

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

EKT-1582

OHRAN HORDEIINIEN UUTTUMINEN JA  
METALLIKATALYSOITU OKSIDAATIO

Elisa Arte

Helsinki 2012



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Elisa Arte			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Ohran hordeiniinien uuttuminen ja metallikatalysoitu oksidaatio			
Oppiaine /Läroämne – Subject Elintarviketeknologia (viljateknologia)			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year Marraskuu 2012	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 65	
Tiivistelmä/Referat – Abstract Tutkielman kirjallisuusosassa perehdyttiin ohran hordeiniinien kemialliseen rakenteeseen ja hordeiniinien erottamiseen. Lisäksi perehdyttiin proteiinien ja aminohappojen metallikatalysoituun oksidaatioon. Kokeellisen työn tavoitteena oli ensinnäkin kehittää ohran isoimpien hordeiniiryhmien, B- ja C-hordeiniinien, yksinkertainen ja tehokas erotusmenetelmä. Tutkimuksen toisena tavoitteena oli selvittää, miten metallikatalysoitu oksidaatio muokkaa erotettuja hordeiineja.  Ohranäytteenä työssä käytettiin suomalaista Jorma-ohraa sen proteiinien hyvän uuttumisen takia ja koska sitä ei tarvinnut kuoria hiomalla ennen jauhamista. Jauhetusta ohrasta uutettiin aluksi vesi- ja suolaliukoinen materiaali pois, minkä jälkeen se pakkaskuivattiin. Kaksiulotteisissa elektroforeesissa C-hordeiniinien isoelektristen pisteiden alueeksi määritettiin 5–7. Hordeiniiryhmien erottamista toisistaan tutkittiin geelisuodatuksella, ammoniumsulfaattisaostuksella ja alkoholiuutoilla. Eri uuttolämpötilat, pH:t tai lämpökäsittelyt eivät kuitenkaan parantaneet B- ja C-hordeiniinien erottamista. Paras C-hordeiniinien erotus saatiin uuttamalla 55-prosenttisella 2-propanolilla 50 °C:ssa, joskin mukana oli myös B-hordeiineja, ja tätä uuttomenetelmää päätettiin käyttää myöhemmissä tutkimuksissa.  Hordeiniinien muokkautumista metallikatalysoidulla oksidaatiolla tutkittiin käyttämällä kuparia tai rautaa katalyyttinä ja vetyperoksidia tai askorbiinihappoa oksidanttina. Reaktiot analysoitiin SDS-PAGE:lla ja SE-HPLC:llä. Hordeiineja pilkkoutui tehokkaimmin reaktiossa, jossa metallina oli kupari ja oksidanttina vetyperoksidi. Tässä reaktiossa 24 tunnin inkuboinnin jälkeen suurten proteiinien määrä oli pienentynyt merkittävästi. SE-HPLC:n tuloksista havaittiin myös B-hordeiniinien olevan lähes täysin aggregoituneina. Nämä aggregoituneet B-hordeiinit pilkkoutuivat oksidaatiossa jo kahden tunnin inkuboinnin jälkeen.  Tulosten perusteella ohran suurimpien hordeiniiryhmien, B- ja C-hordeiniinien, erottaminen oli haasteellista. Ohran hordeiinit pilkkoutuivat tehokkaasti kuparikatalysoidussa oksidaatiossa vetyperoksidilla.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Ohra, hordeiini, prolamiini, metallikatalysoitu oksidaatio, SDS-PAGE, SE-HPLC			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT-sarja 1582			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution – Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä/Författare – Author Elisa Arte			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Extraction and metal-catalysed oxidation of barely hordeins			
Oppiaine / Läroämne – Subject Food Technology (Cereal Technology)			
Työn laji/Arbetets art – Level M. Sc. Thesis		Aika/Datum – Month and year November 2012	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 65
<p>The literature review focused on the composition of the barley hordeins and the known extraction methods. The metal-catalysed oxidation of proteins and amino acids was also reviewed. The aim of the experimental part was to develop a simple selective extraction method for the B and C hordeins and to study how metal-catalysed oxidation affects these hordeins.</p> <p>Hulles barley cf. Jorma was selected as test material since milling of this cultivar was simple with a Brabender Junior mill. From the milled barley, water and salt-soluble material were removed and the rest was freeze-dried. The freeze-dried sample flour was studied by gel separation, precipitation and extraction with aqueous alcohols. The aqueous alcohol extracted the C hordeins completely although there was some B hordeins present. Two-dimensional electrophoresis showed that the isoelectric point of C hordeins was between the pH 5–7. Aqueous alcohols, extraction temperatures and pH were studied for hordein extraction. None of the studied methods improved the extraction of B and C hordeins. The hordein sample used in further experiments was extracted with 55% 2-propanol at 50 °C.</p> <p>The metal-catalysed oxidation of the extracted hordeins was studied by using copper or iron as a catalyst and hydrogen peroxide or ascorbic acid as an oxidant. The reactions were analysed with SDS-PAGE and SE-HPLC. The results showed that the most effective reaction was with copper and hydrogen peroxide where the B and C hordeins were degraded efficiently after 24 hours of incubation. The results from SE-HPLC showed aggregated B hordeins in the extracted sample, which were partly degraded after two hours of incubation with hydrogen peroxide and copper.</p> <p>The results of this study indicated that the biggest groups of hordeins, the B and C hordeins, cannot be selectively separated with extraction. The barley hordeins efficiently degraded in the metal-catalysed oxidation with hydrogen peroxide and copper.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Barley, prolamins, hordeins, metal-catalysed oxidation, SDS-PAGE, SE-HPLC			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited The Digital Repository of University of Helsinki, Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT-series 1582			

## ESIPUHE

Maisterin tutkielma tehtiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen viljaryhmässä. Tutkimusaiheen esitti yliopistonlehtori Tuula Sontag-Strohm, joka toimi myös työn ohjaajana. Tutkielman valvojana toimi professori Hannu Salovaara. Heidän lisäksi ohjausryhmään kuuluivat FT Päivi Kanerva ja ETM Xin Huang. Työn aihe liittyi viljateknologian proteiinien tutkimukseen.

Kiitän lämpimästi kaikkia heitä, jotka auttoivat työni edetessä. Suuri kiitos työni ohjaajalle yliopistonlehtori Tuula Sontag-Strohmille mielenkiintoisesta aiheesta ja opastuksesta. Kiitos myös tutkielman valvojalle professori Hannu Salovaaralle. Lisäksi kiitän FT Päivi Kanervaa ja ETM Xin Huangia arvokkaista neuvoista. Laboratorioanalyysien osalta kiitos myös avusta tutkimusteknikoille, Outi Brinckille ja Miikka Olinille.

Lopuksi iso kiitos lähipiirilleni ja erityisesti vanhemmilleni tuesta ja kannustuksesta opiskelujeni aikana.

Helsingissä 15.11.2012

Elisa Arte

# SISÄLLYSLUETTELO

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

## ESIPUHE

I	JOHDANTO	7
II	KIRJALLISUUSTUTKIMUS	9
1	Ohra ja sen proteiinit	9
2	Ohran hordeiinit	10
2.1	C-hordeiinit	11
2.2	B- ja $\gamma$ -hordeiinit	12
2.3	D-hordeiinit	15
3	Proteiinien oksidaatio metallien avulla	16
3.1	Oksidaatioreaktiot	16
3.2	Proteiinien modifikaatiot	18
3.2.1	Proteiinien metallikatalysoitu oksidaatio	18
3.2.2	Oksidaatioreaktio proteiininirugossa ja proteiinien fragmentointi	20
3.2.3	Aminohappojen oksidaatio	21
4	Menetelmät hordeiinien tutkimiseen	25
4.1	Hordeiinien uuttuminen	25
4.2	Proteiinien erotus geelisuodatuksella	28
4.3	Aggregoituvien proteiinien uutto	29
4.4	Hordeiinien kaksikulotteinen elektroforeesi	30
4.5	Proteiinien metallikatalysoidun oksidaation tutkiminen	31
III	KOKEELLINEN TUTKIMUS	35
5	Materiaalit	35
6	Menetelmät	35
6.1	Ohrajauhon esikäsittely	35
6.2	SDS-PAGE	36
6.3	Hordeiinien geelisuodatus	36
6.4	Saostaminen ammoniumsulfaatilla	37
6.5	Erottaminen uuttamalla	37
6.5.1	Kolmen ohralajikkeen uuttaminen	37
6.5.2	Hordeiinien uuttaminen eri alkoholeilla ja lämpötiloissa	38
6.5.3	Hordeiinien uuttaminen lämpökäsittelyillä ja eri pH:issa	38
6.6	Hordeiinien isoelektristen pisteiden määrittäminen	39

6.7	Hordeiinien hapetuskokeet	41
6.7.1	Uutettujen hordeiinien esikäsitteleminen	41
6.7.2	Hordeiinien hapettaminen	41
6.7.3	Oksidaatioreaktioiden analysoiminen kokoekskluusiokromatografilla	42
7	Tulokset	44
7.1	Geelisuodatus ja saostuminen	44
7.2	Hordeiinien uuttuvuus	45
7.2.1	Ohralajikkeet	45
7.2.2	Uuttolämpötila ja alkoholi	46
7.2.3	Hordeiinien isoelektriset pisteet ja pH	47
7.3	Hordeiinien hapettuminen	49
7.3.1	Hordeiinien pilkkoutuminen hapetuksessa	49
7.3.2	Hordeiinien hapetuksen analysointi kokoekskluusiokromatografilla	52
8	Pohdinta	57
	IV PÄÄTELMÄT	61
	LÄHDELUETTELO	62
	LIITE 1	65

## I JOHDANTO

Ohra on viljellyin viljakasvi Suomessa. Sitä käytetään pääosin rehuna, mallasohrana ja etanolintuotannon raaka-aineena mutta myös ihmisravintona. Vehnä, ruis ja ohra sisältävät alkoholiliukoisia varastoproteiineja, prolamiineja. Ohran prolamiinit, joita kutsutaan hordeiineiksi, jaetaan neljään eri ryhmään mm. koon ja rakenteen mukaan. Suurin osa hordeiineista, noin 80–90 %, luokitellaan C- ja B-hordeiineiksi. Pienemmän osan hordeiineista muodostavat D- ja  $\gamma$ -hordeiinit. Koska ohra on diploidinen, sen proteiinien geneettinen variaatio lajien välillä on pienempää kuin esimerkiksi heksaploidisella vehnällä. (Shewry 1993).

Ohran hordeiineista on tehty paljon tieteellistä tutkimusta, joka on keskittynyt hordeiinien määrään, laatuun, rakenteeseen tai lajien välisiin geneettisiin eroihin. Lisäksi ohraa on tutkittu paljon mallastuksen teknologian näkökulmasta mutta vain vähän keliakian kannalta.

Ohran prolamiineista noin 10–20 % on monomeeristä C-hordeiinia. Sen rakenne on ainutlaatuinen viljojen proteiineista, sillä se koostuu lähes täysin toistuvasta aminohapposarjasta, jossa on runsaasti proliinia ja glutamiinia (Brett 2002). Koska tässä proteiinissa ei ole lähes lainkaan rikkiä sisältäviä aminohappoja, se ei muodosta proteiinin sisäisiä eikä proteiinin välisiä kovalenttisia sidoksia.

Kuten vehnän prolamiinit, myös ohran prolamiinit voivat aiheuttaa keliakiaan liittyvän limakalvovaurion (Mäki 2006). Keliakiapotilailla prolamiinit aiheuttavat ohutsuolen limakalvolla tulehdusreaktion, johon liittyy suolinukkarakenteen häviäminen. Keliakiapotilaiden päähoitomuotona on elinikäinen gluteenin ja siis myös ohran poistaminen ruokavaliosta.

Gluteenittomien ruokaleipien ja leivonnaisten resepteissä käytetään usein eri tärkkelyksiä. Tällä hetkellä tuotteissa käytetään mm. teollisesti gluteenittomaksi puhdistettua vehnätärkkelystä, kauraa tai maissia (Keliakialiitto 2012). Ohratärkkelys voisi olla osana keliakiaa sairastavan ruokavaliota, mikäli sen gluteenipitoisuus saataisiin alle EU:n asettaman rajan vähägluteeniselle tuotteelle. Ohratärkkelys sisältää kuitenkin R5-ELISA:lla (enzyme linked immunosorbent assay) mitattuna gluteenia 320 mg/kg (Kanerva 2012), joka on enemmän kuin sallittu enimmäisraja merkinnälle ”erittäin vähägluteeninen

tuote” (100 mg/ kg) (EC 2009). Tästä johtuen ohratärkkelystä ei voi olla osana keliakiapotilaiden ruokavaliossa.

Ohratärkkelys voitaisiin saada gluteenittomaksi pilkkomalla sen sisältämät hordeiinit. Happiradikaalien tiedetään pilkkovan biomolekyylejä, kun metalleja on läsnä. Metallikatalysoidut oksidaatioreaktiot ovat olleet tehokkaita pilkkomaan mm. kollageenia (Uchida ym. 1992). Lisäksi on tutkittu oligopeptidien ja malli-polymeerien oksidaatiota, jotka ovat osoittaneet oksidaation olevan tehokas pilkkomaan paljon proliinia sisältäviä proteiineja pieniksi peptideiksi (mm. Kato ym. 1992 ja Uchida ym. 1990). Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella on tehty tutkimusta vehnän prolamiinien pilkkoutumisesta metallikatalysoidussa oksidaatiossa. Tutkimuksissa vehnän prolamiinien määrä oli saatu alenemaan metallikatalysoidun oksidaation vaikutuksesta (Huang, 2012).

Tämän maisteritutkielman kokeellisen osan tavoitteena oli ensinnäkin kehittää yksinkertainen ja tehokas menetelmä, jonka avulla B- ja C-hordeiinit voidaan erottaa toisistaan. Tutkimuksen toisena tavoitteena oli selvittää, miten metallikatalysoitu oksidaatio muokkaa erotettuja hordeiineja.

## II KIRJALLISUUSTUTKIMUS

### 1 Ohra ja sen proteiinit

Ohra kuuluu heinäkasvien *Poaceae*-heimoon, vehnän ja rukiin kanssa *Triticeae*-sukuryhmään ja sukuun *Hordeum* (Nilan ja Ullrich 1993). Ohra on erottunut omaksi lajikkeeksi *Triticeae*-sukuryhmästä ensin ja on siten geneettisesti kaukaisempaa sukua vehnälle kuin ruis, joka erottui vehnästä myöhemmin. Nykyinen ohra (*Hordeum vulgare* sp. *spontaneum*) on jalostettu 30–40 000 vuotta sitten kasvaneesta villistä ohrasta (Hockett 2000). Ohra on pääasiassa diploidi mutta myös tetraploidisia ja heksaploidisia ohralajikkeita esiintyy (Nilan ja Ullrich 1993). Ohran tähkässä on pitkät vihneet ja tähkylä voi olla joko kaksitahoinen (*H. vulgare spontaneum*) tai monitahoinen (esim. *H. vulgare agriocrithon*). Monitahoinen ohra on ollut yleisempi viljellyistä ohrista mutta 1700-luvulla kaksitahoisena ohran viljely yleistyi ensin Lounais-Suomessa ja myöhemmin, 1900-luvun alussa, Etelä-Suomessa (MTT 2009).

Ohran jyvässä on proteiinia noin 11 % jyvän kuiva-aineesta (Belitz ym. 2009). Ohran proteiinit voidaan jaotella liukoisuutensa mukaan albumiineihin, globuliineihin, prolamiineihin ja gluteliineihin (Osborne 1907). Albumiinit ovat vesiliukoisia ja ne koaguloituvat lämmön vaikutuksesta (Shewry ja Casey 1999). Globuliinit liukenevat laimeisiin suolaliuoksiin. Prolamiinit ovat liukoisia 70-prosenttiseen etanoliin ja gluteliinit liukenevat heikkoihin happoihin tai emäksiin. Prolamiinit ovat päävarastoproteiineja vehnässä, rukiissa ja ohrassa. Ohran prolamiineja kutsutaan hordeiineiksi. Ohran proteiineista on noin 13 % albumiineja, 12 % globuliineja, 52 % hordeiineja ja 23 % gluteliineja (Lookhart ja Bean 2000). Proteiiniryhmien pitoisuudet ja koostumukset voivat kuitenkin hieman vaihdella ohran lajikkeiden välillä ja kasvuolosuhteiden vaihdellessa.

Osbornen (1907) luokittelu on kuitenkin karkea, koska esimerkiksi jotkin proteiinit eivät sovi mihinkään edellä mainituista ryhmistä: vehnässä, rukiissa ja ohrassa on glykoproteiineja, jotka liukenevat veteen mutta eivät koaguloitu lämmön vaikutuksesta. Osbornen mukaan voidaan siis jaotella proteiineja mutta tarkempaan tunnistukseen tarvitaan muita analyttisiä menetelmiä.

## 2 Ohran hordeiinit

Ohran proteiineista 35–55 % on hordeiineja riippuen jyvän tyypipitoisuudesta (Shewry 1993). Hordeiinit voidaan jakaa neljään eri ryhmään, joista pääryhmät ovat B- ja C-hordeiinit, sekä pienemmät ryhmät D- ja  $\gamma$ -hordeiinit. Hordeiineista 70–80 % koostuu B-hordeiineista ja 10–20 % C-hordeiineista. Loppuosa on D- (2–4 %) ja  $\gamma$ -hordeiineja (ei määritetty).

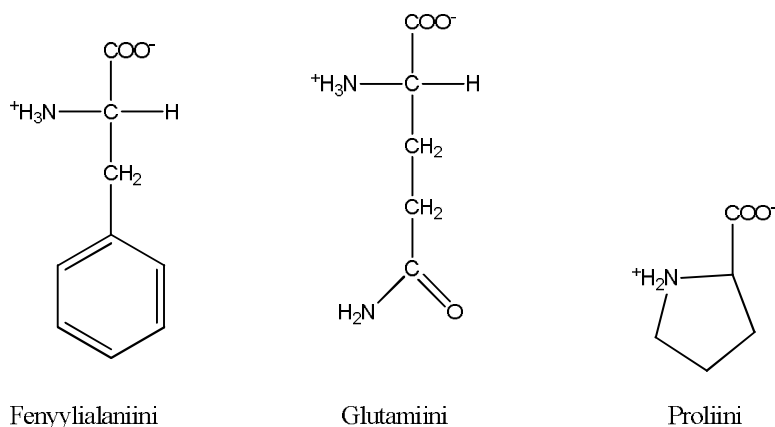
Hordeiinit voidaan luokitella myös rikkipitoisuuden mukaan (Shewry ja Casey 1999). Ohran C-hordeiinit luokitellaan vähärikkisiin ja B- sekä  $\gamma$ -hordeiinit runsasrikkisiin prolamiineihin. D-hordeiinit luokitellaan suurimoolimassaisiin prolamiineihin, joiden rikkipitoisuus on vähän ja runsaasti rikkiä sisältävien prolamiinien välillä. Hordeiiniryhmien aminohappokoostumus on esitetty taulukossa 1. Kaikki ryhmät koostuvat pääasiassa glutamiinihaposta ja proliinista. Eniten vaihtelua ryhmien välillä on seriin, kysteiini, fenyylialaniini ja glysiini pitoisuuksissa.

Taulukko 1. B-, C-, D- ja  $\gamma$ -hordeiinien aminohappokoostumukset (mol %) (muokattu lähteestä Shewry 1993).

Aminohappo (lyhenne)	B	C	D	$\gamma$
Asparagiinihappo (D)	1,4	1,0	1,3	2,9
Treoniini (T)	2,1	1,0	8,1	2,6
Seriini (S)	4,7	4,6	9,7	5,6
Glutamiini (Q)	35,4	41,2	29,6	31,2
Proliini (P)	20,6	30,6	11,6	19,3
Glysiini (G)	1,5	0,3	15,7	4,2
Alaniini (A)	2,2	0,7	2,5	2,4
Kysteiini (C)	2,5	0	1,5	3,0
Valiini (V)	5,6	1,0	4,5	4,6
Metioniini (M)	0,6	0,2	0,2	1,2
Isoleusiini (I)	4,1	2,6	0,7	2,7
Leusiini (L)	7,0	3,6	3,3	7,8
Tyrosiini (Y)	2,5	2,3	3,9	1,9
Fenyylialaniini (F)	4,8	8,8	1,4	5,4
Histidiini (H)	2,1	1,1	3,4	1,8
Lysiini (K)	0,5	0,2	1,1	1,4
Arginiini (R)	2,4	0,8	1,5	2,3

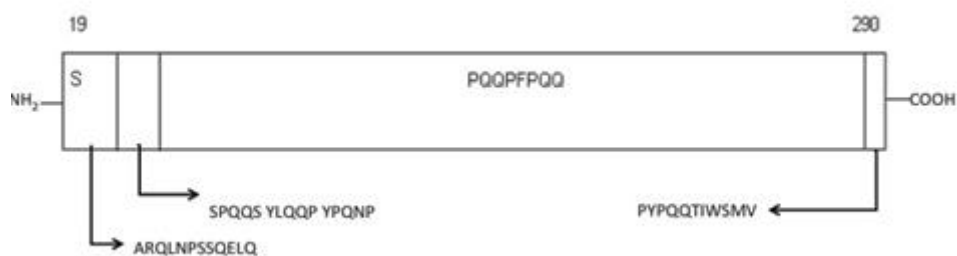
## 2.1 C-hordeiinit

C-hordeiinit, joita on noin 10–20 % ohran prolamiineista, ovat monomeerisiä polypeptidejä. Ne sisältävät runsaasti proliinia, glutamiinia ja fenyylialaniinia mutta eivät lainkaan kysteiiniä (kuva 1, taulukko 1) (Shewry ja Casey 1999). Lisäksi niillä on hyvin vähän varautuneita aminohappoja. Toisin kuin muut hordeiinit, ne liukenevat täysin alkoholiliuoksiin ilman pelkistintä.



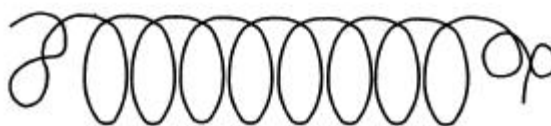
Kuva 1. Fenyylialaniinin, glutamiinihapon ja proliinin kemialliset rakennekaavat.

C-hordeiinit on jaettu viiteen ryhmään, C1-C5, joiden molekyylipainot ovat välillä 55–77 000 g/mol ja niissä on noin 290 aminohappoa (Entwistle 1988; Shewry ja Casey 1999). C-hordeiini alkaa aminopäästä 12 aminohapon ketjulla (ARQLNPSSQELQ, liite 1) ja jatkuu kolmella pentapeptidiryhmällä (kuva 2). Lyhyen aminopään jälkeen proteiinirunko jatkuu toistuvilla kahdeksan aminohapon sarjoilla: PQQPFQQ (P=proliini, Q=glutamiini ja F=fenyylialaniini). Tämän oktapeptidin aminohappojen suhde, 4Q:3P:1F on yhdenmukainen ohran prolamiinien koostumuksen kanssa: 40 mol % Q: 30 mol % P: 8–9 mol % F. C-hordeiinin karboksyyliipää koostuu 11 aminohapon ketjusta: PYPQQTIWSMV.



Kuva 2. Kaavakuva C-hordeiinin rakenteesta, jossa NH<sub>2</sub> on aminopää, S signaalipeptidi, PQQPFQQ toistuva aminohappoketju ja COOH karboksyyliipää (Shewry ym. 1995).

C-hordeiinien oktapeptidien toistuva rakenne johtaa molekyylin erikoiseen sekundaariseen rakenteeseen. Sauvamainen rakenne on pääosin vain löysiä  $\beta$ -käännöksiä ja polyproliini II -rakennetta (kuva 3) (Tatham ym. 1985; Shewry ja Tatham 1990).  $\beta$ -käännöksessä proteiini runko kiertyy  $180^\circ$ , taittuu ja stabiloituu vetysidoksilla (Damodaran 2008). Polyproliini II -rakenteessa peptidisidokset ovat rungossa trans-muodossa. Nämä sekundaarirakenteet ovat tyypillisiä paljon proliinia sisältäville proteiineille. C-hordeiineissa ei ole proteiineille tyypillisiä  $\alpha$ -käännöksiä ja  $\beta$ -tasoja, koska proliinin pitoisuus on suuri (joka toisena, kolmantena tai neljäntenä aminohappona) (Tatham ym. 1985). Tämä johtuu siitä, että proliinin rengasrakenne on osana peptidiketjun runko-osaa, jolloin hiilen ja vedyn välinen vetysidos ei kierry ja täten estää  $\alpha$ -kierteen muodostumisen (Damodaran 2008). Koska C-hordeiineissa ei ole lainkaan kysteiiniä, niihin ei muodostu disulfididisidoksia peptidien sisällä tai välillä (Shewry 1993).



Kuva 3. C-hordeiinin mahdollinen sekundaarirakenne, jossa keskiosa on proteiinirungon  $\beta$ -käännöstä. (muokattu lähteestä Simpson 2001).

## 2.2 B- ja $\gamma$ -hordeiini

B- ja  $\gamma$ -hordeiinit luokitellaan runsarikkisiin prolamiineihin ja ne ovat noin 80-prosenttisesti samanlaisia (Shewry ja Casey 1999). B-hordeiineja on ohran prolamiineista eniten, noin 70–80 %. B-hordeiinit ovat aggregoituvia proteiineja, eli ne voivat kasaantua ja esimerkiksi saostua. Ne sisältävät runsaasti glutamiinia ja proliinia sekä suhteellisen paljon kysteiiniä ja leusiinia verrattuna C-, D- ja  $\gamma$ -hordeiineihin (kuva 4). B-hordeiinit voidaan jakaa kahteen alaryhmään, B1- ja B3-hordeiineihin. B1-hordeiinit ovat molekyylipainoltaan suurempia, noin 45 000 g/mol (noin 274 aminohappoa), ja B3-hordeiinit pienempiä, noin 36 000 g/mol (Tatham ym. 1990). B-hordeiinien isoelektrinen piste on välillä 6,5–8,5 (Shewry ja Casey 1999).



Kuva 4. Kysteiinin ja leusiinin kemialliset rakennekaavat

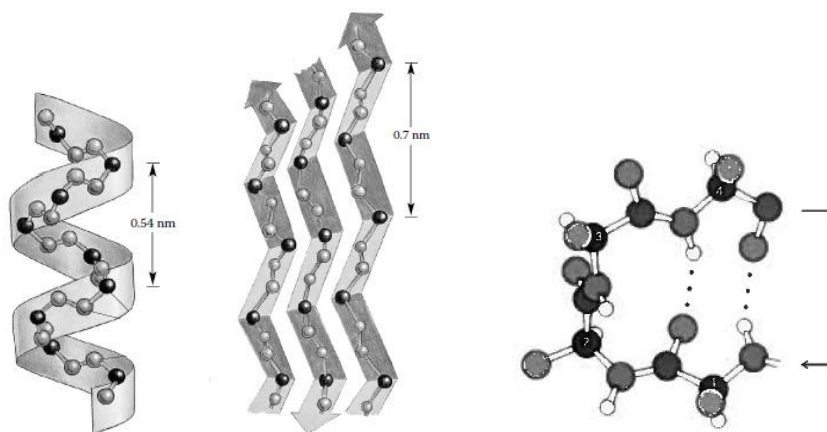
B-hordeiineissa on kaksi rakenteellista osaa: noin puolet peptidirungosta on toistuvia aminohapposarjoja sisältävää aminopäätä ja puolet karboksyylipäätä, jossa ei ole selviä toistuvia aminohappoketjuja (Shewry 1993). Aminopäätä ei ole pystytty määrittämään Edmanin degradaation avulla mutta pään lähellä oleva runko koostuu paljon proliinia sisältävästä, toistuvasta tetrapeptidistä: PQQP (taulukko 2). Karboksyylipään alueella on vain vähän proliinia, paljon varautuneita aminohappoja ja se sisältää suurimman osan proteiinin kysteiinistä.

Taulukko 2. B1-,  $\gamma_2$ - ja  $\gamma_3$ - hordeiinien aminopäät ja toistuvat aminohapposarjat. (muokattu lähteestä Shewry 1993).

B1-hordeiini	$\gamma_2$ -hordeiini	$\gamma_3$ -hordeiini
NH <sub>2</sub> -Q Q Q P F	NH <sub>2</sub> - E M Q V N P S V Q V Q P	I T T T T M Q F N
P Q Q P I	T Q Q Q P Y P E	P S G L E L E R
P Q Q P Q P Y	S Q Q P F I S Q	P Q Q L F
P Q Q P Q P Y	S Q Q P F I S Q	P Q W Q P L
P Q Q P F P	S Q Q Q F P Q	P Q Q P P F
P Q Q P F	P Q Q P F P Q Q	L Q Q E
P Q Q P V	P Q Q P F P Q	P E Q P Y
P Q Q P Q P Y	S Q Q Q C L Q Q	P Q Q Q P L
P Q Q P F P	P Q H Q F P Q	P Q Q Q P F
P Q Q P F	P T Q Q F P Q R	P Q Q P Q L
P Q Q P P F	P L L P F T H	P H Q H Q F
W Q Q K P F	P F L T F P D Q	P Q Q L
P Q Q P P F	- L L - P Q P	P Q Q Q F
GLQ <sup>79</sup>	P H Q S F P Q P	P Q Q M P L Q
	P - Q S Y P Q P	P Q Q Q F
	P L Q P F P Q P	P Q Q M P L <sup>94</sup>
	P Q Q K Y P E Q	
	P Q Q P F P W Q <sup>132</sup>	

B1- ja B3-hordeiineilla on samankaltaiset sekundaariset rakenteet: noin 39 % koko proteiinin sekundaarirakenteesta on  $\beta$ -käännöstä, 28 %  $\alpha$ -kierrettä ja 6–8 %  $\beta$ -tasoa (kuva 5) (Shewry 1993). Peptidin rungossa, jossa on toistuvia aminohapposarjoja, pääosa sekundaarirakenteesta on  $\beta$ -käännöksiä (58 %). Aminopään alueella, jossa ei ole toistuvia

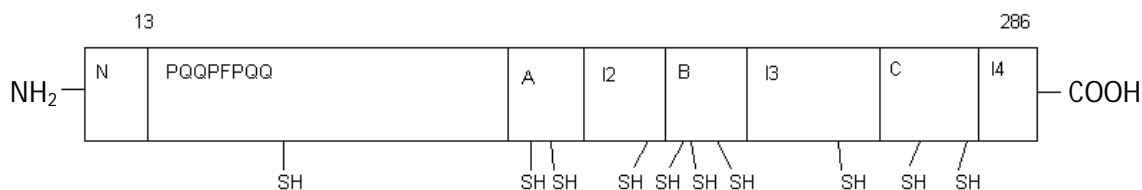
peptidirakenteita, sekundaarirakenteesta suurin osa on  $\alpha$ -heliksiä ja  $\beta$ -käännöksiä (47 % ja 33 %).



Kuva 5.  $\alpha$ -kierre,  $\beta$ -taso (Garlick 2008) ja  $\beta$ -kierre (Stryer 1981).

$\gamma$ -hordeineja on ohrassa vain hyvin pieniä määriä. Ne koostuvat suurimmaksi osaksi glutamiinihaposta ja proliinista ja sisältävät suhteellisesti paljon leusiinia ja valiinia (Shewry ja Casey 1999).  $\gamma$ -hordeiniit jaetaan ryhmiin  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  ja  $\gamma_3$ , jotka eroavat hieman niin aminohappokoostumukseltaan kuin molekyylipainoltaan.  $\gamma$ -hordeiniinien molekyylipainot ovat välillä 36–44 000 g/mol ja ne koostuvat noin 250–300 aminohaposta.

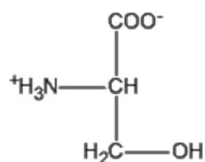
$\gamma$ -hordeiiniryhmillä on jokaisella spesifinen aminopää (kuva 6). Aminopää jatkuu toistuvilla aminohappojen sarjoilla, joissa on runsaasti proliinia ja glutamiinia (Shewry ym. 1985).  $\gamma$ -hordeiniinien sekundaarirakenne on hyvin samankaltainen B-hordeiniinien kanssa eli se koostuu pääosin  $\beta$ -käännöksistä. Koska B- ja  $\gamma$ -hordeiniit sisältävät kysteiiniä (2,5 ja 3 %) ne voivat muodostaa disulfididisoksia. B-,  $\gamma_1$ - ja  $\gamma_2$ -hordeineissa sidokset voivat olla molekyyliketjujen välillä, kun taas  $\gamma_3$ -hordeineissa sidokset ovat vain molekyyliketjun sisällä.



Kuva 6. Kaavakuva  $\gamma$ -hordeiniin rakenteesta, jossa N on aminoterminaali, PQQPFPQQ toistuva aminohapposarja, A, B ja C muuttumattomana säilyneet alueet, I2-I4 välialueet ja SH kysteiinin sivuketju (muokattu lähteestä Shewry ym. 1999).

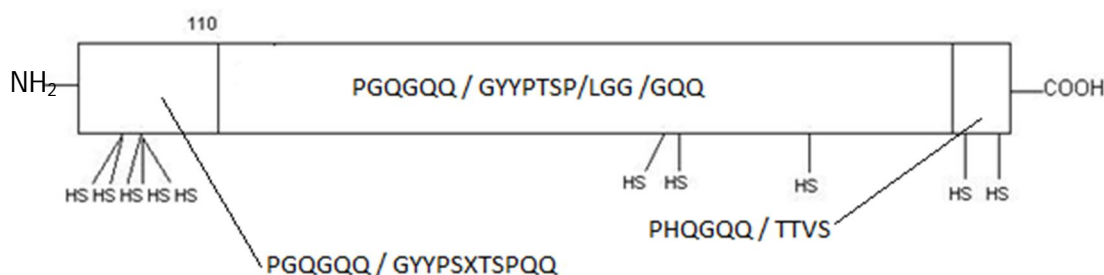
### 2.3 D-hordeiinit

D-hordeiinit koostuvat pääosin glutamiinista, glysiinistä, proliinista ja seriinistä (kuva 7) (Shewry ja Casey 1999). Proliinin määrä D-hordeiineissa on pienin verrattuna muihin hordeiiniryhmiin. D-hordeiinien molekyylipaino on noin 80 000 g/mol ja ne koostuvat noin 627–827 aminohaposta, joista noin 81–104 on aminopäässä ja 42 karboksyyli-päässä. Aminopää koostuu toistuvista aminohappo-sarjoista PGQGQQ (kuva 8). Näiden seassa on lisäksi aminohapposekvenssi GYYPSXTSPQQ. D-hordeiinien karboksyyli-pää koostuu toistuvista heksapeptideistä PHQGQQ ja niiden seassa 11 kertaa satunnaisesti esiintyvistä tetrapeptidistä TTVS. Karboksyyli- ja aminopäät sisältävät miltei kaiken D-hordeiinien kysteiniinistä. D-hordeiinien proteiini-rungossa on kolme toistuvaa aminohapposekvenssiä; heksapeptidi (PGQGQQ), nonapeptidi (GYYPTSP/LQQ) ja joissakin D-hordeiineissa esiintyvä tripeptidi (GQQ).



Seriini

Kuva 7. Seriinien kemiallinen rakennekaava.



Kuva 8. Kaavakuva D-hordeiinin rakenteesta (muokattu lähteestä Shewry ym. 1999)

D-hordeiinien sekundaarirakenne on samankaltainen vehnän gluteniinin kanssa. Se on sauvamainen, jonka karboksyyli- ja aminopäissä on runsaasti  $\alpha$ -kierteitä, ja runko-osassa sekä tetrapeptideissä (TTVS)  $\beta$ -käännöksiä. D-hordeiinien sekundaarirakenteita tasapainottaa molekyylien väliset disulfididisidokset sekä jonkin verran molekyylien sisäiset disulfididisidokset (Shewry 1993).

### 3 Proteiinien oksidaatio metallien avulla

#### 3.1 Oksidaatioreaktiot

Oksidaatio on hapen radikaalien reaktioita molekyylien kanssa. Reaktiiviset happilajit ovat erittäin reaktiivisia molekyyliä, atomeita tai ioneja, joilla on pariton määrä elektroneja uloimmalla elektronikuorella (Nogala-Kalucka ja Siger 2010). Reaktiivisia happilajeja ovat mm. superoksidi, vetyperoksidi, hydroperoksyyli ja hydroksyyli (Taulukko 3). Nämä voivat muodostua mm. ionisoidun säteilyn, näkyvän valon tai metallien katalysoimana (Lund ja Baron 2010).

Oksidaatioreaktioita voi tapahtua joko molekyylin sidosten suoralla jakautumisella tai elektronien siirtymisellä (Hawkins ja Davies 2001). Syntyneet radikaalit aiheuttavat monia eri reaktioita aminohappojen, peptidien ja proteiinien kanssa. Näitä ovat mm. vedyn irtoaminen, elektronin siirto ja lisäys, molekyylien uudelleen järjestäytyminen, fragmentaatio ja dimerisaatio. Reaktiot johtavat eri modifikaatioihin joko proteiinin runkorakenteessa tai aminohappojen sivuketjuissa ja aiheuttavat peptidisidosten tai proteiinien välisten sidosten katkeamista. Oksidaatioreaktiot voivat muuttaa mm. proteiinien hydrofobisuutta, konformaatiota, polymerisaatiota ja saostumista. Lisäksi ne aiheuttavat alkyyliden, peroksyyliden, alkoksiradikaalien, hydroperoksidien ja karbonyylien muodostumista sekä muodostavat radikaaleja proteiinirunkoon tai aminohappojen sivuketjuihin.

Taulukko 3. Reaktiiviset happilajit ja niiden kemialliset merkit (muokattu lähteestä Halliwell ja Gutteridge 2007).

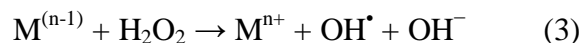
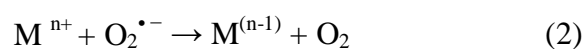
Reaktiiviset happilajit (Radikaalit)	
Superoksidi	$O_2^{\bullet -}$
Hydroperoksyyli	$HO_2^{\bullet}$
Hydroksyyli	$OH^{\bullet}$
Peroksyyli	$RO_2^{\bullet}$
Alkoksyyli	$RO^{\bullet}$

Koska proteiinien aminohappojärjestys on monipuolinen, radikaalit voivat aiheuttaa lukuisia reaktioita ja reaktioiden lopputuotteita. Radikaalien muodostuminen proteiineihin ja peptideihin riippuu hyökkäävän radikaalin laadusta ja reaktiivisuudesta. Esimerkiksi elektrofiiliset radikaalit ( $\text{HO}^\bullet$ , alkoksyyliiradikaalit) hapettavat ensisijaisesti molekyyliä kohdista, joissa elektronitiheys on suuri. Nukleofiiliset radikaalit (fenyylit ja hiili-keskeiset radikaalit) hyökkäävät taas kohtiin, joissa on matala elektronitiheys.

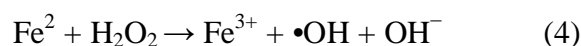
Radikaaleja voi muodostua vetyperoksidista ja superoksidista Haber-Weissin reaktiolla (yhtälö 1) (Haber ja Weiss 1934):



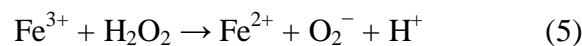
On kuitenkin todistettu, että Haber-Weiss -reaktion nopeus on niin hidas, ettei sillä ole merkitystä radikaalien muodostumisessa biologisissa materiaaleissa (Koppenol ym. 1978). Kun vetyperoksidin ja superoksidin reaktiota katalysoidaan metallilla (yhtälö 2 ja 3), muodostuu hydroksyyliiradikaalia, joka voi reagoida biologisten materiaalien kanssa.



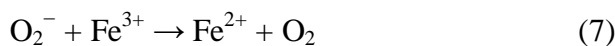
Tunnetuin metallikatalysoitu oksidaatioreaktio on Fenton-reaktio, jossa reaktion yhteydessä rauta hapettuu (yhtälö 4) (Halliwell ja Cutteridge 1984):



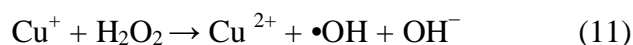
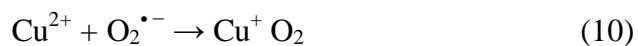
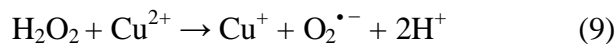
jossa  $\text{Fe}^{3+}$  voi reagoida edelleen vetyperoksidin kanssa (yhtälö 5):



Lisäksi voi tapahtua jatkoreaktioita (yhtälöt 6–9):



Fenton-reaktiossa käytetyn raudan lisäksi kupari voi toimia metallikatalysaattorina radikaalien muodostumisessa (Halliwell ja Gutteridge 1984). Vetyperoksidin reaktio kuparin kanssa on jopa nopeampaa kuin raudan kanssa. (yhtälöt 9–11):

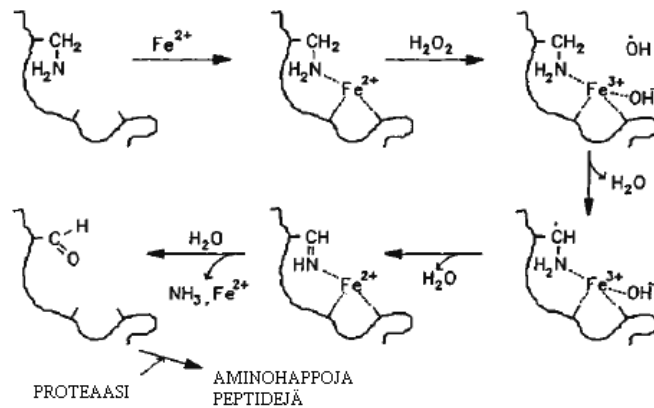


## 3.2 Proteiinien modifikaatiot hapettumisessa

### 3.2.1 Proteiinien metallikatalysoitu oksidaatio

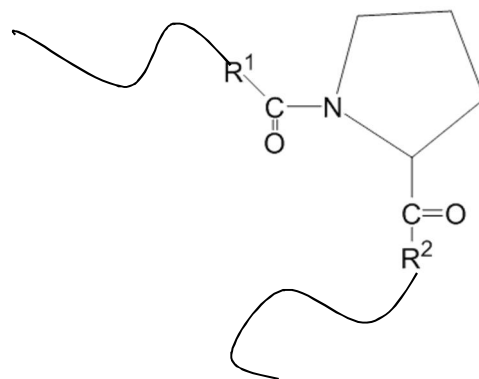
Proteiinien oksidaatio on paikkariippuvainen reaktio, jossa esim. rauta tai kupari kiinnittyy proteiinin metallia sitovaan kohtaan. Sitoutunut metalli reagoi vetyperoksidin ja lähellä olevan aminohapon kanssa. Ohrassa on rautaa 6 mg /100g ja kuparia 0,9 mg /100g kuiva-ainetta kohden (Hockett 2000). Amicin ym. (1989) tutkimuksen mukaan erityisesti histidiini, arginiini, lysiini ja proliini olivat herkkiä metallikatalysoidulle oksidaatiolle. Näiden aminohappojen herkkyys saattaa johtua niiden orientaatiosta proteiinirakenteessa, jolloin ne helposti sitovat metalleja ja edesauttavat siten hapettumisen alkamista proteiinissa.

Eräs mahdollisuus proteiinin oksidaatioreaktiolle on esitetty kuvassa 9. Stadtmanin (1990) mukaan reaktio alkaa siten, että lysiinin  $\epsilon$ -hiili toimii ligandina sitomalla raudan, jolloin syntyy rauta-proteiini-kompleksi. Oksidaatio jatkuu rauta-proteiinikompleksin ja vetyperoksidin reaktiolla, jossa vetyperoksidi hajoaa radikaaleiksi ( $\text{HO}^\bullet$  ja  $\text{HO}^-$ ).  $\text{HO}^-$  kiinnittyy rautaan ja rauta hapettuu  $\text{Fe}^{3+}$ :ksi. Hydroksyyli-radikaali ( $\text{HO}^\bullet$ ) sieppaa vetyatomien lysiinin  $\epsilon$ -hiilestä, jolloin hiili muuttuu radikaaliksi. Lysiinin  $\epsilon$ -hiili-radikaali on erittäin epästabiili, joten se reagoi nopeasti raudan kanssa luovuttaen parittoman elektroninsa raudalle, jolloin se pelkistyy takaisin  $\text{Fe}^{2+}$ :ksi. Oksidaatioreaktioiden jälkeen lysiinin sivuketju muuttuu aldehydiksi raudan ja aminoryhmän irrotessa kompleksista.



Kuva 9. Proteiinien paikkaspesifinen oksidaatio raudan katalysoimana (muokattu lähteestä Stadtman 1990).

Lysiinin sivuketju koostuu hiilivetyketjusta ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ), jonka aminoryhmä tekee sen hydrofiiliseksi. Hydrofiilisyyden takia lysiinin sivuketju osoittaa peptidiketjusta ulospäin, jolloin se reagoi helposti metallien kanssa. Hordeinin yleisimmät aminohapot, glutamiini, fenyylialaniini ja proliini asettuvat proteiinin peptidirakenteeseen erilailla. Proteiinissa proliinin rengasrakenne suuntaa peptidirakenteesta ulospäin (kuva 10) mutta fenyylialaniini ja glutamiini suuntautuvat sisäänpäin. Koska proliini suuntautuu peptidissä ulospäin, se voisi reagoida metallin kanssa samantapaisesti kuin lysiini.

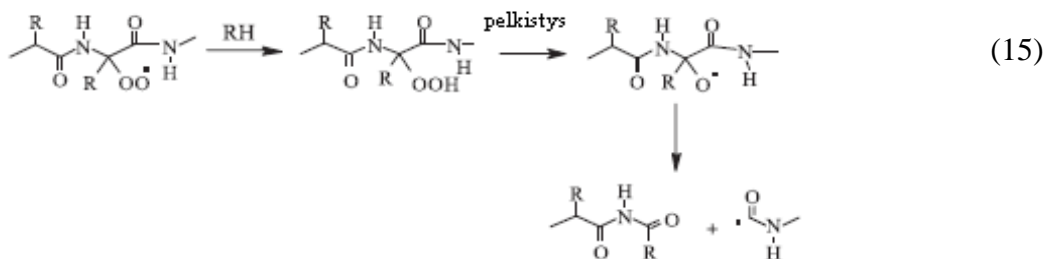
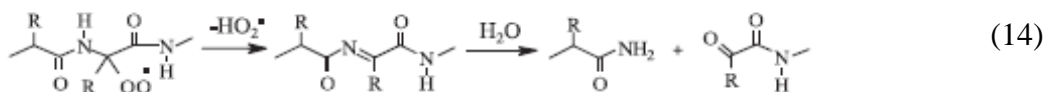
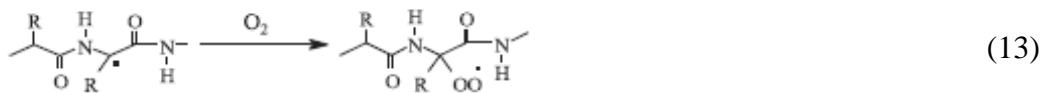
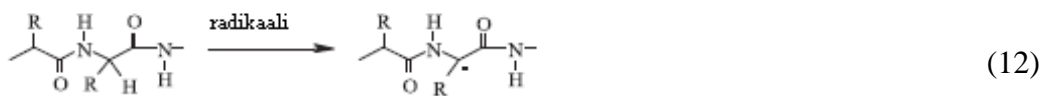


Kuva 10. Proliinin rengasrakenne osoittaa peptidirungossa ulospäin.

### 3.2.2 Oksidaatioreaktio proteiinirungossa ja proteiinien fragmentointi

Jos radikaali reagoi aminohapon  $\alpha$ -hiilen tai proteiinirungon kanssa, irtoaa vetyioni ja aminohapon rungon hiilestä syntyy radikaali (yhtälö 12) (Davies 2005). Tyypillisin ja reaktiivisin radikaali tähän reaktioon on hydroksyyliiradikaali ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Berlett ja Stadtman 1997) Aminohapon hiiliradikaali reagoi nopeasti hapen kanssa muodostaen alkyyliperoksidiradikaalin (yhtälö 13).

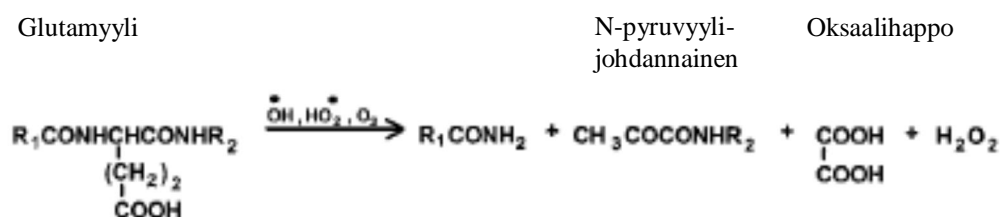
Alkyyliperoksidiradikaali voi fragmentoitua kahden eri reaktion kautta. Se voi reagoida hydroperoksyylin kanssa, jolloin aminohaposta muodostuu imiini. Imiini voidaan hydrolysoida, jolloin sen peptidisidos hajoaa ja muodostuu amidi sekä N- $\alpha$ -ketoasyylilohdannainen (yhtälö 14). Proteiinirungon fragmentoituminen voi tapahtua myös sitomalla jonkin toisen peptidin vetyatomi happimolekyyleihin, jolloin muodostuu hydroperoksidi. Tämä voi pilkkoutua pelkistymällä ensin alkoksyyliiradikaaliksi ja sitten fragmentoitua (yhtälö 15).



### 3.2.3 Aminohappojen oksidaatio

#### Glutamiinihappo

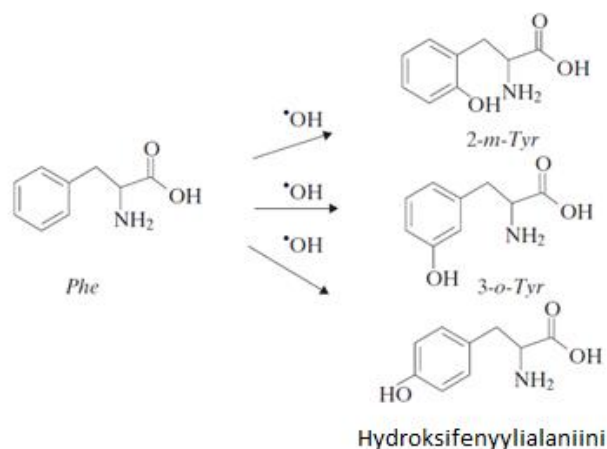
Berlettin ja Stadtmanin mukaan (1997) reaktiiviset happilajit fragmentoivat yllä mainitulla tavalla glutamiinihapon peptidiketjusta. Glutamyylin fragmentoitumisessa aminohapon tyypipäädystä muodostuu oksaalihappo ja happopäädystä N-pyruvyyli-johdannainen (kuva 11).



Kuva 11. Glutamyylin oksidaatio radikaalien kanssa, jossa lopputuotteina N-pyruvyyli, oksaalihappo ja vetyperoksidi (muokattu lähteestä Berlett ja Stadtman 1997).

#### Fenyylialaniini

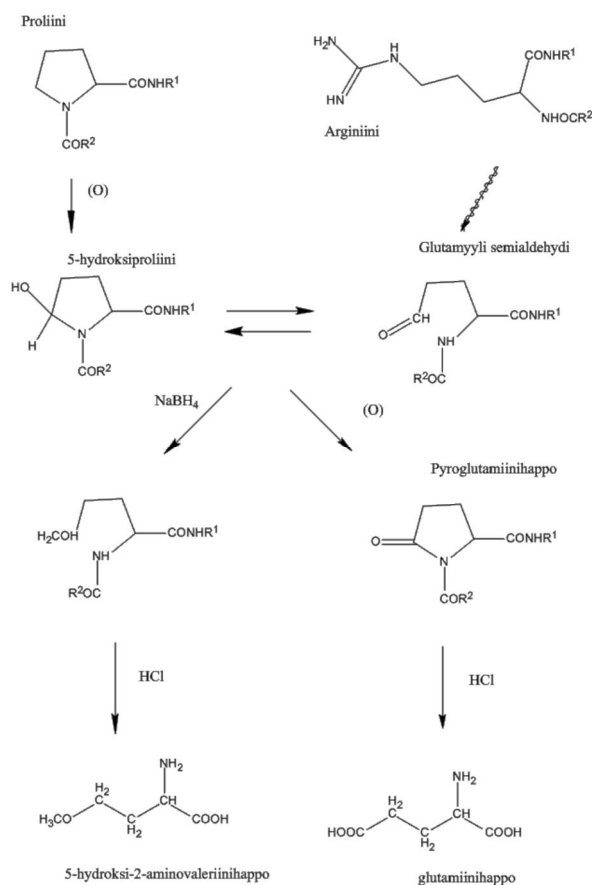
Lundin ja Baronin (2010) mukaan aromaattiset aminohapot, mm. tyrosiini, tryptofaani, histidiini ja fenyylialaniini, ovat herkkiä oksidaatioreaktioille. Fenyylialaniinin oksidaatiossa aromaattiseen renkaaseen liittyy hydroksyyli-ryhmä, jolloin voi syntyä 3-m-tyrosiini, 2-o-tyrosiini ja 4-hydroksifenyylialaniini (tyrosiini) (kuva 12).



Kuva 12. Fenyylialaniinin reaktio hydroksyyli-radikaalin kanssa, jolloin lopputuotteina syntyy 2-m-tyrosiini, 3-m-tyrosiini ja 4-hydroksifenyylialaniini (muokattu lähteestä Lund ja Baron 2010).

## Prolini

Proliin oksidaatioreaktiossa syntyy ensin hydroksiprolini (Amici ym. 1989) ja glutamyylisemialdehydi (Kuva 13). Oksidaatioreaktion jatkuessa glutamyylisemialdehydi hapettuu pyroglutamiinihapoksi, josta voidaan happohydrolyysillä tuottaa glutamiinihappoa. Proliin lisäksi arginiinilla on samat lopputuotteet hajotessa ensin glutamyylisemialdehydiksi.



Kuva 13. Proliin ja arginiinin hapetusreaktioiden lopputuotteet (muokattu lähteestä Amici ym. 1989).

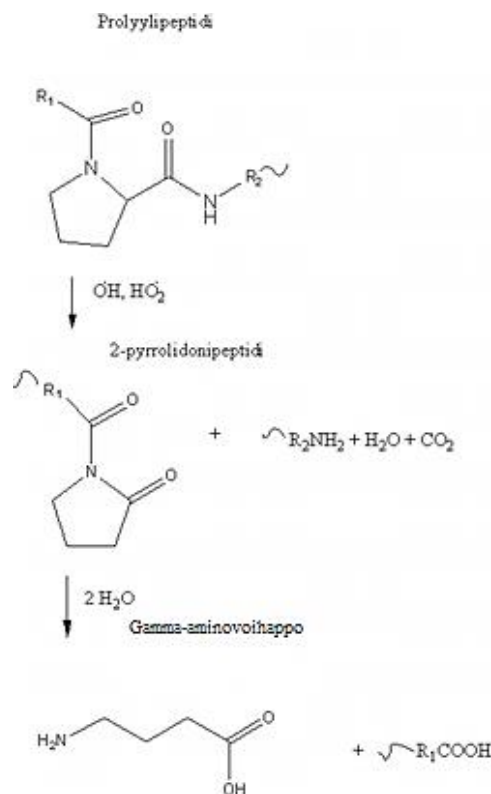
Uchida ym. (1990) tutkivat proliinia sisältävien peptidien metallikatalysoitua oksidaatiota. Tutkimuksessa havaittiin, että polyproliinin reagoissa kuparin ja vetyperoksidin kanssa, proliinin pitoisuus laski mutta hydroksiproliin ja glutamiinihapon pitoisuuden kasvoivat (Taulukko 4).

Taulukko 4. Prolyylipeptidien kuparikatalysoidun oksidaation lopputuotteet (muokattu lähteestä Uchida ym. 1990).

Substraatti	Molaarinen suhde (%)				
	Proliini	Glysiini	Glutamiini	Hydroksiproliini	GABA
<u>Poly(Pro-Gly-Pro)</u>					
natiivi	73,1	25,3	0,26	0,04	0,3
hapetettu Cu(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	57,1	25,0	4,6	4,0	1,7
<u>Poly-L-proliini</u>					
natiivi	99,4	-	-	-	0,01
hapetettu Cu(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	80,8	-	4,1	10,0	0,9

\*) Gamma-aminovoihappo

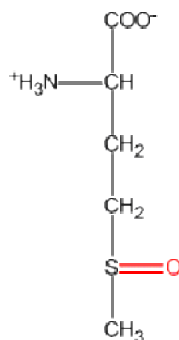
Uchidan ym. (1992) tutkimuksessa kollageenin sisältämästä proliinista 30 % pilkkoutui kuparikatalysoidussa oksidaatiossa, jossa oksidanttina käytettiin vetyperoksidia. Proliinin lisäksi histidiinin, fenyyialaniinin, lysiinin ja arginiinin pitoisuudet pienenevät merkittävästi. Vaikka näiden aminohappojen määrät pienenevät radikaalisti käsittelyssä, hydroksiproliinin, asparagiinihapon ja glutamiinihapon pitoisuudet nousivat. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin gamma-aminovoihapon (GABA) pitoisuuden nousu oksidaation vaikutuksesta. Katon ym. (1992) mukaan suurin osa proliinista pilkkoutuu 2-pyrrolidoniksi metallikatalysoidussa oksidaatiossa (kuva 14). Peptidissä poly(pro-gly-pro) proliinin  $\alpha$ -hiili sitoo vetyatomien, jolloin peptidirunko hajoaa. Tällöin proliinista muodostuu 2-pyrrolidoni ja glysiinistä muodostuu uusi tyypipääty. 2-pyrrolidonista voi syntyä GABA:a happohydrolysoimalla.



Kuva 14. Prolyylin oksidaation lopputuotteena syntyy 2-pyrrolidoni, joka voidaan happohydrolysoida gamma-aminobutyryihapoksi (Stadtman ja Levine 2003).

### Muiden aminohappojen metallikatalysoitu oksidaatio

Berlettin ja Stadtmanin (1997) mukaan kysteini ja metioniini ovat herkkiä reagoimaan kaikkien radikaalien kanssa. Jopa pienetkin määrät kysteiniä proteiineissa saa aikaan kysteinin muuttumisen disulfideiksi ja metioniinin metioniinisulfoksidiksi (kuva 15). Kysteinin ja metioniinin oksidaatiotuotteet ovat ainoat, jotka ovat reversiibelejä reaktioita eli ne voivat palata takaisin alkuperäiseen konformaatioonsa. Eri aminohappojen metallikatalysoidun oksidaation lopputuotteet on esitetty taulukossa 5.



Kuva 15. Metioniinisulfoksidin rakennekaava.

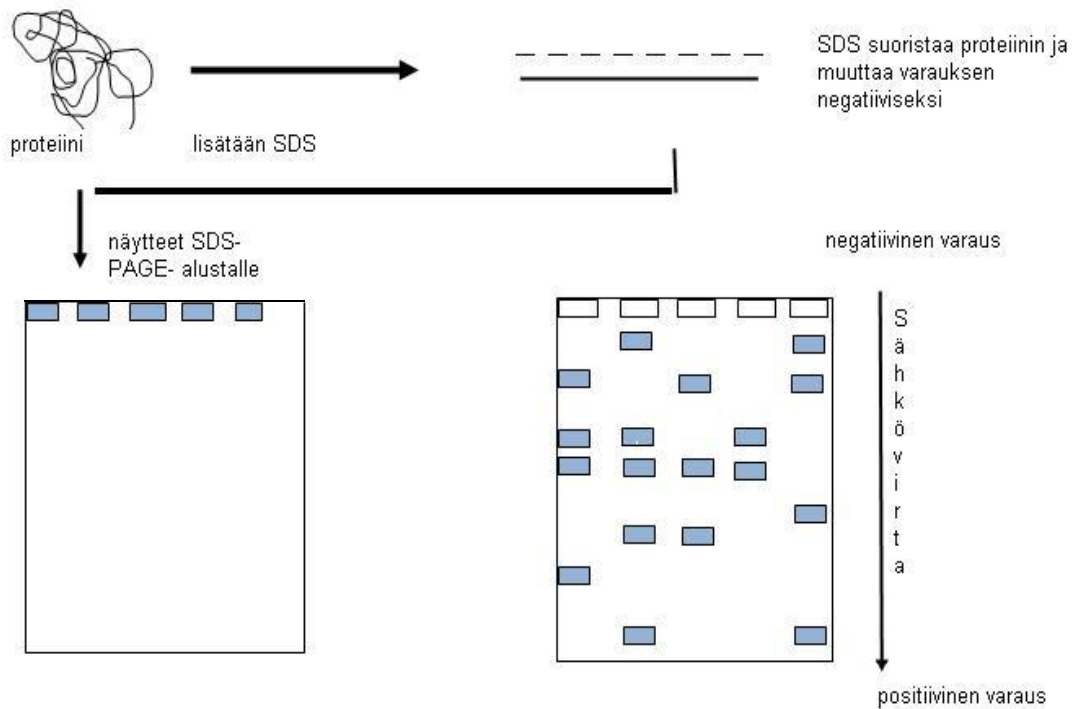
Taulukko 5. Metallikatalysoitujen aminohappojen reaktioiden lopputuotteet (Berlett ja Stadtman 1997).

Aminohappo	Lopputuote
Histiidiini	Aspargiinihappo, asparagiini, oksohistidiini
Arginiini	$\gamma$ -glutamyylisemialdehydi
Lysiini	$\alpha$ -amino-adipiinisemialdehydi
Treoniini	Amino-ketobutyrihappo
Tyrosiini	Dityrosiini, 3,4-dihydroksifenyylialaniini
Kysteiini	-S - S- (disulfidi), kysteiinihappo
Glutamiinihappo/glutamiini	oksaalihappo, pyruvyylihappo

## 4 Menetelmät hordeiinien tutkimiseen

### 4.1 Hordeiinien uuttuminen

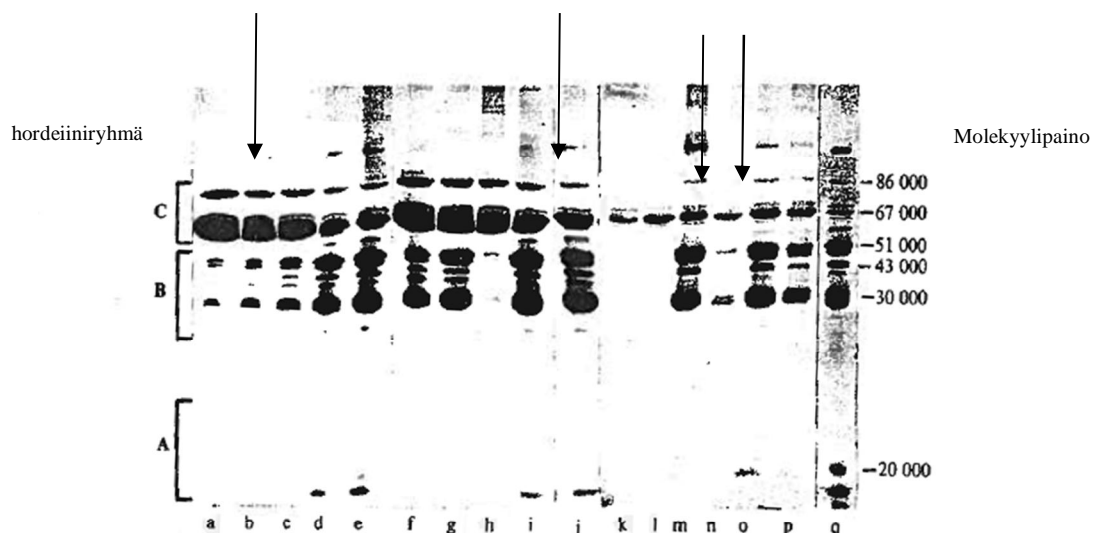
Kuten aikaisemmin todettiin, hordeiinit liukenevat alkoholiliuoksiin. Kaikki hordeiinit voidaan uuttaa alkoholeilla mutta eri hordeiiniryhmien erottamiseen tarvitaan muita menetelmiä. Hordeiinien uuttumista on tutkittu mm. eri alkoholeilla pelkistimen kanssa tai ilman ja eri lämpötiloissa. Tuloksia on analysoitu natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE), joka perustuu varautuneiden partikkeleiden ja molekyylien liikkumiseen sähkökentässä (Westermeier ja Scheibe 2009). Menetelmää voidaan käyttää vain varauksellisiin komponentteihin, kuten nukleiinihappoihin, proteiineihin ja peptideihin. Koska proteiinit ja peptidit ovat amfoteerisiä molekyyliä (voivat toimia sekä happona että emäksenä), ne voidaan analysoida kationeina tai anioneina käyttämällä emäksistä tai hapanta puskuria. SDS-PAGE:ssa proteiinit käsitellään SDS:ää ja pelkistintä sisältävällä puskurilla, jolloin pelkistin saa aikaan proteiinin disulfidididosten katkeamisen ja SDS peptidirungon oikenemisen (kuva 16). Lisäksi SDS päällystää proteiinit, jolloin proteiinit saavat negatiivisen varauksen. Negatiivinen varaus saa molekyylit kulkemaan anodin suuntaan nopeudella, joka riippuu peptidin pituudesta. Peptidien liikkuminen sähkökentässä on suoraan verrannollinen sen molekyylipainoon.



Kuva 16. Kaavakuva SDS-PAGE:n toimintaperiaatteesta.

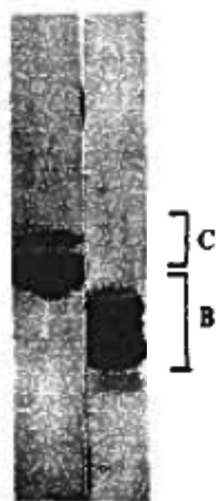
Shewry ym. (1980) tutkivat ohran hordeiinien uuttumista eri alkoholeihin ja analysoimalla uuttumista SDS-PAGE:lla. Tutkimuksessa havaittiin, että C-hordeiinit uuttuivat parhaiten 50-prosenttisella 2-propanolilla huoneenlämmössä ilman pelkistintä ja 60-prosenttisellä etanolilla pelkistimen (2 %  $\beta$ -merkaptetanoli) kanssa (kuva 17). Näytteissä, jotka oli uutettu etanolilla pelkistimen kanssa, oli kuitenkin hordeiinien kokonaisuuttuvuus pienempi kuin muissa näytteissä. B-hordeiinit uuttuivat parhaiten alkoholilla, jossa oli pelkistin ja lisäksi lämpötilaa nostettu (60 °C).

Tutkimuksen mukaan uuttomenetelmä ja olosuhteet voivat myös muuttaa proteiinien konformaatioita. B- ja C-hordeiinien erilainen uuttuminen alkoholilla, jossa oli pelkistintä, johtui B-hordeiinin sisältämästä kysteiinistä. Kysteiinin rikkiä sisältävä sivuketju reagoi  $\beta$ -merkaptetanolin kanssa, jolloin proteiinimolekyylin disulfididisokset pilkkoutuivat ja proteiinin liukoisuus kasvoi. Koska C-hordeiinissa ei ole kysteiiniä eikä disulfididisoksia,  $\beta$ -merkaptetanolin käyttö ei vaikuttanut sen uuttuvuuteen.



Kuva 17. SDS-PAGE ohran hordeiinien uuttomenetelmistä, joissa hordeiinit uutettu a: 50 % etanoli + 2 %  $\beta$ -merkaptotetanoli (20 °C); h: 50 % 1-propanoli (20 °C); k: 60 % etanoli + 2 %  $\beta$ -merkaptotetanoli (4 °C) ja l: 60 % etanoli + 2 %  $\beta$ -merkaptotetanoli (20 °C) (Shewry ym. 1980).

Samassa tutkimuksessa tutkittiin geelikromatografialla erotettuja ja ioninvaihtokromatografialla puhdistettuja B- ja C-hordeiineja. Polypeptidien uuton tehokkuus on esitetty kuvassa 18. Ioninvaihtokromatografialla saatiin erotettua B- ja C-hordeiinit täysin.

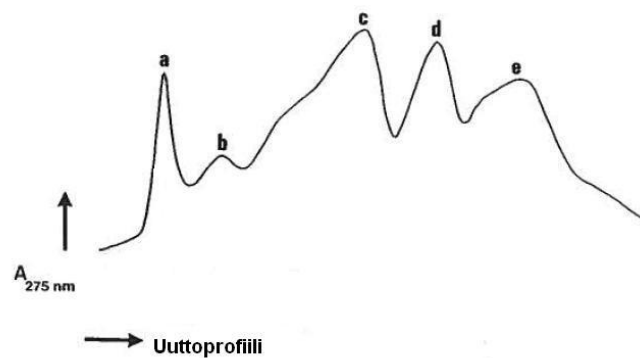


Kuva 18. Ioninvaihtokromatografialla erotettujen B- ja C-hordeiinien SDS-PAGE-analyysi (muokattu lähteestä Shewry ym. 1980).

## 4.2 Proteiinien erotus geelisuodatuksella

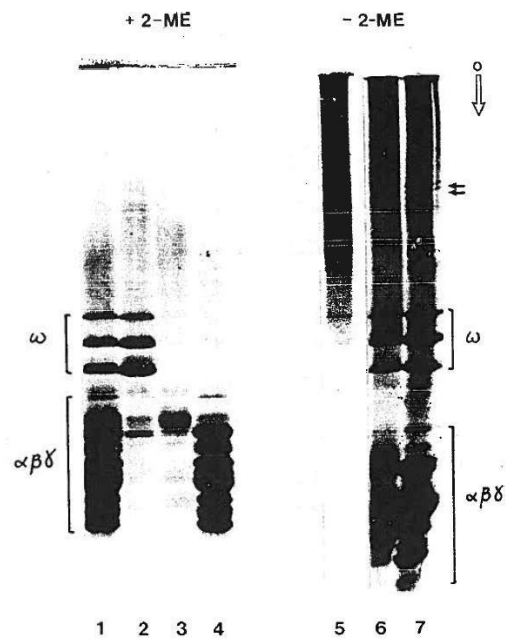
Geelisuodatus perustuu proteiinien erottumiseen molekyylikoon perusteella. Näytteet laitetaan kolonniin, jossa on Sephadex-geeliä. Sephadex sisältää huokoista silikoniraetta, joihin proteiinit kulkeutuvat. Koska pienet proteiinit mahtuvat huokosiin, niiden kulkema matka on pidempi ja siksi kestää kauemmin kulkeutua geelin läpi. Näytteet kerätään sitä mukaa, kun ne tulevat ulos geelikolonnista.

Jacksonin (1984) tutkimuksessa puhdistettiin vehnän eri gliadiiniryhmiä geelisuodatuksella. Kolonnin korkeus oli 81 cm, jossa geelinä oli Sephadex G-100 (erotusalue 4000–150 000 g/mol). Gliadiininäytteet laitettiin kolonniin, jossa ne tulivat noin 17 ml /h vauhdilla kolonnin läpi. Läpitulevaa näytettä kerättiin 7 ml fraktioissa ja niitä tarkasteltiin spektrometrillä (kuva 19).



Kuva 19. Vehnän gliadiinien uuttoprofiili mitattuna spektrofotometrillä (275 nm). Piikit kuvassa vastaavat a) HMW-gliadiineja, b) omegagliadiineja, c) alfa-, beta- ja gammagliadiineja, d) albumiineja ja e) ei-proteiini-materiaalia (muokattu lähteestä Jackson 1984).

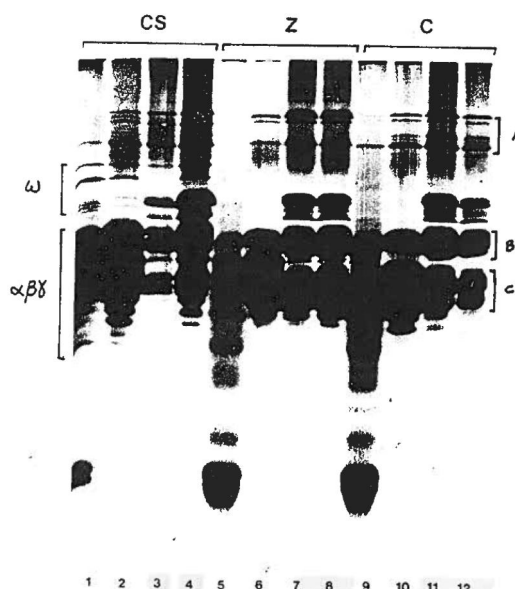
Kuvassa 19 näkyvät piikit a, b ja c puhdistettiin edelleen ja tutkittiin SDS-PAGE:lla pelkistävässä ja ei-pelkistävässä olosuhteissa. Pelkistimenä toimi  $\beta$ -merkaptoetanolii. Näytteet, jotka sisälsivät pelkistintä, sisälsivät vain vähän ristikontaminaatiota muista proteiiniryhmistä (kuva 20, urat 2–4). Näytteissä, joihin ei ollut lisätty pelkistintä, säilyivät alkuperäisessä muodossaan aggregoituneina tai muodostivat juovan (kuva 20, ura 5).



Kuva 20. SDS-PAGE fraktioiduista ja puhdistetuista vehnän alkoholiliuokoisista proteiineista. Kuvassa 1) kokonaisgliadiini, 2) omegagliadiini (fraktio b), 3) HMW-gliadiini (fraktio a), 4) alfa-, beta- ja gammagliadiinit (fraktio c), 5) HMW-gliadiini (fraktio a), 6) kokonaisgliadiini, 7) endospermin kokonaisproteiinit ja 2-ME =  $\beta$ -merkaptotetanoli (muokattu lähteestä Jackson 1984)

#### 4.3 Aggregoituvien proteiinien erotus

Jackson (1984) erotti vehnän gluteniineja saostamalla. Menetelmässä proteiinit uutettiin vehnäjauhoista ensin etikkahapon, urean ja heksadesyytrimetyyliammoniumbromidin kanssa (AUC), minkä jälkeen näyte sentrifugoitiin. Sentrifugoidusta näytteestä poistettiin pohjalle jäänyt sakka ja supernatanttiin lisättiin ammoniumsulfaattia (näyte 1, kuva 21). Jäljelle jäänyt sakka sekoitettiin uudelleen AUC:llä ja siihen lisättiin ammoniumsulfaattia. Näyte sentrifugoitiin ja supernatantti erotettiin (näyte 2) sakasta (näyte 3). Näyte 3 liotettiin etikkahappoon, josta supernatantin erotusta tutkittiin edelleen. Tutkimuksen perusteella on pääteltävissä, että menetelmä voisi toimia hordeiinien erottamiseen.

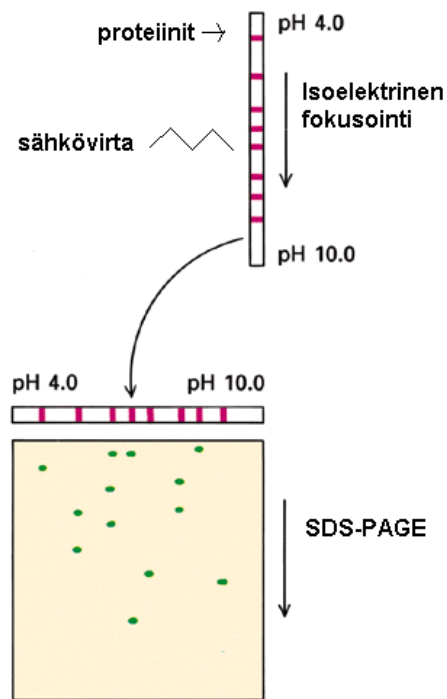


Kuva 21. Vehnän gluteniinien erotus sakkaamalla ammoniumsulfaatilla. Uurteet 1,5 ja 9: supernatantti, ensimmäisen ammoniumsulfaatin lisäämisen jälkeen. Uurteet 2, 4 ja 10: Supernatantti, johon oli lisätty kaksi kertaa ammoniumsulfaattia. Uurteet 3, 4, 7, 8, 11 ja 12: Supernatantit, jotka oli eristetty ammoniumsulfaattiaggregaation uutosta etikkahappoon. Kuvassa CS, Z ja C viittaavat tutkittuihin vehnän lajikkeisiin (Jackson 1984).

#### 4.4 Hordeiinien kaksiulotteinen elektroforeesi

Kaksiulotteinen elektroforeesi tarkoittaa analyysia, jossa ensin ajetaan geelissä isoelektrinen fokusointi ja sen jälkeen SDS-PAGE. Isoelektrinen fokusointi erottaa proteiinit isoelektrisen pisteen perusteella, ja hordeiiniryhmillä pisteet ovat hieman eri pH:ssa. Shewryn ym. (1999) mukaan B-hordeiinien isoelektrinen piste on välillä 6,5–8,5. C-hordeiinien isoelektrinen piste on alle 7 (Shewry ym. 1978) Fokusoinnissa geeliin muodostetaan sähkökenttä, jossa ne liikkuvat varauksensa mukaisesti, joko anodia tai katodia kohti (kuva 22). Proteiinit pysähtyvät, kun niiden nettovaraus on nolla eli ne ovat geelissä oman isoelektrisen pisteensä kohdalla.

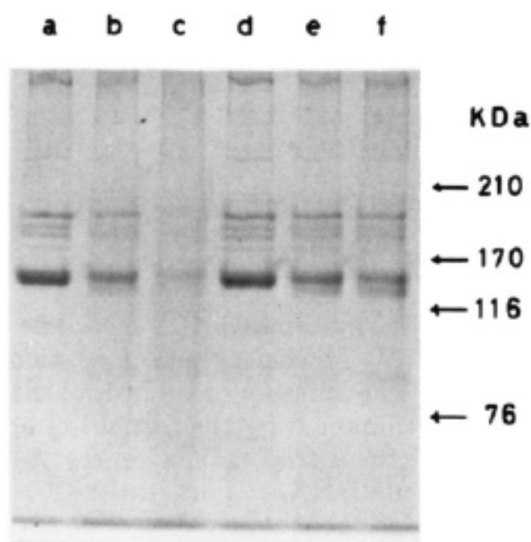
Isoelektrisen fokusoinnin jälkeen samasta geelistä tehdään SDS-PAGE niin, että fokusoinnissa erottuneet proteiinit erottuvat vielä molekyylipainon mukaan.



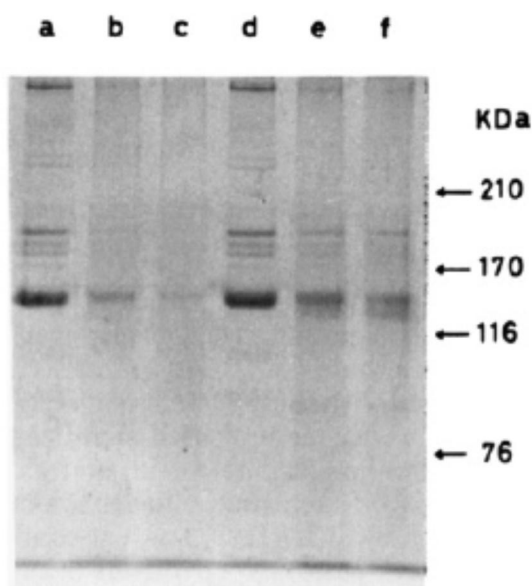
Kuva 22. Kaavakuva proteiinien kaksiulotteisesta PAGE:sta.

#### 4.5 Proteiinien metallikatalysoidun oksidaation tutkiminen

Oksidaation vaikutusta proteiineihin on analysoitu pääasiassa SDS-PAGE:lla ja nestekromatografialla (HPLC). Uchida ym. (1992) tutkivat kollageenin metallikatalysoitua oksidaatiota. Tutkimuksessa metalleina käytettiin kuparia tai rautaa ja oksidanttina vetyperoksidia tai L-askorbaattia. Sekä vetyperoksidilla (kuva 23) että L-askorbaatilla (kuva 24) tehdyissä reaktioissa proteiinit olivat pilkkoutuneet 30 minuutin inkuboinnin jälkeen, kun katalyyttinä käytettiin kuparia. Tutkimuksen mukaan tehokkain menetelmä oli oksidaatio puoli tuntia kuparilla ja vetyperoksidilla, jolloin lähes kaikki proteiinit olivat pilkkoutuneet (kuva 23).

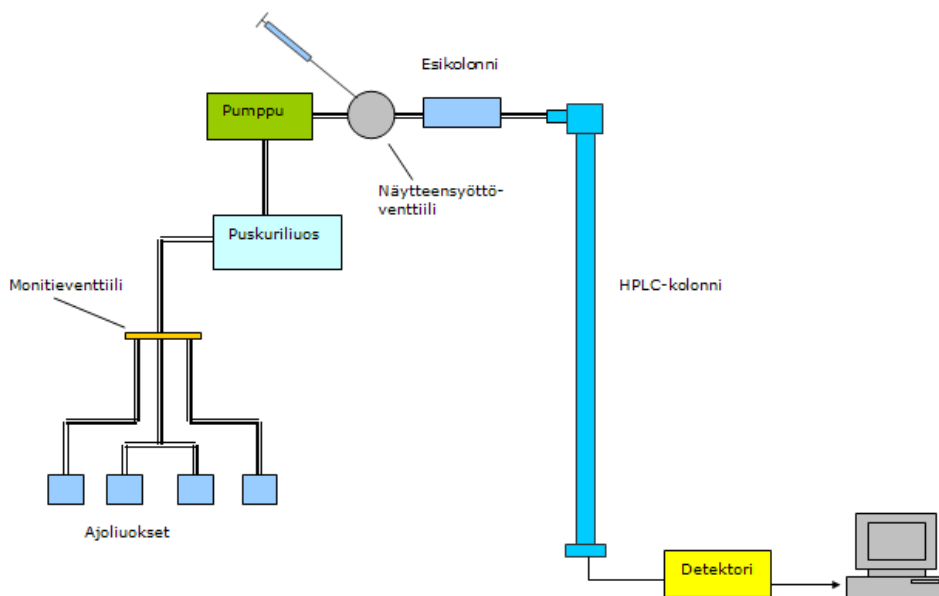


Kuva 23. SDS-PAGE kollageenin metallikatalysoidusta (Cu/Fe) oksidaatiosta (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pH:ssa 7,4. Reaktiossa kollageenia 0,5 mg, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM, Cu(II) 0,05 mM, Fe(II) 0,05mM, 1 ml 0,1 M natriumfosfaattipuskuri ja lämpötila 37 °C. a) kontrolli, b) Cu(II) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 min, c) Cu(II) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 min, d) kontrolli, e) Fe(II) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 min ja f) Fe(II) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 min (Uchida ym. 1992).



Kuva 24. SDS-PAGE kollageenin metallikatalysoidusta oksidaatiosta pH:ssa 7,4. Reaktiossa kollageenia 0,5 mg, askorbaattia 5 mM, kuparia(II) tai rautaa(II) 0,05 mM ja 1 ml 0,1 M natriumfosfaattipuskuria ja lämpötila 37 °C. a) ja d) kontrollit, b) Cu(II) + askorbaatti 15 min, c) Cu(II) + askorbaatti 30 min, e) Fe(II) + askorbaatti (15 min) ja f) Fe(II) + askorbaatti 30 min (Uchida ym. 1992).

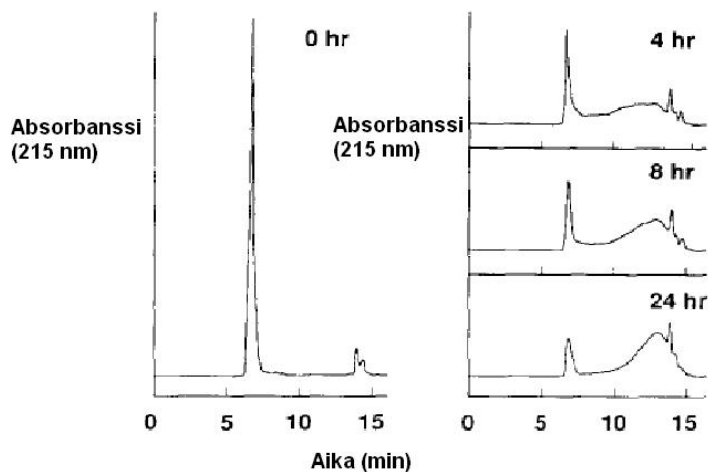
HPLC on menetelmä, jonka avulla eri yhdisteitä voidaan tunnistaa tai erottaa. Menetelmässä pieni määrä näytettä injektoidaan kolonniin, jossa on hienojakoista stationäärifaasia (Ball 2005). Näyte kulkee kolonnin läpi korkean paineen avulla nestemäisessä faasissa (kuva 25). Erottuneet komponentit havaitaan ja voidaan tunnistaa monitorin avulla, joka mittaa esim. valon absorptioon.



Kuva 25. Kaavakuva HPLC:n toimintaperiaatteesta (muokattu lähteestä Opetushallitus 2012).

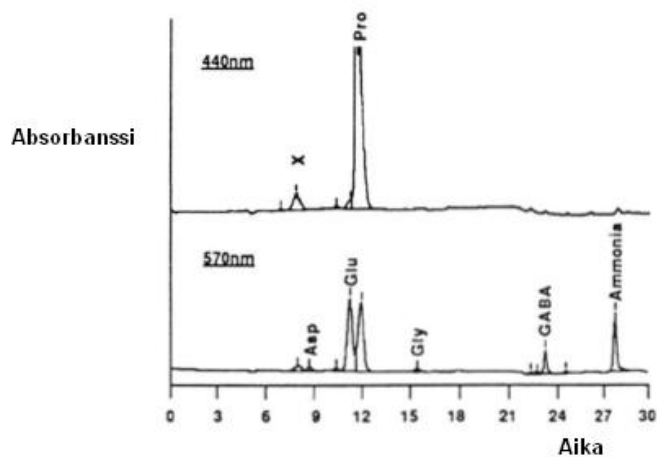
Kokoeksklusiokromatografiassa (SE-HPLC) näyte erotetaan koon ja muodon mukaan (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Pakkausmateriaalina kolonnissa käytetään erikokoisia huokosia sisältävää kiinteää faasia, jonka avulla molekyylit erottuvat. Suuret molekyylit eivät mahdu kiinteään faasin huokosiin, jolloin ne kulkeutuvat kolonnin läpi liikkuvan faasin mukana. Pienet molekyylit kulkeutuvat kiinteään faasin huokosiin ja liikkuvat siten hitaammin kolonnin läpi. Näin erikokoiset molekyylit tulevat eri järjestyksestä kolonnista ulos ja niiden erilaiset moolimassajakaumat voidaan määrittää.

Kato ym. (1992) tutkivat kollageenin ja polyproliinin hajoamista kuparikatalysoidulla oksidaatiolla. Kollageenia käsiteltiin oksidaatioreaktiossa 0, 4, 8 ja 24 tuntia, jonka jälkeen ne tutkittiin ioninvaihtokromatografialla. Kollageenin isomolekyylisten proteiinien määrä aleni ja pienimolekyylisten proteiinien määrä kasvoi reaktioajan mukaan (kuva 26).



Kuva 26. Ioninvaihtogromatogrammi kollageenin kuparikatalysoidun oksidaation vaikutuksesta (muokattu lähteestä Kato ym.1992).

Polyproliinin metallioksidatio aiheutti proliinin katoamisen miltei kokonaan ja tuotti merkittävän määrän glutamiinia, GABA:a ja tuntematonta ainetta (X), joka arveltiin olevan hydroksiproliinia (kuva 27). Tutkimus vahvisti polyproliinien hajoamista oksidaatiossa mm. glutamiiniksi ja GABA:ksi.



Kuva 27. Kromatogrammi polyproliinin kuparikatalysoidun oksidaatioreaktion lopputuotteista analysoituna RP-HPLC:llä (reaktioaika 24 h). Kuvan yllä ei-käsitelty polyproliini ja kuvan alla käsitelty polyproliini, jossa X = tuntematon aine, pro = polyproliini, asp = asparagiinihappo, glu = glutamiini, gly = glysiini, GABA = gamma-aminovoihappo ja ammonia = ammoniakki (muokattu lähteestä Kato ym. 1992)

### III KOKEELLINEN TUTKIMUS

Tutkielman kokeellisen osan tavoite oli kehittää menetelmä, jolla saataisiin isoimmat hordeiiniryhmät, B- ja C-hordeiinit, erotettua toisistaan ja tutkia miten metallikatalysoitu oksidaatio vaikuttaa näihin hordeiineihin.

B- ja C hordeiinien erottaminen toisistaan perustui aiempiin tutkimuksiin, joissa uutettiin joko ohran hordeiineja tai vehnän gliadiineja (Jackson 1984; Shewry ym. 1980). Geelisuodatuksessa oli tavoitteena erotella erikokoiset hordeiiniryhmät molekyylin koon mukaan. Lisäksi testattiin B-hordeiinien saostumista ammoniumsulfaatin avulla ja uuttumista alkoholiliuoksiin.

#### 5 Materiaalit

Raaka-aineena geelisuodatus- ja ammoniumsulfaattisaostus-kokeessa käytettiin kaupallista, monesta ohralajikkeesta koostuvaa ohrajauhoa (Myllyn Paras Oy, Hyvinkää). Uuttokokeissa raaka-aineena käytettiin kuoretonta Jorma-ohraa (Villala, 2006). Jorma-ohra valittiin näytteeksi, koska sitä ei tarvinnut kuoria ennen jauhamista eikä sen proteiinikoostumus poikennut merkittävästi muista ohralajikkeista. Jyvät jauhettiin käyttämällä Brabender Quadrumat Junior -myllyä (1970, Saksa).

#### 6 Menetelmät

##### 6.1 Ohrajauhon esikäsitteleminen

Molemmille ohrajauhoille tehtiin natriumkloridiuutto (1:10 w/v) suolaliukoisen materiaalin sekä suolan poistamiseksi. Uutto (20 °C, 20 min) tehtiin puolen litran sentrifugipulloissa ravistelussa (Heidolph Unimax 1010 Incubator, Heidolph Instruments). Uuton jälkeen pullot sentrifugoitiin (n. 12 400 g, 10 min, 20 °C, Sorvall Instruments RC5C, DuPoint, USA) ja erottuva supernatantti poistettiin.

Jäljelle jääneet sakat uutettiin mRO-vedellä (1:10 w/v) vesiliukoisen materiaalin poistamiseksi. Vesiuutto tehtiin samoin kuin natriumkloridiuutto: puolen litran sentrifugipulloja uutettiin ravistelussa 20 min (20 °C). Uuton jälkeen pullot sentrifugoitiin (n.16 400 g, 10 min, 20 °C) ja erottuva supernatantti poistettiin. Lopuksi sakka pakastettiin

(-80 °C) ja pakkaskuivattiin. Esikäsiteltyä ohrajauhoa valmistettiin tarpeen mukaan tutkimuksia varten. Kaikissa kokeissa käytettiin esikäsiteltyä ohrajauhoa.

## 6.2 SDS-PAGE

Kaikkia uuttoja tarkasteltiin SDS-PAGE:n avulla. SDS-PAGE:ssa käytetty kehikko oli XCell Surelock Mini Cell (Invitrogen, Life Technologies, USA) ja sähkölaite Bio-rad Power Pac 300 (BioRad Laboratories, USA). Näytteet valmistettiin sekoittamalla 40 µl näytettä 60 µl:aan SDS-puskuria (0,76 g tris-base, 20 ml 10 % SDS, 12,5 ml glyseroli, 17,5 ml mQ-H<sub>2</sub>O, hyppysellinen bromofenolisinistä (indicator pH 3–4,6, Merck, Saksa) pH 6,8), jossa oli 2 % β-merkaptoetanolia. Näytteitä kiehausutettiin 5 minuuttia 100 °C:ssa (Grant QBO2, Grant Instruments, UK) ja sentrifugoitiin 10 minuuttia (15 800 g, Eppendorf Centrifuge 5415C, Hinz GmbH, Saksa). SDS-PAGE:n geelinä käytettiin NuPage Bis Tris 10 % Mini -geeliä (12020211–1904, Invitrogen, Life Technologies, USA). Kuoppiin pipetoitiin näytettä 10 µl ja molekyylistandardia 4 µl (Novex Sharp Pre-Stained Proteins, LC5800, Invitrogen, Life Technologies, USA), minkä jälkeen kehikkoon lisättiin ohjeiden mukaan noin puoli litraa ajopuskuria (1 x MES SDS Running Buffer, NP0002, Invitrogen, Life Technologies, USA) ja 500 µl antioksidanttia (NuPage Antioxidant, NP0005, Invitrogen, UK). Jännitteenä ajossa käytettiin 200 V (ajon alussa virta noin 100 mA) ja ajoaika oli 35 minuuttia. Ajon jälkeen geelit jätettiin värjäytymään Coomassie Blue -väriliuokseen heilutuksessa yön yli. Yhden geelin värjäykseen käytettävässä väriliuoksessa oli 10 ml 0,5-prosenttista Coomassie Brilliant Blue R-250 värireagenssia, 30 ml 12-prosenttista trikloorietikkahappoa ja 30 ml mQ-vettä. Värireagenssissa oli 0,5 % Coomassie Blue -väriainetta laimennettuna etanolilla.

## 6.3 Hordeiinien geelisuodatus

Kaupallista ohrajauhoa punnittiin 3 grammaa mittapulloon, johon lisättiin 30 ml 0,1 M etikkahappoa. Näytettä uutettiin 30 min (50 °C) ravistelussa ja sentrifugoitiin 10 min (12 400 g, 20 °C).

Geelisuodatusputkeen (10 ml) laitettiin noin 4 ml Sephadex-geeliä (G-50, erotusalue 1500–30 000 g/mol, Pharmacia Fine Medicals, Ruotsi), joka oli valmistettu sekoittamalla Sephadex-jauhetta mRO-veteen silmämääräisesti. Putkeen lisättiin noin 6 ml 0,1 M etikkahappoa ja pinnan annettiin valua lähelle geelin yläpintaa. Tämän jälkeen putkeen lisättiin hordeiininäyte (10 ml) ja tippuvaa näytettä kerättiin 1 ml erissä eppendorf-putkiin.

Kun näytteen nestepinta oli lähellä Sephadex-geelin yläpintaa, putkeen lisättiin noin 6 ml 0,1 M etikkahappoa. Näytteitä kerättiin yhteensä 16 ja ne analysoitiin SDS-PAGE:lla kuten kappaleessa 6.2.

Geelikromatografia tehtiin toisen kerran yllä esitetyllä tavalla käyttämällä geelinä Bio-gel P-200 (Bio-Rad Laboratories, USA), jonka erotusalue oli 30 000–200 000 g/mol. Näytteitä kerättiin 0,5 ml eppendorf-putkiin ja analysoitiin SDS-PAGE:lla kuten kappaleessa 6.2.

#### 6.4 Saostaminen ammoniumsulfaatilla

Kaupallista ohrajauhoa uutettiin 0,1 M etikkahappoon suhteessa 1:10 (w/v). Näytteitä uutettiin ravistelussa (20 min, 50 °C) ja sentrifugoitiin 10 min (12 400g, 20 °C). Uutteiden supernatantteihin lisättiin ammoniumsulfaattia, kunnes sen pitoisuus liuoksissa oli 90 mg/ml. Näytteitä uutettiin uudelleen ravistelussa 2 min (50 °C) ja sentrifugoitiin 10 min (12 400 g, 20 °C). Sentrifugoitujen näytteiden supernatantit analysoitiin SDS-PAGE:lla kuten kappaleessa 6.2.

#### 6.5 Erottaminen uuttamalla

##### 6.5.1 Kolmen ohralajikkeen uuttaminen

Koska kaupallinen ohra sisältää hordeiineja monista eri ohralajikkeista, haluttiin hordeiiniin uuttumista tutkia kolmella eri ohralajikkeella. Esikäsittelemättömiä (käsittely esitelty kappaleessa 5.1) Jorma-, Kunnari- ja Inari-ohrajauhoja sekä käsiteltyä Jorma-ohrajauhoa uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla (1:10 (w/v), 20 min, 50 °C). Uuton jälkeen näytteet sentrifugoitiin (10 min, 15 800 g) ja supernatantit otettiin talteen ja uutto toistettiin edellä mainitulla tavalla. Tämän jälkeen sentrifugoitujen näytteiden sakat uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla, josta 2 % oli  $\beta$ -merkaptioetanolia (20 min, 50 °C). Uutteet sentrifugoitiin ja supernatantit otettiin talteen SDS-PAGE:a varten. Näytteet sekoitettiin SDS-puskuriin sekä  $\beta$ -merkaptioetanolin kanssa (5 %) että ilman. Ajo tehtiin kuten kappaleessa 6.2 mutta ajopuskurina käytettiin MOPS:ia (1 x MOPS SDS running buffer, 1088425, Invitrogen, Life Technologies, USA) ja ajoaika oli 50 minuuttia.

### 6.5.2 Hordeiinien uutaminen eri alkoholeilla ja lämpötiloissa

Jorma-ohrajauhoa uutettiin suhteessa 1:10 (w/v) 55 %:lla 2-propanolilla, 50 %:lla 1-propanolilla ja 50 %:lla etanolilla. Uuttoja tehtiin kolmessa eri lämpötilassa: 4 °C:ssa, 20 °C:ssa ja 50 °C:ssa (taulukko 6). Kaikkia näytteitä uutettiin ravistelussa 20 min, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (10 min, 15 800 g). Kaikista näytteistä otettiin supernatantti talteen SDS-PAGE:a varten. SDS-PAGE tehtiin kuten kappaleessa 6.2 (ajoaika 45 minuuttia, SDS-näytopuskurissa ei  $\beta$ -merkaptoetanolia).

Taulukko 6. Esikäsitellyn ohran (Jorma) uutossa käytetyt alkoholit ja uuttolämpötilat.

Näyte	Uutto	Lämpötila
1	55 % 2-propanoli	4 °C
2	55 % 2-propanoli	20 °C
3	55 % 2-propanoli	50 °C
4	näytteen 2 jäljelle jääneeseen sakkaan lisättiin 55 % 2-propanolia + 2 % 2-merkaptoetanolia	4 °C
5	50 % 1-propanoli	4 °C
6	50 % 1-propanoli	20 °C
7	50 % etanoli	4 °C
8	50 % etanoli	20 °C
9	50 % etanoli	50 °C

### 6.5.3 Hordeiinien uutaminen lämpökäsittelyillä ja eri pH:ssa

Jorma-ohrajauhoa uutettiin käyttämällä lämpökäsittelyä uuton eri vaiheissa. Kaikki näytteet uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla suhteessa 1:10 (w/v). Uuttomenetelmät on koottu taulukkoon 7. Uuttojen jälkeen näytteet sentrifugoitiin (15 800 g, 10 min) ja erottuneet supernatantit analysoitiin SDS-PAGE:lla. SDS-PAGE suoritettiin kuten kappaleessa 6.2 mutta ajopuskurina oli MOPS ja ajoaika 50 min.

Taulukko 7. Jorma-ohran 55 % 2-propanoli-uuton kuumennuskäsittelyn menetelmät.

Näyte	Uuttomenetelmä
1	Ohrajauho uutettiin veteen (1:10) ja kuumennettiin (3 min, 100 °C), jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin ja sakka uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla (50 °C, 20 min).
2	Ohrajauho uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla 17 min (50 °C), jonka jälkeen näytettä uutettiin vielä 3 min 80 °C:ssa.
3	Ohrajauho uutettiin 20 min (50 °C) 55 %:lla 2-propanolilla, jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin. Erottuneen näytteen supernatantti kuumennettiin 80 °C:ssa 3 min.
4	Ohrajauhoa uutettiin 20 min (50 °C) 55 %:lla 2-propanolilla.
5	Ohrajauhoa uutettiin 20 min (50 °C) 55 %:lla 2-propanolilla, jonka jälkeen näytteet saostettiin yön yli 4 °C:ssa.

Jorma-ohrajauhon hordeiinien saostumista tutkittiin eri pH:issa. Hordeiinit uutettiin suhteessa 1:10 (w/v) 55 %:lla 2-propanolilla (20 min, 50 °C), jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin (10 min, 15 800 g). Uutteen supernatantista kerättiin 10 näytettä, joiden pH:t säädettiin 0,1 M suolahapon (HCl) ja 0,05 M natriumhydroksidin (NaOH) avulla välille 3,7–9,8 (taulukko 9). pH:n säädön ja vorteksoinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin (10 min, 15 800 g) ja analysoitiin SDS-PAGE:lla kuten kappaleessa 6.2 (ajoaika 40 min).

Taulukko 9. Jorma-ohrajauhon uutto 55 % 2-propanolilla (suhteessa 1:10) ja uutteen pH.

Näyte	pH
1	3,63
2	4,30
3	5,7
4	6,55
5	7,38
6	7,94
7	8,70
8	9,11
9	9,77
10	9,84

## 6.6 Hordeiinien isoelektristen pisteiden määrittäminen

Hordeiinien isoelektristä fokusointia varten Jorma-ohrajauhon hordeiinit uutettiin kahdella eri tavalla. Ensimmäisessä kokeessa uutto tehtiin 55 %:lla 2-propanolilla (1:10 (w/v), 50 °C, 20 min), jonka sentrifugoidusta (10 min, 15 800 g) uutteesta otettiin supernatantti talteen. Jäljelle jäänyt sakka uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla, joka sisälsi 2 %  $\beta$ -merkapttoetanolaa, (1:10 w/v, 50 °C, 20 min). Näytteet sentrifugoitiin (10 min, 15 800 g) ja erottunut supernatantti otettiin talteen.

Toisessa menetelmässä ensimmäisen uuton (55 % 2-propanoli, 1:10 w/v, 20 min, 50 °C) jälkeen sakka uutettiin vielä kaksi kertaa 55 %:lla 2-propanolilla (1:10 w/v, 20 min, 50 °C, sentrifugointi 10 min, 15 800 g), jotta kaikki C-hordeiini saataisiin uutettua pois. Tämän jälkeen jäljelle jäänyt sakka uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla, josta 2 % oli  $\beta$ -merkaptotetanolia (1:10 w/v, 20 min, 50 °C). Uute sentrifugoitiin (10 min, 15 800 g) ja supernatantti otettiin talteen.

Kaksiulotteista elektroforeesia varten stripit (Immobiline Dry Strip, pH 3–10, 11 cm, 18–1016-61, GE Healthcare, USA) rehydroitiin valmistajan ohjeiden mukaan yön yli (DeStreak rehydration solution, 17–6003–19, GE Healthcare, USA ja IPG Buffer, pH 3-10, 17–6000–87, 99:1 v/v, GE Healthcare, USA) ja proteiininäytteet puhdistettiin 2-D Clean-Up Kitin (Clean-Up Kit 2D, 80–6484–51, GE Healthcare, USA) ohjeiden mukaan: hordeiininäytteitä pipetoitiin 220  $\mu$ l ja uutettiin Clean-Up Kitin presipitanttiin (550  $\mu$ l), jonka jälkeen niiden annettiin inkuboitua 15 minuuttia. Tämän jälkeen näyteputkiin lisättiin 550  $\mu$ l co-presipitanttia ja sentrifugoitiin (12 000 g, 4 °C, 5 min). Erottuneiden näytteiden supernatantit poistettiin, sakkoihin lisättiin 40  $\mu$ l co-presipitanttia, inkuboitiin (5 min), sentrifugoitiin edellä mainitulla tavalla ja supernatantit poistettiin. Jäljelle jääneisiin proteiinipelletteihin lisättiin 25  $\mu$ l vettä, 1 ml pesupuskuria ja 5  $\mu$ l pesuliuosta ja vorteksoitiin, kunnes pelletit olivat lienneet. Näytteitä inkuboitiin 30 min pakkasessa (–20 °C) ja vorteksoitiin aina 10 minuutin välein. Inkuboinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin kuten aiemmin, ja erottuneet supernatantit poistettiin. Pellettien annettiin kuivua muutama minuutti vetokaapissa, jonka jälkeen niihin lisättiin 30  $\mu$ l rehydraatioliuosta, vorteksoitiin ja annettiin inkuboitua muutama minuutti. Näytteisiin lisättiin vielä 1,5  $\mu$ l tributyylifosfiinia (TBF, 998–40–3, Sigma-aldrich, Saksa) ja noin 0,3  $\mu$ l amfolyyttiä (IPG Buffer) ja sentrifugoitiin kuten edellä. Näytteitä pipetoitiin ajotarjottimelle 15  $\mu$ l ja fokusointiin ETTAN IPGphor -laitteella (GE Healthcare, USA). Fokusointiohjelma on koottu taulukkoon 8.

Taulukko 8. Fokusointiohjelmassa käytetyt jännitteet ja ajat.

Jännite [V]	Jännite · Aika [Vh]
500	500
1000	800
6000	7000
6000	2200
500	max. 22 h

Seuraavana päivänä stripit tasapainotettiin ja tehtiin geelija. Stripit tasapainotettiin inkuboimalla niitä kouruissa ensin 25 minuuttia puskurissa, jossa oli 4 ml TPB:tä (50 mM tris-HCl (pH 6,8), 6 M urea, 2 % SDS, 20 % glyseroli), 80 mg ditriotreitolia (DTT) ja hyppysellinen bromofenolisinistä. Inkuboinnin jälkeen stripit siirrettiin puhtaisiin kouruihin, joissa oli 4 ml TPB:tä, 100 mg jodoasetamia sekä hyppysellinen bromofenolisinistä. Strippien annettiin inkuboitua 25 minuuttia pimeässä, jonka jälkeen ne siirrettiin geeleihin (12,5 % Tris-HCl, Bio-Rad Criterion Precast gel, 345–0102, BioRad Laboratories, UK). Kehikkona käytettiin Criterion Cell -systeemiä (Criterion Cell, Bio-Rad, 165–6001, Bio-Rad Laboratories, Italia) ja ajopuskurina 1 x TGS (25 mM, 192 mM glysiini, 0,1 % SDS, pH 8,6). Ajoaika oli 1 tunti jännitteen ollessa 200 V (400 mA). Ajon jälkeen geelit siirrettiin värjäytymään Coomassie Blue-väriliuokseen yön yli. Standardina geelissä käytettiin Novex<sup>®</sup> Sharp Pre-Stained Protein Standardia kuten kappaleessa 6.2.

## 6.7 Hordeiinien hapetuskokeet

### 6.7.1 Uutettujen hordeiinien esikäsitteleminen

Jorma-ohrajauhon proteiinit, jotka oli uutettu 55 %:lla 2-propanolilla kappaleessa 5.2.3 esitetyllä tavalla, sakattiin asetonilla oksidaatiota varten, koska alkoholi häiritsee oksidaatioreaktioita. Uutteeseen lisättiin kylmää asetonia (−20 °C) suhteessa 1:5 ja annettiin saostua tunnin ajan pakkasessa (−20 °C). Tämän jälkeen uute sentrifugoitiin, supernatantit kaadettiin pois ja sakat jätettiin kuivumaan yön yli (40 °C). Seuraavana päivänä kuivunut hordeini jauhettiin morttelissa.

### 6.7.2 Hordeiinien hapettaminen

Oksidaatio pH:ssa 4,5. Hordeiinien metallikatalysoitu oksidaatio perustui osin Katon ym. (1992) tutkimuksessa tehtyyn hapetukseen. Oksidaatiota varten eppendorf-putkiin punnittiin 2 mg kuivattua hordeiniä. Putkiin lisättiin 1 ml 0,05 mM kuparisulfaattia (CuSO<sub>4</sub>), 0,05 mM rautasulfaattia (FeSO<sub>4</sub>) tai mQ-vettä (kaikissa pH 4,5) (taulukko 10). Reaktio aloitettiin lisäämällä putkiin 100 µl joko 100 mM vetyperoksidia (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tai 100 mM askorbiinihappoa ja inkuboitiin ravistelussa 0, 2, ja 24 tuntia (40 °C). Kontrollinäytteisiin (0 h) ei lisätty vetyperoksidia tai askorbiinihappoa. Oksidaatioreaktiot pysäytettiin lisäämällä näytteisiin 10 µl 10 mM etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA).

Kaikki näytteet analysoitiin SDS-PAGE:lla, joka tehtiin samoin kuin kappaleessa 6.2: näytteisiin lisättiin 1ml SDS-näytepuskuria (SDS-näytepuskuri, jonka pH 8,5 ja jossa 2 % DTT:tä). Ajopuskurina käytettiin MOPS:ia ja ajoaika oli 50 minuuttia (200 V, 100 mA).

Taulukko 10. Metallikatalysoidussa oksidaatioissa käytetyt metalli- ja oksidanttiyhdistelmät.

reaktio (metalli + oksidantti)	Näytematriisin reaktioliuos (1ml)
$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{FeSO}_4$
$\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{CuSO}_4$
$\text{H}_2\text{O}_2$	mQ-vesi (ei metallia)
askorbiinihappo	mQ-vesi (ei metallia)
$\text{Cu}^{2+} + \text{askorbiinihappo}$	$\text{CuSO}_4$
$\text{Fe}^{3+} + \text{askorbiinihappo}$	$\text{FeSO}_4$

Oksidaatio pH:ssa 7,5. Kuivattua hordeiininäytettä punnittiin eppendorf-putkiin 2 mg. Näytteisiin lisättiin 1 ml 0,1 M fosfaattipuskuria (pH 7,4), jossa oli joko 0,05 mM kuparia, 0,05 mM rautaa tai ei lainkaan metallia (taulukko 11). Reaktiot aloitettiin lisäämällä 100 µl joko 100 mM vetyperoksidia tai 100mM askorbiinihappoa ja annettiin inkuboitua ravistelussa (40 °C) 0, 2 ja 24 tuntia. Reaktiot pysäytettiin lisäämällä 10 µl 10 mM EDTA:ta. Kontrollinäytteen (oksidaatio 0 h) lisäksi haluttiin tehdä kontrollit, joita inkuboitui 2 tuntia. Tarkoituksena oli tutkia, miten aika vaikuttaa proteiinin liukoisuuteen. Näytteet tehtiin kuten oksidaatioreaktiot mutta niihin ei lisätty vetyperoksidia tai askorbiinihappoa. Näytteet analysoitiin SDS-PAGE:lla kuten kappaleessa 6.2: Näytepuskurin pH oli 8,5 ja siihen lisättiin 2 % DTT:tä, ajopuskurina käytettiin MOPS:ia ja ajoaika oli 50 minuuttia (200 V, 144 mA).

Taulukko 11. Oksidaatioreaktiot pH:ssa 7,4 ja niissä käytetyt metallit.

Reaktio (metalli + oksidantti)	Käytetyt metallit (1ml)
$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$	0,1 M fosfaattipuskuri + 0,05 mM $\text{FeSO}_4$
$\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$	0,1 M fosfaattipuskuri + 0,05 mM $\text{CuSO}_4$
$\text{H}_2\text{O}_2$	0,1 M fosfaattipuskuri
askorbiinihappo	0,1 M fosfaattipuskuri
$\text{Cu}^{2+} + \text{askorbiinihappo}$	0,1 M fosfaattipuskuri + 0,05 mM $\text{CuSO}_4$
$\text{Fe}^{3+} + \text{askorbiinihappo}$	0,1 M fosfaattipuskuri + 0,05 mM $\text{FeSO}_4$

### 6.7.3 Oksidaatioreaktioiden analysoiminen kokoekskluusiokromatografilla

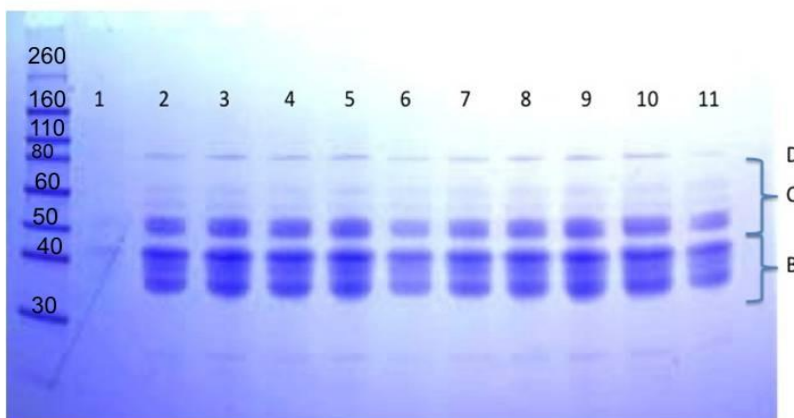
Oksidaatioreaktioita, jotka oli valmistettu kuten kappaleissa 5.8.1-3, analysoitiin lisäksi SE-HPLC:llä. Näiden metallikatalysoitujen oksidaatioreaktioiden lisäksi tehtiin kontrolli, jossa oli 2 mg näytettä, 1 ml mQ-H<sub>2</sub>O:ta (pH 4,5) ja 10 µl 10 mM EDTA:ta. EDTA:n

lisäyksen jälkeen näytteeseen lisättiin vielä 100 µl 100 mM vetyperoksidia. Tätä kontrollinäytettä inkuboitiin kaksi tuntia 40 °C:ssa, jotta proteiinien liukoisuus paranisi. Analyysia varten näytteisiin lisättiin 1 ml HPLC-näytekuskuria (1,5 % SDS, 50 mM natriumfosfaattia, pH 6,9), inkuboitiin 1 tunti 50 °C:ssa (näytteet, joiden pH oli 4,5) tai yön yli 40 °C:ssa (näytteet, joiden pH oli 7,4) ja sentrifugoitiin (10 min, 15 800 g). Näytteiden supernatanttia sekoitettiin suhteessa 1:1 HPLC-ajopuskuriin (0,1 % SDS, 20 % asetonitriili, 50 mM natriumfosfaatti, pH 6,9) ja sentrifugoitiin kuten aiemmin. Ennen analysointia näytteet suodatettiin (Acrodisc 13 mm syringe filter, 0,45 µm nylon membrane, Pall Life Sciences). Supernatanttia analysoitiin SE-HPLC:llä, jossa näytemäärä oli 100 µl, virtausnopeus 0,5 ml/min, ajoaika 120 minuuttia, paine noin 16 baria ja absorbanssina 210 nm. Kokoeksklusiokromatografi-laitteisto koostui pumpusta (Waters 515 HPLC pump, USA), diodirivi-detektorista (Waters Photodiode array detector, USA) ja näytteensyöttäjästä (Waters 717 plus autosampler). Erotusta varten proteiinikolonne (Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare, USA) ja peptidikolonne (Superdex Peptide 10/300 GL, GE Healthcare, USA) olivat liitetty yhteen. Oksidaatioreaktioiden kontrollinäytteiden piikit kerättiin ajosta ja tunnistettiin SDS-PAGE:lla. Näytteitä kerättiin SE-HPLC:ssä näkyvien piikkien mukaan niin, että kerääminen aloitettiin käyrän noustessa ja lopetettiin, kun käyrä palasi etenemään vaakatasossa. Näytteitä kerättiin yhteensä viisi ja ne konsentroituihin 60 °C:ssa (Speedvac Plus, SC 110A, Savant Instruments Inc, USA), kunnes näytettä oli jäljellä enää alle 1 ml. Konsentroituihin näytteisiin lisättiin SDS-näytekuskuria, jossa oli 2 % DTT:tä, suhteessa 1:1. Ajo suoritettiin kuten kappaleessa 6.2.

## 7 TULOKSET

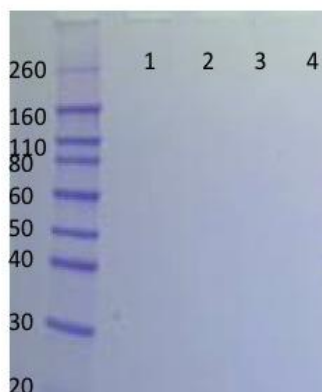
### 7.1 Geelisuodatus ja saostus

Geelisuodatuksella ei saatu erotettu C- ja B-hordeiineja. Hordeiinit eivät kulkeutuneet Sephadex-geelin läpi molekyylin koon mukaan vaan kaikki hordeiinit kulkivat geelin läpi yhtä aikaa (kuva 28). Vaikka työssä käytettiin kahta eri geeliä, joiden erotusalueet olivat 1500–30 000 ja 30 000–200 000 g/mol, kumpikaan ei pystynyt erottamaan hordeiiniryhmiä toisistaan. SDS-PAGE:n geeliltä voitiin kuitenkin nähdä selvästi hordeiiniryhmien molekyylipainot: D-hordeiinit näkyivät vyöhykkeenä noin 80 kDa alueella, C-hordeiinit näkyivät kahtena ohuena ja yhtenä paksuna vyöhykkeenä välillä 50–60 kDa ja B-hordeiinit paksuna vyöhykkeenä noin 35–45 kDa välillä.



Kuva 28. 0,1 M etikkahappoon uutetun ja geelisuodatuksella (geelinä Sephadex G-50) erotettu hordeiini. Kuvassa kirjaimet viittaavat hordeiiniryhmiin. SDS-PAGE -geelissä proteiinit pelkistettyinä.

Hordeiinien saostaminen ammoniumsulfaatilla ei erottanut C- ja B-hordeiineja (kuva 29). B-hordeiinien lisäksi kaikki hordeiiniryhmät saostuivat.

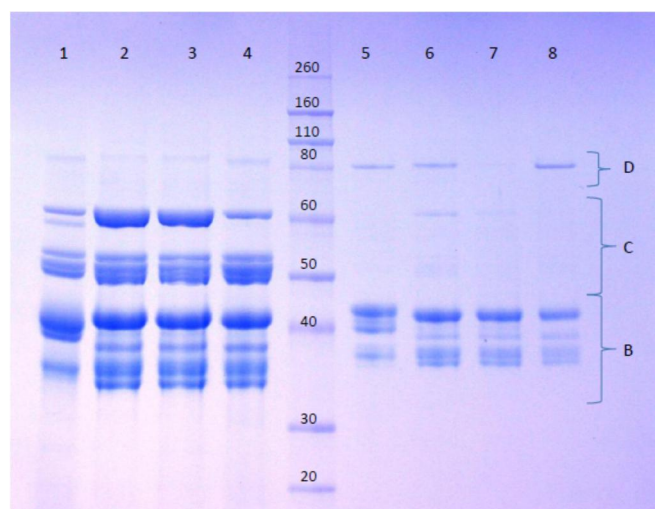


Kuva 29. Kaupallisen ohran hordeiinit erotettuna saostamalla ammoniumsulfaatilla. Kuvassa neljä rinnakkaista näytettä.

## 7.2 Hordeiinien uuttuvuus

### 7.2.1 Ohralajikkeet

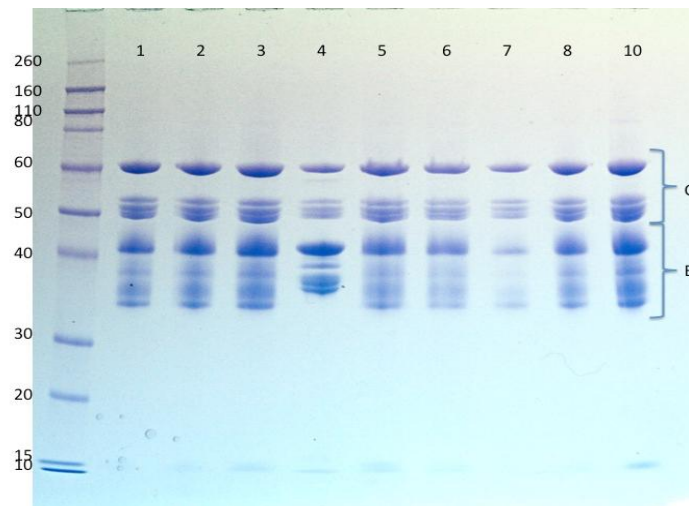
Hordeiineja uutui parhaiten alkoholiliuokseen Jorma-ohralajikkeesta. Ohralajike Kunnarin hordeiinit näyttivät hieman erilaisilta geelissä kuin muiden lajien hordeiinit ja Inari-lajikkeen uuttuvuus vaikutti olevan hieman heikompi kuin Jorma-ohralla (kuva 30). Kaikkien lajikkeiden hordeiiniryhmät olivat kuitenkin lähes samankokoisia. Työssä tutkittiin lisäksi, olisiko esikäsittelyllä vaikutusta Jorma-ohran hordeiinien uuttumiseen. Esikäsittelyssä ohrajauhosta poistettiin vesi- ja suolaliukoinen materiaali, jonka jälkeen jauho pakkaskuivattiin. Esikäsitellyn ja esikäsittelemättömän Jorma-ohran D-hordeiinien uuttuvuudessa oli havaittavissa pieni ero: käsittelemättömän Jorma-ohran sakasta ei uuttunut D-hordeiineja. Lisäksi esikäsitellystä Jorma-ohrasta jäi uuttumatta vähän C-hordeiineja (näyte 6). Näytteissä 5-8 ei havaittu juuri lainkaan C-hordeiineja mutta myös B-hordeiinien määrä geelissä vaikutti olevan pienempi. Koska Jorma-ohralla oli hyvät jauhamisominaisuudet (kuorettomuus) ja uuttuvuus, sitä päätettiin käyttää muissa kokeissa näytteenä.



Kuva 30. Eri ohralajikkeiden uuttuminen 55 %:lla 2-propanolilla ja ohrajauhon esikäsitelyn vaikutus uuttuvuuteen. Näytteet 1 ja 5) Kunnari, 2 ja 6) Esikäsitelty Jorma-ohra, 3 ja 7) esikäsittelemätön Jorma-ohra ja 4 ja 8) Inari. Näytteet 1–4 uutettuna 55 %:lla 2-propanolilla ja näytteet 5-8 ensimmäisen uuton sakka uutettuna 55 %:lla 2-propanolilla, jossa 2 %  $\beta$ -merkaptetaanolia. SDS-näytepuskurissa pelkistintä vain näytteissä 5-8.

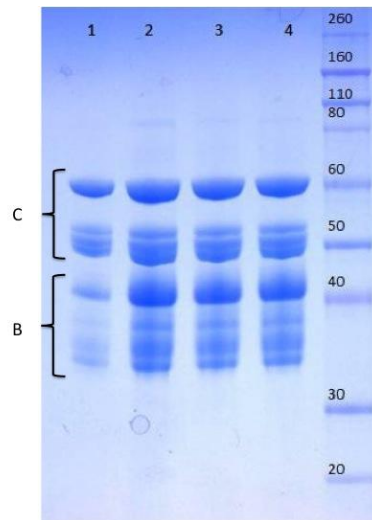
### 7.2.2 Uuttolämpötila ja alkoholi

Tutkituilla alkoholeilla ei ollut merkittävää vaikutusta hordeiinien uuttumiseen (kuva 31). Näytteessä 7, joka oli uutettu 4 °C:ssa 50-prosenttisella alkoholilla, kaikkien hordeiinien uuttuminen oli hieman heikompaa kuin muissa uutteissa. Tämä viittaa hordeiinien uuttuvuuden heikkenemiseen lämpötilan laskiessa. Näytteessä 4, joka oli näytteestä 2 uutetun sakan uutto 55-prosenttisella 2-propanolilla, josta 2 % oli  $\beta$ -merkaptotetanolilla, havaittiin uuttumatta jäänyttä C-hordeiinia. Tulosten perusteella päätettiin myöhemmissä uutoissa käyttää alkoholiliuoksena 55-prosenttista 2-propanolia ja uuttolämpötilana 50 °C.



Kuva 31. Hordeiinit uutettuina eri alkoholeihin eri lämpötiloissa. Kuvassa hordeiinit uutettuna: 1) 55 %:lla 2-propanolilla, 4 °C, 2) 55 %:lla 2-propanolilla, 20 °C, 3) 55 %:lla 2-propanolilla, 50 °C, 4) näytteestä 2 jäänyt sakka uutettuna 55 %:lla 2-propanolilla + 2 %  $\beta$ -merkaptotetanolilla, 4 °C, 5) 50 %:lla 1-propanolilla, 4 °C, 6) 50 %:lla 1-propanolilla, 20 °C, 7) 50 %:lla etanolilla, 4 °C, 8) 50 %:lla etanolilla, 20 °C ja 9) 50 %:lla etanolilla, 50 °C. SDS-puskuriin ei lisätty pelkistintä.

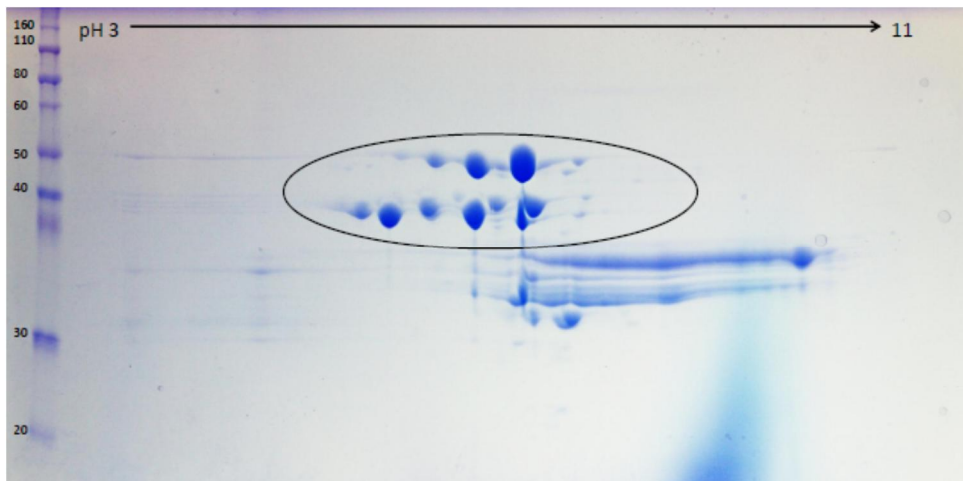
Lämpökäsittelyillä ei ollut merkittävää eroa hordeiinien uuttumiseen (kuva 32). Kokeella haluttiin nähdä, voisiko lämpökäsittely saada B-hordeiinit saostumaan. Näyte 1, joka oli ensin liuotettu veteen ja kuumennettu, kokonaisuuttuvuus alkoholiliuokseen oli hieman heikompaa kuin muissa näytteissä. Ohrajauhosta, joka oli uutettu (55 % 2-propanoli) ja sen jälkeen ollut yön yli kylmässä (4 °C), oli saostunut B-hordeiineja vähemmän kuin 50 °C:ssa uutetuista jauhoista (kuva 36, sivulla 49). Hordeiinien liukoisuus oli kuitenkin kokonaisuudessaan heikompaa matalassa lämpötilassa.



Kuva 32. Lämpökäsittelyn vaikutus ohran hordeiinien uuttuvuuteen. Näyte 1) Liuotettu ensin veteen (1:10), jossa kiehaus 3 min (100 °C) ja jonka jälkeen näyte sentrifugoitu ja sakka uutettu 55 %:lla 2-propanolilla (50 °C, 20 min). Näyte 2) Uutto 55 %:lla 2-propanolilla 17 min (50 °C), jonka jälkeen näytettä uutettu vielä 3 min 80 °C:ssa. Näyte 3) Uutto 20 min (50 °C) 55 %:lla 2-propanolilla, jonka jälkeen näyte sentrifugoitu. Erottuneen näytteen supernatantti kuumennettu 80 °C:ssa 3 min. Näyte 4) Uutto 20 min (50 °C) 55 %:lla 2-propanolilla. SDS-puskuriin ei lisätty pelkistintä.

### 7.2.3 Hordeiinien isoelektristen pisteet ja pH

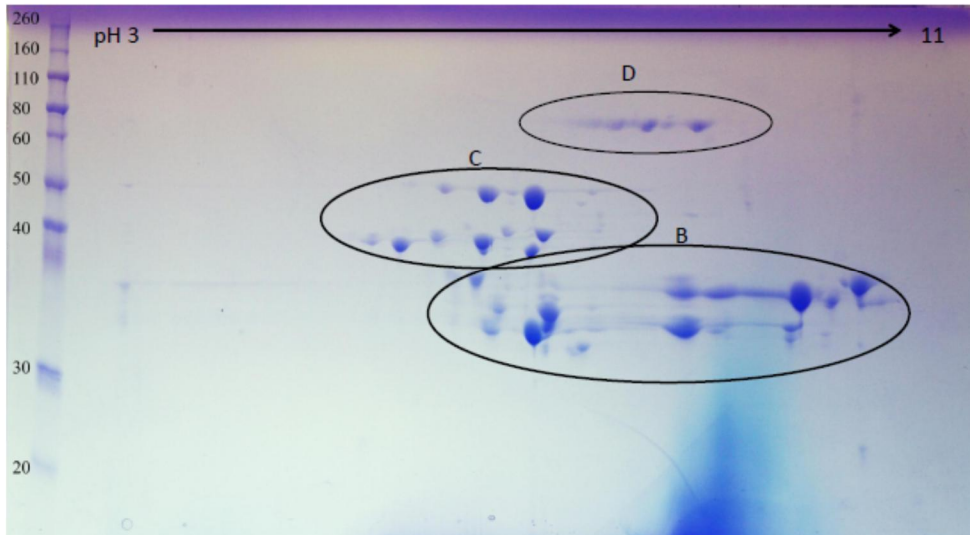
Hordeiinien, jotka olivat uutettu 55-prosenttisellä 2-propanolilla, kaksikulotteisessa elektroforeesissa näkyivät C-hordeiinit pH-alueella 5-7 (kuva 33). Uuttuneet B-hordeiinit näkyivät pH-alueella 6,5–8,5.



Kuva 33. Uutetun (55 % 2-propanoli), esikäsitellyn Jorma-ohran kaksikulotteinen elektroforeesi, jossa ympyröitynä uuttuneet C-hordeiinit ja nauhana näkyvät B-hordeiinit.

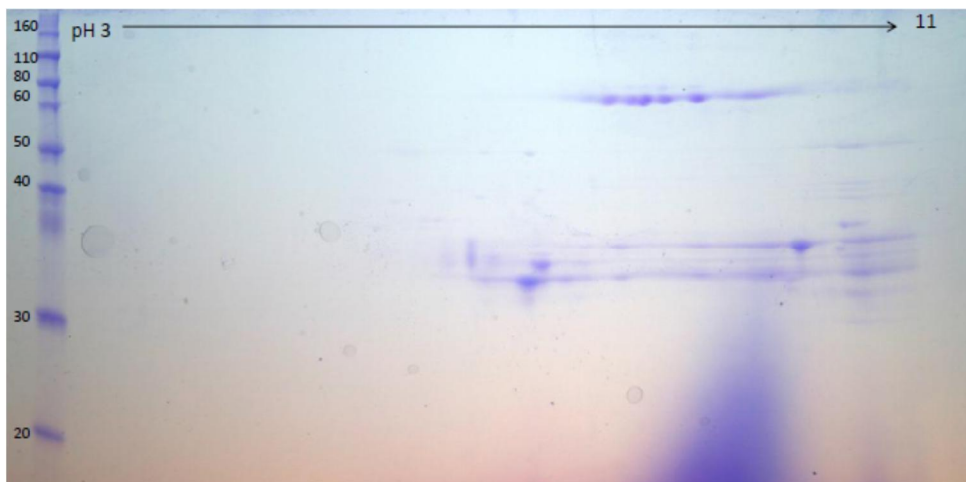
Hordeiinien toisessa uutossa, jossa ensimmäisen uuton sakka uutettiin 55 %:lla 2-propanolilla ja 2 %:lla oli  $\beta$ -merkapttoetanoli, B-hordeiinit näkyivät selkeämmin pH-alueella 6,5–8,5 ja D-hordeiinit pH-alueella 7–7,5 (kuva 34). B-hordeiinien eri proteiinien

erottuminen oli parempi kuin ensimmäisessä uutossa, sillä proteiinien juovamaisuus oli vähentynyt. Lisäksi geelissä näkyi uuttumatta jääneet C-hordeiinit, joskin ne näkyivät hieman heikommin kuin ensimmäisessä geelissä.



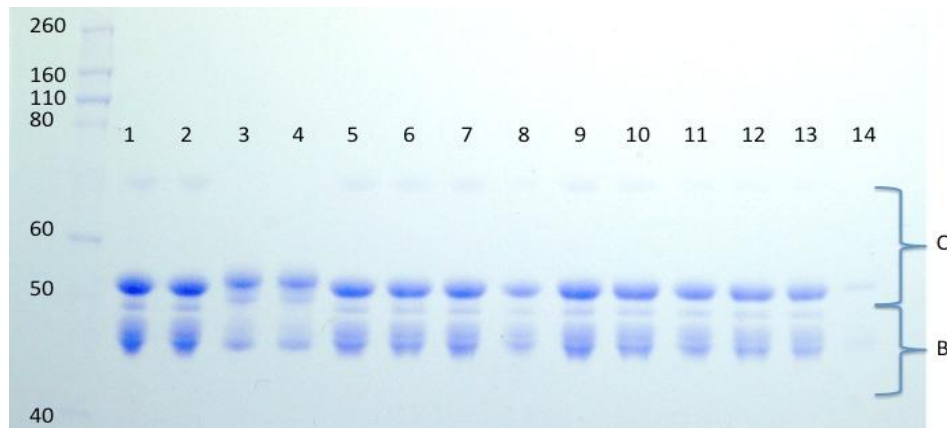
Kuva 34. Uutetun (55 % 2-propanoli), esikäsitellyn Jorma-ohran sakan supernatantti (sakka uutettu 55 %:lla 2-propanolilla, jossa 2 %  $\beta$ -merkapttoetanolia). Ympyröidyissä alueissa D-, C- ja B-hordeiinit.

Kun esikäsiteltyä ohrajauhoa pestiin 55 %:lla 2-propanolilla kaksi kertaa, jäljelle jääneestä sakasta uutui alkoholiliuokseen pelkistimen kanssa D-hordeiineja sekä hyvin vähän B-hordeiineja (kuva 35). Kaikki C-hordeiinit olivat siis uuttuneet 55 %:lla 2-propanolilla.



Kuva 35. Kaksiulotteinen elektroforeesi Jorma-ohrajauhosta, joka oli ensin pesty kaksi kertaa 55 %:lla 2-propanolilla, jonka proteiinit uutettu 55 %:lla 2-propanolilla, jossa 2 %  $\beta$ -merkapttoetanolia.

pH:lla ei ollut suurta vaikutusta hordeiinien uuttumiseen. Vaikka kaksiulotteisen elektroforeesin tulosten mukaan B- ja C-hordeiineilla oli erilaiset isoelektristen pisteiden alueet, B-hordeiinit eivät saostuneet oman isoelektrisen pisteen alueella (kuva 36).



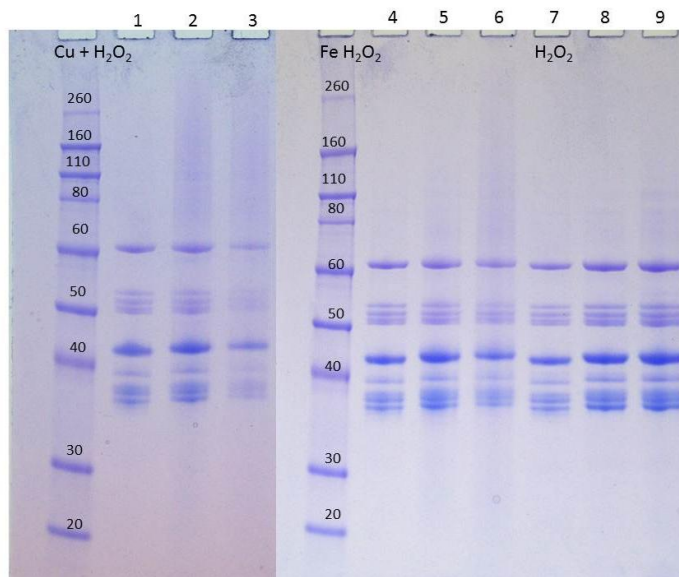
Kuva 36. Hordeiinien uuttuminen eri lämpötiloissa ja liukoisuus eri pH:issa. Geelissä 1) ja 2) uutto 55 %:lla 2-propanolilla (50 °C), 3) ja 4) 2 yötä 55 %:lla 2-propanolilla uuttuneen näytteen supernatantti, 5) pH 3,68, 6) pH 4,30, 7) pH 5,7, 8) pH 6,55, 9) pH 7,38, 10) pH 7,94, 11) pH 8,70, 12) pH 9,11, 13) pH 9,77, 14) pH 9,84. Geelissä näytteet pelkistettyinä.

### 7.3 Hordeiinien hapettuminen

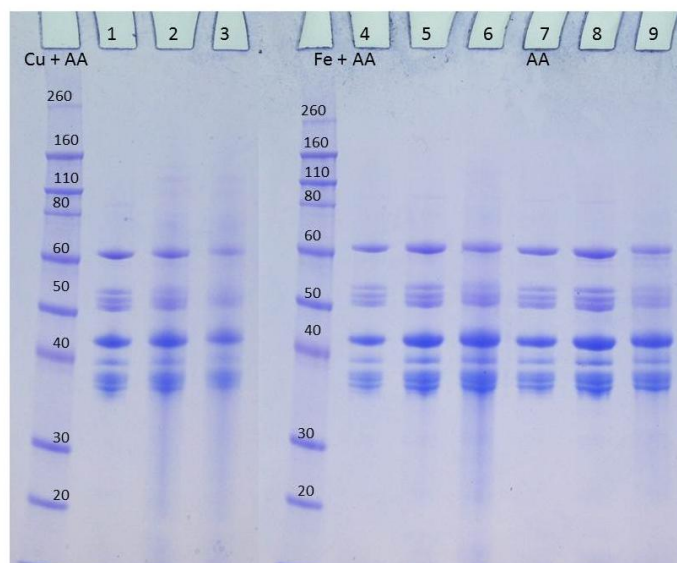
#### 7.3.1 Hordeiinien pilkkoutuminen hapetuksessa

Hordeiinit pilkkoutuivat metallikatalysoidussa oksidaatioissa, kun metallina käytettiin kuparia ja oksidanttina vetyperoksidia (kuva 37). Vetyperoksidin lisäksi askorbiinihappo toimi hyvin oksidanttina kuparikatalysoidussa reaktiossa (kuva 38). Rauta toimi paremmin katalysaattorina askorbiinihapolla tehdyissä oksidaatioissa kuin vetyperoksidilla tehdyissä oksidaatioissa. Ilman metallia oksidaatioreaktio oli hyvin hidasta: 24 tunnin inkuboinnin jälkeen geelissä nähtiin vain vähäistä proteiinien pilkkoutumista.

Oksidaatioreaktioihin vaikutti selvästi hordeinin käsittely ennen reaktioita. Hordeiininäytteen saostus ja kuivaus huononsivat näytteen liukenemistä uudelleen ja tämä saattoi vaikeuttaa oksidaatioreaktioiden tapahtumista proteiineissa.



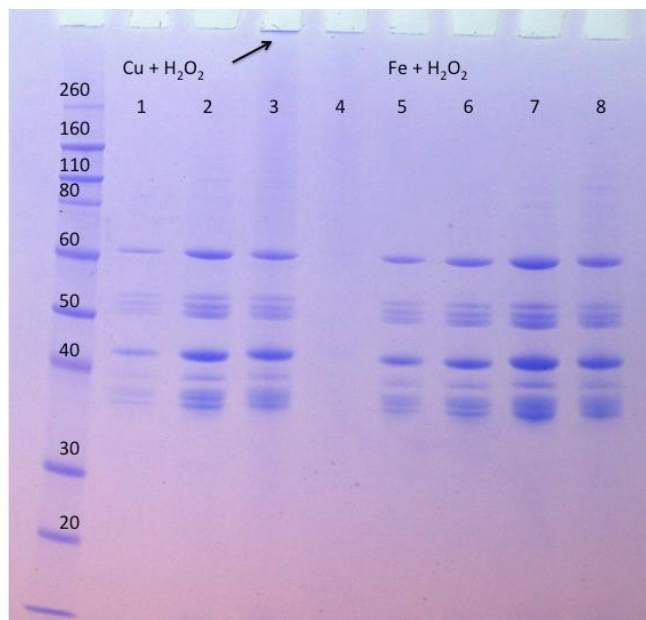
Kuva 37. 55 %:lla 2-propanolilla uutettujen hordeiinien metallikatalysoitu oksidaatio vetyperoksidilla pH:ssa 4,5. Kuvassa 1-3: kuparikatalysoitu oksidaatio, jossa inkubointiaika näytteessä 0 h, 2 h ja 24h. Numerot 4-6: rautakatalysoitu oksidaatio, joissa inkubointiajat olivat 4, 5 ja 24 h. Numerot 7-9: oksidaatio ilman metallia, joissa inkubointiajat olivat 0,2 ja 24 h. Geelissä näytteet pelkistettyinä.



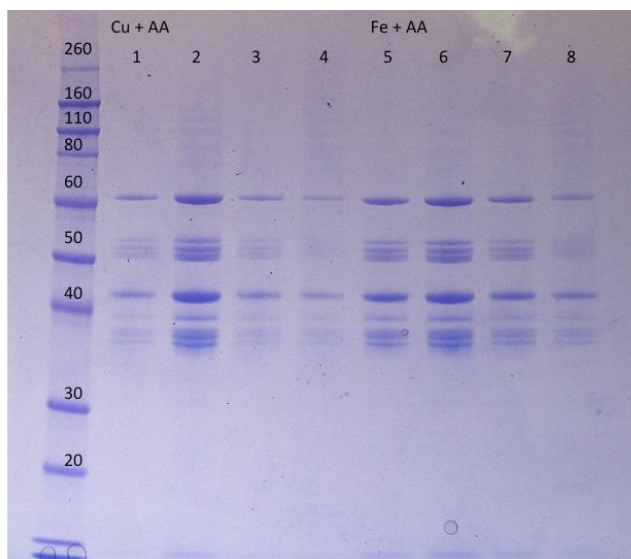
Kuvassa 38. 55 %:lla 2-propanolilla uutettujen hordeiinien metallikatalysoitu oksidaatio askorbiinihapolla pH:ssa 4,5. Numerot 1-3: kuparikatalysoitu oksidaatio, jossa inkubointiajat olivat vasemmalta lähtien 0,2 ja 24 tuntia. Numerot 4-6: rautakatalysoitu oksidaatio, joissa inkubointiajat olivat 0, 2 ja 24 tuntia. Numerot 7-9: oksidaatio ilman metallia, joissa inkubointiaikoina 0, 2 ja 24 tuntia. Geelissä näytteet pelkistettyinä.

Tehokkain oksidaatiomenetelmä pH:ssa 7,4 oli reaktio, jossa käytettiin metallina kuparia ja oksidanttina vetyperoksidia (kuva 39). Näytteessä, jota oli inkuboitu 24 tuntia, proteiinit olivat hajonneet miltei täysin. Kuparikatalysoidussa oksidaatiossa havaittiin 2 tuntia inkuboidussa näytteessä aggregoitumista, mikä näkyi geelissä geelikuopan värjäytymisestä siniseksi (= proteiinit, jotka olivat jääneet näytekuppaan). Esikokeissa havaittiin, että kontrollinäytteet (0 h inkubointi) eivät näkyneet kunnolla SDS-PAGE -geeleissä, jolloin päätettiin tehdä kontrollinäyte, jota inkuboititiin 2 h. Tämä paransi hordeiinien liukenemistä

ja ne näkyivät paremmin geeleissä. Rautakatalysoitu oksidaatio vetyperoksidin kanssa vaikutti pilkkovan proteiineja hitaammin. Rautakatalysoidussa oksidaatioissa, jota oli inkuboitu 2 tuntia, proteiinien määrä vaikutti olevan isompi kuin kontrollinäytteissä. pH:lla oli merkitystä hordeiinien oksidaatioon askorbiinihapolla (kuva 40). Emäksinen pH oli selvästi tehokkaampi askorbiinihapolla tehdyssä oksidaatiossa kuin hapan pH.



Kuva 39. 55 %:lla 2-propanolilla uutettujen hordeiinien metallikatalysoitu oksidaatio. Kuvassa 1-4: Kuparikatalysoitu oksidaatio, joissa 1) kontrolli, 0 h, 2) kontrolli 2 h 3) oksidaatio 2 h, 4) oksidaatio 24 h. Numerot 5-8: rautakatalysoitu oksidaatio, joissa 5) kontrolli 0 h, 6) kontrolli 2 h, 7) oksidaatio 2 h ja 8) oksidaatio 24 h. Kuvassa nuoli osoittaa proteiineja, jotka näkyvät geelin ”taskussa”. Geelissä näytteet pelkistettyinä.



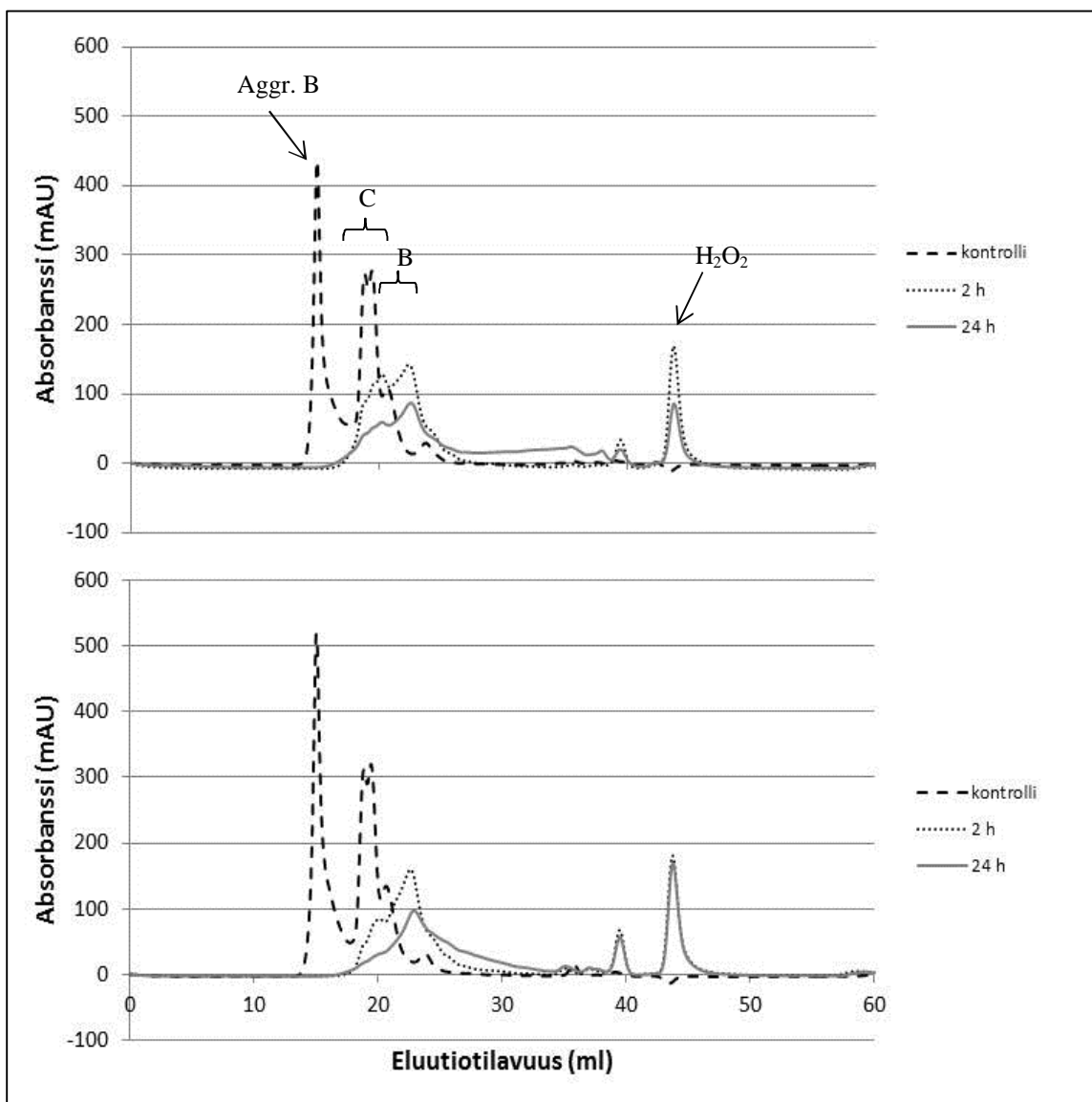
Kuva 40. 55 %:lla 2-propanolilla uutettujen hordeiinien metallikatalysoitu oksidaatio askorbiinihapolla pH:ssa 7,4. Kuvassa numerot 1-4: kuparikatalysoitu oksidaatio, joissa 1) kontrolli 0 h, 2) kontrolli 2 h, 3) oksidaatio 2 h ja 4) oksidaatio 24 h. Numerot 5-8: rautakatalysoitu oksidaatio, joissa 5) kontrolli 0 h, 6) kontrolli 2 h, 7) oksidaatio 2 h ja 8) oksidaatio 24 h. Geelissä näytteet pelkistettyinä.

### 7.3.2 Hordeiinien hapetuksen analysointi kokoekskluusiokromatografilla

Kaikissa oksidaatioreaktioissa suurten hordeiinien määrä laski. SE-HPLC tuki siis tuloksia, joita saatiin SDS-PAGE:lla. Kontrollinäytteistä kerättiin SE-HPLC:ssä näkyvät piikit, jotka konsentroidiin ja analysoitiin SDS-PAGE:lla. SDS-PAGE:n geelin mukaan SE-HPLC:ssä näkyvä ensimmäinen piikki oli B-hordeiineja (ei kuvaa). Koska piikit tulevat ulos suuruusjärjestyksessä, suurimmat molekyylit ensin, pääteltiin ensimmäisen piikin olevan aggregoituneita B-hordeiineja. Tämän jälkeen ns. kaksoispiikki oli SDS-PAGE:n mukaan C-hordeiineja. Kaksoispiikin oikean reunan ”olkapää” ja noin 25 ml eluutiotilavuuden kohdalla oleva piikki oli B-hordeiineja.

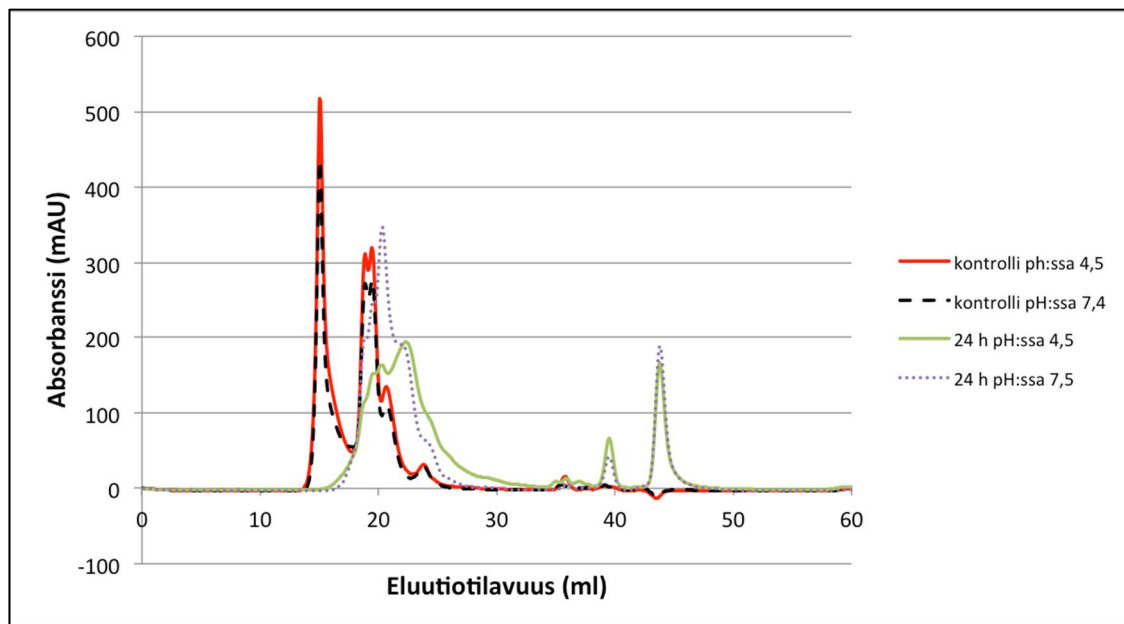
Piikki, joka näkyi kaikissa näytteissä noin 45 ml:n eluutiotilavuuden kohdalla, näkyi myös kontrollissa, johon oli lisätty vetyperoksidia (ei kuvaa). Tuloksen mukaan kuvissa nähtävä viimeinen piikki ei ollut hordeiinien pilkkoutumistuotteita vaan aiheutui reaktiossa käytetystä vetyperoksidista.

SE-HPLC:n tulosten mukaan kuparikatalysoitu oksidaatio vetyperoksidilla (pH 4,5) pilkkoi tehokkaimmin prolamiineja (kuva 41). Jo kahden tunnin inkuboinnin jälkeen aggregoituneet B-hordeiinit olivat hävinneet (piikki 15 ml:n eluutiotilavuuden kohdalla) ja tilalle tullut piikki noin 40 ml:n eluutiotilavuuden kohdalle. Reaktio oli selvästi edennyt 24 tunnin inkuboinnin aikana ja lisäksi oli muodostunut enemmän erikokoisia proteiineja (noin 25–35 ml:n eluutiotilavuus). Tämä viittaa hordeiinien pilkkoutumiseen, jossa pilkkoutumistuotteet nähdään näissä kohdissa virtausnopeutta (ne siis kulkeutuvat hitaammin kolonnissa pienen kokonsa takia). Kuitenkaan pienten peptidien ja aminohappojen määrä ei ollut kasvanut 24 tunnin inkuboinnin aikana. Kuparikatalysoitu oksidaatio vetyperoksidilla pH:ssa 7,4 oli hyvin samankaltainen kuin pH:ssa 4,5. Neutraalissa pH:ssa isokokoisia proteiineja oli kuitenkin enemmän (noin 20–30 ml:n eluutiotilavuuden kohdalla) ja reaktiotuotteita hieman vähemmän (noin 40 ml eluutiotilavuuden kohdalla).



Kuva 41. SE-HPLC ohran 55 %:lla 2-propanolilla uutetuista hordeineista, joita oli hapetettu käyttämällä oksidanttina vetyperoksidia ja metallikatalyyttinä kuparia pH:ssa 4,5. Ylemmässä kuvassa reaktion pH 7,4 ja alemmassa 4,5. Oksidaatioreaktioiden inkubointiajat olivat 0 (kontrolli), 2 ja 24 tuntia. Absorbanssit detektoitiin aallonpituudella 210 nm. Kuvassa Aggr B = aggregoituneita B-hordeiineja ja C = C-hordeiineja, B = B-hordeiineja ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = vetyperoksidia.

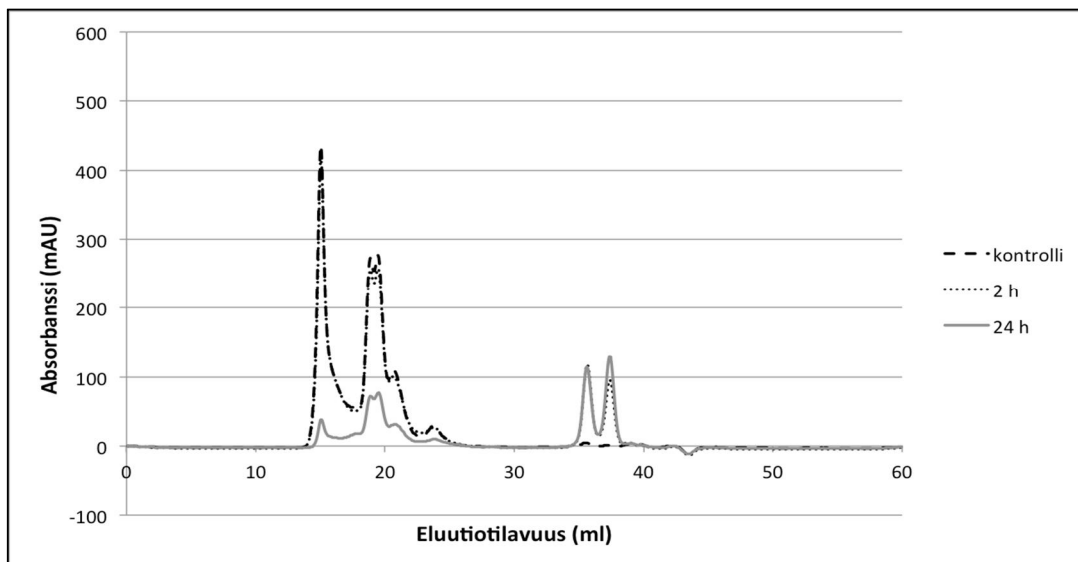
SE-HPLC tuki SDS-PAGE:lla analysoituja rautakatalysoidun vetyperoksidi-oksidaatioreaktioiden tuloksia (kuva 42). Rauta ei siis ollut yhtä tehokas metallikatalyytti kuin kupari. Rauta kuitenkin pilkkoi hordeiineja hieman enemmän, kun pH oli hapan (4,5). Kuvasta havaittiin myös, että eri pH:issa kontrollien piikit olivat hieman erikokoiset. Tämä saattoi johtua hordeiinien erilaisesta liukenemisestä happamaan ja neutraaliin liuokseen.



Kuva 42. SE-HPLC ohran 55 %:lla 2-propanolilla uutetuista hordeiineista, joita oli hapetettu käyttämällä oksidanttina vetyperoksidia ja metallikatalyyttinä rautaa sekä pH:na joko 4,5 tai 7,4. Absorbanssit detektoitiin aallonpituudella 210 nm.

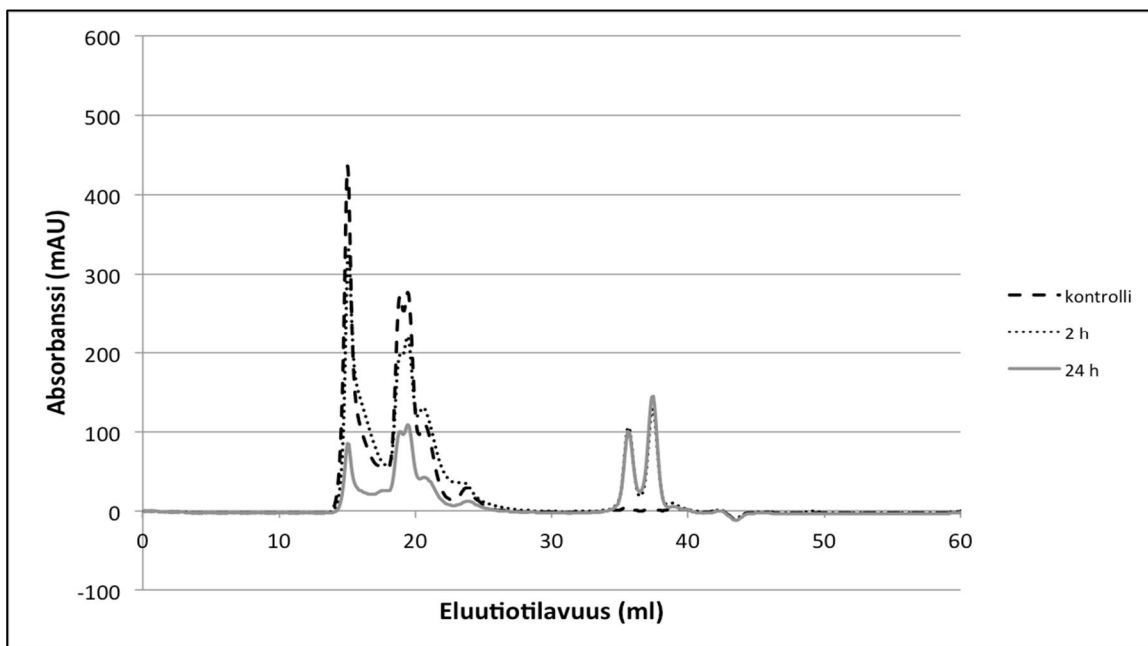
Askorbiinihappo oli pilkkonut hordeiineja selvästi eri tavalla kuin vetyperoksidi. Askorbiinihapolla tehdyissä oksidaatioissa oli vielä 24 tunnin inkuboinnin jälkeen jäljellä suurikokoisia proteiineja. Lisäksi reaktioissa näytti vaikuttavan enemmän pH kuin käytetty metalli. Kuten vetyperoksidilla tehdyissä reaktioissa, myös näissä reaktioissa viimeiset kaksi piikkiä (noin 38–40 ml:n eluutiolavuuden kohdalla) johtuivat askorbiinihaposta, eivätkä siis olleet oksidaation reaktiotuotteita.

Kupari-askorbiinihappo-reaktiossa oli erikoista se, etteivät kahden tunnin inkuboinnin jälkeen ollut aggregoituneet B-hordeiinit ja C-hordeiinit pilkkoutuneet juuri lainkaan (kuva 43). Lisäksi reaktioissa ei nähty reaktiotuotteita kuten vetyperoksidilla tehdyissä reaktiossa.



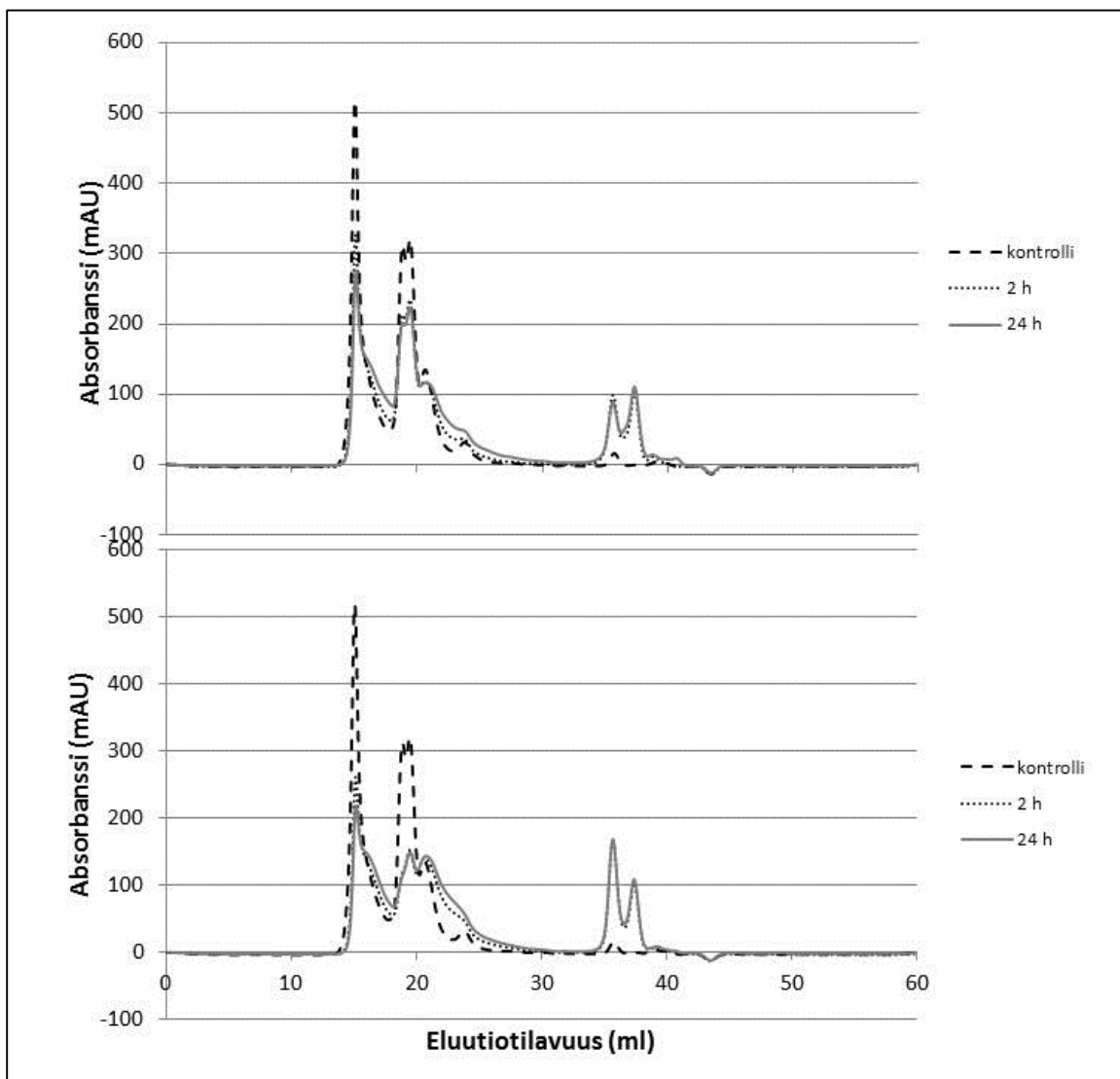
Kuva 43. SE-HPLC ohran 55 %:lla 2-propanolilla uutetuista hordeineista, joita oli hapetettu käyttämällä oksidanttina askorbiinihappoa ja metallikatalyyttinä kuparia pH:ssa 7,4. Oksidaatioreaktioiden inkubointiajat olivat 0 (kontrolli), 2 ja 24 tuntia. Absorbanssit detektoitiin aallonpituudella 210 nm.

Rauta-askorbiinihappo-reaktio pH:ssa 7,4 oli samankaltainen kuin kupari-askorbiinihapolla tehty oksidaatio (kuva 44). Tässä reaktioissa oksidaatio oli edennyt 2 tunnin inkuboinnin jälkeen hieman enemmän kuin kuparikatalysoidussa reaktiossa. 24 tunnin inkuboinnin jälkeen aggregoituneita B-hordeiineja ja C-hordeiineja oli jäljellä enemmän kuin kuparikatalysoidussa reaktiossa.



Kuva 44. SE-HPLC ohran 55 %:lla 2-propanolilla uutetuista hordeineista, joita oli hapetettu käyttämällä oksidanttina askorbiinihappoa ja metallikatalyyttinä rautaa pH:ssa 7,4. Oksidaatioreaktioiden inkubointiajat olivat 0 (kontrolli), 2 ja 24 tuntia. Absorbanssit detektoitiin aallonpituudella 210 nm.

Happamassa pH:ssa tehtyjen askorbiinihappo-oksidaatioreaktioiden tulokset olivat samantyyppisiä käytettäessä kuparia ja rautaa (kuva 45), joskin raudalla suurempi osa hordeineista pilkkoutui. Näissä reaktioissa aggregoituneiden B- ja C-hordeiinien piikit näyttivät pienentyneen 2 tunnin inkuboinnin jälkeen, jonka jälkeen reaktion eteneminen hidastui.



Kuva 45. SE-HPLC ohran 55 %:lla 2-propanolilla uutetuista hordeineista, jotka oli hapetettu käyttämällä oksidanttina askorbiinihappoa ja katalyyttinä kuparia (yllä) ja rautaa (alla). Reaktioissa inkubointiaikoina olivat 0 (kontrolli), 2 ja 24 tuntia sekä pH 4,5.

## 8 POHDINTA

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli erottaa ohran B- ja C-hordeiinit toisistaan ja tutkia metallikatalysoidun oksidaation vaikutusta näihin hordeeiineihin. Hordeiiniryhmien erottaminen osoittautui kuitenkin haasteelliseksi. Mikään tutkittu menetelmä ei erottanut täydellisesti B- hordeiineja ja C-hordeiineja.

Kokeissa käytettiin aikaisemmin muissa tutkimuksissa esiintyviä hordeiinien erotusmenetelmiä: geelisuodatusta ja saostusta. Menetelmät eivät kuitenkaan erottaneet hordeiiniryhmiä. Schmitt (1979) totesikin, että ohran hordeiinit eivät erotu geelisuodatuksessa molekyylipainon mukaan, koska ne adsorboituvat kolonnimatriisiin. Ammoniumsulfaattisaostuksessa, jossa tavoitteena oli saostaa ohran B-hordeiinit, saostuivatkin kaikki hordeiinit eikä B- ja C-hordeiiniryhmiä siis saatu erilleen.

Koska uuttamista on käytetty monessa aikaisemmassa tutkimuksessa hordeiinien erotusmenetelmänä (Schmitt 1979; Shewry ym. 1978; Marchylo ym. 1980 ja Peltonen ym. 1994), haluttiin tässäkin työssä tutkia hordeiiniryhmien uuttumista. Uuttamisella saatiinkin hordeiiniryhmät erilleen melko hyvin, sillä C-hordeiinit ja vain osa B-hordeiineista uuttuivat. Tästä uutosta jäljelle jääneessä sakassa oli loput B-hordeiinit ja D-hordeiinit. Näiden tulosten perusteella haluttiin syventyä ja kehittää hordeiiniryhmien uuttoa.

Eri ohralajikkeiden uuttuvuutta tutkittiin uuttamalla kolmea ohralajiketta mutta ohralajikkeiden välillä ei ollut merkittävää eroa uuttumisessa alkoholiliuoksiin. Koska kuorettoman Jorma-ohran proteiinit olivat samankaltaisia kuin muissa lajikkeissa, sen uuttuvuus oli hyvä ja se oli kuorettomuuden takia yksinkertainen jauhaa, päätettiin lajiketta käyttää näyttemateriaalina.

Paras erottamiseen käytettävä alkoholi haluttiin varmistaa vertailemalla eri alkoholiliuoksia. B- ja C-hordeiineja ei saatu erotettua eri alkoholeihin kuten Shewryn (1980) tutkimuksessa. Tämän työn tulosten perusteella 55 % 2-propanoli 50 °C:n lämpötilassa uutti parhaiten C-hordeiinit mutta mukana oli myös B-hordeiineja. Jäljelle jääneestä sakasta uuttuivat loput B-hordeiinit ja D-hordeiinit, kun uutossa käytettiin pelkistintä. Eri uuttolämpötiloilla ei tämän tutkimuksen mukaan ollut merkittävää eroa hordeiiniryhmien erottumiseen. Uuttolämpötilan nosto näytti kasvattavan vain hieman hordeiinien saantoa. Myöskään kuumentamalla uutteita polymeerisiä B- ja D-hordeiineja ei saatu saostumaan eikä hordeiiniryhmiä siten erottumaan toisistaan.

Shewryn ym. (1999) mukaan B-hordeiinien isoelektrinen piste on välillä 6,5–8,5. Tämä voitiin vahvistaa työssä tehdyllä kaksiulotteisella elektroforeesilla. Tulosten mukaan C-hordeiinien isoelektrinen piste oli välillä 5–7. Toisin kuin Shewryn (1987) tutkimuksessa, tämän tutkimuksen kaksiulotteisen elektroforeesin tuloksista havaittiin, että B- ja C-hordeiinien isoelektriset pisteet olivat osittain päällekkäin. Koska B- ja C-hordeiineilla oli kuitenkin suurimmilta osin eri isoelektriset pisteet, haluttiin tutkia myös pH:n vaikutusta uuttumiseen. Hordeiinien isoelektrisen pisteen alueella oleva pH voisi saada aikaan B-hordeiinien saostumisen ja siten uutteeseen olisi voinut jäädä vain C-hordeiineja. B-hordeiinien saostumista tutkittiinkin säätämällä uuttoliuoksen pH:ta happamasta emäksiseen. Tulosten mukaan pH:lla ei kuitenkaan ollut vaikutusta B-hordeiinien saostumiseen vaan molemmat hordeiiniryhmät (B ja C) pysyivät liukoisina.

Kaksiulotteisen elektroforeesin tulokset osoittivat, että uuttamalla hordeiineja useamman kerran alkoholilla ilman pelkistintä, lähes kaikki B-hordeiinit uuttuivat. Sakkaan oli jäänyt vain muutama yksittäinen B-hordeiini ja D-hordeiinit, jotka tarvitsivat pelkistimen liuetakseen.

Tutkimuksen tulosten perusteella ohran hordeiiniryhmien erottaminen uuttomenetelmillä oli haasteellista. Vaikka B- ja C-hordeiinien rakenne, molekyylipaino ja kemialliset ominaisuudet eroavat paljon, niiden käyttäytyminen uutoissa oli samanlaista. Kirjallisuudessa hordeiiniryhmät on saatu erotettua käyttämällä pääasiassa ioninvaihtokromatografiaa mutta tässä työssä haluttiin löytää yksinkertaisempi ja erotettua hordeiiniryhmää määrällisesti enemmän tuottava menetelmä. B- ja C-hordeiinien erottamista, esimerkiksi perustuen proteiinien varauksiin, pitäisi tutkia. Tutkimuksen toiseen osaan, hordeiinien pilkkomiseen metallikatalysoidulla oksidaatiolla, päätettiin käyttää näytettä, jossa hordeiinit olivat uutettu 55 %:lla 2-propanolilla 50 °C:n lämpötilassa.

Hordeiinien metallikatalysoitua oksidaatiota tutkittiin käyttämällä metalleina kuparia ja rautaa ja oksidanttina vetyperoksidia ja askorbiinihappoa. Ennen metallikatalysoitua oksidaatiota hordeiininäyte saostettiin ja kuivattiin. Kuivattu hordeiininäyte oli aluksi erittäin sähköistä eikä se liennut helposti oksidaatioissa käytettävään fosfaattipuskuriin eikä erotuksessa käytettyyn ajoliuokseen (pH 7,4). Kun näyte oli saanut olla muutaman viikon, sähköisyys oli selvästi vähentynyt ja liukoisuus näytti parantuneen. Kuivattu hordeiininäyte ei kuitenkaan liennut täysin käytettyihin fosfaattipuskureihin, joten oksidaatio saattoi olla hitaampaa näytteen liukenemattomuuden takia.

Hordeiinien metallikatalysoitu oksidaatio suoritettiin sekä pH:ssa 4,5 että pH:ssa 7,4. Nämä pH:t valittiin, koska metallikatalysoidun oksidaation on havaittu pilkkovan hyvin  $\beta$ -glukaanina, kun pH oli 4,5 (Kivelä 2001) ja kollageenia, kun pH oli 7,5 (Kato 1992).

Erikoista SE-HPLC:n tuloksissa oli ensimmäinen ja kooltaan suurin piikki, joka osoittautui SDS-PAGE:n tulosten mukaan B hordeiineiksi. Koska SE-HPLC:ssä molekyylit kulkevat kolonnin läpi suuruusjärjestyksessä, ensimmäisen piikin pääteltiin olevan aggregoituneita B-hordeiineja. Lisäksi aggregoituneiden B-hordeiinien läsnäolo näytteessä kumosi oletuksen siitä, että alkoholiliuokseen uuttuisi ilman pelkistintä vain monomeerisiä hordeiineja vaan mukana uuttuu myös aggregoituneita B-hordeiineja. Tiedetään, että osa B hordeiineista ovatkin aggregoituneina ja osa monomeereinä mutta syy erilaisiin rakenteisiin on epäselvä. Field ym. (1983) esittää yhdeksi syyksi eroavaisuudet B-hordeiinin primaarirakenteessa: kysteiinin paikka tai orientoituminen voi vaikuttaa myönteisesti tai kielteisesti aggregoitumiseen.

Kaikissa tutkituissa metallikatalysoiduissa oksidaatioreaktioissa oli tapahtunut suurien proteiinien (B- ja C-hordeiinien) muokkautumista. Sekä SDS-PAGE:n että SE-HPLC:n tulosten mukaan proteiineja oli pilkkoutunut, kun metallina käytettiin kuparia ja oksidanttina vetyperoksidia. Useassa tutkimuksessa viitataan kuparin toimivan paremmin katalyyttinä kuin raudan oksidaatioreaktioissa (Uchida ym. 1992; Headlam ja Davies 2004). pH:lla ei näyttänyt olevan vaikutusta pilkkoutumiseen, joskin hapan pH (4,5) näytti olevan hieman tehokkaampi. SE-HPLC:n tulosten mukaan näytteessä oli enää hyvin vähän suurikokoisia proteiineja, kun niitä oli hapetettu kuparilla ja vetyperoksidilla 24 tuntia. Tämä voitiin havaita myös SDS-PAGE:n tuloksista, joissa 24 tunnin inkuboinnin jälkeen proteiineja ei näkynyt enää juuri lainkaan. SE-HPLC:n tuloksista oli havaittavissa reaktion lopputuotteita piikkinä, joka näkyi noin 40 ml:n eluutiilavuuden alueella. Reaktion lopputuotteet saattoivat olla noin oligopeptidien tai aminohappojen kokoisia molekyylejä. Tätä tukee Uchidan ym (1992) tutkimus, jossa kollageenin kuparikatalysoidun oksidaatiossa havaittiin proteiinien pitoisuuden lasku ja aminohappojen pitoisuuden nousu.

SE-HPLC osoitti myös askorbiinihapon ja vetyperoksidin toimivan eri tavoin oksidanttina. Askorbiinihapolla tehdyissä reaktioissa oli 24 tunnin inkuboinnin jälkeen jäljellä C-hordeiineja ja jopa aggregoituneita B-hordeiineja mutta ei havaittavia reaktiotuotteita. SDS-PAGE:n tuloksissa oli havaittavissa ajan suhteen voimistuvaa suttaantumista kaikissa askorbiinihapolla tehdyissä reaktioissa. Suttaantuminen viittasi proteiiniketjujen

muutoksiin, jolloin ne eivät kulkeneet yhtenäisesti geelissä. Koska SE-HPLC:n tuloksissa ei ollut havaittavissa hordeiinien pilkkoutumista, on mahdollista, että askorbiinihappo saikin hordeiinit aggregoitumaan suuremmiksi kuin SEC-HPLC:n ja SDS-PAGE:n erotusalueet. Kanon ym. (1987) mukaan hapetus askorbiinihapolla ja kuparilla sai aikaan myös kollageenin aggregoitumista. Toisin kuin Kanon ym. (1987) tutkimuksessa, askorbiinihappo sai aikaan aggregoitumista myös happamassa pH:ssa ja raudalla katalysoiduissa reaktioissa.

Oksidaatioreaktioissa oli havaittavissa vielä 24 tunnin inkuboinnin jälkeen hordeineja ja siksi prolamiinien kvantitatiivisia tutkimuksia ei tehty. Jotta oksidaation vaikutusta saataisiin tehostettua, pitäisi menetelmän olosuhteita edelleen optimoida. Olisi tarpeellista selvittää mahdollisimman hyvät olosuhteet kuparikatalysoidulle oksidaatiolle ja analysoida reaktiossa syntyneet reaktiotuotteet: mitä oligopeptidejä ja aminohappoja reaktioissa muodostuu. Oksidaatioon voisi yhdistää esimerkiksi entsyymeillä tapahtuvaan proteiinien muokkaukseen, jotta hordeiinien pilkkoutuminen tehostuisi. Olisi myös mielenkiintoista tutkia askorbiinihapon vaikutusta hordeineihin: aggregoituvatko kaikki hordeiinit ja tapahtuuko reaktioissa myös pilkkoutumista myöhemmässä reaktiovaiheessa.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella metallikatalysoitu oksidaatio pilkkoi tehokkaasti 2-propanolilla uutettuja ohran hordeineja, kun katalyyttinä käytettiin kuparia ja oksidanttina vetyperoksidia.

#### IV PÄÄTELMÄT

Tämän maisterintutkielman tavoitteena oli erottaa ohran B- ja C-hordeiinit ja tutkia, miten metallikatalysoitu oksidaatio muokkaa erotettua hordeiinia. B- ja C-hordeiinien erottaminen käytetyillä menetelmillä osoittautui haasteelliseksi. Parhaalla menetelmällä, uutolla 55 %:lla 2-propanolilla 50 °C:n lämpötilassa, saatiin erotettua pääasiassa C-hordeiineja, joskin mukana oli myös B-hordeiineja.

Uutettuja hordeiineja tutkittiin metallikatalysoidussa oksidaatiossa neutraalissa ja happamassa pH:ssa. Oksidaatioreaktioissa käytettiin metalleina kuparia tai rautaa ja oksidanttina vetyperoksidia tai askorbiinihappoa. Reaktioita analysoitiin SDS-PAGE:lla ja SE-HPLC:llä. Kaikki reaktiot muokkasivat hordeiineja. Tulosten mukaan reaktiossa, jossa metallina oli käytetty kuparia ja oksidanttina vetyperoksidia, oli suurimolekyylisten hordeiinin määrä laskenut. Tässä reaktioissa oli havaittavissa reaktiotuotteina pieniä peptidejä, oligopeptidejä ja aminohappoja. Kuparikatalysoidussa oksidaatiossa vetyperoksidilla pH:lla ei vaikuttanut olevan suurta merkitystä. SE-HPLC:n tulosten mukaan suurin osa 55-prosenttisella 2-propanolilla uutuneista B-hordeiineista olivat aggregoituneina. Koska aggregoituneiden B-hordeiinien molekyylipaino oli hyvin suuri, ne eivät näkyneet SDS-PAGE:ssa ilman pelkistintä. Oksidaatioreaktioissa nämä aggregoituneet B-hordeiinit pilkkoutuivat jo kahden tunnin inkuboinnin aikana.

Askorbiinihappo ja vetyperoksidi vaikuttivat eri tavoin hordeiinin hapettumiseen. Kun oksidanttina käytettiin askorbiinihappoa, reaktiossa oli jäljellä 24 tunnin inkuboinnin jälkeen C- ja B-hordeiinien kokoisia proteiineja ja hyvin vähän pilkkoutumisen lopputuotteita. Tämä viittasi siihen, että askorbiinihappo aiheutti hordeiinin aggregoitumista eikä pilkkoutumista.

Tulosten mukaan reaktiossa, jossa metallina käytettiin kuparia ja oksidanttina vetyperoksidia, 55-prosenttisella 2-propanolilla uutetuissa hordeiineissa tapahtui muokkautumista ja proteiinien pilkkoutumista.

## LÄHDELUETTELO

Amici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER. 1989. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem*. 264: 3341–6.

Ball GFM. 2005. *Vitamins in foods*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. s 419–584.

Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. 2009. *Food Chemistry*. 4. p. Leipzig, Saksa: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1070 s.

Berlett BS, Stadtman ER. 1997. Minireview: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313–6.

Brett GM, Mills ENC, Bacon J, Wellner N, Husain RD, Tatham AS, Shewry PR, Morgan MRA. 2002. Temperature-dependent binding of monoclonal antibodies to C hordein. *Biochim Biophys Acta* 1594: 17–26.

Celus I, Brijs K, Delcour JA. 2006. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *J Cereal Sci* 44: 203–11.

Damodaran S. 2008. *Amino acids, peptides, and proteins*. Teoksessa: Damodaran S, Parkin KI, Fennema Or. toim. *Fennema's food chemistry*. 4. p. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. s. 233–7.

Davies MJ. 2005. Review: The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 1703: 93–109.

Eliasson A-C, Larsson K. 1992. *Cereals in breadmaking*. NY, USA: Marcel Dekker Inc.

Entwistle J. 1988. Primary structure of a C-hordein gene from barley. *Carlsberg Res Commun* 53: 247–58.

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 41/2009. 2009. Saatavilla: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:016:0003:0005:FI:PDF>. Tulostettu 24.9.2012

Field JM, Shewry PR, Mifflin BJ. 1983. Aggregation states of alcohol-soluble storage proteins of barley, rye, wheat and maize. *J Sci Food Agric* 34: 362–9.

Garlick PJ. 2008. *Protein structure and function in plants and animals*. toim, Hammond BG. Teoksessa: *Food safety of proteins in agricultural biotechnology*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. s. 1–29.

Haber F, Weiss J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser A*. 147: 332–351.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Review: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1–14

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4.p. Oxford, UK: Oxford university press Inc. s. 1–74.

Hawkins CL, Davies MJ. 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta* 1504: 196–219.

Headlam HA, Davies MJ. 2004. Markers of protein oxidation: Different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radical Bio Med* 36: 1175–84.

Hockett EA. 2000. *Barley*. toim, Kulp K, Ponte JG. Teoksessa: *Handbook of cereal science and technology*. 2.p. NY, USA: Marcel Dekker, Inc. s. 81–126.

Huang X. 2012. Metal-catalyzed oxidation of wheat prolamins [henkilökohtainen tiedonanto].

Jackson EA. 1984. *The genetics and biochemistry of the low molecular weight subunits of glutenin in relation to bread-making quality [väitös]*. Wolfson College, Cambridge University.

- Kanerva P. 2012. Ohrakkaan prolamiinipitoisuus. [henkilökohtainen tiedontanto]
- Kano Y, Sakano Y, Fujimoto S. 1987. Cross-linking of collagen by ascorbate-copper ion systems. *J Biochem* 102:839-42.
- Kato Y, Uchida K, Kawakishi S. 1992. Oxidative fragmentation of collagen and prolyl peptide by Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 267: 23646–51.
- [Keliakialiitto] 2012. Keliakia, esiintyvyys. Tulostettu 24.8.2012. Viitattu: [www.keliakialiitto.fi](http://www.keliakialiitto.fi)
- Kivelä R. 2011. Non-enzymatic degradation of (1→3)(1→4)-β-D-glucan in aqueous processing of oats [väitös]. Helsinki: Helsingin yliopisto
- Koppenol WH, Butler J, Van-Leeuwen JW. 1978. *Photochem Photobiol* 28: 651-3. Viite julkaisusta: Shinar E, Navok T, Chevion M. 1983. The analogous mechanism of enzymatic inactivation induced by ascorbate and superoxide in the presence of copper. *J Biol Chem* 258: 14778–83.
- Lookhart G, Bean S. 2000. Cereal Proteins: Composition of their major fractions and methods for identification. Teoksessa: *Handbook of cereal science and technology*. 2.p. NY, USA: Marcel Dekker, Inc. s. 363–384.
- Lund MN, Baron CP. 2010 Protein oxidation in foods and food quality. teoksessa: Skibsted LH, Risbo J, Andersen ML. toim. *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*. Cambridge, UK: Woodhead Pub Lim. s. 33–69.
- Marchylo BA, Kruger JE, Hatcher D. 1986. High-performance liquid chromatographic and electrophoretic analysis of hordein during malting for two barley varieties of contrasting malting quality. *Cereal Chem* 63: 219–31.
- [MTT] Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. 2009. Kasvigeenivaraohjelma, viljelyhistoria. Saatavilla: [https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Tietopaketti/Kasvigeenivarat/MaatiaisTietoPankki/Viljat/Ohra/Viljelyhistoria\\_o](https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Tietopaketti/Kasvigeenivarat/MaatiaisTietoPankki/Viljat/Ohra/Viljelyhistoria_o). Tulostettu: 11.1.2012.
- Mäki M. 2006. Kuinka keliakia syntyy?. teoksessa: Mäki M, Collin P, Kekkonen L, Visakorpi J, Vuoristo M. toim. *Keliakia*. Helsinki, Suomi: Kustannus Oy Duodecim. s 17–24.
- Nilan RA, Ullrich SE. 1993. Barley: Taxonomy, origin, distribution, production, genetics, and breeding. teoksessa: MacGregor AW, Bhatta RS. toim. *Barley: Chemistry and Technology*. St.Paul, Minnesota, USA: AACC inc. s 1–29.
- Nogala-Kalucka M, Siger A. 2010. Free radicals in biological and food systems. teoksessa: Boskou D, Elmadfa I. toim. *Frying of food: oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures*. 2.p. Boca Raton, FL, USA: CRC Press s. 49–69.
- Opetushallitus. 2012. Analyysimenetelmät, nestekromatografia. saatavilla: [http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-6\\_nestekromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html) tulostettu: 19.3.2012.
- Osborne TB. 1907. *The Proteins of the wheat kernel*. Publication No. 84. Carnegie Institute of Washington. Washington, DC, USA.
- Peltonen J, Rita H, Aikasalo R, Home S. 1994. Hordein and malting quality in northern barleys. *Hereditas* 120: 231–9.
- Riekkola M-L, Hyötyläinen T. 2002. *Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat*. 2. p. Helsinki: Yliopistopaino.
- Schmitt JM. 1979. Purification of hordein polypeptides by column chromatography using volatile solvents. *Carlsberg Res. Commun* 44: 431–8.
- Shewry PR, Casey R. 1999. *Seed Proteins*. Dordrecht, Alankomaat: Kluwer Academic Publishers. s 883.

Shewry PR, Ellis JR, Pratt HM, Mifflin BJ. 1978. A Comparison of methods for the extraction and separation of hordein fractions from 29 barley varieties. *J Sci Food Agric* 29: 433–41.

Shewry PR, Field JM, Kirkman MA, Faulks AJ, Mifflin BJ. 1980. The extraction, solubility, and characterization of two groups of barley storage polypeptides. *J Exp Bot* 31: 393–407.

Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7: 945–56.

Shewry PR, Tatham AS. 1990. Review article: The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem J* 267:1–12.

Shewry PR. 1993. Barely Seed Proteins. toim. MacGregor AW, Bhatti RS. teoksessa: Barely chemistry and technology. Minnesota, USA: AACC Inc. s 131–197.

Shewry PR, Kreis M, Parmar S, Lew EJ-L, Kasarda DD. 1985. Identification of  $\gamma$  type hordeins in barley. *FEBS* 190: 61–4.

Simpson DJ. 2001. Review: Proteolytic degradation of cereal prolamins – the problem with proline. *Plant Science* 161: 825–38.

Stadtman ER, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207–18.

Stadtman ER. 1990. Review: Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences *Free radical Biology and Medicine* 9: 315–25.

Stryer L. 1981. *Biochemistry*. 2.p. San Francisco, USA: W. H. Freeman and company.

Tatham AS, Drake AF, Shewry PR. 1985. A conformational study of a glutamine- and proline-rich cereal seed protein, C hordein. *Biochem J*. 226: 557–62.

Tatham AS, Shewry PS, Belton PS. 1990. Structural studies of cereal prolamins, including wheat gluten. teoksessa: Pomeranz Y. toim. *Advances in cereal science and technology*, volume X. St. Paul, Minnesota, USA: AACC Inc.

Uchida K, Kato Y, Kawakishi S. 1990. A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical. *Biochem bioph res co* 169: 265–71.

Uchida K, Kato Y, Kawakishi S. 1992. Metal-catalyzed oxidative degradation of collagen. *J Agric Food Chem* 40:9–12.

Westermeier R, Scheibe B. 2009. Gel electrophoresis in food analysis. Teoksessa: Ötleş S, toim. *Handbook of food analysis instruments*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press s. 424–37.

## LIITE 1

## Aminohappojen lyhenteet

Aminohappo	Lyhenne
Glysiini	G
Alaniini	A
Valiini	V
Leusiini	L
Isoleusiini	I
Prolini	P
Fenyylialaniini	F
Tyrosiini	Y
Tryptofaani	W
Seriini	S
Treoniini	T
Kysteiini	C
Metioniini	M
Arginiini	R
Histidiini	H
Lysiini	K
Asparagiinihappo	D
Glutamiinihappo	E
Asparagiini	N
Glutamiini	Q