

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

RuBisCO-proteiinin talteenotto kaalisivuvirrasta

Pro gradu -tutkielma
20.3.2026
Pihla Hosiokangas



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

TIIVISTELMÄ

Tässä Pro gradu -tutkielmassa tutustutaan yhteen vihreiden lehtien yleisimpään proteiiniin ribuloosi-1,5-bisfosfaatti-karboksylaasi/oksygenaasiin (RuBisCO). Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään ensiksi RuBisCO:n rakennetta ja merkitystä fotosynteesissä sekä sen kemiallisia, funktionaalisia ja ravitsemuksellisia ominaisuuksia sekä talteenottoa kasvimateriaaleista. Tämän lisäksi kirjallisuuskatsauksessa esitellään joitakin yleisimpiä proteiininanalytiikassa käytettyjä menetelmiä, keskittyen erityisesti kvantitatiivisiin menetelmiin.

RuBisCO on runsaasti vihreissä lehdissä esiintyvä liukoinen proteiini, jolla on useita mielenkiintoisia ominaisuuksia. Sillä on huomattu olevan muun muassa elintarviketuotteiden kannalta mahdollisesti hyödyllisiä funktionaalisia ja ravitsemuksellisia ominaisuuksia, joilla se myös erottuu edukseen muista kasvipohjaisista proteiininlähteistä. Lisäksi RuBisCO:n talteenotto voisi tarjota väylän erilaisten kasvipohjaisten sivuvirtojen hyödyntämiseen ja siten edistää kiertotaloutta.

Kokeellisessa työssä tutkittiin RuBisCO:n talteenottoa sivuvirtana muodostuvasta kaalimateriaalista. Erityisesti tutkittiin uuttoliuoksen koostumuksen ja uutto-olosuhteen vaikutusta RuBisCO:n saantoon. Työssä hyödynnettiin proteiinien kvantitatiivisista analyysimenetelmistä pääasiassa Kjeldahl- ja Bradford-menetelmiä. Ennen RuBisCO:n talteenottoa suoritettiin myös onnistuneesti näiden menetelmien käyttöönotto laboratoriossa, painottuen erityisesti Kjeldahl-menetelmää hyödyntävän typpianalysaattorin käyttöönottoon ja testaukseen. Kokeellisessa työssä onnistuttiin eristämään RuBisCO:a neljällä eri menetelmällä, joista tehokkaimmaksi osoittautui ultraääniavusteista uuttoa hyödyntävä menetelmä. Tällä menetelmällä talteenottoprosentiksi saatiin $10,7 \pm 0,8$ %. Tutkituista uuttoliuoksista parhaaksi osoittautui pH 9 karbonaatti-bikarbonaattipuskuriliuos. Tutkielmassa eristettyjen RuBisCO-saostumien proteiinipitoisuudeksi saatiin parhaimmillaan $58,5 \pm 1,0$ %. Saostumista yritettiin tunnistaa RuBisCO UHPLC-MS menetelmällä, siinä kuitenkin onnistumatta. Kokeellisen työn matalahko proteiinisaanto, talteenottoprosentti ja proteiinipitoisuus jättävät myös talteenottoprosessiin kehittämisen varaa.

ESIPUHE

Pro gradu -tutkielman kokeellinen työ suoritettiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella syksyn 2025 aikana. Kirjallisuuskatsauksen kirjoittaminen aloitettiin kesällä 2025 ja koko tutkielma viimeisteltiin helmikuussa 2026. Kokeellinen työ rajattiin koskemaan RuBisCO-proteiinin talteenottoa kaalimateriaalista, tarkemmin raa'asta kaalin kannasta. Merkittävä osa tutkielmaa oli myös proteiinianalytiikkaan tutustuminen ja Kjeldahl-menetelmää hyödyntävän typpianalysaattorin käyttöönotto laboratoriossa. Tutkielmassa hyödynnettyä lähdekirjallisuutta haettiin pääasiassa Google Scholar hakukoneella sekä Jyväskylän yliopiston kirjaston sähköisestä JYKDOK tietokannasta. Tutkielmassa on hyödynnetty OpenAI:n ChatGPT-5 -kielimallia joidenkin englanninkielisten sanojen käännöksen tukena antamalla kielimallille tehtäväksi esimerkiksi 'Käännä seuraava aiheeseen x liittyvä sana suomeksi'. Työn vastaavana ohjaajana toimi FT Elina Kalenius ja toisena ohjaajana FT Jarmo Louhelainen.

Haluan kiittää ohjaajaani Elina Kaleniusta mielenkiintoisesta ja myös todella ajankohtaisesta tutkielman aiheesta sekä asiantuntevasta ja kannustavasta ohjauksesta läpi koko tutkielman. Lisäksi haluan kiittää toista ohjaajaani Jarmo Louhelaista avusta ja hyvistä neuvoista koko tutkielman aikana, mutta erityisesti analyttisten menetelmien haasteiden kanssa. Kiitos myös Vaissi Oy:lle tutkimuksessa käytettyjen kasvimateriaalien tarjoamisesta. Lopuksi vielä suuri kiitos läheisilleni kaikesta siitä tuesta, jota olen saanut tämän graduprojektin ja koko opintojeni aikana.

Jyväskylässä 20.3.2026

Pihla Hosiokangas

SISÄLLYSLUETTELO

Tiivistelmä.....	iii
Esipuhe	iv
Sisällysluettelo.....	v
Käytetyt lyhenteet.....	vii
1 Johdanto	1
2 RuBisCO.....	2
2.1 Rakenne	2
2.2 RuBisCO fotosynteesissä	3
2.3 Ravitsemukselliset ominaisuudet	4
2.4 Kemialliset ja funktionaaliset ominaisuudet	5
3 Proteiinien talteenotto vihreistä lehdistä.....	7
3.1 Vihreiden lehtien proteiinit	9
3.2 Kasvikudoksen hajottaminen	9
3.3 Proteiinien fraktiointi	10
3.4 Valkoisen fraktion talteenotto	11
3.5 Talteenoton haasteita.....	12
4 Proteiinien analyysimenetelmiä	14
4.1 Kokonaisproteiinipitoisuuden kvantitatiivisia analyysimenetelmiä.....	14
4.1.1 Kjeldahl-menetelmä	15
4.1.1.1 Menetelmän teoria.....	16
4.1.1.2 Automaatioitu menetelmä.....	19
4.1.2 Bradford-proteiinimääritys	20
4.1.3 Lowry-proteiinimääritys.....	23
4.1.4 Aminohappoanalyysi.....	25
4.1.5 Proteiinimääritys UV-spektrofotometrialla (A280- ja A205 -menetelmät)	26
4.2 Nestekromatografia	27
4.2.1 Analyttiset kolonnit.....	28
4.2.2 Detektorit.....	31
4.2.2.1 UV-detektorit.....	31
4.2.2.2 Fluoresenssidetektorit.....	32
4.2.2.3 Massaspektrometria.....	32
4.3 SDS-PAGE.....	34
4.3.1 Polyakryyliamidigeeli	34
4.3.2 Näytteen käsittely	36
4.3.3 Elektroforeesi	37
4.3.4 Käyttökohteet, edut ja haasteet.....	38
5 kokeellinen työ	39
6 Laitteistot ja reagenssit	39
7 Proteiinien kvantitatiivisten analyysimenetelmien käyttöönotto.....	41
7.1 Kjeldahl-menetelmä	41
7.1.1 Kjeltac 2300 tyypianalysaattorin käyttöönotto.....	41
7.1.2 Laitteen testaus ja menetelmän validointi	44

7.2 Bradford-menetelmä.....	46
7.3 UHPLC-MS mittaukset	48
8 RuBisCO:n talteenotto.....	50
8.1 Kasvimateriaali.....	50
8.2 Talteenottoprosessin kuvaus.....	51
8.3 Uttoliuosten vertailu	54
8.4 Utto-olosuhteiden vertailu	54
8.5 RuBisCO:n saostaminen.....	55
8.6 RuBisCO:n uhplc-ms mittaus.....	56
9 Työn tulokset ja johtopäätökset.....	58
9.1 Kasvimateriaalin proteiini- ja kosteuspitoisuus	58
9.2 Uttoliuoksen koostumuksen vaikutus.....	59
9.3 Utto-olosuhde	61
9.4 Talteenoton tuloksia	62
9.5 UHPLC-MS mittauksen tulokset.....	65
10 Yhteenveto.....	65
11 Kirjallisuusluettelo	68
Liitteet.....	72

KÄYTETYT LYHENTEET

AC	Affiniteettikromatografia (Affinity chromatography)
ACN	Asetonitriili (Acetonitrile)
BME	2-merkaptetaanoli (2-Mercaptoethanol)
BSA	Naudan seerumialbumiini (Bovine Serum Albumin)
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
ESI	Sähkösumutusionisaatio (Electrospray ionization)
FA	Metaanihappo (Formic acid)
FAO	Yhdistyneiden Kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
GC	Kaasukromatografia (Gas chromatography)
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (High performance liquid chromatography)
ISO	Kansainvälinen standardoimisjärjestö (International Organization for Standardization)
IEC	Ioninvaihtokromatografia (Ion exchange chromatography)
LC-MS	Nestekromatografia-massaspektrometria (Liquid chromatography mass spectrometry)
MALDI	Matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio (Matrix assisted laser desorption/ionization)
MS	Massaspektrometria (Mass spectrometry)
NP-HPLC	Normaalifaasinestekromatografia (Normal phase high performance liquid chromatography)
PF	Konversiokerroin (Protein factor, Jones factor)

RP-HPLC	Käänteisfaasinestekromatografia (Reversed phase high performance liquid chromatography)
RuBisCO	Ribuloosi-1,5-bisfosfaatti-karboksylaasi/oksygenaasi
RuBP	Ribuloosi-1,5-bisfosfaatti
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
SEC	Kokoekskluusiokromatografia (Size exclusion chromatography)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini
TOF	Lentoaika (Time of flight)
UAE	Ultraääniavusteinen uutto (Ultrasound assisted extraction)

1 JOHDANTO

Proteiinit ovat elintärkeitä elämälle. Proteiineja esiintyy käytännössä kaikissa elävissä organismeissa, missä niillä on lukuisia tehtäviä ja toimintoja. Ihmiselle proteiinit ovat myös tärkeitä ravintoaineita ja aminohappojen lähteitä, joita tarvitaan solujen, kudosten ja elinten kriittisiin toimintoihin. Välttämättömien aminohappojen ja ravitsemuksellisen arvon lisäksi proteiinit tarjoavat ruoalle myös toiminnallisia eli funktionaalisia ominaisuuksia. Nämä funktionaaliset ominaisuudet vaikuttavat elintarvikkeen ulkonäköön, makuun ja rakenteeseen, jotka ovat kaikki sen houkuttelevuuteen vaikuttavia tekijöitä.¹

Maailman väestön kasvu lisää ruoan ja samalla myös proteiinien kysyntää. Kasviproteiinien kysyntää lisää samalla myös kuluttajien halukkuus tehdä ympäristön, maapallon ja oman terveyden kannalta kestävämpiä ruokavalioon liittyviä valintoja. Kasviproteiinien tuottaminen on eläinperäisiin proteiineihin nähden lähtökohtaisesti tehokkaampaa ja vaatii vähemmän luonnonvaroja kuten vettä, maata ja energiaa. Viime vuosikymmeninä yhä enemmän huomiota uutena kasviproteiini lähteenä on saanut vihreistä lehdistä eristettävissä oleva proteiini. Vihreät lehdet ovat merkittävä biomassanlähde maapallolla ja myös yksi suurista elintarviketuotannon eri vaiheissa muodostuvista sivuvirroista. Näiden sivuvirtojen hyödyntäminen esimerkiksi funktionaalisten tai ravitsemuksellisten proteiinien valmistamiseen voisi parantaa sekä tuotannon kestävyttä että kannattavuutta.^{1,2}

Tässä pro gradu -tutkielman kirjallisuuskatsauksessa perehdyttiin vihreiden lehtien yhteen merkittävimpään proteiiniin RuBisCO:n, sen rakenteeseen, biologiseen merkitykseen, sen ravitsemuksellisiin, kemiallisiin ja funktionaalisiin ominaisuuksiin sekä talteenottomenetelmiin. Lisäksi tutustuttiin tarkemmin joihinkin yleisimpiin proteiinien analyttisiin menetelmiin. Tutkielman kokeellisessa työssä tutkittiin RuBisCO:n talteenottoa elintarviketeollisuuden sivuvirtana muodostuvasta kaalimateriaalista. Lisäksi tutustuttiin käytännössä proteiininanalytiikkaan muun muassa Kjeldahl-menetelmää hyödyntävän typpianalysaattorin käyttöönoton kautta.

2 RuBisCO

Ribuloosi-1,5-bisfosfaatti-karboksylaasi/oksygenaasi (RuBisCO) on luonnossa esiintyvä entsyymi ja proteiini, joka katalysoi fotosynteesiä ja on siten keskeisessä roolissa ilmakehän hiilidioksidin sidonnassa orgaaniseksi hiileksi eli biomassaksi. RuBisCO toimii katalyyttinä karboksylaatioreaktiossa, jossa ilmakehän hiilidioksidi liittyy ribuloosi-1,5-bisfosfaattiin (RuBP). Sen keskeisestä roolista johtuen RuBisCO:a löytyy suurimmasta osasta yhteyttämiskykyisiä eliöitä aina fotosynteettisistä bakteereista leviin ja kasveihin. RuBisCO on kasvien lehtien pääasiallinen proteiini ja siten yksi runsaiten luonnossa esiintyvistä proteiineista. Onkin arvioitu, että RuBisCO:n osuus kasvien lehtien liukoista proteiineista olisi jopa 50 %.³

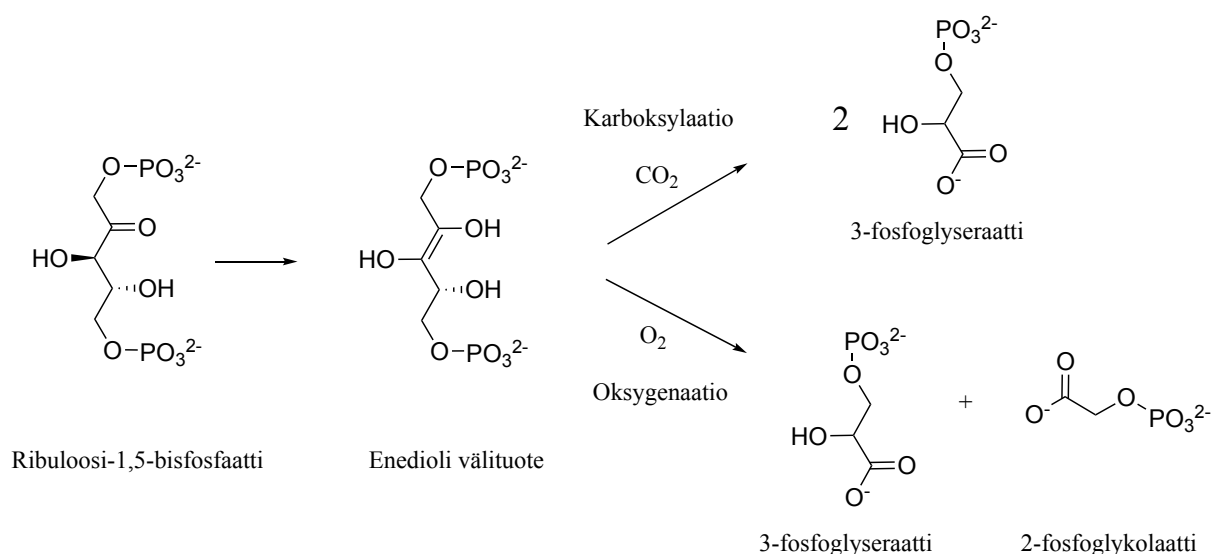
2.1 RAKENNE

Kaikki RuBisCO-entsyymit ovat multimeerisiä eli koostuvat useista proteiinialayksiköistä.³ Tämän entsyymin eri rakenteet ovat siis monimutkaisia biologisia proteiinikomplekseja. RuBisCO:n eri muodot koostuvat kahdentyyppisistä alayksiköistä: suurista yksiköistä (L, 50-55 kDa) ja pienistä yksiköistä (S, 12-18 kDa). RuBisCO:lla on neljä eri muotoa, jotka eroavat toisistaan alayksiköiden sekä esiintyvyyden osalta.³ RuBisCO:n yleisin muoto (muoto I) koostuu kahdeksasta suuresta ja kahdeksasta pienestä alayksiköstä (L8S8), jotka ovat heksadekametrisessä rakenteessa.³ Tämä RuBisCO:n muoto, molekyylipainoltaan noin 496-584 kDa, on myös esimerkiksi levissä ja kasveissa kaikista yleisin.³ RuBisCO:n muoto II taas on dimeeri, joka koostuu kahdesta suuresta alayksiköstä, mutta siinä ei ole ollenkaan pieniä alayksiköitä (L2)_n. Muoto II esiintyy muun muassa bakteereissa. Muoto III viittaa arkeoneissa esiintyvään RuBisCO:n, jotka koostuvat myös pelkästään suurista alayksiköistä esimerkiksi muodossa L2, L8 ja L10. Muoto IV taas viittaa RuBisCO:n kaltaisiin proteiineihin, jotka muodostavat muista muodoista erillisen ryhmän. Tämän ryhmän proteiinit eivät katalysoi muiden muotojen tapaan karboksylaatiota, vaan ovat osallisina muissa reaktioissa.³

2.2 RuBisCO FOTOSYNTESISISSÄ

RuBisCO katalysoi karboksylaatiota, joka on Calvinin kierron ensimmäinen vaihe. Karboksylaatiassa hiilidioksidi liittyy ribuloosi-1,5-bisfosfaattiin (RuBP), jolloin muodostuu kaksi fosfoglyseraattimolekyyliä. Fosfoglyseraatti muunnetaan Calvinin kierrossa yhdessä fotosynteesin valoreaktiotuotteiden kanssa glyseraldehydi-3-fosfaatiksi, jota kasvi käyttää lopulta sokereiden valmistamiseen.⁴

RuBisCO on kuitenkin harvinaisen tehoton ja hidas katalyytti. Tämä johtuu siitä, että RuBisCO katalysoi karboksylaation rinnalla myös oksygenaatiota (kuva 1). Oksygenaatiossa ilmakehän happi kilpailee käytännössä samasta RuBP-molekyylistä ilmakehän hiilidioksidin kanssa, eli oksygenaatio on karboksylaation kanssa kilpaileva sivureaktio.³ Tämä sivureaktio madaltaa hiilensidonnan tehoa kasveissa jopa 50 %.³ Ilman hiilidioksidipitoisuuksissa keskimäärin jokaista kolmea sidottua hiilidioksidimolekyyliä kohden sidotaan myös yksi happimolekyyli.⁴ Oksygenaatiossa muodostuu fosfoglyseraatin lisäksi myös fosfoglykolaattia, jota ei voida käyttää Calvinin kierrossa.⁴ Fosfoglykolaatti käsitellään sen sijaan fotorespiraatioksi kutsutussa prosessissa, jossa se muutetaan myös fosfoglyseraatiksi. Fotorespiraatio kuitenkin kuluttaa energiaa ja häiritsee siksi fotosynteesin tehokkuutta.⁴



Kuva 1. RuBisCO:n katalysoimat reaktiot: karboksylaatio ja oksygenaatio.⁵

Fotosynteesireitit voidaan jakaa kolmeen reittiin: C_3 , C_4 ja CAM. Suurin osa maapallon kasveista käyttää edellä kuvattua C_3 -reittiä hiilensidonnassa.⁴ C_3 kasveilla on vain yhdenlaisia viherhiukkasia, joissa kaikki fotosynteesin reaktiot tapahtuvat. C_4 - ja CAM-reitit ovatkin C_3 -reitien adaptaatioita, joiden tarkoitus on lieventää C_3 -reitien hiilensidontaa rajoittavan fotorespiraation vaikutusta. Yksinkertaistettuna C_4 -reitissä hiilidioksidipitoisuus RuBisCO:n vaikutuspaikalla on niin sanotun biokemiallisen pumpun ansiosta paljon korkeampi kuin ilmakehässä, mikä ehkäisee fotorespiraatiota ja siten parantaa karboksylaatiota.⁴ Tämä on mahdollista, sillä C_4 kasveissa fotosynteesin reaktiot ja toiminnot ovat eroteltu kahteen eri solu- ja viherhiukkastyyppiin.⁴ C_4 kasveja ovat esimerkiksi maissi, sokeriruoko ja amarantti. CAM-reitti taas ehkäisee fotorespiraatiota erottamalla fotosynteesin vaiheet vuorokauden ajan mukaan: yöllä tapahtuu hiilidioksidin sitominen ja säilöminen muun muassa orgaanisiin happoihin, joista se vapautetaan päivällä Calvin-sykliin ja RuBisCO:n käyttöön.⁶ Hiilidioksidipitoisuus pysyy korkeana, mikä ehkäisee fotorespiraatiota.⁶ Esimerkkejä CAM-kasveista ovat kaktukset ja ananaskasvit.

C_3 kasvien lehdistä on enemmän RuBisCO:a, sillä ne joutuvat kompensoimaan fotorespiraatiosta johtuvaa fotosynteesin tehottomuutta lisäämällä entsyymien määrää.^{7,8} On arvioitu, että C_3 kasvien lehtien kuivamassasta noin 5 % on RuBisCO:a, kun C_4 kasveilla vastaava luku on vain noin 1 %.⁹ RuBisCO:n kokonaismassan taas on arvioitu olevan noin 0,7 Gt maanpäällä ja noin 0,03 Gt meressä, mikä tarkoittaa, että yli 90 % entsyymistä on maanpäällisten kasvien lehdistä.⁹

2.3 RAVITSEMUKSELLISET OMINAISUUDET

Proteiinit ja niiden aminohapot ovat olennainen osa ravitsemuksessa, sillä niitä tarvitaan muun muassa kudosten uusiutumiseen, hormonien ja entsyymien toimintaan, molekyylien kuljettamiseen elimistössä sekä puolustusjärjestelmän ylläpitoon. 20 aminohaposta yhdeksän ovat sellaisia, joita ihmisen keho ei pysty itse tuottamaan: histidiini, isoleusiini, leusiini, lysyiini, metioniini, fenyyylialaniini, treoniini, tryptofaani ja valiini. Nämä ovat välttämättömiä aminohappoja, jotka tulee saada ravinnosta. Useiden kasvipohjaisten proteiininlähteiden rajoitteeksi nouseekin niiden aminohappokoostumus, joka on usein puutteellinen verrattuna

esimerkiksi eläinperäisiin proteiineihin. Suositusten mukaan tulisi kuitenkin terveyttä ja ekologista kestävyyttä edistävässä ruokavaliossa muuttaa painotusta eläinproteiineista enemmän kasviproteiineihin.¹⁰

RuBisCO on herättänyt viime vuosina kiinnostusta erityisesti mahdollisena kasvipohjaisen proteiininlähteenä, jota voitaisiin hyödyntää muun muassa elintarviketeollisuuden tuotteissa. RuBisCO:n ajatellaan olevan kasviperäiseksi proteiiniksi verrattain hyvä välttämättömien aminohappojen lähde, tutkimusten mukaan jopa ylittäen YK:n elintarvike- ja maatalousjärjestö FAO:n asettamat vaatimukset esimerkiksi treoniinin, valiinin, leusiinin ja tryptofaanin osalta.¹¹ Aminohappopisteillä tarkoitetaan kaikkien välttämättömien aminohappojen summaa (pois lukien tyrosiini) ja se on yksi keino arvioida proteiinin ravitsemuksellista laatua. Eräässä tutkimuksessa vihreistä lehdistä eristetty proteiini, joka sisältää RuBisCO:a, on saanut paremmat aminohappopisteet kuin usein hyvänä kasvipohjaisen proteiininlähteenä pidetty soijaproteiinikonsentraatti.¹² Myös Pearce ja Brunke¹³ tulivat useita aiheen tutkimuksia kokoavassa kirjallisuuskatsauksessaan siihen lopputulokseen, että joillakin mittareilla RuBisCO on aminohappoprofiililtaan verrattavissa myös jopa eläinproteiineihin.

Proteiinien hyödyntäminen elintarvikkeissa riippuu pitkälti niiden sulavuudesta ruoansulatuskanavassa. Proteiinien sulavuutta voidaan arvioida *in vitro* käyttämällä ruoansulatuskanavan proteaaseja eli proteiineja pilkkovia entsyymejä, kuten pepsiniä (mahalaukun entsyymi) ja pankreatiinia (haiman entsyymiseos). Pilkkoutumista voidaan seurata hydrolyysisteella, joka kuvaa hajonneiden peptidisidosten määrää. Lehtiproteiinien on tällä menetelmällä todettu olevan myös helposti sulavia, sillä ne pilkkoutuvat ruoansulatuskanavan proteaasien toimesta.¹⁴

2.4 KEMIALLISET JA FUNKTIONAALISET OMINAISUUDET

Isoelektrisellä pisteellä tarkoitetaan sitä pH arvoa, jossa molekyylin, kuten aminohapon tai proteiinin, nettovaraus on nolla. Fysiologisessa pH:ssa aminohapot esiintyvät kahtaisioneina sisältäen sekä -NH_3^+ että -COO^- ryhmät, mutta ollen ulospäin silti varauksettomia.

Fysiologisessa pH:ssa on siis useimpien aminohappojen isoelektrinen piste. Vastaavasti proteiinin isoelektrisessä pisteessä sen aminohappojen positiiviset ja negatiiviset varaukset kumoavat toisensa, jolloin ulospäin proteiini on varaukseton.

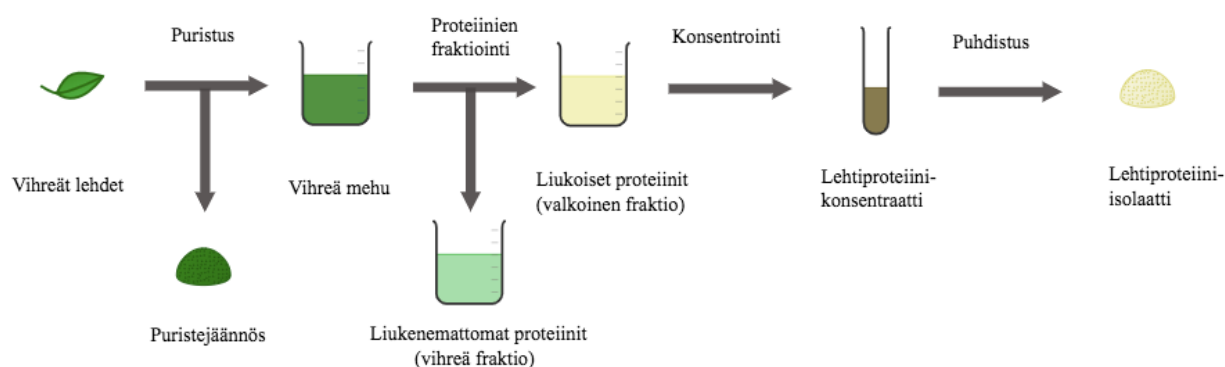
Proteiinien liukoisuuden ymmärtäminen on tärkeää, sillä se vaikuttaa erotusprosessin lisäksi myös funktionaalisiin ominaisuuksiin kuten emulgointiominaisuuksiin, vaahtoutumiseen ja geeliytymiseen.¹⁴ Proteiinien liukoisuus on pienintä isoelektrisen pisteen pH-arvossa, jossa proteiinit aggregoituvat ja saostuvat pois liuoksesta.^{14,15} Tätä ominaisuutta hyödynnetäänkin myös RuBisCO:n erotusprosesseissa.^{2,12,14–16} RuBisCO:n on havaittu olevan vähiten liukoinen noin pH alueella 4–6, mikä viittaa sen isoelektriseen pisteeseen.^{12,17,14} RuBisCO:n on huomattu olevan yleensä kaikista liukoista emäksisessä pH-arvossa, mutta tarkka arvo riippuu myös kasvista.^{12,14–17}

RuBisCO omaa myös elintarvikkeiden kannalta mielenkiintoisia funktionaalisia ominaisuuksia. Proteiinit ovat molekyylitasolla pitkiä polymeerejä, jonka vuoksi ne pystyvät muodostamaan ruoassa esimerkiksi geelejä sekä vaahtoja tai toimimaan emulgointiaineina.¹³ Yleinen ajatus on, että kasviproteiineilla nämä ominaisuudet ovat tyypillisesti huonompia verrattuna eläinproteiineihin kuten kananmunaan.¹³ RuBisCO:lla on kuitenkin huomattu olevan muun muassa hyvä vaahtoutumiskyky, ainutlaatuiset geeliytymisominaisuudet ja hyvät emulgointiominaisuudet, mitkä tekevät siitä hyvin potentiaalisen funktionaalisen ainesosan erilaisiin elintarvikkeisiin.^{14,17}

Proteiinin denaturoituessa se menettää kolmiulotteisen rakenteensa. Denaturoituminen voi tapahtua esimerkiksi lämmön, pH-muutoksen tai joidenkin kemikaalien vaikutuksesta. RuBisCO:n denaturoitumislämpötilan on huomattu riippuvan kasvilajista.² Esimerkiksi Nynäs *et al.*² huomasivat kaalikasvien RuBisCO:n omaavan paremman lämpöstabiilisuuden verrattuna juurikaskasveihin, joiden RuBisCO alkoi selvästi denaturoitua ja saostua jo 55°C lämpötilassa. Proteiinin ympäristö vaikuttaa siis sen stabiilisuuteen ja lämpöherkkyyteen.² Tätä ominaisuutta hyödynnetään muun muassa lehtiproteiinien fraktioinnissa, sillä erilaiset proteiinit denaturoituvat ja siten saostuvat liuoksesta eri lämpötiloissa.¹⁸ Proteiinin denaturoituminen saattaa kuitenkin vaikuttaa sen funktionaalisiin ominaisuuksiin.^{8,13}

3 PROTEIINIEN TALTEENOTTO VIHREISTÄ LEHDISTÄ

Proteiinien eristämiseksi kasvien lehdistä on olemassa useita menetelmiä ja prosesseja. Yleisesti näistä menetelmistä voidaan kuitenkin tunnistaa kaikille yhteiset päävaiheet: kasvikudoksen hajottaminen ja mehun erottaminen kuiduista, proteiinien fraktiointi sekä liukoisten proteiinien konsentrointi tai puhdistus (kuva 2).¹²



Kuva 2. Yksinkertaistettu kuvaus proteiinien fraktioinnin prosessista ja sen yleisimmistä vaiheista. Mukautettu Pérez-Vila *et al.*¹⁹ artikkelista. Kuva luotu Chemix-sivustolla (Created with <https://chemix.org>).

Tarkempi fraktiointimenetelmä tulisi valita kuitenkin aina sen mukaan, mistä biomassan lähteestä proteiinit halutaan erottaa, sillä tällä on olennainen vaikutus fraktioinnin lopputulokseen.² Esimerkiksi biomassan rakenteelliset ominaisuudet, sadon kypsyys ja soluseinän paksuus vaikuttavat erityisesti prosessin ensimmäisessä vaiheessa, jossa mehu ja liukoiset proteiinit erotellaan kuiduista.² Vahvemmat kasvimateriaalit, kuten porkkana ja kaali, vaativat tässä vaiheessa kovemman käsittelyn, jotta proteiinit saadaan vapautettua kasvimateriaalista ja sen solurakenteista.² Samaa yleistä proteiinien erotusprosessia ei voida siis suoraan hyödyntää mille tahansa vihreälle biomassalle, vaan prosessi tulee aina muokata toimivaksi juuri kyseiseen tarkoitukseen.² Menetelmän valintaan vaikuttaa myös, mihin tarkoitukseen lehtiproteiini eristetään. Jos proteiinia on tarkoitus käyttää esimerkiksi ihmisravintona, tulee kiinnittää huomiota siihen, että proteiini on mahdollisimman vapaa epäpuhtauksista esimerkiksi pesemällä kasvimateriaali ennen proteiinin eristämistä.²⁰ Joitakin kirjallisuudessa esitettyjä RuBisCO:n erotusmenetelmiä on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Joitakin kirjallisuudessa esitettyjä RuBisCO:n erotusprosesseja

Biomassan lähde	Mehustusmenetelmä	Avustettu uutto-menetelmä	Emäksinen uutto	Vihreän fraktion erotus	Valkoisen fraktion erotus	Proteiini-saanto/talteenotto*	Viite
Useita kasveja**	Puristus	-	Ei	Lämpösaostus (55°C, 25 min), sentrifugi	Isoelektrinen saostus (pH 4,5)	-	Nynäs <i>et al.</i> ²
Kukkakaali	Mehupuristin	UAE	Kyllä (pH 11)	Suodatus harsokankaalla, sentrifugointi	Isoelektrinen saostus (pH 4)	12 mg/g	Xu <i>et al.</i> ¹⁵
Sokerijuurikas	Mehupuristin	-	Ei	Lämpösaostus (50 °C, 15 min), sentrifugointi	Ultrasuodatus, diafiltraatio	3 mg/g	Martin <i>et al.</i> ¹⁷
Sinimailanen	Puristus	-	Ei	Lämpösaostus (55°C), sentrifugi	Mikrosuodatus	-	Dos Passos ja Ambye-Jensen ¹⁸
Kukkakaali, parsakaali, kaali, punajuuri	Puristus	-	Kyllä (pH 10)	Suodatus	Isoelektrinen saostus (pH 4)	4,38-14,21 %	Sedlar <i>et al.</i> ¹⁴
Sokerijuurikas	Mekaaninen homogenointi Ultra-Turrax-laitteella	UAE, entsyymi-avusteinen uutto	Kyllä (pH 9)	Lämpösaostus (50°C, 30 min), sentrifugi	Isoelektrinen saostus (pH 3,5)	38,09 %	Akyüz <i>et al.</i> ¹⁶
Sinimailanen (kuivattu)	-	-	Kyllä (pH 10)	Lämpösaostus (50°C, 120 min), sentrifugi	Isoelektrinen saostus (pH 3,5), uudelleen liuotus, dialyysi	-	Hojilla-Evangelista <i>et al.</i> ¹²

*Proteiinisaannon ja -talteenoton laskemiseen ja ilmoittamiseen on olemassa useita eri tapoja. Taulukossa on ilmoitettu tulokset vain niistä tutkimuksista, joissa proteiinisaanto ilmoitettiin joko yksikössä mg proteiinia/g raakaa lähtömateriaalia tai proteiinin talteenottoprosenttina (laskukaava luvussa 8.5. *RuBisCO:n saostaminen*).

**Parsakaali, kaali, lehtikaali, mangoldi, punajuuri, sokerijuurikas, porkkana, sinimailanen, pinaatti.

3.1 VIHREIDEN LEHTIEN PROTEIINIT

Kasvisolut sisältävät suuren määrän erilaisia proteiineja, joista suurin osa sijaitsee viherhiukkasissa eli kloroplasteissa.²⁰ Lisäksi jonkin verran proteiinia on myös pienemmissä soluelimissä kuten mitokondrioissa ja ribosomeissa.²⁰ Lehtiproteiineja käsittelevissä tutkimuksissa proteiinit jaetaan usein karkeasti kahteen ryhmään niiden solunsisäisen alkuperän perusteella: kloroplastiseen eli ”vihreään fraktioon” ja sytoplasmaattiseen eli ”valkoiseen fraktioon”.¹⁸ Kloroplastinen proteiinifraktio sisältää usein liukenemattomia proteiineja, jotka ovat liittyneet lipideihin ja pigmentteihin kuten klorofylliin sekä karotenoideihin, mistä myös termi ”vihreä fraktio” juontaa.¹⁸ Sytoplasmaattinen fraktio taas sisältää klorofyllistä vapaita liukoisia proteiineja, jotka ovat kuitenkin nimestään huolimatta peräisin kloroplastin stroomasta eli kloroplastin sisäisestä nesteestä.^{18,20} Merkittävä osa tästä lehtien liukoisesta, valkoisesta proteiinifraktiosta on RuBisCO:a.^{18,20} Tässä tutkielmassa valkoisella fraktiolla tai valkoisella proteiinilla viitataan liukoiisiin proteiineihin ja RuBisCO:n, ja vihreällä fraktiolla tai vihreällä proteiinilla viitataan muihin liukenemattomiin proteiineihin.

3.2 KASVIKUDOKSEN HAJOTTAMINEN

Vesiliukoiset proteiinit sijaitsevat kasvien solujen sisällä. Näiden proteiinien eristämiseksi tulee siten ensin hajottaa kasvin solurakenne. Mekaaniseen solurakenteen rikkomiseen voidaan käyttää käytännössä aivan tavallisia keittiöstäkin löytyviä työvälineitä kuten tehosekoitinta, puristinta tai myllyä.⁸ Yksi yleisimmistä menetelmistä onkin käyttää mekaanista puristulaitetta, kuten esimerkiksi ruuvipuristin mallista mehustinta.^{2,14,15,17,19} Tällöin saadaan eroteltua talteen vihreä mehu kasvin kuitumassasta. Vihreä mehu voidaan vielä lisäksi sentrifugoida, jolloin saadaan partikkeleista vapaa nestekerros eli supernatantti.² Paremman proteiinisaannon takaamiseksi ensimmäisen käsittelykerran kuitumassaa voidaan vielä uuttaa uudestaan vedessä ja sen jälkeen mekaanisesti puristaa uudelleen.² Myös ultraääniaivusteisen uuton on huomattu edesauttavan solurakenteen hajoamista ja siten parantavan lehtiproteiinin saantoa, erityisesti vahvempien kasvimateriaalien kuten kukkakaalin kohdalla.¹⁵

Vaikka mekaaninen proteiinien erottaminen kuiduista onkin yleisin menetelmä, on erotus teoriassa mahdollista tehdä myös kemiallisesti uuttamalla, jolloin erotus perustuu proteiinien liukoisuuteen. Esimerkiksi Hojilla-Evangelista *et al.*¹² erottivat tutkimuksessaan sinimailasen lehtien proteiinit uuttamalla kuivattua ja jauhettua lehtiseosta useilla liuottimilla (vesi, suolaliuos, etanoli, etikkahappo, natriumhydroksidi ja denaturoiva emäksinen puskuriliuos). Proteiinifraktiot saatiin uutettua ja eroteltua lehdistä. Kirjoittajat kuitenkin totesivat, että kuivatut lehdet eivät ole käytännöllinen lähtöaine menetelmälle, sillä menetelmällä oli vaikea saavuttaa korkeaa saantoa ja puhdasta lopputuotetta.¹²

Kuten aiemmin todettu, RuBisCO on kaikista liukoisinta emäksisessä ympäristössä.¹⁴ Erotusprosessissa tehdään siksi joskus aluksi myös proteiinien emäksinen uutto, erityisesti silloin, kun valkoinen fraktio halutaan myöhemmin erottaa isoelektrisellä saostuksella. Uutto tehdään esimerkiksi lisäämällä natriumhydroksidia¹⁵ puristettuun mehuun, kunnes pH on 8²⁰, 9¹⁶ tai jopa 10¹⁴. Emäksisellä uutolla pyritään varmistamaan, että maksimaalinen määrä RuBisCO:a uuttuu solurakenteiden osista nesteeseen. RuBisCO:n saantoa parannetaan joskus myös käyttämällä avustettuja uuttomenetelmiä. Yksi yleisimmistä on ultraääniavusteinen uutto (UAE). Kasvinäytteen UAE-käsittely luo nesteeseen paineaaltoja, jotka aiheuttavat kavitaatiota. Kavitaatiokuplat hajottavat kasvin soluseiniä vapauttaen solunsisäisiä yhdisteitä nesteeseen.¹⁹ Esimerkiksi Xu *et al.*¹⁵ huomasivat UAE-käsittelyn parantavan kukkakaalin lehdistä eristetyn proteiinin saantoa.

3.3 PROTEIINIEN FRAKTIOINTI

Vihreä mehu sisältää valkoisen proteiinifraktion ja RuBisCO:n lisäksi myös muita lehden komponentteja, ei-liukoisia proteiineja ja yhdisteitä kuten klorofylliä. Proteiinien erottamiseksi vihreästä mehusta on olemassa useita menetelmiä. Ei-liukoiset proteiinit voidaan erottaa esimerkiksi suodattamalla^{14,15} tai lämpösaostamalla¹⁸, joista jälkimmäinen on yleisesti käytetty keino. Vihreän mehun tapauksessa ensiksi saostuu vihreä fraktio, joka sisältää liukenemattomia, pigmentteihin kuten esimerkiksi klorofylliin sitoutuneita proteiineja ja muita kloroplastisia fragmentteja.¹⁸ Vihreä fraktio saostuu noin 50°C-60°C lämpötilassa^{2,18}, teoriassa ennen valkoista fraktiota.

Käytetty lämpötila kuitenkin vaikuttaa paljon fraktioinnin lopputulokseen ja sopivan saostuslämpötilan valinta onkin kriittinen tekijä valkoisen proteiini-fraktion talteenotto-prosessissa.¹⁸ Korkeissa lämpötiloissa valkoisen fraktion saanto on huonompi, mutta matalissa lämpötiloissa vihreän fraktion saostuminen on heikompaa.¹⁸ Esimerkiksi Dos Passos ja Ambye-Jensen¹⁸ huomasivat 55°C lämpötilan olevan sellainen, missä alfalfan valkoisen fraktion saanto oli suhteellisen hyvä ja vihreän fraktion saostuminen oli samalla silti tehokasta. Mutta kuten aiemmin todettu, RuBisCO:n lämpöstabiilisuus on vahvasti sidoksissa sen alkuperään. Lämpötilan valinta tulee siis tehdä aina sen perusteella, mistä kasvista RuBisCO:a yritetään erottaa. Lämmityksen jälkeen saostunut vihreä fraktio voidaan poistaa sentrifugoimalla, jolloin jäljelle jäävä supernatantti sisältää valkoisen proteiini-fraktion, mukaan lukien RuBisCO:n, mikäli lämmityksessä ei ole käytetty liian korkeaa lämpötilaa.^{2,18}

Proteiinien fraktiointiin liittyy siis myös haasteita. Lämpösaostamisen haasteena on, ettei se ole täysin selektiivinen menetelmä fraktiointiin, sillä lämmityksessä osa valkoisesta fraktiosta saattaa saostua vihreän fraktion mukana. Lisäksi osa valkoisen fraktion proteiinista voi saostua vielä siinä vaiheessa, kun jo saostunutta vihreää fraktiota erotetaan sentrifugilla. Toisaalta sentrifugointi ei välttämättä onnistu erottamaan kaikkea saostunutta vihreän fraktion proteiinia, vaan ne saattavat jäädä sentrifugoinnin jälkeen vielä mehuun vihreinä aggregaatteina. Näihin tekijöihin voidaan kuitenkin vaikuttaa paljon myös sentrifugin valinnalla.¹⁸

3.4 VALKOISEN FRAKTION TALTEENOTTO

Vihreän fraktion erottamisen jälkeen jäljellä on supernatantti, joka sisältää liukoisien valkoisen fraktion ja RuBisCO:n. Yleinen menetelmä valkoisen fraktion saostamiseksi supernatantista on isoelektrinen saostus.^{2,14,15} Isoelektrisessä saostuksessa liuoksen pH säädetään esimerkiksi suolahapolla lähelle RuBisCO:n isoelektristä pistettä, jolloin se saostuu.^{14,15} Tutkimuksissa on käytetty valkoisen fraktion isoelektriseen saostamiseen esimerkiksi pH arvoja 3,5;¹⁶ 4,5² ja 4^{14,15}.

Vihreä fraktio voidaan siis erottaa saostamalla se lämmön avulla noin 50-60°C lämpötilassa.¹⁸ Myös valkoisen fraktion proteiinit voidaan teoriassa saostaa lämmön avulla, sillä kaikki lehtiproteiinit koaguloituvat ja saostuvat noin 70°C lämpötilassa.^{13,20} Korkea lämpötila kuitenkin denaturoi proteiinit, joka voi vaikuttaa esimerkiksi niiden funktionaalisiin ominaisuuksiin.¹⁹

Paremmen puhtauden saavuttamiseksi valkoisen fraktion erotuksen jälkeen saatu proteiinisaostuma voidaan vielä uudelleen liuottaa. Liuotus tehdään veteen, jonka pH säädetään esimerkiksi natriumhydroksidilla noin arvoon 7.¹² Uudelleenliuottamalla saadaan erotettua RuBisCO entistä puhtaammaksi valkoisen fraktion mukana mahdollisesti saostuneista epäpuhtauksista ja ei-liukoisista partikkeleista.^{2,12} Lopuksi saatu runsaasti RuBisCO:a sisältävä proteiinisaostuma usein lyofilisoidaan eli kylmäkuivataan jauheeksi, joka helpottaa sen säilyttämistä ja jatkoanalysointia.^{2,12,15-18}

3.5 TALTEENOTON HAASTEITA

RuBisCO:n erotusprosessin suurimmat haasteet liittyvät muun muassa klorofylliin, erotuksen saantoon sekä epäsuotuisiin kemiallisiin reaktioihin erotusprosessin aikana. Kasvit sisältävät siis RuBisCO:n lisäksi paljon myös muita yhdisteitä, entsyymejä ja proteiineja, jotka vapautuvat kasvin solurakenteista kasvukudoksen hajotessa. Tämän seurauksena entsyymit, proteiinit ja muut yhdisteet pääsevät kosketuksiin keskenään, mikä voi aiheuttaa lopputuotteen kannalta epäsuotuisia reaktioita. Yksi edellä mainituista on polyfenolioksidaasit, jotka ovat kasveista löytyviä entsyymejä.¹⁹ Polyfenolioksidaasit katalysoivat kasvin polyfenolien hapettumista kinoneiksi, jotka voivat edelleen reagoida kasvin muiden yhdisteiden ja proteiinien kanssa vapautuessaan solurakenteista.^{13,19} Tämä aiheuttaa prosessin aikana epäsuotuisia värinmuutoksia kuten tummumista sekä sivumakuja, jotka vaikuttavat lopputuotteen laatuun.¹⁹ Jos tämä halutaan välttää, tulee erotusprosessiin lisätä vaihe, joka estää nämä hapetusreaktiot.¹⁹ Esimerkiksi askorbiinihappo ja metabisulfiitti voivat estää polyfenolioksidaasien aktiivisuutta ja siten vähentää värinmuutoksia.¹³ Lehtiproteiinien eristämisen kannalta haasteeksi nousevat myös proteolyttiset reaktiot. Nämä ovat seurausta

kasvin omista proteaasientsyymeistä, jotka hajottavat proteiineja päästessään niiden kanssa kosketuksiin.¹⁹ Tämä voi laskea eristettävissä olevien proteiinien määrää ja heikentää saantoa.¹⁹

Vihreiden lehtien sisältämä klorofylli saattaa myös aiheuttaa haasteita. Jos lehtiproteiinia valmistetaan esimerkiksi eläinten rehuksi, ei valmiin proteiinin värillä ja maulla ole juurikaan merkitystä.¹³ Kuluttajien näkökulmasta taas vihreä väri saatetaan nähdä elintarvikkeessa negatiivisena asiana tehden siitä vähemmän houkuttelevan, vaikkakin toisaalta tämä näkökulma on hiljattain ollut muuttumassa myös päinvastaiseksi, ja vihreä väri saatetaan yhdistää myös esimerkiksi luonnonmukaisuuteen ja terveellisyyteen.^{13,19} Jos tavoitteena on kuitenkin väritön tai vaalea proteiini-isolaatti, tulee vihreä klorofylli poistaa.¹³ Riippumatta siitä, halutaanko klorofylli poistaa vai säästää erotusprosessissa, tulee kiinnittää huomiota siihen, ettei prosessin aikana muodostuisi epämiellyttävää väriä.¹⁹

Kaupallisesta näkökulmasta haasteeksi nousee myös proteiinin saanto. Kasvien lehdet sisältävät usein jo lähtökohtaisesti vain vähän proteiinia niiden korkean vesipitoisuuden vuoksi, minkä seurauksena biomassaa joudutaan käsittelemään suuria määriä.¹³ Sen vuoksi on ensiarvoisen tärkeää optimoida erotusprosessin vaiheet. Saantoon vaikuttaa muun muassa biomassan valinta, solurakenteiden hajotuksen tehokkuus, fraktiointimenetelmien valinta, proteolyttiset reaktiot ja polyfenolien hapettuminen sekä vaativat puhdistusvaiheet esimerkiksi klorofyllin ja muiden yhdisteiden poistamiseksi.¹⁹ Proteiinin lopullinen käyttötarkoitus vaikuttaa erotusprosessin valintaan, joka vaikuttaa kustannuksiin ja taloudelliseen kannattavuuteen.¹⁹

4 PROTEIINIEN ANALYYSIMENETELMIÄ

4.1 KOKONAISPROTEIINIPITOISUUDEN KVANTITATIIVISIA ANALYYSIMENETELMIÄ

Kokonaisproteiinipitoisuuden määrittämiseen on olemassa useita menetelmiä. Menetelmät voidaan jakaa esimerkiksi suoriin ja epäsuoriin proteiinimäärittäyksiin (taulukko 2). Suoralla proteiinimäärittäyksellä tarkoitetaan menetelmää, jossa mitataan suoraan proteiinia esimerkiksi spektrofotometrisesti tai sen sisältämien aminohappojen perusteella. Epäsuorassa menetelmässä mitataan jotakin muuta proteiinin ominaisuutta, jonka perusteella proteiinipitoisuus lasketaan. Tästä esimerkki on Kjeldahl-analyysi, jossa mitataan typen määrää, joka sitten muutetaan matemaattisesti proteiinipitoisuudeksi. Tässä tutkielmassa käsitellään joitakin erityisesti lehtiproteiinitutkimuksissa yleisesti käytettyjä kvantitatiivisia analyysimenetelmiä.

Taulukko 2. Kokonaisproteiinipitoisuuden kvantitatiivisia menetelmiä

Menetelmä	Periaate
Suorat menetelmät	
Aminohappoanalyysi	Proteiini digestoidaan ja vapautuneet aminohapot mitataan kromatografisesti, jolloin proteiinin määrä on aminohappojen summa
UV-spektroskopia	Proteiinin aromaattiset aminohapot absorboivat UV-valoa, absorbanssin määrä on verrannollinen pitoisuuteen Beerin-Lambertin lain mukaan
Epäsuorat menetelmät	
Kjeldahl	Määritetään näytteen typpipitoisuus, josta lasketaan konversiokertoimella proteiinin määrä
Bradford	Väriaineen sitoutuminen proteiineihin ja kolorimetrinen määrittäminen
Lowry	Cu^+ -proteiinikompleksin muodostuminen, Folin-reagenssin pelkistyminen ja kolorimetrinen määrittäminen

Elintarvikkeiden proteiininanalytiikka ei ole suoraviivaista ja siihen liittyy myös omat haasteensa. Haasteita ilmenee erityisesti silloin, kun mitataan proteiinipitoisuutta elintarvikkeista, jotka sisältävät myös muita ravintoaineita kuten rasvaa ja hiilihydraatteja.²¹ Proteiinien vuorovaikutukset muiden ravintoaineiden kanssa saattavat heikentää niiden saatavuutta mittauksessa, mikä johtaa proteiinipitoisuuden aliarviointiin.²¹ Toisaalta erityisesti epäsuorien menetelmien haasteeksi nousee joskus päinvastoin proteiinipitoisuuden yliarviointi.²¹ Näihin palataan myöhemmin menetelmiä käsittelevien kappaleiden kohdalla.

4.1.1 KJELDAHL-MENETELMÄ

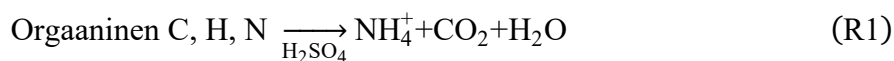
Vuonna 1883 tanskalainen kemisti Johan Kjeldahl kehitti menetelmän typen määrittämiseksi orgaanisista näytteistä.²² Tästä lähtien menetelmää on käytetty laajasti esimerkiksi elintarvikenäytteiden proteiininanalytiikassa ja siitä on kehitetty ja hyväksytty esimerkiksi kansainvälinen ISO-standardoitu menetelmä proteiinien määrittämistä varten.²² Alunperin Kjeldahl kehitti menetelmän viljan proteiinipitoisuuden seuraamiseen, mutta sittemmin sitä on muokattu useiden toimijoiden puolesta soveltumaan moniin erilaisiin typpiyhdisteisiin, laajentaen merkittävästi menetelmän käyttöaluetta.²³ Menetelmä nimettiin sittemmin kehittäjänsä mukaan Kjeldahl-menetelmäksi.

Kjeldahl-menetelmää voidaan soveltaa erityisesti proteiinipitoisuuden määrittämiseen, sillä typpi on proteiineissa runsaasti esiintyvä alkuaine. Menetelmän perustana on näytteen sisältämän typen muuttuminen ammoniakiksi, kun näyte digestoidaan (*engl. sample digestion*) rikkihapossa katalyytin kanssa.²² Muodostuneen ammoniakkin määrä voidaan mitata ja sen perusteella laskea näytteen proteiinipitoisuus.²² Käytännön proteiininanalytiikan kannalta menetelmän etuna on sen monipuolisuus, sillä se soveltuu usealle näytetyypille ja matriisille aina kiinteistä nestemäisiin näytteisiin. Lisäksi menetelmä tuottaa tuloksia yleensä hyvällä tarkkuudella. Menetelmän haasteena on, ettei sillä voida erottaa proteiinista peräisin olevaa tyyppiä muista näytteen typpiyhdisteistä, kuten vapaista aminohapoista, ammoniakista tai ureasta peräisin olevasta tyypestä, mikä saattaa joissakin tapauksissa vääristää menetelmällä laskettua proteiinin määrää.²² Historiassa on esimerkkejä sellaisista tapauksista, joissa elintarvikkeen taloudellista arvoa on yritetty nostaa lisäämällä siihen orgaanista typpirikasta yhdistettä, joka väärentää typen perusteella laskettua proteiinin määrää.²¹

Kjeldahl-menetelmä voidaan jakaa kolmeen päävaiheeseen: näytteen digestointi, ammoniakkin erotus ja ammoniakkin määrittäminen.²⁴ Nykyään Kjeldahl-analyysi voidaan suorittaa laboratorioissa täysin automatisoituna digestointi- ja höyrytislainlaitteilla, mutta menetelmän periaate ja kemia ovat silti yhä käytännössä samat.

4.1.1.1 MENETELMÄN TEORIA

Kjeldahl-menetelmän ensimmäinen ja ehkäpä tärkein sekä eniten aikaa vaativa vaihe on näytteen digestointi.²² Näyte digestoidaan keittäen väkevässä rikkihapossa, jolloin ideaalitilanteessa näytteen kaikki orgaaninen typpi muuttuu hapettumisen seurauksena ammoniumioneiksi.²² Hapettumista voidaan kuvata reaktioyhtälöllä R1:²⁵

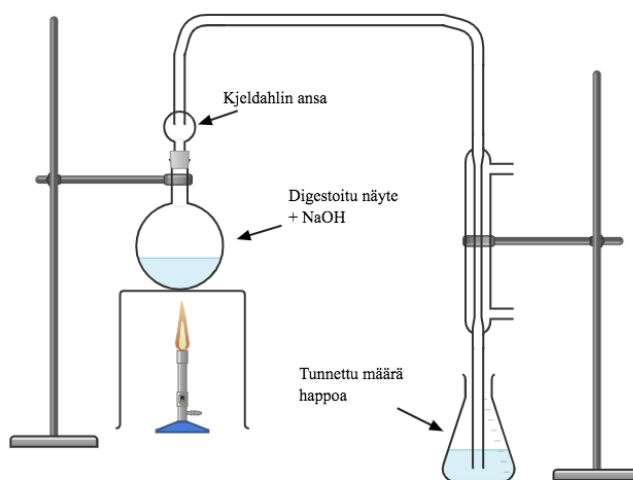


Tätä muuten hidasta reaktiota nopeutetaan yleensä käyttämällä katalyyttiä.²³ Kjeldahl-menetelmän katalyytiksi onkin kokeiltu melkein kaikkia alkuaineita, joista yleisimpinä muun muassa elohopea, seleeni, telluuri, rauta ja kupari.^{22,24} Elohopean on todettu olevan kaikista tehokkain katalyytti, mutta sen käyttöön liittyy turvallisuus- ja ympäristöriskejä sen myrkyllisyyden vuoksi.^{22,24} Lisäksi elohopea muodostaa kompleksiyhdisteitä ammoniumin kanssa, minkä vuoksi se pitää saostaa pois ennen tislautusta.²³ Tämä ylimääräinen vaihe voidaan välttää käyttämällä esimerkiksi kuparikatalyyttiä.²³ Esimerkiksi kuparisulfaatti sopii katalyytiksi elintarvikkeiden typen määrittämiseen.²³ Digestoinnissa lisätään myös kaliumsulfaattia, joka nostaa rikkihapon kiehumispistettä ja siten nopeuttaa näytteen orgaanisen aineksen hapetusreaktioita.^{23,24} Digestointi tehdään perinteisesti Kjeldahl-pullossa, joka on erityisesti tälle menetelmälle suunniteltu pitkäkaulainen ja pyöreäpohjainen lasinen pullo, jonka tilavuus on tyypillisesti 500-800 ml.²² Nykyään kuitenkin myös digestointiin on olemassa automatisoituja laitteita, jotka parantavat muun muassa vaiheen turvallisuutta.

Digestoinnin jälkeen vahvasti hapan liuos laimennetaan liian vahvojen reaktioiden sekä paakkuuntumisen välttämiseksi vedellä ja sen jälkeen alkalisoidaan natriumhydroksidilla.^{22,23} Natriumhydroksidin lisäämisen seurauksena muodostuu ammoniakkia reaktioyhtälön 2 mukaan:²⁵



Muodostuneen ammoniakin talteenottoon on useita eri vaihtoehtoja, joista yksi käytetyimmistä on suora tislauk. ²³ Suorassa tislauksessa digestoidun näytteen sisältävä pullo liitetään tisluslaitteistoon (kuva 3), joka on liitetty tunnetun ylimäärän happoa (usein suolahappo tai boorihappo) ja indikaattoria sisältävään keräysastiaan. ²² Tämän jälkeen liuokseen muodostunut ammoniakki tislataan keräysastiaan. Ammoniakin tislauk on nopea prosessi, ja suurin osa saadaan tislattua jo kiehumisen ensimmäisten minuuttien aikana. ²³



Kuva 3. Kuvaus Kjeldahl-menetelmän tisluslaitteistosta.

Kuva luotu Chemix-sivustolla (Created with <https://chemix.org>).

Tislauksen seurauksena keräysastiaan siirtynyt ammoniakki reagoi suolahapon kanssa reaktioyhtälön 3 mukaisesti:²⁵



Ylimäärä happo titrataan emäksellä, jolloin voidaan määrittää kuinka suuri määrä suolahaposta reagoi ammoniakkin kanssa ja lopulta epäsuorasti kuinka paljon ammoniakkia eli tyypeä näytteessä oli.²² Arvio proteiinipitoisuudesta saadaan laskettua typpipitoisuudesta kaavalla 1:

$$\text{Proteiini} = N \cdot \text{konversiokerroin} \quad (1)$$

missä N tarkoittaa yleensä näytteen typen prosentuaalista määrää (w/w %). Konversiokerroin, jota kutsutaan myös Jonesin kertoimeksi (*engl. Jones factor*) on yleisesti 6,25, joka perustuu siihen arvioon, että proteiineissa olisi keskimäärin 16 % tyypeä ($1/0,16=6,25$). Yhden yleisen kertoimen käyttöön liittyy kuitenkin haasteita. Kaikki näytteen typpi ei ole välttämättä peräisin proteiinista, vaan hyvin usein mukana on myös ei-proteiiniperäistä tyypeä kuten vapaita aminohappoja, nukleotideja tai kreatiinia. Lisäksi eri lähteistä olevien proteiinien aminohappokoostumus ja sen myötä myös typpipitoisuus vaihtelee. Siksi ei ole suositeltavaa soveltaa yhtä ja samaa kerrointa jokaiseen tilanteeseen, vaan kerroin tulisi valita analysoitavan proteiininlähteen mukaan (taulukko 3).²⁶

Konversiokertoimista nousee myös yksi Kjeldahl-menetelmän haasteista, joka on jo aiemmin mainittu proteiinipitoisuuden yliarvioiminen. Eräässä tutkimuksessa²¹ vertailtiin Kjeldahl-menetelmällä ja aminohappoanalyysillä saatuja proteiinipitoisuuksia. Tutkimuksessa huomattiin, että riippumatta siitä, käytettiinkö yleistä konversiokerrointa vai spesifistä kerrointa, saatiin merkittävästi suurempia proteiinipitoisuuksia aina Kjeldahl-menetelmällä.²¹ Siksi tuloksiin kannattaa suhtautua varauksella ja arvioida tilanteen mukaan, kannattaako tulokset ilmoittaa typpenä vai laskettuna proteiinina.

Taulukko 3. Joidenkin ruoka-aineiden konversiokertoimia proteiinipitoisuuden laskemiseen. (Muokattu lähteestä²⁶)

Ruoka-aine	Kerroin
Liha	6,25
Kananmuna	6,25
Maito	6,38
Kaura	5,83
Riisi	5,95
Soijapapu	5,71
Maapähkinä	5,46

Edellä kuvattu Kjeldahl-menetelmä vaatii kaksi standardiliuosta: hapon ja emäksen. Sen vuoksi joskus suositaan vaihtoehtoista menetelmää, jossa ammoniakki tislataan suolahapon sijaan boorihappoon. Tällöin muodostuu reaktioyhtälön 4 mukaan boraattia, joka voidaan titrata tunnetulla suolahapolla reaktioyhtälön 5 mukaan:



Tämä menetelmä on siinä mielessä yksinkertaisempi, että se vaatii vain yhden standardiliuoksen.²² Esimerkiksi myös tämän tutkielman kokeellisessa työssä käytetään Kjeldahl-määrittelyssä vastaanottoliuoksena boorihappoa.

4.1.1.2 AUTOMATISOITU MENETELMÄ

Edellä kuvattu menetelmän suoritus on aikaa vievä, työläs ja vaatii analyysin suorittajalle vaarallisten kemikaalien käsittelyä. Kuten mainittu, nykyään Kjeldahl-analyysi voidaan

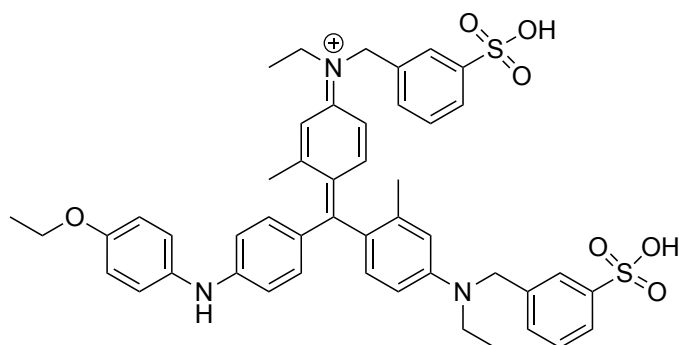
toteuttaa myös instrumentaalisesti ja täysin automatisoituna. Instrumentaalinen määrittäminen tekee analyysistä nopeamman, tehokkaamman ja käyttäjälle turvallisemman.²⁷

Myös automatisoidussa menetelmässä näytteen valmistus ja digestointi ovat analyysin onnistumisen kannalta avainasemassa. Joidenkin näytteiden, kuten kalan, lihan ja öljykasvien korkea rasva- ja öljypitoisuus saattaa kuitenkin aiheuttaa vaahtoamista digestoinnin aikana.²⁷ Vaahdon muodostuminen on ongelma, sillä näytteen kuohuminen putken reunoille tai yli voi vähentää alkuperäisen näytteen määrää, ja siten väärentää tuloksia.²⁸ Ongelman ratkaisuksi onkin kehitetty erityisesti tälle menetelmälle suunnattuja vaahdonestotabletteja. Esimerkiksi valmistajan VELP® vaahdonestotabletit sisältävät kaliumsulfaattia ja silikonia.²⁸

Analyysin helpottamiseksi on nykyään saatavilla myös valmiita katalyyttitabletteja, joilla voidaan korvata jauheena olevat katalyytit. Valmiin tabletin käyttö nopeuttaa mittauksia, mahdollistaa paremman mittauksen toistettavuuden ja tekee mittauksesta käyttäjälle turvallisemman välttämällä helposti pölyävät jauheet.²⁸ Katalyytin valinta riippuu näytteen tyypistä. Kuparikatalyyttiä pidetään yleiskäyttöisenä, ja se sopii useimmille näytetyypeille (muun muassa pähkinät, lihatuotteet, viljat, sokeri ja siirappi).²⁸ Kuitenkin haastavammille rasva- ja öljypitoisille näytteille (esimerkiksi maitotuotteet) suositellaan katalyytiksi seleeniä tai kuparia ja titaania sisältävää seosta.²⁸

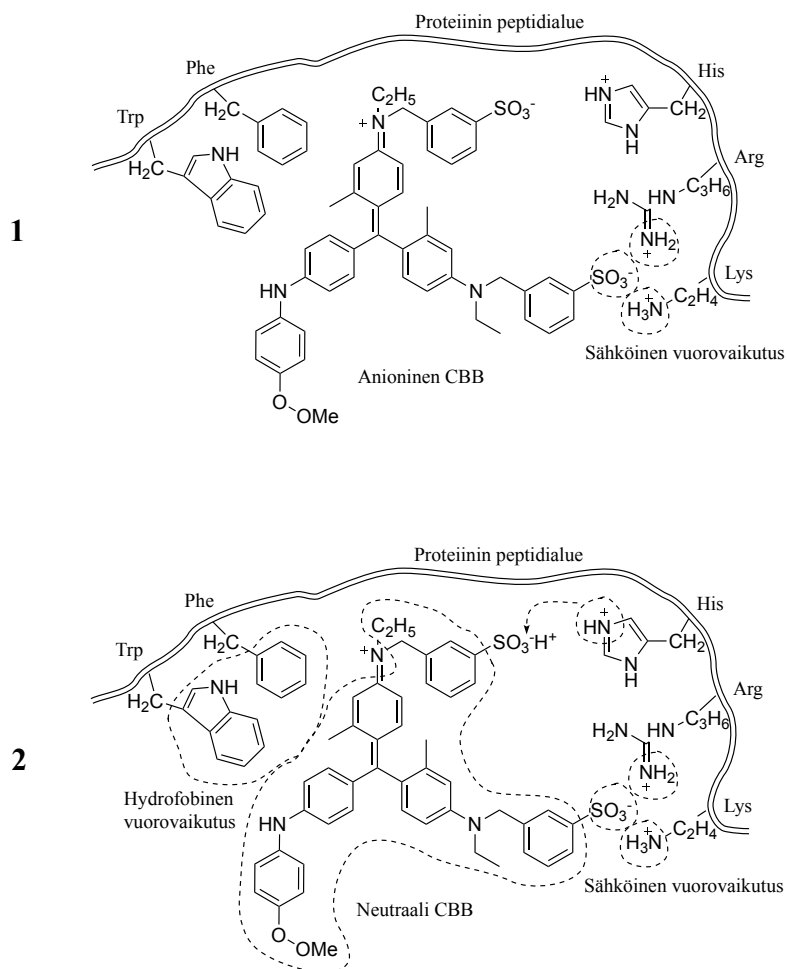
4.1.2 BRADFORD-PROTEIINIMÄÄRITYS

Bradford-proteiinimääritys on kolorimetrinen proteiinien kvantitatiivinen analyysimenetelmä, jonka kehitti Marion M. Bradford vuonna 1976.²⁹ Bradford-menetelmä perustuu väriaineeseen nimeltä Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) (kuva 4), joka sitoutuu proteiineihin.²⁹ Väriaine-proteiinikompleksi saa aikaan absorbanssimaksimin siirtymisen aallonpituudesta 465 nm aallonpituuteen 595 nm, ja tämä siirtymä voidaan mitata spektrofotometrisesti.²⁹ Absorption määrä on verrannollinen näytteen proteiinipitoisuuteen.²⁹



Kuva 4. Coomassie Brilliant Blue G-250 kationinen, kahdesti protonoitunut rakenne, jonka absorbanssi havaitaan noin aallonpituudella 470 nm.³⁰

CBB esiintyy kolmessa muodossa: anionisena (sininen), neutraalina (vihreä) ja kahdesti protonoituneena kationisena (punainen), joka on erittäin happamissa olosuhteissa stabiilein muoto. Molekyylin kolmesta muodosta vain anioninen ja neutraali muoto sitoutuvat proteiineihin (kuva 5). Neutraali muoto sitoutuu proteiineihin sekä hydrofobisilla- että elektrostaattisilla vuorovaikutuksilla ja anioninen muoto pääasiassa vain sähköisillä vuorovaikutuksilla. Elektrostaattiset vuorovaikutukset tapahtuvat CBB:n kvaternäärisestä tyypestä kauempana olevan sulfoniryhmän ja ensisijaisesti proteiinin arginiinin välillä, mutta vuorovaikutusta tapahtuu myös muiden emäksisten aminohappojen, kuten lysiinin ja histidiinin kanssa. Hydrofobinen vuorovaikutus tapahtuu CBB:n ja hydrofobisten aminohappojen, kuten tryptofaanin ja fenyylialaniinin välillä. Neutraalin muodon kvaternääristä tyyppiä lähellä olevan neutraalin sulfoniryhmän sidos on heikentynyt, jonka seurauksena yhdiste käyttäytyy pseudo-anionisesti. Käytännössä tämä siis tarkoittaa, että spektrisesti se käyttäytyy ikään kuin CBB:n anioninen muoto, vaikkei sillä teoriassa ole pysyvää negatiivista varausta. Kationisessa muodossa (kuva 4) ei esiinny sitoutumista, sillä sen kaksi sulfoniryhmää ovat neutraalissa, protonoituneessa muodossa ja siksi eivät reagoi proteiinien aminohappojen kanssa.³⁰



Kuva 5. Anionisen (1) ja neutraalin (2) CBB-molekyylin vuorovaikutukset proteiinin aminohappojen sivuketjujen kanssa. Vuorovaikuttavat molekyylin osat on merkitty katkoviivoilla. Proteiinin peptidialueeseen on piirretty näkyviin tryptofaanin (Trp), fenyylialaniinin (Phe), histidiinin (His), arginiinin (Arg) ja lysiinin (Lys) sivuketjut. Muokattu lähteestä.³⁰

Anioninen ja neutraali CBB sitoutuvat kumpikin proteiineihin yhtä tehokkaasti, eli sillä ei ole mittaustuloksen kannalta väliä, kummassa muodossa väriainemolekyyli alun perin oli.³⁰ Proteiinit siis sitovat maksimaalisen määrän CBB-molekyylejä riippumatta siitä, ovatko molekyylit neutraaleja vai anionisia – lopputulos on silti sininen kompleksi, joka absorboi valoa noin 595-650 nm aallonpituudella.^{29,30}

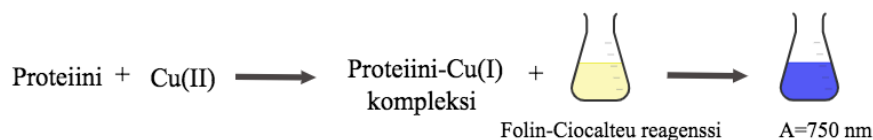
Alkuperäisessä menetelmäkuvauksessa²⁹ valmistetaan hapan väriainereagenssi liuottamalla CBB etanoliin ja fosforihappoon. Reagenssi valmistetaan siten, että siinä on CBB 0,01 % (w/v), etanolia 4,7 % (w/v) ja fosforihappoa 8,5 % (w/v).²⁹ Nykyään on myös kaupallisesti saatavilla

valmista reagenssia, jota löytää usein esimerkiksi nimellä ”*Bradford Reagent*”. Proteiinimääritys suoritetaan valmistamalla tunnetun määrän proteiinia (10-100 µg / 0,1 ml) sisältäviä standardiliuoksia, joihin lisätään puskuriliuosta ja valmista CBB-reagenssia.²⁹ Värimuodostus tapahtuu heti, ja näytteiden absorbanssi mitataan spektrofotometrillä aallonpituudessa 595 nm 2-60 minuutin kuluessa valmistuksesta.²⁹ Standardiliuosten absorbanssien perusteella piirretään standardisuora, jota käytetään tuntemattoman pitoisuuden määrittämiseen.²⁹

Bradford-proteiinimääritys on suhteellisen helppo, nopea ja herkkä menetelmä, joka on myös helposti toistettavissa.²⁹ Menetelmä ei ole kovin altis esimerkiksi kationeista kuten kaliumista tai natriumista eikä hiilihydraateista johtuville häiriöille.²⁹ Sen sijaan pinta-aktiivisten aineiden, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS), Triton X-100 tai astianpesuaineiden suuret määrät aiheuttavat mittausta häiritsevää väriä.²⁹ Häiriötä voi tulla myös, jos näytteiden valmistuksessa käytetään liian emäksistä puskurireagenssia, sillä tämä voi vaikuttaa CBB:n ioniseen muotoon ja siten väriin, mikä puolestaan voi häiritä mittausta sekä väärentää tuloksia.²⁹ Myös Bradford-menetelmä saattaa joissakin tapauksissa yliarvioida proteiinipitoisuuden verrattuna aminohappoanalyysiin.²¹ Tämä viittaa siihen, että menetelmässä esiintyy interferenssiä, vaikka sen onkin yleensä ajateltu olevan näille vähemmän altis.²¹

4.1.3 LOWRY-PROTEIINIMÄÄRITYS

Lowry-proteiinimääritys on myös Bradford-menetelmän tapaan kolorimetrinen kvantitatiivinen menetelmä proteiinipitoisuuden mittaamiseen liuoksesta. Menetelmä perustuu kahteen reaktioon, joista ensimmäinen on proteiinin reaktio kuparin kanssa emäksisessä liuoksessa ja toinen Folin-Ciocalteu reagenssin pelkistymisen kuparikäsitellyn proteiinin seurauksena (kuva 6). Folin-Ciocalteu reagenssi sisältää fosfomolybdeeniä ja fosfowolframaattia.³¹



Kuva 6. Yksinkertaistettu havainnollistava kuvaus Lowry-proteiinimäärityksen vaiheista, jossa lopulta saadaan sininen liuos, jonka absorbanssimaksimi havaitaan noin aallonpituudella 750 nm.

Ensimmäisessä vaiheessa emäksinen kupariliuos, joka sisältää Cu^{2+} -ioneja, lisätään proteiiniliuokseen. Kupari reagoi proteiinien peptidisidosten kanssa muodostaen värillisen kompleksiyhdisteen ja samalla pelkistyen³¹



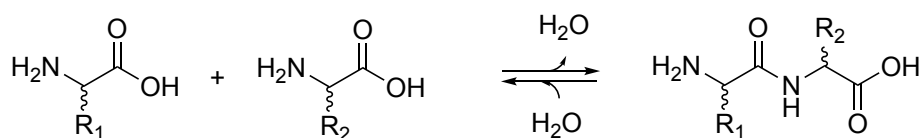
Toisessa vaiheessa liuokseen lisätään Folin-Ciocalteu reagenssi, joka reagoi proteiini-kupari kompleksin kanssa. Reaktion seurauksena Folin-Ciocalteu reagenssi pelkistyy, mikä saa aikaan sinisen värin, joka on mitattavissa 750 nm aallonpituudella. Paras väri saadaan, jos pelkistyminen tapahtuu noin pH 10 arvossa. Folin-Ciocalteu reagenssin lisäyksen seurauksena vapautuu happoa, jonka vuoksi liuos tulee puskuroida esimerkiksi natriumhydroksidilla ja natriumkarbonaatilla, jotta pH pysyy tasaisena ja värin muodostuminen ei häiriinny.³¹

Menetelmän tärkeimpiin etuihin kuuluu sen herkkyys, selektiivisyys ja pienempi alttius sameudesta johtuville mittaushäiriöille. Lisäksi menetelmä on suhteellisen yksinkertainen ja vain harvat aineet aiheuttavat sille merkittävää häiriötä. Lowry-menetelmällä on kuitenkin myös kaksi haittapuolta, jotka liittyvät Folin-reaktioon. Ensinnäkin, värin määrä vaihtelee eri proteiineilla. Toiseksi, väri ei ole tiukasti verrannollinen pitoisuuteen. Hyödyt ja haitat huomioon ottaen Lowry *et al.*³¹ suosittelevat menetelmää muun muassa proteiinien mittaamiseen entsyymien fraktioinnissa, hyvin pienten tai laimeiden proteiinimäärien tai värillisten yhdisteiden seassa olevien proteiinien määrittämiseen.³¹ Alkuperäiseen Lowry *et al.*³¹ kuvaamaan menetelmään on julkaisun jälkeen tehty myös muutoksia ja menetelmää on vuosien saatossa paranneltu muun muassa yksinkertaisemmaksi, nopeammaksi ja laajemmin

sovellettavaksi.³² Kuten Kjeldahl- ja Bradford-menetelmät, myös Lowry-menetelmä saattaa joissakin tapauksissa yliarvioida proteiinipitoisuuden, johtuen mittausta häiritsevistä yhdisteistä.²¹

4.1.4 AMINOHAPPOANALYYSI

Proteiinimääritys aminohappoanalyysillä perustuu yksinkertaisesti proteiinien hajottamiseen aminohapoiksi ja niiden määrän mittaamiseen. Proteiinien peptidisidokset hajotetaan happohydrolyysillä (esimerkiksi olosuhteissa 6 M HCl, 110°C, 24h), jonka jälkeen vapautuneet aminohappojäämät voidaan määrittää kromatografisesti esimerkiksi HPLC- tai GC-tekniikalla ja UV-spektrofotometria- tai massaspektrometriadetektiolla. Proteiinipitoisuus painona lasketaan yksittäisten aminohappotähteiden, joista on vähennetty vesimolekyylin paino, summana. Paino vähennetään, koska proteiinin peptidisidosten muodostumisreaktiossa poistuu vesimolekyyli (kuva 7).²¹



Kuva 7. Peptidisidoksen muodostuminen.

Aminohappoanalyysin yksi suuri etu sen tarkkuuden lisäksi on, ettei siinä tarvitse tehdä oletuksia esimerkiksi proteiinin tarkasta aminohappokoostumuksesta tai näytteen mahdollisesti sisältämästä ei-proteiiniperäisestä tyypestä. Tämä poistaa ne epävarmuudet ja virheen mahdollisuudet, jotka liittyvät esimerkiksi Kjeldahl-menetelmään ja laskennassa käytettyihin konversiokertoimiin. Lisäksi menetelmällä saadaan selville proteiinin tarkka aminohappokoostumus. Menetelmän haasteena taas on, että se vaatii kalliit investoinnit analyysilaitteistoihin, mikä rajoittaa joidenkin laboratorioiden mahdollisuutta hyödyntää sitä. Lisäksi menetelmä vaatii mittaajalta kokemusta, sillä jotkin aminohapot (erityisesti rikki- ja tryptofaani) ovat haasteellisia määrittää.²⁶

Aminohappoanalyysi valitaan usein proteiinitutkimuksissa referenssimenetelmäksi, sillä se on ainoa menetelmä, joka määrittää proteiinipitoisuuden suoraan ilman häiritsevien yhdisteiden vaikutusta tulokseen.²¹ Myös FAO suosittelee tätä menetelmää käytettäväksi proteiinimääritykseen aina, kun se on mahdollista ja erityisesti silloin, kun mitataan proteiinia uuselintarvikkeista, erityisruokavalioille suunnatuista elintarvikkeista tai elintarvikkeista, joita käytetään ainoana ravinnonlähteenä (muun muassa äidinmaidonkorvikkeet).²⁶

4.1.5 PROTEIINIMÄÄRITYS UV-SPEKTROFOTOMETRIALLA (A280- JA A205 - MENETELMÄT)

Proteiinit voidaan mitata myös suoraan UV-spektrofotometrisesti. UV-spektrofotometria perustuu molekyylien kykyyn absorboida valoa eri ultraviolettivalon aallonpituuksilla. Proteiinit absorboivat valoa pääasiassa aallonpituudella 280 nm niiden sisältämien aromaattisten aminohappojen vuoksi.³³ Näitä ovat esimerkiksi tryptofaani, fenyylialaniini ja tyrosiini. Menetelmästä käytetäänkin joskus myös nimitystä A280-menetelmä. Ilmiön taustalla on Beerin-Lambertin laki, jonka mukaan näytteen konsentraatio on suoraan verrannollinen absorboituneen valon määrään:

$$A = \varepsilon bc \quad (2)$$

missä A on absorbanssi, ε on molaarinen absorptiokerroin ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b on näytteen tai kyvetin paksuus (cm) ja c on näytteen absorboivan aineen pitoisuus ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Proteiinin tarkka kvantitatiivinen määrittäminen edellyttää, että sen aminohapposekvenssi ja sitä myötä ε tunnetaan.³³ Siksi menetelmä sopii parhaiten puhtaille proteiineille, jotka eivät sisällä muita UV-absorboivia yhdisteitä. Muussa tapauksessa se antaa vain arvion proteiinin määrästä.

UV-menetelmän etuja ovat sen yksinkertaisuus, nopeus ja kustannustehokkuus, sillä se ei vaadi erityisiä reagensseja tai suoritettavia reaktioita ennen mittausta.³⁴ Toisaalta A280 menetelmä kuitenkin vaatii, että proteiini sisältää aromaattisia aminohappoja. Jos niitä on vain hyvin vähän

tai ei ollenkaan, saadaan virheellisiä tuloksia.³³ Lisäksi muut UV-absorboivat yhdisteet, kuten jotkin pinta-aktiiviset aineet tai muovin pehmittimet voivat häiritä mittausta, jonka vuoksi mittauksessa tulee välttää muovisten välineiden käyttöä.³³

Myös proteiinien peptidisidokset pystyvät absorboimaan UV-valoa alle 210 nm aallonpituuksilla. UV-mittaus voidaan siten suorittaa myös vaihtoehtoisesti aallonpituudella 205 nm (A205-mittaus). Proteiinit sisältävät suuren määrän peptidisidoksia, jonka vuoksi A205-mittauksella voi olla A280-mittausta parempi herkkyys ja vähemmän proteiinien välistä vaihtelua. A205-mittausta käytetään erityisesti laimeilla liuoksilla ja sellaisten proteiinien määrittämisessä, jotka eivät sisällä aromaattisia aminohappoja.³³

4.2 NESTEKROMATOGRAFIA

Useat proteiinien kvantitatiiviseen analysointiin käytetyt menetelmät mittaavat kaiken näytteessä olevan proteiinin sen sijaan, että ne mittaisivat yhden proteiinin pitoisuuden useiden proteiinien seoksessa.³⁵ Esimerkkejä kokonaisproteiinipitoisuuden määrittämisen menetelmistä ovat muun muassa edellä kuvatut Kjeldahl-, Bradford- ja Lowry -menetelmät. Jos kuitenkin halutaan määrittää tietyn proteiinin pitoisuus, tulee kohdeproteiini erotella seoksesta. Tämä onnistuu esimerkiksi analyttisillä kromatografisilla menetelmillä.³⁵

Nestekromatografia on monipuolinen analyttinen menetelmä, jolla voidaan määrittää proteiineja sekä kvantitatiivisesti että kvalitatiivisesti. Nestekromatografia perustuu näytteen molekyylien vuorovaikutuksiin liikkuvan ja pysyvän faasin kanssa. Liikkuva faasi on tässä menetelmässä neste ja pysyvä faasi on huokoinen materiaali kromatografiakolonnin sisällä. Proteiinien erottuminen kolonnissa voi perustua esimerkiksi kokoon, varaukseen, hydrofobisuuteen tai spesifisiin sitoutumisvuorovaikutuksiin. Erottumisen mekanismi määräytyy kromatografian muodolla.

Nestekromatografialaitteisto koostuu liuotinjärjestelmästä, pumpusta, injektorista, kolonnista ja detektorista. Tyypillisesti käytettyjä liuottimia ovat vesi, etanoli, asetonitriili, metanoli ja kloroformi.³⁶ Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) on yksi nestekromatografian suosituimmista muodoista. HPLC-menetelmässä käytetty pumppu tuottaa korkean paineen, jonka avulla liikkuva faasi pumpataan kolonnin läpi. HPLC on yksi käytetyimmistä analyttisistä menetelmistä, ja sitä hyödynnetään laajasti muun muassa kemiallisissa, biolääketieteellisissä ja farmaseuttisissa analyyseissä sekä elintarviketeollisuudessa, ympäristö- ja biotieteissä.³⁷ Menetelmällä voidaan mitata happamia, emäksisiä, neutraaleja, poolisia, poolittomia, ionisoituvia sekä ioniyhdisteitä, eli se soveltuu hyvin laajalle kirjolle erilaisia yhdisteitä.³⁷ HPLC-tekniikan etuna proteiinien analytiikan kannalta on, ettei menetelmällä ole varsinaista ylärajaa analysoitavien yhdisteisen molekyylipainoille, mikä mahdollistaa myös suurempien proteiinien mittauksen.

4.2.1 ANALYTTISET KOLONNIT

Analyttiset kolonnit ovat kromatografisten systeemien avainasemassa ja määrittävät pitkälti osaltaan myös kromatografian tyypin. Tässä tutkielmassa kolonnilla viitataan nimenomaan analyttiseen kolonniin, jossa tapahtuu liuoksen komponenttien erottuminen. Kromatografisissa systeemeissä käytetään myös pienempiä esikolonneja, joiden tarkoitus on toimia suodattimena ja suojata kallista analyttistä kolonnia muun muassa epäpuhtauksilta.

Kolonnin erotusominaisuuksiin vaikuttavat sen sisällä olevan materiaalin kemialliset ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet kuten pinta-ala, huokoisuus, partikkelien koko ja muoto sekä ligandit. Yleisin kolonneissa käytetty materiaali on piidioksidi eli silika. HPLC-tekniikalle on olemassa useita erilaisia kolonneja, jotka jaotellaan niiden erotusmekanismin perusteella. Yleisiä HPLC menetelmän kolonneja ovat normaalifaasi- (NP-HPLC), käänteisfaasi- (RP-HPLC), geelifiltraatio- (SEC), affiniteetti- (AC) ja ioninvaihtokromatografia (IEC), joista RP-HPLC kolonnit ovat kaikista yleisimmin käytettyjä. Taulukossa 4 kootaan joitakin yleisimpiä proteiinianalytiikassa käytettyjä kromatografian muotoja.^{37,38}

Taulukko 4. Nestekromatografian muotoja ja niiden ominaisuuksia

Kromatografian muoto	Erotusmekanismi	Tyypillinen pysyvä faasi		Erityispiirre	
RP	Polaarisuus (hydrofobisuus)	Silika	hydrofobisilla alkyyliketjuilla	Yleisin muoto	HPLC-
NP	Polaarisuus	Silika		Ensimmäinen muoto	LC-
SEC	Molekyylin koko	Huokoinen piidioksidi tai polymeeri		Hyvä erityisesti suurille yhdisteille	
AC	Spesifiset sitoutumisvuorovaikutukset	Funktionalisoitu orgaaninen geeli		Erittäin selektiivinen	
IEC	Varaus	Orgaaninen geeli, johon on varautuneita molekyylejä	hartsia tai liitetty		

Käänteisfaasikromatografia (RP) perustuu poolittomaan pysyvään faasiin ja pooliseen vesiorgaaniseen liikkuvaan faasiin. Proteiinien analytiikassa RP-HPLC-kolonnissa erottuminen perustuu eri proteiinien erilaiseen hydrofobisuusasteeseen. RP-HPLC kolonni sisältää tyypillisesti silikaa, joka on funktionalisoitu hydrofobisia alkyyliketjuja. Yleisin pysyvä faasi on oktadekyylillä päällystetty C18-kolonni, mutta myös lyhyempiä alkyyliketjuja sisältävät C4- ja C8-kolonnit ovat yleisiä. Mitä pidempiä sitoutuneet alkyyliketjut ovat, sitä hydrofobisempi pysyvä faasi on. Hydrofobisemmat proteiinit tarttuvat pysyvään faasiin ja eluoituvat siten hitaammin verrattuna vähemmän hydrofobisiin proteiineihin.^{37,38}

Kokoeksklusiokromatografia (SEC) on hyödyllinen sovellus erityisesti suurten molekyylien (jopa yli 500 miljoonaa Da), kuten proteiinien ja polymeerien analysoinnissa. Toisin kuin RP-HPLC, SEC erottelee molekyylit niiden koon perusteella molekyylien välisten vuorovaikutuksien sijaan. SEC-kolonnin partikkelimateriaalissa on vaihtelevan kokoisia huokosia, joiden sisään molekyylit joko mahtuvat tai eivät mahdu, riippuen niiden koosta ja muodosta. Suuret molekyylit eivät mahdu huokosiin, vaan kulkevat huokosten ohi nopeasti.

Sen sijaan keskikokoiset ja pienet molekyylit voivat juuttua osaan tai jopa kaikkiin huokosiin, jolloin ne eluoituvat suurempia hitaammin ja niiden retentioaika kasvaa. Kolonnin materiaali on usein esimerkiksi ristisilloitettua polystyreeniä, jossa huokosten kokoa voidaan säädellä polymeeriketjujen ristisilloituksen asteella. Myös huokoista silikaa käytetään SEC-kolonneissa.³⁸

Affiniteettikromatografia (AC) perustuu analyytin ja pysyvään faasiin immobilisoituneiden ligandien eli affiniteettiligandien sitoutumiseen. Muihin kolonneihin verrattuna AC on todella selektiivinen ja spesifinen kromatografian muoto, sillä vain tietyt analyytit, jotka sitoutuvat affiniteettiligandeihin, pitäytyvät kolonnissa. Muut molekyylit eluoituvat ilman retentiota. Kolonniin pitäytyneet molekyylit saadaan lopulta eluoitumaan muuttamalla liikkuvan faasin koostumusta. AC-kolonnin pysyvän faasin materiaali voi olla esimerkiksi orgaaninen geeli, joka on funktionalisoitu ligandeilla kuten entsyymeillä, vasta-aineilla tai entsyymi-inhibiittoreilla. Menetelmän suurin etu on sen vahva selektiivisyys, jonka ansiosta kohdeanalyytit saadaan erotettua nopeasti.³⁸

Ioninvaihtokromatografia (IEC) perustuu varaus-varaus vuorovaikutuksiin näytteen molekyyliden ja kolonnin materiaalin välillä. IEC kolonneja on kahdenlaisia, anionin- ja kationinvaihtajia. Anioninvaihtokolonneissa on positiivisesti varautuneet ligandit ja kationinvaihtokolonneissa päinvastoin. Positiivisen nettovarauksen proteiinit sitoutuvat siis kationinvaihtokolonneihin ja negatiivisen nettovarauksen proteiinit anioninvaihtokolonneihin. Kolonnin materiaalin kanssa saman varauksen omaavat ja neutraalit molekyylit eluoituvat kolonnista ilman retentiota. Pysyvä faasi voi olla esimerkiksi orgaaninen hartsi tai geeli, johon on liitetty positiivisesti tai negatiivisesti varautuneita molekyyliä. Proteiinien tapauksessa käytetään usein geelejä, sillä proteiinit eivät pysty suuren kokonsa vuoksi tunkeutumaan hartsin huokosiin. Proteiineja mitattaessa tulee ne puskuroida aina isoelektrisen pisteen mukaan sopivaan pH alueeseen, jotta proteiinille saadaan sopiva nettovaraus ja ne sitoutuvat kolonniin. Kolonniin sitoutuneet proteiinit saadaan eluoitumaan yleensä suola- tai pH-gradientilla, jotka heikentävät proteiinien ja kolonnin ligandien välisiä vuorovaikutuksia. Ioninvaihtokromatografia onkin yksi yleisimmistä proteiinien erotukseen käytetyistä menetelmistä.^{25,39,40}

4.2.2 DETEKTORIT

Parhaallakaan kolonnilla ei tee mitään ilman sopivaa detektoria. Detektorin tarkoitus on havaita molekyylit tehokkaasti sitä mukaan, kun ne eluoituvat kolonnista. Detektorin vasteen tulee olla nopea ja riittävän herkkä, jotta sillä pystytään tuottamaan tarkkoja signaaleja ja piikkejä eluoituville yhdisteille. Detektorit hyödyntävät analyyttien havaitsemiseen niiden fysikaalisia tai kemiallisia ominaisuuksia. Detektoreja on olemassa useita erilaisia, joista esimerkkejä ovat UV-, fluoresenssi- sekä massaspektrometriadetektorit. Alla käydään tarkemmin läpi joitakin yleisimpiä detektorityyppejä, joita hyödynnetään proteiinien analytiikassa.³⁸

4.2.2.1 UV-DETEKTORIT

Proteiinit pystyvät absorboimaan UV-valon aallonpituuksia pääasiassa niiden sisältämien aromaattisten aminohappojen ansiosta. UV-detektorit hyödyntävät juuri tätä ominaisuutta molekyylin havaitsemiseen. Yhdessä massaspektrometrien kanssa nämä ovatkin kaikista käytetyimpiä detektoreja HPLC-tekniikassa.³⁸

UV-detektorit ovat joko kiinteän aallonpituuden tai useita aallonpituuksia mittaavia detektoreja. Kiinteän aallonpituuden detektorien valonlähde tuottaa tarkasti vain yhtä tai useampaa valon aallonpituutta. Näillä detektoreilla voidaan siis käytännössä havaita tietyllä aallonpituudella absorboivan molekyylin eluoituminen, mutta näytteen muista yhdisteistä ei välttämättä saada mitään tietoa. Usean aallonpituuden detektorit sen sijaan emittoivat valoa koko UV- ja näkyvän valon aallonpituusalueelta. Jokaisella erotuksen hetkellä koko UV-spektri mitataan useita kertoja sekunnissa. Ajon alussa detektori mittaa pelkän eluentin spektrin, joka toimii vertailukohtana kaikille muille ajon aikana mitatuille spektreille. Usean aallonpituuden detektori tarjoaa siten paremman herkkyyden ja enemmän joustavuutta mittaukseen, vaikka onkin yleensä kalliimpi kuin kiinteän aallonpituuden detektorit. Detektori mahdollistaa myös puhtausanalyysin, sillä esimerkiksi kahden hiukan päällekkäisen huipun eri kohdista mitattuja UV-spektrejä voidaan vertailla ja sitä kautta selvittää, onko huippu peräisin yhdestä vai useasta samaan aikaan eluoituneesta yhdisteestä. Yksi UV-detektion vahvuus on myös, ettei se ole destruktiivinen eli näytteen molekyylejä ei tarvitse hajottaa havaitsemista varten.³⁸

4.2.2.2 FLUORESENSSIDETEKTORIT

Fluoresenssidetektorien toimintaperiaate muistuttaa hieman UV-detektorien toimintaperiaatetta. Detektio perustuu kuitenkin absorption sijaan fluoresenssiin. Tässä eluoituvaan näytteeseen lähetetään UV- ja näkyvän valon aallonpituutta, jolloin molekyylit voivat absorboida säteilyn ja uudelleen emittoida sen suuremmalla aallonpituudella. Emittoitu valo mitataan ja sen perusteella muodostetaan analyyttien signaalit.

Fluoresenssidetektorit eivät ole yhtä suosittuja kuin UV-detektorit pääasiassa siksi, että vain harvat molekyylit ovat fluoresoivia. Fluoresenssidetektorien herkkyys on kuitenkin paljon parempi verrattuna muihin detektoreihin, ja sitä käytetään biomolekyylien kuten proteiinien havaitsemiseen. Tätä varten kuitenkin proteiineihin usein lisätään fluoresoiva merkkiaine.³⁸

4.2.2.3 MASSASPEKTROMETRIA

Massaspektrometria (MS) on analyttinen menetelmä, jota käytetään muun muassa yhdisteiden tunnistamiseen ja kvantifointiin. MS-detektio yhdistettynä nestekromatografiaan (LC-MS) on paljon käytetty ja tehokas analyttinen menetelmä myös proteiinianalytiikassa, jossa sitä voidaan käyttää esimerkiksi RuBisCO:n alayksiköiden tunnistamiseen. Yleensä proteiinien LC-MS analytiikassa valitaan kromatografian muodoksi käänteisfaasi.⁴¹ Massaspektrometria perustuu ionisoitujen molekyylien erotteluun ja tunnistamiseen niiden massa-per-varaus (m/z) arvon perusteella. Massaspektrometrin kaksi tärkeintä osaa ovat ionilähde sekä massa-analysaattori, joita kumpaakin on olemassa useaa erilaista.

Jotta proteiinit voidaan havaita niiden m/z -arvon perusteella, tulee ne siis ionisoida. Ionisaatiomenetelmiä on olemassa useita erilaisia, ja ne voidaan jakaa massaspektrometrin tyhjiökammiossa tai sen ulkopuolella normaalipaineessa (API) tapahtuvaan ionisaatioon. Lisäksi ionisaatiomenetelmät voidaan jakaa vielä koviin ja pehmeisiin sen perusteella, tapahtuuko ionisaation seurauksena tyypillisesti molekyylien fragmentaatiota. Proteiinien analytiikassa eniten käytettyjä ionisaatiotekniikoita ovat sähkösumutusionisaatio (ESI) ja

matriisiavustettu laserdesorptio/ionisaatio (MALDI), jotka ovat kumpikin pehmeitä ionisaatiotekniikoita eli eivät aiheuta yhdisteisiin merkittävää fragmentaatiota.⁴¹

Sähkösumutusionisaatio (ESI) on API-tekniikka, jossa ionit muodostetaan korkean jännitteen avulla suoraan liuoksesta. Yksinkertaistettusti ESI:ssa eluenttiliuos suihkutetaan sähkökentässä olevan metallikapillaarin läpi, jolloin muodostuu varautuneita pisaroita. Pisaroiden liuotin haihdutetaan pois lämmitetyllä kuivauskaasulla, jolloin liuottimen haihtuessa lopulta jäljelle jää kaasufaasissa olevia ioneja, jotka johdetaan massa-analysaattorille.⁴²

Matriisiavustettu laserdesorptio/ionisaatio (MALDI) on ionisaatiotekniikka, joka perustuu ionien muodostamiseen laserenergiaa absorboivan matriisin avulla. Proteiininanalytiikassa matriisi voi koostua esimerkiksi alfa-syano-4-hydroksikanelihaposta tai 2,5-dihydroksibentsoehaposta. Käytännössä analyytti sekoitetaan matriisin kanssa ja siirretään metallilevylle, jossa siihen kohdistetaan laser. Laser saa aikaan sekä matriisin että analyytin desorption, missä matriisi suojaaa analyyttiä muun muassa fragmentaatiolta. Tarkkaa ionisaation mekanismia ei täysin tunneta, mutta yleinen teoria on, että analyytti ionisoituu matriisimolekyylien kanssa kaasufaasissa tapahtuvien törmäyksien seurauksena desorption jälkeen.⁴³

Suurten biomolekyylien kuten proteiinien analysointi on mahdollista LC-MS laitteistoilla, sillä nämä pystyvät muodostamaan monivarauksellisia ioneja. Kun ionin varaus kasvaa, sen m/z -arvo laskee. ESI on suosittu ionilähde erityisesti proteiininanalytiikassa, sillä se muodostaa tehokkaasti juuri monivarauksellisia ioneja. MALDI pystyy myös muodostamaan monivarauksellisia ioneja, vaikkakin sille tyypillisempää on yksivarauksisten ionien muodostuminen matalilla varausasteilla.^{38,42}

Ionisaation jälkeen ionit johdetaan massa-analysaattorille, jonka tehtävä on erotella ne m/z -arvon mukaan. Myös massa-analysaattoreita on olemassa useita erilaisia. Ne voidaan jakaa toimintaperiaatteen mukaan joko ”aikaperusteisiksi” eli *in-time* tai ”tilaperusteisiksi” eli *in-space*. *In-space* massa-analysaattoreita ovat esimerkiksi kvadrupoli- ja magneettisektorianalysaattorit ja *in-time* analysaattoreita ovat esimerkiksi aikaeroperusteiset

analysaattorit (TOF) ja Fourier muunnosioniansat (FT). Analysaattorilta ionit johdetaan detektorille. Signaalit havaitaan ionivirtoina, jotka syntyvät, kun ionit kulkevat ionilähteeltä analysaattorin kautta aina detektorille. Esimerkiksi 10 ionia sekunnissa vastaa $1,6 \cdot 10^{-18}$ A sähkövirtaa.⁴¹

4.3 SDS-PAGE

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi eli SDS-PAGE on yleisin käytetty menetelmä proteiiniseosten kvalitatiiviseen analysointiin.³⁵ Menetelmä perustuu proteiinien denaturoimiseen ja erotteluun polyakryyliamidigeelissä sähkövirran avulla.³⁵ Menetelmä erottelee proteiinit koon perusteella, jonka vuoksi sitä voidaan käyttää myös proteiinien suhteellisten molekyylipainojen määrittämiseen.³⁵ SDS-PAGE on myös yleisesti käytetty menetelmä RuBisCO:n liittyvissä tutkimuksissa, missä sitä käytetään erityisesti RuBisCO:n alayksiköiden tunnistamiseen, eristyksen onnistumisen arviointiin ja eristetyn lehtiproteiinin puhtauden arviointiin.^{2,12,14,17}

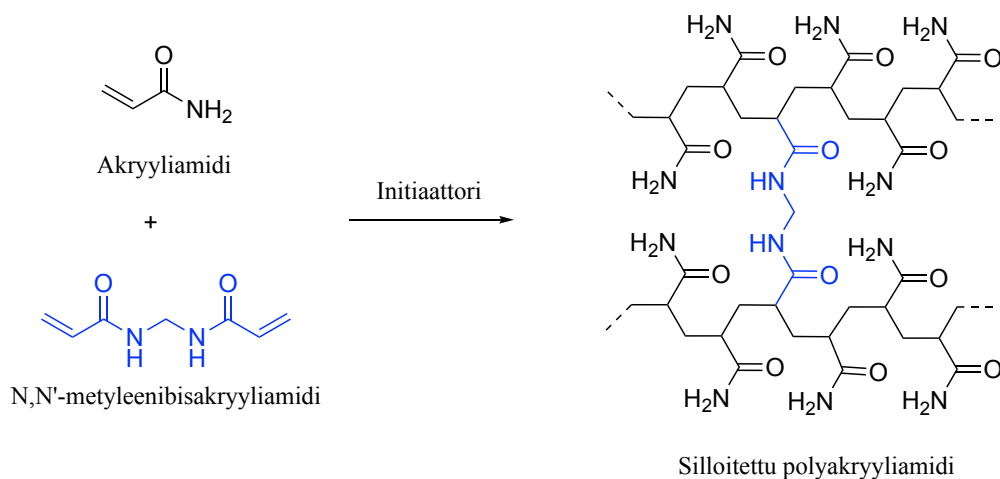
4.3.1 POLYAKRYYLIAMIDIGEELI

Menetelmässä käytetään polyakryyliamidigeeliä, joka on rakenteeltaan silloitettu. Geeli muodostuu akryyliamidin polymerisaatioreaktiossa, jossa bis-akryyliamidi toimii polymeerin silloittavana monomeerinä. Kyseessä on ketjupolymeerireaktio, jonka aloittaa vapaa radikaali. Polymeroinnin initiaattorina toimii ammoniumpersulfaatti ja tämän hajoamista katalysoiva N,N,N',N'-tetrametyleenidiamiini (TEMED), jolloin muodostuu vapaa sulfaattiradikaali.³⁵



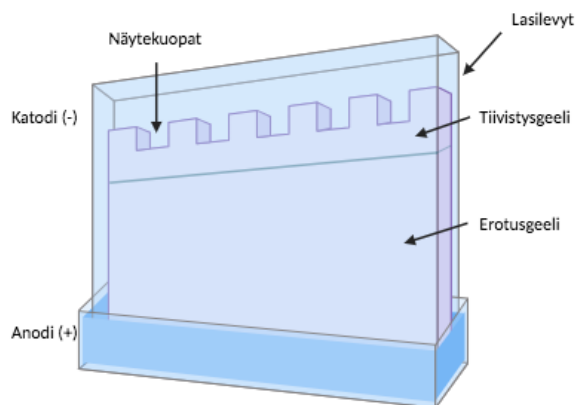
Vapaa radikaali aloittaa radikaalipolymeroitumisen reagoimalla akryyliamidimonomeerin kanssa. Akryyliamidimonomeerit muodostavat pitkiä polymeeriketjuja, joihin liittyy välillä bis-

akryyliamidimolekyyli, josta lähtee rakentumaan uusi ketju. Lopputuloksena on silloitettu polyakryyliamidi (kuva 8).³⁵



Kuva 8. Akryyliamidin polymerointi.³⁵

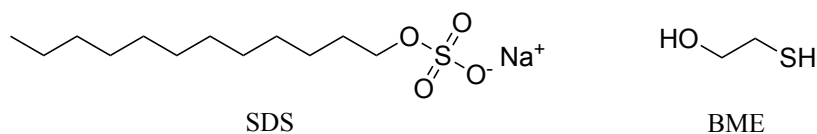
Polyakryyliamidigeeli toimii molekyyliseulana, jonka huokoskoko määräytyy akryyliamidin pitoisuudesta.⁴⁴ SDS-PAGE tekniikassa käytetään kahta geeliä: erotus- ja tiivistysgeeliä.⁴⁴ Kumpikin koostuu akryyliamidista, mutta eroaa sen pitoisuudessa.⁴⁴ Erotusgeelissä, jossa on suurempi akryyliamidipitoisuus, tapahtuu proteiinien erottelu.^{35,44} Erotusgeelin päälle lisätään tiivistysgeeli, jonka avulla saavutetaan parempi tarkkuus proteiinien erotuksessa.^{35,44} Tiivistysgeeli on huokoisempaa kuin erotusgeeli matalamman akryyliamidipitoisuuden vuoksi, ja tämän seurauksena proteiinit liikkuvat tiivistysgeelissä vapaammin.⁴⁴ Tiivistysgeelin tarkoitus on konsentroida proteiinit teräväksi proteiiniraidaksi (*engl. protein band*) ennen erotusgeeliä, jolloin erotusgeelillä saadaan tarkemmat proteiiniraidat.³⁵ Käytännössä ensiksi erotusgeeli kaadetaan lasilevyjen väliin ja annetaan asettua, jonka jälkeen päälle kaadetaan tiivistysgeeli, johon tehdään paikat proteiininäytteille (kuva 9).³⁵



Kuva 9. Havainnollistava kuva SDS-PAGE asetelmasta. Vain osa menetelmän komponenteista on piirretty näkyviin. Kuva pohjautuu lähteeseen.⁴⁴ Kuva luotu BioRender-sivustolla (Created with BioRender.com).

4.3.2 NÄYTTEEN KÄSITTELY

Ennen SDS-PAGE ajoa näytteet käsitellään natriumdodekyylisulfaatilla (SDS) ja 2-merkaptotanolilla (BME) (kuva 10). SDS on anioninen pinta-aktiivinen aine, joka sitoutuu proteiineihin denaturoiden ne. BME:n tarkoitus taas on toimia pelkistävänä aineena, hajottaen proteiinin tertiääristä rakennetta ylläpitävät disulfidisillat.³⁵



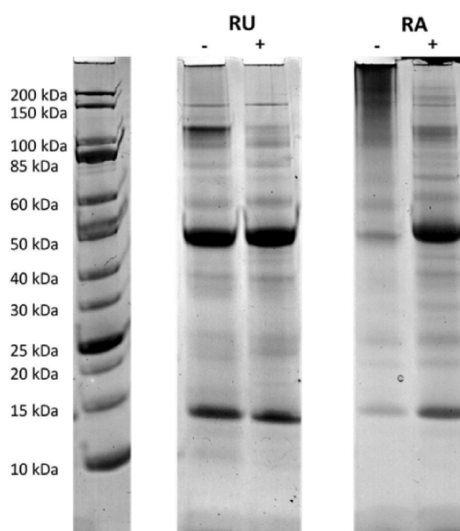
Kuva 10. Natriumdodekyylisulfaatin (SDS) ja 2-merkaptotanolin (BME) rakennekaavat.

Kaikki näytteen proteiinit denaturoituvat käsittelyn seurauksena menettäen natiivirakenteensa siten, että polypeptidiketjujen ympärille on kiinnittynyt negatiivisesti varautuneita SDS-

molekyylejä. Näytteeseen lisätään myös väriainetta, jonka avulla voidaan seurata elektroforeesin etenemistä. Seurantaväri voi olla esimerkiksi bromifenolisininen.³⁵

4.3.3 ELEKTROFOREESI

Elektroforeesilla tarkoitetaan menetelmää, jossa sähköisesti varautuneet molekyylit erotellaan toisistaan ulkoisen sähkökentän avulla. Kun denaturoituneet, negatiivisesti varautuneet proteiinit asetetaan geeliin, jonka läpi kulkee sähkövirta, alkavat ne liikkua geelissä kohti positiivisesti varautunutta anodia. Proteiinit erottuvat erotusgeelissä pelkästään koon perusteella, koska kaikilla on sama varaus-per-massa. Pienet proteiinit pääsevät liikkumaan suuria helpommin geelin huokosten läpi. Kaikista nopeimmin geelissä liikkuu pienen molekyyliekoon vuoksi seurantaväri, jonka eteneminen kertoo myös elektroforeesin etenemisestä ja jonka perusteella ajo lopetetaan. Elektroforeesin jälkeen geeli kastetaan väriaineeseen, esimerkiksi Coomassie Brilliant Blue:n, joka värjää proteiinit ja tämän jälkeen vielä värinpoistoaineeseen, joka poistaa proteiineihin sitoutumattoman väriaineen. Lopputuloksena saadaan geeli, jossa havaitaan erottuneita proteiiniraitoja (kuva 11).³⁵



Kuva 11. RuBisCO-uutteiden (RU ja RA) SDS-PAGE-profiilit pelkistävässä (+) ja ei-pelkistävässä (-) olosuhteissa, sisältäen molekyylipainomarkkerit (vasemmalla). Alkuperäinen tekijä: Ma *et al.*⁴⁵ © 2024 The Authors. Julkaistu lissensillä CC BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X24010579> (9.2.2026)

4.3.4 KÄYTTÖKOHTEET, EDUT JA HAASTEET

SDS-PAGE tekniikalla on useita käyttökohteita biokemiassa, elintarviketieteissä ja proteiinitutkimuksessa. Tekniikan pääsovelluksia ovat muun muassa proteiinianalytiikka, elintarvikkeiden laadunvalvonta sekä turvallisuus- ja viranomaismäärausten seuranta. Proteiinianalytiikassa menetelmää käytetään pääasiassa proteiinien erotukseen, karakterisointiin sekä tunnistamiseen proteiiniseoksista. Menetelmällä voidaan arvioida esimerkiksi proteiinin puhtautta, molekyylipainoa tai rakenteellisia muutoksia. Elintarvikevalvonnassa menetelmää käytetään proteiinimuutosten seuraamiseen eri prosesseissa kuten fermentoinnissa, lämpökäsittelyissä ja entsyymiprosesseissa. Menetelmää käytetään myös erilaisten viranomaismäärausten seurantaan ja noudattamiseen, kuten esimerkiksi allergeenien tunnistaminen elintarvikkeista.⁴⁴

Menetelmän suurimpia etuja ovat sen kyky erotella proteiineja molekyylipainon perusteella korkealla resoluutiolla, kustannustehokkuus sekä sen yksinkertainen suoritus. Näiden vuoksi menetelmä on todella laajasti käytetty ja sopii useille erilaisille laboratorioille. Menetelmän ehkäpä suurin haaste taas on, että proteiinin natiivirakenne menetetään denaturoinnin seurauksena. Tämä vaikuttaa negatiivisesti esimerkiksi menetelmällä eristetyn proteiinin funktionaalisten ja rakenteellisten ominaisuuksien tutkimukseen. Lisäksi haasteena on saavuttaa hyvä resoluutio todella suurten tai pienten proteiinien erotuksessa. Vaihtelevan värjäystehon ja näytemäärän vuoksi menetelmä ei myöskään sovi proteiinien tarkkaan pitoisuusmäärittelyyn, vaikka voikin toimia suuntaa antavana eri proteiinien suhteelliseen määrään.⁴⁴

5 KOKEELLINEN TYÖ

Kokeellisen työn tarkoituksena oli tutkia RuBisCO:n talteenottoa kaalimateriaalista käyttäen eri uutto-olosuhteita. Työssä perehdyttiin myös käytännön proteiininanalytiikkaan Kjeldahl- ja Bradford-menetelmien kautta. Kokeellisessa työssä keskityttiin ensiksi kvantitatiivisten analyttisten menetelmien käyttöönottoon ja testaukseen, sillä ne eivät olleet laboratoriossa ennalta aktiivisessa käytössä. RuBisCO:n talteenotossa tutkittiin aluksi uuttoliuoksen koostumuksen ja sitten -menetelmän vaikutusta proteiinin saantoon.

6 LAITTEISTOT JA REAGENSIT

Kokeellisen työn aikana käytettiin useita Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen laboratoriolaitteistoja. Käytetyt laitteistot on listattu taulukossa 5. Kaikki kokeellisen työn aikana käytetyt reagenssit sekä niiden puhtaus tai pitoisuus on ilmoitettu taulukossa 6.

Taulukko 5. Työssä käytetyt laitteet ja laitteistot

Laite	Valmistaja ja malli
Typpianalysaattori	FOSS Kjelttec 2300
Kjeldahl-menetelmän polttoyksikkö	FOSS Tecator™ Digestor
Spektrofotometri	Beckman DU 640
Ultraäänigeneraattori	Sonics & Materials Inc VCX 750
Kylmäkuivaaja	Heto FD 3
Sentrifugit	Heraeus Megafuge 1.0
	Eppendorf MiniSpin plus
pH mittari	Mettler Toledo SevenEasy
Vaaka	Sartorius (d=0,0001 g)

Taulukko 6. Kokeellisessa työssä käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus/pitoisuus
Boorihappo	VWR Chemicals	99,8-100,05 %
Mettylipuna	Merck	Ei ilmoitettu
Bromokresolinvihreä	Sigma-Aldrich	>95 %
Natriumkarbonaatti (kidevedetön)	VWR Chemicals	99,7 %
Vetykloridihappo	VWR Chemicals	37 %
Natriumhydroksidi	Sigma-Aldrich	≥98 %
Ammoniumsulfaatti	Sigma-Aldrich	≥99 %
Glysiini	J.T. Baker	99 %
Coomassie Brilliant Blue G250	TCI (tokyo chemical industry co.)	Ei ilmoitettu
Fosforihappo	Sigma-Aldrich	85 %
Naudan seerumialbumiini	Sigma Life Science	≥ 98%
Natriumvetykarbonaatti	Honeywell Fluka	99-100.5 %
Rikkihappo	Sigma-Aldrich	95-97 %
Katalyyttitabletit (5g, ilman seleeniä ja elohopeaa, tuotenumero 1.15348)	Sigma-Aldrich	-
Vaahdonestotabletit (1 g, tuotenumero 85532)	VWR Chemicals	-

7 PROTEIINIEN KVANTITATIIVISTEN ANALYYSIMENETELMIEN KÄYTTÖÖNOTTO

Kokeellisessa työssä hyödynnettiin pääasiassa kahta analyttistä menetelmää: Kjeldahl- sekä Bradford-menetelmää. Nämä menetelmät eivät olleet ennestään aktiivisessa käytössä, joten niiden toimivuus ja sopivuus tähän projektiin tuli varmistettiin ennen varsinaisia RuBisCO:n talteenottoon liittyviä mittauksia.

7.1 KJELDAHL-MENETELMÄ

7.1.1 KJELTEC 2300 TYPPIANALYSAATTORIN KÄYTTÖÖNOTTO

Kokeellisen työn alussa tehtiin FOSS Kjelttec 2300 typpianalysaattorin (kuva 12) käyttöönotto, sillä laitetta tarvittiin myöhemmin työn aikana näytteiden proteiinipitoisuuksien määrittämiseen. Typpianalysaattorin toiminta perustuu edellä esiteltyyn Kjeldahl-menetelmään, joka määrittää näytteen kokonaistypen. Laite sisältää tislaus- ja titrausyksikön, eli nämä vaiheet tapahtuvat siinä automaattisesti. Näytteiden hajotus eli digestointi tehtiin ulkoisella polttoyksiköllä.



Kuva 12. Työssä käytetty FOSS Kjelttec 2300 typpianalysaattori.

Polttoyksikön ohjeellinen lämpötila näytteiden digestointiin oli 420°C. Digestiota varten näytteet valmistettiin menetelmän polttoputkiin. Polttoyksikköä testattiin aluksi lisäämällä putkeen rikkihappoa ja katalyyttitabletti, ja pitämällä tätä 420°C lämpötilassa. Digestion tiedetään olevan valmis silloin, kun näytteet ovat väriltään joko sinisiä tai vihreitä. Näin ei kuitenkaan tässä tapauksessa tapahtunut, vaan näyte pysyi tummanruskeana. Näin korkea lämpötila aiheutti myös rikkihapon erittäin voimakasta kiehumista, jolloin höyryjä saattoi vapautua putkesta. Tämän vuoksi digestio testattiin ja todettiin toimivaksi 380°C lämpötilassa ja jatkossa näytteille käytettiin tätä lämpötilaa.

Typpianalysaattori ei ollut uusi, vaan se oli ollut joskus aiemmin jo käytössä. Tästä oli kuitenkin aikaa, jonka vuoksi laitteen liuossäiliöihin menevät letkut vaihdettiin uusiin. Lisäksi liuossäiliöiden kunto tarkastettiin ja ne pestiin tai vaihdettiin uusiin ennen käyttöä. Tärkeää oli huomioda, ettei laitteen ja säiliöiden välillä kulkevat letkut olleet liian pitkiä. Liian pitkät letkut aiheuttivat sen, etteivät laitteen liuotinpumput jaksaneet vetää liuoksia säiliöistä ylös laitteelle.

Typpianalyysissä tarvittavia liuoksia olivat 30 % natriumhydroksidi, 1 % boorihappoliuos metyyliipuna- ja bromokresolinvihreä -indikaattoreilla, 0,05 M suolahappoliuos sekä ionivaihdettu vesi, ja niitä valmistettiin aina tarpeen mukaan. Natriumhydroksidi ja boorihappoliuos valmistettiin punnitsemalla kiinteää natriumhydroksidia tai boorihappoa sopiva määrä ja liuottamalla se ultrapuhtaaseen veteen. Boorihappoliuokseen lisättiin myös indikaattoreja siten, että bromokresolinvihreää oli 0,001 % (w/v) ja metyyliipunaa 0,0007 % (w/v).

Menetelmässä käytettiin titrausliuoksena 0,05 M suolahappoa, joka valmistettiin laimentamalla väkevää suolahaposta ultrapuhtaaseen veteen. Suolahapon tarkka pitoisuus määritettiin titraamalla tunnettu määrä natriumkarbonaattia, jota oli kuivattu 200°C lämpötilassa 2 tunnin ajan. Titraus suoritettiin seuraavasti: punnittiin tarkasti tunnettu määrä natriumkarbonaattia erlenmeyeriin, johon lisättiin 40 ml ultrapuhdasta vettä. Lisättiin 10 tippaa indikaattoriliuosta (0,1 g metyyliipunaa ja 0,1 g bromokresolinvihreää 100 ml:ssa metanolia). Liuos titrattiin vaaleanpunaiseksi ja kulutus V_1 otettiin ylös. Liuosta lämmitettiin, kunnes se muuttui vaalean vihreäksi. Liuos jäähdytettiin nopeasti viileällä vesihauteella huoneenlämpöön, ja titraus sekä

lämmitys ja jäähdytys toistettiin vielä kaksi kertaa, jolloin saatiin kulutukset V_2 ja V_3 . Suolahapon konsentraatio c (mol/l) laskettiin kaavalla 3:

$$c = \frac{18,870 \cdot m}{(V_1 + V_2 + V_3)} \quad (3)$$

missä m on natriumkarbonaatin paino (g) ja V_1 , V_2 sekä V_3 (ml) ovat titrausliuoksen kulutuksia. Luku 18,870 perustuu natriumkarbonaatin moolimassaan, reaktion stoikiometriaan ja tilavuuden yksikkömuunnokseen. Tarkka konsentraatio laskettiin kahden rinnakkaisen titrauksen keskiarvona.

Yhden näytteen mittaukseen tarvittavat reagenssit ja niiden määrät on esitetty taulukossa 7. Lisäksi käytettiin menetelmälle suunniteltuja katalyyttitabletteja ja vaahdonestotabletteja kumpaakin aina yksi näytettä kohden. Ennen jokaista analyysiä mitattiin kaksi nollanäytettä ja tulosten laskennassa käytettiin näiden keskiarvoa. Nollanäytteet käsiteltiin aina samalla tavalla kuin oikeat näytteet.

Taulukko 7. Kjeltec 2300 typpianalyysissä käytetyt reagenssit ja niiden määrät

Reagenssi	Tilavuus
Rikkihappo	12 ml
Natriumhydroksidi	70 ml
Boorihappoliuos	30 ml
Ultrapuhdas vesi	80 ml

7.1.2 LAITTEEN TESTAUS JA MENETELMÄN VALIDOINTI

Typpianalysaattorin toimintaa testattiin alkuvalmistelujen jälkeen ensiksi ammoniumsulfaatilla, sitten puhtaalla glysiinillä ja lopulta maidolla. Ammoniumsulfaatilla testattiin pelkän tislauksen ja titrausyksikön toimivuus. Glysiinillä sekä maidolla testattiin sen sijaan koko typpianalyysiprosessin toimivuus, eli myös digestio polttoyksikössä katalyytin kanssa.

Saantokokeita varten kuivattiin ensiksi ammoniumsulfaattia 4 tuntia noin 102°C lämpötilassa, jonka jälkeen se säilytettiin tiiviissä korkillisessa lasiastiassa eksikaattorissa. Kuivattua ammoniumsulfaattia punnittiin tarkasti menetelmän polttoputkiin, ja näytteet laitettiin suoraan analysaattoriin. Ammoniumsulfaatin typen määräksi asetettiin sen puhtauden perusteella 20,879 % saantoprosentin laskemista varten. Saantokokeen tulokset on esitetty taulukossa 8. Näytteen 2 mittaus epäonnistui, jonka pääteltiin johtuvan titrausliuoksen pitoisuuteen nähden liian suuresta typen määrästä. Tämä aiheutti laitteen titrausastian täyttymisen ennen aikaisesti, jolloin mittaus ei edennyt loppuun.

Taulukko 8. Ammoniumsulfaatin saantokokeen tulokset

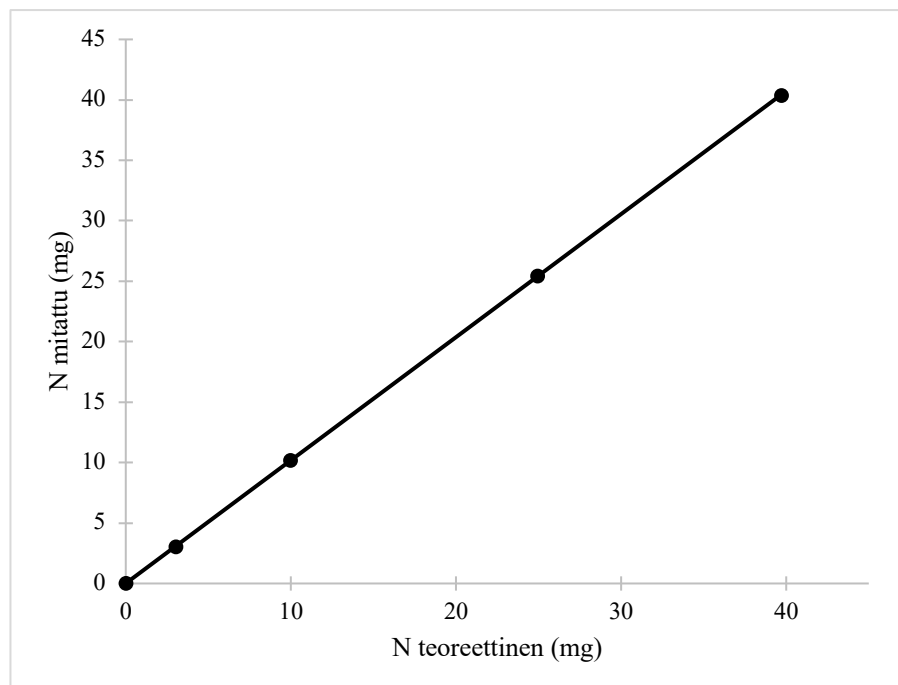
Näyte	m(ammoniumsulfaatti)	Saantoprosentti
1	0,1775 g	103,72 %
2	0,2424 g	-
3	0,1326 g	103,67 %

Koko prosessi, mukaan lukien siis myös näytteiden digestointi ulkoisella polttoyksiköllä, testattiin puhtaalla glysiinillä sekä maidolla. Puhdasta glysiiniä punnittiin ja siirrettiin tarkasti polttoputkiin, jonka jälkeen näytteille suoritettiin digestio ja mittaus. Punnitustulosten perusteella laskettiin typen teoreettinen määrä, kun typpeä oli glysiinissä 18,47 %. Laskettua tulosta verrattiin laitteella mitattuun typen määrään (taulukko 9) ja tuloksista piirrettiin myös kuvaaja (kuva 13). Mitatun ja teoreettisen typen määristä laskettiin niiden erotus ja erotuksien keskihajonta. Erotuksien keskihajonnaksi saatiin 0,3 mg, jonka voidaan ajatella kuvaavan

menetelmän satunnaisvirheestä johtuvaa vaihtelua. Mitattu nollakokeen arvo 0,03 mg N on selvästi keskihajontaa pienempi, joten sitä ei ollut tarpeellista huomioida myöhemmissä mittauksissa.

Taulukko 9. Glysiininäytteiden teoreettinen ja mitattu typen määrä

Näyte	m(glysiini)	N (teoreettinen)	N(mitattu)	Erotus (mg)	Poikkeama teoreettisesta arvosta
1	0	0 mg	0,03 mg	+0,03	-
2	0,0165 g	3,05 mg	3,04 mg	-0,01	-0,33 %
3	0,0540 g	9,97 mg	10,19 mg	+0,22	+2,21 %
4	0,1351 g	24,95 mg	25,47 mg	+0,52	+2,08 %
5	0,2150 g	39,71 mg	40,4 mg	+0,69	+1,74 %



Kuva 13. Glysiininäytteiden mitattu typen määrä teoreettisen typen määrän funktiona. Suoran kulmakerroin on 1,0182, leikkauspiste 0,0077 ja R^2 -arvo 0,9999.

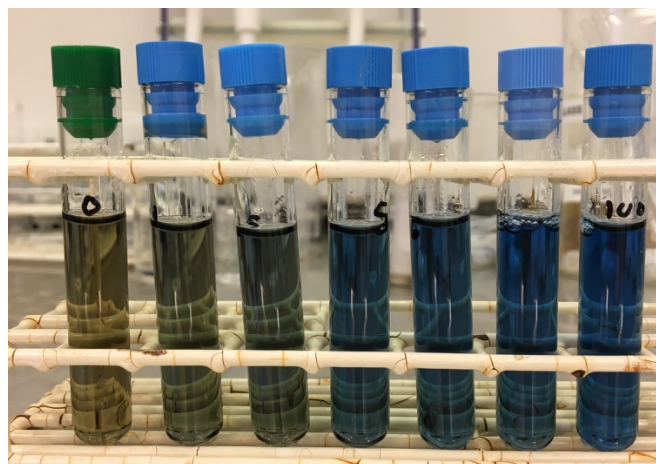
Glysiinin mittaustulosten perusteella piirretyn suoran R^2 -arvo on hyvä, mikä viittaa siihen, että laite mittaa riittävän tarkasti ja luotettavasti typen määrän aina 40 mg asti. Puhdas glysiini on kuitenkin näytteenä hyvin yksinkertainen, jonka vuoksi analyysiprosessi testattiin vielä vaativammalla näytematriisilla. Tähän valittiin kevytmaito, jonka pakkauksessa ilmoitettu proteiinipitoisuus oli 3,2 g / 100 ml. Mittauksia varten käytettiin noin 5 grammaa maitoa näytettä kohden. Rinnakkaisten maitonäytteiden mittaustuloksiksi saatiin 3,41 % ja 3,43 % proteiinia, kun käytettiin tulosten laskennassa konversiokertoimen arvoa 6,38, joka on maidolle suositeltu arvo.²⁶ Jos oletetaan maidon tiheydeksi 1 g/cm³, saadaan keskiarvoksi ja -hajonnaksi $3,42 \pm 0,01$ g / 100 ml. Maidon mittauksessa rinnakkaiset tulokset olivat siis hyvin lähellä toisiaan, mikä viittaa hyvään analyttiseen tarkkuuteen. Keskiarvo poikkesi +6,9 % pakkauksessa ilmoitetusta arvosta. Sen voidaan silti ajatella olevan hyvä tulos, sillä ei ole esimerkiksi tietoa siitä, millä menetelmällä maitopakkausessa ilmoitettu arvo on mitattu ja onko sen laskennassa käytetty esimerkiksi eri konversiokerrointa. Maidon mittaus yhdessä glysiinin ja ammoniumsulfaatin saantokokeiden kanssa antoi tämän projektin kannalta siis riittävän varmistuksen siitä, että menetelmä toimi luotettavasti. Tämän työn tavoitteiden ja aikataulun puitteissa ei siten ollut tarpeellista suorittaa tämän pidempää menetelmän validointia.

7.2 BRADFORD-MENETELMÄ

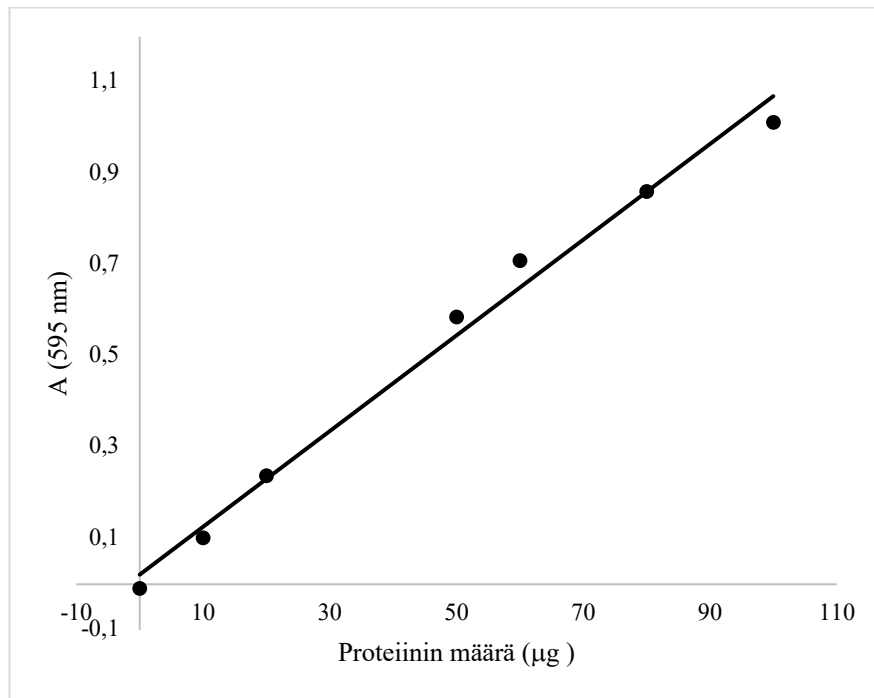
Bradford-menetelmä on Kjeldahl-menetelmään verrattuna suhteellisen helppo ja nopea proteiinien kvantitatiiviseen analytiikkaan. Tarkkojen mittaustulosten saavuttamiseksi tarvitaan kuitenkin jokin standardiproteiini, jonka absorbanssien perusteella määritettyyn standardisuoraan näytteiden tarkka pitoisuusmääritys perustuu. Jos mitattavasta proteiinista ei ole saatavilla standardiproteiinia, on luotettavasti tarkkoja tuloksia haastavampi saavuttaa, sillä proteiinien ja CBB-molekyylin sitoutumistehokkuus saattaa vaihdella aminohappokoostumuksen mukaan.²⁹ Menetelmä on kuitenkin erityisen hyödyllinen tilanteissa, joissa tarkkaa pitoisuutta ei tarvita, esimerkiksi eri näytteiden suhteellisten proteiinipitoisuuksien vertailussa.

Ennen kuin Bradford-menetelmää voitiin hyödyntää näytteiden proteiinipitoisuuksien määrittämisessä, tuli myös tämän menetelmän toimivuus testata juuri kyseisellä kyvetillä ja spektrofotometrillä. Värireagenssi valmistettiin punnitsemalla 10 mg CBB:ta, 5 ml 95 % etanolia, 10 ml 85 % fosforihappoa ja täyttämällä 100 ml tilavuuteen ultrapuhtaalla vedellä. Valmis värireagenssi suodatettiin Whatman 41 paperin läpi ja säilytettiin ruskeassa lasipullossa jääkaapissa. Reagenssi suodatettiin aina uudelleen säilytyksen jälkeen ennen sen käyttöä mittauksissa. Reagenssia valmistettiin vain 100 ml kerrallaan, sillä sen säilyvyydestä ei ollut tarkkaa tietoa.

Bradford-menetelmän suurimmat haasteet nousevat usein väriaineen sitoutumisesta kyvetiin.²⁹ Sen vuoksi testattiin saatavilla olevien muovisten kertakäyttöisten kyvettien sopivuus mittaamalla tunnetun proteiinimäärän sisältäviä standardiliuoksia. Kyvettien tarkempia tietoja ei ollut saatavilla. Standardiliuoksia varten valmistettiin 1 mg/ml kantaliuos naudan seerumialbumiinista (BSA) ultrapuhtaaseen veteen. Standardiliuokset valmistettiin pipetoimalla kantaliuosta 10, 20, 50, 60, 80 ja 100 μ l ja lisäämällä ultrapuhdasta vettä siten, että kokonaistilavuus on jokaisessa 100 μ l. Standardiliuosten proteiinin määrä on tällöin 10-100 μ g. Lisäksi valmistettiin nollanäyte mittaamalla 100 μ l ultrapuhdasta vettä. Värireagenssia lisättiin jokaiseen standardiliuokseen ja nollanäytteeseen 3 ml ja sekoitettiin kevyesti. Värin muodostuminen oli havaittavissa välittömästi (kuva 14). Liuosten absorbanssit mitattiin aallonpituudella 595 nm. Mitatuista absorbansseista piirrettiin standardisuora (kuva 15).



Kuva 14. Bradford-menetelmän BSA-standardiliuokset. Kuvan liuokset sisältävät vasemmalta oikealle 0, 10, 20, 50, 60, 80 ja 100 μ g proteiinia, joka voidaan havaita myös sinisen värin voimistumisena.



Kuva 15. BSA-proteiinin standardisuora, jossa absorbanssi aallonpituudella 595 nm on esitetty proteiinin määrän funktiona. Suoran kulmakerroin on 0,010489, leikkauspiste 0,021153 ja R^2 -arvo 0,98920.

Kuvasta 15 nähdään, että absorbanssi kasvaa lineaarisesti suhteessa proteiinin määrään. R^2 -arvon voidaan ajatella olevan Bradford-menetelmälle tyypillinen, sillä menetelmässä on lähtökohtaisesti pientä epälineaarisuutta johtuen väriagenssin eri värimuotojen spektrien päällekkäisyydestä.²⁹ Korkeaa lineaarisuutta on siis lähtökohtaisesti haastava saavuttaa. Kokeellisen työn varsinaisissa mittauksissa ei kuitenkaan käytetty standardisuoraa, sillä työn kannalta ei ollut välttämätöntä selvittää tarkkoja proteiinipitoisuuksia. Lisäksi ei ollut saatavilla sellaista proteiinia, joka sopisi luotettavasti RuBusCO-mittausten standardiproteiiniksi, sillä proteiini-väriainekompleksin muodostumisen tehokkuus vaihtelee proteiinin mukaan.²⁹

7.3 UHPLC-MS MITTAUKSET

Työssä käytettiin RuBisCO-saostuman analysointiin myös UHPLC-MS menetelmää. Näytteet mitattiin Agilent 6530 UHPLC-QTOF korkean resoluution massaspektrometrillä, jossa oli Agilent 1290 UHPLC nestekromatografi sisäänvientinä. Kuivaus- ja törmäyskaasuna käytettiin

mittauksessa typpeä. Mittauksen massa-alue oli m/z 50-20 000. Taulukossa 10 on kuvattu UHPLC-QTOF menetelmän laiteparametrit ja taulukossa 11 UHPLC-menetelmän parametrit.

Taulukko 10. Massaspektrometrin laiteparametrit

Parametri	Arvo
Sheath gas flow	11 l/min
Sheath gas temp	325°C
Vcap	4500 V
Aquisition mode	Positive
Aquisition time	3 spectra/s
Drying gas	10 l/min
Nebulizer	20 psi

Taulukko 11. UHPLC-menetelmä

Kolonni	Waters BioResolve™ RP mAb Polyphenyl, 450Å, 2.7 µm 4.6 x 100 mm	
Kolonnin lämpötila	30°C	
Virtausnopeus	0,200 ml/min	
Injektio tilavuus	4 µl	
Eluentit	A: vesi + 0,05 % TFA. B: asetonitriili + 0,05 % TFA	
Gradientti	Aika (s)	B (%)
	0	15
	20	55
	20,3	80
	21,3	80
	21,6	55
	30	20
	35	15

8 RuBisCO:N TALTEENOTTO

8.1 KASVIMATERIAALI

Projektia varten saatiin Vaissi Oy:ltä kaalin sivuvirtaa, joka koostui kaalin lehdistä ja kannoista. Kasvimateriaaleja säilytettiin kuljetuksen ajan kylmälaukussa ja ne siirrettiin pakastimeen mahdollisimman pian. Jäistä kaalin lehteä ja kantaa silputtiin myöhemmin yleiskoneella pienempijakoiseksi silpuksi (kuva 16), jonka jälkeen silppu siirrettiin välittömästi pakastimeen pienemmissä erissä muovipusseissa. Kasvimateriaali ei ehtinyt käsittelyn aikana merkittävästi sulaa.

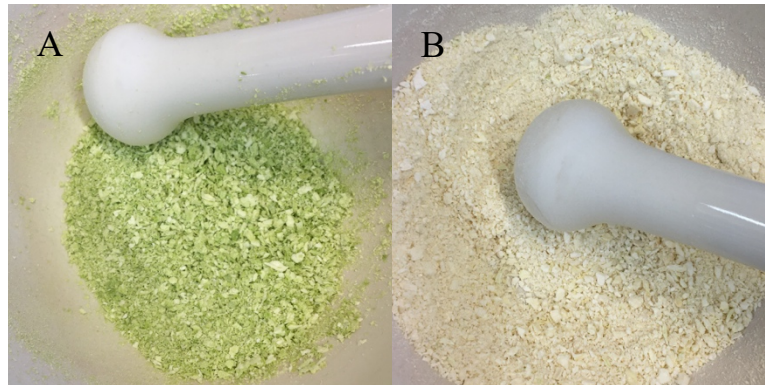


Kuva 16. Jäistä silputtua kaalin lehteä.

Kasvimateriaalista määritettiin sen kokonaisproteiinipitoisuus sekä kosteuspitoisuus. Kosteuspitoisuus määritettiin punnitsemalla esikäsiteltyä kaalisilppua muoviseen dekanterilasiin, esikuivaamalla sitä ensiksi nestetypellä ja sen jälkeen kylmäkuivaajassa noin 2 päivää. Kuivattu kasvimateriaali punnittiin, jauhettiin morttelilla (kuva 17) ja säilytettiin sentrifugiputkissa pakastimessa. Punnitustuloksista laskettiin kosteuspitoisuus kaavalla 4 sekä kuiva-ainepitoisuus kaavalla 5:

$$\text{kosteuspitoisuus (\%)} = \frac{\text{märkápaino-kuivapaino}}{\text{märkápaino}} \cdot 100 \quad (4)$$

$$\text{kuiva-ainepitoisuus (\%)} = 100 - \text{kosteuspitoisuus (\%)} \quad (5)$$



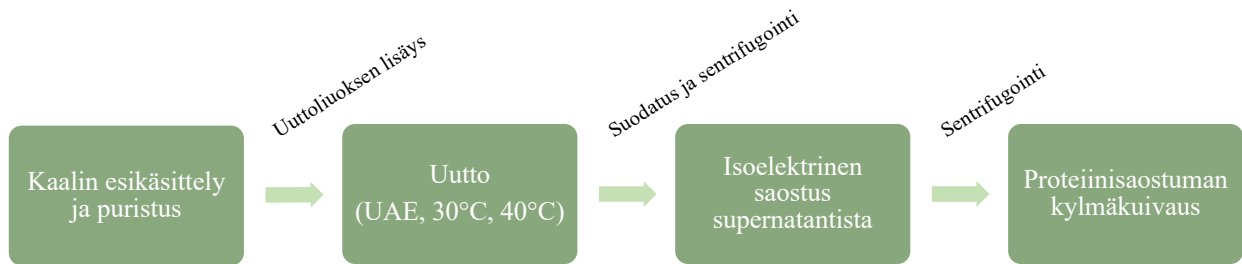
Kuva 17. Kuivattua kaalin lehteä (A) ja kantaa (B).

Kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin Kjeldahl-menetelmällä raa'asta kaalin lehdestä ja kannasta. Kun kosteuspitoisuus tunnetaan, saadaan proteiinipitoisuus kuivapainoon suhteutettuna kaavalla 6:

$$\text{Proteiinipitoisuus kuiva-aineessa} = \text{proteiinipitoisuus (\%)} \cdot \frac{100}{100 - \text{kosteuspitoisuus (\%)}} \quad (6)$$

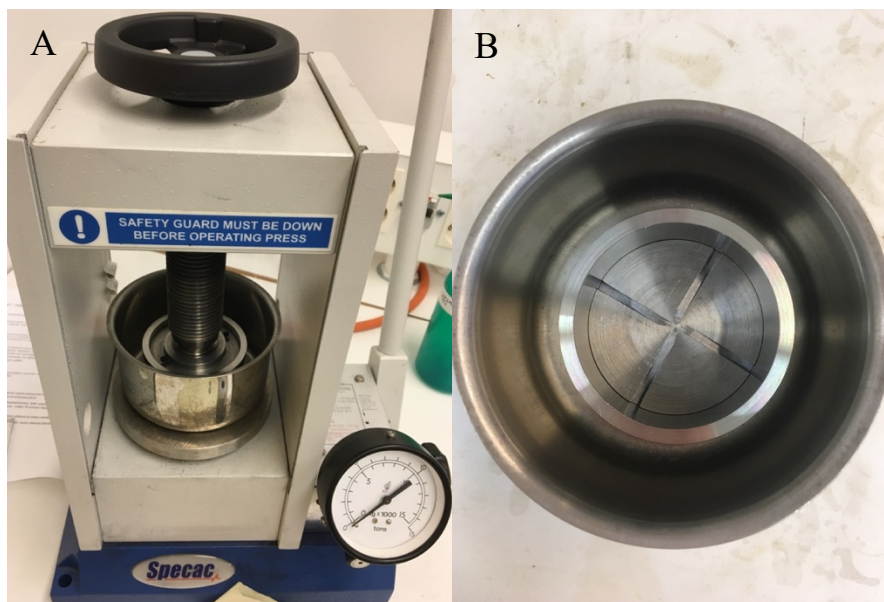
8.2 TALTEENOTTOPROSESSIN KUVAUS

Kokeellisessa työssä käytetty talteenottoprosessi koostui kolmesta päävaiheesta, jotka olivat mekaaninen kasvimateriaalin puristus, proteiinien uutto sekä isoelektrinen saostus. Talteenottoprosessia on havainnollistettu kuvassa 18.



Kuva 18. Kokeellisen työn talteenottoprosessi.

Mekaanisen kasvimateriaalin puristuksen tarkoituksena oli hajottaa kasvin solurakennetta, jotta solunsisäiset liukoiset proteiinit vapautuisivat nesteeseen. Puristus tehtiin manuaalisella hydraulisella puristimella. Apuna tässä käytettiin erityisesti tätä projektia varten tehtyä lisäosaa (kuva 19), jolla saatiin kerättyä talteen sekä puristettu mehu että jäljelle jäävä puristemassa.



Kuva 19. Työssä käytetty mekaaninen puristin sekä lisäosa (A) ja pelkkä lisäosa (B). Kasvimateriaali laitetaan lisäosan keskelle, jolloin puristettaessa mehu pääsee valumaan uomia pitkin keräysastiaan ja puristemassa jää lisäosaan.

Uuttoja varten näytteet valmistettiin puristamalla noin 5 g kaalin kantaa, jonka jälkeen puristettu mehu sekä puristemassa siirrettiin 50 ml sentrifugiputkeen. Kaikkea mehua sekä puristemassaa oli käytännössä mahdotonta siirtää putkeen, mutta työ pyrittiin kuitenkin tekemään siten, että eri näytteiden välillä puristus ja häviö olisi aina mahdollisimman samanlainen. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 20 ml uuttoliuosta, jolloin näytteiden kiinteä/neste- eli S/L-suhde oli 1:4, joka on aiemmissa tutkimuksissa todettu parhaaksi.¹⁵ Jos näyte valmistettiin kuivatusta kasvimateriaalista, tehtiin se punnitsemalla sitä noin 0,43 g, jolloin S/L-suhde oli noin 1:47. Tämä perustui siihen arvioon, että tällä suhteella kuiva-aineen määrä olisi sekä raa'asta että kuivasta kaalista valmistetuissa näytteissä mahdollisimman lähellä toisiaan.

Kokeellisen työn aikana vertailtiin kolmea eri uutto-olosuhdetta: ultraääniavusteista uuttoa (UAE), uuttoa 30°C vesihauteessa sekä uuttoa 40°C vesihauteessa. Ultraääniavusteisen uuton olosuhteet säädettiin siten, että vältettiin liiallinen näytteen lämpötilan nousu ja siten proteiinien denaturoituminen uuton aikana. UAE-menetelmässä näytteitä pidettiin lisäksi jäävesihauteessa koko uuton ajan lämpötilan nousun kontrolloimiseksi. Sentrifugiputkessa oleva näyte uuttoliuoksineen siirrettiin ultraäänigeneraattoriin, jonka kärki upotettiin noin 5 cm liuokseen. UAE-menetelmän olosuhteet on listattu taulukossa 12.

Taulukko 12. UAE-menetelmän olosuhteet

UAE olosuhteet	
Uuttoaika*	15 min
Amplitudi	40 %
Pulse on/off	20 s / 30 s
Lämpötila uuton aikana	noin 30°C

*Uuttoajalla tarkoitetaan sitä aktiivista aikaa, kun näytteeseen kohdistetaan ultraääniaaltoja. Kun otetaan huomioon aaltojen tauotus, oli kokonaisaika 37,5 minuuttia.

8.3 UUTTOLIUESTEN VERTAILU

Kirjallisuudessa RuBisCO:n UAE-uuttoon on käytetty useaa eri uuttoliuosta. RuBisCO on kaikista liukoista emäksisessä pH:ssa, jonka vuoksi uuttoliuos on usein pH arvoltaan joko neutraalia tai emäksistä. Tässä työssä valittiin aikaisempien tutkimusten¹⁴⁻¹⁶ perusteella vertailuun ultrapuhdas vesi, 1 M natriumhydroksidilla pH arvoon 10 säädetty ultrapuhdas vesi ja pH 9 karbonaatti-bikarbonaattipuskuriliuos (0,1 M), joka valmistettiin liuottamalla natriumkarbonaattia ja natriumbikarbonaattia ultrapuhdaaseen veteen.

Jokaista uuttoliuosta kohden valmistettiin raa'asta kaalin kannasta kaksi rinnakkaista näytettä UAE-käsittelyyn sekä kaksi vertailunäytettä, joille ei tehty UAE-käsittelyä. Yhteensä valmistettiin siis aina neljä näytettä yhtä uuttoliuosta kohden. Lisäksi valmistettiin vastaavat näytteet kuivatusta kaalin kannasta. Uuton jälkeen liukoisten proteiinien pitoisuutta arvioitiin Bradford-menetelmällä. Arvioitiin, että mitä suurempi absorbanssi, sitä enemmän proteiinia oli uuttunut. Uuton jälkeen noin 2 ml liuosta sentrifugoitiin (10 min, 14000 rcf) ja supernatantista siirrettiin 100 µl näytettä koeputkeen, johon lisättiin 3 ml värireagenssia. Näytteitä sekoitettiin kevyesti, jonka jälkeen niiden absorbanssit mitattiin Bradford-menetelmällä. Nollanäyte valmistettiin vastaavasti, mutta näytteen sijaan mitattiin 100 µl sitä uuttoliuosta, jota näytteessä oli käytetty. Työtä jatkettiin parhaan absorbanssin tuottavalla uuttoliuoksella.

8.4 UUTTO-OLOSUHTEIDEN VERTAILU

UAE-menetelmässä lämpötila nousee noin 30°C lämpötilaan, joten uuttoa testattiin myös 30°C vesihauteella. Näin saatiin enemmän tietoa siitä, mikä vaikutus UAE:lla todella on proteiinien uuttamiseen ja kuinka paljon tämän vaikutuksesta on pelkästään lämpötilan seurausta. Lisäksi testattiin vertailun vuoksi myös 40°C vesihauteuuttoa. Toiseksi lämpötilaksi valittiin 40°C, sillä tarkkaa kaalin RuBisCO:n denaturoitumislämpötilaa ei ollut tiedossa, joten korkeamman lämpötilan käyttöön olisi liittynyt denaturoitumisen mahdollisuus.

Vesihaudeuuttoja varten valmistettiin näytteet sentrifugiputkiin. Näytteet asetettiin esilämmitettyyn vesihauteeseen ja niitä sekoitettiin kevyesti koko uuton ajan magneettisekoittajalla. Vesihauteen lämpötila säädettiin ja pidettiin koko uuton ajan mahdollisimman tarkasti 30°C ja 40°C lämpötilassa. Tämä toteutettiin käyttämällä lämpömittariin kytkettyä lämpölevyä ja asettamalla mittari suoraan vesihauteeseen, jossa näytteet olivat. Näytteitä uutettiin 37,5 minuuttia, joka oli sama kokonaisaika, joka kului UAE-menetelmässä. Jokaista uuttotapaa (UAE ja vesihauteet) testattiin viidellä rinnakkaisella näytteellä. Tämän lisäksi valmistettiin vertailun vuoksi neljä rinnakkaista näytettä siten, ettei uuttoa tai uuttoliuoksen lisäystä tehty ollenkaan. Näytteet imusuodatettiin Whatman 41 suodatinpaperin läpi ja sentrifugoitiin (10 min, 4000 rpm), jonka jälkeen niistä mitattiin liuoksen proteiinipitoisuus Kjeldahl-menetelmällä.

8.5 RuBisCO:N SAOSTAMINEN

RuBisCO:n saostamista varten valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä jokaista uuttotapaa varten. Näytteet uutettiin uuttoliuoksessa UAE-menetelmällä sekä 30°C ja 40°C vesihauteilla. Lisäksi tehtiin jälleen myös kolme näytettä, joihin ei lisätty uuttoliuosta tai tehty uuttoa, vaan edettiin puristuksen jälkeen suoraan seuraaviin vaiheisiin. Uuton jälkeen näytteet suodatettiin (Whatman 41) ja sentrifugoitiin (10 min, 4000 rpm). Sen jälkeen liukoinen proteiini saostettiin supernatantista säätämällä pH arvoon 4 käyttäen 1 M suolahappoa ja pH mittaria.¹⁵ Saostunut proteiini kerättiin sentrifugoinnin (10 min, 4000 rpm) jälkeen talteen ja kylmäkuivattiin sentrifugiputkissa yön yli noin 24 tunnin ajan. Kuivatut saostumat punnittiin, siirrettiin pienempiin Eppendorf-putkiin ja säilytettiin pakastimessa. Saostumista mitattiin proteiinipitoisuudet Kjeldahl-menetelmällä. Punnitustuloksista laskettiin proteiinisaanto kaavalla 7 ja proteiinin talteenottoprosentti kaavalla 8:

$$\text{Proteiinisaanto (mg / g)} = \frac{m(\text{saostuman proteiini}) \cdot 1000}{m(\text{kaalin kanta})} \quad (7)$$

$$\text{Proteiinin talteenotto (\%)} = \frac{m(\text{saostuman proteiini})}{m(\text{proteiini, teoreettinen})} \cdot 100 \quad (8)$$

missä $m(\text{kaalin kanta})$ on näytteen valmistukseen käytetyn kaalin kannan paino (g). $m(\text{proteiini, teoreettinen})$ kuvaa näytteen teoreettista kokonaisproteiinin määrää ja saadaan kaavalla 9:

$$m(\text{proteiini, teoreettinen}) = \text{proteiini \%} \cdot m(\text{kaalin kanta}) \quad (9)$$

missä proteiini % on Kjeldahl-menetelmällä määritetty kasvimateriaalin proteiinipitoisuus (%). Vastaavasti $m(\text{saostuman proteiini})$ kuvaa saostuman proteiinin määrää (g), ja se saadaan kaavalla 10:

$$m(\text{saostuman proteiini}) = \text{saostuman proteiini \%} \cdot m(\text{saostuma}) \quad (10)$$

missä saostuman proteiini % on Kjeldahl-menetelmällä määritetty saostuman prosentuaalinen proteiinipitoisuus ja $m(\text{saostuma})$ on saostuman paino (g). Tarkemmat laskuesimerkit ovat liitteessä 2.

8.6 RuBisCO:N UHPLC-MS MITTAUS

RuBisCO pyrittiin tunnistamaan proteiinisaostumista UHPLC-MS menetelmällä. Mittausta varten valmistettiin eri menetelmillä saaduista proteiinisaostumista kantaliuokset punnitsemalla 0,1 mg saostumaa ja liuottamalla se ultrapuhtaaseen veteen siten, että liuoksen pitoisuus oli 1,8 μM . Saostuman liuotuksessa oli aluksi haasteita, jonka vuoksi liuoksia sonikoitiin varovasti yhteensä noin 30-60 s, jonka seurauksena saostuma näytti lienneen. Kantaliuokset säilytettiin pakastimessa.

Ennen mittausta näytteet käsiteltiin sentrifugointiin perustuvalla ultrasuodatuksella, jonka tarkoituksena on saada puhtaampi proteiininäyte. Ultrasuodatuksessa käytettiin sentrifugifilttereitä, joiden molekyylipainoraja oli 10 kDa. Ultrasuodatusta varten valmistettiin

pH 6,5 ammoniumasetaattipuskuriliuokset pitoisuudessa 10 mM ja 2,5 mM liuottamalla ammoniumasetaattia ultrapuhdaaseen veteen. Tämän lisäksi valmistettiin myös liuotinseos vedestä, asetonitriilistä (ACN) ja metaanihaposta (FA) suhteessa H₂O:ACN:FA (49,95;49,95;0,1 %v/v).

Jokaista kantaliuosta mitattiin 20 µl sentrifugifiltteriin ja lisättiin 450 µl 10 mM ammoniumasetaattipuskuriliuosta. Näytettä sekoitettiin varovasti, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (15 min, 14 000 rpm). Tämän jälkeen liuotin poistettiin Eppendorf-putkesta ja suodatus toistettiin vielä kahdesti 10 mM puskuriliuoksella. Seuraavaksi suodatus toistettiin vastaavasti vielä kolme kertaa 2,5 mM puskuriliuoksella. Yhteensä kuuden suodatuksen jälkeen filterissä oleva proteiini liuotettiin 1000 µl H₂O:ACN:FA liuotinta ja siirrettiin näytepulloihin, jotka säilytettiin jääkaapissa ennen mittauksia.

Mittausta varten valmistettiin myös näytteet suoraan laimentamalla. Jokaista kantaliuosta mitattiin 10 µl näytepulloon ja lisättiin 190 µl H₂O:ACN:FA liuotinta. Näytteitä sekoitettiin kevyesti ja ne säilytettiin jääkaapissa. Yhteensä näytteitä oli siis kahdeksan: neljä ultrasuodattamalla puhdistettua ja neljä suoraan kantaliuoksesta laimennettua, kaksi jokaista eri menetelmällä saostettua proteiinia kohden. Ultrasuodattamalla valmistettujen näytteiden arvioitu pitoisuus oli 0,036 µM ja kantaliuoksesta laimennettujen 0,09 µM. Valmiit näytteet mitattiin UHPLC-MS menetelmällä.

9 TYÖN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

9.1 KASVIMATERIAALIN PROTEIINI- JA KOSTEUSPITOISUUS

Kaalin lehden kosteuspitoisuudeksi määritettiin $89,9 \pm 0,4$ %, jolloin kuiva-ainepitoisuus oli $10,1 \pm 0,4$ % (liite 1). Kaalin kannan kosteuspitoisuudeksi määritettiin $90,4 \pm 0,9$ % ja kuiva-ainepitoisuudeksi $9,6 \pm 0,9$ % (liite 1). Taulukossa 13 on listattu Kjeldahl-menetelmällä saadut kaalin lehden sekä kannan typpi- ja proteiinipitoisuudet. Proteiinipitoisuuden laskemisessa käytettiin konversiokertoimena yleistä arvoa 6,25, sillä tarkkaa kaalille spesifiä kerrointa ei ollut tiedossa. Tulokset on ilmoitettu kolmen rinnakkaisen mittaustuloksen keskiarvona ja keskihajontana.

Taulukko 13. Kaalin lehden ja kannan proteiinipitoisuuden mittaustulokset

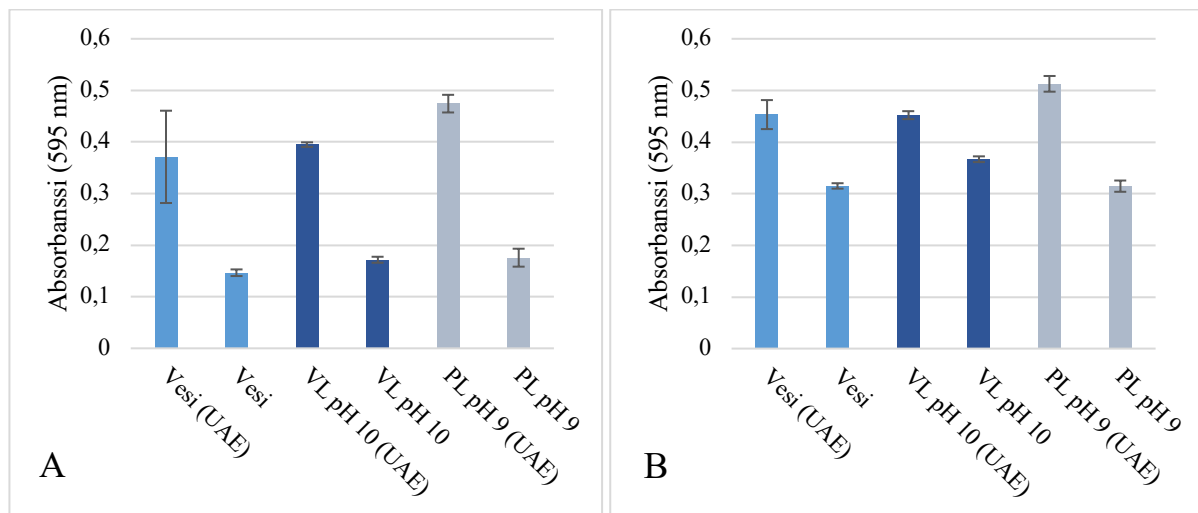
Näyte	N %	% Proteiinia (kerroin 6,25)	% Proteiinia kuiva- aineessa
Raaka kaalin lehti	$0,153 \pm 0,006$	$0,96 \pm 0,04$	$9,5 \pm 0,4$
Raaka kaalin kanta	$0,227 \pm 0,006$	$1,42 \pm 0,04$	$15,0 \pm 1,4$

Raa'an kaalin lehden proteiinipitoisuudeksi määritettiin siis $0,96$ %, jolloin proteiinipitoisuus kuivapainoon suhteutettuna oli $9,5 \pm 0,4$ % (liite 1). Vastaavasti kaalin kannan proteiinipitoisuus kuivapainoon suhteutettuna oli $15,0 \pm 1,4$ % (liite 1). Kirjallisuudessa kaalin lehden kokonaisproteiinipitoisuudeksi on ilmoitettu märkäpainosta esimerkiksi $1,52$ - $2,42$ %⁴⁶ sekä $3,39$ %^{14,46,14,48,14,49} ja kuivapainosta $13,13$ %² sekä $21,22$ %⁴⁷. Erikseen kaalin kannasta tietoa sen sijaan on todella niukasti saatavilla. Tässä työssä mitatut proteiinipitoisuudet ovat hieman matalampia kirjallisuusarvoihin verrattuna, mutta kuitenkin samassa suuruusluokassa: kokonaisproteiinipitoisuuteen voi vaikuttaa esimerkiksi laskemiseen käytetty konversiokerroin, mittaukseen käytetty kaalin osa (ulkolehdet, sisälehdet vai kanta), kasvuympäristö tai kaalin korjuuaika.

Tulosten perusteella kaalin kannassa oli siis noin 48 % enemmän proteiinia kuin kaalin lehdisissä. Tämä on yllättävä havainto siihen nähden, että RuBisCO on fotosynteesiin liittyvä proteiini ja siten proteiinipitoisuuden olisi voinut odottaa olevan suurempi lehdisissä kannan sijaan. Toisaalta tulos ei ota kuitenkaan kantaa siihen, kuinka suuri osa kokonaisproteiinista on RuBisCO:a, ja mikä osa on muita proteiineja tai vääristymää muista typpiyhdisteistä. Kokeellisessa työssä päätettiin kuitenkin käyttää uutoissa pelkästään kaalin kantaa sen korkeamman proteiinipitoisuuden vuoksi.

9.2 UUTTOLIUKSEN KOOSTUMUKSEN VAIKUTUS

Kuvassa 20 on esitetty eri uuttoliuksilla UAE-uutettujen raa'asta sekä kuivatusta kaalin kannasta valmistettujen näytteiden antamat Bradford-menetelmällä mitatut absorbanssit kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvona ja keskihajontana. Näytteisiin lisättiin 20 ml uuttoliuosta, mutta raa'an kaalin näytteissä kokonaistilavuus on tätä suurempi johtuen kaalin sisältämästä nesteestä, joka vapautuu mekaanisessa puristuksessa. Näytteiden kuiva-ainepitoisuus on tästä huolimatta sama, eli siihen suhteutettuna raa'an kaalin näytteet ovat laimeampia. Jotta kuivan ja raa'an kaalin tulokset ovat paremmin vertailukelpoisia, on kuivan kaalin näytteiden absorbanssit kerrottu luvulla 0,88. Keskimäärin puristuksessa kaalista vapautuvan nesteen tilavuudeksi laskettiin 10 puristuksen keskiarvona 2,8 ml. Raa'an kaalin näytteiden kokonaistilavuus oli siis noin 22,8 ml ja kuivan kaalin näytteiden 20 ml. Tilavuuksia vertaamalla saadaan kerroin 0,88 ($20/22,8 \approx 0,88$).



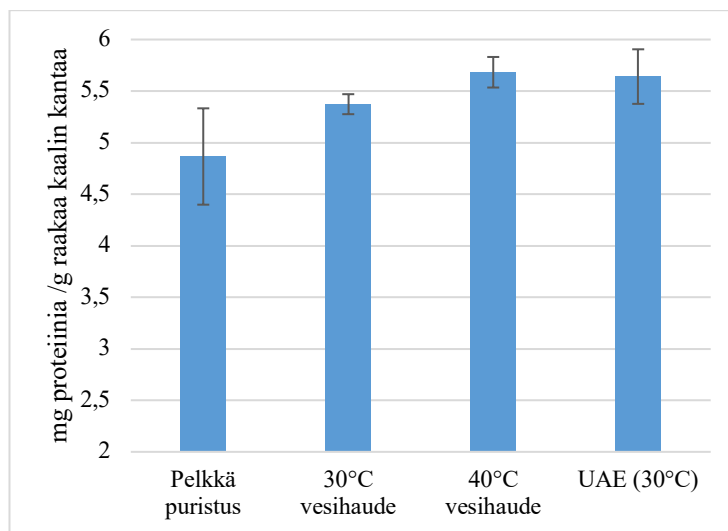
Kuva 20. Raa'asta (A) ja kuivatusta (B) kaalin kannasta valmistettujen näytteiden Bradford-menetelmällä aallonpituudella 595 nm mitatut absorbanssit eri uuttoliuoksissa. VL = vesiliuos (emäksinen) ja PL = puskuriliuos (karbonaatti-bikarbonaatti).

Absorbanssit eivät siis kerro uuttoliuoksen tarkkaa liukoisen proteiinin pitoisuutta, mutta antavat tietoa uuttoliuosten tehokkuudesta RuBisCO:n uuttamiseen suhteessa toisiinsa. Raa'an kaalin kannan lisäksi uuttoa testattiin myös kuivatulla kaalin kannalla, sillä useissa aikaisemmissa tutkimuksissa on käytetty RuBisCO:n uuttamiseen kuivattua kasvimateriaalia raa'an sijaan.

Kuvasta 20 nähdään, että kaikista suurimman absorbanssin tuotti uutto pH 9 karbonaatti-bikarbonaattipuskuriliuoksessa. Muiden uuttoliuosten välillä ei ole havaittavissa yhtä selkeää eroa. Sekä raa'an että kuivan kaalin kohdalla UAE paransi absorbanssia eli nosti liukoisen proteiinin määrää liuoksessa verrattuna näytteisiin, jotka eivät saaneet UAE-käsittelyä. Kuivan kaalin kannan kohdalla ero UAE:n ja vertailunäytteen kohdalla on selvästi pienempi kuin raa'an kaalin kohdalla. Tämä voi johtua esimerkiksi siitä, että kuivauksessa kasvimateriaali saadaan paljon hienojakoisemmaksi, jolloin solurakenne on jo valmiiksi enemmän rikkoutunut ja siten UAE:n merkitys solurakenteen hajotuksessa ja proteiinien vapautuksessa ei ole yhtä suuri. Raa'an kaalin kohdalla UAE selvästi nosti proteiinin määrää, mikä viittaa siihen, että UAE auttoi hajottamaan kasvin solurakennetta paremmin kuin pelkkä mekaaninen puristus. On kuitenkin muistettava, että kuvassa 20 palkkien korkeudet kuvaavat vain absorbansseja, eli tarkkoja pitoisuuksia ei tiedetä.

9.3 UUTTO-OLOSUHDE

Kuvassa 21 on esitetty eri uutto-olosuhteilla karbonaatti-bikarbonaattipuskuriliuoksessa uutettujen näytteiden proteiinisaannot uuttoluoksesta mitattuna Kjeldahl-menetelmällä. Tulokset on ilmoitettu viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvoina ja keskihajontoina.



Kuva 21. Eri menetelmillä uutettujen näytteiden proteiinisaannot mitattuna Kjeldahl-menetelmällä uuttoluoksesta.

Kuvan 21 tulokset kertovat, kuinka paljon proteiinia (mg) saatiin uutettua suhteessa näytteen valmistuksessa käytettyyn kaalin kannan tarkkaan määrään (g). Vertailussa on mukana kolmen eri uuttotavan lisäksi myös pelkkä puristus, joka tarkoittaa, ettei kyseistä näytettä ole ollenkaan uutettu vaan proteiinin määrä on mitattu suoraan mekaanisen puristuksen jälkeen saatavasta vihreästä mehusta. Tulosten perusteella uuttoluoksesta ja -liuoksen käyttö lähtökohtaisesti paransi proteiinisaantoa, mutta eri menetelmien välillä ei ollut nähtävissä suuria eroja. Jälleen tulee kuitenkin huomioida, ettei Kjeldahl-menetelmä ota kantaa siihen, mistä sen mitaama typpi on peräisin. Siten ei siis ole täyttä varmuutta siitä, miten eri menetelmät vaikuttivat juuri RuBisCO:n saantoon. Huomioitavaa on myös, että pelkkää mekaanista puristusta käytettäessä rinnakkaisten näytteiden keskihajonta oli suuri. Tämä viittaa siihen, että tässä työssä käytetty puristusmenetelmä ei tuota kovin toistettavia tuloksia. Muilla menetelmillä keskihajonnat olivat pienempiä, eli uutolla, jossa puristemassa on mukana, voidaan jossakin määrin kompensoida tätä.

9.4 TALTEENOTON TULOKSIA

Taulukossa 14 on esitetty RuBisCO:n saostuksien tulokset proteiinisaantona ja proteiinin talteenotto prosenttina sekä Kjeldahl-menetelmällä mitattuna proteiinipitoisuutena. Tulokset laskettiin kaavoilla 7-10 ja on ilmoitettu kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvona ja keskihajontana (liite 2). Proteiinisaostuman proteiinipitoisuudet on ilmoitettu kahden rinnakkaisen mittauksen keskiarvona ja keskihajontana.

Taulukko 14. Talteenoton tuloksia

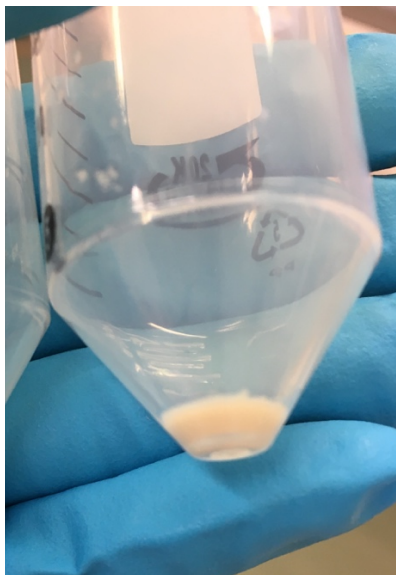
Uutto-olosuhde	Proteiinisaanto (mg/g)	Proteiinin talteenotto (%)	Proteiinisaostuman proteiinipitoisuus (%)
Vesihaude (40°C)	0,7 ± 0,4	4,7 ± 2,3	58,5 ± 1,0
Vesihaude (30°C)	0,80 ± 0,08	5,7 ± 0,6	58,4 ± 0,3
UAE (30°C)	1,52 ± 0,10	10,7 ± 0,8	53,6 ± 1,7
Pelkkä puristus / ei uuttoa	0,5 ± 0,4	3,2 ± 2,7	53,6 ± 1,7

Toisin kuin uutto-olosuhteiden vertailussa, oli saostuksien tuloksissa havaittavissa enemmän eroavaisuuksia. UAE-menetelmä tuotti selkeästi parhaan proteiinisaannon. Tällä menetelmällä saatu $10,7 \pm 0,8$ % talteenotto prosentti osuu myös aikaisempien kaalia käsittelevien tutkimusten^{14,16} tulosten haitarille, ollen kuitenkin matalammasta päästä. Pelkästä kaalin kannasta vertailuarvoa ei ollut saatavilla. Vesihaudemenetelmillä ja pelkällä puristuksella saadut talteenotto prosentit sen sijaan olivat matalia. Proteiinisaannot olivat kaikilla menetelmillä aikaisempaan tutkimukseen verrattuna matalia, mutta toisaalta tähän vaikuttaa paljon myös käytössä ollut kasvimateriaali ja sen kokonaisproteiinipitoisuus.^{15,17} Tässä työssä käytetyn materiaalin kokonaisproteiinipitoisuus oli jo lähtökohtaisesti matalammasta päästä.

UAE-menetelmä tuotti siis selkeästi parhaan proteiinisaannon, eli sillä saatiin uutettua enemmän saostuvaa RuBisCO:a kuin muilla menetelmillä. Tämä voidaan päätellä siitä, ettei proteiinisaannot uuttoliuoksesta mitattuna eronneet samalla tavalla kuin saostuksen jälkeen.

Tämä viittaa siihen, että UAE-menetelmällä uuttoliuoksessa oli kuitenkin enemmän saostuvaa RuBisCO:a kuin muilla menetelmillä. Tuloksista voidaan myös päätellä, ettei pelkkä vesihaude uuttomenetelmänä ollut riittävä rikkomaan solukalvoja ja vapauttamaan solun sisäistä RuBisCO:a. Eli vaikka edellisessä luvussa uutto-olosuhteita vertailtaessa liuoksen proteiinipitoisuuden perusteella näytti siltä, ettei eri menetelmien välillä olisi suuria eroja, talteenoton tulokset viittaisivat toisin: UAE-menetelmän avulla oli uuttunut enemmän RuBisCO:a, joka sitten saostui sen isoelektrisessä pisteessä. Muilla uutto-olosuhteilla oli saattanut uuttua enemmän muita proteiineja, jotka eivät saostuneet RuBisCO:n isoelektrisessä pisteessä, jonka vuoksi kuvassa 22 ei ollut nähtävissä samaa eroa kuin taulukossa 14.

Proteiinisaostumissa proteiinipitoisuus oli jokaisella menetelmällä välillä 50-60 %. Loput noin 50-40 % ovat mahdollisesti isoelektrisessä saostuksessa mukana saostuneita epäpuhtauksia kuten suoloja, hiilihydraatteja tai muita pienijakoisia kasvisolun osia ja yhdisteitä. Proteiinisaostuman puhtautta oltaisiin luultavasti voitu parantaa esimerkiksi saostuman uudelleenliuotuksella ja -saostuksella.^{2,12} Tässä työssä saatu saostuma oli väriltään kuitenkin hyvin vaaleaa, joka viittaa klorofyllin alhaiseen määrään (kuva 22). Tämä oli havaittavissa jo raa'assa kaalin kannassa, joka oli väriltään hyvin vaaleaa. Klorofyllin alhaisen määrän voidaankin ajatella olevan lehtiproteiinin eristämisen kannalta kaalin kannan etu suhteessa kaalin lehteen, jossa on todennäköisesti enemmän klorofylliä, joka voidaan päätellä sen vahvemmassa vihreästä väristä. Vihreiden lehtien runsas klorofyllipitoisuus on yleisesti yksi RuBisCO:n talteenottoon liittyvistä haasteista. Jos klorofylliä ei poisteta, saattaa se aiheuttaa vihreää väriä myös proteiinisaostumaan, mikä puolestaan saattaa heikentää sen laatua elintarvikkeiden näkökulmasta.^{13,19} Klorofyllin poisto lähtökohtaisesti vaatii usein lisävaiheita talteenottoprosessiin.



Kuva 22. Kokeellisessa työssä eristetty proteiinisaostuma ennen kylmäkuivausta.

Lehtiproteiinien talteenotto prosessi on yleisesti monivaiheinen, eikä yhtä oikeaa tapaa ole olemassa. Lisäksi talteenotto prosessiin vaikuttaa vahvasti käytössä oleva kasvimateriaali, sillä esimerkiksi RuBisCO:n kemialliset ominaisuudet, kuten denaturoitumislämpötila, ovat riippuvaisia kasvilajista.² Talteenotto prosessi pitäisi siis optimoida aina spesifisti kasvimateriaalille. Tämän kokeellisen työn talteenotto prosessissa pystyttiin rajallisen aikataulun vuoksi tutkimaan vain murto-osa prosessin tehokkuuteen vaikuttavista tekijöistä. Esimerkiksi ultraääniavusteisen uuton parametrien, kuten lämpötilan, S/L-suhteen ja ajan optimointi jäi kokonaan tämän työn ulkopuolelle. Lisäksi havaittiin viitteitä siitä, ettei prosessin ensimmäinen vaihe eli mekaaninen kasvimateriaalin puristus toiminut välttämättä kovin toistettavasti. Tämän vaiheen optimointi olisi keskeistä RuBisCO:n parhaan mahdollisen talteenoton kannalta, sillä ensimmäisessä vaiheessa menetettyä proteiinia ei saada myöhemmissä vaiheissa enää takaisin. Tämä vaatisi siis lisätutkimusta ja menetelmän kehittämistä. Tämän kokeellisen työn tuloksissa huomio kiinnittyy myös suhteellisen matalaan proteiinisaantoon ja -talteenottoon, ja jatkotutkimusta tarvittaisiin esimerkiksi saostuksen parametrien kuten pH:n optimoimiseksi. Mielenkiintoista olisi myös saostuman puhtauden nostaminen, johon edellä jo ehdotettiin esimerkiksi uudelleenliuotusta. Lisäksi proteiinisaostuman laatua ajatellen oleellista voisi olla myös saostuman epäpuhtauksien, kuten klorofyllin ja polyfenolien määrän tutkiminen.^{13,19}

9.5 UHPLC-MS MITTAUKSEN TULOKSET

Saostumista valmistettiin näytteet UHPLC-MS mittausta varten kahdella tavalla: ultrasuodatuksella sekä suoraan kantaliuoksesta laimentamalla. Tarkoituksena oli tunnistaa RuBisCO:n alayksiköt UHPLC-MS menetelmällä proteiinisaostumista ja saada varmistus siitä, että saostumat todella sisälsivät RuBisCO:a. Mittaus kuitenkin epäonnistui, sillä RuBisCO:a ei havaittu minkään näytteen massaspektrometrissä. Todennäköisesti saostumat sisälsivät liikaa epäpuhtauksia ultrasuodatuksestakin huolimatta, jonka seurauksena mittaus ei onnistunut. Toinen mahdollinen tekijä mittauksen epäonnistumiselle voi olla liian laimeat näyteliuokset. Lisäksi näytteiden valmistuksessa oli haasteita esimerkiksi saostumien liuotusten kanssa, ja ei ole varmuutta siitä, miten näytteiden liuotuksessa käytetty ultraäänihaude ja kantaliuoksen pakastaminen sekä sulattaminen ovat vaikuttaneet RuBisCO:n.

10 YHTEENVETO

Kirjallisuuskatsauksessa tutustuttiin vihreiden lehtien yleisimpään proteiiniin RuBisCO:n, sen ominaisuuksiin ja talteenottoon. Lisäksi perehdyttiin joihinkin yleisimpiin proteiinien analyyttisiin menetelmiin. RuBisCO on keskeisessä osassa fotosynteesiä, jonka vuoksi sitä löytyy runsaasti vihreiden kasvien lehdistä.³ Sillä on tutkimuksissa havaittu olevan elintarvikkeiden kannalta mielenkiintoisia funktionaalisia ja ravitsemuksellisia ominaisuuksia.^{11–14,17} RuBisCO:n talteenottoa on tutkittu useasta eri kasvimateriaalista, kuten esimerkiksi kaalikasveista^{2,14,15}, sokerijuurikkaasta^{16,17} ja sinimailasesta^{12,18}. Kuitenkaan tähän mennessä ei ole tiedossa tutkimuksia, jotka keskittyisivät RuBisCO:n talteenotossa pelkästään kaalin kantaan. Yleisesti talteenoton suurimmat haasteet liittyvät vihreiden lehtien klorofylliin, epäsuotuisiin kemiallisiin reaktioihin talteenoton aikana sekä matalaan proteiinisaantoon.^{13,19}

Tutkielmassa käytiin läpi proteiinien kvantitatiivisista analyysimenetelmistä Kjeldahl-, Bradford- ja Lowry-menetelmät, aminohappoanalyysi sekä UV-spektrofotometrinen määrittäminen. Lisäksi käsiteltiin nestekromatografiaa, jota hyödynnetään sekä kvalitatiivisessa että kvantitatiivisessa proteiininanalytiikassa ja SDS-PAGE:a, jota käytetään erityisesti kvalitatiiviseen analytiikkaan. Kjeldahl-, Bradford- ja Lowry-menetelmät ovat hyödyllisiä ja laajasti käytettyjä kokonaisproteiinipitoisuuden mittaamisen menetelmiä, mutta niiden

haasteeksi nousee usein taipumus yliarvioida proteiinipitoisuutta.²¹ Nestekromatografisilla menetelmillä vastaavaa ongelmaa yleensä ei ole, mutta koska menetelmä vaatii kalliit analyysilaitteistot, saattaa sen käyttöä joissakin tilanteissa rajoittaa taloudelliset tekijät. Kokeellisessa työssä suoritettiin myös Kjeldahl-menetelmään perustuvan tyypianalysaattorin käyttöönotto laboratoriossa onnistuneesti.

Kokeellisessa työssä tutkittiin RuBisCO-proteiinin uuttamista ja talteenottoa sivuvirtana muodostuvasta kaalimateriaalista. Tarkemmin talteenottoon valikoitui korkeamman kokonaisproteiinipitoisuuden perusteella kaalin kanta sen lehden sijaan. Raa'assa kaalin kannassa kokonaisproteiinipitoisuus oli $1,42 \pm 0,04$ %, kun taas lehdessä vain $0,96 \pm 0,04$ %. Työssä tutkittiin aluksi kolmen eri uuttoliuoksen vaikutusta liukoisen proteiinin saantoon. Vertailtavat liuokset olivat vesi, pH 10 emäksinen vesiliuos sekä pH 9 karbonaatti-bikarbonaattipuskuriliuos. Liukoisen proteiinin määrää arvioitiin Bradford-menetelmällä. Parhaaksi uuttoliuokseksi osoittautui karbonaatti-bikarbonaattipuskuriliuos, joka valikoitui liuokseksi työn seuraaviin vaiheisiin. Tämän jälkeen testattiin eri uuttotapojen vaikutusta proteiinin saantoon. Tässä vertailtiin ultraääniavusteista (UAE) uuttoa, 30°C vesihaudeuuttoa sekä 40°C vesihaudeuuttoa. RuBisCO saostettiin isoelektrisesti, jonka jälkeen proteiinisaostuma kylmäkuivattiin. Kaikista parhaan saannon tuotti menetelmä, jossa oli käytetty ultraääniavusteista uuttoa. Saanto oli UAE-menetelmällä $1,52 \pm 0,10$ mg/g, 30°C vesihaudemetelmällä $0,80 \pm 0,08$ mg/g, 40°C vesihaudemetelmällä $0,7 \pm 0,4$ mg/g ja ilman uuttoa eli pelkällä kaalin mekaanisella puristuksella $0,5 \pm 0,4$ mg/g. Proteiinisaostumien proteiinipitoisuudet Kjeldahl-menetelmällä määritettynä olivat 53-59 % välillä. Saostumista pyrittiin myös tunnistamaan RuBisCO UHPLC-MS menetelmällä, siinä kuitenkin onnistumatta. Tämän epäiltiin johtuvan saostumien sisältämistä epäpuhtauksista tai liian laimeista näytteistä.

Kokeellisessa työssä onnistuttiin eristämään lehtiproteiinia kaalin kannasta neljällä eri menetelmällä. Proteiinin talteenottoprosentti oli parhaimmillaan UAE-menetelmällä $10,7 \pm 0,8$ %, joka on tyypillinen lukema verrattuna aiempiin tutkimuksiin.¹⁴ Toisaalta myös paljon korkeammat saannot ovat vastaavissa tutkimuksissa mahdollisia,¹⁶ eli talteenottoprosessissa on kehittämisen varaa esimerkiksi uuton lämpötilan, uuton ajan ja saostuksen optimaalisen pH:n suhteen. Vesihaudeuuton ja pelkän mekaanisen puristuksen pääteltiin olevan vähemmän tehokas menetelmä kasvin solurakenteen hajotukseen ja

solunsisäisten proteiinien vapauttamiseen. Aiheeseen liittyvää jatkotutkimusta vaadittaisiin siis talteenoton parametrien optimointiin liittyen. Lisäksi aihetta olisi mahdollista ja mielenkiintoista laajentaa myös tutkimalla proteiinin talteenottoa kaalin lehdistä tai muista kasvisivuvirroista.

11 KIRJALLISUUSLUETTELO

1. Nadathur, S.; Wanasundara, J. P. D. ja Scanlin, L., *Sustainable Protein Sources*, Academic Press, Lontoo, Yhdistynyt kuningaskunta, 2016.
2. Nynäs, A.-L.; Newson, W. R. ja Johansson, E., Protein fractionation of green leaves as an underutilized food source—protein yield and the effect of process parameters, *Foods*, **2021**, *10*, 2533.
3. Andersson, I. ja Backlund, A., Structure and function of rubisco, *Plant Physiol. Biochem.*, **2008**, *46*, 275–291.
4. Furbank, R. ja Taylor, W., Regulation of photosynthesis in C3 and C4 plants: a molecular approach., *Plant Cell*, **1995**, *7*, 797–807.
5. Fujii, M. ja Tanaka, S., Interspecies comparison of interaction energies between photosynthetic protein RuBisCO and 2CABP ligand, *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, 11347.
6. Black, C. C. ja Osmond, C. B., Crassulacean acid metabolism photosynthesis: ;working the night shift’, *Photosynth. Res.*, **2003**, *76*, 329–341.
7. Evans, J. R., Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of Ca plants, *Oecologia*, **1989**, *78*, 9-19.
8. Di Stefano, E.; Agyei, D.; Njoku, E. N. ja Udenigwe, C. C., Plant RuBisCo: an underutilized protein for food applications, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2018**, *95*, 1063–1074.
9. Bar-On, Y. M. ja Milo, R., The global mass and average rate of rubisco, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2019**, *116*, 4738–4743.
10. Proteiini, <https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/terveytta-edistava-ruokavalio/ravintoaineet/proteiini/>, Ruokavirasto (27.6.2025).
11. Zengin, G.; Aktumsek, A.; Guler, G.-O.; Cakmak, Y.-S.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M. ja Vioque, J., Nutritional quality of protein in the leaves of eleven *Asphodeline* species (*Liliaceae*) from Turkey, *Food Chem.*, **2012**, *135*, 1360–1364.
12. Hojilla-Evangelista, M. P.; Selling, G. W.; Hatfield, R. ja Digman, M., Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf protein, *J. Sci. Food Agric.*, **2017**, *97*, 882–888.
13. Pearce, F. G. ja Brunke, J. E., Is now the time for a Rubiscuit or Ruburger? Increased interest in Rubisco as a food protein, *J. Exp. Bot.*, **2023**, *74*, 627–637.
14. Sedlar, T.; Čakarević, J.; Tomić, J. ja Popović, L., Vegetable by-products as new sources of functional proteins, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **2021**, *76*, 31–36.

15. Xu, Y.; Li, Y.; Bao, T.; Zheng, X.; Chen, W. ja Wang, J., A recyclable protein resource derived from cauliflower by-products: Potential biological activities of protein hydrolysates, *Food Chem.*, **2017**, *221*, 114–122.
16. Akyüz, A.; Tekin, İ.; Aksoy, Z. ja Ersus, S., Determination of process parameters and precipitation methods for potential large-scale production of sugar beet leaf protein concentrate, *J. Sci. Food Agric.*, **2024**, *104*, 3235–3245.
17. Martin, A. H.; Castellani, O.; de Jong, G. A.; Bovetto, L. ja Schmitt, C., Comparison of the functional properties of RuBisCO protein isolate extracted from sugar beet leaves with commercial whey protein and soy protein isolates, *J. Sci. Food Agric.*, **2019**, *99*, 1568–1576.
18. Dos Passos, N. H. M. ja Ambye-Jensen, M., Fractionation of proteins from alfalfa juice at demonstration scale: Effects of temperature and centrifugation strategies on removal of green protein and recovery of the soluble white protein fraction, *Sep. Purif. Technol.*, **2024**, *330*, 125461.
19. Pérez-Vila, S.; Fenelon, M. A.; O'Mahony, J. A. ja Gómez-Mascaraque, L. G., Extraction of plant protein from green leaves: Biomass composition and processing considerations, *Food Hydrocoll.*, **2022**, *133*, 107902.
20. Pirie, N. W., *Leaf Protein: And Its By-products in Human and Animal Nutrition*, 2. painos, Cambridge University Press, Iso-Britannia, 1987.
21. Mæhre, H. K.; Dalheim, L.; Edvinsen, G. K.; Elvevoll, E. O. ja Jensen, I.-J., Protein determination-method matters, *Foods Basel Switz.*, **2018**, *7*, 5.
22. Sáez-Plaza, P.; Michałowski, T.; Navas, M. J.; Asuero, A. G. ja Wybraniec, S., An overview of the kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2013**, *43*, 178–223.
23. Bradstreet, R. B., Kjeldahl method for organic nitrogen, *Anal. Chem.*, **1954**, *26*, 185–187.
24. Kirk, P. L., Kjeldahl method for total nitrogen, *Anal. Chem.*, **1950**, *22*, 354–358.
25. Harris, D., *Quantitative Chemical Analysis*, 7. painos, W. H. Freeman and Company, New York.
26. Food energy - methods of analysis and conversion factors, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rooma, Italia, 2003.
27. Sáez-Plaza, P.; Navas, M. J.; Wybraniec, S.; Michałowski, T. ja Asuero, A. G., An overview of the kjeldahl method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2013**, *43*, 224–272.
28. Optimize your kjeldahl analyses with velp kjtabs - kjeldahl catalyst and antifoaming tablets, https://www.velp.com/en-ww/velp-kjtabs-kjeldahl-catalyst-tablets.aspx?srsId=AfmBOOpMw60Y4tl-MU32tuDif_P7OFGSFUXwk-OqwcdlaQQynh0q41e (17.8.2025).

29. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248–254.
30. Georgiou, C. D.; Grintzalis, K.; Zervoudakis, G. ja Papapostolou, I., Mechanism of coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 391–403.
31. Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, L. ja Randall, R., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265–275.
32. Peterson, G. L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.*, **1977**, 83, 346–356.
33. Noble, J. E. ja Bailey, M. J. A., Quantitation of Protein. Teoksessa: Burgess, R. R. ja Deutscher, M. P. (toim.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2009, vol. 463, s. 73–95.
34. Chutipongtanate, S.; Watcharatanyatip, K.; Homvises, T.; Jaturongkakul, K. ja Thonfboonkerd, V., Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs, *Syst. Comp. Var. Spectrophotometric Color. Methods Meas. Conc. Protein Pept. Amino Acid Detect. Limits Linear Dyn. Ranges Interf. Pract. Unit Costs*, **2012**, 98, 123–129.
35. Walker, J. M., *The Protein Protocols Handbook*, 2nd ed, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2002.
36. Pitt, J. J., Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry, *Clin. Biochem. Rev.*, **2009**, 30, 19–34.
37. Žuvela, P.; Skoczylas, M.; Jay Liu, J.; Bączek, T.; Kaliszan, R.; Wong, M. W. ja Buszewski, B., Column characterization and selection systems in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Chem. Rev.*, **2019**, 119, 3674–3729.
38. Vitha, M. F., *Chromatography: Principles and Instrumentation*, John Wiley & Sons, Inc., Newark, USA, 2016.
39. Chromatographic Techniques for Protein Separation and Analysis - Creative Proteomics, <https://www.creative-proteomics.com/proteinseq/resource/chromatographic-techniques-protein-separation-analysis.htm> (14.9.2025).
40. Adhikari, S.; Manthena, P. V.; Sajwan, K.; Kota, K. K. ja Roy, R., A unified method for purification of basic proteins, *Anal. Biochem.*, **2010**, 400, 203–206.
41. Noor, Z.; Ahn, S. B.; Baker, M. S.; Ranganathan, S. ja Mohamedali, A., Mass spectrometry-based protein identification in proteomics-a review, *Brief. Bioinform.*, **2021**, 22, 1620–1638.
42. Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D. ja Vahidi, S., Unraveling the mechanism of electrospray ionization, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 2–9.

43. Israr, M. Z.; Bernieh, D.; Salzano, A.; Cassambai, S.; Yazaki, Y. ja Suzuki, T., Matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications, *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM*, **2020**, 58, 883–896.
44. Omogbolahan Samson IDOWU; David Oche Idoko; Samuel O. Ogundipe ja Emmanuel Mensah, Optimizing SDS-PAGE for accurate protein characterization in nutritional research and food quality assessment, **2025**.
45. Ma, X.; van Polen, T.; Habibi, M.; Landman, J.; Sagis, L. M. C. ja Shen, P., Rubisco at interfaces I: Conformational flexibility enhances air-water interface and foam stabilization, *Food Hydrocoll.*, **2025**, 160, 110783.
46. Lončarić, A.; Marček, T.; Šubarić, D.; Jozinović, A.; Babić, J.; Miličević, B.; Sinković, K.; Šubarić, D. ja Ačkar, Đ., Comparative evaluation of bioactive compounds and volatile profile of white cabbages, *Molecules*, **2020**, 25, 3696.
47. Rawiwan, P.; Xiang, J. ja Quek, S. Y., Optimisation of protein extraction from selenium-enriched Brassicaceae leaves, *Future Foods*, **2023**, 8, 100273.

LIITTEET

Liite 1: Kosteuspitoisuuden, kuiva-ainepitoisuuden ja kuiva-aineen proteiinipitoisuuden esimerkkilaskut.

Liite 2: Saostuman proteiinin, proteiinisaannon, proteiinin teoreettisen määrän ja proteiinin talteenottoprosentin esimerkkilaskut

Kaalin lehden ja kannan kosteuspitoisuus, kuiva-ainepitoisuus sekä proteiinipitoisuus kuiva-aineessa: esimerkkilaskut

Kun kaalin kannan märkápaino oli 24,34 g ja kuivapaino oli 2,10 g, oli kosteuspitoisuus kaavalla 4:

$$\text{kosteuspitoisuus (\%)} = \frac{24,23-2,10}{24,34} \cdot 100 = 91,37 \%$$

Tällöin kuiva-ainepitoisuus on kaavan 5 mukaan

$$\text{kuiva-ainepitoisuus (\%)} = 100 - 91,37 = 8,63 \%$$

Kun proteiinipitoisuus on raaka-ainassa kaalin kannassa 1,42 %, saadaan proteiinipitoisuus kuiva-aineessa kaavalla 6:

$$\text{Proteiinipitoisuus kuiva-aineessa} = 1,42 \cdot \frac{100}{100-91,37} = 16,45 \%$$

Näyte	Märkápaino (g)	Kuivapaino (g)	Kosteuspitoisuus (%)	Kuiva-ainepitoisuus (%)	Proteiinipitoisuus kuiva-aineessa (%)
Lehti 1	26,5	2,79	89,47	10,53	9,12
Lehti 2	30,35	3,04	89,98	10,02	9,58
Lehti 3	31,9	3,12	90,22	9,78	9,82
Keskiarvo			89,89	10,11	9,50
Keskihajonta			0,38	0,38	0,36
Kanta 1	24,34	2,1	91,37	8,63	16,45
Kanta 2	33,78	3,33	90,14	9,86	14,40
Kanta 3	25,17	2,58	89,75	10,25	13,85
Keskiarvo			90,42	9,58	14,90
Keskihajonta			0,85	0,85	1,37

Saostuman proteiini, proteiinisaanto, proteiinin teoreettinen määrä ja proteiinin talteenotto prosentti: esimerkkilaskut

Esimerkiksi 40°C vesihaudemetelmällä saadun proteiinisaostuman paino oli 0,0075 g, puristetun kaalin alkuperäinen paino 5,158 g ja saostuman proteiinipitoisuus oli 58,47 %. Tällöin kaavalla 10 saadaan saostuman proteiinin määrä:

$$m(\text{saostuman proteiini}) = 0,5847 \cdot 0,0075 \text{ g} = 0,004385 \text{ g}$$

ja kaavalla 7 saadaan proteiinisaanto:

$$\text{Proteiinisaanto (mg / g)} = \frac{0,004385 \text{ g} \cdot 1000}{5,158 \text{ g}} = 0,8501 \text{ mg/g}$$

Kun raa'an kaalin kannan proteiinipitoisuus oli 1,42 %, niin saadaan puristuksessa käytetyn kaalin teoreettinen proteiinin määrä kaavalla 9:

$$m(\text{proteiini, teoreettinen}) = 0,0142 \cdot 5,158 \text{ g} = 0,0732 \text{ g}$$

Tällöin proteiinin talteenotto prosentti on kaavan 8 mukaisesti:

$$\text{Proteiinin talteenotto (\%)} = \frac{0,004385 \text{ g}}{0,0732 \text{ g}} \cdot 100 = 5,99 \%$$

	näyte	m(kanta) g	m(saostuma) g	m(saostuman proteiini) g	m(proteiini, teoreettinen) g	Proteiini- saanto (mg/g)	Proteiinin talteenotto (%)
40°C vesihaude	1	5,158	0,0075	0,0044	0,0732	0,85	5,99
	2	5,3958	0,0079	0,0046	0,0766	0,86	6,03
	3	5,33	0,0028	0,0016	0,0757	0,31	2,16
	keskiarvo			0,0035		0,67	4,73
	keskihajonta			0,0017		0,32	2,22
30°C vesihaude	1	5,2373	0,008	0,0047	0,0744	0,89	6,29
	2	5,316	0,0071	0,0041	0,0755	0,78	5,50
	3	5,2788	0,0067	0,0039	0,0750	0,74	5,22
	keskiarvo			0,0042		0,80	5,67
	keskihajonta			0,0004		0,08	0,55
UAE (30°C)	1	5,2133	0,0157	0,0084	0,0740	1,61	11,36
	2	5,2451	0,0138	0,0074	0,0745	1,41	9,93
	3	5,1928	0,0148	0,0079	0,0737	1,53	10,75
	keskiarvo			0,0079		1,52	10,68
	keskihajonta			0,0005		0,10	0,72
Pelkkä puristus	1	5,4023	0,0035	0,0019	0,0767	0,35	2,45
	2	5,4322	0,0089	0,0048	0,0771	0,88	6,18
	3	5,2573	0,0013	0,0007	0,0747	0,13	0,93
	keskiarvo			0,0024		0,45	3,19
	keskihajonta			0,0021		0,38	2,70