Kandidaatintyö

L-kysteiinin tuotanto rapsista ja sen kaupallinen potentiaali

Lappeenranta 2019

Antti Paarvio

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

LUT School of Engineering Science

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Antti Paarvio

L-KYSTEIININ TUOTANTO RAPSISTA JA SEN KAUPALLINEN POTENTIAALI

Kandidaatintyö
2019

Työn ohjaajat: TkT Maaret Paakkunainen, TkT Satu-Pia Reinikainen

TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

LUT School of Engineering Science

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Antti Paarvio

L-kysteiinin tuotanto rapsista ja sen kaupallinen potentiaali

Kandidaatintyö

2019

89 sivua, 39 kuvaa, 4 taulukkoa, 2 liitettä

Työn ohjaajat: TkT Maaret Paakkunainen, TkT Satu-Pia Reinikainen

Hakusanat: rapsi, rypsi, L-kysteiini, kysteiini, kystiini, entsymaattinen, hydrolyysi, aminohappo, peptidi, alikriittinen, uutto, CAPEX, OPEX, tuotantokustannus, valmistuskustannus

Aminohappojen maailmanmarkkinoilla ei-eläinperäisen L-kysteiinin kysyntä kasvaa 10% vuodessa, mutta sen nykyinen tuotanto bakteerikäymisellä on kallista. Euroopassa ja Suomessa tuotetuimpien rapsin ja rypsin kasviöljyjen erotuksen jälkeen jää jäljelle kahta kolmasosaa vastaava määrä runsaasti L-kysteiiniä sisältävää kasviproteiinia. Työssä tarkasteltiin rapsinsiemenen proteiineja potentiaalisena raaka-aineena L-kysteiinin eristämiseksi niin, että kaikki syntyvät sivuvirrat voitaisiin hyödyntää korkean jalostusasteen tuotteina. Kirjallisuudesta löydettiin lupaavia menetelmiä, jotka ovat ympäristöystävällisiä ja vähän energiaa, vettä tai kemikaaleja kuluttavia; entsymaattinen hydrolyysi ja alikriittinen vesiuutto.

Proteiinien ja peptidien pilkkomismenetelmien parametrien avulla kehitettiin prosessikokonaisuus, jonka teknillistä toimintaa ja taloudellisuutta arvioitiin sopivaa tutkimusta pohjana käyttäen. Laskettujen tulosten perusteella L-kysteiinin erottamisen taloudellisuus riippuu etenkin entsyymien hintatasosta sekä käytettävien erotusprosessien, kuten kalvo- ja geelisuodatuksen tehokkuudesta verrattuna sivutuotteista saataviin tuloihin. L-kysteiinin erottaminen rapsin proteiineista on teknisesti toimiva ja taloudellisesti kannattava tuotantotapa teoreettisen tarkastelun perusteella. Jatkotutkimuksissa kannattaisi keskittyä entsyymeihin, koska niillä voidaan saada suurin L-kysteiinin rikastaminen aikaan, sekä taloudelliseen kannattavuuteen oleellisesti vaikuttavien sivutuotteiden määrät ja laadut selville.

Sisällysluettelo

Symboliluettelo 5
Lyhenneluettelo 7
1 Johdanto 9
2 Kysteiini 11
2.1 Kysteiinistä ja sen merkityksestä 11
2.2 Kysteiinin ja muiden aminohappojen eristämisestä 17
3 Kysteiinirikkaiden kasviraaka-aineiden valinta 21
4 Auringonkukansiemen raaka-aineena 27
5 Rapsinsiemen raaka-aineena 28
5.1 Rapsinsiemenen proteiinien rakenteesta 28
5.2 Rapsin proteiinien fysiokemiallisia ominaisuuksia 30
5.3 Rapsinsiemenen tuotanto ja hintataso 31
5.4 Rapsiöljyn tuotanto ja syntyvät sivutuotteet 34
6 Rapsin proteiinien käsittely 41
6.1 Rapsin proteiini-isolaattien valmistus 41
6.2 Rapsin proteiinien kysteiinien disulfidisiltojen avaaminen 44
6.3 Rapsin ja auringonkukan proteiinien entsymaattinen hydrolyysi 47
7 Alikriittisen ja korkean lämpötilan veden käyttö uutossa 49
7.1 Yleisesti alikriittisestä vesiuutosta 49
7.2 Proteiinien hydrolyysiä alikriittisellä vesiuutolla 51
8 Kysteiinin tuotannon taloudellisuus 54
8.1 Tuotantolaitoksen teknillis-taloudellinen analyysi 54
8.2 L-kysteiinin erotusprosessien sivutuotteita 66
9 Yhteenveto kirjallisuuskatsauksesta 68
10 Yhteenveto ja johtopäätökset 69
11 Lähteet 74
Liitteet 84
Liite I, Kuvat 1 ja 2, Taulukot 1 ja 2 84
Liite II, Kuvat 3-10 88

Symboliluettelo

CEPCI	Chemical Engineering Plant Cost Index [-]
$C_{Cys,x}$	kysteiinin konsentraatio raaka-aineessa [kg/kg]
$C_{in,t}$	nettokassavirta ajanjaksolla t [euroa]
$C_{out,t}$	alkusijoitus ajanjaksolla t [euroa]
D	diffuusiovakio [m^2/s]
f	kitkavakio [-]
h	entalpia [kJ/kg]
kDa	kilodalton [1000 g/mol]
m_{Cys}	kysteiinin vuosituotanto [kg]
M	moolimassa [g/mol]
N_A	Avogadron luku [mol^{-1}]
R	kaasuvakio [1000g m^2 /s^2mol K]
r	ennakkokorko [-]
r_s	radiaalisijainti [m]
S	sedimentaatiovakio [s]
T	lämpötila [K]
u	havaittu makromolekyylin radiaalikiihtyvyys [m/s^2]
v	osittaisominaistilavuus [m^3/kg]
V_{Vesi}	veden tilavuus alikriittisessä reaktorissa [m^3]
W	systeemiin tehty työ [kJ/kg]
$\varepsilon_{lämmönvaihdin}$	alikriittisen vesireaktorin lämmön talteenoton hyötysuhde [-]

ρ	liuoksen tiheys [kg/m^3]
ω	kulmanopeus [rad/s]
$\omega^2 r$	keskipakoisvoimainen kenttä [$rad^2 m/s^2$]

Lyhenneluettelo

AB-	Alfa-Beta-
ADM	Archer Daniels Midland Company
CAPEX	Capital Expenditure (Investointikustannukset)
COL	Cost of labour (Työntekijäkustannukset suorittavalla puolella ja hallinnoinnissa)
CP	Crude protein (Raakaproteiini)
CRM	Cost of raw materials (Kustannukset raaka-aineille)
CUT	Cost of utilities (Juoksevat kulut)
CWT	Cost of waste treatment (Jätteenkäsittelykustannukset)
Cys tai C	Kysteiini, jälkimmäinen peptidiketjuissa
DH	Hydrolyysiaste
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
DT	Desolventizer-toaster (Liuottimenpoistaja-paahdin)
E221	Natriumsulfiitti
E920	Kysteiinin E-koodi
FCI	Fixed cost of investment (Pääomasijoituksen kiinteä kustannus)
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (Kaasukromatografi-massaspektrometri)
GHS	Glutationi
HTW	High Temperature Water
IRR	Internal rate of return (Efektiivinen korko)

KRP	Kysteiini-rikkaat peptidit
KSP	Kysteiiniä sisältämättömät peptidit
Low-GSL	Low-glucosinolate (Matalan glukosinolaatin)
N-, C-	Amino-, carboxyl-terminal (Amino-, karboksyyli-pääteryhmä)
NDICP	Neutral Detergent Insoluble Crude Protein (Neutraaliin pesuliuokseen liukenematon raakaproteiinifraktio)
NPV	Net Present Value (Nettonykyarvo)
OPEX	Operational expenditure (Operatiiviset menot)
pH	Happamuus
PMM	Protein Micellation Method (Proteiinin misellöinti-menetelmä)
PVR	Present Value Ratio (Nykyarvon suhde)
ROI	Return On Investment (Sijoitetun pääoman tuottoaste)
RSC, RK	Rapeseed cake (Rapsinsiemenkakku)
RSM	Rapeseed measurement (Rapsinsiemen-mittausnäyte)
S	Sedimentaatiovakio peptideille ja proteiineille
SCW	Subcritical water (Alikriittinen vesi)
SFA	Sunflower albumins (Auringonkukan albumiinit)
UF-	Ultrafiltteri

1 Johdanto

Elintarvike-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa käytettävän ei-eläinperäisen L-kysteiinin, rikkipitoisen aminohapon, kysyntä kasvaa tällä hetkellä yli 10% vuodessa (Tamba-Berehoiu, et al., 2013) Kysyntää vastaamaan on perustettu uusia bakteerien käymisliuoksista L-kysteiiniä erottavia tuotantolinjoja viime vuosina esimerkiksi Wackerin toimesta Eurooppaan (Bachmair, 2018) ja CJ Shenyangin tehtaalle Kiinaan (CNS Media, 2017). Kysynnän kasvuun vaikuttavat halal- ja kosher-säädökset kasvissyönnin lisäksi, sekä Kiinan tiukentunut ympäristönormien valvonta, joka nostaa halvimman eläinperäisen L-kysteiinin hintaa (CNS Media, 2017).

Hydrolyysi tarkoittaa veden lisäämistä esimerkiksi ketjutettujen aminohappojen väliin niin, että ne erkanevat toisistaan. Voimakkaita alkaleja tai happoja käyttämällä voidaan nopeuttaa huomattavasti veden reaktiota ketjutettujen aminohappojen, kuten peptidien ja proteiinien kanssa. Aminohappojen tuottaminen voimakkailla hapoilla proteiineja hajottamalla ja syntyneistä pilkkoutumistuotteista eristämällä on hyvin vanha tapa. Verrattuna bakteereilla tehtävään käymiseen ja erottamiseen, on proteiinien hapoilla hajottaminen säilynyt taloudellisesti järkevänä pienempien tuotantomäärien aminohapoille (Tonouchi & Ito, 2017) etenkin Kiinassa (Höfer, 2009).

Esimerkiksi suolahapolla tehtävä hydrolyysi on syövyttävä ja matalan kokonaissaannon prosessi, jossa sivutuotteena syntyy paljon vaikeasti hyödynnettävää ja ympäristön kannalta ongelmallista jätettä (Takagi & Ohtsu, 2017). Bakteeriperäinen L-kysteiini on taas huomattavasti kalliimpaa, Euroopassa 150 e/kg (Merck, 2019) ja Kiinassa kolmanneksen tästä. Eläinperäinen L-kysteiini on hinnaltaan noin puolet bakteeriperäisestä Kiinassa tuotettuna, noin 20–30 e/kg (Alibaba, 2019). Korkeat tutkimus-, kehitys- ja alkuinvestointikustannukset nostavat L-kysteiinin hintaa sitä bakteereilla tuotettaessa.

Tämän kirjallisuustyön tavoitteena on löytää uusi tapa yhdistää hyvät puolet happohydrolyysistä ja bakteeriperäisestä käymisestä. Ollakseen sekä ympäristöystävällinen, että taloudellinen, on tuotantoprosessin oltava raaka-aineita ja energiaa säästävä sekä jätteitä mahdollisimman vähän tuottava, kuten ympäristöä säästävän vihreän kemian perusperiaatteisiin kuuluu. Parhaimmillaan kasvikuntaan kuuluvasta proteiinin lähteestä voisi saada pelkän L-kysteiinin erotettua joko hapettuneena dimeerinä, eli kystiininä tai muuten mahdollisimman harvan muun aminohapon kanssa pieninä aminohappojaksoina, peptideinä. Jos muita aminohappoja olisi mahdollisimman vähän L-kysteiinin lisäksi, voitaisiin käyttää paljon vähemmän suolahappoa lopullisen tuotteen saamiseksi. Sivutuotteina syntyvien aminohappojen ja peptidien hyödyntämisen on oltava olennainen osa taloudellista kannattavuutta.

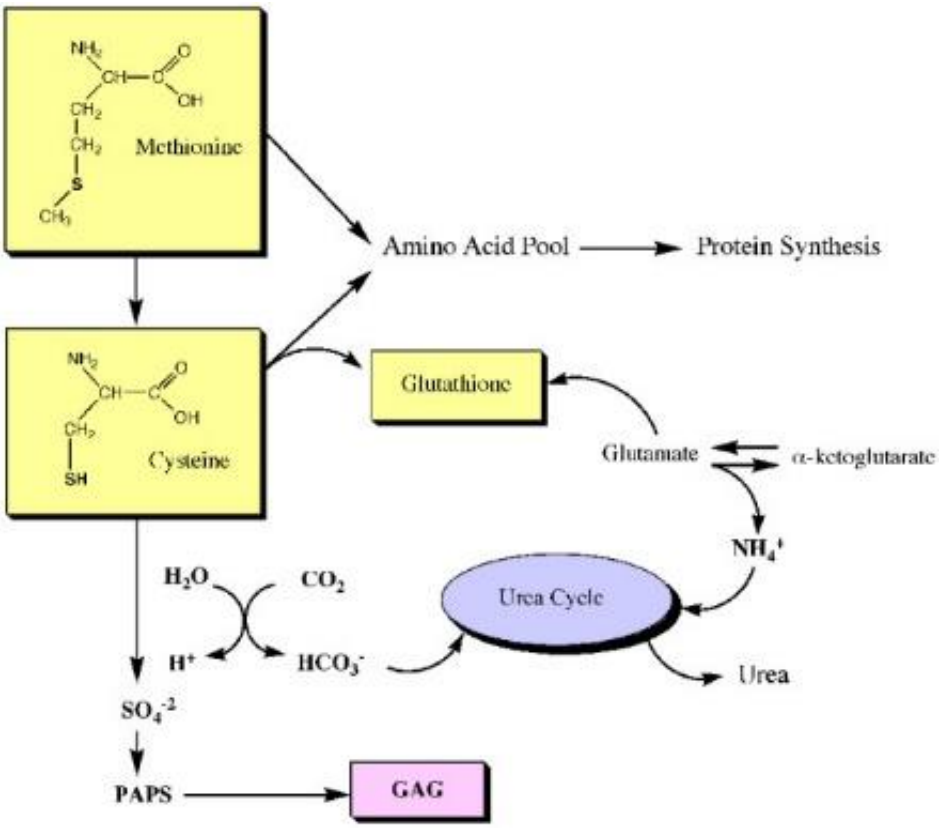
Työssä tutkitaan kysteiiniä ja erilaisia sivuvirtoja, jotka ovat kasviperäisiä ja edullisia. L-kysteiinistä rikkaimpiin kasviperäisiin proteiineihin tutustutaan tarkemmin. Lupaavimmat kirjallisuudesta löydetyt prosessit L-kysteiinin rikastamiseksi ovat entsyymikäsittely ja alikriittinen vesiuutto. Löydettyjä tietoja käytetään L-kysteiinin 100 tonnin vuosituotannon teollisuuslaitoksen suunnittelemiseksi, taloudellisen kannattavuuden laskemiseksi sekä prosessikokonaisuutta esittävän vuokaavion rakentamiseksi. Työn lopussa pohditaan myös muita taloudellisesti mielenkiintoisia tuotteita ja saatujen tuloksien pohjalta etsitään niille käyttökohteita jatkotoimenpiteiden esittämisen lisäksi.

2 Kysteiini

2.1 Kysteiinistä ja sen merkityksestä

Kysteiini on kaupallisesti ja biologisesti tärkeä aminohappo. Monet mikrobit ja kasvit syntetisoivat kysteiiniä ja metioniinia saatavilla olevista epäorgaanisista rikkiyhdisteistä, kuten sulfaatista (SO_4^{2-}), tiosulfaatista ($S_2O_3^{2-}$), sulfiitista (SO_3^{2-}) ja sulfidista (S^{2-}) sekä sitovat nämä osaksi suurempia kokonaisuuksia, peptidejä ja niistä muodostuvia proteiineja. Tämä rikin kemiallinen muuntaminen ja varastointi ylläpitää muita elämänmuotoja maapallolla, mukaan lukien ihmisiä, koska rikin saanti on melkein kokonaan edellä mainituista aminohapoista riippuvaista. (Kawano, et al., 2018) Ihmiset saavat pieniä määriä rikkiä epäorgaanisina sulfaatteina ja orgaanisena rikkinä juomavedestä, ruoan lisäaineista, lisäravinteista, sipuleista ja esimerkiksi ruusukaalista. (Nimni, et al., 2007)

Metioniini on toinen rikkiä sisältävistä ja yksi yhdeksästä välttämättömästä aminohaposta, mitä ihmiskeho ei pysty valmistamaan itse. Metioniinin ja kysteiinin eroja reaktiivisuudessa ja toiminnallisuudessa selittää eniten rikin tapa sitoutua muuhun molekyyliin. Kysteiinissä rikki on osana ketjun päätä tiolissa (-S-H), kun taas metioniinissa se on osa tioeetteriä (CH_3-S-R) ketjun muiden osien välissä. (Kawano, et al., 2018) Metioniinia kuluu kysteiinin valmistamiseen, jonka taas uskotaan olevan tärkeän kehossa toimivan antioksidantin, glutationin (GHS) valmistusta rajoittava tekijä. Kysteiini toimii muilta osin proteiinien, tauriinin ja sulfaatin synteeseissä. Ihmisellä ja eläimillä rikin saanti, käyttö ja säätely ovat hyvin samankaltaisia. Kysteiini pystyy korvaamaan ainakin osan tarpeellisesta metioniinista, kunhan metioniinin saannin välttämätön minimi ylittyy ja metioniini/kysteiini-suhde on hyvä, vaikka arviot korvattavista määristä vaihtelevat. (Ball, et al., 2006)

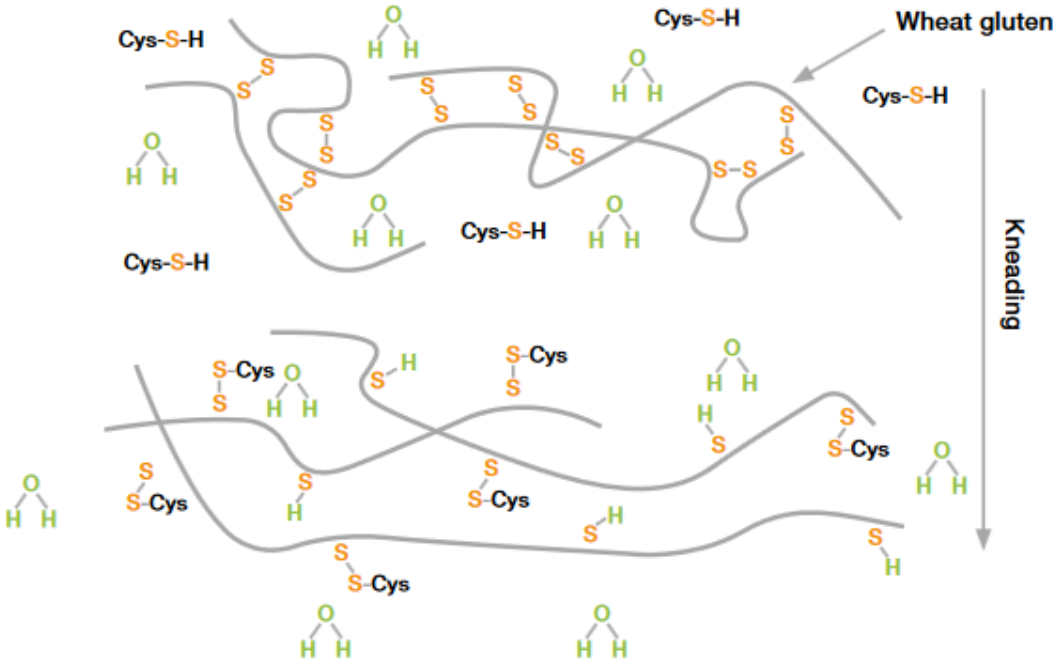


Kuva 1 Yksinkertaistettu rikin aineenvaihdunta ja kierto kehossa. Tärkeimpänä metioniinin (Methionine) ja kysteiinin (Cysteine) rakenteet. (Nimni, et al., 2007)

Kysteiiniä käytetään lääketeollisuudessa mm. limanirrotus-lääkkeiden valmistuksessa. Kysteiinin johdannaiset, kuten mekysteiini ja asetyylikysteiini vähentävät liman liikaeritystä normalisoimalla liman ominaisuuksia, alentamalla tulehdustilaa ja toimimalla antioksidanttina. (Vardanyan & Hruby, 2016) N-asetyyli-kysteiini-johdannaista käytetään parasetamoli- (Heard, 2008) ja akryylinitriili- (Buchter, et al., 1984) myrkytysten ja ionisoivan (gamma)säteilyn aiheuttamien DNA-vaurioiden (Reliene, et al., 2009) hoitoon ja ehkäisyyn. Monia muita terapeuttisia vaikutuksia erilaisiin sairauksiin on löydetty aivan viime aikoina. (Frye & Berk, 2019)

Elintarviketeollisuudessa suolahappoon liuotettua kysteiiniä (E920) on käytetty jo 60-luvulta alkaen vehnätaikinan muovattavuuden ja paistetun tuotteen sisäosien tasalaatuisuuden parantamiseen etenkin pitkälle automatisoiduilla tuotantolinjoilla. (Cauvain, 2015) Kysteiini pilkkoo pitkälle verkottunutta vehnän gluteenia hapettamalla eri proteiineja yhdistäviä kysteiinien välisiä disulfidisidoksia (Cys-S-S-Cys). Aiemmin hiivasta eristettyä

proteiinia pilkkovaa entsyymiä tai glutationia (gamma-glutamiinihappo-kysteiini-glysiini-tripeptidiä) käytettiin samassa tehtävässä ja joista jälkimmäisen toiminta perustuu myös reaktiiviseen kysteiini-osaan. Proteiiniin liittynyt kysteiini-ryhmä suojaa sitä uudelleenlinkittymiseltä. (Wacker Chemie AG, 2017)



Kuva 2 Kysteiinin toiminta vehnätaikinan muokattavuuden parantamisessa. Kysteiini tiomuodossaan (Cys-S-H) avaa gluteenin proteiiniketjujen välillä olevia disulfidisiltoja (Gluteeni-S-S-Gluteeni) ja liittyy niihin (Gluteeni-S-S-Cys). Gluteenin ketjut liikkuvat toistensa lomassa vapaammin, joka johtaa parempaan venyvyyteen ja vaivattavuuteen. (Wacker Chemie AG, 2017)

Kysteiinin sisältämä tioliryhmä antaa sille hyvät ominaisuudet pelkistäjänä kosmetiikassa permanenttien teossa, jossa disulfidisidosten katkaisemisen jälkeen ne liitetään uudelleen toiseen proteiiniketjuun hapettimella hiusten muotoilun jälkeen. Tioglykolihappoa korvatessaan kysteiinin käyttö vähentää hiuksiin kohdistuvia vahinkoja ja antaa pehmeämmän lopputuloksen. (Tonouchi & Ito, 2017)

Kysteiinille on käyttöä elintarvike- lääke- ja elintarviketeollisuuksien erilaisissa sovelluksissa joko sellaisenaan (L-Cys), suolahappoon liuotettuna (L-Cys HCl) tai dimeroituna, eli

kahden kysteiinin muodostamana kystiininä (L-Cystin). Mikrobeilla tuotetun L-kysteiinin hydrokloridin hinta liikkuu Euroopassa n. 70 e/kg (Merck, 2019) ja Kiinassa >40 e/kg (Alibaba, 2019). Kiinassa happohydrolyysillä tuotetun eläinperäisen L-kysteiinin hydrokloridin hinta on 10-20 e/kg (Alibaba, 2019). Vapaa aminohappo eli vähemmän stabiili, pelkkä mikrobilla tuotettu L-kysteiini on Euroopassa 149 e/kg (Merck, 2019) ja Kiinassa >50 e/kg. (Alibaba, 2019) Kiinalainen mahdollisesti eläinperäinen L-kysteiini on 20-30 e/kg. (Alibaba, 2019)

Kuva 3 L-kysteiinin hydrokloridin monohydraatti, eli L-kysteiinin ja suolahapon suola, sisältää kiteistä vettä yhden yksikön per L-Cys HCl. (Alibaba, 2019)

Vuosittaisen L-kysteiinin tuotannon markkina-arvo on n. 55 milj. dollaria, josta keratiinin hydrolyysillä tuotetaan 4400 tn ja fermentaatiolla 600 tn vuodessa. Markkinat L-kysteiinille kasvavat keskimäärin 4% vuodessa ja mikrobisesti tuotetulle 10% vuodessa. Fermentaatiolla tuotetun kysteiinin nopeaa kysynnän kasvua selittää sen korkeammasta hinnasta huolimatta halal-, kosher- ja vegaanisertifiointi, joka on perinteisesti keratiinista tuotetulle L-kysteiinille lähtökohtaisesti mahdotonta. (Tamba-Berehoiu, et al., 2013)

Kysteiinin tuotanto keratiinin happohydrolyysillä vaatii käsiteltävän eläin- tai ihmisperäisen karva/hius/sulka-materiaalin upottamisen (6 h, 100 ºC, HCl >20%) happoliuokseen. Suurin osa suolahaposta kuluu muun kuin halutun kysteiinin irrottamiseen ja tuottaa siksi paljon ei-toivottua jätettä suuren materiaalikulutuksen lisäksi. Verrattuna fermentaatiosta saatavan kystiinin hajottamiseen suoraan kahdeksi kysteiiniksi vie happohydrolyysi 27 kg HCl: ää tuotettua kysteiini-kiloa kohti yhden suolahappokilon sijaan. (Tamba-Berehoiu, et al., 2013)

Kirjallisuustutkimusta varten kartoitettiin paljon kysteiiniä sisältäviä kasviperäisiä lähteitä, jotka olisivat mielellään edullisia, runsaasti saatavilla myös Suomessa, sekä mahdollisesti osa jonkun muun teollisuuden alan sivutuotevirtaa, jolle voisi tuoda jalostamalla lisäarvoa. Huomio kiinnittyi jo alussa yleisiin öljykasveihin, joiden kasviöljynerotuksen jälkeiset hyvin proteiinipitoiset kakut päätyvät monesti lievän hydrolyysin jälkeen tuotantoeläinten ruoaksi. Tulevaisuuden suuria megatrendejä ovat kasviruoan tuotannon kasvattaminen ja dieettien muuttuminen vähemmän eläinperäisiksi, joka osaltaan luo kysyntää löytää uusia käyttökohteita ja prosesseja nykyiselle eläinrehulle.

Tarkempaa tutkimusta varten valikoituivat auringonkukan ja rapsin siementen proteiinit edellisten kriteerien perusteella. Näitä tutkiessa kävi ilmi, että kysteiinit muodostavat usein proteiinien ja polypeptidien rakennetta stabiloivia rikkisiltoja, disulfidisidoksia, jotka ovat kohtalaisen vaativia avata. Ennen kysteiinin erottamista disulfidisidokset on saatava poikki ja kysteiinit paremmin esille, jotta ne voisi myöhemmin irrottaa rungosta esimerkiksi entsyymeillä.

Toinen tärkeä huomio koskee kysteiinin jakaumaa proteiinityyppien välillä. Runsaslukuisimmat proteiinityypit ovat pienempikokoiset, vesiliukoiset albumiinit ja suurempikokoiset, suolavesiliukoiset globuliinit. Huolimatta kokoeroista ja globuliinien paljon suuremmasta massaosuudesta kokonaisproteiinimäärässä, jakautuu kysteiinien määrä suurin piirtein tasan näiden välillä. Tämä tarkoittaa sitä, että helpommin liukeneva ja massaosuudeltaan pienempi proteiinifraktio on paljon rikkaampi halutusta komponentista, suurin piirtein samaa kertaluokkaa kuin keratiinilla. Analogiana kaivoksessa on tiedossa helpommin liukeneva ja rikkaampi malmityyppi, jota on todennäköisesti helpompi ensin alkaa taloudellisesti hyödyntää.

Tässä työssä keskitytään enemmän vesiliukoisiin, pienempiin ja vähemmän monimutkaisiin albumiineihin, joille etsitään sopivia ympäristöystävällisiä esikäsittelymenetelmiä, hydrolyysiprosesseja ja valikoivia erotustekniikoita. Mielenkiintoisimpia ovat sulfiittien ja kysteiinin kaltaisten yhdisteiden käyttö rikkisidosten avaamiseksi, alikriittinen vesiuutto ja entsymaattiset menetelmät hydrolyysiin sekä kenties kalvotekniikat ja kromatografia erotukseen.

2.2 Kysteiinin ja muiden aminohappojen eristämisestä

Aminohapot luokitellaan yleisimmin kahdella eri tavalla; sivuketjujen ominaisuuksien mukaan polaarittomiin, polaarisiin happamiin tai emäksisiin aminohappoihin, tai vaihtoehtoisesti rikkiä sisältäviin, neutraaleihin, happamiin, emäksisiin, alifaattisiin tai aromaattisiin aminohappoihin. Kysteiini jaotellaan joko polaariseksi tai rikkiä sisältäväksi aminohapoksi. (Vornamo, 2016)

Aminohappojen hydrolyysin jälkeinen erotus on yksi tärkeimmistä rajoittavista tekijöistä niiden muuntamiseksi lisäarvoltaan paremmiksi lopputuotteiksi. Aminohappoja voi erottaa esimerkiksi koon, varauksen, hydrofobisuuden, niiden johdannaisten erottamiselle suotuisimpien ominaisuuksien tai yhdistetyn elektrolyysin ja muuntamisen kanssa. (Villegas-Torres, et al., 2015)

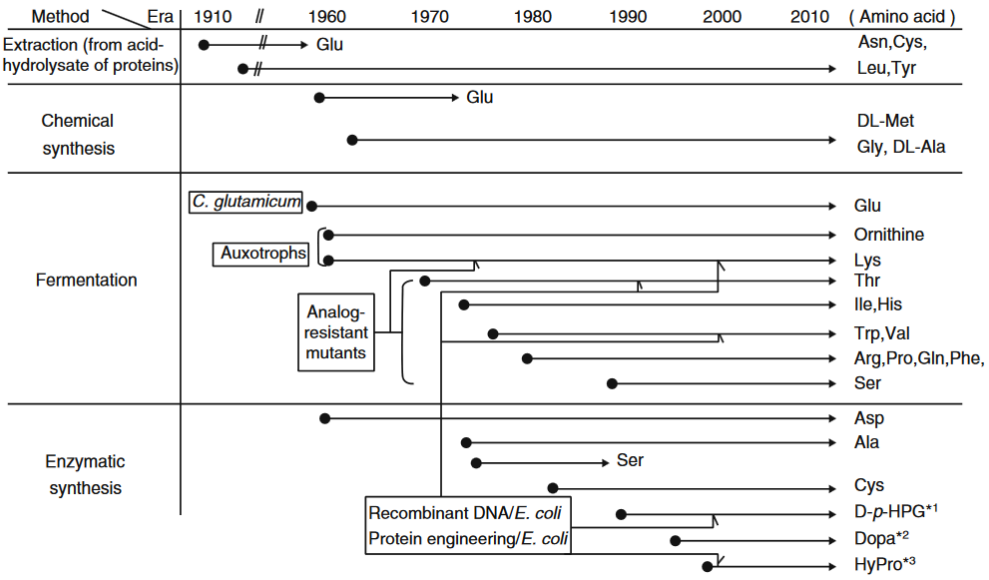
Kuva 4 Vasemmalla: Natriumglutamaatin (MSG) keksijä, tohtori K. Ikeda. Yksi kymmenestä Japanin tärkeimmästä keksijästä Japanin patenttitoimiston mukaan. (AJI-NO-MOTO CO., INC, 2018)

Keskellä: Ajinomoto-yhtiön MSG-pakkauksia 1920-luvulta. (Japan Patent Office, PR, 2002)

Oikealla: Moderni MSG-pakkaus. (Amazon, 2015)

Aminohappojen tuotanto sai alkunsa Japanissa, jossa perinteisessä ruoanlaitossa käytetyn *konbu*-merilevän umami-aromia antava ainesosan, glutamiinihapon, löysi 1908 Tokion Keisarillisen Yliopiston professori Kikunae Ikeda. Hän tuotti natriumglutamaattia, glutamiinihapon maultaan hyväksi havaittua natriumsuolaa vehnän ja soijapavun proteiineista happohydrolyysillä. Ajinomoto-yhtiön perustaja Saburosuke Suzuki kehitti menetelmää edelleen ja kaupallisti tuotteen brändillä ”AJI-NO-MOTO”. Prosessia käytettiin kaupallisesti menestyksekkäästi seuraavat 50 vuotta tämän arominvahventeen valmistamiseen. (Tonouchi & Ito, 2017)

Suurimittakaavaisen tuotantoprosessin haittapuolia olivat sekä raaka-aineiden suuret kustannukset, että kuuman suolahapon käyttö, joista jälkimmäisellä oli kielteisiä vaikutuksia ympäristöön, tehdasoperaattoreiden terveyteen ja tuotantolaitosten korroosioon. Tämä historiallinen opetus alleviivaa vihreän kemian periaatteiden käyttöä, jos auringonkukan tai rapsin siemenproteiineista aiotaan ottaa onnistuneesti kysteiiniä talteen. Ihanteellisesti suolahappoa kuluu siis vain kystiinin kemialliseen lopputuotteeksi pelkistämiseen. (Tonouchi & Ito, 2017)

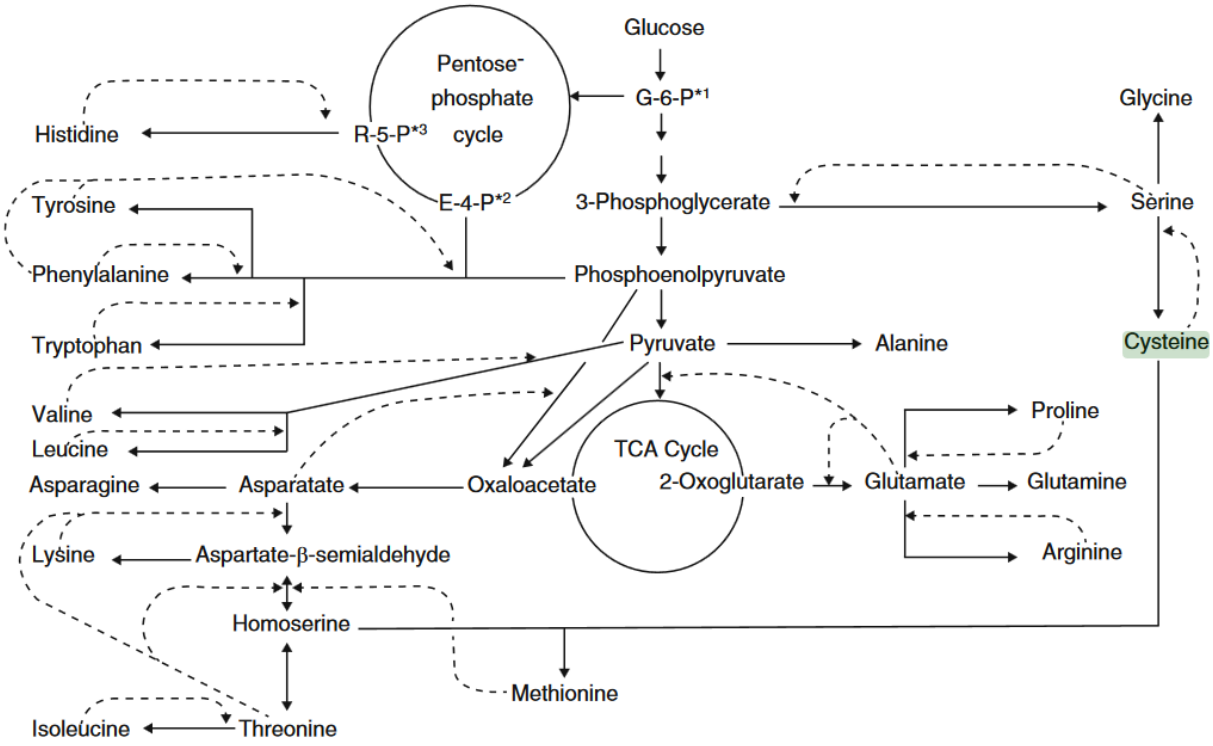


Kuva 5 Aminohappojen tuotantometodien historialliset muutokset. Kysteiinin tuotanto alkaa 1900-luvun alussa proteiinien happohydrolyysillä nykypäivään asparagiinin, leusiinin ja tyrosiinin kanssa. 1980-luvun alusta alkaen kysteiiniä aletaan tuottaa entsymaattisella synteesillä. (Tonouchi & Ito, 2017)

Kuvasta 5 nähdään, että aminohappojen kaupallisessa tuotannossa happohydrolyysin rinnalle ja myös sitä korvaamaan on kehitetty kemiallista synteesiä, fermentatiivisia tekniikoita, että entsymaattista synteesiä. L-asparagiinille, L-kysteiinille, L-leusiinille ja L-tyrosiinille markkinat ovat olleet muihin verrattuna pienemmät, joten niiden tuotanto on ollut kannattavampaa biologisista lähteistä kemiallisesti eristämällä. Glysiiniä, D- ja L-metioniinia ja D- ja L-alaniinia tuotetaan kemiallisella synteesillä.

Muita aminohappoja sekä nykyisin kysteiiniä tuotetaan fermentaatiolla ja entsymaattisella synteesillä. Nämä vaativat enemmän tutkimus- ja kehityspanostuksia, suurempia markkinoita ja enemmän pääomaa ollakseen kannattavia.

L-kysteiiniä tuotetaan nykyisin etenkin kanojen ja hanhien höyhenistä, sian harjaksista, parturisalonkien hiusjätteestä ja kanien karvoista happohydrolyysillä Kiinassa. (Höfer, 2009) Saksalainen Wacker avasi 2018 uuden tehtaan Pohjois-Espanjaan Leóniin, joka käyttää jalostettua E. coli:a kystiinin ja L-kysteiinin fermentaatiolla tuottamiseksi. (Bachmair, 2018)



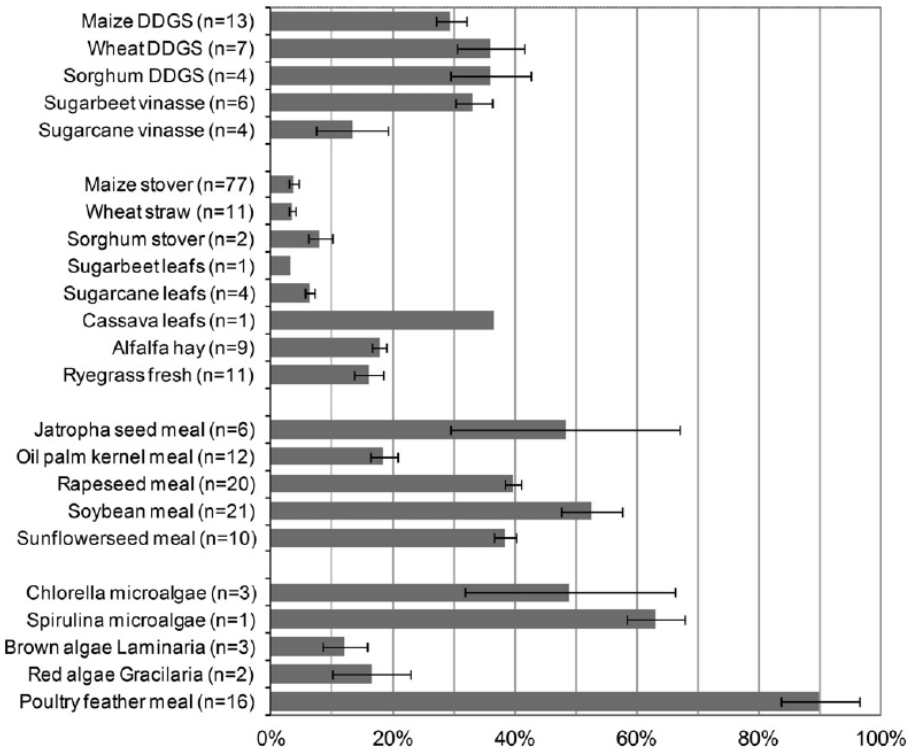
Kuva 6 Kaavio aminohappojen biosynteesistä ja sen säätelystä mikro-organismeissa. Kysteiinin sijainti vihreällä taustavärillä korostettuna. *1glukoosi-6-fosfaatti, *2erytroosi-4-fosfaatti, *3riboosi-5-fosfaatti, ------->: biosynteesireitti, <- - - - lopputuotteen aiheuttama ja sen tuotantoa vaimentava takaisinkytkentä. (Tonouchi & Ito, 2017)

Kuvassa 6 nähdään kysteiinin sijainti mikrobin aineenvaihdunnassa. Fermentaatiolla eli käymisellä tuotettavan kysteiinin pitoisuuden kasvu mikrobissa vähentää sen muodostumista seriinistä. Kysteiini muuttuu edelleen välttämättömäksi aminohapoksi, metioniiniksi, tai homoseriiniksi

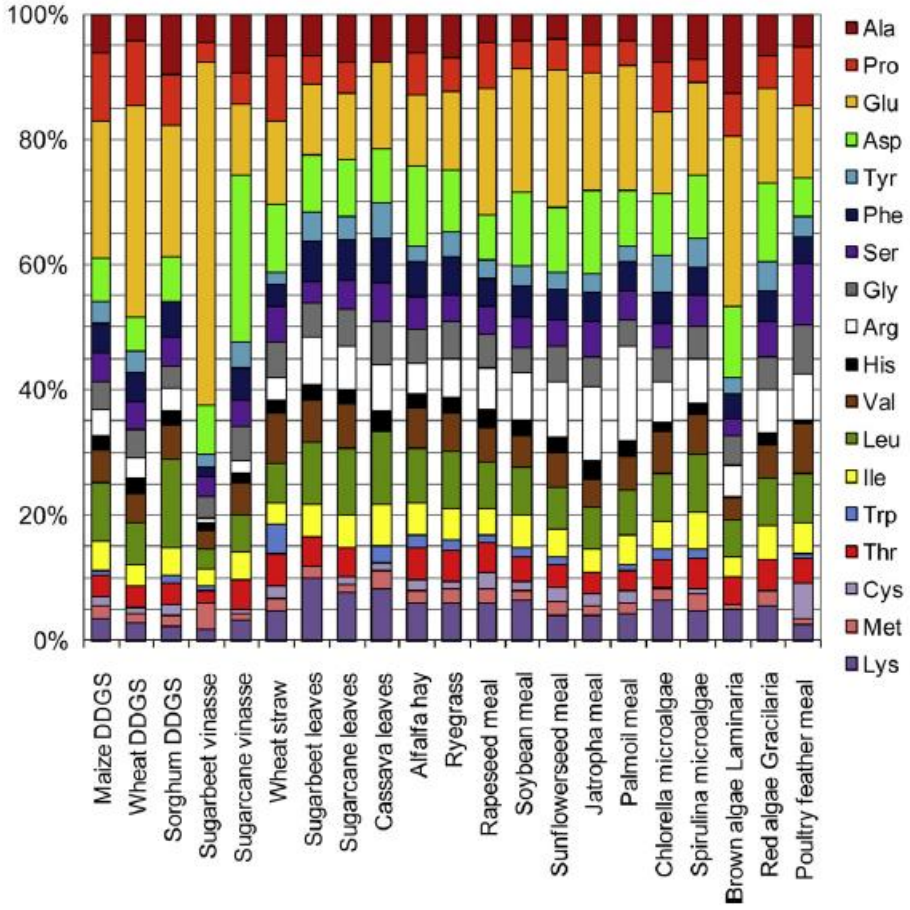
.

3 Kysteiinirikkaiden kasviraaka-aineiden valinta

Suomen oloissa kasvavista kasveista mielenkiintoisimmat ovat rapsi ja auringonkukka. (Kuva 7), (Kuva 8)



Kuva 7 Erilaisten maatalouden sivutuotteiden sisältämiä raakaproteiinin massafraktioita kuiva-aineen prosenttiosuuksina. Mustat viivat päätypalkkeineen kuvaavat keski-hajontaa ja n = kirjallisuudesta löydettyjen esimerkkien lukumäärä. (Lammens, et al., 2012)



Kuva 8 Aminohappojen pitoisuus massafraktiona proteiinissa hydrolyysin jälkeen erilaisissa sivutuotteissa. Cys = kysteiini, Met = metioniini. Kysteiini on vaaleanharmaansininen kolmas pylväs alhaalta laskettuna. Kuvasta näkee, että suhteessa eniten kysteiiniä on kanalihan tuotannosta syntyvässä höyhenjätteessä (5,8%). Kasviperäisistä sivutuotteista eniten sitä on rapsinsiemenkakussa (2,8%), auringonkukansiemenkakussa (2,2%), palmuöljykakussa (2,1%), alfalfassa ja öljyjatropakakussa (1,8%). (Lammens, et al., 2012)

Sekä rapsilla että auringonkukalla kaikkein kysteiini-rikkain proteiinifraktio kuuluu vesiliukoisiin 2S-albumiineihin. S tulee sedimentaatiovakiosta epälineaarisessa yhtälössä, jossa aina kyseisen partikkelin hydrodynamiikkaan massa, tiheys ja muoto vaikuttavat.

Sedimentaatiovakio on sentrifugissa tapahtuvan vajoamisnopeuden suhde sopivassa yksikössä olevaan kiihtyvyyteen; 2S ($2x10^{-13}$ s). Sentrifugivoimat aiheuttavat koeputkessa olevien makromolekyylien vajoamisen konsentraatiorajapintana pohjaa kohti ajan funktiona, jolloin voidaan käyttää Svedbergin yhtälöä (2). Suhdetta (1) käytettiin oikeanpuoleisen muodon saamiseksi.

$$D = \frac{RT}{N_A f} \tag{1}$$

D = diffuusiovakio [m^2/s]

f = kitkavakio [-]

N_A = Avogadron luku [mol^{-1}]

R = kaasuvakio [1000g m^2/s^2mol K]

T = lämpötila [K]

$$s = \frac{u}{\omega^2 r_s} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{N_A f} = \frac{MD(1-\bar{v}\rho)}{RT} \tag{2}$$

N_A = Avogadron luku [mol^{-1}]

M = moolimassa [g/mol]

r_s = radiaalisijainti [m]

S = sedimentaatiovakio [s]

u = havaittu makromolekyylin radiaalikiihtyvyys [m/s^2]

$\overline{v}$ = osittaisominaistilavuus [m^3/kg]

ρ = liuoksen tiheys [kg/m^3]

ω = kulmanopeus [rad/s]

$\omega^2 r$ = keskipakoisvoimainen kenttä [$rad^2 m/s^2$]

1940 kehitetyn Svedbergin yhtälön sijaan nykyisin käytetään tehokkaampia laskennallisia tekniikoita, jolloin dataa mallinnetaan suoraan perustavaa laatua olevalla kuljetusyhtälöllä (kuten Lamm). (Lebowitz, et al., 2002)

Suolavesiliuokoiset 12S-globuliinit, cruciferiinit ja vesiliukoiset 2S-napiinit ovat kylmäpuristetussa rapsiöljyssä esiintyviä allergeeneja, joita on suomalaisen tutkimuksen mukaan siinä minimaalisesti. (Puumalainen, et al., 2015) Koska ihmiset voivat saada allergisia oireita rapsin, eivätkä auringonkukan globuliineista tai albumiineista, voisi olla hedelmällistä hydrolysoida etenkin rapsinsiemenkakun sisältämät proteiinit aminohapoikseen ja eristää ne ruoantuotantoon tai muuhun käyttöön.

Toinen hyvä syy käyttää rapsia proteiinin raaka-aineena liittyy sen nykyiseen tuotantoketjuun, jossa päätuotteena olevan rapsiöljyn eristyksen optimointi johtaa jäljelle jäävän siemenkakun proteiinien soveltumattomuuteen ihmisravinnoksi jalostamiseen taloudellisesti. Suurin osa öljyn erotuksesta tehdään liotinprosessilla, jossa murskatuista rapsinsiemenistä saatuun kakkuun jää hyvin vähän öljyä, mutta jonkin verran liottimena käytettävää heksaania. Heksaanin eristämiseksi käytetään samanaikaista rapsinsiemenkakun liuottimen talteenottoa ja paahtamista (DT, desolventizer-toaster), jossa korkean lämpötilan vesihöyryä käytetään heksaanin takaisinottoon. DT:ssä korkea lämpötila tuhoaa aminohappoja ja vaikuttaa proteiinien rakenteeseen ja ominaisuuksiin ylimääräisten antiravintoaineiden ja niiden hajoamistuotteiden kiinnittymisen lisäksi. (Mupondwa, et al., 2018)

Kuva 9 Vasemmalla: Rapsiöljytehtaan loppuvaiheen käsittelylaitteistoa. Rapsinsiemenmassan sisältämän liuottimen talteenottajapaahtaja eli Desolventizer Toaster (DT). (AGICO GROUP, 2018)

Oikealla: DT-käsiteltyä rapsinsiemenmassaa, huomaa tummemmat paahtuneet kohdat siemenmurskassa. (Heuzé, et al., 2018)

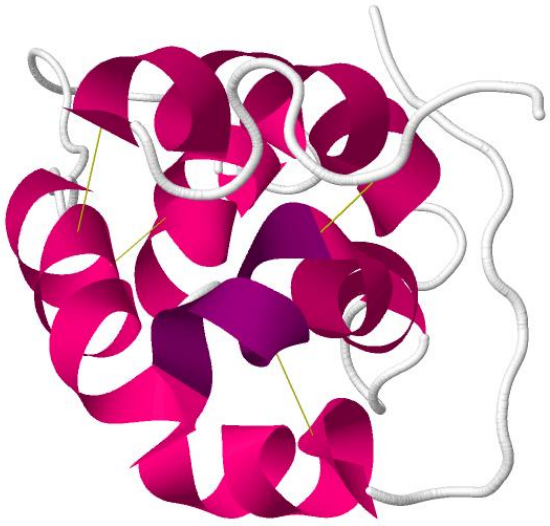
Yhdysvaltojen maatalousministeriön laboratorioissa tehdyissä kokeissa havaittiin rapsia vastaavissa soijan DT-siemenkakuissa vuosikymmenien aikana erilaisia huonoja puolia proteiinien tuhoutumisesta loppuprosessin takia, kuten huonoa kosteuden siirtymistä sisään tai ulos proteiinirakenteista sekä paahtumista, jotka eivät ole korkealaatuisen raaka-aineen tunnusmerkkejä. (Mupondwa, et al., 2018)

Koska vain pienet tuottajat tekevät kylmä- tai kuumapuristettua rypsiöljyä, ovat puristekakkujen jälkimarkkinat proteiinierotukseen pienet ilman proteiini-isolaattien valmistajien yhteistyön tekemistä suurempien kasviöljyteollisuuden valmistajien kanssa. Korkeat investointikustannukset hellävaraisempiin liottimen talteenottoteknologioihin ja valmiit (matalan) lisäarvon markkinat rapsinsiemenkakuille eläinten rehuksi jarruttavat DT-siemenmassan käyttöönottoa ihmisravinnoksi soveltuviin kohteisiin. (Mupondwa, et al., 2018)

DT-siemenmassa on huomattavasti halvempaa kuin esimerkiksi valmiiksi eristetty proteiini-isolaatti, oli se sitten puhtaampaa napiinia tai seosta cruciferiinin kanssa, joten sen käyttöä kysteiinin eristämiseksi kannattaa tutkia. Napiinin eristäminen jatkoprosessointiin kysteiinikonsentraation nostamiseksi on välivaiheena suhteellisen yksinkertainen olettaen, että paahtuminen ja denaturoituminen (Yang, et al., 2014) eivät ole vaikuttaneet albumiinien ja globuliinien liukoisuuteen liian negatiivisesti esimerkiksi suurempien proteiiniyksiköiden muodostumisella tai sokereiden ja peptidiketjujen yhdistymisellä Maillard-reaktioiden kautta. (He, et al., 2019)

4 Auringonkukansiemen raaka-aineena

Enemmistön auringonkukan albumiineista enkoodaavat geenit SESA2, SESA20 ja SESA3 (SEed Storage Albumin). GC-MS:llä suoritetussa tutkimuksessa havaittiin pelkistyksien ja alkylaatioiden jälkeen, että nämä kaikki isoformeineen ovat monomeereja (vain yksi pitkä peptidiketju). SESA2-1 sisältää 116 tai 117 yksikköä eroten yhdellä treoniinilla. SESA2-2 on 128 yksikköä pitkä. SESA20-2 on 127 yksikön pituinen. SESA3 (tunnetaan myös SFA8:na, SunFlower Albumin 8) sisältää 103 yksikköä. Kaikki tutkitut auringonkukan albumiinit sisältävät kahdeksan kysteiiniä stabiloiden kutakin rakennetta neljällä disulfidisidoksella. (Franke, et al., 2016) Rapsinsiementen albumiineihin verrattuna auringonkukan albumiinit sisältävät suunnilleen saman verran mooliprosentteina kysteiiniä tehden molemmista mielenkiintoisimman proteiinijakeen kussakin kasvissa kysteiinin erotuksen kannalta (Barciszewski, et al., 2000)

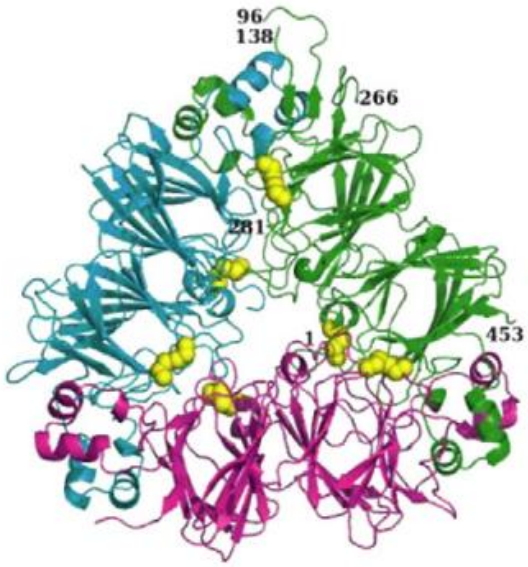


Kuva 10 Metioniini- ja kysteiini-rikas auringonkukan albumiini SESA3 (SFA8), neljä kysteiinien muodostamaa disulfidisiltaa näkyvät ohuina sauvamaisina sidoksina. (Pantoja-Uceda, et al., 2004)

5 Rapsinsiemen raaka-aineena

5.1 Rapsinsiemenen proteiinien rakenteesta

Rapsinsiemen sisältää 19,6 - 23,5 % proteiinia kuiva-aineena laskettuna (8,5 % kosteutta), josta voidaan erottaa kaksi suurta ryhmää. Suurin osa (60 %) proteiinista on neutraalia, suolaliuokseen liukenevaa 12S-globuliineihin kuuluvaa cruciferiinia (300-350 kDa) ja toinen (20 %) emäksistä, vesiliukoista 2S-albumiineihin kuuluvaa, pienempää (12-16 kDa) napiinia. (Wanasundara, et al., 2016) Yhteensä nämä varastoproteiinien muodot ovat kirjallisuuden vaihtelevien arvioiden mukaan 80-90 % kokonaismäärästä loppujen ollessa rakenteisiin ja aineenvaihduntaan liittyviä proteiineja. (Campbell, et al., 2016) (Wanasundara, et al., 2016)



Kuva 11 Procruciferiinin yleinen stereosymmetrinen rakenne (trimeeri). Valmis cruciferiini muodostaa heksameerin kahdesta kuvan kaltaisesta trimeeristä. Kolme aliyksikköä merkitty vihreällä, sinisellä ja purppuralla. Aliyksiköiden sisäiset ja väliset kysteiinien muodostamat disulfidisidokset on merkitty keltaisilla palloilla ja ei-järjestäytyneiden ketjujen pääteryhmät on numeroitu. (Tandang-Silvas, et al., 2010)

Cruciferiini on heksameeri, jossa aliyksiköt koostuvat happamesta (40 kDa) α- ja emäksisestä (20 kDa) β-polypeptidistä. Osat yhdistyvät toisiinsa disulfidi- ja ei-kovalenttisin sidoksin. Cruciferiinin muoto riippuu myös ympäröivän liuoksen ionivahvuudesta. Yli 0,5 M NaCl vesiliuoksissa cruciferiini esiintyy 12S-muodossaan heksameerina, mutta hajoaa vedellä laimennettaessa 7S-komponentteihin, jotka ovat oletettavasti trimeeri-puolikkaita heksameerista. (Schwenke & Linow, 1982)

Napiini koostuu kahdesta (4 kDa ja 9 kDa) pääasiassa disulfidisidoksilla yhteen liitetystä polypeptidiketjusta. (Wanasundara, et al., 2016)

Kuva 12 Rapsin napiini BNIB, kaksi aliyksikköä (sateenkaaren spektri punaisesta tummansiniseen) sisältävät yhteensä kahdeksan kysteiiniä, joilla ne yhdistyvät keskenään muodostaen neljä disulfidisidosta (kuvassa ohuet sauvamaiset sidokset). (Rico, et al., 1997)

Noin 450-500 aminohappoa sisältävässä cruciferiinissa on viisi tai seitsemän kysteiiniä, kun taas napiinin 130 aminohapon ryppäässä kysteiinejä on kahdeksan. Napiini sisältää paljon enemmän kysteiiniä mooliprosentteina kuin cruciferiini. Tämän lisäksi se liukenee hyvin pelkkään veteen ja on helppo erottaa suolaveteen liukoisesta cruciferiinista. (Schneider, et al., 1989)

5.2 Rapsin proteiinien fysiokemiallisia ominaisuuksia

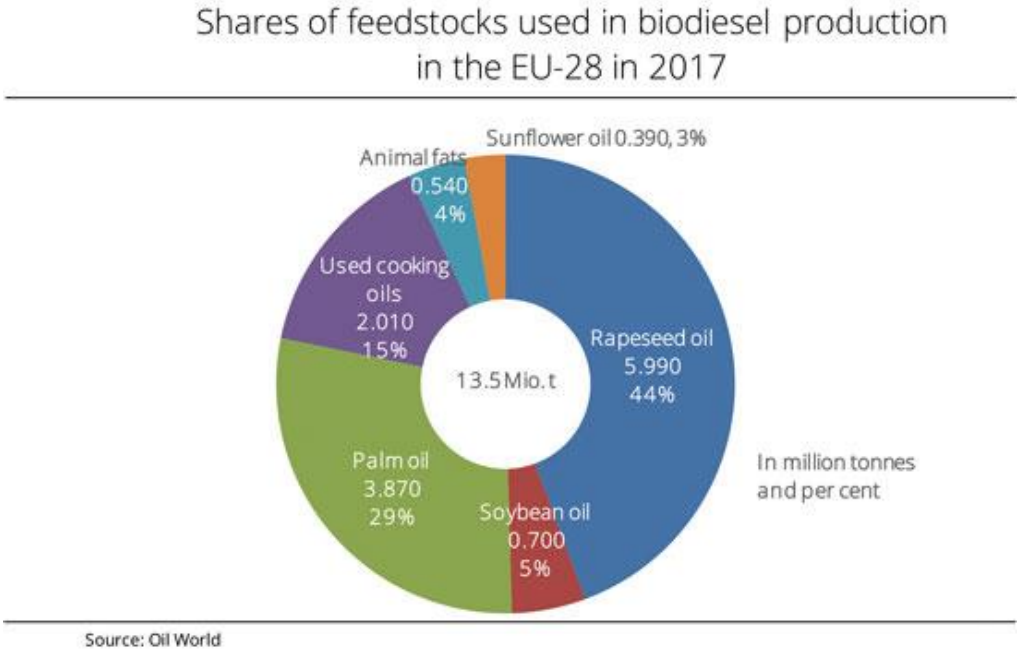
Rapsin proteiini-isolaatin vesiliuoksissa cruciferiini vaikuttaa eniten geelin muodostukseen napiinin liisteröityessä vain heikosti. Näitä rakenteiden jähmettymisiä tutkittaessa havaittiin, että disulfidi- ja vetysidokset vaikuttivat vain vähän muodostuneet geelimäisen rakenteen ominaisuuksiin. Käytetyt isolaatti-pitoisuudet olivat 5 %, 7 % ja 9 % lämpötilavälillä 25 - 95 ºC. Proteiinien denaturointi tapahtui n. 80 - 90 ºC välillä, jolloin kvaternaarinen ja tertiäärinen vetysidos-rakenne järkkyy ja proteiinit hajoavat ja avautuvat sekundäärirakenteiksi. Denaturointilämpötilan yli mentäessä hydrofobiset kohdat voivat avautua liuosta päin ja kysteiiniä sisältävät vierekkäiset kohdat yhdistyä disulfidisidoksin. Hydrofobisten vuorovaikutusten ajateltiin olevan määräämiä gelaatiossa. (Kim, et al., 2016)

Toinen tutkimusryhmä raportoi rapsin proteiini-isolaattien erillisille jakeille denaturointilämpötilojen arvoja, cruciferiinille 83 - 93 ºC ja napiinille 106 - 118 ºC. Korkeampaan napiinin denaturointilämpötilaan vaikutti suurempi rakennetta vakauttavien disulfidisidosten lukumäärä. (Yang, et al., 2014)

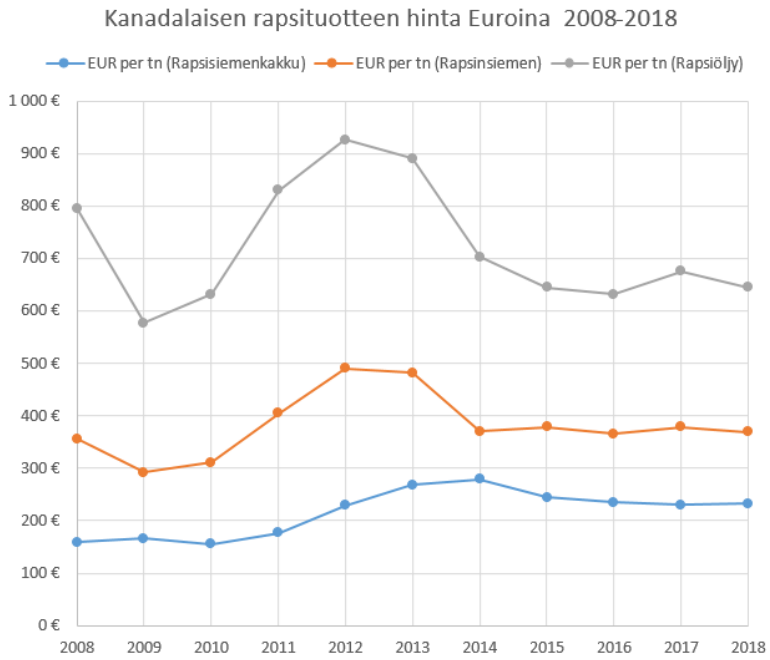
Napiinien ja cruciferiinien rakenteessa on jonkin verran geneettistä vaihtelua, jonka suuruus paljastui parhaiten vertailemalla Uniprot-tietokannasta ladattuja peptidiketjujen kuratoituja tietoja (Brassica napus). (Schneider, et al., 1989) Erot eivät olleet suuria, mutta vaikuttavat jonkin verran varsinkin spesifisten entsyymien toimintaan, jotka katkaisevat tiettyjen aminohappojen kohdalta. Yhdenkin aminohapon vaihtuminen toiseksi voi esimerkiksi tuplata hydrolyysin jälkeisen todennäköisen peptidiketjun pituuden. Taulukot 1 ja 2 sekä kuvat 1 ja 2 löytyvät Liitteestä 1.

5.3 Rapsinsiemenen tuotanto ja hintataso

Rapsia kasvatetaan pääasiassa sen sisältämän kasviöljyn takia. Öljyn erotuksen jälkeen tonnista rapsinsiementä jää jäljelle 650 kg rapsinsiemenkakkua sivutuotteena (Pińkowska, et al., 2014). Rapsin kasvatuksen oletetaan lisääntyvän tulevaisuudessa, koska etenkin kasviperäistä ruokaa tarvitaan entistä useammalle ja rapsiöljy on edelleen tärkein raaka-aine biodieselin valmistukseen Euroopassa (Kuva 13). Rapsin hintakehitys Kanadassa liittyy tulevissa luvuissa esitettäviin asioihin. (Kuva 14.)



Kuva 13 Biodieselin raaka-ainelähteet EU-28-maissa 2017. (Anon., 2018)



Kuva 14 Rapsinsiemenen, siitä liuotinerotellun rapsiöljyn sekä rapsiöljyjalostamon sivutuotteena syntyneen liuotinpuhdistetun ja paahdetun rapsinsiemenkakun hinta Kanadassa euroina vuosina 2008 - 2018. (CCoC, 2019)

Taulukosta 1 nähdään, että rapsinsiemenkakun sisältämän kysteiinin hinta ilman eristystä asettuu luokkaan 24 - 29 €/kg, joka on 48 – 58 % Kiinassa (Alibaba, 2019) ja 16 – 19 % Euroopassa (Merck, 2019) tuotetun vapaan L-kysteiinin hintatasosta. Ainakin Euroopassa tuotetulle L-kysteiinille voisi olla mahdollisuus saada kustannuskykyinen kilpailija rapsiperäisestä L-kysteiinistä, jos muut kustannukset investointien ja palkkojen lisäksi, kuten energia-, vesi- ja kemikaaliterät pysyvät kurissa. (Rommi, 2016)

Taulukko 1 Rapsin siemenen raaka-aineiden hinnat välillä 200-250€ per tn. (Adewolea, et al., 2016)

Raaka-aine:	Alin hinta per tn	Keskihinta per tn	Ylin hinta per tn
Rapsinsiemenkakku	200 €	225 €	250 €
Proteiinia (mitattavissa)	588 €	662 €	735 €
Kysteiiniä	23 500 €	26 500 €	29 400 €

Koska suolavesiliukoisissa cruciferiineissa on puolet kysteiinistä vesiliukoisten napiinien lisäksi (Wanasundara, et al., 2016), olisi taloudellisesti edullista saada molemmat proteiinifraktiot käyttöön. Sellaiset menetelmät, jotka ovat vihreitä, edullisia ja ennustettavasti kysteiini-pitoisia kohtia peptideistä rikastavia nostavat kysteiinin erottamisen kannattavuutta olennaisesti. Kappaleessa 6.3 käsitellään entsymaattista hydrolyysiä tarkemmin.

Taulukko 2 Napiinien kysteiini-pitoisuuksia mooliprosentteina. (Schneider, et al., 1989)

Napiinin Uniprot-ID	Napiinin moolimassa (g/mol)	Kysteiiniä (g/mol)	Kysteiiniä (w-%)
P01091	12736,58	848,12	6,66 %
P80208	14053,09	969,28	6,90 %
P17333	13790,86	969,28	7,03 %
P09893	14420,55	848,12	5,88 %
P27740	13552,72	969,28	7,15 %
P24565	12708,45	969,28	7,63 %
Keskimäärin:	13495,21	934,66	6,94 %

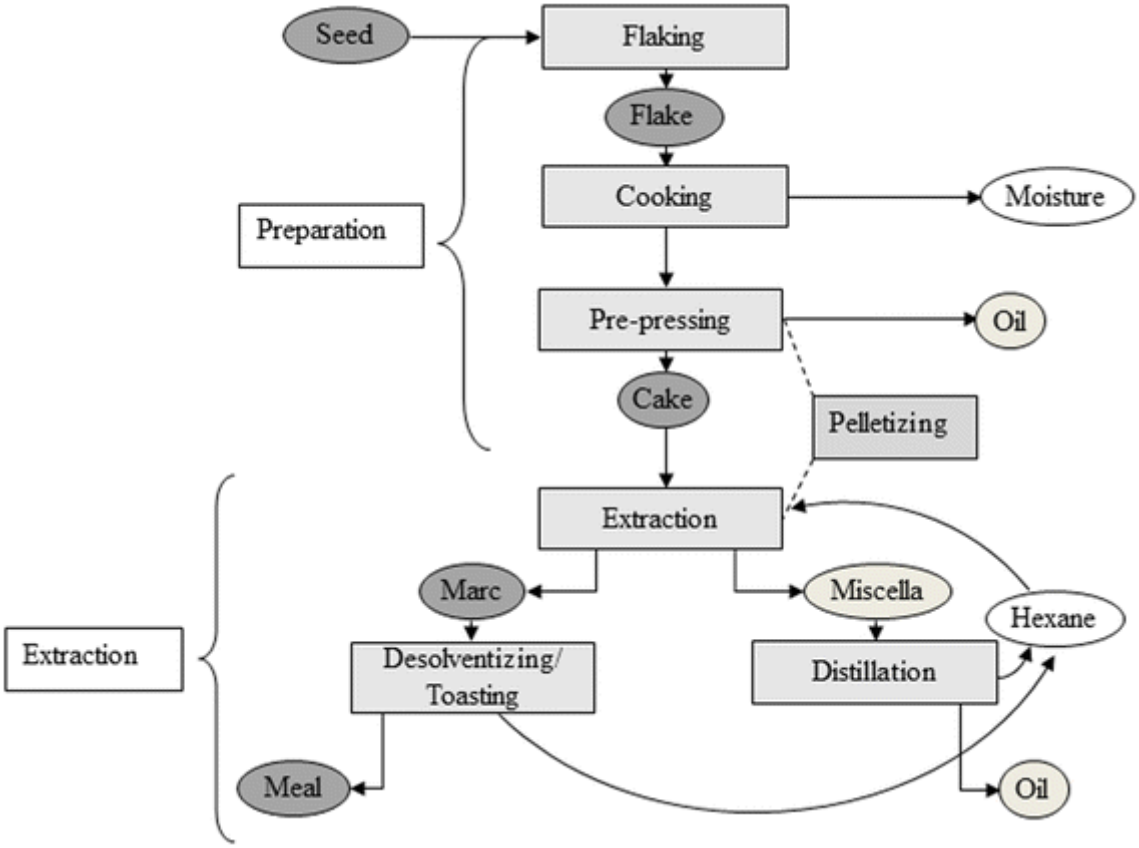
Kilossa rapsinsiemenkakkua on 340 g proteiinia ja 20 % eli 68 g napiinia. Yhteensä kysteiiniä on 2,50 w-% kokonaiskuivapainosta ja napiinin kysteiinipitoisuus on keskimäärin 6,94 w-%. Näistä seuraa, että kilossa rapsinsiemenkakkua on kysteiiniä 8,50 g, josta napiinin sisältämää kysteiiniä on 4,72g, eli n. 56 %. Loput 44 % kysteiinistä jakautuvat cruciferiinin sekä rakenne- ja aineenvaihduntaproteiinien kesken. Napiinin kysteiinin arvoksi rapsinsiemenkakussa saadaan n. 42 e/kg, jos vain napiinin sisältämä kysteiini lasketaan lopputuotteeksi. Taloudellisessa analyysissä oletetaan napiinin L-kysteiini-pitoisuudeksi jonkin verran alempi 6 w-%.

Entsymaattisesti syntyvät kysteiinittömät peptidit, alikriittisessä vesihydrolyysissä muodostuvat makuyhdisteet sekä kysteiinittömät peptidi-hydrolysaatit voivat olla myös tuotteita.

5.4 Rapsiöljyn tuotanto ja syntyvät sivutuotteet

Nykyisin rapsiöljyä tuotetaan kahdella eri tavalla, joiden välinen valinta vaikuttaa merkittävästi myös myöhempään proteiinien kaupalliseen erottamiseen. Hyvin pääomaintensiivinen raffinoitua rypsiöljyä tuottava liuotinuuttomenetelmä pääsee 99 % erotustehokkuuteen käsitellen 100 - 5000 tn rapsinsiemeniä päivässä, kun taas tyypillisesti kymmenen kertaa pienempiä määriä parempilaatuista (kylmä)puristettua öljyä valmistavat tuottajat pääsevät alle 90 % tehokkuuteen osan öljystä jäädessä puristekakkuun. Raffinoidun öljyn tuottamiseen kuuluu viimeisenä vaiheena liuottimena toimivan heksaanin poisto korkean lämpötilan vesihöyryllä (DT, Desolventizer Toaster), joka valitettavasti tuhoaa aminohappoja ja vaikuttaa jäljelle jäävän kakun proteiinien rakenteeseen ja ominaisuuksiin. Koska myös proteiinin ravintoarvoja heikentävät glukosinolaattien hajoamistuotteet ja fenolit jäävät näiden lisäksi kakkuun liuotinuuton viimeisessä vaiheessa, ei sen käyttö ole muun muassa ruokaproteiinien erottamiseen sopivaa. Kuuma- tai kylmäerotellun mekaanisen puristuksen jälkeisen siemenkakun sisältämä öljymäärä täytyy poistaa ennen proteiinien erotusta erillisessä vaiheessa sen soveltuessa muuten paremmin elintarviketeollisuuden tarpeisiin. (Mupondwa, et al., 2018)

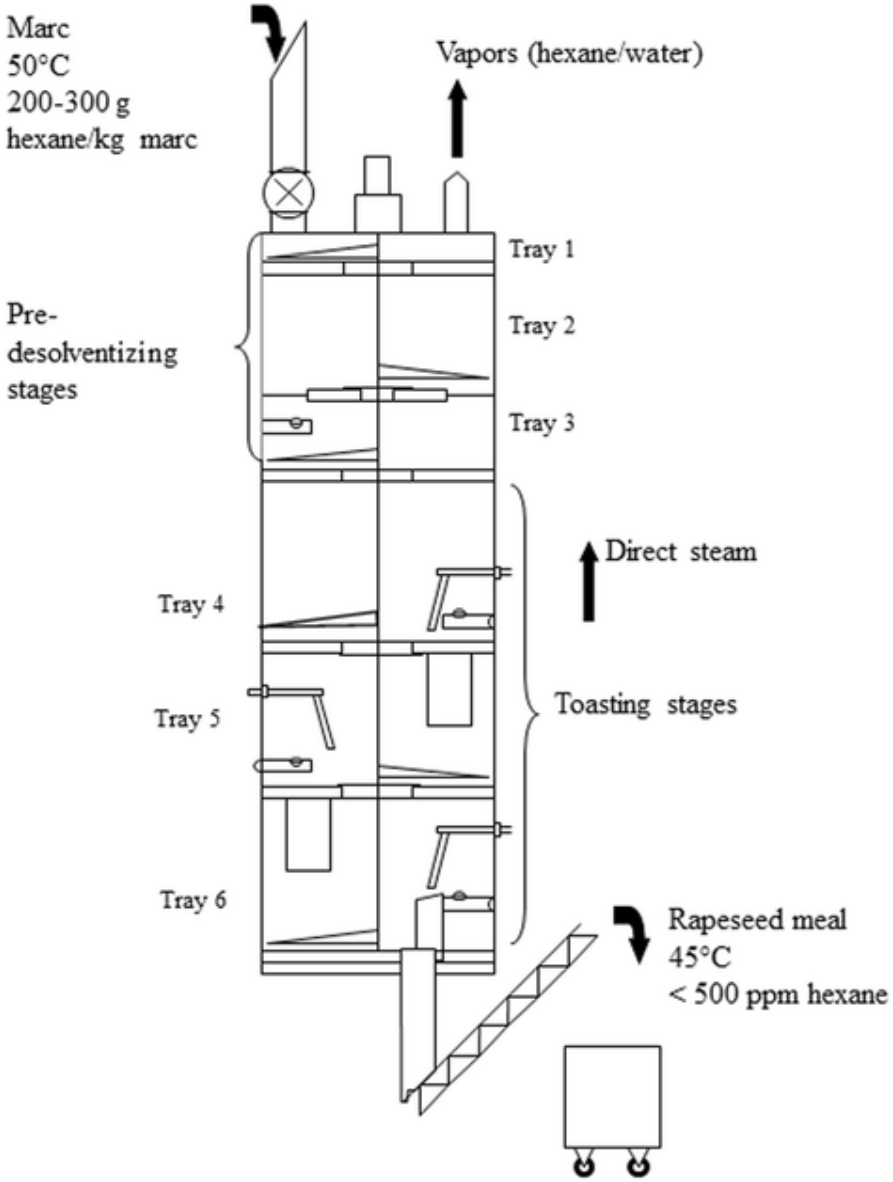
Kuva 15 Paahtunutta rapsinsiemenmassaa DT-käsittelyn jälkeen. Käsitelty kasviaines on muuttunut ruskeammaksi muun muassa sokerien ja proteiinien muodostaessa yhdisteitä keskenään. (Kandouj Company, 2016)



Kuva 16 Rapsin siemenen prosessoinnin pilottivaiheen vuokaavio. (Mosenthin, et al., 2016)

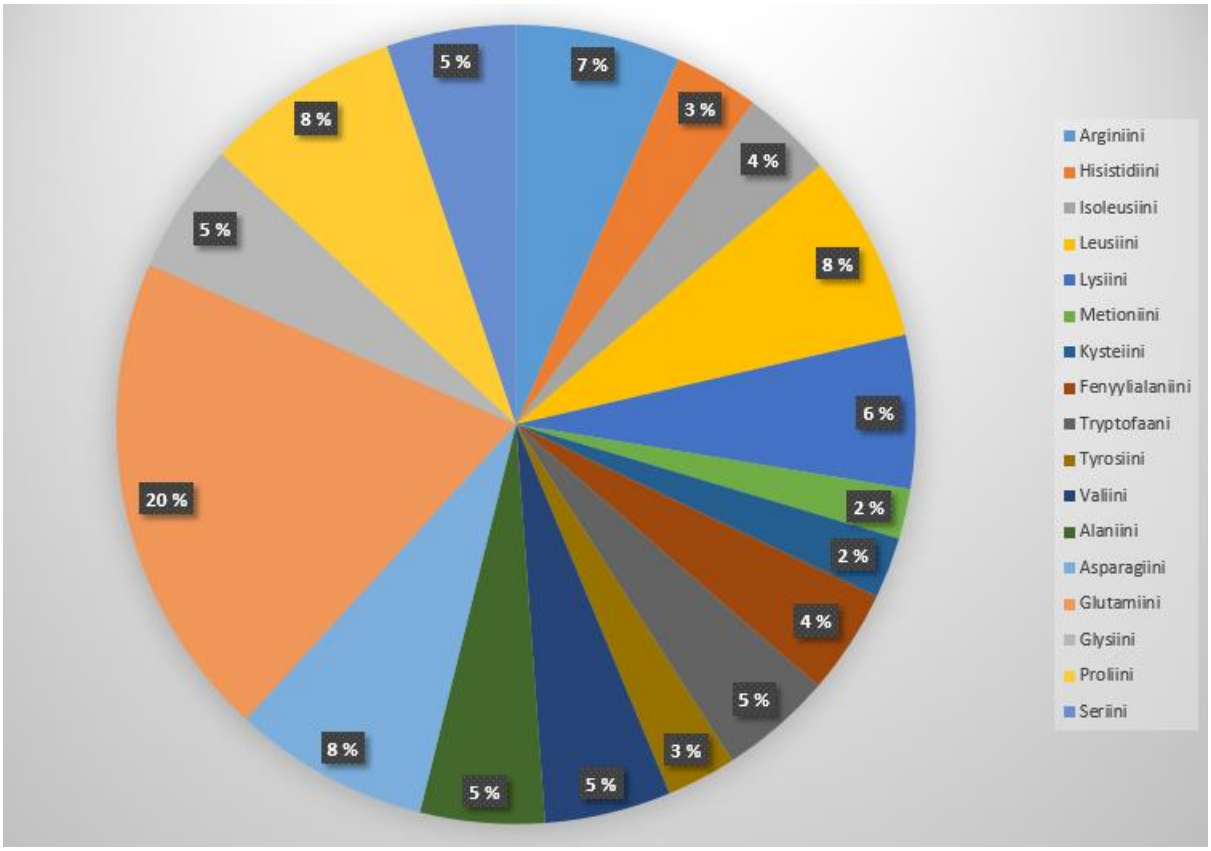
Yksi mahdollinen lempeämpi menetelmä heksaanin poistoon, jossa proteiinimassa ei denaturoidu tai siinä tapahdu muita ei-haluttuja reaktioita, on nk. flash-prosessi. Ylikuumennettu siemenmassan kanssa kontaktiin tuotava heksaani höyrystää nestemäisen heksaanin, jonka jälkeen molemmat imetään siemenkakusta tyhjiöllä ja jäähdytetään. Tätä menetelmää käytetään jo sille 5 %:lle soijasta, joka ei mene eläinten rehuksi. Koska rapsiproteiinille on jo olemassa markkinat rehupuolella ja pelkkä öljynerotus tuottaa hyvin voittoa rapsista (70 - 80 %) soijankäsittelylaitoksiin verrattuna (40 %), on öljyntuottajilla vähemmän halukkuutta kalliisiin investointeihin jälkikäteisasennuksina. (Mupondwa, et al., 2018)

Kysteiinin eristämiseen liuotinkäsitellystä rapsiproteiinikakusta voivat vaikuttaa sen öljynerotuksen esikäsittelyn (T = 85 - 95 ºC, kosteus 4,5 - 6 %, t = 30 - 40 min) ja heksaanin talteenottovaiheissa (T = 95 - 115 ºC, t = 35 - 50 min) käytetyt prosessiolosuhteet. (Adewolea, et al., 2016)



Kuva 17 Schumacher-tyyppinen liuottimen talteenotto-paahto-laitteisto (DT). Marc = liuotinuuton jälkeinen laitteiston yläpäähän syötettävä siemenkakku, jossa on vielä heksaania jäljellä. Laitteiston alapäähän injektoitu vesihöyry lämmittää siemenmassassa olevan heksaanin höyrystäen sen. Heksaanista rikas vesihöyry poistuu laitteiston yläpäästä ja heksaanista köyhä rapsinsiemenmassa poistetaan alhaalta. (Mosenthin, et al., 2016)

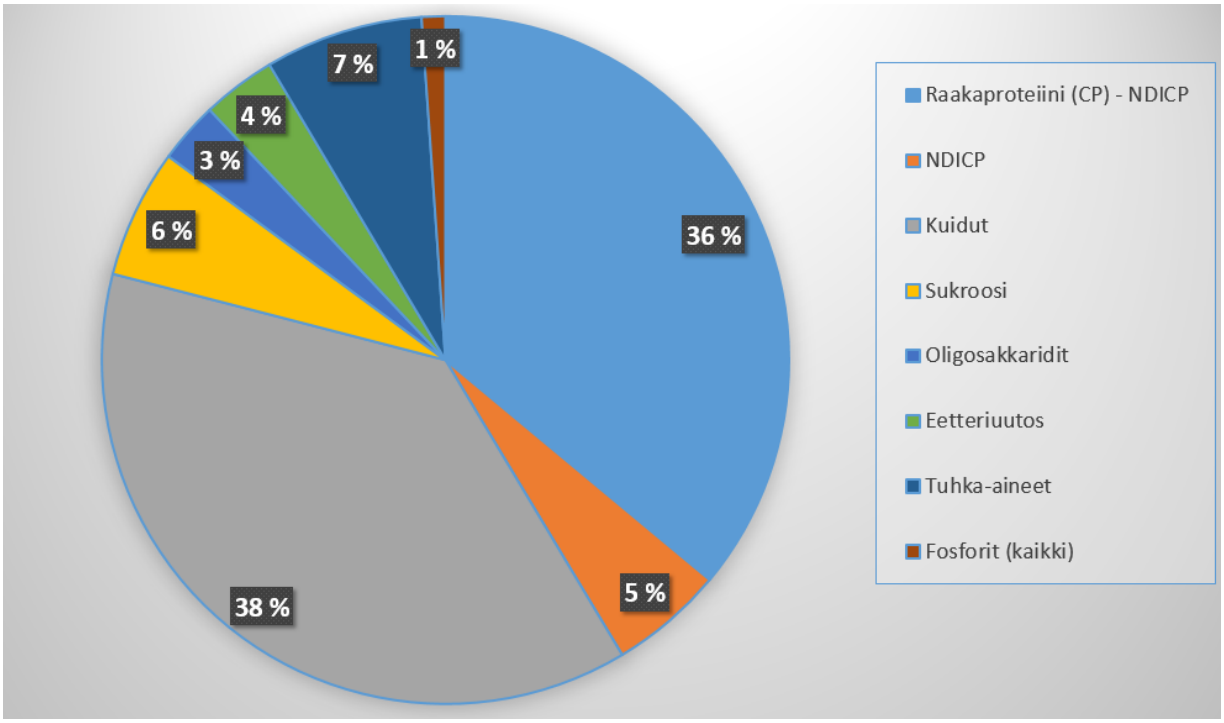
Neutraaliin pesuliuokseen liukenemattoman raakaproteiinifraktion (Neutral Detergent Insoluble Crude Protein, NDICP) (FTL, 2005) määrä DT-siemenkakussa lisääntyi huomattavasti yli 110 ºC:n lämpötiloissa ravintokuidun ja proteiinin merkittävän sulavuuden laskun lisäksi. NDICP on siis proteiinia, joka on rehumateriaalin sisältämään ligniiniin, selluloosaan ja hemiselluloosaan kovalenttisesti sitoutunutta proteiinia (Licitra, et al., 1996), minkä sisältämät aminohapot, kuten kysteiini, ovat vaikeammin erotettavissa matriisista. Sulavampien proteiinin osuus nousi huomattavasti aina 108 ± 1 ºC saakka. (Slominski, 1997).



Kuva 18 Keskimääräinen raakaproteiinin aminohappokoostumus kanadalaisissa DT-käsitellyissä rapsinsiemenkakuissa. (Adewolea, et al., 2016)

Neljän vuoden (2011 - 2014) aikana yhdestätoista kanadalaisesta rapsiöljytehtaasta kerätyistä DT-näytteistä kävi ilmi, että keskimääräinen raakaproteiinipitoisuus (CP, Crude protein) oli kuivapainossa mitattuna 42 w-% (Kuva 19) ja kysteiinipitoisuus koko massassa oli 0,84 w-%. Kysteiiniä oli mitattavissa olevassa (34,0 w-%) raakaproteiinimäärässä 2,5 w-% (Kuva 18). (Adewolea, et al., 2016)

Lysiiniä (keskimäärin 2,1 w-%) on tarkasteltu kokeissa, koska se reagoi herkimmin kakussa valmiiksi olevien pelkistävien sokereiden (glukoosi ja fruktoosi) kanssa Maillard-reaktiossa. Suurin lysiinin hajoaminen tapahtuu DT-vaiheessa kosteuspitoisuuksissa 15-18 w-%. Useimmat aminohapot kysteiini mukaan lukien ovat vapaissa muodoissaan alttiina Strecker-hajoamisille, joissa muodostuu tummia pigmenttejä. Korkea NDICP-pitoisuus voi johtua siemenkakun ylikuumenemisesta joissain tehtaissa. (Adewolea, et al., 2016)



Kuva 19 Kanadalaisten DT-käsiteltyjen rapsinsiemenkakkujen sisältämien aineiden keskimääräisiä pitoisuuksia kuivapainoa kohden ilmaistuna. (Adewolea, et al., 2016)

Kuva 19 kertoo, että kuituun sitoutuneen proteiinifraktion pitoisuus DT-käsitellyssä rapsinsiemenkakussa on seitsemän kertaa pienempi kuin vapaan proteiinin määrä. Kuidun osuus on huomattavan suuri, reilusti yli kolmasosa kakun kuivapainosta. Kakkua on käsiteltävä edelleen raakaproteiinin sisältämän vesiliukoisen napiini-fraktion eristämiseksi, jotta etenkään siemenkakun sisältämät ja vielä vapaana olevat pelkistävät sokerit eivät reagoisi lopulta talteen otettavan kysteiinin kanssa. Hyvänä puolena lysiiniin verrattuna kysteiini on paremmin suojattuna syvemmällä sisällä proteiinirakenteissa sekä vakaampana muotona disulfidisidoksin.

On mahdollista, että esimerkiksi alikriittisellä vedellä DT-rapsinsiemenkakusta saatavaa vesiliukoista proteiinia käsiteltäessä sen sisältämät Maillard-reagoineet sokeri-peptidi-tuotteet reagoivat uudelleen vapautuvien aminohappojen kanssa muodostaen pidempiä melanoideja etenkin korkeammissa lämpötiloissa ja paineissa (Peterson, et al., 2010). Käytännössä nämä vaikutukset olisi kokeellisesti testattava. Maillard-reaktioita halutaan siis välttää kysteiiniä irrottaessa, jotta saanto ei laskisi.

(Pińkowska, et al., 2014) havaitsivat rapsinsiemenkakkua alikriittisessä vedessä hydrolysoidessaan, että vesiliukoisen fraktion vapaiden aminohappojen pitoisuutta saattoivat vähentää niiden dekarboksylaatioiden ja deaminaatioiden lisäksi aminohappojen, peptidien ja proteiinien sekä oligomeerien ja hiilihydraattien väliset Maillard-kondensaatioreaktiot ja niiden tuotteina syntyvät typpipitoiset polymeerit, melanoidit. Syntyneet melanoidit voivat myös hajota edelleen. 100 – 300 ºC:n lämpötilassa termisiä reaktiotuotteita ovat pääasiassa pyratsiinit, pyridiinit, pyrrolit ja furaanit. (Tehrani, et al., 2002) Koska rapsinsiemenkakussa olevien muiden aineiden ja proteiinin välillä voi tapahtua paljon sivureaktioita, olisi hyvä saada proteiinimassa tämän estämiseksi eroon muista.

Kysteiinin tuotannon kannalta ylimääräiset reaktiot eivät ole toivottavia, mutta voivat olla silti yleisellä tasolla jopa taloudellisesti kiinnostavia. Yhtenä esimerkkinä kahdella proteaasilla valmistettua rapsiproteiinin peptidiseosta, D-ksyloosia ja kysteiiniä sisältävissä kokeissa saatiin myös miellyttäviä paahdettua lihaa muistuttavia aromiyhdisteitä aikaan hydrolyysin jälkeen. Hydrolysoitujen rapsiproteiinien tutkimista voisi riittää kaupallisessa mielessä siis myös makuyhdisteiden tuotannon suunnalla. (He, et al., 2019)

Item	RSC	RSM48	RSM64	RSM76	RSM93	Low-GSL RSM	Casein
Analyzed composition							
Indispensable AA, g/kg DM							
Arg	17.7	22.1	21.5	20.6	20.6	20.9	35.3
His	7.8	10.1	10.0	10.0	10.0	10.0	29.1
Ile	11.9	15.3	15.3	15.2	15.0	14.6	45.4
Leu	20.9	27.0	26.7	26.8	26.8	26.6	92.3
Lys[2]	17.0	19.5	18.8	17.7	17.2	17.2	78.2
Met	5.9	7.6	7.4	7.6	7.4	7.4	28.7
Phe	11.7	15.3	15.0	15.2	15.1	15.1	50.8
Thr	13.4	17.6	17.1	17.3	17.5	17.5	43.1
Trp	ND[3]	5.1	5.0	5.1	5.1	5.1	12.5
Val	15.6	19.7	19.6	19.7	19.1	18.6	58.6
Dispensable AA, g/kg DM							
Ala	13.2	17.1	16.8	17.0	17.0	16.8	30.1
Asp	21.8	28.3	27.7	27.9	27.6	27.4	71.1
Cys[2]	7.2	9.1	8.9	8.8	8.7	8.3	5.8
Glu	47.0	60.3	59.5	59.9	59.6	59.3	217.0
Gly	15.6	20.1	19.8	20.1	20.0	19.7	18.0
Pro	17.5	22.4	23.5	24.0	22.8	22.2	110.6
Ser	12.5	16.4	16.2	16.0	16.7	16.7	58.9
Reactive Lys[2]	13.8	16.0	15.2	13.1	12.5	13.3	ND[3]
Lys:CP ratio,[2] g/g	0.058	0.051	0.050	0.047	0.045	0.045	ND[3]

Kuva 20 Rapsinsiemenkakun (RSC), eri aikoja (minuutteja) liuottimen poistoa ja paahtoa matkivissa olosuhteissa käsiteltyjen rapsinäytteiden (RSCXX), matalan glukosinolaatin rapsinäytteiden (Low-GSL RSM) ja kaseiinin (Casein) sisältämien aminohappojen pitoisuuksia (g/kg). ([2]Lineaarinen kysteiinin ja lysiinin pitoisuuksien aleneminen ajan kasvaessa välillä 48-93 min). (Eklund, et al., 2015)

Kuva 20 antaa ymmärtää, että kysteiinin pitoisuus ei-kylläisellä höyryinjektiolla ja epäsuoralla (140 ºC) lämmityksellä käsiteltäessä laskee lineaarisesti ajan funktiona, kun tarkoituksena on matkia liuottimen poistoa ja paahtoa (DT) viimeisessä rapsikakun prosessointivaiheessa. Kysteiinin pitoisuus ei laske kuitenkaan dramaattisesti käsittelemättömään kakkuun verrattuna ja on samassa linjassa muiden aminohappojen pitoisuuksien muutoksen kanssa alun ja 48 min näytteiden välillä. (Eklund, et al., 2015)

Yhteenvetona DT-rapsinsiemenkakkuja voisi siis hyvin käyttää kysteiinin pitoisuuksien puolesta sen eristämiseen. Napiinin eristämistä liuotinkäsitellystä siemenkakusta vesiliukoseen sekä cruciferiinin ja muiden komponenttien yhteistä sakkauttamista pois on vain selvitettävä ensin, jotta rikkain proteiinijae saataisiin eristettyä mahdollisimman puhtaana seuraavaa prosessivaihetta ajatellen.

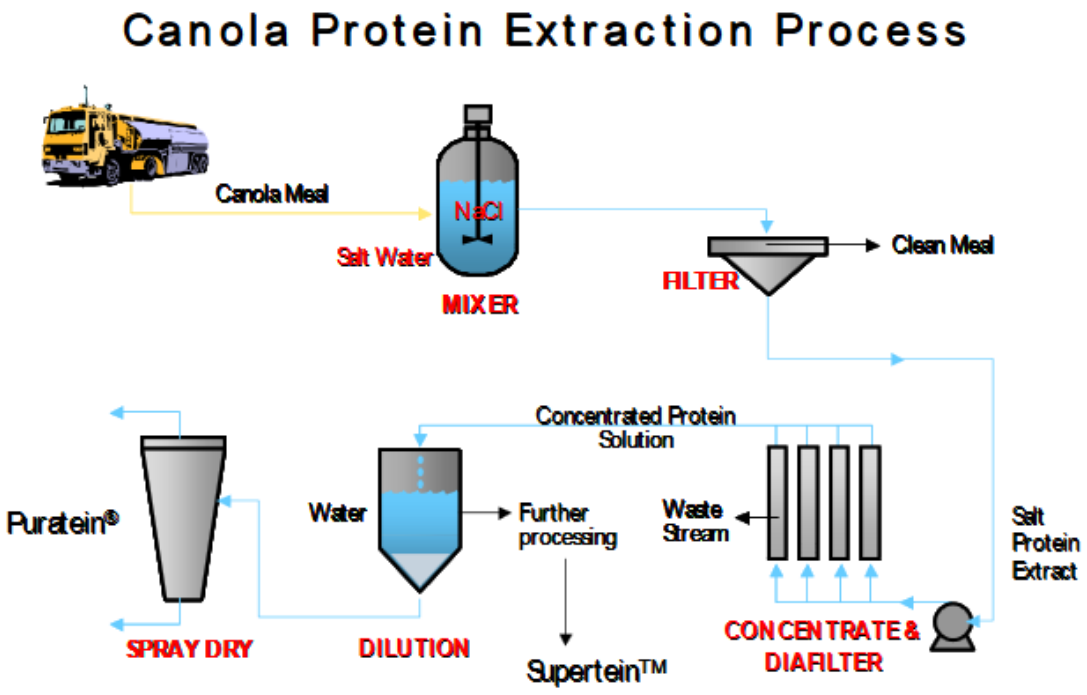
6 Rapsin proteiinien käsittely

6.1 Rapsin proteiini-isolaattien valmistus

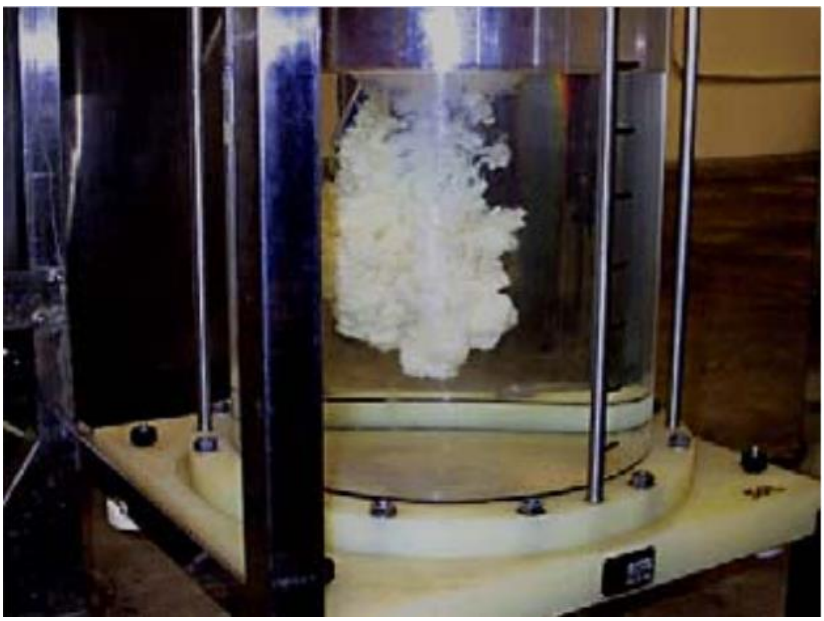
Rapsin proteiinikonsentraattien valmistuksessa kasviöljyerotuksen jälkeisestä puristekakusta poistetaan siemenkuori ja alkoholiin liukenevat pelkistävät sokerit (kuten glukoosi ja galaktoosi), glukosinolaatteja sekä fenolisia yhdisteitä. Saatu n. 70 % proteiinirikaste voidaan jalostaa n. 90 % proteiini-isolaatiksi erilaisin tavoin, jotka menetelmästä riippuen sisältävät erilaisia proteiinijakeita sekä niiden kanssa reagoineiden muiden aineiden välisiä yhdisteitä. (Wanasundara, et al., 2016) Elintarvikelaatuisissa tuotteissa on tärkeää, ettei sivumakuja tai voimakkaita värejä päädy lopputuotteeseen ja että mahdollisesti erotuksessa käytettäviä aineita, kuten voimakkaita happoja, emäksiä tai niiden suoloja ei isolaatissa myöskään esiinny.

Ruokateollisuudessa käytettävistä rapsiproteiinin erotusoperaatioista eräs patentoiduimmista ja kaupalliseen käyttöön sopivimmista on proteiinin misellöinti-menetelmä (Protein Micellation Method, PMM). Siinä öljynerotuksen jälkeinen proteiinia sisältävä natriumkloridin vesiliuos pidetään samassa ionivahvuudessa proteiinipitoisuuden ultrafiltteröinnillä konsentroinnin ajan. Tämän jälkeen lähellä neutraalia pH:ta olevaa liuosta laimennetaan, jolloin pääasiassa cruciferiinia sisältävät proteiinit alkavat toisiinsa tiivistyessään muodostaa pilvimäistä miselliä laimennusliuokseen. (Hiron, 2006)

Konsentroituneen proteiinin annetaan laskeutua ja muodostaa tiheää gluteenimaista massaa, joka kuivataan. Tämä sisältää yli 90 % proteiinia, josta 60 - 98 % luokitellaan ryhmään 7S, 1 - 15 % ryhmään 12S ja 0 – 25 % ryhmään 2S. (Hiron, 2006) Ryhmä 7S:n yliedustus jakeessa on oletettavasti seurausta voimakkaan ionivahvuuden liuoksen laimennusprosessista ja 12S-heksameerien pilkkoutumisesta trimeereiksi. (Schneider, et al., 1989) Laskeutuneen proteiinin yläpuolelle jäänyt vesiliuos, supernatantti, sisältää enimmäkseen vesiliukoista napiinia. Kuivattu supernatantti sisältää siis yli 90 % proteiinia, josta 0 – 5 % kuuluu ryhmään 12S, 5 – 40 % ryhmään 7S ja 60 – 95 % ryhmään 2S. (Hiron, 2006)



Kuva 21 Kanadalaisen Burcon NutraSciencen kehittämä rapsin proteiinien erotusprosessi, jossa lopputuotteena on ovat napiinista (2S) rikas Puratein® ja enimmäkseen cruciferiinia (12S) sisältävä Supertein®. Trimeereiksi (7S) hajonnutta cruciferiinia on molemmissa jakeissa painottuen vähemmän vesiliukoiseen Puratein®:iin. (Schweizer, et al., 2007)



Kuva 22 Konsentroidun rapsiproteiini-NaCl-liuoksen laimentamista kylmään veteen Burcon NutraSciencen proteiinierotuksen pilotissa. Pilvimäinen massa on korkean molekyylimassan proteiinien (cruciferiinin) sakkautumista ja tiivistymistä matalan molekyylimassan napiinien jäädessä liuokseen. (Schweizer, et al., 2007)

Koska rapsiproteiini-isolaattia on mahdollista valmistaa jo nyt kahtena eri jakeena sen helppouden vuoksi ja koska toinen näistä sisältää jo valmiiksi hyvin paljon napiinia (2S-albumiinia 60 - 95 %, kysteiiniä 4,5 %) (Hiron, 2006), voi kysteiinin erottamiseksi rapsin tapauksessa keskittyä jo valmiin prosessin jatkokehittelyyn. Edellisten kappaleiden tapauksessa rapsiproteiinia sisältävän vesiliuoksen konsentrointi ja kuivaus vievät huomattavia määriä energiaa. Kysteiiniä sisältävien proteiinien pilkkominen tapahtuu lisäksi kohtuullisen laimeassa vesiliuoksessa, joten kysteiinin erottamisen integrointi valmiiseen tehdasympäristöön voisi olla taloudellisesti hyvinkin kannattavaa.

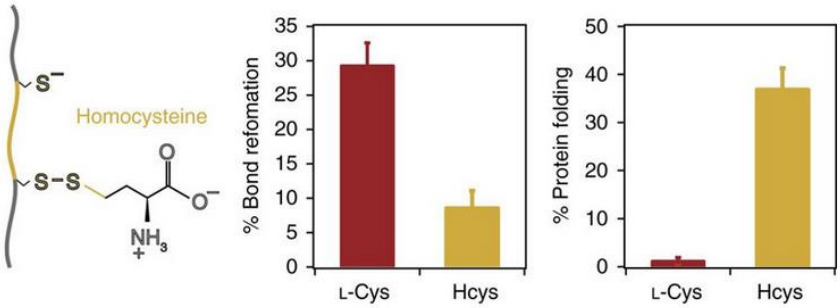
Burconilla on patentti (US7750119B2) myös hyvin puhtaan napiinijakeen tuottamiseen kationinvaihtokolonnilla, matriisina SP Sepharose XL. Funktionaalisena ryhmänä hartsissa toimii sulfopropyyli (-CH_2 $CH_2CH_2S0_3^-$), joka on vakaa pH:ssa 2 - 12. (Merch KGaA, 2007)

Veteen liukenemattoman proteiinijakeen sakkauttamisesta liuokseen jäljelle jääneeseen napiini-rikkaaseen osaan liotetaan NaCl niin, että sen konsentraatio on välillä 0,25 - 0,35 M ja esimerkiksi HCl: llä että NaOH: lla säädetty pH on 5 - 6. Saatu suolarikas liuos viedään kationinvaihtokolonnin läpi, jolloin vain napiini tarttuu kiinni paikallaan olevaan kiinteään faasiin. Napiini irrotetaan kolonnista voimakkaammalla suolaliuoksella (0,55 - 0,65 M) ja suolaton lopputuote saadaan dialysoimalla NaCl pois ultrafiltterin läpi. Kromatografilla tutkitun näytteen puhtaus oli patentin mukaan 99,85 %. (Segall & Schweizer, 2010)

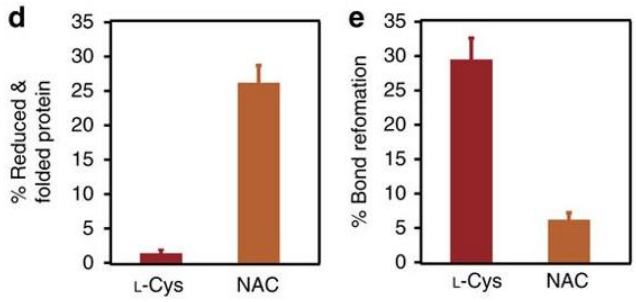
Burcon NutraSciencen vuosittaisessa katsauksessa vuodelta 2018 todetaan yhtiön tarvitsevan uusia strategisia kumppaneita herne- ja rapsiproteiini-isolaattien kaupallistamiseksi. Tällä hetkellä ainoa yrityksen markkinoilla saatavilla oleva tuote on ADM:n (Archer Daniels Midland Company) kanssa yhteistyönä valmistettava soijakonsentraatti. (Burcon NutraScience Corp., 2018) Soija- ja heraproteiinivalmisteet ovat saaneet jo tuotanto- ja jakeluketjut valmiiksi ja vallanneet markkina-alueensa elintarviketeollisuudessa edullisina proteiinilähteinä. (Mupondwa, et al., 2018) Rapsiproteiini-isolaatit ovat uusia elintarvikkeita ja vaativat vielä kumppanien löytymisen jälkeen elintarvikeluvat EU:n alueella. (Burcon NutraScience Corp., 2018)

6.2 Rapsin proteiinien kysteiinien disulfidisiltojen avaaminen

Ennen entsymaattista käsittelyä disulfidisillat on avattava jotenkin. Pelkistämällä ne esimerkiksi natriumbisulfiitilla (Li, 2012), homokysteiinillä tai N-asetyyli-kysteiinillä (Beedle, et al., 2017) saadaan aikaan pelkkää kysteiiniä kestävämpiä sidoksia, jotka eivät muutu yhtä herkästi ajan kuluessa. (Segall, et al., 2014) L-kysteiinillä on jatkoprosessoinnin kannalta huono taipumus rikki-rikki-sidoksen avaamisen jälkeen sitoa se uudelleen samaan tai toiseen rikkipitoiseen kohtaan. (Kuva 23) (Kuva 24)



Kuva 23 L-kysteiini eroaa kemiallisilta ominaisuuksiltaan huomattavasti homokysteiininstä, vaikka jälkimmäisessä on lisänä vain vasemmanpuoleisessa kuvassa oleva keltaisella merkitty metyleeni-ryhmä rikkisidoksen oikealla puolella. Keskimmäisessä kuvassa nähdään, että eronneiden kaksoissidosten uudelleen liittyminen on homokysteiinillä paljon pienempää kuin L-kysteiinillä. Oikeanpuoleinen kuva näyttää suhteellisen eron hapettuvassa laskostumisessa, jota homokysteiini estää tehokkaasti. (Beedle, et al., 2017)



Kuva 24 Myös NAC eli N-asetyylikysteiini on homokysteiinin tavoin paljon tehokkaampi estämään hapettuvaa laskostumista takaisin pelkistetystä muodosta L-kysteiiniin verrattuna. (Beedle, et al., 2017)

Keratiinia hydrolysoivien keratinaasien tapauksessa on havaittu, että vahvojen disulfidisidoksien aukaisemiseen tarvitaan disulfidisidos-reduktaasia (erityisesti rikkisidoksia aukaiseva entsyymi) tai sulfitolyysiä, jotta varsinainen proteaasi voisi toimia. Sulfitolyysissä keratiinien peptidiketjujen välisten rikkisidoksen aukaisun jälkeen tioliryhmä (S-H) vapautetaan kokonaan. Esimerkiksi natriumsulfiitilla (Na_2SO_3) pelkistettäessä rikkisillan eri puolet jakautuvat kysteiiniksi (-S-H) ja S-sulfokysteiiniksi (-S-SO_2-OH). Disulfidisidosten katkaisu on siis ennakkovaatimus tavallisen entsymaattisen aminohappojen välisiä sidoksia pilkkovan hydrolyysin toimimiselle. (Sharma & Devi, 2018)

Soijaproteiini-isolaatteja tutkittaessa havaittiin, että Na_2SO_3 konsentraatiolla 0,01%, joka laskennallisesti riittäisi pelkistämään proteiinien väliset ja sisäiset rikki-rikki-sidokset, edisti AB-11S-aliyksikön hajoamista ja pienempien yksiköiden tiivistymistä yhteen jo ennen lämmittämistä. Tutkittu denaturointi 90 ºC ja 100 ºC lämpötiloissa AB-aliyksiköiden pelkistämisessä natriumsulfiitilla ei silti toiminut. Alhaisemmissa denaturointi-lämpötiloissa tapahtui tiivistymistä, joka vaikeutti sulfiitin pääsyä paljastuneille SS-sidoksille**.** Auringonkukan tai rapsin proteiinin agglomeroituminen voi ainakin näissä lämpötiloissa mahdollisesti haitata rikkisidosten pelkistämistä olettaen niiden käyttäytyvän samalla tavalla kuin soijan vastaavissa. Korkeamman kuin 100 ºC lämpötilan käyttö, eli käytännössä alikriittiset lämpötilat voisivat auttaa proteiiniyksiköiden pitämisessä erillään. (Petruccelli & Añon, 1995)

Itse kysteiiniä (E920) on natriumsulfiitin (E221) kanssa käytetty ruokaproteiinien pilkkomiseen jo 60-luvulla, kuten soijan proteiinien muodostamien geelien viskositeetin laskemiseen (10 % dispersioon asti myös lämmitettynä). (Hamada, 1997) Saman tyyppinen agglomeroituminen on kyseessä myös soijalla korkeammassa lämpötilassa. (Petruccelli & Añon, 1995)

Huoneenlämpötilassa alkalihydrolyysillä valmistetun soijaproteiini-isolaatin viskositeetin käyttäytymistä lämpötilassa 20 ºC tutkittaessa havaittiin, että yli kahdeksasta aliyksiköstä koostuneet disulfidisidoksilla muodostuneet aggregaatit hävisivät täysin natriumsulfiitilla käsiteltäessä. Kun natriumsulfiitti poistettiin, viskositeetti kasvoi uudelleenhapettumisen myötä, mutta ei alkuperäisiin arvoihin agregaattien muodostuessa uudestaan pienempinä tilavuuksina tai määrinä verrattuna käsittelemättömään isolaattiin. (Petruccelli & Añon, 1995)

6.3 Rapsin ja auringonkukan proteiinien entsymaattinen hydrolyysi

Rapsin proteiinijakeen albumiinien entsymaattista hydrolyysiä tutkittiin Xue et al. toimesta Huaza3-lajikkeella ensin Alcalase-nimisellä seriiniä sisältäviä kohtia pilkkovalla entsyymillä, jonka jälkeen Flavourzyme-seos sieniperäisiä entsyymejä paloitteli ketjuja edelleen pienempiin osiin. Hydrolyysiaste, DH (eli auenneiden peptidisidosten osuus kaikkiin peptidisidoksiin), samalla käsittelyllä eri tutkimusryhmillä auringonkukalla saavutti 50 % ja 60 % (Megias, et al., 2007) (Villanueva, et al., 1999), kun taas rapsilla se oli 30 %. (Xue, et al., 2009)

Suuret havaitut ryhmät olivat peptidejä ja loput pienemmät jakeet vapaita aminohappoja, sakkarideja ja suoloja. Entsyymikäsittelyn jälkeen tryptofaani hajosi täysin ja glutamiini sekä asparagiini muuntuvat glutamiinihapoksi ja asparagiinihapoksi. Kolme jaetta sisältävät paljon arginiinia, glutamiinihappoa, fenyylialaniinia, leusiinia, tyrosiinia ja proliinia. Vapaat ja varautuneet C- ja N-pääteryhmät peptidiketjujen päissä edesauttoivat niiden liukenemista veteen. (Xue, et al., 2009)

Rapsin hydrolysoituminen on vähäisempää kuin auringonkukalla ja aminohappoja hajoaa tai muuntuu entsyymikäsittelyjen aikana. Näiden takia oikean entsyymin valintaan kannattaa käyttää aikaa ja kokeilla käytännössä, millaisia peptidejä syntyy.

Vioque et al. raportoi Alcalase-entsyymin (alkalaasi) toimintaa estävistä peptideistä, kun rapsiproteiinia hydrolysoitiin viimeksi mainitulla ja Flavourzymella vuorotellen. Molekyylipainoiltaan 8,4 ja 5,1 kDa olevat hydrolyysiä estävät inhibiitorit ovat sitoutuneet toisiinsa disulfidisidoksilla muodostaen tutkimuksissa nähdyn yksittäisen piikin molekyylipainolla 18 kDa. Inhibiittorit muistuttavat rakenteeltaan paljon tuttuja varastoproteiineja, 2S-albumiineja eli napiineja. Niiden metioniini- (4,2 %) ja kysteiini- (4,2 %) pitoisuudet ovat suuret, kolme kertaa suuremmat kysteiinille ja kaksi kertaa suuremmat metioniinille kuin pel-

kässä proteiini-isolaatissa. Proteaasien inhibiittoreissa näyttäisi olevan korkea rikkiaminohappo-pitoisuus, jolloin muodostuvat disulfidisillat suojaavat sitä entsymaattiselta proteolyysiltä. (Vioque, et al., 2001) Disulfidisiltojen aukaiseminen on tehtävä ensimmäiseksi ennen entsymaattista hydrolyysiä, jotteivat proteiinin pilkkomisreaktiot hidastu ja kysteiinin tuotantokustannukset nouse.

Kirjallisuudesta löytyi kasvi- ja bakteeriperäisiä entsyymejä, joilla on napiinien ja cruciferiinin aminohapposekvenssin järjestyksen ja kysteiinien sijoittumisen huomioon ottaen edullisia ominaisuuksia. Kahden pitkän peptidiketjun välisten disulfidisidosten pelkistämisen jälkeen endopeptidaasit pääsevät käsiksi rakenteisiin ja pilkkovat ne pienempiin pätkiin. Kysteiinin rikastamisen kannalta olisi hyvä, jos syntyneiden kysteiini-pitoisten peptideiden koko olisi mahdollisimman pieni ja niillä olisi sellaiset fysiokemialliset ominaisuudet, että niiden erottaminen muista peptideistä olisi mahdollisimman helppoa ja valikoivaa. Entsymaattisen hydrolyysin jälkeen kysteiini-pitoiset peptidit pilkotaan mahdollisuuksien mukaan vapaiksi aminohapoiksi sekä erotetaan muista hajoamistuotteista.

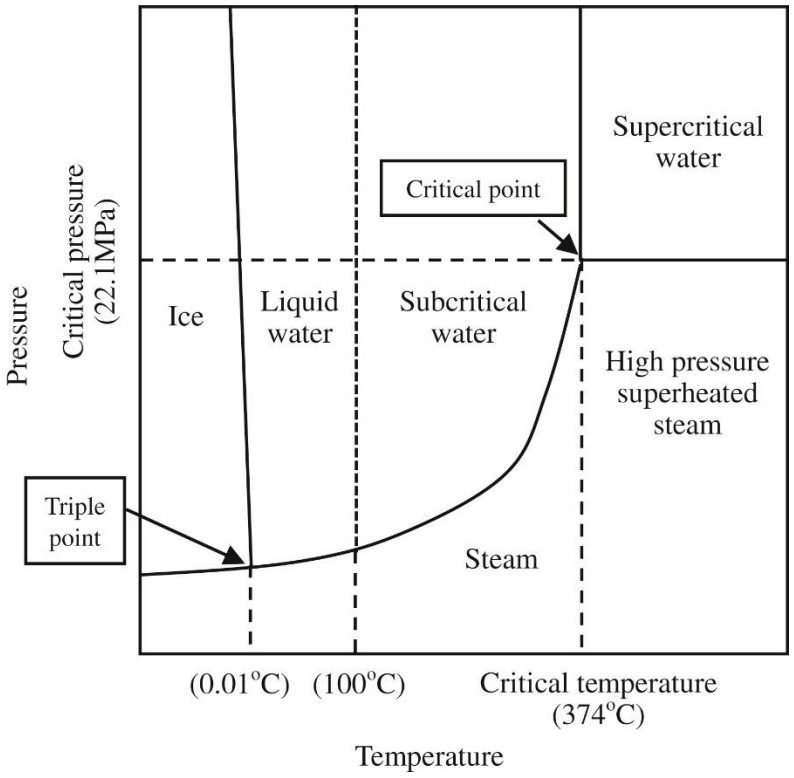
Hajottamiseen voidaan käyttää perinteistä HCl:llä tehtävää happohydrolyysiä, mutta jos peptideissä on paljon muita aminohappoja, syntyy sivutuotevirtaa ja mahdollista jätettä samalla tavalla kuin muutoin halvalla tehtävässä keratiinin hydrolyysissä. Rikastusvaihe tehdään pH:ta säätelemällä, että vuorottaisella suolahappo-aminohappo-suolon uudelleenkiteytyksellä, suodatuksella ja pesulla. (Xiè & Xiè, 2016)

Toinen kirjallisuudesta löydetty ja lupaavalta vaikuttava vaihtoehto happohydrolyysille on alikriittinen vesiuutto, jossa käytännössä proteiinihydrosylaatin vesiliuos laitetaan (korkea)painekeittimeen. Eksoottisemmassa olotilassa vaikuttava vesi erottaa aminohappoja toisistaan. (Ramachandraiah, et al., 2017) Varsinainen aminohappojen rikastus tapahtuu esimerkiksi UF-membraaneilla (He, et al., 2016), kokoerottelukromatografialla (geelisuodatuksella) (Yang, et al., 2016) tai jäähdytyskiteytyksellä. (Xiè, 2017)

7 Alikriittisen ja korkean lämpötilan veden käyttö uutossa

7.1 Yleisesti alikriittisestä vesiuutosta

Veden ollessa nestemäisessä olomuodossa T= 200 - 374 ºC ja p < 218 atm (alle superkriittisen tilan) puhutaan korkean lämpötilan vedestä (HTW). Alikriittinen vesi (SCW) kattaa terminä lämpötilat 100 - 374 ºC. Vesi käyttäytyy lämpötilaa nostettaessa etenevässä määrin yksinkertaisen kaasun tavoin tiheyden laskiessa sekä muodostaa vähemmän ja heikompia vetysidoksia vesimolekyylien välillä. Vesimolekyylit muodostavat laajan vetysidosverkon sijaan kasaumia, joiden koko pienenee lämpötilan kohotessa. (Akiya & Savage, 2002) (Sunphorka, et al., 2012)

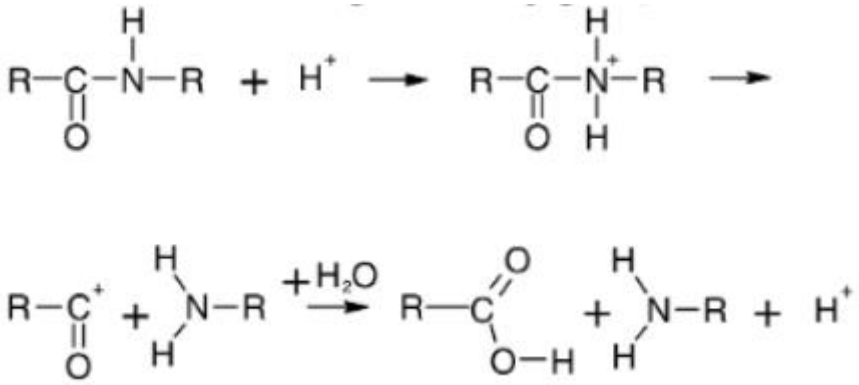


Kuva 25 Alikriittinen vesi (Subcritical water) faasialueena. (Okajima & Sako, 2014)

Veden staattinen dielektrinen vakio laskee lämpötilan kohotessa, huoneenlämpötilassa se on 78 ja esimerkiksi 300 ºC:ssa se pienenee arvoon 21. Tietyissä olosuhteissa vesi alkaa tämän takia käyttäytyä enemmän polaarisen orgaanisen liuottimen kuin tavallisen nestemäisen veden tavoin. Pienet orgaaniset yhdisteet esimerkiksi liukenevat paremmin HTW:hen epäorgaanisten suolojen liukoisuuden samalla pienentyessä. (Akiya & Savage, 2002)

HTW:n diffuusiivisuus kasvaa selvästi, kun vetysidoksia on vähemmän ja molekyylit pääsevät pyörimään ja kääntyilemään vapaammin. (Akiya & Savage, 2002)

Veden lämpötilan nosto esimerkiksi huoneenlämmöstä lähelle kriittistä lämpötilaa kasvattaa sen ionisaatiovakiota K_w (1×10^{-14}) tuhatkertaiseksi, jolloin hydronium- (H_3O^+) ja hydroksidi- (OH^-) ionien konsentraatio kasvaa. (Akiya & Savage, 2002) Tällöin HTW voi toimia hyvin happo- ja emäskatalysoiduissa reaktiossa sekä katalysoida esimerkiksi proteiineilla hydrolyysiä ja hajoamisreaktioita. (Sunphorka, et al., 2012)



Kuva 26 Proteiinien hydrolyysissä protoni kiinnittyy peptidisidoksessa olevaan typpeen irrottaen syntyneen aminoryhmän ja hiili-kationi-ryhmän toisistaan. Lopuksi läheinen vesimolekyyli luovuttaa hydroksidi-ionin karboksyyliryhmän muodostamiseksi ja vapauttaa protonin takaisin liuokseen. Sama mekanismi toimii sekä veden autoionisoituessa nopeutuen korkeammissa lämpötiloissa, että happohydrolyysissä. (Brunner, 2009)

7.2 Proteiinien hydrolyysiä alikriittisellä vesiuutolla

Alikriittisen vesiuuton käyttö jo lievissä olosuhteissa (140 ºC, 10 min) aiheutti sen, että rikkiä sisältävien aminohappojen vapaat tioliryhmät tai disulfidisidokset (-SH ja –S-S-) tutkituissa lyhyissä peptideissä hapettuivat sulfini- ja sulfonihapoiksi (-SO_2H ja -SO_3H). Sulfenihappo-välimuoto (-SOH) jää eliniältään lyhyeksi sen joko muodostaessa ympäristöstä riippuen nopeasti disulfidisidoksen tai hapettuessa edelleen sulfini- tai sulfonihapoksi. (Powell, et al., 2017) Rikin ei-toivotun hapettumisen välttämiseksi sen suojaaminen jollain kemiallisella ryhmällä olisi siis tärkeää. (Segall, et al., 2014)

Jätevillan alikriittisessä vesiuutossa 170 ºC lämpötilassa ja 7 bar paineessa (30, 60 ja 90 min) rikkisiltojen rikkoutumisen lisäksi kystiiniä tuhoutui paljon, joka taas mahdollisti dehydroalaniinin ja vapaiden sulfhydryyli-ryhmien reagoimisen ja lanthionin muodostumisen rikkisillalla (-S-). Lisäksi hajonnut kysteiini vapautti rikkiä myös rikkivetynä (H_2S). (Bhavsar, et al., 2016) On huomattava, että edellä mainituissa olosuhteissa ei tarvittu disulfidisidoksien avaamiseen muuta kuin aikaa, vaikka materiaalina on hyvin pitkälle rikkisilloilla verkottunut villa. Todennäköisesti edellisen kappaleen lievät olosuhteet (<140 ºC, kymmeniä minuutteja) riittävät valmiiksi avattujen rapsiproteiinien pilkkomiseen.

Alikriittisen veden hyödyntämistä proteiinien käsittelyssä on käytetty muille yleisille, kokonaisille luonnossa esiintyville eläinproteiineillekin kuin vain villalle. Hemoglobiinia, naudan seerumin albumiinia ja β-kaseiinia vedellä alikriittisesti käsiteltäessä ja verrattaessa entsymaattiseen hydrolyysiin trypsiinillä havaittiin, että lämpötilassa 160 ºC kaikki proteiinit pilkkoutuivat mieluiten asparagiinihapon kohdalta. β-kaseiinin tapauksessa ketjun avautuminen glutamiinihapon kohdalta oli etusijalla lämpötiloissa 160 ºC ja 207 ºC ja naudan seerumin albumiinille sama lämpötilassa 207 ºC. Glutamiinihapon korkeampi pKa vaati korkeamman veden lämpötilan sen ionitulon (tai dissosiaatiovakion) K_w nostamiseksi ja viereiseen aminohappoon liittyvän sidoksen hajottamiseksi. (Powell, et al., 2016)

Disulfidisidosten avautuminen oli rajoittunutta alikriittisessä uutossa, siksi olisi hyvä käyttää esimerkiksi aiemmin mainittua rikkisillan pelkistämistä jollain. Käytetyt lämpötilat ovat melko suuria, joten olisi hyvä kartoittaa myös apukemikaalien käyttöä matalammissa lämpötiloissa, joissa kysteiini ei hajoa herkästi.

Vapaiden aminohappojen konsentraation muutosta eri pH: issa on tutkittu jauhettuja soijapapuja alikriittisellä vedellä uutettaessa. Maksimiarvo konsentraatiolle saavutetaan n. 190 ºC kohdilla, jonka jälkeen pitoisuus kääntyy hitaaseen laskuun aminohappojen hajotessa nopeammin kuin niiden irrotessa peptideistä. Tutkijat päättelivät pH:n noususta korkeammissa lämpötiloissa ja aiemmista tutkimuksista, että hydrosylaateissa oli enemmän emäksistä aminohappoa, lysiiniä lämpötilan noustessa, jonka konsentraatio nousi muiden laskiessa. Tosin sanoen yleisesti aminohappojen uuttamiseksi lämpötilan voisi pitää mielellään ainakin alle 190 ºC olettaen, että auringonkukan ja rapsin proteiinit käyttäytyvät suunnilleen samalla tavalla kuin soijan. (Ramachandraiah, et al., 2017)

Kysteiinin reaktiivisuutta proteiinirakenteissa tutkittaessa on huomattu, että siihen vaikuttavat sen viereiset, polaariset, monesti vetysidoksia muodostavat aminohapot. Polaarisista aminohapoista erityisesti histidiini ja treoniini lisäävät viereisen kysteiinin herkkyyttä hapettumiselle. (Salsbury Jr, et al., 2008)

Kysteiinin pitoisuudet alenivat (Eric, et al., 2013) kokeiden edetessä auringonkukanproteiinin hydrosylaattien reagoidessa tämän ja ksyloosin kanssa. Samat tutkijat (Eric, et al., 2014) huomasivat, että lämpötilavälillä 80 - 100 ºC vapaiden aminohappojen määrä väheni selvästi. Tämä voi johtua Strecker- tai termisistä hajoamisista kysteiinin ollessa läsnä, jossa muodostuu herkästi haihtuvia yhdisteitä.

Korkeissa lämpötiloissa tapahtuvat peptidin hajoamiset vapaiksi aminohapoiksi ja aminohappojen jälleen-yhdistymiset peptidiketjuiksi saavuttavat vesiliuoksissa tasapainotilan. Kysteiini estää myös näiden peptidiketjujen yhteen-linkittymistä siirtäen tasapainotilaa enemmän pienempien peptidiketjujen ja vapaiden aminohappojen puolelle. (Lan, et al., 2010) Kysteiinin lisäys estää myös värillisten melanoidien aminoyhdisteistä ja ksyloosista muodostumista. (Huang, et al., 2010)

Näyttäisi siltä, että sokerien esiintyminen proteiinien ja kysteiinien kanssa edesauttaa alikriittisen vesiuuton olosuhteissa kysteiinin hajoamista ja reagoimista muiden yhdisteiden kanssa. Ilman sokeria kysteiiniä hajoaa korkeammissa lämpötiloissa.

8 Kysteiinin tuotannon taloudellisuus

8.1 Tuotantolaitoksen teknillis-taloudellinen analyysi

Kysteiinin eristämiselle rapsinsiemenkakusta voidaan erottaa selvästi viisi eri vaihetta:

1. Rapsiproteiinin eristäminen rapsinsiemenkakusta esimerkiksi suolavesi-misellöimällä.
2. Rapsiproteiini-isolaatin disulfidisidosten avaus ja kysteiinien suojaus kemiallisella pelkistimellä, kuten natriumbisulfiitilla ja sen jälkeinen esihydrolyysi esimerkiksi entsyymeillä lyhyempien peptidien tuottamiseksi.
3. Entsymaattisen hydrolysaatin erottaminen kysteiiniä sisältämättömiin pieniin, kysteiiniä sisältämättömiin suuriin ja kysteiiniä sisältäviin peptidijakeisiin.
4. Kysteiinistä rikkaan (20 %) rapsiproteiini-hydrosylaatin alikriittinen vesiuutto (1:20 w/v vettä) vapaiden aminohappojen ja kiinnostavien di- ja tripeptidien irrottaminen lyhyemmistä peptideistä.
5. Vapaiden aminohappojen sekä di- ja tripeptidien eristäminen kysteiinistä rikkaasta aminohappo-seoksesta kalvosuodatuksella, kromatografisesti tai suolahapon lisäyksen jälkeisellä uudelleenkiteytyksellä.

Teknillis-taloudellisessa analyysissä käsitellään alikriittistä vesiuuttoa sen suuren lisäarvontuoton, energian- ja vedenkulutuksen että uutuusarvon vuoksi. Seuraavan analyysin pohjana käytettiin alikriittistä vesihydrolyysiä, superkriittistä hiilidioksidiuuttoa ja perinteistä liuotinuuttoa rypälepuristejätteen sisältämille bioaktiivisille fenolisille yhdisteille soveltavaa tutkimusta. (Todd & Baroutian, 2017)

Alikriittisen vesiuuton parametrit ovat sopivat myös kandityölle. Laskelmien yksinkertaistamiseksi tehdään useita tässä luvussa mainittavia oletuksia ja saatava arvio kannattavuudesta onkin siten suhteellisen karkea.

Toiminnan kannattavuuden mittarina voi käyttää nettonykyarvoa (NPV, Net present value), joka kuvaa jatkuvien tulo- ja menovirtojen nykyarvojen erotusta tietyllä ajanjaksolla:

$$NPV = \sum_{t=1}^{n} \frac{C_{In,t}}{(1+r)^t} - C_{Out} \quad (3)$$

$C_{Int,t}$ = Nettokassavirta ajanjaksolla t vuotta.

$C_{Out,t}$ = Alkusijoitus (initial Capital Expenditure, initial CapEx).

r = Ennakkokorko (diskonttokorko), jolla voidaan vertailla rahamäärien arvoa eri ajankohtina. Yleensä oletettava vuotuinen korko, tässä yhteydessä tarkoittaa sijoituksen arvon laskemista.

Nykyarvon suhde (Present Value Ratio, PVR) on positiivisten ja negatiivisten kassavirtojen nykyarvon suhde, jonka ollessa enemmän kuin yksi (1) kertoo investoinnin olevan taloudellisesti kannattava. Alle yhden kerroin tarkoittaa investoinnin olevan kannattamaton.

$$PVR = \frac{Positiivisten\ kassavirtojen\ nykyarvo}{Negatiivisten\ kassavirtojen\ nykyarvo} \quad (4)$$

Valmistuskustannuksen (Cost of manufacture) laskemiseksi käytettiin seuraavaa yhtälöä:

$$\mathrm{COM} = 0{,}304 \text{ x } \mathrm{FCI} + 2{,}73 \text{ x } \mathrm{COL} + 1{,}23 \text{ x } (\mathrm{CU} + \mathrm{CWT} + \mathrm{CRM}) \quad (5)$$

Jossa:

FCI = pääomasijoituksen kiinteä kustannus (Fixed cost of investment)

COL = työntekijäkustannukset suorittavalla puolella ja hallinnoinnissa (Cost of labour)

CUT = juoksevat kulut (Cost of utilities)

CWT = jätteenkäsittelykustannukset (Cost of waste treatment)

CRM = kustannukset raaka-aineille (Cost of raw materials)

Alikriitiselle vesiuutolle elintarviketeollisuudessa on käytetty aiemmin suhteellisen korkeaa tekijää diskonttaukseen, (25 %) koska se on tekniikkana uusi ja käytännön kokemusta teollisuudessa on vähän sen ollessa melko tuntematonta aluetta sekä sisältäen enemmän epävarmuustekijöitä. (Todd & Baroutian, 2017)

Alikriittisessä vesiuutossa paineen nostamiselle 1 bar paineesta vaikkapa 100 bar ei vaadi paljoa työtä, eli sen sisältämän potentiaalienergian määrä ei nouse paljoa ja entalpian muutos on pieni. Suurin osa työstä tehdään lämpötilaa nostettaessa 25 ºC: eesta 125 ºC: een. Suurin osa tehdystä lämmitystyöstä voidaan ottaa talteen, arvot vaihtelevat 75 – 82 %. (Clifford, A.A, 2008) Alikriittisessä vesiuutossa tehtävän työn laskemiseksi käytetään veden entalpian arvoja paineistetulle vedelle. (NIST.gov, 2015)

Veteen tehty työ sen lämpötilan ja paineen nostamiseksi on entalpioiden ero:

$$W_{SWE,kg} = \Delta h = h_{125C,10MPa,} - h_{25C,0,1MPa} =$$

$$(525{,}60 - 104{,}93)\, kJ/kg = \ 420{,}67\, kJ/kg = 0{,}12\, kWh/kg \qquad (6)$$

RK = Rapsikakku, Cys = L-kysteiini, SWE = alikriittinen vesiuutto.

Koska tehdas mitoitetaan 100 tonnille lopputuotetta ja alikriittisessä reaktorissa käytettävän raaka-aineen massan ja veden suhde on 1:20, saadaan lämmitettäväksi määräksi yksinkertaistaen n. 21 osaa vettä proteiiniliuokselle.

$$W_{SWE,kaikki} = W_{kg} N_{kaikki} = 0{,}12\, kWh/kg * 21 = 2{,}45\, kWh/kg \qquad (7)$$

Kysteiiniä on rapsiproteiinissa keskimäärin 2,5 w-% ja käytettävä lämmön talteenoton hyötysuhde on 80%, joten sitä kohti energiaa tarvitaan:

$$W_{SWE,Cys,RK} = \frac{W_{SWE,kaikki}}{C_{Cys,RK}} * (1 - \varepsilon_{lämmönvaihdin}) =$$

$$\frac{2{,}45\, kWh/kg}{0{,}025} 0{,}2 = 19{,}63\, kWh/kg \qquad (8)$$

Kysteiiniä on entsyymikäsitellyssä ja erotellussa napiini-isolaatissa keskimäärin 20 w-% ja käytettävä lämmön talteenoton hyötysuhde on 80%, joten sitä kohti energiaa tarvitaan:

$$W_{SWE,Cys,RK} = \frac{W_{SWE,kaikki}}{C_{Cys,Napiini}} * (1 - \varepsilon_{lämmönvaihdin}) =$$

$$\frac{2{,}45\ kWh/kg}{0{,}20}\,0{,}2 = 2{,}45\ kWh/kg \quad (9)$$

Koska kysteiiniä halutaan valmistaa 100 tn eli 100000 kg vuodessa, on vuotuinen energiamäärä alikriittiselle vesireaktorille:

$$W_{SWE,Cys,RK} = W_{SWE,Cys,RK} m_{Cys} =$$

$$19{,}63\ kWh/kg * 100000\ kg/a = 1963000\ kWh/a \approx 1{,}96\ \text{GWh}/a \quad (10)$$

$$W_{SWE,Cys,Napiini} = W_{SWE,Cys,Napiini} m_{Cys} =$$

$$2{,}45\ kWh/kg * 100000\ kg/a = 245000\ kWh/a \approx 0{,}245\ \text{GWh}/a \quad (11)$$

Laskennassa oletetaan käytettävän sähköenergiaa lämmittämiseen sekä pumppauksien ja muun sähkönkulutuksen olevan siihen verrattuna hyvin pientä. Entsymaattista hydrolyysiä varten lämpötila pitää nostaa tunneiksi n. 50 – 60 ºC: een. Tämän ylläpidosta johtuvan lämpöhukan oletetaan olevan hyvin pientä. Kysteiinin kuivaukseen tarvittavaa energiaa ei lasketa, sen oletetaan olevan melko pieni.

Sähkön hinnaksi oletetaan 8 snt/kWh, joka on kahden viimeisimmän vuoden keskiarvo Tilastokeskuksen arviosta keskisuurelle teollisuudelle, 2-20 GWh [Liitekuvio 5. Sähkön hinta kuluttajatyypeittäin, (Tilastokeskus, 2018)]. Tämä on alle puolet tyypillisen pientalon (5 MWh/vuosi) sähkön hintatasosta. Tällöin alikriittisen vesiuuton sähkönkulutuksen hinnaksi tulee yhteensä:

$$Hinta_{SWE,sähkö,RK} = W_{SWE,Cys,RK} * Hinta_{Sähkö,\frac{€}{kWh}} =$$

$$1963000\ kWh/a\ 0{,}08\frac{€}{kWh} = 157000\ € \quad (12)$$

$$Hinta_{SWE,sähkö,Napiini} = W_{SWE,Cys,Napiini} * Hinta_{Sähkö,\frac{€}{kWh}} =$$

$$245000\ kWh/a\ 0{,}08\frac{€}{kWh} = 19600\ € \quad (13)$$

Entsymaattisessa hydrolyysissä käytettävän entsyymin hinnaksi oletetaan kirjallisuuteen nojaten ja alennetulla tukkuhinnalla 1000 euroa hydrolysoitavaa proteiinitonnia kohti. Entsyymin käyttöä ei ole täysin optimoitu prosessin kannalta, joten tämän hinta voi vielä laskea.

$$Hinta_{RK,Entsyymi} = Hinta_{Entsyymi,tn\ proteiinia} * \frac{m_{Cys}}{C_{Cys,RK}} =$$

$$1000\ \frac{€}{tn} * \frac{100\ tn}{0{,}025} = 4\ milj.€ \quad (14)$$

$$Hinta_{Napiini,Entsyymi} = Hinta_{Entsyymi,tn\ proteiinia} * \frac{m_{Cys}}{C_{Cys,Napiini}} =$$

$$1000\ \frac{€}{tn} * \frac{100\ tn}{0{,}06} = 1{,}67\ milj.€ \quad (15)$$

Suomelle ominaisia arvoja ekonomiseen analyysiin käytettiin soveltuvin osin. Tutkimuksen olettamana tehtaan rakennuspaikkana toimi Uusi-Seelanti, joka on kauempana kaupankäynnin solmupisteistä oleva, vaikeapääsyisempi, rikas, kallis ja korkean verotuksen teollisuusmaa kuten Suomikin. Suurin kiinteä pääomasijoituksen osa on tehtaan rakentaminen, joka vuodelle 2019 skaalauksen jälkeen oletettiin arvonvähenemisineen samaksi yksinkertaistuksena, jotta kandityön analyysissä voitaisiin keskittyä enemmän juokseviin kuluihin. (Todd & Baroutian, 2017)

Tehdasinvestoinnin skaalauksissa käytettiin esimerkkianalyysissä Chemical Engineering Plant Cost Index:iä (CEPCI). (Jenkins, Scott, 2018)

Tehdasinvestoinnin hinnaksi muunnetaan pohjana olevan analyysin tulos vuodesta 2016 (Todd & Baroutian, 2017) vuoteen 2018.

$$Tehdasinvestoinnin\ hinta_{2018,NZ\$} = Tehdasinvestoinnin\ hinta_{2016,NZ\$} \left(\frac{CEPCI_{2018}}{CEPCI_{2016}}\right)$$

$$= 5{,}389\ milj.NZ\$\ \frac{603{,}1}{556{,}8} = 5{,}837\ milj.NZ\$ \qquad (16)$$

Euroiksi (Eurostat, 2019) muunnettuna:

$$Tehdasinvestoinnin\ hinta_{2018,€} =$$

$$Tehdasinvestoinnin\ hinta_{2018,NZ\$} * muuntokerroin_{2018,NZ\$=>€} =$$

$$5{,}837\ milj.NZ\$ * 0{,}7267\ \frac{€}{NZ\$} =\ 3{,}42\ milj.€ \qquad (17)$$

Rapsiproteiinin erityksselle eli rapsiproteiini-isolaatin arvolle raaka-aineena oletetaan hinta-haarukka alimmillaan rapsinsiemenkakun sisältämän proteiiniosan hintatasolle sellaisenaan ja ylimmillään kaupallisesti saatavissa olleelle napiini-rikkaalle (90 %) rapsiproteiini-isolaatille laskien sen hinnan puhtaan tuotteen mukaan. (CCoC, 2019) (Mupondwa, et al., 2018)

$$Hinta_{RK} = Hinta_{RK,tn} * \frac{m_{Cys}}{C_{Cys,RK} * C_{proteiini,RK}} =$$

$$225\,\frac{€}{tn} * \frac{100\ tn}{0{,}025 * 0{,}34} = 2{,}65\ milj.€ \quad (18)$$

$$Hinta_{Napiini,} = Hinta_{Napiini,tn} * \frac{m_{Cys}}{C_{Cys,Napiini}} =$$

$$5200\,\frac{€}{tn} * \frac{100\ tn}{0{,}06} = 8{,}67\ milj.€ \quad (19)$$

Veden hinnaksi oletetaan Lappeenrannan veroton hintataso ja olettaen suurin perusmaksu. (Lappeenrannan Energia Oy, 2018) Lasketaan vedenkäyttö rapsiproteiinille kakusta ja entsyymikäsitellystä ja erotetusta napiini-isolaatista:

$$Hinta_{Vesi,SWE,RK} = Hinta_{Vesi,€/m^3} * V_{Vesi,SWE,RK} + Hinta_{perusmaksu} =$$

$$1{,}62\,\frac{€}{m^3 vettä} * \frac{0{,}020\,m^3 vettä/1\ kg\ kysteiiniä}{0{,}025\ kysteiiniä\ rapsiproteiinia\ kakussa} * 100000 kg\ kysteiiniä + 1870\ €$$

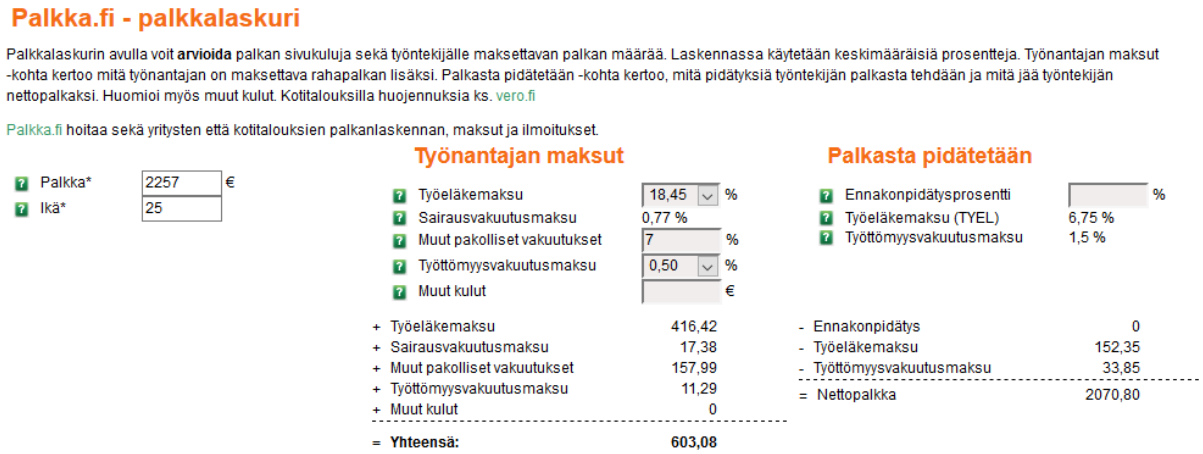
$$= 131000\ € \quad (20)$$

$$Hinta_{Vesi,SWE,Napiini} = Hinta_{Vesi,€/m^3} * V_{Vesi,SWE,Napiini} + Hinta_{perusmaksu} =$$

$$1{,}62\,\frac{€}{m^3 vettä} * \frac{0{,}020\,m^3 vettä/1\ kg\ kysteiiniä}{0{,}20\ kysteiiniä\ rapsiproteiinia\ kakussa} * 100000 kg\ kysteiiniä + 1870\ €$$

$$= 18100\ € \quad (21)$$

Tuotantolaitoksen suorittavien työntekijöiden palkkakustannuksiksi oletettiin uusimman kemian perusteollisuuden työehtosopimuksen (TES) mukainen palkkaus kolmivuorotyölle seitsemänä päivänä viikossa keskimääräisellä vaatimustasolla, kun vuosilomaa pidetään n. 5 viikkoa tai 35 päivää. Tehtaan tuotanto toimii 7920 tuntia vuodessa kahdellatoista (12) työntekijällä kahden työntekijän vuoroissa. Työnantajan sivukulujen laskemiseen käytettiin Palkka.fi-sivuston laskuria olettaen hyvin korkea tapaturmavakuutusmaksu (7 %, (Eläkevakuutusyhtiö Ilmarinen, 2018)). (Verohallinto, 2019) ja palkkaus.fi-sivustoa (Isosävi, Janne, 2019).



Kuva 27 Palkkalaskurilla lasketut kustannukset yhdelle työntekijälle.

Kaikkien kahdentoista työntekijän kulut ovat ainakin:

$$Hinta_{työntekijät} = \frac{(2257\ € + 603{,}09\ €)}{kk} * 12\ * 12\ \text{kk} = 412000\ € \quad (22)$$

Hallinnointikuluja oli pohjana olevassa analyysissä arveltu olevan 250000 NZ$. Euroiksi muutettuna ja inflaatiokorjattuna (1,8 %) tämä on:

$$Hinta_{hallinnointikulut} = 185000\ € \quad (23)$$

Saadut hinnat sijoitetaan yhtälön (5) termeihin:

FCI = 3,42 milj.€

COL = 412000 € + 185000 € = 597000 €

CUT_{RK} = 157000 € + 131000 € = 288000 € (rapsiproteiini kakussa)

$CUT_{Napiini}$ = 19600 € + 18100 € = 37700 € (napiini-isolaatti)

CWT = Oletetaan olevan 0 € kuten pohjana olevassa analyysissä.

CRM_{RK} = 2,65 milj. € + 4 milj. € = 6,65 milj. €

$CRM_{Napiini}$ = 8,67 milj. € + 1,7 milj. € = 10,37 milj. €

COM:n tuloksia tarkastellessa on huomioitava, että tämäkin yhtälö on arvio. Vaikka NPV:tä laskettaessa käytettäisiin COM: in yksikköhintaa pienempää myyntihintaa, voi esimerkiksi 20 vuoden kassavirta olla silti positiivisena tai PVR olla enemmän kuin yksi.

Yhtälöön (5) sijoitettuna saadaan rapsinsiemenkakun sisältämästä proteiinista eristettävälle kysteiinille valmistuskustannukseksi kokonaisuudessaan ja tuotettua kysteiini-kiloa kohti:

$$\mathrm{COM_{RK}} = 0{,}304 * \mathrm{FCI} + 2{,}73 * \mathrm{COL} + 1{,}23 \times (\mathrm{CUT_{RK}} + \mathrm{CWT} + \mathrm{CRM_{RK}})$$

$$= 11{,}2 \text{ milj.} €$$

$$\mathrm{COM_{RK,kg}} = 112 \ €/kg \qquad (24)$$

Yhtälöön (5) sijoitettuna saadaan entsyymikäsitellystä ja erotetusta napiini-isolaatista eristettävälle kysteiinille valmistuskustannukseksi kokonaisuudessaan ja tuotettua kysteiini-kiloa kohti:

$$\mathrm{COM_{Napiini}} = 0{,}304\,\mathrm{FCI} + 2{,}73\,\mathrm{COL} + 1{,}23\,(\mathrm{CUT_{Napiini}} + \mathrm{CWT} + \mathrm{CRM_{Napiini}})$$

$$= 15{,}4 \text{ milj.} €$$

$$\mathrm{COM_{Napiini,kg}} = 154 \ €/kg \qquad (25)$$

Oletetaan kysteiinin myyntihinnaksi sitä vuodesta toiseen muuttamatta 135 e/kg:

$$NPV_{RK} = \sum_{t=1}^{T} \frac{C_{In,t,RK}}{(1-r)^t} - C_{Out,RK} = (23{,}6 - 3{,}4) milj.€ = 20{,}2 \text{ milj.} € \quad (26)$$

$$NPV_{Napiini} = \sum_{t=1}^{T} \frac{C_{In,t,Napiini}}{(1-r)^t} - C_{Out,Napiini} = (10 - 3{,}4)\ milj.€ = 6{,}6 \text{ milj.} € \quad (27)$$

Efektiivinen korko (Internal rate of return, IRR) tarkoittaa korkotasoa investoinnin tuotto-odotukselle, jolloin NVP = 0 eli kassavirtojen nykyarvot ovat yhtä suuret:

$$IRR_{RK} = NPV_{RK} = \sum_{t=1}^{T} \frac{C_{In,t,RK}}{(1-r)^t} - C_{Out,RK} = 0, kun$$

$$r = 1{,}745\ eli\ korko\ on\ 174{,}5\ \% \quad (28)$$

$$IRR_{Napiini} = NPV_{Napiini} = \sum_{t=1}^{T} \frac{C_{In,t,Napiini}}{(1-r)^t} - C_{Out,Napiini} = 0, kun$$

$$r = 0{,}7403\ eli\ korko\ on\ 74{,}03\ \% \quad (29)$$

Sijoitetun pääoman tuottoaste (Return on investment, ROI) tarkoittaa NPV: n ja FCI: n, eli sijoituksen tuoton ja sijoituksen välistä suhdetta.

$$ROI_{RK} = \frac{NPV_{RK}}{FCI_{RK}} = \frac{20{,}17\ milj.€}{3{,}42\ milj.€} = 5{,}90 \quad (30)$$

$$ROI_{Napiini} = \frac{NPV_{Napiini}}{FCI_{Napiini}} = \frac{6{,}59\ milj.€}{3{,}42\ milj.€} = 1{,}93 \quad (31)$$

Lopuksi tehtiin herkkyysanalyysiä NPV: lle ja ROI: lle vaihdellen kysteiinin (135 – 155 e/kg), entsyymin (1 - 3 e/(kg proteiinia)) ja raaka-aineen (225 - 250 e/tn, 5,2 – 6,95 e/kg) hintoja sekä alikriittisen reaktorin lämpötiloja (125 - 145 ºC).

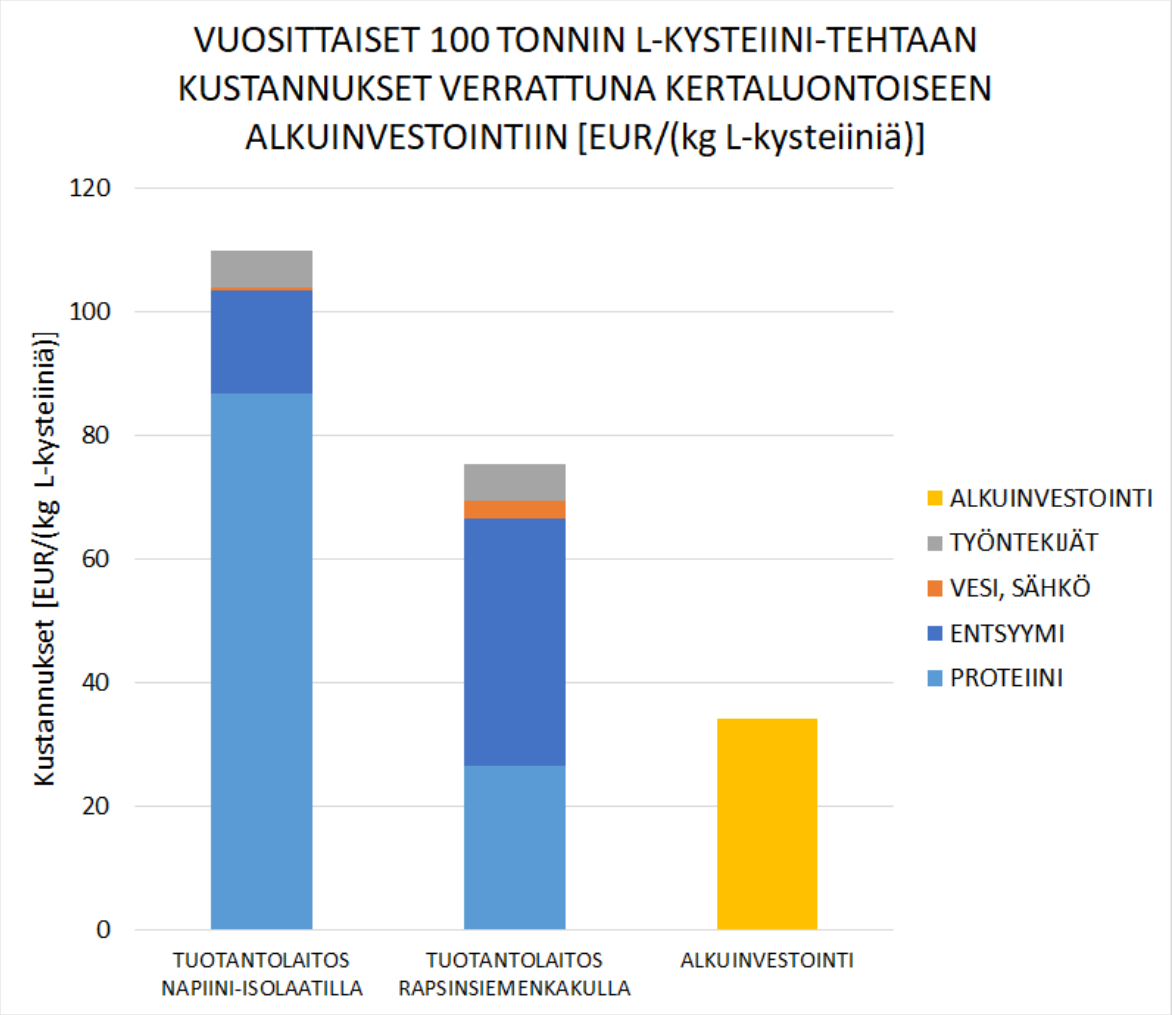
Kysteiinin myyntihinnan kohoaminen vaikutti odotetun positiivisesti sekä rapsikakun että napiinin kannattavuuteen raaka-aineena ja tämä näkyi molemmissa samana absoluuttisena NPV: n ja ROI: n arvojen kohoamisena (Liite II, kuvat 3 ja 4). Koska napiinin käytössä raaka-aineena voittomarginaalit olivat pienemmät, oli suhteellinen hyöty paljon suurempi.

Entsyymin hinnan vaihtelu vaikutti kannattavuuteen odotetusti sen hinnan nousun heikentäessä positiivisia kassavirtoja. Liitteen II kuvista 5 ja 6 nähdään, että kysteiinin markkinahinnalla 135 e/kg prosessiin hankittavan entsyymin hinta ei saisi olla enempää kuin 2 e/(kg proteiinia). Rapsinsiemenkakulle entsyymikustannus oli suhteessa suurempi kuin napiinille.

Raaka-aineen hintaa nostettiin rapsinsiemenkakulla ja napiinilla molemmilla kolmasosa (Liite II, kuvat 7 ja 8). Napiinin suhteellisen hinnan noston vaikutus on paljon jyrkempi, koska sen raaka-aineen hinta on lähtökohtaisestikin paljon suurempi. Sekä NPV että ROI näyttivät, että kannattavuuden raja on noin 5,1 e/kg napiini-isolaatin hinnalle muiden muuttujien pysyessä samoina. Rapsinsiemenkakulle sama oli 650 e/kg, joka on paljon korkeampi ja noin kolme kertaa suurempi kuin käypä markkinahinta. Rapsinsiemenprosessille tulisi todennäköisesti lisäkuluja proteiinin erottamisesta, joka vaikuttaisi selvästi kannattavuuteen.

Alikriittisen vesireaktorin lämpötila muutos ei yllättäen juurikaan vaikuttanut prosessin kannattavuuteen muihin laskettuihin muuttujiin verrattuna (Liite II, kuvat 9 ja 10).

Pääomasijoituksen kertaluontoinen kiinteä kustannus on sijoitettu samaan pylvääseen kuvassa 27 vuotuisten kustannusten kanssa. Kuvasta nähdään myös kasviraaka-aineiden ja entsyymin hintojen aiheuttavan ylivoimaisesti suurimmat OPEX: in vuotuiset kustannukset.



Kuva 28 Kokonaiskustannukset kysteiinin tuotannolle eri raaka-aineista, CAPEX (keltainen, FCI) ja OPEX (muut).

8.2 L-kysteiinin erotusprosessien sivutuotteita

Sivutuotteena syntyy alkuarvioiden mukaan peptidejä ja muita aminohappoja ilman suoloja n. 15 – 40 kertaa enemmän kuin itse lopputuotteeksi erotettavaa kysteiiniä. Nämä eivät ole jätteitä, vaan koosta ja aminohapoista riippuen hyvinkin arvokkaita lopputuotteilla omillaan. Taloudellisessa analyysissä näiden erottamisen ja jälleenmyymisen välinen ero oletetaan hyvin pieneksi yksinkertaistuksena, mutta positiivisen kassavirran saaminen näistä voi olla hyvinkin mahdollista, kuten seuraavat kappaleet kertovat.

Taloudellisessa analyysissä käytetty entsyymikäsittely jakaa napiinia niin, että ennen alikriittistä vesiuuttoa voidaan ottaa pois kysteiinittömiä aminohappoja ja peptideitä. Alikriittiseen vesiuutto-reaktoriin menevä massa on moninkertaisesti rikkaampi kysteiinistä, noin viidesosa.

Kirjallisuudesta (lähteenä yhdestä vielä vertaisarvioimattomasta sekä monesta vanhemmasta julkaistusta) löytyi ainakin viitteitä siitä, että tämän työn taloudelliseen analyysiinkin valitulla entsyymillä saisi napiinista irti juuri sellaisia kysteiinittömiä pieniä peptideitä ja aminohappoja, joilla esimerkiksi hiiva panimo- ja elintarviketeollisuudessa kasvaisi mahdollisimman hyvin. Tietyt aminohapot edistävät ja toiset hidastavat hiivan kasvua ja etanolin tuottoa toisten ollessa neutraaleja. (Ruiz, et al., 2017) Entsyymillä saadaan hiivalle suotuisia tai neutraaleita aminohappoja typpilähteiksi, joiden käyttö varsinkin intensiivisissä ja energiaa säästävissä korkean vierrepitoisuuden fermentaatioissa on tärkeää. Lisäarvoa tuo siis inhibitoivien aminohappojen puuttuminen typpilähteestä ympäristöystävällisen prosessin sivutuotteena.

Entsyymikäsittelyn jälkeiset kysteiinittömät, suuremmat, helposti pienemmistä erotettavat peptidit sisältävät taas 200 – 600 %:a määriä välttämättömiä aminohappoja per massaosuus (pois lukien tryptofaania) verrattuna Yhdysvaltain kansallisen tiedeakatemian ravitsemuksellisen konsensusraportin referenssiarvoihin. (Trumbo, et al., 2002) Entsyymikäsitelty suurempi peptidijae voisi olla siis potentiaalisesti hyvin myytävissä ihmiselle sopivaksi ravintolisäksi.

Edellä mainitut hyödyt koskevat napiini-jaetta. Rapsinsiemenkakkua käsiteltäessä teoreettista tarkastelua monimutkaistaa siinä olevien ylimääräisten fenolien ja glukosinolaattien uuttuminen proteiineja eristettäessä, joka vaikuttaa siihen, kuinka paljon sivutuotteina myytävillä entsyymikäsittelyn jälkeisillä peptideillä on jälleenmyyntiarvoa. Alikriittinen vesiuutto voi ehkä muuttaa konsentraatioita tai ominaisuuksia, mutta tämä olisi tutkittava.

Toinen rapsinsiemenkakun käyttöä raaka-aineena pelkästä napiinista erottava tekijä on sen sisältämä L-kysteiinistä köyhempi cruciferiini sekä sen aminohappoketjujen erilaisuus napiiniin verrattuna. Cruciferiinin käsittely vaatii erilaiset entsyymit hajotakseen sopiviksi peptideiksi ja aminohapoiksi kuin napiini, jotta sen eri jakeita voitaisiin myydä ja jalostaa eri käyttötarkoituksiin.

Yhteenvetona kokoeroihin perustuva jakeiden erottaminen ja fiksujen käyttökohteiden löytyminen tarkoittavat sitä, että kysteiinin lisäksi syntyisi enää neljä kertaa siihen verrattava määrä sivutuotteita SWE: n jälkeen entsyymikäsittelyn kanssa. Nämäkin voidaan todennäköisesti myydä viimeisen erotuksen jälkeen eteenpäin erilaisina peptidi-hydrolysaatteina.

9 Yhteenveto kirjallisuuskatsauksesta

Tämän kandityön aikana löydetystä kirjallisuudesta kävi ilmi, että kysteiinin erotukseen Suomen oloissa paras kasvipohjainen raaka-aine on rapsiöljyteollisuuden sivutuotteena suurina määrinä syntyvä rapsinsiemenkakku. Tällä hetkellä suurin osa maailmalla tuotetusta rapsinsiemenkakusta ei sovellu suoraan ihmisille kelpaavaan proteiinierotukseen sen sisältämien maku- ja väriyhdisteiden takia. (Wanasundara, et al., 2016) Lisäksi on viitteitä siitä, että rapsin sisältämät napiinit voivat olla tärkeitä herkistäjiä atooppisista ihottumista kärsiville (Poikonen, et al., 2009) (Puumalainen, et al., 2015). Näiden syiden takia syntyy paljon matalan lisäarvon rehua tuotantoeläimille (Wanasundara, et al., 2016). Rapsi on maailman mittakaavassa suosittu öljykasvi, jonka sivutuotteen valorisoinnille voisi olla potentiaalisesti suuret vientimarkkinat (Mupondwa, et al., 2018).

Työssä tunnistettiin ympäristöystävällisiä vihreän kemian menetelmiä rapsiproteiinien eristämiseksi rapsinsiemenkakusta (Wanasundara, et al., 2016), proteiinin pilkkomiseksi peptideiksi (Xue, et al., 2009) (Rommi, 2016), erottelemiseksi kysteiini-rikkaisiin fraktioihin (He, et al., 2016) sekä edelleen käsittelemiseksi vapaiksi aminohapoiksi (Pińkowska, et al., 2014) (Abdelmoez & Yoshida, 2013), että hyvin lyhyiksi peptideiksi (Powell, et al., 2016). Varsinainen lopputuote on vegaaninen, halal- ja kosher-sertifioitavissa oleva aminohappo kalvoerotuksen (He, et al., 2016), kromatografisen erotuksen (Yang, et al., 2016) tai perinteisemmän suolahappo-suolon uudelleenkiteytyksen (Xiè & Xiè, 2016) jälkeen.

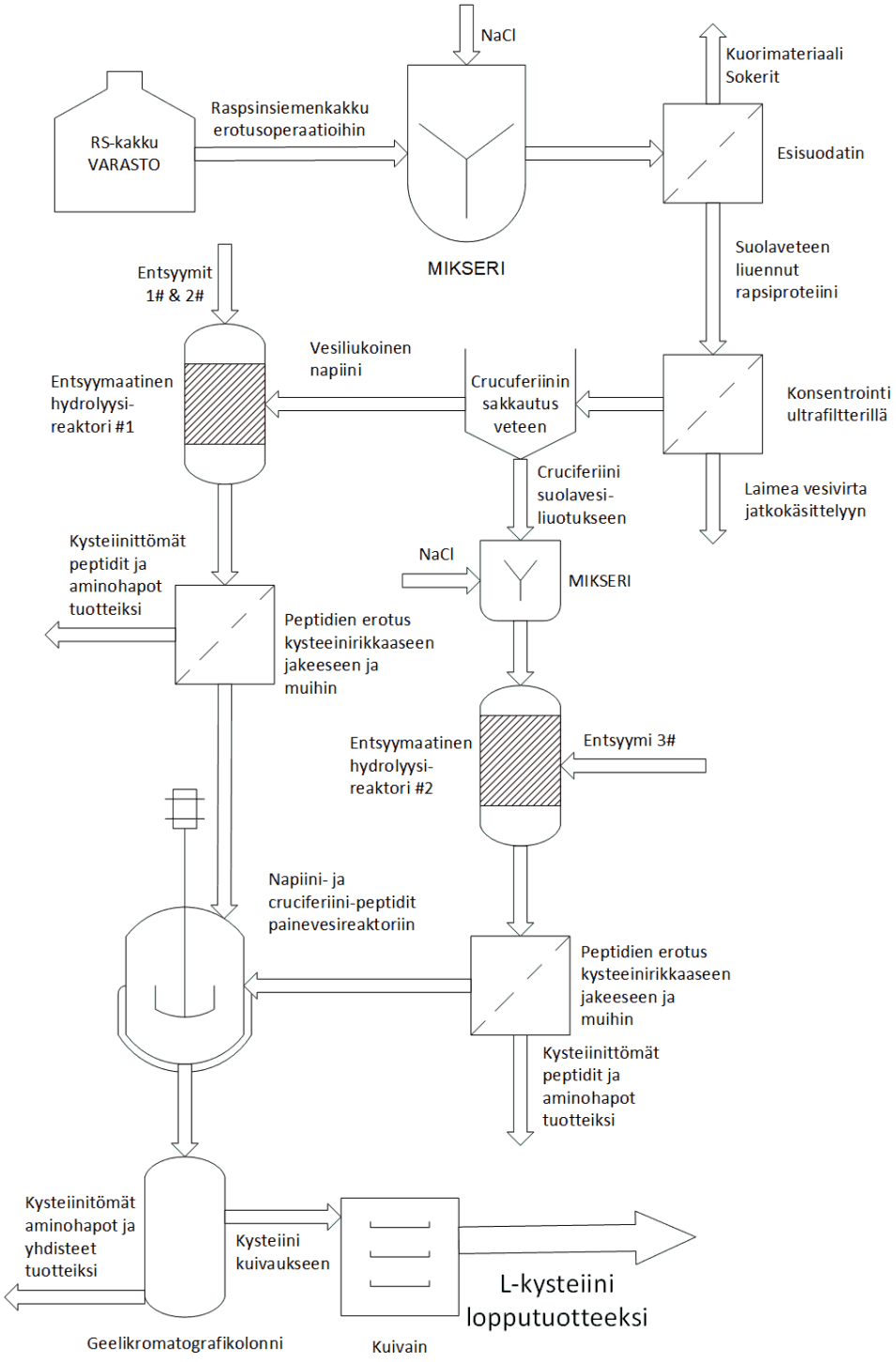
10 Yhteenveto ja johtopäätökset

Löydettyjä menetelmiä käytettiin komponentteina yhtenä mahdollisena esimerkkinä (Kuva 29) koottuun kokonaisprosessiin kysteiinin erottamiseksi rapsinsiemenkusta. Vuodessa 100 tonnia kysteiiniä tuottava laitos oli teknillis-taloudellisen analyysin mukaan voitollinen pääosan kustannuksista tullessa kasviraaka-aineiden hankinnasta. Kuvitetussa vuokaaviossa esitellään lyhyesti tärkeimmät erotus- ja puhdistusoperaatiot. Eri prosessivaiheisiin kuuluvia lämmön- ja aineensiirtoja pitää käsitellä erikseen. Suurimmat valituista menetelmistä ja optimoinneista riippuvat kustannukset muodostuvat käytetystä energiasta ja vedestä, joten näissä voidaan saavuttaa suurimmat säästöt. Käytetyt entsyymit muodostivat oletettua suuremman kuluerän, mutta optimointi voisi pienentää niiden tarvetta. (Rommi, 2016)

Ennen kuin proteiineja erotetaan toisistaan, syntyy sivuvirtoina proteiinipitoista kuitua ja hiilihydraattia sekä proteiinipitoista alkusuodosta suolaliuotuksen jälkeen. On luultavaa, että näissä ja muissa eri erotusprosesseissa syntyy sivuvirtoja, joissa on konsentroituneena ihmisille epämiellyttäviä maku- ja väriaineita kiinnittyneenä hiilihydraatteihin, sokereihin tai proteiineihin. (Adewolea, et al., 2016) (Wanasundara, et al., 2016) Tällaisia sivutuotteita voitaisiin myydä erillisinä tai toisiinsa sekoitettuina esimerkiksi eläinrehuksi, kuten raaka-ainettakin alun perin.

Käytännössä prosessissa suolavesiliuotuksen ja alkupuhdistusten jälkeen rapsiproteiinia erotetaan suolaveteen ja pelkkään veteen liukeneviksi fraktioiksi kuten proteiini-isolaattia tekevissä kaupallisissa prosesseissa (Schweizer, et al., 2007), jonka jälkeen kullekin erilaiselle proteiinille tehdään niiden aminohappojärjestykselle sopiva entsyymikäsittely kysteiinien rikastamiseksi peptiditasolla. Oikeiden entsyymien valinta on tärkeää, kun tavoitellaan aminohapposidoksia koskevaa selektiivisyyttä sekä markkinoiden vaatimuksia esimerkiksi valmiista elintarviketeollisesta hyväksyttävyydestä tehokkuuden, vegaanisuuden ja taloudellisuuden lisäksi.

Kysteiini-rikkaat peptidit (KRP) erotellaan niiden fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien perusteella kysteiiniä sisältämättömistä peptideistä (KSP) esimerkiksi sopivilla membraaneilla (He, et al., 2016). Sivutuotteena syntyviä KSP: itä voitaisiin myydä elintarvike- tai lääketeollisuudelle jatkokäsittelyyn puhdistuksen jälkeen tai paremmin sulavana korkeamman jalostusasteen hydrosylaattina ravintoarvo-paranteeksi rehuihin, kuten aiempi sivuvirta.



Kuva 29 Vuokaavio rapsinsiemenkakun käsittelyn päävaiheista erilaisiksi lopputuotteiksi. Proteiinit erotetaan muista rapsinsiemenkakun osista kahdeksi eri jakeeksi ja pilkotaan pienemmiksi peptideiksi entsyymeillä. Kysteiinistä rikkaat osat syötetään alikriittiseen vesiuuttoreaktoriin, jonka jälkeen vapautuneille aineille tehdään kalvo-, geelikromatografi- tai uudelleenkiteytys-erotusta. Erotettu kysteiini tai hapettunut dimeeri, kystiini, kuivataan myytäväksi lopputuotteeksi.

Veteen laimennetut KRP: t käsitellään alikriittisessä vesihydrolyysireaktorissa, joka on käytännössä jatkuvatoiminen painekattila (130-150 ºC, > 3-5 bar). Riittävän kauan reaktorissa pidettynä peptidit alkavat pilkkoutua vapaiksi aminohapoiksi. Kysteiinien hapettumisen estämiseksi käytetyn lämpötilan täytyy olla riittävän alhainen (Powell, et al., 2016) ja kysteiinien rikkipäädyn on oltava suojattuna sopivalla yhdisteellä (Li, 2012) (Beedle, et al., 2017).

Aminohappoja sisältävä vesiliuos jäähdytetään lämpö talteenottaen reaktoriin tulevan KRP-vesiliuoksen esilämmittämiseksi. Vapaat aminohapot otetaan vesiliuoksesta talteen esimerkiksi geelikromatografialla (Yang, et al., 2016) tai liuotetaan perinteisemmin suolahapolla (Xiè & Xiè, 2016), jonka jälkeen ne puhdistetaan uudelleenkiteyttämällä ja suodattamalla ominaisuuksiltaan erilaisia aminohappojen suoloja.

Käytetyn erotus- ja puhdistusmenetelmän valinta riippuu siitä, kuinka monta erilaista aminohappoa ja missä määrissä niitä KRP-vesiliuokseen päätyi. Jos erilaisia aminohappoja on vähän kysteiinin lisäksi, historiallisesti aiemmin käytetty suolahappomenetelmä saattaa olla taloudellinen ja minimaalisesti ylimääräistä jätettä tuottava vaihtoehto, kun verrataan Kiinassa tehtävään keratiinista eristettävään L-kysteiiniin (Xiè & Xiè, 2016). Lopputuotteena L-kysteiinin hydrokloridi on elintarviketeollisuudessa laajassa käytössä oleva, hyvin liukeneva ja suosittu lisäaine. Monimutkaisemman, alikriittisesti käsitellyn KRP-liuoksen ollessa kyseessä geelikromatografia (Yang, et al., 2016) saattaa olla paikallaan todennäköisesti suuremmasta alkukustannuksesta huolimatta. Lopputuotteena saadaan vapaata L-kysteiiniä tai hapettamisen jälkeen vakaampaa dimeeriä, kystiiniä.

Suurimmat kysymysmerkit läpikäydyissä prosesseissa myös laboratorioskaalalla liittyvät entsymaattiseen ja alikriittisellä vedellä tehtävään hydrolyysiin sekä näistä saatujen peptidien ja aminohappojen erottamisiin. Tästä kirjallisesta työstä seuraavia askelia miettiessä kokeellinen työ pystyisi kyllä selvittämään paremmin sopivia menetelmiä ja niihin liittyviä parametreja.

Kysteiinin lisäksi edellä mainitut prosessit tuottaisivat paremmin sulavaa rehua eläimille, korkean ravintoarvon peptidejä ihmisille sekä fermentaatiota vaikeuttavista aminohapoista vapaata orgaanisen typen lähdettä (olut)hiivoille. Lääketeollisesti mielenkiintoisia peptidejä voi saada entsymaattisesti hydrolysoidusta rapsista esimerkiksi verenpainelääkkeiksi. (Marczak, et al., 2003)

11 Lähteet

Abdelmoez, W. & Yoshida, H., 2013. Production of Amino and Organic Acids from Protein Using Sub-Critical Water Technology. *International Journal of Chemical Reactor Engineering,* 1(11), s. 1-16.

Adewolea, D., Rogiewicza, A., Dyckb, B. & Slominskia, B., 2016. Chemical and nutritive characteristics of canola meal from Canadian processing facilities. *Animal Feed Science and Technology,* Volume 222, s. 17-30.

AGICO GROUP, 2018. *Oil Mill Plant > Solvent Extraction Plant > Desolventizer Toaster.* [Online]
Saatavissa: http://www.gcmachines.com/desolventizer-toaster.html
[Haettu 25. maaliskuuta 2019].

AJI-NO-MOTO CO., INC, 2018. *Basic knowledge of AJI-NO-MOTO®.* [Online]
Saatavissa: https://www.ajinomoto.com/features/aji-no-moto/en/basic/
[Haettu 25. maaliskuuta 2019].

Akiya, N. & Savage, P. E., 2002. Roles of Water for Chemical Reactions in High-Temperature Water. *Chemical Reviews,* 102(8), s. 2725-2750.

Alibaba, 2019. *Alibaba.com.* [Online]

Saatavissa: https://www.alibaba.com/products/cysteine.html?spm=a2700.gallery-offerlist.galleryFilter.15.44226706ZQsOXb&IndexArea=product_en&assessment_company=ASS&viewtype=G
[Haettu 20. helmikuuta 2019].

Amazon, 2015. *Aji No Moto Ajinomoto Monosodium Glutamate Umami Seasoning 454g / 1LB / 16oz HALAL.* [Online]

Saatavissa: https://www.amazon.com/Ajinomoto-Monosodium-Glutamate-Umami-Seasoning/dp/B00IH28XDE
[Haettu 25. maaliskuuta 2019].

Anon., 2018. *UFOP, Chart of the week (49).* [Online]

Saatavissa: https://www.ufop.de/english/news/chart-week/
[Haettu 15. maaliskuuta 2019].

Bachmair, C., 2018. *WACKER Press Releases; WACKER Starts Cystine Production in Spain.* [Online]
Saatavissa: https://www.wacker.com/cms/en/press_media/press-releases/pressinformation-detail_96128.jsp
[Haettu 12. helmikuuta 2019].

Ball, R. O., Courtney-Martin, G. & Pencharz, P. B., 2006. The In Vivo Sparing of Methionine by Cysteine in Sulfur Amino Acid Requirements in Animal Models and Adult Humans. *The Journal of Nutrition,* 136(6), s. 1682S–1693S.

Barciszewski, J., Maciej, S. & Haertlé, T., 2000. Minireview: Analysis of Rape Seed Napin Structure and Potential Roles of the Storage Protein. *Journal of Protein Chemistry,* 19(4), s. 249–254.

Beedle, A. E. M. et al., 2017. Tailoring protein nanomechanics with chemical reactivity. *Nature Communications,* Volume 8, s. 15658.

Bhavsar, P. et al., 2016. Superheated Water Hydrolysis of Waste Wool in a Semi-Industrial Reactor to Obtain Nitrogen Fertilizers. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering,* 4(12), s. 6722-6731.

Brunner, G., 2009. Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids,* 47(3), s. 373-381.

Buchter, A., Peter, H. & Bolt, H., 1984. N-Acetylcysteine as an antidote in accidental acrylonitrile poisoning. *International Archives of Occupational and Environmental Health,* 53(4), s. 311-9.

Burcon NutraScience Corp., 2018. *BURCON NUTRASCIENCE CORPORATION.* [Online]
Saatavissa: https://www.burcon.ca/wp-content/uploads/2018/06/BURCON_FY2018_AIF.pdf
[Haettu 12. maaliskuuta 2019].

Campbell, L., Rempel, C. B. & Wanasundara, J. P., 2016. *Canola/Rapeseed Protein: Future Opportunities and Directions—Workshop Proceedings of IRC 2015.* Saskatoon, Kanada, Plants.

Cauvain, S., 2015. Activated Dough Development (ADD) and Flour Treatment Agents or Oxidizing Agents. In: *Technology of Breadmaking.* s.l.:Springer International Publishing, s. 40, 71-72.

CCoC, 2019. *Canola Council of Canada: Statistics of Current Canola Oil, Meal, and Seed Prices.* [Online]
Saatavissa: https://www.canolacouncil.org/markets-stats/statistics/current-canola-oil,-meal,-and-seed-prices/
[Haettu 15. maaliskuuta 2019].

Clifford, A.A, 2008. *Change of Water Properties with Temperature: Use of enthalpies to calculate energy requirements for superheated water plant.* [Online]
Saatavissa: http://www.criticalprocesses.com/Use%20of%20enthalpies%20to%20calculate%20energy%20needed.htm
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

CNS Media, 2017. *CJ CheilJedang Launches Fermented L-Cysteine Through Sustainable Technology.* [Online]
Saatavissa: https://www.foodingredientsfirst.com/news/CJ-CheilJedang-Launches-Fermented-L-Cysteine-Through-Sustainable-Technology
[Haettu 31. maaliskuuta 2019].

Eklund, M. et al., 2015. Effect of processing of rapeseed under defined conditions in a pilot plant on chemical composition and standardized ileal amino acid digestibility in rapeseed meal for pigs. *Journal of Animal Science,* 93(6), s. 2813–2825.

Eläkevakuutusyhtiö Ilmarinen, 2018. *Työnantajamaksut – työnantaja, tiedätkö työntekijän palkan sivukulut?* [Online]
Saatavissa: https://www.ilmarinen.fi/uutishuone/arkisto/2018/tyonantajamaksut/
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Eric, K. et al., 2014. Temperature and cysteine addition effect on formation of sunflower hydrolysate Maillard reaction products and corresponding influence on sensory characteristics assessed by partial least square regression. *Food Research International,* Volume 57, s. 242-258.

Eric, K. et al., 2013. Sensory attributes and antioxidant capacity of Maillard reaction products derived from xylose, cysteine and sunflower protein hydrolysate model system. *Food Research International,* 54(2), s. 1437-1447.

Eurostat, 2019. *Euro/ECU exchange rates - annual data.* [Online]
Saatavissa: http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=ert_bil_eur_a&lang=en
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Franke, B., Colgrave, M. L., Mylne, J. S. & Rosengren, K. J., 2016. Mature forms of the major seed storage albumins in sunflower: A mass spectrometric approach. *Journal of Proteomics,* Volume 147, s. 177-186.

Frye, R. E. & Berk, M., 2019. *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine.* 1. painos. s.l.: Adis, Springer Nature.

FTL, 2005. *Forage Terms and Explanations From the University of Vermont Forage Testing Lab.* [Online]
Saatavissa: https://pss.uvm.edu/vtcrops/articles/ForageTermsExplanations2.pdf
[Haettu 13. maaliskuuta 2019].

Hamada, J., 1997. Characterization of Protein Fractions of Rice Bran to Devise Effective Methods of Protein Solubilization. *Cereal Chemistry,* Issue 74, s. 662-668.

Heard, K. J., 2008. Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning. *New England Journal of Medicine,* 359(3), s. 285-292.

He, R. et al., 2016. Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry,* 197(Part A), s. 1008-1014.

He, S. et al., 2019. Contributions of temperature and l-cysteine on the physicochemical properties and sensory characteristics of rapeseed flavor enhancer obtained from the rapeseed peptide and d-xylose Maillard reaction system. *Industrial Crops and Products,* Volume 128, s. 455-463.

Heuzé, V. et al., 2018. *Feedipedia: Rapeseed meal.* [Online]
Saatavissa: https://www.feedipedia.org/node/52
[Haettu 25. maaliskuuta 2019].

Hiron, S., 2006. *Canola protein isolate functionality III.* Winnipeg, Canada, Patent No. US7776378B2.

Huang, M. et al., 2010. Contribution of sulfur-containing compounds to the colour-inhibiting effect and improved antioxidant activity of Maillard reaction products of soybean protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* Issue 91, s. 701-720.

Höfer, R., 2009. Chapter 12; White Biotechnology; Recent Examples; L-Cysteine. In: R. Höfer, painoksessa. *Sustainable solutions for modern economies.* Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Publishing, s. 458.

Isosävi, Janne, 2019. *Palkkaus.fi: Työnantajan sivukulut.* [Online]
Saatavissa: https://www.palkkaus.fi/cms/article/tyonantajan_sivukulut
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Japan Patent Office, PR, 2002. *Kikunae Ikeda, Sodium Glutamate.* [Online]
Saatavissa: https://www.jpo.go.jp/e/introduction/rekishi/10hatsumeika/kikunae_ikeda.html
[Haettu 25. maaliskuuta 2019].

Jenkins, Scott, 2018. *Chemical Engineering Plant Cost Index: 2018 Annual Value.* [Online]
Saatavissa: https://www.chemengonline.com/2019-cepci-updates-january-prelim-and-december-2018-final/
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Jyothi, T. et al., 2007. Napin from Brassica juncea: Thermodynamic and structural analysis of stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,* 1774(7), s. 907-919.

Kandouj Company, 2016. *Faravari Sabous Kandouj Oil Seed Processing Company: Rapeseed meal.* [Online]
Saatavissa: http://www.kandouj.org/products/rapeseed-meal/
[Haettu 25. maaliskuuta 2019].

Kawano, Y., Suzuki, K. & Ohtsu, I., 2018. Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize l-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 102(19), s. 8203–8211.

Kim, J. H., Varankovich, N. V., Stone, A. K. & Nickerson, M. T., 2016. Nature of protein-protein interactions during the gelation of canola protein isolate networks. *Food Research International,* Volume 89 Part 1, s. 408-414.

Lammens, T., Franssen, M., Scott, E. & Sanders, J., 2012. Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals. *Biomass and Bioenergy,* Volume 44, s. 168-181.

Lan, X. et al., 2010. Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. *Food Chemistry,* 120(4), s. 967-972.

Lappeenrannan Energia Oy, 2018. *Lappeenrannan Energiaverkot Oy: Vesi- ja jätevesihinnasto.* [Online]
Saatavissa: https://www.lappeenrannanenergia.fi/sites/default/files/2019-01/1812-LEV-Vesi-ja-jatevesihinnasto-web.pdf
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Lebowitz, J., Lewis, M. S. & Schuck, P., 2002. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. In: J. Lebowitz, painoksessa. *Protein science: a publication of the Protein Society.* s.l.: Protein Society, s. 2067-2079.

Licitra, G., Hernandez, T. & Van Soest, P., 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology,* 57(4), s. 347-358.

Li, N. Q. G. S. X., 2012. Effects of Sodium Bisulfite on the Physicochemical and Adhesion Properties of Canola Protein Fractions. *Journal of Polymers and the Environment,* 20(4), s. 905-915.

Marczak, E. D. et al., 2003. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides,* 24(6), s. 791-798.

Megias, C. et al., 2007. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* Volume 55, s. 6509–6514.

Merch KGaA, 2007. *Merck, Technical documentation for ion-exchance-chromatography, Sepharose XL – for selected proteins that require very high binding capacity to increase productivity, easy scale-up.* [Online]
Saatavissa: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/ion-exchange-chromatography/sepharose-xl.html
[Haettu 12. maaliskuuta 2019].

Merck, 2019. *Merck KGaA, L-Cysteine, Food grade, (R)-2-Amino-3-mercaptopropionic acid.* [Online]
Saatavissa: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w326305?lang=fi&region=FI
[Haettu 20. helmikuuta 2019].

Merck, 2019. *Merck KGaA, L-Cysteine hydrochloride, Food grade, product of Wacker Chemie AG.* [Online]
Saatavissa: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w778567?lang=fi&region=FI
[Haettu 20. helmikuuta 2019].

Mosenthin, R. et al., 2016. Effect of the desolventizing/toasting process on chemical composition and protein quality of rapeseed meal. *Journal of Animal Science and Biotechnology,* 7(1).

Mupondwa, E., Li, X. & Wanasundara, J. P. D., 2018. Technoeconomic Prospects for Commercialization of Brassica (Cruciferous) Plant Proteins. *Her Majesty the Queen in Right of Canada Journal of the American Oil Chemists' Society,* 95(8), s. 903-922.

Nimni, M. E., Han, B. & Cordoba, F., 2007. Are we getting enough sulfur in our diet? *Nutrition & Metabolism,* 24(4).

NIST.gov, 2015. *Table 3. Compressed Water and Superheated Steam.* [Online]
Saatavissa: https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/srd/NISTIR5078-Tab3.pdf
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Okajima, I. & Sako, T., 2014. Energy conversion of biomass with supercritical and subcritical water using large-scale plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 117(1), s. 1-9.

Pantoja-Uceda, D. et al., 2004. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics: PDB ID 1S6D (Solution Structure of a Methionine-Rich 2S Albumin from Sunflower Seeds: Relationship to Its Allergenic and Emulsifying Properties.) (2004) Biochemistry 43: s. 6976-6986.* [Online]
Saatavissa: https://www.rcsb.org/structure/1S6D
[Haettu 18. helmikuuta 2019].

Peterson, A. A., Lachance, R. P. & Tester, J. W., 2010. Kinetic Evidence of the Maillard Reaction in Hydrothermal Biomass Processing: Glucose-Glycine Interactions in High-Temperature, High-Pressure Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research,* 49(5), s. 2107-2117.

Petruccelli, S. & Añon, M., 1995. Soy Protein Isolate Components and Their Interactions. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry,* 43(7), s. 1762-1767.

Petruccelli, S. & Añon, M., 1995. Thermal Aggregation of Soy Protein Isolates. *Journal of Agricultural Food Chemistry,* s. 3035-3041.

Pińkowska, H., Wolak, P. & Oliveros, E., 2014. Hydrothermolysis of rapeseed cake in sub-critical water. Effect of reaction temperature and holding time on product composition. *Biomass and Bioenergy,* Volume 64, s. 50-61.

Poikonen, S. et al., 2009. Sensitization and allergy to turnip rape: a comparison between the Finnish and French children with atopic dermatitis. *Acta Pædiatrica,* 98(2), s. 310-315.

Powell, T., Bowra, S. & Cooper, H. J., 2016. Subcritical Water Processing of Proteins: An Alternative to Enzymatic Digestion? *Analytical Chemistry,* 88(12), s. 6425–6432.

Powell, T., Bowra, S. & Cooper, H. J., 2017. Subcritical Water Hydrolysis of Peptides: Amino Acid Side-Chain Modifications. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(9), s. 1775–1786.

Puumalainen, T. et al., 2015. Proteomic identification of allergenic seed proteins, napin and cruciferin, from cold-pressed rapeseed oils. *Food Chemistry*, Volume 175, s. 381-385.

Ramachandraiah, K., Koh, B.-B., Davaatseren, M. & Hong, G.-P., 2017. Characterization of soy protein hydrolysates produced by varying subcritical water processing temperature. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* Volume 43, s. 201-206.

Reliene, R. et al., 2009. N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 665(1-2), s. 37-43.

Rico, M. et al., 1997. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics: PDB ID 1PNB (1H NMR assignment and global fold of napin BnIb, a representative 2S albumin seed protein) (1996) Biochemistry 35: s. 15672-15682.* [Online]
Saatavissa: http://www.rcsb.org/3d-view/1PNB
[Haettu 18. helmikuuta 2019].

Rommi, K., 2016. Enzyme-aided recovery of protein and protein hydrolyzates from rapeseed cold-press cake. *VTT Science.*

Ruiz, S. J., Van 't Klooster, J. S., Bianchi, F. & Poolman, B., 2017. *Growth inhibition by amino acids in Saccharomyces cerevisiae.* [Online]
Saatavissa: https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/12/01/222224.full.pdf
[Haettu 29. maaliskuuta 2019].

Salsbury Jr, F. R., Knutson, S. T., Poole, L. B. & Fetrow, J. S., 2008. Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein Science,* 17(2), s. 299-312.

Schneider, M. et al., 1989. *Uniprot, Reviewed (Swiss-Prot) - Manually annotated. Records with information extracted from literature and curator-evaluated computational analysis. (The UniProtKB/Swiss-Prot knowledgebase and its Plant Proteome Annotation Program.) Journal of proteomics.* [Online]
Saatavissa: "https://www.uniprot.org/uniprot/?query=id:P33523%20OR%20id:P33524%20OR%20id:P33525%20OR%20id:P33522%20OR%20id:P11090&format=fasta&sort=entry_name&fil=reviewed:yes"
[Haettu 17. helmikuuta 2019].

Schweizer, M. et al., 2007. *Rapeseed/canola protein isolates for use in the food industry (s. 160–162).* Wuhan, China, Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress.

Schwenke, K. & Linow, K., 1982. A reversible dissociation of the 12S globulin from rapeseed (Brassica napus L.). *Food/Nahrung,* K5-K6(26).

Segall, K. I. & Schweizer, M., 2010. *Production of 2S canola protein involving ion exchange.* USA, Patentti Nro. US7750119B2.

Segall, K. I. et al., 2014. *PRODUCTION OF SOLUBLE SOY PROTEIN PRODUCT FROM SOY PROTEIN MICELLAR MASS ("S200Ca").* EU, Patentti Nro. EP2389073B1.

Sharma, R. & Devi, S., 2018. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology,* 17(1), s. 19-45.

Slominski, B., 1997. Developments in the breeding of low fiber rapeseed/canola. *Journal of Animal and Feed Sciences,* 6(3), s. 303-317.

Sunphorka, S., Chavasiri, W., Oshima, Y. & S., N., 2012. Protein and Sugar Extraction from Rice Bran and De-Oiled Rice Bran using Subcritical Water in a Semi-Continuous Reactor: Optimization by Response Surface Methodology. *International Journal of Food Engineering,* 8(3), s. 1556-3758.

Takagi, H. & Ohtsu, I., 2017. L-Cysteine Metabolism and Fermentation in Microorganisms. In: A. Yokota & I. M., painoksessa. *Amino Acid Fermentation.* Tokyo: Springer Japan, s. 36-38.

Tamba-Berehoiu, M. R., Popa, C. N. & Popescu, S., 2013. Assessment of the E 920 additive (L-cysteine) in relation to some problems of modern food industry. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest,* 13(1).

Tandang-Silvas, M. R. G. et al., 2010. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,* 1804(7), s. 1432-1442.

Tehrani, K. A. et al., 2002. Thermal Degradation Studies of Glucose/Glycine Melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50(14), s. 4062-4068.

Tilastokeskus, 2018. *Energian hinnat 2018, 1. neljännes.* [Online]
Saatavissa: https://www.stat.fi/til/ehi/2018/01/ehi_2018_01_2018-06-12_fi.pdf
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Todd, R. & Baroutian, S., 2017. A techno-economic comparison of subcritical water, supercritical CO2 and organic solvent extraction of bioactives from grape marc. *Journal of Cleaner Production,* Volume 158, s. 349-358.

Tonouchi, N. & Ito, H., 2017. Present Global Situation of Amino Acids in Industry. In: A. Yokota & M. Ikeda, painoksessa. *Amino Acid Fermentation.* Tokyo: Springer Japan, s. 3-14; 36-38.

Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A. A. & Poos, M., 2002. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *Journal of the American Dietetic Association,* 102(11), s. 1621-1630.

Wacker Chemie AG, 2017. *Wacker Chemie AG.* [Online]
Saatavissa: https://www.wacker.com/cms/media/publications/downloads/6882_EN.pdf
[Haettu 20. helmikuuta 2019].

Wanasundara, J. P. et al., 2016. Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids,* 4(23), s. 1-15.

Vardanyan, R. & Hruby, V., 2016. Chapter 23 - Drugs for Treating Respiratory System Diseases. In: R. Vardanyan & V. Hruby, painoksessa. *Synthesis of Best-Seller Drugs.* s.l.:Academic Press, s. 357-381.

Watchararuji, K., M., G., Sasaki, M. & Shotipruk, A., 2008. Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technology,* 99(14), s. 6207-6213.

Verohallinto, 2019. *Palkka.fi - palkkalaskuri.* [Online]
Saatavissa: https://www.palkka.fi/palkkalaskuri/
[Haettu 27. maaliskuuta 2019].

Villanueva, A. et al., 1999. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas Aceites,* Volume 50, s. 472-476.

Villegas-Torres, M., Ward, J. & Lye, G., 2015. The protein fraction from wheat-based dried distiller's grain with solubles (DDGS): extraction and valorization. *New Biotechnology,* 32(6), s. 606-611.

Vioque, J. et al., 2001. Alcalase Rapeseed Inhibitors: Purification and Partial Characterization. *Journal of Enzyme Inhibition,* 16(1), s. 81-87.

Vornamo, T., 2016. *Biomassaperäisen liuoksen fraktiointi membraanisuodatuksella,* Lappeenranta: LUT.

Xiè, Q., 2017. *Device for the low-temperature separation of amino acid.* Kiina, Patentti Nro. CN107096254A.

Xiè, Q. & Xiè, H., 2016. *Refining plant for the preparation of cystine.* Kiina, Patentti Nro. CN206308294U.

Xue, Z. et al., 2009. Preparation and Antioxidative Properties of a Rapeseed (Brassica napus) Protein Hydrolysate and Three Peptide Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 57(12), s. 5287-529.

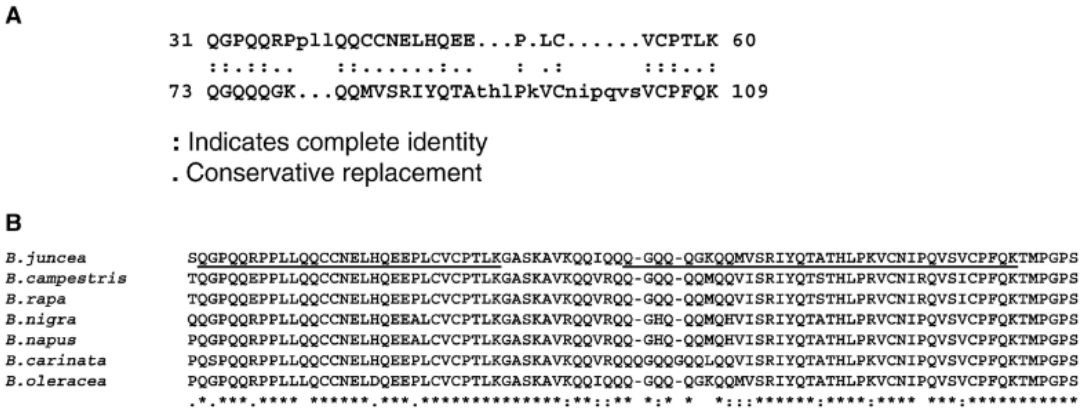
Yang, C., Wang, Y., Vasanthan, T. & Chen, L., 2014. Impacts of pH and heating temperature on formation mechanisms and properties of thermally induced canola protein gels. *Food Hydrocolloids,* Volume 40, s. 225-236.

Yang, X., Duohua, C. & Qingxiang, X., 2016. *Separation and preparation method of complete essential amino acids.* Kiina, Patentti Nro. CN106399411A.

Liitteet

Liite I, Kuvat 1 ja 2, Taulukot 1 ja 2

Kuva 1 Napiinin ja napiinin tyyppisten 2S albumiinien vertailua. (napA-C ja) BRANA = *Brassica napus* (rapsi); ARATH = *Arabidopsis thaliana* (lituruoho); CAPMA = *Capparis masaikai* (马 槟 榔, mǎ bīnláng); BRAJU = *Brassica juncea* (sareptansinappi); SINAL = *Sinapsis alba* (keltasinappi); SINAR = *Sinapsis arvensis* (rikkasinappi). Aminohappoketjuja vertailemalla nähdään, että rapsin napiinit ovat hyvin samankaltaisia ja eroavat korkeintaan 1-4 yksiköllä toisistaan (pois lukien 2SSI_BRANA). (Barciszewski, et al., 2000)



Kuva 2 Serepansinapin (B. juncea) napiinin sekvenssistä voidaan huomata hyvin suuri sisäisten toistojen säilyminen Brassica-suvun lajista toiseen. (A) Muuttuneet kohdat laajassa napiinin aliyksikössä (: = täysin sama ja . = konservatiivinen muutos). (B) Brassica-lajien napiinien (2S albumiinien) aminohappoketjun vertailua (* = aminohapon säilyminen kaikissa vertailluissa lajeissa). Kaksi sisäistä toistoa jotka ovat säilyneet kaikissa lajeissa on alleviivattu serepansinapin kohdalla. Säilyneet toistot sisältävät yhteensä kuusi kysteiiniä. (Jyothi, et al., 2007)

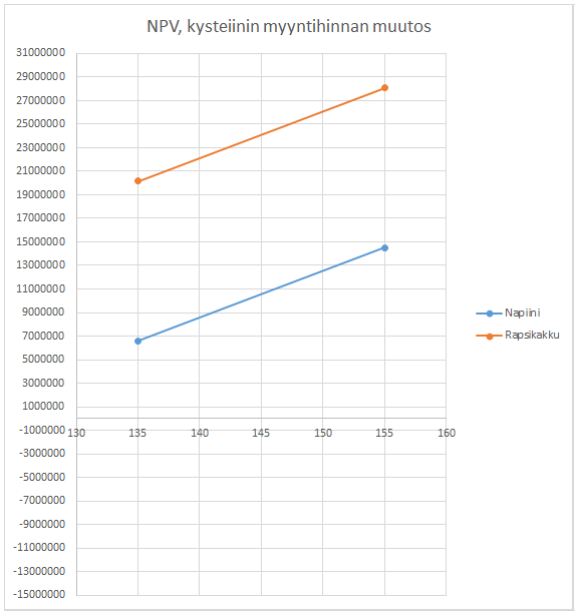
Taulukko 1 Napiinien rakenne aminohapposekvensseinä. Kysteiiniä sisältävät kohdat [**C**] on merkitty lihavoituna ja suuremmalla fontilla. (Schneider, et al., 1989)

Merkintä	Merkinnän nimi	Proteiinin nimi	Peptidiketju 1#	Peptidiketju 2#
P01091	2SS1_BRANA	Napin-1	PK**C**RKEFQQAQ HLKA**C**QQWLH KQAMQSGGG	PQQRPPLHQQY**C**NELQQEEPL**C**V**C**PTLRGA SKAVKQQIQQQEQQQGKQQMVNRIYQTATH LPKV**C**NIPQVSV**C**PFQKTMPG
P80208	2SS3_BRANA	Napin-3	SAGPFRIPK**C** RKEFQQAQHL RA**C**QQWLHKQ AMQSGSG	PQGPQQRPPLLQQ**C**CNELHQEEPL**C**V**C**PTL KGASRAVKQQVRQQQGQQGQQLQQVISRIY QTATHLPKV**C**NIPQVSV**C**PFQKTMPGPS
P17333	2SS4_BRANA	Napin	AGPFRIPK**C**R KEFQQAQHLK A**C**QQWLHKQA MQSGSG	PQQRPPLLQQ**C**CNELHQEEPL**C**V**C**PTLKGA SKAVKQQVRQQQGQQGQQLQQVISRIYQTA THLPKV**C**NIPQVSV**C**PFQKTMPGPSY
P09893	2SSE_BRANA	Napin embryo-specific	AGPFRIPK**C**R KEFQQAQHLR A**C**QQWLHKQA MQPGGGSG	PQQRPPPPQQ**C**CNELHQEEPL**C**V**C**PTLKGA SKAVRQQVRQQQGQQMQGQQMQQVISRVYQ TATHLPRV**C**NIRQVSI**C**PFQKTMPGPGFY
P27740	2SSB_BRANA	Napin-B	AGPFRIPK**C**R KEFQQAQHLK A**C**QQWLHKQA MQSGSG	PQQRPPLLQQ**C**CNELHQEEPL**C**V**C**PTLKGA SKAVKQQIQQQGQQQGKLQMVSRIYQTATH LPKV**C**KIPQVSV**C**PFQKTMPGPSY
P24565	2SSI_BRANA	Napin-1A	QPQK**C**QREFQ QEQHLRA**C**QQ WIRQQLAGSP F	QSGPQEGPWLREQ**C**CNELYQEDQV**C**V**C**PTL KQAAKSVRVQGQHGPFQSTRIYQIAKNLPN V**C**NMKQIGT**C**PFIAIPFFP
P01090	2SS2_BRANA	Napin-2	AGPFRIPK**C**R KEFQQAQHLR A**C**QQWLHKQA MQSGGG	PQQRPPLLQQ**C**CNELHQEEPL**C**V**C**PTLKGA SKAVKQQIQQQGQQQGKQQMVSRIYQTATH LPKV**C**NIPQVSV**C**PFQKTMPG

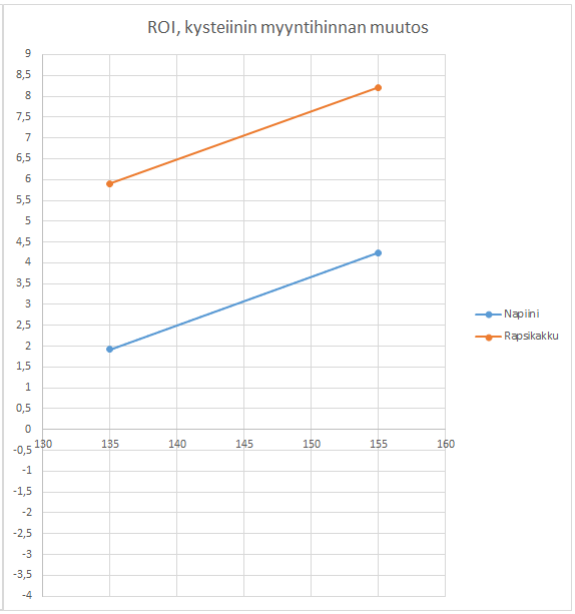
Taulukko 2 Cruciferiinien rakenne aminohapposekvensseinä. Kysteiiniä sisältävät kohdat [**C**] on merkitty lihavoituna ja suuremmalla fontilla. (Schneider, et al., 1989)

Merkintä	Merkinnän nimi	Proteiinin nimi	Peptidiketju 1#	Peptidiketju 2#
P33525	CRU3_BRANA	Cruciferin CRU1	QQFPNE**C**QLDQLNALEPSHVLKAEAGRIEV WDHHAPQLR**C**SGVSFVRYIIESKGLYLPSF FSTAKLSFVAKGEGLMGRVVPG**C**AETFQDS SVFQPSGGSPSGEGQGQGQQGQGQGHQGQG QGQQGQQGQQGQQSQGQGFRDMHQKVEHIR TGDTIATHPGVAQWFYNDGNQPLVIVSVLD LASHQNQLDRNPRPFYLAGNNPQGQVWIEG REQQPQKNILNGFTPEVLAKAFKIDVRTAQ QLQNQQDNRGNIIRVQGPFSVIRPPLRSQR PQETEVN	GLEETI**C**SAR**C**TDNLDDPSNADVYKPQLGY ISTLNSYDLPILRFLRLSALRGSIRQNAMV LPQWNANANAVLYVTDGEAHVQVVNDNGDR VFDGQVSQGQLLSIPQGFSVVKRATSEQFR WIEFKTNANAQINTLAGRTSVLRGLPLEVI SNGYQISLEEARRVKFNTIETTLTHSSGPA SYGGPRKADA
P33523	CRU1_BRANA	Cruciferin BnC1	QQWPNE**C**QLDQLNALEPSQIIKSEGGRIEV WDHHAPQLR**C**SGFAFERFVIEPQGLYLPTF LNAGKLTFVVHGHALMGKVTPG**C**AETFNDS PVFGQGQGQEQGQGQGQGQGQGFRDMHQKV EHLRSGDTIATPPGVAQWFYNNGNEPLILV AAADIANNLNQLDRNLRPFLLAGNNPQGQQ WLQGRQQQKQNNIFNGFAPQILAQAFKISV ETAQKLQNQQVNRGNIVKVQGQFGVIRPPL RQGQGGQQPQEEGN	GLEETL**C**TMR**C**TENLDDPSSADVYKPSLGY ISTLNSYNLPILRFLRLSALRGSIHNNAMV LPQWNVNANAALYVTKGKAHIQNVNDNGQR VFDQEISKGQLLVVPQGFAVVKRATSQQFQ WIEFKSNDNAQINTLAGRTSVMRGLPLEVI SNGYQISPQEARSVKFSTLETTLTQSSGPM GYGMPRVEA
P33522	CRU4_BRANA	Cruciferin CRU4	QQWPNE**C**QLDQLNALEPSQIIKSEGGRIEV WDHHAPQLR**C**SGFAFERFVIEPQGLYLPTF LNAGKLTFVVHGHALMGKVTPG**C**AETFNDS PVFGQGQGQEQGQGQGQGQGQGFRDMHQKV EHLRSGDTIATPPGVAQWFYNNGNEPLILV AAADIANNLNQLDRNLRPFLLAGNNPQGQQ WLQGRQQQKQNNIFNGFAPQILAQAFKISV ETAQKLQNQQVNRGNIVKVQGQFGVIRPPL RQGQGGQQPQEEGN	GLEETL**C**TMR**C**TENLDDPSSADVYKPSLGY ISTLNSYNLPILRFLRLSALRGSIHNNAMV LPQWNVNANAALYVTKGKAHIQNVNDNGQR VFDQEISKGQLLVVPQGFAVVKRATSQQFQ WIEFKSNDNAQINTLAGRTSVMRGLPLEVI SNGYQISPQEARSVKFSTLETTLTQSSGPM GYGMPRVEA
P11090	CRUA_BRANA	Cruciferin	QQFPNE**C**QLDQLNALEPSHVLKAEAGRIEV WDHHAPQLR**C**SGVSFVRYIIESKGLYLPSF FSTARLSFVAKGEGLMGRVVL**C**AETFQDSS VFQPSGGSPFGEGQGQGQQGQGQGHQGQGQ GQQGQQGQQGQQSQGQGFRDMHQKVEHIRT GDTIATHPGVAQWFYNDGNQPLVIVSVLDL ASHQNQLDRNPRPFYLAGNNPQGQVWIEGR EQQPQKNILNGFTPEVLAKAFKIDVRTAQQ LQNQQDNRGNIIRVQGPFSVIRPPLRSQRP QEEVN	GLEETI**C**SAR**C**TDNLDDPSNADVYKPQLGY ISTLNSYDLPILRFLRLSALRGSIRQNAMV LPQWNANANAVLYVTDGEAHVQVVNDNGDR VFDGQVSQGQLLSIPQGFSVVKRATSEQFR WIEFKTNANAQINTLAGRTSVLRGLPLEVI SNGYQISLEEARRVKFNTIETTLTHSSGPA SYGGPRKADA
P33524	CRU2_BRANA	Cruciferin BnC2	QQFPNE**C**QLDQLNALEPSHVLKAEAGRIEV WDHHAPQLR**C**SGVSFVRYIIESQGLYLPSF LNTANVSFVAKGQGLMGRVVPG**C**AETFQDS SVFQPGSGSPFGEGQGQGQQGQGQGQGQ GKGQQGQGKGQQGQSQGQQGQGQGFRDMHQ KVEHIRSGDTIATHPGVAQWFYNNGNQPLV IVAVMDLASHQNQLDRNPSQFYLAGKNPQG QSWLHGRGQQPQNNILNGFSPEVLAQAFKI DVRTAQQLQNQQDNRGNIVRVQGPFGVIRP PLKSQRPQETEAN	GLEETI**C**SAR**C**TDNLDDPSNADVYKPQLGY ISILNSYDLPILRVLRLSALRGSIRQNAMV LPQWKSKSNAVLYVTDGEAQIQVVNDNGDR VFDGQVSQGQLLSIPQGFSVVKRATSDQFR WIEFKTNANAQINTLAGRTSVMRGLPLEVI ANGYQISLEEARRVKFNTIETTLTHSSGPA SYGRPRKADA

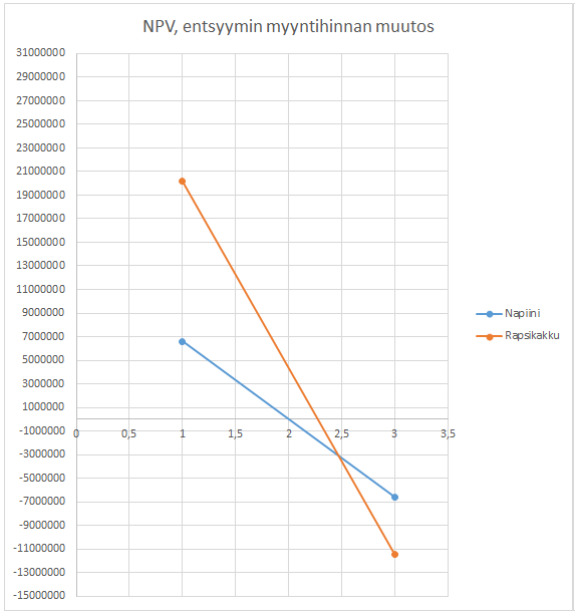
Liite II, Kuvat 3-10



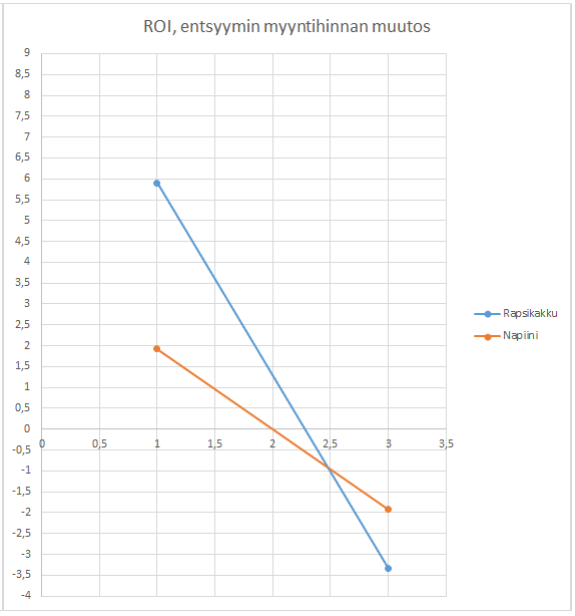
Kuva 3



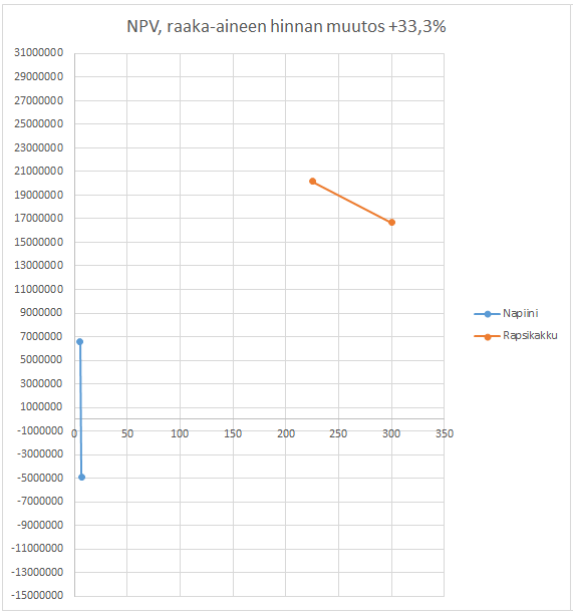
Kuva 4



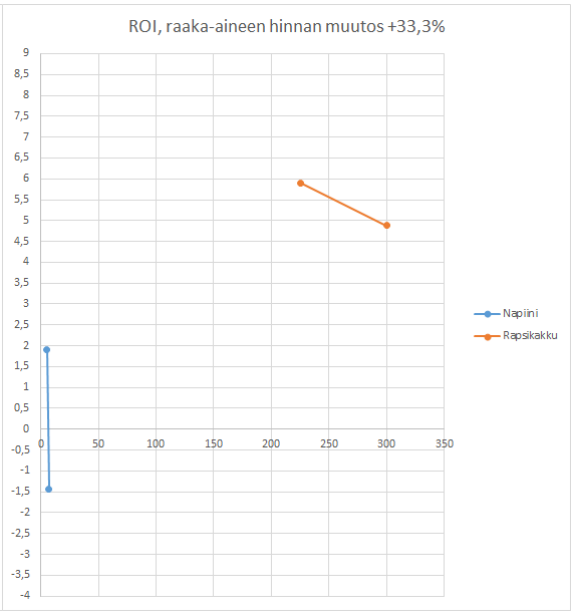
Kuva 5



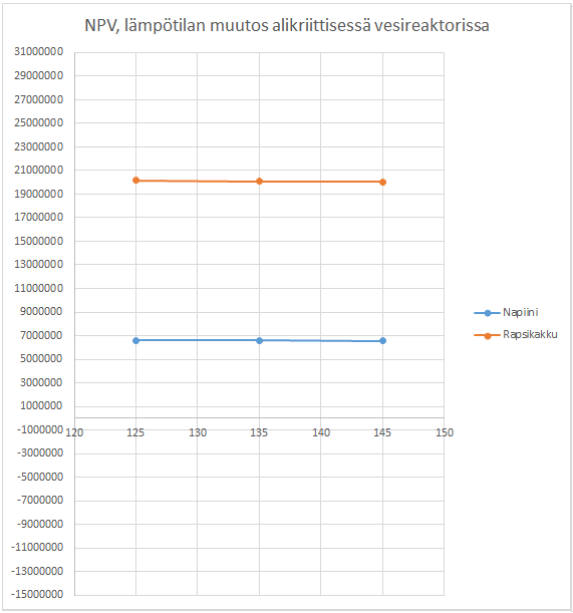
Kuva 6



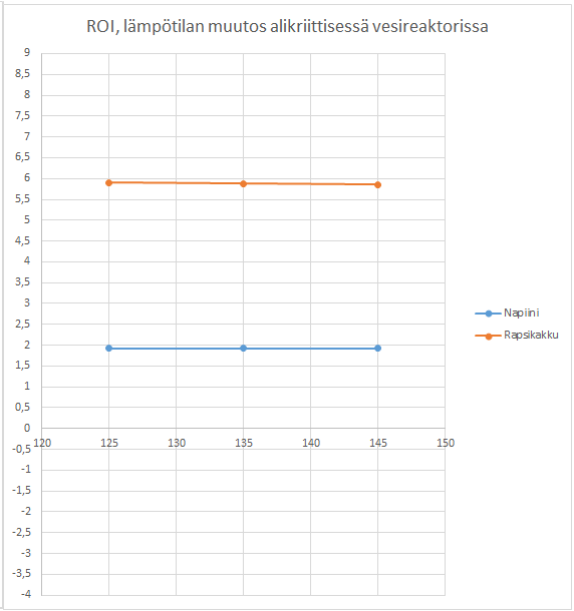
Kuva 7



Kuva 8



Kuva 9



Kuva 10