

ISSN 0355-1180

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

EKT-sarja 1938

**KOIVUN GLUKURONOKSYLAANILLA STABILOIDUN
EMULSION RAJAPINNAN KARAKTERISOINTI**

Venla Juntti

Helsinki 2020



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen		Laitos/Institution– Department Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto	
Tekijä/Författare – Author Venla Juntti			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Koivun glukuronoksyylaanilla stabiloidun emulsion rajapinnan karakterisointi			
Oppiaine /Läroämne – Subject Elintarviketieteet			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year Maaliskuu 2020	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 80	
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Puuteollisuus hyödyntää puusta korkean arvon lopputuotteina lähinnä selluloosaa. Ligniinin ja hemiselluloosien käyttökohteita vasta kehitetään. Niiden eristäminen onnistuu ympäristöystävällisesti kuumavesiuutolla ilman liuottimia, jolloin hemiselluloosaan jää sitoutuneeksi myös ligniiniä. Koivun hemiselluloosista tärkein on glukuronoksyylaani (GX). Sen mahdollisia jalostustuotteita voisi olla mm. emulgointiaineena toimiminen, jota voitaisiin käyttää elintarvie-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa tuotteiden hyllyiän pidentämiseksi.</p> <p>Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia GX:lla stabiloidun öljy vedessä -emulsion pysyvyyttä ja analysoida emulsion pisaroiden rajapintaa. Pysyvyyttä arvioitiin määrittämällä pisarakokojakauma ja peroksidiluku kolmen kuukauden aikana. Alkuperäisestä materiaalista, emulsion jatkuvasta faasista ja rajapinnoilta määritettiin monosakkaridijakauma GC-FID-laitteistolla ja fenoliset yhdisteet UHPLC-UV/FID-aitteistolla. Fenolisista yhdisteistä tunnistettiin tärkeimmät massaspektrometrisesti. Tämän lisäksi yritettiin fraktioida anioninvaihtokromatografisesti galakturonihappoa (GalA) sisältävät fraktiot.</p> <p>GX:n stabiloima emulsio oli pysyvä sekä kemiallisesti että fysikaalisesti. Kolmen kuukauden aikana sen peroksidiluku ei kasvanut merkittävästi, mutta pisarakoko kasvoi. Faasit eivät kuitenkaan erottuneet toisistansa. GX:n tärkeimmiksi fenolisiksi yhdisteiksi tunnistettiin vanilliini ja syringaldehydi. Molempia löytyi jatkuvasta faasista ja rajapinnoilta. Suurin osa GX:n fenolisista yhdisteistä oli sitoutunut polysakkaridiketjuun esterisidoksilla ja glykosidisidoksilla.</p> <p>GX sopisi hyvin elintarvikkeiden stabilointiaineeksi, koska se ehkäisee hapettumista ja emulsiorakenteen hajoamista. GX:n pisaroiden rajapinnalla on sekä esterisidoksia että glykosidisidoksia. Esterisidokset mahdollistavat tiiviin rakenteen ja polysakkaridiketjujen pelkistävässä päässä olevat glykosidisidokset paksun, mutta harvan rakenteen. Myös GalA:n suuri määrä rajapinnalla viittaa siihen, että pektiini saattaa osallistua stabilointiin.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Hemiselluloosa, glukuronoksyylaani, emulsio, rajapinta, emulgointiaine			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information ETK-sarja 1938			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution– Department Department of Food and Nutrition	
Tekijä/Författare – Author Venla Juntti			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Characterization of emulsion interface stabilized by birch glucuronoxylan			
Oppiaine /Läroämne – Subject Food science			
Työn laji/Arbetets art – Level M.Sc. Thesis	Aika/Datum – Month and year March 2020	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 80	
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>New extraction methods are developed to valorize wood hemicelluloses and lignin. Main hemicellulose type for birch is glucuronoxylan (GX). It could be used as emulsifier in food, pharmaceutical and cosmetic industry. When extracted by pressurized hot water extraction, some lignin is also present in the hemicellulose-rich fraction. The aim of the study was to find out could GX work as emulsifier and how its monosaccharide and phenolic compounds are distributed in emulsion.</p> <p>GX's monosaccharide composition was determined by GC-FID and phenolic compounds by UHPLC-FL/UV. The main phenolic compounds were recognized by mass spectrometer. Galactouronic acid (GalA) -rich fractions were extracted by anion-exchange-chromatography. The emulsion stability was followed for three months by measuring its peroxide value (PV) and droplet size distribution. Emulsions were fractioned by centrifugation to continuous phase (CP) and cream (CR). The fractions' monosaccharide composition and phenolic compounds were determined.</p> <p>Emulsions were stable against physical and chemical degradation. GX emulsion's PV did not significantly increase during the study. The droplet size increased, but the emulsion did not separate into different phases. GX's most important phenolic compounds were vanillin and syringaldehyde. GalA was found mostly in the cream phase. Relative phenolic compound content was higher in CR than CP. The phenolic compounds were mostly bonded to hemicelluloses by ester bonds and less by glycosidic bonds.</p> <p>GX produced a stable emulsion and can be used as emulsifier. In the droplet interface, both glycoside bonds and ester bonds were abundant. Ester bonds may facilitate the even packing of GX parallel to the interface. Glycosidic bonds form a thick and porous layer, because those can be formed only in the reducing ends of the polysaccharide. The ester bonds are probably formed between methylglucuronic acids (meGlcA) and lignin. The stabilization mechanism may include pectin.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Hemicelluloose, Glucuronoxylan, Emulsion, Interface, Emulsifier			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited The Digital Repository of University of Helsinki, Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT-series 1938			

ESIPUHE

Tutkielma tehtiin Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolle Food Materials Science -ryhmään. Ryhmä karakterisoi teollisuuden sivuvirroissa syntyviä polysakkarideja ja pyrkii kehittämään niille uusia käyttökohteita. Työn ohjaajina toimivat apulaisprofessori Kirsi Mikkonen ja tohtori Maarit Lahtinen. Työn vastuuproffessorina toimi Vieno Piironen.

Kiitos hyvästä ohjauksesta ja mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta Maaritille sekä Kirsille. Kannustavan ilmapiirin ansiosta sain kirjoitettua tutkielman valmiiksi ja haastamisen ansiosta sain tekstiini myös paljon sisältöä. Kiitos myös LUKE:lle saamistani GX-näytteistä. Kiitos myös kaikille laboratoriossa avustaneille, jotka perehdyttivät minut laitteiden saloihin ja auttoivat aina tarvittaessa.

Työtä on ollut paljon ja kiitos kaikille ystävilleni ja perheelleni, jotka ovat auttaneet minua jaksamaan ja kestäneet kaikki tuskailuni. Varsinkin Jenni ja Elina, kiitos teille lounaista ja vertaistuesta. Tarvitsin näitä kanavia purkautua, kiitos että kestitte siellä toisessa päässä kaiken. Kiitos myös Julille tuesta ja ruokatauoista huolehtimisista.

Helsingissä 2020,

Venla Juntti

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	2
ABSTRACT	3
ESIPUHE	4
1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	9
2.1 Puun soluseinän rakenne	9
2.1.1 Selluloosa	9
2.1.2 Hemiselluloosat	9
2.1.3 Ligniini	10
2.1.4 Puun soluseinän muut yhdisteet	10
2.2 Koivun glukuronoksyylaani	11
2.2.1 Glukuronoksyylaanin eristäminen	11
2.2.2 Glukuronoksyylaanin rakenne	14
2.2.3 Fenoliset yhdisteet	15
2.2.4 Glukuronoksyylaanin analysointi	17
2.2.5 Glukuronoksyylaanin elintarvikesovellukset	21
2.3 Emulsiot	22
2.3.1 Emulsioiden valmistus	22
2.3.2 Emulsion pysyvyys	22
2.3.3 Emulsion pysyvyyden mittaaminen	26
2.3.4 Elintarvike emulgointi- ja stabilointiaineet	28
3 KOKEELLINEN TUTKIMUS	35
3.1 Tutkimuksen tavoite	35
3.2 Materiaalit ja menetelmät	35
3.2.1 Näytteet	35
3.2.2 Käytetyt lasitarvikkeet	36
3.2.3 Emulsioiden valmistaminen	36
3.2.4 Rajapinnan erottaminen jatkuvasta faasista	36
3.2.5 Monosakkaridimääritys	39
3.2.6 Fenolisten yhdisteiden määrittäminen	41
3.2.7 Varastointikoe	45

3.2.8 Galakturonihappo rikkaiden fraktioiden eristäminen	47
3.2.9 Analyysien oikeellisuuden tarkkailu	49
3.3 Tulokset	50
3.3.1 Fenolisten yhdisteiden menetelmä	50
3.3.2 Glukuronoksytaanin karakterisointi	53
3.3.3 Emulsion pysyvyys sekä koostumus	57
3.4 Pohdinta	61
3.4.1 Emulsion pysyvyys ja sen mekanismit	61
3.4.2 Galakturonihapon merkitys emulsion pysyvyydelle	66
3.4.3 Kromatografisten analyysien oikeellisuuden arviointi	67
4 PÄÄTELMÄT	68
LÄHDELUETTELO	70
LIITTEET	75
Liite 1 Monosakkaridianalyysin kromatogrammit	75
Liite 2 Massaspektrometrian massaspektrit	76
Liite 3 Fenolisten yhdisteiden kromatogrammit	78
Liite 4 Käytetyt kaavat	79
Liite 5 Orsinolivärjäykset	80

1 JOHDANTO

Useissa teollisuuden prosesseissa hyödynnetään vain osa käytössä olevasta materiaalista. Kiertotalouden mukaisesti yhä useampia prosesseja pyritään optimoimaan niin, että koko materiaali hyödynnettäisiin. Tämä parantaisi sivuvirtojen rahallista arvoa ja vähentäisi syntyvää jätettä.

Suomessa yleisesti paperin raaka-aineena käytettävän koivun soluseinä koostuu pääasiassa selluloosasta, hemiselluloosista ja ligniinistä (Sjöström 1993). Selluloosa on lineaarinen homopolysakkaridi, joka muodostuu glukoosiyksiköistä. Hemiselluloosat ovat taas joko lineaarisia tai haaroittuneita heteropolysakkarideja, jotka koostuvat useista eri monosakkariideista. Ligniini on polyfenolinen yhdiste, joka koostuu toisiinsa sitoutuneista fenyylipropaneista.

Puun tärkeä jalostustuote on paperi, jonka valmistukseen tarvitaan puusta vain selluloosaa (Sjöström 1993). Tällöin hemiselluloosat ja ligniini jäävät hyödyntämättä. Samoin sahojen tuottama sahanpuru jää hyödyntämättä materiaalina ja se lähinnä poltetaan energiaksi. Selluloosan tuotannossa puulle voidaan tehdä esiuuttoja, jolloin sellusta erotetaan ligniini ja hemiselluloosat (Naidu ym. 2018). Eristysmenetelmiä on useita, mutta ympäristöystävällinen ja tehokas tapa on kuumavesiuutto, joka tarvitsee vain paineistuksen ja kuumaa vettä (Kilpeläinen ym. 2014a). Tähän massaan jää hemiselluloosien lisäksi osa ligniinistä, joka voidaan poistaa massasta mm. etanolisaostuksen avulla (Naidu ym. 2018).

Koivussa tärkein hemiselluloosatyyppi on glukuronoksyylaani (GX). GX muodostuu pääasiassa ksyloosiketjusta. Osa ksyloosien hydroksiryhmistä on asetyloitunut ja ksyloosiketjusta haarautuu α -(1 \rightarrow 2)-sidoksilla 4-O-metyyli-D-glukoronihappoa (Jacobs ym. 2001). GX:n tarkkaa rakennetta on vaikea määrittää sen heterogeenisyyden vuoksi. Ei myöskään tarkasti tiedetä, miten se on sitoutunut ligniiniin ja ovatko nämä kovalenttiset sidokset olemassa jo soluseinässä vai muodostuvatko ne vasta eristyksen aikana (Giummarella ym. 2019).

Koivun GX:lle on kehitetty jo useita sovelluksia, minkä takia sen eristäminen lignosellumassasta on järkevämpää kuin polttaminen vain energiaksi (Mikkonen ja Tenkanen 2012; Naidu ym. 2018). Siitä voidaan jatkojalostaa mm. ksylitolia, furfuraalia ja maitohappoa (Naidu ym. 2018). On myös tutkittu sen käyttömahdollisuuksia biohajoavien kalvojen valmistuksessa tai hydrokolloideina (Mikkonen ym. 2009; Alekhina ym. 2014; Ren ym. 2015;

Naidu ym. 2018). Sen on todettu myös stabiloivan tehokkaasti emulsioita, joten sille voisi löytyä käyttöä elintarvike-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudesta (Mikkonen ym. 2016a; Lahtinen ym. 2019). Tällä hetkellä elintarviketeollisuudessa yksi käytetyimmistä emulsion stabilointiaineista on arabikumi. Sitä eristetään akasiapuista, jotka kasvavat pääasiassa Afrikassa. Yksi arabikumin tärkeimmistä tuotantomaista on Sudan (Koli ym. 2013). Se on siis tuontituote ja saattaa mahdollisesti kärsiä tulevina vuosina myös ilmastomuutoksen lisäämästä kuivuudesta. Myös alueen poliittinen epävarmuus voi vaikeuttaa tuotantoa. Koivun GX olisi siis ympäristöystävällinen ja kotimainen vaihtoehto.

Kuumavesiuutolla eristetty GX sisältää myös ligniiniä (Lahtinen ym. 2019). Tällöin GX:lla stabiloidusta emulsiosta voidaan analysoida sekä sen monosakkaridijakaumaa että fenolisia yhdisteitä. Hajottamalla emulsio jatkuvaksi faasiksi ja kermaksi voidaan määrittää molempien jakeiden koostumusta erikseen. GX-näytteiden monosakkaridijakauman määrittämiseen paras menetelmä on happaman metanolyysin ja kaasukromatografian yhdistelmä (Willför ym. 2009). Ligniiniä sisältäviä fenolisia yhdisteitä voidaan puolestaan määrittää nestekromatografisesti (Lahtinen ym. 2019).

Elintarvike-emulsioiden yksi säilyvyyttä rajoittava tekijä on emulsion pysyvyys. Pysyvämpi emulsio mahdollistaa pidemmän hyllyiän. Emulsion pysyvyyttä voidaan arvioida sekä fysikaalisena pysyvyytenä että kemiallisena pysyvyytenä. Fysikaalisessa pysyvyydessä seurataan lähinnä emulsion pisarakokojakauman muutoksia ja kemiallisessa emulsion öljypisaroiden hapettumista.

Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia GX:n käyttöä stabilointiaineena. Tarkoitus oli samalla selvittää GX:lla stabiloidun emulsion rajapinnan rakennetta tutkimalla sieltä löytyviä monosakkarideja sekä fenolisia yhdisteitä ja yrittää saada viitteitä siitä, ovatko ne kovalenttisesti sitoutuneina toisiinsa.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Puun soluseinän rakenne

Puun soluseinien rakenne muodostuu pääasiassa selluloosasta (30–50 %), hemiselluloosasta (15–30 %) ja ligniinistä (10–25 %) (Sjöström 1993; Naidu ym. 2018). Komponenttien osuudet vaihtelevat hiukan puulajin ja puun iän mukaan (Fengel ja Wegener 1989; Sjöström 1993). Näiden lisäksi löytyy pieniä määriä mm. pektiiniä sekä vahoja ja epäorgaanisia suoloja.

2.1.1 Selluloosa

Selluloosa toimii puiden solujen runkona. Selluloosa on homopolysakkaridi, joka koostuu β -(1→4)-sidoksilla lineaarisesti sitoutuneista D-glukoosiyksiköistä (Fengel ja Wegener 1989; Sjöström 1993). Selluloosassa vetysidokset muodostavat ristisidoksia, minkä takia selluloosasta löytyy sekä amorfisia että kiteisiä alueita. Tämän takia selluloosa muodostaa mikrokuituja, jotka muodostavat lopulta selluloosakuituja, joita voidaan käyttää mm. paperin valmistukseen (Sjöström 1993).

2.1.2 Hemiselluloosat

Hemiselluloosien antavat tukea soluseinälle (Sjöström 1993). Hemiselluloosat ovat heteropolymeereja, jotka koostuvat eri monosakkarideista (Fengel ja Wegener 1989; Sjöström 1993). Ne ovat herkkiä happohydrolyysille, joka pilkkoo ne oligo- ja monosakkarideiksi. Hemiselluloosat muodostavat lyhyempiä ketjuja kuin selluloosa, eivät kiteydy ja ovat usein haaroittuneita (Fengel ja Wegener 1989). Puulajeissa on usein yksi vallitseva hemiselluloosatyyppi ja pienempiä määriä muita hemiselluloosia. Vallitsevia hemiselluloosia havupuissa ovat mm. galaktoglukomannaani, arabinoglukuronoksyylaani ja arabinogalaktaani (Sjöström 1993). Lehtipuissa sen sijaan tärkeimmät hemiselluloosatyyppit ovat glukuronoksyylaani ja glukomannaani.

2.1.3 Ligniini

Ligniinin tehtävänä on sitoa soluseinän osat toisiinsa ja sitä löytyy tämän takia soluseinien välistä ja sekundaarisesta seinästä (Sjöström 1993). Ligniini parantaa puun mekaanista kestävyyttä, minkä ansiosta puiden on mahdollista kasvaa erittäin korkeiksi (Fengel ja Wegener 1989). Sen hydrofobisuus suojelee myös soluseinän rakenteita ulkopuolelta tulevalta vedeltä (Lu ym. 2017; Naidu ym. 2018). Ligniini on polyfenolinen polymeeri, joka koostuu fenyylipropaaniyksiköistä (Sjöström 1993; Lu ym. 2017). Ne ovat sitoutuneet toisiinsa joko eetterisidoksilla tai C-C-sidoksilla. Näistä β -O-4-rakenteet ovat kaikkein yleisimpiä, jopa 60 % kaikista lehtipuiden ligniinin fenyylipropaaniyksiköistä on sitoutunut näin toisiinsa. Syringyyliryhmät ovat näille tyypillisiä ja ne ovat yleensä eetteröityneitä. Funktionaalisia ryhmiä ligniinissä ovat mm. metoksyyliryhmät, fenoliset hydroksyyliiryhmät ja karbonyyliryhmät.

Ligniini ei hajoa herkästi entsyymaattisesti tai kemiallisesti, minkä ansiosta se suojelee tehokkaasti puun soluseinää mikrobiologisilta hyökkäyksiltä (Sjöström 1993; Naidu ym. 2018). Ligniinin määrä ja koostumus vaihtelevat huomattavasti eri soluseinän kerroksissa. Soluseinän rakenne voi olla melko heterogeeninen, mikä näkyy eri puusolujen rakenteissa.

2.1.4 Puun soluseinän muut yhdisteet

Näiden kolmen pääkomponentin, selluloosan, hemiselluloosien sekä ligniinin, lisäksi puista löytyy pieniä määriä muitakin yhdisteitä. Pektiini ja tärkkelys ovat polysakkarideja, joita löytyy puusta. Pektiini muodostuu pääasiassa galakturonihaposta, galaktoosista, arabiinoo-sista ja ramnoosista (Fengel ja Wegener 1989). Sitä ei luokitella hemiselluloosaksi, mutta sitä voi olla vaikeata erottaa hemiselluloosista (Sjöström 1993).

Pihka muodostuu terpenoideista ja steroideista, jotka ovat isopreeniüksiköistä muodostuvia polymeerejä (Fengel ja Wegener 1989; Sjöström 1993). Ne muodostavat rengasrakenteita, joihin voi olla liittyneenä funktionaalisia ryhmiä, jolloin ne voivat muodostaa mm. hartsi-happoja. Näiden lisäksi puusta löytyy erilaisia rasvoja ja vahoja, joista osa löytyy pihkasta ja osa esiintyy vapaina rasvahappoina (Fengel ja Wegener 1989).

Puusta löytyy lignaanin lisäksi myös muita fenolisia yhdisteitä, kuten stilbeenejä, lignaaneja, tanniineja ja flavoinoideja (Sjöström 1993). Ne osallistuvat puun värin muodostumiseen ja suojaavat puuta mikrobiologisilta hyökkäyksiltä.

Puussa on myös epäorgaanisia yhdisteitä, jotka ovat lähinnä metallisuoloja. Yleisimpiä metalleja ovat kalsium, kalium ja magnesium. Ne ovat usein sitoutuneena ksyalaaniin tai pektiiniin (Sjöström 1993).

2.2 Koivun glukuronoksyalaani

2.2.1 Glukuronoksyalaanin eristäminen

Jotta GX:a voidaan käyttää, täytyy se eristää ensin puusta. Lähtömateriaalina voidaan käyttää paperimassaa, josta ligniinin poiston yhteydessä liukenee myös paljon hemiselluloosia (Sjöström 1993). Hemiselluloosia voidaan eristää myös puuteollisuuden sivuvirroista, kuten sahanpuruista (Kilpeläinen ym. 2012; Martínez-Abad ym. 2018). Jos lopputuotteesta halutaan kehittää myös elintarvikekäyttöön kelpaava, on tärkeää, ettei puhdistusprosessissa tuoteseen muodostu tai prosessista liukene ihmiselle haitallisia yhdisteitä, kuten orgaanisia liuottimia.

Hemiselluloosia voidaan eristää useilla eri menetelmillä useista eri lähtömateriaaleista. Huomioon tulee ottaa sekä lähtömateriaali että eristettävän hemiselluloosan käyttötarkoitus. Kun lähtömateriaalina on paperimassa, on tärkeää tuottaa mahdollisimman puhtaita hemiselluloosia ilman paperimassan laadun heikkenemistä (Borrega ym. 2017). Naidu ym. (2018) ovat koonneet kokoama-artikkelissaan erilaisia ksyalaanin eristysmenetelmiä, kuten emäs-, liuotin- ja paineistettu kuumavesiuutto.

Emäksisessä ksyalaanien eristyksessä käytetään mm. natrium- ja kaliumhydroksia katkaistamaan ksyalaanin ja ligniinin välisiä esterisidoksia, jotta eristäminen massasta onnistuisi (Janzon ym. 2008). Menetelmä ei vaadi korkeita lämpötiloja tai painetta, mutta se saattaa muuttaa ksyalaanin rakennetta asetyyliryhmien hydrolysoitumisella ja muodostamalla suoloja massaan (Peng ym. 2012). Tämä huonontaa ksyalaanin liukoisuutta veteen (Naidu ym. 2018). Kun halutaan pilkkoa GX:a, voidaan käyttää myös happouuttoa (Mosier ym. 2005). Laimea rikkihappo hydrolysoi seosta vapauttaen ksyloosia. Prosessissa muodostuu furfuraalia, joka voidaan kerätä talteen (Mosier ym. 2005).

Liutinuutosta puhutaan, kun GX:n eristykseen käytetään orgaanisia liuottimia. Niitä voidaan yhdistellä myös muihin uuttomenetelmiin. Yleisiä käytettyjä liuottimia ovat alkoholit, kuten etanoli, metanoli, glyseroli, ja orgaaniset hapot (Naidu ym. 2018). Liutinuuton hyviä puolia ovat sen korkeat saantoprosentit ja mahdollisuus kierrättää käytettyjä liuottimia. Huonoina puolina ovat liuottimien kalleus ja niiden käsittelyyn liittyvät vaarat, kuten tulenarkuus. Liutinuuttoa voidaan vielä tehostaa ultraäänellä. Tämä perustuu kavitaatioon, jossa ultraääni aiheuttaa ilmakuplien nopean kasvamisen ja lopulta hajoamisen. Tämä aiheuttaa nesteen kiertoa ja turbulenssia, minkä ansiosta liuotin läpäisee biomassan tehokkaasti. Ultraäänien käyttö tehostaa uuttoa, mutta liian pitkä käsittely saattaa muuttaa ksylaanin rakennetta (Ebringerová ja Hromádková 2010).

Kuumavesiuutto, tai ylikriittinen vesiuutto, perustuu sidosten katkeamiseen korkean paineen ja korkean lämpötilan vaikutuksesta (Mosier ym. 2005). Vesiuutossa ei tarvita muita kemikaaleja, minkä takia se on melko ympäristöystävällinen ja turvallinen menetelmä, mutta korkea lämpötila ja paine vaativat paljon energiaa. Menetelmällä saadaan eristettyä 50–80 % eristettävästä hemiselluloosista, mikä on paljon verrattuna muiden menetelmien saantoihin (Kilpeläinen ym. 2014a; Naidu ym. 2018). Menetelmän tärkein vaikuttava tekijä on käytetty lämpötila, mutta muuttamalla käsittelyaikaa ja seoksen pH:ta voidaan vaikuttaa prosessiin merkittävästi (Kilpeläinen ym. 2014b). Käsittelyn aikana saattaa vapautua uronihappoja ja muodostua etikkahappoa hydrolysoituneista asetyyliryhmistä. Nämä laskevat seoksen pH:ta ja edesauttavat GX:n hajoamista. Prosesseissa saattaa myös muodostua epäpuhtauksia, kuten furfuraalia (Mosier ym. 2005). Epäpuhtauksien määrä on kuitenkin melko pieni ja ne voidaan haihduttaa kuivataessa lopputuotetta (Kilpeläinen ym. 2014b).

Kuumavesiuuttoa lähtömateriaalina voidaan käyttää paperimassaa. Pidemmällä uuttoajalla saadaan vähennettyä GX:n määrää paperimassassa, mutta liian pitkä käsittely hajottaa myös selluloosaa (Borrega ym. 2017). Hydrolyysin takia myös GX:n molekyyliä on pienempi pitkin uuttoajan jälkeen. GX:n erottaminen täydellisesti paperimassasta ilman sellu- ja GX-fraktioiden polymeerien hajoamista on mahdotonta (Kilpeläinen ym. 2014b). Jotta polymerisoitunut GX saadaan eristettyä paperimassasta, täytyy käsittelyaika optimoida päättymään hetki ennen selluloosan hajoamista.

Kun lähtöaineena on sahanpuru, on mahdollista keskittyä vain GX:n eristämiseen. Syklisellä kuumavesiuutolla voidaan tehokkaasti myös fraktioida GX:a molekyyliä painoon perustuen, kuten pienimolekyyliemmät mannaanit suurempimassaisista ksylaaneista (Martínez-Abad

ym. 2018). Paineistettua kuumavesiuuttoa on myös laajennettu laboratoriomittakaavasta teollisuusmittakaavaan onnistuneesti, jolloin GX:a voidaan tuottaa suuria määriä raaka-aineksi (Kilpeläinen ym. 2014a).

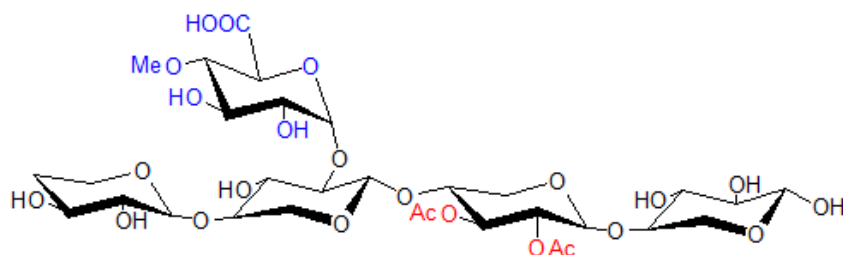
Höyryräjäytystä voidaan käyttää vesiuton kanssa (Naidu ym. 2018). Tarkoituksena on rikkoa selluloosan rakennetta ja pilkkoa ligniiniä. Tämä saavutetaan altistamalla materiaali korkealle lämpötilalle ja paineelle höyrystämällä sitä, jonka jälkeen paine vapautetaan nopeasti. Höyryn nopea laajeneminen hajottaa lignosellumassan rakennetta (Singh ym. 2014). Massan pH laskee, koska funktionaaliset sivuryhmät muodostavat orgaanisia happoja. Nämä puolestaan saattavat hydrolysoida GX:a ksyloosiksi ja oligosakkardeiksi (Singh ym. 2014). Tällä voidaan nopeasti hajottaa lignoselluloosan rakenne, minkä jälkeen vesiutolla voidaan vielä erottaa fraktiot toisistaan. Prosessin tehokkuuteen vaikuttavat pääasiassa käsittelyaika, lämpötila, kosteuspitoisuus ja lähtömateriaalin, kuten sahanpurujen, partikkelikoko (Negro ym. 2003).

Useissa eristetyissä hemiselluloosissa on vielä mukana muita yhdisteitä, joista ligniini on merkittävin. Kun halutaan konsentroida GX-jaetta, täytyy sitä vielä jatkokäsitellä. Kiinteä- neste-utolla yhdistettynä neste-neste-uttoon on mahdollista poistaa 70 % ligniinistä (Westbye ym. 2008). Myös emäsfraktiointia, veteen sekoitettavaa liuotinta, kromatografisia menetelmiä ja erilaisia suodatuksia käytetään (Naidu ym. 2018). Tarkoitus on saostaa eristettävä ksylaani, jolloin se voidaan erottaa vedestä. Myös ulossuolausta käytetään puhdistukseen, vaikka sen käyttö on yleisempää proteiinien eristyksessä (Naidu ym. 2018). Yleisempiä käytettyjä suoloja ovat ammoniumsulfaatti ja litiumkloridi. Mitä enemmän suolaa käytetään eristykseen sitä haaroittuneempaa ja pienimolekyylisempää ksylaania saadaan eristettyä.

Kromatografisia menetelmiä on useita ja käytössä ovat mm. ioninvaihto- ja kokoekskluusiopylväät (Naidu ym. 2018). Menetelmällä saadaan hyvin puhdasta ksylaania, mutta ongelmana on vaikeus muuttaa menetelmää teollisuusmittakaavaan ja puskurina käytettävien suolojen poisto eristyksen jälkeen. Suodatuksella taas voidaan erottaa tietyn molekyyli- lipainon mukaan kerättävät ksylaanit. Se vaatii vain vähän energiaa ja liuottimia. Suodatuksen toimivuuteen kuitenkin vaikuttavat mm. liuoksen viskositeetti, ksylaanin haaroittuneisuus ja liukoisuus, joten on vaikea täysin hallita erotetun jakeen koostumusta.

2.2.2 Glukuronoksyylaatin rakenne

Koivun (*Betula pendula*) GX muodostuu β -(1 \rightarrow 4)-sidoksilla toisiinsa sitoutuneista β -D-ksylopyranosyyliyksiköistä (kuva 1). Ketjusta haarautuu muita monosakkarideja ja uronihappoja, joista tärkein on α -(1 \rightarrow 2)-sidoksin sitoutunut 4-O-metyyli-D-glukuronihappo (meGlcA). Kuitenkin tarkan rakenteen määrittäminen on haastavaa GX:n heterogeenisyyden takia. GX:n haaroittuminen on satunnaista, mutta meGlcA-yksiköitä esiintyy noin 7-12 aina 100 ksyloosia kohden (Jacobs ym. 2001).



Kuva 1. Glukuronoksyylaatin perusrakenne Ebringerovan (2006) mukaan. Sinisellä on korostettu ksyloosiketjuun sitoutunut meGlcA ja punaisella on korostettuna asetyloituneet hydroksiryhmät

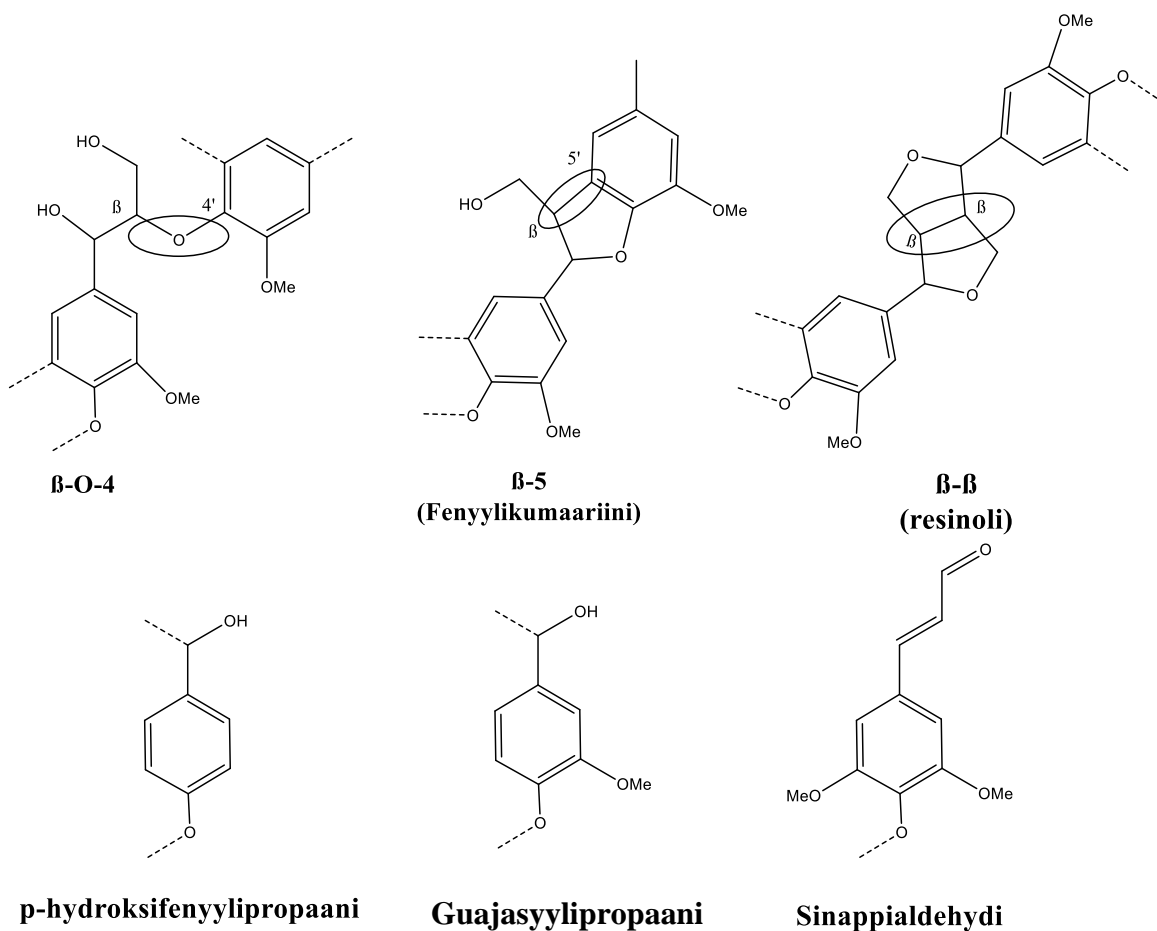
GX:n liukoisuudelle ja muille ominaisuuksille tärkeää on sen asetyloitumisaste. Noin 60–70 % sen ksyloosien C2- ja/tai C3-hiileen sitoutuneista hydroksyyliyhdistä on asetyloitunut (Westbye ym. 2008). Tässäkään jakauma ei kuitenkaan ole homogeeninen. Kun useampi GX:n hydroksiryhmä on asetyloitunut, on myös enemmän meGlcA-ryhmiä sitoutuneena (Giummarella ja Lawoko 2016).

MeGlcA ja asetyloituneet hydroksyyliyhdistä ovat tärkeimpiä sivuryhmiä pääketjussa. Tämän lisäksi myös ksyloosiketjun pelkistävässä päässä on löydetty D-Xyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl-rakenne, jonka mukaan myös ramnoosi (Rha) ja galaktouronihappo (GalA) ovat osa GX:n polysakkaridiketjua (Ericsson ym. 1977; Johansson ja Samuelson 1977; Komiyama ym. 2009). Kuitenkin myös pektiini muodostuu GalA-yksiköistä ja se saattaisi myös olla lähde osalle monosakkaridianalyseissä löytyvälle GalA:lle (Meshitsuka ym. 1982).

2.2.3 Fenoliset yhdisteet

Ligniinit ja muut fenoliset yhdisteet

Puumateriaalista löytyvät fenoliset yhdisteet ovat yleensä peräisin ligniinistä. Koivusta löytyneistä ligniinirakenteista tärkeimpiä vaikuttaisi olevan β -O-4-sidokset, β -5, β - β , p-hydroksifenyyli-, guajasyylipropaani ja sinappialdehydi, joita on esitetty kuvassa 2.



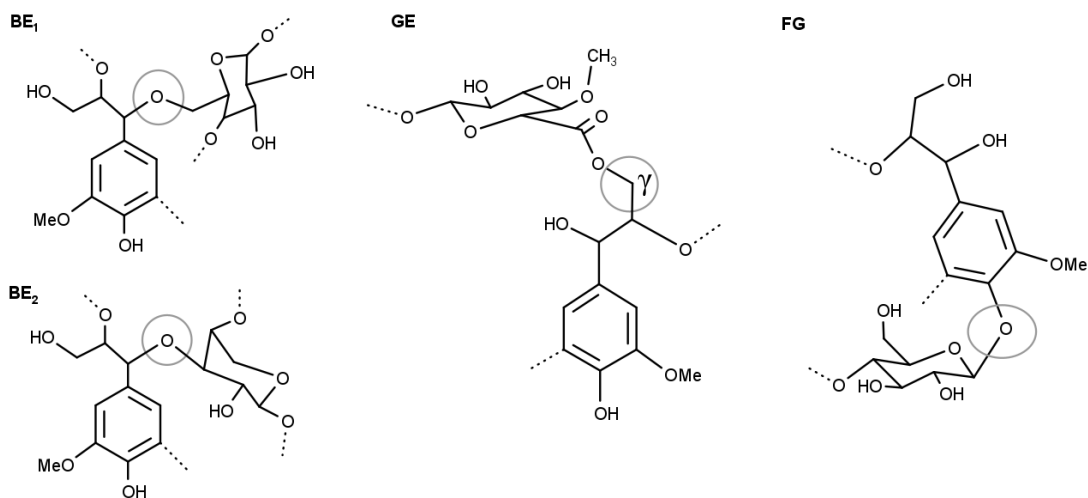
Kuva 2. Koivun GX:n yleisimpiä ligniinirakenteita Gabovin ym. (2014) ja Giummarellan ja Lawokon (2016) mukaan

Koivun sisemällä kuorella esiintyy useita erilaisia fenolisia yhdisteitä, kuten flavonoideja, diaryyliheptanoideja, yksinkertaisia fenolisia yhdisteitä, fenolihappoja, tanniineja, lignaaneja ja prosyaniideja (Fengel ja Wegener 1989; Šmite ym. 1995; Liimatainen ym. 2012). Flavonoideilla tarkoitetaan fenolisia yhdisteitä, jotka muodostuvat kahdesta bentseenirenkaasta ja yhdestä heterosyklisestä renkaasta. Lignaaneilla tarkoitetaan kahta toisiinsa sitoutuneen fenyylipropaaniyksikön muodostamaa rakennetta.

Ligniini-hiilihydraattikompleksit

Ligniini–hiilihydraattikomplekseja (LCC) on tutkittu paljon. Ne ovat hemiselluloosaan kovalenttisilla sidoksilla sitoutuneen ligniinin muodostamia aggregaatteja (Sjöström 1993).

Jotta komplekseja voidaan tutkia, täytyy soluseinän rakenne rikkoa. Tämän takia ei ole varmaa, esiintyvätkö nämä sidokset jo soluseinässä vai muodostuvatko ne vasta prosessoinnin aikana (Hutterer ym. 2016; Giummarella ja Lawoko 2016). Kuitenkin uskotaan ainakin osan ligniini–hiilihydraattisidoksista (LC-sidokset) olevan jo soluseinässä, koska useilla eri eristymenetelmillä sidoksia on löydetty (Giummarella ja Lawoko 2016). Pääasiallisiksi sidostyypeiksi kirjallisuudessa on esitetty bentsyylietteri-, bentsyyliesteri- ja fenyyliglykosidisidokset, jotka on esitetty kuvassa 3 (Sjöström 1993; Giummarella ym. 2019). Bentsyyliesterisidokset muodostuvat luultavasti ligniinin ja meGlcA:n välille (Watanabe ja Koshijima 1988; Imamura ym. 1994).

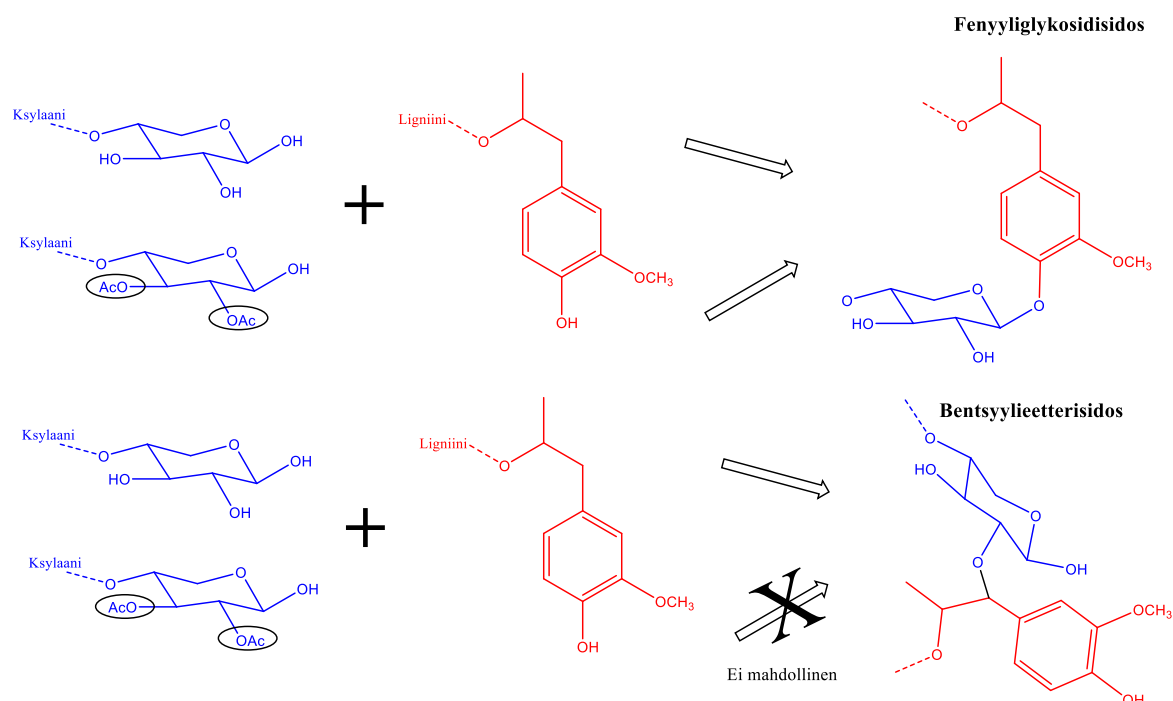


Kuva 3. Tärkeimmät ligniini-hiilihydraattisidostyyppit Giummarellan ym. (2019) mukaan. BE₁ = bentsyylietterisidos, sitoutunut glukoosin, galaktoosin tai mannoosin C6-hiileen, arabiinissa C5 hiileen, BE₂ = bentsyylietterisidos sitoutunut glukoosiin, galaktoosin, mannoosin, ksyloosin tai arabiinissa C2/C3 hiileen, GE = gammaesterisidos FG= fenyyliglykosidisidos

Koivussa ligniini ja GX voivat olla sitoutuneina toisiinsa suoraan tai pektiinin kautta (Meshitsuka ym. 1982). Meshitsuka ym. (1982) eristivät GX:sta LCC-rikkaan jakeen, jossa oli myös merkittävästi GalA:a. Jae käsiteltiin pektinaaseilla, minkä jälkeen jakeesta irtosi suurin osa hemiselluloosasta. Tämä viittaa pektiinillä olevan osuutensa LCC-rakenteessa, koska pektinaasit erottivat ligniinin ksyloosista. GalA on osa GX:n polysakkaridiketjua, mutta käytetyt pektinaasit katkovat GalA:n välisiä α -(1→4)-sidoksia, joten niiden ei pitäisi

vaikuttaa GX:n ksyloosiketjun ja GalA:n välisiin sidoksiin. Koivun GX:n ja pektiinin mahdollisia kovalenttisia sidoksia on tutkittu vähän, mutta pektiini ja ligniini saattavat olla kovalenttisesti sitoutuneina toisiinsa (Giummarella ja Lawoko 2016). Tomaatin ksylaanin ja pektiinin välisten sidosten olemassaolosta on viitteitä, mutta näitä ei kuitenkaan voi verrata täysin puiden soluseinän rakenteeseen (Broxterman ja Schols 2018).

Giummarellan ja Lawokon (2016) mukaan GX:n pääketjuun sitoutuneet sivuryhmät vaikuttavat bentsyylietterisidosten määrään negatiivisesti: mitä enemmän asetyloituneita hydroksyyliiryymiä sitä vähemmän LC-sidoksia. Molemmat sitoutuvat GX:n C2-hiileen, joten siihen sitoutuneet sivuryhmät saattavat vaikeuttaa myös C1-hiilen sidosten muodostusta (kuva 4).



Kuva 4. Mahdollinen asetylyiryhmien säätelemä ligniini-hiilihydraattisidosten sijainneille Giummarellan ja Lawokon (2016) mukaisesti

2.2.4 Glukuronoksylaanin analysointi

GX:n analysointi ei ole helppoa sen heterogeenisyyden vuoksi. Analyysimenetelmän valintaan vaikuttaa lähtömateriaali, eli miten GX-näyte on eristetty ja onko sitä puhdistettu muista yhdisteistä. Näytteen esikäsittelyt voivat muokata sidoksia, jolloin ei tiedetä, mitä alkuperäisessä näytteessä todellisuudessa oli (Naidu ym. 2018). Näytteen koostumusta analysoitessa tämä ei välttämättä ole ongelma, mutta rakenneanalyysissä ja sidoksia tutkiessa tämä voi olla antaa virheellisen tuloksen.

Monosakkaridianalyysit

Määrittämällä näytteen monosakkaridikoostumus saadaan tietoa GX:n rakenteesta. Näillä menetelmillä ei voida selvittää, miten yhdisteet ovat sitoutuneet toisiinsa, mutta niiden avulla saadaan tarkempaa tietoa kemiallisesta koostumuksesta. Analyysit vaativat eriasteisia esikäsittelymenetelmiä, joilla hajotetaan poly- ja oligosakkaridit, jotta yksittäisiä monosakkarideja voidaan tunnistaa. Esikäsittelymenetelminä käytetään mm. hydrolyysiiä ja metanolyysiiä.

Kulometrisiämenetelmiä on käytössä useita. Niissä hiilihydraatit reagoivat värireagenssin kanssa, mikä voidaan mitata UV-VIS-spektrofotometrisesti (Dubois ym. 1956; Blumenkrantz ja Asboe-Hansen 1973; Zhang ym. 2016). Menetelmiä on useita erilaisia, samoin kuin reagensseja, kuten orsinoleja, karbatsoleja ja fenolisia yhdisteitä. Menetelmien ongelmia ovat värireaktioita häiritsevät yhdisteet, eikä menetelmissä yleensä kyetä samanaikaisesti määrittämään neutraaleja monosakkarideja ja uronihappoja (Blumenkrantz ja Asboe-Hansen 1973; Zhang ym. 2016). Kulometriset menetelmät eivät kuitenkaan vaadi suuria laiteinvestointeja, joten suurpiirteiseen tunnistamiseen ne ovat nopeita ja helppoja vaihtoehtoja.

Jos halutaan määrittää GX:n tarkka monosakkaridiprofiili, täytyy polysakkaridien rakenne rikkoo esimerkiksi happamalla metanolyysillä, happohydrolyysillä tai entsyymaattisesti (Blumenkrantz ja Asboe-Hansen 1973; Sundberg ym. 1996; Tenkanen ym. 1999). Happohydrolyysin huono puoli on, että se katkoo huonosti glukoosin ja mGlcA:n välisiä α -(1 \rightarrow 2)-sidoksia ja liian rajuna se saattaa pilkkoa uronihappoja (Willför ym. 2009; Lorenz ym. 2016). Hapan metanolyysi on ksyylaanien ja uronihappojen määrittämistä varten näistä paras esikäsittelymenetelmä, koska se katkoo mGlcA:n ja glukoosin välisiä sidoksia muttei aiheuta uronihappojen hajoamista (Willför ym. 2009). Entsyymaattinen pilkkominen tai happohydrolyysi voivat olla sopivia vaihtoehtoja esimerkiksi kiteytyneiden hemiselluloosien pilkkomiselle. Happohydrolyysillä voidaan saavuttaa parhaat saantoprosentit analysoitaessa vain neutraaleja monosakkarideja (Rantanen ym. 2007; Willför ym. 2009).

Sundberg ym. (1996) validoivat kaasukromatografisen monosakkaridianalyysin. Menetelmän etuja oli, että sillä voitiin samaan aikaan määrittää neutraalit ja happamat monosakkaridit. Menetelmä oli toistettava ja selektiivinen hemiselluloosille ja pektiinille. Sen lisäksi tarvittavat näyte- ja reagenssimäärät olivat pieniä. Samaan aikaan voitiin valmistaa paljon

näytteitä ja esikäsitelyssä polysakkaridit hajotettiin yhden vaiheen menetelmällä. Siinä kuivattu näyte käsiteltiin happamalla metanolyysillä ja silyloitiin, jolloin saatiin monosakkaridit erottumaan GC-FID-ajossa hyvin toisistansa.

Happamalla metanolyysillä tapahtuu monosakkaridien anomerisaatiota ja rengasrakenteen isomerisaatiota (Bleton ym 1996). Tällöin rakenteen mukaan eri retentioajoilla erottuvat α - ja β -anomeerit, jotka voivat olla pentooseina tai heksooneina. Yleensä piikit erottuvat hyvin toisistaan, mutta täytyy aina tarkistaa etteivät piikit peitä toisiansa. Samalla menetelmällä voidaan myös määrittää uronihapot. MeGlcA:n määrittämiseksi käytetään glukuronihapon (GlcA) standardisuuraa, koska sille ei ole tarjolla kaupallista vertailunäytettä. Chong ym. (2013) tutkivat, kuinka hyvin eri GlcA:n suorat kuvaavat meGlcA:n todellista pitoisuutta. GlcA:sta syntyy happamassa metanolyysissä myös α - ja β -laktonimuodot, joten kromatogrammiin syntyy 6 piikkiä. Parhaiten meGlcA:n todellista pitoisuutta vastasi GlcA:n standardisuora, jossa ei otettu laktonimuotojen piikkejä huomioon.

Myös monosakkaridianalyseille on kehitetty nestekromatografisia menetelmiä, joista yleisin on korkean erotuskyvyn anioninvaihtokromatografinen menetelmä liitettynä pulssiamperometriseen ilmaisimeen (HPAEC-PAD) (Rantanen ym. 2007; Lorenz ym. 2016). Ongelmana on, ettei usein samassa ajossa voida analysoida sekä neutraaleja monosakkarideja että uronihappoja, koska se olisi epäkäytännöllistä niiden suuren vaste-eron takia (Rantanen ym. 2007; Willför ym. 2009; Chong ym. 2013). Lorenz ym. (2016) ovat myös kehittäneet korkean erotuskyvyn anioninvaihtokromatografisen menetelmän liitettynä UV/VIS-spektrometriin (HPAEC-UV/VIS) monosakkaridikoostumuksen määrittämiseksi. Menetelmä vaikuttaa lupaavalta vaihtoehdolta, koska sillä voidaan määrittää helposti myös meGlcA:n määrä, mikä on perinteisissä menetelmissä haastavaa kaupallisen standardin puutteen vuoksi. Tutkittava näyte käsitellään lievällä happohydrolyysillä ja vapautuneet mono- ja oligosakkaridit leimataan, jotta ne voidaan havaita UV/VIS-spektrometrillä. Happohydrolyysi saattaa kuitenkin hajottaa uronihappoja, minkä takia se ei ole paras esikäsitelymenetelmä, kun halutaan määrittää myös uronihapot (Sundberg ym. 1996). Tämän takia Lorenz ym. (2016) pyrkivät kehittämään riittävän hellävaraisen happohydrolyysin. Tällä saatiin optimoituja hydrolyysiolosuhteet, mutta esikäsitely on happamaan metanolyysiin verrattuna monivaiheisempi. Tämä tekee menetelmästä hitaan ja työlään, koska laboratoriotyöskentelyssä aikaa vievät usein eniten esikäsitelyt.

Neutraalien ja varautuneiden polysakkaridien eristys

Polysakkarideja voidaan erottaa myös varauksen mukaan. Tähän on käytetty mm. anioninvaihtokromatografiaa (AEC) (Broxterman ja Schols 2018). Aikaisemmin tämä oli tarpeellista, kun monosakkaridit ja uronihapot määritettiin eri menetelmillä. Nykyään on useita menetelmiä, jolla ne voidaan määrittää samanaikaisesti. Anioninvaihtokromatografia perustuu käytetyn hartsin positiivisiin varauksiin, jotka sitovat negatiivisesti varautuneet yhdisteet. Tämän jälkeen ne voidaan vapauttaa joko ulossuolauksen tai pH:n muuttamisen avulla. Ulossuolauksessa suolan ionit kilpailevat tutkittavan yhdisteen kanssa, jolloin se vapautuu pylväästä. Pylvään pH:n muutos toimii, jos tutkittavana on proteiini, happo tai muu yhdiste, jonka varaus muuttuu pH:n vaikutuksesta, jolloin yhdiste vapautuu pylväästä.

LC-sidosten ja ligniinijäämien analytiikka

Ligniiniä ja ligniiniperäisiä fenolisia yhdisteitä jää usein eristettyyn GX-jakeeseen. Pelkän ligniinin määrä puussa määritetään usein ns. Klason-ligniininä, joka saadaan poistamalla polysakkaridit happohydrolyysillä ja määrittämällä gravimetrisesti jäljelle jäävän aineksen massa (Sjöström 1993). Tämän määrittämisen ongelmia ovat happohydrolyysin vaikutus ligniinin rakenteeseen: osa lehtipuiden ligniinistä liukenee happoon, jolloin sen määrää ei voida määrittää suoraan gravimetrisesti. Liuenneen ligniinin määrä voidaan määrittää UV-spektrofotometrisesti. Ligniini voidaan määrittää myös hajottamalla polysakkarideja entsymaattisesti, jolloin sen rakenne säilyy. Rakenneanalyysiä varten ligniiniä voidaan erottaa massasta jauhamalla puun rakennetta rikki ja keräämällä liuottimella irronnutta ainesta. Tällöin saadaan vain osa ligniinistä talteen, mutta sen rakenne ei muutu käsittelyn aikana. Ligniinin määrää voidaan myös määrittää kokoeksluoksiokromatografilla, johon on liitetty UV-ilmäisin (Hutterer ym. 2016).

Tutkittavan jakeen ligniinin rakenne täytyy rikkoa sen koostumuksen analysointia varten. Mahdollisten LC-sidokset voidaan rikkoa happo- tai emäshydrolyysillä, jolloin glykosidi- ja esterisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet vapautuvat (Mattila ja Kumpulainen 2002; Lu ym. 2017).

Esikäsitellyssä vapautuneita fenolisia yhdisteitä voidaan analysoida tarkemmin mm. nestekromatografisilla menetelmillä (Kylli ym. 2011; Liimatainen ym. 2012). Fenoliset yhdisteet

näkyvät UV- ja osa fluoresenssi-ilmaisimella (Kylli ym. 2011; Hutterer ym. 2016). Ne voidaan jakaa yhdisteryhmiin, jolloin saadaan kuva niiden jakaumasta (proantosyanidit, antosyaniinit, flavonolit, hydroksisinnamihapot ja hydroksibentsoehapot) (Kylli ym. 2011). Määrittämisessä käytetään tällöin ulkoista standardia ja jokainen yhdisteryhmä havainnoidaan sille sopivalla aallonpituudella. Massaspektrometrialla voidaan taas varmistua yhdisteiden tunnistuksesta, jos ollaan kiinnostuneita tietyistä yhdisteistä eikä yhdisteryhmistä (Lahtinen ym. 2019). Soveltamalla menetelmää voidaan myös määrittää fenolisten yhdisteiden jakaumaa emulsiossa (Lehtonen ym. 2018). Tämä ei todista LC-sidosten olemassaoloa, mutta antaa viitteitä siitä, mitkä fenoliset yhdisteet ja monosakkaridit saattaisivat olla sitoutuneina toisiinsa.

Kun halutaan tutkia vain LC-sidoksia, ei niitä ole tarkoitus rikkoa. Tätä varten voidaan puhdistaa näyte sitoutumattomista hemiselluloosista kuumavesiuutolla ja kromatografisella erotuksella (Giummarella ym. 2016). Tämän jälkeen LC-sidosten määrittämiseen käytetään rakenneanalyttisiä menetelmiä, kuten ydinmagneettiresonanssispektroskopia (NMR), kaasukromatografia yhdistettynä massaspektrometriin (GC-MS) ja infrapunaspektroskopia IR (Teleman ym. 2002; Giummarella ja Lawoko 2016; Qin ym. 2018). Näillä saadaan selvitettyä, minkä tyyppisiä sidoksia näytteissä on.

2.2.5 Glukuronoksyylaatin elintarvikesovellukset

Koska koivun GX:n eristämiseen on olemassa toimivia menetelmiä, on sen mahdollisia käyttökohteita tutkittu paljon. Tarkoituksena on kehittää taloudellisesti kannattavia sovelluksia, jotta puuteollisuus voisi myydä sitä energiaksi polttamisen sijaan. Samalla muu teollisuus hyötyisi saamalla laadukkaita raaka-aineita prosesseihinsa.

Koska koivun GX muodostuu pääasiassa ksyloosista ja meGlcA:sta, voidaan sen monosakkarideja hyödyntää hajottamalla sen rakenne. Hydrolyysi voidaan tehdä happohydrolyysillä, autohydrolyysillä tai entsyymaattisesti (Naidu ym. 2018). Monosakkaridit voidaan fermentoida maitohapoksi ja ksylitoliksi (Naidu ym. 2018). Maitohappoa käytetään teollisuudessa useaan eri tarkoitukseen ja ksylitolia käytetään mm. makeutusaineena ja edistämään hampaiden terveyttä (Naidu ym. 2018). Ksylitolia voidaan valmistaa myös hydrogenaatiolla ksyloosista.

Hydrogeeleillä tarkoitetaan polymeerien muodostamia veteen liukenemattomia verkostoja, jotka sitovat vettä (Naidu ym. 2018). GX:t voivat muodostaa tällaisia verkostoja, jotka eivät ole vaaraksi ihmiselle ja joiden tuottaminen on suhteellisen yksinkertaista. Niille mahdollisia sovelluskohteita löytyy bioaktiivisten yhdisteiden kuljetuksesta ja raskasmetallien sitomisesta (Naidu ym. 2018).

2.3 Emulsiot

Emulsiolla tarkoitetaan kahden toisiinsa sekoittumattoman nesteen muodostamaa seosta (McClements 2005). Yleisimmät emulsiot elintarvikkeissa ovat vesi öljyssä- (W/O) ja öljy vedessä -emulsiot (O/W). Emulsiossa on aina jatkuva faasi, jonka seassa on pisaroina siihen liukenematon faasi.

2.3.1 Emulsioiden valmistus

Kahden toisiinsa liukenemattoman faasin yhdistämistä emulsioksi kutsutaan emulgoinniksi, joka voidaan toteuttaa mm. homogoinnilla (McClements 2005). Homogoinnin tarkoitus on jakaa partikkelit mahdollisimman tasaisesti seokseen. Homogointi voidaan jakaa vielä primaariseen ja sekundaariseen homogointiin. Primaarisella homogoinnilla voidaan kaksi faasia yhdistää emulsioksi. Sekundaarisella homogoinnilla voidaan jo olemassa olevan emulsion pisarakokoa pienentää. Emulgointiin voidaan käyttää erilaisia laitteita, jotka perustuvat usein joko mekaaniseen työhön tai paineen käyttöön. Kuinka paljon energiaa systeemiin täytyy syöttää, jotta saadaan muodostettua pisaroita, riippuu käytettävistä materiaaleista (Tadros 2013). Homogoinnissa syntyneet pisarat yhdistyvät toisiinsa vähitellen ja emulsio hajoaa kahdeksi erilliseksi faasiksi. Tätä pyritään estämään lisäämällä emulgointi- ja stabilointiaineita, joiden tehtävänä on toimia faasien rajapinnoilla ja hidastaa pisaroiden yhteenliittymistä (McClements 2005; Tadros 2013).

2.3.2 Emulsion pysyvyys

Emulsion pysyvyys tarkoittaa emulsion kykyä vastustaa fysikaalis-kemiallisia muutoksia ajan kuluessa (McClements 2005). Tähän vaikuttaa jatkuvan faasin ominaisuudet, kuten viskositeetti, pisaroiden ominaisuudet ja niiden konsentraatio ja rajapinnan rakenne. Emulsioi-

den pysyvyyttä tarkastellaan usein pisaroiden ominaisuuksien mukaan, koska niiden yhteenliittyminen tarkoittaa emulsion hajoamista. Kun tutkitaan emulsion pysyvyyteen vaikuttavia tekijöitä, voidaan tarkastella myös jatkuvan faasin ominaisuuksia ja rajapinnan rakennetta.

Pisaroiden ominaisuudet

Pisaroiden ominaisuuksista eniten emulsion pysyvyyteen vaikuttavat niiden konsentraatio, koko ja varaus (McClements 2007). Pisaroiden koko vaikuttaa emulsion muihinkin ominaisuuksiin, kuten väriin ja viskositeettiin (McClements 2005). Piskeroon vaikutus emulsion pysyvyyteen on merkittävä, koska se vaikuttaa sekä painovoimaiseen erottumiseen että pisaroiden yhteenliittymiseen. Piskarat saattavat olla joko kaikki samankokoisia, mutta usein pisaroita on useaa eri kokoa, jolloin pisaroiden kokoa kuvataan kokojakaumalla. Tämä kuva erikokoisten pisaroiden konsentraatiota emulsiossa. Kuvaaja voi olla jatkuva, mikä on usein tarpeellista elintarvike-emulsioille, joissa on usean eri kokoluokan pisaroita (McClements 2005). Piskaroiden kokoa voidaan kuvata joko niiden halkaisijan tai säteen mukaan. Niiden konsentraatiota voidaan taas kuvata joko tilavuus- tai lukumääräprosenttina.

Piskaroilla on usein varaus johtuen niihin sitoutuneista ionisoituneista molekyyleistä, kuten proteiineista, hiilihydraateista, fosfolipideistä tai ioneista (McClements 2005; Tadros 2013). Piskaran varaus on tärkeä ominaisuus stabiilisuuden kannalta, koska se voi tehokkaasti estää pisaroiden liittymistä yhteen hylkivien elektrostaattisten varausten takia. Sitä voidaan kuvata usealla eri yksiköllä, mutta yksi käytetyimmistä on ζ -potentiaali (McClements 2007). Se kuvaa elektropotentiaalia sillä etäisyydellä piskaran pinnalta, missä piskaran varaus vaikuttaa vielä ioneihin.

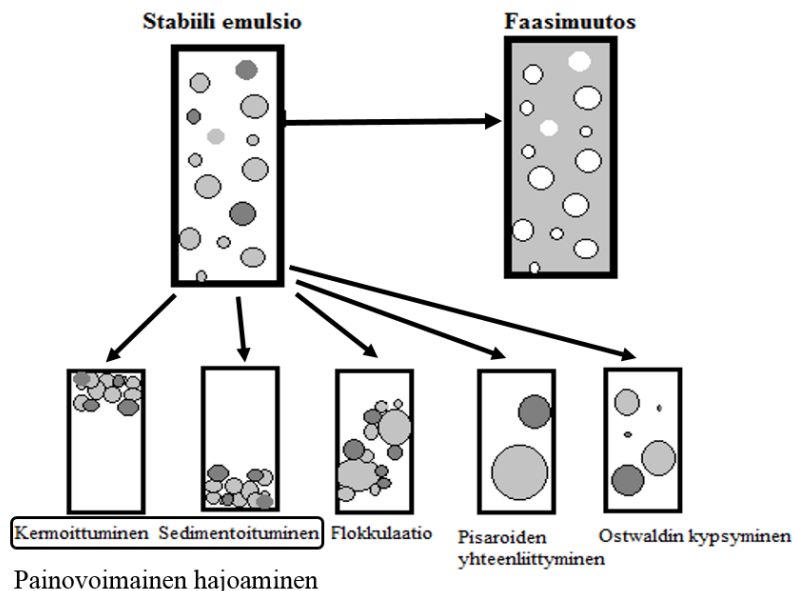
Rajapinnan rakenne

Rajapinnalla tarkoitetaan piskaran ja jatkuvan faasin välistä kapeaa (1–50 nm) aluetta, jossa sekoittuvat jatkuva faasi, piskara ja mahdolliset emulgointiaineet (McClements 2007). Mitä pienempiä piskarat ovat, sitä suurempi on rajapinnan kokonaispinta-ala emulsiossa. Rajapinnan paksuus ja ominaisuudet vaihtelevat paljon sen mukaan, minkä tyyppisiä molekyylejä pinnalle on sitoutunut (Berton-Carabin ym. 2014). Proteiinit muodostavat usein huokoisen rakenteen piskaran ympärille, kun taas pienet molekyylit peittävät tasaisesti piskaran pinnan. Rajapinnan rakenne määrää, kuinka hyvin piskarat pysyvät erillään ja kuinka helposti hapettumista edistävät molekyylit pääsevät kulkeutumaan rajapinnan läpi öljypiskaraan O/W-

emulsioissa (Waraho ym. 2011; Berton-Carabin ym. 2014). Rajapinnoilta lähtevät paksut steeriset esteet estävät pisaroiden yhteenliittymistä ja näin hidastavat emulsion hajoamista (Tadros 2013). Myös rajapinnalle hakeutuneet yhdisteet voivat muuttaa pisaran varausta, jolloin elektrosteeriset voimat pitävät pisarat etäällä toisistansa. Tämän takia emulsion stabiilisuuteen pyritään usein vaikuttamalla rajapinnan rakenteeseen emulgointi- ja stabilointiaineiden avulla. Rajapintaan voi myös hakeutua kiinteitä partikkeleita, jotka stabiloivat emulsiota (McClements ym. 2005). Tätä kutsutaan Pickering-emulsioksi.

Hajoaminen

Emulsion hajoamismekanismeja on useita, joista tärkeimpiä ovat painovoimaan perustuvat kermottuminen ja sedimentoituminen, flokkulaatio, pisaroiden yhteenliittyminen, Ostwaldin kypsyminen ja faasimuutokset (kuva 5). Nämä mekanismit vaikuttavat usein toisiinsa, joten emulsion hajoamisessa täytyy ottaa huomioon yleensä useita mekanismeja. Esimerkiksi emulsio saattaa kermottua selvästi, mutta kermoittuminen saa alkunsa pisaroiden flokkulaatiosta (McClements 2007).



Kuva 5. Emulsion hajoamismekanismit McClements (2007) mukaan

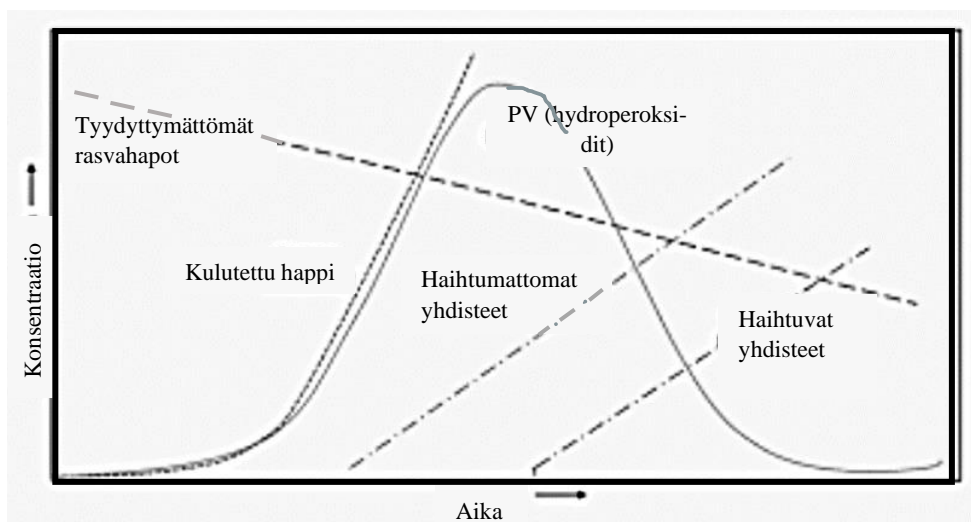
Painovoimaisessa erottumisessa vähemmän tiheät partikkelit nousevat tiheämmän jatkuvan faasin pintaan (kermoittuminen) tai tiheämmät partikkelit laskeutuvat vähemmän tiheään jatkuvan faasin pohjalle (sedimentoituminen) (McClements 2005). Koska öljyn tiheys on yleisesti vettä pienempi, O/W-emulsioiden ongelma on kermottuminen ja W/O-emulsioiden sedimentoituminen. Pisaroiden yhteenliittymisessä ja Ostwaldin kypsymisessä molemmassa

pisaroita ei erota enää rajapinta vaan ne liittyvät yhteen. Ostwaldin kypsyminen tarkoittaa isojen pisaroiden taipumusta yhdistyä pieniin pisaroihin. Flokkulaatiossa pisarat ovat lähentyneet toisiansa, mutta niiden välissä on edelleen rajapinta, joka erottaa ne toisistansa. Flokkulaatio voi johtaa painovoimalliseen erottumiseen tai pisaroiden yhteenliittymiseen. (McClements 2005).

Emulsion kemiallinen pilaantuminen

Emulsion fysikaalinen hajoamisen lisäksi elintarvikesovelluksissa on myös säilyvyyden kannalta tärkeitä sen kemiallinen ja mikrobiologinen säilyvyys. Kemiallisista reaktioista varsinkin öljyn rasvahappojen hapettuminen lyhentää tuotteen hyllyikää. Tyydyttymättömät rasvat, erityisesti monityydyttymättömät, hapettuvat helposti. Hiilen ja vedyn väliset sidosenergiat ovat pienemmät kaksoissidokselliseen hiileen sitoutuneella hiilellä, kuin yksöissidokseen sitoutuneella hiilellä (Kim ja Min 2007). Happimolekyylit eivät reagoi perustilaisen makrokomponenttien kanssa, mutta vetyatomien lohjettua syntyneet radikaalit reagoivat (Kim ja Min 2007). Rasvahapot muodostavat radikaaleja ($L\bullet$) reagoidessaan mm. UV-valon, lämmön, metallien tai muiden radikaalien vaikutuksesta (Kim ja Min 2007). Radikaloituneet rasvahapot reagoivat happimolekyylien kanssa muodostaen uusia radikaaleja, mikä ylläpitää reaktiosarjaa. Radikaali ja happi reagoivat keskenään muodostaen peroksyyliradikaaleja ($LOO\bullet$). Näiden reagoidessa edelleen lipidien kanssa muodostuu hydroperoksideja ($LOOH$), jotka ovat stabiileja yhdisteitä. Ne voivat kuitenkin hajota, jolloin syntyy uusia radikaaleja, kuten alkoksiradikaaleja ($LO\bullet$). Radikaalit saattavat myös huonontaa elintarvikkeiden ravitsemuksellista arvoa, koska radikaalit voivat reagoida muiden makrokomponenttien, kuten proteiinin kanssa.

Säilytysolosuhteilla, kuten valon ja hapen määrällä sekä säilytyslämpötilalla, voidaan vaikuttaa hapettumiseen. Rasvan ominaisuudet myös vaikuttavat hapettumiseen. Rasvahappojen seassa olevat komponentit, kuten antioksidantit, saattavat hidastaa hapettumista (Kim ja Min 2007). Antioksidantit reagoivat radikaalien kanssa muodostaen pysyviä yhdisteitä, mikä hillitsee radikaalireaktion etenemistä. Rasvojen hapettuessa tapahtuu siis useita reaktioita, joiden lopputuotteiden tai lähtöaineita mittaamalla voidaan seurata hapettumisen etenemistä (kuva 6).



Kuva 6. Rasvojen hapettuminen ja hapettumistuotteet suhteessa aikaan hapettumisen edetessä Finleyn ja de-Manin (2018) mukaan. PV = peroksidiluku

Waraho ym. (2011) ovat keränneet kokooma-artikkelissaan emulsion öljyn hapettumiseen vaikuttavia tekijöitä. Emulsion hapettumiseen vaikuttavat paljon öljyyn kosketuksissa olevat komponentit ja mitä pisaroiden rajapinnan läpi pääsee kulkeutumaan (Waraho ym. 2011). Esimerkiksi proteiinit voivat hillitä hapettumista, koska osa niistä voi sitoa pro-oksiantteja, kuten rautaioneja (Waraho ym. 2011). Koska ferrirautaa (Fe^{2+}) on ferrirautaa (Fe^{3+}) liukoisempi ja reaktiivisempi, on se tehokas pro-oksiantti (Ahn ja Kim 1998; Waraho ym. 2011). Hiilihydraatit taas voivat joko hillitä tai kiihdyttää hapettumista. Pelkistävät disakkaridit ja jotkin monosakkaridit kiihdyttävät hapettumista, koska ne voivat pelkistää ferriraudan ferriraudaksi (Yamauchi ym. 1984). Sen sijaan useat polysakkaridit voivat toimia radikaalisieppareina ja sitoa metalleja, mikä ehkäisee hapettumista (Waraho ym. 2011). Myös rajapinnan rakenteen muutoksilla voidaan ehkäistä hapettumista. Esimerkiksi paksu, monikerroksinen rajapinta suojaa pisaroita hapelta ja pro-oksiantteilta (Waraho ym. 2011). Jos rajapinta ei suojele öljyä näiltä, hapettuu öljy nopeammin kuin se hapettuisi pelkkänä öljyfaasina, koska tällöin öljyn pinta-ala on suuri (Berton-Carabin ym. 2014). Myös happi pääsee reagoimaan öljyn kanssa homogoinnin aikana, joten se saattaa myös vaikuttaa emulsion öljyn hapettumiseen (Berton-Carabin ym. 2014).

2.3.3 Emulsion pysyvyyden mittaaminen

Emulsioita tutkiessa voidaan karakterisoida emulsion rakenteita, kuten pisaroiden ominaisuuksia, jatkuvan faasin koostumusta tai rajapinnan koostumusta. Tämän lisäksi voidaan seurata erilaisilla menetelmillä emulsion hajoamista, joka usein perustuu pisaroiden ominaisuuksien muutoksen seuraamiseen.

Emulsion pysyvyyttä mitattaessa pisaroiden ominaisuuksien mittaaminen ja kemiallisten pilaantumismekanismien seuraaminen ovat tärkeimpiä menetelmiä. Tämän takia pisaroiden ominaisuuksia, kuten konsentraatiota, kokoa ja varausta karakterisoimalla saadaan tietää paljon emulsion rakenteesta.

Emulsion painovoimaista hajoamista voidaan tutkia yksinkertaisella kermoittumiskokeella joko spektrofotometrisesti tai visuaalisesti (McClements 2007). Visuaalisessa kermoittumiskokeessa tasapohjaiseen näyteputkeen siirretään emulsio ja aikapisteissä sen pohjalle erottuvan läpinäkyvän seerumin korkeus mitataan. Tällöin voidaan laskea sen kermoittumiskerroin. Ongelma visuaalisella kermoittumisen arvioinnilla on sen epätarkkuus. Valonsirontaan perustuvat laitteet antavat tarkempaa kuvaa näytteen pisaroiden muutoksista, eivätkä tuhoa näytettä. Tämä vaatii kuitenkin laiteinvestointeja. Matemaattinen mallintaminen perustuen Stokesin lakiin ja se mahdollistaa myös emulsion stabiilisuuden ennustamisen (McClements 2005). Malli perustuu kuitenkin nesteen newtoniseen käyttäytymiseen ja usein elintarvikematriisien monimutkaisuus vaatisi useiden mallin ulkopuolisten tekijöiden huomioon ottamisen (McClements 2007).

Optinen, valo-, tai atomimikroskooppi ovat hyviä laitteistoja flokkulaation seuraamiseksi (McClements 2005). Niillä voidaan havainnoida pisaroiden aggregoitumista. On hyvä selvittää myös pisaroiden koko, koska pieniä pisaroita ei välttämättä pysty havaitsemaan mikroskoopilla, mutta niiden aggregaatteja voi. Tällöin voi kuvasta päätellä, onko pienipisarainen emulsio flokkuloitunut. Tulkinnoissa kannattaa kuitenkin olla varovainen, koska näytteen valmistelu vaikuttaa näytteeseen, kaksiulotteisesta kuvasta voi olla vaikea päätellä kolmiulotteisten partikkelien todellista paikkaa ja vain lähekkäin olevat pisarat eivät ole välttämättä flokkuloituneet (McClements 2007).

Tarkemman kolmiulotteisen kuvan voi luoda mm. lasersirontamenetelmillä. Koska pisarat flokkuloituvat, kun puoleensa vetävät voimat pisaroiden pinnalla ovat suurempia kuin luotaan työntävät voimat, voidaan myös pisaroiden varausta tutkimalla arvioida emulsion flokkulaatiotaipumusta.

Pisaroiden yhteenliittymistä voidaan tarkkailla useilla menetelmillä, joista mikroskopointi ja partikkelikoon mittaaminen ovat yleisiä (McClements 2007). Suurin haaste on erottaa se

flokkulaatiosta ja Ostwaldin kypsymisestä. Flokkulaatiosta erottamiseksi voi mitata pisarakoon ennen ja jälkeen antiflokkulaatioaineen lisäämisen. Jos pisarakokojakauma muuttuu, on kyse flokkulaatiosta. Jos jakauma ei muutu, on kyse pisaroiden yhteenliittymisestä. Ostwaldin kypsymisen ja pisaroiden yhteenliittymisen eron voi lähinnä päätellä niiden pisarakokojakaumista. Ostwaldin kypsymisessä suuret pisarat kasvavat ja pienet pienenevät, kun taas pisaroiden yhteenliittymisessä muodostuu usean eri kokoisia pisaroita (McClements 2007).

Hajoamista tutkittaessa voidaan käyttää nopeutettua säilyvyyskoetta, jolloin näytteitä säilötään esim. lämpökaapissa reaktioiden nopeuttamiseksi (McClements 2007). Hajoamista voidaan nopeuttaa myös käyttämällä sentrifugia, joka rikkoo emulsion rakennetta.

Emulsion öljyn hapettumista mittaamalla voidaan määrittää emulsion kemiallista pysyvyyttä. Öljyn hapettumista voidaan analysoida monella eri tavalla, koska hapettumien on monimutkainen prosessi. Yksinkertaisimmillaan voidaan lähteä tarkastelemaan öljyn primaarista hapettumista mittamalla emulsiosta sen peroksidiluku, joka kuvaa hydroperoksidien määrää. Hydroperoksiedeja syntyy rasvojen hapettumistuotteena, mikä antaa selkeän mittarin öljyn hapettumisasteelle (Shahidi ja Wanasundara 2007). Peroksidiluku voidaan määrittää titraamalla, nestekromatografisesti tai värireaktioiden avulla (Shahidi ja Wanasundara 2007) Titrauksessa hydroperoksidit pelkistyvät, jolloin jodi-ionit muodostavat jodia. Menetelmä ei ole kovin tarkka, koska lämpötila, titrausaika, peroksidien rakenne ja reaktiivisuus vaikuttavat reaktioihin. Myöskään pieniä määriä peroksiedeja ei voida määrittää, koska titrauksen lopettaminen oikeaan aikaan on hankalaa. Koska menetelmässä on useita virhelähteitä, sen tulokset eivät ole vertailukelpoisia eri olosuhteissa saatuihin tuloksiin. Luotettavampi menetelmä on ferrotiosyanaattimenetelmä (Shahidi ja Wanasundara 2007). Siinä hydroperoksidit reagoivat ferroraudan kanssa hapettaen tätä, hapettunut ferrorauta reagoi seoksessa olevan ammoniumtiosyanaatin kanssa ja syntyy punainen ferritiosyanaattiyhdiste. Sen määrää voidaan mitata esimerkiksi spektrofotometrisesti UV/VIS-alueella. Menetelmä on yksinkertainen ja toistettava, eikä se vaadi suuria laiteinvestointeja.

2.3.4 Elintarvike emulgointi- ja stabilointiaineet

Emulgointiaineilla tarkoitetaan laajaa kemiallisesti toisistaan eroavaa ryhmää. Emulgointiaineet hakeutuvat emulsion pisaroiden rajapinnalle ja yleensä parantavat niiden pysyvyyttä.

Stabilointiaineet ovat laajempi ryhmä. Niiden tarkoitus on ylläpitää elintarvikkeen rakennetta, kemiallista pysyvyyttä ja väriä (Ruokavirasto 2018). Toimivalle emulgointiaineelle on tärkeätä, että se hakeutuu homogoinnin aikana tehokkaasti rajapinnoille, koska niiden täytyy laskemaan rajapinnan jännitettä merkittävästi ja estämään syntyneiden pisaroiden yhteenliittymistä (McClements 2005). Ei ole kuitenkaan olemassa yhtä täydellistä emulgointiainetta, koska tuotteen ominaisuudet vaikuttavat sen toimintaan niin paljon. Emulgointiaineet voivat vuorovaikuttaa proteiinien ja hiilihydraattien kanssa parantaen tai huonontaen emulsion stabiilisuutta. Niiden toimivuuteen voi vaikuttaa myös pH, emulsion valmistuksessa käytettävä lämpötila ja emulgointiaineen liukoisuus kyseessä olevaan matriisiin (McClements 2005).

Emulgointi- ja stabilointiaineiden toiminta voi perustua pisaran rajapinnan luotaantyöntäviin elektrostaattisten voimien lisäämiseen tai jatkuvan faasin viskositeetin lisäämiseen (McClements 2005). Vaikka emulgointiaine ei olisi varautunut, se voi erottaa pisaroita toisistaan muilla hylkivillä voimilla (McClements 2005). Emulgointi- ja stabilointiaineet voivat olla poolisia, poolittomia tai amfifiilisiä. Esimerkiksi ne voivat olla lesitiinejä, proteiineja, rasvahappojen johdannaisia, hiilihydraatteja tai pienimolekyylisiä yhdisteitä. Niitä voidaan jaotella mm. niiden hydrofiilisuuden ja lipofiilisuuden, geometrian tai rajapinnalle hakeutumisenopeuden mukaan. Kun niitä lisätään matriisiin, ne joko asettuvat rajapinnoille tai muodostavat misellejä tai muita stabiileja rakenteita (McClements 2005). Ne saattavat vaikuttaa seoksen ominaisuuksiin ja makuun. Emulsiossa haihtumattomat aromaattiset yhdisteet havaitaan voimakkaammin vesifaasissa kuin öljyfaasissa (McClements 2005). Tämän takia misellien mukana siirtyvät aromaattiset yhdisteet muuttavat koko emulsion makua.

Hiilihydraatit emulgointi- ja stabilointiaineena

Polysakkaridit ovat hyvin vaihtelevan kokoisia biopolymeerejä, joilla on usein myös vaihteleva kolmiulotteinen rakenne. Tähän rakenteeseen vaikuttaa suuresti hydrofobiset voimat, elektrostaattiset vuorovaikutukset, vetysidokset ja van der Waalsin voimat (McClements 2005). Jos polymeerissä on sekä poolisia että poolittomia alueita, voi se hakeutua faasien rajapinnoille homogoinnin aikana ja stabilisoida emulsiota. Hiilihydraattien etu verrattuna toisiin biopolymeereihin emulgointiaineina on, että pH ei yleensä vaikuta niin merkittävästi niiden rakenteeseen, jolloin emulsion valmistus on mahdollista laajemmalla pH-alueella. Esimerkiksi proteiinien isoelektronisen pisteen tuntumassa ei ole riittävästi hylkiviä varauksia pitämään pisarat erillään.

Arabikumi on yleinen emulgointiaine, jota eristetään kumiakaasiasta. Se muodostuu vähintään kolmesta suurimassaisesta biopolymeerifraktiosta, joista pinta-aktiivinen osa on luultavammin haaroittunutta arabinogalaktania sitoutuneena polypeptidirunkoon, joka muodostuu arabinogalaktoproteiinista ja glykoproteiineista (Randall ym. 1988; McClements 2005). Nämä proteiineja sisältävät rakenteet mahdollistavat arabikumin toiminnan emulgointiaineena (Randall ym. 1988). Homogenointi avaa polypeptidit, jolloin hydrofobiset peptidit voivat ankkuroitua öljypisaraan (Cirre ym. 2014). Niihin sitoutuneet vesiliukoiset arabinogalaktaanit jäävät vesifaasiin muodostaen steerisen esteen ja täten hidastavat pisaroiden yhteenliittymistä ja flokkulaatiota (Qiu ym. 2017). Arabikumi on melko stabiili laajalla pH-alueella, eri suolapitoisuuksissa ja lämpötiloissa. Sen ongelmana on tarve käyttää sitä suurina pitoisuuksina, johtuen sen melko heikosta affiniteetista rajapintoja kohtaan (McClements 2005).

Tämän lisäksi on laaja joukko muita kasvikumeja, jotka on hyväksytty elintarvikekäyttöön, kuten johanneksenleipäpuukumi, guarkumi, tragantti, ksantaanikumi, karaijakumi, tarakumi ja gellaniinikumi (Ruokavirasto 2018). Näitä voi käyttää myös yhdessä halutun lopputuloksen saavuttamiseksi. Esimerkiksi käytettäessä emulgointiaineena seosta, jossa on ksantaanikumia ja arabikumia yhteisvaikutusten avulla arabikumi vaikuttaa pisaroiden kokoon ja ksantaanikumi puolestaan vaikuttaa merkittävästi viskositeettiin (Desplanques ym. 2012).

Selluloosaa ja tärkkelystä voidaan muunneltuina käyttää emulgointiaineina (McClements 2005). Sellaisenaan ne ovat melko huonoja emulgointiaineita, koska tärkkelys on hydrofiilinen yhdiste, joka ei hakeudu rajapinnoille ja selluloosa taas ei ole vesiliukoinen. Muunnellun tärkkelyksen edut ja ongelmat ovat samoja kuin arabikumin. Muunneltu selluloosa on tämän lisäksi herkkä korkeille lämpötiloille, koska sen vesiliukoisuus voi kärsiä (McClements 2005).

Edellä mainittujen lisäksi on muitakin polysakkarideja, jotka toimivat stabilointiaineina, kuten pektiini. Niiden toimintamekanismit vaihtelevat. Polysakkaridien käyttö voi perustua jatkuvan faasin viskositeetin kasvattamiseen tai polysakkaridien hakeutumiseen rajapinnoille. Rajapinnoille ne hakeutuvat, jos niihin on sitoutunut hydrofobisia proteiineja tai sitten itse polysakkaridissa on sekä hydrofiilisiä että hydrofobisia alueita (McClements 2005). Elintarvikekäyttöön hyväksytyjä ovat mm. karrageeni ja agar (Ruokavirasto 2018). Näiden lisäksi

myös *Amorphophallus konjac* -kasvin juurista on eristetty konjacia, joka on glukomannaania ja luokitellaan sakeuttamisaineeksi (Ruokavirasto 2018).

Hemiselluloosat emulgointi- ja stabilointiaineina

Kasvien soluseinien hemiselluloosat jäävät useassa prosessissa hyödyntämättä. Tämän takia sivuvirtojen mahdollisten käyttökohteita tutkitaan. Elintarvikelisäaineina on jo hyväksyttyinä muutamia hemiselluloosia. Uusin lisäys on soijapapuhemiselluloosa. Se uutetaan soijan kiuista, joita saadaan soijaöljyn ja -proteiinin tuotannon sivutuotteesta (Ruokavirasto 2018).

Viljakasvien hemiselluloosat

Useiden viljelykasvien soluseinien päähemiselluloosatyyppi on arabinoksyylaani. Koska viljakasveista, kuten ohrasta, durrasta, vehnästä, riisistä, maissista ja kaurasta, jää käyttämättä osia elintarviketalouden jälkeen, mistä voidaan eristää esimerkiksi arabinoksyylaania muun teollisuuden käyttöön. Tästä voidaan valmistaa mm. etanolia, mutta uusia käyttökohteita tutkitaan.

Arabinoksyylaani

Maissin arabinoksyylaania on tutkittu paljon sen suuren saatavuuden takia (Yadav ym. 2007). Se vaikuttaisi muodostavan pysyvemmän emulsion juomissa, kuin arabikumi. Maissin arabinoksyylaaniin emulgointi- ja stabilointiominaisuudet paranevat suuremman proteiinipitoisuuden mukaan, minkä takia arabinoksyylaaniin sitoutuneilla proteiineilla on luultavasti tärkeä osa stabilointimekanismeissa (Yadav ym. 2007). Arabinoksyylaaniin sitoutuneet proteiinit toimivat hyvin samalla tavalla kuin arabikumin proteiinit: hydrofobiset peptidit paljastuvat homogenisoinnin aikana ja ankkuroituvat öljypisaroihin (Cirre ym. 2014). Suurempi molekyylipaino ja suurempi määrä fenoli- ja rasvahappoja paransivat emulsioiden pysyvyyttä, joten ne myös vaikuttavat stabilointimekanismiin (Yadav ym. 2009).

Ohrasta eristetty arabinoksyylaani toimii myös emulgointiaineena, mutta ei yhtä hyvin kuin maissin arabinoksyylaani (Yadav ja Hicks 2015). Yadav ja Hicks (2015) käyttivät tutkimuksessaan ohran korsia ja ohran jyvien kuorimisen jälkeen ylijääviä kuoria. Varsinkin ohran korsista eristetty vesiliukoinen arabinoksyylaani paransi emulsion pysyvyyttä. Jakeen pro-

teiniipitoisuus oli melko alhainen, mutta myös ohran arabinoksyylaanin stabilointikyky saattaa perustua silti osittain sen proteiineihin. Kuitenkin ohran arabinoksyylaanin proteiniipitoisuus erosi korren ja kuoren välillä. Korressa oli vähemmän vesiliukoista arabinoksyylaania ja proteiineja, mutta ne muodostivat pysyvämpiä emulsioita verrattuna kuoresta eristettyihin hemiselluloosajakeisiin (Yadav ja Hicks 2015).

Yksi Afrikan tärkeimmistä viljoista on durra. Siitäkin syntyy paljon biomassaa elintarviketalouden jälkeen, minkä takia myös sen arabinoksyylaania on tutkittu. Sillä stabiloitu emulsio on pysyvämpi kuin paljon tutkitun maissin arabinoksyylaanin. Molemmista vesi- ja happoliukoinen ns. hemiselluloosa B -jake muodostaa kaikkein pysyvimmän emulsion (Qiu ym. 2017). Durran ja maissin arabinoksyylaanin stabilointikykyä paransi suurempi molekyyli-paino, proteiini- ja lipidipitoisuus, ja kompaktimpi rakenne (Yadav ym. 2009; Qiu ym. 2017). Isomolekyyliset polysakkaridit pizaroiden pinnalla estävät tehokkaasti pizaroiden yhteenliittymistä muodostamalla steerisiä esteitä, jolloin emulsion pysyvyys paranee huomattavasti (Qiu ym. 2017).

Puiden hemiselluloosat

Elintarvikekäyttöön soveltuvia hemiselluloosia on tutkittu elintarvikekelpoisista materiaaleista, kuten viljoista. Sen lisäksi hemiselluloosia löytyy myös mm. puusta, minkä takia näiden hemiselluloosien ominaisuuksia tutkiminen emulgointiaineina on herättänyt kiinnostusta.

Arabinogalaktaani

USA:ssa on elintarvikekäyttöön hyväksytty lehtikuusesta eristetty hemiselluloosa arabinogalaktaani (FDA 2000). Vesiliukoisuutensa ansiosta arabinogalaktaanin käyttö on mahdollista useissa elintarvikkeissa ja se on tarkoitettu stabilointiaineeksi (Pitkänen ja Striegel 2015). Arabinogalaktaanin on todettu olevan yleisesti turvallinen ravinnossa ja sen lisäämisellä elintarvikkeisiin ei ole haittavaikutuksia. Sitä ei ole kuitenkaan hyväksytty Euroopassa lisääneeksi.

Galaktoglukomannaani

Hemiselluloosista emulgointiaineena on tutkittu kuusen galaktoglukomannaania (GGM). Verrattaessa kaupalliseen Tween 20 -emulgointiaineeseen GGM muodostaa viskoosimman jatkuvan faasin ja emulsio on pysyvä jopa kuukausia, kun taas Tween 20 -emulsiot kermituvat jo muutamassa päivässä (Mikkonen ym. 2016a). Mitä enemmän GGM:a lisättiin, sitä korkeamman viskositeetin jatkuva faasi saavutti, mikä luultavasti suojaasi emulsiota kermotumiselta ja pisaroiden yhteenliittymiseltä (Mikkonen ym. 2016a). Myös verrattaessa arabikumiin todettiin GGM:lla stabiloitujen emulsioiden pysyvyyden olevan parempi (Mikkonen ym. 2016b).

Lehtosen ym. (2016) tutkimuksen mukaan hemiselluloosat stabiloivat emulsioita arabikumia tehokkaammin ja niitä tarvittiin huomattavasti pienempi määrä. GGM:n stabiloimien emulsioiden fysikaalinen ja kemiallinen hajoaminen oli hitaampaa verrattuna arabikumilla stabiloituun. Nämä ominaisuudet saattavat kytkeytyä toisiinsa, koska emulsion hajoaminen voi altistaa öljypisaroita hapettumiselle. GGM:iin sitoutuneet fenoliset yhdisteet vaikuttaisivat suojelevan sen stabiloimia emulsioita hapettumiselta (Lehtonen ym. 2016). GGM:iin on sitoutuneena paljon fenolisia yhdisteitä verrattuna arabikumiin ja maissin arabinoksyylaaniin. Tämän takia GGM:n stabiloimat emulsiot hapettuvat arabikumin ja arabinoksylaanin stabiloimia emulsioita hitaammin. GGM:ssa lähes kaikki fenoliset yhdisteet ovat glykosididoksilla sitoutuneita flavanoleja, kun taas arabikumissa ja maissin arabinoksylaanissa on suhteessa enemmän muita fenolisia yhdisteitä, kuten hydroksibentsoaatteja (Lehtonen ym. 2016). Fenoliset yhdisteet paransivat emulsioiden pysyvyyttä. Jos GGM puhdistetaan etanolisäostuksella ennen emulsion valmistamista, näiden emulsioiden fysikaalinen ja kemiallinen stabiilisuus heikkenee (Lehtonen ym. 2018). Vaikuttaisi siltä, että vain pieni osa fenolisista yhdisteistä on rajapinnoilla (0,1%), mutta ne selvästi silti parantavat emulsion pysyvyyttä merkittävästi. Jos ne ovat sitoutuneena esterisidoksilla, muodostaisivat ne todennäköisesti tiiviin ja paksun kerroksen pisaran ympärille. Glykosididoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet sitoutuivat GGM:n pelkistävään päähän, jolloin ne muodostaisivat huokoisesta rakenteesta rasvapisaran ympärille (Lehtonen ym. 2018).

Puun hemiselluloosat voisivat toimia hyvin siis myös elintarviketeollisuudessa. Koska puun hemiselluloosia ei ole vielä hyväksytty elintarvikekäyttöön, täytyy niiden turvallisuus tutkia ensin ja saada EFSA:ta (European Food Safety Administration) hyväksyntä lisäaineena tai uuselintarvikkeena. Pitkänen ym. (2018) tekivät kuumavesiuutetusta kuusen GGM-jakeesta

kirjallisuuskatsauksen liittyen sen turvallisuuteen elintarvikekäytössä. Sen mukaan GGM ei sisällä terveyshaittoja emulgointiaineena käytettävänä määrinä. Arviot perustuivat vertailuun kemiallisesti samankaltaisten yhdisteiden ja GGM-jakeesta löytyvien yhdisteiden määrän myrkyllisyyden tarkasteluun (Pitkänen ym. 2018). Arviointipohjana käytettiin Euroopan uuselintarvikelainsäädäntöä, jossa määritetään tarvittavat tiedot yhdisteen kemiallisesta koostumuksesta, toksikologiasta ja käyttötarkoituksesta. Arvioiden mukaan kuumavesiuutettu GGM on turvallinen ja ravintokuituna se saattaa olla jopa hyväksi suoliston mikrobeille. Tämän lisäksi siihen sitoutuneet ligniiniperäiset fenoliset yhdisteet voivat toimia antioksidanteina ja radikaalisieppareina.

Glukuronoksyylaani

GX:n käyttöä emulgointi- ja stabilointiaineena on tutkittu vasta vähän. Sen on todettu stabiloivan öljy vedessä -emulsioita ja hakeutuvan rajapinnoille (Mikkonen ym. 2016a). Ei kuitenkaan tiedetä, mihin nämä ominaisuudet perustuvat. Polysakkarideissa ei ole poolittomia sivuryhmiä, jotka amfihiilisinä hakeutuisivat öljypisaroiden rajapinnoille. Yksi teoria on, että osa GX:sta ei liukenisi veteen ja nämä aggregaatit toimisivat Pickering-emulsion puoliksi pisaraan uponneina partikkeleina (Mikkonen ym. 2016a). On myös mahdollista, että GX:iin on sitoutunut ligniiniperäisiä fenolisia yhdisteitä, jotka voisivat selittää tämän hakeutumisen rajapinnoille ja emulsion tehokkaan stabiloimisen (Lehtonen ym. 2018). Myös GX:n uro-nihapot luultavasti vaikuttavat emulsion stabilisuuteen. GX:lla stabiloitujen emulsion öljypisaroiden ζ -potentiaali oli -35 mV, mikä kertoo pisaroiden välillä olevan elektrostaattisia vuorovaikutuksia, jotka pitävät ne erillään toisistansa (Mikkonen ym. 2016a)

Kuten GGM, myös GX tarvitsee turvallisuusarvioinnin ennen kuin se voidaan hyväksyä elintarvikekäyttöön. Muiden kasvien ksylaaneista on tehty toksikologisia kokeita, joissa ei ole havaittu haittavaikutuksia (Qin ym. 2017; Muhammad ym. 2018). Qin ym. (2017) tekivät 90 päivän toksikologisen kokeen rotilla sokeriruo'osta eristetyllä ksylaanilla. Kokeessa käytetyillä pitoisuuksilla ei havaittu vaikutuksia, jonka mukaan NOAEL (no observed adverse effect level) todettiin olevan 9 g/kg uroksilla ja 10,6 g/kg naarailla (Qin ym. 2017). Tämän lisäksi vaaditaan kuitenkin laajaa selvitystä koivun GX:n turvallisuudesta ennen kuin sitä voidaan hyväksyä elintarvikekäyttöön. Huomioon on otettava käytettävässä jakeessa olevat muutkin yhdisteet ja koivun GX:n toksikologinen arviointi on suoritettava.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

3.1 Tutkimuksen tavoite

Työn tavoitteena oli selvittää paineistetulla kuumavesiuutolla eristetyn koivun GX:lla stabiloidun emulsion pysyvyyttä ja koostumusta. Emulsion pysyvyydestä tutkittiin fysikaalista ja kemiallista pysyvyyttä. Koostumuksesta analysoitiin emulsion monosakkaridijakauma ja ligniiniperäisten fenolisten yhdisteiden jakautuminen jatkuvaan faasiin ja pisaroiden rajapinnoille. Tutkittiin myös, miten fenoliset yhdisteet olivat sitoutuneet ksyloosiketjuun. Työssä pyrittiin ymmärtämään GX:lla stabiloidun emulsion stabilointimekanismia eristämällä sen muodostaman emulsion rajapinnalla olevia monosakkarideja ja tutkimalla niihin sitoutuneita fenolisia yhdisteitä.

3.2 Materiaalit ja menetelmät

3.2.1 Näytteet

Käytetty koivun GX saatiin Luonnonvarakeskukselta (LUKE). Ne oli eristetty Kilpeläisen ym. (2014a) mukaisesti sahanpurusta (Koskisen Oy ja Metsä Wood, Suomi) paineistetulla kuumavesiuutolla (PHWE). Sahanpuruja käsiteltiin 170 °C:ssa 60 minuutin ajan läpivirtauksella 20 l/min. Näyte ultrasuodatettiin Bhattarain ym. (2019) kuvailemalla tavalla ja sumutuskuivattiin (Buchi Mini Spray Dryer B-290, Sveitsi). Tuloaukon lämpötila oli 170 °C ja ulostuloaukon 65 °C. Lopullisen näytteen kosteuspitoisuus oli 3,9 % (Lahtinen ym. 2019). Näytettä säilytettiin valolta suojattuna huoneenlämpötilassa. Emulsioissa käytetty rypsiöljy ostettiin kaupasta (Bunge Finland Oy, Suomi). Useasti käytetyt kemikaalit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Työssä useasti käytettyjä kemikaaleja

Kemikaali	Valmistaja	Puhtaus
Metanoli	Fisher Chemicals, USA	HPLC
Etanoli	Altia, Suomi	AAS
Heptaani	Honeywell Fluka, USA	HPLC
Vesi	Millipore, USA	MilliQ
Etyyliasettaatti	Sigma Aldrich, USA	HPLC, >99,7%
Pyridiini	Merck, Saksa	
Suolahappo (HCl)	Merck, Saksa	37% fuming
Natriumhydroksidi (NaOH)	J.T Baker, USA	

3.2.2 Käytetyt lasitarvikkeet

Lasitarvikkeet pestiin erikoispesulla, jotta mahdolliset epäpuhtaudet laseissa eivät häiritseisi herkkiä analyysejä. Tämä oli tärkeää varsinkin fenolisten yhdisteiden analyyseissä. Erikoispesussa lasitavaroista puhdistetaan ensin näkyvät epäpuhtaudet, minkä jälkeen niitä liotettiin hetki pesuaineessa, sitten etanolissa ja lopulta vielä yön yli pesuaineessa (Active Dip). Tämän jälkeen ne pestiin vielä tiskikoneessa.

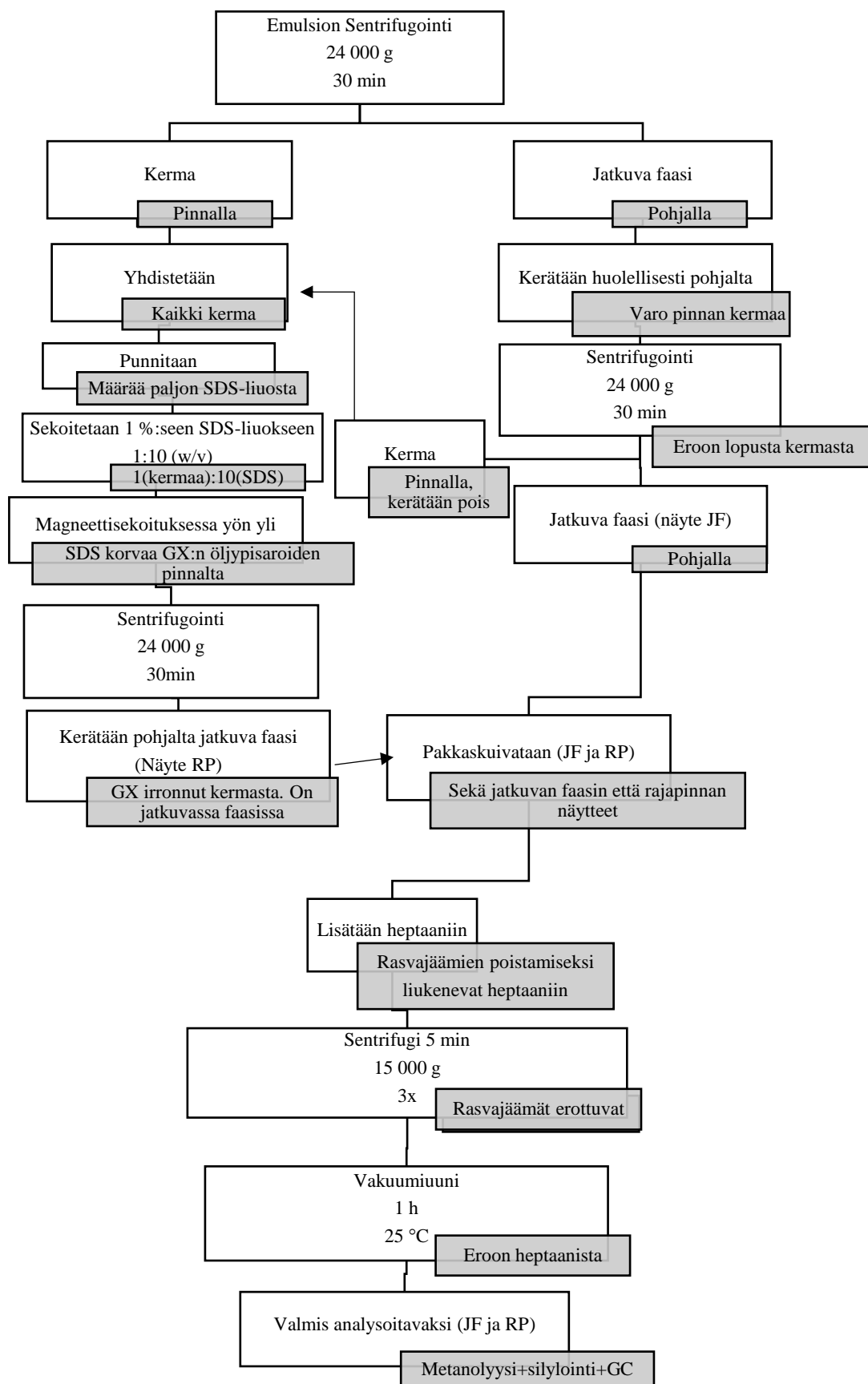
3.2.3 Emulsioiden valmistaminen

Emulsio valmistettiin tutkimusryhmän hyväksi testaaman menetelmän mukaisesti valmistamalla 80 ml emulsiota (Mikkonen ym. 2016b). Emulsiot sisälsivät 1 % (w/w) kuiva-ainetta ja 5 % (w/w) öljyä. Emulsiot valmistettiin 25 mM sitraattihappopuskuriin (Sigma Aldrich, USA). Ensin kuiva-aine (1 %) punnittiin ja sekoitettiin puskuriin magneettisekoittajassa yön yli, jotta se olisi varmasti kokonaan liuennut. Sitten punnittiin mukaan öljy (5 %) ja esiemulsio tehtiin kahden minuutin mekaanisella sekoituksella (nopeudella 22 000 kierrosta minuutissa) (Ultra-Turrax, IKA, Saksa). Lopullinen emulsio muodostettiin kierrättämällä esiemulsiota 800 bar:n paineella painekammioiden läpi 32 sekunnin ajan (Microfluidisizer, Microfluidics, USA, painekammiot: 75 mm:n Y-tyyppinen F20Y ja 200 mm:n Z-tyyppinen H30Z kytkettyinä sarjaan).

3.2.4 Rajapinnan erottaminen jatkuvasta faasista

Kohdassa 3.2.3 valmistetun emulsion rakenne rikottiin rajapinnan ja jatkuvan faasin analyysia varten kuvan 7 mukaan (Mikkonen ym. 2016b; Bhattarai ym. 2019). Emulsiota sentrifugoitiin 30 min ajan 24 000 g:n voimalla huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen jatkuva faasi

ja kerma kerättiin erilleen. Fenolisten yhdisteiden analyysiä varten näytteet olivat valmiit tämän jälkeen ja ne analysoitiin tästä suoraan kohdan 3.2.6 mukaisesti. Monosakkaridianaalyyssia varten jatkuva faasi oli valmis pakkaskuivaukseen (näyte JF). Kerma sekoitettiin 1-prosenttiseen (w/v) SDS-liuokseen (VWR, USA) suhteella 1:10. Liuos jätettiin yön yli sekoittumaan magneettisekoittajaan. SDS korvaa pinta-aktiivisena aineena GX:n rajapinnalta, jolloin GX vapautuu jatkuvaan faasiin (Chapleau ja de Lamballerie-Anton 2003; Mikkonen ym. 2016b). Seuraavaksi liuos sentrifugoitiin 24 000 g:n voimalla 30 min ajan huoneenlämmössä, mistä jatkuva faasi kerättiin talteen. Tämä näyte edusti rajapinnan monosakkarideja (näyte RP). Rajapinnan näyte pakkaskuivattiin kuten jatkuvan faasin näyte. Kuivista näytteistä (JF ja RP) uutettiin rasvajäämät pois lisäämällä heptania näytteeseen, jonka jälkeen näytettä sentrifugoitiin (Hermle 2323, Saksa) 15 000 g:n voimalla 5 min ajan ja heptaanikerros poistettiin pasteur-pipetillä. Uutto toistettiin kolme kertaa. Lopuksi kuivattiin näytteet (JF ja RP) vakuumiunissa (Salvislab, Sveitsi) tunnin ajan 25 °C:ssa. Näytteet olivat valmiit monosakkaridianaalyyysiin (kohta 3.2.5).



Kuva 7. Emulsion hajottaminen kermaksi ja jatkuvaksi faasiksi esikäsitellynä kaasukromatografista monosakkaridianalyysiä varten. GX = glukuronoksyylaani, GC = kaasukromatografi SDS = natriumdodekyylisulfaatti

3.2.5 Monosakkaridimääritys

Kuivattu GX analysoitiin suoraan seuraavan menetelmän mukaisesti. Emulsioiden rajapinnalle ja jatkuvalla faasille tehtiin kohdassa 3.2.4 mainittu esikäsittely. Menetelmä perustuu Sundbergin ym. (1996) validoimaan menetelmään, joka on kuvattu 2.2.4 kohdassa tarkemmin.

Standardeina käytettiin L-arabinoosia (Merck, Saksa), D-ksyloosia (Merck, Saksa), L-ramnoosimonohydraattia (Fluka, USA), D-galaktoosia (Merck, Saksa), D-glukoosia (Merck, Saksa), D-mannoosia (Merck, Saksa), D-galaktouronihappomonohydraattia (Fluka, USA), D-glukuronihapponatriumsuolamonohydraattia (Aldrich, USA) ja D-sorbitolia (Aldrich, USA). Sorbitoli toimi sisäisenä standardina ja se osoitti näytteiden silyloinnin onnistumisen. Sorbitolia punnittiin tarkasti 100 mg 100 ml:n mittapulloon ja laimennettiin metanolilla, jolloin liuoksen sorbitolipitoisuus oli 1 mg/ml. Liuosta säilytettiin 4 °C:ssa. Muita standardeja käytettiin standardisuorien määrittämiseen.

Kuivattuja näytteitä ja standardeja punnittiin tarkasti 10 mg päärynäkolveihin kolmena rinnakkaisena näytteenä. Näytteet kuivattiin vakuumiuunissa (Salvislab, Sveitsi) 30 min ajan 30 °C:ssa. Kuivattuihin näytteisiin lisättiin täyspipetillä 2 ml metanolyysi-reagenssia (2 M HCl metanolissa (Sigma, USA) ja näytteet vietiin viiden tunnin ajaksi 100 °C:n lämpötilaan (Thermals). Näytteiden annettiin jäähtyä ja ne neutralisoitiin 100 µl:lla pyridiiniä. Sitten ne siirrettiin kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloihin ja laimennettiin metanolilla. Laimennetut näytteet siirrettiin Falcon-putkiin ja säilytettiin -20 °C:ssa.

Laimennettuja näytteitä pipetoitiin 600 µl 10 ml:n KIMAX-putkiin silylointia varten. Standardeja pipetoitiin taulukon 2 mukaisesti standardisuoraa varten. Näytteisiin lisättiin 250 µl sorbitolia, joka toimi sisäisenä standardina. Tämän avulla voitiin tarkistaa silyloinnin onnistuminen. Näytteistä haihdutettiin metanoli typpihaihduttimella (Pierce, USA) 50 °C:ssa. Sitten näytteisiin lisättiin 100 µl pyridiiniä ja 100 µl tuoretta silylointireagenssia, (1:99 trimetyylisilylikloridi (Fluka):Bistrimetyylisilylitrifluoroaset-amidi (Merck)). KIMAX-putket suljettiin huolella ja vietiin 60 °C:seen lämpökaappiin (Horo, Saksa) 30 minuutin ajaksi. Näytteet haihdutettiin kuiviksi typpihaihduttajalla (Pierce, USA) 50 °C:ssa, jonka jälkeen ne liuotettiin 1 ml:aan heptaania. Näytteet sekoitettiin koeputkisekoittajalla ja suodatettiin GC-vialeihin ruiskusuodattimella (GHP 13 mm filteri, 0,45 µm, VWR, USA).

Taulukko 2. Monosakkaridianalyysiin pipetoidut näytemäärät standardiaineita. Ara = arabinoosi, Xyl = ksyloosi, Rha = ramnoosi, Gal = galaktoosi, Man = mannoosi, GalA= galakturonihappo, GlcA = glukuronihappo

TASO	Ara μl	Xyl μl	Rha μl	Gal μl	Glc μl	Man μl	GalA μl	GlcA μl
1	5	50	5	5	5	5	5	10
2	10	150	10	10	10	10	10	20
3	15	250	15	15	15	15	15	30
4	20	350	20	20	20	20	20	40
5	25	450	25	25	25	25	25	50

GC-ajo

Käytetty laitteisto oli GC-FID (Agilent 6890N, Santa Clara, CA, USA / Chemstation 06). Näytteensyöttäjän lämpötila oli 250 °C, heliumin paine 0,99 bar, split-suhde 20:1, split virtaus 16 ml minuutissa, kokonaisvirtaus oli 20,2 ml/min ja injektio-tilavuus 1 μl . Kolonnina oli DB-1 (pituus 30 m, kalvon paksuus 0,25 μm , halkaisija 250 μm), jonka nimellinen esi- virtaus oli 0,8 ml/min, keskimääräinen nopeus 25 cm/s ja heliumin paine 0,99 bar. Uunin lämpöohjelma oli: 150 °C kolmen minuutin ajan, minkä jälkeen lämpötila nousi 2 °C/min 186 °C:seen. Tämän jälkeen 1 celsiusastetta minuutissa 200 °C:seen ja lopuksi vielä 20 celsiusastetta minuutissa nopeudella nousu 300 °C:een. Yhteensä ajoajaksi tuli 40 min. Ilmaisimen lämpötila oli 280 °C, vety virtasi 30 ml/min, ilmavirtaus oli 400 ml/min ja heliumin virtaus oli 25 ml/min.

Tulosten laskeminen

Tuloksia varten tarkasteltiin standardien kromatogrammeja. Jokaisesta yhdisteestä erottui 2–6 erillistä piikkiä riippuen konformaatiomuodoista. Osa piikeistä eluoitui osittain päällekkäin, jolloin niiden pinta-aloja ei voinut käyttää. Hylättyjä piikkejä olivat GlcA3, GalA3, Man3, Gal2 ja Gal3. Loppujen saman monosakkaridin muodostamien piikkien pinta-alat laskettiin yhteen, jonka avulla piirrettiin standardisuorat pinta-aloista ja pitoisuuksista. Sorbitolin pinta-alan vertailulla varmistettiin, että kaikki näytteet olivat silyloituneet. MeGlcA:lle ei ollut omaa kaupallista standardiainetta, joten sen pitoisuuden määrittämiseksi käytettiin GlcA:n standardisuoraa. Eluointiajan tarkistamiseen käytettiin aikaisemmassa tutkimuksessa koivusta eristettyä meGlcA:ta, jota oli säilytetty –18 °C:ssa (Chong ym. 2013). MeGlcA:n standardisuoraksi paras mahdollinen olisi ollut neljällä GlcA:n piikillä muodostettu standardisuora, mutta koska GlcA3:n suurin piikki eluoitui osittain päällekkäin Man3:n piikin kanssa, käytettiin vain kahta suurinta piikkiä standardisuoran määrittämiseen. Tämän takia saadut tulokset voivat olla hiukan todellisuutta suuremmat (Chong ym. 2013).

3.2.6 Fenolisten yhdisteiden määrittäminen

Fenolisten yhdisteiden analyysi perustui Kyllin ym. (2011) validoimaan menetelmään, jota oli sovellettu jo tässä tutkimusryhmässä (Lehtonen ym. 2016). Menetelmää vielä muokattiin Lahtisen ym. (2019) mukaisesti, mutta kaikki GX-näytteet eivät saostuneet, minkä takia tutkimuksessa käytetty menetelmä eroaa siltä osin Lahtisen ym. (2019) esittämästä menetelmästä.

Fenoliset yhdisteet määritettiin sekä alkuperäisestä materiaalista että emulsiosta. Kuivaa GX-näytettä punnittiin tarkasti 25 mg 10 ml:n KIMAX-putkiin. Yhtä rinnakkaista näytettä kohden punnittiin aina kolme näytettä, joista yhtä ei käsitelty (N), toinen happohydrolysoitiin (A) ja viimeinen emäshydrolysoitiin (B). Analyysit suoritettiin kolmella rinnakkaisella näytteellä näillä kaikilla eri käsittelyillä. Aluksi näytteet saostettiin lisäämällä 1 ml 80-prosenttista etanoliliuosta (AAS). Näytettä sentrifugoitiin 10 min ajan 3000 g:n voimalla huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen etanoli kerättiin 50 ml:n haihdutuskolviin. Jotta kaikki etanoliliukoiset fenoliset yhdisteet saatiin kerättyä, toistettiin saostus ja sentrifugointi kolme kertaa. Tämän jälkeen kolveissa olleet näytteet haihdutettiin kuiviksi pyöröhaihduttimella (Heidolph, Saksa).

Emulsioille tehtiin kohdassa 3.2.4 kohdassa esitetty käsittely faasien erottamiseksi. Sekä kermaa että jatkuvaa faasia punnittiin tarkasti 1 ml. GX:n saostamiseksi näytteisiin lisättiin 4 ml 80-prosenttista etanoliliuosta. Tämän jälkeen rasvajäämät poistettiin uuttamalla näytteet 3 kertaa 5 ml:lla iso-oktaania. Välissä näytteet sentrifugoitiin 10 min 3000 g:n voimalla. GX ei saostunut tuntemattomasta syystä, joten etanolijae kerättiin sellaisenaan 50 ml:n kolviin. Iso-oktaani kerättiin 200 ml:n kolviin ja siitä tarkistettiin, etteivät tutkittavat fenoliset yhdisteet poistu sen mukana. Tämän jälkeen kolveissa olleet näytteet haihdutettiin kuiviksi pyöröhaihduttimella (Heidolph, Saksa).

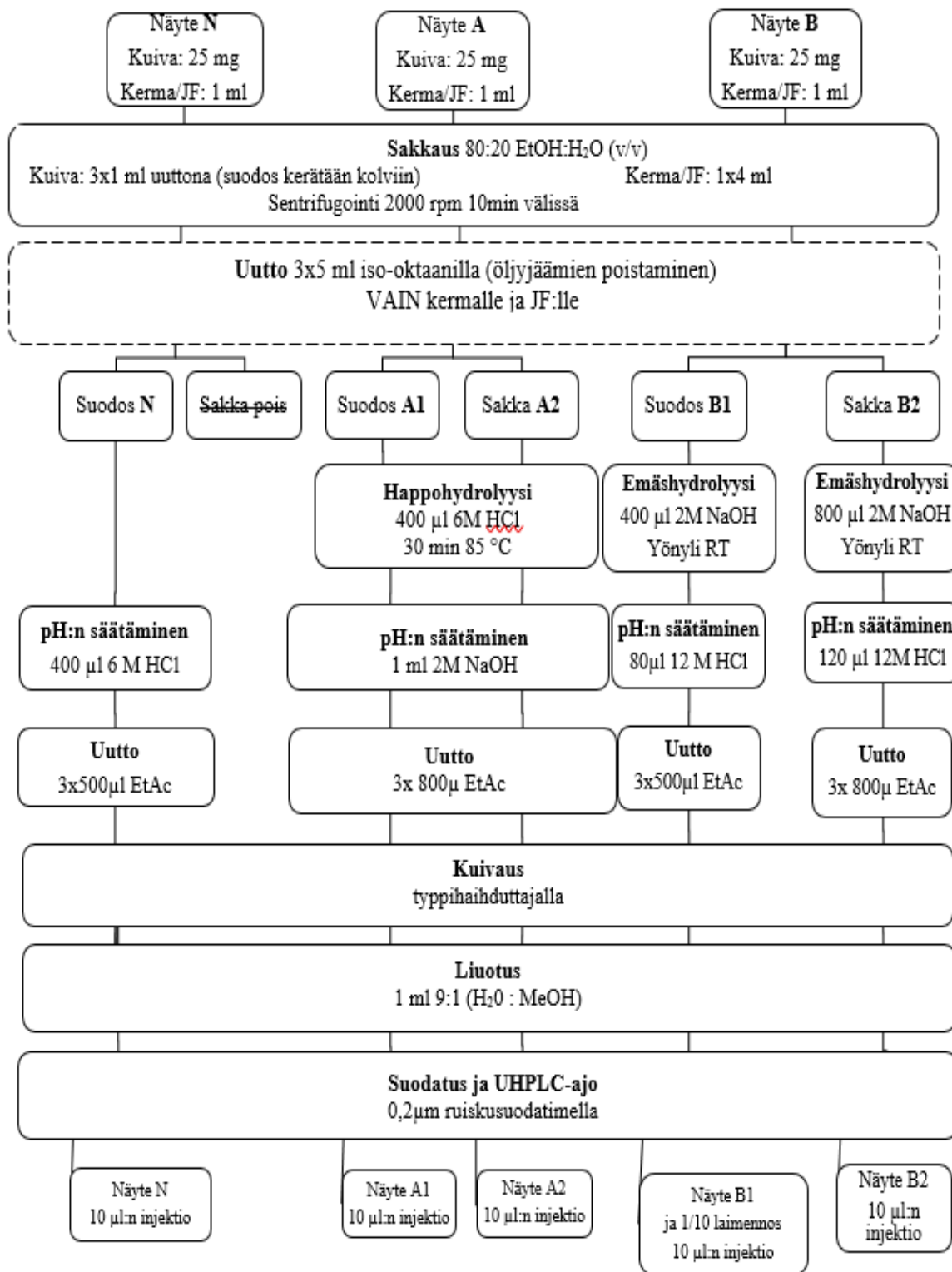
Neutraalin fraktion (N) pH säädettiin lisäämällä 400 µl 6 M suolahappoa. Emäshydrolysoitaviin B-näytteisiin lisättiin 400 tai 800 µl 1 M natriumhydroksia. Nämä näytteet jätettiin huoneenlämpötilaan magneettisekoittajaan yön yli. Aamulla (n. 16–17 tunnin jälkeen) reaktiot lopetettiin säätämällä pH 2:een lisäämällä 80 tai 120 µl 12 M suolahappoa. Jotta voitiin varmistua pH:n säädön onnistuneen, mitattiin saman käsittelyn saaneen kontrollinäytteen pH

pH-paperin tarkkuudella (Merck). Emulsioista saatuihin näytteisiin lisättiin tämän arvion takia vielä 80 µl 12 M suolahappoa.

Happohydrolysoitaviin näytteisiin lisättiin 400 µl 6 M suolahappoa. Näytteet jätettiin ravistelevaan 85 °C:een vesihateeseen 30 min:n ajaksi. Sitten näytteet nostettiin jäähtymään pöydälle ja lisättiin 1 ml 2 M natriumhydroksidia, jotta saavutettiin pH 2.

Kuivattu iso-oktaanijae sisälsi öljyä. Siitä uutettiin 6 M suolahapolla (3 x 400 µl) mahdolliset fenoliset yhdisteet ja nämä kerättiin 8 ml:n KIMAX-putkeen. Tämä näyte uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 800 µl) ja käsiteltiin, kuten muutkin näytteet.

Kun kaikkien näytteiden (N, A, B) pH oli säädetty arvoon 2, kerättiin niistä vapautuneet fenoliset yhdisteet uuttamalla 3 x 500–800 µl etyyliasetaatilla 8 ml:n KIMAX-putkissa. Etyyliasetaatifraktio pinnalta kerättiin eppendorf-putkiin. Etyyliasetaatia haihdutettiin typpihaihduttimella (Pierce, USA) 30 °C:ssa ja jäännös liuotettiin 1 ml:aan vesi-metanoliliuosta (9:1). Näytteet suodatettiin ruiskusuodattimella (13 mm:n suodatin, 0,2 µm:n PTFE-membraani, VWR, USA) HPLC-vialeihin (Supelco, USA), minkä jälkeen ne olivat valmiina nestekromatografiseen ajoon. Käsitely on vielä havainnollistettu kuvassa 8.



Kuva 8. Fenolisten yhdisteiden nestekromatografista analyysia varten tehdyt esikäsittelyt. Neutraali fraktio (N) kuvaa vapaiden fenolisten yhdisteiden määrää, happohydrolyysillä käsitelty näyte A kuvaa glykosidisidoksilla sitoutuneita fenolisia yhdisteitä ja emäshydrolyysillä (B) saadut näytteet esterisidoksilla. JF = jatkuva faasi, HCl = suolahappo, NaOH = natriumhydroksi, EtAc = etyyliasetatti

Standardien valmistaminen

Lahtinen ym. (2019) analysoivat GX:n merkittävien fenolisten yhdisteiden olevan vanilliinia ja syringaldehydiä. Tämän takia standardiliuoksia varten punnittiin tarkasti n. 10 mg vanilliinia (Sigma-Aldrich, USA) ja 10 mg syringaldehydiä (Sigma-Aldrich, USA) 5 ml:n mittapulloon. Mittapullo täytettiin merkkiin 9:1 vesi-metanoliliuoksella. Mittapulloista otettiin täyspipetillä 1 ml 10 ml:n mittapulloon, joka täytettiin merkkiin samalla vesi-metanoliliuoksella. Tästä tehtiin ajoa varten laimennossarja. Ensin laimennettiin 1/120-liuos, mistä laimennettiin 1/240 ja vielä 1/480 alkuperäiseen liuokseen nähden. Näistä eri laimennoksista injektioitiin 1, 2,5 ja 5 µl injektiot.

UHPLC-DAD-FLD

Näytteet analysoitiin UHPLC-laitteistolla (Aquity UPLC, Waters USA). Kolonnina oli Acquity UPLC HSS T3 C18 -kolonni (2,1 mm x 150 mm, partikkelikoko 1,8 µm (Waters, USA)). Ajossa näytteesyöttäjän lämpötila oli 10 °C ja kolonniuunin 40 °C. Ajoliuoksia oli kaksi: ajoliuos A (0,5 % muurahaishappoa vedessä) ja ajoliuos B (0,5 % muurahaishappoa asetonitrilissä). Ajo kesti 30 min, jonka aikana B-ajoliuoksen osuus muutettiin 0 %:sta 64 %:iin virtausnopeuden ollessa 0,5 ml/min. Erottavat yhdisteet havaittiin sekä UV- että fluoresenssi-ilmaisimella. UV-ilmaisimella havainnoidaan aallonpituuksilla 200–600 nm ja fluoresenssidetektiossa käytettiin viritysaallonpitoisuutta 280 nm ja emissioaallonpitoisuutta 325 nm.

Fenolisia yhdisteitä tunnistettiin myös massaspektrometrisesti. Edellisessä kappaleessa kuvattu UHPLC-laitteisto kytkettiin Waters Synapt G2-Si -massaspektrometriin, jonka ionosointilähde oli LockSpray Exact Mass Ionization Source. LC-MS-spektri käsiteltiin MassLynx 4.1 -ohjelmistolla, joka käyttää leusiinienkefaliinille lukitsemismassa-arvoa 556,2771 (m/z: [M+H]⁺ + e⁻). Vanilliinia ja syringaldehydiä käytettiin standardina suurimpien piikkien tunnistamiseen. Furfuraaliksi tunnistettiin happohydrolyysissä suuri piikki vertaamalla sitä standardiaineeseen. Vanilliinille käytettiin massa-arvoa 153,0552 m/z [M+H]⁺ (C₈H₉O₃ + e⁻ vastaa arvoa 153,0552), syringaldehydille käytettiin massa-arvoa 183,0657 m/z [M+H]⁺ (C₉H₁₁O₄ + e⁻ vastaa arvoa 183,0657) ja furfuraalille käytettiin massa-arvoa 97,085 m/z [M+H]⁺ (C₅H₄O₂ + e⁻ vastaa arvoa 97,085).

Tulosten laskeminen

Standardisuoria varten vanilliinia ja syringaldehydille injetointiin kaikilla kolmella laimennoksella (1/120, 1/240 ja 1/480) ja kolmella eri injektioilavuudella (1, 2,5 ja 5 µl). Koska haluttiin varmistua, ettei injektioilavuus vaikuttanut standardisuoriin, tarkasteltiin jokaisella injektioilavuudella laskettuja kolmen pisteen suoria, jotka muodostuivat laimennossarjasta. Tulokset laskettiin pinta-alan mukaan 5 µl:n injektioista saaduilla standardisuorilla, koska ne kattoivat mittausalueen ja olivat lineaarisia mittausalueella.

Tulosten tilastollinen käsittely

Tuloksissa ei syntynyt vertailtavaa dataa, jonka tilastollisesti merkitseviä eroavaisuuksia voitaisiin arvioida tilastoanalyysillä. Myös käytetyt materiaalit olivat hyvin heterogeenisiä, mikä aiheuttaa suurta hajontaa tulosten välille. Kaikille tuloksille laskettiin keskihajonta ja variaatiokerroin, jotta tuloksien luotettavuutta voitiin arvioida.

3.2.7 Varastointikoe

Varastointikoe suoritettiin esikokeena ennen tutkimuksen aloittamista. Siinä seurattiin emulsioiden fysikaalista ja kemiallista pysyvyyttä. Koe oli osa erillistä tutkimusasetelmaa, jossa tutkittiin hemiselluloosiin sitoutuneen ligniinin vaikutusta emulsion pysyvyyteen (Lahtinen ym. 2019). Emulsiot valmistettiin kuten esitetty kohdassa 3.2.3 ja tämän jälkeen niitä säilytettiin valolta suojattuna 40 °C:ssa. Mittaukset suoritettiin 1–2 viikon välein kolmen kuukauden ajan.

Fysikaalinen pysyvyys

Pysyvyyttä tutkittiin pääasiallisesti seuraamalla pisarakokojakaumaa. Pisarakokojakaumaa mitattiin Mastersizer Hydro 3000:lla (Malvern Instruments, Iso-Britannia), joka perustuu valonsirontaan pisaroiden pinnalta. Ohjelman taitekertoimet olivat 1,33 vedelle ja 1,47 rypsiöljylle. Emulsionäytteet lisättiin suoraan näytteensyöttäjään jatkuvasti sekoittaen (2400 rpm). Mittausten tulokset olivat keskiarvo kolmesta rinnakkaisesta mittauksesta.

Kemiallinen pysyvyys

Kemiallista pysyvyyttä tarkkailtiin primaarihapettumisen kautta mittaamalla emulsioiden peroksidiluku ferritiosyanaattimenetelmällä. Emulsiota sekoitettiin, jonka jälkeen siitä punnittiin tarkasti 500 mg. Emulsiosta otettiin kaksi rinnakkaista näytettä. Emulsion rakenteen hajottamiseksi putkiin lisättiin 2 ml etanolia (AAS) ja sekoitettiin koeputkisekoittajassa. Öljy- ja erotettiin lisäämällä 2,0 ml iso-oktaania täyspipetillä ja kääntelemällä putkia minuutin ajan. Iso-oktaaniajatta pipetoitiin näyteputkiin 500 µl. Molemmista rinnakkaisesta iso-oktaanijakeista otettiin kaksi rinnakkaista näytettä, jolloin emulsiota kohden oli neljä näytettä yhteensä. Näyteputkiin lisättiin 9,5 ml liuotinta (metanoli (Fisher), dekanoli (Fisher), heptaanii (Merck) 3:2:1) ja 50 µl 30-prosenttista ammoniumtiosyanaattiliuosta (NH₄SCN) (Sigma). Tämän lisäksi nollanäyte tehtiin kahtena rinnakkaisena lisäämällä 9,5 ml:aan liuotinta 0,5 ml iso-oktaania. Standardisuoran laskemista varten valmistettiin taulukon 3 mukaiset standardinäytteet. Standardisuoran pisteiden mittaamista varten lisättiin 50 µl NH₄SCN-liuosta, minkä jälkeen näytteet mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä tasan 5 minuutin kuluttua. Näytteiden mittaamista varten lisättiin 50 µl Fe(II)Cl₂-liuosta (4 mg/ml 3,5 %:ssa suolahapossa (Fluka)) ja näyteliuosten absorbanssi mitattiin myös tasan 5 min jälkeen.

Taulukko 3. Peroksidilukumittauksen standardinäytteisiin pipetoidut rauta(III)kloridiliuoksen (FeCl₃) ja suolahapon määrä (HCl) sekä paljon pipetoitu rauta(III) liuos sisältää ferrirautaa mikrogrammoissa.

	FeCl ₃ -liuos µl	3,5 % HCl µl	Vastaa Fe(III) µg
1	0	200	0
2	25	175	5
3	50	150	10
4	100	100	20
5	150	50	30
6	200	0	40

Tulosten laskeminen

Mitatusta absorbanseista vähennettiin taustakohinan eli ei yhtään rautaa sisältävän liuoksen (taulukosta 3: 0 µg Fe(III)) absorbanssi, minkä jälkeen piirrettiin standardisuora mitattu absorbanssi suhteessa Fe(III)-pitoisuuteen. Tämän avulla laskettiin mitatut peroksidiluvut kaavan 1 mukaisesti.

$$PV \left(\frac{\text{mekv}}{\text{kg}} \right) = \frac{(A_{\text{näyte}} - A_{0\text{-näyte}}) - b}{\frac{a}{n \times M_{\text{Fe}} \times m}}$$

A = mitattu absorbanssi

b = standardisuoran leikkauspiste

a = standardisuoran kulmakerroin

n = siirtyvien elektronien määrä (2 kpl)

M = raudan moolimassa (55,84 g/mol)

m = öljyn määrä näytteessä (g)

$$= \frac{\text{punnittu öljyn määrä (g)}}{\text{näytetilavuus (ml)}}$$

× määritykseen pipetoitu näytemäärä (ml)

(1)

3.2.8 Galkturonihappo rikkaiden fraktioiden eristäminen

Titraus

Ennen fraktiointia pyrittiin selvittämään, ovatko GX:ssa esiintyvät happoryhmät vapaina, jotta niiden avulla olisi mahdollista erottaa neutraalit ja happamat monosakkaridit toisistaan. Valmistettiin GX-liuos, jossa oli kuiva-ainetta 1 %. Liuoksen pH oli 5,5 ja siihen lisättiin 1 ml 0,1 M suolahappoa, jotta saavutettiin pH 2. Tämän jälkeen liuosta titrattiin 0,1 M KOH-liuoksella, kunnes saavutettiin pH 10. Titrauskäyrän avulla määritettiin ekvivalenttipiste ja pKa-arvo.

Pylvään pakkaaminen

GalA-fraktiointia varten sovellettiin neutraalien ja happamien oligosakkaridien erottamista toisistaan anioninvaihtokromatografian avulla. Fraktiointia varten pakattiin XK 26/20 -pylväs (GE Healthcare Life Science) anioninvaihtohartsilla (Dowex 1x2-200, Sigma-Aldrich). Hartsia mitattiin 60 ml mittalasiin ja siihen lisättiin reilusti vettä (Milli-Q®). Välillä sekoittellen hartsin annettiin turvota tunnin ajan. Tämän jälkeen ylimääräinen vesi poistettiin ja lisättiin uutta vettä. Kun hartsi oli laskeutunut pohjalle, poistettiin ylimääräinen vesi tähdäten noin 75-prosenttiseen hartsi-vesiseokseen.

XK 26/20 -pylväs valmistettiin täyttöä varten. Letkuista ja suodattimesta poistettiin ilma työntämällä ruiskulla niiden läpi Milli-Q®-vettä. Putken alaosa kiinnitettiin ja ruiskun avulla sinne lisättiin 20 ml vettä. Putki täytettiin yli puolilleen vettä ja hartsi kaadettiin varovasti

reunoja pitkin. Ruisku poistettiin alaosasta ja veden annettiin valua ulos. Hartsia lisättiin hiljalleen aina ennen kuin pylväs kuivui tai asettui kokonaan. Kun hartsi oli lisätty, täytettiin putki vedellä. Yläosa (josta ilma oli poistettu) liitettiin varovasti, jottei ilmaa jäänyt putkeen. Pylväs pakattiin P50-pumpulla (Amersham Biosciences, Iso-Britannia) käyttäen 2,5 ml/min virtausnopeutta. Yläosan säädin laskettiin hiukan alle hartsin pinnan ja kiristettiin. Lopullinen pylvään tilavuus oli 69 ml, josta laskettiin sitoutuneen veden tilavuuden mukaan tyhjä tilavuus, joka oli noin 20 ml.

Ajoliuosten ja reagenssin valmistaminen

Ajoliuoksiksi käytettiin vettä (Milli-Q®) ja 2 M ammoniumformaattia. Ammoniumformaatti valmistettiin mittaamalla dekanterilasiin 1 l vettä, jota sekoitettiin magneettisekoittajassa. Veteen lisättiin hitaasti 185 ml muurahaishappoa. Seuraavaksi lisättiin hitaasti ammoniakkaa (25-prosenttinen liuos, Merck), kunnes pH 6 saavutettiin. Valmis liuos suodatettiin imusuodatuksella (589/4, Schleicher & Schuell) ja kaasut poistettiin vakuumin avulla imupullossa jatkuvasti sekoittaen magneettisekoittajalla. Samoin käsiteltiin 2 l MilliQ®-vettä.

Sakkaridien nopeaan tunnistukseen jakeista tarvittiin orsinolivärjäysliuosta (2 % (w/v) orsinolia (Sigma, USA) etanoli-vesi-rikkihappoliuoksessa (80:10:10) (etanoli (AA Etax (99,5 %), Altia, Suomi, rikkihappo (90-91%) (J.T. Baker, USA))). Ensin punnittiin tarvittava orsinoli, joka liuotettiin veteen ja etanoliin. Tämän jälkeen jatkuvasti sekoittaen lisättiin hitaasti rikkihappo. Orsinoliliuoksen aiheuttama värireaktio tarkistettiin GX- ja GalA-liuoksilla, joita pipetoitiin TLC-levylle 5 µl. Pisaroiden päälle lisättiin orsinoliliuosta ja TLC-levy vietiin lämpökaappiin 100 °C:n lämpötilaan 10 min ajaksi. Orsinoliliuosta säilytettiin jääkaapissa 4 °C:ssa.

Fraktiointi

Näytteeksi punnittiin 100 mg glukuronoksylaania, joka liuotettiin 50 ml:aan vettä (MilliQ). Näytteen annettiin liuota yön yli magneettisekoittajassa. Näyte sentrifugoitiin (15 000 g 20 minuutin ajan) ja pelletti poistettiin, minkä jälkeen supernatantti suodatettiin ruiskuodattamimella (0,45 µm, GHP Life science).

Kromatografialaitteistosta poistettiin ilma 20-prosenttisen etanoliliuoksen avulla. Järjestelmä puhdistettiin ensin ammoniumformaattilla ja sen jälkeen MilliQ®-vedellä. Veden annettiin virrata 2 ml/min vauhdilla, kunnes johtokykyarvo oli alle 0,1 mSV/cm, jolloin järjestelmä nollattiin. Näyte ladattiin näytteenyöttäjään (superloop) ja injektoitiin 2 ml/min nopeudella pylvääseen. Kun johtokykyarvo nousi hiukan, kerättiin poistuvaa nestettä, koska se sisälsi neutraalit sokerit, jotka eivät sitoutuneet pylvääseen. Kun johtokykyarvo alkoi laskea, tarkistettiin orsinoliliuoksella eluoituiko vielä sokereita. Kun sokereita ei enää vapautunut, aloitettiin sitoutuneiden happamien polysakkaridien vapauttaminen pylväästä. Gradientti ohjelmoitiin muuttumaan 0 ml:sta 800 ml:aan 0 %:sta 20 %:iin ammoniumformaattia, minkä jälkeen 800–900 ml 20–100 % ammoniumformaattia ja sen jälkeen 100 % ammoniumformaattia vielä n. 200 ml. 10 ml:n jakeita (93 kpl) kerättiin yön yli virtausnopeuden ollessa 0,7 ml/min. Ammoniumformaatti puhdistettiin järjestelmästä pois huuhtelemalla MilliQ®-vedellä.

Kustakin 93 eristetystä jakeesta pipetoitiin 5 µl TLC-levylle (60 silikageeli, Merck) ja päälle lisättiin pisara orsinoliliuosta. TLC-levyt vietiin lämpökaappiin 100 °C:n 10min ajaksi, jolloin nähtiin, mihin jakeisiin sokereita oli kertynyt. Positiivinen orsinolireaktio ja fraktioiden reaktioita on esitetty liitteessä 5. Nämä jakeet yhdistettiin yhdeksi näytteeksi, koska näytemäärä olisi jäänyt liian pieneksi analysoitaessa yksittäisiä fraktioita.

Fraktioinnin jälkeen oli edelleen nähtävissä, että pylväässä oli tummaa ainetta sitoutuneena. Tämän arveltiin olevan ligniiniä, minkä takia pylvästä huuhdottiin vielä 50-prosenttisella etanoliliuoksella ja näyte kerättiin talteen (etanolijae). Etanolijae kuivattiin pyöröhaihduttimella. Tämän jälkeen neutraalit sokerit, yhdistetyt fraktiot ja etanolijae pakkaskuivattiin ja niistä analysoitiin fenoliset yhdisteet ja monosakkaridijakauma kuten aikaisemminkin. Näytemäärät olivat niin pieniä, ettei ollut mahdollista tehdä niitä kolmena rinnakkaisena.

3.2.9 Analyysien oikeellisuuden tarkkailu

Monosakkaridianalyysi

Monosakkaridien analyysimenetelmään ei ollut käytössä vertailumateriaalia, millä valvoa analyysien oikeellisuutta. Monosakkaridimenetelmässä käytettiin sekä sisäisen että ulkoisen standardin menetelmää tulosten tarkastamiseksi. Tämän lisäksi standardisuorat määritettiin

useasti ja käytettiin aina uusinta standardisuoraa tulosten laskemiseen. Kaikki näytteet analysoitiin myös kolmena rinnakkaisena mittauksena, jotta variaatiokerroin pystyttiin määrittämään.

Fenolisten yhdisteiden analyysi

Fenolisten yhdisteiden analyysissä ei ollut käytössä vertailumateriaalia, joten menetelmän toistettavuutta tarkasteltiin ajamalla standardisuoraa. Menetelmä oli validoitu fenolihappojen analyysiin, joten tässä työssä tutkittiin myös sen soveltuvuutta määrittää aldehydejä. Tämä tehtiin suorittamalla saantokoe. Matriisina oli GX, johon lisättiin vanilliinia ja syringaldehydiä. GX:iin lisättiin tarkasti mitattu n. 5 µg standardiainetta välilaimennoksen avulla ja saanto laskettiin kolmesta rinnakkaisesta näytteestä (kaava liitteessä 4). Tämän lisäksi laskettiin taustakohinan pinta-ala käyttäen vanilliinin ja syringaldehydinin standardisuoraa, milloin voitiin laskea havaitsemis- ja määrittysrajat (LOD ja LOQ) kertomalla tulos kolmella ja kymmenellä.

Syringaldehydinin ja vanilliinin mittausalueen lineaarisuus tarkistettiin määrittämällä regressiosuora, tarkastelemalla sen selittävyysastetta ja laskemalla jäännösarvot ja arvioimalla jäännösarvokuvaajasta suoran lineaarisuutta (Hägg 2016). Selittävyysasteen tavoite oli olla yli 0,999. Jäännösarvolla tarkoitetaan mitatusta arvosta vähennettyä kalibrointikuvaajaan sovitettua yhtälön laskettua arvoa. Jos jäännösarvot jakautuvat tasaisti negatiiviselle ja positiiviselle puolelle, tukee se suoran lineaarisuutta. Jos pisteet ryhmittyvät toiselle puolelle tai muodostavat kaaren, ei kalibrointisuora ole lineaarinen (Hägg 2016).

3.3 Tulokset

3.3.1 Fenolisten yhdisteiden menetelmä

Piikkien tunnistaminen

Käyttäessä detektioaallonpitoisuutta 280 nm suurimmat piikit olivat vanilliini ja syringaldehydi, jotka tunnistettiin massaspektrometrialla Lahtisen ym. (2019) mukaisesti. Happohydrolysoiduista näytteistä löytyi myös suuria määriä furfuraalia, joka tunnistettiin myös massaspektrometrin avulla. Massaspektrometrin saadut massaspektri on esitetty liitteessä 1.

Muissakin aallonpituuksilla ja fluoresenssidetektorilla havaittuja piikkejä tarkasteltiin, mutta niitä ei tunnistettu.

Menetelmän tarkastelu

Menetelmän toimivuutta aldehydejä tutkittaessa otettiin huomioon saanto, menetelmän lineaarisuus, LOD ja LOQ. Menetelmä oli validoitu jo fenolihapoille, joten tässä työssä tutkittiin sen sopivuutta aldehydeille. Saantoprosentit olivat melko alhaiset näytteille N ja A, mutta B-näytteen saanto syringaldehydille oli hyvin korkea ja hajonta oli suurta (taulukko 4).

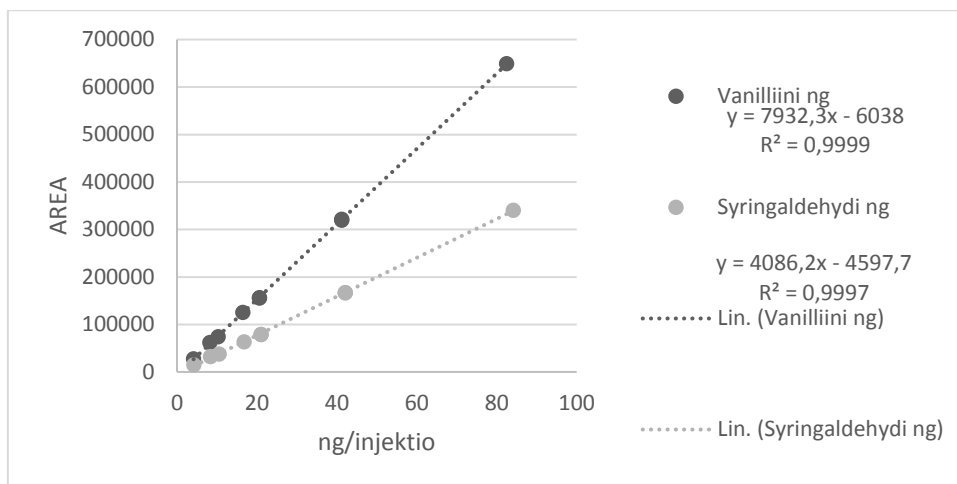
Taulukko 4. GX-matriisille tehdyn saantokokeen tulokset saantoprosentteina. N = neutraalit fenoliset yhdisteet, A = happohydrolyysissä vapautuneet fenoliset yhdisteet ja B = emäshydrolyysissä vapautuneet fenoliset yhdisteet. % = saantoprosenttien keskiarvo STDV = keskihajonta.

Näyte	Vanilliini (%±STDV)	Syringaldehydi (%±STDV)
N	64,2±3,8	76,0±16,2
A	26,2±22,6	29,2
B	83,8	161

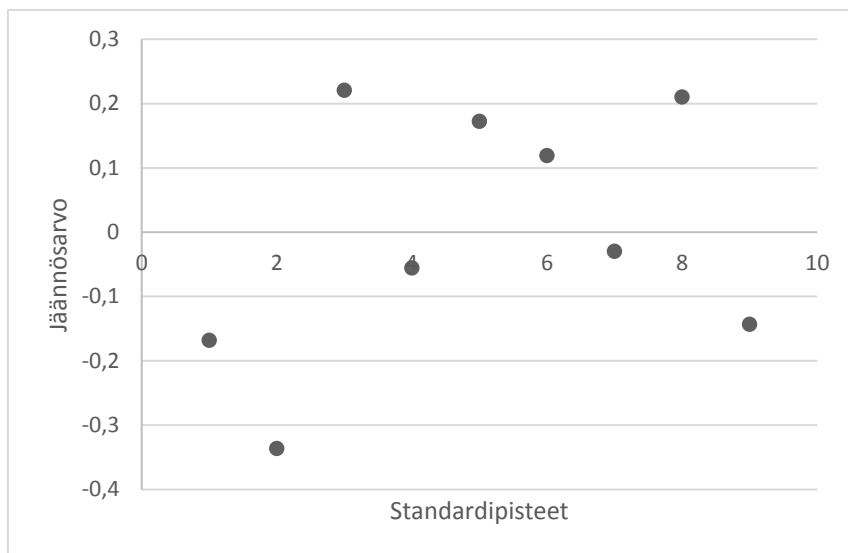
Taulukko 5. Vanilliinille ja syringaldehydille määritetyt LOD (limit of detection) ja LOQ (limit of quantification)

	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Vanilliini	0,074±0,019	0,092±0,020
Syringaldehydi	0,063±0,038	0,10±0,013

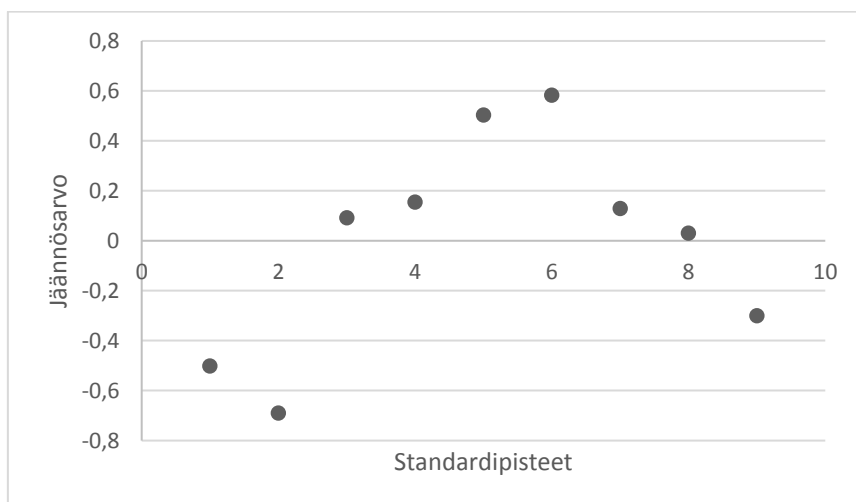
Havaitsemis- ja määrittämissrajat olivat alhaisia ja analysoidut pitoisuudet olivat niitä suurempia, joten menetelmä sopi tutkituille pitoisuuksille. Menetelmä oli lineaarinen suurella pitoisuusalueella vanilliinin osalta (taulukko 5 sekä kuvat 9 ja 10). Selitysaste (R^2) oli erinomainen ja jäännöskuvaajassa arvot hajautuivat negatiivisiin ja positiivisiin arvoihin, mikä vahvistaa mittausalueen olevan lineaarinen. Sen sijaan syringaldehydin selitysaste (R^2) oli riittävän hyvä, mutta jäännöskuvaajan mukaan suorassa on kaarevuutta, koska pienet ja isot arvot olivat negatiivisia, mutta keskellä olevat olivat positiivisia (kuva 9 ja kuva 11). Tämän takia syringaldehydin pitoisuutta laskettaessa oli erityisen tärkeää käyttää pienemmän mittausalueen standardisuoraa, jonka todettiin olevan lineaarinen.



Kuva 9. Fenolisten yhdisteiden (vanilliini ja syringaldehydi) nestekromatografisella menetelmällä määritetty standardisuora. Mittausalueen lineaarisuutta tarkasteltiin fenolisten yhdisteiden vanilliinin ja syringaldehydinin mittausteillä



Kuva 10. Fenolisten yhdisteiden analyysissä määritetyn vanilliinin standardisuoran jäännöskuvaaja



Kuva 11. Fenolisten yhdisteiden analyysissä määritetyn syringaldehydinin standardisuoran lineaarisuuden arviointia varten piirretty jäännösarvokuvaaja

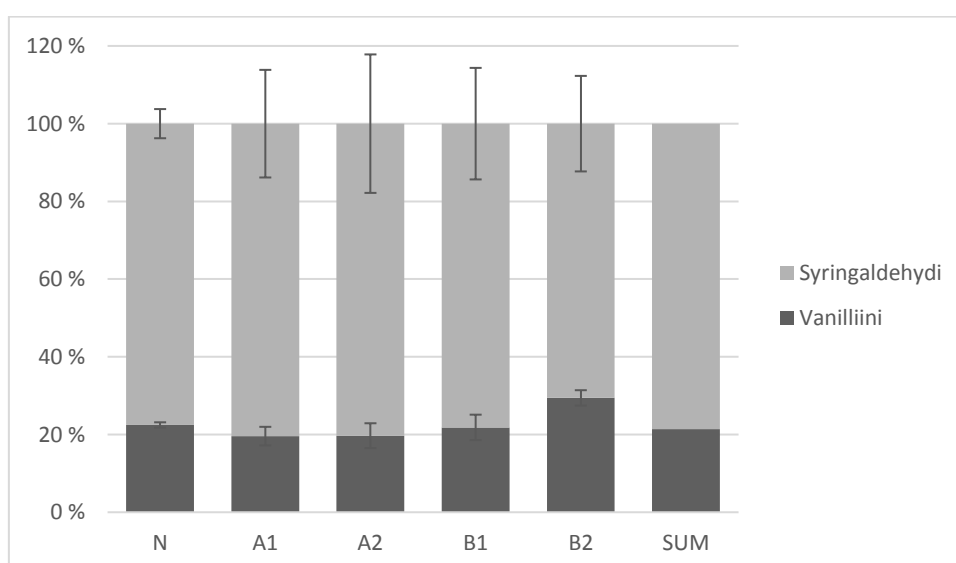
3.3.2 Glukuronoksyylaatin karakterisointi

GX:n monosakkaridijakauman mukaan tärkeimmät monosakkaridit olivat ksylaani ja metyyli-glukoronihappo (taulukko 6). Muiden monosakkaridien pitoisuudet olivat pieniä ja glukoronihappoa ei pystytty määrittämään ollenkaan. Monosakkaridit muodostivat tämän perusteella n. 61 % koko näytteen massasta. GX:n monosakkaridien muodostama kromatogrammi on esitetty liitteessä 2.

Taulukko 6. GX:n monosakkaridijakauma määritettynä kaasukromatografisesti mg/g näytettä. (Ara = arabiinosisi, Xyl = ksyloosi, Rha = ramnoosi, Gal = galaktoosi, Glc = glukoosi, Man = mannoosi, GalA = galakturonihappo, GlcA = glukoronihappo, meGlcA = metyyli-glukoronihappo, KA = keskiarvo 3 rinnakkaisesta näytteestä, STDV = keskihajonta, CV% = variaatiokerroin)

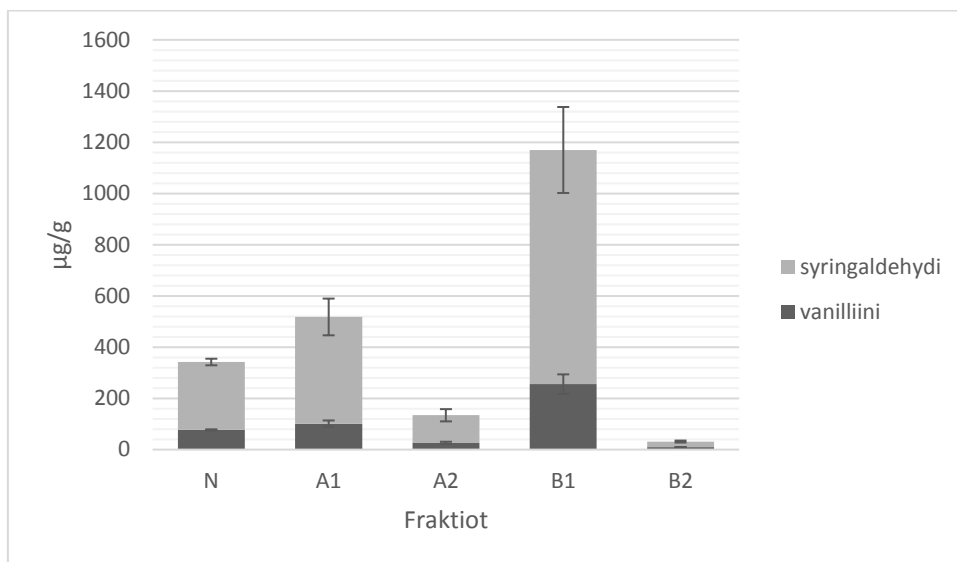
	Ara mg/g	Xyl mg/g	Rha mg/g	Gal mg/g	Glc mg/g	Man mg/g	GalA mg/g	GlcA mg/g	meGlcA mg/g	Sum mg/g
KA	2,2	495,9	7,7	13,5	13,3	18,1	11,2	ND	48,6	610,5
STDV	0,12	3,24	0,15	0,34	0,15	0,05	0,12		0,37	
CV%	5,32	0,65	1,90	2,51	1,15	0,29	1,10		0,76	

GX-näytteessä suurin osa fenolisista yhdisteistä oli syringaldehydiä ja vanilliinia. Kun suhteutettiin pitoisuudet näytteiden massoihin, niiden jakauma oli kaikissa näytteissä samankaltainen. Noin 20 % fenolisista yhdisteistä oli vanilliinia ja loppu oli syringaldehydiä (kuva 12).



Kuva 12. GX-näytteen fenolisten yhdisteiden suhteellinen jakauma (N = vapaat fenoliset yhdisteet, A1 = etanoliliukoiset glykosididisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet, A2 = glykosididisidoksilla sitoutuneet yhdisteet, B1 = etanoliliukoiset esterisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet, B2 = etanolisakkaantuneet fenoliset yhdisteet)

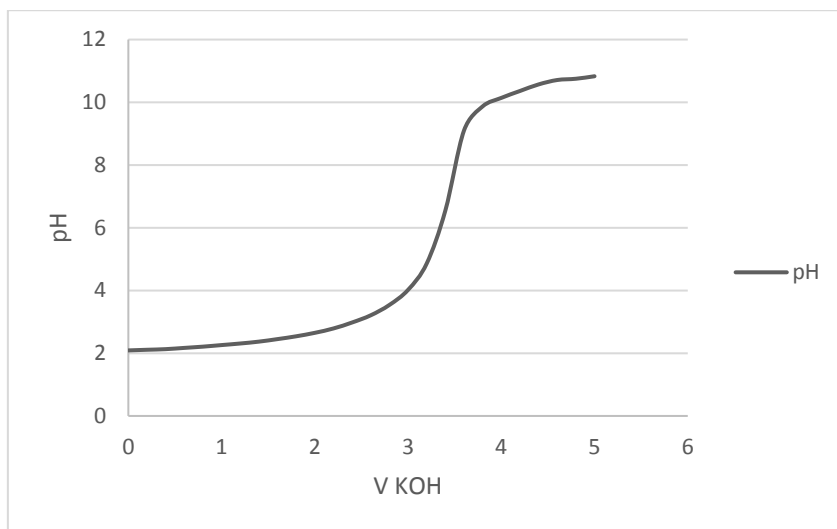
Määrällisesti fenolisia yhdisteitä oli ylivoimaisesti eniten B1-näytteessä, joka oli käsitelty sisältämään esterisidoksilla sitoutuneita etanoliliukoisia fenolisia yhdisteitä (kuva 13). Myös vapaita (N) ja glykosidisidoksilla sitoutuneita fenolisia yhdisteitä oli paljon (A1) (kuva 13). Suodoksissa (A1 ja B1) oli selvästi enemmän fenolisia yhdisteitä kuin saoksissa (A2 ja B2).



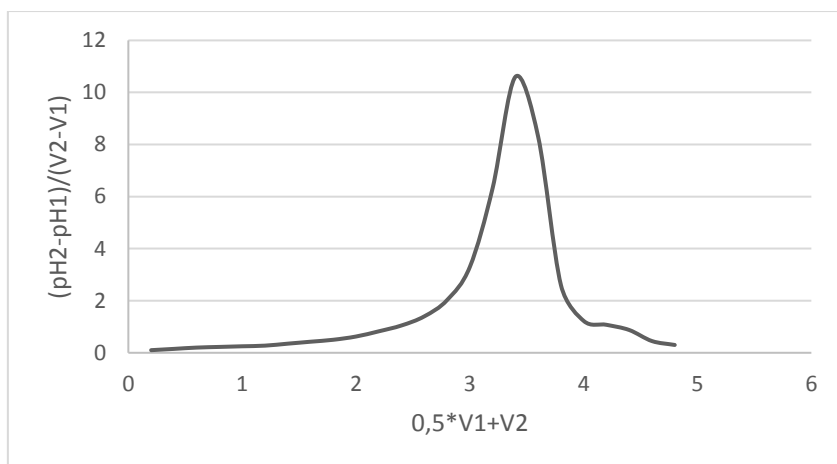
Kuva 13. Fenolisten yhdisteiden määrät µg/g näytettä (N = vapaat fenoliset yhdisteet, A1 = etanoliliukoiset glykosidisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet, A2 = etanoliin liukenemattomat glykosidisidoksilla sitoutuneet yhdisteet, B1 = etanoliliukoiset esterisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet, B2 = etanoliin liukenemattomat esterisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet)

GalA:n fraktiointi

Aluksi tehdystä titrauksesta saatiin GX-liuoksen titrauskäyrä. Tästä laskettuna GX-liuoksen isoelektroniseksi pisteeksi laskettiin 6,55 käyttäen hyödyksi titrauskäyrää ja sen derivaattaa (kuvat 14 ja 15). Tästä laskettuna liuoksen pKa-arvo oli 2,5 (kaavat liite 4).

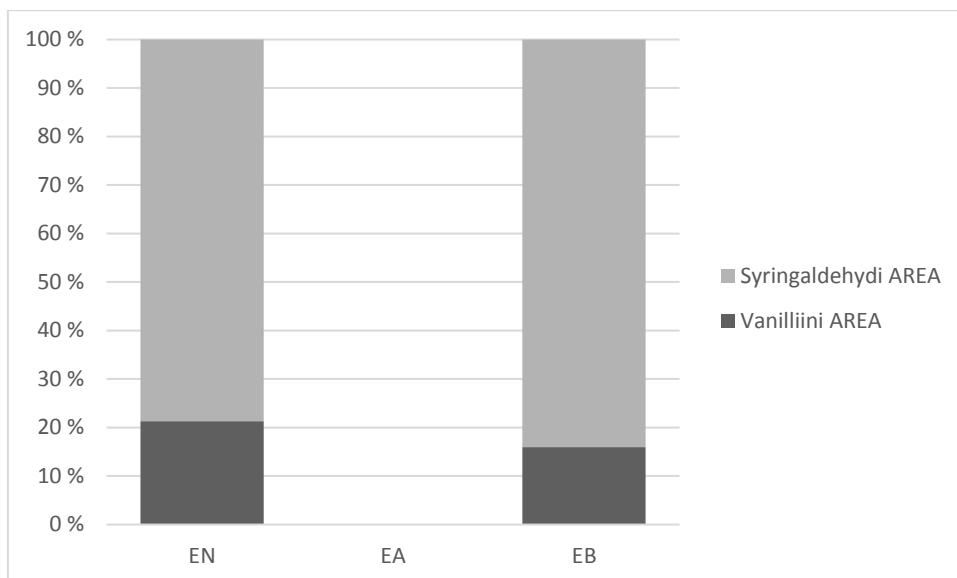


Kuva 14. 1%:sen GX-liuoksen titrauskäyrä titrattuna 0,1 M KOH-liuoksella



Kuva 15. GX-liuoksen titrauskäyrän derivaatan kuvaaja

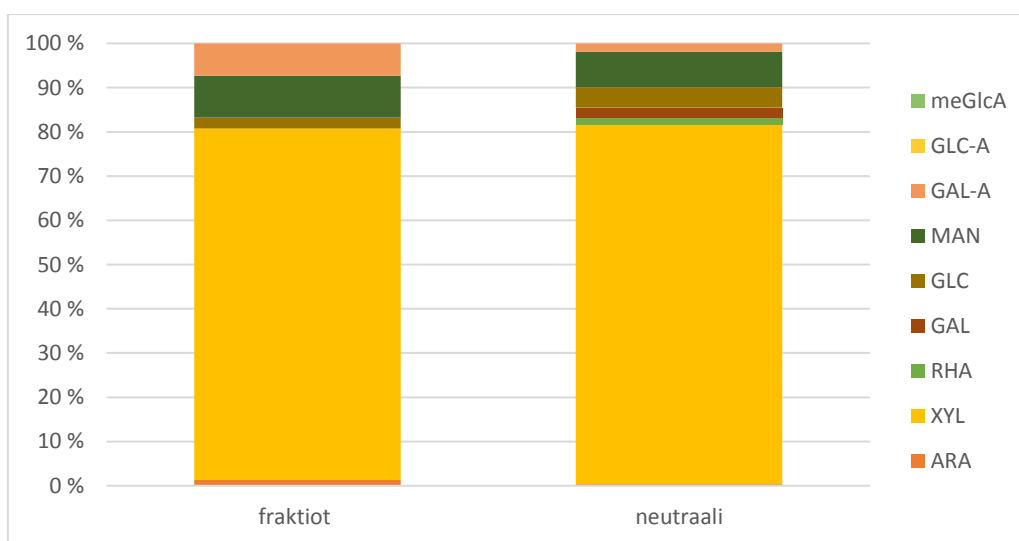
Tuloksissa ei ole hajontaa merkittävästi, koska näytteet tehtiin vain yhdellä rinnakkaisella. Monosakkaridianalyysin tuloksia ei saatu etanolifraktiosta, koska näytteen esikäsittely epäonnistui eikä näytettä ollut käytettävissä enempää. Fenolisia yhdisteitä löytyi vain etanolifraktiosta. Suurin osa fenolisista yhdisteistä oli sitoutunut esterisidoksilla (B-näyte), mutta syringaldehydin ja vaniliinin suhde oli hyvin samanlainen kaikissa jakeissa (kuva 16). Monosakkaridijakauman mukaan GalA:ta oli suhteessa enemmän fraktioissa, mutta pienten näytemäärien takia tulos ei välttämättä ole luotettava (taulukko 7 ja kuva 17).



Kuva 16. GX:n fraktioinnista saatu etanoliliukaisen jakeen fenolisten yhdisteiden jakauma. EN=vapaat fenoliset yhdisteet, EA= glykosididisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet, EB= esteridisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet. Näytteestä ei löytynyt glykosididisidoksilla sitoutuneita fenolisia yhdisteitä

Taulukko 7. GX:n fraktioinnista happamiin, neutraaleihin ja etanoliliukoiisiin saatujen jakeiden monosakkariiditulokset. (Ara = arabinoosi, Xyl = ksyloosi, Rha = ramnoosi, Gal = galaktoosi, Glc = glukoosi, Man = mannoosi, GalA = galakturonihappo, GlcA = glukoronihappo, meGlcA = metyyli-glukoronihappo)

Näyte	Ara mg/g	Xyl mg/g	Rha mg/g	Gal mg/g	Glc mg/g	Man mg/g	GalA mg/g	GlcA mg/g	meGlcA mg/g	SUM mg/g
Etanoli liukoiset	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Happamat	1,1	64,8	N/D	N/D	2,0	7,7	5,9	N/D	N/D	81,6
Neutraalit	1,6	359,3	7,2	9,8	20,5	35,5	8,3	N/D	N/D	442,3

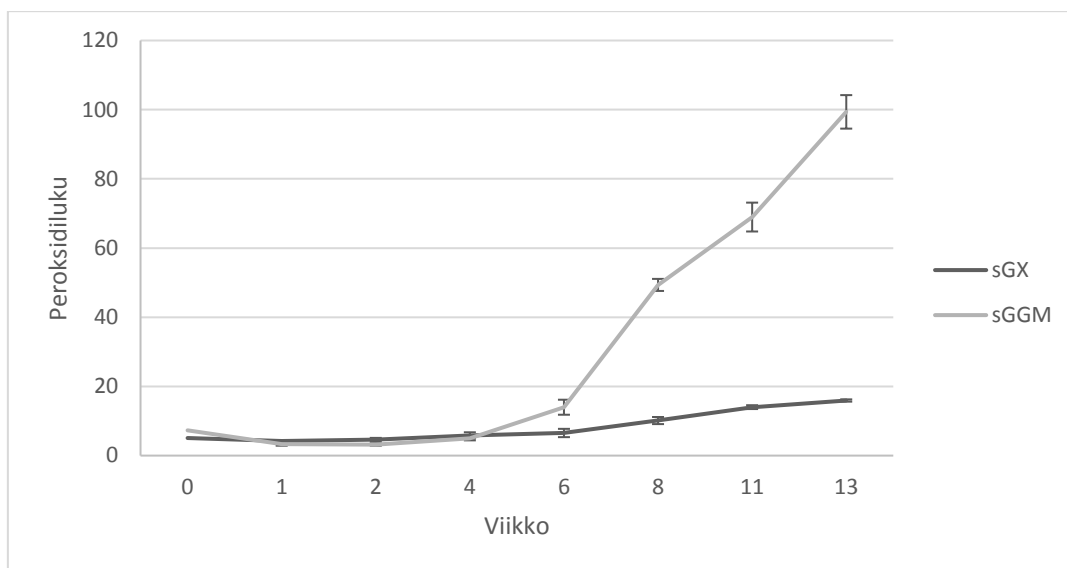


Kuva 17. GX:n fraktioinnista happamiin, neutraaleihin ja etanoliliukoiisiin saatujen jakeiden monosakkariidijakauma fraktiot- ja neutraalijakeessa ARA= arabinoosi, XYL = ksyloosi, RHA = rhamnoosi, GAL = galaktoosi, GLC = glukoosi, MAN=mannoosi, GAL-A = galakturonihappo, GLC-A = glukoronihappo, meGlcA = metyyli-glukoronihappo

3.3.3 Emulsion pysyvyys sekä koostumus

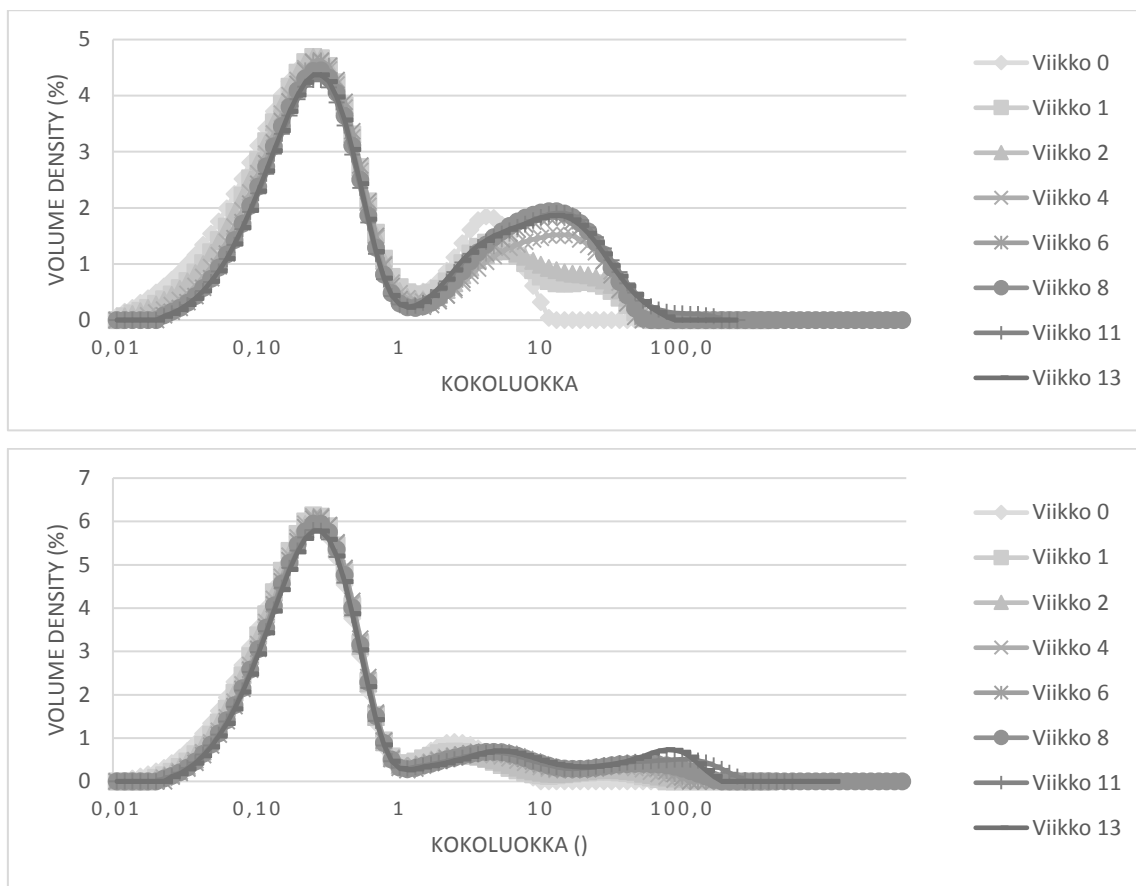
Pysyvyys

Esikokeena tehtyjen emulsion stabiilisuuskokeiden mukaan GX oli kemiallisesti pysyvämpi kuin GGM. GX:n stabiloiman emulsion öljyn peroksidiluku ei kolmen kuukauden aikana noussut yli 20:n, kun taas GGM:n peroksidiluku kasvoi nopeasti kahden kuukauden säilytyksen jälkeen (kuva 18).



Kuva 18. GX- ja GGM-emulsioiden öljyn peroksidiluvun muutos 13 viikon aikana

GGM:lla stabiloidun emulsion pisarakokojakaumassa pieniä (halkaisijaltaan $<1 \mu\text{m}$) pisaroita oli koko mittausajan eniten. Suurempia pisaroita kehittyi hiljalleen. GX:lla stabiloidun emulsion pisarakokojakaumassa oli koko mittausajan aikana nähtävänä pienien pisaroiden ja suurempien pisaroiden välinen selvä jako. Suuret pisarat kasvoivat entisestään mittausten aikana selvästi (kuva 19 ja taulukko 8).



Kuva 19. GX- (ylhällä) ja GGM-emulsioiden (alhaalla) pisarakokojakaumien muutos 13 viikon aikana

Taulukko 8. GGM- ja GX-emulsioiden pisarakoot 13 viikon aikana. $D_x(10)$ = 10 % pisaroista ovat tätä pienempiä, $D_x(50)$ = 50 % pisaroista on tätä pienempiä $D_x(90)$ = 90 % pisaroista ovat tätä pienempiä, $D[4,3]$ = tilavuudella painotettu keskiarvo, $D[3,2]$ = pinta-alalla painotettu keskiarvo

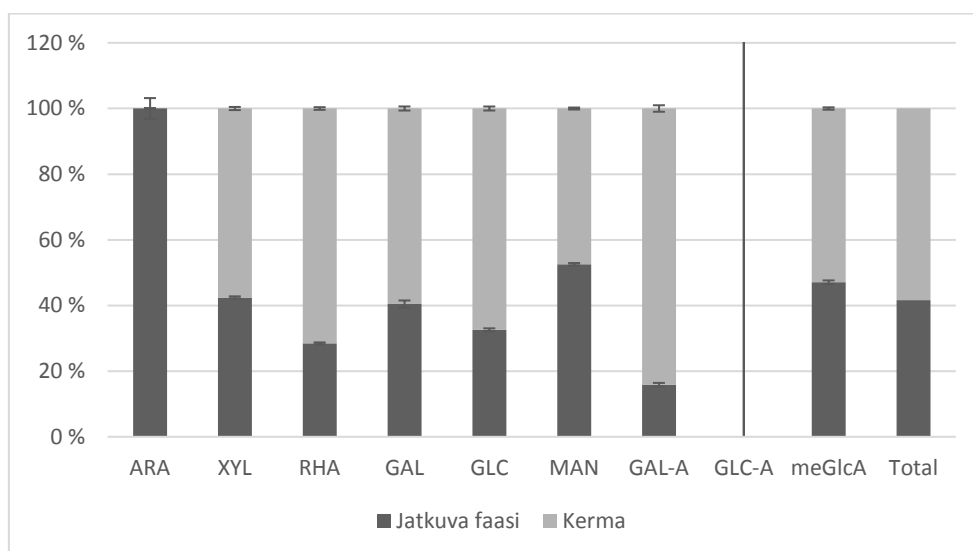
	GGM	Säilytysaika	$D_x(10)$ μm	$D_x(50)$ μm	$D_x(90)$ μm	$D[4,3]$ μm	$D[3,2]$ μm
		Viikko 0	0,07	0,237	1,05	0,552	0,152
		Viikko 1	0,0818	0,255	1,44	1,3	0,177
		Viikko 2	0,081	0,255	1,82	1,97	0,176
		Viikko 4	0,0894	0,271	2,93	2,16	0,193
		Viikko 6	0,0929	0,28	4,12	2,88	0,202
		Viikko 8	0,0916	0,281	5,42	4,27	0,201
		Viikko 11	0,0928	0,289	10,1	8,09	0,207
		Viikko 13	0,0946	0,294	11,5	6,95	0,212
	GX	Viikko 0	0,0572	0,259	4,02	1,07	0,137
		Viikko 1	0,0718	0,299	7,11	2,56	0,169
		Viikko 2	0,0725	0,301	9,44	3,1	0,171
		Viikko 4	0,0873	0,343	15,1	4,14	0,21
		Viikko 6	0,0997	0,376	15,3	4,23	0,243
		Viikko 8	0,1	0,393	16,4	4,7	0,249
		Viikko 11	0,105	0,427	19,8	6,47	0,265
		Viikko 13	0,104	0,413	17,9	5,35	0,26

Karakterisointi

Emulsion jatkuvan faasin ja kerman merkittävimmät monosakkaridit olivat ksyloosi ja meGlcA (taulukko 9). Muita monosakkarideja oli pieniä määriä. Arabinoosin piikkiä ei voitu erottaa kermassa. Suhteutettuna osuuksiin faaseissa, GalA:ta oli merkittävästi enemmän rajapinnoilla, kuin muita monosakkarideja (kuva 20).

Taulukko 9. Emulsion monosakkaridijakauma jatkuvassa faasissa ja kermassa (eli rajapinnalla), mg/g emulsiota. JF = jatkuva faasi Ara = arabinoosi, Xyl = ksyloosi, Rha = rhamnoosi, Gal = galaktoosi, Glc = glukoosi, Man = mannoosi, GalA = galakturonihappo, GlcA = glukoronihappo, meGlcA = metyyli-glukoronihappo, STDV=keskihajonta, CV%=variaatiokerroin

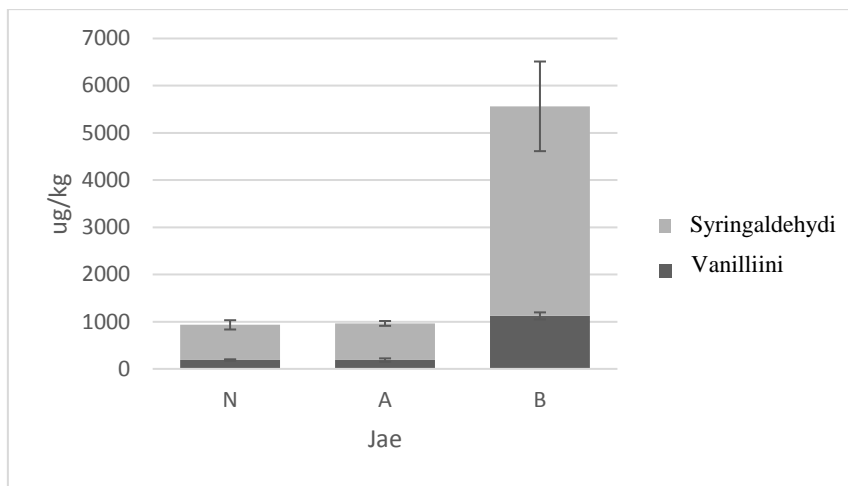
Näyte	mg/g emulsiossa									
JF	Ara	Xyl	Rha	Gal	Glc	Man	GalA	GlcA	meGlcA	Summa
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	
Keskiarvo	0,03	1,53	0,03	0,07	0,06	0,08	0,03	N/D	0,17	1,99
STDV	0,002	0,031	0,001	0,005	0,002	0,001	0,003		0,005	
CV %	8,16	2,04	2,86	6,88	3,81	1,82	8,52		2,93	
KERMA										
Keskiarvo	0,00	0,57	0,02	0,03	0,03	0,02	0,04	N/D	0,05	0,76
STDV	N/D	0,044	0,001	0,003	0,003	0,001	0,005		0,003	
CV%		7,80	5,30	9,82	8,59	5,99	11,02		6,35	



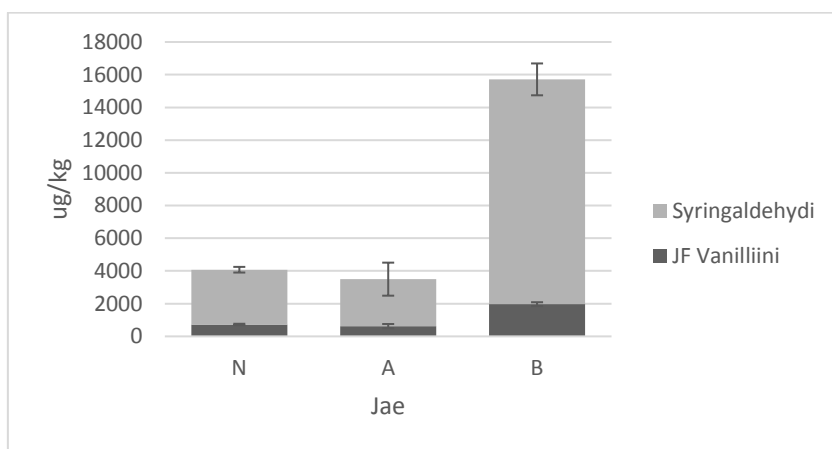
Kuva 20. GX:lla stabiloidun emulsion jatkuvan faasin ja kerman monosakkaridijakauma suhteutettuna mitatun faasin massaan. ARA = arabinoosi, XYL = ksyloosi, RHA = rhamnoosi, GAL = galaktoosi, GLC = glukoosi, MAN = mannoosi, GAL-A = galakturonihappo, GLC-A = glukoronihappo, meGlcA = metyyli-glukoronihappo

Suurin osa fenolisista yhdisteistä oli sitoutuneena esterisidoksilla sekä kermassa että jatkuvassa faasissa (kuvat 21 ja 22). Molemmista löytyi kuitenkin sekä vapaita fenolisia yhdisteitä

että glykosididisidoksilla sitoutuneita fenolisia yhdisteitä. Fenolisia yhdisteitä oli selvästi enemmän jatkuvassa faasissa kuin kermassa, mutta ne olivat jakautuneet hyvin samankaltaisesti faaseihin.

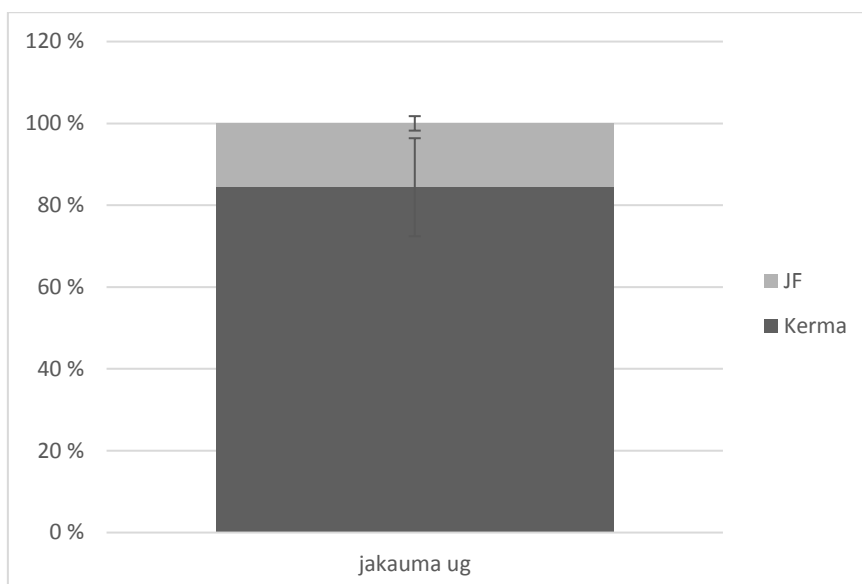


Kuva 21. GX:lla stabiloidusta emulsiosta eristetyn kerman fenolisten yhdisteiden jakauma N = vapaat fenoliset yhdisteet, A = glykosididisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet, B = esteridisidoksilla sitoutuneet yhdisteet



Kuva 22. GX:lla stabiloidusta emulsiosta eristetyn jatkuvan faasin fenolisten yhdisteiden jakauma N = vapaat fenoliset yhdisteet, A = glykosididisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet, B = esteridisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet

Emulsioidissa suurin osa fenolisista yhdisteistä oli jatkuvassa faasissa. Kuitenkin kun fenolisten yhdisteiden määrä suhteutettiin faasin massaan, osoittautui kermassa olevan suhteessa merkittävästi enemmän fenolisia yhdisteitä (kuva 23). Fenoliset yhdisteet vaikuttaisivat konzentroituvan rajapinnoille, vaikka niitä jääkin paljon myös jatkuvaan faasiin.



Kuva 23. Fenolisten yhdisteiden jakauma emulsiossa suhteutettuna faasin massaan (mg/kg) faasia kohden (kerma tai jatkuva faasi). JF = jatkuvafaasi Kerma = rajapinta

3.4 Pohdinta

3.4.1 Emulsion pysyvyys ja sen mekanismit

Tutkittavaksi näytteeksi valittiin kuumavesiuutettu GX, koska kuumavesiuutto on lupaava ja ympäristöystävällinen tapa eristää hemiselluloosia (Kilpeläinen ym. 2014a). Jakeessa oletettiin olevan jääminä myös ligniiniä, joka vaikuttaa GX-jakeen ominaisuuksiin (Kilpeläinen ym. 2014a). Jaetta ei puhdistettu ligniinistä, koska ligniinin uskottiin parantavan emulgointiominaisuuksia (Lehtonen ym. 2018).

Esikokeena tutkittiin emulsion pysyvyyttä. Emulsion pysyvyys on elintarvikkeissa tärkeää ja pidempi pysyvyysaika mahdollistaa pidemmän hyllyiän. Tulosten mukaan GX muodostaa pysyvän emulsion sekä kemiallisesti että fysikaalisesti. GGM valittiin vertailumateriaaliksi, koska se on myös puusta kuumavesiuutolla eristetty hemiselluloosa. Sen on myös todettu stabiloivan emulsioita paremmin kuin arabikumi tai Tween 20, jotka ovat molemmat elintarvikkeiden stabilointiaineita ja sopivia vertailukohteita (Mikkonen ym. 2016a; Mikkonen ym. 2016b). Vaikka GX:n stabiloimaan emulsioon muodostui suurempia pisaroita kuin GGM:n stabiloimaan emulsioon. GX:n stabiloima emulsio oli hyvin pysyvä. GGM muodosti tasaisesti pieniä pisaroita, kun taas GX muodosti ryhmänä pieniä ja isoja pisaroita. Emulsioiden pisarajakauma vastaa hyvin aikaisemmin saatuja tuloksia (Mikkonen ym. 2016a; Lehtonen ym. 2018). Tarkasteltaessa D[90]-arvoja on selvästi nähtävissä, että GX-emulsioon

muodostuu suurempia pisaroita kuin GGM-emulsioon. Kuitenkin se kertoo vain minkä kokoisia 90 % pisaroista ovat. Mielenkiintoista on, että D[4,3] ja D[3,2] olivat hyvin saman suuruisia molemmissa emulsioissa. D[4,3] kuvaa tilavuuden keskiarvoa ja D[3,2] pisaroiden pinnan pinta-alan keskiarvoa, jolloin D[4,3]-arvoon vaikuttavat suuret pisarat enemmän ja D[3,2]-arvoon pienet pisarat. Tuoreissa emulsioissa GX-emulsiossa oli selvästi kaikilla parametreilla suurempia pisaroita, mutta 13. viikon kohdalla D[4,3] oli suurempi GGM-emulsiolla. Tämä johtuu GGM-emulsioon muodostuneista suurista pisaroista. GX-emulsiot vaikuttaisivat olevan fysikaalisesti hyvin pysyviä verrattuna GGM-emulsioihin.

Emulsion fysikaalisen hajoamisen mekanismeista oli vaikea määrittää näillä kokeilla. Pisarakoon nähtiin kasvavan, joten pisaroiden yhteenliittymistä ja/tai Ostwaldin kypsymistä tapahtui säilytyksen aikana. Ostwaldin kypsymisessä pisarakokojakaumassa kasvaa selvästi suurten pisaroiden koko ja pienten pienenee (McClements 2007). Heterogeenisessä pisaroiden yhteenliittymisessä taas yleensä muodostuu pieniä pisaroita, joiden koko kasvaa hitaasti ajan kanssa, ja suuria pisaroita, joiden koko kasvaa nopeammin (McClements 2007). Tämän perusteella luultavasti emulsion hajoaminen perustui enemmän pisaroiden yhteenliittymiseen, mikä johtuu yleensä pisaroiden läheisestä kontaktista, kuten kermottumisesta, flokkulaatiosta tai pisaroiden törmäämisestä toisiinsa liian vähäisten hylkimisvoimien vuoksi (McClements 2007).

Flokkulaatiota ei voitu todistaa tällä koeasetelmalla, koska mitattiin vain pisarakokojakaumaa, jolloin suuret pisarat saattavatkin olla flokkuloituneita lähekkäin toisiansa ja pienten pisaroiden sijaintia suhteessa toisiinsa ei voida arvioida (McClements 2007). Lahtinen ym. (2019) mikroskoipoivat GX-emulsion pisaroita 13 viikon säilytyksen jälkeen. Kuvista oli nähtävillä, että emulsiossa oli suuria pisaroita erillään toisistaan, mutta ei voitu pienten pisaroiden kohdalla määrittää, olivatko ne flokkuloituneet. GGM:lla stabiloitujen emulsioiden pisaroiden on todettu flokkuloituvan säilytyksen aikana, joten tämä voisi olla mahdollista myös GX:lla (Bhattarai ym. 2019).

Rasvojen hapettuminen lyhentää hyllyikää huomattavasti, minkä takia sen hidastaminen on elintarvikkeissa keskeistä. Peroksidiluku kertoo vain primaarisesta hapettumisesta, joten koeasetelma ei anna koko kuvaa monimutkaisesta hapettumisprosessista (Lehtonen ym. 2018). Primaarihapettumisen seuraaminen valittiin menetelmäksi, koska haluttiin selvittää alustavasti, onko GX:lla antioksidanttisia ominaisuuksia, joita hyödyntää elintarvikkeiden säilyvyyden parantamisessa.

GX suojasi emulsioita selvästi paremmin hapettumiselta kuin GGM. GGM:lla stabiloidun emulsion öljyn mitatut peroksidiluvut vastasivat hyvin aikaisempia tuloksia, joiden mukaan peroksidiluku pysyy lähes muuttumattomana ensimmäiset kuusi viikkoa ja sitten nousee (Lehtonen ym. 2018). Myös homogenointi saattaa edesauttaa hapettumista (Berton-Carabin ym. 2014). Tässä tutkimuksessa homogenointi ei kuitenkaan vaikuttaisi aiheuttavan hapettumista, koska ensimmäisissä mittauksissa öljy ei ollut vielä hapettunut. Kuuden viikon kohdalla GGM:lla stabiloidun emulsion öljyn peroksidiluku kasvoi ja emulsion pisarakoko kasvoi selvästi, mikä on nähtävissä suuremmasta D[4,3]-luvusta. Fysikaalinen hajoaminen saattaa edistää myös kemiallista pilaantumista (Berton-Carabin ym. 2014), mikä voisi selittää, miksi peroksidiluku suureni kuuden viikon säilytyksen jälkeen merkittävästi. GX:lla stabiloidun emulsion pisaroiden kasvu oli paljon maltillisempaa, kuten myös sen primaarinen hapettuminen. Hidas fysikaalinen hajoaminen hidasti myös hapettumista.

Yleisesti elintarvikekäytössä olevien öljyjen hyväksyttävä peroksidiluku on enintään 10. Koska GX:lla stabiloidun emulsion öljyn peroksidiluku nousi vasta kahdeksan viikon jälkeen yli sen. Luultavasti hapettumista ehkäisee tehokkaasti GX:ssa esiintyvät fenoliset yhdisteet, koska niiden on arveltu ehkäisevän myös GGM:lla stabiloidun emulsion öljyn hapettumista (Lehtonen ym. 2018). GX:lla stabiloidun emulsion pisarakoko oli suurempi kuin GGM:lla stabiloidun, mutta kuitenkin sen peroksidiluku ei kasvanut yhtä nopeasti.

Nypelö ym. (2016) saivat GX:n eetterimuodoilla parannettua GX:n pinta-aktiivisuutta ja muodostettua emulsioita (Nypelö ym. 2016). Ne eivät kuitenkaan vaikuta yhtä stabiileilta kuin tässä tutkimuksessa valmistettu emulsio ja GX:n muuttaminen eetterimuotoon vaatii ylimääräisiä työvaiheita.

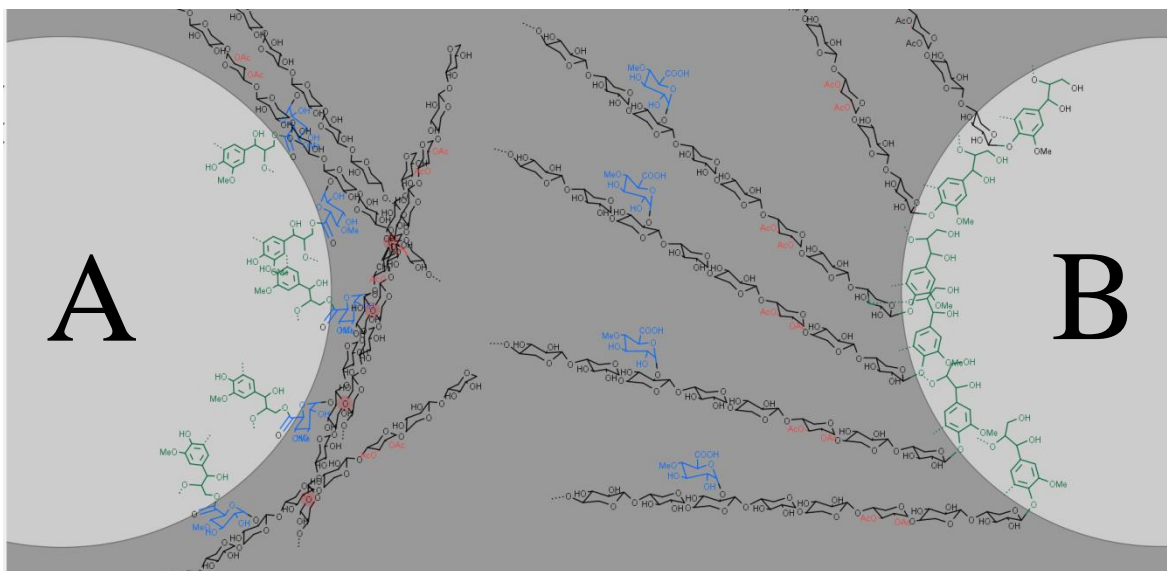
Koska GX ei ole rasvaliukoinen, fysikaalinen stabilointimekanismi voisi selittyä GX:iin sitoutuneilla fenolisilla yhdisteillä tai Pickering-emulsiolla (Mikkonen ym. 2016a). Fenolisten yhdisteiden uskotaan toimivan ankkurina, jotka kiinnittävät hemiselluloosaketjun pinnan pinnalle. Tämä vaikuttaisi mahdolliselta, koska fenolisia yhdisteitä löytyi suhteessa enemmän rajapinnoilta kuin jatkuvasta faasista. Fenoliset yhdisteet konsentroituivat rajapinnoille ja niihin oli sitoutuneena monosakkarideja. Nämä luultavasti muodostivat rajapinnan pinnan ja jatkuvan faasin välille. Antioksidanttien hakeutuminen rajapinnoille parantaa myös niiden kykyä ehkäistä emulsion öljyn hapettumista (Waraho ym. 2011).

GX:n monosakkaridijakauma noudatti kirjallisuudessa esitettyä (Westbye ym. 2008). Emulsion rajapinnan ja jatkuvan faasin eri monosakkaridit jakautuivat muuten melko tasaisesti, paitsi GalA:ta oli rajapinnoilla suhteessa enemmän. Tälle voi olla monta selitystä, koska GalA on osa pektiiniä ja ksyloosiketjua (Ericsson ym. 1977; Johansson ja Samuelson 1977; Meshitsuka ym. 1982; Komiyama ym. 2009). Ksyloosiketjun pelkistävä pää on ainoa paikka, mihin fenoliset yhdisteet voivat sitoutua glykosididisidoksilla. Jos näissä päädyissä on myös GalA:ta sitoutuneena, se saattaisi selittää GalA:n suuren määrän rajapinnoilla. Kuitenkin vain pieni osa fenolisista yhdisteistä oli sitoutunut glykosididisidoksilla ja suurin osa esterisidoksilla.

Toinen mahdollisuus voisi olla, että pektiini vaikutti rajapinnalla. Pekiini saattaa olla sitoutuneena ligniiniin ja GX:iin koivussa, jolloin sillä voi olla myös merkitystä emulsioiden stabiloinnissa (Meshitsuka ym. 1982; Giummarella ja Lawoko 2016). Pekiinin sitoutumisesta ligniiniin ja hemiselluloosiin on viitteitä myös muiden kasvien, kuten tomaatin, soluseinissä (Broxterman ja Schols 2018). Tarkemmat yksityiskohdat tästä rakenteesta ovat vielä selvittämättä. Tomaattia ja koivua ei voi verrata suoraan toisiinsa, mutta tulokset tukevat teoriaa, että kasvikkunnassa nämä rakenteet olisivat olemassa. Pekiinin rooli jäi kuitenkin epäselväksi emulsion stabiloinnissa, koska ei tiedetä, oliko tutkimuksessa analysoitu GalA peräisin pektiinistä. Stabilointimekanismin parempi ymmärtäminen vaatisi lisää tietoa siitä, miten pektiini on sitoutunut ligniiniin tai GX:iin. Tätä voitaisiin tutkia esimerkiksi käyttämällä pektinaaseja, kuten endopolygalaktouranaasia tai endopektiinilyaasia, jotka ovat spesifejä pektiinin suhteen eivätkä pilko esimerkiksi hemiselluloosan ja GalA:n välisiä sidoksia (Meshitsuka ym. 1982).

Rajapinnan rakenteesta paljastui tutkimuksessa joitakin yksityiskohtia. Luultavasti GX:n ksyloosiketjut, joihin fenoliset yhdisteet olivat sitoutuneet glykosididisidoksilla, asettautuisivat kohtisuoraan rajapintaan nähden. Fenolisiin yhdisteisiin esterisidoksilla sitoutuneet ketjut taas muodostaisivat kerroksen pisanan pintaan, kuten aikaisemmin on arveltu GGM:n toimivan rajapinnoilla (Lehtonen ym. 2018). Esterisidokset muodostuisivat luultavasti meGlcA:n ja fenolisten yhdisteiden välille (Watanabe ja Koshijima 1988; Imamura ym. 1994). Glykosididisidoksin sitoutuneet GX-ketjut muodostaisivat luultavasti melko harvan rakenteen, koska sivuryhmän meGlcA estäisi tiiviin pakkautumisen. Tämän kaltainen kerros saattaisi edistää suurempien pisaroiden syntymistä (Lehtonen ym. 2018). Tällöin kuitenkin ksyloosiketjut muodostaisivat steerisiä esteitä, jotka hidastavat emulsion hajoamista (McClements 2005; Tadros 2013). Steeriset esteet ovat polysakkarideilla usein tärkeä osa

stabilointimekanismia (Qiu ym. 2017). Ehkä tämä selittäisi myös, miksi GX:lla stabiloidun emulsion pisarakokojakaumassa oli suuria ja pieniä pisaroita. Suuremmat pisarat muodostuisivat glykosidisidoksin ankkuroituneiden fenolisten yhdisteiden ansiosta. Sen sijaan pienempien pisaroiden rajapinnalla saattaisi olla esterisidoksia enemmän, jolloin pisaran ympärillä olisi tiiviimpi kerros. Mahdollinen GX:n rajapinnan rakenne on esitetty kuvassa 24 käyttäen mallina Lehtosen ym. (2018) esittämää mallia.



Kuva 24. Mahdolliset tavat, miten GX on voinut asettautua rajapinnalle. Lehtonen ym. 2018 ovat esittäneet vastaavan kuvajaan GGM:n rajapinnasta. Vihreällä on esitetty fenoliset yhdisteet, sinisellä meGlcA (metyyliglukoronihappo), punaisella asetyloituneet sivuryhmät ja mustalla ksyloosiketju. A=gammaesterisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet. B= glykosidisidoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet

Fenolisten yhdisteiden jakautuminen rajapinnan ja jatkuvan faasin välille eroaa merkittävästi kuumavesiuutolla eristetyyn kuusen GGM:n tuloksista. GX:ssa jopa 20% fenolisista yhdisteistä löytyi rajapinnalta, kun taas GGM:n fenolisista yhdisteistä alle 1 % (Lehtonen ym. 2018). Tämä voi johtua analyysissa olleista eroista, kuten että GX:lla stabiloitu emulsio ei saostunut etanolikäsitteystä. Voi myös olla, että GGM:n ja GX:n rakenteet poikkeavat merkittävästi toisistaan, minkä takia myös niiden LC-sidokset voivat vaihdella hyvin paljon. Tämä saattaisi osaltaan selittää miksi GX-emulsiot hapettuivat huomattavasti vähemmän verrattuna GGM-emulsioihin. GGM:n stabilointimekanismi muutenkin luultavasti perustuu steeriseen esteeseen, mutta GX:n ζ -potentiaali on myös aavistuksen negatiivinen etanolilla puhdistetussa GX:ssa (-35 mV) johtuen meGlcA:sta ja GalA:sta (Mikkonen ym. 2016a). GX:n ja GGM:n vertaaminen toisiinsa ei siis välttämättä ole järkevää, koska tämän tutkimuksen tulosten perusteella niiden stabilointimekanismit vaikuttaisivat eroavan toisistaan.

GX:n stabilointimekanismi eroaa luultavasti myös maissin arabinoksyalaanin stabilointimekanismista, koska arabinoksyalaaniin on sitoutuneena peptidejä mutta ei fenolisia yhdisteitä (Yadav ym. 2007; Yadav ym. 2009). Myös GX-jakeessa on luultavasti pieniä määriä proteiineja, mutta niitä ei ole analysoitu ja määrien uskotaan olevan niin pieniä, ettei niillä ole merkitystä stabiloinnin kannalta (Kilpeläinen ym. 2014a).

3.4.2 Galakturonihapon merkitys emulsion pysyvyydelle

GX:n fraktiointia varten tutkittiin olivatko happoryhmät vapaita vai sitoutuneita, jotta niiden avulla voitaisiin fraktioida happamat ja neutraalit jakeet erilleen. Titrauskäyrästä saatu pKa-arvo oli alhaisempi kuin sen olisi voinut olettaa olevan GalA:lle ja meGlcA:lle, joiden pKa-arvot ovat n. 3,2–3,5 välillä (Kohn ja Kovac 1978; Grein-Iankovski ym. 2018). Kuitenkin tämän tuloksen perusteella voidaan arvella, että osa hapoista on kuitenkin vapaana ja sen mukaan GalA-fraktiointia jatkettiin.

GX:n GalA-rikkaiden fraktioiden eristämisen tavoite oli ymmärtää tutkimuksessa saatua tulosta monosakkaridien jakaumasta rajapinnan ja jatkuvan faasin välille. Koska GalA:ta oli merkittävästi rajapinnoilla, tutkittiin, mitä fenolisia yhdisteitä GalA-rikkaisiin fraktioihin oli sitoutunut ja miten ne ovat mahdollisesti sitoutuneena. Valittu menetelmä perustui saatavilla oleviin laitteistoihin ja aikaisemmin toteutettuun puun hemiselluloosien fraktiointiin happamien ja neutraalien monosakkaridien mukaan. Tutkittu GX erosi aikaisemmasta, koska sitä ei pilkottu entsyymaattisesti oligosakkarideihin ja GX:iin oli sitoutuneena ligniiniä (Lahtinen ym. 2019). Kaikki näyte ei irronnut pylväästä, minkä todistaa etanolin irrottamat fenoliset yhdisteet, joita ei löytynyt neutraaleista tai happamista fraktioista. Ongelmallista oli, että esikäsitelyssä näyte sentrifugoitiin ja pelletti poistettiin. Suuri osa fenolisista yhdisteistä poistuu vastaavanlaisessa käsittelyssä (Valloppi ym. 2019). Tällöin myös kiinnostuksen kohteena olevia LC-sidoksia menetettiin.

Fraktioinnissa ei saatu selville, mitä yhdisteitä on sitoutunut GalA:n, joten tätä täytyy tutkia jollain toisella menetelmällä. Mielenkiintoista oli kuitenkin, ettei fenolisia yhdisteitä löytynyt lähes lainkaan neutraaleista tai happamista fraktioista. Myöskään meGlcA:ta ei löydetty näistä fraktioista, vaikka niitä alkuperäisessä näytteessä oli ja myös sentrifugoidussa näytteessä niitä pitäisi olla (Valloppi ym. 2019). Tämä saattaa osittain johtua pienistä näytemääristä, mutta on myös mahdollista, että kaikki meGlcA oli sitoutunut fenolisiin yhdisteisiin ja sen takia sitä ei saatu analysoitua muista näytteistä. Tätä tukevat aikaisemmat tutkimukset,

joissa bentsyyliesterisidoksen on arvioitu muodostuvan meGlcA:n ja ligniinin välille (Watanabe ja Koshijima 1988; Imamura ym. 1994). Emulsion rajapinnalla nämä olivat selvästi merkittävin sidostyyppi, joten oletettavasti meGlcA on sitoutunut pääasiallisesti ligniiniin ja vaikuttaa emulsion muodostukseen ja pysyvyyteen. Happamista fraktioista löytyi GalA:ta mutta ei fenolisia yhdisteitä. GalA ei ole siis kokonaan ainakaan sitoutunut fenolisiin yhdisteisiin vaan esiintyy myös siitä vapaana. GalA:ta saattaa edelleen esiintyä sekä pektiinissä että GX:n polysakkaridirungossa, joten tämän perusteella ei voida vielä päätellä, mistä vapaa GalA olisi peräisin.

3.4.3 Kromatografisten analyysien oikeellisuuden arviointi

Monosakkaridimenetelmä

Käytetty menetelmä oli hyvin vakiintunut monosakkaridijakauman määrittämiseksi. Se oli suositeltava menetelmä, kun halutaan määrittää samanaikaisesti ksylaania ja uronihappoja sisältäviä näytteitä (Willför ym. 2009). Tuloksista laskettu variaatiokerroin oli AOAC:n rajoissa alkuperäisessä materiaalissa kaikilla paitsi arabinoosilla (AOAC 2002). Kermassa vaihtelu oli pitoisuuteen nähden liian suurta. Tämä saattaa johtua pienistä pitoisuuksista tai näytteiden heterogeenisyydestä enemmän kuin varsinaisesta analyysimenetelmästä.

Emulsioiden analytiikkaan esikäsittelyvaiheita voitaisiin kehittää. Itse menetelmä perustuu ulkoisen standardin käyttämiseen, mutta silylointia tarkkaillaan sisäisen standardin avulla. Tämän lisäksi olisi hyvä kuitenkin ottaa laitteelle käyttöön referenssinäyte, jonka pitoisuus olisi tunnettu. Silloin voidaan valvoa laitteen toimintaa. Sisäinen standardi kertoo vain silyloinnin onnistumisesta, mutta ei laitteen toiminnasta. Referenssinäytteen antama tulos kertoisi laitteen toiminnasta ja tulosten luotettavuudesta.

Fenolisten yhdisteiden analyysimenetelmä

Menetelmän esikäsittely ei ole riittävä, jotta sillä voitaisiin pilkkoa näytteessä olevaa ligniiniä. Käsittelyjen tarkoituksena on vain rikkoa hemiselluloosan ja fenolisten yhdisteiden väliset sidokset, joten analyysi ei anna täydellistä kuvaa ligniinin rakenteesta. Menetelmä on validoitu fenolihappojen analysoimiselle marjoista (Kylli ym. 2011). Massaspektrometrialla kuitenkin varmistettiin, että tutkitut yhdisteet olivat aldehydejä. Tämän perusteella päädyt-

tiin tutkimaan menetelmää tarkemmin ja todettiin sen vaativan kehittelyä, koska saannot eivät olleet lähelläkään tavoiteltua 90–107 % (AOAC 2002). Myös tulosten variaatiokerroimet olivat suurempia kuin AOAC:n rajat sallivat näillä pitoisuuksilla (AOAC 2002). Osittain vaihtelevat tulokset johtuivat mahdollisesti näytteiden heterogeenisyydestä ja ligniinin epätäydellisestä hajoamisesta, mikä lisää hajontaa. Tämän takia esikäsittelymenetelmän vaihtaminenkaan ei välttämättä toisi parempaa tulosta. Menetelmää voitaisiin kuitenkin kehittää validoimalla se GX:lle. Tämä vaatisi laajempia kokeita, mitä tämän työn aikana suoritettiin.

4 PÄÄTELMÄT

Kuumavesiuutolla eristetty GX-jae vaikuttaa hyvin lupaavalta stabilointiaineelta ja antioksidantilta. Sen hapettumisestokky oli vastaavaan stabilointiaineeseen verrattuna erinomainen ja sen muodostamat emulsiot pysyivät koossa useita kuukausia, vaikka niissä oli lähtökohtaisesti suurempia pisaroita. Tämä mahdollistaisi GX:lla stabiloidun emulsion pitkän hyllyiän.

GX-jakeen fenolisista yhdisteistä suurin osa oli esteridisoksilla sitoutuneita. Syringaldehydi ja vanilliini olivat tärkeimpiä rakenteita. Emulsion rajapinnalla fenoliset yhdisteet sitoutuvat esteridisoksilla luultavasti GX:n happoryhmiin, jolloin ne muodostavat tiiviin rakenteen pisanan rajapinnalle. Glykosididisoksilla sitoutuneet fenoliset yhdisteet sitoutuvat GX:n pääketjun pelkistävään päähän ja tämä GX muodostaa paksun, mutta harvan rajapinnan rakenteen. GalA:n merkitys jäi vielä selvittämättä tällä koeasetelmalla, joten ei tiedetä, miten se vaikuttaa rajapinnoilla.

Näiden tulosten pohjalta avautui monta uutta mahdollista tutkimuskohdetta. Koska GX ehkäisee hapettumista tehokkaasti, voisi tulevissa tutkimuksissa tutkia, mitkä fenoliset yhdisteet tähän vaikuttavat. Voisi myös perehtyä hapettumismekanismeihin syvällisemmin seuraamalla primaarireaktioiden lisäksi myös sekundaarisia reaktioita.

Fenolisten yhdisteiden analysointia varten olisi hyvä kokeilla toisia menetelmiä. Ligniinin hajottamiseen on kirjallisuudessa erilaisia menetelmiä, joita voisi yrittää yhdistää HPLC-analyysiin. Näin ehkä saataisiin suurempi osa ligniinistä hajotettua analyysiä varten. Myös massaspektrometrialla voisi olla mahdollista tunnistaa useampia hajoamistuotteita.

Edelleen mielenkiinnon kohteena pysyvät syyt GalA:n hakeutumiselle emulsioiden rajapinnalle. Valittu fraktiointimenetelmä ei sopinut, koska ligniini sitoutui liian vahvasti käytettyyn pylvääseen. Selvästi pylvääseen jäi kaikkein mielenkiintoisin jae, koska fenolisia yhdisteitä ei löytynyt neutraaleista tai happamista jakeista. Tässä kokeessa myös kerätyt jakeet jäivät liian pieniksi, kun ne pakkaskuivattiin. Jatkoanalyysiä varten olisi hyvä pystyä analysoimaan ne jo nestemäisistä jakeista. Myös olisi mielenkiintoista selvittää, onko löydetty GalA peräisin pektiinistä vai GX:n pääketjusta.

LÄHDELUETTELO

Ahn DU, Kim SM. 1998. Effect of Superoxide and Superoxide-Generating Systems on the Prooxidant Effect of Iron in Oil Emulsion and Raw Turkey Homogenates. *Poult Sci* 77(9):1428-35.

Alekhina M, Mikkonen KS, Alén R, Tenkanen M, Sixta H. 2014. Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films. *Carbohydr Polym* 100:89-96.

[AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2002. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Saatavilla: http://members.aoc.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf. Tulostettu 15.1.2020.

Berton-Carabin C, Ropers M, Genot C. 2014. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(5):945-77.

Bhattarai M, Pitkänen L, Kitunen V, Korpinen R, Ilvesniemi H, Kilpeläinen PO, Lehtonen M, Mikkonen KS. 2019. Functionality of spruce galactoglucomannans in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 86:154-61.

Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54(2):484-9.

Borrega M, Concha-Carrasco S, Pranovich A, Sixta H. 2017. Hot water treatment of hardwood kraft pulp produces high-purity cellulose and polymeric xylan. *Cellulose* 24(11):5133-45.

Broxterman SE, Schols HA. 2018. Characterisation of pectin-xylan complexes in tomato primary plant cell walls. *Carbohydr Polym* 197:269-76.

Chapleau N, de Lamballerie-Anton M. 2003. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids* 17(3):273-80.

Chong S-L, Koutaniemi S, Virkki L, Pynnönen H, Tuomainen P, Tenkanen M. 2013. Quantitation of 4-O-methylglucuronic acid from plant cell walls. *Carbohydr Polym* 91(2):626-30.

Cirre J, Al-Assaf S, Phillips GO, Yadav MP, Hicks KB. 2014. Improved emulsification performance of corn fibre gum following maturation treatment. *Food Hydrocolloids* 35:122-8.

Desplanques S, Renou F, Grisel M, Malhiac C. 2012. Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 27(2):401-10.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28(3):350-6.

Ebringerová A. 2006. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol Sympos* 232:1-12.

Ebringerová A, Hromádková Z. 2010. An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Cent Eur J Chem* 8(2):243-57.

Ericsson T, Petersson G, Samuelson O. 1977. Galacturonic acid groups in birch xylan. *Wood Sci Technol* 11(3):219-23.

[FDA] U.S. Food and Drug Administration. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000047. 2000. Saatavilla: <https://wayback.archive-it.org/7993/20171031033330/https://www.fda.gov/Food/Ingredients-PackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153766.htm>. Tulostettu: 2.2.2019.

Fengel D, Wegener G. 1989. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin: De Gruyter. 632 s.

Finley JW, deMan JM. 2018. Lipids. *Teoksessa: Principles of Food Chemistry*. 4 p. Food Science Text Series. s. 39-116.

- Gabov K, Gosselink RJA, Smeds AI, Fardim P. 2014. Characterization of lignin extracted from birch wood by a modified hydrotropic process. *J Agric Food Chem* 62(44):10759-67.
- Giummarella N, Lawoko M. 2016. Structural Basis for the Formation and Regulation of Lignin-Xylan Bonds in Birch. *ACS Sustainable Chem Eng* 4(10):5319-26.
- Giummarella N, Pu Y, Ragauskas AJ, Lawoko M. 2019. A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem* 21(7):1573-95.
- Giummarella N, Zhang L, Henriksson G, Lawoko M. 2016. Structural features of mildly fractionated lignin carbohydrate complexes (LCC) from spruce. *RSC Adv* 6(48):42120-31.
- Grein-Iankovski A, Ferreira JGL, Orth ES, Sierakowski M-, Cardoso MB, Simas FF, Riegel-Vidotti IC. 2018. A comprehensive study of the relation between structural and physical chemical properties of acacia gums. *Food Hydrocolloids* 85:167-75.
- Hägg M. 2016. Validoinnin suunnitelun opas. VTT Technical Research Centre of Finland (276):22.01.2020-50.
- Hutterer C, Schild G, Kliba G, Potthast A. 2016. Lignin profiling in extracted xylans by size-exclusion chromatography. *Carbohydr Polym* 151:821-6.
- Imamura T, Watanabe T, Kuwahara M, Koshijima T. 1994. Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*. *Phytochemistry* 37(4):1165-73.
- Jacobs A, Larsson PT, Dahlman O. 2001. Distribution of uronic acids in xylans from various species of soft- and hardwood as determined by MALDI Mass spectrometry. *Biomacromolecules* 2(3):979-90.
- Janzon R, Saake B, Puls J. 2008. Upgrading of paper-grade pulps to dissolving pulps by nitren extraction: Properties of nitren extracted xylans in comparison to NaOH and KOH extracted xylans. *Cellulose* 15(1):161-75.
- Johansson MH, Samuelson O. 1977. Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. *Wood Sci Technol* 11(4):251-63.
- Kilpeläinen PO, Hautala SS, Byman OO, Tanner LJ, Korpinen RI, Lillandt MK-, Pranovich AV, Kitunen VH, Willför SM, Ilvesniemi HS. 2014a. Pressurized hot water flow-through extraction system scale up from the laboratory to the pilot scale. *Green Chem* 16(6):3186-94.
- Kilpeläinen PO, Kitunen V, Hemming J, Pranovich A, Ilvesniemi H, Willför S. 2014b. Pressurized hot water flow-through extraction of birch sawdust - Effects of sawdust density and sawdust size. *Nord Pulp Pap Res J* 29(4):547-56.
- Kilpeläinen PO, Leppänen K, Spetz P, Kitunen V, Ilvesniemi H, Pranovich A, Willför S. 2012. Pressurised hot water extraction of acetylated xylan from birch sawdust. *Nord Pulp Pap Res J* 27(4):680-8.
- Kim HJ, Min DB. 2007. Chemistry of Lipid Oxidation. Teoksessa: Akoh,CC, Min,DB, toim. *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 3. p. CCR. s. 299.
- Kohn R, Kovac P. 1978. Dissociation constants of D-galacturonic and D-glucuronic acid and their O-methyl derivatives. *Chem Zvesti* 32478-85.
- Koli AO, Eltayeb AM, Sanjak EM, Mohammed MH. 2013. Socio-economic aspects of gum Arabic production in Dalanj Area, South Korodofan, Sudan. *Pak J Biol Sci* 16(21):1407-10.
- Komiyama H, Enomoto A, Sueyoshi Y, Nishio T, Kato A, Ishii T, Shimizu K. 2009. Structures of aldouronic acids liberated from kenaf xylan by endoxylanases from *Streptomyces* sp. *Carbohydr Polym* 75(3):521-7.
- Kylli P, Nohynek L, Puupponen-Pimiä R, Westerlund-Wikström B, Leppänen T, Welling J, Moilanen E, Heironen M. 2011. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European Cranberry (*Vaccinium microcarpon*) Proanthocyanidins: Isolation, Identification, and Bioactivities. *J Agric Food Chem* 59(7):3373-84.

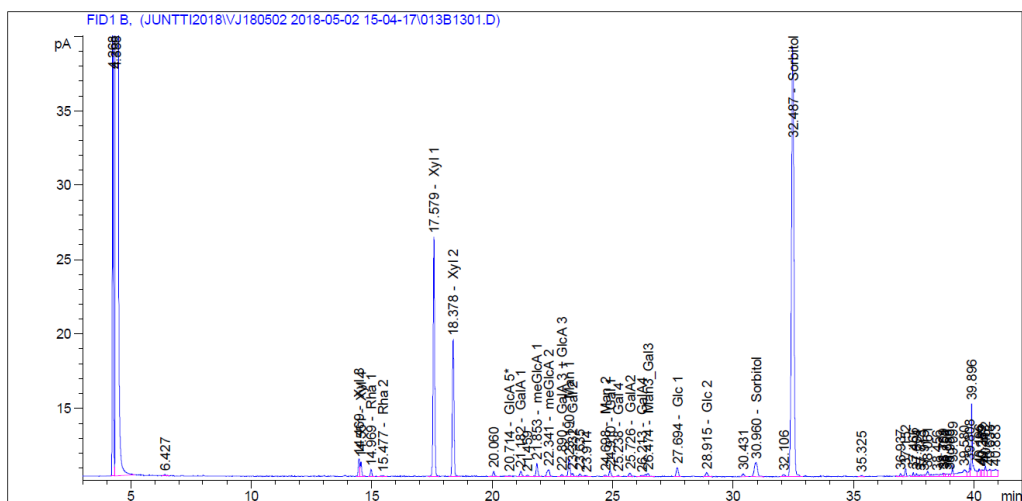
- Lahtinen MH, Valoppi F, Juntti V, Heikkinen S, Kilpeläinen PO, Maina NH, Mikkonen KS. 2019. Lignin-Rich PHWE Hemicellulose Extracts Responsible for Extended Emulsion Stabilization. *Frontiers in Chemistry* 7:871.
- Lehtonen M, Merinen M, Kilpeläinen PO, Xu C, Willför SM, Mikkonen KS. 2018. Phenolic residues in spruce galactoglucomannans improve stabilization of oil-in-water emulsions. *J Colloid Interface Sci* 512:536-47.
- Lehtonen M, Teräslahti S, Xu C, Yadav MP, Lampi A-M, Mikkonen KS. 2016. Spruce galactoglucomannans inhibit lipid oxidation in rapeseed oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 58:255-66.
- Liimatainen J, Karonen M, Sinkkonen J, Helander M, Salminen J-P. 2012. Characterization of phenolic compounds from inner bark of *Betula pendula*. *Holzforschung* 66(2):171-81.
- Lorenz D, Erasmy N, Akil Y, Saake B. 2016. A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydr Polym* 140:181-7.
- Lu Y, Lu Y-C, Hu H-Q, Xie F-J, Wei X-Y, Fan X. 2017. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. *J Spectroscopy* 2017:1-15.
- Martínez-Abad A, Giummarella N, Lawoko M, Vilaplana F. 2018. Differences in extractability under subcritical water reveal interconnected hemicellulose and lignin recalcitrance in birch hardwoods. *Green Chem* 20(11):2534-46.
- Mattila P, Kumpulainen J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J Agric Food Chem* 50(13):3660-7.
- McClements DJ. 2005. *Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques*. 2. p. USA: CRC Press. 633 s.
- McClements DJ. 2007. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47(7):611-49.
- Meshitsuka G, Lee ZZ, Nakano J. 1982. Studies on the nature of lignin - carbohydrate bonding. *J Wood Chem Technol* 2(3):251-67.
- Mikkonen KS, Heikkinen S, Soovre A, Peura M, Serimaa R, Talja RA, Helén H, Hyvönen L, Tenkanen M. 2009. Films from oat spelt arabinoxylan plasticized with glycerol and sorbitol. *J Appl Polym Sci* 114(1):457-66.
- Mikkonen KS, Merger D, Kilpeläinen P, Murtomäki L, Schmidt US, Wilhelm M. 2016a. Determination of physical emulsion stabilization mechanisms of wood hemicelluloses: Via rheological and interfacial characterization. *Soft Matter* 12(42):8690-700.
- Mikkonen KS, Tenkanen M. 2012. Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. *Trends Food Sci Technol* 28(2):90-102.
- Mikkonen KS, Xu C, Berton-Carabin C, Schroën K. 2016b. Spruce galactoglucomannans in rapeseed oil-in-water emulsions: Efficient stabilization performance and structural partitioning. *Food Hydrocolloids* 52:615-24.
- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96(6):673-86.
- Muhammad G, Hussain MA, Ashraf MU, Naeem-Ul-Hassan M, Bukhari SNA. 2018. Appraisal of acute oral toxicity of glucuronoxylan hydrogel from mimoso pudica seeds. *Bras J Pharm Sci* 54(3): e17579.
- Naidu DS, Hlangothi SP, John MJ. 2018. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydr Polym* 179:28–41.
- Negro MJ, Manzanares P, Oliva JM, Ballesteros I, Ballesteros M. 2003. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy* 25(3):301-8.

- Nypelö T, Laine C, Aoki M, Tammelin T, Henniges U. 2016. Etherification of Wood-Based Hemicelluloses for Interfacial Activity. *Biomacromolecules* 17(5):1894-901.
- Peng F, Peng P, Xu F, Sun R-C. 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol Adv* 30(4):879-903.
- Pitkänen L, Heinonen M, Mikkonen KS. 2018. Safety considerations of plant polysaccharides for food use: A case study on Phenolic-rich softwood galactoglucomannan extract. *Food Funct* 9(4):1931-43.
- Pitkänen L, Striegel AM. 2015. Polysaccharide characterization by hollow-fiber flow field-flow fractionation with on-line multi-angle static light scattering and differential refractometry. *J Chromatogr A* 1380:146-55.
- Qin G, Wen P, Wang Y, Zhang L, Liang H, Qin H, Tang S, Zhao P. 2017. Safety assessment of xylan by a 90-day feeding study in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 85:1-6.
- Qin Z, Ma Y-X, Liu H-M, Qin G-Y, Wang X-D. 2018. Structural elucidation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) from Chinese quince (*Chaenomeles sinensis*) fruit. *Int J Biol Macromol* 116:1240-9.
- Qiu S, Yadav MP, Yin L. 2017. Characterization and functionalities study of hemicellulose and cellulose components isolated from sorghum bran, bagasse and biomass. *Food Chem* 230:225-33.
- Randall RC, Phillips GO, Williams PA. 1988. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Top Catal* 2(2):131-40.
- Rantanen H, Virkki L, Tuomainen P, Kabel M, Schols H, Tenkanen M. 2007. Preparation of arabinoxylobiose from rye xylan using family 10 *Aspergillus aculeatus* endo-1,4- β -d-xylanase. *Carbohydr Polym* 68(2):350-9.
- Ren J, Wang S, Gao C, Chen X, Li W, Peng F. 2015. TiO₂-containing PVA/xylan composite films with enhanced mechanical properties, high hydrophobicity and UV shielding performance. *Cellulose* 22(1):593-602.
- Ruokavirasto. **Elintarvikelisäaineryhmät**. 2018. Saatavilla: <https://www.ruokavirasto.fi/yritykset/elintarvikela/valmistus/yhteiset-koostumusvaatimukset/elintarvikeparanteet/lisaaineet/lisaaineryhmat/>. Tulostettu: 02.10.2019.
- Shahidi F, Wanasundara UN. 2007. Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and oils. Teoksessa: *Akoh, CC, Min, DB, toim. Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 3. p. CRC Press. s. 387-409.
- Singh R, Shukla A, Tiwari S, Srivastava M. 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable Sustainable Energy Rev* 32:713-28.
- Sjöström E. 1993. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. 2. p. San Diego: Academic Press. 293 s.
- Šmite E, Pan H, Lundgren LN. 1995. Lignan glycosides from inner bark of *Betula pendula*. *Phytochemistry* 40(1):341-3.
- Sundberg A, Sundberg K, Lillandt C, Holmbom B. 1996. Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. *Nord Pulp Pap Res J* 11(4):216-9.
- Tadros TF. 2013. *Emulsion Formation and Stability*. Weinheim: John Wiley & Sons, Incorporated. 252 s.
- Teleman A, Tenkanen M, Jacobs A, Dahlman O. 2002. Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucuronoxylan isolated from birch and beech. *Carbohydr Res* 337(4):373-7.
- Tenkanen M, Tamminen T, Hortling B. 1999. Investigation of lignin-carbohydrate complexes in kraft pulps by selective enzymatic treatments. *Appl Microbiol Biotechnol* 51(2):241-8.
- Valoppi F, Lahtinen MH, Bhattarai M, Kirjoranta SJ, Juntti VK, Peltonen LJ, Kilpeläinen PO, Mikkonen KS. 2019. Centrifugal fractionation of softwood extracts improves the biorefinery workflow and yields functional emulsifiers. *Green Chem* 21(17):4691-705.
- Waraho T, McClements DJ, Decker EA. 2011. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology* 22(1):3-13.

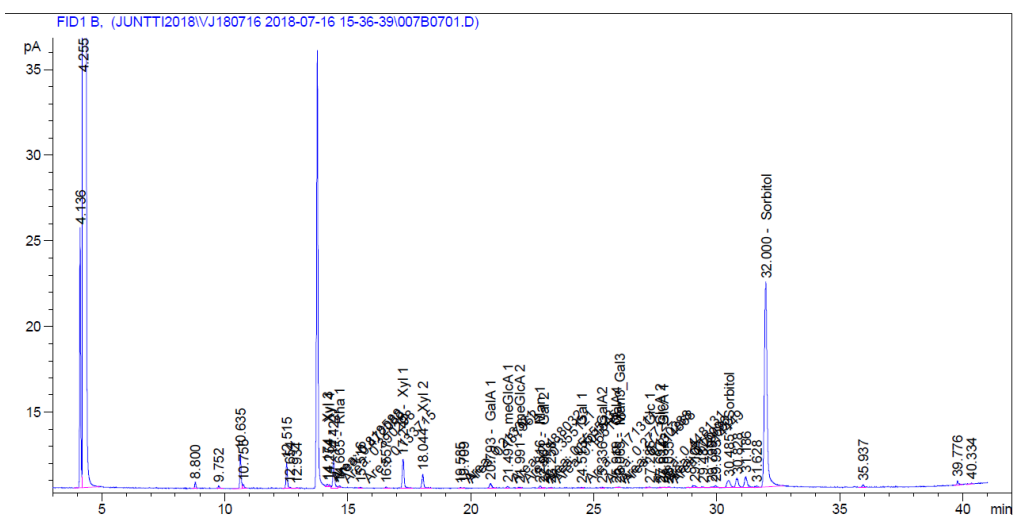
- Watanabe T, Koshijima T. 1988. Evidence for an Ester Linkage between Lignin and Glucuronic Acid in Lignin-Carbohydrate Complexes by DDQ-Oxidation. *Agric Biol Chem* 52(11):2953-5.
- Westbye P, Köhnke T, Gatenholm P. 2008. Fractionation and characterization of xylan rich extracts from birch. *Holzforschung* 62(1):31-7.
- Willför S, Pranovich A, Tamminen T, Puls J, Laine C, Suurnäkki A, Saake B, Uotila K, Simolin H, Hemming J, Holmbom B. 2009. Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides-A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Ind Crops Prod* 29(2-3):571-80.
- Yadav MP, Hicks KB. 2015. Isolation of barley hulls and straw constituents and study of emulsifying properties of their arabinoxylans. *Carbohydr Polym* 132:529-36.
- Yadav MP, Johnston DB, Hicks KB. 2009. Corn fiber gum: New structure/function relationships for this potential beverage flavor stabilizer. *Food Hydrocolloids* 23(6):1488-93.
- Yadav MP, Johnston DB, Hotchkiss Jr. AT, Hicks KB. 2007. Corn fiber gum: A potential gum arabic replacer for beverage flavor emulsification. *Food Hydrocolloids* 21(7):1022-30.
- Yamauchi R, Goto Y, Kato K, Ueno Y. 1984. Prooxidant Effect of Dihydroxyacetone and Reducing Sugars on the Autoxidation of Methyl Linoleate in Emulsions. *Agric Biol Chem* 48(4):843-8.
- Zhang C, Yun Y, Zhang Z, Liang Y. 2016. Simultaneous determination of neutral and uronic sugars based on UV-vis spectrometry combined with PLS. *International Journal of Biological Macromolecules* 87:290-4.

LIITTEET

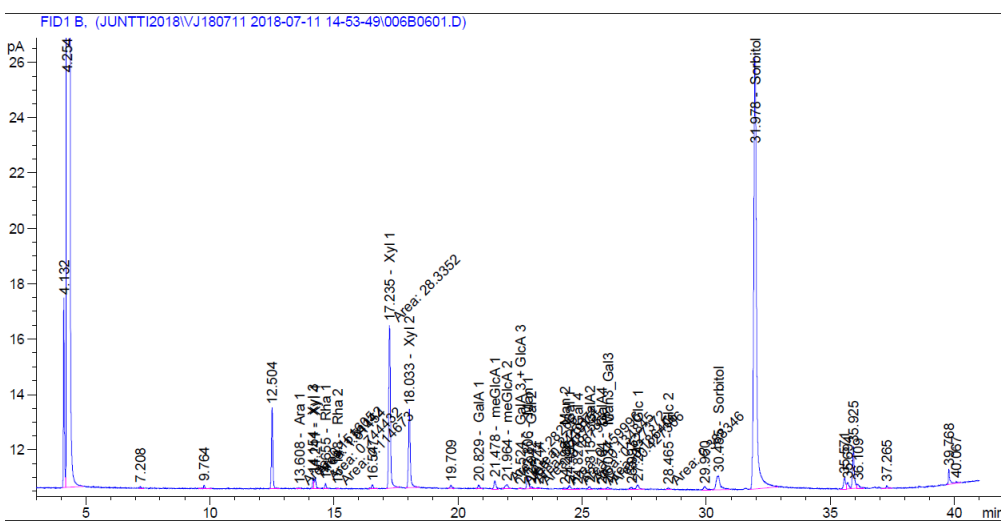
Liite 1 Monosakkaridianalyysin kromatogrammit



Kuva 1 GX:n monosakkaridijakauma

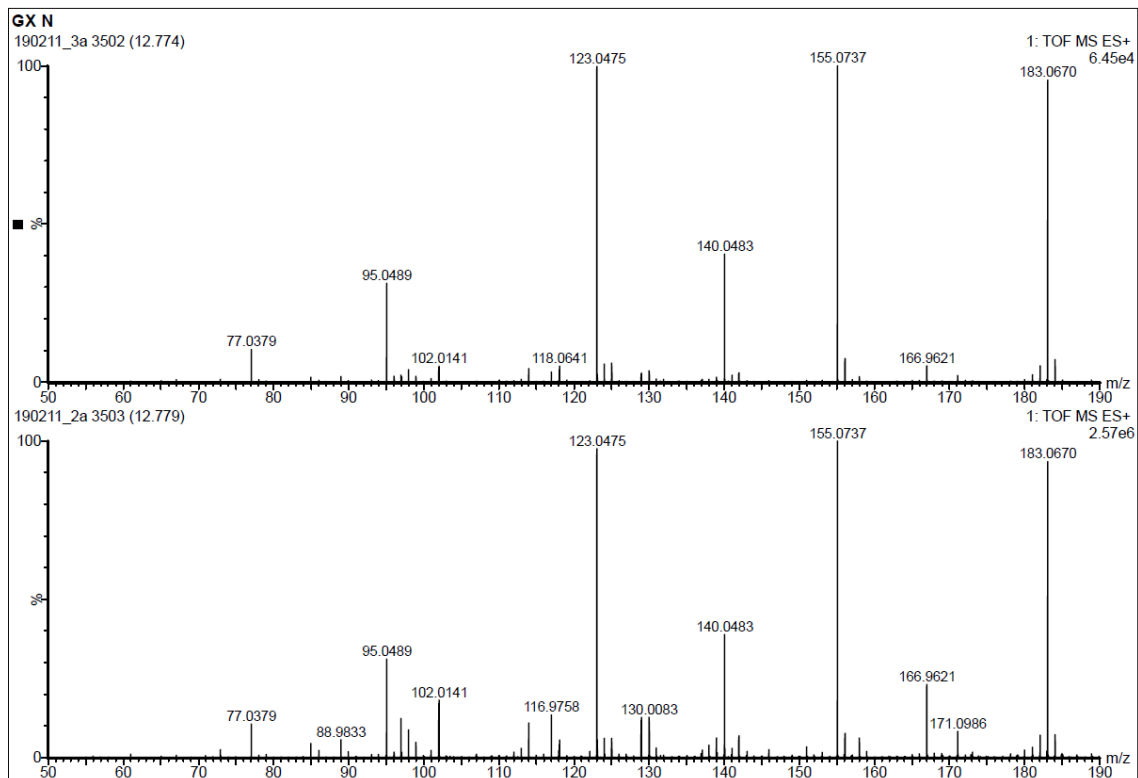


Kuva 2 Kerman monosakkaridijakauma

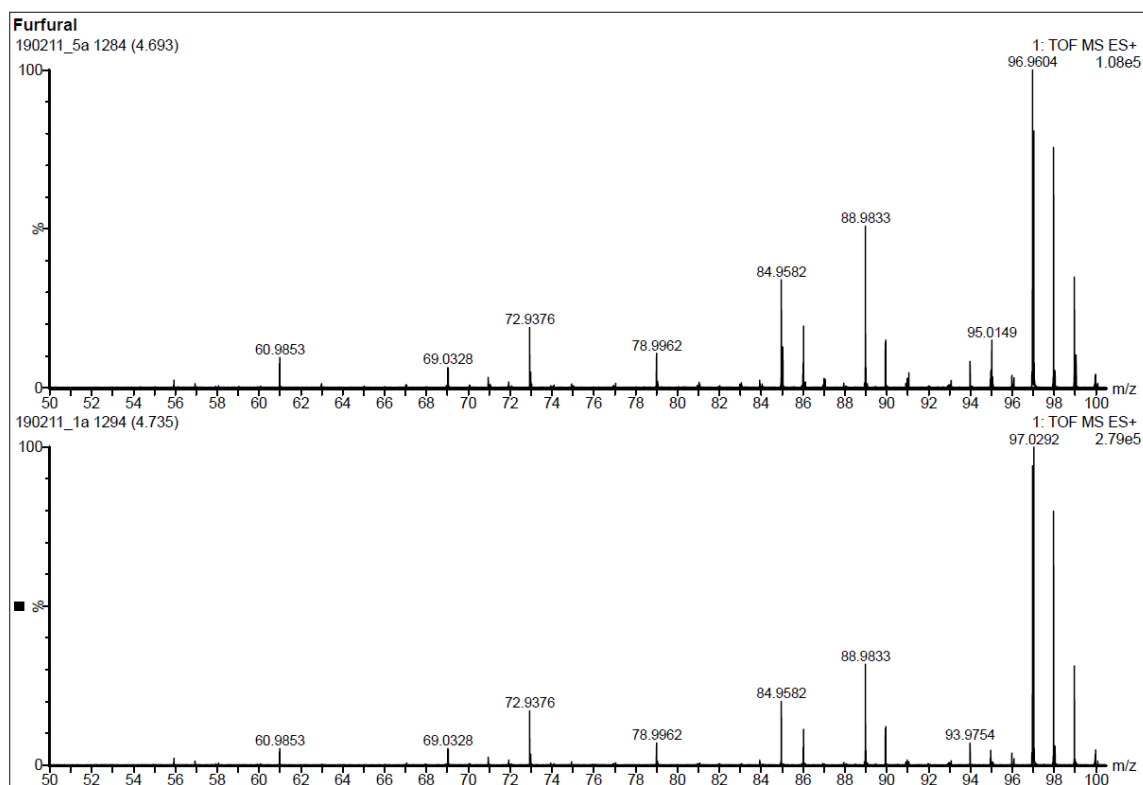


Kuva 3 Jatkuvan faasin monosakkaridijakauma

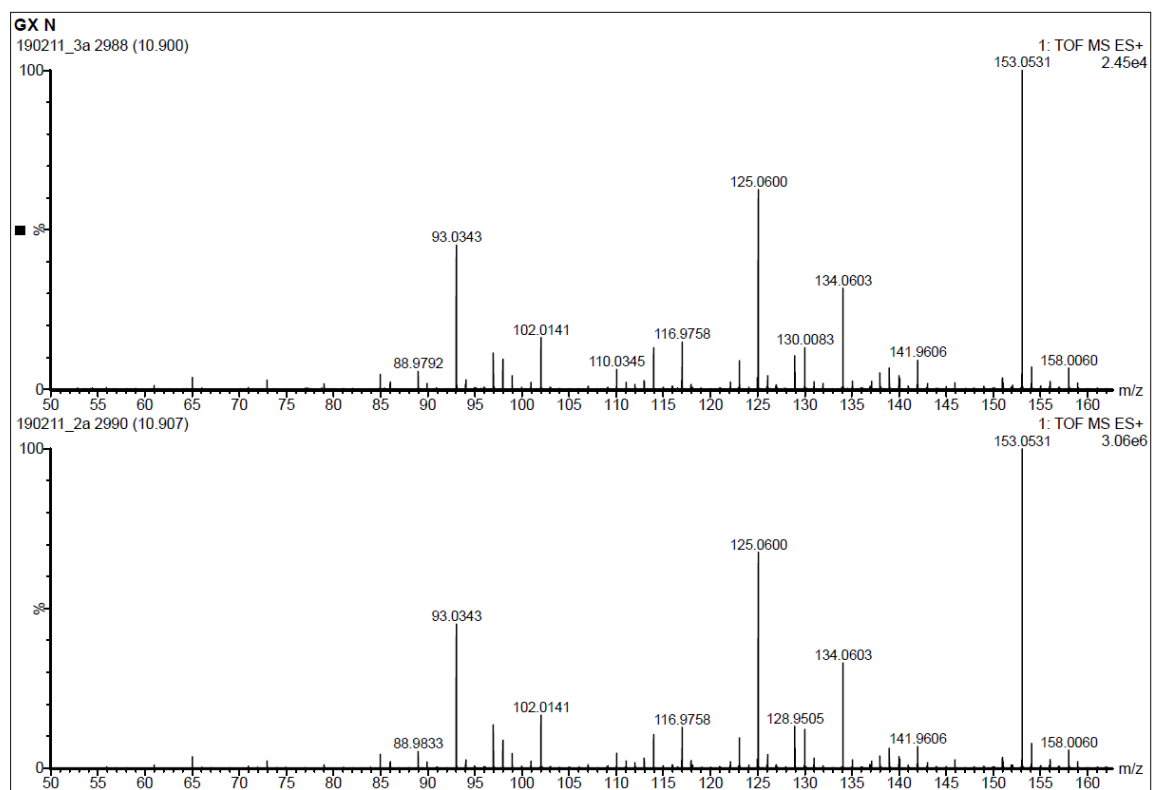
Liite 2 Massaspektrometrian massaspektrit



Kuva 1 Ylhäällä GX:n N-näytteestä analysoitu massaspektri ja alhaalla vaniliinistandardista



Kuva 2 Ylhäällä GX:n happohydrolyysinäytteen massaspektri ja alhaalla furfuraalistandardin



Kuva 3 Ylhäällä GX N-näytteen massaspektri ja alhaalla syringaldehydistandardiaineen

Liite 4 Käytetyt kaavat

Saantoprosentin määrittäminen

$$\text{Saanto -\%} = (\text{määritetty pitoisuus} / \text{lisätty pitoisuus}) \times 100 \% \quad (1)$$

Keskihajonta

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} \quad (2)$$

Variaatiokerroin (CV%)

$$CV\% = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3)$$

Henderson-Hasselbalch'in yhtälö

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \quad (4)$$

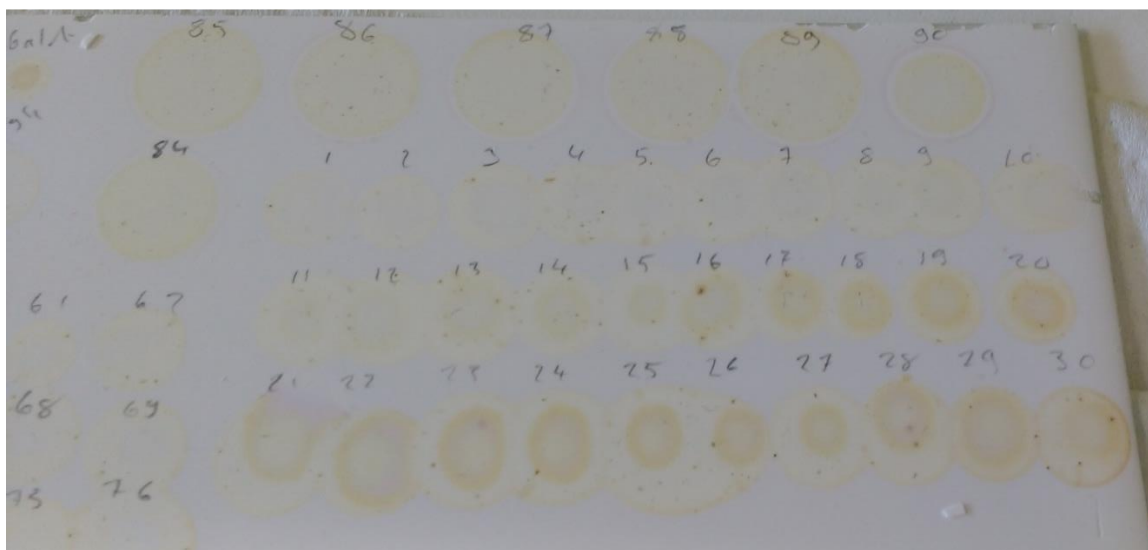
Isoelektronisen pisteen ja pK_a:n suhde

$$pI = (pK_{a1} + pK_{a2})/2 \quad (5)$$

Liite 5 Orsinolivärjäykset



Kuva 1 Orsinoliliuksen testaukset. Vasemmalla GalA-standardin, keskellä GX-standardin ja oikealla veden kanssa reagoineet orsinoliliukset 10 min 100 °C:ssa jälkeen.



Kuva 2 Orsinoliliuksella värjättyjä fraktioita