



Mikko Sakki

Lämpötilan ja ajan vaikutus 1,3:1,6-  
 $\beta$ -glukaanin uuttosaantoon  
*Ganoderma lucidum* -sienilajista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

11.5.2021

# Tiivistelmä

Tekijä:	Mikko Sakki
Otsikko:	Lämpötilan ja ajan vaikutus 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin uuttosaantoon <i>Ganoderma lucidum</i> -sienilajista
Sivumäärä:	40 sivua + 2 liitettä
Aika:	11.5.2022
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat:	Lehtori Timo Laitinen Tuotantopäällikkö Ilse Aalto

---

Tämä insinöörityö tehtiin keväällä 2022 Kääpä Biotech Oy:lle. Työn tavoitteena oli selvittää lämpötilan ja ajan vaikutusta 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin uuttosaantoon *Ganoderma lucidum* -sienilajista kuumavesiuuttomenetelmällä ja löytää tutkittujen resurssien ja 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanisaannon suhteen optimaaliset uuttoparametrit.

Insinöörityön teoriaosuus jakautuu kahteen osioon. Ensimmäisessä osassa käydään läpi lääkekinnällisiä sieniä yleisellä tasolla sekä *Ganoderma lucidum* -sienilajin ominaispiirteitä. Teoriaosuuden toinen osa käsittelee bioaktiivisten aineosien uuttamista eloperäisestä materiaalista ja erilaisia uuttomenetelmiä.

Kokeellisessa osuudessa *Ganoderma lucidum* -sienijauhetta uutettiin vedessä kolmessa eri lämpötilassa, ja uutteista kerättiin kiintoainejäämänäytteet kolmessa eri ajankohdassa. Kiintoainejäämänäytteiden 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuutta verrattiin raakajauhenäytteen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuuteen, josta pääteltiin veteen liunneen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin määrä. 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuus analysoitiin näytteistä Megazyme-yrityksen sienien ja hiivojen  $\beta$ -glukaanipitoisuuden määrittämiseen tarkoitetulla menetelmällä.

Tutkimustuloksissa ei nähty selvää positiivista lineaarista korrelaatiota lämpötilan, ajan ja liuottimeen siirtyneen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuuden välillä. Kuumavesiuutto ei tulosten valossa näyttäytynyt tehokkaana menetelmänä 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin uuttamiseen *Ganoderma lucidum* -sienilajista. Lisätutkimuksia olisi hyvä suorittaa tulosten varmistamiseksi ja vaihtoehtoisia uuttomenetelmiä tutkia 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanisaannon lisäämiseksi.

Avainsanat: *Ganoderma lucidum*, lakkakääpä, sieni, beetaglukaani, uutto

## Abstract

Author: Mikko Sakki  
Title: Effect of Time and Temperature to the Yield of 1,3:1,6- $\beta$ -Glucan From *Ganoderma lucidum*  
Number of Pages: 40 pages + 2 appendices  
Date: 11 May 2022

Degree: Bachelor of Engineering  
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering  
Professional Major: Biotechnology and Food Engineering  
Supervisors: Timo Laitinen, Senior Lecturer  
Ilse Aalto, Production Manager

---

This thesis was made in the spring of 2022 for Kääpä Biotech Oy. The purpose of the thesis was to evaluate the effect of temperature and time on the extraction yield of 1,3:1,6- $\beta$ -glucan from *Ganoderma lucidum* mushroom species. The extraction was performed by using the hot water extraction method. The empirical section of the study investigated optimal extraction parameters in relation to the used resources and the 1,3:1,6- $\beta$ -glucan yield.

The theory section of this thesis is divided into two parts. The first part studies medicinal mushrooms and characteristics of *Ganoderma lucidum* species. The second part focuses on the extraction of bioactive components from organic material and different extraction methods.

In the empirical section of the thesis *Ganoderma lucidum* mushroom powder was extracted at three different temperatures and solid residue samples were collected from these at three different points of time. The 1,3:1,6- $\beta$ -glucan of solid residue samples was compared to the 1,3:1,6- $\beta$ -glucan of raw powder sample from which the  $\beta$ -glucan concentration was interpreted. The 1,3:1,6- $\beta$ -glucan concentration was analysed using Megazyme's method for mushroom and yeast beta-glucan.

No clear positive linear correlation between temperature, time and the 1,3:1,6- $\beta$ -glucan dissolved into the solution was found in the study. The hot water extraction method does not seem to be an efficient method for the extraction of 1,3:1,6- $\beta$ -glucan from the *Ganoderma lucidum* species. More studies should be conducted to confirm the results and alternative extraction methods studied in order to increase the yield of 1,3:1,6- $\beta$ -glucan.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, reishi, fungi, mushroom, beta-glucan, extraction

# Sisällys

1	Johdanto	1
2	Lääkinnälliset sienet	2
3	<i>Ganoderma lucidum</i>	3
3.1	Sienen ominaispiirteet	3
3.2	Tärkeimmät bioaktiiviset yhdisteet	8
3.2.1	Beetaglukaani	8
3.2.2	Terpeenit	9
3.3	Terveysvaikutukset	11
4	Bioaktiivisten ainesosien uuttaminen eloperäisestä materiaalista	13
4.1	Uuttomenetelmiä	14
4.1.1	Kuumavesiuutto	15
4.1.2	Mikroaaltoavusteinen uutto	15
4.1.3	Ultraääniavusteinen uutto	18
4.1.4	Entsyymiavusteinen uutto	19
4.2	Polysakkaridien uuttaminen sienistä	20
5	Tärkeimmät havainnot teoriaosuudesta kokeellisen osuuden kannalta	23
6	Tutkimusaineisto ja menetelmät	23
6.1	Näytteiden valmistus	24
6.2	1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin pitoisuuden analysointi	25
7	Tulokset ja niiden tarkastelu	26
8	Yhteenveto ja johtopäätökset	32
	Lähteet	36
	Liitteet	
	Liite 1: Menetelmä 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuuden määrittämiseen	
	Liite 2: Näytteistä mitattu aineisto	

# 1 Johdanto

Sieniä on pitkään arvostettu niiden maun, ravintosisällön ja lääkinällisten ominaisuuksien takia, ja ne ovat olleet merkittäviä lukuisille kulttuureille eri puolilla maailmaa. Sieniä on käytetty tuhansia vuosia niiden lääkinällisen käyttöhistorian ulottuessa jopa aikaan 3000 eaa. Perinteisesti lääkinällisiä sieniä on käytetty erityisesti Aasian maissa, kuten Kiinassa, Japanissa ja Koreassa, mutta nykyään lääkinällisten sienien käyttö tunnetaan ympäri maapallon. [1, s. 1; 2, s. 702; 3, s. 503.]

Työssä käsitellään ensin lääkinällisiä sieniä ja tutustutaan *Ganoderma lucidum* -sienilajiin yleisellä tasolla sekä syvennytään sienen bioaktiivisiin yhdisteisiin ja mahdollisiin terveysvaikutuksiin. Painopiste siirtyy tämän jälkeen erilaisten uutomenetelmien käsittelyyn ja polysakkaridien uuttamiseen sienistä. Työn jälkimmäinen osa käsittelee tutkimuksessa käytettyjä menetelmiä, saatuja tuloksia ja niistä tehtyjä johtopäätöksiä.

Kokeellinen osuus koostui kahdesta osiosta. Ensimmäisessä osuudessa valmistettiin koeuutteet ja kerättiin uutteen kiintoainejäännösnäytteet. Toisessa osuudessa kiintoainejäännös- ja raakajauhenäytteistä analysoitiin 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuus ja tuloksia verrattiin keskenään.

Insinöörityön toimeksiantaja oli Kääpä Biotech Oy, jossa haluttiin selvittää optimaalinen uuttolämpötila ja -aika *Ganoderma lucidum* -sienilajille. Tavoitteena oli löytää sellaiset parametrit, jotka antaisivat parhaimman 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanisaannon käytettyihin resursseihin nähden. Tutkimalla uuttoparametrien vaikutusta 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanisaantoon, yritys voi nopeuttaa tuotantoaan ja vähentää käytetyn energian määrää.

## 2 Lääkinnälliset sienet

Lääkinnälliset sienet voidaan määritellä makroskooppisiksi Basidiomycetes- tai Ascomycetes-kaareen kuuluviksi sienilajeiksi, joiden avulla voidaan ennaltaehkäistä, lievittää tai parantaa erilaisia sairauksia ja tukea terveellistä ruokavaliota. Lääkinnällisistä sienistä saatavien yhdisteiden erityislaatuisuus ja teho on kyetty osoittamaan viimeisten kolmen vuosikymmenen aikana. Arvioidaan, että sienilajeista tiedetään ainoastaan murto-osa, eikä kaikkia sienten biokemiallisia ja farmakologisia vaikutuksia vielä tunneta. Sienillä on tulevaisuudessa merkittävästi potentiaalia uusien lääkeaineiden etsinnässä. [3, s. 504–505.]

Sienet sisältävät monenlaisia bioaktiivisia yhdisteitä, jotka voidaan jakaa toissijaisiin aineenvaihduntatuotteisiin, glykoproteiineihin ja polysakkarideihin, jotka ovat enimmäkseen beetaglukaaneja. Toissijaisiin aineenvaihduntatuotteisiin voidaan lukea esimerkiksi hapot, terpenoidit, polyfenolit, alkaloidit, sterolit ja vitamiinit. Monet lääkinällisten sienien sisältämät polysakkaridit ja polysakkaridi-proteiinikompleksit näyttäisivät tehostavan immuunipuolustusta ja estävän kasvaimien syntyä inhiboimalla ja tuhoamalla kasvainsoluja. Sienien sisältämät polysakkaridit eivät pysty suoranaisesti vaikuttamaan kasvainsoluihin, vaan kasvainsolujen kasvua estävä vaikutus johtuu polysakkaridien kyvystä aktivoida isäntäeliön immuunivastetta. Lääkinällisten sienien on myös havaittu edistävän verenkierroelimistön ja hermoston normaalia toimintaa sekä ehkäisevän diabetesta, korkeaa kolesterolia ja ylipainoa. Näiden lisäksi on havaittu antioksidanttisia, -bakteerisia ja -viraalisia ominaisuuksia sekä loisia ja sieniä torjuvia vaikutuksia. Hermostoon kohdistuvat vaikutukset ovat sekä neuroneja suojaavia että neurogeneesiä edistäviä, mikä saattaa tehdä lääkinällisten sienten käytöstä varteenotettavan tukihoitomuodon dementiasta kärsiville ihmisille. [3, s. 505–506; 1, s. 2–3.]

Lääkinällisiä sieniä käytetään usein terveyden edistämiseen ravintolisien muodossa, jotka eivät vaikuta lääkkeiden tavoin, mutta ne tuottavat siitä huolimatta mahdollisia terveyshyötyjä. Nykyään on saatavilla monenlaisia lääkinällisistä sienistä saatavia ravintolisiä, kuten erilaisia uutteita, jauheita, kapseleita ja

tabletteja. Ne voidaan tehdä esimerkiksi itiöemistä, sienirihmastosta, primordiasta, itiöistä ja kasvusubstraatista. Ravintolisissä käytettävät sienet ja niiden osat voidaan kerätä luonnosta tai kasvattaa keinotekoisesti lukuisilla erilaisilla kasvatustekniikoilla, aina perinteisestä sienien tukkikasvatuksesta bioreaktoreissa tehtävään nesteviljelyyn. [3, s. 508.]

### **3 *Ganoderma lucidum***

*Ganoderma lucidum* (Karst, 1881) on yksivuotinen ja kookas kääpäsieni, joka tunnetaan lääkinnällisenä sienenä [4, s. 292]. *Ganoderma lucidum*, josta käytetään yleisesti myös nimiä lakkakääpä, reishi ja lingzhi, on ollut pitkään käytössä Kiinassa, Japanissa ja muissa Aasian maissa sen terveysvaikutusten vuoksi [4, s.292; 5]. *Ganoderma lucidum* -sienilajin väitetyt terveysvaikutukset perustuvat osin kansanlääkinnälliseen traditioon ja anekdoottisiin todisteisiin, mutta osalla terveysväitteistä on myös tieteellistä näyttöä [5]. *Ganoderma lucidum* -sienilajia käytetään monissa eri muodoissa, kuten tinktuurana, teenä, keittona, siirappina ja pillerinä, mutta myös sekoitettuna esimerkiksi viinin tai oluen joukkoon [6, s. 776].

#### **3.1 Sienen ominaispiirteet**

*Ganoderma lucidum* -sienilajilla on yleensä kookas, munuaisen tai viuhkan muotoinen litteä, sileä ja kiiltävä lakki, joka on halkaisijaltaan 5–20 senttimetriä ja paksuudeltaan 1–4 senttimetriä [4, s. 292; 6, s. 756; 7; 8]. Toinen tunnettu kasvumuoto on sarvityyppi, jossa sieni muodostaa ohuita sarven kaltaisia itiöemiä korkean hiilidioksidipitoisuuden takia [9, s. 293]. Kuvassa 1 esitetään viuhkatyyppi ja kuvassa 2 sarvityyppi. Lakissa on usein tunnusomaisia alueita, joista käy ilmi sienien samankeskinen kasvutapa [6, s. 757]. Lakin yläpinnan väritys on nuorella sienellä oranssinpunertava ja myöhemmin itiöpölyn värjäämänä kastanjanruskea [4, s. 292]. Lakin reuna saattaa olla kellanruskea tai valkeahko [8]. Lakin alapinta on vaalean okranvärinen ja muuttuu ruskeammaksi kosketettaessa sekä sienien ikääntyessä [4, s. 292; 6, s. 757]. Uusi kasvukohta on aluksi valkoinen, mutta muuttuu myöhemmin kellertäväksi ja lopulta punertavaksi [6, s.

757]. Malto on koostumukseltaan pehmeän korkkimainen ja väriltään kermanvalkoinen [4, s. 292]. Pillit ovat pyöreät, pituudeltaan 0,3–1 senttimetriä ja niitä on neljästä kuuteen jokaista millimetriä kohden. Jalka on monesti mutkitteleva ja se kiinnittyy epäkeskisesti lakkiin. [4, s. 292; 6, s. 757; 8.] Jalan väriyty vaihtelee aluksi valkoisesta kellertävään ja muuttuu myöhemmin ruskeaksi tai mustaksi [6, s. 757]. Jalan pituus voi vaihdella lähes olemattomasta jopa 10 senttimetriin, ja sen paksuus on 0,5–5 senttimetriä [6, s. 757; 8].



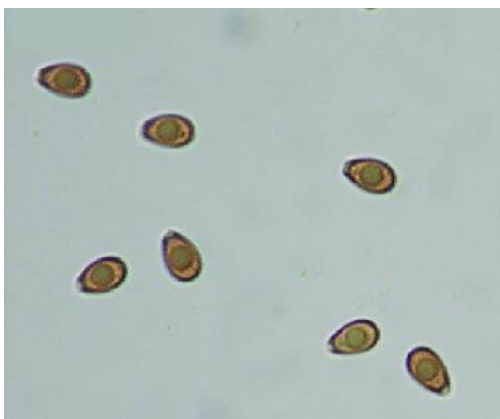
Kuva 1. Viuhkatyyppin *Ganoderma lucidum* -sieniyksilö [10].





Kuva 2. Sarvityypin *Ganoderma lucidum* -sieniyksilö [11].

Itiöt ovat muodoltaan tylppäpäisiä ellipsoideja ja väritykseltään punaruskeita, kuten nähdään kuvasta 3 [6, s. 758]. Sienirihmasto kasvaa nopeasti säteittäin pitkittäissuunnassa ja on väritykseltään aluksi valkoinen, mutta muuttuu myöhemmin kellertäväksi. Rihmasto muodostaa tiiviin kasvuston, joka muuttuu yleensä alueelliseksi sienen ikääntyessä. [6, s. 760.] Kuvassa 4 nähdään tyypillistä *Ganoderma lucidum* -sienilajin kasvualustaan muodostamaa sienirihmasto.



Kuva 3. *Ganoderma lucidum* -sienilajin itiöitä [12, s. 745].

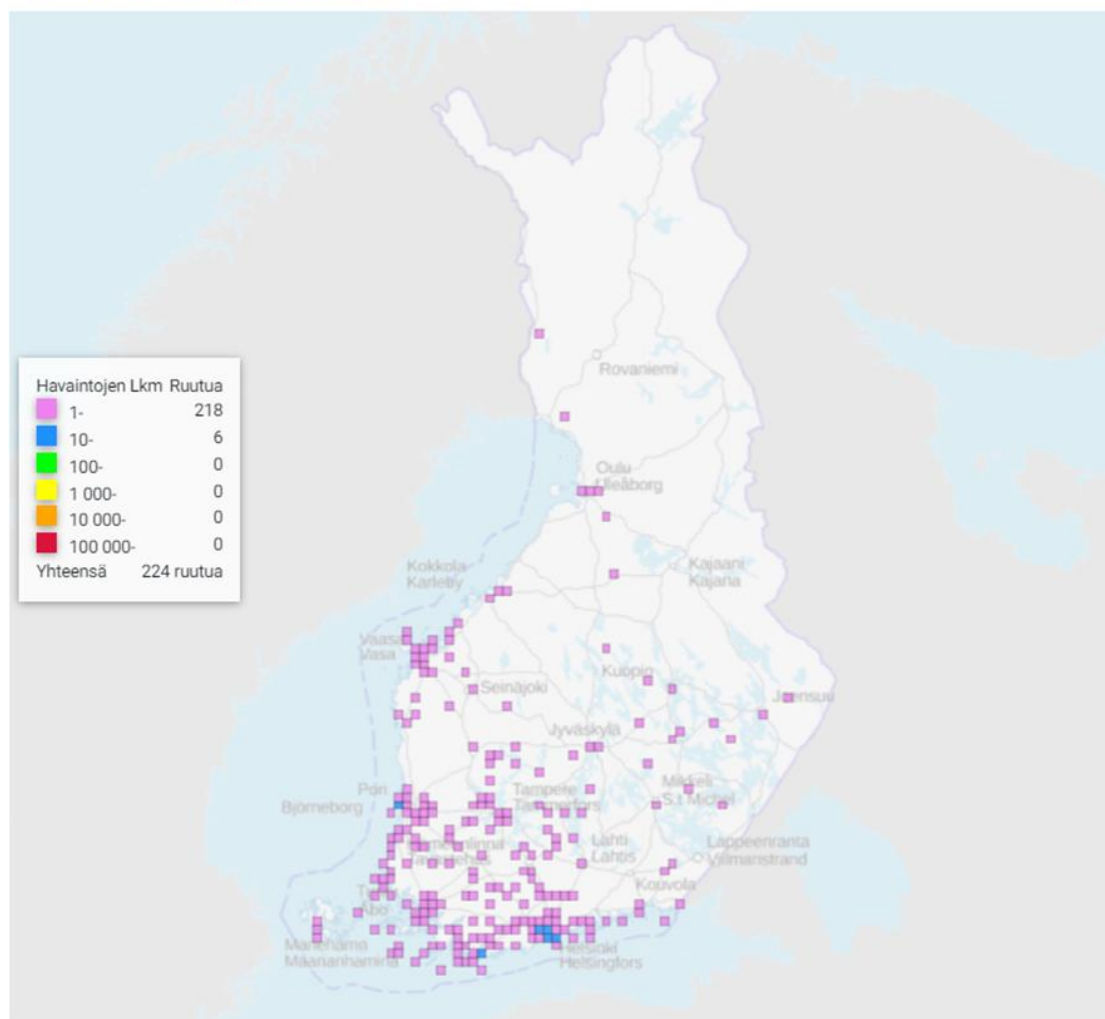


Kuva 4. Tiiviisti kasvanutta ja osittain kellertävää *Ganoderma lucidum* -sienilajin sienirihmastoja viljelypussissa.

Morfologisissa tunnusmerkeissä on paljon vaihtelua, mikä johtuu esimerkiksi erilaisista kasvuolosuhteista ja muutoksista sienien geneettisessä perimässä. Tästä johtuen *Ganoderma*-lajien tunnistaminen makromorfologisten tunnusmerkkien perusteella on monesti haastavaa. Luotettavampana tunnistamiskeinona voidaan pitää itiöiden morfologisia tunnusmerkkejä, mutta taksonomisessa luokittelussa on hyödynnetty myös erilaisia biokemiallisia, geneettisiä ja molekulaarisia tapoja. [5.]

*Ganoderma lucidum* kuuluu valkolahottajiin, ja isäntälajeja ovat yleensä tammien, tervaleppien ja muiden lehtipuiden lahoavat kannot ja rungot, mutta lajia tavataan myös lahoavilla havupuilla [4, s. 292; 6, s. 757–758]. Lajia esiintyy maailmanlaajuisesti lauhkealla, subtrooppisella ja trooppisella ilmastovyöhykkeellä, mutta se on yleisempi lämpimämmillä vyöhykkeillä [6, s. 757; 13]. Suomessa sen levinneisyys rajoittuu hemi- ja eteläborealiselle vyöhykkeelle, mutta havaintojen määrä on vähäinen ja ne keskittyvät suurelta osin Etelä-Suomeen [4, s. 292; 14]. *Ganoderma lucidum* -sienihavainnot Suomessa nähdään kuvasta 5, joita on merkitty 16.4.2022 yhteensä 555 kappaletta. Suomessa sen satoaika ajoittuu elokuusta lokakuuhun. *Ganoderma lucidum* -sienilajille otollisia kasvupaikkoja ovat kosteat ja rehevät rantalehdot, korpimaiset sekametsät ja tervaleppäkorvet. [4, s. 292.]

Kartta esittää havaintoja tästä taksonista, mutta sitä ei voi käyttää levinneisyyskarttana. Suomessa yhteensä 555 havaintoa ?



Kuva 5. *Ganoderma lucidum* -sienilajin havainnot Suomessa.

Suurimman osan *Ganoderma lucidum* -sienilajin massasta muodostaa sen korkea vesipitoisuus, joka voi olla enimmillään 90 prosenttia. Vedettömän sienen massa sisältää 3–28 prosenttia hiilihydraatteja, 10–40 prosenttia proteiineja, 28 prosenttia rasvaa, 3–32 prosenttia kuitua ja 8–10 prosenttia tuhkaa. Sienen sisältämät mineraalit ovat suurimmaksi osaksi sinkkiä, kuparia, rautaa, magnesiumia, seleeniä, kalsiumia, kaliumia ja fosforia. Näiden lisäksi sienen on tutkittu sisältävän esimerkiksi d<sub>2</sub>-vitamiinia ja runsaasti monitydyttymättömiä rasvahappoja verrattuna muihin sienilajeihin. Sieni sisältää runsaasti erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, jota käsitellään tarkemmin seuraavassa luvussa. [5; 15, s. 3]

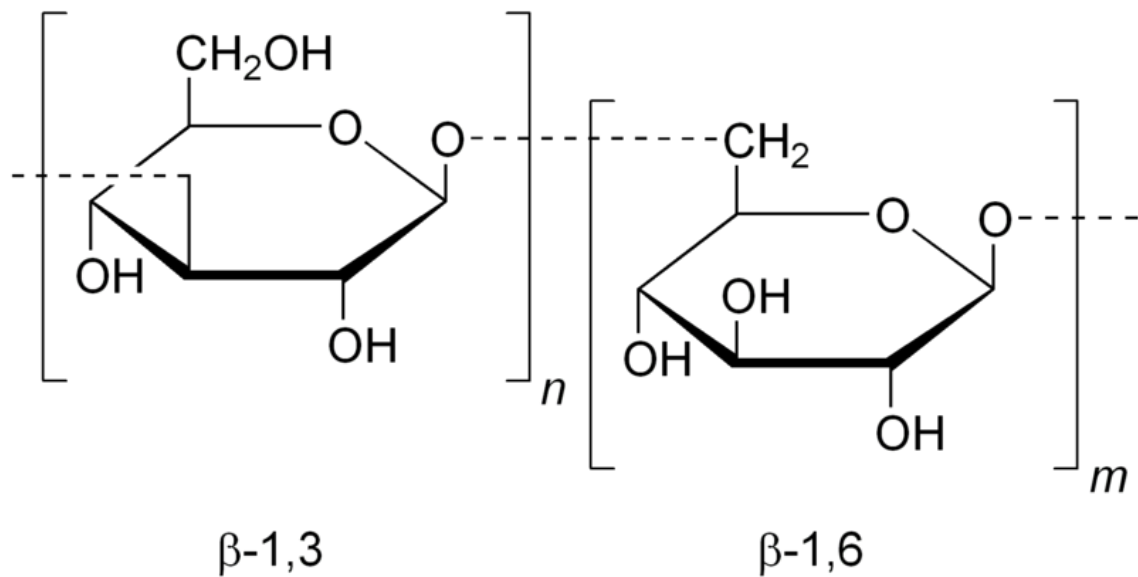
## 3.2 Tärkeimmät bioaktiiviset yhdisteet

*Ganoderma lucidum* -sienilajin sisältämät polysakkaridit ja triterpenoidit kuuluvat sen tuottamiin tärkeimpiin bioaktiivisiin yhdisteisiin. Muita bioaktiivisia yhdisteitä ovat esimerkiksi erilaiset vitamiinit, peptidoglykaanit, alkaloidit, fenolit, entsyymit, proteiinit, aminohapot, flavonoidit, glykoproteiinit ja steroidit. Yleisesti ottaen *Ganoderma lucidum* sisältää noin 400 erilaista bioaktiivista ainesosaa, joista suurin osa on polysakkarideja ja triterpeenejä. Näillä yhdisteillä on mahdollisesti esimerkiksi syöpää ehkäiseviä, antimikrobisia, immuniteettia vahvistavia ja tulehdustekijöitä vähentäviä ominaisuuksia. [16, s. 2; 17, s. 769.] Bioaktiivisten ainesosien määrät voivat vaihdella merkittävästi eri sieniyksilöiden välillä. Niiden määrään vaikuttaa esimerkiksi sienikanta, kasvualusta, viljelytekniikat, kehitysvaihe, ikä, varastointiolosuhteet ja prosessointi. [18, s. 3.]

### 3.2.1 Beetaglukaani

Beetaglukaani on polysakkarideihin kuuluva polymeeri, joka koostuu glykosididoksien toisiinsa liittyneistä rengasmuotoisista glukoosiyksiköistä [19, s. 164; 20, s. 301]. Beetaglukaani on merkittävä soluseinämien rakenneosa sienissä ( $\leq 50$  % soluseinämästä), hiivoissa, viljoissa ja joissakin bakteereissa. Beetaglukaanin makromolekyylinen rakenne riippuu sen alkuperästä. Eroavuuksia on sidosten ja haarautumisen lisäksi esimerkiksi molekyylimassassa, tertiäärirakenteessa, liukoisuudessa, varauksessa ja konformaatioissa. [21, s. 279.] Sienien sisältämään beetaglukaanin määrään vaikuttavat esimerkiksi sienilaji, kasvuolosuhteet ja itiöemän kasvuvaihe [22, s. 626].

Sienissä esiintyvistä beetaglukaaneista valtaosa on 1,3:1,6- $\beta$ -glukaaneja, joiden 1,3- $\beta$ -glukaanirungossa olevat yksittäiset D-glukosyylijäännökset liittävät 1,6- $\beta$ :n joka kolmanteen tai neljänteen D-glukosyyliyksikköön 1,3-glukaanirungossa, mutta myös monimutkaisempia rakenteita on havaittu. Kuvassa 6 esitetään 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin rakennekaava, josta nähdään 1,3- $\beta$ -glukaanirunkoon kiinnittynyt 1,6- $\beta$ -glukaaniyksikkö. [23, s. 364.]



Kuva 6. 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin rakennekaava [24].

Sienet sisältävät sekä veteen liukenevia että veteen liukenemattomia beetaglukaaneeja. Liukenevuus riippuu beetaglukaanien rakenteesta, joka vastaavasti on sidonnainen raaka-aineeseen eli sienilajiin. Veteen liukenevien beetaglukaanien osuus voi vaihdella merkittävästi eri sienilajien välillä. Liukenevuus kuitenkin lisääntyy lämpötilan kasvaessa. [22, s. 624; 22, s. 626.] *Ganoderma lucidum* -sienilajilla on tavattu jopa yli 50 m-% beetaglukaanipitoisuuksia sekä niiden ja muiden *Ganoderma*-lajien itiöemistä on eristetty vesiliukoisia polysakkarideja [25, s. 6; 26, s. 168; 27, s. 283].

### 3.2.2 Terpeenit

Terpeenit ja terpenoidit ovat yleisiä luontaisista lähteistä saatavia orgaanisia yhdisteitä, joihin kuuluu suuri määrä rakenteeltaan moninaisia yhdisteitä. Niitä tuottavat suurimmaksi osaksi erilaiset kasvit, mutta myös osa sienistä, hyönteisistä ja mikrobeista. [28, s. 17; 29, s. 704.] Terpeeniä ja terpenoidia käytetään usein virheellisesti keskenään vaihtokelpoisina termeinä, vaikka molemmat muodostavat omat yhdisteryhmänsä. On myös yleistä, että terpenoidit nähdään osana terpeenien ryhmää tai terpenoidia pidetään modifioituna terpeeninä. [29, s. 129.] Tässä opinnäytetyössä terpenoidit luetaan osaksi terpeenien

yläkäsitetä, ja niiden nähdään muodostavan oman alakategoriansa sen sisällä, mikä on yleinen lähteistä löytyvä käytäntö. Terpeeneillä siis tarkoitetaan jatkossa sekä terpenoideja että terpeenejä, ellei erikseen tarkenneta, että kyse on ainoastaan terpenoideista.

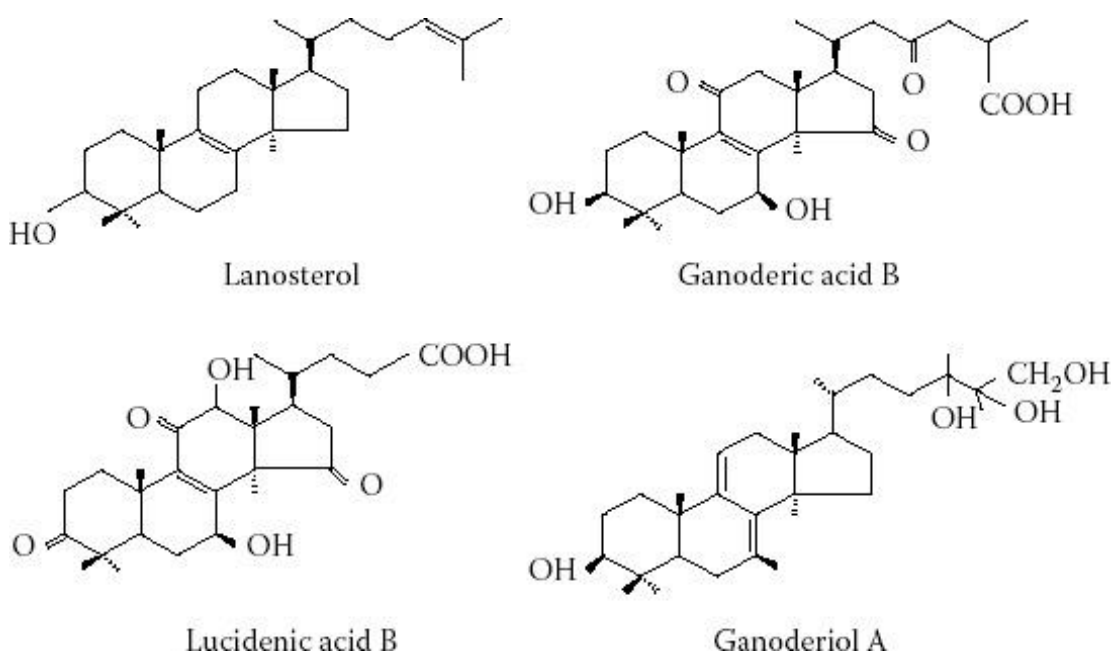
Terpeenit ovat hiilivety-yhdisteitä, joiden hiilirunko muodostuu isopreeniyksiköistä ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub>. Terpeenit voidaan jakaa omiin luokkiinsa hiiliatomien lukumäärän perusteella. Luokittelu tehdään taulukossa 1 osoitetulla tavalla. Terpenoidit muodostuvat terpeenien tapaan isopreeniyksiköistä, mutta niiden moninaisissa funktionaalisissa ryhmissä on happea. Lisäksi metyyliiryhmä saattaa siirtyä tai hävitä, minkä takia rakennetta ei voida tarkasti määrittellä ainoastaan isopreeniyksiköiden perusteella. Terpenoidit voidaan luokitella terpeenien tapaan niiden hiiliatomien lukumäärän perusteella, kuten taulukosta 1 nähdään. [30.]

Taulukko 1. Terpeenien ja terpenoidien nimeäminen hiiliatomien perusteella [30; 31, s. 234].

Hiiliatomien lukumäärä	Terpeenit	Terpenoidit
C <sub>5</sub>	Hemiterpeenit	Hemiterpenoidit
C <sub>10</sub>	Monoterpeenit	Monoterpenoidit
C <sub>15</sub>	Seskviterpeenit	Seskviterpenoidit
C <sub>20</sub>	Diterpeenit	Diterpenoidit
C <sub>25</sub>	Sesterterpeenit	Sesterterpenoidit
C <sub>30</sub>	Triterpeenit	Triterpenoidit
C <sub>40</sub>	Tetraterpeenit	Tetraterpenoidit
C <sub>5n</sub>	Polyterpeenit	Polyterpenoidit

*Ganoderma lucidum* -sienessä terpeenit ovat lanostaaniyhdisteeseen pohjautuvia triterpeenejä, jotka ovat kuvassa 7 esiintyvän lanostreolin aineenvaihduntatuotteita. Triterpeenit muodostuvat kuudesta isopreeniyksiköstä eli niiden voidaan ajatella sisältävän kolme monoterpeeniyksikköä. Triterpeenejä on löydetty

*Ganoderma lucidum* -sienestä useita, eikä monia niistä esiinny missään muualla. Suurin osa löydetyistä triterpeeneistä kuuluvat ganoderisten ja lucidenisten happojen ryhmään, mutta myös muihin ryhmiin kuuluvia triterpeenejä on tunnistettu. Kuvassa 7 nähdään esimerkki ganodermisestä ja lucidenisestä haposta, jotka on löydetty *Ganoderma lucidum* -sienilajista. On kuitenkin huomioitavaa, että triterpeenien koostumukseen vaikuttaa sienen kasvuvaihe ja se, mitä osaa sienestä tarkastellaan. [5, s. 181.]



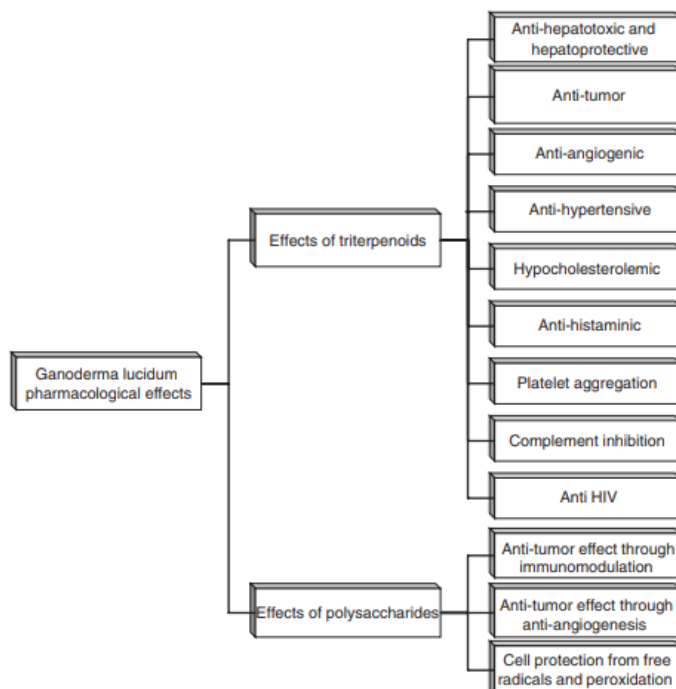
Kuva 7. *Ganoderma lucidum* -sienilajista eristetyt triterpeenit: lanostreoli, ganoderinen happo B, lucideninen happo B ja ganoderioli A [5, s. 182].

### 3.3 Terveysvaikutukset

*Ganoderma lucidum* -sienen on todettu sisältävän suuren määrän erilaisia bioaktiivisia ainesosia, joilla on erilaisia farmakologisia vaikutuksia. Farmakologisesti erityisen tärkeinä ryhminä pidetään sen sisältämiä polysakkarideja ja triterpenoideja, joita on tutkittu yksityiskohtaisesti. [15, s. 2–3.]

Sienien sisältämien beetaglukaanien on havaittu alentavan kolesterolia, stimuloivan immunitettia ja sisältävän antituumorisia ominaisuuksia. Beetaglukaani myös vaikuttaa terveyttä edistävästi ihmiskehon sokeri- ja rasvametaboliaan ja

kasvattaa Th1 lymfosyyttien määrää verenkierrassa, joka tehostaa vastustuskykyä allergioita vastaan. [22, s. 628–629.] Vesiliukoisten beetaglukaanien on havaittu olevan biologisesti aktiivisempia, kun niitä on verrattu veteen liukenemattomiin beetaglukaaneihin [22, s. 625]. On osoitettu, että kaikista merkittävimmin immuunipuolustukseen vaikuttavat vesiliukoiset ja etanolilla saostettavat  $\beta$ -1,3-D ja  $\beta$ -1,6-D glukaanit [27, s. 283]. *Ganoderma*-lajien polysakkarideista tehdyt tutkimukset keskittyvät pitkälti sen antituumorisiin ominaisuuksiin, jotka liittyvät immuunijärjestelmässä tapahtuviin muutoksiin, mutta myös soluja sääteleviä ja suojaavia vaikutuksia on havaittu. [27, s. 283.] *Ganoderma lucidum* -sienilajissa olevilla triterpenoideilla on havaittu lukuisia erilaisia terveystaikutuksia. Näitä ovat esimerkiksi niiden antituumoriset, maksaa suojaavat sekä verenpainetta ja kolesterolia alentavat vaikutukset. *Ganoderma lucidum* -sienen farmakologisia vaikutuksia on esitetty kuvassa 8, josta voidaan todeta, että mahdollisia terveystaikutuksia on runsaasti ja ne ovat ominaisuuksiltaan moninaisia. Tämän takia *Ganoderma lucidum* on mielenkiintoinen ja hyödyllinen biolääketieteen tutkimuskohde myös tulevaisuudessa. [15, s. 2]



Kuva 8. *Ganoderma lucidum* -sienilajissa esiintyvien triterpenoidien ja polysakkaridien terveystaikutukset [27, s. 277].



Useat in vitro -tutkimukset ja eläinkokeet tukevat käsitystä *Ganoderma lucidum* -sienen terveyttä edistävästä vaikutuksista, mutta osa ihmiskokeista saaduista tuloksista on ollut riittämättömiä, eivätkä ne ole aina vastanneet in vitro -tutkimuksissa löydettyjä havaintoja. Haasteena on erityisesti tutkimuksissa käytettävien valmisteiden erilaisuus, jonka takia tutkimustulosten vertailu on hankalaa. Terveysvaikutusten validoimiseen vaaditaan siten lisää hyvin suunniteltuja kliinisiä tutkimuksia, joissa vaikuttavien aineiden pitoisuus, bioaktiivisuus ja biosaattavuus on tarkasti määritetty. [32, s. 1168–1169; 33, s. 10–11]

#### **4 Bioaktiivisten ainesosien uuttaminen eloperäisestä materiaalista**

Uuttaminen on aineiden erilaisiin liukoisuuksiin perustuva erotusmenetelmä, jossa kemiallinen yhdiste tai yhdisteryhmä uutetaan sen alkuperäisestä faasista toiseen faasiin. Uutettava aine voi olla olomuodoiltaan kiinteä, neste tai kaasu. Eloperäisen materiaalin uuttamista tehdään esimerkiksi kiinteä-nesteuuttana, jossa kiinteästä faasista uutetaan halutut ainesosat nestemuodossa olevaan liuottimeen. [34.] Eloperäisen materiaalin uuttaminen alkaa liuottimen työntymisellä matriisiin, jonka jälkeen liuotettavat yhdisteet liukenevat liottimeen. Uutettavat yhdisteet diffundoituvat liuottimen mukana pois matriisista, jolloin ne voidaan ottaa talteen. [35, s. 1.]

Uuttotehokkuuteen vaikuttaa yleisesti liuottimen ominaisuudet, raakamateriaalin partikkelikokojakauma, liuottimen ja liuotettavan ainemäärien suhde sekä uuton lämpötila ja kesto. Liuotinta valittaessa tulee erityisesti ottaa huomioon sen liuotusominaisuudet ja niiden yhteensopivuus liuotettavien yhdisteiden kannalta, mutta myös sen hinta ja turvallisuus. Yleisesti voidaan todeta, että mitä pienempi partikkelikoko, niin sitä parempi on uuttsaanto. Tämä johtuu siitä, että liuotin pystyy penetroitumaan tehokkaammin uutettavien partikkelien sisälle ja uutettavat yhdisteet diffundoituvat helpommin ulos partikkeleista. Liian pienet partikkelit voivat kuitenkin aiheuttaa uutteen liiallisen imeytymisen partikkeleihin ja vaikeuttaa suodattamista. Korkea lämpötila parantaa liukenevuutta ja diffuusiota, mutta se voi samalla lisätä uutettavien yhdisteiden hajoamista.

Uuttoajan pidentäminen parantaa uuttosaantoa, kunnes liuotettava aine on tasapainotilassa matriisin sisä- ja ulkopuolella. Myös liuotinmäärän kasvattaminen parantaa uuttosaantoa, mutta pidentää samalla konsentroidin kestoa. [35, s. 1–2.]

Eloperäisen aineksen onnistunut uuttaminen vaatii tarkkaa ymmärrystä matriisin ja uutettavien yhdisteiden biokemiallisesta luonteesta, jotta uuttoon voidaan soveltaa vaadittavia fysikaaliskemiallisia ilmiöitä. Uttomenetelmän oikealla valinnalla on siten ratkaiseva merkitys onnistuneen lopputuloksen kannalta. [36, s. 66.] Haasteena ovat uutettavien ainesosien vähäinen osuus eloperäisessä aineksessa sekä monimutkaiset ja aikaa vievät prosessit [34, s. 1]. Eliömaailmasta löytyy suuri määrä erilaisia matriiseja ja yhdisteitä, jotka luovat myös omalta osaltaan haasteita uuttoprosessiin.

#### 4.1 Uttomenetelmiä

Tavanomaisiin uuttotekniikoihin kuuluvat arkielämästä tuttu liotus- ja keittouutto. Muita yleisiä tekniikoita ovat esimerkiksi maserointi, perkolaatio, refluksi- ja Soxhlet-uutto [37, s. 498]. Perinteisissä menetelmissä uuttosaanto saattaa kuitenkin olla vähäinen, ja ne voivat vaatia pitkän prosessiajan sekä suuren määrän ympäristölle haitallisia liuottimia. Lisäksi perinteiset uuttomenetelmät saattavat aiheuttaa lämpöherkkien yhdisteiden tuhoutumisen, jonka takia ne eivät välttämättä sovellu tietyille yhdisteille. [36, s. 65.] Näistä syistä johtuen uusia ympäristöystävällisempiä, tehokkaampia ja soveltuvampia menetelmiä kehitetään jatkuvasti. Uuttoprosessia on pyritty tehostamaan esimerkiksi mikroaaltoihin, ultraääneen, entsyymeihin tai ylikriittiseen nesteeseen perustuvilla tekniikoilla. [37, s. 498.] Tässä insinööriyössä syvennytään uudempiin uuttotekniikoihin, koska niiden avulla on mahdollista vähentää uuttoon käytettävää aikaa ja energiaa sekä parantaa saantoa. Näin voidaan vähentää ympäristölle aiheutuvaa kuormitusta ja säästää resursseja.

#### 4.1.1 Kuumavesiuutto

Kuumavesiuutto on helppoutensa ja vähäisten laitekustannusten johdosta yleisesti käytetty uuttomenetelmä. Menetelmä on nimensä mukaisesti uuttamista veden ja korkean lämpötilan avulla, joka tehostaa aineosien uuttumista veteen. Menetelmän heikkouksia ovat sen suuri energiavaatimus, prosessointiaika ja korkeat lämpötilat, jotka saattavat olla haitallisia termolabiileille yhdisteille. [38, s. 5.] Tästä syystä kuumavesiuuton kesto ja lämpötila on syytä optimoida käytetylle raaka-aineelle mahdollisimman sopivaksi. Kuumavesiuuton saantoa on pyritty tehostamaan myös korkealla paineella, jolloin puhutaan paineistetusta kuumavesiuutosta.

#### 4.1.2 Mikroaaltoavusteinen uutto

Mikroaaltoavusteinen uutto on menetelmä, joka perustuu mikroaaltojen kuumentavaan vaikutukseen. Sen seurauksena soluissa oleva vesi höyrystyy ja aiheuttaa soluihin valtavan paineen. Soluihin kohdistuva valtava paine saa solut hajoamaan, jolloin niiden sisältö diffundoituu käytettävään liuottimeen. Mikroaltoihin perustuvaa tekniikkaa on hyödynnetty useiden erilaisten kemiallisten aineosien uuttamisessa luontaisista lähteistä. [39, s. 3.]

Mikroaallot ovat korkeataajuisia sähkömagneettisia säteilyaaltoja sähkö- ja magneettikentässä, joiden värähtelytaajuus on 0,3–300 GHz [40, s.280; 41, s. 838]. Niiden kuumentava vaikutus johtuu dielektrisestä kuumenemisilmiöstä, joka on riippuvainen aineen kyvystä absorboida mikroaaltojen tuottamaa energiaa ja muuntaa se lämpöenergiaksi. Jotta aine voi tuottaa lämpöenergiaa mikroaaltojen vaikutuksesta, sen täytyy sisältää sähködipoleja eli olla sähköisesti polaarinen. Aineen dielektriset ominaisuudet vaikuttavat siten mikroaaltojen aiheuttamaan lämmitysvaikutukseen. Aineen kykyä muuntaa sähkömagneettista energiaa lämmöksi annetussa lämpötilassa ja annetulla taajuudella ilmaistaan kaavalla 1.

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon' \quad (1)$$

$\tan \delta$  on häviötangentti

$\varepsilon''$  on dielektrinen häviö

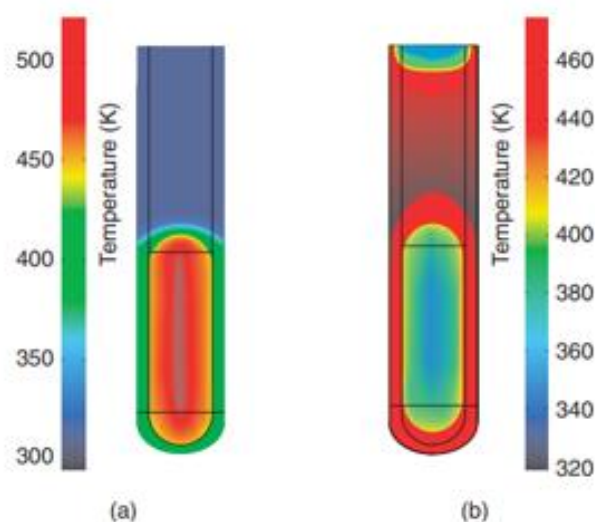
$\varepsilon'$  on dielektrinen vakio

Dielektrinen häviö kertoo mikroaaltoenergian suhteellisesta määrästä, joka muuntuu aineessa lämpöenergiaksi, ja dielektrinen vakio kuvaa molekyylien kykyä polarisoitua sähkökentän vaikutuksesta. Tehokkaan mikroaalloilla tapahtuvan lämmityksen vaatimuksena on riittävän suuri  $\tan \delta$ -arvo. Mikroaallot asettavat aineen dipolit linjaan sähkökentässä, ja sähkökentän värähdellessä, dipolienttä yrittää järjestäytyä muuttuvan sähkökentän mukaisesti. Tämä aiheuttaa molekyylien välistä kitkaa ja dielektristä häviötä, joka tuottaa lämpöenergiaa. Liian suuri tai matala taajuus heikentää mikroaaltojen kykyä tuottaa lämpöä. Tämä johtuu siitä, että taajuuden ollessa suuri, dipoleilla ei ole tarpeeksi aikaa järjestäytyä. Jos taajuus on liian matala, dipolit ehtivät järjestäytyä liikaa. Tästä johtuen monissa kaupallisissa tuotteissa on päädytty käyttämään mikroaaltoja, joiden taajuus on 2,45 GHz. Tämä taajuus mahdollistaa tehokkaan lämmöntuoton, koska molekyylien dipoleilla on aikaa järjestäytyä riittävästi uudelleen, mutta ne eivät täysin ehdi seurata muuttuvaa sähkökenttää. [41, s. 839.]

Mikroaaltoavusteisessa uutossa liuotin ja liuotettava aine voivat olla dielektrisiltä ominaisuuksiltaan erilaisia, mikä vaikuttaa osaltaan uuttoprosessiin. Esimerkiksi liuottimen dielektrinen häviöarvo voi olla pieni, kun liuotettavan aineen dielektrinen häviöarvo voi olla suuri. Tällöin liuotettava aine kuumenee mikroaaltojen vaikutuksesta ja diffuntoituu liuottimeen, jota mikroaallot eivät ole kuumentaneet. Liuottimen ja liuotettavan aineen ominaisuuksien ja niiden ainesosien suhteen lisäksi mikroaaltoavusteiseen uuttoon vaikuttavat esimerkiksi mikroaaltojen intensiteetti, uuttoaika ja lämpötila. [36, s. 70–73.]

Perinteisten lämmitysmenetelmien heikkoutena ovat niiden suhteellinen hitaus ja se, että lämmön jakautuminen on riippuvainen konvektiovirroista ja erilaisten aineiden lämmönjohtokyvystä. Tämä aiheuttaa lämpötilaeroja lämmittävän

kontaktipinnan ja aineen välille, mutta saattaa luoda myös merkittäviä lämpötilaeroja ainemassan sisällä, mikä voi johtaa aineen paikalliseen ylikuumentumiseen, ja aiheuttaa termolabiilien yhdisteiden hajoamisen. Mikroaaltojen avulla aine voidaan lämmittää tehokkaammin ja tasaisemmin, joka vähentää lämpötilaeroja. Kuvassa 9 on esitetty mikroaalto- (a) ja öljylämmitteisen (b) astian lämpötilaprofiileja, josta nähdään kuinka mikroaallot lämmittävät lähes tasaisesti astian sisällä olevan aineen, mutta öljylämmitteisessä astiassa aine lämpenee ensin reunoista. Astian materiaalivalinnalla ja laitteiston tarkalla suunnittelulla voidaan edelleen tehostaa lämmitettävän aineen tasalaatuista lämpenemistä. [41, s. 840.]



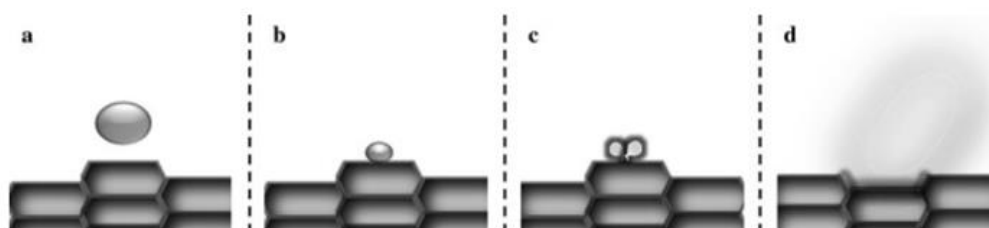
Kuva 9. Mikroaalto- (a) ja öljylämmitteisen (b) astian lämpötilaprofiilit [41, s. 841].

Mikroaaltojen käyttäminen nopeuttaa bioaktiivisten yhdisteiden uuttoprosessia ja parantaa niiden saantoa. Mikroaaltoavusteista uuttoa voidaan pitää myös vihreänä teknologiana, sillä sen avulla voidaan vähentää uuttoprosessissa käytettyjen liuottimien määrää. Nämä tekijät tekevät mikroaaltoavusteisesta uutustamisesta kiinnostavan ja hyödyllisen menetelmän. [40, s. 280.]

### 4.1.3 Ultraääniavusteinen uutto

Ultraäänit ovat ääniaaltoja, joiden taajuus on suurempi kuin 20 kHz [42]. Niiden avulla voidaan parantaa uuton saantoa ja nopeutta, minkä takia uuttolämpötilaa voidaan alentaa ja liuottimien määrää vähentää. Ultraäänellä voidaan parantaa uuton tehokkuutta merkittävästi jo prosessin alkuvaiheessa, joka tekee siitä houkuttelevan menetelmän teollisuudelle. Hyötyihin lukeutuu myös energiatehokkuus, vähäinen huoltotarve ja helppo asennus. [43, s. 110; 43, s. 116.]

Ultraäänit aiheuttavat väliaineeseen tihentymiä ja harventumia, jotka luovat suuria leikkausvoimia aiheuttavia kavitaatiokuplia. Kuplien puhjetessa syntyy shokkiaalto, joka nostaa lämpötilan ja paineen paikallisesti erittäin korkeaksi. Lämpötilan nousu parantaa uutettavan aineen liukenemistä liuottimeen ja helpottaa sen diffuusiota matriisiin ulko-osiin. Paineen nousu vastaavasti parantaa liuottimen kulkeutumista matriisiin ja yhdisteiden siirtymistä. Kavitaatiokuplien imploosio eli kappaleen äkillinen sisäänpäin luhistuminen saattaa osua myös kiinteään matriisiin pintaan, jolloin solurakenne voi hajota ja solun sisällä oleva aine vapautuu liuokseen. [43, s. 110] Kuvassa 10 nähdään, kuinka ultraäänen synnyttämä kavitaatiokupla iskeytyy ja puhkeaa soluseinämän pinnalla (a ja b), luoden shokkiaaltoja ja mikropurkauksia (c), jotka hajottavat soluseinämän ja vapauttavat solun sisäisen aineksen liuokseen (d).



Kuva 10. Ultraäänen aiheuttaman kavitaatiokuplan iskeytyminen solumatriisiin [43, s. 110].

Tavallisten uuttoon vaikuttavien tekijöiden lisäksi ultraääniavusteiseen uuttoon vaikuttaa esimerkiksi ultraäänen voimakkuus, taajuus ja pulssisuhde sekä

käytettävän astian geometria. Näiden tekijöiden optimointi on tärkeää, jotta prosessi olisi tuotannollisesti ja taloudellisesti mahdollisimman onnistunut. [43, s. 110.]

Ultraäänen voimakkuuden kasvattaminen lisää usein uuton saantoa, ja välillä voimakkuus korreloi lineaarisesti saannon kanssa. Voimakkuuden lisääminen voi myös vähentää uuttoon käytettävää aikaa ja saattaa muuttaa uutettavien ainesosien suhdetta. Voimakkuuden lisääminen ei kuitenkaan välttämättä enää tehosta uuttoa sen jälkeen, kun soluja hajottava vaikutus on saavutettu. Varsinaista akustista energiaa on kuitenkin vaikea mitata, eikä voiman tiheys ole kauttaaltaan sama, mikä voi aiheuttaa haasteita, kun arvioidaan voimakkuuden aiheuttamia vaikutuksia. [43, s. 111.]

Ultraäänen taajuus vaikuttaa kavitaatiokuplien kokoon. Mitä matalampi taajuus, sitä suurempia kavitaatiokuplat ovat. Suuremmat kuplat aiheuttavat voimakkaampia imploosioita, jotka parantavat uuton tehokkuutta. Taajuudella saattaa olla vaikutusta myös ultraäänen aiheuttamaan aineiden kulkeutumiseen. Optimaalinen taajuus uuton kannalta riippuu mahdollisesti uutettavan matriisin koostumuksesta. [43, s. 114.]

Astian geometria, nestekorkeus ja ultraäänielementtien sijoittelu täytyy ottaa tarkasti huomioon, jotta maksimaalinen määrä energiaa saadaan siirrettyä liuokseen. Optimaalisen tuloksen saavuttamiseksi täytyy yleensä kokeilla erilaisia astioiden geometrioita ja ultraäänielementtien sijainteja, mutta myös monia numeerisia simulaatiota on kehitetty havainnollistamaan erilaisten järjestelmien toimintaa. [43, s. 115]

#### 4.1.4 Entsyymiavusteinen uutto

Entsyymiavusteinen uutto perustuu entsyymien kykyyn alentaa substraattiin kohdistuvan reaktion aktivaatioenergiaa. Entsyymit muodostavat substraatin kanssa heikkoja vuorovaikutuksia, jotka pakottavat sen siirtymätilaan. Tämä vapauttaa energiaa, joka katalysoi reaktiota. [44, s. 67.] Entsyymien avulla

voidaan hajottaa sekä heikentää soluseinämiä ja solukalvoja, joka tehostaa bioaktiivisten ainesosien uuttumista. Soluseinämän rakennetta voidaan rikkoa esimerkiksi sellulaaseilla, hemisellulaaseilla ja pektinaaseilla, jotka hydrolysoivat soluseinän eri rakenneosia ja parantavat siten soluseinän läpäisevyyttä. [45, s. 39.]

Entsyymien tehokas käyttäminen uuttoprosessissa vaatii ymmärrystä niiden katalyyttisistä ominaisuuksista, vaikutustavoista ja optimaalisista käyttöolosuhteista, joita ovat esimerkiksi aika, lämpötila, pH ja entsyymien konsentraatio. Käytettävää entsyymiä tai entsyymejä valitessa on tärkeää huomioida kohde johon entsyymit vaikuttavat, jotta valitut entsyymit pystyvät katalysoimaan kohdeksessa tapahtuvia reaktioita. [45, s. 39; 45, s. 42–43.]

Entsyymiavusteisen uuton on osoitettu nopeuttavan uuttota, parantavan saantota sekä vähentävän energian ja liuottimien kulutusta perinteisiin uuttomenetelmiin verrattuna, mikä tekee siitä ympäristöystävällisemmän uuttomenetelmän. Energian kulutusta vähentää se, että entsyymien ansioista voidaan alentaa uuttoprosessissa vaadittavaa lämpötilaa, aikaa ja materiaalia. Entsyymien avulla voidaan myös mahdollisesti vähentää vaadittavia prosessivaiheita, joka voi parantaa energiatehokkuutta. Menetelmän haasteena ovat kuitenkin olosuhteiden vakioiminen teollisessa mittakaavassa, kallis hinta ja epätäydellinen hydrolyysi. [45, s. 41; 46, s. 303]

## 4.2 Polysakkaridien uuttaminen sienistä

Bioaktiivisten polysakkaridien taloudellinen ja energiatehokas uuttaminen sienistä on monimutkaisten solurakenteiden takia haastavaa, joten optimaalisen uuttomenetelmän valinta vaatii ymmärrystä soluseinän ja uutettavien polysakkaridien ominaisuuksista [38, s. 3; 39, s. 2]. Uuttoprosessilla voidaan vaikuttaa esimerkiksi polysakkaridien saantoon, suhdelukuun, rakenteeseen ja bioaktiivisuuteen, mikä tulee huomioida valitessa sopivaa uuttomenetelmää. Näiden lisäksi pitää huomioida myös tuotantotekniset haasteet, tuotantokustannukset ja ympäristöystävällisyys. [38, s. 3; 38, s. 13]



Polysakkaridien uuttaminen sienistä perinteisillä uuttotekniikoilla on usein tehotonta, minkä takia uusia innovatiivisia uuttotekniikoita on pyritty ottamaan käyttöön [39, s. 3].

Polysakkaridien uuttaminen sienistä voidaan jakaa kolmeen eri vaiheeseen, joihin kuuluvat esikäsitteleminen, uutto ja puhdistus. Esikäsittelemiseen kuuluvat esimerkiksi lipidien poistaminen orgaanisilla liuottimilla ja alhaisen molekyylipainon omaavien epäpuhtauksien poistaminen alkoholilla, mutta myös entsyymattainen käsittely sekä raaka-aineen jauhaminen ja homogenointi. Uuttamisen jälkeen polysakkaridit voidaan tarvittaessa edelleen puhdistaa esimerkiksi saostamalla, deproteinoimalla tai dialyysillä. Tyypillisesti polysakkaridit saostetaan etanolilla. Useimmat sienien bioaktiiviset polysakkaridit ovat polaarisia ja hyvin liukenevia yhdisteitä, minkä takia niitä voidaan uuttaa vedellä. Sienet sisältävät kuitenkin myös heikosti liukenevia ja viskoosisia polysakkarideja, joiden tehokas uuttaminen perinteisin menetelmin vaatii korkeampaa uuttolämpötilaa tai pidempää uuttoaikaa. [38, s. 3]

Kuumavesiuutto on hyvin yleinen tapa uuttaa polysakkarideja, koska se on helppo toteuttaa, eikä se vaadi kalliita laiteinvestointeja. Pitkä uuttoaika, korkea lämpötila ja suuri vaadittava liuotinmäärä tekevät siitä sellaisenaan heikosti teollisuuden käyttöön soveltuvan menetelmän. Korkeat lämpötilat voivat aiheuttaa proteiinien koaguloitumista, hiilihydraattien rakenteellisia muutoksia ja termolabiilien yhdisteiden tuhoutumista, kun taas pidempi uuttoaika saattaa johtaa ei-haluttujen ainesosien vapautumiseen. Vesiuuttoa voidaan kuitenkin tehostaa käyttämällä apuna esimerkiksi mikroaaltoja, ultraääntä, entsyymejä ja korkeaa painetta. Kuumavesiuutto tapahtuu tavallisesti 50–100 celsiusasteessa ja sen kesto on 1,5–5 tuntia. Lämpötilan nostamisen on osoitettu lisäävän 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanien saantoa ilman, että sillä olisi merkittävää vaikutusta niiden haarautumiseen. Yli 100 celsiusasteen lämpötila voi kuitenkin aiheuttaa beetaglukaanien hajoamista, eikä kolmoiskierrettä enää havaittu tutkimuksessa, jossa uuttolämpötila oli yli 150 celsiusastetta 15 minuuttia. Esimerkiksi *Grifola frondosa* -sienilajin eli koppelokäävän kuumavesiuutossa suurin polysakkariidisaanto saatiin 121 celsiusasteen lämpötilassa. [38, s. 3–5.]

Mikroaaltoavusteinen uutto parantaa perinteisiin menetelmiin verrattuna polysakkaridien uuttoaikaa sekä vähentää uuttoon vaadittua aikaa ja energiaa. Polysakkaridien mikroaaltoavusteisessa uutossa on otettava huomioon mikroaaltojen intensiteetti, joka saattaa liian suurena heikentää saantoa. Tämä saattaa johtua siitä, että liian suuri energiamäärä aiheuttaa häiriöitä molekyylien väliin vuorovaikutuksiin. Mikroaaltoaltistuksen pidentäminen nostaa aineen lämpötilaa, joka parantaa polysakkaridien uuttoaikaa, mutta saattaa lisätä termolabiilien polysakkaridien hajoamista. Menetelmän heikkoutena ovat suuret laitekustannukset ja edellä mainittu mahdollinen termolabiilien polysakkaridien hajoaminen. [38, s. 7; 38, s. 13]

Ultraääniavusteisen uuttoaikaa voidaan vähentää uutossa käytettävää aikaa ja lämpötilaa, jonka takia sitä voidaan hyödyntää termolabiilien polysakkaridien uuttoaikassa [39, s. 2]. Ultraäänen käytössä tulee kuitenkin välttää liian suurta tehoa, koska se saattaa aiheuttaa muutoksia polysakkaridien rakenteeseen. On osoitettu, että ultraääniavusteisessa uutossa polysakkaridien ja muiden makromolekyylien saanto syötävistä sienistä oli 52–129 % suurempi kuin kuumavesiuutossa. Ultraääniavusteisten *Ganoderma lucidum* -uutteiden on havaittu sisältävän 77,6 % enemmän 1,3:1,6- $\beta$ -glukaaneja kuumavesiuuttoaikaa verrattuna. Ultraääniavusteisesti uutettujen *Ganoderma*-lajien beetaglukaanien on huomattu myös olevan molekyylipainoltaan suurempia, optimaalisemmin haurautuneita ja antioksidanttisilta ominaisuuksiltaan parempia perinteisiin uuttoaikoihin verrattuna. [39, s. 2; 38, s. 6.]

Entsyymiavusteinen uutto on tehokas, ympäristöystävällinen, spesifi ja energia- ja lämpötehokas uuttoaikamalli. Entsyymien avulla voidaan hajottaa uutettavien sienien soluseinä, joka lisää uuttoaikasta saatavien polysakkaridien saantoa. Entsyymaattisessa uuttoaikaprosessissa on tärkeää varmistaa, että toimintaolosuhteet ovat entsyymeille otolliset. Entsyymien toimintaan vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi lämpötila, liuenninmäärä, kofaktorit ja pH. Tyypillisesti sienistä saatavien polysakkaridien entsyymaattisessa uuttoaikassa käytetään sellulaasi-entsyymejä, mutta myös papaiini- ja pektiinaasi-entsyymejä. [38, s. 9]

## 5 Tärkeimmät havainnot teoriaosuudesta kokeellisen osuuden kannalta

1,3:1,6- $\beta$ -glukaanien uuttamiseen valittiin tässä työssä kuumavesiuuttomenetelmä, sillä muiden uuttotekniikoiden hyödyntämiseen ei ollut saatavilla resursseja. Saatua tietoa optimaalisesta uuttolämpötilasta ja ajasta voidaan kuitenkin soveltaa arvioidessa sopivia parametreja myös muille uuttotekniikoille. Teoria tukee sienipolysakkaridien uuttamista vedellä, mutta toteaa menetelmän vaativan korkeaa lämpötilaa ja pitkää uuttoaikaa. *Ganoderma lucidum* -sienilajin rakenne on sitkeä ja puumainen, minkä takia polysakkaridien uuttaminen kuumavesiuuttomenetelmällä saattaa olla erityisen haastavaa. Tämän takia uuttamista päätettiin kokeilla suhteellisen korkeilla lämpötiloilla ja pitkillä uuttoajoilla, joiden pitäisi parantaa beetaglukaanisaantoa. Näytteenottoajankohdat ja uuttolämpötilat pyrittiin määrittämään siten, että niiden vaikutus näytteiden beetaglukaanipitoisuuksiin voitaisiin nähdä selvästi. Yleisesti suuntaa antoivat tutkimuskirjallisuudesta löytyvät lämpötila- ja aika-arvot, joilla polysakkarideja on onnistuneesti uutettu sienistä. Beetaglukaanin tuhoutumista näissä lämpötiloissa pidettiin siksi epätodennäköisenä.

## 6 Tutkimusaineisto ja menetelmät

Kokeellisen osuuden tarkoituksena oli selvittää, miten lämpötila ja aika vaikuttavat 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin uuttamiseen *Ganoderma lucidum* -sienilajista kuumavesiuuttomenetelmällä. Vesiliuokseen siirtyneen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin määrää arviointiin vertaamalla raakajauhenäyteen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuutta koeuutteista kerättyjen kiintoainejäämänäytteiden 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuuksiin. Raakajauhenäyte valmistettiin uuttoprosessia lukuun ottamatta samalla tavalla kuin kiintoainejäämänäytteet. Raakanäyte ja koeuutteiden kiintoainejäämät analysoitiin Megazyme-yrityksen sienten ja hiivojen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuuksien mittaamiseen tarkoitetun testikitin ja analysointimenetelmän avulla (Mushroom and Yeast Beta-glucan Assay Procedure K-YBGL 02/21). Analysointimenetelmä löytyy kokonaisuudessa liitteestä 1.

## 6.1 Näytteiden valmistus

Näytteiden valmistus aloitettiin esijauhamalla vasaramyllyllä sarvityypin *Ganoderma lucidum* -sienipaloja, jotka oli kuivattu ja varastoitu valolta suojattuna 13.7.2021. Vasaramyllyn avulla sienipalat saatiin jauhettua partikkeleiksi, joiden koko oli alle 5 millimetriä. Esijauhettua sieniaainesta jauhettiin tämän jälkeen tärinämyllyllä, jossa vapaasti liikkuvat metallitangot jauhavat tärinäliikkeen vaikutuksesta sieniaineksen hienojakoiseksi jauheeksi. Kuvassa 11 nähdään kokonaisia *Ganoderma lucidum* -sienipaloja ennen jauhatusa sekä esi- ja hienojauhettua ainesta.



Kuva 11. Kuvassa vasemmalla on kokonaisia paloja, keskellä karkeaa esijauhettua ainesta ja oikealla hienojakoista jauhetta.

Uuttaminen tehtiin 20 litran kannellisissa teräskattiloissa ja lämpötilasäädelyillä keittolevyillä. Lämpötila varmistettiin vielä erillisellä lämpötilamittarilla. Jokaiseen uutokseen käytettiin 0,5 kilogrammaa hienoksi jauhettua sienijauhetta ja 10 litraa ionivaihdettua vettä, eli aineisosien massojen suhde oli 1:20. Koeuutokset tehtiin kolmessa eri lämpötilassa, jotka olivat 60, 80 ja 100 celsiusastetta. Jokaisesta uutoksesta otettiin näytteet 2, 4 ja 6 tunnin välein. Näytteitä oli siten yhteensä yhdeksän kiintoainejäämänäytettä ja yksi raakajauhenäyte. Tasalaa-tuiseksi sekoitettu sienijauhe lisättiin veden joukkoon ja vispattiin

homogeeniseksi liuokseksi. Ajan ottaminen käynnistettiin, kun vesi oli saavuttanut tavoitelämpötilansa.

Ennen näytteen ottamista uute vispattiin uudelleen mahdollisimman homogeeniseksi ja suodatettiin 100 mikrometrin suodattimella ylimääräisen nesteen poistamiseksi. Jokaista suodatettua kiintoainejäämänäytettä kerättiin 20 grammaa, ja näytteet huuhdeltiin edelleen 0,5 litrassa ionivaihdettua vettä mahdollisten nesteeseen jääneiden beetaglukaanijäämien varalta. Huuhtelun jälkeen näytteistä poistettiin edelleen ylimääräinen neste 100 mikrometrin suodattimella ja näytteitä kuivattiin uunissa 6 tuntia 50 celsiusasteessa. Näytteet siirrettiin kuivaamisen jälkeen 0,5 litran ilmatiiviisiin muovitaskuihin ja pidettiin valolta suojattuna näytteiden analysoimiseen asti.

## 6.2 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin pitoisuuden analysointi

Kiintoainejäämänäytteet ja raakajauhenäyte analysoitiin Megazyme-yrityksen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin pitoisuuden määrittämiseen tarkoitettulla analysointimenetelmällä (Mushroom and Yeast Beta-glucan Assay Procedure K-YBGL 02/21), jonka yksityiskohdat löytyvät liitteestä 1. Menetelmä koostui kahdesta eri osasta. Ensimmäisessä osassa määritettiin kokonaisglukaani, oligosakkaridien D-glukoosi, sakkaroosi ja vapaa D-glukoosi. Toisessa osassa määritettiin  $\alpha$ -glukaanit, sakkaroosin D-glukoosi ja vapaa D-glukoosi. Näytteiden pitoisuudet saatiin määrittämällä absorbanssiarvot spektrofotometrisesti 510 nanometrin aallonpituudella nollanäytettä vastaan. 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanin määrä saatiin vähentämällä toisessa osiossa mitatun  $\alpha$ -glukaanin ja muiden ainesosien määrä ensimmäisessä osiossa mitatusta kokonaisglukaanista ja muista ainesosista. Jatkossa ensimmäisessä osiossa määritettyihin ainesosiin viitataan ainoastaan kokonaisglukaanina ja toisessa osiossa määritettyihin ainesosiin  $\alpha$ -glukaanina.

Kokonaisglukaani määritettiin liuottamalla ensin 1,3:1,6- $\beta$ -D-glukaanit, 1,3- $\beta$ -D-glukaanit ja  $\alpha$ -glukaanit jääkylmään 12-molaariseen rikkihappoon ja sen jälkeen hydrolysoitiin 2-molaarisella rikkihapolla. Jäljelle jääneet glukaaniosat hydrolysoitiin glukoosiksi käyttämällä exo-1,3- $\beta$ -glukanaasia ja  $\beta$ -glukosidaasia.

Näytteiden  $\alpha$ -glukaanit ja sakkaroosi määritettiin hydrolysoimalla ne D-glukoosiksi ja D-fruktoosiksi, jonka jälkeen glukoosi saatiin määritettyä lisäämällä amyloglukosidaasin ja invertaasin yhdistelmää sekä glukoosin määritysreagenssia. Käytettyjen kemikaalien tarkemmat tiedot löytyvät liitteestä 1.

Näytteistä tehtiin erilliset näytteet kokonaisglukaanin ja  $\alpha$ -glukaanin mittaamista varten. Kaikille näytteille tehtiin rinnakkaisnäytteet, ja näytteet kahdennettiin menetelmän loppuvaiheessa. Yhdestä näytteestä tehtiin siten yhteensä kahdeksan absorbanssimittausta. Jokaista analysointikertaa varten tehtiin myös hiivakontrollinäyte, kaksi nollanäytettä ja D-glukoosistandardi, johon kuului neljä samanaista glukoosistandardinäytettä. Hiivakontrollinäytettä voitiin käyttää analyysin luotettavuuden varmistamiseen, sillä hiivakontrollinäytteen beetaglukaanipitoisuus tiedettiin. D-glukoosistandardista saatiin absorbanssilukema 100 mikrogrammalle D-glukoosia ja sen avulla määritettiin kaavassa 2 esiintyvä kerroin F. Nollanäytteitä käytettiin poistamaan natriumasetaattipuskurin ja glukoosin määritysreagenssin vaikutus näytteiden absorbanssiarvoon.

## 7 Tulokset ja niiden tarkastelu

Taulukossa 2 esitetään keskiarvo beetaglukaanin massaprosenttisesta osuudesta näytteissä. Alkuperäisnäytteiden ja rinnakkaisnäytteiden beetaglukaaniosuuksien välisen eron vaihteluväli oli 1,31–5,16 massaprosenttiyksikköä ja vaihteluvälillä esiintyvien arvojen keskihajonta 1,09. Hiivakontrollinäytteillä vastaava vaihteluväli oli 1,15–7,01 massaprosenttiyksikköä ja keskihajonta 2,93. Alkuperäisen raakanäytteen ja sen rinnakkaisnäytteen välinen ero beetaglukaaniosuudessa oli 1,48 massaprosenttiyksikköä. Taulukkoon 2 on lisätty selitteet, joiden avulla lukija voi tulkita taulukossa esiintyviä lyhenteitä. Tuloksien raaka-aineisto löytyy liitteestä 2, josta löytyvät näytteiden ja glukoosistandardien absorbanssiarvot ja näytteiden massat. Tuloksien analysoimisessa hyödynnettiin Megazyme-yrityksen tarjoamaa Mega-Calc-laskentataulukkoa, jonka avulla näytteiden beetaglukaaniosuudet laskettiin. Näytteiden beetaglukaanipitoisuuden laskemiseen käytetään kaavaa 2.

$$\text{Alfaglukaani } \left( \% \frac{m}{m} \right) = \Delta A \frac{F}{W} 9,27 \quad (2)$$

$$\text{Beetaglukaani } \left( \% \frac{m}{m} \right) = \text{kokonaisglukaani} - \text{alfaglukaani}$$

$$\text{Kokonaisglukaani } \left( \% \frac{m}{m} \right) = \Delta A \frac{F}{W} 90$$

$$F \text{ on } \frac{100 \text{ (}\mu\text{g D-glukoosi)}}{\text{glukoosistandardin absorbanssien keskiarvo}}$$

$\Delta A$  on reaktioabsorbanssista vähennetty nollanäytteen absorbanssi

$W$  on analysoitavan näytteen massa

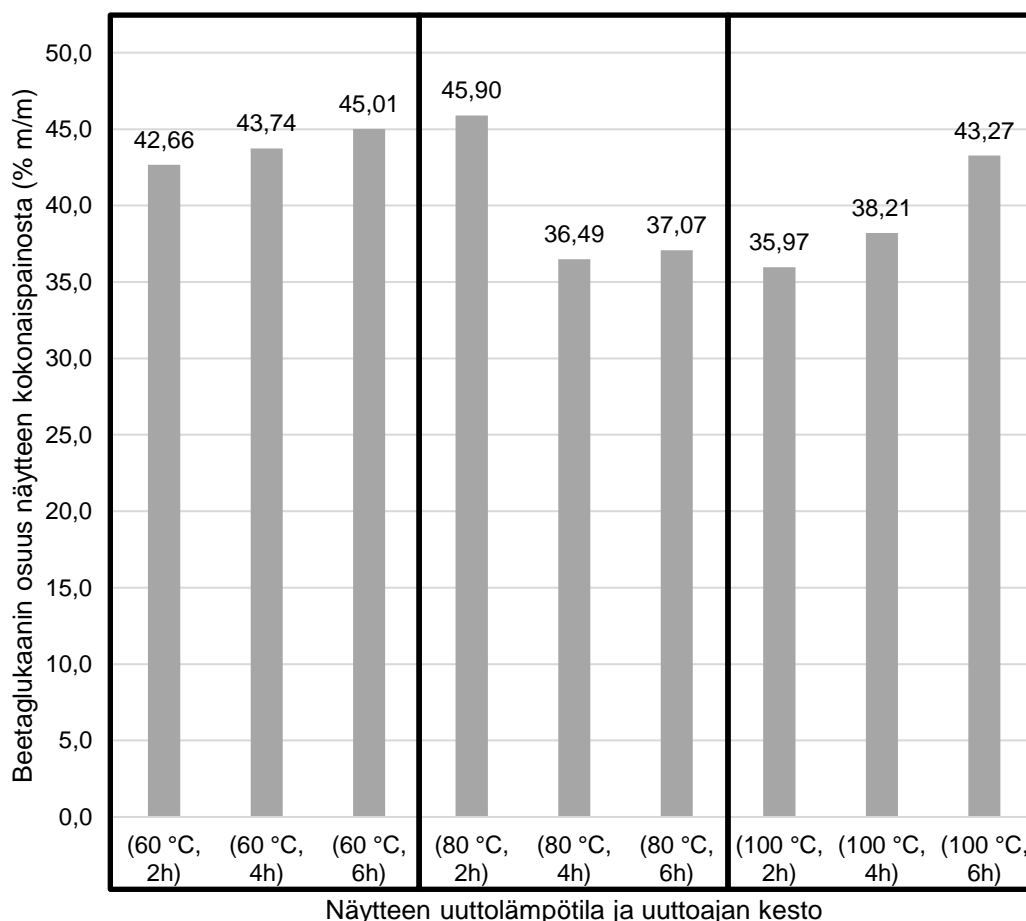
Taulukko 2. Näytteistä saatujen beetaglukaanipitoisuuksien keskiarvot.

Näyte	Keskiarvo beetaglukaanin massaprosenttisesta osuudesta näytteissä (% m/m)	Näyte	Keskiarvo beetaglukaanin massaprosenttisesta osuudesta näytteissä (% m/m)
1.1 1.1 (K)	42,66	5.1 5.1 (K)	36,49
1.2 (R) 1.2 (RK)		5.2 (R) 5.2 (RK)	
2.1 2.1 (K)	43,74	6.1 6.1 (K)	37,07
2.2 (R) 2.2 (RK)		6.2 (R) 6.2 (RK)	
3.1 3.1 (K)	45,01	7.1 7.1 (K)	35,97
3.2 (R) 3.2 (RK)		7.2 (R) 7.2 (RK)	
4.1 4.1 (K)	45,90	8.1 8.1 (K)	38,21
4.2 (R) 4.2 (RK)		8.2 (R) 8.2 (RK)	
Raakanäyte 1.1 Raakanäyte 1.1 (K)	39,95	9.1 9.1 (K)	43,27
Raakanäyte 1.2 (R) Raakanäyte 1.2 (RK)		9.2 (R) 9.2 (RK)	
Hiivakontrolli 1.1 Hiivakontrolli 1.1 (K)	54,08	Hiivakontrolli 1.1 Hiivakontrolli 1.1 (K)	52,07
Hiivakontrolli 1.2 (R) Hiivakontrolli 1.2 (RK)		Hiivakontrolli 1.2 (R) Hiivakontrolli 1.2 (RK)	
Lyhenne	Selite	Lyhenne	Selite
K	Kaksoiskappale	5	80 °C, 4 h
R	Rinnakkaisnäyte	6	80 °C, 6 h
1	60 °C, 2 h	7	90 °C, 2 h
2	60 °C, 4 h	8	90 °C, 4 h
3	60 °C, 6 h	9	90 °C, 6 h
4	80 °C, 2 h		

Tuloksista nähdään, että näytteissä 1–4 ja 9 on suurempi osuus beetaglukaania kuin raakanäytteessä. Näissä näytteissä beetaglukaanin osuus on 2,71–5,95

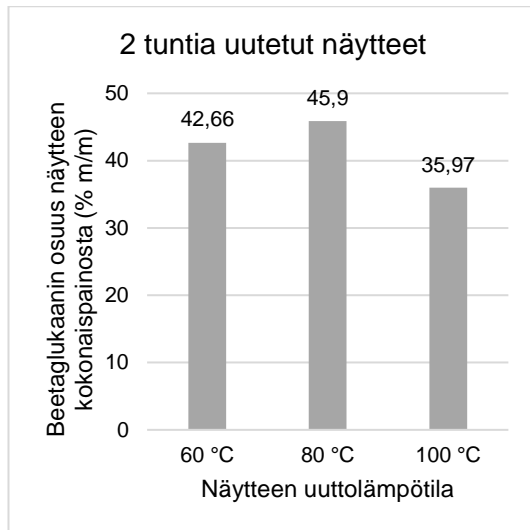


prosenttiyksikköä suurempi kuin raakanäytteessä. Näytteissä 5–8 beetaglukaanin osuus on 1,74–3,98 prosenttiyksikköä pienempi kuin raakanäytteessä. Näytteissä olevan beetaglukaaniosuuden vaihteluväli on 35,97–45,90 m-% eli vaihteluvälin pituus on 9,93 prosenttiyksikköä. Hiivakontrollinäytteiden beetaglukaaniosuudet ovat 54,08 m-% ja 52,07 m-%, joka on 5,08 ja 3,07 prosenttiyksikköä suurempi kuin valmistajan ilmoittama 49 m-%. Näytteiden beetaglukaaniosuuk-sien keskiarvo on 40,83 m-%, joka eroaa raakanäytteestä ainoastaan 0,88 prosenttiyksikköä. Tulosten keskihajonta on 3,54. Korrelaatiokerroin ajan ja näytteiden beetaglukaaniosuuden välillä oli näytteille 1–3 0,998, näytteille 4–6 -0,837 ja näytteille 7–9 0,976. Kuvassa 12 nähdään graafinen esitys beetaglukaanin massaprosenttisesta osuudesta näytteissä.

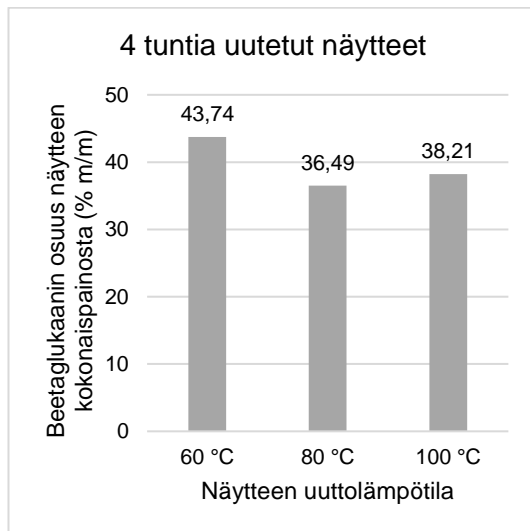


Kuva 12. Keskiarvo beetaglukaanin massaprosenttisesta osuudesta näytteissä.

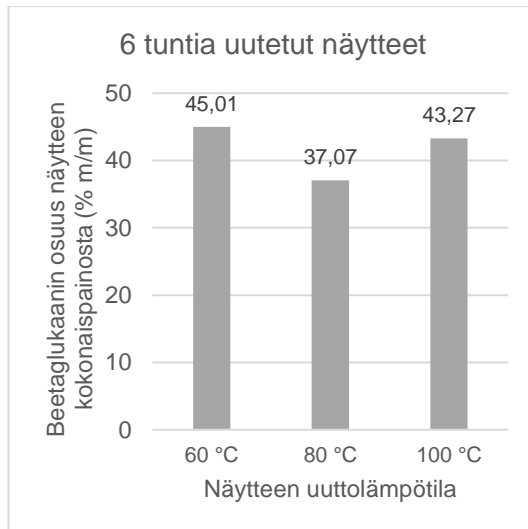
Kuvissa 13–15 havainnollistetaan erityisesti lämpötilan vaikutusta näytteiden beetaglukaanipitoisuuteen. Kuvista havaitaan, että beetaglukaaniosuus ja lämpötila eivät korreloi lineaarisesti keskenään. 2 tunnin näytteille korrelaatiokerroin lämpötilan ja beetaglukaaniosuuden välillä oli -0,661, 4 tunnin näytteille -0,730 ja 6 tunnin näytteille -0,208.



Kuva 13. Beetaglukaanin massaprosenttinen osuus 2 tunnin näytteissä.

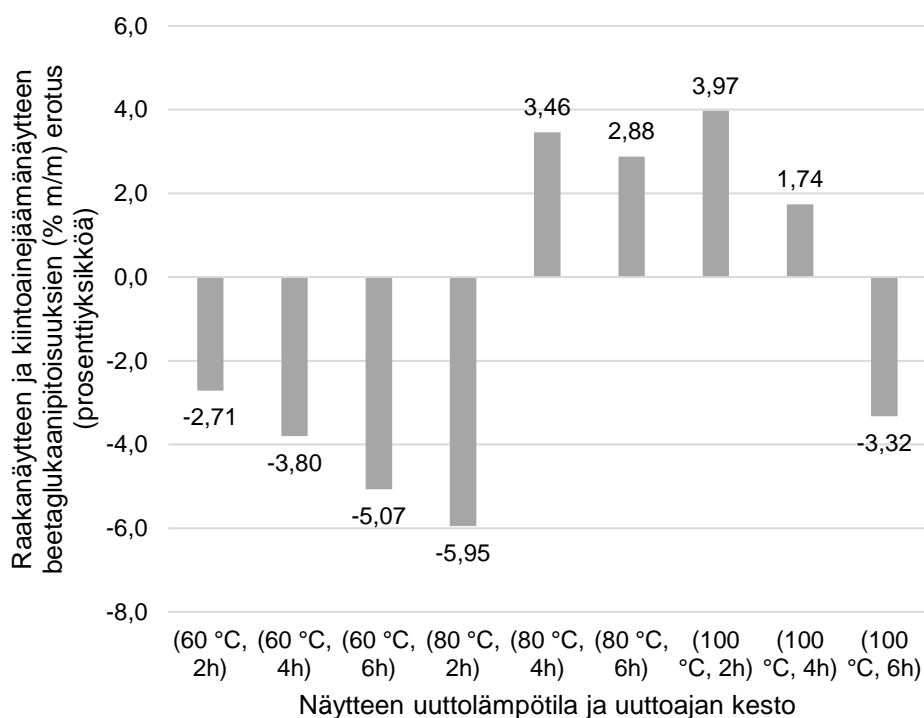


Kuva 14. Beetaglukaanin massaprosenttinen osuus 4 tunnin näytteissä.



Kuva 15. Beetaglukaanin massaprosenttinen osuus 6 tunnin näytteissä.

Kuva 16 havainnollistaa veteen liunneen beetaglukaanin osuutta, joka on laskettu vähentämällä raakanäytteen beetaglukaanipitoisuudesta kiintoainejäämänäytteen beetaglukaanipitoisuus. Kuvasta 16 nähdään, että beetaglukaania ei ole liennut näytteistä 1–4 ja 9, minkä takia arvot ovat negatiivisia. Beetaglukaania on liennut näytteistä 5–8 1,74–3,97 m-%.



Kuva 16. Näytteistä liunneen beetaglukaanin massaprosenttinen osuus.

## 8 Yhteenveto ja johtopäätökset

Lääkinnälliset sienet sisältävät monia erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joilla on havaittu runsaasti erilaisia farmakologisia ominaisuuksia. Lääkinnällisten sienien avulla voidaan ehkäistä, lievittää tai parantaa sairauksia ja tukea terveellistä ruokavaliota. Lääkinnällisiin sieniin kuuluvasta *Ganoderma lucidum* -sienilajista on niin ikään löydetty useita terveyteen vaikuttavia polysakkarideja ja triterpeenejä, minkä takia sitä voidaan hyödyntää esimerkiksi funktionaalisten elintarvikkeiden, ravintolisien ja lääkkeiden muodossa.

Bioaktiivisten aineosien uuttaminen eloperäisestä materiaalista vaatii tarkkaa ymmärrystä uutettavan aineen matriisista ja uutettavien yhdisteiden biokemiallisesta luonteesta. Kuumavesiuutto on yleinen, mutta monesti tehoton menetelmä sienipolysakkaridien ja muiden bioaktiivisten ainesosien uuttamiseen. Useita erilaisia uuttotekniikoita on kehitetty parantamaan uuttoaantoa ja

resurssitehokkuutta, joka vähentää prosessin aiheuttamaa kuormitusta ympäristölle.

Tämän työn tavoitteena oli selvittää, miten lämpötila ja aika vaikuttavat *Ganoderma lucidum* -sienilajista kuumavesiuuttomenetelmällä tehdyn uutteen 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuuteen, ja löytää optimaaliset uuttoparametrit, joiden avulla prosessin uuttosaantoa, ekologisuutta ja resurssitehokkuutta voitaisiin kasvattaa.

Tutkimuksen tulokset osoittavat, että beetaglukaanin määrä kiintoainejäämänäytteissä ei vähene lineaarisesti lämpötilan tai ajan kasvaessa. Usean näytteen kohdalla ajan pidentäminen jopa kasvattaa beetaglukaanin massaprosenttista osuutta kiintoainejäämänäytteessä, minkä voisi olettaa johtuvan satunnaisvaihtelun lisäksi mahdollisesta beetaglukaanin konsentroitumisesta näytteeseen. Suurin muutos nähdään näytteiden 1–4 ja 5–8 välillä, jossa beetaglukaanin massaprosenttinen osuus laskee selvemmin, mutta ero raakanäytteen ja näytteiden 5–8 beetaglukaaniosuuksissa on edelleen marginaalinen. Lämpötila saattaa kuitenkin osittain selittää beetaglukaanin pienempää massaprosenttista osuutta näytteissä 5–8.

Hiivakontrolleista mitattu beetaglukaanin massaprosenttinen osuus poikkeaa hieman sen todellisesta määrästä, joka on 49 m-%. Tutkimuksessa, johon beetaglukaanimittaukset perustuvat, voidaan kuitenkin nähdä, että rikkihapolla hydrolysoidut *Aspergillus niger mycelium* (49 %  $\beta$ -glucan Megazyme Lot No. 130905a) -näytteet antavat suuremman kokonaisglukaanituloksen vetykloridiin verrattuna, mikä voi osaltaan selittää hiivakontrollinäytteiden poikkeavia beetaglukaaniarvoja [23, s. 371]. Valmistaja on luvannut menetelmällä saaduille beetaglukaanituloksille ainoastaan <5 % standardipoikkeaman, joten satunnaisvaihtelu saattaa osaltaan selittää poikkeavuutta. Hiivakontrollinäytteistä mitatun ja todellisen beetaglukaaniosuuden välinen ero on kuitenkin niin vähäinen, että analyysija voidaan pitää onnistuneina.

*Ganoderma lucidum* -sienilajissa olevan beetaglukaanin heikko liukeneminen kuumavesiuutossa johtuu mahdollisesti sen kiinteästä ja puumaisesta rakenteesta. Tuloksista voidaan päätellä, että beetaglukaanin tehokkaaseen uuttamiseen *Ganoderma lucidum* -sienilajista vaaditaan todennäköisesti muita uuttotekniikoita. Esimerkiksi Viscozyme L -entsyymiä on käytetty onnistuneesti beetaglukaanisaannon parantamiseen [47, s. 235]. Myös mikroaaltojen ja ultraäänen avulla voitaisiin mahdollisesti kasvattaa beetaglukaanin uuttosaantoa.

Raakajauhenäytteen ja kiintoainejäämänäytteiden partikkelikokojakauman ja kosteuspitoisuuden vakiointi sekä näytteiden huuhtelu suuremmissa määrässä liuotinta olisi lisännyt tulosten luotettavuutta. Näytteet olisi voitu myös sentrifugoida, mikä olisi saattanut vähentää liuottimesta näytteeseen jääneiden beetaglukaanijäämien määrää. Useammalla raakanäytteellä olisi saatu kartoitettua tarkemmin raaka-aineen sisältämän beetaglukaanin määrää, jolloin olisi voitu tehdä tarkempia johtopäätöksiä beetaglukaanin liukenevuudesta kuumavesiuutossa.

Näytteet 1–4 ja raakanäyte sekä näytteet 5–9 analysoitiin kahdessa eri sarjassa aikarajoitusten vuoksi. Määrittämällä kaikki näytteet samalla kerralla olisi voitu sulkea pois mahdollisuus siitä, että erot näytesarjojen välillä olisivat johtuneet osaltaan poikkeavuuksista näytesarjojen käsittelyssä. Molemmat näytesarjat tehtiin kuitenkin noudattamalla huolellisesti analysoinnissa käytettyä ohjetta, joten näytteiden analysointi kahdessa eri sarjassa ei selittäne tuloksia.

Tulevaisuudessa koe kannattaisi yrittää toistaa edellä mainituilla koejärjestelyyn tehtävillä muutoksilla, jotta voitaisiin olla varmempia juuri ajan ja lämpötilan vaikutuksesta kuumavesiuutossa. Mikäli tulokset edelleen toistuisivat samankaltaisina, voitaisiin todeta, että kuumavesiuutto ei ole itsessään tehokas menetelmä *Ganoderma lucidum* -sienilajissa olevien 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanien uuttamiseen.

Erilaisten uuttomenetelmien ja niiden yhdistelmien vaikutusta 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanien uuttamiseen *Ganoderma lucidum* -sienilajista olisi syytä tutkia tarkemmin, koska niiden avulla uuttosaantoa voitaisiin todennäköisesti kasvattaa ja

prosessin aika- ja energiatehokkuutta parantaa. 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanien uuttumista kannattaisi tutkia lisää myös muista sienilajeista, joiden solumatriisi on helpommin hajoava.

Yritys ei pysty suoranaisesti hyödyntämään saatuja tuloksia prosessiparametrien optimoinnissa. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin todeta, että yrityksen kannattaa todennäköisesti keskittyä kuumavesiuuton sijaan muihin uuttomenetelmiin, kun *Ganoderma lucidum* -sienilajista uutetaan 1,3:1,6- $\beta$ -glukaaneja. Yrityksen kannattaisi kokeilla insinööriyön teoriaosuudessa esiintyviä uuttotekniikoita 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanisaannon parantamiseksi.

## Lähteet

- 1 Valverde, María Elena; Hernández-Pérez, Talía & Paredes-López, Octavio. 2015. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, s. 1–14.
- 2 Moradali, Mohammad-Fata; Mostafavi, Hossein; Ghods, Shirin & Hedjaroude Ghorban-Ali. 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, Vol. 7, Issue 6, s. 701–724.
- 3 Zied, Diego Cunha & Pardo-Giménez, Arturo. 2017. *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*. E-kirja. Wiley-Blackwell.
- 4 Salo, Pertti & Salo, Ulla. 2016. *Metsiemme ruokasienet*. Jyväskylä: Docendo.
- 5 Benzie, Iris & Wachtel-Galor, Sissi. 2011. *Herbal Medicine. Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. E-kirja. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- 6 Stamets, Paul. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3rd ed. E-kirja. Ten Speed Press.
- 7 Meuninck, Jim. 2015. *Basic Illustrated Edible and Medicinal Mushrooms*. E-kirja. Falcon Guides.
- 8 Spahr, David L. 2009. *Edible and medicinal mushrooms of New England and Eastern Canada*. E-kirja. Berkley, California: North Atlantic Books.
- 9 Sudheer, Surya; Taha, Zain; Manickam, Sivakumar; Ali, Asgar & Cheng, Poh Guat. 2018. Development of antler-type fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and determination of its biochemical properties. *Fungal Biology*, Vol. 122, Issue 5, s. 293–301.
- 10 Filippov, Ilya. 2015. iNaturalist. Verkkoaineisto. <https://www.inaturalist.org/photos/33544774>. Luettu 16.4.2022.
- 11 Hokkaido Reishi Co., Ltd. 2011. Verkkoaineisto. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hokkaido\\_Reishi%27s\\_Deer\\_Horn\\_Shape\\_Reishi.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hokkaido_Reishi%27s_Deer_Horn_Shape_Reishi.JPG). Luettu 16.4.2022.
- 12 Karadeniz Emel; Esen Sarigullu, Fatma & Untac Isil. 2013. Isolation and germination of *Ganoderma lucidum* basidiospores and effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on



the germination of spores. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.11 (1), s. 745–747.

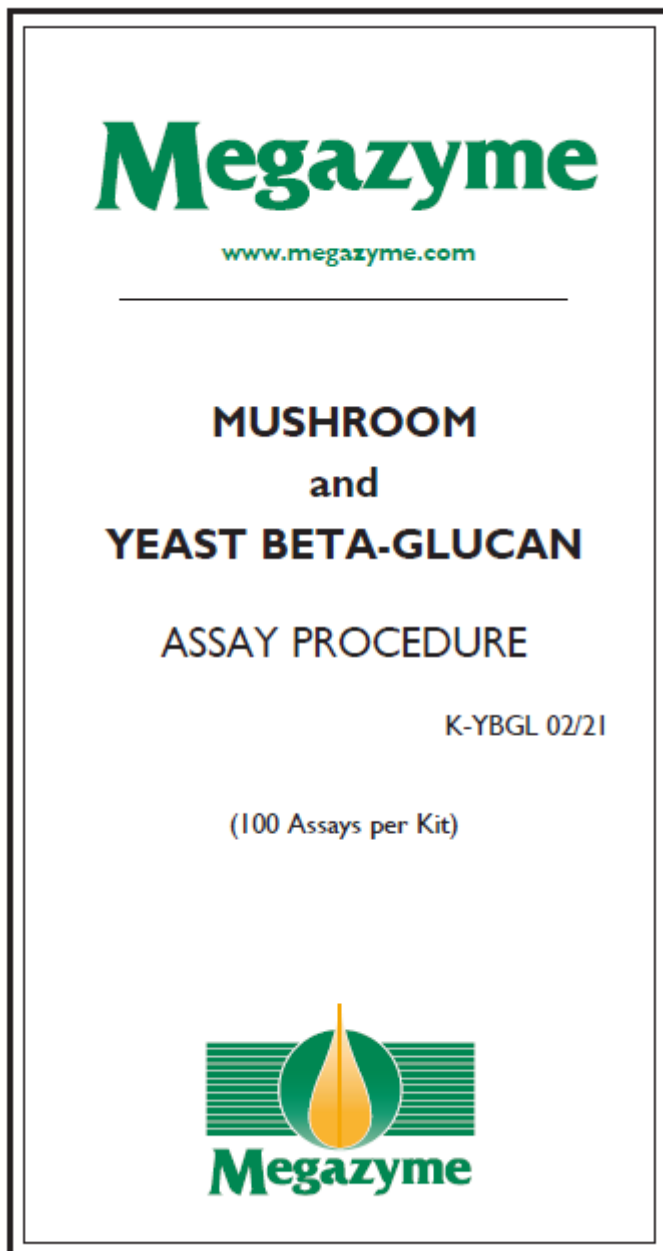
- 13 Lakkakääpä. Verkkoaineisto. UPM Forest Life. <<https://www.upmforest-life.com/fi/lajit/lakkakääpä>>. Luettu 16.1.2022.
- 14 Lakkakääpä – *Ganoderma lucidum*. Verkkoaineisto. Suomen Lajitietokeskus. <https://laji.fi/taxon/MX.205937>. Luettu 17.1.2022.
- 15 Cör, Darija; Knez, Željko & Knez Hrnčič, Maša. 2018. Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma Lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. *Molecules*, Vol. 23 (3): 649, s. 1–21.
- 16 Loyd, Andrew; Richter, Brantlee; Jusino, Michelle; Truong, Camille; Smith, Matthew; Blanchette, Robert & Smith, Jason. 2018. Identifying the “Mushroom of Immortality”: Assessing the *Ganoderma* Species Composition in Commercial Reishi Products. *Frontiers in microbiology*. Vol. 9, 1557.
- 17 Ahmad, Faruque; Ali Ahmad, Fakhruddin; Idreesh Khan, Mohammed, Alsayegh, Abdulrahman; Wahab, Shadma; Alam, Intakhab & Ahmed, Fayaz. 2021. *Ganoderma lucidum*: A potential source to surmount viral infections through  $\beta$ -glucans immunomodulatory and triterpenoids antiviral properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 187, s. 769–779.
- 18 Valverde, María Elena; Hernández-Pérez, Talía & Paredes-López, Octavio. 2014. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, Vol. 2015, s. 1–14.
- 19 Damodaran, Srinivasan & Parkin, Kirk L. 2017. *Fennema’s Food Chemistry*. 5. Painos. Boca Raton: CRC Press.
- 20 Bak, Won Chull; Park, Heon Ji; Park, Young Ae & Ka, Kang Hyeon. 2014. Determination of glucan contents in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars. *Mycobiology*. 42(3): s. 301–304.
- 21 Volman, Julia; Ramakers, Julian & Plat, Jogchum. 2008. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. *Physiology & Behavior*. Vol. 94, s. 276–284.
- 22 Rop, Otakar; Mlcek, Jiri & Jurikova, Tunde. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, Volume 67, Issue 11, s. 624–631.

- 23 McCleary, Barry; Draga Anna. 2016. Measurement of  $\beta$ -glucan in mushrooms and mycelial products. *Journal of AOAC International*. Vol. 99, s. 364–373.
- 24 Edgar181. Chemical structure of beta-1,3-1,6-glucan. Verkkoaineisto. Wikipedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-1,3-1,6-glucan.png>. Luettu 16.4.2022.
- 25 Cortina-Escribano, Marta; Pihlava, Juha-Matti; Miina, Jari; Veteli, Pyry; Linnakoski, Riikka & Vanhanen, Henri. 2020. Effect of Strain, Wood Substrate and Cold Treatment on the Yield and  $\beta$ -glucan Content of *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. *Molecules*, Vol. 25, s. 1–13.
- 26 Zhu, Fengmei; Du, Bin; Bian, Zhaoxiang & Xu, Baojun. 2015. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 41, s. 165–173.
- 27 Boh, Bojana; Berovic, Marin; Zhang, Jingsong & Zhi-Bin, Lin. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*, Vol. 13, s. 265–301.
- 28 Belgacem, Mohamed Naceur & Gandini, Alessandro. 2008. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. E-kirja. Elsevier Science & Technology.
- 29 Reyes, Beverly; Dufourt, Elsa; Ross, Jennifer; Warner, Michael; Tanquilut, Neil; Leung, Albert. 2018. *Selected Phyto and Marine Bioactive Compounds: Alternatives for the Treatment of Type 2 Diabetes*. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 55, s. 111–143.
- 30 McNaught, Alan & Wilkinson, Andrew. 1997. *Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed. E-kirja. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- 31 Badal, Simone & Delgoda, Rupika; 2017. *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies*. E-kirja. Academic Press.
- 32 Chan, Sze Wa; Tomlinson, Brian; Chan, Paul & Wai Kei Lam, Christopher. 2021. The beneficial effects of *Ganoderma lucidum* on cardiovascular and metabolic disease risk. *Pharmaceutical biology* vol. 59, No.1, s. 1161–1171.
- 33 Seweryn, Ewa; Ziła, Anna & Gamian, Andrzej. 2021. Health-Promoting of Polysaccharides Extracted from *Ganoderma lucidum*. *Nutrients*, Vol 13. (8): 2725, s. 1–14.

- 34 Erotusmenetelmät. Verkkoaineisto. Opetushallitus. <[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-1\\_yleista\\_erotusmenetelmista.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-1_yleista_erotusmenetelmista.html)>. Luettu 26.2.2022.
- 35 Zhang, Qing-Wen; Lin, Li-Gen & Ye, Wen-Cai. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 13, 20, s. 1–26.
- 36 Saha, Sudipta; Singh, Ashok; Keshari, Amit; Raj, Vinit; Rai, Amit; Maity, Siddhartha. 2018. Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food. Chapter 2 – Modern Extraction Techniques for Drugs and Medicinal Agents. *Handbook of Food Bioengineering, Volume 4*, s. 65–106. Academic Press.
- 37 Rao, Priyanka & Rathod, Virendra. 2017. Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food. Chapter 13 – Phytochemicals: An Insight to Modern Extraction Technologies and Their Applications. Academic Press. *Handbook of Food Bioengineering, Volume 4*, s. 495–521. Academic Press.
- 38 Leong, Yoong Kit, Yang, Fan-Chiang & Chang, Jo-Shu. 2021. Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 251, s. 1–16.
- 39 Gong, Pin; Wang, Siyuan; Liu, Meng; Chen, Fuxin; Yang, Wenjuan; Chang, Xiangna; Liu, Ning; Zhao, Yuanyuan; Wang, Jing; Chen, Xuefeng. 2020. Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini review. *Carbohydrate Research*, Volume 494, s. 1–9.
- 40 Radrigán, Rudi; Aqueveque, Pedro & Ocampo, Margarita. 2017. Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food. Chapter 7 – Extraction and Use of Functional Plant Ingredients for the Development of Functional Foods. *Handbook of Food Bioengineering, Volume 4*, 275–306. Academic Press.
- 41 Kappe, Christian Oliver. 2007. Microwave-Assisted Chemistry. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. s. 837–860. Elsevier, Oxford.
- 42 Ultrasound. Acoustical Society of America. Standards. <<https://asastandards.org/terms/ultrasound-2/>>. Luettu 12.2.2022.
- 43 Esclapez, M.D; Garcia-Perez, J.V; Mulet, A. & Carcel, J.A. 2011. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng Rev* 3, s. 108–120. Springer Science + Business Media.

- 44 Heino, Jyrki & Vuento, Matti. 2010. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: WSOY.
- 45 Puri, Munish; Sharma, Deepika & Barrow, Colin J. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends Biotechnol, Vol. 30, No. 1, s. 37–44.
- 46 Gligor, Octavia; Mocan, Andrei; Moldovan, Cadmiel; Locatelli, Marcello; Crişan, Gianina; & Ferreira, Isabel; 2019. Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. Trends in Food Science & Technology, Vol 88, s. 302–315.
- 47 In-Wook, Hwang; Bo-Min, Kim; Young-Chan, Kim; Sang-Han, Lee & Shin-Kyo, Chung. 2018. Improvement in b-glucan extraction from Ganoderma lucidum with high-pressure steaming and enzymatic pre-treatment. Applied Biological Chemistry, Vol. 61, s. 235–242.

**Liite 1. Menetelmä 1,3:1,6- $\beta$ -glukaanipitoisuuden määrittämiseen (Megazyme Mushroom and Yeast Beta-glucan Assay Procedure K-YBGL 02/21)**



© Megazyme 2021

Kuva 1. Mushroom and Yeast Beta-glucan analyysimenetelmän kansilehtinen.

### INTRODUCTION:

(1-3)- $\beta$ -Glucans are widely distributed in nature, especially in algae, fungi and yeast, but also in higher plants. They serve a variety of biological functions. They form the major structural components of cell walls, they act as storage carbohydrates and they sometimes play a protective role by forming at specific sites in response to particular stimuli such as wounding.<sup>1</sup> The medicinal properties of many species of mushroom have been valued and utilised in traditional Chinese medicine for centuries. More recent studies<sup>1-7</sup> have demonstrated that the key active compounds are triterpenoids, ergosterol and most importantly 1,3:1,6- $\beta$ -glucan. This  $\beta$ -glucan activates the immune system and may even have anti-carcinogenic properties.<sup>1-7</sup> There is concern within the regulatory community regarding health claims relating to nutritional supplements as well as the identity and purity of these products,<sup>8</sup> and this relates particularly to medicinal mushrooms where the key active components have been identified as 1,3:1,6- $\beta$ -glucan, triterpenoids and ergosterol. The 1,3:1,6- $\beta$ -glucans of several mushroom species have been studied in considerable detail and the most predominant structural feature has been identified as a 1,3- $\beta$ -glucan backbone with single D-glucosyl residues linked 1,6- $\beta$  to every third<sup>9</sup> or fourth D-glucosyl unit in the 1,3- $\beta$ -glucan backbone. However, much more complex structures have also been reported.<sup>10-14</sup> The structures of mushroom and fungal  $\beta$ -glucans are quite different to the cereal  $\beta$ -glucans (so-called mixed-linkage  $\beta$ -glucans) that are linear polysaccharides in which D-glucosyl residues are linked 1,3- $\beta$ - and 1,4- $\beta$ -, and the ratio of these linkage types varies with the source of the  $\beta$ -glucan (e.g. oats, barley and wheat). Other  $\beta$ -glucans include cellulose (1,4- $\beta$ -D-glucan) and curdlan (1,3- $\beta$ -D-glucan). A highly specific enzymic procedure has been described for the measurement of cereal 1,3:1,4- $\beta$ -D-glucans.<sup>15,16</sup> Enzymic procedures have also been described for measurement of 1,3:1,6- $\beta$ -D-glucans in commercial yeast products,<sup>17,18</sup> however while these procedures are very useful for this particular application, they are less specific than the method that has been developed for the measurement of cereal  $\beta$ -glucan.<sup>15,16</sup> No quantitative enzymic procedure has been described for measurement of  $\beta$ -glucan in mushroom fruiting bodies or mycelium. To date, many of the methods developed for the measurement of  $\beta$ -glucan<sup>19,20</sup> in mushroom are modifications of the Prosky<sup>21,22</sup> dietary fiber procedure.

This booklet describes a method for the specific measurement of (1-3)(1-6)- $\beta$ -glucan in mushroom and mycelial products, yeast and fungal preparations.<sup>23</sup> The procedure readily allows the measurement of mushroom products which are highly contaminated with  $\alpha$ -glucans such as cereal starches.

1

Kuva 2. Ohjekirjan perehdytys beetaglukaanien ominaisuuksiin.

**PRINCIPLE:**

1,3:1,6- $\beta$ -D-Glucans, 1,3- $\beta$ -D-glucans and  $\alpha$ -glucans are solubilised in ice cold 12 M  $H_2SO_4$  and then hydrolysed to near completion in 2 M  $H_2SO_4$ .<sup>24,25</sup> Remaining glucan fragments are then quantitatively hydrolysed to glucose using a mixture of highly purified *exo*-1,3- $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -glucosidase. This gives a measure of total glucan.  $\alpha$ -Glucans and sucrose are specifically hydrolysed to D-glucose and D-fructose and glucose is measured with amyloglucosidase and invertase using GOPOD reagent.  $\beta$ -Glucan is determined by difference. Pure mushroom samples contain a much higher  $\beta$ -glucan content than do many commercial mushroom/mycelial products available in capsule form (Tables 1 and 2, page 8 and 10).

In an alternative format for total glucan hydrolysis, the sample is suspended and stirred in 12 M HCl at 30°C for 1 h. The solution is then diluted to 2 M with water and incubated at ~ 100°C in a boiling water bath for 2 h. With most mushroom samples analysed, very similar total glucan was obtained with both acids (Table 2, page 10).<sup>23</sup> However, for a few mushrooms, namely *Ganoderma lucidum*, *Poria cocos* and *Cordyceps militaris*, values with sulphuric acid are significantly higher than with hydrochloric acid.

**ACCURACY:**

Standard errors of < 5% are achieved routinely (Table 3, page 10).

**KITS:**

Kits suitable for performing 100 assays are available from Megazyme. The kits contain the full assay method plus:

- Bottle 1: (x2)** *exo*-1,3- $\beta$ -Glucanase (100 U/mL) plus  $\beta$ -Glucosidase (20 U/mL) ammonium sulphate suspension, 2.0 mL.  
Stable for > 4 years at 4°C.
- Bottle 2:** Amyloglucosidase (1,630 U/mL) plus invertase (500 U/mL) solution in 50% (v/v) glycerol, 20 mL.  
Stable for ~ 2 years at 4°C or > 4 years below -10°C.
- Bottle 3:** GOPOD Reagent Buffer.  
Buffer (50 mL, pH 7.4).  
*p*-hydroxybenzoic acid and sodium azide (0.09%).  
Stable for > 4 years at 4°C.
- Bottle 4:** GOPOD Reagent Enzymes. Glucose oxidase plus peroxidase and 4-aminoantipyrine. Freeze-dried powder. Stable for > 5 years below -10°C.

Kuva 3. Kuvaus menetelmän periaatteesta, menetelmän tarkkuus ja osa (1/2) pakkauksen sisältämistä kemikaaleista lueteltuna.

**Bottle 5:** D-Glucose standard solution (5 mL, 1.00 mg/mL) in 0.2% (w/v) benzoic acid.  
Stable for > 5 years; store sealed at room temperature.

**Bottle 6:** Control yeast  $\beta$ -glucan preparation (~ 2 g,  $\beta$ -glucan content stated on the bottle label).  
Stable for > 5 years; store sealed at room temperature.

#### PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS:

1. To bottle 1, add 9 mL of 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) (i.e. dilute the contents of one vial to 11 mL). Divide into appropriately sized aliquots and store in polypropylene tubes below -10°C between use and on ice during use. Once diluted, the reagent is stable for > 2 years below -10°C. Dilute the contents of second vial when required.
2. Use the contents of bottle 2 as supplied.  
Stable for ~ 2 years at 4°C or > 4 years below -10°C.
3. Dilute the contents of bottle 3 to 1 L with distilled water.  
This is Solution 1. Use immediately.

#### NOTE:

1. On storage, salt crystals may form in the concentrated buffer. These must be completely dissolved when this buffer is diluted to 1 L with distilled water.
2. This buffer contains 0.09% (w/v) sodium azide.  
This is a poisonous chemical and should be treated accordingly.
4. Dissolve the contents of bottle 4 in approx. 20 mL of solution 1 and quantitatively transfer to the bottle containing the remainder of solution 1. Cover this bottle with aluminium foil to protect the enclosed reagent from light. This is **Glucose Determination Reagent (GOPOD Reagent)**.  
Stable for ~ 3 months at 2-5°C or > 12 months below -10°C.  
  
If this reagent is to be stored in the frozen state, preferably it should be divided into aliquots. Do not freeze/thaw more than once.  
  
When the reagent is freshly prepared it may be light yellow or light pink in colour. It will develop a stronger pink colour over 2-3 months at 4°C. The absorbance of this solution should be less than 0.05 when read against distilled water.
5. Use the contents of bottle 5 as supplied.  
Stable for > 5 years; store sealed at room temperature.

Kuva 4. Osa (2/2) pakkauksen sisältämistä kemikaaleista lueteltuna sekä ohjeita (1/2) reagenssiliuosten valmistamiseen ja käyttöön.



6. Use the contents of bottle 6 as supplied.  
Stable for > 5 years; store sealed at room temperature.

**REQUIRED REAGENTS (not supplied):**

1. **Sodium Acetate Buffer (200 mM, pH 4.5)**  
Add 11.6 mL of glacial acetic acid (1.05 g/mL) to 900 mL of distilled water and adjust to pH 4.5 using 4 M (16 g/100 mL) sodium hydroxide solution. Adjust the volume to 1 L.  
Stable for ~ 1 year at 4°C.
2. **Sodium Acetate Buffer (1.2 M, pH 3.8)**  
Add 68.6 mL of glacial acetic acid (1.05 g/mL) to 800 mL of distilled water and adjust to pH 3.8 using 4 M sodium hydroxide. Adjust the volume to 1 L with distilled water.  
Stable for > 2 years at room temperature.
3. **Sodium Hydroxide (8.0 M)**  
In a well ventilated fume cupboard, add 320 g of NaOH to 700 mL of distilled water and dissolve by stirring. Allow the solution to cool to room temperature and then adjust the volume to 1 L.  
Stable for > 2 years at room temperature.
4. **Sodium Hydroxide (1.7 M)**  
Add 68 g of NaOH to 800 mL of distilled water and dissolve by stirring. Adjust the volume to 1 L.  
Stable for > 2 years at room temperature.
5. **Sulphuric Acid (12 M, 72% w/w)**  
In a well ventilated fume cupboard, carefully add 640 mL of concentrated acid (98%, sp. gr. 1.835) to 300 mL of distilled water. Dilute to 1 L and mix well.  
Stable at room temperature for > 4 years.

**EQUIPMENT (RECOMMENDED):**

1. Glass test tubes (round bottomed, 16 x 100 mm, 14 mL capacity).
2. Corning Culture Tubes. - Screw cap tubes, 20 x 125 mm (Fisher Scientific Cat no. FB59563) plus caps (Cat. no. FB51355).  
Screw cap tubes, 16 x 125 mm (Fisher Scientific Cat. no. FB59559) plus caps (Cat. no. FB51354).
3. Boiling water bath (deep-fry cooker filled with water).
4. Micro-pipettors, 100 µL (e.g. Gilson Pipetman<sup>®</sup> or Rainin EDP-2<sup>®</sup> motorised dispenser).
5. Positive displacement pipettor e.g. Eppendorf Multipette<sup>®</sup>  
- with 5.0 mL Combitip<sup>®</sup> (to dispense 0.1 mL aliquots of hydrolysed sample solution and 0.1 mL of enzymes).

Kuva 5. Ohje (2/2) reagenssiliuoksen liuoksen käyttämiseen, vaaditut reagenssit, jotka eivät tule pakkauksen mukana ja osa (1/2) vaadituista välineistä lueteltuna.

- with 50 mL Combitip<sup>®</sup> (to dispense 2.0 mL aliquots of 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 mL aliquots of 8 M NaOH and 3.0 mL of GOPOD Reagent).
- 6. Magnetic stirrer plus stirrer bars (5 x 15 mm).
- 7. Analytical balance.
- 8. Microfuge centrifuge - capable of 13,000 rpm.
- 9. Disposable 2.0 mL polypropylene microfuge tubes.
- 10. Spectrophotometer set at 510 nm.
- 11. Thermostated water bath set at 40°C.
- 12. Vortex mixer.

#### CONTROLS AND PRECAUTIONS:

1. Safety goggles, gloves and laboratory coat must be worn at all times. When incubating the tube in the boiling water bath, the tube with cap loosened, should be placed into the boiling water bath for 5 min to allow the contents to heat. The cap should then be tightened. This prevents excess pressure accumulation in the tube and removes the possibility that tubes might explode.
2. Concentrated sulphuric acid is a very strong acid. Extreme caution must be exercised when handling this solution. These operations should be performed in a well ventilated fume cupboard.

#### MEASUREMENT OF 1,3:1,6-β-GLUCAN IN YEAST AND MUSHROOM PREPARATIONS:

##### A. MEASUREMENT OF TOTAL GLUCAN (α-glucan + β-glucan) plus D-Glucose in Oligosaccharides, Sucrose and free D-Glucose

- a. Solubilisation and partial hydrolysis of total glucan (α-glucan + β-glucan) plus D-glucose in oligosaccharides, sucrose and free D-glucose
  1. Mill mushroom or yeast sample to pass a 1.0 mm screen using a Retsch centrifugal mill, or similar.
  2. Add milled sample [approx. 90 mg, weighed accurately] to a 20 x 125 mm Fisher Brand culture tube. Tap the tube to ensure that all of the sample falls to the bottom of the tube.
  3. Add 2.0 mL of ice cold 12 M sulphuric acid to each tube, cap the tubes and stir them vigorously on a vortex mixer. Place the tubes in an ice-water bath and leave them there for 2 h.

Kuva 6. Osa (2/2) vaadituista välineistä lueteltuna, turvaohjeet ja osa (1/2) kokonaisglukaanin mittaamisohjeesta.

Over this period of time, vigorously stir the tube contents (for 10-15 sec) several times on a vortex mixer (to ensure complete dissolution of the  $\beta$ -glucan).

4. Add 4 mL of water to each tube, cap the tubes and vigorously stir the contents on a vortex mixer for 10 sec. Then add 6 mL of water, cap the tubes and stir the contents for a further 10 sec.
  5. Loosen the caps on the tubes and place them in a boiling water bath ( $\sim 100^{\circ}\text{C}$ ). After 5 min, tighten the caps and continue the incubation for 2 h.
  6. Cool the tubes to room temperature and carefully loosen the caps.
  7. Quantitatively transfer the contents of each tube to a 100 mL volumetric flask using a wash bottle containing 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).
  8. Add 6 mL of 8.0 M NaOH solution to the volumetric flask and adjust to volume with 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). Mix the contents well by inversion and collect an aliquot of the sample in a microfuge tube.
  9. Centrifuge an aliquot of the solution at 13,000 rpm for 5 min.
- b. Measurement of total glucan plus D-glucose in sucrose and free D-glucose.**
1. Transfer 0.1 mL aliquots (in duplicate) of filtered or centrifuged extract to the bottom of glass test tubes (16 x 100 mm).
  2. Add 0.1 mL of a mixture of *exo*-1,3- $\beta$ -glucanase (20 U/mL) plus  $\beta$ -glucosidase (4 U/mL) in 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) to the bottom of each tube, mix the tube contents on a vortex mixer and incubate at  $40^{\circ}\text{C}$  for 60 min.
  3. Add 3.0 mL of GOPOD Reagent to each tube and incubate at  $40^{\circ}\text{C}$  for 20 min.
  4. Measure the absorbance of all solutions at 510 nm against the reagent blank.

Kuva 7. Osa (2/2) kokonaisglukaanin mittaamisohjeesta.

**NOTE:**

With each set of determinations, include at least one control yeast or mushroom preparation. Also include reagent blanks and glucose standards of 100 µg (in quadruplicate). Run these through the entire incubation procedure with GOPOD Reagent

The reagent blank consists of 0.2 mL of sodium acetate buffer (200 mM, pH 4.5) + 3.0 mL GOPOD Reagent.

The D-glucose standard consists of 0.1 mL D-glucose standard (1 mg/mL) + 0.1 mL of sodium acetate buffer (200 mM, pH 4.5) + 3.0 mL GOPOD Reagent.

**B. MEASUREMENT OF  $\alpha$ -GLUCAN (phytoglycogen and starch) plus D-glucose in sucrose and free D-glucose.**

**a. Solubilisation, hydrolysis and measurement of  $\alpha$ -glucan, D-glucose from sucrose and free D-glucose**

1. Add milled sample (approx. 100 mg, weighed accurately) to a 20 x 125 mm Fisher Brand culture tube. Tap the tube to ensure that all of the sample falls to the bottom of the tube.
2. Add a magnetic stirrer bar (5 x 15 mm) followed by 2 mL of 1.7 M NaOH to each tube and suspend the pellets (and dissolve the phytoglycogen/starch) by stirring for approx. 20 min in an ice/water bath over a magnetic stirrer.
3. Add 8 mL of 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) to each tube with stirring. Immediately add 0.2 mL of amyloglucosidase (1.630 U/mL) plus invertase (500 U/mL), mix well and place the tubes in a water bath at 40°C.
4. Incubate the tubes at 40°C for 30 min with intermittent mixing on a vortex stirrer.
5. For samples containing > 10%  $\alpha$ -glucan content; quantitatively transfer the contents of the tube to a 100 mL volumetric flask (using a water wash bottle) and adjust to volume with water. Mix well. Centrifuge an aliquot of the solution at 13,000 rpm for 10 min or filter through Whatman No. 1 filter paper (9 cm).
6. For samples containing < 10%  $\alpha$ -glucan content; transfer 2 mL of solution to a microfuge tube and centrifuge at 13,000 rpm for 5 min. For such samples the final volume in the tube is approx. 10.3 mL (however, this volume may vary slightly with the type of sample being analysed). In some cases, an appropriate allowance for volume should be made in the calculations.

Kuva 8. Ohje nollanäytteiden ja D-glukoosistandardin valmistamiseen sekä osa (1/2) ohjeesta alfaglukaanien mittaamiseen.

7. Transfer 0.1 mL aliquots (in duplicate) of either the diluted or undiluted supernatants into glass test tubes (16 x 100 mm), add 0.1 mL of sodium acetate buffer (200 mM, pH 4.5) plus 3.0 mL of GOPOD reagent and incubate at 40°C for 20 min.
8. Measure the absorbance of all solutions at 510 nm against the reagent blank.

**NOTE:**

Mushroom and yeast samples generally contain < 10%  $\alpha$ -glucan. However, some commercial mushroom mycelia are grown on cereal grains, and in this case, the starch content of the recovered product can be as high as 75% w/w.

This method is **NOT** applicable to the analysis of yeast  $\beta$ -glucan in the presence of cellulose (1,4- $\beta$ -D-glucan).

Kuva 9. Osa (2/2) ohjeesta alfa-glukaanien mittaamiseen ja huomautus.

## Liite 2. Näytteistä mitattu aineisto

Taulukko 1. Näytteistä mitatut absorbanssiarvot ja painot.

Näytteet	Kokonaisglukaaninäytteen paino (mg)	Alfaglukaaninäytteen paino (mg)	Kokonaisglukaaninäytteen absorbanssi	Kokonaisglukaaninäytteen absorbanssi (K)	Alfaglukaaninäytteen absorbanssi	Alfaglukaaninäytteen absorbanssi (K)
1.1	90,1	100,3	0,4163	0,4624	0,0584	0,0551
1.2 (R)	90	100,3	0,4382	0,4077	0,0558	0,0707
2.1	90,2	100,5	0,4567	0,4579	0,0768	0,0982
2.2 (R)	90	100,6	0,4327	0,4293	0,0857	0,0681
3.1	90,4	100,3	0,4192	0,451	0,1076	0,1164
3.2 (R)	89,9	100,4	0,4702	0,491	0,0691	0,0734
4.1	90,2	100,2	0,4713	0,4836	0,1222	0,1026
4.2 (R)	89,9	100,6	0,463	0,4556	0,124	0,1166
Raakanäyte						
1.1	90,2	100,5	0,3977	0,4035	0,1031	0,0919
Raakanäyte						
1.2 (R)	90,1	100,1	0,4091	0,4253	0,1248	0,1222
Hiivakontrolli						
1.1	90,2	100,8	0,5347	0,5496	0,0924	0,0706
Hiivakontrolli						
1.2 (R)	90,4	100,7	0,5519	0,5571	0,0745	0,0804
5.1	90,3	100,3	0,3862	0,4171	0,1317	0,1732
5.2 (R)	90,2	100,1	0,4234	0,4238	0,1374	0,1695
6.1	90,2	100	0,4203	0,4142	0,0631	0,0537
6.2 (R)	90,6	100	0,4199	0,4054	0,1442	0,1443
7.1	90	100,1	0,3871	0,3913	0,1422	0,1386
7.2 (R)	90,6	100,5	0,4097	0,4347	0,1292	0,1329
8.1	90,1	99,8	0,4408	0,4482	0,143	0,1377
8.2 (R)	90,6	100,4	0,4187	0,3992	0,0477	0,0571
9.1	89,8	100	0,4836	0,4663	1,809(hylätty)	0,1575
9.2 (R)	90,3	100,4	0,4992	0,4938	0,1428	0,156
Hiivakontrolli						
1.1	89,8	99,9	0,6235	0,5994	0,0782	0,0813
Hiivakontrolli						
1.2 (R)	90,4	100	0,5351	0,5457	0,0811	0,112
Näyte	Kokonaisglukaaninäytteille (näytteet 1–4, raakanäyte ja hiivakontrolli) käytetyn glukosistandardin absorbanssiarvot		Alfaglukaaninäytteille (näytteet 1–4, raakanäyte ja hiivakontrolli) käytetyn glukosistandardin absorbanssiarvot	Kokonaisglukaaninäytteille (näytteet 5–9 ja hiivakontrolli) käytetyn glukosistandardin absorbanssiarvot	Alfaglukaaninäytteille (näytteet 5–9 ja hiivakontrolli) käytetyn glukosistandardin absorbanssiarvot	
St 1	0,5825 (hylätty)		1,108	1,0283	1,0979	
St 2	0,9325		1,1247	1,0908	1,1116	
St 3	0,9667		1,1031	1,1255	1,0915	
St 4	1,0944		0,9005	1,1136	1,1157	

Lyhenne	Selite
K	Kaksoiskappale
R	Rinnakkaisnäyte
1	60 °C, 2 h
2	60 °C, 4 h
3	60 °C, 6 h
4	80 °C, 2 h

Lyhenne	Selite
5	80 °C, 4 h
6	80 °C, 6 h
7	90 °C, 2 h
8	90 °C, 4 h
9	90 °C, 6 h