käyttämät lupiin siemenet oli kuivattu, mutta kuivauslämpötilasta ja kuivauksen kestosta ei ollut tietoa, eikä siis voida olla varmoja, että kuivauskäsittely on ollut samanlainen. Erot kuivauslämpötilassa ja käsittelyn kestossa ovat voineet aiheuttaa eroja siementen folaattipitoisuuksiin. Lisäksi eroa on voinut aiheuttaa myös erilainen siementen varastointi. Kuivauksen jälkeen Rekolan (2011) tutkimuksessa käytetyt siemenet oli pakastettu, kun nyt näytteinä olleet siemenet oli säilytetty varastossa, jossa lämpötila vaihteli ulkolämpötilan mukaisesti. Folaatin hävikkiä on voinut tapahtua siis enemmän pakastamattomien siementen varastoinnin aikana.

Folaattipitoisuuden vaihteluista kasvukausien välillä on tehty melko vähän tutkimusta. Kuitenkin muun muassa genotyypin vaikutusta vehnän folaattipitoisuuksiin on tutkittu (Kariluoto ym. 2010). Kyseisessä tutkimuksessa havaittiin vehnän folaattipitoisuudessa jopa 2,8-kertainen ero eri genotyyppien välillä. Samassa tutkimuksessa oli vertailtu myös eri kasvuvuotia ja -paikkoja, ja näillä havaittiin olevan enimmillään 1,5-kertainen vaikutus vehnän folaattipitoisuuksiin. Tutkimusta on tehty myös perunan tiamiinin vaihtelusta muun muassa genotyypistä ja varastoinnista riippuen (Goyer ja Haynes 2011). Tutkimuksessa havaittiin, että kasvukauden aikana eri ajankohtina korjatuissa perunoissa tiamiinipitoisuudessa oli huomattavaa vaihtelua. Lisäksi verrattaessa kahden peräkkäisen vuoden saman perunalajikkeen tiamiinipitoisuuksia oli pitoisuuksissa huomattaviakin eroja, ja merkittävä osa tiamiinipitoisuuden vaihtelusta havaittiin olevan geneettistä vaihtelua.

Verrattaessa alkuperäisten siementen ja laboratoriossa kuivattujen siementen folaattipitoisuuksia voidaan todeta, ettei folaatin hajoamista ollut tapahtunut, sillä molemmissa folaattipitoisuus oli noin 1200 ng/g kuiva-ainetta. Eri fraktioiden välillä puolestaan oli havaittavissa eroa, sillä kuoritun siemenen eli ydinfraktion folaattipitoisuus oli noin 1,7-kertainen verrattuna kuorifraktion folaattipitoisuuteen. Folaattipitoisuus määritettiin ydinfraktion lisäksi myös ydinjauhosta, joka oli tehty ydinfraktiota jauhamalla. Tulosten mukaan folaattipitoisuus oli suurempi ydinjauhossa kuin jauhamattomassa ydinfraktiossa. Tämä johtunee siitä, että jauhetuista näytteistä folaatti saadaan täydellisemmin uutumaan kuin uutettaessa kokonaisia, uuttopuskurissa homogenoituja siemeniä.

Lupiinin siemenistä tehtyjen koko- ja ydinjauhojen vitameerijakaumat

Verrattaessa kokojauhonäytteiden vitameerijakaumia ydinjauhojen vitameerijakaumiin merkittävin ero on 5-CH₃-H₄:n osuudessa. Ydinjauhossa oli sekä kuumentamattomalla että kuumennetulla puskurilla uutettuna suurempi osuus 5-CH₃-H₄:a kuin kokojauhossa. 5,10-CH⁺-H₄:a oli puolestaan enemmän kokojauhossa, ja lisäksi kokojauhossa oli myös pieni osuus vitameereista 10-CHO-PGA:a, kun taas ydinjauhoissa tätä vitameeria ei ollut lainkaan. Rekola (2011) tutki Boruta–sinilupiinilajikkeen vitameerijakaumaa uuttamalla jauhot kuumentamattomalla puskurilla. Muilta osin käytetty määrittäminen vastasi nyt käytettyä menetelmää. Rekolan (2011) tutkimuksen tulosten mukaan noin 60 % folaateista oli 5-CH₃-H₄:a ja noin 30 % oli 5-CHO-H₄:a. Nyt kuumentamattomalla puskurilla uutetun kokojauhon 5-CH₃-H₄:n osuudeksi saatiin noin 66 % ja 5-CHO-H₄:n osuudeksi noin 25 %. Näiltä osin tulokset olivat siis lähes yhtenevät.

Vertailtaessa eri uuttokäsittelyitä voidaan havaita, että vitameerijakaumat ovat erilaiset riippuen siitä, onko uuttokäsittely tehty esikuumennetulla puskurilla vai kuumentamattomana lisätyllä puskurilla. Jauhetuissa näytteissä tapahtuu vitameerien hajoamista ja muuntumista toisikseen muun muassa entsyymaattisesti. Vahteristo ym. (1998) tutkivat folaattien säilymistä muun muassa kalan paiston aikana, ja havaitsivat 5-CH₃-H₄:n säilyvän paremmin kuin H₄:n. Kirjolohinäytteissä 5-CH₃-H₄:n määrän havaittiin jopa kasvavan, ja tämän epäiltiin johtuvan muun muassa näytteen homogoinnin ja uuton aikana tapahtuneesta entsyymaattisesta vitameerien muuntumisesta toisikseen.

Samanlaista muuntumista voi tapahtua myös kasvin sisältämien entsyymien aikaansaamana. Lupiininäytteillä 5-CH₃-H₄:n osuus oli suurempi niillä näytteillä, joihin uuttopuskuri oli lisätty kuumentamattomana. Tämä voi johtua nimenomaan siitä, että jotkin vitameerit ovat muuntuneet entsyymien katalysoimana 5-CH₃-H₄:ksi. Kun puskuri lisättiin jauhonäytteisiin kuumennettuna, saatiin entsyymejä inaktivoitua, eikä siten vitameerien muuntumista toisikseen tapahtunut yhtä paljoa. Tämän seurauksena 5-CH₃-H₄:n osuus oli pienempi ja muiden vitameerien, kuten H₄:n, osuus suurempi kuin jauhoissa, joihin puskuri oli lisätty kuumentamattomana. H₄ on yksi epästabiliimpia folaattivitameerejä, ja tämä havaitaan myös vertaamalla lupiinijauhonäytteiden H₄-osuuksia eri kuumennuskäsittelyiden välillä (Vahteristo ym. 1998). Näytteissä, joihin uuttopuskuri oli lisätty kuumentamattomana, H₄:n osuus oli vain 0,4–1,3 %, kun puolestaan näytteissä, joihin uuttopuskuri oli lisätty kuumana, H₄:a

oli noin 9 %. Tämä tukee sitä oletusta, että epästabiili H₄ muuntuu näytteissä herkästi stabiilimmiksi vitameereiksi, kuten 5-CH₃-H₄:ksi, jos entsyymejä ei ole inaktivoitu.

Valtaosa lupiinijauhojen folaateista oli 5-CH₃-H₄:a ja 5-CHO-H₄:a. Nämä molemmat vitameerit ovat verrattain stabiileja, sillä 5- ja 10-paikassa olevien typpiatomien substituotuminen lisää vitameerien stabiilisuutta verrattuna substituotumattomaan H₄:iin (Eitenmiller ym. 2008). Lupiinin siemenistä tehtyjen koko- ja ydinjauhojen voidaan siis todeta sisältävän runsaasti stabiileja folaattivitameerimuotoja, ja siten ne voisivat olla elintarvikkeissa hyvä folaattien lähde. Esimerkiksi soijapapuun verrattuna lupiini on hyvä folaattien lähde vitameerien stabiiliuden kannalta, sillä soijapavussa valtaosa folaateista on H₄:a (Rychlik ym. 2007). Noin 40 % suomalaisten ravinnosta saamasta folaatista on peräisin viljatuotteista (Paturi ym. 2008). Etenkin keliakikoilla folaattien saanti tulee turvata muista lähteistä ja siten lupiinien käyttö gluteenittomassa leivonnassa olisi kiinnostava vaihtoehto. Lupiinijauhojen sisältämien vitameerien stabiilius mahdollistaa lupiinin käytön muun muassa leivonnassa, jossa kuumennuskäsittelyiden myötä etenkin labiilimpien vitameerien hajoamista voisi tapahtua merkittävässä määrin.

3.4.2 Idätyksen vaikutukset folaatteihin

Idätettyjen lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet

Idätyskoe I tehtiin ensimmäiseksi ja tätä seurasivat idätyskokeet II ja III, jotka suoritettiin samanaikaisesti. Idätyskokeiden II ja III aikana voitiin havaita kuvan 11 mukaisesti melko samanlainen suurentuminen folaattipitoisuudessa. Folaattipitoisuus suurentui melko samalla nopeudella, ja molemmissa idätyskokeissa neljän vuorokauden jälkeen saavutettiin sama folaattipitoisuus. Idätyskokeiden II ja III aikana folaattipitoisuus saatiin siis noin 2-kertaistettua. Erona idätyskokeiden välillä oli se, että idätyskokeessa III havaittiin folaattipitoisuuden suurentumisen tasaantuminen ja jopa pieni folaattipitoisuuden pienentyminen kolmannen ja neljännen vuorokauden välillä. Idätyskokeessa II puolestaan folaattipitoisuus suurentui tasaisesti neljänteen vuorokauteen saakka, eikä näin ollen voitu varmistua, että maksimifolaattipitoisuus saavutettiin kyseisellä idätyskerralla.

Idätyskoe I erosi toisista idätyskokeista muun muassa siten, että sen kesto oli viisi vuorokautta. Myös tulokset poikkesivat kahdesta muusta idätyskokeesta, sillä nyt folaattipitoisuuden suurentumisen tasaantuminen havaittiin jo kahden vuorokauden jälkeen, ja folaattipitoisuus alkoi pienentyä jo kolmannen vuorokauden kohdalla. Kyseisessä idätyskokeessa ei saavutettu yhtä suuria folaattipitoisuuksia kuin idätyskokeissa II ja III. Kyseessä on biologinen koe, joten toistojen välinen vaihtelu on normaalia. Lisäksi tuloksiin on vaikuttanut mahdollisesti myös se, että nostatuskaappi, jossa idätykset tehtiin, käynnistettiin juuri ennen kokeen I aloitusta. Idätyskokeessa I havaittiin siementen kuivumista, vaikka nostatuskaapin suhteellinen kosteus olikin 100 % ja siemeniä kostutettiin päivittäin. Näin ollen idätyskokeissa II ja III siemeniä kostutettiin yhä tehokkaammin. Myöhemmin suoritetuissa idätyskokeissa nostatuskaappi oli ollut jo viikon käytössä ja siten on mahdollista, että esimerkiksi lämpötilassa ja suhteellisessa kosteudessa on tapahtunut vähemmän vaihtelua kuin idätyskokeessa I. Idätyskokeissa II ja III myös itujen kasvun havaittiin olevan nopeampaa kuin idätyskokeessa I.

Kaikissa idätyskokeissa havaittiin merkittävä folaattipitoisuuden suurentuminen jo idätyksen kestätyä kaksi vuorokautta. Idätyskokeessa I folaattipitoisuus 1,8-kertaistui kolmen ensimmäisen vuorokauden aikana ja tämän jälkeen pitoisuus alkoi pienentyä. Idätyskokeissa II ja III folaattipitoisuus 2-kertaistui neljän vuorokauden idätyksen aikana. Kariluoto ym. (2006b) tutkivat idätyksen vaikutuksia rukiin folaattipitoisuuksiin. Idätys suoritettiin kolmessa eri lämpötilassa, joita olivat 5 °C, 10 °C ja 25 °C, ja näistä 10 °C idätyslämpötila oli lähinnä lupiin siementen idätyksessä käytettyä lämpötilaa 15 °C. Kyseisessä 10 °C:n lämpötilassa rukiin folaattipitoisuus saatiin idätyskerrasta riippuen noin 2,2–2,8-kertaistettua neljän vuorokauden idätyksen aikana. Verrattaessa tätä tulosta lupiin idätyksen tuloksiin voidaan havaita, että idätyksen vaikutukset lupiin folaattipitoisuuteen olivat melko samanlaiset kuin idätettäessä ruista. Rukiin folaattipitoisuus suurentui hieman enemmän etenkin, kun ottaa huomioon pienen eron idätyslämpötiloissa. Kuitenkin matriisit ovat erilaiset ja idätyskoe oli suoritettu eri tavoin, joten tuloksia voidaan verrata vain suuntaantavasti. Palkokasveilla tehtyjen idätyskokeiden vaikutuksista folaattipitoisuuksiin ei ollut löydettävissä tutkimuksia, ja tämän vuoksi saatuja tuloksia ei pystytty vertailemaan sellaisiin tuloksiin, jotka olisivat olleet suoraan vertailtavissa nyt saatuihin tuloksiin.

Ydinfraktion lisäksi idätyskokeissa I ja II tutkittiin myös itujen folaattipitoisuuksien muutoksia idätyksen myötä. Itujen pitoisuudet olivat huomattavan suuria, mutta pitoisuuksissa ei havaittu yhtä suurta muutosta idätyksen aikana kuin siementen ydinfraktiossa. Idätysko-

keen I itujen folaattipitoisuus suureni hieman ensimmäisen kolmen vuorokauden aikana, ja alkoi sitten pienentyä. Idätyskokeessa II folaattipitoisuus näytti alkavan suurentua hitaammin, eikä folaattipitoisuus koskaan suurentunut yhtä paljoa kuin idätyskokeen I itujen folaattipitoisuus parhaimmillaan. Kuitenkin tuloksia tarkasteltaessa on otettava huomioon, että kuvan 12 kuvaajassa esitetyt tulokset ovat laskettu tuorepainoa kohti. Idätyskokeen II aikana siemeniä kasteltiin idätyskoetta I enemmän, joten tämän perusteella voitaisiin olettaa, että idätyskokeen II itujen kosteuspitoisuus on suurempi. Näin ollen laskettaessa tulokset kuiva-ainetta kohti voisivat folaattipitoisuuden erot tasoittua. Lisäksi tuloksiin on voinut vaikuttaa myös se, että idätetyt siemenet kuorittiin käsin, ja siten itufraktion joukkoon on voinut päätyä pieniä määriä muita fraktioita.

Kariluoto ym. (2006b) tutkivat rukiin idätyksen aikana muodostuvien itujen folaattipitoisuuksia ja havaitsivat itujen folaattipitoisuuden olevan jopa 10–19-kertainen verrattuna alkuperäiseen siemenen folaattipitoisuuteen ja 6–10-kertainen verrattuna ituja vastaavien rukiin jyvien folaattipitoisuuteen (sama idätyskoe ja sama idätyksen kesto). Lupiin in itujen folaattipitoisuudet olivat puolestaan vastaaviin idätettyihin siementen ytimiin verrattuna noin 5–7-kertaiset ja alkuperäisiin kuivattuihin siemeniin verrattuna noin 8–14-kertaiset. Kyseiset tulokset olivat näin ollen melko samanlaisia kuin rukiin idätyksessä saadut itujen ja idätettyjen ja alkuperäisten jyvien suhteet. Verrattaessa näitä tuloksia keskenään on kuitenkin huomioitava erilainen matriisi ja se, että lupiin in itujen kuiva-ainepitoisuuksina ei ole käytetty tarkkoja kuiva-ainepitoisuuden arvoja. Lisäksi on huomioitava, että rukiin ja lupiin in itämistapa ei ole aivan samanlainen, eivätkä muodostuvat idut ole täysin samanlaisia.

Kuorifraktioiden folaattipitoisuuksissa oli erjoa idätyskokeiden I ja II välillä. Kummassakaan idätyskokeessa folaattipitoisuuden muutokset eivät olleet kovin merkittäviä, mutta eroa oli kuitenkin siinä, mihin suuntaan muutos tapahtui. Idätyskokeessa I folaattipitoisuus suureni idätyksen aikana, kun idätyskokeessa II folaattipitoisuus puolestaan pieneni. Idätyskokeiden väliset erot voivat selittyä muun muassa sillä, että idätettyjen siementen kuorinta suoritettiin käsin. Useissa huonosti itäneissä siemenissä itu oli kiinnittynyt kuoreen, jolloin itua on voinut joutua kuorifraktion mukaan. Itujen folaattipitoisuus oli merkittävästi suurempi kuin kuorien folaattipitoisuus, joten jo pieni määrä itufraktiota kuorien joukossa on voinut vaikuttaa huomattavasti kuorifraktion folaattipitoisuuteen.

Idätysolosuhteet optimoimalla lupiinin siementen folaattipitoisuutta voidaan siis suurentaa merkittävästi. Käytetyillä koeolosuhteilla folaattipitoisuus saatiin nyt parhaimmillaan 2-kertaistettua, mutta esimerkiksi idätyslämpötilaa nostamalla folaattipitoisuutta voitaisiin saada suurennettua enemmänkin. Esimerkiksi vehnän idätyskokeissa on havaittu, että folaattipitoisuus suurenee kasvatettaessa idätyslämpötilaa 20 °C:sta 30 °C:een, mutta alkaa pienentyä idätyslämpötilan noustessa 35 °C:een (Hefni ja Witthöft 2011). Folaattipitoisuuden muutoksissa ei ollut havaittavissa eroja riippuen siitä, oliko siemenet liotettu ennen idätystä vedessä vai maitohappoliuoksessa. Maitohappoliotusta voitaisiin siis käyttää mikrobikasvun inhiboimiseksi idätyksen aikana ilman, että sillä olisi vaikutusta folaattipitoisuuksiin. Idätys vaikuttaakin näiltä osin hyvältä prosessointimenetelmältä lupiinin siementen folaattipitoisuuden suurentamiseksi.

Idätettyjen lupiinin siementen vitameerijakaumat

Kaikissa idätysnäytteissä, joista määritettiin vitameerijakaumat, valtaosa folaateista oli verrattain stabiilia 5-CH₃-H₄:a, sillä kaikissa ydinfraktioissa kyseisen vitameerin osuus kaikista folaateista oli välillä 77–88 %. Alkuperäisistä siemenistä tehdyn ydinjauhon 5-CH₃-H₄:n osuus oli noin 60 %, joten sen osuus suurentui merkittävästi idätyksen myötä. Toisaalta taas esimerkiksi epästabiilin H₄:n osuus pienentyi alkuperäisten siementen ydinjauhon 9 %:sta 1,5–5,0 %:iin näytteestä riippuen.

Ydinfraktion 5-CHO-H₄:a osuus suurentui myös idätyksen aikana samoin kuin 5,10-CH⁺-H₄:n osuus. 5,10-CH⁺-H₄:n osuuden suurentuminen voi johtua myös muodostuvan 5-CHO-H₄:n muuntumisesta 5,10-CH⁺-H₄:ksi. Etenkin happamassa pH:ssa voi tapahtua nimenomaan 5-CHO-H₄:n muuntumista 5,10-CH⁺-H₄:ksi, vaikka muuten 5-paikan typpi-atomin substituotuminen stabiloikin folaattirakenteita (Eitenmiller ym. 2008).

Lupiinin idätystä koskevia tutkimuksia ei ollut löydettävissä, mutta vastaavia idätyskokeita on tehty muun muassa rukiilla. Kariluoto ym. (2006b) tutkivat rukiin idätyksen vaikutuksia sekä kokonaisfolaattipitoisuuteen että folaattivitameereihin. Kolmen vuorokauden idätyksen jälkeen folaateista noin 55 % oli 5-CH₃-H₄:a, noin 24 % H₄:a ja noin 9 % 10-CHO-H₂:a. Vastaavat prosenttiosuudet viiden vuorokauden idätyksen jälkeen olivat noin 54 %, noin 24 % ja noin 10 %, joten vitameeriosuuksissa ei tapahtunut merkittävää muutosta ver-

rattaessa näitä kahta idätysaikaa toisiinsa. Lupiineilla 5-CH₃-H₄:n osuus oli siis huomattavasti suurempi kuin rukiissa. Kuitenkin idättämättömien lupiinien ja rukiin vitameerijakaumatkin erosivat toisistaan, ja tämä on otettava huomioon myös tarkasteltaessa idätyksen vaikutuksia folaattivitameereihin. Idättämättömän rukiin folaateista 5-CH₃-H₄:a oli noin 25 %, joten idätyksen myötä sen osuus noin 2-kertaistui (Kariluoto ym. 2001). Lupiinilla puolestaan idättämättömällä jauholla 5-CH₃-H₄:n osuus kaikista folaattivitameereista oli kokojauhossa noin 40 % ja ydinjauhossa noin 56 %. Kyseisen vitameerin osuus siten myös lupiinilla noin kaksinkertaistui.

Kariluoto ym. (2006b) tutkivat myös rukiin idätyksen myötä kasvaneiden itujen vitameerijakaumia. Itujen folaateista 67–77 % oli 5-CH₃-H₄:a eli kyseisen vitameerin osuus iduissa oli hieman suurempi kuin idätetyn rukiin jyvässä. H₄:a rukiin iduissa oli 4–10 % eli huomattavasti vähemmän kuin idätetyn rukiin jyvässä. Näiden kahden vitameerin osuuksien summat olivat kuitenkin sekä iduissa että jyvissä melko samansuuruiset. Verrattaessa näitä tuloksia lupiinien itujen vitameeriosuuksiin voidaan todeta, että 5-CH₃-H₄:n osuus lupiinien iduissa (79–91 %) on suurempi kuin rukiin jyvissä. H₄:a ei puolestaan lupiinien iduissa ole havaittavissa lainkaan. Idätettyjen lupiinien siementen 5-CH₃-H₄:n ja H₄:n yhteenlaskettu osuus kaikista vitameereista oli kaikissa idätysnäytteissä välillä 80–90 %. Myös lupiinilla tämä yhteenlaskettu 5-CH₃-H₄:n ja H₄:n osuus on hyvin samansuuruinen verrattaessa idätettyjen lupiinien siementen ja itujen vitameerien osuuksia.

Palkokasvien idätyskokeita on tehty vasta vähän, eikä siten täysin soveltuvia vertailutuloksia ole löydettävissä. Idätyskokeiden tulosten mukaan vaikuttaisi kuitenkin siltä, että lupiinien idätyksen myötä näytteeseen muodostuu stabiileja vitameereja. Lupiininäytteissä hyvin huomattava osa folaateista on 5-CH₃-H₄:a, ja siten idätyksen avulla voitaisiinkin suurentaa lupiinimatriisin folaattipitoisuutta sellaisilla folaattivitameereilla, jotka ovat optimaalisia lupiinien elintarvikekäyttöä ajatellen.

3.4.3 Fermentoinnin vaikutukset kokonaisfolaattipitoisuuksiin

Näytteiden fermentoinnin jälkeisiä folaattipitoisuuksia verrattiin sekä vastaavien vertailunäytteiden että vastaavien aikapisteiden 0 h näytteiden folaattipitoisuuksiin. *S. thermophilus* -bakteerilla fermentoiduissa näytteissä ei ollut tapahtunut merkittävää folaattipitoisuus-

den suurentumista fermentoinnin aikana. Fermentoitaessa idätettyä jauhoa folaattipitoisuus jopa pienentyi 18 % aikapisteiden 0 h ja 24 h välillä. Kyseinen folaattipitoisuuden pienentyminen voi johtua muun muassa folaattien hajoamisesta näytteessä tai siitä, että näytteessä kasvaa jokin mikrobi, joka kuluttaa folaattia. Folaattipitoisuuden pienentymistä tapahtui nimenomaan idätetyssä matriisissa, joka on idättämätöntä jauhoa ravinteikkaampi kasvualusta useille mikrobeille. Siten on todennäköistä, että siinä on kasvanut muitakin kuin lisätyjä mikrobeja, sillä koetta ei suoritettu steriloidulla jauholla.

Fermentoitaessa idättämätöntä jauhoa *S. cerevisiae* -hiivalla havaittiin selkeä folaattipitoisuuden suurentuminen. Verrattaessa aikapisteitä 0 h ja 24 h folaattipitoisuus noin 1,8-kertaistui, kun näytteeseen oli lisätty glukoosia. Ilman glukoosilisää folaattipitoisuus suurentui vain noin 13 %, joten tämän perusteella idättämätön jauho vaikuttaisi olevan liian vähäravinteinen kasvualusta *S. cerevisiae* -hiivalle, ja siksi hiivan kasvu vaatii glukoosilisän.

Idätetyn jauhon folaattipitoisuuksissa ei tapahtunut yhtä suurta muutosta fermentoitaessa *S. cerevisiae* -hiivalla kuin idättämättömässä jauhossa. Aikapisteiden 0 h ja 24 h välillä folaattipitoisuudessa havaittiin vain hieman alle 20 % suurentuminen, eikä vertailunäytteisiin verrattuna 24 h näytteiden folaattipitoisuuksissa ollut juuri eroa. Idätetyssä jauhossa glukoosilisällä ei myöskään havaittu olevan eroa folaattipitoisuuden muutokseen, joten tämän perusteella idätetty jauho vaikuttaisi sellaisenaan riittävän ravinteikkaalta kasvualustalta kyseiselle hiivalle. Pohdittaessa folaattipitoisuuden verrattain vaatimatonta suurenemista idätetyssä jauhossa verrattuna glukoosilisälliseen idättämättömään jauhoon tulee ottaa huomioon juuri tämä idätetyn jauhon ravinteikkuus. On todennäköistä, että kyseinen jauho on riittävän ravinteikas myös joidenkin muiden mikrobien kasvamiseen, ja onkin mahdollista, että jauhossa on kasvanut jokin mikrobi, joka on ollut jauhossa valmiiksi. Se, että folaattipitoisuus ei suurentunut vertailunäytteeseen nähden hiivafermentoinnin aikana idätetyssä jauhossa, ei välttämättä johdu siitä, ettei *S. cerevisiae* tuottaisi folaattia kyseisessä näytteessä. Tähän on mahdollisesti vaikuttanut myös se, että vertailunäytteessä on ollut jokin mikrobi, joka on myös tuottanut folaattia.

Kariluoto ym. (2006a) tutkivat fermentoinnin vaikutuksia rukiin folaattipitoisuuteen fermentoimalla ruisjauho-vesiseoksia 30 °C:ssa 19 h ajan. Tuloksia oli verrattu steriiliin ja epästeriiliin vertailunäytteeseen. Tutkimuksessa hiivan havaittiin suurentavan folaattipitoisuutta merkittävimmin, ja *S. cerevisiae* -hiivalla fermentoidun ruisjauhonäytteen folaattipi-

toisuus oli fermentoinnin jälkeen noin 4-kertainen steriiliin vertailunäytteeseen verrattuna. Epästeriilin vertailunäytteen folaattipitoisuus oli puolestaan jopa hieman suurempi kuin *S. cerevisiae* -hiivalla fermentoidun jauhun folaattipitoisuus. Lupiinijauhojen fermentointi steriloituja jauhoja käyttäen oletettavasti suurentaisi myös fermentoinnin aikaista folaattipitoisuuden muutosta, sillä näytteessä ei olisi ravinteista kilpailevia tai folaatteja kasvuun käyttäviä mikrobeja. Lisäksi vertailunäytteiden folaattipitoisuudet olisivat oletettavasti pienemmät, sillä jauhosta peräisin olevien folaattia tuottavien mikrobien määrä saataisiin minimoitua.

Ruisjauho-vesiseoksen *S. thermophilus* -fermentoinnin jälkeen Kariluoto ym. (2006a) havaitsivat folaattipitoisuuden olevan noin 2-kertainen steriilin vertailunäytteen folaattipitoisuuteen nähden, mutta vain noin 50 % epästeriilin vertailunäytteen folaattipitoisuudesta. Kyseisessä tutkimuksessa *S. thermophilus* -bakteerilla fermentoitujen näytteiden folaattipitoisuus kuitenkin suureni aikapisteiden 0 h ja 19 h välillä noin pitoisuudesta 70 ng/g pitoisuuteen 100 ng/g. Vastaavaa pitoisuuden suurenemista ei havaittu fermentoitaessa lupiinijauhoja *S. thermophilus* -bakteerilla etenkin idätetyssä lupiinijauhossa, jossa pitoisuus jopa laski fermentoinnin myötä. Tähän voi kuitenkin vaikuttaa se, että idätetty lupiinijauho on luultavasti ravinteikkaampi matriisi kuin idättämätön ruisjauho, ja näin ollen sopiva kasvualusta useille mikrobeille, joista osa voi myös kuluttaa folaattia.

Kariluodon ym. (2006a) tutkimuksessa oli tarkkailtu myös pH:n muutoksia fermentoinnin myötä. Lähtötilanteessa ruisjauho-vesiseosten pH-arvot olivat välillä 6,0–6,2. Lupiinijauho-vesiseosten lähtötilanteen pH-arvot vastaavat siis hyvin tätä. Kariluodon ym. (2006a) tutkimuksissa pH laski fermentoinnin aikana arvoon 5,3 fermentoitaessa samalla hiivakannalla ja arvoon 4,0 fermentoitaessa samalla *S. thermophilus* -bakteerikannalla kuin nyt lupiinijauhoja. Lupiinijauhojen hiivafermentoinnin myötä pH laski noin arvoon 5,2–5,4 näytteestä riippuen ja ruisjauhojen fermentoinnin jälkeinen pH vastasi hyvin tätä. Bakteerifermentoinnin myötä lupiinijauhojen pH laski hieman vähemmän kuin ruisjauhoissa, sillä lopputilanteen pH oli lupiinijauhoissa noin 4,3–4,5.

Pokela (2011) tutki muun muassa tempen valmistuksen aikaisia folaattipitoisuuden muutoksia kahdella eri soijapapulajikkeella. Pavut liotettiin ja keitettiin ennen 48 tunnin fermentointia. Toisella papulajikkeella neutraaliliotettujen soijapapujen folaattipitoisuus noin 3,3-kertaistui 24 tunnin fermentoinnin aikana ja jopa lähes 5,8-kertaistui 48 tunnin fermentoinnin aikana. Toisella tutkitulla papulajikkeella folaattipitoisuuden muutos oli fermentoinnin aikana.

toinnin aikana pienempi, sillä se noin 2,4-kertaistui 24 tunnissa ja noin 3,8-kertaistui 48 tunnissa. Folaattipitoisuuden suurentumisen epäiltiin johtuvan etenkin siitä, että tempen valmistukseen käytetty *Rhizopus*-home oli tuottanut näytteeseen folaattia. Lisäksi kyseisen homeen arveltiin tuottaneen myös entsyymejä, jotka vapauttivat soijapavusta matriisiin sitoutunutta folaattia. Lupiinijauhojen fermentoinnissa muodostui selvästi vähemmän folaattia. Tutkimuksissa oli kuitenkin käytetty eri mikrobeja, ja lisäksi soijapavut oli sekä liotettu että kuumennettu ennen fermentointia. Kyseiset käsittelyt tuhosivat soijapavussa olleita mikrobeja, joten näin ollen näytteisiin muodostunut folaatti on ollut lisätyn mikrobin tuottamaa. Pokelan (2011) tutkimuksen tuloksista on havaittavissa, että muun muassa papulajike voi vaikuttaa suurestikin fermentoinnin aikana tapahtuvaan folaattipitoisuuden muutokseen. Lisäksi folaattipitoisuutta saatiin suurennettua edelleen 24 tunnin fermentoinnin jälkeen, joten myös lupiinilla folaattipitoisuutta voitaisiin suurentaa edelleen pidentämällä fermentoinnin kesto.

Lupiinjauhojen fermentointikokeet tulisi toistaa, ja lisäksi kokeet tulisi suorittaa myös steriilisti. Tehty fermentointikoe kuitenkin havainnollisti, miten fermentoinnin avulla voidaan vaikuttaa lupiinin folaattipitoisuuteen. *S. thermophilus* -bakteerilla fermentoitaessa ei havaittu merkittävää muutosta lupiinijauhojen folaattipitoisuuksissa. *S. cerevisiae* puolestaan vaikutti kiinnostavalta vaihtoehdolta pyrittäessä suurentamaan lupiinijauhojen folaattipitoisuutta. Etenkin idättämättömässä jauhossa, johon oli lisätty glukoosia, havaittiin selkeä suureneminen folaattipitoisuudessa. Idätetyssä jauhossa ei tapahtunut kovin suurta muutosta vertailunäytteeseen verrattuna, mutta jotta *S. cerevisiae* -hiivan folaatin tuottoa kyseisessä matriisissa voitaisiin luotettavasti arvioida, tulisi koe suorittaa steriilisti. Lisäksi folaattien vitameerijakauma tulisi määrittää, jotta saataisiin selville, ovatko muodostuvat vitameerit stabiileja (Eitenmiller ym. 2008).

4 PÄÄTELMÄT

Bioprosessoimattomien lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet olivat noin 1200 ng/g kuiva-ainetta riippumatta siitä, oliko kyseessä alkuperäinen siemen vai laboratoriossa kuivattu siemen. Folaattipitoisuudet olivat merkittävästi pienempiä kuin Rekolan (2011) opinnäytetyössä tutkittujen lupiinin siementen kokonaisfolaattipitoisuudet. Tähän on voinut vaikuttaa se, että siemenet olivat eri sadosta ja mahdollisesti eri vaiheessa kasvukautta korjattu. Lisäksi siementen varastointi- ja mahdollisesti myös esikuivaus-olosuhteet ovat olleet erilaisia.

Kuivatuista siemenistä tehtyjen koko- ja ydinjauhojen vitameerijakaumat olivat erilaiset verrattaessa kuumennetulla puskurilla uutettuja jauhoja kuumentamattomalla puskurilla uutettuihin jauhoihin. Lisättäessä uuttopuskuri jauhoihin kuumennettuna H₄ oli säilynyt näytteissä paremmin kuin lisättäessä uuttopuskuri kuumentamattomana. Tällöinkin H₄:n osuus oli vain noin 9 %, joten valtaosa folaateista oli H₄:a stabiilimpia muotoja, kuten 5-CH₃-H₄:a ja 5-CHO-H₄:a, joiden yhteenlasketut osuudet molemmissa jauhoissa olivat välillä 75–84 %.

Idätyksen avulla saatiin parhaimmillaan 2-kertaistettua lupiinin ydinten folaattipitoisuus. Idätyiskoetoistojen välillä oli pientä eroa siinä, kuinka nopeasti folaattipitoisuus lähti suurenemaan ja kuinka kauan suurenemista tapahtui. Maitohapossa liotettujen siementen ydinten folaattipitoisuus suureni kuitenkin idätyksen aikana samalla tavoin kuin vedessä liotettujen siementen, ja siten maitohappoliotusta voitaisiin käyttää mikrobikasvun inhiboimiseen idätyksen aikana. Itujen folaattipitoisuus ei suurentunut idätyksen aikapisteiden välillä yhtä merkittävästi kuin ydinten, mutta niiden folaattipitoisuudet olivat huomattavasti suurempia kuin ydinten. Suurimmillaan itujen folaattipitoisuus oli jopa 3850 ng/g tuorepainoa eli arvioidun kuiva-ainepitoisuuden perusteella laskettuna yli 19 000 ng/g kuiva-ainetta. Sekä ydin- että itufraktioiden folaattivitameereista suurin osa oli verrattain stabiilia 5-CH₃-H₄:a. Itunäytteissä ei ollut lainkaan epästabiilia H₄:a, ja ytimissäkin kyseisen vitameerin osuus oli suurimmillaan 5 %.

Fermentointikokeessa *Streptococcus thermophilus* -bakteerin ei havaittu tuottavan folaattia idätetyssä tai idättämättömässä lupiinsiemenjauhossa. *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva puolestaan tuotti folaattia. Idättämättömässä jauhossa hiiva vaati glukoosilisän, ja tällöin

folaattipitoisuus noin 1,8-kertaistui aikapisteiden 0 h ja 24 h välillä. Ilman glukoosilisää folaatin tuotanto oli merkittävästi vähäisempää. Idätetyssä jauhossa aikapisteiden 0 h ja 24 h välillä folaattipitoisuus suureni hieman, mutta vertailunäytteeseen verrattuna folaattipitoisuus ei suurentunut. Tämän epäiltiin johtuvan siitä, että idätetty jauho on niin ravinteikas kasvualusta, että siinä on kasvanut muitakin mikrobeja, jotka ovat joko estäneet *S. cerevisiae* -hiivan kasvua tai jopa kuluttaneet näytteen folaattia.

Idätyksen ja fermentoinnin avulla voidaan suurentaa lupiinien siementen luonnostaan suurta folaattipitoisuutta merkittävästi. Prosessoituja lupiininsiemeniä voitaisiin lisätä jauhoihin ja käyttää etenkin gluteenittomaan leivontaan. Lisäksi fermentoimalla voitaisiin valmistaa tempen kaltaisia elintarvikkeita tai esimerkiksi maitoa korvaavia juomia. Jotta folaattipitoisuutta saataisiin suurennettua mahdollisimman paljon, tulisi kuitenkin vielä tutkia esimerkiksi erilaisten idätysolosuhteiden vaikutusta folaattipitoisuuden suurenemiseen. Lisäksi fermentointikoe tulisi suorittaa steriloidulla jauholla steriiliin vertailunäytteeseen verraten, jotta saataisiin tarkempaa tietoa etenkin *S. cerevisiae* -hiivan tuottaman folaatin määrästä. Fermentoinnin myötä muodostuvien vitameerien jakaumaa tulisi myös tutkia, jotta saataisiin selvitettyä, ovatko muodostuvat vitameerit stabiileja ja siten kiinnostavia elintarvikkeiden kannalta.

5 KIRJALLISUUSLÄHTEET

AACC American Association of Cereal Chemists. 2000. Method 44-15A. Moisture — Air-oven methods. Approved methods of the AACC.

AACC American Association of Cereal Chemists. 86-47.01. Total folate in cereal products — microbiological assay using trienzyme extraction. Approved methods of the AACC

Arcot J, Wong S, Shrestha AK. 2002. Comparison of folate losses in soybean during the preparation of tempeh and soymilk. *J Sci Food Agric* 82(12):1365-8.

Basset GJC, Quinlivan EP, Gregory III JF, Hanson AD. 2005. Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification. *Crop Sci* 45(2):449-53.

Blakley RL. 1987. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. Recommendations 1986. *FEBS Journal* 168(2):251-3.

Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Steegers-Theunissen RPM. 2001. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutr Res Rev* 14(2):267-93.

Campos-Vega R, Loarca-Pina G, Oomah BD. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res Int* 43(2):461-82.

Choi SW, Mason JB. 2000. Folate and carcinogenesis: An integrated scheme. *J Nutr* 130:129-132.

Committee on Genetics. 1999. Folic acid for the prevention of neural tube defects. *Pediatrics* 104(2):325-7.

Cossins E. 2000. The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Can J Bot* 78(6):691-708.

Czeizel AE, Dudas I. 1992. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327(26):1832.

Dang J, Arcot J, Shrestha A. 2000. Folate retention in selected processed legumes. *Food Chem* 68(3):295-298.

Edelmann M, Kariluoto S, Nyström L, Piironen V. 2012. Folate in oats and its milling fractions. *Food Chem.* (lähetetty julkaistavaksi)

Eitenmiller RR, Ye L, Landen WO. 2008. Folate and folic acid. *Teoksessa: Vitamin analysis for the health and food sciences.* 2 p. CRC Press.

Erbas M, Certel M, Uslu MK. 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chem* 89(3):341-5.

- Fazili Z, Pfeiffer CM, Zhang M. 2007. Comparison of serum folate species analyzed by LC-MS/MS with total folate measured by microbiologic assay and Bio-Rad radioassay. *Clin Chem* 53(4):781-4.
- Goyer A, Haynes KG. 2011. Vitamin B₁ content in potato: effect of genotype, tuber enlargement, and storage, and estimation of stability and broad-sense heritability. *Am J Pot Res* 88(4):374-85.
- Gregory JF, Sartain DB, Day BPF. 1984. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. *J Nutr* 114(2):341-53.
- Gregory JF. 1995. The bioavailability of folate. Teoksessa: *Folate in health and disease, toimittanut: Bailey L.* 1 p. Marcel Dekker.
- Gregory JF. 2008. Vitamins. Teoksessa: *Fennema's Food Chemistry, toimittanut: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR.* 4 p. CRC Press.
- Han JY, Tyler RT. 2003. Determination of folate concentrations in pulses by a microbiological method employing trienzyme extraction. *J Agric Food Chem* 51(18):5315-8.
- Hanson AD, Gregory JF. 2011. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:105-25.
- Hefni M, Öhrvik V, Tabekha M, Witthöft C. 2010. Folate content in foods commonly consumed in Egypt. *Food Chem* 121(2):540-5.
- Hefni M, Witthöft CM. 2011. Increasing the folate content in Egyptian baladi bread using germinated wheat flour. *LWT - Food Science and Technology* 44(3):706-12.
- Holasova M, Fiedlerova V, Roubal P, Pechacova M. 2005. Possibility of increasing natural folate content in fermented milk products by fermentation and fruit component addition. *Czech J Food Sci* 23(5):196-201.
- Holasova M, Fiedlerova V, Vavreinova S. 2008. Determination of folates in vegetables and their retention during boiling. *Czech J Food Sci* 26(1):31-7.
- Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, Douce R, Rebeille F. 2003. One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol* 131(3):1431.
- Jastrebova J, Strandler HS, Patring J, Wiklund T. 2011. Comparison of UPLC and HPLC for analysis of dietary folates. *Chromatographia* 73(3):219-25.
- Johansson M. 2005. Analytical and nutritional aspects of folate in cereals. [väitöskirja]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Kariluoto S, Vahteristo L, Piironen V. 2001. Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in studying folate contents in rye. *J Sci Food Agric*, 81(9), p 938-942 81(9):938-42.

Kariluoto S, Vahteristo L, Salovaara H, Katina K, Liukkonen KH, Piironen V. 2004. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chem* 81(1):134-9.

Kariluoto S, Aittamaa M, Korhola M, Salovaara H, Vahteristo L, Piironen V. 2006a. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *Int J Food Microbiol* 106(2):137-43.

Kariluoto S, Liukkonen KH, Myllymaki O, Vahteristo L, Kaukovirta-Norja A, Piironen V. 2006b. Effect of germination and thermal treatments on folates in rye. *J Agric Food Chem* 54(25):9522-8.

Kariluoto S, Edelmann M, Piironen V. 2010. Effects of environment and genotype on folate contents in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *J Agric Food Chem* 58(17):9324-933.

Koehler KM, Pareo-Tubbeh S, Romero LJ, Baumgartner RD, Garry PJ. 1997. Folate nutrition and older adults: Challenges and opportunities. *J Am Diet Assoc* 97(2):167.

Legume Futures Resource Centre. 2010. About legume futures. Saatavilla: <http://www.legumefutures.eu/about>. Tulostettu: 12.4.2012.

Liu S, West R, Randell E, Longrich L, OConnor KS, Scott H, Crowley M, Lam A, Prabhakaran V, McCourt C. 2004. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy and Childbirth* 4(20):

Maknickiene Z, Asakaviciute R. 2008. Alkaloid content variations in lupin (*Lupinus L.*) genotypes and vegetation periods. *Biologija* (2):112-5.

Martínez-Villaluenga C, Frías J, Vidal-Valverde C. 2006. Functional lupin seeds (*Lupinus albus L.* and *Lupinus luteus L.*) after extraction of α -galactosides. *Food Chem* 98(2):291-9.

Molloy AM. 2005. The role of folic acid in the prevention of neural tube defects. *Trends Food Sci Technol* 16(6):241-5.

Nassar AG, Mubarak AE, El-Beltagy A. 2008. Nutritional potential and functional properties of tempe produced from mixture of different legumes. 1: Chemical composition and nitrogenous constituent. *Int J Food Sci Tech* 43(10):1754-8.

Öhrvik V, Staffas A, Strandler H, Mattisson I. 2010. Pulses as vitamin sources. [konferenssijulkaisu]. The First International Vitamin Conference. 19.-21.5.2010, Kööpenhamina.

Patring J. 2007. Development and validation of chromatographic methods to study folate derivatives produced by yeasts. [väitöskirja]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.

Paturi M, Tapanainen H, Reinivuo H, Pietinen P. 2008. Finravinto 2007 -tutkimus. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja B23/2008.

- Pokela L. 2011. Folaatti- ja B12-vitamiinipitoisuudet tofun ja tempen valmistuksessa, EKT-sarja 1501. [maisterin tutkielma]. Helsingin yliopisto.
- Rekola K. 2011. Kokonaisfolaattipitoisuuden määrittäminen härkäpavuista, linsseistä ja lupiineista sekä selvitys niiden vitameerijakaumista. [opinnäytetyö]. Tampereen ammattikorkeakoulu.
- Ryan-Harshman M, Aldoori W. 2008. Folic acid and prevention of neural tube defects. *Can Fam Physician* 54(1):36.
- Rychlik M, Englert K, Kapfer S, Kirchhoff E. 2007. Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *J Food Comp Anal* 20(5):411-9.
- Sahr T, Ravanel S, Rebeille F. 2005. Tetrahydrofolate biosynthesis and distribution in higher plants. *Biochem Soc Trans* 33(4):758-62.
- Scott J, Rebeille F, Fletcher J. 2000. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric* 80(7):795-824.
- Sektoritutkimuksen neuvottelukunta. 2010. Elintarvikevalintojen ja ohjauseinojen haasteet globaalissa toimintaympäristössä. 1-2010.
- Selhub J, Troen A, Rosenberg IH. 2010. B vitamins and the aging brain. *Nutr Rev* 68:112-8.
- Stea TH, Johansson M, Jagerstad M, Frolich W. 2007. Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. *Food Chem* 101(3):1095-107.
- Stoddard F, Lizarazo C, Mäkelä P, Nykänen A. 2009. Uusia palkokasveja Suomen olosuhteisiin. *Maaseudun tiede* 3:10.
- Tiwari BK, Gowen A, McKenna B. 2011. Pulse Foods. Processing, quality and nutraceutical applications. 1. p. Academic Press. 496 s.
- US Department of Agriculture. 2011. USDA nutrient database for standard reference. saatavissa: <http://ndb.nal.usda.gov/>. Päivitetty: 07.12.2011. Tulostettu: 4.3.2012.
- Vadez V, Berger JW, T., Asseng S, Ratnakumar P, Rao K, Gaur P, Munier-Jolain N, Larmure A, Voisin A, Sharma H, Pande S, Sharma M, Krishnamurthy L, Zaman M. 2012. Adaptation of grain legumes to climate change: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 32(1):31-44.
- Vahteristo LT, Lehikoinen KE, Ollilainen V, Koivistoinen PE, Varo P. 1998. Oven-baking and frozen storage affect folate vitamere retention. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 31(4):329-33.
- Valtion ravitsemusneuvottelukunta. 2005. Suomalaiset ravitsemussuosituksien - ravinto ja liikunta tasapainoon. Edita Publishing.

Viksten S. 2012. Sinilupiinin idätys ja fermentointi, EKT-sarja 1549. [maisterin tutkielma]. Helsingin yliopisto. (painossa)

Wald DS, Morris JK, Law M, Wald NJ. 2006. Cardiovascular disease - Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *Br Med J* 333(7578):1114-7.

LIITE 1 Vitameerien injektioinnit standardisuoraa varten

Vitameerien injektioinnit UPLC:lle standardisuoraa varten.

Injektioilavuus	Affiniteettkromatografialla		Vitameerimäärät injektiossa (ng)						
	puhdistettu näytetilvuus	H4	5-CH3-H4	5-CHO-H4	10-CHO-PGA	PGA	10-CHO-H2	5,10-CH+-H4	
2 µl	200 µl	0,0162	0,0160	0,0158	0,0161	0,0160	0,0320	0,0159	
10 µl	200 µl	0,0808	0,0801	0,0792	0,0803	0,0799	0,1598	0,0797	
10 µl	400 µl	0,1616	0,1603	0,1585	0,1606	0,1598	0,3197	0,1594	
10 µl	900 µl	0,3635	0,3606	0,3565	0,3614	0,3595	0,7192	0,3586	
20 µl	900 µl	0,7271	0,7212	0,7130	0,7229	0,7189	1,4385	0,7171	
30 µl	200 µl	0,2424	0,2404	0,2377	0,2410	0,2396	0,4795	0,2390	
30 µl	400 µl	0,4847	0,4808	0,4754	0,4819	0,4793	0,9590	0,4781	
30 µl	900 µl	1,0906	1,0819	1,0696	1,0843	1,0784	2,1577	1,0757	
30 µl	1200 µl	1,4541	1,4425	1,4261	1,4458	1,4378	2,8769	1,4343	

LIITE 2 Idätettyjen lupiin siementen kokonaisfolaatipitoisuudet

Idätyskokeiden näytteiden folaatipitoisuudet.

Näyte	Kokonaisfolaatipitoisuus (ng/g tp)	Kuiva-ainepitoisuus(%)	Kokonaisfolaatipitoisuus (ng/g ka)
Kuorifraktio, 1 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	110 (28%*)	65,7	167
Idut, 1 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	3275		
Ydinfraktio, 1 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	717	42,4	1691
Kuorifraktio, 2 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	173	81,8	211
Idut, 2 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	3845		
Ydinfraktio, 2 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	1097	48,1	2281
Kuorifraktio, 3 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	182 (33%*)	80,6	226
Idut, 3 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	4192		
Ydinfraktio, 3 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	1213	52,5	2310
Kuorifraktio, 4 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	180	80,3	224
Idut, 4 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	3849		
Ydinfraktio, 4 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	1150	60,0	1908
Kuorifraktio, 5 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	199 (29 %*)	84,0	237
Idut, 5 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	3578		
Ydinfraktio, 5 vrk, vesiliotus, idätyskoe I	1236	65,0	1902
Kuorifraktio, 1 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	90 (28 %*)	54,3	166
Idut, 1 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	2813		
Ydinfraktio, 1 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	683	37,6	1816
Kuorifraktio, 2 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	116	67,5	172
Idut, 2 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	2370		
Ydinfraktio, 2 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	868	41,1	2112
Kuorifraktio, 3 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	57	77	74
Idut, 3 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	2553		
Ydinfraktio, 3 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	975	44,2	2206
Kuorifraktio, 4 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	55	74	74
Idut, 4 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	2896		
Ydinfraktio, 4 vrk, vesiliotus, idätyskoe II	1151	45,4	2535
Ydinfraktio, 1 vrk, maitoh.liotus, idätyskoe III	635	37,7	1684
Ydinfraktio, 2 vrk, maitoh.liotus, idätyskoe III	857	41	2090
Ydinfraktio, 3 vrk, maitoh.liotus, idätyskoe III	1081	42,4	2550
Ydinfraktio, 4 vrk, maitoh.liotus, idätyskoe III	1142	45,2	2527

*Rinnakkaisten näytteiden välinen ero prosentteina näytteillä, joissa ero ollut suurempi kuin 10 %.

LIITE 3 Fermentoitujen lupiinijauhojen kokonaisfolaattipitoisuudet

Taulukko 1. Fermentointikokeiden tulokset aikapisteissä 0 h ja 24 h.

Jauhomatriisi	Mikrobi	Glukoosilisä	Aikapiste	Folaattipitoisuus ng/g tp	Muutos vertailunäyt- teeseen verrattuna	pH
idätetty	<i>kontrolli</i>	kyllä	0 h	149		5,86
idätetty	<i>kontrolli</i>	ei	0 h	155		5,88
idättämätön	<i>kontrolli</i>	kyllä	0 h	114		6,17
idättämätön	<i>kontrolli</i>	ei	0 h	114		6,2
idätetty	<i>S. thermophilus</i>	ei	0 h	193		5,95
idätetty	<i>S. cerevisiae</i>	kyllä	0 h	210		5,96
idätetty	<i>S. cerevisiae</i>	ei	0 h	205		5,89
idättämätön	<i>S. thermophilus</i>	ei	0 h	135		6,23
idättämätön	<i>S. cerevisiae</i>	kyllä	0 h	153		6,11
idättämätön	<i>S. cerevisiae</i>	ei	0 h	157		6,12
idätetty	<i>kontrolli</i>	kyllä	24 h	236		4,7
idätetty	<i>kontrolli</i>	ei	24 h	250		5,44
idättämätön	<i>kontrolli</i>	kyllä	24 h	142		4,62
idättämätön	<i>kontrolli</i>	ei	24 h	139		4,57
idätetty	<i>S. thermophilus</i>	ei	24 h	159	-91	4,45
idätetty	<i>S. cerevisiae</i>	kyllä	24 h	245	9	5,25
idätetty	<i>S. cerevisiae</i>	ei	24 h	241	-9	5,39
idättämätön	<i>S. thermophilus</i>	ei	24 h	149	10	4,32
idättämätön	<i>S. cerevisiae</i>	kyllä	24 h	270	128	5,38
idättämätön	<i>S. cerevisiae</i>	ei	24 h	178	38	5,23

Taulukko 2. Fermentointikokeen eri aikapisteiden välinen vertailu.

Mikrobi	Idätetty/idättämätön jauho	Glukoosilisä	Folaattipitoisuus 0 h (ng/g tp)	Folaattipitoisuus 24 h (ng/g tp)	Folaattipitoisuu- den muutos aika- pisteiden välillä
<i>S. thermophilus</i>	idätetty	ei	193	159	-18%
<i>S. cerevisiae</i>	idätetty	kyllä	210	245	17%
<i>S. cerevisiae</i>	idätetty	ei	205	241	18%
<i>S. thermophilus</i>	idättämätön	ei	135	149	11%
<i>S. cerevisiae</i>	idättämätön	kyllä	153	270	77%
<i>S. cerevisiae</i>	idättämätön	ei	157	178	13%
vertailunäyte	idätetty	kyllä	149	236	58%
vertailunäyte	idätetty	ei	155	250	61%
vertailunäyte	idättämätön	kyllä	114	142	25%
vertailunäyte	idättämätön	ei	114	139	22%

LIITE 4 Lupiinijauhojen vitameerijakaumat

Lupiinikokojauhon ja -ydinjauhon folaattien vitameerijakaumat.

Vitameeri	Kuumennettu puskuri		Kuumentamaton puskuri	
	Kokojauho	Ydinjauho	Kokojauho	Ydinjauho
H ₄ (%)	9,1	8,7	1,3	0,4
5-CH ₃ -H ₄ (%)	40,4	56,4	65,7	70,2
5-CHO-H ₄ (%)	34,6	27,5	25,3	24,7
5,10-CH ⁺ -H ₄ (%)	10,4	4,3	3,1	1,8
PGA (%)	3,0	3,0	2,7	2,6
10-CHO-H ₂ (%)	0,0	0,0	0,0	0,0
10-CHO-PGA (%)	2,4	0,1	1,9	0,3

LIITE 5 Idätysnäytteiden vitameerijakaumat

Taulukko 1. Idätyskokeiden I, II ja III näytteiden vitameerijakaumat prosentteina.

Näyte	H ₄ (%)	5-CH ₃ -H ₄ (%)	5-CHO-H ₄ (%)	5,10-CH ⁺ -H ₄ (%)	PGA (%)	10-CHO-H ₂ (%)	10-CHO-PGA (%)
1 vrk, IK I	3,4	89,6	2,7	2	2,3	0,0	0
2 vrk, IK I	2,4	86,0	4,1	5,7	1,9	0,0	0
3 vrk, IK I	1,8	85,8	5,0	5,8	1,7	0,0	0
4 vrk, IK I	2,5	83,9	5,2	5,4	1,7	0,0	1,4
5 vrk, IK I	2,2	79,5	7,8	6,6	1,5	0,0	2,4
1 vrk, IK II	2,2	82,0	1,0	4,8	9,8	0,0	0,2
2 vrk, IK II	1,5	79,5	4,5	6,7	7,4	0,0	0,4
3 vrk, IK II	3,4	80,7	4,4	6,4	5,0	0,0	0
4 vrk, IK II	5,0	78,5	4,9	7,4	4,0	0,0	0,2
1 vrk, IK III	1,8	88,5	2,7	3,8	2,6	0,0	0,6
2 vrk, IK III	2,3	86,5	2,3	6,4	2,0	0,0	0,5
3 vrk, IK III	4,0	78,2	4,7	10,3	1,7	0,0	1
4 vrk, IK III	3,0	80,3	4,6	9,8	1,3	0,0	0,9

Taulukko 2. Idätyskoe II:n itunäytteiden vitameerijakaumat prosentteina.

Näyte	H ₄ (%)	5-CH ₃ -H ₄ (%)	5-CHO-H ₄ (%)	5,10-CH ⁺ -H ₄ (%)	PGA (%)	10-CHO-H ₂ (%)	10-CHO-PGA (%)
1 vrk, IK II	0,0	79,2	2,5	8,1	1,6	0,0	8,5
2 vrk, IK II	0,0	89,6	0,0	3,2	2,1	0,0	5,1
3 vrk, IK II	0,0	90,5	0,0	3,1	1,7	0,0	4,7
4 vrk, IK II	0,0	85,9	0,0	3,2	2,5	0,0	8,4
5 vrk, IK II	0,0	84,9	0,0	3,5	2,4	0,0	9,2