

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

EKT-sarja 1626

OHRAN HORDEIINIEN KOKOJAKAUMAN MÄÄRITYS ASYMMETRISELLÄ  
POIKITTAISVIRTAUSKENTTÄVIRTAUSFRAKTIOINNILLA

Pasi Perkiö

Helsinki 2013

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI		
Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta	Laitos — Institution — Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Pasi Perkiö		
Työn nimi — Arbetets titel — Title Ohran hordeiinien kokojakauman määrittäminen asymmetrisellä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioidulla		
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarviketeknologia (viljateknologia)		
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterin tutkielma	Aika — Datum — Month and year Joulukuu 2013	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 69
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Tutkielman kirjallisuussosiossa tarkasteltiin ohran (<i>Hordeum vulgare</i>) prolamiineja eli hordeiineja ja niiden teknologisia ominaisuuksia. Lisäksi perehdyttiin eluutiomenetelmä kenttävirtausfraktiointiin ja proteiinien moolimassajakauman määrittämiseen moolimassaselektiivisillä sekä spektrofotometrisillä menetelmillä. Kokeellisessa osiossa määritettiin uuttomenetelmä, jolla pyrittiin uuttamaan suuret polymeeriset hordeiinit rikkomatta niiden sisältämiä rikkisiltoja. Hordeiinien moolimassa, molekyylikoko ja -muoto määritettiin AF4:iin (engl. asymmetric flow field-flow fractionation) kytketyillä MALS-, UV- ja RI-ilmaisimilla.</p> <p>Hordeiinien uuttoliuokseksi valittiin 40-prosenttinen 1-propanoli ja polymeeristen hordeiinien uutto tehostettiin sonikoimalla näyte. Käytetty uuttomenetelmä liuotti suurimman osan ohran hordeiineista. Ajoliuoksena AF4:ssa käytettiin 20-prosenttista 1-propanolia, etteivät laitteiston kanavat vahingoittuisi. Ohrautteen ekstinktiokerroin <math>\epsilon</math> mitattiin 280 nm:n aallonpituusalueella 20-prosenttisessä 1-propanolissa ja <math>\frac{\partial n}{\partial c}</math>-arvo määritettiin laskennallisesti. Mittaustuloksien mallintamiseen käytettiin Berry-yhtälöä.</p> <p>Ohrautteen AF4 fraktogrammeista havaittiin viisi selkeää piikkiä, jotka elektroforeesin avulla tunnistettiin koostuvan aggregoituneista monomeerisistä ja polymeerisistä hordeiineista sekä pienistä määristä albumiineja, globuliineja ja sonikoinnissa pilkkoutuneita proteiineja. Hordeiinien muotoa tutkittiin AF4:lla saatujen massafraktaalien (<math>v</math>) ja polydispersiteetti-indeksin (PDI) avulla. Hordeiinien todettiin muodostavan 20-prosenttisessä 1-propanolissa epäsäännöllisen muotoisia ja sauvamaisia aggregaatteja.</p> <p>Virhettä tuloksiin aiheutti mitattu ekstinktiokerroin ja laskennallinen <math>\frac{\partial n}{\partial c}</math>-arvo sekä valonsirontailmaisimen ylikuormittuminen. Näyteajojen saanto oli välillä 19–26 %. Alhainen saanto selittyy hordeiinien takertumisella ruiskusuodattimeen ja AF4:n virtauskanavan ultrasuodatusmembraaniin sekä saannon laskemiseksi käytetyn laskentamallin soveltumattomuudella suurille aggregaateille.</p> <p>Tutkimuksessa osoitettiin AF4:n yhdistettynä MALS/UV-ilmaisimiin soveltuvan hordeiinien moolimassan, koon ja muodon analysoimiseen. Sen sijaan hordeiinien analysointi AF4:lla 20-prosenttisessä 1-propanolissa osoittautui vaikeaksi, sillä hordeiinit eivät pysyneet liukoisessa muodossa pitkiä aikoja, vaan muodostivat suuria proteiiniaggregaatteja.</p>		
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Ohra, proteiini, hordeiini, prolamiini, moolimassa, kenttävirtausfraktiointi, valonsironta		
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda		
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-sarja 1626		

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI		
Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry	Laitos — Institution — Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä — Författare — Author Pasi Perkiö		
Työn nimi — Arbetets titel — Title Determination of molecular weights of polymeric barley proteins by asymmetrical flow field-flow fractionation combined with MALS/UV/RI		
Oppiaine — Läroämne — Subject Food Technology (Cereal Technology)		
Työn laji — Arbetets art — Level M. Sc. Thesis	Aika — Datum — Month and year December 2013	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 69
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>The aim of the literature review was to examine barley's (<i>Hordeum vulgare</i>) alcohol-soluble proteins – hordeins and their technological attributes. Additionally, applicability of flow field-flow fractionation (FFF) separation method as well as spectrophotometric and light scattering methods for protein characterization was under investigation. The objective of the experimental research was to determine a suitable extraction method for hordeins and subsequent analysis of their molecular weight distribution, size and conformation by the use of AF4 (asymmetric flow field-flow fractionation) in combination with MALS-, UV- and RI-detectors.</p> <p>40 % 1-propanol combined with mild sonication treatment proved to be the most efficient method to extract hordeins from barley flour. In order to prevent deterioration of the FFF channels the solvent had to be diluted to 20 %. Same dilution was used to measure hordeins' extinction coefficient and to calculate <math>\frac{dn}{dc}</math> theoretically. Berry plot was found to be the most suitable fit for the data analysis.</p> <p>Extracted hordeins were analysed with SDS-PAGE. Extracts contained monomeric C, B and <math>\gamma</math> hordeins and polymeric B, D and <math>\gamma</math> hordeins. Also, small amounts of albumins, globulins and hydrolysed proteins were present. Extracts' fractograms had five distinctive peaks. All of the peaks' mass fractals and polydispersity indices were above 1, which means analysed aggregates were polydisperse and shaped as complex rods. This can be explained by 1-propanol influenced protein aggregation.</p> <p>Some inference in light scattering was identified in the MALS-detector signal. This and the use of measured extinction coefficient and calculated index of refraction caused some errors in the data. The low sample yield (19–26 %) can be explained by the hordeins' adhering to a syringe filter and adsorbing to the surface of AF4's ultrafiltration membrane. Also, the use of over simplifying mathematical model to calculate the results and yield could cause some errors in the results.</p> <p>This study showed that it is possible to study <math>M_w</math>, size and conformation of polymeric hordeins with AF4 combined with MALS/UV-detectors and that hordeins form big aggregates in 20 % 1-propanol. For MALS proteins should be extracted in a solvent that will not interfere with subsequent analysis and proteins net charge, which creates a challenge to find proper solvent for hordeins. Nevertheless AF4 proved to be useful and delicate tool for characterizing cereal polymeric proteins.</p>		
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Barley, protein, prolamin, hordein, molar mass, field-flow fractionation, multi-angle light scattering		
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited University of Helsinki's Digital Archive, Helda		
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-series 1626		

## **ESIPUHE**

Maisterin tutkielma tehtiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen viljateknologian ryhmässä. Työn aiheen esittivät ja myös työn ohjaajina toimivat ylitarkastaja Päivi Kanerva Evirasta ja ETT Leena Pitkänen NIST:ltä (The National Institute of Standards and Technology, USA). Apurahan myönsi Helsingin yliopisto.

Haluan kiittää Päivi Kanervaa ja Leena Pitkästä työn ohjauksesta ja arvokkaista neuvoista. Kiitokset yliopistonlehtori Päivi Tuomaiselle ja yliopistonlehtori Tuula Sontag-Strohille viisaista sanoista sekä opastuksesta. Kiitos tuesta ja opastuksesta tutkielman valvojalle professori Hannu Salovaaralle. Haluan kiittää myös tutkimusteknikko Outi Brinckää korvaamattomasta avusta käytännön työn suorituksessa. Lisäksi tahdon kiittää ETT Ndegwa Mainaa, ETM Noora Mäkelää ja ETYO Helinä Siivistä vertaistuesta ja hyvistä kommentteista.

Lopuksi kiitos perheelleni ja lähipiirilleni kannustuksesta opintojeni aikana.

Helsingissä 22.11.2013

Pasi Perkiö

# SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ESIPUHE

1 JOHDANTO	8
2 KIRJALLISUUSTUTKIMUS	10
2.1 Kirjallisuustutkimuksen tavoitteet	10
2.2 Ohran proteiinit	10
2.2.1 Ohran prolamiinit eli hordeiinit	11
2.2.2 Hordeiinien uuttaminen	17
2.2.3 Hordeiinien funktionaaliset ominaisuudet	18
2.3 Kenttävirtausfraktiointi	23
2.3.1 Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi	25
2.3.2 Erotuskyvyn optimointi asymmetrisellä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioinnilla	26
2.3.3 Moolimassan ja molekyylikoon määrittäminen valonsirontamenetelmällä	27
2.3.4 Proteiinien kenttävirtausfraktiointianalyysin haasteet	30
3 KOKEELLINEN TUTKIMUS	32
3.1 Kokeellisen tutkimuksen tavoitteet	32
3.2 Materiaalit ja menetelmät	32
3.2.1 Tutkimuksessa käytetyt materiaalit	32
3.2.2 Uuttomenetelmän kehittäminen	32
3.2.3 Hordeiinien koko- ja moolimassajakauman määrittäminen	34
3.2.4 Tulosten käsittely	39
3.3 Tulokset	40
3.3.1 Uuttomenetelmä	40
3.3.2 Hordeiinien ekstinktiokerroin ja $dn/dc$ -arvo	41
3.3.3 Hordeiinien moolimassan ja molekyylikoon määrittäminen kenttävirtausfraktioinnilla	42
3.3.4 Tilastollisen tarkastelun tulokset	47
3.4 Pohdinta	48
3.4.1 Uuttomenetelmä	48
3.4.2 Hordeiinien ekstinktiokerroin ja $dn/dc$ -arvo	49

3.4.3 Ajo-olosuhteiden optimointi	50
3.4.4 Moolimassan ja jakauman laskeminen AF2000-ohjelmalla	52
3.4.5 Hordeiinien moolimassa, koko ja muoto	52
4 PÄÄTELMÄT	56
LÄHDELUETTELO	57
LIITTEET	63
Liite 1. Hordeiinien aminohapposekvenssit	63
Liite 2. Hordeiinien ekstinktiokertoimet	66
Liite 3. Hordeiinien kokojakaumatuloksien tilastollisen käsittelyn tulosteet	68

## KÄYTETYT LYHENTEET

AF4	Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi -menetelmä (engl. asymmetric flow field-flow fractionation)
FFF	Kenttävirtausfraktiointi-menetelmä (engl. field-flow fractionation)
FTIR	Fouriermuunnosilmaisin (engl. Fourier transform infrared)
HMW	Suuri moolimassa (engl. high molecular weight)
IEP	Isoelektrinen piste (engl. isoelectric point)
LMW	Pieni moolimassa (engl. low molecular weight)
MALDI-MS	Matriisiavusteinen laser-desorptioionisaatiomassaspektrometri (engl. matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)
MALS	Monikulmavalonsirontailmais (engl. multi-angle light scattering)
MMW	Keskisuuri moolimassa (engl. medium molecular weight)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi-ilmais (engl. nuclear magnetic resonance)
PDI	Polydispersiteetti-indeksi (engl. polydispersity index)
RI	Taitekerroin (engl. refractive index)
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (engl. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

## 1 JOHDANTO

Viime vuosikymmenen aikana kenttävirtausfraktioinnin (engl. field-flow fractionation, FFF) käyttö elintarvikkeiden makromolekyylien moolimassan, koon ja muodon määrittämiseksi on kasvanut huomattavasti. Kenttävirtausfraktioinnin avulla on mahdollista erotella ja analysoida suuria (>1 µm) liukoisia molekyyliä ja aggregaatteja, vaikkakin useimmat sovellukset ovat alle 1 µm:n molekyylielle (Nilsson 2013). Tunnetusti *Triticeae*-tribuksen viljojen alkoholiliukoiset proteiinit eli prolamiinit muodostavat hyvin suuria ( $M_w > 10^7$  g/mol) proteiiniaggregaatteja, joita on mahdotonta tutkia aggregoituneessa muodossa perinteisillä analyysimenetelmillä, kuten geelielektroforeesilla (Shewry ja Tatham 1999; Stevenson ym. 2003). Juuri proteiinien polymeroitumiskyvyn uskotaan olevan monien hyviksi todettujen teknologisten ominaisuuksien, kuten rakenteenmuodostuskyvyn, taustalla. Toinen mielenkiintoinen tutkimusaihe on ollut viljapohjaiset proteiini-isolaatit, joiden funktionaalisten ominaisuuksien kannalta proteiinin liukoiset ominaisuudet ovat tärkeitä (Yalçın ja Çelik 2007). Erityisesti ohran (*Hordeum vulgare*) proteiinit ovat olleet kiinnostuksen kohteena tärkkelysteollisuudelle, koska ohratärkkelyksen tuotannosta muodostuu proteiinirikkaita sivujakeita, jotka tällä hetkellä menevät matalatuottoiseen rehukäyttöön (Andersson ja Åman 2001).

Ohrassa on 8–15 % proteiinia, josta yli 50 % on prolamiiniksi luokiteltua varastoproteiinia (Shewry 1993). Ohran prolamiineja eli hordeiineja on tutkittu paljon mallastuksen kannalta, mutta niiden teknologiset ominaisuudet ja potentiaaliset käyttökohteet ovat jääneet huomattavasti pienemmälle huomiolle. Vähäisen kiinnostuksen taustalla on ollut hordeiinien kyvyttömyys muodostaa vehnän gluteenin tapaista viskoelastista proteiiniverkosta, sitkoa, mikä on rajoittanut ohran käyttöä leipomoteollisuudessa. Ohran käyttöön kaupallisissa sovelluksissa on kuitenkin yritetty kannustaa, ohran β-glukaanille myönnettyjen terveystaittämien takia (EFSA 2011).

Hordeiineja voidaan käyttää muissa elintarvikesovelluksissa kuin leipomotuotteissa, kuten proteiini-isolaatteina, konsentraatteina ja vaahdonmuodostajina (Yalçın ja Çelik 2007, Wang ym. 2010; Zhao ym. 2011). Proteiinien teknologiset ominaisuudet ovat riippuvaisia niiden koosta, moolimassasta, liukoisuudesta, konformaatiosta ja vuorovaikutuksista ympäröivien molekyylien kanssa.

Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. asymmetric flow field-flow fractionation, AF4) on hellävarainen molekyylien erotusmenetelmä, johon tyypillisesti on



kytketty moolimassaselektiivinen valonsirontailmaisoin yhdistettynä RI- sekä UV-ilmaisimiin. Menetelmän avulla saadaan tietoa molekyylien muodosta, kokojakaumasta ja liukoisista ominaisuuksista. Menetelmä on ylivertainen verrattuna esimerkiksi geelielektroforeesiin, jolla voidaan analysoida vain alle 260000 g/mol:n kokoluokkaa olevia proteiineja.

AF4:n etuna on, että ajoliuksena voidaan käyttää melkein mitä vesiliuosta tahansa. Erotuskykyä voidaan parantaa optimoimalla virtausnopeudet, valitsemalla oikeat membraanit ja säätämällä ajoliuksen pH:ta, lämpötilaa tai ionivahvuutta (Yohannes ym. 2011). Menetelmässä on kuitenkin omat haasteensa. Ensinnäkin näyte täytyy saada liukoiseen muotoon. Toiseksi, virtauskanavassa voi tapahtua proteiinien ennakoimatonta tarttumista ultrasuodatusmembraaniin tai aggregoitumista, mikä vaikuttaa analyysituloksiin (Rambaldi ym. 2009).

Tutkimuksen kirjallisuusosion tavoitteena oli perehtyä ohran hordeiineihin ja niiden teknologisiin ominaisuuksiin. Lisäksi tutustuttiin FFF:iin eluutiomenetelmänä ja proteiinien moolimassan määrittämiseen MALS/UV/RI-ilmaisimilla. Tutkielman kokeellisen osuuden tavoitteena oli kehittää uutomenetelmä, jonka avulla saadaan uutettua ohran suurikokoisimmat hordeiinit rikkomatta niiden sisältämiä rikkisiltoja ja analysoida hordeiinien koko- ja massajakauma AF4:lla.

## 2 KIRJALLISUUSTUTKIMUS

### 2.1 Kirjallisuustutkimuksen tavoitteet

Tutkielman kirjallisuusosiossa tarkastellaan ohran (*Hordeum vulgare*) proteiinien prolamiineja ja niiden teknologisia ominaisuuksia. Lisäksi perehdytään kenttävirtausfraktiointiin eluutiomenetelmänä ja molekyylien moolimassan määrittämiseen MALS/UV/RI-ilmaisimilla.

### 2.2 Ohran proteiinit

Ohra on diploidinen viljakasvi ja se kuuluu *Triticeae*-tribukseen, johon kuuluu myös vehnä ja ruis. Ohran jyvässä on n. 8–15 % proteiinia (Shewry 1993). Klassisesti viljojen proteiinit on luokiteltu liukoisuuden mukaan. Luokittelun kehitti Thomas Burr Osborne 1900-luvun alkupuolella (Osborne 1924). Veteen liukenevia ja lämmöstä koaguloituvia proteiineja kutsutaan albumiineiksi. Globuliinit liukenevat laimeaan suolaliuokseen, muttei veteen eikä vahvaan suolaliuokseen. Prolamiinit liukenevat alkoholin 40–70 % vesiliuoksiin. Proteiineja, jotka liukenevat heikkoihin happo- ja emäsluoksiin tai pelkistyksen jälkeen alkoholiliuokseen kutsutaan joko gluteliineiksi tai suurimoolimassaisiksi (engl. high molecular weight) prolamiineiksi.

Osbornen fraktiointi on vanha luokittelutapa ja todettu monelta osin epätäydelliseksi (Mifflin ym. 1983; Shewry ja Tatham 1990). Esimerkiksi monista yrityksistä huolimatta kaikkea proteiinia ei ole saatu erotettua viljamateriaalista liukoiseen muotoon. Tätä kutsutaan jäännösproteiiniksi. Tämän vuoksi on huomattavasti järkevämpää luokitella proteiiniä sen kemiallisen koostumuksen ja rakenteen perusteella.

Rhodes ja Gill (1980) tutkivat ohran proteiinijakeen koostumusta ja määrittivät albumiinien osuudeksi proteiinijakeesta 8,5–12,5 %:a ja globuliinien 2,3–5,7 %:a. Loput proteiinijakeesta koostuu varastoproteiineiksi luokitelluista prolamiineista. Suurikokoisimpia prolamiineja on vaikea liuottaa, mikä asettaa haasteen niiden analysoimiseksi. Lisäksi on hyvä huomioda, että viljojen proteiinianalytiikassa proteiinipitoisuus määritetään typpipitoisuuden kautta, eikä kaikki typpi ole peräisin proteiineista. Osa tyyppiä on muun muassa peräisin vapaista aminohapoista ja peptideistä.

Prolamiinit voidaan jakaa monomeerisiin ja polymeerisiin sen perusteella, onko proteiinin polypeptidiketju sitoutunut disulfididisidoksilla toiseen polypeptidiketjuun. Näin voi muodostua hyvin suuria proteiinimolekyyliä, joita on vaikea liuottaa. Polymeeriset

vehnän prolamiinit ovat olleet jo pitkään mielenkiinnon kohteena, sillä niiden on todettu muun muassa korreloivan lukuisten hyvien vehnäjäuhon leivontaominaisuuksien kanssa (Orth ja Bushuk 1972; MacRitchie 1973,1978; Huebner ja Wall 1976; Field ym. 1983; Huebner ja Bietz 1985; Chakraborty ja Khan 1988). Gupta ym. (1993) tutkivat polymeeristen prolamiinien määrän ja kokojakauman merkitystä vehnäjäuhon leivontalaatuun ja totesivat, että suurien prolamiinien suhteellisesti suurempi määrä ennusti paremmin hyvää leivontalaatua kuin kokonaismäärä.

### 2.2.1 Ohran prolamiinit eli hordeiinit

Ohran proteiinista 40–50 % on prolamiiniksi luokiteltua varastoproteiinia (Delcour ja Hosney 2010; Tatham ja Shewry 2012). Kirjallisuudessa ohran prolamiineista käytetään nimitystä hordeiini ohran latinankielisen nimen *Hordeum* perusteella. Tästä eteenpäin tässä työssä ohran prolamiineja kutsutaan hordeiineiksi.

Hordeiinit ovat alkuperäisessä (natiivissa) muodossa veteen tai vahvaan suolaliuokseen liukenemattomia, mikä erottaa ne albumiineista ja globuliineista (Shewry ja Tatham 1990). Eri hordeiinien luokitteluperusteet vaihtelevat luokittelijan näkökulman ja taustan mukaan. Hordeiinit voidaan luokitella aminohapposekvenssin, liukoisuuden tai koon perusteella. Mifflin ym. (1983) luokittelivat hordeiinit aminohappokoostumuksen perusteella vähän (engl. S-poor) tai paljon (engl. S-rich) rikkiä sisältäviin ja suurimoolimassaisiin hordeiineihin. Luokittelussa on etuna ajatus hordeiinien teknologisista ominaisuuksista, joihin rikkiä sisältävillä aminohapoilla on suuri merkitys niiden rakenteenmuodostuskyvyn ansiosta.

Liukoisuuden perusteella hordeiinit voidaan luokitella neljään eri ryhmään. Monomeerisia hordeiineja ovat C- ja  $\gamma$ - sekä osa B-hordeiineista ja ne liukenevat 40–70 % alkoholiliuokseen. Polymeeriset B-,  $\gamma$ - ja D-hordeiinit liukenevat heikkoihin happo- ja emäsluokseen tai disulfididosten pelkistyksen jälkeen alkoholiliuokseen. Koon perusteella hordeiinit voidaan jakaa kolmeen eri ryhmään: suuri (HMW), keskisuuri (engl. medium molecular weight; MMW) ja pieni moolimassaisiin hordeiineihin (engl. low molecular weight; LMW) (Wieser ja Köhler 2008). HMW-hordeiineja ovat D-hordeiinit, MMW-hordeiineja ovat C-hordeiinit ja LMW-hordeiineja ovat B- ja  $\gamma$ -hordeiinit.

Hordeiinit sisältävät eniten (mol-%) aminohappo glutamiinia ja proliinia sekä huomioitavan määrän rikkisiltoja muodostavaa kysteiniä (taulukko 1). Hordeiineissa on paljon hydrofobisia aminohappoja: proliini, alaniini, valiini, isoleusiini ja leusiini. Tästä

seuraa tiivis proteiinirakenne, jossa hydrofobiset alueet ovat pakkautuneet molekyylin keskustaa kohti ja hydrofiiliset ulospäin. Hydrofobisuus tekee hordeineista hydrofiilisiin liuottimiin niukkaliukoisia polymeerejä ja hidastaa proteiinien digestiota ruoansulatuskanavassa. Hordeineissa olevat spesifiset aminohapposekvenssit laukaisevat ohutsuolen limakalvolla T-soluvälitteisen immuunireaktion geneettisesti vehnän, rukiin ja ohran prolamiineille alttiille henkilöille (Wieser ja Köhler 2008).

**Taulukko 1.** Ohran hordeiinien aminohappokoostumus (mol-%).

Aminohappo	Korkean	Vähän rikkiä	Runsaasti rikkiä	
	molekyyllipainon (HMW)	(S-poor) (MMW)	(S-rich) (LMW)	
	D hordeiini <sup>1</sup>	C hordeiini <sup>2</sup>	B hordeiini <sup>1</sup>	γ hordeiini <sup>1</sup>
Alaniini (A)	3,2	1,5	2,5	2,1
Kysteiini (C)	1,5	0	2,9	3,5
Asparagiinihappo (D)	0,6	0,6	0	0,7
Glutamiinihappo (E)	2,2	1,5	1,8	2,1
Fenyylialaniini (F)	1,3	7,6	4,7	5,6
Glysiini (G)	15,7	0,6	2,9	3,1
Histiidiini (H)	3,1	0,6	1,4	1,4
Isoleusiini (I)	0,7	3,4	4,4	3,8
Lysiini (K)	1,2	0,9	0,7	1,7
Leusiini (L)	4,1	8,5	8,0	7,0
Metioniini (M)	0,4	0	1,1	2,1
Asparagiini (N)	0,9	0,9	0,7	1,7
Proliini (P)	10,5	29,0	19,3	16,8
Glutamiini (Q)	25,8	37,2	30,3	28,0
Arginiini (R)	1,6	0,9	2,6	1,4
Seriini (S)	10,5	2,4	4,7	5,6
Treoniini (T)	7,3	1,2	2,2	3,1
Valiini (V)	4,1	0,3	6,2	7,3
Tryptofaani (W)	1,2	0,6	0,7	0,7
Tyrosiini (Y)	4,2	1,8	2,5	2,1
%-osuus hordeineista	2–4 <sup>3</sup>	10–20 <sup>4</sup>	70–80 <sup>1</sup>	<5 <sup>1</sup>
Molekyylien välisiä disulfidisidoksia	+	–	±	±
Toistojakso <sup>5</sup>	QQPGQG (x26)	QPQQPFP (x36)	QQPFPQ (x13)	QPQQPFP (x15)

<sup>1</sup>Shewry ym. (1999).

<sup>2</sup>Tatham ja Shewry (2012).

<sup>3</sup>Shewry (1993)

<sup>4</sup>Tatham ja Shewry (1995)

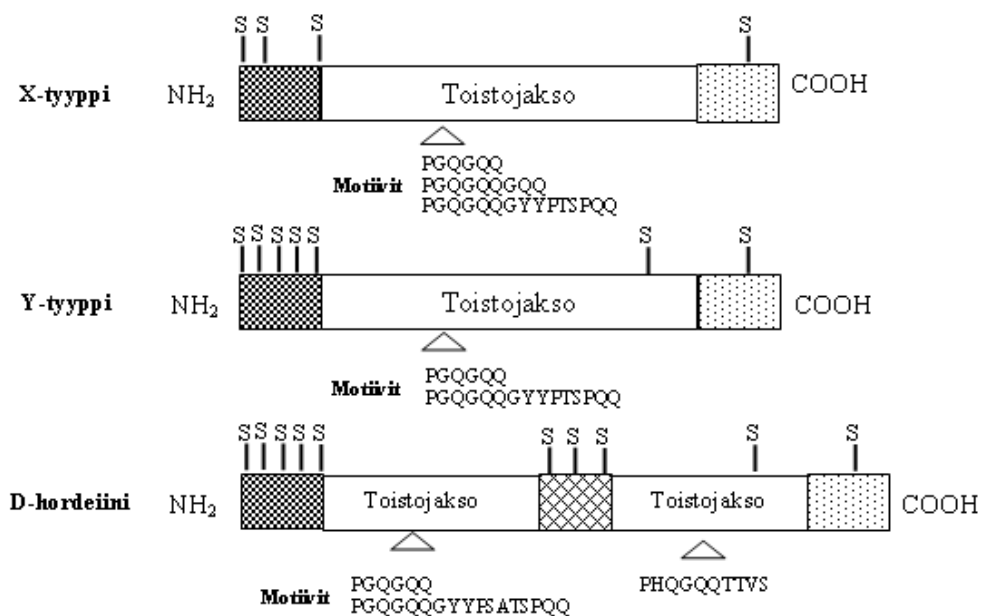
<sup>5</sup>Wieser ja Tatham (2008)

## **D-hordeiini**

Suurimmat hordeiinit, jotka eivät liukene ilman pelkistystä 70-prosenttiseen alkoholiliuokseen, on luokiteltu gluteliineiksi. Tässä työssä ei käytetä termiä gluteliini, vaan puhutaan D-hordeiinista, jolla tarkoitetaan suurikokoisia hordeiineja, joiden peptidiketjujen välissä on disulfididisidoksia.

D-hordeiinien aminohappokoostumus on päätelty ohran perimästä DNA:n emäsjärjestyksen avulla (Shewry ym. 1999). Lajikkeesta riippuen D-hordeiini koostuu 686 aminohappotähteestä, joista 544 kuuluu kolmeen eri toistojaksoon. Toistojaksot ovat P/GHQHQQ, GYYPSXTSPQQ ja TTVS. D-hordeiini muodostaa spiraalimaisen rakenteen, jonka keskellä ja N- sekä C-päässä on rikkiä sisältäviä tähteitä, jotka muodostavat molekyylin sisäisiä ja ulkoisia disulfididisidoksia. Disulfididisidokset tekevät D-hordeiinista massaltaan suuren ja niukasti liukenevan proteiinin.

Ohran D-hordeiini muistuttaa aminohapposekvenssiltään vastaavia vehnän HMW-prolamiineja. Ohrajauho ei kuitenkaan pysty muodostamaan vehnäjäuhon kaltaista vahvaa sitkoa veden kanssa sekoitettaessa. Heikkojen leivontaominaisuuksien uskotaan johtuvan kahdesta eri tekijästä. Ensinnäkin, Anderson ym. (2003) tutkivat vehnän HMW-proteiineja koodaavia geenejä ja he havaitsivat geenien monistuneen kahteen eri paikkaan kromosomistossa (x ja y). Vastaavaa geenimuunnosta ei löydy ohran saati muiden *Triticeae*-tribuksen viljojen kromosomistosta. Geenien toistumisen takia vehnän proteiinit ovat suurikokoisempia, minkä on todettu korreloivan hyvien leivontaominaisuuksien kanssa. Toinen selittävä tekijä on D-hordeiinin aminohapposekvenssin keskellä sijaitseva kysteiniipitoinen ei-toistuva jakso, joka puuttuu vehnästä (kuva 1) (Gu ym. 2003). Keskellä sijaitsevien kysteiniinien vapaiden rikkimolekyylien uskotaan muodostavan molekyylin sisäisiä sidoksia proteiinin N- ja C-pääteissä sijaitsevien rikkimolekyylien kanssa, mikä estää pitkien molekyylien välisten sidoksien muodostumisen, eikä vehnän proteiineille tyypillisiä jättimäisiä polymeerejä pääse muodostumaan. Rikkiä sisältävällä ei-toistojaksolla on oma tehtävänsä kasvin kasvun kannalta. Sen uskotaan toimivan substraattina kysteiniendoproteaasille, jolla on tärkeä rooli jyvän itäessä typpivarastojen vapauttamiseksi (Davy ym. 2000).



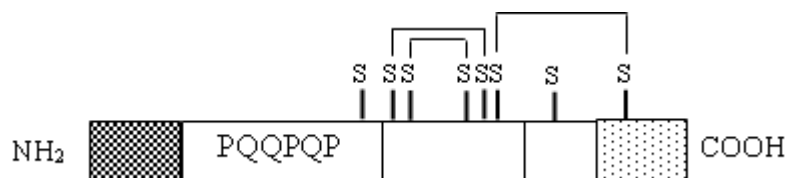
**Kuva 1.** D-hordeiinin ja vehnän x- ja y-tyyppin HMW-gluteenin aminohapposekvenssit. D-hordeiinin sekvenssin keskellä on yksi rikkipitoinen ei-toistuva jakso, joka puuttuu vehnästä (Gu ym. 2003).

### **B- ja $\gamma$ -hordeiinit**

Runsaasti rikkiä sisältävät B- ja  $\gamma$ -hordeiinit ovat määrällisesti suurin ryhmä ja käsittävät n. 80 % ohran prolamiineista. Ryhmä voidaan jakaa monomeerisiin ja polymeerisiin B- ja  $\gamma$ -hordeineihin. Vaikka B- ja  $\gamma$ -hordeineja koodaavat eri geenit, niiden aminohapposekvenssit ovat yllättävän homologisia (Shewry ym. 1985).

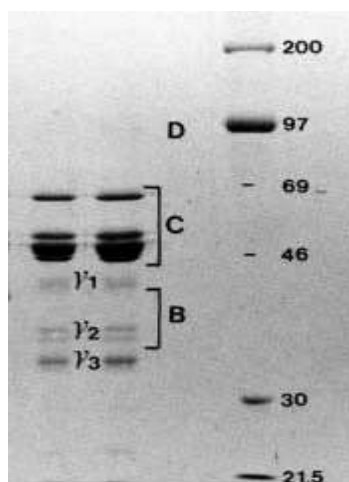
B-hordeiini jakaantuu kahteen eri tyyppiin: B<sub>1</sub>- ja B<sub>3</sub>-hordeineihin (Kreis ym. 1983). Molempien tyyppien aminopäässä on kuuden aminohapon (PQQQP) toistojakso, jonka jälkeen tulee epäsäännöllinen viisi kysteiniä sisältävä jakso (kuva 2). Tämän jälkeen tulee glutamiinipitoinen jakso ja lopulta toistojaksollinen karboksyylipää. B-hordeiinien kahdeksasta vapaasta rikkimolekyylistä kuuden uskotaan muodostavan intramolekulaarisia disulfididoksia ja kahden intermolekulaarisia.

B-hordeiinin toistojakson uskotaan muodostavan löysän spiraalimaisen rakenteen, joka muistuttaa C-hordeiinin rakennetta (kts. seuraava alakappale) (Shewry ja Tatham 1999). Karboksyylipäässä on  $\alpha$ -kierrettä,  $\beta$ -käännöksiä ja  $\beta$ -levyjä sekä sattumanvaraista kierrettä muistuttavia alueita ja rikkipitaisuutensa ansiosta alueen uskotaan olevan globulaarinen (Shewry ja Tatham 1999).



**Kuva 2.** B-hordeiinin aminohapposekvenssi, jonka aminopäässä on kuuden aminohapon toistojakso (PQQPQP). Viivalla yhdistettyjen rikkimolekyylin uskotaan muodostavan molekyylin sisäisiä disulfididisidoksia ja kaksi vapaata rikkiä molekyylien välisiä disulfididisidoksia (Anderson 2013).

$\gamma$ -hordeiinit ovat hyvin pieni ryhmä (<5 mol-%), joka voidaan jakaa  $\gamma_1$ -,  $\gamma_2$ -, ja  $\gamma_3$ -hordeineihin (Shewry ym. 1985).  $\gamma_1$ - ja  $\gamma_2$ -hordeiinit ovat hyvin homologisia keskenään ja ne muodostavat sekä molekyylin sisäisiä että molekyylien välisiä disulfididisidoksia (kuva 3) (Rechinger ym. 1993).  $\gamma_3$ -hordeiini eroaa niin rakenteeltaan kuin funktioltaan edellisistä. Se on monomeerinen runsaasta kysteiniipitoisuudesta huolimatta ja muodostaa vain molekyylin sisäisiä rikkisidoksia. Rechinger ym. (1993) tutkivat  $\gamma_3$ -hordeiinin tarkoitusta kasville ja he havaitsivat sen pitävän muut prolamiinit kuljetuskelpoisina kasvin solulimassa.



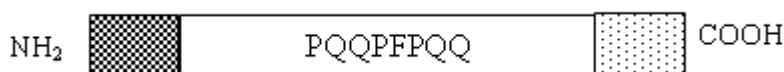
**Kuva 3.** Geelielektroforeesilla ajetun B-hordeiinia vähän sisältävän ohralajikkeen hor2ca pelkistetty prolamiinijae.  $\gamma_1$ - ja  $\gamma_2$ -hordeiinit muodostavat molekyylien välisiä disulfididisidoksia ja ovat kooltaan 40000–45000 g/mol.  $\gamma_3$ -hordeiini muodostaa vain molekyylin sisäisiä sidoksia ja on kooltaan alle 40000 g/mol (Rechinger ym. 1993).

### **C-hordeiini**

Vähärikkinen C-hordeiini käsittää n. 10–20 % ohran prolamiineista ja esiintyy pääasiassa monomeerisena polymeerinä (Tatham ja Shewry 1995, 2012). SDS-PAGE:lla määritettynä C-hordeiinin koko on 55000–70000 g/mol. Savage ym. (2002) määrittivät matriisiavusteisella laser-desorptioionisaatiomassaspektrometrillä (MALDI-MS) C-hordeiinin kooksi 44000–47000 g/mol. Tulos vastaa paremmin geenisekvenssin

perusteella laskettua molekyylimassaa (liite 2, taulukko 5), joten MALDI-MS:n oletetaan olevan tarkempi analyysimenetelmä.

C-hordeiinissa ei ole lainkaan kysteiniä, joten se ei myöskään muodosta molekyylien välisiä disulfididisidoksia. C-hordeiini koostuu pääasiassa kolmesta varauksettomasta aminohaposta: glutamiinista 40–50 mol-%, proliinista 20–30 mol-% ja fenyylialaniinista 7–9 mol-%. Nämä aminohapot muodostavat kahdeksan aminohapon toistojakson (PQQPFPQQ), joka muodostaa polymeerin selkärangan lukuun ottamatta epäsäännöllisiä amino- ja karboksyylipeittä (kuva 4) (Tatham ja Shewry 2012). Arkin ym. (2001) mallinsivat C-hordeiinin aminohapposekvenssin perusteella polymeerin kolmiuloitteisen rakenteen. Heidän mukaansa polymeeri muodostaa  $\beta$ -käännösten tapaisia – mutta löyhempiä –  $\gamma$ -käännöksiä, jotka koostuvat kolmen aminohapon motiiveista: QQP, QPY, QPF, QPQ ja FPQ.



**Kuva 4.** C-hordeiinin aminohapposekvenssi, joka koostuu pääasiassa kahdeksan aminohapon toistojaksosta (PQQPFPQQ) (Tatham ja Shewry 2012).

Hydrofoobisuutensa takia C-hordeiinia on vaikea pilkkoa entsymaattisesti (Steiner ym. 2011). Tämä on osoittautunut eduksi esimerkiksi oluen valmistuksessa, jossa C-hordeiinin on todettu parantavan oluen vaahdon muodostusta (Sheehan ja Skerit 1997). Muut teknologiset ominaisuudet elintarvikkeiden rakenteen muodostajana ovat heikot, koska C-hordeiini ei pysty muodostamaan kovalenttisia sidoksia muiden polymeerien kanssa.

Ohran C-hordeiinien käyttäytymisestä leivonnassa ei ole julkaistua tutkimustietoa. C-hordeiini on rakenteeltaan hyvin samankaltainen vehnän  $\omega$ -gliadiinin kanssa, joten tietyllä varauksella  $\omega$ -gliadiinilla tehtyjen leivontakokeiden tuloksista voidaan arvella C-hordeiinin käyttäytymistä. Leivontakokeissa, joissa vehnä jauhoihin on lisätty eri vehnäproteiinijakeita, on todettu, että rikkiköyhä  $\omega$ -gliadiini pienensi leivän tilavuutta (MacRitchie ym. 1991; Uthayakumaran ym. 2001). Tatham ja Shewry (2012) tarkastelivat leivontatutkimuksia pitkältä aikaväliltä ja he havaitsivat, että  $\omega$ -gliadiinin vaikutus leivontatulokseen on riippuvainen leivonnassa käytetyn jauhon sitkopitoisuudesta. Jos jauho on hyvin sitkopitoinen, siitä leivotun leivän rakenne ei pysty laajenemaan nostatuksen aikana.  $\omega$ -gliadiinin on todettu pehmentävän jauhoa ja täten suurentavan ominaistilavuutta. Sen sijaan, vähän sitkoproteiineja sisältävää jauhoa  $\omega$ -gliadiini heikentää entisestään: gluteeniverkostosta tulee rikkonainen ja leivän rakenne murtuu nostatuksen



aikana. C-hordeiinin voidaan olettaa toimivan leivonnassa vastaavalla periaatteella. Koska C-hordeiini ei pysty muodostamaan kovalenttisia sidoksia muiden polymeerien kanssa, sillä on negatiivinen vaikutus esimerkiksi leivän leivonnassa muodostuvaan proteiiniverkostoon.

### 2.2.2 Hordeiinien uuttaminen

Aminohapposekvenssi määrittää hordeiinien kemiallisen luonteen. Kaikkien muiden hordeiinien, paitsi D:n (26 mol-%), aminohapoista lähes 50 mol-%:a ovat hydrofobisia. Kasvin kannalta ajateltuna hordeiinit ovat varastoproteiineja, joten niiden natiivin konformaation oletetaan olevan hyvin tiiviisti pakkautunut siten, että hydrofobiset ryhmät ovat kääntyneet sisäänpäin ja hydrofiiliset ulospäin. Jotta proteiinin kyseinen termodynaaminen konformaatio purkautuisi ja se siirtyisi liukoiseen muotoon, liuottimen on ylitettävä rakenteen tasapainoa ylläpitävä Gibbsin vapaa energia (Dill ja Shortle 1991). Tämä tarkoittaa, että jonkun ulkoisen tekijän, kuten lämpötilan tai liuottimen, täytyy ylittää tämä vapaaenergia. Jotta liuotin kykenee ylittämään tämän energian, liuottimen ja proteiinin välisten vuorovaikutusten täytyy olla voimakkaampia kuin proteiinin sisäisten vuorovaikutusten.

Hordeiinien kokojakauman tutkimiseksi AF4:lla, hordeiinit täytyy pystyä erottamaan toisistaan. Tämä tarkoittaa, että niiden täytyy olla liukoisessa muodossa. Hordeiinit eivät liukene veteen tai suolaliuoksiin. Alkoholit, jotka ovat luonteeltaan amfifiilisiä, ovat osoittautuneet hyviksi liuottimiksi. Niillä ei kuitenkaan saada uutettua koko hordeiinifraktiota, vaan n. 95 %:a (Singh ym. 1990). Aikaisemmissa tutkimuksissa käytettyjä uuttoliuoksia ovat esimerkiksi AUC (0,1 M etikkahappo, 3 M urea ja 0,01 M setyylitrimetyyliammoniumbromidi), 1-prosenttinen SDS (natriumdodekyylisulfaatti), emäksiset liuokset (pH 11) ja laimeat happoliuokset (pH 3) (Meredith ja Wren 1966; Danno ym. 1974; Huebner ja Wall 1976; Booth ym. 1980). Tutkimuksien tavoitteina oli uuttaa hordeiinit ohrajauhosta mahdollisimman natiivissa muodossa ilman pelkistystä. Disulfididisidokset on helppo pelkistää esimerkiksi 2-merkaptetaanolilla tai vahvoilla emäsluoksilla (Shewry ym. 1978). Hordeiinien uuttaminen ilman pelkistystä on kuitenkin osoittautunut mahdottomaksi tehtäväksi, sillä kaikki muut hordeiinit – paitsi rikkiköyhä C-hordeiini – muodostavat intermolekulaarisia disulfididisidoksia ja ilman näiden sidoksien hajottamista, koko hordeiinifraktiota ei pystytä uuttamaan. Pelkistämällä disulfididisidokset saadaan tietoa yksittäisistä denaturoituneista polypeptideistä, mutta polypeptidien keskinäisiä vuorovaikutussuhteita tai proteiiniaggregaatteja ei pystytä tutkimaan.

Singh ym. (1990) käyttivät vehnän prolamiinien uuton tehostamiseksi kemiallisen pelkistyksen sijaan ultraäänikäsittelyä. Uuttoliuksena he käyttivät 0,05 M natriumfosfaattia, jossa oli 2-prosenttista SDS:a. Pitkäkestoisen sonikoinnin todettiin hajottavan proteiinien välisiä disulfididoksia ja aminohappojen välisiä peptididoksia, mutta hellävaraisemman käsittelyn ( $\leq 1$  min) havaittiin hajottavan vain disulfididoksia. Sonikointi paransi siis huomattavasti uuttotehokkuutta. Arfvidsson ym. (2004) tutkivat sonikoinnin vaikutusta polymeerien välisiin disulfididoksiin ja he totesivat hellävaraisen sonikoinnin ( $\leq 15$  sek) hajottavan disulfididoksia tuhoamatta peptidien välisiä sidoksia. Sonikointi yhdistettynä amfiifiiliseen liuottimeen vaikuttaisi toimivan tehokkaana menetelmänä ohran hordeiinien uuttamiseksi.

### **2.2.3 Hordeiinien funktionaaliset ominaisuudet**

Ravitsemuksellisesti hordeiinit sisältävät niukasti ihmisille välttämättömiä aminohappoja lysiniä, metioniinia, treoniinia ja tryptofaania (Baik ym. 2011). Hordeiinit ovat varastoproteiineja ja ne sijaitsevat jyvän endospermissä, kun taas ihmisille välttämättömät aminohapot sijaitsevat pääasiassa jyvän aleuronikerroksessa ja alkiossa. Vertailtaessa proteiinipitoisuuksiltaan erilaisia lajikkeita ja antamalla kasveille ylenmäärin typpeä, on havaittu, ettei ihmisille välttämättömien aminohappojen osuus kasva, vaan aminohappokoostumus on melko riippumaton ulkoisista tekijöistä. Maailmanlaajuisen etsinnän jälkeen on kuitenkin löydetty lajikkeita, jotka sisältävät luontaisesti paljon välttämättömiä aminohappoja. Tästä muutamina esimerkkeinä ovat Munck ym. (1970) löytämä etiopialainen Hiproly-lajike ja kööpenhaminalaisen Carlsbergin tutkimuslaitoksen kehittämä Bomi Risø 1508 -lajike (Ingversen ym. 1973), joilla hyvistä ravitsemuksellisista ominaisuuksista huolimatta ei ole ollut kaupallista menestystä. Ohraa tuotetaan pääasiassa rehuksi tai mallasteollisuuden käyttöön ja paljon välttämättömiä aminohappoja sisältävissä lajikkeissa on vähemmän tärkkelystä kuin mallastukseen tarkoitetuilla lajikkeilla.

### **Vaahdonmuodostusominaisuudet**

Funktionaalisesti hordeineilla on hyviä ominaisuuksia ja paljon potentiaalisia käyttötarkoituksia. Hordeiinit ovat oivallisia vaahdonmuodostajia, sillä ne ovat luonteeltaan amfiifiilisiä, niissä on paljon hydrofobisia aminohappoja ja ne kykenevät muodostamaan elastisia kolmiulotteisia rakenteita ei-kovalenttisin sidoksin. Hyvät vaahdonmuodostusominaisuudet riippuvat polymeerin diffuusionopeudesta vesi-ilma-rajapinnalle ja elastisuudesta rajapinnalla (Wierenga ja Gruppen 2010). Sauvamaisten ja osittain denaturoituneiden proteiinien – denaturaatiossa proteiinin

hydrofobiset alueet avautuvat – on todettu diffundoituvan nopeammin ja mukautuvan paremmin kuplan muotoon.

Kirjallisuudessa on ristiriitaisia tuloksia vaahdon muodostumiseen ja kestävyteen vaikuttavista tekijöistä. Yleisen ajatuksen mukaan proteiinien diffuusionopeuden vesi-ilma-rajapinnalle, elastisuuden ja vaahdon kestävyuden on todettu kasvavan pH:n ollessa lähellä isoelektristä pistettä (IEP) (Wierenga ja Gruppen 2010). Tällöin polymeerin elektrostaattiset repulsiovoimat ovat heikoimmillaan eli adsorptiota vastustava Gibbsin energia on pienimmillään ja polymeerimolekyylit muodostavat tiiviimmän rakennelman rajapinnalle. Vaahdon kestävyys riippuu kuplan rajapinnalla olevien partikkeleiden desorptioon vaaditusta energiasta (Wierenga ja Gruppen 2010). Kun systeemissä on riittävästi energiaa tämän energiakynnyksen ylittämiseksi, systeemin tila muuttuu, mistä seuraa kuplan puhkeaminen. Dickinson ym. (2004) havaitsivat tutkiessaan osittain hydrofobisten silika-nanopartikkeleiden vaikutusta ilmakupliin, että mitä suurempi partikkeli, sitä suurempi desorptioenergia ja sitä epävakaampi kupla. Tämä teoria ei näytä olevan niin yksiselitteinen hordeiinien kohdalla.

Wu ym. (1979) raportoivat hordeiinien IEP:n olevan lähellä pH 6:tta. Hordeiinin vaahdotumiskokeissa vaahdonmuodostus oli heikoimmillaan pH-välillä 5–6 (Yalçın ym. 2008; Wang ym. 2010; Zhao ym. 2010). Vastaavia tuloksia on saatu kauran vaahdonmuodostuskokeissa (Ma ja Harwalker 1984). Vehnällä on taas saatu päinvastaisia tuloksia (Agyare ym. 2009). Yalçın ym. (2008) raportoivat, että hordeiinista valmistetun vaahdon kestävyys oli heikoimmillaan pH 6:ssa, mutta kestävimmillään pH 4:ssä. Wang ym. (2010) ja Zhao ym. (2010) taas raportoivat vaahdon olleen kestävimmillään pH 5:ssä ja suurten polymeeristen hordeiinien parantaneen vaahdon kestävyyttä eli toimineen steerisinä tasapainottajina. Vaahdonmuodostuskyky ja vaahdon tasapaino pitäisi olla parhaimmillaan pH:n ollessa lähellä IEP:tä, jolloin repulsiovoimat eivät myötävaikuta desorptioenergiaan. Edellä mainittujen tutkimuksien tuloksien ja tämän teorian välillä on selkeä ristiriita, mikä osoittaa, että partikkeleiden koosta riippuvia vaikutusmekanismeja ei vielä tunneta riittävästi yksiselitteisen teorian muodostamiseksi.

Hordeiinien vaahdotumisominaisuuksia voidaan parantaa deamidoimalla hordeiineja proteiiniglutamaasilla (Zhao ym. 2010). Deamidaatiossa aminohappo glutamiini muutetaan glutamiinihapoksi. Tämän on todettu vähentävän hordeiinien aggregoitumista, minkä on todettu parantavan vaahdon kestävyyttä (Zhao ym. 2010). Hordeiinien IEP oli

lähellä pH 6:tta, mutta deamidoitujen hordeiinien IEP oli lähelle pH 3:a ja pH 7:ää (Wu ym. 1979; Wang ym. 2010; Zhao ym. 2010; Zhao ym. 2011).

Eri viljalajeilla tehtyjen vaahtoamiskokeiden keskinäinen vertailu on hankalaa eriävien raaka-ainekäsittelyiden ja vaahtoutumiskokeiden takia. Ohra vaikuttaisi olevan kauraa parempi vaahtonmuodostaja, mutta vehnää heikompi (Ma ja Harwalker 1984; Linarès ym. 2000; Yalçın ym. 2008; Agyare ym. 2009; Wang ym. 2010; Zhao ym. 2010; Kaukonen ym. 2011). Kaurassa on muita viljoja enemmän poolittomia triglyseridejä, jotka häiritsevät vaahtonmuodostusta (Kaukonen ym. 2011). Deamidaatio paransi ohran vaahtonmuodostusominaisuuksia, mutta systeemin pH optimi oli 3:ssa, mikä voi olla ongelma elintarvikesovelluksia ajatellen (Zhao ym. 2010). Deamidaation jälkeinen toinen optimi oli neutraalissa pH:ssa, jossa tosin vaahto ei muodostanut yhtä kestäväää rakennetta (Zhao ym. 2010). Ohrasta oli kuitenkin mahdollista valmistaa vaahtoja, joita voidaan käyttää elintarvikkeissa esimerkiksi maitotuotteiden korvaajina.

### **Emulgointiominaisuudet**

Hordeiineissa on 40 % poolittomia aminohappoja, mikä tekee niistä oivallisia emulgaattoreita. Hordeiinit voivat adsoroida hajanaiset lipidipartikkelit nopeasti ja muodostaa partikkelin ympärille kalvon, joka toimii hyvänä steerisenä tasapainottajana ja estää partikkeleiden koaguloitumista. Wang ym. (2010) tutkivat kahden erilaisen hordeiinijakeen emulgointiominaisuuksia ja he totesivat niiden vedenpidätyskyvyn olevan kaksi kertaa parempia kuin esimerkiksi useampien palkokasvien (1,3–3,5 g/g) tai öljykasvien (< 4 g/g) proteiinien. Vedenpidätyskyky kuvaa proteiinien polaaristen sivuketjujen kykyä sitoa vettä. Erityisesti HMW-hordeiineilla (5,7 g/g) oli erinomaiset poolittomien ryhmien sidontaominaisuudet. Zhao ym. (2011) tutkivat deamidaation vaikutusta HMW-hordeiinien emulgointiominaisuuksiin. He havaitsivat, että deamidaation seurauksena hydrolysoidut hordeiinit muodostivat suuria liukoisia aggregaatteja, joilla oli hyvät emulgointiominaisuudet. Emulsioilla oli vielä hyvät lämmönsieto-ominaisuudet, mikä laajentaa niiden käyttömahdollisuuksia paistettuihin tuotteisiin (Wang ym. 2010). Ohran proteiineja voidaan siis käyttää emulgaattorina esimerkiksi liha- ja leipomotuotteissa sekä salaattikastikkeissa.

### **Hordeiinien soveltuvuus pakkauskalvoksi**

Pakkauksiksi voidaan laskea perinteisen määritelmän lisäksi erilaiset kalvot, päällysteet ja kapselit (Janjarasskul ja Krochta 2010). Proteiinit ovat lämpömuokattavia polymeerejä,

joilla on sekä poolista että poolitonta luonnetta. Proteiinien monimuotoisten sidosten ansiosta niillä on hyvät funktionaaliset ominaisuudet. Proteiinikalvoja on jo pitkään käytetty pidentämään elintarvikkeiden hyllyikää ja suojaamaan lääkkeitä (taulukko 2). Nykypäivänä kalvoja käytetään paljon lääke- ja lisäravintoesovelluksissa, joissa vaikuttava ainesosa päällystetään kalvolla, jonka sulamisnopeutta ja -paikkaa elimistössä voidaan säädellä valittujen raaka-aineiden ja prosessiparametrien avulla (Janjarasskul ja Krochta 2010).

Tyypillisesti kalvot on valmistettu märkäprosessilla, jossa proteiini on liuotettu joko happamaksi tai emäksiseksi säädettyyn etanoli-vesi-seokseen ja neste on haihdutettu pois. Toinen tehokkaammaksi todettu vaihtoehto on lämpöpuristaminen, jossa proteiini ensin lämpödenaturoituu ja siirtyy amorfiseen tilaan, jolloin se voidaan muovata haluttuun muotoon. Lämpöpuristamalla saadaan kestävämpiä ja barrieriominaisuuksiltaan parempia kalvoja (Xia ym. 2011). Kalvoissa käytetään muovituotteiden tapaan plastisoijia, kuten glyserolia, pehmentämään ja vahvistamaan kalvon rakennetta (Irissin-Mangata ym. 2001).

Vehnän gluteenista valmistettuja kalvoja on tutkittu paljon aina 1960-luvulta asti (Zhang ja Mittal 2010). Gluteenista tehdyllä kalvolla on hyvät elastiset ominaisuudet ja erityisen hyvät läpäisemättömyysominaisuudet happea vastaan ( $\frac{2,06 \text{ g}}{10^{12} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}}$ ) (Cuq ym. 1998). Sen sijaan gluteenikalvolla on huono vedenpidätyskyky ( $34\text{--}50 \times \frac{\text{g}}{10^{11} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}}$ ), mikä rajoittaa sen käyttöä elintarvikesovelluksissa.

Ohran proteiineista valmistettuja kalvoja on tutkittu huomattavasti vähemmän kuin gluteenikalvoja. Hordeineilla on hyvät elastiset ominaisuudet ja ne ovat luonteeltaan hydrofobisia, joten ohra on potentiaalinen biohajoavien kalvojen valmistusmateriaali. Xia ym. (2011) valmistivat hordeineista kalvoja lämpöpuristamalla käyttäen eri lämpökäsittelyjä ja glyserolin määräsuhteita. Vedenpidätyskyvyn ja elastisien ominaisuuksien lisäksi he tutkivat kalvojen sytotoksisuutta *in vitro* -kokeilla. Gluteeniin verrattuna kalvoilla oli samanlaiset vedenpidätyskyvyt ( $\frac{40 \text{ g}}{10^{11} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}}$ ), mutta huomattavasti huonommat kuin esimerkiksi polyeteenikalvolla ( $7,3\text{--}9,7 \times \frac{\text{g}}{10^{13} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{Pa}}$ ). Elastisilta ominaisuuksiltaan hordeiinikalvot osoittautuivat erinomaisiksi. Niiden vetolujuus 40 %:n glyseroli-lisäyksellä oli 14,2–21,1 MPa:a ja venyvyys 90–100 %:a. Vastaavasti vehnän gluteenikalvolla oli vain 8 MPa:a ja 85 %:a (Sothornvit ym. 2007). Soijaproteiinikalvolla oli vain 2,6 MPa:a ja 75 %:a (Cunningham ym. 2000; Janjarasskul ja Krochta 2010). Hordeiinikalvojen myrkyllisyyttä testattiin MTT-määrittämisselä ja kalvot todettiin

biosopiviksi. MTT-menetelmässä aineen myrkyllisyyttä testataan sitomalla väriaine formasaani testisoluihin, minkä jälkeen solujen lukumäärä voidaan mitata spektrofotometrisesti värin intensiteetistä. *In vitro* -kokeissa havaittiin, että kalvot liukenivat vasta suolisto-olosuhteissa, mikä mahdollistaa niiden käytön esimerkiksi vatsaa ärsyttävien aineiden päällystämiseen.

Muita hordeiinikalvoista tehtyjä tutkimuksia oli niukasti saatavilla tutkielman kirjoitushetkellä. Song ym. (2012) valmistivat kalvoja ohran leseeseen vesiliukoisista proteiineista ja gelatiinista. Kalvoilla oli hordeiinikalvoja parempi vetolujuus (35–40 MPa:a), mutta venyvyys oli huomattavasti huonompi (40 %:a). Myös vedenpidätyskyky oli merkittävästi heikompi ( $2,5\text{--}3,00 \frac{g}{10^9 * m * s * Pa}$ ). Tutkimusten perusteella hordeiinit osoittivat potentiaalia kalvojen valmistusmateriaalina.

**Taulukko 2.** Syötävien ja synteettisten kalvojen läpäisevyysarvot ja mekaaniset ominaisuudet.

Raaka-aine	Vetolujuus (MPa)	Venyvyys (%)	Vedenpidätyskyky ( $\frac{g}{m^2 * s * Pa}$ )	Hapenpidätyskyky ( $\frac{g}{m^2 * s * Pa}$ )
Ohraproteiini	14,2–21,1	90–100	$40 \times 10^{-11}$	
Ohraleseen liukoiset proteiinit ja gelatiini	35–40	40	$2,5\text{--}3,0 \times 10^{-9}$	
Polyeteeni	2,4–31,7	6,9–15	$7,3\text{--}9,7 \times 10^{-18}$	
Soijaproteiini	2,6	74,5	$4,5 \times 10^{-10}$	
Vehnägluteeni	8,0	85	$34\text{--}50 \times 10^{-11}$	$2,1 \times 10^{-12}$

## 2.3 Kenttävirtausfraktiointi

Kenttävirtausfraktiointi (engl. field-flow fractionation; FFF) on yksi monipuolisimmista molekyylien erotusmenetelmistä (Yohannes ym. 2011). Menetelmän kehitti professori Calvin Giddings (1966). Yhteistä kaikille kenttävirtausfraktiointitekniikoille on näyteliuksen virtaaminen ohuessa kanavassa, jossa molekyylit erotetaan kohdistamalla ulkoinen poikittaiskenttä kohtisuoraan näytevirtausta vastaan (Riekkola ja Hyötyläinen 2002).

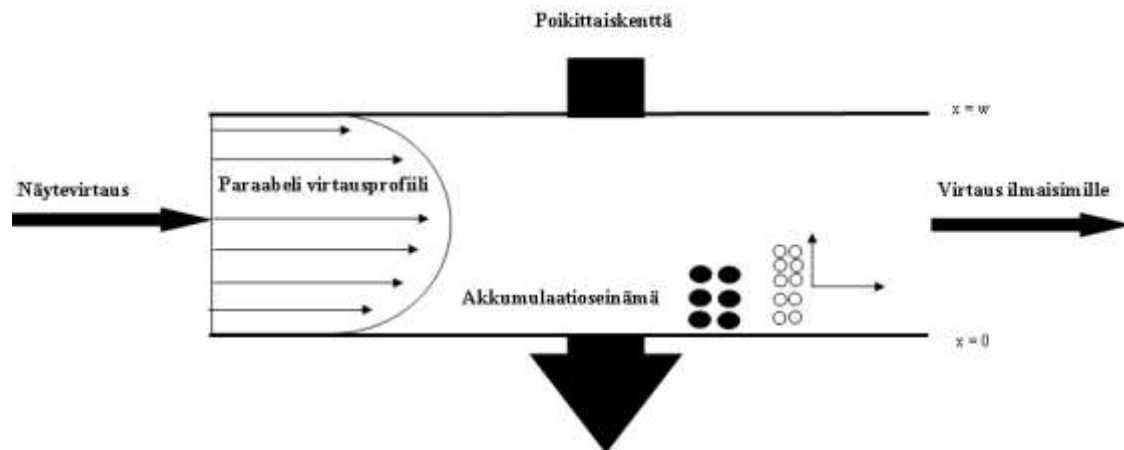
Kenttävirtausfraktioinnin erotusmekanismi perustuu molekyylidiffuusioon ja edelleen kokoon. Kuvassa 5 on esitetty normaalin kenttävirtausfraktioinnin toimintaperiaate. Siinä näytevirtaus pumpataan virtauskanavaan, jossa näytevirtauksen oletetaan olevan vakaisissa ja alhaisissa virtausnopeuksissa laminaarinen (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Laminaarinen virtaus on virtausprofiililtaan parabolinen. Parabolisessa virtauksessa muodostuu eri nopeuksilla liikkuvia virtausvyöhykkeitä, joiden yhdistymisen estää kitka. Keskellä virtausta on nopeimmin liikkuva vyöhyke ja reunoilla hitaimmin liikkuvat vyöhykkeet. Virtaukseen kohdistettu pystysuora poikittaiskenttä painaa virtauksessa kulkevia näytemolekyylejä kohti akkumulaatioseinämää (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Seinämään muodostuu eksponentiaalinen tiheysjakauma, jolloin molekyyleihin vaikuttaa poikittaiskentän lisäksi noste eli hydrostaattinen paine ja Brownin liike. Molekyylin retentioaika riippuu diffuusiovakiosta ( $D$ ), joka taas on suoraan verrannollinen molekyylin molekyylimassaan ja muotoon sekä ajoliuksen lämpötilaan, pH:n ja ionivahvuuteen (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Riippuvuusuhde voidaan ilmaista yhtälön (1) muodossa, jossa  $M$  on molekyylimassa,  $A$  on vakio, joka kuvastaa molekyylin rakennetta, viskooseja ominaisuuksia ja lämpötilaa, kun taas vakio  $b$  kuvaa molekyylin konformaatiota.

$$D = AM^{-b} \quad (1)$$

Erottumismekanismia, jossa poikittaiskentän voima on nosteen ja Brownin liikkeen voimia suurempi, kutsutaan **normaaliksi kenttävirtausfraktioinniksi**. Siinä suurempien molekyylien tiheysjakauman painopiste on lähempänä akkumulaatioseinämää kuin pienempien, joiden painopiste on lähempänä nopeammin virtaavaa vyöhykettä. Pienemmät molekyylit siis kulkeutuvat nopeammin virtauskanavassa ja eluoituvat ennen isompia molekyylejä (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Hydrodynaamisen säteen ( $r_h$ ) ja partikkeliin retentioajan ( $t_r$ ) välinen yhteys saadaan yhtälöstä (2), jossa  $k$  on Boltzmannin vakio

$(1,38 \times 10^{-16} \frac{g \text{ cm}^2}{s^2 K})$ ,  $T$  on absoluuttinen lämpötila kelvineissä,  $\eta$  on liuottimen viskositeetti  $(0,01 \frac{g}{\text{cm s}})$   $20 \text{ }^\circ\text{C}$  lämpötilassa ja  $t^0$  on liuottimen läpikulkuaika (Postnova Analytics).

$$r_h = \frac{2kTV^0 t_r}{\pi \eta w^2 V_c t^0} \quad (2)$$



**Kuva 5.** Normaali kenttävirtausfraktiointi. Virtauskanavassa kulkee ajoliuos parabolisena virtauksena ja näytemolekyylit kerääntyvät kohti akkumulaatioseinämää poikittaiskentän ajamana. Näytemolekyylien tiheysjakauman painopiste riippuu molekyylien diffuusiovakiosta. Mitä suurempi molekyylimassa on, sitä lähempänä seinämää piste on (Postnova Analytics).

Normaalin erottumismekanismin lisäksi on olemassa **sterinen** ja **hyperlayer kenttävirtausfraktiointi**. Normaalisessa kenttävirtausfraktioinnissa erotettavien molekyylien keskimääräinen halkaisija ( $d_p$ ) on alle  $1,0 \text{ } \mu\text{m}$ . Steerisessä ja hyperlayer kenttävirtausfraktioinnissa erotettavat molekyylit voivat olla halkaisijaltaan  $1,0 - 50 \text{ } \mu\text{m}$ :ä. Näin isojen molekyylien keskimääräinen etäisyys kanavan seinämästä ( $l$ ) on pienempi kuin halkaisija ja molekyyliin kohdistuva noste kumoaa poikittaiskentän ja Brownin liikkeen vaikutuksen. Tällöin eksponentiaalista tiheysjakaumaa ei synny ja molekyylien liikkumisnopeus riippuu siitä, kuinka etäälle virtaukseen molekyylit ulottuvat (Yohannes ym. 2011). Eluutiojärjestys on normaaliin kenttävirtausfraktiointiin nähden päinvastainen, koska isot molekyylit ulottuvat pieniä molekyyliä kauemmaksi nopeammin liikkuvaan virtaukseen ja eluotuvat siten nopeammin ulos kanavasta.

Kenttävirtausfraktioinnilla on monia etuja perinteisiin kromatografisiin menetelmiin nähden. Menetelmällä voidaan erotella moolimassaltaan  $10^3 - 10^{15} \text{ g/mol}$  ja halkaisijaltaan  $2 \text{ nm} - 50 \text{ } \mu\text{m}$ :ä olevia molekyyliä (Giddings 1966; Yohannes ym. 2011). Kokoeksklusiokromatografiaan verrattuna näytteeseen kohdistuu heikompia rakennetta



hajottavia leikkausvoimia, eikä FFF:ssa tarvita stationaarifaasia, jolloin näytettä ei adsorpidu stationaarifaasin pintaan (Messaud 2009). Erotuksen kannalta ajo-olosuhteita on helppo säätää näytteelle sopivaksi ja laitteistoon voidaan kytkeä monia erilaisia ilmaisimia, kuten monikulmavalonsirontailmaisoin (MALS), taitekerroinilmaisoin (RI), UV-ilmaisoin, ydinmagneettinen resonanssi-ilmaisoin (NMR), viskometri ja fouriermuunnosilmaisoin (FTIR). Tosin NMR- ja FTIR-ilmaisimia sekä viskometriä käytetään harvemmin.

Erotusmekanismin lisäksi FFF voidaan jakaa eri alateknikoihin ulkoisen voimakentän mukaan (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Tässä työssä perehdytään asymmetriseen poikittaiskenttävirtausfraktiointiin (AF4). Muita käytettyjä voimakenttiä ovat lämpötilagradientti-, sähkö-, magneetti- ja sedimentaatiokenttä (Riekkola ja Hyötyläinen 2002; Johannes ym. 2011). Sopivan kentän valitsemiseen vaikuttavat erotettävien molekyylien fysikaaliskemialliset ominaisuudet.

### 2.3.1 Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi

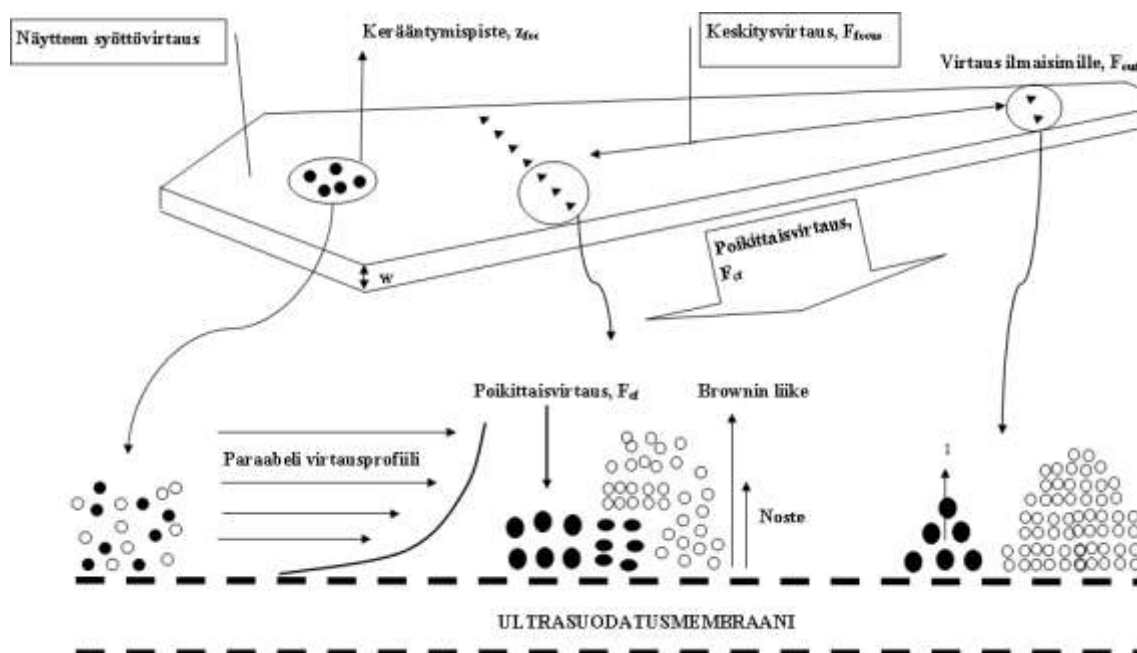
Asymmetrisessä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioinnissa (AF4) erottavana voimakenttänä käytetään näytevirtaukseen nähden poikittaista virtausta. Poikittaisvirtaus muodostuu siten, että näytevirtaus pumpataan virtauskanavaan, jossa näytevirtaus kohtaa päinvastaiseen suuntaan liikkuvan kohdistusvirtauksen (kuva 6). Virtauksien kohtaamispiistettä kutsutaan kerääntymispisteeksi ( $z_{foc}$ ), koska erotettavat molekyylit painautuvat syntyvän poikittaisvirtauksen voimasta kohti akkumulaatioseinämää. Akkumulaatioseinämä on tehty huokoisesta membraanista, joka päästää poikittaisvirtauksen lävitseen. Molekyylit laskostuvat diffuusio- ja koko-ominaisuuksien mukaan eri vyöhykkeisiin. Tätä erotteluvaihetta kutsutaan tarkennusvaiheeksi. Eluutiovaiheessa poikittaisvirtaus pienenee asteittaisesti kohti nollaa ja molekyylit kulkeutuvat koon perusteella ilmaisimille. Molekyylien kulkeutumista kanavassa vakio poikittaisvirtauksella voidaan mallintaa retentiotekijän ( $\lambda$ ) avulla (yhtälö 3). Retentiotekijä kuvaa molekyylien diffuusio kertoimen ( $D$ ) ja kanavan tilavuuden suhdetta ( $V^0$ ) kanavan paksuuteen ( $w$ ) ja poikittaisvirtaukseen ( $V_c$ ) (Johannes ym. 2011). Käytettäessä muunlaista poikittaisvirtausohjelmaa kuin vakio poikittaisvirtausta, akkumulaatiosenämälle muodostunut eksponentiaalinen tiheysjakauma hajoaa molekyylien lämpöliikkeen seurauksena, eikä yhtälö (3) pidä paikkaansa. Tällöin hydrodynaaminen säde saa todellisuutta pienempiä arvoja. Håkansson ym. (2012) totesivat, että hydrodynaamisen säteen aliarvioiminen johtaa keskimäärin 4 %:n virheeseen moolimassan arvioinnissa ja

ehdottivat retentiotekijän laskemiseksi yhtälöä (4), jossa  $\alpha$  on molekyylin säteen suhde kanavan paksuuteen (5).

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{DV^0}{w^2 V_c} \quad (3)$$

$$R = 6(\alpha - \alpha^2) + 6\lambda(1 - 2\lambda) \left( \coth\left(\frac{1-2\alpha}{2\lambda}\right) - \frac{2\lambda}{1-2\alpha} \right) \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{r}{w} \quad (5)$$



**Kuva 6.** Hahmotelma molekyylien erottumisesta puolisuunnikkaan muotoisessa virtauskanavassa. Molekyylit painautuvat poikittaisvirtauksen voimasta kohti akkumulaatioseinämää ja erottuvat koon perusteella.  $w$  = kanavan paksuus.  $l$  = molekyylien keskimääräinen etäisyys kanavan seinämästä (Wahlund ja Nilsson 2012).

### 2.3.2 Erotuskyvyn optimointi asymmetrisella poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioidilla

Erotuskyvyn optimoinnissa virtausnopeuksien säätö on erotuskyvyn kannalta tärkein tekijä. Erotuskykyä voidaan parantaa säätämällä poikittaisvirtauksen voimakkuutta ja virtausohjelmaa. Liian voimakas poikittaisvirtaus painaa näytemolekyylit ultrasuodatusmembraanin lävitse tai pidättää molekyyliä siten, että ne eluoituvat vasta ajon lopussa. Liian heikko poikittaisvirtaus taas ei erota molekyyliä riittävästi. Pienillä molekyyliellä vakio voimakkuuksinen virtaus on todettu riittävän molekyylien erottamiseksi (Nilsson 2013). Polydispersseille ja suurikokoisille näytteille sen sijaan on suositeltavaa käyttää laskevaa poikittaisvirtausta paremman erotuskyvyn ja lyhyemmän

ajoajan takia (Stevenson ym. 2003). Leeman ym. (2006) tutkivat tärkkelys- ja selluloosajohdannaisten erotusta eri poikkivirtausohjelmilla ja he havaitsivat, että suurikokoisille molekyylielle soveltuu parhaiten eksponentiaalisesti heikkenevä poikittaisvirtaus. Optimiajo-olosuhteissa molekyylit erottuvat selkeästi ajon kuluessa ajoajan olematta liian pitkä.

Hyvän erotuskyvyn takaamiseksi AF4:lla täytyy ottaa huomioon minkälaisia vuorovaikutuksia näytteellä on virtauskanavan ultrasuodatusmembraanin, laitteen kapillaarien ja ajoliuoksen kanssa. Erityisesti pinta-aktiivisten aineiden analysoimisen haasteena on niiden vuorovaikutus eri pintojen kanssa. Adsorpoituneet molekyylit haittaavat erotusta, eikä tulos edusta koko näytopopulaatiota (You ym. 2002). Vastaavasti mahdolliset repulsiivoimat työntävät molekyylit pois membraanin pinnalta, mikä häiritsee eksponentiaalisen tiheysjakauman muodostumista ja täten erotusta (Nilsson 2013). Optimitilanteessa näytteellä ei ole vuorovaikutusta eri pintojen kanssa. Huolellisesta harkinnasta huolimatta laitteiston ja membraanin sekä näytteen välisistä vuorovaikutuksista ei saada varmuudella tietoa muuta kuin kokeellisesti. Hyvin toimivassa systeemissä molekyylit erottuvat selkeästi ja saanto on lähellä 100 %:a.

Huono saanto ei aina tarkoita molekyylien adsorpoitumisesta kanavien pinnalle. Bello-Perez ym. (1998) ja Yokoyama ym. (1998) havaitsivat, että huono saanto voi olla myös seurausta näytemolekyylien odottamattomasta aggregoitumisesta virtauskanavassa tai leikkausvoimien aiheuttamasta molekyylien pilkkoutumisesta. Lisäksi näyte voi kulkeutua poikittaisvirtauksen mukana membraanin läpi. Ongelmat on helppo tunnistaa seuraamalla poikittaisvirtauksen ja näytevirtauksen takaisinsaantoa.

Optimaalisen näytekonsentraation määrittäminen on tärkeää hyvän erotuksen, luotettavien tuloksien ja kanavan sekä ilmaisimien tukkimisen estämiseksi. Optimointi tehdään syöttämällä näyteliuoksia eri konsentraatioilla ja katsomalla, etteivät ilmaisimet ylikuormitu tai sironnut valon intensiteetti jää liian pieneksi ja retentioaika pysyy samana toistojen kesken (Stevenson ym. 2003).

### **2.3.3 Moolimassan ja molekyylikoon määrittäminen valonsirontamenetelmällä**

Kenttävirtausfraktioinnissa on kolme tapaa määrittää näytteen moolimassajakauma. Koska molekyylien erottuminen perustuu niiden diffuusiokertoimiin ja hydrodynaamiseen tilavuuteen, voidaan moolimassajakauma määrittää retentioteorian (1) perusteella, kunhan molekyylien hydrodynaamisen säteen ja massan välinen suhde tunnetaan. Toinen tapa

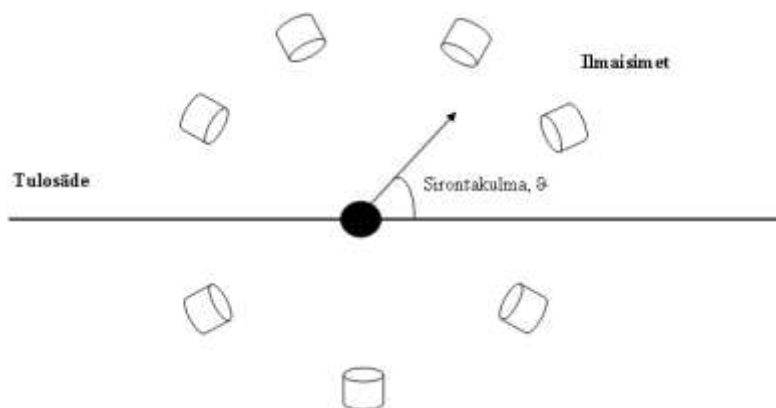
moolimassajakauman määrittämiseksi on moolimassastandardien käyttäminen. Tällöin moolimassastandardit tulisivat olla kemiallisilta ominaisuuksiltaan näytteiden kaltaisia. Kolmas tapa on laskea moolimassa yhdisteen valonsironnasta. Tällöin tarvitaan lisäksi konsentraatioilmaisimen (Taskinen 2000). Tässä työssä moolimassa ja molekyylikoko määritetään valonsirontamenetelmällä. Tämän takia alla kuvataan tarkemmin monikulmavalonsirontailmaisimen pääperiaatteet. Lisäksi kuvataan kahden yleisen konsentraatioilmaisimen – ultravioletti- ja taitekerroinilmaisimen – pääperiaatteet.

### **Monikulmavalonsirontailmaisimen (MALS)**

Molekyylin valonsirannon mittaaminen on tehokas keino määrittää molekyylin moolimassa, sillä moolimassa on suoraan verrannollinen sironneen valon intensiteettiin. Monikulmavalonsirontailmaisimen toiminta perustuu näyteliuokseen kohdistetun valonsäteen sironnan mittaamiseen useasta eri kulmasta (kuva 7) (Burchard 1994). Sironnut valo koostuu sekä näytteen että liuottimen molekyylien emittoimasta valosta. Molekyylien liike näytekammiossa aiheuttaa tiheyseroja  $\rho(\vec{r})$  valon intensiteettiin, joiden keskiarvon ilmaisimet havaitsevat. Sironneen valon intensiteetti on riippuvainen fyysisten kappaleiden konsentraation ja moolimassan tulosta, joka voidaan ilmaista Rayleighin suhteen  $R(\theta)$  avulla (6), jossa  $c$  on liuenteen aineen konsentraatio,  $K$  on optinen vakio,  $M_w$  on näytteen moolimassa ja  $P(\theta)$  on kappaleen muototekijä (Burchard 1994). Suurilla molekyyleillä valon intensiteetti voi joko vahvistua tai heikentyä molekyylin rakenteesta riippuen. Optinen vakio  $K$  voidaan määrittää yhtälöllä (7), jossa  $n_0$  on taitekerroin,  $\frac{\partial n}{\partial c}$  on näytteen taitekertoimen muutos konsentraation suhteen ja se on sisällytetty  $K$  termiin,  $\lambda$  on aallonpituus tyhjiössä ja  $N_A$  on Avogadron vakio.  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvon määrittäminen on edellytys taitekerroinilmaisimen käytölle.

$$\frac{R(\theta)}{c K} = M_w P(\theta) \quad (6)$$

$$K = \frac{(2\pi n_0 \frac{\partial n}{\partial c})^2}{\lambda^4 N_A} \quad (7)$$



**Kuva 7.** Näyteliuokseen kohdistetun valon valonsironnan mittaaminen monikulmavalonsirontailmaisimella (MALS). Molekyylit siroavat valoa voimakkaammin pienillä kulmilla kuin suurilla ja pienet kulmat ovat erityisen herkkiä esim. ajoliuoksessa oleville epäpuhtauksille. Tyypillisesti  $11^\circ$ :n kulmalla mitatussa datassa on noin kymmenen kertaa enemmän kohinaa kuin  $90^\circ$ :n kulmassa mitatulla. Pienemmillä kulmilla saadaan kuitenkin tarkempia tuloksia molekyylien ominaisuuksista (Postnova Analytics).

Kappaleen muototekijä  $P(\vartheta)$  ilmaisee, kuinka sironnut valo riippuu mittauskulmasta. Muototekijä saa arvon 1 kulmassa  $0^\circ$ :tta ja pienenee kulman suuretessa. Partikkeleiden – joiden koko on kahdeskymmenesosa instrumentissa käytettävän laserin aallonpituudesta – muototekijä on vakio eli saa arvon 1, koska pienet partikkelit siroavat tasaisesti valoa kaikkiin suuntiin tulokulmasta huolimatta (Burchard 1994). Tällaisille partikkeleille ei voida määrittää hyrräsädettä, sillä hyrräsäde määritetään sironnakulman avulla. Muussa tapauksessa muototekijä voidaan ratkaista Taylorin sarjalla (8), jossa  $r_g^2$  on partikkelin hyrräsäteen neliö. Yhdistämällä Taylorin sarja ja sironnayhtälö, näytteen moolimassa voidaan laskea yhtälöllä (9). Teoreettisesti tarkasteltuna moolimassan, konsentraation ja sironneen valon intensiteetin suhde on yksinkertaisimmillaan mittauskulmassa  $0^\circ$ , jolloin yhtälö (7) supistuu muotoon  $M_w = \frac{R(\vartheta)}{cK}$ . Tässä kulmassa ei kuitenkaan voida kokeellisesti mitata sironneen valon intensiteettiä, vaan se täytyy mitata nollaa suuremmilla kulmilla ja ekstrapoloida kohti nollaa (Andersson ym. 2003).

$$P(\vartheta) = \left( 1 - \frac{2}{3!} \langle r_g^2 \rangle \left[ \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\vartheta}{2} \right]^2 + \frac{2}{5!} \langle r^4 \rangle \left[ \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\vartheta}{2} \right]^4 \pm \dots \right) \quad (8)$$

$$\frac{R(\vartheta)}{cK} = M_w \left( 1 - \frac{2}{3!} \langle r_g^2 \rangle \left[ \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\vartheta}{2} \right]^2 + \frac{2}{5!} \langle r^4 \rangle \left[ \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\vartheta}{2} \right]^4 \pm \dots \right) \quad (9)$$

### Ultravioletti-ilmaisimien (UV)

Liukoisten proteiinien konsentraatio voidaan määrittää mittaamalla liuoksen absorbanssi  $280 \text{ nm}$ :n aallonpituusalueella (Pace ym. 1995). Tällä aallonpituusalueella on vain kolme aminohappoa, jotka absorboivat valoa: tryptofaani, tyrosiini ja kysteini. Proteiinien konsentraatio voidaan määrittää Beer-Lambertin-lain perusteella (10), jossa  $A$  on

absorbanssi,  $\epsilon$  on ekstinktiokerroin,  $c$  on konsentraatio ja  $l$  on näyteastian pituus (1 cm). Ekstinktiokerroin ( $\epsilon$ ) on suure, joka kuvaa aineen valon absorptiokykyä tietyllä aallonpituusalueella. UV-ilmaisimen käyttö edellyttää analysoitavan yhdisteen ekstinktiokerroimen määrittämistä.

$$A_{280} = \epsilon * c * l \quad (10)$$

UV-ilmaisimen käyttöä rajoittaa suuret proteiiniaggregaatit, jotka häiritsevät sironneen valon intensiteettiä, mikä aiheuttaa mittavirhettä analyysituloksiin (Nilsson 2013). Toisaalta 280 nm:n aallonpituusalue ei ole herkkä epäpuhtauksille tai rajoittunut ajoliuoksen suhteen, mikä on suuri etu biologisia näytteitä analysoitaessa.

### **Taitekerroinilmaisim (RI)**

Taitekerroinilmaisim vertaa reaaliajassa puhtaan ajoliuoksen taitekerrointa näytettä sisältävän ajoliuoksen taitekertoimeen (Higson 2004). Ajoliuoksen taitekerroin on riippuvainen näytekonsentraatiosta yhtälön (11) mukaisesti, jossa  $R_i$  on mitattu taitekerroin hetkellä  $i$ ,  $K_r$  on ilmaisimelle määritetty vakio,  $C_i$  on näytekonsentraatio hetkellä  $i$  ja  $\frac{\partial n}{\partial c}$  on taitekertoimen muutos konsentraation suhteen (molekyylistä riippuvainen vakio) (Taskinen 2000).

$$R_i = K_r \frac{\partial n}{\partial c} C_i \quad (11)$$

Taitekerroinilmaisimen etu on sen monikäyttöisyydessä. Käytännössä mikä tahansa yhdiste antaa vasteen taitekerroinilmaisimella. Menetelmä on sen sijaan hyvin herkkä paineen ja lämpötilan muutoksille. Menetelmä ei myöskään ole yhtä herkkä kuin monet muut markkinoilla olevat ilmaisimet.

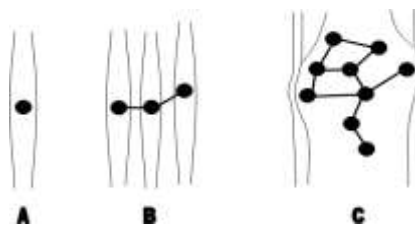
### **2.3.4 Proteiinien kenttävirtausfraktiointianalyysin haasteet**

Ajoliuoksen kemiallinen luonne, pH, ionivahvuus ja lämpötila vaikuttaa proteiinien laskostumiseen (Dill ja Shortle 1991; Wang 1998; Uversky 2002, Yohannes 2011). Koska systeemi pyrkii aina energiaminiimiin, proteiinin reaktio muuttuviin olosuhteisiin riippuu polypeptidiketjun intra- ja intermolekulaarisista vuorovaikutuksista sekä molekyylin ja liuotinmolekyylien välisistä vuorovaikutuksista. Natiivissa konformaatioissa proteiinin hydrofobisten alueiden ajatellaan suuntautuvan sisäänpäin ja stabiloivan proteiinin rakennetta, kun taas hydrofiiliset alueet ovat suuntautuneet ulospäin (Creighton 1984;

Wang 1998). Neutraalissa pH:ssa hydrofobisten voimien ja vetysidosten on todettu tasapainottavan proteiinin rakennetta ja ohjaavan laskostumista. Proteiinin nettovarauksen kasvaessa elektrostaattiset hylkimisvoimat voimistuvat, jolloin proteiini levittäytyy suuremmalle alueelle (Song ym. 1990; Dimitrov ja Crichton 1997; Bhattacharjee ym. 2013). Ajoliuos vaikuttaa merkittävästi proteiinin konformaatioon, joten ajoliuosta ja uuttoliuosta valittaessa olisi hyvä olla tietoinen liuottimen vaikutuksesta polymeerin rakenteeseen.

Proteiinit ovat hyvin pinta-aktiivisia aineita ja niillä on taipumusta takertua eri pinnoille, mikä häiritsee niiden analysoimista (Nilsson 2013). Erityisesti polymeeriset proteiinit ovat ongelmallisia, sillä niiden käyttäytymistä virtauskanavassa ja vuorovaikutuksia ultrasuodatusmembraanin kanssa on vaikea ennustaa. Molekyylien aggregoituminen virtauskanavassa vahvistaa sironneen valon intensiteettiä ja antaa virheellisen ylisuuren arvion molekyylin hyrräsäteestä ja hydrodynaamisesta tilavuudesta (kuva 8). Pienemmät monomeeriset proteiinit voivat muodostaa kooltaan hyvin suuria komplekseja polymeeristen proteiinien kanssa ja eluoitua vasta ajon lopussa.

Edellisten tekijöiden lisäksi proteiinien konformaatioon voi vaikuttaa ligandien (substraatit, kofaktorit, aminohapot, erilaiset pienet molekyylit) sitominen, mikä vaikuttaa polypeptidiketjun nettovaraukseen tai paikallisiin hydrofobisiin voimiin (Bychkova ym. 1992; Wright ja Dyson 1999; Uversky 2002). Ligandi on kelaatioon osallistuva molekyyli eli se on jokin molekyyli joka on sitoutunut keskusatomiksi kutsuttuun itsenäiseen kokonaisuuteen (Muller 1994). Kelaatio on prosessi, jossa ligandi muodostaa sidoksia tai on jotain muuta vuorovaikutusta keskusatomien kanssa. Ohran fenoliset yhdisteet voivat sitoutua proteiineihin ja muodostaa joko liukoisia tai liukenemattomia kolloideja, jotka vaikuttavat valonsirontaan (Siebert ym. 1996). Asano ym. (1982) havaitsivat, että fenolit sitoutuivat erityisesti paljon proliinia sisältäviin proteiineihin. Hordeiinit sisältävät huomattavan määrän proliinia (taulukko 1).



**Kuva 8.** Molekyylien hydrodynaamiseen tilavuuteen vaikuttavat tekijät virtauskanavassa. Tapauksessa a) molekyyleillä ei ole merkittäviä vuorovaikutuksia keskenään ja molekyyleillä on tilaa erottua. Tapauksessa b) molekyyleillä on virtauksen aiheuttamia leikkausvoimia voimakkaampaa vuorovaikutusta keskenään ja molekyyli muodostavat kimpun. Tapauksessa c) molekyyli muodostavat tiiviin rakennelman, jonka läpi virtaus ei pääse kulkemaan (Burchard 1994).

## 3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

### 3.1 Kokeellisen tutkimuksen tavoitteet

Tutkielman kokeellisella osuudella oli kaksi tavoitetta. Tavoitteena oli selvittää uuttomenetelmä, jonka avulla ohran hordeiininit saadaan erotettua viljamateriaalista mahdollisimman pilkkoutumattomina. Toiseksi, tavoitteena oli tutkia AF4:lla hordeiinien moolimassaa, kokoa ja muotoa. Hordeiinien tutkimiseksi AF4:lla, hordeiineille täytyi määrittää ekstinktiokerroin ja  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvo. Tämän lisäksi ajo-olosuhteet täytyi optimoida riittävän erotuksen saamiseksi.

### 3.2 Materiaalit ja menetelmät

#### 3.2.1 Tutkimuksessa käytetyt materiaalit

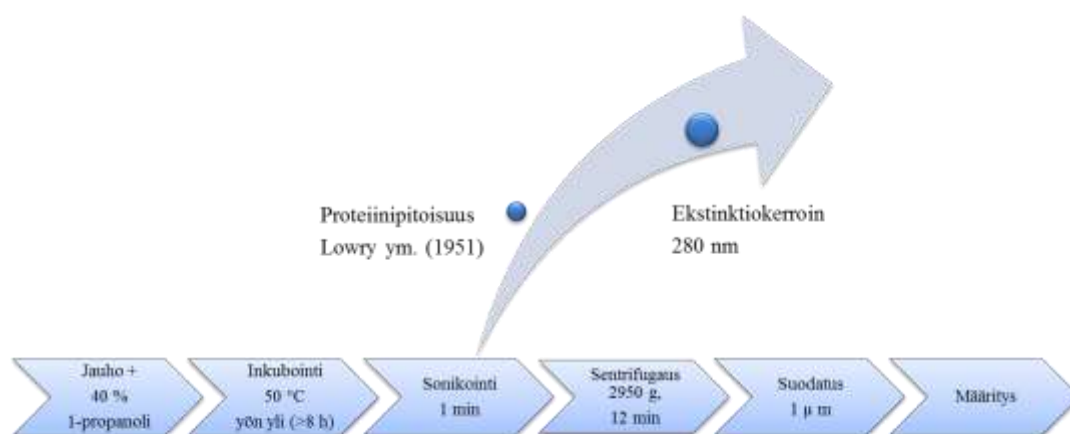
Tutkimuksessa käytettiin näyttemateriaalina Laitisen tilalta saatua kuoretonta Jorma-ohraa (saapunut 12.10.2011). Kuoreton Jorma-ohra valittiin helpon prosessoitavuuden takia. Ohra jauhettiin keskipakoismyllyllä (Retsch ZM 200, Dreieich, Saksa) alle 0,5 mm:n partikkelikokoon. Jorma-ohran jauhosäntö oli 98,3 %. Jauhon tyyppipitoisuus määritettiin AACC-menetelmällä 46–30 (Dumas) ja kosteuspitoisuus AACC-menetelmällä 44–15A. Jauhon proteiinipitoisuus oli kertoimella 5,7 laskettuna 14,2 % tuorepainossa. Jauhojen kosteuspitoisuus oli 11,1 %. Elintarvikenäytteenä käytettiin ohratärkkelyksen valmistuksesta muodostuvia proteiinipitoisia sivujakeita (ylite ja alite), jotka saatiin Altia Oyj:n Koskenkorvan tehtaalta. Sivujakeiden proteiinipitoisuudet olivat 27,7 % (ylite) ja 33,0 % (alite).

#### 3.2.2 Uuttomenetelmän kehittäminen

Aikaisemman kirjallisuuden perusteella kokeiltiin kolmen eri liuoksen uuttotehoa hordeiinien uuttamiseksi jauhönäytteestä (kuva 9). Uuttoliuokset olivat 0,05 M ja 0,10 M etikkahappo sekä 40 %:nen 1-propanoli. Näytteitä inkuboitiin uuttoliuoksessa 50 °C:n ilmahauteessa yön yli (Inkubator 1000, Heidolph Instruments, Schwabach, Saksa). Jauhönäytteiden uuttokonsentraatio oli 1 g jauhoa / 10 ml uuttoliuosta. Uuton tehostamiseksi näyte sonikoitiin (Labsonic H, tyyppi 853972, B. Brown, USA). Sonikaattori tuotti ultraääniä 50/60 Hz:n taajuudella vakiosäädöllä. Sonikoinnin jälkeen uutteen sentrifugoitiin (2950 g) 12 min (Eppendorf Centrifuge 5810R, Saksa). Näytteistä kerättiin talteen supernatantti, joka analysoitiin geelielektroforeesilla ja AF4:lla.



Lopulliseksi uuttomenetelmäksi valittiin kuvassa 9 esitetty menetelmä, jolla saatiin suurin saanto suuria hordeiinimolekyylejä. Menetelmän mukaan ohrajauhoa inkuboitii 40-prosenttisessa 1-propanolissa yön yli 50 °C:ssa ilmahauteessa. Näytepitoisuus oli 1 g jauhoa / 10 ml uuttoliuosta. Inkuboinnin jälkeen näyte sonikoitiin (1 min, 138 W) ja sentrifugattiin (12 min, 2950 g). Supernatantti kerättiin talteen ja siitä määritettiin sekä proteiinipitoisuus että ekstinktiokerroin kappaleessa 3.2.3 kuvatulla tavalla. Ennen spektrofotometrisia määityksiä näytteitä sentrifugoitiin (30000 g) 6 minuuttia sameuden poistamiseksi (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hampuri, Saksa). Sentrifugattu supernatantti laimennettiin deionisoidulla vedellä vastaamaan ajoliuoksen propanolipitoisuutta (20 %). Laimennuksen jälkeen näyte sentrifugattiin (12100 g) 4 min (MiniSpin<sup>®</sup>, Eppendorf, Hampuri, Saksa) ja suodatettiin 1 µm:n ruiskusuodattimella (Pall Corporation Life Sciences, USA). Suodatetut näytteet ajettiin FFF-laitteella automaattista näytteesyöttäjää käyttäen.



**Kuva 9.** Prosessikaavio hordeiinien uuttomenetelmästä. Ohrajauho inkuboitii 40-prosenttisessä 1-propanolissa yön yli, minkä jälkeen näyte sonikoitiin 1 min (138 W). Ennen proteiinipitoisuuden määrittystä näyte sentrifugoitiin (30000 g) 6 min. Supernatantti laimennettiin 1:2 deionisoidulla vedellä ja laimennoksesta määritettiin proteiinipitoisuus ja ekstinktiokerroin spektrofotometrillä. Laimennos suodatettiin 1 µm:n ruiskusuodattimella ja suodoksen proteiinien moolimassa ja koko määritettiin AF4:lla.

### Utteiden proteiinit geielektroforeesilla analysoituna

Supernatanteista valmistettiin näytteet natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeielektroforeesia (SDS-PAGE) varten. Näytteitä varten valmistettiin SDS-näytepuskuri (1,5 % Trisma basea; 20 % glyserolia; 40 % SDS:a; pisara bromifenolisinistä; 40 % deionisoitua vettä ja lopuksi pH säädettiin 2 M:lla suolahapolla 8,5:een). Näytteisiin lisättiin SDS-puskuria suhteessa 4:6 (näyte:puskuri). Osaan näytteistä lisättiin pelkistävää 2-merkaptetaanolia. Näytteitä kuumennettiin 100 °C:n lämpötilassa 4 min, minkä jälkeen kutakin näyteliuosta pipetoitiin 8 µl geelin (NuPAGE 10 % Bis-Tris

1.5 mm, Life Technologies, Carlsbad, USA) kaivoihin. Ennen ajon aloittamista ajopuskuriin (MOPS-ajopuskuri, Life Technologies, Carlsbad, USA) lisättiin 500 µl antioksidanttia (NuPAGE antioxidant NP0005, Life Technologies, Carlsbad, USA). Molekyylipainomarkkerina käytettiin värjättyä proteiinistandardia Novex sharp LC5800 (Life Technologies, Carlsbad, USA). Jännitteenä käytettiin 150 V:a ja ajo tehtiin huoneenlämmössä. Ajo kesti 1 h 30 min, minkä jälkeen geeli värjättiin Coomassie väriliuoksella (20 ml 99,5 % etanolia, jossa 0,5 % Coomassie Brilliant Blue R250; 60 ml 12 % trikloorietikkahappoa ja 60 ml deionisoitua vettä).

### **3.2.3 Hordeiinien koko- ja moolimassajakauman määrittäminen**

#### **Poikittaiskenttävirtausfraktiointi**

Hordeiinien kokojakauma määritettiin kenttävirtausfraktiointi-laitteella AF2000 MT (Postnova Analytics, Landsberg/Lech, Saksa), johon oli kytketty monikulmavalonsirontailmaisoin (MALS, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA), taitekerroinilmaisoin (PN 3150, Postnova Analytics) ja ultravioletti-ilmaisoin (PN3211, Postnova Analytics). Konsentraatioilmaisimena käytettiin joko UV- (280 nm) tai RI-ilmaisinta. Ilmaisimet kalibroitiin BSA:lla. Ilmaisimien viivekertoimeksi määritettiin 0,03. Virtauskanavan ultrasuodatusmembraanina käytettiin regeneroitua selluloosakalvoa (RC Membran, 10 000 g/mol, Postnova Analytics). Ajoliuoksina käytettiin 20-prosenttista 1-propanolia (n=12) – koska 40 %:sta 1-propanolia ei voinut käyttää AF4-laitteistossa – ja 0,05 M etikkahappoliuosta (n=3). Ajo-olosuhteet on esitetty taulukossa 3. Näytteet valmistettiin kuvassa 9 esitetyllä menetelmällä. Ohranäytteiden lisäksi ajettiin ohratärkkelyksen valmistuksesta syntyvät sivujakeet ylite ja alite sekä standardit BSA (engl. bovine serum albumin; AppliChem, Saksa) ja gliadiini (PWG-gliadin, Prolamin Working Group, Saksa). Jokaisesta edellä mainitusta näytteestä ajettiin toisto.

**Taulukko 3.** AF4:n ajo-olosuhteet eri ajoliuksilla.

<b>Muuttuja</b>	<b>Arvo</b>	
<b>Ajoliuos</b>	20 % 1-propanoli	0,05 M EtCOOH
<b>Näytteen syöttö-olosuhteet</b>		
syöttöaika	5 min	3 min
syöttövirtaus	0,20 ml/min	0,20 ml/min
poikittaisvirtaus	1,00 ml/min	1,5 ml/min
muutos aika	1 min	1 min
<b>Erotus-olosuhteet</b>		
1. vaihe	lineaarisesti laskeva	lineaarisesti laskeva
ajoaika	45 min	44
virtaus ilmaisimille	0,50 ml/min	1,00
poikittaisvirtaus	1,00 ml/min	1,5–3,0
2. vaihe	vakio	vakio
ajoaika	10 min	10 min
virtaus ilmaisimille	0,50 ml/min	1,00 ml/min
poikittaisvirtaus	0,05 ml/min	0,05 ml/min

Elugrammien piikkien tulkitsemiseksi ajoliuosta kerättiin talteen 14 minuutin ajan. Kerättyjä fraktioita tutkittiin SDS-PAGE:n avulla.

### **Moolimassan ja molekyylikoon laskeminen AF2000-ohjelmalla**

Poikittaiskenttävirtaus-laitteeseen kytkettyjen ilmaisimien vasteiden perusteella voidaan laskea AF2000-ohjelmalla (Postnova Analytics, Saksa) näytteen moolimassa ja hyrräsäde ( $r_g$ ). Jotta ilmaisimien havaitsema vaste ( $U$ ) voidaan yhdistää näytteen konsentraatioon ja moolimassaan, konsentraatio- ja valonsirontailmaisimelle täytyy määrittää kalibrointivakio  $\alpha$ . Ilmaisimet kalibroitiin monodisperssillä BSA:lla.

Ohjelma laskee molekyylin moolimassan ja hyrräsäteen sovittamalla ensin MALS- ja konsentraatioilmaisimella mitatut datapisteet pienimmän neliösumman menetelmällä suorakulmaiseen koordinaatistoon, jossa  $\frac{R_\theta}{K \times c}$  esitetään  $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$  funktiona. Tätä esitystapaa kutsutaan Debye-yhtälöksi, josta voidaan laskea hyrräsäde  $r_g$  koordinaatistoon sovitetun suoran kulmakertoimesta, kun muototekijä  $P(\theta)$  saa arvon 0 eli on 1, ja moolimassa suoran ja y-akselin leikkauspisteestä. Taulukossa 4 on esitetty suoran sovittamiseen kirjallisuudessa käytettyjä yhtälöitä. Sopiva suoran yhtälö valittiin empiirisesti tutkimalla, mikä funktio antoi parhaan mallin (kuva 10).

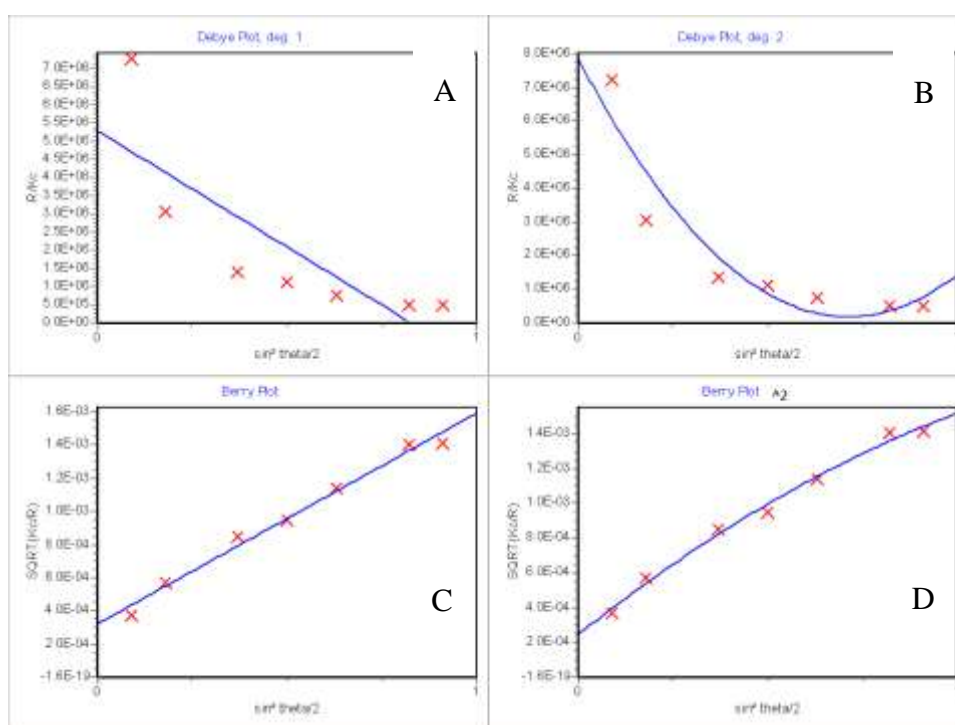
**Taulukko 4.** Debye-yhtälöön sovitettavan suoran Berry-, Debye- ja Zimm-yhtälöt, joiden perusteella voidaan ratkaista molekyylin moolimassa ja hyrräsäde.

Menetelmä	Moolimassa	Yhtälö	Kulmakerroin
Berry <sup>1</sup>	$M_w^{-1/2}$	$\sqrt{\frac{K \times c}{R_\theta}} = \frac{1}{M_w} + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2 M_w} \langle r_g \rangle^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$	$\frac{8\pi^2 r_g^2}{3\lambda^2 M_w^{1/2}}$
Debye <sup>2</sup>	$M_w$	$\frac{R_\theta}{K \times c} = M_w - \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle r_g \rangle^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$	$\frac{-16\pi^2 M_w r_g^2}{3\lambda^2}$
Zimm <sup>3</sup>	$M_w^{-1}$	$\frac{K \times c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2 M_w} \langle r_g \rangle^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$	$\frac{16\pi^2 r_g^2}{3\lambda^2 M_w}$

1) Berry (1966)

2) Debye (1947)

3) Zimm (1948)



**Kuva 10.** Sopiva suoran yhtälö valittiin empiirisesti tutkimalla, mikä ja minkä asteinen funktio soveltui parhaiten 40-prosenttisella 1-propanolilla uutettujen ja 20-prosenttisellä 1-propanolilla ajettujen hordeiniin mittaustalalle. Ensimmäisen asteen Berry-yhtälö antoi parhaimman sovituksen mittaustalalle. A = ensimmäisen asteen Debye-yhtälö. B = toisen asteen Debye-yhtälö. C = ensimmäisen asteen Berry-yhtälö. D = toisen asteen Berry-yhtälö.

Suoran  $\log r_g$  ja  $\log M_w$  kulmakertoimen  $v$  eli massafraktaalien avulla voidaan arvioida molekyylin muotoa (Nilsson 2013). Pallon muotoiselle partikkelille  $v = 0,33$ ; sattumanvaraisen muotoiselle  $0,5-0,6$  ja sauvalle 1.

Ohjelma laskee jokaiselle valitulle alueelle painokeskiarvomoolimassan ja hyrräsäteen kaavoista 12 ja 13, missä  $i$  on elugrammin segmentin indeksiarvo,  $M_i$  on indeksia vastaava laskennallinen moolimassa,  $r_i$  on indeksia vastaava laskennallinen hyrräsäde ja  $c_i$  on konsentraatio kyseisellä segmentillä. Ohjelma laskee numerokeskiarvot yhtälöiden (14) ja (15) mukaisesti. Painokeskiarvomoolimassan ja numerokeskiarvomoolimassan suhdetta

kutsutaan polydispersiteetti-indeksiksi (engl. polydispersity index; PDI) ja se kuvaa polymeerin homogeenisuutta. Monodispersseillä polymeereille  $M_w = M_n$ , joten PDI saa arvon yksi. Polydisperssin näytteen moolimassa vaihtelee ja painokeskiarvomoolimassa on suurempi kuin numerokeskiarvomoolimassa. Tästä syystä polydispersseille polymeereille PDI on suurempi kuin yksi.

$$M_w = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i} \quad (12); \quad r_w = \frac{\sum c_i r_i}{\sum c_i} \quad (13)$$

$$M_n = \frac{\sum \frac{c_i}{M_i} M_i}{\sum \frac{c_i}{M_i}} \quad (14) \quad r_n = \frac{\sum \frac{c_i}{M_i} R_i}{\sum \frac{c_i}{M_i}} \quad (15)$$

### **Hordeiinien ekstinktiokerroimen määrittäminen laskennallisesti ja kokeellisesti**

Hordeeineille määritettiin ekstinktiokerroin sekä laskennallisesti että kokeellisesti. Laskennallinen arvo määritettiin kuorettoman ohran hordeiinien aminohapposekvenssien perusteella. Kaikkien muiden hordeiinien sekvenssit haettiin NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) ylläpitämästä geenitietokannasta (GenBank<sup>®</sup> 2013) paitsi C-hordeiinin, jonka sekvenssi otettiin Tatham ja Shewryn (2012) julkaisusta. Koska näyteuute oli seos eri hordeeineista, täytyy eri hordeiinien suhteelliset osuudet selvittää. Osuuksia arvioitiin näyteuutteesta valmistetun SDS-PAGE-geelin perusteella. Geeli kuvattiin UVIGAS7100-geelinkuvantamislaitteella (UVitec, Cambridge, Iso-Britannia) ja kuva analysoitiin UVIBandMap (11.01) ohjelmalla. Ohjelma määritti kuvassa näkyville värjäytyille hordeeineille numeerisen arvon värjäymän intensiteetin ja alueen pikseleiden määrän perusteella. Numeerista arvoa käyttäen kullekin hordeiinille laskettiin suhteellinen osuus uutessa.

Pace ym. (1995) määrittivät 280 nm:n aallonpituusalueella absorboiville aminohapoille (tryptofaani, tyrosiini ja kysteiini) kertoimet, joita käyttäen voidaan laskea proteiinin ekstinktiokerroin vedessä. Hordeeineille laskettiin ekstinktiokerroin yhtälön (16) mukaan, missä # tarkoittaa kyseisen aminohapon lukumäärää. Uutteen ekstinktiokerroin laskettiin huomioiden hordeiinien suhteelliset osuudet.

$$\varepsilon_{280} = (\#Trp)(5500) + (\#Tyr)(1490) + (\#Cys)(125) \quad (16)$$

Näyteuutteelle määritettiin ekstinktiokerroin kokeellisesti 280 nm:n aallonpituusalueella 20 % 1-propanolissa. Määrittystä varten mitattiin uutteen proteiinipitoisuus spektrofotometrisesti Lowryn menetelmällä (Lowry ym. 1951). Proteiinistandardina

käytettiin PWG-gliadiinia (Prolamin Working Group, Saksa). Näytteiden absorbanssit mitattiin UV-1800 spektrofotometrillä (Shimadzu, Japani). Ennen näyteuutteiden ekstinktiokertoimien määrittystä näytteet laimennettiin 1 mg/ml pitoisuuteen. Näyteuutteiden absorbanssit mitattiin 280 nm:n aallonpituusalueella ja ekstinktiokertoimet laskettiin Beer-Lambertin lain perusteella (10).

### **Hordeiinien dn/dc-arvon määrittäminen laskennallisesti**

Hordeiineille määritettiin laskennallisesti  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvo 20-prosenttisessa 1-propanolissa aminohapposekvenssin perusteella SEDFIT (14.1) tietojenkäsittelyohjelmalla. Ohjelma laskee taitekertoimen McMeekin ym. (1964) kokeellisesti määrittämien aminohappojen molaaristen jäännöspitoisuuksien taittuvuuteen ja Durchschlagin (1986) sekä Cohn ym. (1943) määrittämien jäännösominaistilavuuksien perusteella seuraavia yhtälöitä käyttäen. Ensin ohjelma laskee arvot vakioille  $R_p$  (vakio kertoo kuinka paljon gramma proteiinia taittaa valoa) ja  $v_p$  (proteiinin osittainen ominaistilavuus) yhtälöillä (17) ja (18), joissa  $R_a$  on aminohapon painotuskerroin,  $M_a$  on jäännösmoolimassa ja  $v_a$  on jäännösominaistilavuus.

$$R_p = \frac{\sum_a R_a M_a}{\sum_a M_a} \quad (17)$$

$$v_p = \frac{\sum_a v_a M_a}{\sum_a M_a} \quad (18)$$

Lorentz-Lorenz-yhtälöllä (19) voidaan laskea proteiinin taitekerroin ( $n_p$ ). Wiener-yhtälö (20) on jatke Lorentz-Lorenz-yhtälölle. Wiener-yhtälöllä (20) voidaan laskea proteiinin taitekertoimen muutos konsentraation suhteen ( $\frac{\partial n}{\partial c}$ ) laimeissa liuoksissa. Yhtälössä  $n_0$  tarkoittaa liuottimen taitekerrointa, joka laskettiin veden (1,3340) ja 1-propanolin (1,387) taitekertoimista tilavuusprosentin perusteella.

$$n_p = \sqrt{\frac{2R_p + v_p}{v_p - R_p}} \quad (19)$$

$$\frac{\partial n}{\partial c} = \frac{3}{2} v_p n_0 \frac{n_p^2 - n_0^2}{n_p^2 + 2n_0^2} \quad (20)$$

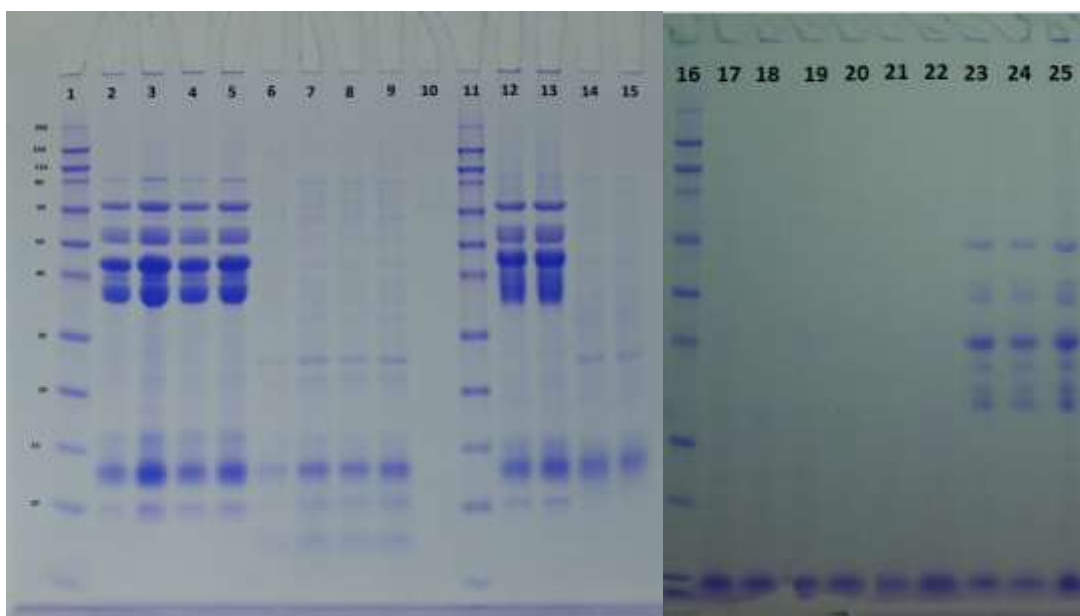
### **3.2.4 Tulosten käsittely**

Tuloksia käsiteltiin taulukkolaskentaohjelma Excelillä (Microsoft, USA), kuvaajat piirrettiin OriginPro 8.6 -ohjelmalla (OriginLab, USA) ja tilastokäsittelyt tehtiin tilasto-ohjelma SPSS Advanced Statistics 20.0:llä (IBM, USA). Tuloksien normalisuus testattiin Shapiro-Wilkin testillä ja muuttujien keskinäisiä vaikutussuhteita testattiin ei-parametrisella Kruskal-Wallis testillä.

### 3.3 Tulokset

#### 3.3.1 Uuttomenetelmä

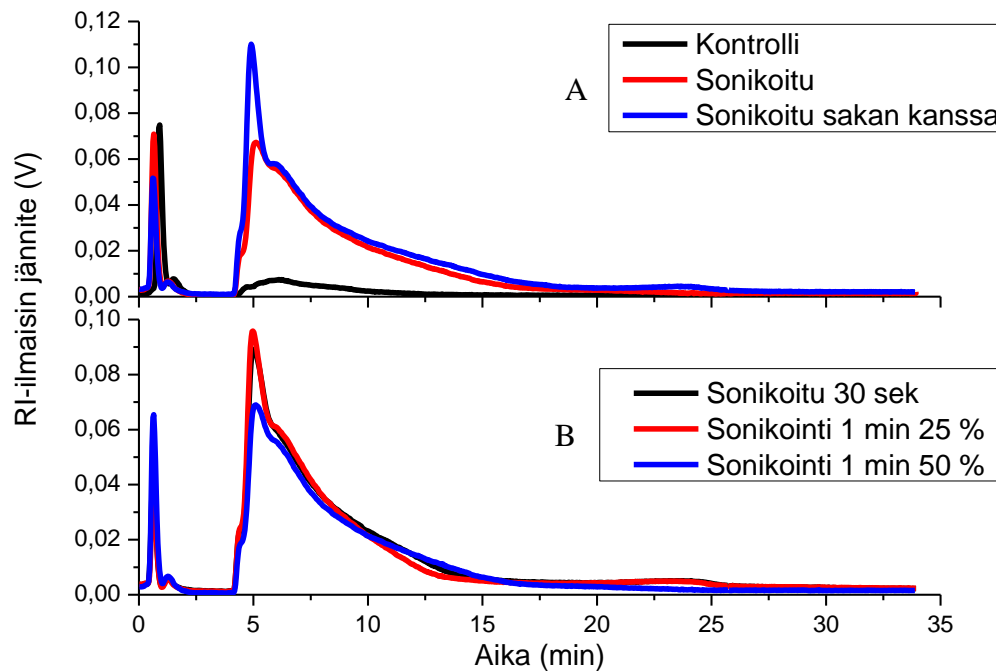
Sopivan uuttoliuoksen selvittämiseksi 0,05 ja 0,10 M:lla etikkahapolla sekä 40-prosenttisella 1-propanolilla uutettujen näytteiden eroja tutkittiin SDS-PAGE:lla (kuva 11). Kokeessa tutkittiin myös sonikoinnin vaikutusta uuttotehokkuuteen. Vertaamalla proteiinvivöhykkeiden värin intensiteettiä ja Lowryn menetelmällä mitattujen näytteiden proteiinipitoisuuksia (taulukko 5), tehokkaimmaksi uuttoliukseksi todettiin 40 %:nen 1-propanoli (kuva 11). Sonikointi paransi hordeiinien saantoa ja irrotti enemmän suuria molekyylejä jauhomateriaalista. Lopulliseksi uuttomenetelmäksi valittiin kuvassa 9 esitetty menetelmä.



**Kuva 11.** 0,05 tai 0,10 M:lla etikkahapolla tai 40-prosenttisella 1-propanolilla uutettujen hordeiinien geielektroforeesin tulokset. 1. molekyylimarkkeri; 2. 1-prop.; 3. 1-prop. sonikoitu; 4. 1-prop; 5. 1-prop. sonikoitu; 6. 0,05 M EtCOOH; 7. 0,05 M EtCOOH sonikoitu; 8. 0,05 M EtCOOH; 9. 0,05 M EtCOOH sonikoitu; 10. tyhjä; 11. molekyylimarkkeri; 12. 1-prop. pelkistämätön; 13. 1-prop. pelkistämätön ja sonikoitu; 14. 0,05 M EtCOOH pelkistämätön; 15. 0,05 M EtCOOH pelkistämätön ja sonikoitu; 16. molekyylimarkkeri; 17. 0,05 M EtCOOH sonikoitu; 18. 0,05 M EtCOOH sonikoitu; 19. 0,05 M EtCOOH sonikoitu; 20. 0,10 M EtCOOH sonikoitu; 21. 0,10 M EtCOOH sonikoitu; 22. 0,10 M EtCOOH sonikoitu; 23. 1-prop. sonikoitu; 24. 1-prop. sonikoitu; 25. 1-prop. sonikoitu.

Hordeiinien uuttotehon parantamista tutkittiin sonikoimalla näyte joko jauhosakan kanssa tai ilman. Näytteet uutettiin 0,05 M:lla etikkahapolla, jota käytettiin myös ajoliuksena AF4:ssa. Suurin saanto oli sakan kanssa sonikoidulla näytteellä, mikä näkyy RI-ilmaisimen piikeistä (kuva 12). Seuraavaksi kokeiltiin erilaisia sonikointikäsitteilyjä. Näytteitä sonikoitiin sakan kanssa joko 1 min tai 30 sek 25 %:n tai 50 %:n teholla (0,47–1,00 W). Tehokkain käsittely oli 1 min sonikointi 25 %:n teholla.





**Kuva 12.** Ohrajauhosta 0,05 M:lla etikkahapolla uutetut näytteet sonikoitiin joko jauhosakan kanssa tai ilman (A). Näyteajoissa käytettiin ajoliuoksena 0,05 M:sta etikkahappoa ja ilmaisimina käytettiin MALS/RI-yhdistelmää. Sonikointi sakan kanssa paransi uutotehokkuutta huomattavasti. Tehokkain sonikointikäsitteily oli 1 min sonikointi 25 %:n teholla (B).

### 3.3.2 Hordeiinien ekstinktiokerroin ja $dn/dc$ -arvo

#### Hordeiinien ekstinktiokerroin

Hordeiinien ekstinktiokerroin  $\epsilon$  ( $\frac{ml}{mg \cdot cm}$ ) määritettiin sekä laskennallisesti että kokeellisesti (taulukko 5). UVIBandMap-ohjelmalla laskettiin eri hordeiinien suhteellinen osuus uutuksessa, minkä jälkeen hordeiineille määritettiin laskennallinen ekstinktiokerroin (liite 2). Hordeiinien ekstinktiokertoimen laskennalliseksi arvoksi saatiin  $0,95$  ( $\frac{ml}{mg \cdot cm}$ ), sillä oletuksella, että kysteiinistä 50 %:a oli kystiiniä. Kysteiini absorboi säteilyä vain vähän  $>260$  nm:n aallonpituusalueella, eikä täten vaikuta ekstinktiokertoimen määrittämiseen. BSA:n ekstinktiokerroin ja taitekerroin otettiin kirjallisuudesta (Theisen ym. 1999).

#### Hordeiinien $dn/dc$ -arvo

Hordeiinien  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvo määritettiin laskennallisesti aminohapposekvenssin perusteella SEDFIT-ohjelmalla.  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvoksi saatiin  $0,1815$  ( $\frac{ml}{g}$ ).

**Taulukko 5.** Ohrautteiden, ylitteen, alitteen, BSA:n ja gliadinin Lowryn menetelmällä mitatut proteiinkonsentraatiot, 280 nm:n aallonpituusalueella 20-prosenttisessä 1-propanolissa (1,69 mg hordeiniä / ml) mitatut ekstinktiokertoimet ja näytteille lasketut taitekerroimet (liite 2).

Näyte	Uuttoliuos	Konsentraatio ( $\frac{mg}{ml}$ )	Ekstinktiokerroin ( $\frac{1}{\frac{mg}{ml} * cm}$ )	Taitekerroin ( $\frac{ml}{g}$ )
Ohra	40 % 1-propanoli	8,46±0,33	1,34±0,04	0,1815
Ohra	0,05 M EtCOOH	4,49±0,31	0,77±0,06	0,1815
Ohra	0,10 M EtCOOH	4,84±0,17	0,75±0,06	0,1815
Ylite	-	27,68±1,41	1,84±0,07	0,1815
Alite	-	33,00±1,67	1,68±0,14	0,1815
BSA	-	1,00	0,67*	0,166*
Gliadin	40 % 1-propanoli	1,61	0,63±0,03	0,1800**

\*Theisen ym. 1999

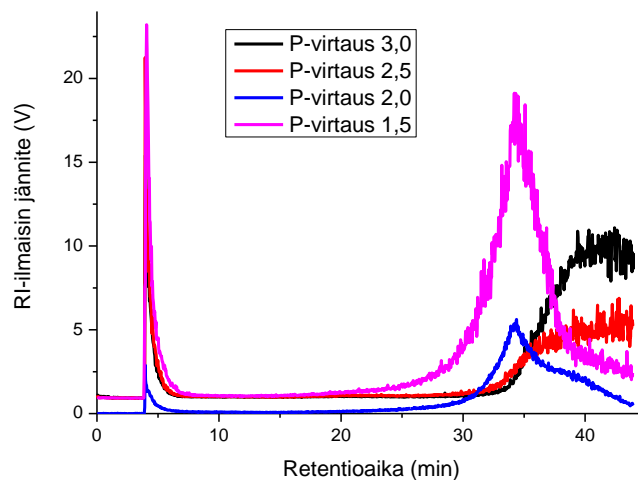
\*\* Bean ym. 2001; Stevenson ym. 2003

### 3.3.3 Hordeiniinien moolimassan ja molekyylikoon määrittäminen kenttävirtausfraktioinnilla

#### Ajo-olosuhteiden optimointi kenttävirtausfraktioinnissa

Ajo-olosuhteiden vaikutusta ohrajauhoutuutteen retentioon tutkittiin 0,05 M:lla etikkahapolla uutetuilla näytteillä. Aikaisemmat tutkimukset muunnellulla tärkkelyksellä suosittelivat hidasta virtausnopeutta ilmaisimille hajottavien leikkausvoimien pienentämiseksi, eikä nopeammilla virtausnopeuksilla ole ollut todistettua merkitystä erotukseen tai moolimassajakaumaan (Modig ym. 2006; Nilsson ym. 2006). Kirjallisuuden perusteella virtauskanavan virtausnopeudeksi valittiin 1,0 ml/min ja virtausohjelmaksi lineaarisesti laskeva. Molekyylien erotuksen parantamista kokeiltiin eri poikittaisvirtausnopeuksilla 1,5–3,0 ml/min (kuva 13). Voimakkaammilla poikittaisvirtausnopeuksilla suurimmat molekyylit eluoituvat vasta ajon lopussa poikittaisvirtauksen heikentyessä, eikä selkeää piikkiä ehtinyt muodostua. Poikittaisvirtauksella 1,5 ml/min saatiin selkeät piikit ajoajan puitteissa.

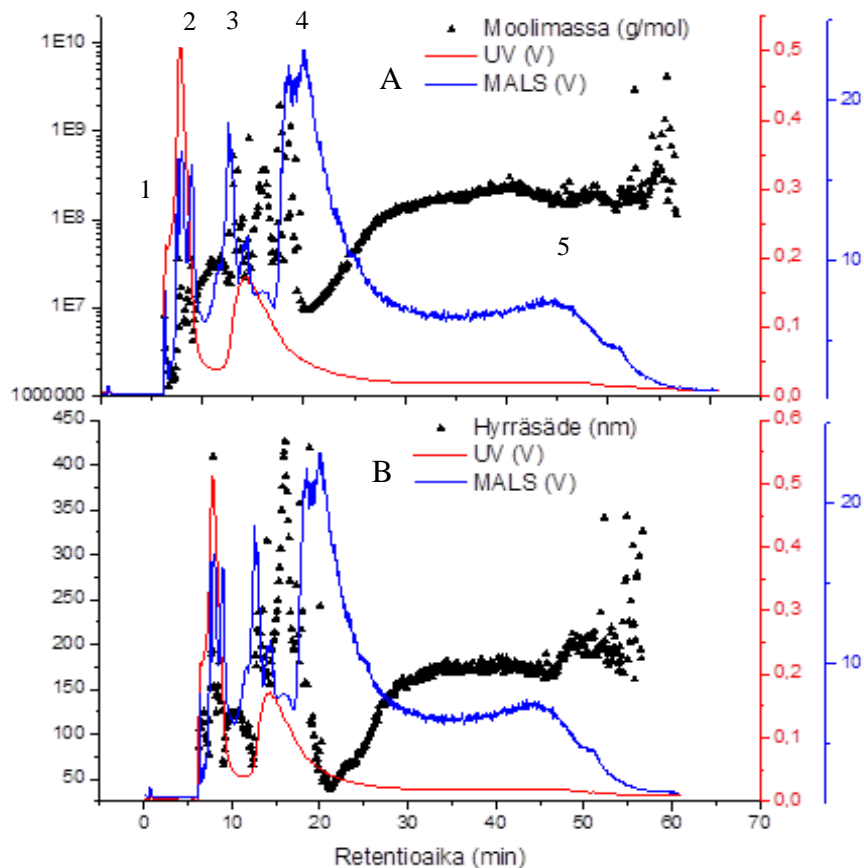
Ajo-olosuhteet optimoitiin myös 20-prosenttisellä 1-propanolilla, mutta optimointia rajoitti paineen kasvaminen liian suureksi yli 0,5 ml/min kanavan virtausnopeuksilla. 20-prosenttisen 1-propanolin viskositeetti ( $\eta$ ) 20 °C:n lämpötilassa on 3,109 mPas, kun taas puhtaan veden – jota 0,05 M:n etikkahappoliuoksen voidaan olettaa olevan – viskositeetti 20 °C:n lämpötilassa on 1,002 mPas (Pang ym. 2007; Yan ym. 2010). Propanoliliuoksen suuri viskositeetti selittää paineen kasvamisen. Kuitenkin 1-propanolia haluttiin käyttää ajoliuoksena sen hyvien uutto-ominaisuuden takia. Ajo-olosuhteiksi (taulukko 2) määritettiin kokeellisesti voimakkaimmat virtausnopeudet, jotka pumput kestivät.



**Kuva 13.** 0,05 M:lla etikkahapolla uutettujen hordeiinien erottuvuus MALS/RI-ilmaisimilla mitattuna poikittaisvirtausnopeuksilla 1,5–3,0 ml/min. Poikittaisvirtaus 1,5 ml/min osoittautui sopivimmaksi nopeudeksi. Ajoliuksena käytettiin 0,05 M:sta etikkahappoa.

### Hordeiinien moolimassa, koko ja muoto

Ohrautteiden moolimassajakauma (g/mol) ja hyrräsäde (nm) määritettiin MALS/UV-ilmaisimilla ekstinktiokerrointa 1,341 käyttäen (kuva 14, taulukko 6). Utteiden määritetyt proteiinkonsentraatiot kirjattiin ajo-ohjelmaan. 1-propanolin ollessa ajoliuksena RI-ilmaisinta ei voitu käyttää signaalihäiriön takia. Ajanhetkellä 5–8 min (1. piikki) eluoituivat pienikokoisimmat – luultavasti aggregoituneet pallonmuotoiset ja monomeeriset – proteiinit ( $M_w < 3 \times 10^6$  g/mol;  $r_g < 100$  nm). Pitkänomaiset ja sauvamaiset polymeeriset proteiinit ajanhetkellä 8–10 min (2. ja 3. piikki) ( $M_w < 10^7$  g/mol;  $r_g$  100–150 nm). Hetkellä 10–15 min (4. piikki) eluoitui suuret polymeeriset ( $M_w < 10^8$  g/mol;  $r_g$  150–250 nm) ja suurikokoisimmat polymeeriset proteiinit eluoituivat hetkellä 45–55 min (5. piikki) ( $M_w$   $10^8$ – $10^9$  g/mol;  $r_g$  150–200 nm). Molekyylien  $r_g$  on ajanhetkellä 13–17 min suurempi kuin eluution lopussa, mikä tarkoittaa, että suurimmat molekyylit eluoituivat steerisessä moodissa. Ajanhetkellä 10–20 min piikeissä on havaittavissa sahalaitaa, joka voidaan tulkita ilmaisimien ylikuormittumisena. Näyteajojen saanto konsentraatioilmaisimen avulla laskettuna oli 19–26 %.



**Kuva 14.** Ohrautteiden moolimassajakauma (g/mol) (A) ja hyrräsäde (nm) (B) retentioajan funktiona (min).

FFF:lla erotettuja hordeineja yritettiin tunnistaa SDS-PAGE:n avulla keräämällä ilmaisimien läpikäynyttä näytevirtausta talteen minuutin välein. Konsentroidusta huolimatta näytepitoisuus laimeni virtauskanavassa niin pieneksi, etteivät proteiinit näkyneet geelissä. Tutkimalla uutteista tehtyä geeliä (kuva 11) voidaan kuitenkin päätellä, mitä piikit mahdollisesti sisälsivät. Ensimmäinen piikki on luultavasti sekoitus albumiinia, globuliinia ja sonikoinnissa pilkkoutuneita hordeineja. Ajanhetkellä 8–10 eluotuneet molekyylit koostuvat luultavasti monomeerisistä B- ja  $\gamma$ -hordeineista sekä C-hordeiinista. Hetkellä 10–15 min eluotuneet molekyylit ovat luultavasti polymeerisia B-,  $\gamma$ - ja D-hordeineja. Kaikista suurimmat molekyylit ovat luultavasti sekoitus disulfididisoksilla ja heikoilla vuorovaikutuksilla toisiinsa sitoutuneita D- ja B-hordeineja.

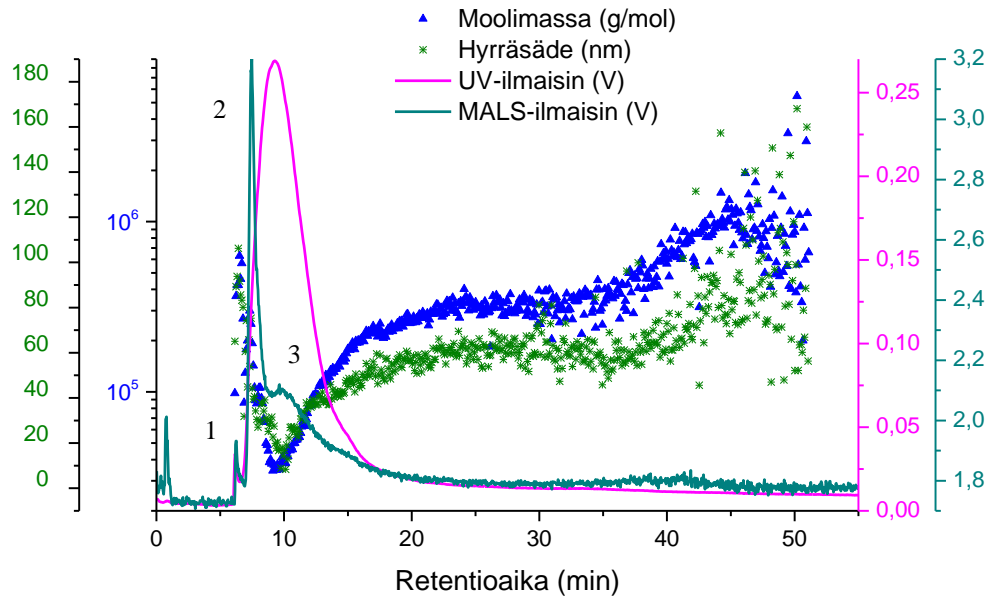
Hordeiinien muotoa tutkittiin massafraktaalien ( $v$ ) avulla. Kaikkien piikkien massafraktaalien keskiarvo oli yli yhden eli eluotuneet molekyylit olivat suurikokoisia ja muodoltaan avonaisia sekä epäsäännöllisiä (taulukko 6). Joidenkin näytteiden ensimmäisten piikkien massafraktaali oli 0,1–0,4 eli pallonmuotoisia, mutta keskiarvollisesti kaikkien näytteiden  $v$  oli yli yhden. Proteiinit saattoivat aggregoitua laimeassa propanolivesiliuoksessa ja dataa oli hankala sovittaa Berry-yhtälöön, mikä

selittäisi tulosta. Kaikkien näytteiden piikkien polydispersiteetti-indeksi (PDI) oli yli yhden, mikä kuvastaa molekyylien polydispersiyyttä.

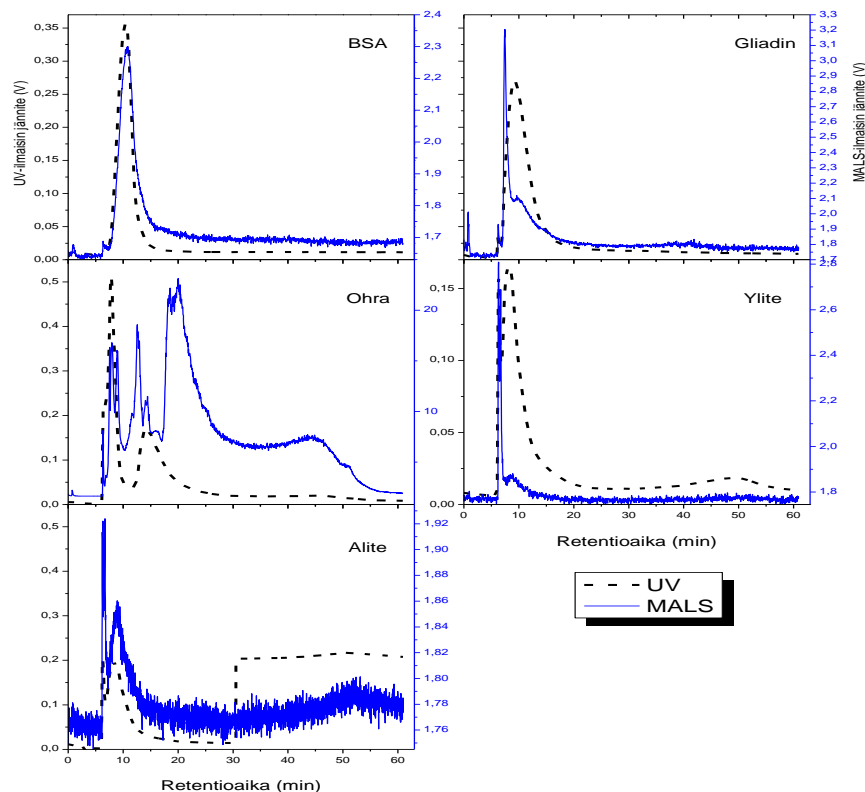
**Taulukko 6.** Ohrautteen, BSA:n, gliadinin, alitteen ja ylitteen näytekonsentraatio ( $\mu\text{g/ml}$ ), moolimassat ( $\text{g/mol}$ ), saanto (%), massafraktaali sekä hyrräsäde (nm). Taulukon hordeiniin piikit viittaavat kuvassa 14 esitettyyn dataan.

Näyte	c ( $\mu\text{g/ml}$ )	1. piikki ( $\text{g/mol}$ )	2. piikki ( $\text{g/mol}$ )	3. piikki ( $\text{g/mol}$ )	4. piikki ( $\text{g/mol}$ )	5. piikki ( $\text{g/mol}$ )	Saanto (%)
<b>1-propanoli</b>							
Ohra	4200	$2,5 \times 10^6$ ( $\pm 2,0 \times 10^6$ )	$6,1 \times 10^7$ ( $\pm 7,9 \times 10^7$ )	$6,0 \times 10^7$ ( $\pm 4,0 \times 10^7$ )	$5,6 \times 10^9$ ( $\pm 8,9 \times 10^9$ )	$1,1 \times 10^8$ ( $\pm 8,8 \times 10^7$ )	23 ( $\pm 2,9$ )
$V_{\text{ohra}}$		2,0	1,6	2,2	1,5	4,4	
$r_g$		110	140	240	190	210	
BSA	1000	$6,3 \times 10^4$ ( $\pm 2,0 \times 10^3$ )					95 ( $\pm 2,8$ )
$V_{\text{BSA}}$		1,1					
$r_g$		19					
Gliadin	4000	$2,6 \times 10^5$ ( $\pm 2,6 \times 10^4$ )	$2,7 \times 10^5$ ( $\pm 1,9 \times 10^5$ )	$3,5 \times 10^4$ ( $\pm 1,2 \times 10^3$ )			33 ( $\pm 25$ )
$V_{\text{gliadin}}$		0,5	1,8	0,3			
$r_g$		86	49	21			
Alite	4100	$1,9 \times 10^5$ ( $\pm 1,2 \times 10^5$ )	$4,0 \times 10^4$ ( $\pm 1,6 \times 10^4$ )				6,0 ( $\pm 0,1$ )
$V_{\text{alite}}$		1,9	1,0				
$r_g$		99	57				
Ylite	3500	$2,0 \times 10^6$ ( $\pm 2,4 \times 10^6$ )	$1,2 \times 10^5$ ( $\pm 1,3 \times 10^4$ )				5,9 ( $\pm 0,5$ )
$V_{\text{ylite}}$		1,0	0,3				
$r_g$		97	60				
<b>EtCOOH</b>							
Ohra		$1,7 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$		94
$V_{\text{ohra}}$		0,02	1,1	5,9	0,8		
$r_g$		110	120	150	53		

Menetelmää testattiin analysoimalla tunnettu gliadiinistandardi. Gliadiinilla havaittiin olevan kolme piikkiä (kuva 15), joiden moolimassojen keskiarvot olivat  $2,6 \times 10^5$  ( $\pm 2,6 \times 10^4$ ),  $2,7 \times 10^5$  ( $\pm 1,9 \times 10^5$ ) ja  $3,5 \times 10^4$  ( $\pm 1,2 \times 10^3$ )  $\text{g/mol}$ . Gliadiinin konsentraatioilmaisimella laskettu saanto oli 33 %. Koskenkorvan tehtaalta saaduissa sivujakeissa (alite ja ylite) havaittiin olevan 2 piikkiä (kuva 16). Alitteen ensimmäisen piikin moolimassan keskiarvo oli  $1,9 \times 10^5$  ( $\pm 8,5 \times 10^4$ ) ja toisen  $4,0 \times 10^4$  ( $\pm 1,2 \times 10^4$ )  $\text{g/mol}$ . Ylitteellä ensimmäisen piikin moolimassan keskiarvo oli  $2,0 \times 10^6$  ( $\pm 1,7 \times 10^6$ ) ja toisen  $8,8 \times 10^4$  ( $\pm 4,4 \times 10^4$ )  $\text{g/mol}$ . Sivujakeiden saannot olivat 6 %:a. Kalibrointiliuoksen ja 1-propanolin välinen viskoosisuusero aiheutti havaittavissa olevaa piikkien siirtymistä (kuva 16), minkä johdosta ilmaisimien kalibroinnissa määritetty viivekerroin ei pitänyt paikkaansa ja tuloksiin muodostui virhettä.



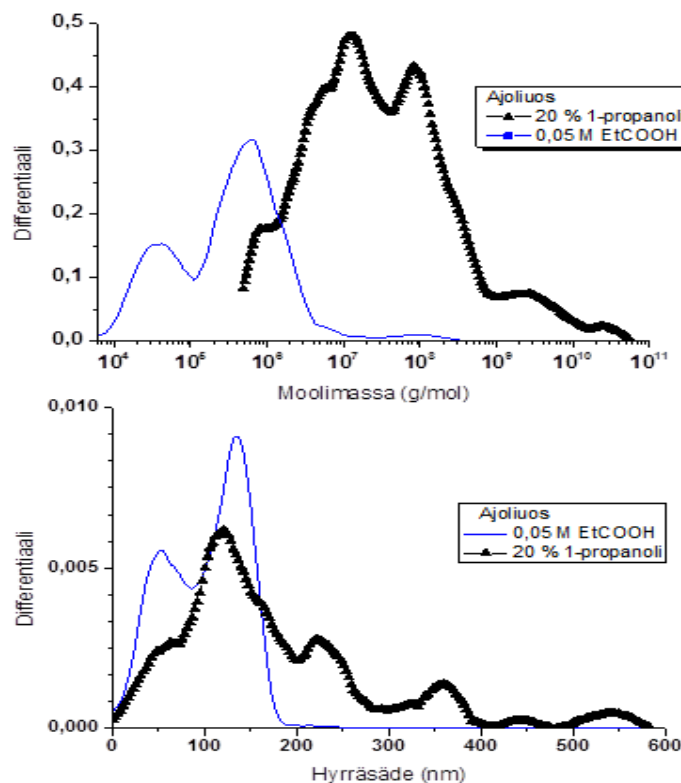
**Kuva 15.** Gliadiinin hyrräsäde (nm) ja moolimassajakauma (g/mol) sekä UV- ja MALS-ilmaisimen jännite (V) esitettyinä retentioajan (min) funktiona. Kuvaajasta voi havaita UV- ja MALS-piikkien epäsymmetrisyyden, joka on seurausta kalibroitiliuoksen ja ajoliuoksen viskoosisuuseroista. Gliadiinin hyrräsädejakauma oli 20–100 nm ja moolimassajakauma oli 35000–260000 (g/mol).



**Kuva 16.** Naudan seerumin albumiini (BSA), gliadiini (gliadin), ohraute (ohra), ylite ja alite uutenaytteiden UV- ja MALS-ilmaisimien jännite (V) retentioajan (min) funktiona. Kuvaajista on havaittavissa piikkien epäsymmetrisyyttä.

### Uuttoliuoksen merkitys moolimassa- ja kokotuloosiin

40 % 1-propanoli liuotti 0,05 M etikkahappoa enemmän ja isompia molekyylejä (kuva 17). Etikkahappo liuotti eniten  $6 \times 10^5$  g/mol olevia molekyylejä, kun taas 1-propanoli liuotti  $1 \times 10^7$  g/mol olevia molekyylejä. Propanolin liuottamat molekyylit olivat hyrräsäteeltään huomattavasti suurempia kuin etikkahapolla liuotetut. Molekyylien suuri koko kertoo proteiinien aggregoitumisesta.



**Kuva 17.** Uuttoliuoksen ja ajoliuoksen merkitys hordeiinien moolimassa- ja hyrräsädejakaumaan. Ohrajauhonäytteet uutettiin joko 40 % 1-propanolilla (musta) tai 0,05 M etikkahapolla (sininen). Ajoliuoksina käytettiin 20 % 1-propanolia tai 0,05 M etikkahappoa. Ilmaisimina käytettiin MALS/UV-yhdistelmää, koska RI-ilmaisim ei toiminut 20 % 1-propanolissa. Käyrien pinta-alasta voidaan havaita, kuinka 1-propanoli liuotti enemmän ja isompia hordeiineja kuin etikkahappo.

#### 3.3.4 Tilastollisen tarkastelun tulokset

Hordeiinien moolimassojen analyysituloksien normaalisuutta testattiin Shapiro-Wilkin-testillä (liite 3). Piikki 1 ja saanto noudattivat normaalijakaumaa, mutta muut tulokset eivät. Tilastollista käsittelyä varten valittiin ei-parametrinen Kruskal-Willisin-testi, jolla testattiin oliko käsittelyllä tai päivällä vaikutusta tuloksiin. Testin mukaan käsittelyllä ei ollut vaikutusta tuloksiin 1 %:n riskitasolla ( $p \geq 0,01$ ). Päivällä oli sen sijaan tilastollisesti vaikutusta 1. ja 5. piikkien analyysituloksiin ( $p \leq 0,01$ ), mikä todennäköisesti selittyy proteiinien tartumisella laitteiston pintoihin eli laitteiston tasapainottumisesta näytteen ja ajoliuoksen suhteen.

### 3.4 Pohdinta

Tutkielmassa määritettiin uuttomenetelmä, jolla pyrittiin liuottamaan ohran suuret polymeeriset hordeiininit rikkomatta niiden sisältämiä rikkisiltoja. Uutetut hordeiininit erotettiin koon perusteella AF4:lla eri fraktioihin, joiden moolimassa analysoitiin UV-, RI- ja MALS-ilmaisimilla. Perinteisesti viljojen proteiinien moolimassaa on tutkittu geelielektroforeesilla, jolla ei voi tutkia suurimpia polymeerisiä proteiineja (Nilsson 2013). Geelielektroforeesilla menetetään arvokasta tietoa hordeiinien keskinäisistä vuorovaikutuksista ja käyttäytymisestä liukoisessa muodossa. Ohran hordeiinien moolimassajakaumaa ja polymeerien käyttäytymistä 1-propanolissa ei ole aikaisemmin tutkittu AF4:lla. Vehnän alkoholiliukoisten proteiinien tiedetään muodostavan suuria proteiiniaggregaatteja, joiden tiedetään olevan monien hyvien vehnäjäuhon leivontaominaisuuksien taustalla ( $M_w > 10^7$  g/mol) (Shewry ja Tatham 1999; Stevenson ym. 2003). Myös ohran oletetaan muodostavan suuria proteiiniaggregaatteja, mutta tätä ei ole aikaisemmin tutkittu AF4:lla. Tässä tutkimuksessa hordeiininit muodostivat 20-prosenttisessa 1-propanolissa moolimassaltaan yli  $10^9$  g/mol olevia aggregaatteja.

#### 3.4.1 Uuttomenetelmä

Tutkimuksessa pyrittiin uuttamaan ohran hordeiinifraktio tuhoamatta hordeiinien välisiä rikkisiltoja. Valikoidulla uuttomenetelmällä onnistuttiin uuttamaan 60 %:a ohrajauhon proteiineista. SDS-PAGE:n mukaan uutuksessa oli pieniä määriä mukana albumiineja ja globuliineja, mutta valtaosa uutetuista proteiineista oli hordeiineja. Tyypillisesti, kuten tässäkin tutkimuksessa, viljojen proteiinipitoisuus määritetään tyypipitoisuuden kautta, eikä kaikki tyyppi ole peräisin proteiineista. Myöskään proteiinimuunnoskertoimesta ja sen todenmukaisuudesta ei olla täysin yksimielisiä tiedeyhteisössä. Käyttöön on vakiintunut arvot 5,7 ja 6,25. Uutteiden proteiinipitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti ja ohran fenolisten yhdisteiden on todettu sitoutuvan proteiineihin muodostaen joko liukoisia tai liukenemattomia kolloideja, jotka vaikuttavat valonsirontaan joko heikentäen tai voimistaen valon intensiteettiä (Siebert ym. 1996). Uuton saantoa voitaisiin parantaa lisäämällä pelkistintä uuttoliuokseen, mutta tämä tuhoaisi hordeiinien väliset rikkisillat. Geelielektroforeesin perusteella 40 % 1-propanoli liuotti hyvin hordeiineja ja todennäköisesti jauhosta uuttui valtaosa uutettavissa olevista hordeiineista. Singh ym. (1990) raportoivat uuttaneensa 2 %:lla SDS, 0,05 M:lla natriumfostaattiliuoksella sonikoinnin avulla 95 %:a vehnän prolamiineista. Tutkimuksessa proteiinipitoisuudet mitattiin spektrofotometrisesti Smithin menetelmällä ja tuloksiksi saatiin yli 100 %:n



saantoja eli liuoksissa on ollut muitakin komponentteja vaikuttamassa valon intensiteettiin kuin prolamiineja (Smith ym. 1985). Tässä tutkimuksessa vältettiin SDS:n käyttöä, koska se sitoutuu proteiinimolekyylisiin muuttamalla proteiinin konformaatiota.

### 3.4.2 Hordeiinien ekstinktiokerroin ja $dn/dc$ -arvo

Jotta UV- ja RI-ilmaisimia voitaisiin käyttää konsentraatioilmaisimina, analysoitavalle yhdisteelle täytyy määrittää sekä ekstinktiokerroin että  $\frac{dn}{dc}$ -arvo.  $\frac{dn}{dc}$ -arvoa ei ollut mahdollista mitata, joten arvo piti määrittää laskennallisesti. Määrittämistä varten uutteen hordeiinien suhteelliset osuudet täytyi tuntea. Suhteelliset osuudet määritettiin SDS-PAGE-geelistä geelinkuvantamisohjelmalla. Osuuksien todettiin muuten täsmäävän aikaisempien tutkimuksien tuloksien kanssa paitsi C- ja B-hordeiinien kohdalla (Rhodes ja Gill 1980; Shewry 1993; Tatham ja Shewry 1995; Shewry ym. 1999; Wieser ja Tatham 2008; Tatham ja Shewry 2012). Tuloksissa C-hordeiinin osuus ylikorostui ja B-hordeiinin taas alikorostui. Suurin osa B-hordeiineista ei liukene ilman pelkistintä, mikä selittää epäsuhteen hordeiinien pitoisuuksissa. Geelinkuvantamisohjelma perustuu geelistä otetun kuvan pikseleiden intensiteettiin eli geelistä määritettiin haluttujen alueiden värin voimakkuus. Menetelmä on nopea ja osoittautui riittävän tarkaksi tämän tutkimuksen tarkoituksiin. Hordeiinien suhteellisten osuuksien avulla määritettiin laskennallinen ekstinktiokerroin ( $0,95 \frac{ml}{mg*cm}$ ), jota verrattiin kokeellisesti määritettyyn kertoimeen ( $1,341 \frac{ml}{mg*cm}$ ). Suuremmalla kertoimella lasketut moolimassat olivat 29 %:a suurempia. Laskennallinen kerroin on lähempänä gliadiinistandardille tässä tutkimuksessa mitattua kerrointa ( $0,632 \frac{ml}{mg*cm}$ ). Hordeiineissa on huomattavasti enemmän kromoforeja kuin gliadiinissa, joten tuloksen oletetaan olevan suurempi, mutta hordeiinien laskennallisen ja mitatun kertoimen välillä ei pitäisi olla näin suurta eroa. Mittausta on voinut vääristää ohran fenoliset yhdisteet.

Hordeiinien  $\frac{dn}{dc}$ -arvo määritettiin laskennallisesti aminohapposekvenssin perusteella ( $0,1815 \frac{ml}{g}$ ). Arvo vastaa hyvin aikaisemmissa tutkimuksissa määritettyjen vehnän polymeeristen proteiinien  $\frac{dn}{dc}$ -arvoa ( $0,180-0,208 \frac{ml}{g}$ ) (Bean ym. 2001; Stevenson ym. 2003). Ongelma teoreettisesti määritetyssä  $\frac{dn}{dc}$ -arvossa on, ettei Jorma-ohran aminohapposekvenssiä ollut saatavilla, joten käytetyt sekvenssit ovat peräisin eri lajikkeista ja niiden sekvenssien keskiarvoista. Lisäksi mittavirheen välttämiseksi  $\frac{dn}{dc}$ -arvo

pitäisi määrittää samoissa olosuhteissa kuin itse ajo-olosuhteet. pH:n pitäisi olla lähellä neutraalia, etteivät varautuneet ionit häiritse ilmaisimien tiedon keruuta (Burchard and Cowie 1972; Nagasawa and Takahasi 1972; Straizelle 1972; Eisenberg 1976). Hordeineja ei kuitenkaan pysty uuttamaan sellaisella liuottimella, joka ei vaikuttaisi proteiinin nettovarauksiin. Teoreettisesti määritetty  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvo vastaa kuitenkin hyvin vehnän polymeeristen proteiinien  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvoa, joten arvosta johtuvan mittavirheen voidaan olettaa olevan merkityksetön.

### 3.4.3 Ajo-olosuhteiden optimointi

Uutteiden erotusolosuhteet optimoitiin AF4:lla 0,05 molaariselle etikkahapolle. Optimaaliseksi poikittaisvirtauksen arvoksi määritettiin 1,5-kertainen virtausnopeus ilmaisimille menevästä virtausnopeudesta. Tutkimuksessa kokeiltiin suurempia poikittaisvirtauksen arvoja, mutta virtaukset osoittautuivat liian voimakkaiksi. Alhaisemmilla virtausnopeuksilla molekyyli-molekyyli ja molekyyli-membraani välisiä sidoksia ei muodostu yhtä paljon (Litzén 1993). Etikkahapolle määritettyjä ajoparametrejä ei voitu käyttää 20-prosenttisella 1-propanolilla ajoliuoksen viskoosisuuden takia ja virtausnopeuksien suhteen täytyi olla kaksinkertainen riittävän erotuksen saamiseksi.

Ajoprofiilina käytettiin lineaarisesti alenevaa poikittaisvirtausta, joka tehokkaasti erotti hordeiniitit. Aikaisemmissa tutkimuksissa on sen sijaan havaittu, että eksponentiaalisesti aleneva poikittaisvirtaus olisi tehokkain ajoprofiili polydispersseille ja suurikokoisille molekyyliille (Stevenson ym. 2003; Leeman ym. 2006). Tässä tutkimuksessa kokeiltiin erilaisia ajoprofiileja, mutta ohjelmistovian takia ajojen tulokset eivät tallentuneet. Kokeita ei toistettu, koska lineaarisesti heikkenevä poikittaisvirtaus osoittautui riittävän tehokkaaksi ajoprofiiliksi. Erotusta voisi vielä tehostaa kokeilemalla monipuolisemmin erilaisia virtausnopeuksia ja ajoprofiileja.

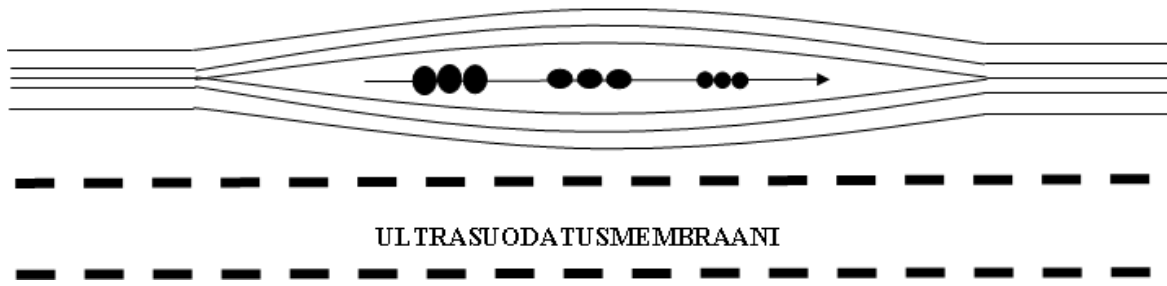
Tarkkojen tuloksien saamiseksi, ilmaisimien kalibrointi täytyy tehdä tunnetulla yhdisteellä ja valonsirontailmaisimen kalibrointi pitäisi tehdä samassa liuottimessa kuin ajettavat näytteet. Kalibroitiliuoksen ja ajoliuoksen eron vaikutusta analyysituloksiin testattiin analysoimalla BSA- ja gliadiinistandardien moolimassa 20-prosenttisessä 1-propanolissa. BSA:n moolimassaksi saatiin valmistajan ilmoittamaa moolimassaa pienempi tulos, mutta ero ei ollut merkityksellinen. Ero voi johtua liuosten viskositeettierosta, mistä seurasi virhettä ilmaisimien viivekertoimeen. Toisin sanottuna, valonsirontailmaisimen kalibroiminen eri liuoksessa kuin itse ajoliuos ei näyttäisi vaikuttaneen merkittävästi

tuloksiin. Tässä työssä käytettiin absoluuttista moolimassan määrittämenetelmää eli valonsirontra- ja konsentraatioilmaisimien yhdistelmää, eikä menetelmä ole herkkä molekyylien erotuksen pienille poikkeavuuksille.

Laitteen valmistaja (Postnova Analytics) ilmoitti, että jos näyteajoissa käytetään automaattista näytteensyöttäjää, pitäisi ilmaisimet myös kalibroida käyttäen näytteensyöttäjää. Näyte voi nimittäin adsorboitua automaattisen näytteensyöttäjän kapillaareihin, jolloin konsentraatioilmaisimella laskettuun saantoon voi tulla jopa 10 %:n heitto. Tässä tutkimuksessa ilmaisimet kalibroitettiin käyttäen manuaalista syöttöä, mutta itse ajoissa käytettiin automaattista syöttöä. BSA:n saannoksi saatiin 95 % eli näytettä on todennäköisesti jäänyt injektoriin.

Gliadiinistandardin analyysitulokset osoittavat gliadiinin aggregoituneen 1-propanolissa (taulukko 6). Valmistajan mukaan SDS-PAGE:lla määritettynä gliadiinien moolimassa pitäisi olla 30000–94000 g/mol (Eckert ym. 2006). Alkoholiliuoksen on todettu paljastavan proteiinien hydrofobiset alueet, mikä vahvistaa polymeerien välisiä hydrofobisia ei-kovalenttisia sidoksia. Suurimmat aggregaatit ovat luultavasti oligomeerisia gliadiineja (kuva 15). Toiseksi suurimmat ovat monomeerisia ja kaikista pienimmät molekyylit ovat luultavasti epäpuhtautena standardissa olevia albumiineja ja globuliineja.

Uuttoliuos vaikutti merkitsevästi proteiinien hyrräsäteeseen. Propanolissa analysoitujen isompien molekyylien suurempi määrä voi olla paremman uuttotehokkuuden lisäksi seurausta siitä, että alkoholi-vesi-seos on puhdasta vettä poolittomampi, jolloin alkoholin hydrofobiset alueet muodostavat misellimäisen rakenteen proteiinin ympärille ja proteiinien hydrofobiset alueet avautuvat. Proteiinin natiivin rakenteen purkautuessa  $\alpha$ -kierteisyys lisääntyy, mikä selittää osaltaan hordeiinien massafraktaalien osoittamaa sauvamaista rakennetta (Brandts ja Hunt 1966; Hirota-Nakaoka ja Yogo 1999; Romero ym. 2007). Toinen sauvamaiseen muotoon vaikuttanut tekijä on luultavasti ollut virtauksen aiheuttama paine, joka on pakottanut molekyylit aggregoitumaan tai järjestäytymään peräkkäin (kuva 18). Ei-kovalenttiset sidokset ovat luonteeltaan heikkoja sidoksia ja virtauksen voimakkuus on voinut olla riittävä muovaamaan aggregaattien muotoa.



**Kuva 18.** Proteiiniaggregaattien massafraktaalien osoittama sauvamainen muoto voi olla seurausta virtauksen aiheuttamasta paineesta, joka on pakottanut molekyylit järjestäytymään ja aggregoitumaan peräkkäin.

### 3.4.4 Moolimassan ja jakauman laskeminen AF2000-ohjelmalla

Hordeiinien moolimassajakauman laskemiseksi käytettiin Berry-yhtälöä (21). Andersson ym. (2003) tutkivat Zimm-, Berry- ja Debye-yhtälöiden virheen suuruutta suhteessa molekyylien kokoon. He havaitsivat, että Debye-yhtälö soveltuu parhaiten pyöreän muotoisille kooltaan yli 50 nm:ä oleville molekyyilleillä, kun taas Berry-yhtälö soveltuu parhaiten epäsäännöllisen muotoisille ”random coil” molekyyilleille. Hordeiinien kokojakauman laskemiseksi käytettiin Berry-yhtälöä, joka huomioi paremmin partikkelin suuren ja epäsäännöllisen muodon ylimääräisellä muototekijällä  $q$  (Berry 1966; Burchard 1994).

Oikeatyypin yhtälön valitseminen on kriittistä tuloksien tarkkuuden kannalta, sillä eri mallit antoivat hyvin erilaisia tuloksia moolimassajakaumalle ja hyrräsäteelle. Suurimmillaan mallien välillä oli  $10^6$  g/mol suuruisia heittoja. Yllättäen ensimmäisen asteen yhtälö mallinsi polynominaalista yhtälöä paremmin hordeiinien moolimassajakaumaa. Yleensä korkeamman asteen yhtälöt soveltuvat paremmin suurille molekyyilleille. Niitä ei vain suositella käytettäväksi virhettä sisältävälle datalle virheen moninkertaistumisen välttämiseksi. Lineaarinen sovitus oli tältäkin kannalta ylivoimainen valinta. Käytettävissä olevat mallit eivät suinkaan ole täydellisiä ja ne ovat vain karkeita arvioita todellisuudesta. Hordeiinien silminnähtävä geelilytyminen kuitenkin tukee mallien avulla laskettuja todella suuria moolimassoja.

### 3.4.5 Hordeiinien moolimassa, koko ja muoto

Hordeiinien aggregoituminen 40 % 1-propanolissa herättää kysymyksiä 1-propanolin soveltuvuudesta uuttoliuottimeksi. Hordeiineja, saati muita prolamiineja, ei ole mahdollista uuttaa neutraaleilla tai proteiinin nettovaraukseen vaikuttamattomilla liuottimilla. Valonsirontamenetelmät ovat taas tarkimmillaan elektrostaattisten voimien ollessa pienimmillään, mikä taas heikentää hordeiinien liukoisuutta. Yleisesti ottaen,

valonsironta-analyysimenetelmät soveltuvat parhaiten kaksikomponenttisysteemille tai isorefraktiiviselle monikomponentti-systeemille, jota ohrautteen eivät ole (Bean ja Lookhart 2001).

MALS-piikeissä oli havaittavissa röpelöisyyttä, joka on peräisin joko suurien molekyylien aiheuttamasta valonsironnan häiriöstä tai ilmaisimen ylikuormittumisesta. UV-ilmaisimen piikeissä ei ollut havaittavissa ylikuormittumista. MALS-piikkien röpelöisyys on todennäköisesti peräisin liian suuresta konsentraatiosta. Pienempi näytekonsentraatio olisi voinut ehkäistä häiriöitä. Molekyylien moolimassan ja hyrräsäteen äkillinen hyppäys suuruusluokassa osoittaa isojen molekyylien eluoituneen samanaikaisesti pienempien kanssa. Vaihtoehtoisesti pienempiä molekyylejä on ollut niin paljon, että on muodostunut huomattava määrä suuria aggregaatteja. Näytekonsentraatiota pienentämällä erotusta olisi voinut tarkentaa, kunhan erikokoisten molekyylien pitoisuudet eivät alita ilmaisimien havaintokynnystä.

Hordeiinien moolimassojen keskihajonnat olivat hyvin suuria eli joidenkin ajojen hordeiinien analysoidut moolimassat poikkesivat suuresti keskiarvosta. Tämä on todennäköisesti seurausta virtauskanavan ultrasuodatusmembraaniin tarttuneiden hordeiinien äkillisestä liukenemisestä ajojen välillä. Tätä päätelmää tukee myös näyteajojen heikko laskennallinen saanto. Takaisinsaantoa yritettiin seurata myös SDS-PAGE:lla, mutta ilmaisimilta ulostulevan ajoliuoksen näytekonsentraatio laimeni virtauskanavassa niin alhaiseksi, ettei SDS-PAGE:lla saatu tuloksia näytteen konsentroidinnista huolimatta. Näytteitä olisi pitänyt kerätä useasta eri ajosta riittävän näytepitoisuuden saamiseksi. Ajojen jälkeen membraanin pinnalla oli havaittavissa silminnähtäviä proteiinigeelejä. Laitteiston huuhtelusta ja membraanin vaihdosta huolimatta myöhemmissä ajoissa oli havaittavaa proteiinikontaminaatiota. Hordeiinit luultavasti alkoivat saostua 1-propanolin laimentamisen jälkeen. Ajoissa täytyisi käyttää 40 %:sta 1-propanolia hordeiinien pitämiseksi liukoisessa muodossa, mutta tämä tarkoittaisi laitteiston kapillaarien ja pumppujen vaihtamista orgaanista liuotinta kestäviksi, mikä ei ollut mahdollista tämän tutkimuksen aikana. Ulmius ym. (2012) havaitsivat tutkimuksessaan, että suurimmat ohran  $\beta$ -glukaani-aggregaatit jäivät kiinni jo ruiskusuodatukseen. Myös tässä tutkimuksessa havaittiin ruiskusuodatusta vastustavaa painetta eli suodatimen huokosten tukkeutumista, vaikka membraanin huokoskoko oli 1  $\mu\text{m}$ .

Valonsirontailmaisimen häiriöt ja matemaattisten mallien paikkansapitävyys hyvin suuria molekyyliä analysoitaessa asettavat haasteita tarkkojen analyysituloksien saamiseksi. Sen sijaan kenttävirtausfraktiointi osoittautui nopeaksi ja dynaamiseksi erotusmenetelmäksi. Menetelmän käyttö analytiikassa varmasti lisääntyy, sillä se mahdollistaa sekä suurien molekyylien että aggregaattien analysoimisen. Menetelmä ei myöskään tuhoa näytettä, mikä mahdollistaa näytteen jatkoanalysoinnin.

Verrattaessa etikkahapolla uutettujen ja ajettujen hordeiinien moolimassoja ja molekyylin kokoa 1-propanolilla uutettuihin, 1-propanoli liuotti huomattavasti enemmän ja suurempia hordeeineja. Hordeiinit sisältävät runsaasti hydrofobisia aminohappoja, jotka luultavasti kääntyivät kohti 1-propanolin poolittomia hiilivetyhäntiä. Rakenteen avautuminen lisäsi hordeiinien välisiä hydrofobisia ei-kovalenttisia vuorovaikutuksia. Etikkahapon tapauksessa hordeiinien monomeerien väliset vuorovaikutukset olivat todennäköisesti voimakkaampia kuin eluentin ja monomeerien, jolloin hordeiinit puristuivat kasaan hakeutuessaan energisesti edullisempaan konformaatioon (Dill ja Shortle 1991). Tällöin hordeeineilla oli pienempi taipumus muodostaa suuria aggregaatteja. Happama ajoliuos on myös vaikuttanut hordeiinien nettovaraukseen, jolloin varautuneiden aminohappojen väliset repulsiivoimat ajavat proteiinin joko tiiviiseen tai avonaiseen rakenteeseen proteiinista riippuen (Goto ym. 1993). Ajoliuoksen vaikutus hordeiinien konformaatioon on hyvin linjassa aikaisempien tutkimuksien tuloksien kanssa, joissa alkoholi raportoitiin happoa tehokkaammaksi liuottimeksi (Aune ym. 1967).

Hordeiinien havaittu voimakas aggregoituminen kuvaa niiden muodostamia hydrofobisia ei-kovalenttisia sidoksia täysin avonaisessa konformaatioissa. Onko mahdollista, etteivät hordeiinit varsinaisesti aggregoituneet, vaan että hordeiinit esiintyvät ohran jyvässä hyvin suurina proteiinipolymeereinä? Ohralla ei ole kuitenkaan vehnän erinomaisia leivontaominaisuuksia, mikä voi selittyä rikkipitoisten aminohappojen sijoittumisella hordeiinien aminohapposekvenssin keskialueelle, toisin kuin vehnän gluteenissa. Suuret proteiiniaggregaatit eivät siis riitä selittämään vehnäjauhon hyviä leivontaominaisuuksia.

Koskenkorvan tehtaalta saatujen proteiinipitoisten sivujakeiden sisältämät hordeiinit olivat moolimassaltaan huomattavasti pienempiä kuin ohrajauhosta uutettujen. Ilmeisesti tärkkelyksen erotuksessa käytetyt prosessit pilkkovat sivujakeen sisältämät proteiinit pienemmiksi yksiköiksi. Proteiinien rakenteen muodostusominaisuudet ovat riippuvaisia niiden koosta ja aminohappokoostumuksesta. Sivujakeella ei välttämättä ole sellaisenaan

monia teknologisia ominaisuuksia, mutta sivujakeesta olisi mahdollista valmistaa lisäravinteiksi tarkoitettuja proteiini-isolaatteja.

Tulevaisuudessa tarkempien tuloksien saamiseksi hordeiinien aggregoitumista tulisi välttää käyttämällä vähintään 40 %:n vahvuista 1-propanolia ajoliuoksena tai käyttämällä vaihtoehtoista liuotinseosta. Lisäksi olisi hyvä tutkia minkälaisia teknologisia ominaisuuksia suurilla polymeerisilla hordeiineilla oikein on.

## 4 PÄÄTELMÄT

Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi yhdistettynä MALS- ja UV-ilmaisimeen on lupaava menetelmä ohran monomeeristen ja polymeeristen proteiinien koon ja muodon määrittämiseksi. Ohran 40-prosenttisella 1-propanolilla uutettujen hordeiinien todettiin muodostavan hyvin suurikokoisia, sauvamaisia ja satunnaisten muotoisia aggregaatteja. Eniten uutteessa oli moolimassaltaan  $10^6$ – $10^7$  g/mol olevia hordeiineja. Suurikokoisimmat polymeeriset hordeiinit eluoutuivat ajon lopussa ja niiden moolimassa oli n.  $10^9$  g/mol.

Käytetyllä uutomenetelmällä uutettiin ohran hordeiinifraktio ilman kemiallista pelkistintä. SDS-PAGE:n avulla uutteesta tunnistettiin monomeeriset C-, B-, ja  $\gamma$ -hordeiinit sekä polymeeriset B-,  $\gamma$ - ja D-hordeiinit. Lisäksi uutteisissä havaittiin olevan pieniä määriä albumiineja ja globuliineja. Kenttävirtausfraktioinnilla proteiinit erotettiin moolimassan perusteella viiteen eri fraktioon, joiden moolimassat ja hyrräsäteet vaihtelivat välillä  $10^6$ – $10^9$  g/mol ja 50–450 nm:ä.

Tuloksissa havaittiin valonsirontailmaisimen ylikuormittumista, joka aiheutti mittausvirhettä. Tuloksien laskemiseksi käytettiin spektrofotometrillä näytteistä mitattua ekstinktiokerrointa ja ohran proteiinien aminohapposekvenssien perusteella arvioitua  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvoa, joka vastasi kirjallisuuden perusteella vehnän prolamiinien  $\frac{\partial n}{\partial c}$ -arvoa. Hordeiinien moolimassa ja hyrräsäde laskettiin ensimmäisen asteen Berry-yhtälöllä, joka todettiin empiirisesti sopivimmaksi malliksi. Konsentraatioilmaisimen avulla lasketun saannon ja empiirisen havainnoinnin perusteella proteiiniaggregaattien todettiin takertuvan AF4:n kapillaareihin ja ultrasuodatusmembraaniin, mikä heikensi analyysituloksien edustavuutta näytepopulaatiosta. Takertumista voitaisiin välttää käyttämällä 40-prosenttista 1-propanolia ajoliuoksena.

Hordeiinien moolimassan, koon ja muodon luotettava analysoiminen laimeassa alkoholivesiliuoksessa osoittautui haasteelliseksi tehtäväksi, sillä hordeiinit eivät pysyneet liukoisessa muodossa kovin pitkiä aikoja ja takertuivat kesken analyysien AF4-laitteen pinnoille. Kenttävirtausfraktiointi todettiin soveltuvuusalueeltaan monipuoliseksi ja nopeaksi erotusmenetelmäksi. Menetelmä tarjoaa hellävaraisen työkalun sekä suurikokoisten molekyylien että aggregaattien funktionaalisten ominaisuuksien, muodon, moolimassan ja koon tutkimiseksi.



## LÄHDELUETTELO

- Agyare KK, Addo K, Xiong YL. 2009. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. *Food Hydrocolloids* 23:72-81.
- Anderson OD, Rausch C, Moullet O, Laqudah ES. 2003. The wheat D-genome HMW-glutenin locus: BAC sequencing, gene distribution, and retrotransposon clusters. *Funct Integr Genomics* 3:56-68.
- Anderson OD. 2013. The B-hordein prolamin family of barley. *Genome* 56:179-85.
- Andersson AAM, Åman P. 2001. Starch and By-products from a Laboratory-Scale Barley Starch Isolation Procedure. *Cereal Chemistry* 78:507-13.
- Andersson M, Wittgren B, Wahlund K-G. 2003. Accuracy in Multiangle Light Scattering Measurements for Molar Mass and Radius Estimations. Model Calculations and Experiments. *Anal Chem* 75:4279-91.
- Arfvidsson C, Wahlund K-G, Eliasson A-C. 2004. Direct molecular weight determination in the evaluation of dissolution methods for unreduced glutenin. *J Cereal Science* 39:1-8.
- Arkin H, Yaşar F, Çelik T, Çelik S, Köksel H. 2001. Molecular modelling of pentapeptide and tetrapeptide sequences of C-hordein. *J Institute Brewing* 107:383-8.
- Asano K, Shinagawa K, Hashimoto N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J American Society of Brewing Chemists* 40:147-54.
- Aune KC, Salahuddin A, Zarlengo MH, Tanford C. 1967. Evidence for residual structure in acid- and heat-denatured proteins. *J Biological Chem* 242:4486-9.
- Baik B-K, Newman CW, Newman RK. 2011. Food uses of barley. Teoksessa: Ullrich SE, toim. Barley: production, improvement and, uses. Oxford, Iso-Britannia: Wiley-Blackwell. s 532-62.
- Bean SR, Lookhart GL. 2001. Factors influencing the characterization of gluten proteins by size-exclusion chromatography and multiangle laser light scattering (SEC-MALLS). *Cereal Chemistry* 78:608-18.
- Bello-Perez LA., Roger P, Baud B, Colonna P. 1998. Macromolecular features of starches determined by aqueous high performance size exclusion chromatography. *J. Cereal Science*. 27:267-78.
- Berry GC. 1966. Thermodynamic and conformational properties of polystyrene. I. Light-scattering studies on dilute solutions of linear polystyrenes. *J Chem Phys* 44:4550-64.
- Bhattacharjee N, Rani P, Biswas P. 2013. Capturing molten globule state of  $\alpha$ -lactalbumin through constant pH molecular dynamics simulations. *J Chemical Physics* 138:095101-8.
- Booth MR, Bottomly RC, Ellis JRS, Malloch G, Schofield JD, Timms MF. 1980. The effect of heat on gluten-physico-chemical properties and baking quality. *Annales Technologie Agricole* 1:399-408. Viite julkaisusta: Lagrain B, Brijs K, Veraverbeke WS, Delcour JA. 2005. The impact of heating and cooling on the physico-chemical properties of wheat gluten–water suspensions. *J Cereal Science* 42:327-333.
- Brandts JF, Hunt L. 1966. The thermodynamics of protein denaturation. III. The denaturation of ribonuclease in water and in aqueous urea and aqueous ethanol mixtures. *J Am Chem Soc* 89:4826-38.
- Burchard W. 1994. Light scattering techniques. Teoksessa: Ross-Murphy SB, toim. Physical techniques for the study of food biopolymers. 1p. Glasgow, Iso-Britannia: Blackie Academic & Professional. s 152-211.
- Bychkova VE, Berni R, Rossi GL, Kutysenko VP, Ptitsyn OB. 1992. Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH. *Biochemistry* 31:7566-71.
- Chakraborty K, Khan K. 1988. Biochemical and breadmaking properties of wheat protein components. II. Reconstitution baking studies of protein fractions from various isolation procedures. *Cereal Chemistry* 65:340-4.

Cho SY, Rhee C. 2012. Functional and Film-forming Properties of Fractionated Barley Proteins. *Food Science Biotechnology* 18:889-94.

Cohn EJ, Edsall JT. 1943. Density and apparent specific volume of proteins. Teoksessa: Cohn EJ, Edsall JT, toim. *Proteins, amino acids and peptides*. Princeton, USA: Van Nostrand-Reinhold. s 370-81. Viite julkaisusta: Zhao H, Brown P, Schuck P. 2011. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophysical Journal* 100:2309-17.

Creighton TE. 1984. *Proteins in solution*. Teoksessa: Creighton TE, toim. *Proteins: structures and molecular properties*. USA: W.H. Freeman and company. 515 s.

Cunningham P; Ogale AA; Dawson PL; Acton JC. 2000. Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *J Food Science* 65:668-71.

Cuq B, Gontard N, Guilbert S. 1998. Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production. *Cereal Chemistry* 75:1-9.

Danno G, Kanazawa K, Natake M. 1974. Extraction of wheat flour proteins with sodium dodecyl sulphate and their molecular weight distribution. *Agric Biol Chem* 38:1947-53.

Davy A, Sørensen, Svendsen I, Cameron-Mills V, Simpson DJ. 2000. Prediction of protein cleavage sites by the barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B based on the kinetics of synthetic peptide hydrolysis. *Plant Physiology* 122:137-45.

Debye P. 1947. Molecular-weight determination by light scattering. *J Phys Chem* 51:18-32.

Delcour JA, Hoskeney RC. 2010. *Proteins of Cereals*. Teoksessa: Delcour JA, Hoskeney RC, toim. *Principles of cereal science and technology*. 3 p. St.Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemistry, Inc. s 53-70.

Dickinson E, Ettelaie R, Kostakis T, Murray BS. 2004. Factors controlling the formation and stability of air bubbles stabilized by partially hydrophobic silica nanoparticles. *Langmuir* 20:8517-25.

Dill KA, Shortle D. 1991. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem* 60:795-825.

Dimitrov RA, Crichton RR. 1997. Self-consistent field approach to protein structure and stability. I: pH dependence of electrostatic contribution. *proteins: structure, function and genetics* 27:576-96.

Durchschlag H. 1986. Specific volumes of biological macromolecules and some other molecules of biological interest. Teoksessa: Hinz H-J, toim. *Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology*. Berlin, Germany: Springer. s 45-128. Viite julkaisusta: Zhao H, Brown P, Schuck P. 2011. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophysical Journal* 100:2309-17.

Eckert R, Berghofer E, Ciclitira PJ, Chirido F, Denery-Papini S, Ellis HJ, Ferranti P, Goodwin P, Immer U, Mamone G, Méndez E, Mothes T, Novalin S, Osman A, Rumbo M, Stern M, Thorell L, Whim A, Wieser H. 2006. Towards a new gliadin reference material— isolation and characterisation. *J Cereal Science* 43:331-41.

[EFSA] European Food Safety Authority. 2011. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to barley beta-glucans and lowering of blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 9:2471-84.

Field JM, Shewry PR, Mifflin BJ. 1983. Solubilisation and characterisation of wheat gluten proteins: correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. *J Sci Food Agric* 34: 370-7.

Giddings JC. 1966. New separation concept based on a coupling of concentration and flow non-uniformities. *Separation Sci* 1:123-5.

Goto Y, Hagihara Y, Hamada D, Hoshino M, Nishii I. 1993. Acid-Induced unfolding and refolding transitions of cytochrome c: A three-state mechanism in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. *Biochemistry* 32: 11878-85.

Gu YQ, Anderson OD, Londeorë CF, Kong X, Chibbar RN, Lazo GR. 2003. Structural organization of the barley D-hordein locus in comparison with its orthologous regions of wheat genomes. *Genome* 46:1084-97.

- Gupta RB, Khan K, MacRitchie F. 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *J Cereal Science* 18:23-41.
- Higson SPJ. 2004. *Separatory methods and chromatography*. Teoksessa: Higson SPJ, toim. Analytical chemistry. 1 p. Oxford, Iso-Britannia: Oxford University Press. s 208-45.
- Hirota-Nakaoka N, Goto Y. 1999. Alcohol-induced denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin: A close correlation to the alcohol-induced  $\alpha$ -helix formation of melittin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7:67-73.
- Huebner FR, Wall JS. 1976. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. *Cereal Chemistry* 53:258-69.
- Huebner FR, Bietz JA. 1985. Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 327:333-42.
- Håkansson A, Magnusson E, Bergenståhl B, Nilsson L. 2012. Hydrodynamic radius determination with asymmetrical flow field-flow fractionation using decaying cross-flows. Part I. A theoretical approach. *J Chromatography* 1253:120-6.
- Ingversen J, Kjøie B, Doll H. 1973. Induced seed protein content of barley endosperm. *Experientia* 29:1151-2.
- Irissin-Mangata J, Bauduin G, Boutevin B, Gontard N. 2001. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer J* 37:1533-41.
- [IUPAC] International Union of Pure and Applied Chemistry. 1996. Glossary of basic terms in polymer science. *Pure Applied Chemistry* 68:2287-2311.
- Janjarasskul T, Krochta JM. 2010. Edible packaging materials. *Annu Rev Food Sci Technol* 1:415-48.
- Kaukonen O, Sontag-Strohm T, Salovaara H, Lampi A-M, Sibakov J, Loponen J. 2011. Foaming of differently processed oats: Role of nonpolar lipids and tryptophanin proteins. *Cereal Chemistry* 88:239-44.
- Kreis M, Rahman S, Forde BG, Pywell J, Shewry PR, Mifflin BJ. 1983. Sub-families of hordein mRNA encoded at the *Hor2* locus of barley. *Molec Gen Genet* 191:194-200.
- Leeman M, Wahlund K-G, Wittgren B. 2006. Programmed cross flow asymmetrical flow field-flow fractionation for the size separation of pullulans and hydroxypropyl cellulose. *J Chromatography A* 1134:236-45.
- Linarès E, Larrè C, Lemeste M, Popineau Y. 2000. Emulsifying and Foaming Properties of Gluten Hydrolysates with an Increasing Degree of Hydrolysis: Role of Soluble and Insoluble Fractions. *Cereal Chemistry* 77:414-20.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.
- Ma CY, Harwalkar VR 1984. Chemical characterization and functionality assessment of oat protein fractions. *J Agric Food Chem* 32:144-9.
- MacRitchie F. 1973. Conversion of a weak flour to a strong one by increasing the proportion of its high molecular weight gluten protein. *J Sci Food Agric* 24:1325-9.
- MacRitchie F. 1978. Differences in baking quality between wheat flours. *J Food Technol* 13:187-94.
- MacRitchie F, Kasarda DD, Kuzmicky DD. Characterization of wheat protein fractions differing in contributions to breadmaking quality. *Cereal Chemistry* 68:122-30.
- McMaster TJ, Miles MJ, Shewry PR, Tatham AS. 2000. In situ surface adsorption of the protein C hordein using atomic force microscopy. *Langmuir* 16:1463-8.

- McMeekin TL, Groves ML, Hipp NJ. 1964. Refractive indices of amino acids, proteins, and related substances. Teoksessa: Stekol JA, toim. Amino acids and serum proteins. 1 p. Washington DC, USA: American Chemical Society. Viite julkaisusta: Zhao H, Brown P, Schuck P. 2011. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophysical Journal* 100:2309-17.
- Meredith OB, Wren JJ. 1966. Determination of molecular-weight distribution in wheat-flour proteins by extraction and gel filtration in a dissociating medium. *Cereal Chemistry* 43:169-86.
- Messaud FA, Sanderson RD, Runyon JR, Otte T, Pasch H, Williams KR. 2009. An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science* 34: 351-68.
- Mifflin BJ, Field JM, Shewry PR. 1983. Cereal storage proteins and their effect on technological properties. Teoksessa: Daussant J, Mossé J, Vaughan J, toim. Seed proteins. 1 p. Lontoo, Iso-Britannia: Academic Press Inc. s 255-319.
- Modig G, Nilsson L, Bergenståhl B, Wahlund K-G. 2006. Homogenization-induced degradation of hydrophobically modified starch determined by asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering. *Food Hydrocolloids* 20:1087-95.
- Muller P. 1994. Glossary of terms used in physical organic chemistry. *Pure & Appl Chem* 66(5):1077-184.
- Munck L, Karlson KE, Hagberg A, Eggum BO. 1970. Gene for improved nutritional value in barley seed protein. *Science* 168:985 -987.
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information. 2013. GenBank®. U.S. National Library of Medicine. Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.
- Nilsson L, Leeman M, Wahlund K-G, Bergenståhl B. 2006. Mechanical degradation and changes in conformation of hydrophobically modified starch. *Biomacromolecules* 7:2671-79.
- Nilsson L. 2013. Separation and characterization of food macromolecules using field-flow fractionation: A review. *Food Hydrocolloids* 30:1-11.
- Orth RA, Bushuk W. 1972. A comparative study of the proteins of wheats of diverse baking qualities. *Cereal Chemistry* 49:268-75.
- Osborne TB. 1924. The vegetable proteins. 2 p. Lontoo, Iso-Britannia: Longmans Green & Co. Viite julkaisusta: Tatham AS, Shewry PR. 2012. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *J Cereal Science* 55: 79-99.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4:2411-23.
- Pang F-M, Seng C-E, Teng T-T, Ibrahim MH. 2007. Densities and viscosities of aqueous solutions of 1-propanol and 2-propanol at temperatures from 293.15 K to 333.15 K. *J Molecular Liquids* 136:71-8.
- Postnova Analytics. AF2000 MT operation manual. 2.p. Landsberg am Lech, Saksa: Postnova Analytics GmbH.
- Rechinger KB, Simpson DJ, Svendsen I, Cameron-Mills V. 1993. A role for  $\gamma_3$  hordein in the transport and targeting of prolamins polypeptides to the vacuole of developing barley endosperm. *Plant J* 4:841-53.
- Rhodes AP, Gill AA. 1980. Fractionation and amino acid analysis of the salt-soluble protein fractions of normal and high-lysine barleys. *J Sci Food Agric* 31:467-73.
- Riekkola M-L, Hyötyläinen T. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2.p. Helsinki: Yliopistopaino. s 343.
- Romero CM, Lozano JM, Sancho J, Giraldo GI. 2007. Thermal stability of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of aqueous solution of alcohols and polyols. *Int J Biological Macromolecules* 5:423-8.

- Savage AWJ, Saletti R, Foti R, Foti S, Shewry PR, Tatham AS. 2002. Determination of molecular weights of C hordeins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Cereal Chemistry* 79:768-70.
- Sheehan MC, Skerritt JH. 1997. Identification and characterisation of beer polypeptides derived from barley hordeins. *J Institute Brewing* 103:297-306.
- Shewry PR, Hill JM, Pratt HM, Leggatt MM, Mifflin BJ. 1978. An Evaluation of Techniques for the Extraction of Hordein and Glutelin from Barley Seed and a Comparison of the Protein Composition of Bomi and RisØ 1508. *J Experimental Botany* 29:677-92.
- Shewry PR, Kreis M, Parmar S, Lew EJ-L, Kasarda DD. 1985. Identification of  $\gamma$ -type hordeins in barley. *Federation European Biochemical Societies* 190:61-4.
- Shewry PR, Tatham AS. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Review article. *Biochem J* 267:1-12.
- Shewry, PR. 1993. Barley seed proteins. Teoksessa: MacGregor AW, Bhatti BS, toim. *Barley: Chemistry and technology*. St.Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemistry, Inc. s 131-97.
- Shewry PR, Tatham AS. 1999. The characteristics, structures and evolutionary relationships of prolamins. Teoksessa: Shewry PR, Casey R, toim. *Seed proteins*. Alankomaat: Kluwer Academic Publishers. s 11-33.
- Shewry PR, Tatham AS, Halford NG. 1999. The prolamins of the Triticeae. The characteristics, structures and evolutionary relationships of prolamins. Teoksessa: Shewry PR, Casey R, toim. *Seed proteins*. Alankomaat: Kluwer Academic Publishers. s 35-78.
- Shewry PR, Halford NG. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Experimental Botany* 53: 947-58.
- Siebert KJ, Troukhanova NV, Lynn Y. 1996. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *J Agric Food Chem* 44:80-5.
- Singh NK, Donovan GR, Batey IL, MacRitchie F. 1990. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chemistry* 67:150-61.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85.
- Sothornvit R; Olsen CW; McHugh TH; Krochta JM. 2007. Tensile properties of compression-molded whey protein sheets: determination of molding condition and glycerol-content effects and comparison with solution-cast films. *J Food Eng* 78:855-60.
- Steiner E, Gastl M, Becker T. 2011. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. *Eur Food Res Technol* 232:191-204.
- Stevenson SG, You S, Izydorczyk MS, Preston KR. 2003. Characterization of polymeric wheat proteins by flow field-flow fractionation / MALLS. *J Liquid Chromatography & Related Technologies* 26: 2771-81.
- Taskinen T. 2000. Polysakkaridien moolimassan määrittäminen [pro gradu -tutkielma]. URN:NBN:fi-fe20001120. Helsinki: Helsingin yliopisto, Kemian laitos. 121 s.
- Tatham AS, Marsh MN, Wieser H, Shewry PR. 1990. Conformational studies of peptides corresponding to the coeliac-activating regions of wheat  $\alpha$ -gliadin. *Biochem J* 270:313-8.
- Tatham AS, Shewry PR. 1994. Mini review: The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *J Cereal Science* 22: 1-16.
- Tatham AS, Shewry PR. 2012. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *J Cereal Science* 55: 79-99.

- Theisen A, Johann C, Deacon MP, Harding SE. 2000. Refractive increment data-book. Nottingham, Iso-Britannia: Nottingham University Press. 64 s.
- Ulmius M, Önning G, Nilsson L. 2012. Solution behaviour of barley  $\beta$ -glucan as studied with asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocolloids* 26:175-80.
- Uthayakumaran S, Tömösközi S, Tatham AS, Savage AWJ, Gianibelli MC, Stoddard FL, Bekes F. 2001. Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. *Cereal Chemistry* 78:138-41.
- Uversky VN. 2002. What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 269:2-12.
- Wahlund KG, Nilsson L. 2012. Flow FFF - Basics and key applications. Teoksessa: Williams SKR, Caldwell K, toim. Field-flow fractionation in biopolymer analysis. Wien, Itävalta: Springer Verlag. s 1-21.
- Wang C, Tian Z, Chen L, Temelli F, Liu H, Wang Y. 2010. Functionality of barley proteins extracted and fractionated by alkaline and alcohol methods. *Cereal Chemistry* 87:597-606.
- Wierenga PA, Gruppen H. 2010. New views on foams from protein solutions. *Colloid Interface Science* 15:365-73.
- Wieser H, Köhler P. 2008. The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chemistry* 85:1-13.
- Wright PE, Dyson HJ. 1999. Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293:321-31.
- Wu YV, Sexson KR, Sanderson JE. 1979. Barley protein concentrate from high-protein, high-lysine varieties. *J Food Science* 44:1580-3.
- Xia Y, Wang Y, Chen L. 2011. Preparation and characterization of films using barley and oat  $\beta$ -glucan extracts. *J Agricultural Food Chemistry* 59:13221-9.
- Yalçın E, Çelik S. 2007. Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chemistry* 104:1641-7.
- Yalçın E, Çelik S, İbanoğlu E. 2008. Foaming properties of barley protein isolates and hydrolysates. *Eur Food Res Technol* 226:967-74.
- Yan Q, Zhiguo D, Youguang MA, Peisheng MA, Shuqian X. 2010. Viscosities of pure water, acetic acid + water, and p-xylene + acetic acid + water at different temperature and pressure. 2010. *Chinese J Chemical Engineering* 18:446-54.
- Yohannes G, Jussila M, Hartonen K, Riekkola M-L. 2011. Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *J Chromatography A* 1218:4104-16.
- Yokoyama, W., Renner-Nantz, J. J., and Shoemaker, C. F. 1998. Starch molecular mass and size by size-exclusion chromatography in DMSOLiBr coupled with multiple angle laser light scattering. *Cereal Chemistry*. 75:530-5.
- You S, Stevenson SG, Izydorczyk MS, Preston KR. 2002. Separation and characterization of barley starch polymers by a flow field-flow fractionation Technique in combination with multiangle light scattering and differential refractive index detection. *Cereal Chemistry* 79:624-30.
- Zhang H, Mittal G. 2010. Biodegradable protein-based films from plant resources: a review. *Environmental Progress Sustainable Energy* 29:203-220.
- Zhao J, Tian Z, Chen L. 2011. Effects of deamidation on aggregation and emulsifying properties of barley glutelin. *Food Chem* 128:1029-36.
- Zimm BH. 1948. Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering; preliminary results on polystyrene solutions. *J Chem Phys* 16:1099-117.

## LIITTEET

### Liite 1. Hordeiinien aminohapposekvenssit

Aminohapposekvensseihin on merkitty lihavoituna translaation aloituskohta.

#### D-hordeiini [*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*]

Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAA11642.1>.

**MAKRLVLFVAVIVALVALTTAEREINGN**NIFLDSRSRQLQCERELQESSLEACRR  
 VVDQQLVGQLPWSTGLQMCCQQLRDVSPECRPVALSQQVVRQYEQQTEVPSKG  
 GSFYPGGTAPPLQQGGWWGTSVKWYYPDQTSSQQSWQGGQGYHQSVTSSQQPG  
 QGQQGSYPGSTFPQQPGQGQQPGQRQPWSYPSATFPQQPGQGQQGGYYPGATS  
 LLQPGQGQQGPYQSATSPQQPGQGQQQETYPPIATSPHQPGWQQPGQGQQGFY  
 PSVTSPQQSGQGQQGYPSTTSPQQSGQGQQLGQGQQPGQGQQGYPSATFPQQPGQ  
 WQQGSYPSTTSPQQSGQGQQGYNPSGTSTQQPGQVQQLGQGQQGYYPPIATSPQQP  
 GQGQQLGQGQQPGHGQQLVQGQQQGQGQQGHYPSMTSPHQTGGQKGYPSAI  
 SPQQSGQGQQGYQPSGASSQGSVQGACQHSTSSPQQQAQGCQASSPKQGLGLSLY  
 YPSGAYTQQKPGQGYNPGGTSPLHQGGGGFGGGLTTEQPQGGKQPFHCQQTTVS  
 PHQGQQTTVSPHQGQQTTVSPHQGQQTTVSPHQGQQTTVSPHQGQQTTVSPHQG  
 QQTTVSPHPGQQTTVSPHQGQQTTVSPHQGQQTTVSPHQGQQPGEQPCGFPGQQT  
 TVSLHHGQQSNELYYGSPYHVSVEQPSASLKVAKAQQLAQLPAMCRLEGGGGL  
 LASQ

#### B<sub>1</sub>-hordeiini

Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABB82614.1>.

**MKTFLIFALLAIVATSTIA**QQQPYPQQPQPFQPPQPIQQPQPFQPPQPYPPQPPQPF  
 PQQPIQQPQPYPPQPPQPFQPPQPIQQPQPYPPQPPQPFPLQPFPSQQPFQPPFFWQQQ  
 PVLSQQQPCTPQQTPLPQGQQDQMLVQVQIPFVHPSILQQLNPKVFLQQQCSPVA  
 MSQRIARSQMLQQSSCYVLQQCCQQLPQIPEQFRHEAVRAIVYSIVLQEPPQQLV  
 QGVSQPQQSQLHQVGCFSFQQPQPQQGQQQQVQPSVFLQPLQLAQLEATASIAL  
 RTLPMMSVNVNPFYRILPFGIDTRVGV

**B3-hordeiini**

Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFM77744.1>.

**MKTFLIFALLAIVATSTIA**QQQPYPQQPQPFQQQPIPQQPQPFQQQPYPQQPQPF  
 PQQPIPQQPQYPQQPQPFQQQPIPQQPQYPQQPQPFPLQPFPSQQPFPQQPPFWQQ  
 QPVLSSQQPCTQEQTPLLQEQDQMLLQVQIPFVHPSILQQLNPCKVFLQQQCSPV  
 AMSQRIARSQMLQSSCYVLQQQCCQQLPQIPEQFRHEAVRAIVYSIVLQEQSLQL  
 VQGVSQPQQSSQQQVVGQCSFQQPQPQQGQQQQVQPSVLLQPHQIAQLEATTSIA  
 LRTLPTMCSVNVPLYRIVPLAIDTRVGV

 **$\gamma_1$ -hordeiini**

Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFM77737.1>.

**MKILILTILAMATTFATSEM**QVNPSVQVQPTQQQPYPESQQPFISQSQQQFPQPQ  
 QPFPQQPQQPFPQSQQQCLQQPQHQPQPTQQFPQRPLLPFTHPFLTFPDQLLPQP  
 HQSFPQPPQSYPQPPLQPFQPPQQKYPEQPQQPFPWQQPTIQLYLQQQLNPCKEFL  
 LQQCRPVSLLSYLWSKIVQQSSCRMVQQCCCLQLAQIPEQYKCTAIDSIVHAIFMQ  
 QGQRQGVQIVQQQPQPQQVQCVLVQGGQVVQPQQLAQMEAIRTLVLQSVPSM  
 CNFNVPPNCST IKAPFVGVVVTGVGGQ

 **$\gamma_2$ -hordeiini (osittainen sekvenssi)**

Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAE45747.1>.

**MQVNPSVQVQPTQQQPYPES**QQPFISQSQQQFPQPQQPFPQRPLLPFTHPFLTFPD  
 QLLPQPPHQSFQPPQSYPQPPLQPFQPPQQKYPEQPQQPFPWQQPTIQLYLQQQL  
 NPYKEFLLQQCRPVSLLSYLWSKIVQQSSCRMVQQCCCLQLAQIPEQYKCTAIDSI  
 VHAIFMQQGQRQGVQIVQQQPQPQQVQCVLVQGGQVVQPQQLAQMEAIRTLV  
 LQSVPSMCNFNVPPNCSTIKAPFVGVVVTGVGGQ



**$\gamma_3$ -hordeiini**

Saatavilla: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFM77739.1>.

**MKIFLLESLLGVATAITTTT**MQFNPSGLELERPQQLFPQWQPLPQQPPFLQQEPEQ  
 PYPQQQPLPQQQPFQQPQLPHQHQPQQLPQQQFPQQMPLQPQQQPQFPQQKPF  
 GQYQQPLTQQPYPQQQPLAQQQPSIEEQHQLNLCKEFLQCTLDEKVPLLQSVIS  
 FLRPHISQQNSCQLKRQQCCQQLANINEQSRCPAIQTIVHAIVMQQQQQQVQQQV  
 DHGFVQSQLQQLGQGMPIQLQQQPGQAFVLPQQQAQFKVVGSLVIQTLPMLCNV  
 HVPPYCSFPGSMATGSGGQ

**C-hordeiini (Tatham ja Shewry 2012)**

ARQLNPSSQELQSPQQSYLQQPYPNPYLQQPFPVQQPFHTPQQYFPYLPEELFPQ  
 YOIPTPLPQQQPFQQPQQPLPRPQQPFPWQPQQPFPQPQQPIPQQPQQPFPQQPQQI  
 ISQQPQQPFPQPQQPFPWQPQQPFPQPQQPFLQPQQPFPWQPQQPFPQPQQPIGQQ  
 PQQPQQPQQPFLQPQQPFPQQPQQPFPQQPQQIISQQPQQSYPVQPQQPFPQPQP  
 PQQRPQQASPLQPQQPFPQQSWQIIPQQPFLQPQQPFPQQPQQPLQPQQPFRQQA  
 ELIIPQQPQQPFLQPHQPYPQQTIWSMV

## Liite 2. Hordeiinien ekstinktiokertoimet

Hordeiinien suhteellisten osuuksien määrittämisessä UVIBandMap-ohjelmalla käytettiin kuvan 12 geelejä. Hordeiinien laskennalliset ekstinktiokertoimet:

Hordeiini	Suhteellinen osuus (%)	$\epsilon$ (cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> (g/mol)
D	4,7	88460	75105
C	34,8	29420	34496
B	57,5	39420	37003
$\gamma$	3,0	16825	34256

Hordeiinien laskennallinen ekstinktiokerroin:

$$\epsilon_{hordeiinit} = (88460 * 0,05) + (29420 * 0,57) + (39420 * 0,35) + (16825 * 0,03) = 35286,8867 \frac{l}{cm * mol}$$

Hordeiinien moolimassa:

$$M_w(hordeiinit) = (75105 * 0,04686192) + (34496 * 0,57476986) + (37003 * 0,34811715) + (34256 * 0,03025105) = 37264,48446 \frac{g}{mol}$$

Yksikkömuutos AF2000-ohjelmalle sopivaksi:

$$\epsilon = \frac{35286,8867 \frac{l}{cm * mol}}{37264,48446 \frac{g}{mol}} = 0,9469307629326586 \frac{ml}{mg * cm}$$

### Hordeiinien kokeellinen ekstinktiokerroin

Spektrofotometrisesti 280 nm:n aallonpituusalueella mitatun ohrautteen ekstinktiokertoimen ja konsentraation keskiarvo ja keskihajonta:

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ekstinktiokerroin	14	1,287	1,436	1,34093	,041659
Konsentraatio	14	7,65	9,21	8,4589	,33213
Valid N (listwise)	14				

Spektrofotometrisesti 280 nm:n aallonpituusalueella mitatun ylitteen ekstinktiokertoimen ja konsentraation keskiarvo ja keskihajonta:

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ekstinktiokerroin	2	1,793	1,889	1,84100	,067882
Konsentraatio	2	27,68	27,68	27,6800	,00000
Valid N (listwise)	2				

Spektrofotometrisesti 280 nm:n aallonpituusalueella mitatun alitteen ekstinktiokertoimen ja konsentraation keskiarvo ja keskihajonta:

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ekstinktiokerroin	2	1,575	1,776	1,67550	,142128
Konsentraatio	2	33,00	33,00	33,0025	,00000
Valid N (listwise)	2				

Spektrofotometrisesti 280 nm:n aallonpituusalueella mitatun gliadinin ekstinktiokertoimen ja konsentraation keskiarvo ja keskihajonta:

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ekstinktiokerroin	4	,608	,655	,63183	,027076
Konsentraatio	4	1,61	1,61	1,6100	,00000
Valid N (listwise)	4				

### Liite 3. Hordeiinien kokojakaumatuloksien tilastollisen käsittelyn tulosteet

Shapiro-Wilkin testillä testattiin hordeiinien moolimassojen analyysituloksien normaalisuutta. Testin mukaan piikki 1 ja saanto (mges\_μg) olisivat normaalisti jakautuneita 1 %:n riskitasolla ( $p \geq 0,01$ ):

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Piikki_1	,205	12	,176	,877	12	,080
Piikki_2	,330	12	,001	,497	12	,000
Piikki_3	,210	12	,152	,811	12	,013
Piikki_4	,504	12	,000	,346	12	,000
Piikki_5	,253	12	,033	,853	12	,040
mges_ug	,192	12	,200*	,916	12	,256

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Willisin testillä testattiin käsittelyn vaikutusta moolimassojen analyysituloksiin 1 %:n riskitasolla. Testin mukaan käsittelyllä ei ollut tilastollisesti tarkasteltuna merkitystä analyysituloksiin ( $p \geq 0,01$ ):

	Piikki_1	Piikki_2	Piikki_3	Piikki_4	Piikki_5
Chi-Square	9,051	6,077	7,308	4,333	9,154
df	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	,029	,108	,063	,228	,027

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Uute

Kruskal-Willisin testillä testattiin vaikuttiko päivä tilastollisesti moolimassojen analyysituloksiin. Riskitasolla 1 %:a päivällä oli tilastollisesti merkitystä ( $p \leq 0,01$ ) piikkien 1 ja 5 analyysituloksiin:

	Piikki_1	Piikki_2	Piikki_3	Piikki_4	Piikki_5
Chi-Square	8,308	5,026	,641	,231	6,564
df	1	1	1	1	1
Asymp. Sig.	,004	,025	,423	,631	,010

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: PVM\_Num

Kruskal-Willisin testillä testattiin käsittelyn vaikutusta saantoon 1 %:n riskitasolla. Testin mukaan käsittelyllä ei ollut tilastollisesti tarkasteltuna vaikutusta saantoon ( $p \geq 0,01$ ):

	mges_ug
Chi-Square	5,974
df	3
Asymp. Sig.	,113

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Uute