

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO
Teknillinen tiedekunta
Kemiantekniikan koulutusohjelma
Teknillisen kemian laboratorio
Kandidaatintyö

**STEROLI- JA STANOLIESTERIT –
RAAKA-AINEET JA TUOTANTOPROSESSIT**

Sterol and stanol esters – raw materials and production processes

Sini Kaartinen
0279937

9.3.2010

SISÄLLYS

1	Johdanto.....	2
2	Kasvisterolit, -stanolit ja rasvahapot	3
2.1	Kemialliset ominaisuudet	5
2.2	Rasvahappojen tuotanto.....	8
2.3	Kasvisterolien tuotantoprosessit	12
2.3.1	Mäntyöljy.....	12
2.3.2	Kasviöljyt.....	18
2.4	Sterolien hydraus	19
3	Esteröintiprosessit.....	21
3.1	Entsyyattiset menetelmät	22
3.2	Kiinteät emäskatalyyttimenetelmät	26
4	Käyttö	27
5	Yhteenveto ja johtopäätökset.....	30
	Lähteet	32

1 Johdanto

Suomalaisten haitallisimpiin kansansairauksiin kuuluvat sydän- ja verisuonitaudit. Myös muualla maailmassa kyseiset taudit ovat ongelmallisia. Maailman terveysjärjestön (WHO) mukaan sydän- ja verisuonitauteihin kuoli maailmassa noin 17,1 miljoonaa ihmistä vuonna 2004 eli noin 0,3 %:a koko maailman väestöstä. Näistä 17,1 miljoonasta 7,2 miljoonaa kuoli sepelvaltimotautiin, jonka riskitekijöitä ovat erityisesti sekä kohonnut verenpaine että veren kolesteroli, tupakoiminen ja epä-terveellinen ruokavalio. (WHO¹)

Korkea kolesteroliarvo on ollut riski ihmiselle jo viime vuosisadan alkuvaiheessa ja niinpä kolesterolia alentavia tekijöitä on tutkittu siitä lähtien. Vuonna 1951 on todettu sitosterolin seerumin kolesterolia alentava vaikutus eläimissä ja pari vuotta myöhemmin huomattiin sen myös pätevän ihmisiin, joissa sitosteroli estää kolesterolin imeytymistä suoleen. Suomessa sitosterolitutkimuksia on suorittanut mm. professori Tatu Miettinen Hyksissä (Helsingin yliopistollisessa keskussairaalassa) 1960-luvulta lähtien.

1980-luvun puolivälissä saksalaisen professori von Bergmannin tutkimusryhmän tekemän tutkimuksen ansiosta stanolin todettiin alentavan kolesterolia sterolia paremmin imeytymättä itse verenkiertoon. Sterolien ja stanolien liukoisuus margariiniin ei kuitenkaan tuottanut parhaita mahdollisia tuloksia, joten sen muuttamista rasvaliukoisempaan muotoon alettiin tutkia 1980-luvun lopulla.

Margariini, jolla on voitu vaikuttaa alentavasti veren kolesteroliarvoon, saatiin vihdoinkin markkinoille vuonna 1995 monien ponnistelujen ja yhteistöiden kautta, jolloin Raisio Yhtymä toi ensimmäisenä maailmassa markkinoille stanoliestereitä sisältävän Benecol-margariinin. Sitostanoliesterien on todettu alentavan sekä kokonais- että LDL-kolesteroliarvoa jopa 5–15 % päivittäin käytettynä. (Miettinen *et al.*², Fernandes ja Cabral³)

Tuon 1995 vuoden jälkeen sitosterolit, -stanolit ja niiden rasvahappoesterit ovat olleet suurennuslasin alla. Niitä on tutkittu lisää ja yritetty kehittää erilaisia tuotantoprosesseja esteröintiin, kuten myös niihin vaikuttavia katalyyttejäkin. Tässä työssä on tarkoituksena käydä läpi steroli- ja stanoliestereitä, niiden valmistukseen tarvittavia raaka-aineita sekä tuotantoprosesseja.

2 Kasvisterolit, -stanolit ja rasvahapot

Steroli- ja stanoliesterien tärkeimpiin raaka-aineisiin kuuluvat *kasvisterolit*, jotka ovat solukalvojen elintärkeitä rakenneosia ja joita tuottavat sekä eläimet että kasvit. Steroleita löytyy myös siemenistä, viljojen jyvistä, pähkinöistä, kasviksista ja erilaisista kasviöljyistä, kuten maissi-, rypsi-, auringonkukka- ja soijaöljystä, mukaan luettuna myös sellutuotannosta saatavasta mäntyöljystä. Kasvisteroleiden tehtävänä on kontrolloida kalvon valuvuutta ja permeabiliteettia. Yleisimpiä kasvisteroleita ovat β -sitosteroli, stigmasteroli ja kampesteroli, joista β -sitosteroli on yleisin. Taulukossa I on luokiteltu eri viljojen jyvien, kasvien ja hedelmien (koskeuspitoisuus kasvaa alaspäin mentäessä) sisältämien yleisimpien kasvisterolien määrät. (Fernandes ja Cabral³, Piironen *et al.*⁴)

Taulukko I Yleisimmät kasvisterolit viljojen jyvissä, kasviksissa ja hedelmissä (mg/kg tuorepainoa kohti) (Piironen *et al.*⁴).

Ruoka-aine	Sterolien kokonaismäärä	Sitosteroli	Kampesteroli	Stigmasteroli
Ruis	910–1100	421	159	17
Vehnä	603–690	309	88	15
Kaura	329–520	167–282	24–40	12–15
Ohra	586–830	289	111	150
Maissi	1780	1200	320	210
Ruusukaali	430		80	3,8
Parsakaali	390	310	69	11
Kukkakaali	400	260	95	37
Porkkana	160	110	22	28
Peruna	38	27	2,3	3,8
Vahapapu	170	89	13	51
Omena	130	130	3,6	1,0
Appelsiini	240	200	30	10

Taulukosta I voidaan huomata, että maissi sisältää kokonaismäärältään eniten kasvisteroleita ja jopa hedelmissä, kuten esimerkiksi appelsiinissa on enemmän steroleita kuin porkkanassa.

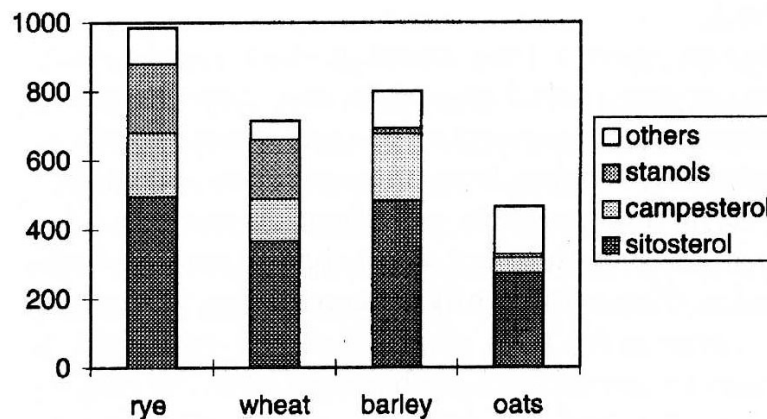
Rikkaimmat luonnonlähteet, joista steroleita saadaan, ovat kasviöljyjä, jotka sisältävät steroleita yhteensä keskimäärin noin 1–5 g/kg. Poikkeuksia olivat maissista, rypsistä, riisileseestä ja vehnänalkiosta valmistetut öljyt, jotka sisältävät tätäkin suurempia määriä steroleita. Taulukossa II on esitetty muutamien kasviöljyjen sterolipitoisuudet. (Fernandes ja Cabral³, Piironen *et al.*⁴)

Taulukko II Tärkeimpien sterolilähteiden, raakojen sekä jalostettujen kasviöljyjen, sterolipitoisuudet (Fernandes ja Cabral³).

Kasviöljy	Sterolipitoisuus öljyssä (mg/100 göljyä)	
	Raaka	Jalostettu
Maissi	850	730
Rypsi	820	770
Auringonkukka	430	350
Soija	350	260

Syy siihen miksi kasviöljyjä jalostetaan, vaikka sterolipitoisuus raa'assa öljyssä on parempi kuin jalostetussa, selviää myöhemmin käsiteltäessä kasviöljyjen tuotantoprosesseja, joista saadaan sekä rasvahappoja että steroleita.

Stanolit ovat osoittautuneet steroleita paremmiksi ja tehokkaammiksi kolesterolia alentaviksi yhdisteiksi. Ne kuuluvat myös tärkeimpiin raaka-aineisiin sterolien ohella, valmistettaessa etenkin stanoliestereitä. Vaikka steroleita on suurin osa lähtötuotteista, sisältävät jotkut tuotteet myös stanoleita. Stanolit ovat steroleiden tyydyttynyt muoto ja ne esiintyvät vastaavasti kasvistanoleina, joka on seos β -sitostanolia sekä kampestanolia. Kuvassa 1 näkyy viljojen sisältävän myös stanoleita. (Piironen *et al.*⁴)



Kuva 1. Ruis-, vehnä-, ohra- ja kaurajyvien sisältämien stanolien, kampesterolien, sitosterolien ja muiden yhdisteiden määrien suhteet mitattuna mg/kg (Piironen *et al.*⁴).

Stanoleita siis esiintyy jonkin verran viljatuotteissa, muutamasta mg:sta 200 mg:aan kilossa, eniten ruis- ja vehnäjyvissä. Niitä on myös todettu pieniä määriä maissista, joka sisälsi taulukon I mukaan eniten kasvisteroleita. (Piironen *et al.*⁴)

Rasvahappoja, jotka ovat osa sterolien ja stanolien esteröintiprosessia, löytyy laajalti luonnosta lipidien yhdisteinä rasvoista, vahoista, steroliestereistä ja triterpeenialkoholien estereistä. Alun perin termi ”rasvahappo” oli sovellettu ainoastaan karboksyylihapolle, jota saatiin erotettua eläinten ja kasvien rasvoista. Nykyään termi kattaa sekä tyydyttyneet että tyydyttymättömät alifaattiset karboksyylihapot, joiden hiiliketjun pituus on välillä C_6 – C_{24} . Teollisuudessa käytetään pääsääntöisesti rasvahappoja, joita saadaan kasviöljyistä, kuten esimerkiksi soijaöljystä tai rypsiöljystä. Taulukossa III on esitetty muutamia tärkeimpiä rasvahappoja ja niiden massaprosenttiosuuksia tärkeimmissä kasviöljyissä. Taulukossa mainittujen kaksoissidosten määrään ei ole laskettu rasvahapon happo-osan ($-COOH$) sisältämää kaksoissidosta. (Ullmann’s⁵)

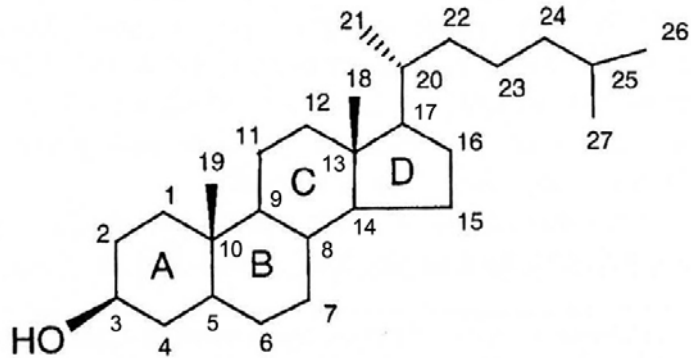
Taulukko III Kasviöljyjen sisältämien tärkeiden rasvahappojen massaprosenttiosuudet sekä hiilien ja kaksoissidosten lukumäärät (Ullmann’s⁵).

Rasvahappo	Hiilien lukumäärä	Kaksoissidosten määrä	Oliiviöljy	Maissiöljy	Rypsiöljy	Soijaöljy	Auringonkukkaöljy
Palmitiini	C_{16}	0	7–16	8–19	2–5	7–12	3–10
Steariini	C_{18}	0	1–3	0–4	0–3	2–3	1–10
Öljy	C_{18}	1	65–85	19–50	11–60	20–30	14–65
Linoli	C_{18}	2	4–15	36–62	12–24	45–58	20–75

Taulukossa III mainittujen rasvahappojen tärkeys voidaan perustella siten, että kukin niistä esiintyi jok’ikisessä taulukon kasviöljyssä ja lähteen esittämässä muissa kasviöljyissä pieninä tai vähän suurempina osuuksina. Taulukosta voidaan päätellä, että yleisimmät ja käytetyimmät rasvahapot ovat öljy- ja linolihapot, joita löytyi kasviöljyistä muita mainittuja happoja selvästi suurempia määriä. (Ullmann’s⁵)

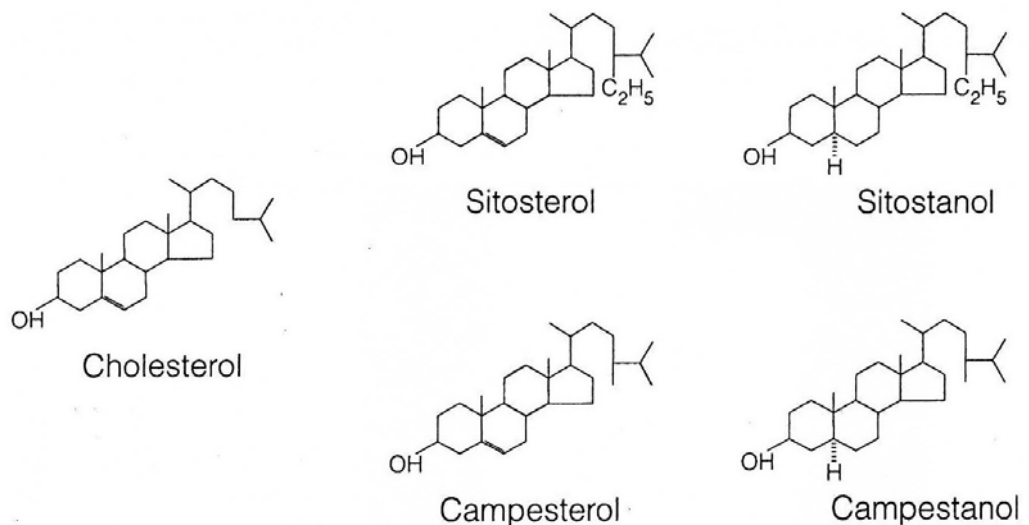
2.1 Kemialliset ominaisuudet

Kasvisterolit ovat steroidisia alkoholeja ja muistuttavat rakenteeltaan sekä ominaisuuksiltaan kolesterolia. Steroleita löydetään eläimistä, sekä niiden kemiallisista että biologisista toiminnoista. Perus steroliyhdisteiden kemiallinen rakenne muistuttaa kuvan 2 5α -kolestan- 3β -olin rakennetta, joka saadessaan kaksoissidoksen hiilien 5 ja 6 välille muodostaa kolesterolin, kemialliselta nimeltään 5α -kolestan- 3β -olin. (Piironen *et al.*⁴)

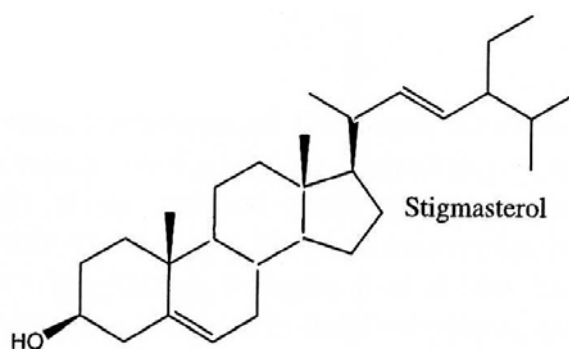


Kuva 2. 5α -kolestan- 3β -oli yhdisteen kemiallinen rakenne (Piironen *et al.*⁴).

Steroliyhdisteet koostuvat neljästä renkaasta, kuvan 2 mukaisesti kolmesta 6-renkaasta (A, B ja C) ja yhdestä 5-renkaasta (D), joilla on *trans* rengasliitokset ja täten muodostaa laajan α -systeemin. B-renkaassa kaksoissidos sijaitsee yleensä hiilien 5 ja 6 välillä, kuten kolesterolilla. Hiilissä 10 ja 13 on sivuketjuina kaksi metyyliiryhmää, jotka ovat rengasmuotoon nähden viistossa ja näin ollen omaavat β -stereokemian, kuten myös hydroksyyliiryhmä, joka on kiinni 3. hiilessä. Erona kolesteroliin, tärkeimmillä kasvisteroleilla on hiilessä 24 sivuketjuna joko etyyli- tai metyyliiryhmä, joka voi omata α - tai β -kiraalisuuden. Kuvassa 3 ja 4 on esitetty sekä kasvisteroleiden että -stanoleiden tärkeimmät muodot. (Fernandes ja Cabral³, Piironen *et al.*⁴)



Kuva 3. Kolesterolin, kasvisteroleista sitosterolin ja campesterolin sekä vastaavien stanoleiden, sitostanolin ja kampestanolin kemialliset rakenteet (Thompson ja Grundy⁶).

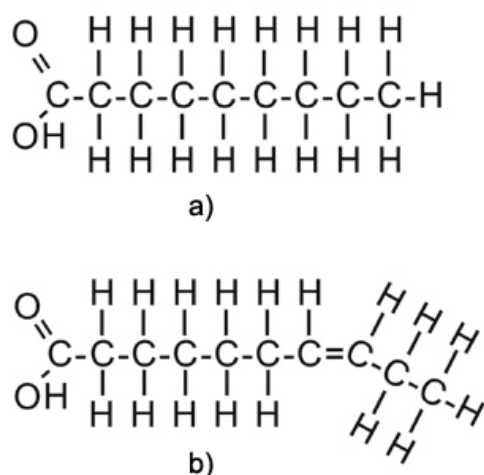


Kuva 4. Stigmasterolin kemiallinen rakenne (Folmer⁷).

Sitosterolin, kampesterolin ja stigmasterolin sulamispisteet ovat 140, 157–158 ja 170 °C. Mitä pidemmän sivuketjun sterolit omaavat, sitä hydrofobisempia niistä tulee. Sivuketjun sisältämä kaksoissidos edistää myös tätä ominaisuutta. Kasvisterolien tärkeä kemiallinen reaktio on hapettuminen, josta voi seurata haitallisia steroideja. Hapettuminen tapahtuu olosuhteissa, joissa on läsnä lämpöä, valoa, saastuttavia/kontaminoivia metalleja ja happea. Reaktiiviset happilajit ja hapettavat entsyymit voivat myös käynnistää sterolien hapettumisen. (Piironen *et al.*⁴)

Kasvistanolit erottuvat steroleista siten, että niissä ei ole laisinkaan kaksoissidosta hiilien 5 ja 6 välillä, muuten ne koostuvat aivan samalla tavalla, sisältäen joko 28 tai 29 hiiltä. Kiteisen stanolijauheen sulamispiste on samaa luokkaa sterolien kanssa (140–150 °C). (Folmer⁷)

Rasvahapot, jotka muodostuvat osin triglyserideista hydrolyysin avulla, voivat olla joko tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä. Ne poikkeavat toisistaan siten, että tyydyttymättömillä rasvahapoilla on useampia kaksoissidoksia hiiliketjussa kun tyydyttyneillä on kaksoissidos ainoastaan happo-osassa (-COOH). Ketjun konfiguraatio on myös erilainen, joka tyydyttymättömillä voi olla joko *cis*- tai *trans*-muotoa. Tyydyttyneitten tasalukuisten rasvahappojen sulamispiste kasvaa hiiliketjun kasvaessa ja laskee tyydyttymättömyyden kasvaessa. Esimerkiksi linolihapon (3 kaksoissidosta) sulamispiste on -5 °C, kun taas öljyhapon (2 kaksoissidosta) on 16,3 °C ja palmitiinihapon (1 kaksoissidos) on 62,9 °C. Kuvassa 5 on esitetty sekä tyydyttyneen että tyydyttymättömän rasvahapon kemialliset rakenteet. (Ullmann's⁸)

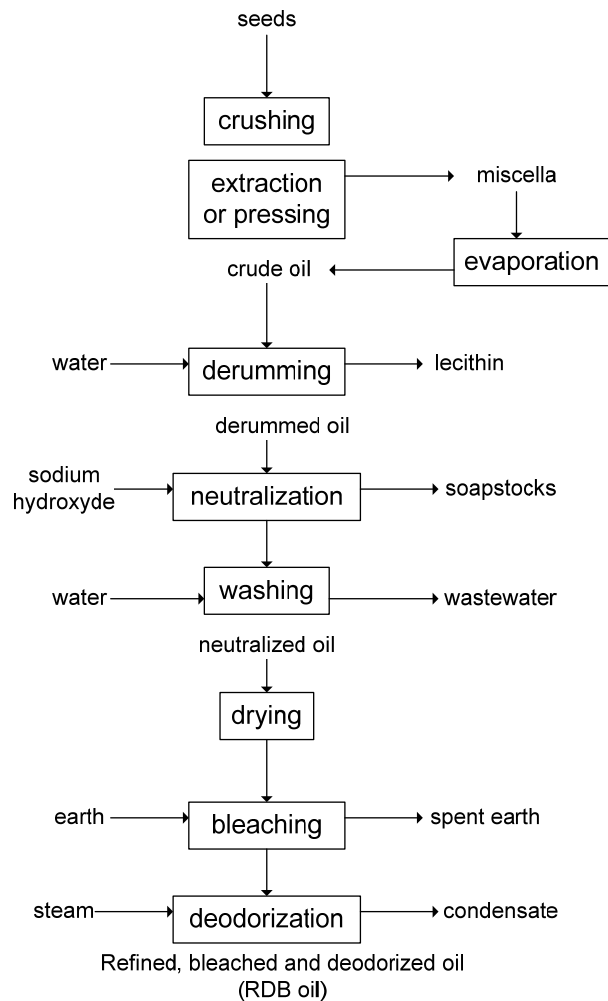


Kuva 5. a) Tyydyttyneen ja b) tyydyttymättömän rasvahapon kemiallinen rakenne (Integrated Supplements⁹).

Rasvahappojen sisältämät kaksoissidokset voidaan tyydyttää kokonaan tai osittain hydrauksen avulla käyttäen katalyyttinä esimerkiksi nikkeliä, platinaa, kuparia tai palladiumia. Hydraus vaikuttaa positiivisesti sulamispisteen nousuun, koska rasvahapon tyydyttymättömyys laskee. Osittainen hydraus johtaa usein *cis*-kaksoissidoksen isomerointiin *trans*-kaksoissidokseksi. (Ullmann's⁸)

2.2 Rasvahappojen tuotanto

Rasvahapot, jotka ovat tärkeä osa steroli- ja stanoliestereiden tuotannossa, saadaan kasviöljyjen jalostuksesta, joista saadaan samalla myös tuotettua steroleita. Kasviöljyt sisältävät steroleiden lisäksi erilaisia pieniä aineita, kuten fosolipidejä, väriaineita ja vapaita rasvahappoja. Kahta päämenetelmää on käytetty kasviöljyjen jalostuksessa. Ensimmäinen sisältää sarjan, johon kuuluu hartsinpoisto (degumming), neutralisointi (neutralization), valkaisu (bleaching) ja hajunpoisto (deodorization). Tätä sarjaa voidaan kutsua kemialliseksi jalostukseksi. Toinen menetelmä, fysikaalinen jalostus, rakentuu hartsinpoistosta, valkaisusta, ja höyryjalostuksesta. Kemiallista jalostusmenetelmää käytetään enemmän sekä rasvahappojen että steroleiden tuotannossa, koska fysikaalisen jalostusmenetelmän puutteena on, ettei se pysty poistamaan kunnolla hydratoitumattomia fosfatideja, mikä on haittekkijä steroleita tuottaessa. Kuvassa 6 on esitetty kemiallisen jalostusmenetelmän kaavio, jossa on sen pääaskeleet. (Fernandes ja Cabral³, Pioch *et al.*¹⁰, Lin *et al.*¹¹)



Kuva 6. Kasviöljyjen kemiallisen jalostuksen päävaiheet (Pioch *et al.*¹⁰).

Kasviöljyjä saadaan pääosin murskamalla alussa jyvät tai siemenet, jonka jälkeen puristetaan raakaöljy tai uutetaan liuottimilla (heksaani), josta saadaan misellit höyrystettäväksi ja lisättyä puristuksesta saatuun raakaöljyyn. Raakaöljy johdetaan hartsinpoistoon, jossa sitä käsitellään vedellä tai fosforihapolla. Hartsinpoistolla saadaan alennettua fosfolipidien tasoa ja poistettua lesitiiniä. Tämän jälkeen saatu öljy menee neutralisointiin, jossa käytetään natriumhydroksidia neutralisoimaan vapaat rasvahapot saippuaksi. Saippua poistetaan jäljelle jääneiden fosfolipidien kanssa sentrifugoimalla. Öljy pestään vielä vedellä ja saadaan neutraloitua öljyä, joka menee kuivauksen kautta valkaisuun. Valkaisussa väriaineet adsorboidaan happoaktivoituilla savilla. Valkaisusta öljy menee lopuksi hajunpoistoon, jossa se höyrytislataan 220–240 °C lämpötilassa ja alipaineessa (0,2 kPa). Näin saadaan poistetuksi pieniä määriä vapaita rasvahappoja, aldehydejä, ketoneja ja muita epävakaita yhdisteitä. (Pioch *et al.*¹⁰, Lin *et al.*¹¹)

Kuvan 6 prosessissa hartsinpoisto-osan sivuaineena saadaan lesitiiniä, joka on fosfatidien yksi tärkeimmistä ainesosista. Se sisältää fosfatidien lisäksi myös jonkin verran muita yhdisteitä kuten rasvahappoja, triglyserideja, steroleita, hiilihydraatteja ja glykolipideja. Sentrifugissa olevat kumihartsit käsitellään vetyperoksidilla ja kuivataan, jolloin kosteus alentuu ja voidaan siten jäähdyttää. Saadaan kuusi yleisintä lesitiinilajia, joita voidaan käyttää ruoanvalmistuksessa ja teollisissa prosesseissa. Lesitiinissä esiintyvät triglyseridit voidaan erottaa hydrolyysin avulla rasvahapoiksi ja glyseroleiksi. (Ullmann's⁵, Pandey *et al.*¹², Kirk-Othmer¹³)

Neutralisointiosan sivuaineena saatava saippualieju saadaan kasviöljyjen emäsjalostuksesta ja luokitellaan jätteeksi. Öljyn ja emäksen reaktio on esitetty yhtälössä (1). Saippualieju sisältää 50 % kokonaisrasva-ainetta ja sen takia sillä on myös kaupallista arvoa. (Pandey *et al.*¹²)

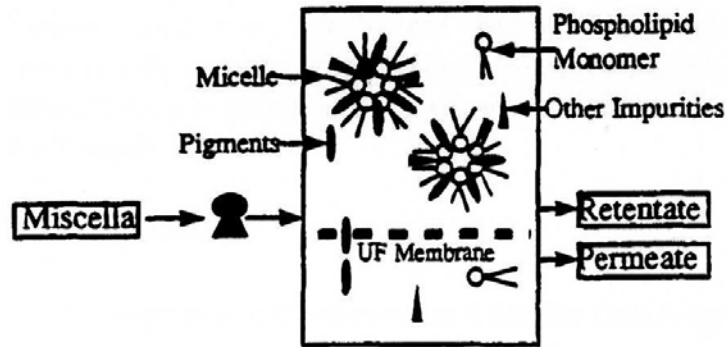


Hajunpoistosta saatava tisle on epävakaata ja haihtuva orgaaninen materiaali. Teollisuudessa saatu tisle sisältää vapaita rasvahappoja, tokoferoleita ja steroleita, joiden takia tisle meneekin hajunpoistosta jatkojalostukseen. Jatkojalostuksessa saadaan otettua talteen kyseiset tärkeät ainesosat. Rasvahapot voidaan erottaa steroleista jatkojalostuksessa alipainetislauksen avulla, joka perustuu siihen, että hajunpoistotisleen sisältävien yhdisteiden kiehumispisteet ovat erilaisia. (Pandey *et al.*¹²)

Moniaskelisen jalostusprosessin takia suuria määriä energiaa kuluu öljyn lämmittämiseen ja jäähdyttämiseen sekä pumppujen, sentrifugien ja muiden prosessilaitteiden käyttämiseen. Kyseisten ongelmien takia on etsitty erilaisia menetelmiä, jotka voisivat korvata joitakin jalostusprosessin osia ja samalla pienentää myös energiankulutusta. (Lin *et al.*¹¹)

Koska kalvojen valmistus on myös kehittynyt vuosien varrella, on keksitty paljon kestävämpiä kalvoja. Kalvot, jotka kestävät heksaania (raakaöljyn uuttoliuotin), antoivat uusia ulottuvuuksia kasviöljyjen jalostukseen. Mikro- ja ultrasuodattimien käyttöä kasviöljyn jalostuksen hartsinpoistossa tutkivat Lin *et al.*¹¹. He testasivat kahta ei-vesikalvoa, joiden molekyylipainon katkaisukoot olivat erisuuruisia.

Seoksen syötössä kalvolle käytettiin poikittaisvirtausta. Kuvassa 7 on esitetty mekanismi, jossa hartsinpoisto suoritetaan kalvoa käyttäen.



Kuva 7. Hartsinpoistomekanismi kalvoa käyttäen (Lin *et al.*¹¹).

Raakaöljyn kalvoon perustuva hartsinpoisto tuottaa permeaatti- ja retentaattiosan, missä permeaatti sisältää triasyyliglyseroleja ja retentaatti fosfolipidejä. Suurin osa väriaineista, jotkut vapaista rasvahapoista ja muista epäpuhtauksista, ovat kiinnittyneinä sekä fosfolipideihin että miselleihin ja täten poistuvat retentaattina öljystä. Tutkimuksessa ensimmäisellä kalvolla, jolla oli 15 kertaa pienempi molekyylipainon katkaisukoko kuin toisella kalvolla, saavutettiin fosfolipidien 99 % rejektio. Isommalla kalvolla saavutettiin vastaavasti 94 % rejektio. Kalvon likaantumisen ei tuottanut tutkimuksissa isoa ongelmaa. Kalvon käytöllä hartsinpoistossa on energiankulutusta alentavia vaikutuksia. Se myös yksinkertaistaa koko jalostusprosessia ja alentaa jäteveden muodostumisen määrää. (Lin *et al.*¹¹)

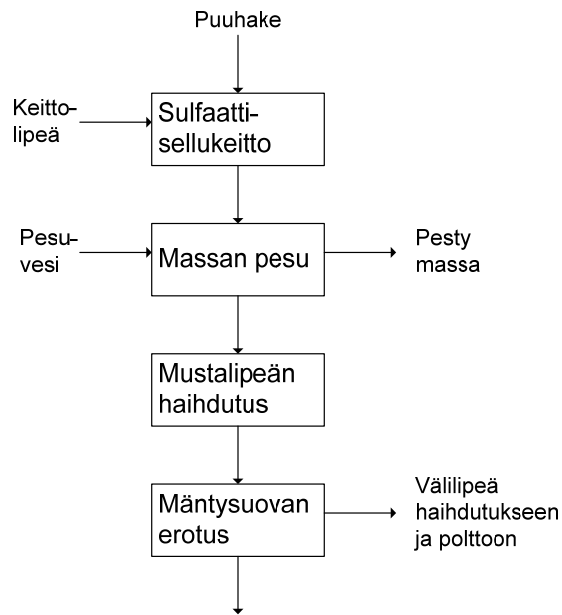
Pioch *et al.*¹⁰ tutkivat myös kalvojen käyttöä hartsinpoistossa. Kokeissa käytettiin mikro-suodatuskalvoja ja syöttö tuli vastaavasti poikkivirtauksena kalvolle. Tulokset olivat lupaavia kasviöljyjen jalostuksessa. Lupaavista tuloksista huolimatta on paljon asioita, joita pitää ottaa huomioon. Esimerkiksi suodatuksesta saatu permeaatti palautettiin jatkuvasti takaisin syöttöön välttämällä vaikutus, jossa retentaatin silmukan konsentraatiotekijä kasvoi ja aiheutti täten huokoisten tukkeutumista. Kyseiset kokeet sisälsivät paljon erilaisia parametreja, joilla oli monimutkaisia vaikutuksia kokeisiin. Tämän takia toimintaolosuhteet tulee optimoida huolellisesti.

2.3 Kasvisterolien tuotantoprosessit

Puu on ollut Suomen tärkein luonnonvara ja siitä saatujen kemikaalien tuotanto on ollut kasvussa. Mäntyöljystä ja sekasuovasta saatavien sterolien tuotanto sai Suomessa alkunsa Lappeenrannan Kaukaalla ja on sieltä lähtenyt ”valloittamaan” muuta Suomea. Steroleita, joita esiintyy mäntyöljyn ja sekasuovan lisäksi sekä kasveissa että viljoissa, tuotetaan myös kasviöljyistä, joissa sterolipitoisuudet ovat kohtuullisen suuret. Soijakasveista saataviin öljyihin kuitenkin erittyy huomattavasti vähemmän kasvisteroleita kuin mäntyöljyyn. Tuotantoprosesseista saatavien kasvisteroleiden laadun ja saatavuuden mukaan niiden kilohinta vaihtelee muutamista dollareista kymmeneen dollariin. (Kullas¹⁴)

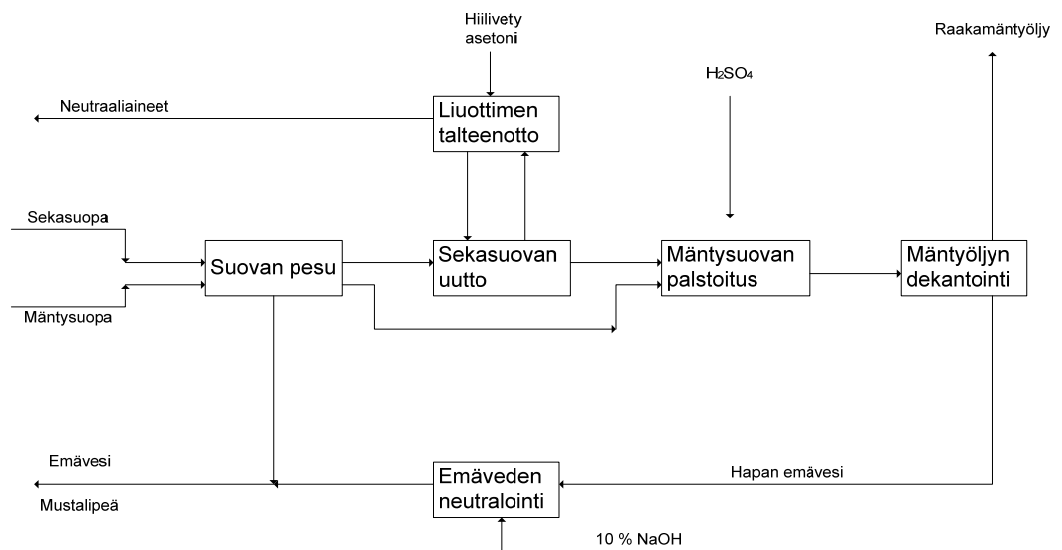
2.3.1 Mäntyöljy

Kasvisteroleita, pääasiassa β -sitosterolia, on alun perin alettu tuottaa Suomessa vuonna 1980 Kaukaan kemiallisessa tehtaassa Lappeenrannassa, jossa steroleita saadaan sellutuotannosta. Sellunvalmistuksen alussa puuhaketta johdetaan kattilaan, jossa haketta keitetään natriumsulfidin ja -hydroksidin seoksessa (kuva 8). Tämän jälkeen sellumassa pestään ja pesty massa erotetaan mustasta lipeästä, joka on puun sisältämien rasva- ja hartsihappojen saippuoitunut kolloidinen emulsio. Mustalipeä johdetaan haihdutukseen, jossa sitä väkevöidään kunnes rasva- ja hartsihappojen natriumsuolat, saippuat, sekä saippuoitumattomat aineet, kuten rasvaalkoholit, rasvahapon esterit, vapaat ja esteröidyt sterolit, erottuvat ja nousevat välilipeän pinnalle mäntysuopana. Mäntysuopa erotetaan välilipeästä ja johdetaan mäntyöljylaitokselle. Välilipeä vastaavasti johdetaan haihdutukseen ja polttoon. (Miettinen², Fernandes ja Cabral³, Riistama *et al.*¹⁵)



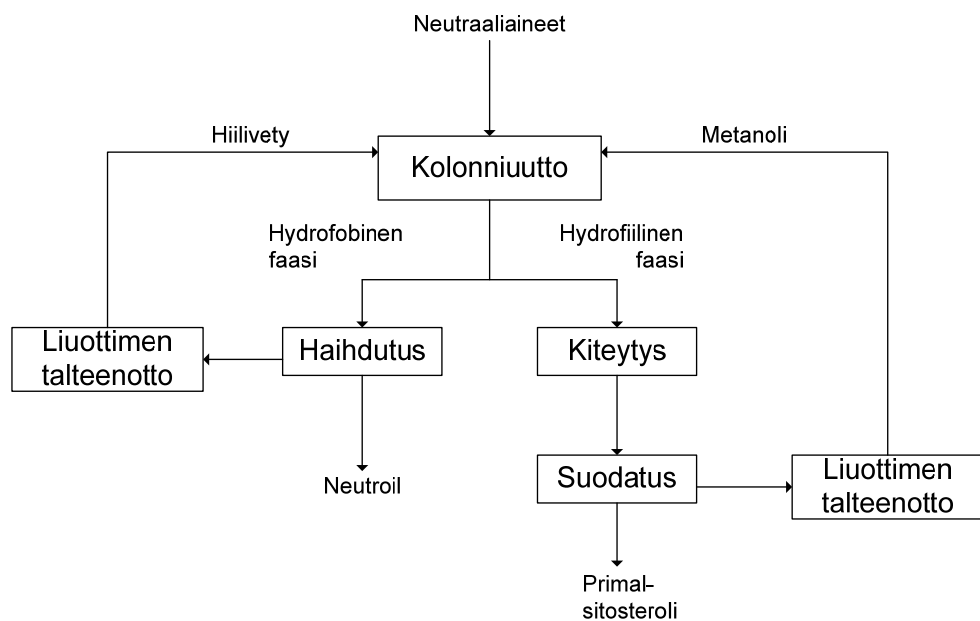
Kuva 8. Mäntysuovan erotus sellusta (Riistama *et al.*¹⁵).

Sulfaattikeiton raaka-aineena voidaan myös käyttää koivuhaketta, joka vaatii mäntysuovan tai hartsisaippuan lisäystä, jotta koivusuovan erottuminen parantuisi. Kun mäntysuopa ja koivusuopa menevät sekaisin, saadaan sekasuopaa, joka sisältää runsaasti neutraaliaineita, kuten steroleita. Neutraaliaineet heikentävät mäntyöljyn laatua, joten ne on poistettava mäntysuovan CSR-uuttoprosessilla (Crude Soap Refining) (kuva 9). (Riistama *et al.*¹⁵)



Kuva 9. Neutraaliaineiden erotus mäntysuovan CRS-uuttoprosessilla (Riistama *et al.*¹⁵).

CSR-prosessissa seka- ja mäntysuopaseos johdetaan pesuun, jonka jälkeen se uutetaan ja johdetaan liuottimen talteenottoon. Siellä seka-suopa, joka on dispergoitunut vesi-asetoniseokseen, uutetaan hiilivetyjen avulla. Tämä vaikuttaa siihen, että neutraaliaineet, jotka sisältävät β -sitosterolia, diterpeenialkoholeja ja -aldehydeja, siirtyvät rasvaliukoiseen faasiin ja voidaan täten johtaa suoraan sitosterolin erotusprosessiin (kuva 10). Liuottimen talteenotossa syntynyt asetonifaasi johdetaan takaisin mäntysuovan uuttoprosessiin, josta saadaan raaka-aineeksi raakamäntyöljyä.



Kuva 10. Kaukaan tehtaan Primal-sitosterolin erotusprosessi (Riistama *et al.*¹⁵).

Neutraaliaineet tulevat CSR-prosessista uuttokolonniin, jossa hiilivetyfaasia uutetaan metanolilla vastavirtaperiaatteella, tarkoituksena saada neutraaliaineen sitosteroli siirrettyä hiilivedystä alkoholiin. Jäljelle jäänyt hiilivetyliuos, hydrofobinen faasi, johdetaan haihdutukseen, josta neutraaliöljy, Neuroil, otetaan talteen ja haihtunut hiilivetyliuotin johdetaan takaisin uuttoon. Sitosterolia sisältävä hydrofiilinen alkoholifaasi johdetaan uutosta kiteytykseen. Kiteytyksessä sitä käsittelee jatkuvatoiminen tyhjäkiteytin, joka luokittelee kidekokoja. Tämän jälkeen kiteytyneet sterolit ohjataan painesuodatukseen. Suodatuksessa eristetty sitosteroli kuivataan vielä tyhjökuivaimessa, jonka jälkeen se on valmis pakattavaksi. Tuotteeksi saatu Primal-sitosteroli on seos, joka sisältää β -sitosterolia, β -sitostanolia, kampesterolia, kampestanolia ja lisäksi α -sitosterolia. (Riistama *et al.*¹⁵)

CSR-prosessi on ollut käytössä ainoastaan UPM-Kymmene Oyj:n Kaukaan kemiallisella tehtaalla, joka suljettiin vuonna 2006. Forchem puolestaan on vuodesta 2005 asti suunnitellut uuden kasvisterolitehtaan rakentamista Raumalle, jossa ennestään on mäntyöljyn tislaus- ja jalostustehdas. Uudella tehtaalla tarkoituksena olisi saada steroleita mäntyöljyä tislaamalla ja tehtaan suunniteltiin käynnistyvän vuonna 2007. Mutkia matkaan tuli kuitenkin samana vuonna (2005), jolloin Oulussa sijaitseva amerikkalaisyhtiö Arizona Chemicals ja Forchem riitelivät patenttiasioista. Raisio on tähän mennessä ostanut kasvisterolit Arizona Chemicalsilta ja siihen saattaisi tulla muutos, kun Forchem saa luvan rakentaa sterolitehtaansa Raumalle. Vuoden 2007 alussa kaupunkilehti Uusi Rauma¹⁷ uutisoi sterolitehtaan rakennushankkeen varmistumisesta. Sen mukaan parhaimmassa tapauksessa tuotanto voisi alkaa jo vuoden 2008 lopulla. Toistaiseksi lisätiedotteita tehtaan valmistumisesta ei ole löytynyt. (Kulla¹⁴, Etelä-Saimaa¹⁶, Kauppalehti¹⁷, Kaupunkilehti Uusi Rauma¹⁸)

Kuvassa 11 on esitetty neljästä eri raaka-ainelähteestä saatavien steroleiden talteenotto menetelmät. Neljästä raaka-aineesta kolme saadaan puusta tai puunjalostuksesta saatavista materiaaleista/yhdisteistä ja yksi kasviöljyjen jalostuksen sivutuotteesta. Nämä kolme puunjalostuksesta saatavaa raaka-ainetta ovat mustalipeän natriumsaippua, raakamäntyöljy ja mäntypiki. (Fernandesin ja Cabralin³)

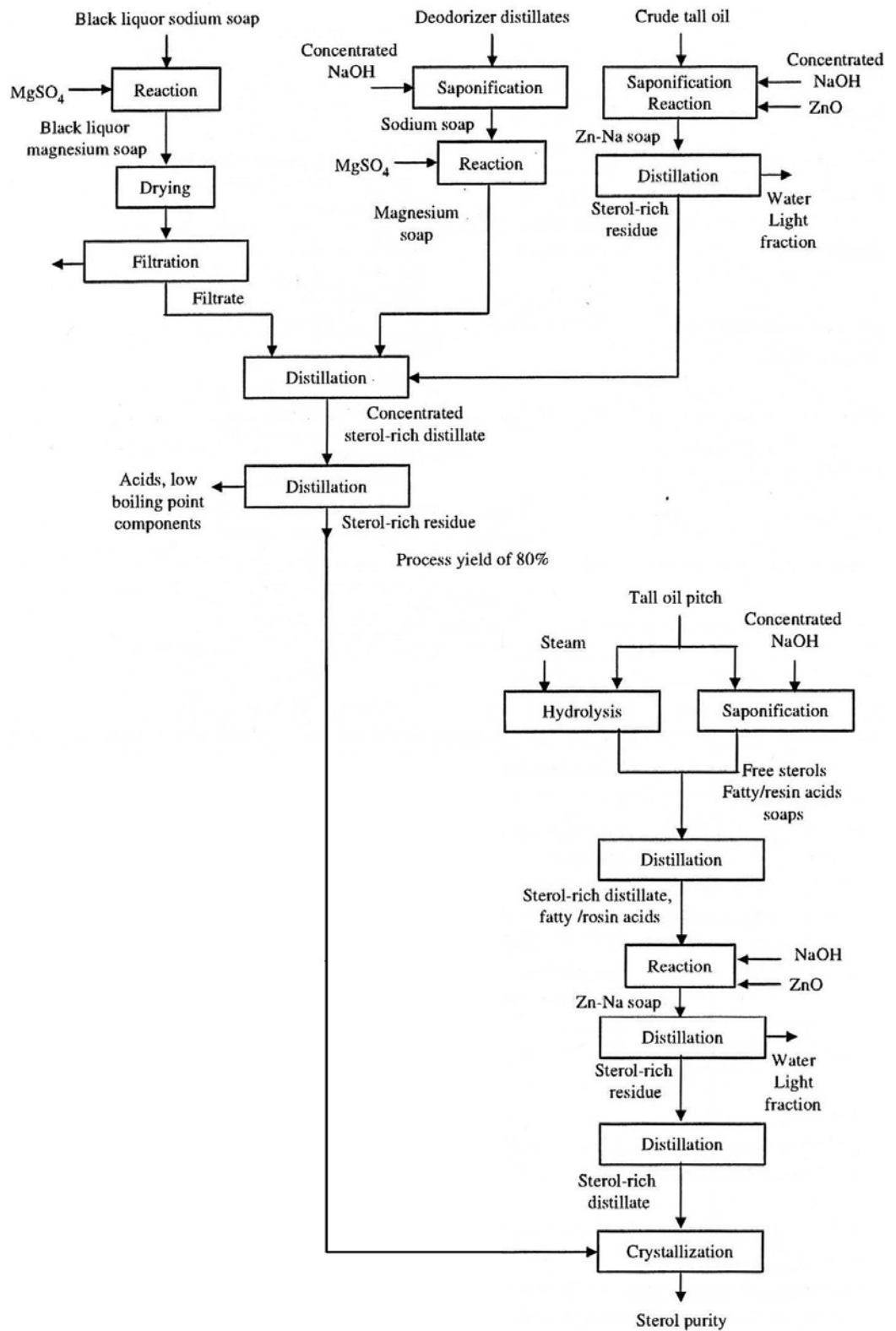
Mustalipeän natriumsaippua, joka oli myös Kaukaan kemiallisella tehtaalla tärkeä vaihe steroleiden tuotannossa, tunnetaan myös nimellä mäntysaippua. Saippua reagoi mineraalihapon ($MgSO_4$) kanssa, jolloin syntyy mustalipeän magnesiumsaippuaa. Kuivaamalla tätä seosta ja suodattamalla saadaan erotettua kiinteä ja nestemäinen aines. Suodos johdetaan tästä ensimmäiseen yhteistislaukseen, johon myös liittyy kasviöljyn jalostuksesta ja raakamäntyöljyprosessista saatava runsaasti steroleita sisältävä seos.

Raakamäntyöljy johdetaan reaktoriin, jossa se saippuoituu metallisaippuaksi (Zn-Na-saippua) ja saippuoitumattomiksi yhdisteiksi. Reaktorissa raakamäntyöljyn sekaan liitetään natriumhydroksidia ja metallisaippuan muodostusta edesauttavia yhdisteitä (sinkkioksidia). Tämän jälkeen seos, joka sisältää metallisaippuat ja saippuoitumattomat yhdisteet johdetaan tislaukseen, jossa ne erotetaan toisistaan. Saatava tisle sisältää saippuoitumattomat yhdisteet ja jäännös sisältää metallisaip-

puan. Tisle johdetaan poistoon ja sterolirikas jäännös johdetaan yhteistislaukseen, josta saadaan väkevöityä runsaasti steroleita sisältävää tislettä. Nämä kolmesta eri raaka-ainelähteestä saadut sterolitisleet johdetaan toiseen tislaukseen, jossa poistetaan tisleenä rasvahapot ja alhaisen kiehumispisteen omaavat yhdisteet alipainetta käyttäen. Alipainetislauksen avulla materiaalin määrä saataisiin jopa puolitettua. Näin sterolien talteenottomenetelmiä saadaan yksinkertaistettua, kun hajunpoistosta saatavan tisleen happojen massaprosenttiosuus on alhainen ja sterolien korkea. Jäännöksenä saatu runsaasti steroleita sisältävä seos, joka on prosessisaannosta noin 80 %, johdetaan kiteytykseen, johon johdetaan myös mäntypiestä saatu steroliseos.

Mäntypiestä saatavien sterolien talteenotto prosessi tapahtuu lähes samalla tavalla kuin raakamäntyöljystä saatavien sterolien talteenotto. Koska steroleita löydetään osittain raaka-ainemateriaalista esterimuodossa, on prosessin sisältämät steroliesterit hydrolysoitu vapaiksi saippuoitumattomiksi steroleiksi. Esikäsittely, joka sisältää steroliesterin hydrolyysin, voidaan suorittaa liittämällä steroliesteriä sisältävä materiaali veteen paineen (1,5–50 MPa) sekä korkean lämpötilan (200–260 °C) alaiseksi. Esikäsittely voidaan suorittaa myös liittämällä steroliesterimateriaalia natrium- tai kaliumhydroksidiin (saponification) lämpötilan ollessa 90–120 °C, sekoittaen ja lopuksi lisäten painetta. Näistä vaiheista saadut vapaat sterolit ja rasva- tai hartsihapposaippuat johdetaan seuraavana tislaukseen, josta saadaan runsaasti steroleita sisältävää tislettä ja rasva- tai hartsihappoja.

Jäännöksenä saatu saippua reagoi natriumhydroksidin ja sinkkioksidin kanssa muodostaen metallisaippuaa, kuten edellisessä kappaleessa (raakamäntyöljy). Tämän jälkeen seos tislataan kahdesti. Ensimmäisellä tislauksella saadaan poistettua veden lisäksi rasva- ja hartsihapot tisleenä ja steroleita sisältävä jäännös johdetaan toiseen tislaukseen. Siitä saatu runsaasti steroleita sisältävä tisle menee kiteytykseen, joka voidaan suorittaa apuna käyttäen hiilivetyjä, kuten lyhytketjuisia alkoholeja (metanoli, isopropanoli, n-pentanoli) tai vettä. (Fernandesin ja Cabralin³)



Kuva 11. Prosessit, joilla saadaan käsiteltyä useita raakamateriaaleja, jotta saadaan lopputuotteeksi steroleita (Fernandes ja Cabral³).

2.3.2 Kasviöljyt

Kasviöljyt, jotka ovat sterolien rikkaimpia luonnonlähteitä, on jalostettava, vaikka raakojen kasviöljyjen sterolipitoisuudet ovat suuremmat kuin jalostettujen (taulukko II). Raakaöljyjä jalostamalla saadaan poistettua epäpuhtaudet, kuten fosfatidit, vahat, vapaat rasvahapot, pigmentit, hapettavat tuotteet, saippuat ja hivenmetallit. (Fernandes ja Cabral³)

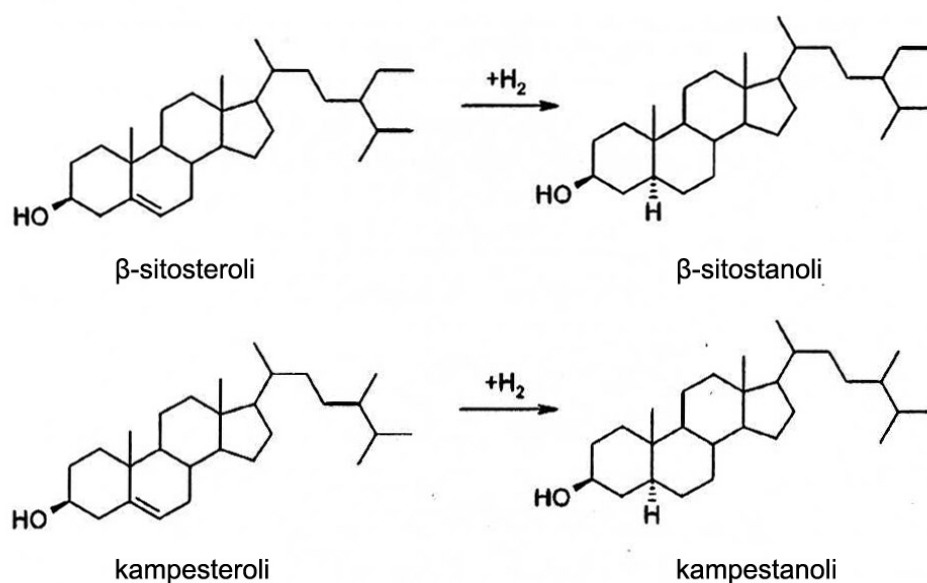
Sterolien erottamisprosessin alkuvaiheet tapahtuvat samalla tavalla kuin rasvahappojen valmistuksessa (kuva 6). Raan kasviöljyn prosessoidusta jalostustavasta (kemiallinen/fysikaalinen) riippumatta, steroleiden poisto, suurimmaksi osaksi vapaan muodon, tapahtuu jalostuksessa hajunpoisto-osiossa (deodorization). Tämä on yleinen ja teollinen tapa saada erotettua steroleita kasviöljyistä.

Hajunpoistosta haihtuva jäännös saadaan poistettua höyrytislauksen avulla korkeassa alipaineessa (1–8 mbar) ja lämpötilassa (180–270 °C). Tislauksen saantona on sivutuote, hajunpoistotisle (deodorizer distillate), joka on runsaasti kasvisteroleita sisältävä seos. Tisle sisältää eniten rasvahappoja ja jonkin verran tokoferoleita (E-vitamiini). Kasviöljyjen lisäksi yleisimmät hajunpoistotisleet ovat ne jotka saadaan maissi-, vehnänalkio- ja soijaöljystä. Tyypillisesti hajunpoistossa syntynyt tisle sisältää painoprosenttiosuksiltaan 30–50 % vapaita rasvahappoja, 5–30 % glyseridejä, 2–15 % vapaita steroleita, 1–8 % tokoferoleita ja 0–5 % steroliestereitä. Soijaöljystä saadun hajunpoistotisleen kasvisterolien määrä voi yltää jopa 18 painoprosenttiin.

Hajunpoistotislettä saippuoidaan aluksi väkevöidyllä natriumhydroksidilla, mikä saa aikaan jäljelle jääneiden rasvahappojen ja niiden estereiden saippuoitumisen. Tämän jälkeen natriumsaippua reagoi lisäävän magnesiumsulfaatin kanssa, jonka seurauksena syntyy magnesiumsaippuaa (metallisaippua). Saippua johdetaan yhteistislaukseen, jossa on saippuan lisäksi puuperäisistä raaka-aineista saatavat runsaasti steroleita sisältävät seokset. Tislauksesta saatu väkevöity runsaasti steroleita sisältävä tisle menee uudelleen tislattavaksi (tokoferolien poisto) ja siitä kiteytykseen, kuten aikaisemmin on mainittu. Kiteytyksestä saadaan steroleita, joiden puhtauspitoisuus vaihtelee menetelmästä riippuen 80–98 %. (Fernandes ja Cabral³)

2.4 Sterolien hydraus

Saksalaisen professori von Bergmannin tutkimusryhmän tekemän tutkimuksen tulos vuonna 1986 oli tärkeä askel sitostanoliesterin tuotannolle. Sen mukaan sitostanoli, joka oli sitosterolin tyydytetty muoto, alensi sitosterolia paremmin seerumin kolesterolia imeytymättä itse verenkiertoon. Stanoleiden pienien pitoisuuksien takia niitä on alettu tuottaa steroleita hydraamalla. Jälkeenpäin on myös huomattu β -sitostanolin eduksi niiden olevan hapettumattomia, kun taas β -sitosteroli voi hapettua haitallisiksi steroidiyhdisteiksi, kuten esimerkiksi 7-sitosteroliksi. (Miettinen *et al.*², Clifton¹⁹)



Kuva 12. β -sitosterolin ja kampesterolin hydraus vastaaviksi stanolimuuodoiksi (Paatero *et al.*²⁰).

Lappeenrannan Kaukaan kemiallisella tehtaalla steroleita oli saatu sellutuotannosta jo vuodesta 1980. Professori Tatu Miettisen yhteistyön avulla ja professori von Bergmannin tutkimuksen innoittamana saatiin Raisio Margariini mukaan yhteistyöhön, jossa alettiin tuottaa sitosterolista sitostanoleita ja stanoliestereitä, jotka olivat rasvaliukoisempia ja täten sopivat myös rypsiöljypohjaiseen margariiniin paremmin alentamaan kolesterolia. (Miettinen *et al.*²)

Kuitenkin tehokasta tuotantoa, jolla saataisiin steroleita hydrattua stanoleiksi, ei ollut selvillä. Kaukaan tehdas otti tämän takia yhteyttä professori Erkki Paateron

tutkimusryhmään LTKK:ssa (Lappeenrannan teknillinen korkeakoulu, nykyään Lappeenrannan teknillinen yliopisto, LUT), joka suunnitteli tuotantoprosessin sitostanolin valmistukseen. Paateron luotsaama ryhmä tutki hydrausta, jossa käytettiin jalometallikatalyyttejä. (Miettinen *et al.*²)

Paatero *et al.*²⁰ tutkivat puupohjaisten kasvisterolien, β -sitosterolin ja kampesterolin, hydrausta, jota katalysoitiin polymeerikuituista tukiainetta sisältävällä Pd (palladium) -katalyytillä, jota saatiin turkulaiselta Smoptech Oy:ltä. Tutkimus osoitti, että hydraus toimi hyvin laboratoriomittakaavassa. Metallit eivät uuttautuneet reaktioseokseen eikä mekaaninen sekoitus vahingoittanut kuitukatalyyttiä. Tuloksia, joita saatiin 11 tekijästä, seulottiin osittaistekijäkoemallilla, joka tunnetaan Taguchin L_{12} matriisina. Näitä tekijöitä saatiin β -sitosterolin konversiosta, β -sitostanolin saannosta ja katalyytin rikkiipitoisuudesta.

Tutkimus osoitti, että sekoitusnopeudella ja katalyytin ja sterolin konsentraatiolla on suurin vaikutus konversioon. Vielä mielenkiintoisempi tulos oli vedessä turvonneen katalyytin positiivinen vaikutus konversioon, joka oli huomattavasti korkeampi kuin käytettäessä kuivaa katalyyttiä. Stanolien saantoon eniten vaikuttivat edelläkin mainitut katalyytin ja sterolin konsentraatiot sekä lisäksi lämpötila. Muita vähemmän vaikutusta omaavia tekijöitä olivat esimerkiksi sekoitusnopeus ja paine. Katalyytin rikkiipitoisuutta näyttivät lisäävän korkea veden konsentraatio liuotuksessa ja korkea lämpötila. (Paatero *et al.*¹⁹)

Mäki-Arvelan *et al.*²¹ mukaan myöhemmin on myös tutkittu enemmän erilaisia tukiaineita sisältäviä Pd-katalyyttejä, kuten mikrohuokoisia Pd/C-, polymeerikuiduilla tuettuja Pd- ja joitakin muita Pd-katalyyttejä. Haasteena teollisessa sterolin hydrauksessa on ollut katalyytin deaktivoituminen. Deaktivoitumisen on raportoitu johtuvan esimerkiksi Pd-katalyytin myrkyttymisestä ja sintraantumisesta sekä huokosen tukkeentumisesta ja koksienmuodostumisesta. Lisäksi on muistettava, että sitosterolin molekyyli on suhteellisen iso verrattuna tyypilliseen tukimateriaalista valmistetun katalyytin huokosen kokoon ja siksi, koska Pd sijaitsee mikrohuokosen rakenteen sisällä, se on osittain sterolin luoksepääsemättömissä.

Niinpä Mäki-Arvela *et al.*²¹ tutkivat mikro- ja mesohuokoisesti valmistettujen Pd/C-katalyyttien vaikutusta sterolien hydraukseen. Alkutesteissä käytettiin eri

määriä katalyyttejä, joista pienemmät määrät vaikuttivat merkittävimmin katalyytin deaktivoitumiseen. Tämä osoitti sen, että katalyytti toimii epäpuhtauksia adsorboivana aineena. Ja täten, käytettäessä suuria määriä katalyyttiä, katalyytin aktiivisuus pysyi korkeampana kauemmin. Katalyytin myrkyttymisen ja näin myös sen deaktivoitumisen alkuperänä olivat raakamateriaalissa esiintyvät aineet, fosfori ja rikki. Lisäksi katalyytin ominaispinta-alan huomattiin alenevan silloin, kun katalyytin käyttö aiheutti koksaantumista.

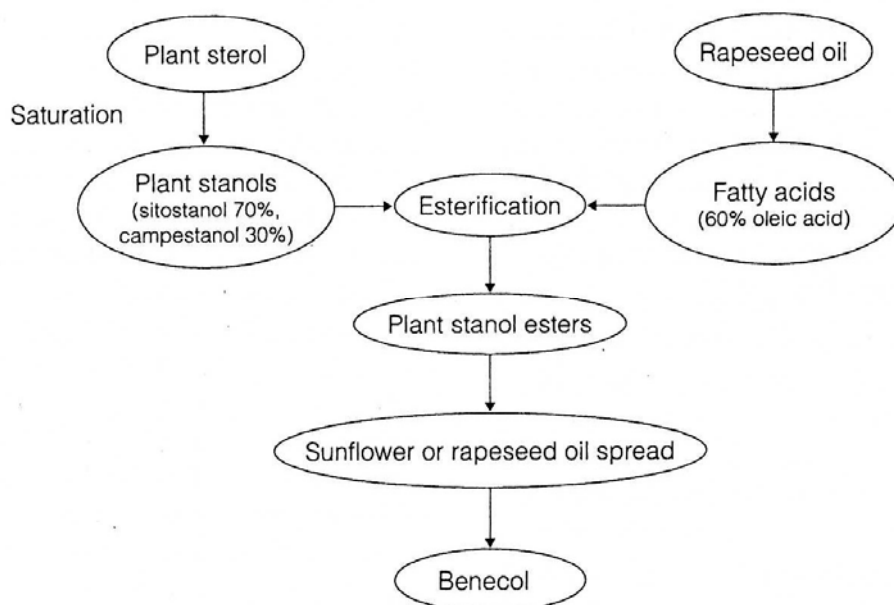
Vertailtaessa mesohuokoista 4-painoprosenttista Pd/C-katalyyttiä (Sibunit) ja mikrohuokoista 5-painoprosenttista Pd/C-katalyyttiä (Aldrich), korkeampi konversio saatiin mesohuokoisen katalyytin pitkän reaktioajan ansiosta, minkä takia mesohuokoinen katalyytti valittiin kineettisiin tutkimuksiin. Vaikka katalyytin deaktivoitumista tapahtuu myös mesohuokoisella katalyytillä, saatiin sen aktiivisuus pidettyä suhteellisen korkealla suuremman huokoskoon ansiosta. Kun katalyytin deaktivoituminen oli erittäin merkittävää, katalyytin teho laski sitosterolin konversion noustessa.

Tutkimuksessa testattiin myös lämpötilan ja sitosterolin alkukonsentraation vaikutusta sitosterolin hydruuksessa käytettäessä 4-painoprosenttista Pd/C-katalyyttiä (Sibunit). Reaktio näytti etenevän nopeammin korkeammalla sitosterolin alkukonsentraatiolla säätäen samalla reaktion kertalukua positiiviseksi. Hydruusmäärä kasvoi odotetusti, kun nostettiin lämpötilaa. Deaktivoituminen oli merkittävämpää 80 °C:ssa kuin 70 °C:ssa, joten lämpötilan nousu lisäsi vastaavasti myös deaktivoitumista. (Mäki-Arvela *et al.*²¹)

3 Esteröintiprosessit

Kasvisterolien ja -stanolien niukan liukoisuuden ja fyysisten reaktiivisuuksien takia niitä tarvitaan margariiniin suuria määriä alentamaan kolesterolia. Luomalla liukoisempi kasvisteroli/-stanolituote saadaan pienillä määrillä sama tulos tehokkaammin. Valmistamalla steroli- ja stanoliestereitä saatiin ratkaistua tämä liukoisuusongelma. Steroli- ja stanolilähteenä toimivat yleensä soijaöljyt ja puusta peräisin saatavat mäntyöljyt. Rasvahappolähteenä toimii vastaavasti rypsiöljy, josta 60 % on öljyhappoa, jota käytetään tavallisesti esteröinnissä. Mutta on myös muita kasviöljyjä, joita on mahdollista käyttää rasvahappolähteinä. Kuvassa 14 on

esitetty yksinkertaiset Benecol-margariinin tuotannon pääaskeleet, joissa tuotetut stanoliesterit liitetään margariiniin, joka on valmistettu auringonkukansiemenien öljystä tai rypsiöljystä. (Thompson & Grundy⁶, Torres *et al.*²²)



Kuva 13. Raisio Yhtymän patentoima esteröintiprosessi kolesterolia alentavan margariinin valmistukseen (Thompson ja Grundy⁶).

Tavallisesti sterolien, stanolien tai sterodien rasvahappoesterit valmistetaan vastaavanlaisten steroliyhdisteiden kemiallisella esteröinnillä rasvahappojen kanssa, vaihtoesteröinnillä rasvahappometyyliesterin kanssa tai reagoimalla rasvahappohalogenidien tai -anhydridien kanssa. Entsymaattiset menetelmät steroliestereitä valmistettaessa vaativat monesti orgaanisia liuottimia ja molekyyliuuloja tai muita kuivausaineita. (Torres *et al.*²²)

3.1 Entsymaattiset menetelmät

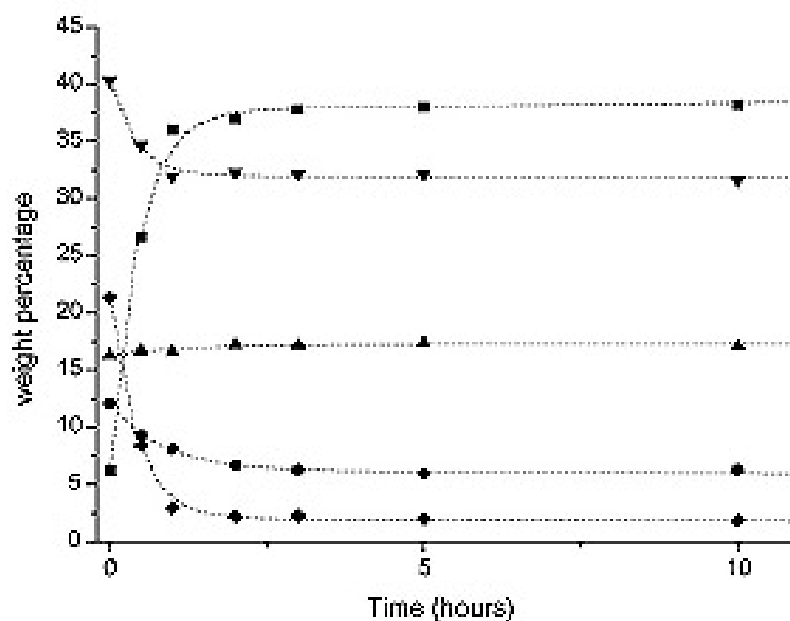
Torresin *et al.*²² mukaan tutkimuksia, joissa esteröintiprosessissa on käytetty entsyymaattisia reaktioita, on tehty viime vuosina. Tutkimuksissa on käytetty ruskomädän sisältämiä entsyymiä (*Pseudomonas*), *Candida rugosa* tai *Burkholderia cepacia* entsyymiä. Sterolien rasvahappoestereiden valmistuksessa on käytetty monivaiheisia menetelmiä, joissa steroliesterien muodostuksen ansiosta saadaan hyviä konversionopeuksia. Suuren mittakaavan tuotannossa monivaiheiset mene-

telmät kuitenkin hankaloittavat lopullista tuotteen puhdistusta, ellei prosessissa käytetä ylikriittisiä fluideja. Steroli- ja stanoliestereitä voidaan saada suuria määriä valmistamalla niitä alipaineessa, käyttäen kohtuullista lämpötilaa ja kiinnitettyä entsyymiä. Tämä alipaineessa suoritettava esteröinti ei vaadi orgaanista liuotinta, vettä eikä kuivausaineina käytettäviä molekyylliseuloja osakseen.

Soijaöljyn jalostuksesta saatava hajunpoistotisle, josta saadaan steroleita ja tokoferoleita, on osoittautunut tärkeäksi sterolilähteeksi esteröintiprosesseja ajatellen. Tisleen sisältämät sterolit saadaan muutettua rasvahappoestereiksi ja asyyloglyserolit hydrolysoitua, kun entsyymireaktioita sovelletaan puhdistettaessa tokoferoleita ja steroleita. Lyhyen tien tislauksella saadaan erotettua tokoferolit ja sterolierit toisistaan hajunpoistotisleestä. Tätä prosessia hankaloittaa vapaiden rasvahappojen ja tokoferolien tehoton erottuminen toisistaan, koska näiden aineiden kiehumispisteet ovat lähellä toisiaan. Ongelma voidaan korjata muuttamalla vapaat rasvahapot niiden metyyliestereiksi.

Samanaikaista sterolien entsyymikatalysoitua ja etyylin esteröintiä voidaan säädellä veden konsentraatiolla. Näiden esteröintien tasapainoa ei ole aina helppo saavuttaa, johtuen läsnäolevan veden määrästä. Tämä takia on hyvä erottaa nämä kaksi esteröintivaihetta toisistaan. Erotus voidaan suorittaa kaksivaiheisella entsyymaattisella reaktiomenetelmällä käyttämällä *C. rugosa* ja *Candida antarctica* entsyymejä.

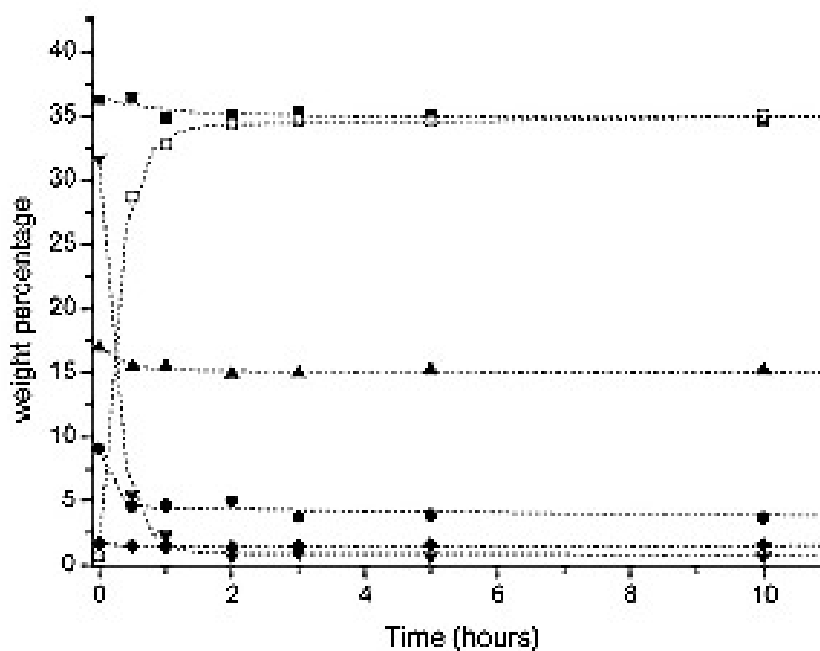
Ensimmäisessä vaiheessa, jossa valmistetaan steroliestereitä, öljyhapolla muunneltu soijaöljystä saatu hajunpoistotisle sekoitetaan 10-painoprosenttisen *C. rugosa* entsyymin kanssa. Seoksen annetaan hautoa sekoituksen (200 rpm) ja lämpötilan (35 °C) alaisena noin 24 tuntia. Soijaöljyn hajunpoisto tisleeseen lisätään öljyhappoa alentamaan tisleen sulamispistettä. Kuvassa 14 on esitetty steroliesterien muodostus ensimmäisessä vaiheessa massaprosenttina ajan funktiona. (Torres et al.²²)



Kuva 14. Steroliesterien muodostus ensimmäisen vaiheen entsymaattisessa reaktiossa. Olosuhteet: 10 g öljyhapolla muunneltua tisleettä, 1 g *C. rugosa* entsyymiä, 35 °C ja 200 rpm. (■) Steroliesterit, (●) asyyli-glyserolit, (▲) tokoferolit, (▼) vapaat rasvahapot, (◆) sterolit (Torres et al.²²).

Kuvasta 14 huomataan, että jo viidessä tunnissa enemmän kuin 90 % steroleista on muuttunut vastaaviksi steroliestereiksi. Lisäksi tokoferolien määrä pysyi samana koko 24 tunnin kestäväen reaktion aikana. Tämä osoittaa, että tokoferolien haptumisen 35 °C:ssa voidaan olettaa olevan lähes merkityksetöntä. Asyyli-glyserolin määrä laski 12 painoprosentista 5:een. Nämä tulokset osoittavat, että *C. rugosa* entsyymi katalysoi sekä vapaiden rasvahappojen esteröintiä että asyyli-glyserolin vaihtoesteröintiä steroleiden kanssa muodostaen steroliestereitä. Tämä esteröinti-prosessi ei vaadi lainkaan vettä reaktioseoksiin eikä myöskään alipainetta.

Toisessa vaiheessa jäljelle jääneet vapaat rasvahapot ja asyyli-glyserolit esteröidään keskenään muodostaen etyyliestereitä. Öljyhapolla muunneltua soijaöljyn hajunpoistotisleettä sekoitetaan 10-painoprosenttisen etanolin, 5-painoprosenttisen *C. antarctica* entyymiin ja 8-painoprosenttisen heksadekaanin kanssa samoissa olosuhteissa kuin ensimmäisessä vaiheessa ja yhtä kauan. Kuvassa 15 on esitetty toisessa vaiheessa muodostuvien etyyliesterien muodostus massaprosenttina ajan funktiona.



Kuva 15. Entsymaattisesti katalysoitu etyylien esteröinti vapaiden rasvahappojen kanssa, jotka saadaan tuoteseoksesta steroleiden esteröinnin (ensimmäisen vaiheen) jälkeen. Olosuhteet: 10 g tuoteseosta, 1 g etanolia, 0,5 g *C. antarctica* entsyymiä, 35 °C ja 200 rpm. (■) Steroliesterit, (●) asyyliglyserolit, (▲) tokoferolit, (▼) vapaat rasvahapot, (◆) sterolit, (□) rasvahappojen etyyliesterit (Torres et al.²²).

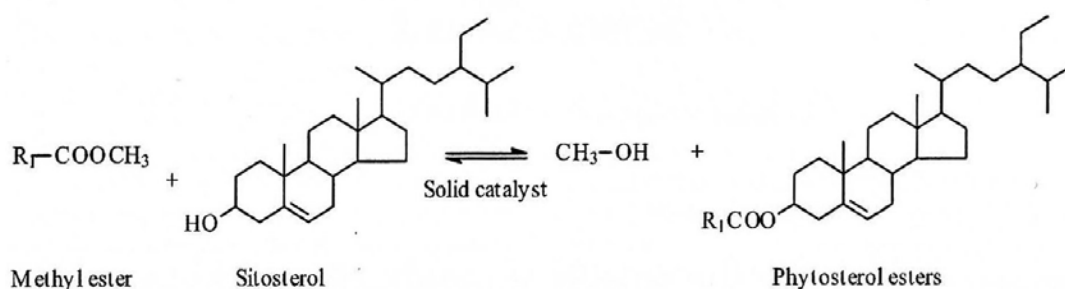
Tarkastellessa ylläolevaa kuvaa voidaan huomata, etteivät steroliesterien eivätkä sterolien massaprosenttiosuudet muutu etyylien esteröintireaktion kulkiessa eteenpäin. Rasvahappojen etyyliesterit muodostuvat lähes kokonaan reaktion ollessa 2 tunnin kohdalla. On huomattava myös asyyliglyserolin prosenttiosuuden pieni lasku reaktion kulkiessa, joka johtuu esteröinnin ohella tapahtuvasta osittaisesta vaihtoesteröinnistä.

Torresin *et al.*²² tutkimus on osoittanut, että steroliestereiden, tokoferoleiden ja rasvahapon etyyliestereiden saanti ja selektiivisyys ovat hyviä käytettäessä biokatalyyttiä apuna niiden valmistuksessa. Lopullinen tuoteseos aiotaan käyttää steroliestereiden, tokoferoleiden ja rasvahappojen etyyliestereiden puhdistukseen yli-kriittisen fluidin vastavirtauutun avulla.

3.2 Kiinteät emäskatalyyttimenetelmät

Lukuisia kemiallisissa reaktioissa käytettäviä homogeenisia katalyyttejä ovat muun muassa vahvat mineraalit, orgaaniset emäkset (esim. KOH, NaOEt). Näiden katalyyttien syövyttävä luonne ja hankala erottaminen reaktioväliaineesta tekevät niistä epäsoivia ympäristöystävällisiin katalyyttisiin prosesseihin. Lisäksi vahvat emäkset voivat edesauttaa sivutuotteiden muodostumisia, joita syntyy vedenpoiston, polymeroinnin, hapettumisen ja muiden sivureaktioiden takia. Sivutuotteiden muodostuminen laskee haluttujen tuotteiden välisiä selektiivisyyksiä, jolloin ne on vaikea erottaa toisistaan. Esimerkiksi käytettäessä kiinteitä emäskatalyyttejä vaihtoesteröinnissä, saadaan vältettyä edellä mainitut hankaluudet, koska ne voidaan yksinkertaisen suodatuksen jälkeen ottaa talteen ja käyttää helposti uudelleen. (Valange *et al.*²³)

Emäksisiä kiinteitä katalyyttejä, kuten magnesium- ja sinkkioksidia, voidaan käyttää kasvisterolien vaihtoesteröinnissä rasvahapon metyyliesterin kanssa ilman liuotinta (kuva 16). Näin voidaan saada steroliesterien saannoksi yli 75 % huolimatta suurista happopaikkojen määristä, jotka esiintyvät vahvojen emäspaikkojen kanssa magnesiumoksidissa ja aiheuttavat sivureaktiona vedenpoiston, jonka seurauksena muodostuu stigmastadineja.



Kuva 16. Sterolien reagoissa rasvahappometyyliesterien (R₁-COOCH₃) kanssa kiinteätä katalyyttin läsnäollessa, tuotteena saadaan steroliestereitä ja metanolia (Valange *et al.*²³).

Valange *et al.*²³ tutkivat sitosteroliesterien synteesiä vaihtoesteröimällä rasvahapon metyyliesterit β-sitosterolin kanssa käyttäen kiinteätä katalyyttiä, lantaanioksidia (La₂O₃) apuna reaktiossa. Verrattuna magnesium- ja sinkkioksidin emäksiset oksidit osoittautuivat erittäin aktiivisiksi ja selektiivisiksi katalyyteiksi tuotet-

taessa steroliestereitä. Kilpailu sterolin vaihtoesteröinti-reaktion ja vedenpoiston sivureaktion välillä estettiin täysin ja steroliesterin selektiivisyydeksi saatiin 90–96 %. Korkeat konversio- ja selektiivisyysarvot johtivat myös steroliesterien saannon kasvuun (≥ 83 %).

Lantaanioksidin happo-emäsominaisuuksia on tutkittu infrapunaspektroskopiolla, joka on paljastanut kaikkien kiintoaineiden sisältävän karbonaattilajien jäännöksiä. Lantaanioksidi ei siedä pieniäkään määriä CO₂:a, mikä helposti johtaa katalyytin osittaiseen pinnan karbonointiin. Tämä paljastuu propyyenin kiinnittymisenä lantaanioksidin pintaan. Steroliesterien selektiivisyyden kasvun on huomattu olevan korrelaatiossa happo-emäsominaisuuksiin. Mitä alhaisempi karbonaatin emäksisyys, sitä korkeampi kasvisteroliesterien saanto. (Valange *et al.*²³)

4 Käyttö

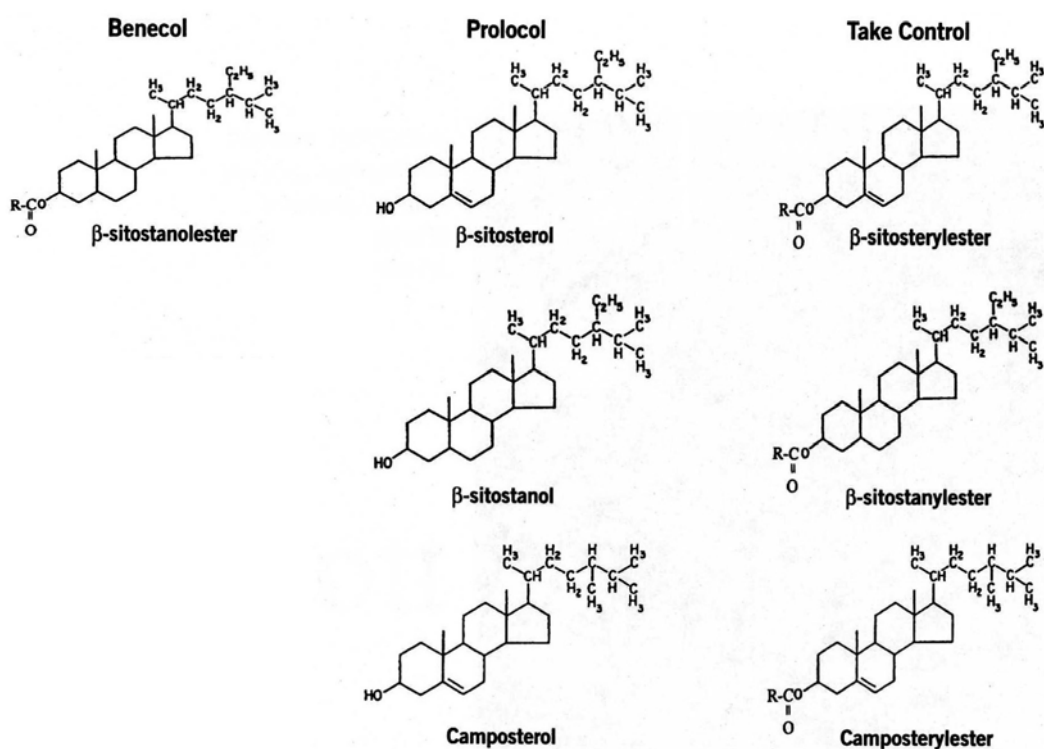
Sterolit, stanolit ja niiden rasvahappoesterit ovat levinneet hyvää vauhtia markkinoille. Terveysvaikutteisia margariineja, jogurtteja, mehuja ja välipalapatukoita on tarjoilla jo lähes jokaisen elintarvikekaupan hyllyllä. Kasvisteroleita voidaan käyttää elintarvikkeiden lisäksi myös lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa. (Riistama *et al.*¹⁵)

Lääketeollisuudessa sterolit toimivat hyvinä lääkkeenkantajina vereen ja niillä on myös merkittäviä biologisia vaikutuksia organismeissa. Sterolien samankaltainen rakenne kolesterolin kanssa saattaa olla yksi syy, miksi epäetoksylaattisilla sterooleilla on erittäin hyvä parannusvaikutus vahingoittuneeseen ihoon. Sterolit ovat myös auttaneet auringon polttamaan ja vaippaihottumaihoon parantamalla ihon jätneyttä. (Folmer⁷)

Kosmetiikkateollisuudessa trendinä on käyttää raaka-aineena mahdollisimman paljon aineita, joita saadaan luonnosta. Sterolien käyttö kosmetiikoissa onkin lisääntynyt. Sterolien hyvät ihotauteihin vaikuttavat ominaisuudet (etoksylaatti) ovat nostaneet sen yhdeksi ehdokkaaksi uusiin kosmetiikkasovelluksiin. Koska sterolietoksylaatit ovat hyviä emulgaattoreita, niitä käytetään jo monissa kosmetiikkatuotteissa, kuten kosteusvoiteissa, huulipunissa, shampoissa ja hiustenhuuh-

teluaineissa. Hiustuotteisiin lisättyinä ne parantavat hiusten kuntoa, helpottavat kuivien hiusten harjattavuutta ja poistavat hiusten sähköisyyttä. (Folmer⁷)

Terveysvaikutteiset margariinit, jotka sisältävät stanoli- ja steroliestereitä, tulivat markkinoille Suomessa vuonna 1995, jonka jälkeen ne levisivät muualla maailmassakin. Tunnetuimmat kolesterolia alentavat margariinit maailmalla ovat Benecol, Prolocol, Take Control ja Becel ProActive, joista kolmen ensimmäisen margariinin sisältämät steroli- ja stanoliyhdisteet on esitetty kuvassa 17. (Saxén²⁴)



Kuva 17. Terveysvaikutteiset margariinit ja niiden sisältämät sterolit, stanolit ja niiden esterit (Saxén²⁴).

Suomessa valmistettava Raision kehittämä Benecol sisältää pelkästään β-sitostanoliesteriä. Ruotsissa valmistettava Prolocol ei sisällä laisinkaan estereitä vaan pelkkiä steroleita ja stanoleita. Pohjois-Amerikassa valmistettava Unileverin Take Control -margariini sisältää β-sitostanoliesterin lisäksi β-sitosteroli- ja kampesteroliesteriä. Näistä Benecolin ja Take Controlin sisältämät esterit saadaan soijaöljyperäisistä steroleista mutta Benecol käyttää soijaöljyn lisäksi mäntyöljystä saatavia steroleita. (Saxén²⁴)

Thompsonin ja Grundyn⁶ mukaan puuperäiset stanoliesterit ovat kolesterolin alentajana tehokkaampia kuin kasviöljyistä saadut stanoliesterit. Tutkimuksessa puuperäiset stanoliesterit saatiin mäntyöljystä ja kasviperäiset stanoliesterit soijaöljystä. Kolmen eri kokeen antamien tulosten perusteella huomattiin, ettei näillä kahdella eri öljylähteellä valmistettujen esterien vaikutuksella kolesteroliin ole merkittävää eroa toisiinsa nähden. Samojen kolesterolia alentavien vaikutusten takia stanoliesterit voidaan valmistaa käyttäen joko mäntyöljyperäisiä tai soijaöljyperäisiä steroleita riippuen niiden hinnasta ja saatavuudesta. Kahden eri sterolieriseosta sisältävän margariinin eroavaisuudet on esitetty seuraavassa taulukossa (taulukko IV). Margariinien sterolilähteinä on käytetty rypsi- ja mäntyöljyä.

Taulukko IV. Margariinien pitoisuudet eri sterolilähteistä valmistettaessa (Heggen *et al.*²⁵).

	Margariinissa käytettyjen sterolien lähde	
	Rypsiöljy	Mäntyöljy
Energia (kJ/g)	13	13
Rasvasta saatu energiamäärä (%)	35	35
Kasvisteroleita (g/100 g)	8	8
Kasvisterolit (%):		
β-sitosteroli	51	76
Sitostanoli	0,4	10,1
Kampesteroli	34	10
Kampestanoli	0,3	1,1
Stigmasteroli	1,4	0,4
Brassikasteroli	8,7	0,4
Muut sterolit	4,1	2,4

Taulukon IV perusteella voidaan todeta sama mikä aikaisemminkin, eli kolesterolin vaikutukseen ei vaikuta merkittävästi steroli- tai stanoliesterien valmistukseen käytettyjen sterolien lähteet.

5 Yhteenveto ja johtopäätökset

Sterolien ja rasvahappojen valmistuksessa käytettävät raaka-aineet saadaan pääosin mänty-, soija- ja rypsiöljystä. Suomen tärkein luonnonvara on edelleen puu, vaikka metsäyhtiöt ovat laman takia joutuneet vähentämään toimintaansa. Puusta peräisin saatavat mäntyöljyt ja niiden raaka-aineet ovat erinomaisia sterolilähteitä, joita tullaan valmistamaan Suomessa varmasti vielä pitkään tulevaisuudessakin. Sterolien raaka-aineista soijaa on jouduttu jo geenimanipuloimaan, koska sitä käytetään todella paljon elintarviketeollisuudessa.

Ympäri maailmaa tehdään varmasti parastaikaa uusia tutkimuksia, joiden avulla halutaan löytää kannattavimmat ja tehokkaimmat menetelmät, joilla saadaan tuotettua steroleita kasviöljyjen jätteistä ja selluprosesseista. Prosessien tavoitteena on saada tulokseksi puhtaita kiteitä väkevistä sterolilietteistä samalla tavoitellen korkeaa saantoa. Suurin osa menetelmistä, joilla tuotetaan tärkeitä steroleita ja rasvahappoja, sisältävät perinteisiä erotusprosesseja, kuten uuttamisen liuottimilla, tislauksen, haihduttavan jakotislauksen, saippuoinnin ja kemiallisen vaihtoesteröinnin. Uusien innovaatioiden löytäminen voisi ratkaista joitakin prosesseihin liittyviä ongelmia.

Stanoleita tuotettaessa Pd-katalyytit ovat osoittautuneet erinomaisiksi reaktioapuvälineiksi, koska ne eivät uuttautuneet reaktioseokseen eivätkä vahingoittuneet sekoituksen läsnäollessa. Stanoleiden muodostumista edesauttaa katalyytin turpoaminen vedessä. Tulevaisuudessa vastaavanlaisia siirtymämetalleja voitaisiin tutkia edistämään stanoleiden muodostumista.

Stanoli- ja steroliestereitä tuotettaessa kaksivaiheisella entsyymaattisella reaktio- menetelmällä käyttäen biokatalyyttejä, *C. rugosa* ja *Candida antarctica* entsyymiä, saadaan saannoltaan lähes 90 % steroliestereitä. Myös kiinteitä emäskatalyyttejä (Li_2O_3 , MgO, ZnO) käyttämällä sterolien/stanolien ja rasvahappojen metyyliesterien vaihtoesteröinnissä saadaan paljon steroli- tai stanoliestereitä, joiden saannot kohoavat yli 80 %:n.

Tulevaisuudessa kolesterolia alentavia steroli- ja stanoliestereitä tullaan soveltamaan erilaisiin funktionaalisiin ruokiin, jotta saadaan vähennettyä paremmin sydän- ja verisuonitauteihin kuolevien uhrien määrää. Tämä taas tuo lisähaasteita sterolien, stanolien ja niiden esterien valmistusprosesseihin, joita ennestään voivat hankaloittaa raaka-aineiden puute ja asiakkaiden tiukat vaatimukset raaka-aineiden lähteiden suhteen.

Lähteet

1. World Health Organisation,
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>,
25.9.2009.
2. Miettinen R., Lehenkari J., Hasu M., Hyvänen J., *Osaaminen ja uuden luominen innovaatioverkoissa*, Puuta leivän päälle – Benecol-margariini kansallisena innovaationa, Vantaa, 1999, s. 145–165.
3. Fernandes P., Cabral J.M.S., Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresources Technology* **98**(2007), 2335–2350.
4. Piironen, V., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A.M., Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(2000), 939–966.
5. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Edition, Vol. A10, Fatty acids, Weinheim, 1987, s. 245–275.
6. Thompson G.R., Grundy S.M., History and development of plant sterol and stanol ester for cholesterol-lowering purposes, *The American Journal of Cardiology* **96**(2005), 1A, 3D–9D.
7. Folmer B.M., Sterol surfactants: from synthesis to applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **103**(2003), 99–119.
8. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Edition, Vol. A10, Fats and Fatty Oils, Weinheim, 1987, s. 173–243.
9. Integrated Supplements,
http://www.integratedsupplements.com/intsup/intsup0002.newsletter200711_11/2007.
10. Pioch D., Larguèze C., Graille J., Ajana H., Rouviere J., Towards an efficient membrane based vegetable oils refining. *Industrial Crops and Products* **7**(1998), 83–89.
11. Lin L., Rhee K.C., Koseoglu S.S., Bench-scale membrane degumming of grude vegetable oil: Process optimization. *Journal of Membrane Science* **134**(1997), 101–108.
12. Pandey R.A., Sanyal P.B., Chattopadhyay N., Kaul S.N., Treatment and reuse of wastes of vegetable oil refinery. *Resources, Conservation and Recycling* **37**(2003), 101–117.
13. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th Edition, Vol 15, Lecithin, John Wiley & Sons, New York, 1995, s. 192–198.

14. Kullas E., Terveudeksi! Steroli- ja stanolitehtaat nousevat. *Talouselämää* **11**(2005), 18.
15. Riistama K., Laitinen J., Vuori M., *Suomen kemianteollisuus*, Tampere, 2003, s. 135–142.
16. Etelä-Saimaa,
http://www.esaimaa.fi/page.php?page_id=8&news_id=200612342541,
19.9.2006.
17. Kauppalehti,
<http://www.kauppalehti.fi/5/i/talous/uutiset/avoinarkisto/index.jsp?xid=2115457&date=2006/11/08>, 8.11.2006.
18. Kaupunkilehti Uusi Rauma,
<http://www.ur.fi/artikkeli.phtml?id=19904&UrSession=xbzqgkxgctbnofk>,
10.1.2007.
19. Clifton P., Plant sterols and stanols—comparison and contrast. Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: is there a difference?. *Atherosclerosis Supplements* **3**(2002), 5-9.
20. Paatero E., Helminen J., Hotanen U., Hydrogenation of Plant Sterols over a Polymer Fiber-Supported Pd Catalyst. *Organic Process Research & Development* **10**(2006), 1, 51–63.
21. Mäki-Arvela P., Martin G., Simakova I., Tokarev A., Wärnå J., Hemming J., Holmbom B., Salmi T., Murzin D.Y., Kinetics, catalyst deactivation and modeling in the hydrogenation of β -sitosterol to β -sitostanol over microporous and mesoporous carbon supported Pd catalysts. *Chemical Engineering Journal* (2009), 1–7.
22. Torres C.F., Torrelo G., Señorans F.J., Reglero G., A two steps enzymatic procedure to obtain sterol esters, tocopherols and fatty acid ethyl esters from soybean oil deodorizer distillate. *Process Biochemistry* **42**(2007), 1335–1341.
23. Valange S., Beauchaud A., Barrault J., Gabelica Z., Daturi M., Can F., Lanthanum oxides for the selective synthesis of phytosterol esters: Correlation between catalytic and acid-base properties. *Journal of Catalysis* **251**(2007), 113–122.
24. Saxén R., Konsttillskott sänker kolesterol. *Kemivärlden Biotech* **8**(2000), 27–28.
25. Heggen E., Granlund L., Pedersen J.I., Holme I., Ceglarek U., Thierry J., Kirkhus B., Tonstad S., Plant sterol from rapeseed and tall oils: Effects on lipids, fat-soluble vitamins and plant sterol concentrations. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2009), 1–8.