

ISSN 0355-1180

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

EKT 1851

**LEHMÄNMAIDON LÄMPÖKÄSITTELYN TODENTAMINEN
β-LAKTOGLOBULIININ RAKENNEMUUTOSTEN PERUSTEELLA**

Antti Haapalainen

Helsinki 2018

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author Antti Haapalainen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Lehmänmaidon lämpökäsittelyn todentaminen β -laktoglobuliinin rakennemuutosten perusteella			
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarviketeknologia (maitoteknologia)			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma	Aika — Datum — Month and year Marraskuu 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 49 + 2	
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Tutkielman aluksi tutustutaan β-laktoglobuliinin rakenteeseen sekä maidon lämpökäsittelyihin ja niiden aiheuttamiin muutoksiin. Lisäksi perehdytään käytettyjen menetelmien teoriaan ja näytteiden valmistelun käytänteisiin. Kokeissa keskityttiin yhdistämään kerättyjä tietoja, jotta natiivi-PAGE ja Western blotting -menetelmät saataisiin toimimaan yhdessä maito- ja heranäytteiden sekä β-laktoglobuliinin vasta-aineen kanssa. Toimivuuden ohella oli tärkeää saada yleisimmät kaupallisesti käytetyt lämpökäsittelyt eroteltua toisistaan pienistäkin pitoisuuksista.</p> <p>Kokeellisessa tutkimuksessa kehitetyllä menetelmällä on mahdollista erotella toisistaan raakamaito, pastöroitu maito, ESL- ja UHT-käsitellyt maidot. Merkittäviä eroja näytteiden välillä löytyi β-laktoglobuliinin natiivimuotoja ja oligomeerejä tarkastelemalla. Käsittelyn voimakkuuden kasvaessa natiivien BLG-muotojen määrä väheni suhteessa lievempään lämpökäsittelyyn, kunnes UHT käsitellyssä maidossa niitä ei havaittu enää ollenkaan. Pienien oligomeerien määrän havaittiin kasvavan ESL-käsittelyn voimakkuuteen asti, jonka jälkeen ne hävisivät lähes kokonaan UHT-käsittelyn voimakkuudessa. UHT-käsittely oli riittävän voimakas aggregoimaan lähes kaiken havaittavan BLG:n niin suuriksi komplekseiksi, etteivät ne päässeet näytekäivosta erottelugeeliin ja geeli jäi lähes tyhjäksi.</p> <p>Menetelmän erottelukyky vaikuttaa erinomaiselta, sillä niinkin pieni kuin 2 μg β-laktoglobuliinia tai 3 μl maitoa riittää luettavan tuloksen saamiseksi. Vasta-aineen erottelukyky on parempi kuin pelkän PAGE-menetelmän ja se on BLG-spesifinen. Lisäksi näytteet voivat olla pakastettuja. Natiivi-PAGE yhdistettynä Western blotting -menetelmään on kuitenkin herkkä häiriöille ja vie aikaa, joten se soveltuu enemmän pitkäaikaiseen tutkimukseen kuin päivittäiseen lämpökäsittelyn seurantaan.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords lehmänmaito, lämpökäsittely, BLG, β -laktoglobuliini, natiivi-PAGE, Western blotting, vasta-aine, lämpökäsittely			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-sarja 1851			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Food and Nutrition	
Tekijä — Författare — Author Antti Haapalainen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Determining heat treatment of bovine milk by analyzing structural changes of β -lactoglobulin			
Oppiaine — Läroämne — Subject Food Technology (Dairy Technology)			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year November 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 49 + 2
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>In the literature section, knowledge was gathered about β-lactoglobulin, typical heat treatments and what effects they have on milk, sample preparation and the methods used in the practical part. Aim in the laboratory was to create a functional method for evaluating milk and whey samples using native-PAGE and Western blotting methods together with β-lactoglobulin specific antibody. The idea was to create a method able to tell apart and determine the most common treatment levels of milk from even tiny sample volumes.</p> <p>With the method developed in the practical study, it is possible to distinguish raw, pasteurized, ESL and UHT milks. Significant differences were found in the amounts of native and oligomer forms of β-lactoglobulin. The more intense the heat treatment, the less native forms are left on the gel, and there might not be any left in UHT milk. Number of small oligomers first increases from raw to ESL, but decreases again significantly in UHT milk. Almost all the protein in UHT milk is too large to enter the separation gel.</p> <p>Resolving power of the method seems excellent, since mere 2 μg BLG or 3 μl milk is enough to gain results even from thawed samples. In comparison to native-PAGE the antibody has better sensitivity and it gives BLG-specific information from smaller amounts than just the Native-PAGE method. However native-PAGE combined with Western Blotting is quite time consuming and prone to errors, and therefore this method is better suited to long term research purposes rather than daily routine monitoring of heat treatment.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords bovine milk, cow milk, BLG, β -lactoglobulin, native-PAGE, Western blotting, antibody, heat treatment			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited The Digital Repository of University of Helsinki, Helda			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-Series 1851			

ESIPUHE

Suoritin maisterintutkielman laboratorio-osuuden Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteidenlaitoksella sen elintarviketeknologian osastolla helmikuun 2015 ja syyskuun 2016 välillä. Tutkielman kirjoittamisen sain monien vaiheiden jälkeen lopulta päätökseen syyskuussa 2018. Ohjaajina olivat maitoteknologian professori Tapani Alatossava ja maitoteknologian yliopistonlehtori Pekka Varmanen.

Keskityin tutkimaan lämpökäsittelyjen aiheuttamia muutoksia heraproteiinien, erityisesti β -laktoglobuliinin (BLG), rakenteessa. Tammi-helmikuussa 2015 suorittamani tutkimusharjoittelun aikana olin tutustunut tutkielmassani tarvittaviin menetelmiin ja todennut BLG-spesifin vasta-aineen toimivuuden suunnitellun kaltaisessa prosessissa. Selvitin kirjallisuuden avulla oletettavissa olevia muutoksia, vertasin niitä saatuihin tuloksiin ja tein päätelmiä niiden tietojen pohjalta. Työn aikana minulle selvisi monia asioita myös itsestäni työntekijänä.

Kiitokset ohjaajille ja laboratoriossa työskennelleille avusta kokeiden suorittamisessa ja kirjoitustyössä sekä suurkiitos yliopistolle ja vastuuproffessorille ymmärryksestä projektin venyessä. Lisäksi kiitän Helsingin yliopiston professorien puolisoita ry:tä stipendin tuomasta taloudellisesta tuesta. Lopuksi tahdon antaa suurimmat kiitokseni tasapuolisesti sekä äidilleni, että puolisololleni kannustuksesta vaikeina aikoina.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ESIPUHE

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO.....	7
2	KIRJALLISUUSKATSAUS.....	8
2.1	MAIDON LÄMPÖKÄSITTELY.....	8
2.1.1	Termisointi.....	8
2.1.2	Pastörointi.....	8
2.1.3	Korkeapastörointi.....	9
2.1.4	ESL-kuumennus.....	9
2.1.5	Iskukuumennus (UHT).....	9
2.1.6	Sterilointi.....	10
2.2	MAIDON LÄMPÖKÄSITTELYN TOTEAMISEEN KÄYTETTYJÄ SOVELLUKSIA.....	10
2.3	MAIDON FRAKTIOINTI.....	13
2.3.1	Rasvan erottaminen.....	13
2.3.2	Heran erottaminen hapolla.....	13
2.3.3	Heran erottaminen entsyymillä.....	14
2.4	B-LAKTOGLOBULIINI (BLG).....	15
2.4.1	β -laktoglobuliinin rakenteesta.....	16
2.4.2	β -laktoglobuliinin aggregoitumisesta.....	17
2.5	POLYAKRYYLIAMIDIGEELIELEKTROFOREESI (PAGE).....	19
2.6	WESTERN BLOTTING.....	20
2.6.1	Siirto (engl. transfer).....	20
2.6.2	Tukkiminen eli blokkauk (engl. blocking).....	21
2.6.3	Vasta-aineiden kiinnitys.....	21
2.6.4	Kuvantaminen.....	23
3	KOKEELLINEN TUTKIMUS.....	24
3.1	TUTKIMUKSEN TAVOITE.....	24
3.2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	24
3.2.1	Näytteet.....	25

3.2.2	Näytteiden esikäsittely.....	25
3.2.3	Analyysin suorittamisen kuvaus.....	27
3.3	KOESUUNNITTELU	28
3.3.1	Proteiinien rakennemuutosten määrittäminen eri pH-arvoissa.....	28
3.3.2	Heran kymosiinilla erottamisen ja näytteiden suodattamisen	
	vaikutusten määrittäminen.....	29
3.3.3	Rasvan ja homogenoinnin vaikutusten määrittäminen.....	30
3.3.4	Lämpökäsittelyiden aiheuttamien BLG:n muutosten määrittäminen	
	maidossa ja fosfaattipuskurissa	30
3.3.5	Lämpökäsittelyiden eroja havainnollistavien sarjojen määrittäminen	
	tuoreista ja pakastetuista näytteistä.....	30
3.4	TULOKSET	31
3.4.1	BLG- ja heranäytteiden pH:n vaikutus proteiinirakenteisiin.....	31
3.4.2	Kymosiinierotuksen ja suodatuksen vaikutuksia maitonäytteiden	
	luettavuuteen.....	35
3.4.3	Rasvan ja homogenoinnin vaikutus BLG:n rakenteisiin pastöroidussa	
	maidossa	37
3.4.4	Lämpökäsittelyiden vaikutuksia BLG-proteiiniin maidossa	
	ja fosfaattipuskurissa	38
3.4.5	Tuoreista ja pakastetuista näytteistä muodostetut lämpökäsittelyiden	
	eroja havainnollistavat sarjat	39
3.5	POHDINTA.....	43
4	PÄÄTELMÄT	46
	LÄHDELUETTELO	47

LIITTEET

Liite 1. Kokeissa käytettyjen työvälineiden luettelo

Liite 2. Kokeissa käytettyjen aineiden ja reagenssien luettelo

1 JOHDANTO

Maidon lämpökäsittelyyn on monia tapoja ja sen todentamiseksi on kehitetty erilaisia menetelmiä (Feinberg ym. 2005; Ritota ym. 2017), mutta mikään niistä ei ole täydellinen. Tästä syystä uudelle menetelmälle olisi käyttöä. β -laktoglobuliinia (BLG) on käytetty ennenkin määrittämään maidon lämpökäsittelyn voimakkuutta (esim. Lin ym. 2010), mutta tiettävästi BLG:n vasta-aineen avulla suoritettua todentamista ei ole aiemmin tutkittu. Esitutkimuksissa totesin, että BLG:n vasta-ainetta voidaan soveltaa Western blotting -menetelmään. Lisäksi tutkimuksissa voisi paljastua uutta tietoa BLG:sta ja lämpökäsittelyistä. Uusi tieto voisi tuottaa muitakin soveltamismahdollisuuksia. Edellä mainittujen perusteella tutkimuksen aloittaminen oli perusteltua

Kirjallisuuskatsaus keskittyy BLG:iin, maidon lämpökäsittelyyn ja sen todentamiseen liittyvään tietoon. Kokeellisessa osiossa on pyritty hyödyntämään olemassaolevaa tietoa, jotta löydetään sopivat ja riittävän yksinkertaiset menettelytavat uudelle määrittämenetelmälle.

Maisterintutkielman kokeellisen tutkimuksen tavoitteena oli havaita lämpökäsittelyn aiheuttamia muutoksia nestemaitotuotteissa ja kehittää menetelmä, jolla pystytään tunnistamaan maidolle suoritettun lämpökäsittelyn intensiivisyys pienistäkin näytemääristä.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Maidon lämpökäsittely

Maidon lämpökäsittelyn tarkoituksena on ensisijaisesti taata tuotteen hyvä mikrobiologinen laatu, alentaa entsyymiaktiivisuuksia ja mahdollisesti aikaansaada kemiallisia muutoksia, joista on hyötyä maidon jatkojalostuksessa (Walstra ym. 2006). Erilaisia lämpökäsittelymenetelmiä on kehitetty erilaisiin tarpeisiin ja lämpökäsittelymenetelmä valitaankin yleensä maidon käyttötarkoituksen ja halutun säilyvyyden mukaan. Lämpökäsittelymenetelmät eroavat toisistaan kuumennukseen käytetyn ajan ja lämpötilan suhteen. Oikean lämpökäsittelyn voimakkuuden ja keston määrittäminen on tärkeää, jotta saadaan kuumennuskäsittelystä riittävä hyöty aiheuttamatta kuitenkaan liikaa ei-toivottuja muutoksia. Raja-arvot ovat usein valittu siten, että lämpökäsittely on riittävä jonkin bakteerin tuhoamiseksi tai tietyn entsyymin aktiivisuuden lopettamiseksi. Erilaisia lämpökäsittelyitä jaoteltuina niiden voimakkuuden perusteella ovat: termisointi, pastörinti, korkeapastörinti, ESL-käsittely, isku-kuumennus (UHT) ja sterilointi (Walstra ym. 2006; Milk Works 2016).

2.1.1 Termisointi

Termisoinnin on määrä tappaa eläviä bakteereja, erityisesti psykrotrofeja eli kylmäsäilytyslämpötiloissa lisääntyviä bakteereja, ja alentaa joidenkin entsyymien aktiivisuutta (Walstra ym. 2006). Termisointi ei juurikaan aiheuta peruuttamattomia muutoksia maidon muihin ominaisuuksiin. Lämpökäsittelyaika on yleensä 20 s ja lämpötila 60 - 69 °C.

2.1.2 Pastörinti

Walstran ym. (2006) mukaan pastörintin mittarina on maidon alkalinen fosfataasi-entsyymi (EC 3.1.3.1), jonka aktiivisuuden pitäisi hävitä lämpökäsittelyn seurauksena. Tähän riittää 15 s lämpökäsittely väh. 72 °C:n lämpötilassa tai 30 min väh. 63 °C:n lämpötilassa. Rysstadin ja Kolstadin (2006) mukaan jo 71,7 °C:n lämpötilassa 15 s käsittely olisi riittävä. Rysstad ja Kolstad (2006) mainitsevat myös muiden vastaavien aika-lämpötila yhdistelmien olevan käypiä, kunhan fosfataasitestin (alkalisen fosfataasin aktiivisuutta mittaava testi) tulos on negatiivinen ja peroksidaasitestin (laktoperoksidaasi -entsyymien aktiivisuutta mittaava testi) tulos on positiivinen. Pastörintinissa kuolevat patogeenit ja suurin osa vegetatiivisista bakteereista, mutta bakteerien itiöt selviävät, kun taas hiivojen ja homeiden itiöt kuolevat (Walstra ym. 2006; Tomasula ym. 2011). Osa entsyymeistä menettää aktiivisuutensa,

maidon maku ei juuri muutu ja hyvin pieni osa heran proteiineista lämpödenaturoituu. Hie-
man voimakkaampi lämpökäsittely (20 s 75 °C:ssa) riittää denaturoimaan maidon immuno-
globuliinit vähentäen kylmäagglutinaatiota ja bakteerien kasvua hidastavien järjestelmien
toimintaa sekä aiheuttaa havaittavaa maun muutosta maidossa. Pastörointi on tyypillinen
lämpökäsittely mm. juotaville maidoille. Pastöroinnista puhuttaessa käytetään joissain yh-
teyksissä myös termiä HTST (High Temperature Short Time) kuvaamaan nopeaa, jatkuva-
toimista pastörointitapaa. Pastörointi on kenties yleisin maidolle suoritettava lämpökäsittely,
ainakin Suomessa.

2.1.3 Korkeapastörointi

Walstran ym. (2006) mukaan korkeapastöroinnin on tuhoava maidon laktoperoksidaasin -
entsyymin (EEC 1.11.17) aktiivisuus, mikä saavutetaan 20 s lämpökäsittelyllä 85 °C:n läm-
pötilassa. Kuumennuslämpötila voidaan nostaa aina 100 °C:n lämpötilaan asti. Lähes kaikki
elävät bakteerit kuolevat ja monet entsyymit menettävät aktiivisuutensa, mutta maidon plas-
miini, lipaasi ja joidenkin bakteerien tuottamat proteinaasit säilyttävät ainakin osan aktiivi-
suudestaan. Heraproteiinien lämpödenaturaatiota tapahtuu, mikä on toivottu ominaisuus
mm. jogurtteja valmistettaessa. Keitetyn makua ilmaantuu ja C-vitamiini tuhoutuu, mutta
muuten maidolle ei tapahdu suuria ravitsemuksellisia tai pysyviä kemiallisia muutoksia.

2.1.4 ESL-kuumennus

ESL on lyhenne sanoista Extended Shelf Life eli pidennetty hyllyikä, mutta ESL-kuumennus
ei ole kovinkaan yksiselitteinen määritelmä. ESL-kuumennus on iskukuumennuksen tapai-
nen lämpökäsittely, jossa maito voidaan kuumentaa esim. 125 - 135 °C:n lämpötilaan 0,5 -
2 s ajaksi (Rysstad ja Kolstad 2006; Milk Works 2016; Valio Oy 2016; Deeth 2017). ESL-
kuumennus voidaan myös luokitella kuuluvaksi korkeapastörointiluokkaan, sillä lopputulos
ei ole steriili tuote ja siksi kylmässä säilytettävä. ESL-tuotteen valmistuksessa on monia tek-
niikoita ja pidemmän hyllyiän saavuttamiseksi käytetään myös mekaanisia keinoja (mm.
suodatus) ja erilaisia hygieenisiä pakkausmenettelyjä, joilla tuotteen säilyvyyttä saadaan pa-
rannettua (Rysstad ja Kolstad 2006).

2.1.5 Iskukuumennus (UHT)

Iskukuumennuksen eli UHT-käsittelyn (Ultra-High Temperature) tarkoituksena on tappaa
kaikki mikrobit ml. itiöt aiheuttamatta suuria muutoksia maidon maulle tai ravintoarvoille

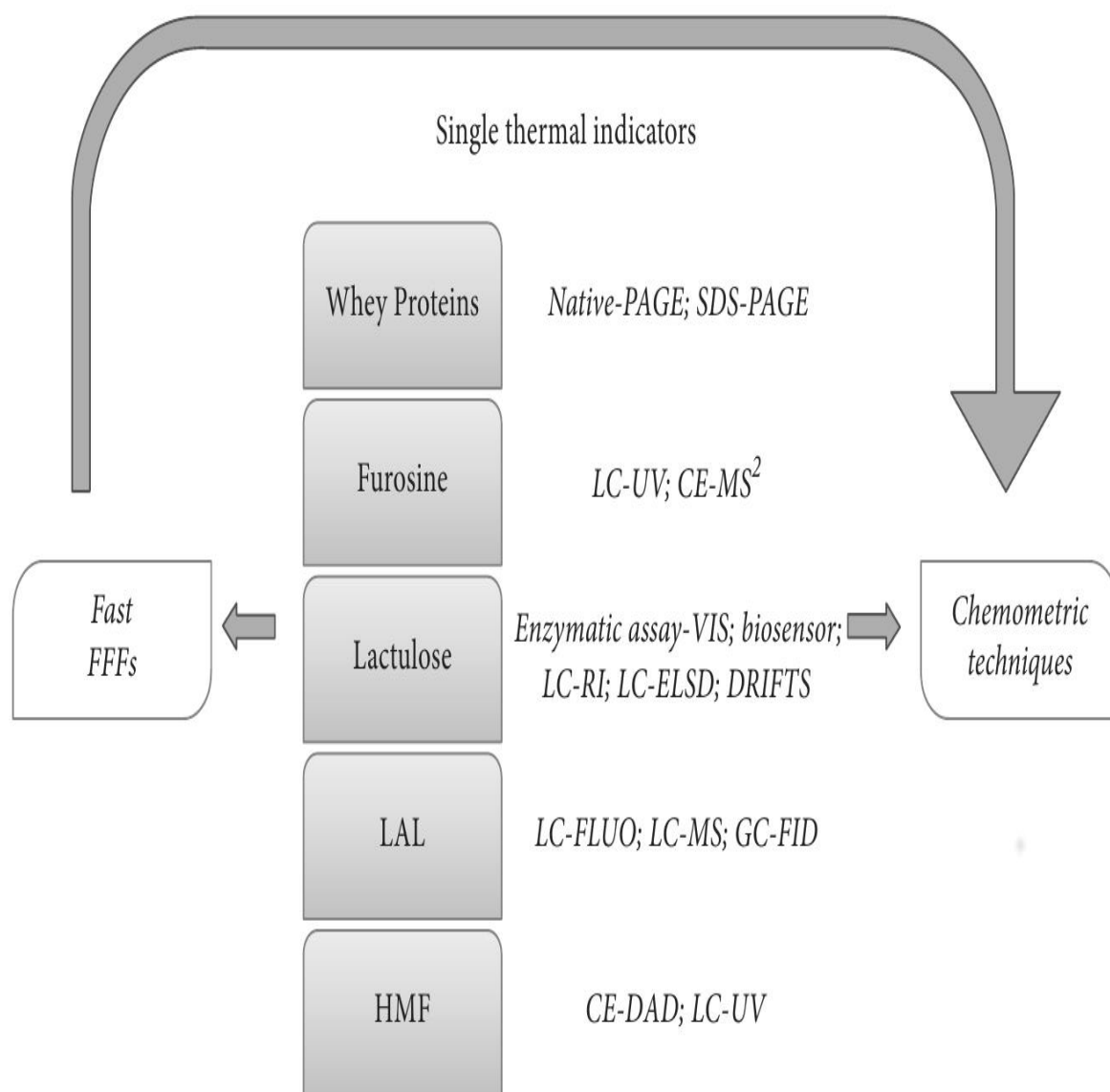
(Walstra ym. 2006; Rysstad ja Kolstad 2006). Iskukuumennuskäsittelyn lämpötila-aika yhdistelmistä löytyy erilaisia variaatiota eri lähteissä. Walstran ym. (2006) mukaan maidon lämpökäsittely väh 1 s väh. 145 °C:n lämpötilassa tai 30 s väh. 130 °C:n lämpötilassa ovat riittäviä, kun Rysstad ja Kolstad (2006) mainitsevat, että UHT-käsittelyssä maidon tulisi saavuttaa väh. 135 °C:n lämpötila väh. 1 s ajan. Lämpökäsittelyyn käytettävän laitteen toimintaperiaate vaikuttaa myös merkittävästi lämpötila-aika yhdistelmään (Rysstad ja Kolstad 2006). Hyvin lyhyessä UHT-käsittelyssä (1 s väh. 145 °C) maidossa ei juuri tapahdu kemiallisia reaktioita, heraproteiinit pysyvät vielä osittain liukoisina ja keitetyn makua muodostuu vain vähän, eikä käsittely tuhoa kaikkien entsyymien (esim. plasmiiini, bakteerien lipaasit ja proteinaasit) aktiivisuutta. Entsyymiaktiivisuuden säilymisen vuoksi hyvin lyhyttä käsittelyä käytetään harvoin ilman esikuumennusta esim. pastörintia (Walstra ym. 2006).

2.1.6 Sterilointi

Sterilointia käytetään, kun halutaan tappaa kaikki mikrobit mukaan lukien itiöt (Walstra ym. 2006). Sterilointi saavutetaan lämmittämällä maitoa 30 min ajan väh. 110 °C: lämpötilassa. Steriloinnin seurauksena maidon kaikki maidon entsyymit menettävät aktiivisuutensa, mutta bakteerien tuottamat lipaasit ja proteinaasit voivat selviytyä. Maidossa tapahtuu runsaasti Maillard-reaktiota, proteiinikoostumuksen muutoksia, vapaan lysiinin ja vitamiinien pitoisuuksien laskua, sekä maidon pH-arvon alenemista (n. 0,2 yksikköä). Mahdollisia sovelluskohteita ovat esim. maitosäilykkeet.

2.2 Maidon lämpökäsittelyn toteamiseen käytettyjä sovelluksia

Maidon lämpökäsittely siis aiheuttaa moninaisia muutoksia maidon komponentteihin, mikä teoriassa mahdollistaa maidon lämpökäsittelyin toteamisen tuntemattomasta näytteestä, kun tiedetään, millaisia muutoksia siinä esiintyy. Lämpökäsittelyn aiheuttamien muutosten todentamiseen on käytössä useita erilaisia keinoja (Feinberg ym. 2005; Walstra ym. 2006; Ritota ym. 2017). Kuvaan 1 Ritota ym. (2017) ovat koonneet lämpökäsittelyn todentamisen merkkiaineita tai -yhdisteitä ja niiden tutkimiseen käytettäviä sovelluksia. Heidän mukaansa näistä yleisimpiä ovat erilaiset neste- ja kaasukromatografiat, kapillaarielektroforeesia tai spektroskopiaa käyttävät tekniikat, joilla tarkastellaan yhden indikaattorin muutoksia. Uusia menetelmiä on kuitenkin kehitteillä ja niissä on käytetty mm. kemometrisiä sovelluksia.



Kuva 1. Erilaisia lähestymistapoja lämpökäsittelyn todentamiseen maidossa ja maitotuotteissa (Ritota ym. 2017). Suomentajien: Single thermal indicator eli yksittäinen lämpöindikaattori, whey proteins eli heraproteiinit, chemometric techniques eli kemotermit teknikat. Lyhenteiden selityksiä: Front-face fluorescence spectroscopy (FFFs), liquid chromatography (LC), ultra-violet (UV), capillary electrophoresis (CE), tandem mass spectrometry (MS²), visible light (VIS), refractive index (RI), evaporative light scattering detection (ELSD), diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy (DRIFTS), lysinoalanine (LAL), fluorescence (FLUO), mass spectrometry (MS), gas chromatography (GC), flame ionization detector (FID), 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), diode array detector (DAD).

Ritotan ym. (2017) mukaan useimmat viralliset menetelmät (taulukko 1) keskittyvät maidon proteiinien (tärkeimpinä entsyymit ja heraproteiinit) ja laktoosin muutoksiin sekä Maillard-reaktion tuotteiden analysointiin (indikaattorina furosiini). Nämä standardien mukaiset menetelmät perustuvat kaikki yhden indikaattorin muutoksiin. Menetelmien avulla voidaan todeta eriaisteisia lämpökäsittelyitä ja muutoksia maidon ominaisuuksissa sekä niitä yhdistelemällä selvittää, mikä on kovin lämpökäsittely, joka maitoon on kohdistunut.

Taulukko 1. Yleisimmät standardoidut menetelmät maidon lämpökäsittelyiden todentamiseen (Ritota ym. 2017).

Tarkasteltava aine tai yhdiste	Lämpökäsittelystä saatava tieto	Sovelluskohteet	Standardi
Alkaalinen fosfataasi (EC 3.1.3.1.)	Entsyymi inaktivoituu pastöroitaessa	Raakamaito ja pastöroitu maito	11816-1 (ISO 2013)
Laktoperoksidaasi (EEC 1.11.17)	Entsyymi inaktivoituu korkeapastöroitaessa	Pastöroitu ja korkeapastöroitu maito	17193 (ISO/TS 2011)
Liukoisen heraproteiinin osuus	Pitoisuus vähenee suhteessa käsittelyn voimakkuuteen	Maito ja maitovalmisteet	8968 (ISO 2016)
Furosiini	Pitoisuus kasvaa suhteessa käsittelyn voimakkuuteen	Maito ja maitovalmisteet, myös juusto	18329 (ISO 2004)
Laktuloosi – Entsyymaattinen	Pitoisuus kasvaa suhteessa käsittelyn voimakkuuteen	Lämpökäsitellyt maidot	11285 (ISO 2004)
Laktuloosi – HPLC	Pitoisuus kasvaa suhteessa käsittelyn voimakkuuteen	Eryteisesti UHT ja steriloidun maidon erotus	11868 (ISO 2007)

Myös standardoimattomia menetelmiä maidon lämpökäsittelyihin on olemassa ja taulukossa 2 on esiteltynä muutamien yksittäiseen parametriin keskittyvien menetelmien tarkkuuksia ja käyttökohteita. Uusien menetelmien tutkimisella vaikuttaisi olevan pyrkimys tarkempaan analysointiin ja mahdollisesti löytää uusia markkereita hyödynnettäväksi tulevaisuuden analysoinnissa. Ritotan ym. 2017 artikkelin mukaan uusia menetelmiä kaivataan myös esimerkiksi pitkäaikaisten säilyvien tuotteiden tutkimiseen, sillä varastoinnin on havaittu vaikuttavan ainakin joihinkin yksittäisiin markkereihin, kuten Maillard-reaktiossa muodostuneisiin yhdisteisiin.

Taulukko 2. Eri menetelmien havainnointirajoja (LOD) ja -tarkkuuksia (LOQ) muutamissa lämpökäsittely todentamissovelluksissa (Ritota ym. 2017).

Tarkasteltava aine tai yhdiste	Tarkkuus	Sovelluskohteet	Lähde
Furosiini	LOD 0,07 mg/L; LOQ 0,25 mg/L	Maito	Bignardi ym. (2012)
Laktuloosi	LOD 2,5 mg/L	Pastöroitu, UHT ja steriloitu maito	Marconi ym. (2004)
Laktuloosi	LOD 0,17 mg/100 mL	Pastöroitu, UHT ja steriloitu maito	Moscone ym. (1999)
Laktuloosi	LOD 0,013 mg/mL; LOQ 0,028 mg/mL	UHT maito	Manzi ja Pizzoferrato (2013)
Laktuloosi	LOD 2,5 mg/L	Steriloitu maito ja vähälaktoosinen jogurtti	Schuster-Wolff-Büh-ring ym. (2011)
Lysinoalaniini (LAL)	LOD 50 ppm/proteiini; LOQ 152 ppm/proteiini	Kaseinaatit ja tuorejuustot	Montilla ym. (2007)
5-hydroksimetyylifurfuraali (HMF)	LOD 0,2 µmol/L	Prosessoidut maitotuotteet	Morales ym. (2000)
5-hydroksimetyylifurfuraali (HMF)	LOD 0,067 µg/mL	Maito	Chen ja Yan (2009)

Lin ym. (2010) ovat tehneet tärkeää tutkimusta tarkastellessaan äolyakryyliamidigeielektroforeesin (PAGE) toimivuutta heraproteiinien lämpökäsittelymuutosten todentamisessa. He tarkastelivat erilaisia maitonäytteitä natiivi-PAGE:n avulla sekä kvalitatiivisin, että kvantitatiivisin menetelmin. He tunnistivat neljä selkeää proteiinivyöhykettä ja havaitsivat niissä merkittäviä muutoksia eri lämpökäsittelyn saaneiden maitojen kesken. Tunnistetut proteiinit olivat BLG:n A- ja B-muodot (BLG A ja B), α -laktalbumiini (ALA) ja naudan seerumin albumiini (BSA). Lin ym. (2010) mukaan tärkeimpien heraproteiinien pitoisuudet suhteessa raakamaitoon olivat alle 23 % pienempiä pastöroidussa maidossa ja yli 85 % UHT-käsittelyn saaneessa maidossa. Tulosten perusteella he mainitsevat ALA:n olleen hyvin lämpöresistentin, BSA:n saattavan hävitä lähes kokonaan ja BLG:n varianttien denaturoitumisen olevan näiden kahden välistä. Lin ym. (2010) saamat tulokset vaikuttavat rohkaisevilta ajatellen tutkielman tavoitetta eli käyttää BLG-spesifiä vasta-ainetta todentamaan lämpökäsittelymuutoksia sillä, jos pelkällä PAGE-tekniikalla voidaan saada näkyviin hyviä haluttuja proteiinimuotoja, niin todennäköisesti tarkempi analyysi toimii myös.

2.3 Maidon fraktiointi

Maito on heterogeeninen neste, josta on mahdollista erotella eri osia erilleen toisistaan eli fraktioida esim. laboratoriotutkimuksia varten (Walstra ym. 2006).

2.3.1 Rasvan erottaminen

Yleisin erotettava osio on maidon rasva, joka erottuu raakamaidosta spontaanisti, mutta erotus tehdään yleisesti sentrifugoimalla, jolloin raskaampi vesiosa erottuu nopeasti rasvaosasta keskipakovoiman ansiosta. Laboratoriossa riittävä käsittely rasvan erottamiseen on Salihan ym. (2013) mukaan sentrifugoida näytettä 4000 g:n voimalla 15 minuuttia, mutta Lin ym. (2010) käyttivät jopa 8500g voimaa 15 minuutin ajan.

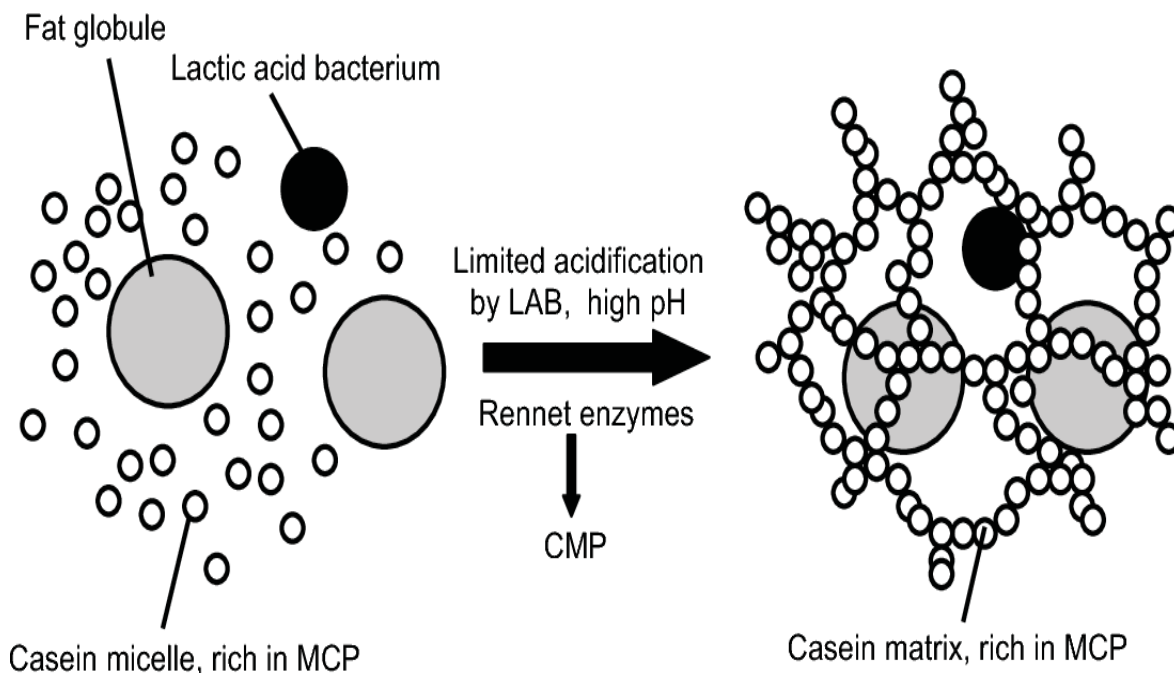
2.3.2 Heran erottaminen hapolla

Scottin (1986) ja Walstran ym. (2006) mukaan heraproteiinien ja kaseiinien erotus voidaan tehdä säätämällä maidon pH-tasoa hapolla ja erottamalla juoksettunut kaseiini sentrifugoimalla. Kaseiinin juoksettuminen alkaa 5,3 pH:ssa ja kaseiinit juoksettuvat kokonaan 4,6 pH kohdalla eli isoelektrisessä pisteessä. Walstran ym. (2006) mukaan happamuuden johdosta muodostuva juoksettuma sisältää runsaasti heraa ja sen synereesi eli nesteen erottuminen on heikkoa, etenkin pH alueella 4.2-5, mikä voi vaikeuttaa heran erottumista. Santosin ja Liesin

(2013) mukaan heraa voidaan erottaa juoksettumasta sentrifugoimalla ja saatu hera voidaan suodattaa 0,45 µm suodattimen läpi puhtaamman saannon aikaansaamiseksi.

2.3.3 Heran erottaminen entsyymillä

Juoksettuminen (kuva 2) voidaan saada aikaan myös entsyymijuoksetteella, tyypillisesti kymosiinilla (EC 3.4.23.4), jolloin maidon pH-arvoa ei tarvitse muuttaa ja mahdolliset muutokset heraproteiinien tertiäärirakenteessa jäävät vähäisemmiksi (Scott 1986; Walstra ym. 2006; Madureira ym. 2007; Janhøj ja Qvist 2010; Kindstedt 2013). Walstran ym. (2006) ja Kindstedtin (2013) mukaan entsyymijuoksettuman synereesi on happosaostettua geeliä voimakkaampaa ja rakenne kestävämpi, mitkä mahdollistavat paremman herasaannon. Kymosiinin juoksettava vaikutus perustuu sen kykyyn pilkkoa κ-kaseiinin ”häntä”, joka auttaa pitämään kaseiinit vesiliukoisena. Maidon neutraalissa pH:ssa 6,7 kymosiini katkaisee erityisesti κ-kaseiinin Phe–Met -peptidisidoksen 105. ja 106. aminohapon väliltä (Walstra ym. 2006). Hännän katkeaminen muuttaa varausta κ-kaseiinimisellin pinnalla, mikä aiheuttaa voimakkaan koaguloitumisen muiden kaseiinimisellien kanssa. Kindstedt (2013) käyttää irronneista pätkistä yleisnimitystä kaseiinimakropeptidit (CMP). Juoksetteen aiheuttama aggregoituminen aiheuttaa myös rasvapallosten jäämistä muodostuvan juoksettuman sisään, kuten kuvassa 2 on esitetty (Walstra ym. 2006; Kindstedt 2013). Maidon geelityminen riippuu mm. lämpötilasta, happamuudesta, ionitasapainosta ja juoksetteen lisäysmäärästä. Kindstedtin (2013) mukaan maito (pH 6,6 - 6,3) geeliiytyy 30-60 minuutissa entsyymin lisäyksestä. Walstran ym. (2006) mukaan juoksettuminen ei pääse tapahtumaan kunnolla matalassa lämpötilassa, vaan lämpötilan olisi hyvä olla esim. 30-35 °C asteen välillä. Yli 35 °C asteen lämpötilassa juoksettuminen alkaa hidastumaan kymosiinin inaktivoitumisen vuoksi. Juoksettuma vahvistuu ajan myötä, mikäli olosuhteet ovat suotuisat (Scott 1986; Walstra ym. 2006; Janhøj ja Qvist 2010; Kindstedt 2013). Hera voidaan erottaa juoksettumasta sentrifugoimalla ja suodatuksen (0,45 µm suodattimen läpi) avulla näytteistä saadaan vielä puhtaampia (Santos ja Lies 2013).



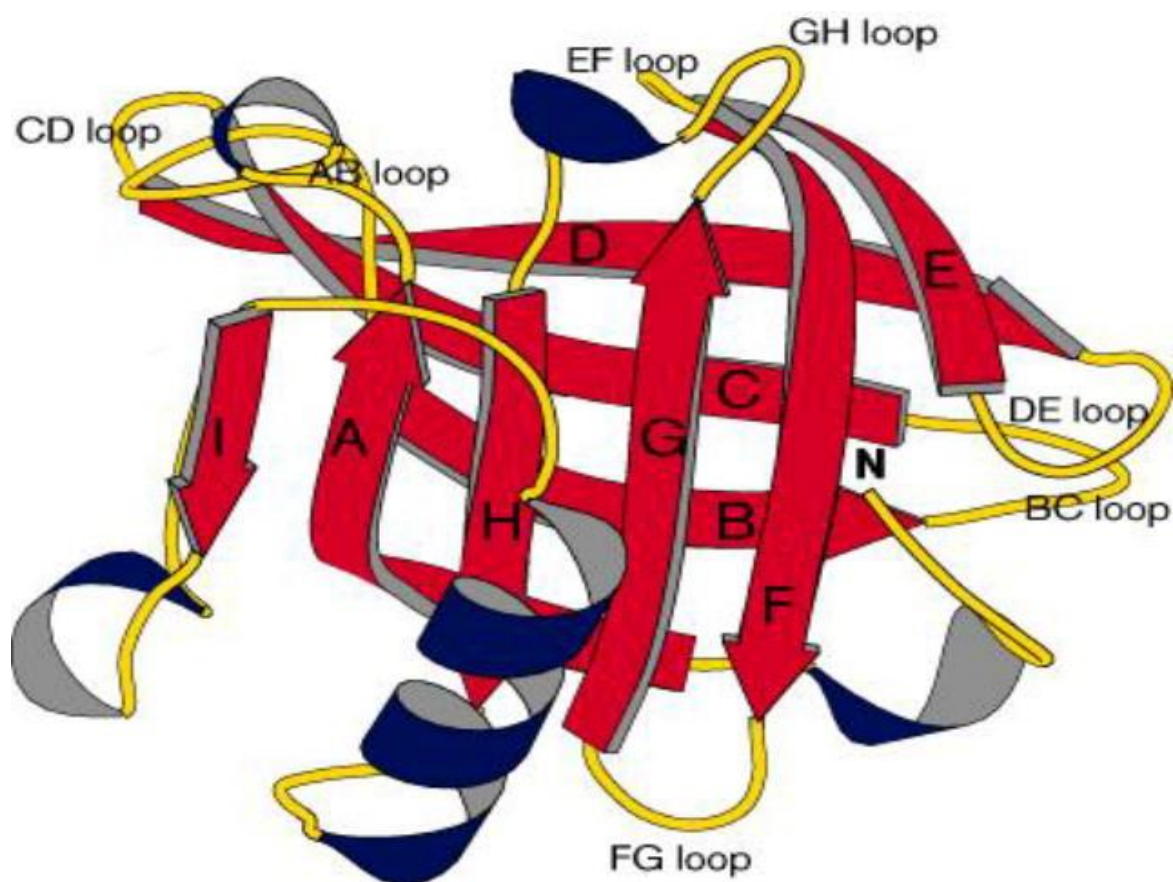
Kuva 2. Kymosiinin aiheuttama kaseiinien aggregoituminen (Kindstedt 2013). Kuvassa on havainnollistettu maidon komponentteja (rasvapallo, maitohappobakteeri [LAB] ja kaseiinimiselli) ja muodostuva kaseiinimatriisi, jonka sisään rasvapallot ja maitohappobakteerit ovat jääneet. Lyhenteitä: MCP (misellaarinen kalsiumfosfaatti), CMP (kaseiinimakropeptidi).

2.4 β -laktoglobuliini (BLG)

β -laktoglobuliinin määrä lehmänmaidossa vaihtelee mm. rotujen, laktaatiokierron ja ympäristötekijöiden mukaan (Kroeker ym. 1985; Ng-Kwai-Hang ym. 1987), mutta keskimäärin sitä on 0,3 % eli 300 mg / 100 ml ja näin ollen se on heran valtaproteiini (Bell ja McKenzie 1964). Suuren osuutensa ja helpon eroteltavuutensa johdosta β -laktoglobuliinia on tutkittu runsaasti (Hambling ym. 1992). BLG on määritelty kuuluvaksi lipokaliineihin (engl. Lipocalin), jotka ovat tyypillisesti lyhyitä (160-180 aminohappoa) solun ulkopuolisia proteiineja (Banaszak ym. 1994; Flower 1996; Flower ym. 2000; Kontopidis ym. 2004). Kaikille lipokaliineille yhteisiä piirteitä ovat: kompleksien muodostaminen muiden liukoisten makromolekyylien kanssa, kyky sitoa pieniä hydrofobisia molekyyliä ja tiettyihin pintareseptoreihin kiinnittyminen. Lipokaliinit ovat tyypillisesti kuljetusproteiineja, mutta niillä voi olla myös muita funktioita solun immunologisten reaktioiden ja homeostaasin säätelyssä. Tutkimuksissa lehmänmaidon β -laktoglobuliininin on havaittu pystyvän sitomaan pieniä ligandeja, kuten rasvahappoja ja vitamiineja (Flower 1996; Flower ym. 2000; Kontopidis ym. 2004). Lisäksi BLG:n on todettu aiheuttavan allergiaa, mikä johtunee samankaltaisuuksista lehmänmaidon BLG:n ja ihmisen glykodeliinin välillä (Gjesing ym. 1986; Virtanen ym. 1999; Kontopidis ym. 2004).

2.4.1 β -laktoglobuliinin rakenteesta

Kuvassa 3 on havainnollistettu lehmänmaidon β -laktoglobuliinin monomeerin kolmiulotteista rakennetta (Brownlow ym. 1997). BLG muuttaa muotoaan herkästi pH:n vaikutuksesta ja esiintyy eri muotoisena eri pH:n arvoilla: Esim. kuvassa 3 esitetty rakenne, joka on tyyppinen pH välillä 6,3 - 6,9. BLG muodostuu yhdeksästä ei-rinnakkaisesta β -laskoksesta (A-I), joista kahdeksan (A-H) muodostavat kartiomaisen tynnyrirakenteen, jonka sisällä on hydrofobisten ligandien kiinnittymispaikka (Brownlow ym. 1997; Sawyer ym. 1998; Kontopidis ym. 2004). Kontopidisin ym. (2004) mukaan β -laskostynnyrin yksi seinämä muodostuu laskoksista A-D ja toinen laskoksista E-H. Tynnyrillä on kansimainen rakenne ns. EF-lenkki, joka vaihtaa asentoaan pH:n mukaan (Brownlow ym. 1997; Kontopidis ym. 2004). Matalassa pH:ssa kansi on kiinni, estäen pääsyn kiinnittymispaikalla ja korkeassa pH:ssa EF-lenkki aukeaa mahdollistaen ligandien kiinnittymisen. Laskostynnyrin ulkopuolella on 3-kierteinen α -kierre, sekä yhdeksäs β -laskos I (ensimmäisen laskoksen A sivulla), joka toimii AB-lenkin kanssa tärkeänä dimeerien muodostumispintana (Qin ym. 1998; Sakurai ja Goto 2002; Kontopidis ym. 2004).



Kuva 3. Havainnekuva β -laktoglobuliini monomeerin kolmiulotteisesta rakenteesta (Brownlow ym. 1997). Kuvasta on nimetty yhdeksän β -laskosta (A-I) ja laskosten väliset seitsemän lenkkiä (AB-loop - GH-loop). Alhaalla keskellä α -kierre.

BLG:n molekyyli­massa on n. 18 300 Da (Eigel ym.1984; Hambling ym. 1992, Walstra ym. 2006), mutta McKenzi­en (1971) ja Walstran ym. (2006) mukaan BLG esiintyy yleensä dimeerinä (n. 36 600 Da) pH välillä 3-7,5. BLG muodostaa helposti myös oligomeereja pH-välillä 3,5-5 (Kontopidis ym. 2002; Walstra ym. 2006). BLG:sta on löydetty kolme varianttia A, B ja C (McKenzie 1971; Brownlow ym. 1997; Manderson ym. 1998; Walstra ym. 2006). Walstran ym. (2006) mukaan variantit esiintyvät dimeereinä vain samanlaisten varianttien kanssa eli esim. AA ja BB, muttei AB. Hamblingi ym. (1992) ovat löytäneet kuusi erilaista BLG-muotoa, joista A-C ovat yleisimpiä. Manderson ym. (1998) ovat laskeneet, että teoriassa eri variantteja voisi olla 30. Kaikki yleiset muodot (A-C) koostuvat 162 aminohaposta, mutta A- ja B-muodot eroavat toisistaan kahden aminohapon kohdalla (McKenzie 1971; Brownlow ym. 1997; Manderson ym. 1998; Walstra ym. 2006): A:n Asp (64) ja Val (118) ovat B:llä Gly (64) ja Ala (118) (McKenzie 1971; Brownlow ym. 1997). B- ja C-muodot ovat muilta osin samanlaisia, mutta ne eroavat toisistaan aminohapon 59 kohdalla, jossa B:llä on Gln ja C:llä His.

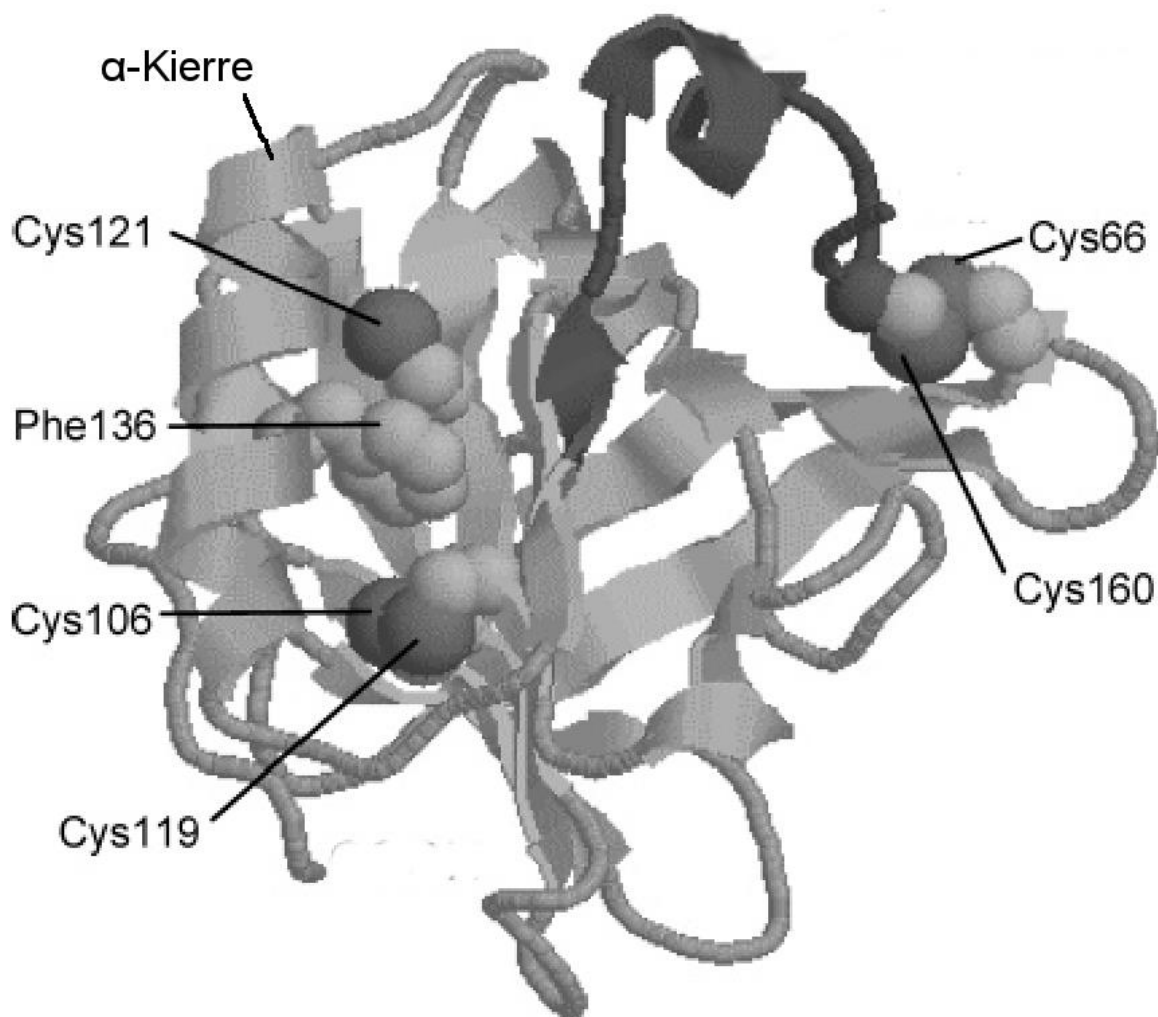
2.4.2 β -laktoglobuliinin aggregoitumisesta

BLG-varianttien lämpöherkkyksissä on eroja: B muoto on herkin ja C kestävin (Manderson ym. 1995; Hill ym. 1996). Eri muotojen aggregoitumistaipumuksista Manderson ym. (1995) kertovat, että lämpökäsittelyn (12,5 min, 50 °C ja 90 °C) aikana pH-arvolla 6,7, BLG-C muodostaa eniten suuria komplekseja ja BLG-A vähiten. Näiden lisäksi muodostui useita odottamattomia välituotteita, etenkin A-muodosta. Manderson ym. (1995) raportoivat PAGE-kokeissaan löytäneensä lämpökäsittelyssä syntyviä natiiveja monomeerejä hitaampia eli kooltaan suurempia, mutta dimeerejä nopeampia eli kooltaan pienempiä ei-natiiveja monomeerejä. Ei-natiiveja monomeerejä syntyi enemmän BLG-A muodolle, kuin -B tai -C -muodoille. Edellä mainittujen huomioiden lisäksi he raportoivat BLGn aggregoitumisen olevan hyvin monimutkaista ja dimeerien olevan tärkeitä välimuotoja suurempien kompleksien muodostumisessa.

BLG-dimeerien tärkeys suurempien rakenteiden synnyssä perustuu osaltaan niiden suuriin pitoisuuksiin maidossa (Brownlow ym. 1997). Sakurain ja Goton (2002), Creamerin ym. (2004) sekä Walstran ym. (2006) mukaan erityisesti BLG:n -S-S- rikkisillat eli disulfididokset ovat tärkeitä suurempien kompleksien muodostumisessa. BLG-monomeerissa on kaksi disulfididosta kysteiinien välillä (Cys66-Cys160 ja Cys106-Cys119) sekä yksi va-

paan kysteiniini (Cys121), jolla on reaktiivinen tioli-ryhmä (-SH) (Sakurai ja Goto 2002; Creamer ym. 2004; Walstra ym. 2006; Ikeguchi 2014). Creamer ym. (2004) raportoivat todistaaneensa BLG:n disulfididisidoksellisten kysteiniinien (Cys-Cys) muodostaneen lämmityksen aikana sidoksia muiden disulfidi-sidoksia sisältäneiden proteiinien, kuten ALA:n kanssa. Cys106-Cys119 on todettu herkäksi sidokseksi, joka aukeaa ja muodostaa uusia disulfididisidoksia lämmön ja pH:n vaikutuksesta (Bronlow ym. 1997; Creamer 2004). Creamer ym. (2004) mukaan Cys66-Cys160 sidokset aukeavat kuumakäsittelyssä ja Cys160 on herkkä muodostamaan uusia ei-natiiveja sidoksia, joista suurin osa on disulfididisidoksia. Kuitenkin merkittävässä osassa ei-natiiveista BLG-muodoista Cys160 ei ollut disulfididisidoksessa, mikä olisi todennäköisesti seurausta korkeassa lämpötilassa tapahtuneesta energian lisäyksestä 25 aminohapon C-terminaalini löystyessä. Creamer ym. (2004) kertovat vahvistaneensa Manderson ym. (1998) esittämää teoriaa, jossa esitetään BLG:n olevan vain yksi mahdollinen rakenne kolmestakymmenestä kovalenttisesta rakenteesta, jossa on polypeptidiketju, kaksi disulfididisidosta ja vapaa kysteiniini. Näin ollen olisi 29 mahdollista muuta ei-natiivista BLG muotoa ja ehkä vielä suurempi määrä tertiäärirakenteita. Creamer ym. (2004) mukaan korkeammassa lämpötiloissa on oletettavaa, että alhaisimman energiatason muoto ei ole natiivi-BLG ja osa näistä muutoksista jäisi pysyviksi myös maidon jäähtyessä.

Kuvassa 4 on havainnollistettu -S-S- sidosten paikat β -laktoglobuliinimonomeerissa (Creamer ym. 2004). Sutariya ja Patel (2017) tutkivat vetyperoksidin vaikutusta BLG:n lämpöaggregoitumiseen ja huomasivat merkittäviä vaikutuksia BLG:n lämpöstabiilisuudessa, kun heraproteiini-isolaatista valmistettuun liuokseen lisättiin vetyperoksidiliuosta yli 0,072 suhteessa proteiinipitoisuuteen (HTPR). Tulostensa perusteella he päättelivät vetyperoksidin vaikuttaneen BLG:n disulfididisidosten ja vapaan kysteiniinin (Cys121) reaktioiden vähenemiseen denaturoitumisen aikana, jolloin suuria komplekseja ei päässyt syntymään. Tulokset vahvistavat disulfididisidosten merkityksellisyyttä BLG:n aggregoitumisessa lämpökäsittelyn aikana (Sutariya ja Patel 2017).



Kuva 4. Havainnekuva β -laktoglobuliini monomeerin kolmiulotteisesta rakenteesta (Creamer ym. 2004). Kuvaan on nimetty α -kierre ja viisi kysteiiniä sidoksissaan: Disulfididisidokset Cys66-Cys160 ja Cys106-Cys119 sekä vapaa kysteiini Cys121-Phe136.

2.5 Polyakryyliamidigeelielektroforeesi (PAGE)

Elektroforeesi perustuu varautuneiden molekyylien, kuten proteiinien, liikkeeseen sähkökentässä (Garfin 1990; Westermeier ym. 2005). Proteiinit liikkuvat kohti vastakkaista varusta sähkökentässä nopeudella, joka riippuu kunkin proteiinin ja koelaitteiston ominaisuuksista. Proteiinien elektroforeesiin vaikuttavat monet tekijät, joista merkittävimmät ovat sähkökentän voimakkuus, systeemin lämpötila, pH-arvo, ionityyppi, puskuriliuos ja proteiinien koko, muoto sekä varaus. Shin ja Jackowskin (1998) sekä Westermeierin ym. (2005) mukaan PAGE-tekniikassa on useita soveltamismahdollisuuksia, joista tässä työssä käytettiin tapaa, jossa näytteet ajetaan kahden seinämän väliin tehtyyn kaksiosaiseen geeliin pelkistämättömässä ja proteiineja denaturoivia yhdisteitä sisältämättömässä (natiivi) puskurissa. Geelissä on ensin huokoisempi osio, jossa näytteet pakkautuvat tiiviisti, ja tiheämpi osio, jossa näytteet erottuvat toisistaan. Natiivi-PAGE tekniikassa näytteiden puskurit ja

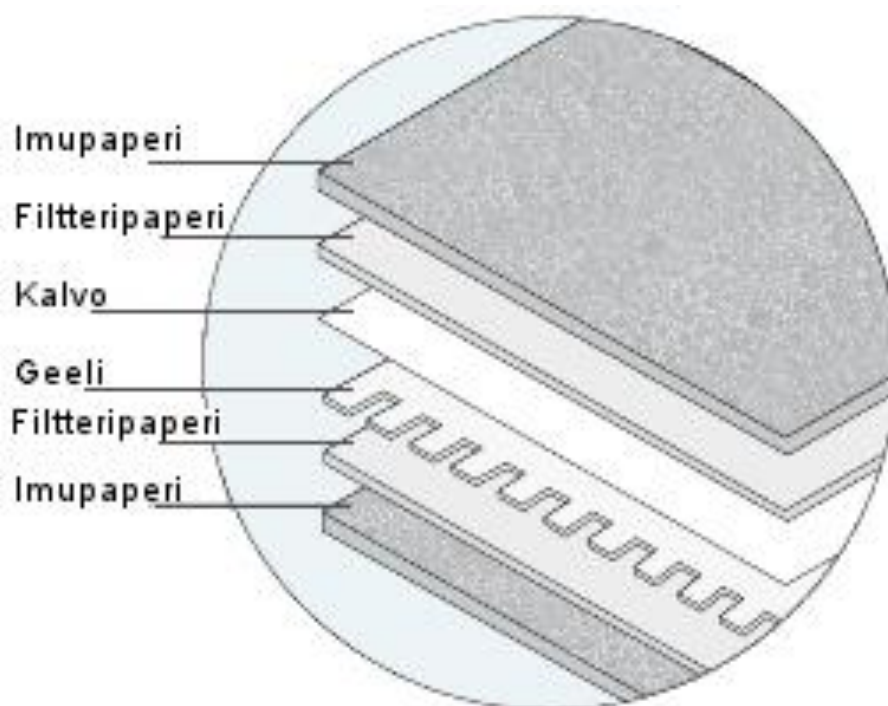
geeli eivät denaturoi proteiineja (Shi ja Jackowski 1998; Kurien ja Scofield 2005; Westermeier ym. 2005). Natiivi-PAGE:ssa proteiinien rakenteet säilyvät, mikä mahdollistaa lämpökäsittelyn proteiineille aiheuttamien muutosten tarkastelemisen, minkä Lin ym. (2010) ovat herän osalta todistaneet. Westermeierin ym. (2005) mukaan natiivi-PAGE on pelkistävää natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE) herkempi virheille ja diffuusio voi vaikuttaa proteiinien erottumiseen ja aiheuttaa sumeita alueita geeliin vyöhykkeiden välille, mikä heikentää tulosten luettavuutta ja tarkkuutta. Lisäksi natiivi-PAGE:ssa osa monimutkaisista proteiiniaggregaateista voi jäädä näytekaivoihin suuren molekyylikokonsa takia (Kurien ja Scofield 2005).

2.6 Western blotting

Western blotting -nimityksen alle kuuluu useampia sovelluksia, joissa siirretään tutkittavia proteiineja tai peptidejä yhdestä matriisista toiseen käyttäen voimana esim. sähkövirtaa tai painetta ja siirron jälkeen proteiineja analysoidaan uudelta matriisilta (Merril ja Washart 1998; Westermeier ym. 2005). Yksi Western blotting -menetelmistä on immunoblot. Immunoblot-menetelmässä proteiineja siirretään elektroforeesin avulla geeliltä kalvomatriisiin, jota seuraa proteiinien immunologinen analysointi.

2.6.1 Siirto (engl. transfer)

Yksi siirron toteutustavoista, jota tässäkin työssä käytettiin, on kasata geeli ja kalvo puskurilla kasteltujen imukykyisten paperien väliin (kuva 5). Koko pakan on oltava märkä ja ilmakuplat rullattava pois geelin ja kalvon välistä. Pakka suljetaan tiiviisti kasaamisen jälkeen ja sen läpi johdetaan sähkövirtaa, jotta proteiinit siirtyisivät geelistä kalvolle. Kalvona voidaan käyttää mm. polyvinyylidenedifluoridi (PVDF) -kalvoa, joka on kestävä ja omaa hyvän proteiinien sitomiskyvyn. Westermeierin ym. (2005) mukaan ei ole vielä kehitetty kalvoa, joka sitoisi 100 % proteiineista, joten elektroblottauksen yhtenä haasteena on saada isot proteiinit siirrettyä geeliltä blottauskalvolle ilman, että pienet ja herkemmin siirtyvät menevät läpi kalvosta.



Kuva 5. Esimerkki pakan kokoonpanosta immunoblot-ajoa varten ([Bio-Rad] 2016).

2.6.2 Tukkeminen eli blokkauk (engl. blocking)

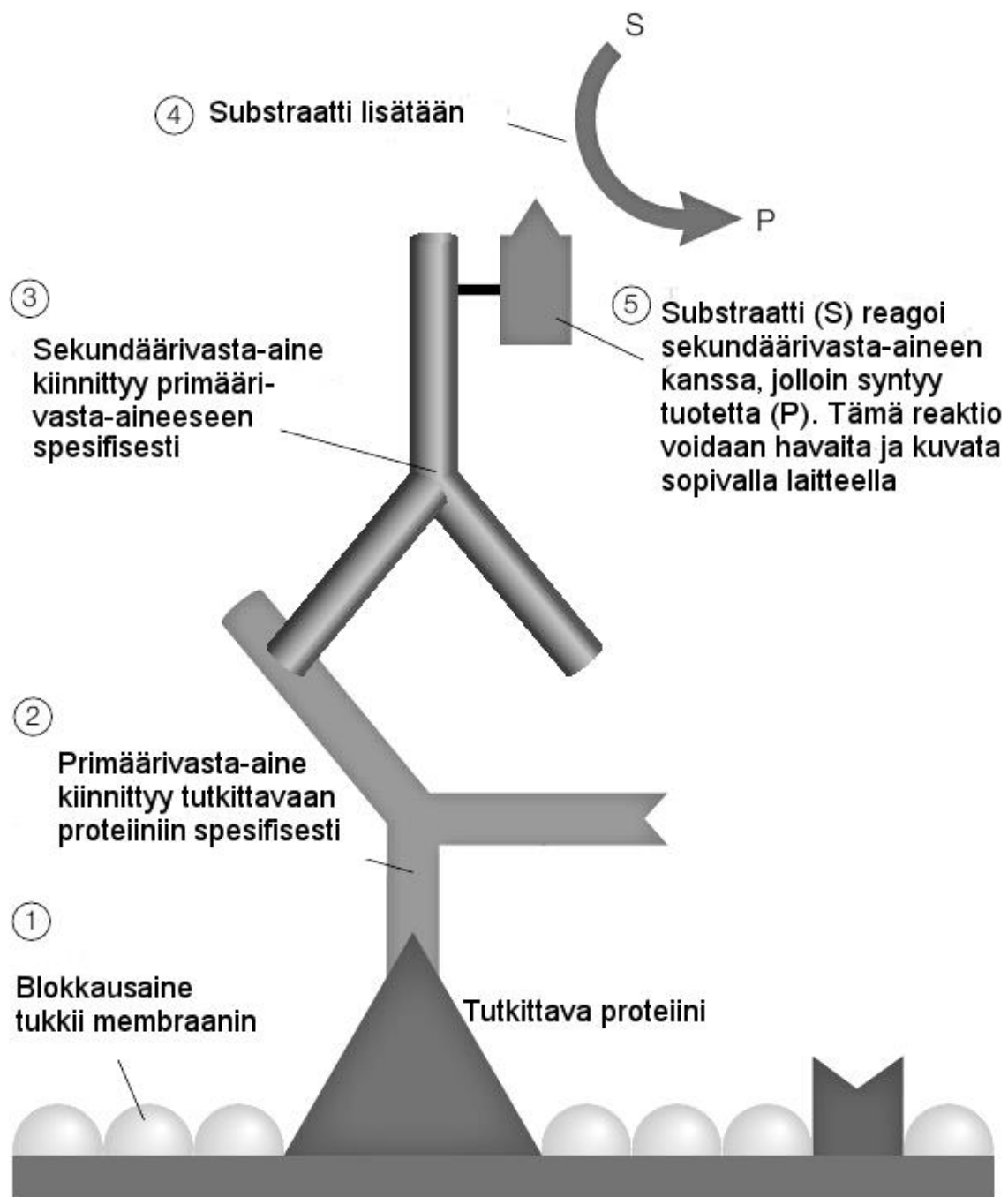
Kun proteiinit on siirretty kalvolle, sen muut kiinnittymiskohdat tulee tukkia eli blokata (engl. blocking), jotteivät tunnistuksessa käytettävät reagenssit itse tartu kalvoon, mikä aiheuttaa tulosten laadun ja tarkkuuden heikentymistä (Merril ja Washart 1998; Westermeier ym. 2005; [Bio-Rad] 2016). Blokkauk voidaan tehdä useammilla aineilla, tyypillisesti gelaatiinilla tai Tween 20®:lla. Sopivan aineen tai aineyhdistelmän valinta on tehtävä siten, että tarttuminen käytettävään membraaniin on mahdollisimman hyvä, mutta tukkija ei saa reagoida tutkittavien proteiinien tai vasta-aineiden kanssa. Käytännössä blokkauk tapahtuu tavallisesti upottamalla tutkittava membraani puskuriin esim. Tris-suolapuskuriin, jossa on mukana valitut blokkaukaineet, esim. Tween 20® ([Bio-Rad] 2016).

2.6.3 Vasta-aineiden kiinnitys

Blokkauksen jälkeen membraani on valmis ensimmäisen eli primäärivasta-aineen (engl. primary antibody) lisäykselle (Merril ja Washart 1998; Westermeier ym. 2005; [Bio-Rad] 2016). Membraania inkuboidaan puskuriliuoksessa, jossa on primäärivasta-ainetta. Vasta-aine voi olla spesifi ja tarttua vain tiettyyn proteiiniin (mm. immunoglobuliinit) (Merril ja Washart 1998; Westermeier ym. 2005; [Bio-Rad] 2016) tai vähemmän spesifinen (mm. jotkin entsyymit ja radioaktiiviset merkkiaineet) ja tarttua useampiin (Westermeier ym 2005).

Merril ja Washart (1998) mukaan joissain tapauksissa ensimmäistä vasta-ainetta voidaan tutkia suoraan joillain kuvantamismenetelmillä, esim. ensimmäisen aineen ollessa fluori-soiva tai radioaktiivinen. Ylimääräinen (sitoutumaton) vasta-aine on kuitenkin ensin huuhdeltava pois sopivalla pesuliuksella. Sekä Merril ja Washart (1998) että Westermeier ym. (2005) lisäävät, ettei radioaktiivisia vasta-aineita kuitenkaan enää nykyisin suosita niiden terveydelle haitallisten ominaisuuksien takia.

Suoran menetelmän lisäksi voidaan käyttää myös ns. epäsuoraa menetelmää (Merril ja Washart 1998; Westermeier ym. 2005). Siinä primäärivasta-aineen jälkeen lisätään toista vasta-ainetta, joka kiinnittyy ensimmäiseen ja mahdollistaa tutkittavan kohteen havainnoinnin esim. siihen liitetyn entsyymien avulla (Merril ja Washart 1998; Westermeier ym. 2005; [Bio-Rad] 2016). Membraani on pestävä sopivalla pesuliuksella vasta-aineiden välillä, jotta ylimääräinen primääri vasta-aine saadaan pois. Toiseksi eli sekundäärivasta-aineeksi voidaan valita jokin useista vaihtoehdoista havainnoitavasta kohteesta ja käytetystä havainnointi menetelmästä riippuen. Mahdollisia sekundäärivasta-aineita ovat mm. radioaktiiviset proteiinit, peroksidaasi- tai fosfataasi-entsyymiin yhdistetyt vasta-aineet ja fluoresenssiin tai keluminisenssiin kykenevään yhdisteeseen kiinnitetyt vasta-aineet. Kuvassa 6 on esitetty epäsuoran immunoblot-menetelmän vaiheet, joiden tuloksena syntyneen reaktion jäljet voidaan kuvata ja tallentaa myöhempää tarkastelua varten ([Bio-Rad] 2016).



Kuva 6. Kuvallinen esitys epäsuoran entsyymikatalysoidun immunoblot-menetelmän vaiheista ja toimintaperiaatteesta ([Bio-Rad] 2016). Kuvaan on merkitty numeroin menetelmän vaiheita: 1) Blokkaus, 2) Primäärivasta-aineen kiinnittyminen, 3) Sekundäärivasta-aineen kiinnittyminen, 4) Katalysoitavan substraatin lisäys ja 5) havainnoitavan reaktion tapahtuminen.

2.6.4 Kuvantaminen

Kuvantamisessa perusideana on kaapata näytteen tuottama signaali kalvolta – esim. fluoresenssissa vapautuvan fotonin tuottama valo – sekä tallentaa se helpommin tarkasteltavaan ja käsiteltävään muotoon (Westermeier ym. 2005; [Bio-Rad] 2016). Uusia sovelluksia ja

laitteita on kehitetty eri havainnollistamiskeinoille, kuten sekundäärivasta-aineen fluoressille tai keluminisenssille, korvaamaan vanhoja hitaampia keinoja, esim. röntgenfilmille tallentaminen ([Bio-Rad] 2016). Nykyisellä teknologialla on mahdollista kuvata kalvolta tuleva heikkokin signaali suoraan digitaaliseen muotoon erilaisilla skannereilla (Westermeier ym. 2005; Deshpande 2010; [Bio-Rad] 2016). Skannereiden avulla voidaan havaita jopa hyvin heikot signaalit, mikä voi tarkoittaa femtogramman (10^{-15} g) luokkaa olevia näytämääriä (Deshpande 2010; [Bio-Rad] 2016). Tarkkuuden ja nopeuden lisäksi digitaaliseen muotoon tallentavat laitteet helpottavat tulosten tarkastelua ja analysointia mahdollistamalla kuvamuokkauksen ja uudelleen kuvaamisen ensimmäisen kuvantamisyrittäksen epäonnistuessa. Tarkkuus, nopeus ja helppokäyttöisyys lisäävät mm. elintarvikealalle soveltuvien menetelmien kehittämisen mahdollisuuksia (Deshpande 2010; [Bio-Rad] 2016).

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

3.1 Tutkimuksen tavoite

Maisterintutkielman kokeellisen tutkimuksen tavoitteena oli havaita lämpökäsittelyn aiheuttamia muutoksia nestemaitotuotteissa käyttäen natiivi-PAGE- ja Western blotting -menetelmiä yhdessä BLG-spesifisen vasta-aineen kanssa.

3.2 Materiaalit ja menetelmät

Työt suoritettiin Helsingin yliopiston Viikin kampuksen EE-talon projektilaboratorioissa 3084 ja 3086 helmikuun 2015 ja huhtikuun 2016 välisenä aikana. Laboratoriotutkimuksia edeltäneessä tutkimusharjoituksessa todettiin BLG:n vasta-aineen toimivan Western blotting -menetelmässä, joten kokeissa pystyttiin keskittymään lämpökäsittelyiden vaikutusten todentamiseen ja toimivan näytteiden käsittelymenetelmän kehittämiseen.

Geelielektrofooresikokeet tehtiin Bio-Rad laboratories Inc.:n natiivi-PAGE ohjeiden mukaisesti ko. yrityksen laitteilla (Power Pac™ Basic) ja geeleillä, joko valmiilla (Mini-PROTEAN®TGX™ 12 %) tai itsevaletuilla vastaavanlaisilla (Mini-Protean® Tetra Handcast System). Western blotting -kokeet tehtiin Bio-Rad laboratories Inc.:n laitteella (Trans-Blot® Turbo™ Blotting System) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Primäärivasta-aineena käytettiin

polyklonaalista BLG-vasta-ainetta (Mäentausta ym. 2002). Sekundäärivasta-aineena käytettiin IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Li-COR Biosciences). PAGE-kokeiden tulokset kuvattiin Alpha Imager® HP gel documentation -laitteella (Protein Simple) ja Western blotting -kokeiden tulokset Odyssey® Classic -skannerilla (Li-COR Biosciences). Tarkempi listaus käytetyistä välineistä liitteessä 1 ja aineista liitteessä 2.

3.2.1 Näytteet

Taulukossa 3 on esitettyä tutkimuksissa käytetyt näytteet. Puhtaat näytteet (BLG, heraisolaatti ja BSA) pysyivät koko tutkimuksen ajan samana, mutta maidon rajallisesta säilyvyydestä johtuen niiden lähde vaihteli kokeiden aikana, mutta aina käytettiin saman valmistajan samaa tuotetta, minkä pitäisi vähentää maitonäytteiden keskinäistä vaihtelua.

Taulukko 3. Kokeissa käytetyt näytteet, niiden tuotenimet, sekä valmistajat.

Näyte	Tuotenimi	Valmistaja
β-laktoglobuliini	β-Lactoglobulin, From Bovine Milk, Approx. 90 % (PAGE)	Sigma®
Heraisolaatti	Isolate Whey 90 Instant	Armor Proteinés
BSA	Albumin, from bovine serum	Sigma-Aldrich®
Raakamaito	Raakamaito	Valio Oy
Pastöroitu maito	Valio Rasvaton maito, Valio Kevytmaito	Valio Oy
ESL-maito	Valio Eila® rasvaton maitojuoma laktoositon, Valio Eila® kevytmaitojuoma laktoositon	Valio Oy
UHT-maito	Valio Rasvaton maito HYLA®UHT, Valio Kevytmaito HYLA®UHT	Valio Oy
Jogurttimaito	Jogurtin valmistukseen lämpökäsitelty ä (90 °Cm / 10 min) maitoa	Helsingin Meijeriliike Oy
Homogenioimaton pastöroitu maito	Valio Luomu™ rasvaton maito, Valio Luomu™ kevytmaito	Valio Oy

3.2.2 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden käsittelyssä käytettiin hyväksi aikaisempien julkaisujen (Scott 1986; Manderson ym. 1995; Lin ym. 2010; Saliha ym. 2013; Santos ja Lies 2013) ja ohjaajien tarjoamia tietoja hyvistä käytännöistä.

Kantaliuokset

Kantaliuoksia (BLG, BSA ja heraisolaatti) valmistettaessa jauheet liuotettiin Eppendorf-putkissa Milli-Q -veteen tai fosfaattipuskuriin koeputkisekoittajan avulla. Kantaliuoksesta valmistettiin kulloisenkin koesuunnitelman mukainen määrä näytteitä pipetoimalla kantaliuosta

Eppendorf-putkiin ja lisäämällä niihin Milli-Q -vettä tai fosfaattipuskuria ja sentrifugoimalla nesteet hyvin lyhyesti putken pohjalle.

Fosfaattipuskurit

Fosfaattipuskurit valmistettiin liuottamalla fosfaattiyhdisteitä Di-natriumvety-fosfaatti ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ja mononatriumfosfaatista (NaH_2PO_4) Milli-Q -veteen ja yhdistelemällä saatuja liuoksia saadakseni eri pH:n puskuriliuoksia BLG, BSA ja heraisolaatti näytteille.

Heran erotus ja suodatus

Raakamaidoista erotettiin rasvan sentrifugoimalla 50 ml sentrifugointi putkissa (4000 g / 15 min, 4 °C). Sitten maidot lämmitettiin vesihauteessa n. 37 °C asteeseen. Lämmitettyihin maitoihin lisättiin biologista ALBAMAX-kymosiinia (Clerici-Sacco) 1:1500 ja niiden annettiin juoksettua lämpökaapissa (37 °C) koejärjestelyiden mukaisen ajan (15-60 min). Juoksettuneet näytteet sentrifugoitiin (1800 g / 20 min) huoneenlämmössä (n. 20 - 22 °C) juoksettuman erottamiseksi herasta (juoksettaminen toimii käytännössä vain raakamaidolle ja pastöroidulle maidolle). Näytteet suodatettiin 0,45 µm suodattimen läpi ruiskulla puristamalla.

Näytteiden lämpökäsittely

Näytteiden lämpökäsittelyt tehtiin Eppendorf-putkille lämpöblokkissa eli kuivassa lämpöhauteessa ja 50 ml koeputkille sekoittajalla varustetussa lämpökaapissa. Kuumennuksen jälkeen näytteet laitettiin jäämurskansekaiseen veteen jäähtymään viideksi minuutiksi.

Näytteiden pakastaminen

Pakastettava näytteet pipetoitiin Eppendorf-putkiin, pakattiin pahviseen Eppendorf-putkille tarkoitettuun laatikkoon ja säilytettiin pakastimessa (-18 °C)

Varsinaiset näytteet

Varsinaiset näytteet (näytekooko 15 µl) tehtiin pipetoimalla 3-12 µl esikäsiteltyä näytettä Eppendorf-putkiin ja lisäämällä tarvittaessa Milli-Q vettä 12 µl:aan asti. Seuraavaksi näytteille tehtiin mahdolliset koesuunnitelman mukaiset kuumennuskäsittelyt. Jäähtyneisiin näytteisiin lisättiin 3 µl natiivi-PAGE-näytteille tarkoitettua käyttövalmista Bromofenyylisininen

(BPB) -näytepuskuria (Sigma-Aldrich®) ja näytteet sentrifugoitiin pikaisesti putken pohjalle.

Vetyperoksidikäsittely

Vetyperoksidikäsittely tehtiin lisäämällä näytteeseen 0,3 % H₂O₂ (loppupitoisuus) ennen lämpökäsittelyä ja jatkokäsittelyt tehtiin samaan tapaan kuin muille saman sarjan näytteille.

3.2.3 Analyysin suorittamisen kuvaus

Menetelmän kuvauksessa on esimerkkinä viimeisin koe, jossa pakastetuille näytteille tehdään analyysi.

Kantanäytteiksi valittiin puhdasta BLG-liuosta (3 mg/ml proteiinia), raakamaitoa, pastöroitua maitoa, ESL- ja UHT-käsiteltyjä maitoja sekä raakamaidosta erotettua ja 0,45 µm suodattimella suodatettua heraa. Näytteet pakastettiin 1 ml erissä Eppendorf-putkissa -18 °C. Analyysipäivänä näytteet otettiin sulamaan ja valmisteltiin natiivi-PAGE-geeli ja -laitteisto, mikäli valmisgeelejä ei ollut käytettävissä tehtiin geeli edellisenä päivänä taulukon 4 mukaisesti. Seuraavaksi valmistettiin näytteet koeasetelman mukaisesti sulaneista näytteistä. Maidosta ja herasta tehtiin 3 µl:n näytesarja (3 µl näytettä, 3 µl näytepuskuria ja 9 µl Milli-Q) ja 7 µl:n näytesarja (7 µl maitoa tai heraa, 3 µl näytepuskuria ja 5 µl Milli-Q). Lisäksi tehtiin 9 µg proteiinia sisältävät standardinäytteet BLG:sta (3 µl kantanäytettä, 3 µl näytepuskuria ja 9 µl Milli-Q). Näytteet pipetoitiin geelin näytekaivoihin, geelit vietiin kylmiöön (4 °C) ja asennettiin PAGE-laitteistoon. Kammiot täytettiin natiivi-PAGE-puskurilla (Bio-Rad TG: 25 mM Tris, 192 mM glysiini; liuoksen pH 8,3, valmistaja Bio-Rad laboratories Inc.). Ajo-kammio siirrettiin jäällä täytettyyn astiaan, pohjalle lisättiin magneetti ja käynnistettiin magneettisekoittaja. Laitteistoa ajettiin 125 V 30 min ja 200 V 70 min. Geelielektroforeesiajon loputtua valmisteltiin geeli Western blotting -ajoa varten tai, mikäli kyseessä PAGE-kuvatava verrokki, värjättiin geeli Coomassie blue -liuoksella (engl. Coomassie brilliant blue, valmistaja Bio-Rad laboratories Inc). Western blotting -ajoa varten geeli ja PVDF-kalvo upotettiin omiin Towbyn-liuoksiinsa (100 ml 10xTG-puskuriliuosta, 200 ml metanolia ja 700 ml Milli-Q -vettä) 10 minuutin ajaksi, mitä ennen kalvo käytettiin metanolissa hydrofobisuuden poistamiseksi. Seuraavaksi kasattiin blottaus-kasetti, syötettiin se Western blotting -laitteeseen ja ajettiin 30 min (25 V, 1,0 A). Ajon jälkeen huuhdeltiin PVDF-kalvo kolme

Taulukko 4. Natiivi-PAGE-geelien teossa käytetyt aineet ja niiden määrät.

Reagenssi	2-geeliä alageeli	2-geeliä ylägeeli
10 % APS	50 µl	30 µl
1M Tris-HCl, pH 6,8	-	0,83 ml
30 % akryyliamidiliuos	4 ml	0,75 ml
3M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml	-
Milli-Q	4,7 ml	5 ml
TEMED	8 µl	8 µl

kertaa Milli-Q -vedellä ja upotettiin lopuksi PBS-liuokseen kahdeksi minuutiksi, sekä laitettiin Coomassie blue -värjäykseen. Seuraavaksi upotettiin PVDF-kalvo 30 ml:aan Odyssey® blocking-puskuria ja annettiin liota tasosekoittajassa (n. 55 rpm) tunnin ajan. Tunnin jälkeen astia vietiin kylmähuoneeseen (4 °C), liuos kaadettiin pois ja lisättiin tilalle 1:3000 laimennettua BLG-vasta-aineliuosta

(10 µl BLG:n vasta-ainetta, 30 ml blocking-puskuria ja 60 µl Tween 20 -liuosta). Kalvoa inkuboitiin tasosekoittajassa (n. 53 rpm) tunnin ajan. Tämän jälkeen kalvoa pestiin 100-150 ml:ssa pesuliuosta (PBS -liuos, jossa 0,1 % Tween 20) 4 x 5 min tasosekoittajan nopeudella 80 rpm, vaihtaen liuosta pesujen välillä. PVDF- kalvo siirrettiin pesujen jälkeen toiseen vasta-aineliuokseen (1,5 µl IR800 vasta-ainetta, 30 ml Odyssey-puskuria, 60 µl Tween 20:tä ja 30 µl 10 % SDS-liuosta) ja rasia suojattiin valolta sekä nostettiin tasosekoittajalle (n. 53 rpm) tunniksi. Tunnin inkuboinnin jälkeen kalvo pestiin, kuten ensimmäisen vasta-aineen jälkeen, mutta astia suojattiin valolta. Lopuksi kalvo huuhdeltiin PBS-liuoksella ja säilytettiin PBS-liuoksessa kuvaukseen asti.

3.3 Koesuunnittelu

3.3.1 Proteiinien rakennemuutosten määrittäminen eri pH-arvoissa

Koesarjan pH-arvoiksi valittiin 7,4, 7,0, 6,6 ja 6,0. Kokeet suoritettiin BLG- ja heraisolaatilla, jotka liotettiin fosfaattipuskureihin. Jokaisesta näytteestä tehtiin lämpökäsittämättömän ja lämpökäsitelty (90 °C/10 min) versio. Lisäksi tehtiin yhdet BLG- ja heraisolaattinäytteet pH 6,6 puskurissa, joihin oli lisätty 0,3 % H₂O₂ ja kuumennettu 90 °C/10 min. Kantänäytteiden proteiinipitoisuudet olivat 3 mg/ml (BLG) ja 6 mg/ml (Heraisolaatti). Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä (7 µl näytettä, 3 µl näytekuskuria ja 5 µl Milli-Q). Natiivi-PAGE-ajo parametrit olivat 125 V 15 min ja 200 V 67 min, ts. kunnes väri oli geelin alalaidassa.

Lisäksi tutkittiin heran proteiinien käyttäytymistä pH-arvoltaan (5,8, 6,0 ja 7,6) erilaisissa fosfaatti puskureissa. Tätä varten puolet näytteistä lämpökäsiteltiin (90 °C/5 min) ja puolet jäivät käsittelemättä. BLG:n pitoisuudet olivat 3 mg/ml ja heran 6 mg/ml. Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä (7 µl näytettä, 3 µl näytepuskuria ja 5 µl Milli-Q). Näytteille tehtiin natiivi-PAGE-ajo (125 V 15 min ja 200 V 78 min).

Lämpökäsittelyn voimakkuuden erojen arvioimiseksi lämpökäsiteltiin fosfaattipuskureihin (pH 6 ja 6,6) liuotettuja BLG- ja heraisolaatti näytteitä (proteiini pit. 3 mg/ml ja 6 mg/ml vastaavasti) 90 °C:ssa 1, 3, 5 ja 10 min ajan. Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä (7 µl näytettä, 3 µl näytepuskuria ja 5 µl Milli-Q). Natiivi-PAGE-ajot suoritettiin 125 V 15 min ja 40 min (rinnakkaista 55 min) 200 V jännitteellä.

3.3.2 Heran kymosiinilla erottamisen ja näytteiden suodattamisen vaikutusten määrittäminen

Suoritettiin koe käsittelemättömillä raakamaidoilla ja 90 °C/10 min kuumennetulla raakamaidolla. Näytteisiin pipetoitiin 3, 7, 10 ja 12 µl raakamaitoa, 3 µl näytepuskuria ja näytteen lopputilavuus tehtiin 15 µl:aan Milli-Q -vedellä. Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä. Natiivi-PAGE-ajo suoritettiin parametrein 125 V 15 min ja 200 V 67 min, ts. kunnes väri oli geelin alalaidassa.

Lisäksi tutkittiin pastöroidusta ja raakamaidosta erotettuja (15, 30 ja 60 min juoksettumisajoilla) heranäytteitä. UHT-näyte ei juoksettunut, joten siitä ei tehty näytteitä. Bradford-menetelmällä tehtyjen arvioiden perusteella heranäytteistä tehtiin 1:5 laimennokset. Laimennoksista (1:5) tehtiin rinnakkaiset näytesarjat (5 µl näytettä, 3 µl puskuria ja 7 µl Milli-Q -vettä), sekä lisäksi BLG-kontrollit (7 µl 3 mg/ml vahvuista BLG-liuosta, 3 µl väriä ja 5 µl Milli-Q). Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä. PAGE-ajo suoritettiin itsevaletuilla geeleillä parametrein 125 V 15 min ja 200 V 70 min.

Lisäksi kokeiltiin 30 ja 60 minuuttia juoksetetuista maidoista erotettuja heranäytteitä ilman laimentamista. Tehtiin 5 µl, 3 µl ja 2 µl heraliuosta sisältävät näytesarjat, joista 5 µl näytteille tehtiin rinnakkaiskoe. Näytteisiin lisättiin 3 µl näytepuskuria ja näytteen lopputilavuus tehtiin 15 µl:aan Milli-Q -vedellä. Lisäksi tehtiin BLG-kontrollinäytteet (1 µl 2 mg/ml vahvuista BLG-liuosta, 3 µl näytepuskuria ja 11 µl Milli-Q). Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä. PAGE-ajon suoritettiin valmisgeeleillä (125 V 15 min ja 200 V 53 min). Western blotting -tutkimuksessa käytettiin BLG-vasta-ainetta 1:5000 laimennoksena. Blotting-ajon

asetuksina oli 25 V, 1,0 A ja ajoaika 30 min. Valmis kalvo säilytettiin PBS-liuoksessa pimeässä yön yli ennen kuvausta.

3.3.3 Rasvan ja homogenoinnin vaikutusten määrittäminen

Tutkittaviksi tuotteiksi valittiin seuraavat: Kevytmaito, homogenoimaton kevytmaito, rasvaton maito, raakamaito ja BLG. Kymosiinierotuksessa ei erotettu rasvaa raakamaidosta erikseen. Puolet näytteistä suodatettiin. Näytteistä tehtiin rinnakkaiset sarjat (5 µl näytettä, 3 µl puskuria ja 7 µl Milli-Q -vettä) sekä lisäksi kahdet BLG-kontrollit (1 ja 2 µl 2 mg/ml vahvuista BLG-liuosta, 3 µl puskuria ja Milli-Q -vettä 15 µl:n tilavuuteen). Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä. PAGE-ajossa parametreinä oli 125 V 15 min ja 200 V 50 min ja blotting-ajossa 25 V, 1,0 A ja ajoaika 30 min. BLG-vasta-aineena oli 1:5000 laimennos.

3.3.4 Lämpökäsittelyiden aiheuttamien BLG:n muutosten määrittäminen maidossa ja fosfaattipuskurissa

Näytteinä käytettiin BLG (3 mg / ml), raakamaitoa, pastöroitu maitoa (~73 °C/15 s) ja panospastöroitu jogurttimaito (90 °C/10 min, homogenoitu). BLG-näytteitä kuumennettiin vastaamaan maitojen lämpökäsittelyitä: Pastörinti 63 °C/30 min ja panospastörinti 90 °C 10 min. Maitonäytteiden annettiin juoksettua 60 min, paitsi jogurttimaito 100 min, hyvän juoksettuman aikaansaamiseksi. Saatu hera erotettiin ja suodatettiin. Valmistettiin näytesarja (5 µl näytettä, 3 µl puskuria ja 7 µl Milli-Q -vettä) ja lämpökäsitellyistä valmistettiin rinnakkaiset näytteet. Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä. PAGE-ajossa parametreinä oli 125 V 15 min ja 200 V 70 min ja blotting-ajossa 25 V ja 1,0 A, 30 min. BLG-vasta-aineena oli 1:5000 laimennos.

3.3.5 Lämpökäsittelyiden eroja havainnollistavien sarjojen määrittäminen tuoreista ja pakastetuista näytteistä

Maitonäytteiksi valittiin Valion pastöroitu rasvaton maito, ESL- ja UHT-käsitellyt rasvattomat maidot sekä raakamaito ja Helsingin Meijeriliike Oy:ssä pastöroitu täysmaito. Proteiini-näytteiksi puolestaan BLG, pastöroitu BLG, pastöroitu BLG 2:1 ALA (n. sama suhde kuin herassa), korkeapastöroitu BLG ja negatiivinen kontrolli pastöroitu α -laktalbumiini (ALA). Raakamaidosta erotettiin rasvaa sentrifugoimalla, mutta näytteitä ei juoksetettu. Proteiini-näytteiden pastörinti suoritettiin 63 °C 30 min ja korkeapastörinti 90 °C 5 min pH 6,6 fosfaattipuskurissa. Maidosta valmistettiin näytesarjat (10 µl maitoa, 3 µl puskuria ja 2 µl Milli-Q) ja proteiiniliuoksista (6 µl näytettä, 3 µl puskuria ja 6 µl Milli-Q). Näytekaivoihin

pipetoitiin 15 µl näytettä. Suoritettiin PAGE-ajo (125 V 15 min ja 200 V 70 min) ja blotting-ajo (25 V ja 1,0 A, 30 min). BLG-vasta-aineena oli 1:5000 laimennos.

Selvitettäessä pakastuksen vaikutuksia havaintosarjan luettavuuteen näytteiksi valittiin: Raakamaito, BLG (3 mg/ml proteiinia pH 6,6 fosfaattipuskurissa), ALA (3 mg/ml proteiinia pH 6,6 fosfaattipuskurissa), Valion pastöroitu maito, ESL- ja UHT-käsitellyt maidot, sekä raakamaidosta erotettu ja suodatettu hera. Näytteet pakastettiin ja kokeet suoritettiin viikon päästä pakastuspäivästä. Maito- ja heranäytteille pipetoitiin 3 µl:n näytesarja (3 µl maitoa tai heraa, 3 µl puskuria ja 9 µl Milli-Q) ja 7 µl:n näytesarja (7 µl maitoa tai heraa, 3 µl puskuria ja 5 µl Milli-Q). Lisäksi valmistettiin BLG- ja ALA-näytteet (3 µl kantaliuosta, 3 µl puskuria ja 9 µl Milli-Q). Näytekaivoihin pipetoitiin 15 µl näytettä. PAGE-ajossa parametreinä oli 125 V 15 min ja 200 V 70 min ja blotting-ajossa 25 V ja 1,0 A, 30 min. BLG-vasta-aineena oli 1:3000 laimennos.

3.4 Tulokset

Natiivi-PAGE-geeleiltä ei voida päätellä tarkkoja molekyylipainoja, joten tuloksia on verrattava aikaisempaan tietoon ja mahdollisiin kontrollinäytteisiin, joita geelille on lisätty. Tuloksia tulkitessa on verrattu kuvia etenkin Manderson ym. (1995), Chen ym. (2007) ja Lin ym. (2010) raportoimiin tuloksiin sekä muusta kirjallisuudesta löytyvään tietoon vyöhykkeitä muodostaneiden proteiinien tunnistamiseksi ja tulosten laadun arvioimiseksi.

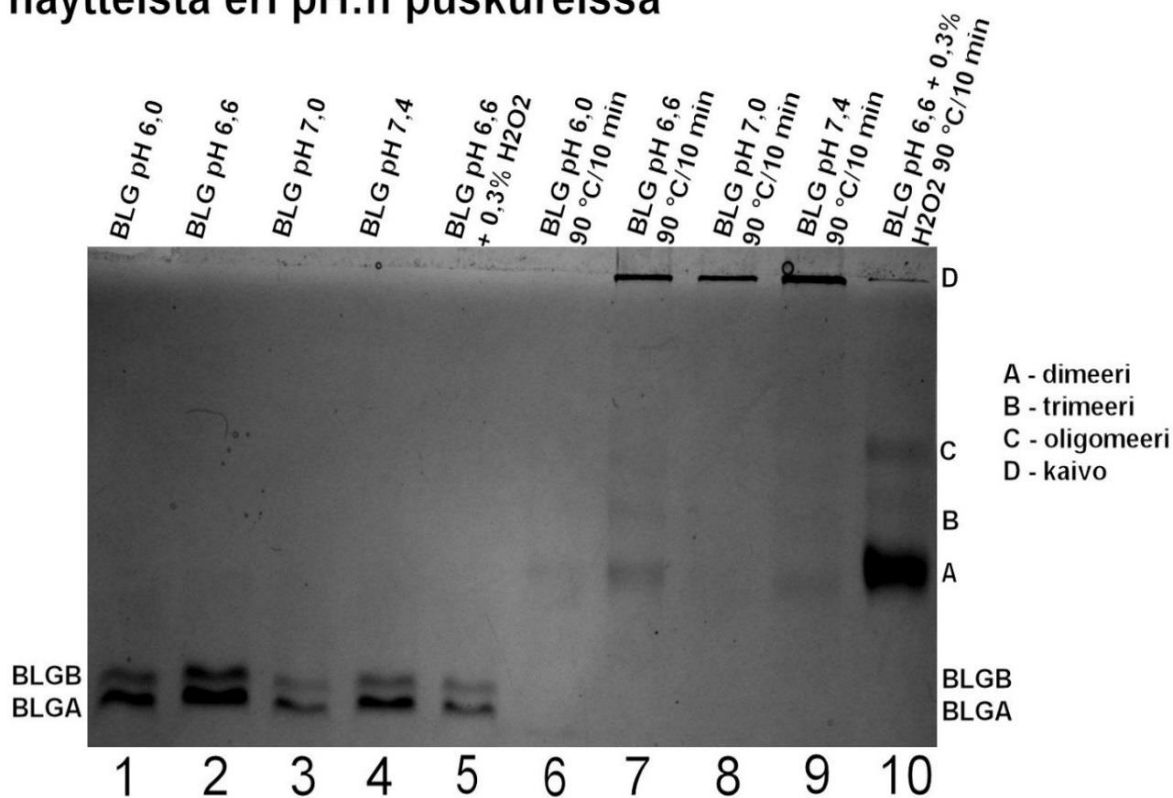
3.4.1 BLG- ja heranäytteiden pH:n vaikutus proteiinirakenteisiin

Kuvassa 7 nähdään lämpökäsittelyn vaikutuksia BLG-proteiinin rakenteeseen. Vasemmalla nähdään BLG:n A- ja B-muotoja (Chen ym. 2007) lämpökäsittlemättömissä näytteissä (1-5), eikä vetyperoksidikäsittely (näyte 5) näytä vaikuttavan. Lämpökäsitellyissä (90°C / 10 min) näytteissä (6-10) monomeerejä ei näy, mutta monimutkaisempia eli denaturoituneita komplekseja, mahdollisesti ainakin di- ja trimeerejä (vyöhyke A ja B), on havaittavissa etenkin pH 6,6 näytteellä 7. Tämä oli kirjallisuuden perusteella odotettua (Manderson ym. 1995; Chen ym. 2007; Lin ym. 2010; Walstra ym. 2006). perusteella oli odotettua. Myös muita oligomeerejä näyttäisi olevan pieniä määriä (vyöhyke C). Vetyperoksidia sisältäneessä näytteessä 10 on enemmän yksinkertaisempia muotoja, etenkin dimeeriä (vyöhyke A), suhteessa muihin näytteisiin. Lisäksi suuria komplekseja vähemmän, sillä näytekaivoon (vyöhyke D) ei näytä jääneen yhtä paljon näytettä kuin muihin. Vyöhykkeiden leviämistä pidemmälle matkalle aiheuttaa Chen ym. (2007) mukaan proteiinien polymerisoituminen ja Westermeier

ym. (2005) mukaan diffuusio. Molemmat aiheuttajat voivat selittää kuvissa havaittua vyöhykkeiden leviämistä. Näytteen 6 kanssa on ilmeisesti tapahtunut virhe, eikä näytekaivoon ole päätynyt riittävästi proteiinia.

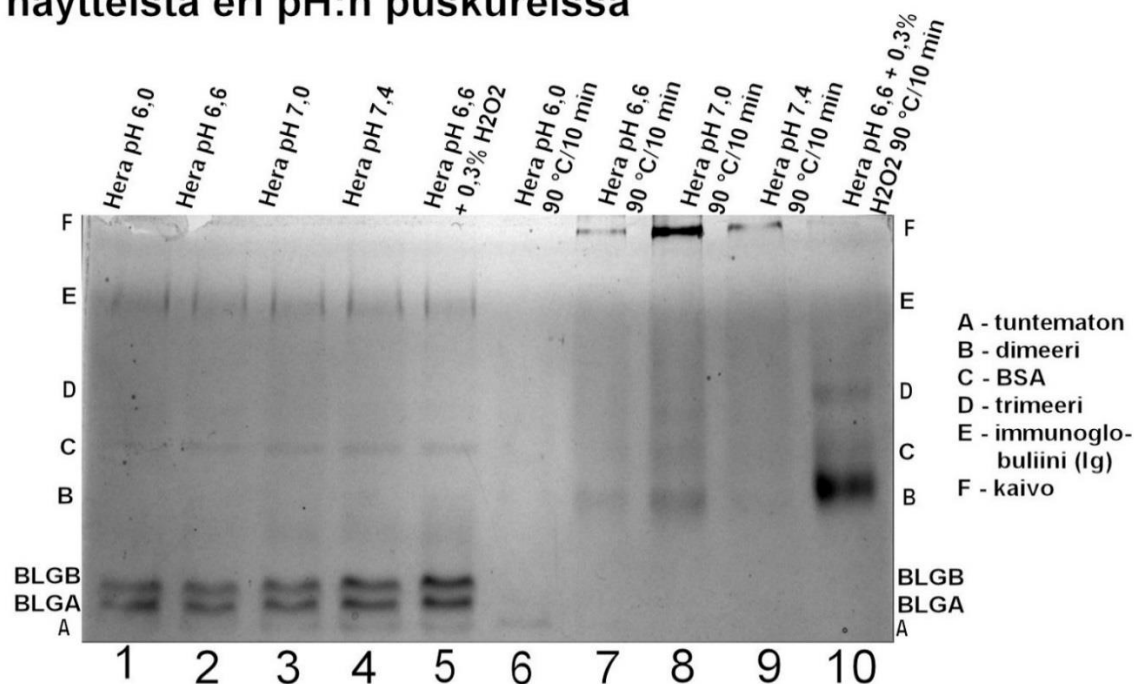
Sama alempien vyöhykkeiden (BLGA ja BLGB) häviäminen ja monimutkaisempien vyöhykkeiden tuhuisuus havaitaan myös heraisolaatin kohdalla (kuva 8). Lämpökäsittämättömissä näytteissä ylinnä näkyvä vyöhyke lienee immunoglobuliinia (Ig), sillä Lin ym. (2010) kokeissa se oli ylin vyöhyke ja he havaitsivat sen häviävän lämpökäsittelyn seurauksena. Keskellä oleva selkeä vyöhyke voisi olla lehmän seerumin albumiinia (BSA). Tunnistamattomana vyöhykkeenä näytteissä 3-6 näkyy BLG-A:n alla vielä yksi heikko vyöhyke, jolle ei ole selitystä.

Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli BLG-näytteistä eri pH:n puskureissa



Kuva 7. Natiivi-PAGE-geeli, jossa lämpökäsittämättömät BLG-näytteet (1-5) ja vastaavat lämpökäsittellyt (6-10), pH arvoilla 6,0 (1, 6), 6,6 (2,7), 7,0 (3,8) ja 7,4 (4,9), sekä pH 6,6, johon lisätty 0,3 % H₂O₂ (näytteet 5,10). Kuvaan merkitty havaittuja vyöhykkeitä: BLG:n A- ja B-muodot (BLGA, BLGB), BLG:n di- (A), tri- (B) ja oligomeerejä (C), sekä näytekaivoon jääneet proteiinit (D).

Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli heraisolaatti-näytteistä eri pH:n puskureissa

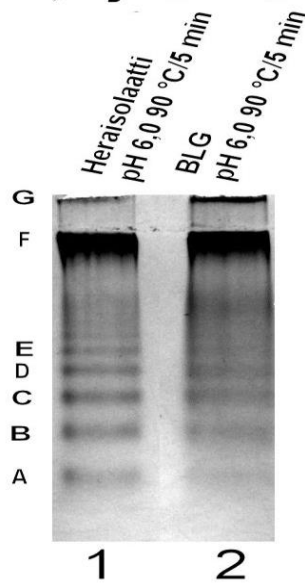


Kuva 8. Natiivi-PAGE-geeli, jossa lämpökäsittämättömät heraisolaattinäytteet (1-5) ja vastaavat lämpökäsitellyt (6-10), pH arvoilla 6,0 (1, 6), 6,6 (2,7), 7,0 (3,8) ja 7,4 (4,9), sekä pH 6,6, johon lisätty 0,3 % H₂O₂ (näytteet 5,10). Kuvaan merkitty tunnistettuja vyöhykkeitä: BLG:n A- ja B-muodot (BLGA, BLGB), BLG:n di- (B) ja trimeeri (D), lehmän seerumin albumiini (BSA) (C), immunoglobuliini (E) ja näytekaiivo (F), sekä tunnistamaton proteiini (A).

Kuvassa 9 nähdään miedommalla lämpökäsittelyllä (90 °C/5 min) pH-arvolla 6,0 heraisolaatin ja BLG:n muodostaneen samankaltaisen ”tikapuun” kuin Manderson ym. (1995) esittivät omissa tuloksissaan. He raportoivat vyöhykkeiden olevan monomeerejä, ei-natiiveja monomeerejä, di-, tri- ja oligomeerejä.

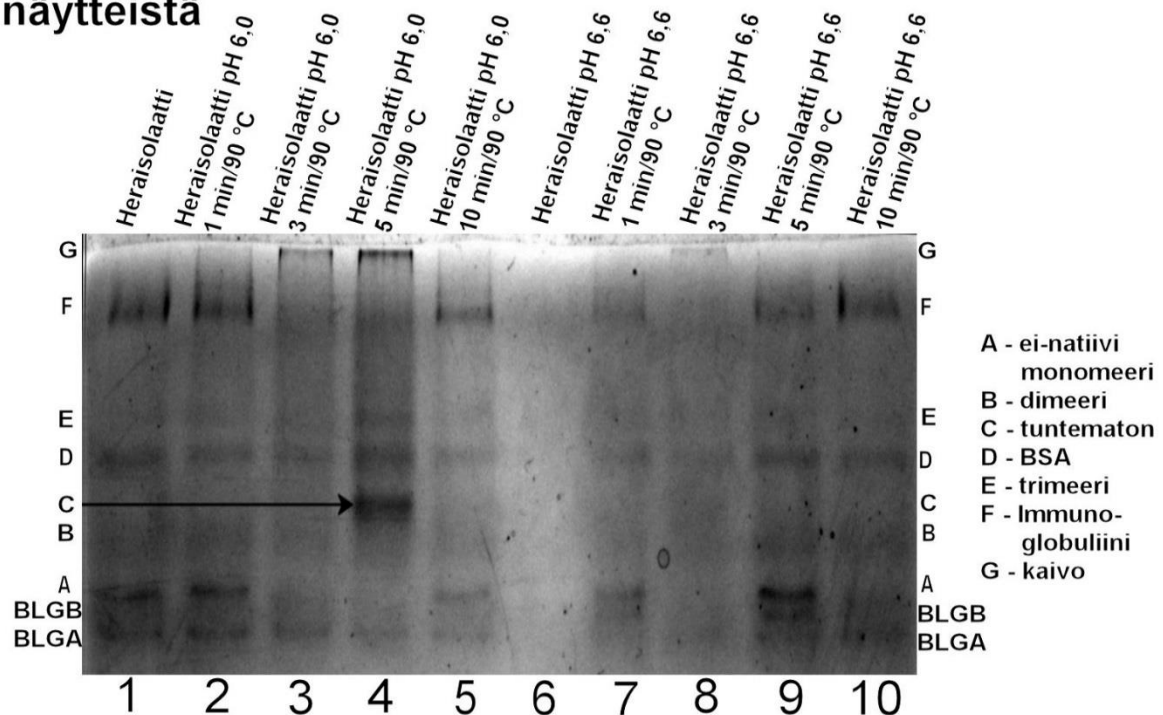
Kuvassa 10 heran lämpökäsittelyissä näyttäisivät pH 6,0 näytteet (1-5) olevan hieman selvemmin erottuvia kuin pH 6,6 (6-10). Molemmassa pH-arvoissa havaitaan denaturoitumisen aiheuttama proteiinikompleksien kasvu ja yksinkertaisempien muotojen väheneminen. Havaitaan edellisessä kokeessa todettu 90 °C/5 min lämpökäsittelyn pH 6,0 puskurissa saaneen näytteen muodostaneen useita komplekseja. Immunoglobuliini näyttäisi häviävän kolmen minuutin (näytteet 3, 8) lämpökäsittelyn jälkeen, mutta samalla paikkaa havaitaan jälkiä mahdollisesti suurista komplekseista 5 min (näytteet 4, 9) ja 10 min (näytteet 5,10) kohdalla. Näytteiden pH näyttäisi vaikuttavan tuloksiin vain vähän, kun ottaa huomioon aikaisempia tuloksia tarkastellessa havaitun vaihtelun näytteiden onnistumisessa. BLG-A- ja BLG-B-muotojen lisäksi näkyy joissain näytteissä (ainakin näytteet 7 ja 9) mahdollinen kolmas vyöhyke (A), joka voi olla Manderson ym. (1995) raportoima ei-natiivi BLG-A-monomeeri. Ilmakupla esti näytteen pääsemisen näytekaiivoon 6.

Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli pH 6,0 ja 90 °C/5 min käsitellyistä näytteistä



Kuva 9. Osa Natiivi-PAGE-geeliä, jossa lämpökäsitellyt (90 °C/5 min) heraisolaatti pH 6,0 (näyte 1), BLG pH 6,0 (näyte 2). Kuvaan merkitty mahdollisia BLG:n di- (A), tri- (B) ja oligomeerejä (C-G).

Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli pH 6,0 ja 6,6 puskureissa eri lämpökäsittelyn saaneista heraisolaatti näytteistä



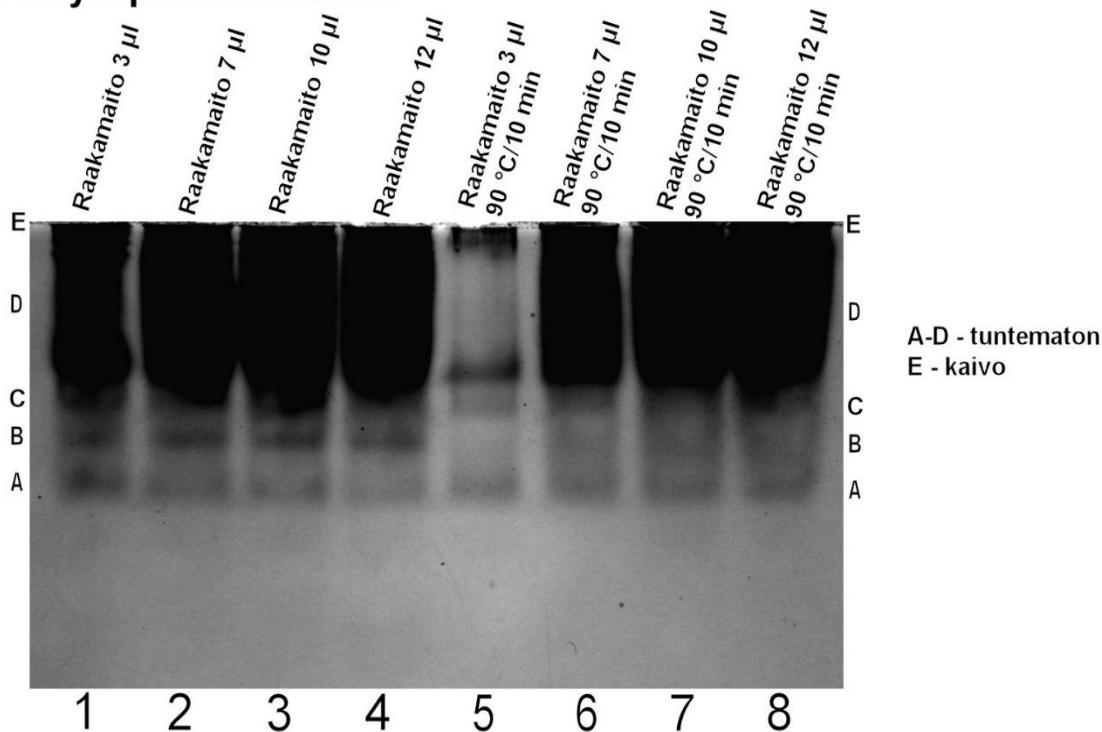
Kuva 10. Natiivi-PAGE-geeli, jossa eri lämpökäsittelyn saaneita heranäytteitä, ajoaika 43 min. Puskurin pH 6 (1-5) ja pH 6,6 (6-10): Lämpökäsittelemättömät näytteet (1,6), 1 min/90 °C (2,7), 3 min/90 °C (3,8), 5 min/90 °C (4,9) ja 10 min/90 °C (5,10). Merkittävät vyöhykkeet: BLG:n A- ja B-muodot (BLGA, BLGB), BLG:n mahdollinen ei-natiivi monomeeri (A), dimeeri (B), trimeeri (E), Lehmän seerumin albumiini (D), että immunglobuliini (F) ja tunnistamaton rakenne (C), sekä näytekäivo (G).

3.4.2 Kymosiinierotuksen ja suodatuksen vaikutuksia maitonäytteiden luettavuuteen

Raakamaitonäytteissä (kuva 11) ei havaita aikaisemmista kuvista tunnistettuja pieniä proteiinimuotoja, vaan sen sijaan suurempia proteiinirakenteita (A, B ja C) ja kenties rasvan sekä suurien kompleksien aiheuttamat paksut mustat alueet (D) geelin yläosassa. Lämpökäsitellyssä 3 μ l näyte (5) vaikuttaa vähemmän täydeltä kuin muut, mutta siitä näyttää myös jäävän havaitsematta vyöhyke B verrattuna 7 μ l näytteeseen (6). Toisaalta 10 μ l ja 12 μ l näytteissä (7 ja 8) näytettä on niin runsaasti, että C-alue on vaikeasti erotettavissa D-alueesta.

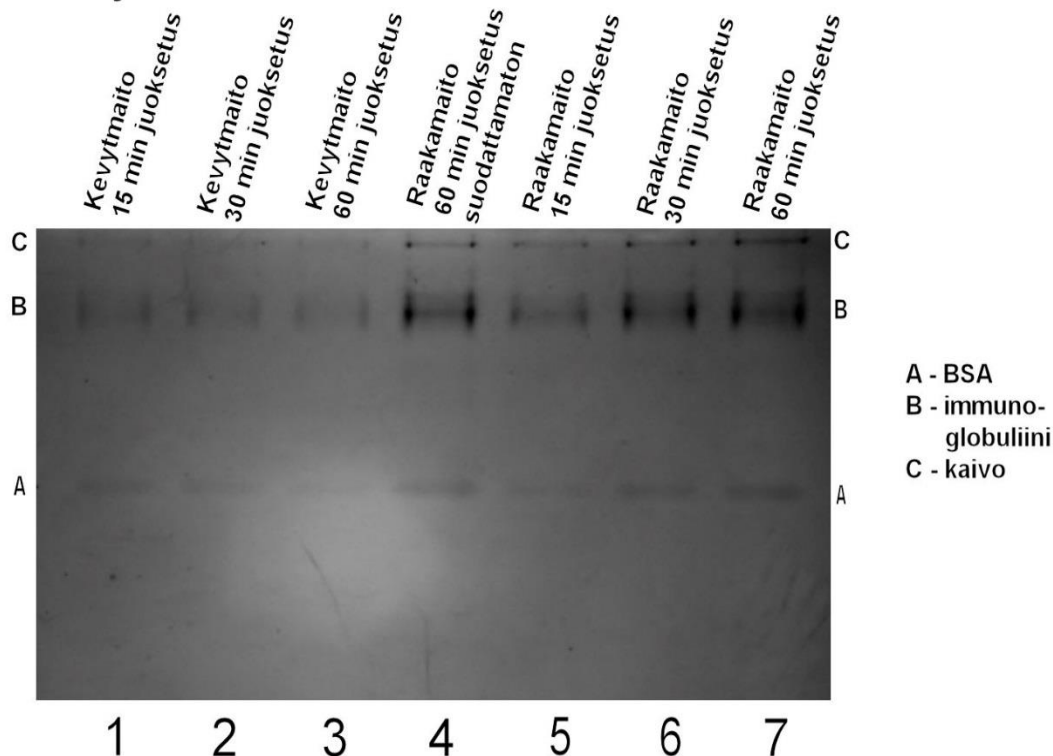
Heran erottaminen maitonäytteistä juoksetteen avulla onnistui, mutta näytteet näyttävät olleen liaksi laimennettuja Coomassie blue -värin erotuskyvyille, kuten kuvassa 12 on nähtävissä. Pidempi juoksettumisaika näyttäisi, ainakin raakamaitojen kohdalla, vaikuttavan positiivisesti heraan jäävien proteiinien määrään (vrt. 15 min (näyte 5) vs. 60 min (näyte 7) juoksetettu). Suodatuksella ei näyttäisi olevan vahvaa vaikutusta tulosten luettavuuteen tässä kokeessa (vrt. suodattamaton (näyte 4) vs. suodatettu (näyte 7)).

Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli raakamaidosta eri näytepitoisuuksilla



Kuva 11. Natiivi-PAGE-geeli, jossa lämpökäsittelemättömät raakamaito näytteet (1-4) ja lämpökäsitellyt (5-8). Lisäsmäärät olivat 3 μ l (1,5), 7 μ l (2,6), 10 μ l (3,7) ja 12 μ l (4,8). Kuvaan merkitty havaittuja vyöhykkeitä (A-D) ja näytekaivon sijainti (E).

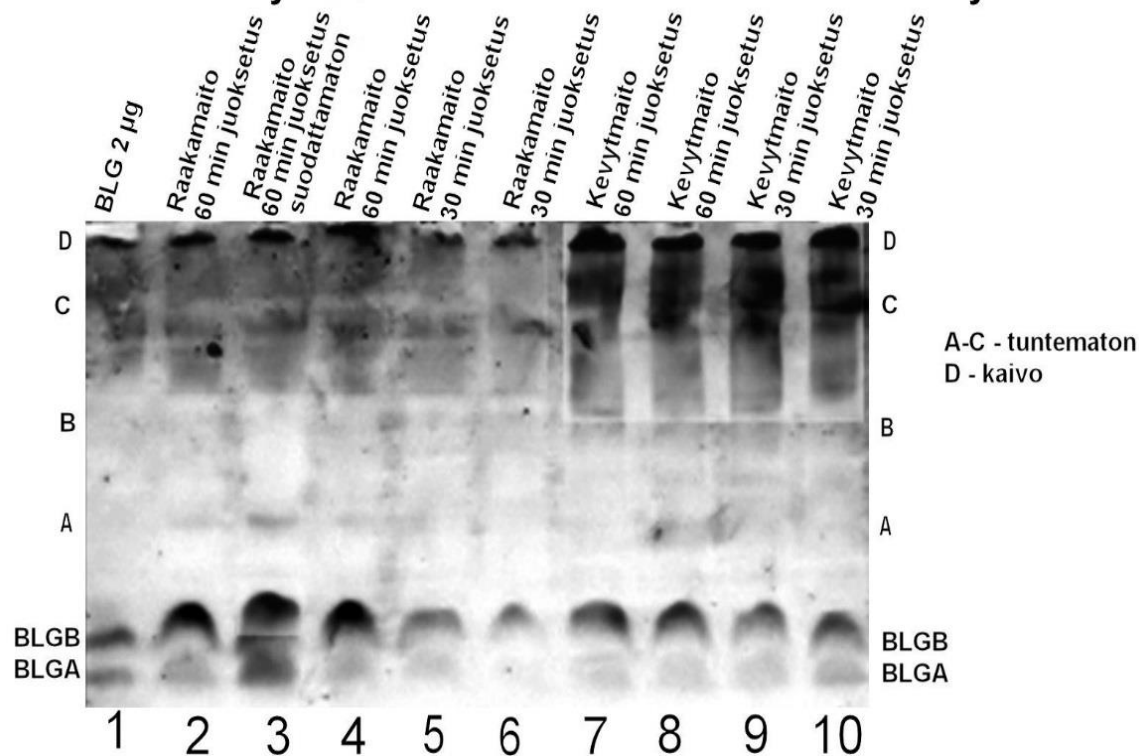
Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli juoksetetuista maitonäytteistä



Kuva 12. Kymosiinilla 15, 30 ja 60 minuutin ajan juoksetettujen maitojen heroista valmistettuja näytteitä natiivi-PAGE-geelissä. Kuvassa 15 min juoksetettu kevytmaito (1), 30 min juoksetettu kevytmaito (2), 60 min juoksetettu kevytmaito (3), 60 min juoksetettu suodattamaton raakamaito (4), 15 min juoksetettu raakamaito (5), 30 min juoksetettu raakamaito (6), 60 min juoksetettu raakamaito (7). Merkittviä vyöhykkeitä: mahdollinen lehmän seerumin albumiini (A) ja immunoglobuliini (B), sekä näytekaivo (C).

BLG-vasta-aineella leimattu PVDF-kalvo (kuva 13) suodatetuista ja suodattamattomista raaka- ja kevytmaitonäytteistä. Kuvasta näkee selvästi BLG:n A- ja B-muodot (BLGA ja BLGB) sekä pastöroitujen tuotteiden (7-10) kohdalla isompien proteiinikompleksien suuremman määrän (vyöhyke C) verrattuna lämpökäsittelymättömien näytteiden (1-6) vastaviin (vyöhyke B). Suodattamattomassa näytteessä 3 näyttää olevan hieman enemmän BLG:a kuin suodatetuissa näytteissä 2 ja 4. Raakamaidon 60 min juoksetus (näytteet 2 ja 4) näyttäisi hieman parantavan tulosten luettavuutta vrt. 30 min juoksettumisaikaan (näytteet 5 ja 6).

BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo kymosiinin avulla erotetuista heranäytteistä

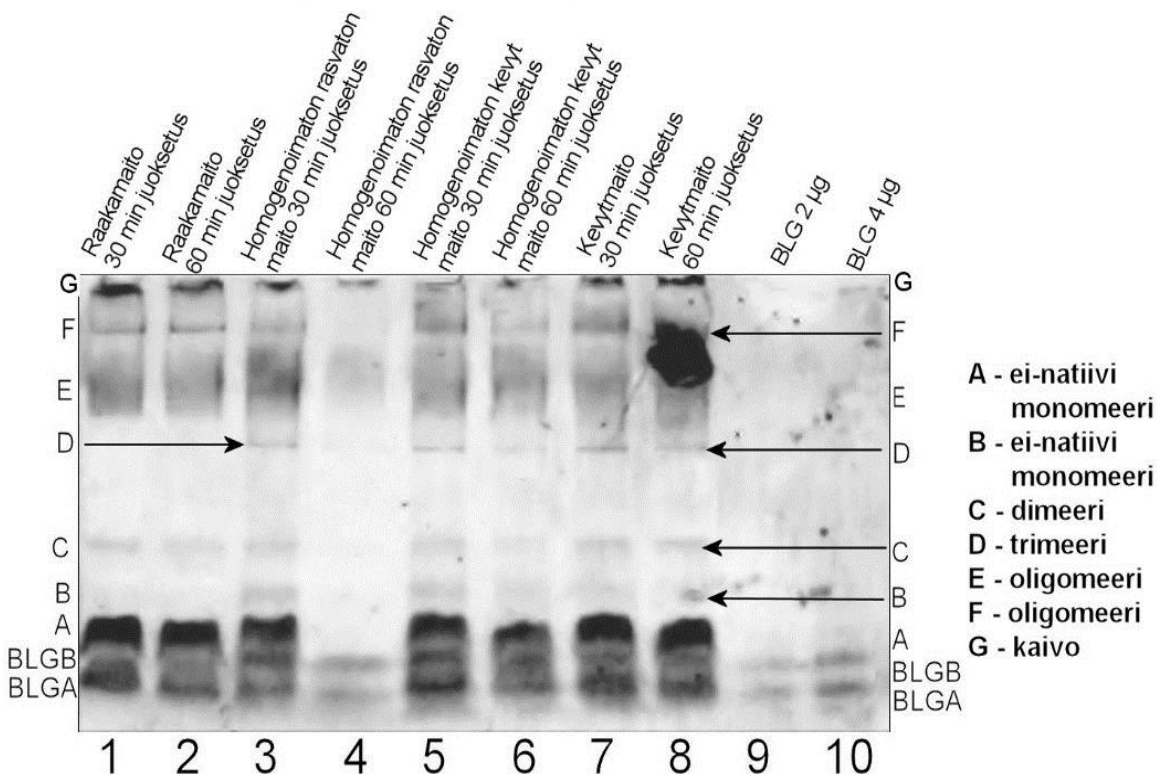


Kuva 13. BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo kymosiinilla erotetuista raaka- ja kevytmaito heroista: BLG 2 µg (1), raakamaito 60 min juoksetettu (2), suodattamaton raakamaito 60 minuutin juoksetus (3), raakamaito 60 min juoksetettu (4), raakamaito 30 min juoksetettu (5), raakamaito 30 min juoksetettu (6), kevytmaito 60 min juoksetettu (7), kevytmaito 60 min juoksetettu (8), kevytmaito 30 min juoksetettu (9) ja kevytmaito 30 min juoksetettu (10). Merkittviä vyöhykkeitä: BLG:n A- ja B-muodot (BLGA, BLGB), mahdollinen BLG:n dimeeri (A), suurempia rakenteita ja komplekseja (B, C), sekä näytekaivo D.

3.4.3 Rasvan ja homogenoinnin vaikutus BLG:n rakenteisiin pastöroidussa maidossa

Kuvassa 14 nähdään hyvin lämpökäsittelyn seurauksena muodostuneita proteiini muotoja (vyöhykkeet B ja D). Homogenoimattomilla pastöroiduilla maidoilla (näytteet 3-6) ei näy selkeää eroavuutta BLG:n rakenteissa verrattuna homogenoituihin maitoihin (näytteet 7 ja 8). Tässä kokeessa juoksettumisajalla ei näyttäisi olevan merkitystä tulosten luottavuuteen. Alimpien vyöhykkeiden voimakkuudesta johtuen on vaikea sanoa varmasti, mutta BLG-A:n ja BLG-B:n lisäksi näyttäisi olevan kolmas vyöhyke (A) ja niiden yläpuolella vielä neljäs (B), jotka voisivat olla Manderson ym. (1995) tutkimuksissaan havaitsemia ei-natiiveja BLG:n monomeerejä. Manderson ym. (1995) havaitsivat BLG-A:lla muodostuvan kaksi ja BLG-B ja C muodoilla vain yhden. Näytteen 4 kohdalla kaikki näyte ei varmaankaan ole päätynyt näytekaivoon.

BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo homogenoinnin, juoksetusajan ja rasvan vaikutuksesta tulosten luettavuuteen

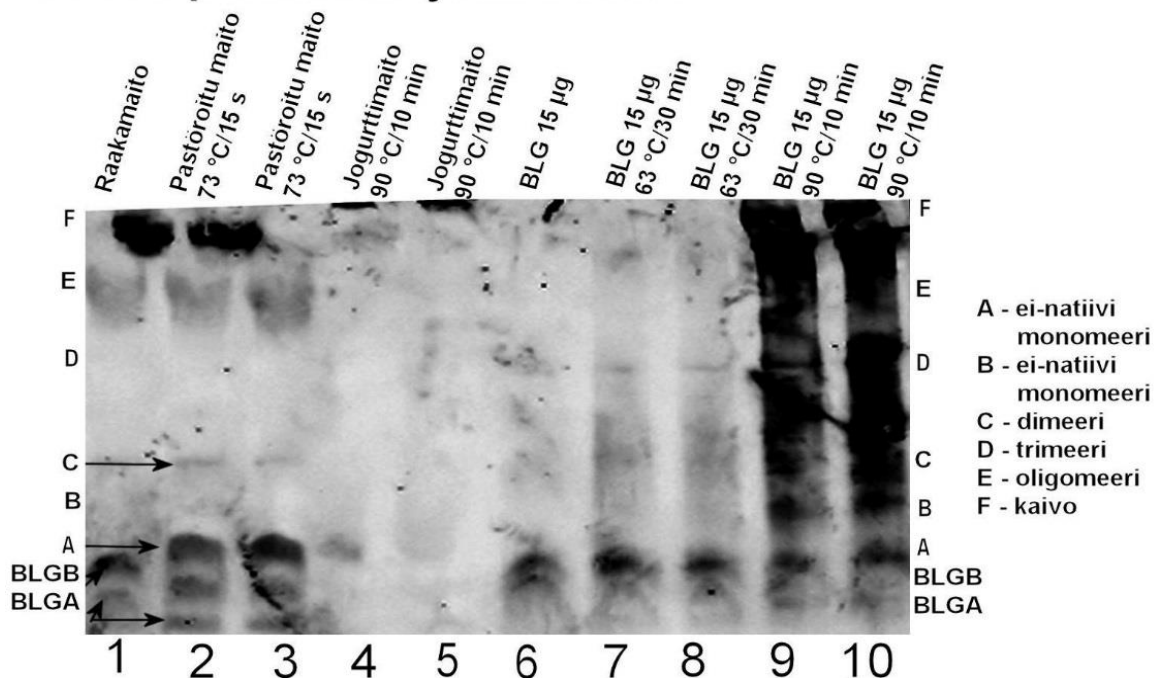


Kuva 14. BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo, jossa kymosiinilla erotettuja heränäytteitä (rasvaisista, rasvattomista ja homogenoiduista maidoista) ja BLG-verrokkeja. Kuvassa 30 min juoksetettu raakamaito (1), 60 min juoksetettu raakamaito (2), 30 min juoksetettu homogenoimaton rasvaton maito (3), 60 min juoksetettu homogenoimaton rasvaton maito (4), 30 min juoksetettu homogenoimaton kevyt maito (5), 60 min juoksetettu homogenoimaton rasvaton maito (6), 30 min juoksetettu kevyt maito (7), 60 min juoksetettu kevyt maito (8), 2 µg BLG (9) ja 4 µg BLG. Merkittyjen vyöhykkeiden mahdollisia aiheuttajia: BLG:n A- ja B-muodot (BLGA, BLGB), mahdollisesti BLG:n ei-natiiveja monomeerejä (A ja B), di- (C) ja trimeerejä (D), sekä oligomeerejä tai muita suuria proteiini- ja rasva-aineryhmiä (E-F).

3.4.4 Lämpökäsittelyiden vaikutuksia BLG-proteiiniin maidossa ja fosfaattipuskurissa

Kokeen tulosten perusteella (kuva 15) BLG:n rakenteet näyttäisivät eroavan jossain määrin, kun verrataan lämpökäsittelyä maidossa (näytteet 1-5) ja pH 6,6 fosfaattipuskurissa (näytteet 6-10). Maidossa vyöhykkeet ovat hieman selkeämpiä, kuin pH 6,6 fosfaattipuskurissa, eikä polymeroitumisen aiheuttamaa liukumaa (näytteet 7-10) ole yhtä paljon. Toisaalta jogurttimaito (näytteet 4 ja 5) näyttää sisältäneen niin suuria komplekseja, ettei näytteistä päässyt geeliin juuri mitään, vaan näytteet jäivät näytekaivoihin (F). Voi myös olla, että vasta-aine ei ole päässyt kiinnittymään jogurttimaidossa proteiineihin niiden rakennemuutosten takia, mutta ainakaan BLG-isolaatin kanssa ongelmaa ei näyttäisi olleen (kts. näytteet 9 ja 10).

BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo lämpökäsitellyistä BLG-näytteistä pH 6,6 fosfaattipuskurissa ja maidossa

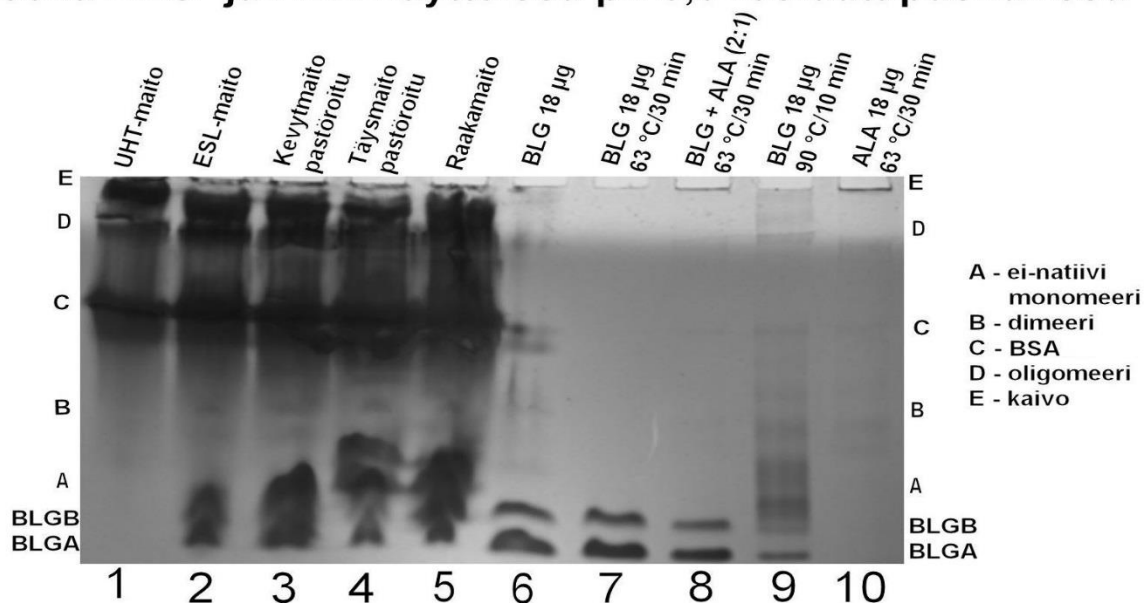


Kuva 15. BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo, jossa eri lämpökäsittelyn saaneista maitonäytteistä erotettuja heroja ja samat lämpökäsittelyt pH 6,6 fosfaattipuskurissa saaneita BLG näytteitä: Raakamaito (1), pastöroitu maito (2,3), 90 °C/10 min kuumennettu jogurttimaito (4,5), lämpökäsittelemätön BLG 15 µg (6), 63 °C/30 min kuumennettu BLG 15 µg (7,8), 90 °C/10 min kuumennettu BLG 15 µg (9,10). Merkittävät vyöhykkeet: BLG:n A- ja B-muodot (BLGA, BLGB), mahdollisia ei-natiiveja monomeerejä (A ja B), dimeerejä (C), trimeerejä (D) ja oligomeerejä ja muita komplekseja (E), sekä näytekaivo (F).

3.4.5 Tuoreista ja pakastetuista näytteistä muodostetut lämpökäsittelyiden eroja havainnollistavat sarjat

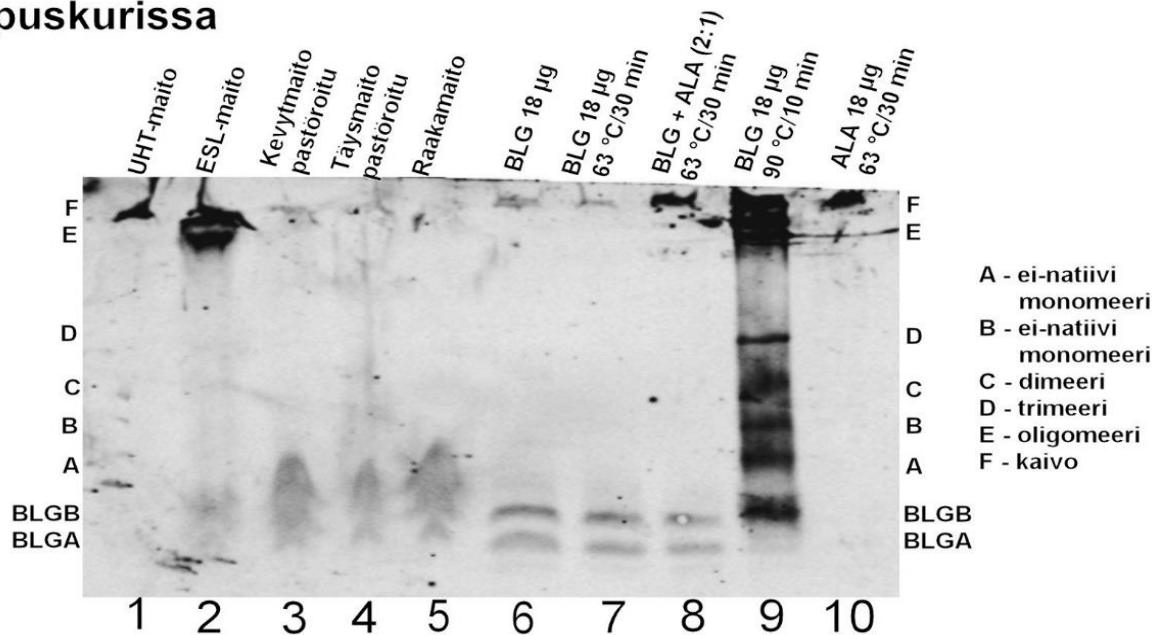
Kuvasta 16 nähdään eroja lämpökäsittelyjen välillä: Natiivimuotojen (alue A) määrä näyttäisi vähenevän lämpökäsittelyn kasvaessa siten, ettei UHT-maidossa (näyte 1) enää havaita natiivimuotoja ollenkaan. Maitonäytteet ovat hieman vaikeasti tulkittavissa vyöhykkeiden suhruisuuden takia. Pastöroitujen BLG- ja BLG+ALA 2:1 -liuosnäytteiden (7 ja 8) kohdalla havaitaan selkeät BLG-A ja BLG-B vyöhykkeet ja heikkoja vyöhykkeitä ylempänä. Ylemmät heikot vyöhykkeet (alueet B ja C) havaitaan myös ALA:n (näyte 10) kohdalla, mutta BLG-A ja BLG-B uupuvat. Kovemman lämpökäsittelyn (90 °C/5 min) saanut BLG (näyte 9) toistaa Manderson ym. (1995) kokeiden kaltaisen ”monipuolaisen tikapuun”. Vertailemalla kuvia 16 ja 17 havaitaan BLG-vasta-aineella leimauksen ero Coomassie blue -värijäykseen: BLG-vasta-aine on sitoutunut vain BLG:a sisältäviin vyöhykkeisiin (vrt. kuvan 16 B-D alueet vs. kuvan 17 B-E alueet). Lisäksi ALA:a sisältävissä näytekohdissa (8 ja 10) ei näy kuvan 16 heikkoja vyöhykkeitä. Kuvan 17 kaivoissa 8 ja 10 havaittavan tumman vyöhykkeen aiheuttajaa ei tiedetä.

Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli lämpökäsittelymuutoksista erilaisissa maitonäytteissä sekä BLG- ja ALA-näytteissä pH 6,6 fosfaattipuskurissa



Kuva 16 Coomassie blue -värjätty natiivi-PAGE-geeli, jossa eri lämpökäsittelyn saaneita maitotuotteita. Geelillä lisäksi BLG- ja ALA-liuoksia, sekä BLG:n ja ALA:n 2:1 -liuos pH 6,6 fosfaattipuskurissa: UHT-käsitelty maito (1), ESL-käsitelty maito (2), pastöroitu kevytmaito (3), pastöroitu täysmaito (4), raakamaito (5), käsittelemätön BLG 18 µg (6), 63 °C/30 min pastöroitu BLG 18 µg (7), 63 °C/30 min pastöroitu BLG:n ja ALA:n 2:1 -liuos (8), 90 °C/5 min BLG 18 µg (9), 63 °C/30 min pastöroitu ALA 18 µg (10).

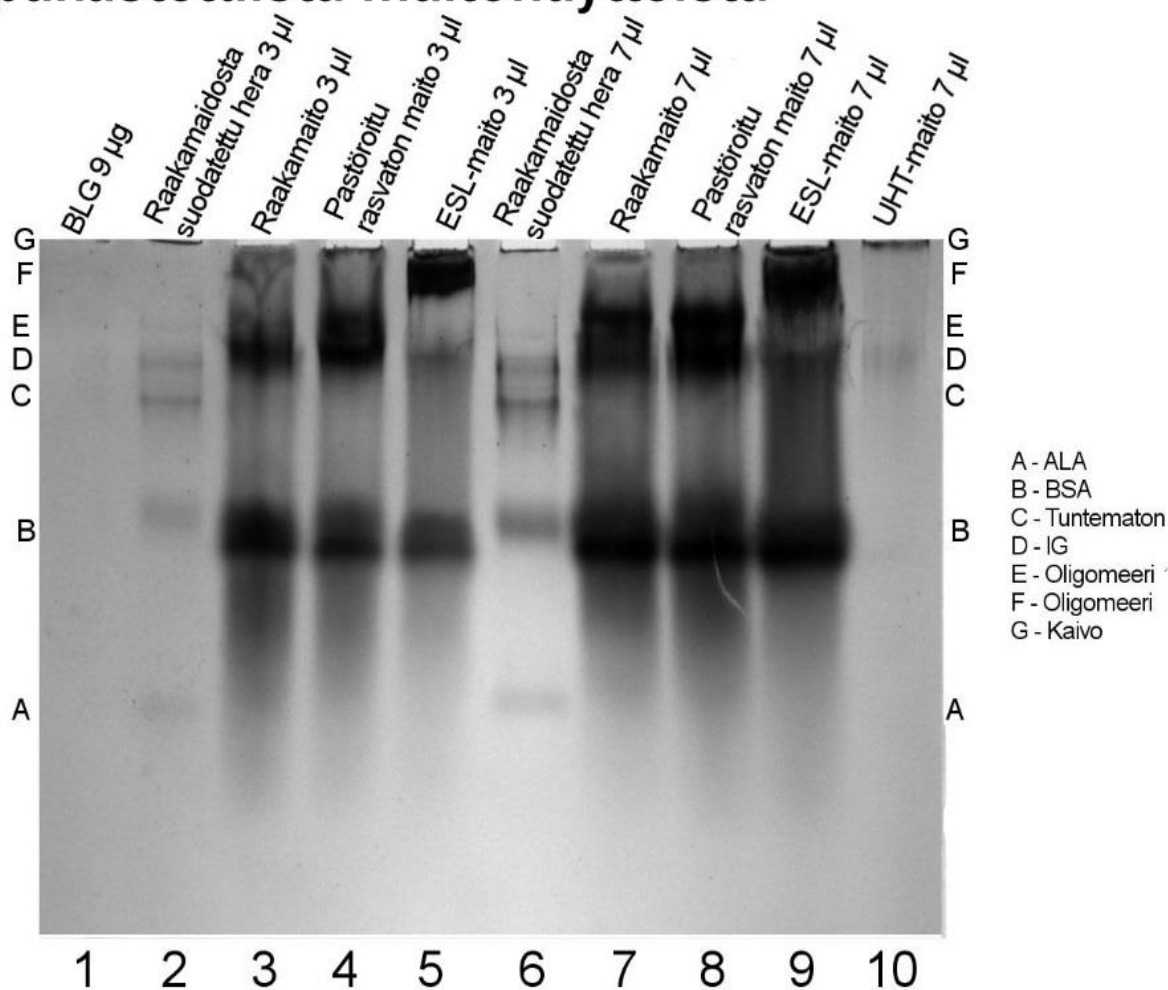
BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo lämpökäsittelymuutoksista erilaisissa maito- näytteissä sekä BLG- ja ALA-näytteissä pH 6,6 fosfaatti- puskurissa



Kuva 17. BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo, jossa eri lämpökäsittelyn saaneita maitotuotteita. Geelillä lisäksi BLG- ja ALA-liuoksia, sekä BLG:n ja ALA:n 2:1 -liuos pH 6,6 fosfaattipuskurissa: UHT-käsitelty maito (1), ESL-käsitelty maito (2), pastöroitu kevytmaito (3), pastöroitu täysmaito (4), raakamaito (5), käsittelemätön BLG 18 µg (6), 63 °C/30 min pastöroitu BLG 18 µg (7), 63 °C/30 min pastöroitu BLG:n ja ALA:n 2:1 -liuos (8), 90 °C/5 min BLG 18 µg (9), 63 °C/30 min pastöroitu ALA 18 µg (10).

Näytteiden pakastamisen vaikutuksia kokeen lopputulokseen voidaan tarkastella kuvista 18 ja 19. Kuvista huomataan myös BLG-vasta-aineella leimatun PVDF-kalvon parempi tarkkuus verrattuna Coomassie blue -värjättyyn geeliin (kts. kuva 18): BLG-vasta-aineella leimatun kalvon (kuva 19) näytteessä 1 havaitaan BLGA- ja B-muodot, joita Coomassie blue -värjätyn geelin näytteessä 1 ei nähdä (kuvan 18). Lisäksi nähdään maitonäytteen juoksettamisen ja siitä saadun heran suodattamisen (näytteet 2 ja 6) tuoma etu tarkkuuteen suhteessa suodattamattomiin ja juoksettamattomiin maitonäytteisiin (3-5 ja 7-10). Kuvan perusteella suurimmat erot näytteiden välillä havaitaan alueilla C-F. Raakamaidon (näytteet 3 ja 7) ja pastöroidun maidon (näytteet 4 ja 8) erot näyttävät vähäisiltä, lievää eroa D ja E alueilla. ESL-maito (näytteet 5 ja 9) raaka- ja pastöroiduista näytteistä heikomman D alueen perusteella, lisäksi alueella F on selkeä vyöhyke. UHT-maito (näyte 10) näyttäisi jättävän heikon vyöhykkeen alueelle D ja jäävän suurimmaksi osaksi näytkeäivon (E).

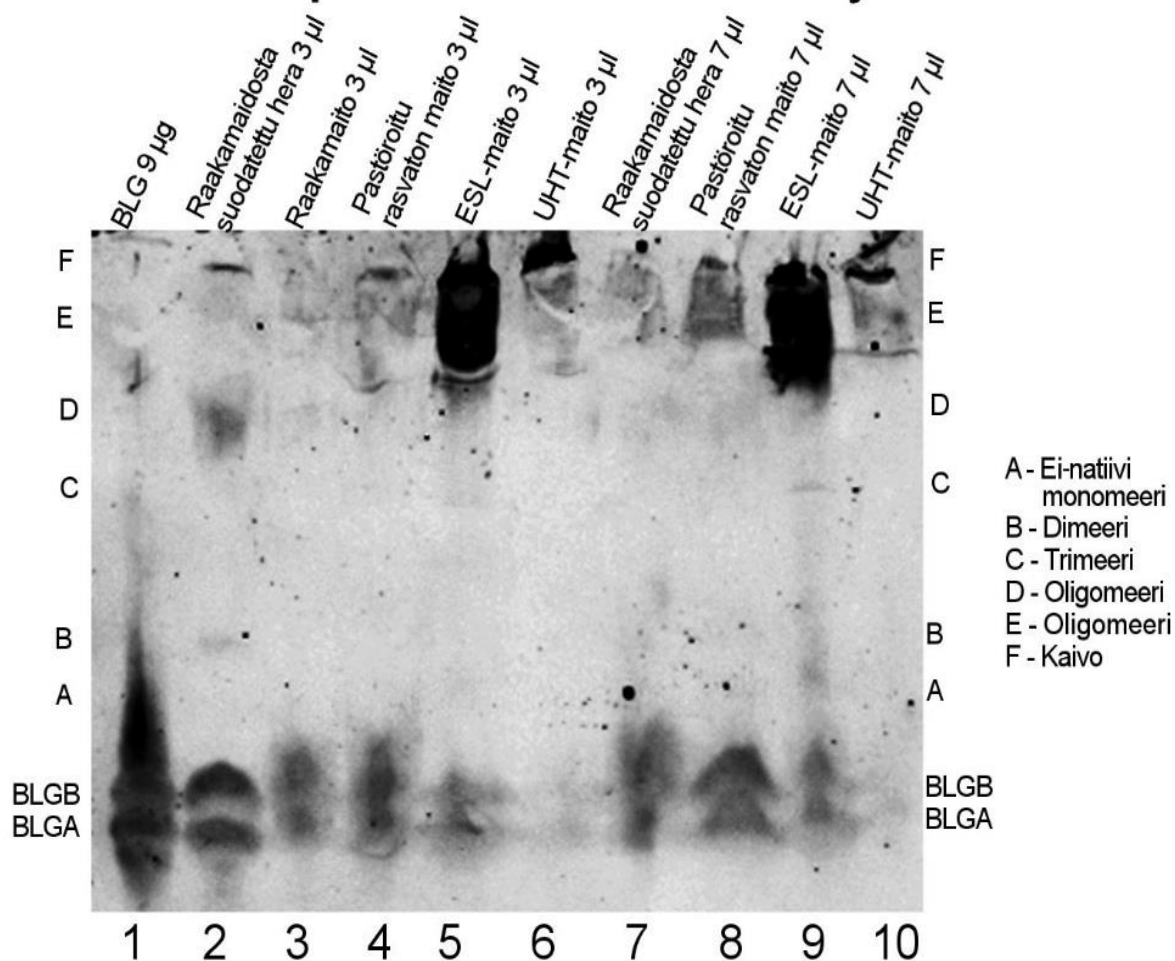
Coomassie blue-värjätty natiivi-PAGE-geeli pakastetuista maitonäytteistä



Kuva 18. Coomassie blue -värjätty natiivi-PAGE-geeli pakastetuista maitonäytteistä ja BLG-isolaattiliuksesta.

Kuvassa 19 nähdään, että natiivit BLG-A ja BLG-B muodot vähenevät lämpökäsittelyn voimakkuuden lisääntyessä ja UHT-maidossa (näytteet 6 ja 10) niitä ei näy enää ollenkaan. Pastöroidulla maidolla (näytteet 4 ja 8) natiivit BLG-muodot pysyvät melko muuttumattomina, mutta alueella E havaitaan haalea vyöhyke (näyte 8 selkeämpi). Alueella E on ESL-maidon kohdalla (näytteet 5 ja 9) huomattavasti pastöroitua maitoa (näytteet 4 ja 8) vahvempi vyöhyke. UHT-maidolla (näytteet 6 ja 10) alueella C havaitaan pastöroitua maitoa (näytteet 4 ja 8) heikompi vyöhyke ja ainoa selkeä merkki proteiineista on näytekaivon (F) pohjalla kuvan ylälaudassa.

BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo pakastetuista maitonäytteistä



Kuva 19. BLG-vasta-aineella leimatun natiivi-PAGE-geelin PVDF-kalvo pakastetuista maitonäytteistä ja BLG-isolaattiliuoksesta

3.5 Pohdinta

Kokeellisen tutkimuksen tuloksia on verrattu kirjallisuuteen ja muihin PAGE-tekniikkaa käyttäneisiin tutkimuksiin (Manderson ym. 1995; Chen ym. 2007; Lin ym. 2010) aiheesta ja vaikuttavat olevan samansuuntaisia aiempien tulosten kanssa. Kaikkien vyöhykkeiden varmuudella tunnistaminen olisi vaatinut lisätutkimuksia, mutta se ei tämän tutkielman resurs-sien puitteissa ollut mahdollista. Tutkielman tavoitteet saatiin saavutettua eli pystyttiin ha-vaitsemaan erot lämpökäsittelyiden aiheuttamien rakennemuutosten välillä, vaikei proteiini-muotoja varmuudella pystyttykään nimeämään. Käytettyjen menetelmien (natiivi-PAGE yhdistettynä immunoblot-kokeeseen) häiriöherkkyys (Westermeier ym. 2005), kompleksi-nen tutkimuskohde eli maito sekä kokeiden tekijän harjaantuneisuuden puute lienevät suurimmat syyt vaihteleviin koetuloksiin. Tulokset eivät olleet täydellisiä, mutta niiden perusteella voidaan kuitenkin tehdä johtopäätöksiä ja suunnitella tulevia tutkimuksia sekä mieltä, missä kohdin voisi seuraavalla kerralla tehdä paremmin.

Tulosten perusteella voi sanoa, että tällä menetelmällä on mahdollista todentaa ainakin raaka-, pastöroitu-, ESL- ja UHT-maitojen käsittelyissä syntyneitä eroja BLG:n eri rakenne-muotojen pitoisuuksissa pienimpien eli geelille siirtyneiden muotojen kohdalla. Erot löytyi-vät BLG:n natiivimuotoja ja oligomeerejä tarkastelemalla (kuvat 18 ja 19). Käsittelyn voi-makkuuden kasvaessa natiivien BLG- muotojen määrä suhteessa lievempään lämpökäsitte-lyyn vähenee, kunnes UHT käsitellyssä maidossa niitä ei enää havaita (kts. kuvat 18 ja 19). Vastaavanlaisia tuloksia olivat saaneet myös mm. Mc Swiney ym. (1994), Manderson ym. (1995), Chen ym. (2007) ja Lin ym. (2010). Pienien oligomeerien määrä kasvaa ESL-käsit-telyn voimakkuuteen asti, jonka jälkeen ne häviävät lähes kokonaan UHT-käsittelyn voi-makkuudessa (kuvat 18 ja 19). UHT-käsittely oli riittävän voimakas aggregoimaan lähes kaiken havaittavan BLG:n niin suuriksi komplekseiksi, etteivät ne päässeet näytekaiivosta erottelugeeliin (kuvat 18 ja 19). Myös Lin ym. (2010) tuloksissa UHT-käsiteltyjen maitojen kohdalla geelit olivat jo varsin tyhjiä, joten tulokset vaikuttavat näiltäkin osin luotettavilta

Menetelmän toimivuutta maidon normaalin pH-alueella ulkopuolella ei todennettu ja siinä voi olla ongelmia tai ainakin tulokset eroavat normaali pH:n maidon tuloksista, johtuen pH:n vaikutuksesta maidossa tapahtuviin lämpömuutoksiin. Näytteiden pH:n vaikutuksia tarkas-televista kokeista huomaa pH:n vaikuttavan rakenteiden muutoksiin selvästi etenkin kevy-emmillä lämpökäsittelyillä (kuvat 7-10). Kirjallisuudessakin mainitaan pH:n vaikuttavan

BLG:n aggregoitumiseen merkittävästi (mm. Brownlow ym. 1997; Creamer ym. 2004; Walstra ym. 2006). Lähteiden perusteella muutokset aggregoitumistaipumuksissa liittyvät BLG:n kolmiulotteisen rakenteen muutoksiin eri pH-arvoilla, sillä rakenteen avautuminen mahdollistaa useampien sidosten muodostumisen. Käytetyillä koeparametreilla ei havaittu merkittäviä eroja voimakkaimpien (90 °C/10 min) lämpökäsittelyiden vaikutuksissa eri pH-arvoilla, todennäköisesti muodostuneiden proteiinikompleksien liian suuren koon vuoksi (kuvat 7 ja 8). Lämpökäsittelyn vaikutuksesta eri pH-arvoilla on saatu samansuuntaisia tuloksia aiemmissakin tutkimuksissa (Manderson ym. 1995; Creamer ym. 2004; Lin ym. 2010). Tämän perusteella kokeiden tuloksia voidaan pitää riittävän luotettavina johtopäätösten tekemistä varten. Manderson ym. (1995) raportoima monivyöhykkeinen ”tikapuu”-rakenne tuli näkyviin fosfaatipuskurin pH-arvolla 6,0 ja 90 °C/5 min lämpökäsittelyllä (kuva 9). Sitä voisi tarvittaessa käyttää standardisuoran tavoin määritettäessä lämpökäsittelyitä tai BLG:n rakenteita. Standardisuoran olemassaolo olisi erinomaisen tehokas tapa osoittaa tarkasti, mitä muutoksia havaitaan ja mikä sen todennäköisesti aiheuttaa, sillä standardin vyöhykkeitä voitaisiin tutkia muillakin menetelmillä ja näin varmistaa niiden muodostaja. Lisäksi standardi voisi mahdollistaa verrattavien näytteiden vähentämisen koesarjassa ja näin lisätä kerralla tutkittavien tuntemattomien näytteiden määrää tulosten tarkastelun häiriintymättä.

Vetyperoksidin havaittiin aiheuttavan muutoksia proteiinien aggregoitumisessa (kuvat 7 ja 8), mikä on linjassa kirjallisuuden kanssa (Sutariya ja Patel 2017): Vetyperoksidia sisältävissä näytteissä syntyi lämpökäsittelyn aikana vähemmän suuria proteiinimuotoja ja enemmän yksinkertaisempia rakenteita. Vetyperoksidin vaikutus näkyi BLG- ja heraisolaatti näytteissä (kuvat 7 ja 8). Puhtaan BLG:n kohdalla ero ei ollut niin selvä kuin heraisolaatissa, jonka tapauksessa todettiin mahdollisia di- ja trimeerejä (kuvat 7 ja 8, näytteet 10 ja 10). Vetyperoksidin aiheuttamat muutokset kertovat suurien kompleksien todennäköisimmin muodostuneen BLG:n disulfididosten ja vapaan kysteiniin(Cys121) vaikutuksesta (Sutariya ja Patel 2017). Hapettimen vaikutuksesta uusia -S-S- rikkisiltoja ei pääse muodostumaan yhtä helposti, jolloin rakenteetkin jäävät pienemmiksi. Tämän ovat todistaneet kokeiltaan myös Sutariya ja Patel (2017).

Maito vaikuttaa varsin ongelmalliselta PAGE-tekniikan kanssa, mutta kymosiinilla juoksettaminen ja 0,45 µm suodattimella suodatus parantavat tulosten tarkkuutta ja luettavuutta (vrt. kuvat 11 vs. 12, kuva 13 näytteet 2 ja 4 vs. 3, kuva 17 näyte 2 vs. 3, sekä kuva 18 näyte 2 vs. 3). Juoksettaminen onnistui hyvin pastöroidulla ja raakamaidolla. Mikäli maitoa ei voi

juoksettaa, olisi hyvä yrittää sentrifugoida rasva erilleen ja suodattaa maito vähemmän rasvaisena, sillä suodatin tukkeutui herkästi käsittelemättömiä näytteitä suodatettaessa. BLG-vasta-aine vähensi kokeissa maidon muiden komponenttien aiheuttamia ongelmia tulosten tarkastelussa erinomaisen erottelukykynsä ansiosta (vrt. kuva 18 vs. 19). BLG-vasta-aine tarttui vain BLG-proteiiniin ja jo 2 µg näytemäärät olivat havaittavissa (kuvat 14 ja 17). Spesifisen BLG-vasta-aineen ansiosta mitään esikäsittelyä ei siis välttämättä tarvita tulosten saamiseksi (kuva 19). Ongelmallista pienien pitoisuuksien tarkastelussa tosin oli se, että paljon proteiineja sisältäneet näytteet tuottivat paljon valoa luoden vahvan kontrastin tummaa taustaa vasten ja vähemmän proteiinia sisältävät alueet tuottivat vähemmän valoa jääden hyvin himmeiksi. Eroista johtuen oli hankala havainnollistaa tuloksia yhdessä kuvassa, kun kirkkaat kohdat ylivalottuivat, kun kuvan valoisuutta lisäsi himmeämpien alueiden tarkastelua varten. Tutkimuksen aikana saatujen tulosten ja kokeiden perusteella 7 µl vaikuttaa sopivalta määrältä maitoa näytteeseen (kuvat 18 ja 19). Tällöin pienempienkin proteiinien pitoisuudet tuntuvat riittävän tarkasteluun ja suuren rakenteen omaavat proteiinit ovat edes jotenkin erotettavissa samaan aikaan.

PAGE-näytteet olisivat voineet hyötyä huokoisemmasta eli laimeammasta geelistä, jolloin niiden liikkuminen geelissä olisi ollut nopeampaa ja erottuminen kenties parempaa. Lisäksi suurempia proteiiniaggregaatteja olisi saattanut päästä näytekaivoista erottelemaan geeliin tarkasteltaviksi. Tämä olisi osaltaan voinut helpottaa lämpökäsittelyiden muutosten tarkastelua. Huokoisemmalla geelillä olisi kenties voinut lyhentää ajoaikoja, jolloin mm. sähkökentän aiheuttama puskurin lämpeneminen ja sen mahdollisesti aiheuttamat virheet olisivat olleet vähäisempiä (Westermeier ym. 2005; [Bio-Rad] 2016). Tosin Manderson ym. (1995) ajoivat kokeitaan 90 minuuttia ja saivat silti luettavia tuloksia. Heidän tutkimuksissaan ei tosin mainita, kuinka monta kertaa ajo oli suoritettava, jotta hyvä kuva saatiin. Kokeellisessa osassa sama koe tehtiin useampaan kertaa, jotta koe onnistuisi ja kuva olisi riittävän siisti julkaistavaksi. BLG- ja heraisolaattinäytteissä ongelmana tuntui olevan proteiinien huono liukeneminen fosfaattipuskureihin. Lisäksi pienien määrien punnitsemisessa jauheiden sähköisyys vaikeutti niiden mittaamista, mistä syystä tutkittavia proteiineja oli välistä vähemmän kuin odotettu tai niitä ei näkynyt geeleillä ollenkaan. Oletettavasti kontaminaation aiheuttama proteiinien proteolyysi johti liuosten vanhenemiseen aiheuttaen parin kokeen epäonnistumisen. Tämä puolestaan johtui suunnitelmien muutoksista ja aikataulujen venymisestä.

4 PÄÄTELMÄT

Työssä saavutettiin asetetut tavoitteet eli saatiin kehitettyä menetelmä, jolla voidaan tarkastella hyvin pieniä lehmänmaidonäytteitä ja erottaa niitä toisistaan lämpökäsittelyn aiheuttamien muutosten perusteella. Kehitetyllä menetelmällä on mahdollista näyttää toteen ainakin raaka-, pastöroitu-, ESL- ja UHT-maitojen lämpökäsittelyissä syntyviä muutoksia BLG:n rakenteissa ja niitä vertailemalla erottaa lämpökäsittelyt toisistaan. Erot havaitaan BLG:n natiivimuotojen vähenemisenä lämpökäsittelyn voimistuessa siten, että UHT-käsitellyssä maidossa niitä ei enää havaita. Toiseksi pieneköjen oligomeerien määrä kasvoi ESL-käsittelyn voimakkuuteen asti. Erottelugeelin yläosaan jäävien oligomeerien määrä vähenee radikaalisti UHT-käsittelyn voimakkuudessa. UHT-käsitellyssä suurin osa BLG:sta muodostaa niin suuria aggregaatteja, että ne jäävät näytekaivoon, eikä niitä pystytä erottelemaan käytetyllä geelillä.

Kokeiden perusteella menetelmä näyttäisi varsin häiriöherkältä ja liian hitaalta päivittäiseen lämpökäsittelyseurantaan. Native-PAGE menetelmällä saatujen tulosten riittävä tarkkuus suhteessa Immunoblot -menetelmällä saadun lisäinformaation vaatimaan lisäaikaan ja resurssihin saavat miettimään menetelmän hyödyllisyyttä lehmänmaidon lämpökäsittelyn todentamisessa. Lisäkuluihin ja vaatimuksiin suhteutettuna menetelmä ei liene merkityksellinen maidon lämpökäsittelyn todentamisessa päivittäisessä käytössä, kun yksittäisen näytteen koko ei ole rajattu ja muiden yksinkertaisempien menetelmien tuoma informaatio riittää.

Erikoistapauksissa, kuten tarkemmissa tutkimuksissa ja pitkäaikaisseurannassa, sovellusmahdollisuuksia voisi olla, sillä erinomainen erottelukyky mahdollistaa hyvin pienet näytekoot (μg eli 10^{-6} grammaa proteiinia), jolloin pienistä pakastetuista näytteistä voitaisiin suorittaa vaikkapa pienen meijerin kuukauden lämpökäsittelyhistoria vertailulaboratoriossa esim. vuositarkastuksen yhteydessä. BLG-spesifisen vasta-aineen tarttuminen denaturoituneisiin ja BLG:n muodostamiin komplekseihin sekä mahdollisuus nykyisiä menetelmiä tarkempaan rakenteiden tarkasteluun avanee lehmänmaidon tutkintaan uusia mahdollisuuksia. Poikkitieteellistä hyötyä tutkitusta menetelmästä tai sen kehittämisestä voisi olla esim. biologian ja lääketieteen aloilla tutkittaessa maitoallergiaa, jossa BLG:n on todettu aiheuttavan yliherkkyyttä (Gjesing ym. 1986; Virtanen ym 1999) tai tutkittaessa BLG:n esiintymistä ihmisen verenkierrössä. Jatkotutkimuksissa menetelmän toimintavarmuutta voitaisiin parantaa ja saattaa loppuun menetelmän kehitys ja testata joitain muitakin sovelluksia kuin neste-maidot, esim. BLG:n todentaminen ihmisen seerumista.

LÄHDELUETTELO

- Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. 1994. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem* 45:89-151.
- Bell K, McKenzie HA. 1964. b-Lactoglobulins. *Nature* 204:1275–1279. Bignardi C, Cavazza A, Corradini C. 2012. Determination of furosine in food products by capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 33(15):2382–2389.
- [Bio-Rad] Bio-Rad Laboratories, Inc. 2016. Bulletin 2895 Ver C [Sähköinen julkaisu]. *Protein Blotting Guide*. 85 s. Saatavilla: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf. Tulostettu 19.1.2017.
- Brew K, Castellino F, Vanaman T, Hill R. 1970. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry* 10:4570–4582.
- Chen Z, Yan X. 2009. Simultaneous determination of melamine and 5-hydroxymethylfurfural in milk by capillary electrophoresis with diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(19):8742–8747.
- Chen W L, Hwang M, Liau C, Ho J, Hong K ja Mao S. 2005. β -Lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra. *Journal of Dairy Science* 88:1618-1630.
- Creamer LK, Bienvenue A, Nilsson H, Paulsson M, Van Wanroij M, Lowe EK, Anema SG, Boland MJ, Jimäenez-flores R. 2004. Heat-induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins: 1. Bovine β -Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 52:7660-7668.
- Deeth, H. (2017). Optimum thermal processing for extended shelf-life (ESL) milk. *Foods* 6(11) 102.
- Deshpande SS. 2010. Principles and applications of luminescence spectroscopy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(3). 155-224. Saatavilla: <https://doi.org/10.1080/20014091091797>. Viite julkaisusta: Pásztor-Huszár. 2008. Protein changes of various types of milk as affected by high hydrostatic pressure processing. Budapest: Corvinus University of Budapest. 118.
- Eigel W, Butler J, Ernstrom C, Farrell H, Harwalkar V, Jenness R. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67:1599-1631.
- Feinberg M, Dupont D, Efstathiou T, Louâpre V, Guyonnet J-P. 2005. Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. *Food Chemistry* 98:188-194.
- Flower DR. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318(1):1-14.
- Flower DR, North ACT, Sansom CE. 2000. The lipocalin protein family—structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 1482:9-24.
- Garfin DE. 1990. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 182:425-441.
- Gjesing B, Østerballe O, Schwartz B, Wahn U, Lowenstein H. 1986. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy* 41: 51-56.
- Hambling SG, McAlpine AS, Sawyer L. 1992. B-Lactoglobulin. Teoksessa: Fox PF toim. *Advanced Dairy Chemistry – 1 Proteins*. London: Elsevier Applied Science. s 141-165.
- Hill JP, Boland MJ, Creamer LK, Anema SG, Otter DE, Paterson GR, Lowe R, Motion RL, Thresher WC. 1996. Effect of bovine b-lactoglobulin phenotype on the properties of b-lactoglobulin, milk composition and dairy products. Teoksessa: Parris N, Kato A, Creamer LK, Pearch J toim. *Macromolecular interactions in food technology*. Washington, DC: American Chemical Society. s 281-294.
- Ikeguchi M. 2014. Transient non-native helix formation during the folding of β -lactoglobulin. *Biomolecules* 2014(4):202-216.
- Janhøj T, Qvist KB. 2010. The formation of cheese curd. Teoksessa: Law BA ja Tamine AY toim. *Technology of Cheesemaking*. 2 p. West Sussex. Blackwell Publishing Ltd. s 130-165.
- Kindstedt PS. 2013. The basics of cheesemaking. *Microbiol Spectrum*1(1) 17. Saatavilla: CM-0002-2012.doi:10.1128/microbiolspec.CM-0002-2012
- Koistinen H, Koistinen R, Seppala M, Burova TV, Choiset Y, Haertle T. 1999. Glycodelin and beta-lactoglobulin, lipocalins with a high structural similarity, differ in ligand binding properties. *FEBS Lett.* 450(1-2):158-162.

- Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. 2004. Invited review: β -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science* 87:785-796.
- Kroeker EM, Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE. 1985. Effect of β -lactoglobulin variant and environmental factors on variation in the detailed composition of bovine milk serum proteins. *Journal of Dairy Science* 68(7):1637-1641.
- Kurien B, Scofield R. 2005. Western blotting. *Methods* 38(4):283-293. Viite julkaisusta: Pásztor-Huszár. 2008. Protein changes of various types of milk as affected by high hydrostatic pressure processing. Budapest: Corvinus University of Budapest. 118 s.
- Lin S, Sun J, Cao D, Cao D, Jiang W. 2010. Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. *Food Chemistry* 121:803-808.
- Madureira A, Pereira C, Gomes A, Pintado M, Malcata F. 2007. Bovine whey protein – Overview on their main biological properties. *Food Research International* 40 (10): 1197-1211.
- Manderson GA, Hardman MJ, Creamer LK. 1995. Thermal denaturation of bovine b-lactoglobulin A, B and C. *Journal of Dairy Science* 78(1):132.
- Manderson GA, Hardman MJ, Creamer LK. 1998. Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of beta-lactoglobulin A, B, and C. *J Agric Food Chem* 46:5052–5061.
- Manzi P, Pizzoferrato L. 2013. HPLC determination of lactulose in heat treated milk. *Food and Bioprocess Technology* 6(3):851–857.
- Marconi E, Messia MC, Amine A, Moscone D, Vernazza F, Stocchi F, Palleschi G. 2004. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. *Food Chemistry* 84(3):447–450.
- McKenzie HA. 1971. b-lactoglobulins. Teoksessa: McKenzie HA toim. *Milk proteins: Chemistry and molecular biology*. 2 p. New York: Academic Press. s 257–330.
- Mc Swiney M, Singh H, Campanella OH. 1994. Thermal aggregation and gelation of bovine β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*. 8(5): 441-453.
- Merril C, Washart K. 1998. Protein detection methods. Teoksessa: Hames BD toim. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 3. p. New York: Oxford University Press. s 53-92.
- Milk Works. ESL-kuumennus. Saatavilla: <http://www.milkworks.fi/oppimateriaali/kasittely-meijerissa/esl-kuumennus/Sivut/default.aspx>. Tulostettu 10.6.2016.
- Montilla A, Gómez-Ruiz JÁ, Olano A, Castillo MDD. 2007. A GC-FID method for analysis of lysinoalanine. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(4):415–422.
- Morales F-J, Romero C, Jiménez-Pérez S. 2000. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *International Journal of Food Science & Technology* 35(2):193–200.
- Moscone D, Bernardo RA, Marconi E, Amine A, Palleschi G. 1999. Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors. *Analyst* 124(3):325–329.
- Mäentausta O, Viitanen M, Valkonen KH, Alatosava T. 2002. Immunochemical characterization and measurements of bovine betalactoglobulin. Teoksessa: Alatosava T toim. *Immunological and Biochemical Tools for Analysis of Dairy Starters, Processes and Products*: 51-64.
- Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG. 1987. Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *Journal of Dairy Science* 70(3):563-570.
- Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker EN, Jameson GB. 1999. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine [beta]-lactoglobulin. *Protein Science* 8:75-83.
- Ritola M, Di Costanzo MG, Mattera M, ja Manzi P. 2017. New trends for the evaluation of heat treatments of milk [Sähköinen julkaisu]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2017. 12 s. Saatavilla: <https://doi.org/10.1155/2017/1864832>. Tulostettu 12.3.2018.
- Rysstad G, Kolstad J. 2006. Extended shelf life milk – advances in technology. *International Journal of Dairy Technology* 59 (2): 85-96.
- Sakurai K, Goto Y. 2002. Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine beta-lactoglobulin by amino acid substitution. *J Biol Chem* 277(28):25735-40.

- Saliha SAZ, Dalila A, Chahra S, Saliha BH, Abderrahmane M. 2013. Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25(4): 283-290.
- Santos M, Lies M. 2013. Analysis of casein and whey protein in whole, 2%, and skim milk by capillary gel electrophoresis. Beckman Coulter Life Sciences B2013-14117: IB-18070A.
- Savilahti E, Kuitunen M 1992. Allergenicity of cow milk proteins. *J Pediatr* 121:12-20.
- Sawyer L, Brownlow S, Polikarpov I & Wu S-Y. 1998. Beta-lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *Int Dairy J* 8(2):65-72.
- Schuster-Wolff-Bühning R, Michel R, Hinrichs J. 2011. A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk. *Dairy Science & Technology* 91(1):27-37.
- Scott R. 1986. *Cheesemaking practice*. 2. p. Essex: Elsevier applied science publishers LTD. 539 s.
- Shi Q, Jackowski G. 1998. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Teoksessa: Hames BD toim. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 3. p. New York: Oxford University Press. s 1-52.
- Sutariya S, Patel H. (2017). Effect of hydrogen peroxide on improving the heat stability of whey protein isolate solutions. *Food Chemistry* 223:114-120.
- Tomasula PM, Mukhopadhyay S, Datta N, Porto-Fett A, Call JE, Luchansky JB, Renye J, Tunick M. 2011. Pilot-scale cross-flow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk. *Journal of Dairy Science* 94(9): 4277-4291.
- Valio Oy. Maidon käsittely. Saatavilla: <http://www.valio.fi/tuotteet/artikkeli/maidon-kasittely-1/>. Tulostettu 10.6.2016.
- Varnam A, Sutherland JP. 1994. *Milk and Milk Products*. Lontoo SE1: Chapman & Hall. 452 s.
- Virtanen T, Zeiler T, Rautiainen J, Mantyjarvi R. 1999. Allergy to lipocalins: a consequence of misguided T-cell recognition of self and nonself? *Immunol Today* 20(9):398-400.
- Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. 2006. *Dairy Science and Technology*. 2. p. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis. 808 s.
- Westermeier R, Gronau S, Becket P, Büllles J, Schickle H, Theßeling G. 2005. *Electrophoresis in Practice*. 4. p. Weinheim: Wiley-VCH. 406 s.

Liite 1. Töissä käytettyjen työvälineiden luettelo.

Työväline	Kauppanimi, tarkempi nimitys	Lisätietoja	Valmistaja
Ajokammio	Mini-Protean® Tetra Cell	Geelielektroforeesia varten	Bio-Rad laboratories Inc.
Analyysivaaka	Precisa 180 A	Kalibroidaan jokaisena käyttöpäivänä	Precisa
Autoklaavi	Instrulab 46 E		Oy Santasalo- Sohlberg Bio-Rad laboratories Inc.
Blottaus- paperi	Thick electroblotting paper		DURAN Group / SciLabware / VWR
Dekanteri- laseja	Beaker flask (DURAN® Schott / Pyrex® / VWR Borosilicate 3.3)	Eri tilavuuksisia, eri valmistajia	Sigma-Aldrich®
Eppendorf- putkia	Eppendorf® Safe-lock microcentrifuge tubes, 1,5 ml	Läpinäkyvä kirkas, valoherkille aineille läpinäkymätön ruskea	DURAN Group / SciLabware / VWR
Erlenmeyer- pulloja	Erlenmeyer flask (DURAN® Schott / Pyrex® / VWR Borosilicate 3.3)	Eri tilavuuksisia, eri valmistajia	Protein Simple
Geelien kuvauslaite	Alpha Imager® HP gel documentation		Bio-Rad laboratories Inc
Geelien valulaitteisto	Mini-Protean® Tetra Handcast System	Sis. kaikki tarvittavat välineet 1,0 mm paksujen geelien valuun	GE Healthcare Li-COR Biosciences
Imupaperia	Whatman blotting paper		Bibby Scientific
Infrapunaskan neri	Odyssey®		Bio-Rad laboratories Inc.
Kuiva lämpöhaude	Stuart® Block Heater SBH 130D	”Lämpöblokki” Eppendorf- putkille	BRAND / SciLabware
PVDF-kalvo	Low-fluorescent PVDF (LV) membrane	Kalvo vasta-aine värjäykseen	BRAND / DURAN Group / SciLabware
Mittalaseja	BRAND® Graduated cylinders, Pyrex® Volumetric cylinders	Eri tilavuuksisia, eri valmistajia	Kimtech science
Mittapulloja	Volumetric flask (BRAND® / DURAN® Schott / Pyrex®	Eri tilavuuksisia, eri valmistajia	Nippon Genetics Europe
Nukkaamaton paperipyyhe	Delicate task tissue		Sartorius
Pieni sentrifugi	Mini centrifuge NG002G		Sartorius
Pipetin kärkiä Pipettejä	Bio-Hit pipetinkärkiä Bio-Hit pipettejä	Autoklaavissa steriloituja Säädettäviä pipettejä eri tilavuuksille	Bibby Scientific Greiner Bio-One International
Sekoittaja Sentrifugointi putkia	Stuart® Vortex mixer SA8 Greiner centrifuge tubes, 50 ml, conical		Sempermed® / Ansell
Spaatteleita	Semperguard® vinyl powder- free / NeoTouch® premium disposable neoprene gloves	Metallia NeoTouch käsineitä käytettiin suojaamaan käsiä akryyliamidilta	VWR / DURAN group IKA®
Säilöpullo	GL 45 (VWR Borosilicate 3.3 / DURAN® Schott)	Eri tilavuuksisia, eri valmistajia	Bio-Rad laboratories Inc.
Tasosekoittaja Tela	Yellowline OS 10 control Blot roller	Geelien ja membraanien tasoittamiseen	Bio-Rad laboratories Inc.
Valmisgeeli	Mini-PROTEAN®TGX™ 12 %	cat. # 456-1043	Bio-Rad laboratories Bio-Rad laboratories Inc.
Western Blotting - laitteisto	Trans-Blot® Turbo™ Blotting System		Bio-Rad laboratories Inc.
Voimalähde	Powerpac™ Basic	Geelielektroforeesilaitteistolle	Bio-Rad laboratories Inc.

Liite 2. Kokeissa käytettyjen aineiden ja reagenssien luettelo.

Aine, reagenssi	Kauppanimi, tarkempi nimitys	Lisätietoja	Valmistaja
1 M Tris-HCl pH 6,8	PlusOne Tris	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ , Tris(hydroxymethyl)-aminonethane	GE Healthcare
10 % APS	PlusOne APS (ammonium persulfate)	Ammoniumpersulfaatti (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Amersham Biosciences
10 % SDS	PlusOne SDS (sodium dodecyl sulphate)	Natriumlautyyliisulfaatti, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	GE Healthcare
3 M Tris-HCl pH 8,8	PlusOne Tris	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ , Tris(hydroxymethyl)-aminonethane, Tris 17-1321-01	GE Healthcare
30 % Akryyliamidi liuos	Acrylamide / bis-Acrylamide 30 % solution	100 ml, 0,2 µm filtered	Sigma®
Alkoholi	ETAX A	Denaturoitua etanolia, 500 ml, min. 94,0 paino -% / 96,1 til -%	Altia OYJ
Alkoholi 80 % BLG	ETA 80 β-Lactoglobulin, From Bovine Milk, Approx. 90 % (PAGE)	500 ml β -laktoglobuliineja A- ja B- muotoja	Altia OYJ Sigma®
BLG-vasta-aine	Polyclonal antibodies for BLG	Jäniksissä kasvatettua β- laktoglobuliinin vasta-ainetta	Mäentausta ym. (2002)
Blocking- puskuri	Odyssey® Blocking Buffer (PBS)		Li-COR Biosciences
BSA	Albumin, from bovine serum	Naudan seerumi albumiini	Sigma-Aldrich®
Coomassie blue	Bio-Safe™ Coomassie	G-250 stain, Coomassie blue - värjäysliuos	Bio-Rad laboratories Inc. Borer Chemie Merck
deconex	deconex® 11 UNIVERSAL		
Di-natriumvety- fosfaatti	Di- Natriumhydrogenphosphat-2- hydrat	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, 1 Kg, art.6580	Merck
Etikkahappo	Acetic acid 99-100 % GRP RECTAPUR	CH ₃ COOH, BDH PROLABO®	VWR chemicals
Heraiolaatti Infrapunaväri	Isolate Whey 90 Instant IRDye® 800CW Goat anti- Rabbit IgG (H+L)	0,5 mg	Armor Proteinés Li-COR Biosciences
Kymosiini	ALBAMAX	Biologinen kymosiini juoksete C ₂ H ₆ OS, Thioethylglycol 2- Hydroxyethylmercaptan	Clerici-Sacco Sigma-Aldrich®
Merkaptoetanol	2-Mercaptoethanol	CH ₃ OH, BDH PROLABO®	VWR chemicals
Metanoli	Methanol AnalaR NORMAPUR		
Milli-Q -vesi	Milli-Q® water	Valmistettu Milli-Q® Millipore Academic -laitteella	Merck Millipore
Mono natriumfosfaatti	Sodium phosphate monobasic	NaH ₂ PO ₄ , S8282-500 g, p.code 41209063	Sigma-Aldrich®
Natiivi- ajopuskuri	Bio-Rad 10x TG	1x vahvuinen sisälsi 25 mM Tris, 192 mM glycine; liuoksen pH 8,3	Bio-Rad laboratories Inc.
PBS	Phosphate buffered saline	100 tablets, Dulbecco A [IVD], pH 7,3	Oxoid
Bromofenyyl sininen	Bromophenol Blue (BPB)	3',3'',5',5''- Tetrabromophenolsulfonephthalein	Sigma-Aldrich®
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl- ethlenediamine	TMEDA, 1,2 - bis(di- methylamino)ethane	Sigma®
Towbin	25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20 % Metanoli, 8,3 pH	Valmistettiin itse	
Tween20	Tween® 20		Merck
Väripoistoliuos	30 % etanolia, 5 % etikkahappoa	Valmistettiin itse	