Tampereen yliopisto

Emilia Saarela

KERATIININ KÄYTTÖ LÄÄKETIETEELLISENÄ BIOMATERIAALINA

Uutto- ja puhdistusmenetelmät

Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Kandidaatintutkielma
Huhtikuu 2024

TIIVISTELMÄ

Emilia Saarela: Keratiinin käyttö lääketieteellisenä biomateriaalina – uutto- ja puhdistusmenetelmät
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Teknisten tieteiden kandidaattiohjelma, materiaalitekniikka
Huhtikuu 2024

Keratiini on proteiini, jonka lähteenä ovat ihmisellä hiukset, kynnet ja iho ja muilla selkärankaisilla muun muassa villa, höyhenet ja nokkamaiset ruumiinosat. Keratiini muodostuu keratinosyyttisoluissa, jotka erikoistuvat filamenttimaiseksi keratiiniproteiiniksi. Perusrakenne muodostuu polypeptidiketjuista, jotka muokkautumisen seurauksena kiertyvät joko α-tyypin keratiiniksi tai laskostuvat levymäiseksi β-keratiiniksi. Rakenteita pitää kasassa vety- ja disulfidisidokset. Sidosten ansiosta keratiinilla on erinomaiset mekaaniset ominaisuudet, kuten stabiilius ja sitkeys. Uutettaessa keratiinia, sillä on myös luontainen kyky rakentua skaffoldeiksi, mikä edistää niiden käyttöä lääketieteessä. Työn tavoitteena oli tutkia keratiinin lääketieteellisiä käyttökohteita, sekä perehtyä uutto- ja puhdistusmenetelmiin, joiden avulla keratiini saadaan käytettäväksi eri kohteissa.

Erinomaisen bioyhteensopivuuden ja biohajoavuuden ansiosta keratiinista voidaan valmistaa sovelluksia lääketieteellisiin käyttökohteisiin. Keratiinista on valmistettu hydrogeelejä, kalvoja, kuituja, sieniä, sekä mikrokapseleita ja nanopartikkeleita. Nämä sovellukset ovat osoittaneet potentiaalia muun muassa haavojen hoidossa, kudosteknologiassa sekä lääkeaineiden annostelujärjestelmissä. Keratiinipohjaiset tuotteet edistävät solujen kiinnittymistä, lisääntymistä ja kulkeutumista haavojen alueelle sekä lääkeaineiden annostelujärjestelmissä niillä on kyky kuljettaa ja vapauttaa lääkeainetta hallitusti.

Uuttomenetelmien tavoitteena on katkoa keratiinirakenteessa olevia sidoksia, jolloin keratiinin liukenevuus paranee ja se saadaan talteen. Uuttomenetelmät jaetaan kemiallisiin, fysikaalisiin ja biologisiin menetelmiin. Kemiallisiin menetelmiin kuuluvat pelkistäminen, hapetus, hydrolyysi, sulfitolyysi ja ioniliuoksien käyttö. Fysikaaliset menetelmät jaetaan höyryräjäytykseen, ylikuumennetun veden käyttöön ja mikroaaltosäteilytykseen. Biologisia menetelmiä ovat mikrobiset ja entsymaattiset menetelmät. Kemiallisista menetelmistä tehokkaimmaksi ja vaarattomimmaksi on todettu sulfitolyysi, koska siinä ei käytetä yhtä myrkyllisiä kemikaaleja kuin muissa kemiallisissa menetelmissä. Fysikaalisista menetelmistä ylikuumennetun veden käyttö on taloudellisin, puhtain ja tehokkain menetelmä. Verrattuna kaikkiin menetelmiin, mikrobisten ja entsymaattisten menetelmien käyttö on kuitenkin todettu ympäristöystävällisimmäksi ja turvallisimmaksi menetelmäksi. Puhdistusmenetelmien tavoitteena on poistaa keratiiniliuoksesta muut komponentit, kuten epäpuhtaudet, jolloin jäljelle jää keratiiniproteiinit, joita voidaan käyttää erilaisiin lääketieteellisiin sovelluksiin raaka-aineena. Puhdistusmenetelmät perustuvat liuoksessa olevien molekyylien erotteluun niiden koon-, varauksen-, sitoutumiskyvyn tai liukoisuuseron perusteella. Menetelmiä, joita käytetään proteiinien puhdistuksessa ovat dialyysi, ultrasuodatus, saostaminen, kromatografiset menetelmät, sentrifugointi ja elektroforeesi. Näistä erityisesti ultrasuodatus on todettu tehokkaaksi tuotteiden suuren läpimenon, hellävaraisuuden ja nopeuden kannalta verrattuna muihin menetelmiin. Usein puhdistuksessa käytetään useampaa menetelmää, jotta saavutetaan haluttu puhtausaste.

Avainsanat: keratiini, haavanhoito, lääkeaineiden annostelujärjestelmä, kudosteknologia uutto, puhdistus

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ABSTRACT

Emilia Saarela: Keratin as a medical biomaterial – extraction and purification methods
Bachelor's thesis
Tampere University
Bachelor's Program in Engineering sciences, Materials engineering
April 2024

Keratin is a protein derived from human hair, nails, skin and wool, feathers, and beak parts in other vertebrates. Keratin is formed in keratinocyte cells, which specialize in a filamentous keratin protein. The basic structure consists of polypeptide chains which, upon modification, either coil into α-type keratin or fold into a sheet-like β-keratin. The structures are held together by hydrogen and disulfide bonds. These bonds give keratin excellent mechanical properties such as stability and toughness. When extracted, keratin also has an inherent ability to build up into scaffolds, which promotes their use in medicine. This work aimed to investigate the medical applications of keratin and look for the extraction and purification methods to make keratin available for use in various applications.

Due to its excellent biocompatibility and biodegradability, keratin can be used to produce applications for medical uses. Keratin has been used to produce hydrogels, films, fibers, sponges, microcapsules, and nanoparticles. These applications have shown potential in wound care, tissue engineering, and drug delivery systems. Keratin-based products promote cell attachment, proliferation, and delivery to the wound site and, in drug delivery systems, can transport and release drugs in a controlled manner.

Extraction methods aim to break the bonds in the keratin structure, thus improving the solubility of keratin and its recovery. Extraction methods are divided into chemical, physical, and biological methods. Chemical methods include reduction, oxidation, hydrolysis, sulfitolysis, and the use of ionic solutions. Physical methods are divided into steam explosion, superheated water, and microwave irradiation. Biological methods include microbial and enzymatic methods. Of the chemical methods, sulfitolysis is the most effective and least dangerous, as it does not use as many toxic chemicals as other chemical methods. Of the physical methods, the use of superheated water is the most economical, cleanest, and most efficient. However, compared to all methods, microbial and enzymatic methods are the most environmentally friendly and safest. Purification methods aim to remove other components, such as impurities, from the keratin solution, leaving keratin proteins that can be used as raw material for various medical applications. Purification methods are based on separating molecules in solution according to their size, charge, binding capacity, or solubility difference. Methods used for protein purification include dialysis, ultrafiltration, precipitation, chromatography, centrifugation, and electrophoresis. Of these, ultrafiltration is effective in terms of high throughput, sensitivity, and process speed compared to other methods. Often, several methods are used to achieve the desired degree of purity.

Keywords: keratin, wound healing, drug release system, tissue engineering, extraction, purification

The originality of this thesis has been checked using the Turnitin OriginalityCheck service.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO 1
2. KERATIINI MATERIAALINA 2
2.1 Keratiini 2
2.2 Keratiinin rakenne 3
2.3 Keratiinin ominaisuudet 5
3. LÄÄKETIETEELLISET SOVELLUKSET 7
3.1 Hydrogeelit 8
3.2 Keratiinikalvot 9
3.3 Nanokuidut 9
3.4 Keratiinisienet 10
3.5 Mikrokapselit ja nanopartikkelit 11
4. UUTTOMENETELMÄT 13
4.1 Kemialliset menetelmät 13
4.1.1 Pelkistäminen 13
4.1.2 Hapetus 14
4.1.3 Hydrolyysi 15
4.1.4 Sulfitolyysi 16
4.1.5 Ioniliuokset 17
4.2 Fysikaaliset menetelmät 18
4.2.1 Höyryräjäytys 18
4.2.2 Ylikuumennetun veden käyttö 19
4.2.3 Mikroaaltosäteilytys 20
4.3 Biologiset menetelmät 21
5. PUHDISTUSMENETELMÄT 22
5.1 Dialyysi 22
5.2 Ultrasuodatus 23
5.3 Saostaminen 25
5.4 Kromatografiset menetelmät 26
5.5 Sentrifugointi 27
5.6 Elektroforeesi 28
6. YHTEENVETO 31
LÄHTEET 34

.

1. JOHDANTO

Luonnonpolymeerejä on tutkittu käytettäväksi lääketieteen sovelluksissa jo vuosikymmenien ajan niiden erinomaisten ominaisuuksien ansiosta. Näitä ovat muun muassa bioyhteensopivuus ja kyky jäljitellä kudoksien rakennetta ja toimintoja. Luonnonpolymeereistä proteiinit, kuten kollageeni, gelatiini, ja keratiini ovat herättäneet mielenkiintoa biomateriaalien valmistuksessa. [1] Proteiinipitoisten biomateriaalien etuina on niiden kyky solujen väliseen viestintään ja vuorovaikutukseen sekä kyky toimia tukirakenteena [2]. Proteiineista erityisesti keratiini on toiminut lupaavana materiaalina lääketieteen sovelluksissa.

Keratiini on proteiini, jota esiintyy ihmisellä hiuksissa, ihossa ja kynsissä sekä eläimillä muun muassa sarvissa, nokissa ja höyhenissä [3]. Materiaalina keratiini on osoittanut potentiaalia useissa lääketieteellisissä sovelluksissa sen ainutlaatuisten ominaisuuksien ansiosta. Rakenteensa vuoksi keratiinilla on hyviä mekaanisia ominaisuuksia, kuten stabiilius ja jäykkyys [2]. Lisäksi se on hyvin bioyhteensopiva ja biohajoava [1].

Jotta keratiinia voidaan käyttää biomateriaalina, se tulee uuttaa ja puhdistaa tehokkaasti, jotta varmistetaan sen laatu ja soveltuvuus lääketieteen käyttökohteissa. Tässä kandidaatintyössä vastataan siihen, millaisia erilaisia tuotteita keratiiniproteiinista voidaan valmistaa ja millaisiin lääketieteellisiin sovelluskohteisiin niitä voidaan käyttää. Lisäksi vastataan siihen, millaisia erilaisia menetelmiä on kehitetty keratiinin uuttoon eri lähteistä ja millaisia puhdistusmenetelmiä keratiiniin sovelletaan uuton jälkeen. Uutto- ja puhdistusmenetelmien tavoitteena on saada keratiinista riittävän puhdas, jotta sitä voidaan käyttää lääketieteen sovelluksissa.

2. KERATIINI MATERIAALINA

Keratiini on kollageenin ohella yksi tärkeimmistä luonnonpolymeereistä, joita eläimistä on löydetty [3]. Alun perin nimellä ”keratiini” viitattiin ryhmään proteiineja, joita oli mahdollista uuttaa eri lähteistä. Tähän kuului itse keratiinin lisäksi muitakin proteiineja. Uusimpien määritelmien mukaan keratiini on proteiini, joka muodostaa kuitumaisia rakenteita ja omaa erityiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet. Määritelmään kuuluu myös se, että näiden proteiinien tuotanto tapahtuu kaikkien selkärankaisten epiteelien koteloituneessa kerroksessa. [4] Tässä luvussa käsitellään keratiinin lähteitä, rakennetta sekä ominaisuuksia.

2.1 Keratiini

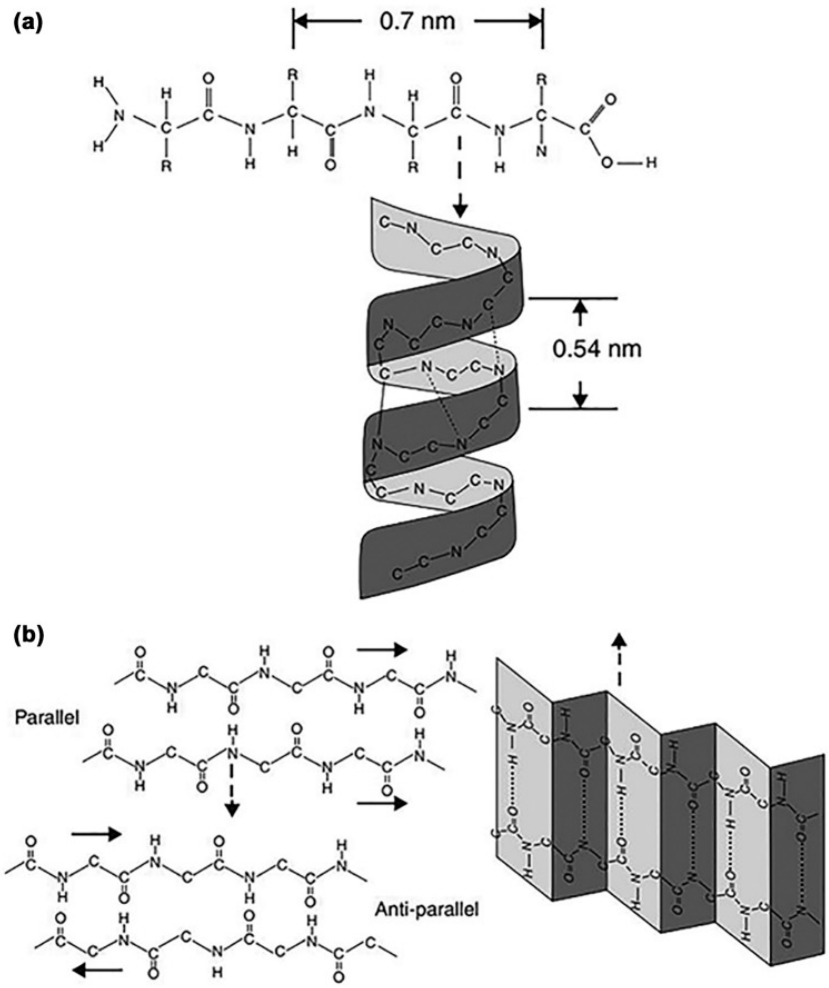
Keratiini on proteiini, jota löytyy selkärankaisilla ihokudoksesta. Ihmisellä keratiinia esiintyy muun muassa ihon orvaskeden sarveiskerroksessa ja orvaskeden lisäkkeissä, kuten hiuksissa ja kynsissä. [3] Muilla selkärankaisilla keratiinia esiintyy erilaisissa höyhenissä tai turkissa, nokkamaisissa- ja sarvimaisissa ruumiinosissa sekä sorkissa. Yksi merkittävä keratiinin lähde on villa. [2] Kuvassa 1 on esitetty keratiinin lähteitä. Verrattaessa keratiinia muihin proteiineihin, kuten kollageeniin tai elastaaniin, keratiinilla on huomattavan korkea rikkipitoisuus, mikä johtuu polypeptidiketjuissa olevista useista kysteiinihapoista. Kysteiini aiheuttaa rakenteeseen disulfidisidoksia, jotka vaikuttavat keratiinin mekaanisiin ominaisuuksiin, kuten liukenevuuteen ja stabiilisuuteen. [2] [3]

Kuva 1. Keratiinin lähteet, muokattu lähteestä [2]

Keratiinin tuotannosta vastaavat keratinosyytit. Ne ovat soluja, jotka erikoistuvat filamenttimaiseksi keratiiniksi. Ihmisellä orvaskeden soluista yli 95 % muodostuu keratinosyyteistä. [5] Keratinisaatiossa keratinosyyttien sisällä olevat soluelimet korvautuvat filamenttimaisella proteiinilla, jonka seurauksena keratinosyytit muuttuvat stabiileiksi kuolleiksi soluiksi. Keratinosyytit kokevat siis apoptoosin, eli solukuoleman. Vapautunutta keratiinia voidaan tämän perusteella kutsua kuolleeksi kudokseksi [5].

2.2 Keratiinin rakenne

Keratiinin perusrakenne muodostuu polypeptidiketjuista, joiden muokkautumisen perusteella muodostuu joko kierremäisiä α-tyypin keratiineja tai levymäisesti laskostuneita β-tyypin keratiineja [5]. Yleisesti keratiinit voidaan siis luokitella joko α- tai β-tyypin keratiineiksi. Molemmat tyypit muodostavat nanotasolla filamenttimaisen matriisirakenteen. Polypeptidiketjussa olevien aminohappojen määrä ja järjestys vaikuttavat keratiinifilamentin toiminnallisiin ominaisuuksiin, sekä ne määrittävät keratiinin rakenteen sekundääri-, tertiääri- ja kvaternääritasolla. Yksittäisten aminohappojen ominaisuudet voivat vaihdella myös polaarisuuden, varauksen ja koon suhteen, mikä myös vaikuttaa yksittäisen keratiiniproteiinin ominaisuuksiin. [4]

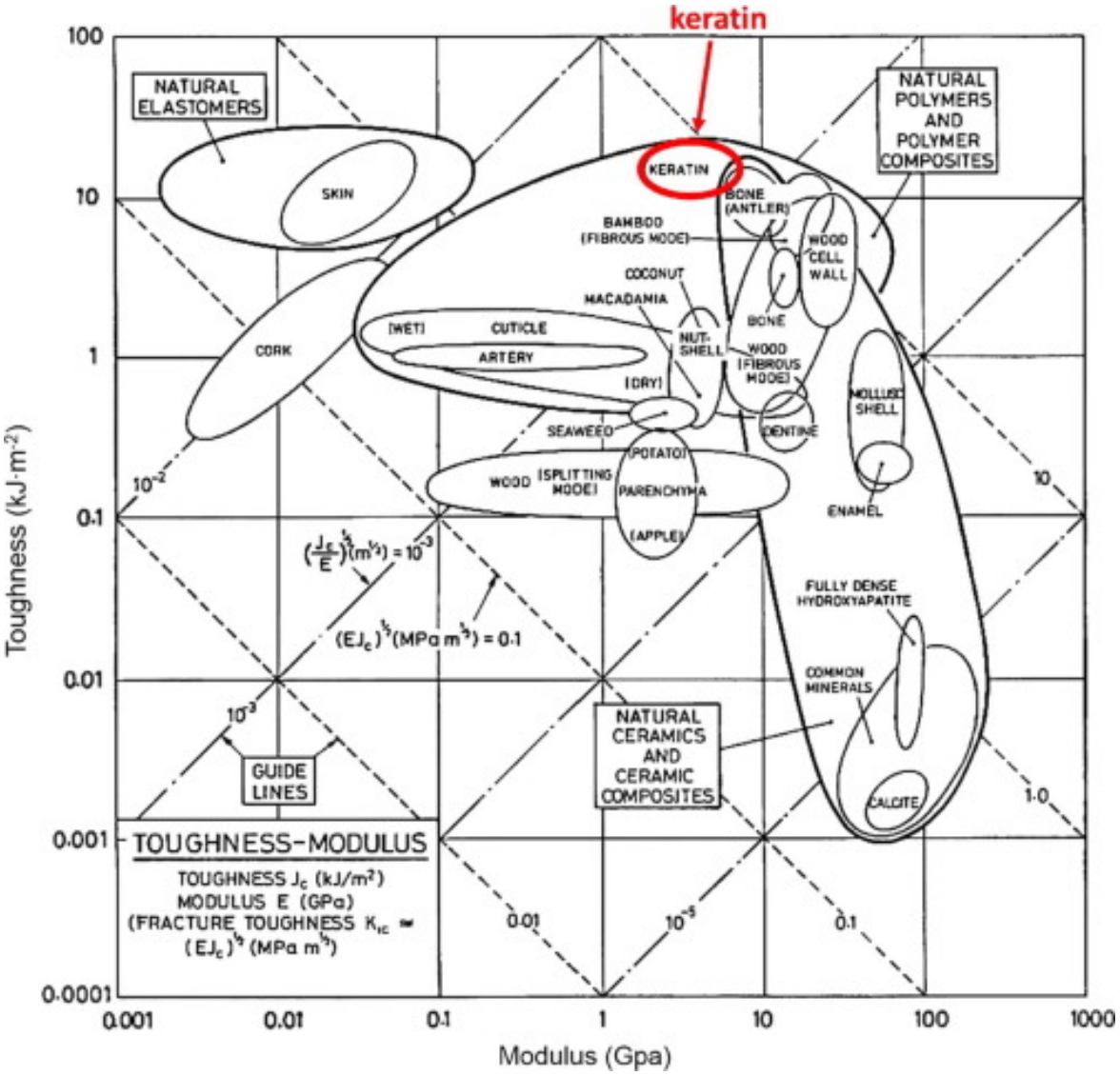


Kuva 2. Keratiinin rakenteet a) α-rakenne b) β-rakenne [6]

Keratiinin α-rakenteessa proteiiniketju kiertyy itsensä ympäri, jolloin muodostuu kierre. Kierre pysyy kasassa vetysidoksilla, joita muodostuu eri tasojen välille. α-rakenteessa on myös disulfidisidoksia eli rikkisiltoja proteiinikierteiden välillä. Myös β-rakenteessa levymäisesti järjestäytyneiden keratiiniproteiinien rakennetta pitää kasassa vetysidokset. Rikkisiltoja muodostuu β-rakenteessa ketjujen välille. [4] Kuvassa 2 on kuvattu keratiinin kierremäinen α- ja levymäinen β-rakenne. Disulfidisidokset johtuvat keratiinin korkeasta kysteiinipitoisuudesta, mikä saa aikaan kovalenttiset rikkisillat rakenteissa [5]. Sidoksia muodostuu koko matriisirakenteen osien välille. Keratiineja luokitellaan myös rakenteen rikkipitoisuuden perusteella. Kovissa keratiineissa keratiinipitoisuus on yli 3 painoprosenttia ja pehmeissä keratiineissa pitoisuus on alle 3 painoprosenttia. Pehmeää keratiinia esiintyy ihon sarveiskerroksessa, ja kovaa keratiinia esiintyy muun muassa villassa, hiuksissa, kynsissä ja sarvissa. [7] Keratiineja voidaan myös kutsua komposiittimaisiksi materiaaleiksi, koska niissä on kuituosana muokkautuneet polypeptidiketjut ja niiden ympärillä amorfinen matriisirakenne [5].

2.3 Keratiinin ominaisuudet

Keratiinilla on monia hyviä mekaanisia ja biologisia ominaisuuksia. Sen korkea kysteiinipitoisuus tekee siitä kestävän mekaanista ja kemiallista rasitusta vastaan [6]. Rikkisillat, jotka muodostuvat molekyylien välille ja sisälle, tekevät keratiinista liukenemattoman orgaanisiin liuottimiin, happoihin, emäksiin ja veteen [3] [4]. Keratiini liukenee kuitenkin denaturoiviin liuottimiin, kuten ureaan. Verrattuna muihin proteiineihin, keratiini on stabiilimpi johtuen rakenteessa olevista vety- ja disulfidisidoksista. Sidokset tekevät keratiinista myös jäykemmän. [2] Keratiini on materiaalina sitkeä, ja sillä on korkea kimmokerroin [3]. Kuvasta 3 huomataan, että verrattaessa keratiinia muihin materiaaleihin, sen sitkeys ja kimmokerroin ovat suuria. Lisäksi korkean denaturointilämpötilan (sulamispiste yli 215°C) ansiosta keratiini kestää hyvin lämpökäsittelyä [7].



Kuva 3. Keratiinin sitkeys ja kimmokerroin [3]

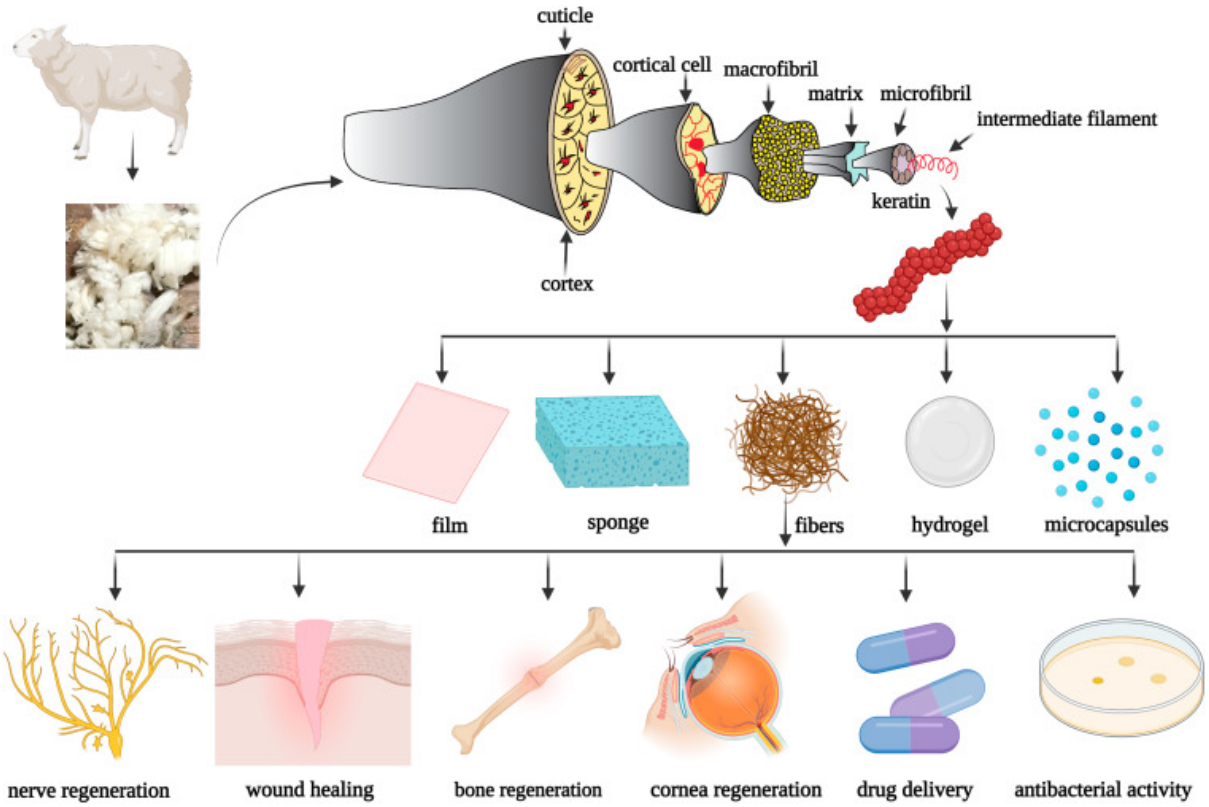
Keratiinit ovat luonnostaan bioyhteensopivia ja biohajoavia sekä niitä on runsaasti saatavilla. Kun keratiinia uutetaan, sillä on materiaalina luontainen kyky polymeroitua pitkiksi polymeeriketjuiksi ja muodostaa skaffoldeja (eng. scaffold), jotka ovat rakenteeltaan huokoisia ja kuitumaisia. [1] Verrattaessa α- ja β- tyypin keratiineja keskenään, β-tyyppi on jäykempi kuin α-tyypin keratiini. Vetojännityksessä α-tyypin rakenne muuttuu kierremäisestä levymäiseksi β-tyyppiä vastaavaksi rakenteeksi. [3] Mekaanisiin ominaisuuksiin vaikuttaa kuitenkin kosteus, ketjujen orientaatio ja suuntautuminen sekä filamenttien tilavuusosuudet [7].

Mekaanisten ominaisuuksien lisäksi keratiini osallistuu solujen väliseen viestintään, solujen erikoistumiseen- ja kuljetukseen sekä solujen lokeroitumiseen. Keratiinifilamenteilla on myös vaikutusta siihen, miten solut reagoivat sisäisiin ja ulkoisiin signaaleihin. Filamentit säätelevät myös solujen proteiinisynteesiä ja kasvua. [4]

Proteiineista valmistetuissa biomateriaaleissa merkittävä ominaisuus on niiden biohajoavuus. Se on tärkeä ominaisuus lääketieteen sovelluksissa, sillä sen avulla materiaali ei jää pysyvästi kudoksiin. Hajoamisnopeus on kriittinen tekijä, ja sen tulisi olla hallittua. Hajoamisen tulisi tapahtua samalla nopeudella kuin kudoksen paraneminen tapahtuu. Keratiinin kohdalla hajoaminen on hitaampaa kuin muilla proteiineilla, kuten kollageenilla, koska ihmiskehossa ei ole sitä hajottavaa keratinaasientsyymiä. [7] Koska keratiini on myös liukenematon useimpiin liuottimiin, sen hajoaminen luonnollisesti on vaikeaa. Keratiini kykenee vastustamaan tiettyjen proteaasien, kuten pepsiinin ja trypsiinin vaikutusta [4], mutta keratinaasit kykenevät hajottamaan keratiinia aminohapoiksi. Keratinaasit ovat hydrolyyttisiä entsyymejä, ja niiden tehtävänä on katalysoida keratiinin hajoamisprosessia [8]. Niitä tuottavat dermatofyytit, jotka kuuluvat sieniryhmään. Dermatofyytit tarvitsevat keratiinia ravinnokseen, joten niitä esiintyy keratiinipitoisissa lähteissä, kuten ihmisellä hiuksissa, kynsissä ja ihossa. [9]

3. LÄÄKETIETEELLISET SOVELLUKSET

Keratiinin käyttöä erilaisissa lääketieteellisissä sovelluksissa on tutkittu jo vuosikymmenien ajan [1]. Keratiinin kyvyllä polymeroitua pitkiksi polymeeriketjuiksi, ja muodostaa kierteistä tai levymäistä rakennetta on vaikutus siihen, että ne ovat hyvin bioyhteensopivia. Tämä tekee niistä hyviä materiaaleja kudosteknologian sovelluksiin ja lääkeaineiden annostelujärjestelmiin. Bioyhteensopivuuden lisäksi keratiinilla on hyvä mekaaninen kestävyys, ja se on materiaalina biohajoava. [6]



Kuva 3. Keratiinista valmistetut sovellukset ja käyttökohteet [7]

Keratiinin lähteen mukaan käyttökohteita on monia. Kudosteknologiassa keratiinia on käytetty apuna solujen kiinnittymisessä ja lisääntymisprosessissa sekä kudosten uusiutumisessa. Keratiinista on valmistettu muun muassa hydrogeelejä, kalvoja, sieniä sekä erilaisia solun rakennusosia. [6] Kuvassa 3 on esitetty keratiinista valmistettuja tuotteita sekä niiden käyttökohteita.

3.1 Hydrogeelit

Hydrogeelit ovat materiaaleja, joita voidaan valmistaa polysakkarideista, proteiineista tai synteettisistä polymeereistä. Hydrogeelit ovat rakenteeltaan huokoisia, mikä saa aikaan sen, että ne pystyvät varastoimaan itseensä vettä sekä muita biologisia nesteitä suurissa määrin. Keratiinihydrogeelin valmistuksessa käytetään yleensä keratoosia, joka on keratiinin vesiliukoinen komponentti. [2]

Keratiinista valmistettuja hydrogeelejä voidaan tutkimuksien perusteella käyttää palovammojen hoidossa, sillä niillä on todettu olevan kyky hidastaa palovammojen etenemistä ja vaikuttaa ihon uudistumiskykyyn [6]. Keratiinipohjaiset hydrogeelit lisäävät hermosolujen aktiivisuutta ja niiden lisääntymistä kudoksessa [10]. Jo 15 %:n keratiinipitoisuus hydrogeelissä vaikuttaa tehokkaasti hermojen uudistumis- ja palautumiskykyyn haavojen hoidossa. Keratiinipohjaisia hydrogeelejä on käytetty myös hammaslääketieteellisessä kudosteknologiassa skaffoldien kehittämiseen. [6]

Keratiinihydrogeelejä on tutkittu käytettäväksi lääkeaineiden annostelussa, koska niillä on kyky varastoida itseensä lääkeainetta ja vapauttaa sitä vähitellen. Siprofloksasiinin sisällytys keratiinihydrogeelin joukkoon on tutkimuksen mukaan vapauttanut 60 % kyseistä antibioottia 10 päivän aikana ja estänyt bakteerien lisääntymisen. [11] Keratiinihydrogeelien on myös todettu olevan hyviä estämään adheesiota joidenkin leikkausten, kuten vatsakalvoleikkausten, jälkeen. Tutkimuksen mukaan keratiinihydrogeeli pystyy myös toimimaan monikäyttögeelinä ja kuljettaa lääkeaineen tapaturmakohtaan.

Rajoitteita, jotka liittyvät keratiinihydrogeelien käyttöön lääkeaineiden annostelussa, ovat lääkeaineen heikko pysyvyys keratiinimatriisissa sekä keratoosihydrogeelin nopea hajoaminen keratiinimatriisissa. [10] Vaikka keratiini on rakenteeltaan stabiili, hydrogeeleissä käytettävä vesiliukoinen komponentti, keratoosi, hajoaa jopa kahdessa viikossa. Rajoittavat tekijät kuitenkin riippuvat myös kohdekudoksen fysiologisesta ympäristöstä. Ratkaisuna näihin ongelmiin on tutkittu ristisilloitettuja disulfidihydrogeelejä, nanopartikkeleita lääkeaineen kuljetukseen tai kovalenttisten sidosten muodostaminen keratiinimatriisiin. Keratiiniproteiinin aminohappoketjua on myös muokattu, jolloin on mahdollista parantaa keratiinin vakautta ja kykyä kuljettaa lääkeainetta. [11]

3.2 Keratiinikalvot

Keratiinikalvoja valmistetaan liuotinvalun avulla. Menetelmässä keratiiniliuos valetaan muottiin, jonka jälkeen liuotin haihdutetaan, ja jäljelle jää kalvomainen tuote. [12] Keratiinikalvoja käytetään haavojen hoidossa sekä kudosteknologian sovelluksissa. Kalvoilla on ominaisuuksia, jotka edistävät solujen kiinnittymistä haavan parantumisen yhteydessä. [6] Haavojen hoidossa keratiinikalvot edistävät solujen adheesiota, lisääntymistä ja kulkeutumista [11].

Vaikka keratiinilla on materiaalina hyvät mekaaniset ominaisuudet, haasteena on ollut jäljitellä niitä muun muassa keratiinikalvoihin. Eräässä tutkimuksessa puhtaasta keratiinista valmistetut kalvot olivat liian hauraita käytettäväksi. Keratiinin joukkoon lisätäänkin usein jotain muuta materiaalia, jotta mekaaniset ominaisuudet saadaan ylläpidettyä myös sovelluskohteissa. [2] Keratiinin joukkoon on lisätty muun muassa kitosaania, jolloin mekaanista lujuutta on parannettu [1].

Keratiinikalvoja on käytetty haavojen hoidossa haavansidoksena, sillä kalvoilla on kyky imeä vettä itseensä. Kalvot mahdollistavat kaasujen vaihdon sidoksen läpi sekä veden pääsyn haavan alueelle, mutta toimivat myös esteenä sille, että bakteerit eivät kulkeudu haavaan. Kalvot ovat myös hyvin joustavia. Puhtaan keratiinin mekaanisia ominaisuuksia voi parantaa myös lisäämällä keratiinin joukkoon synteettisiä molekyylejä, kuten etyleeniglykolidiglysidyylieetteriä (EGDE). [13] Keratiinikalvoja, joissa on pehmittiminä 20 % glyserolia, käytetään piilolinssien valmistuksessa [6]. Myös silmänpinnan korjauksessa on käytetty keratiinikalvoja vaihtoehtoisena materiaalina lapsivesikalvolle, koska keratiinikalvon valonläpäisevyys ja mekaaniset ominaisuudet ovat parempia kuin lapsivesikalvon. Keratiinikalvoja käytetään myös erilaisissa soluviljelyissä, koska kalvon ansiosta solunkasvu on tehokkaampaa. [11]

3.3 Nanokuidut

Nanokuituja valmistetaan yleensä sähkökehruun avulla. Näin saadaan aikaan rakenne, jonka mekaanisia ominaisuuksia on helppo säädellä. Keratiinilla on kuitenkin liian alhainen moolimassa ja huono viskoelastisuus, jotta sitä voitaisiin käyttää yksinään sähkökehruumenetelmässä. [13] Myös keratiinin liukenemattomuus aiheuttaa haasteita. Keratiinin joukkoon lisätäänkin synteettisiä polymeerejä, jolloin nämä ominaisuudet paranevat. Nanokuituja käytetään erityisesti haavojen hoidossa haavansidoksena. Kuitujen hy-

vinä ominaisuuksina ovat niiden suuri pinta-ala sekä huokoisuus, mikä mahdollistaa hapen kulkeutumisen sekä haava-alueen hengittävyyden. Myös lääkeannostelujärjestelmissä huokoisuutta ja suurta pinta-alaa on hyödynnetty, koska lääkeaineen annostelukapasiteetti kuituun on tällöin suurempi. Hyvänä ominaisuutena on myös nanokuitujen samankaltaisuus soluväliaineen kuitujen kanssa, mikä edistää solujen kiinnittymistä, siirtymistä ja lisääntymistä. Tällä on vaikutusta haava-alueen parantumiseen. [13] Koska kuidut muistuttavat soluväliaineen kuituja, niiden avulla on myös mahdollista kehittää muun muassa maksan ja sydämen kudoksia [14].

Keratiinia on käytetty yhdessä polykaprolaktonin (PCL) kanssa valmistettaessa komposiittinanokuituja. Tällä yhdistelmällä on saatu aikaan materiaali, jossa yhdistyvät PCL:n mekaaniset ominaisuudet sekä keratiinin biologiset ominaisuudet. Tällä komposiittinanokuidulla on potentiaalia käytettäväksi erilaisissa lääketieteellisissä sovelluksissa. Kuitu on mekaanisesti lujaa ja vahvaa, minkä ansiosta se pystyy edistämään solujen tarttumista ja lisääntymistä. Komposiittinanokuitu myös muistuttaa soluväliaineen kuituja, jolloin sitä voidaan käyttää kudostekniikassa. [14]

3.4 Keratiinisienet

Keratiinisieniä valmistetaan lyofilisoimalla eli kylmäkuivauksella. Menetelmän tavoitteena on saada aikaan mikrorakenne, joka muistuttaa soluväliaineen rakennetta. [7] Toinen valmistustapa on tekniikka, jossa yhdistetään ahtopuristus ja hiukkasliuotus (eng. compression moulding/particulate leaching) [1]. Menetelmässä keratiini puristetaan muottiin, jossa on läsnä määrätyn kokoisia hiukkasia. Kun tuote on valmis, hiukkaset poistetaan vedellä, ja jäljelle jää liukenematon keratiinisieni. [15] Tämän yhdistelmämenetelmän avulla on mahdollista säädellä huokosten kokoa ja huokoisuutta hiukkasten avulla. Nämä ovat tärkeitä ominaisuuksia kudostekniikan sovelluksissa, joissa tavoitteena on saada aikaan riittävä solujen tunkeutuminen rakenteeseen ja ravintoaineiden ja kehon nesteiden kuljetus. [1]

Keratiinista ja kalsiumfosfaattia sisältävistä materiaaleista on valmistettu hybridisieniä. Tämä on tehty joko kiinnittämällä kalsium- ja fosfaatti-ionit kemiallisesti sieneen tai sekoittamalla hydroksiapatiittihiukkasia keratiini-karboksirakenteeseen. Näiden hybridisienien on todettu edistävän erityisesti osteoblastisolujen kasvua ja kiinnittymistä soluviljelyissä. [10] Varsinkin villasta peräisin olevista keratiiniproteiineista valmistettuja sieniä on tutkittu, ja niillä on todettu olevan homogeeninen huokoinen mikrorakenne, joka on saanut aikaan solujen kiinnittymisen, leviämisen ja kasvun sienillä [16].

Koska keratiinirakenteissa on vapaita kysteiinijäämiä, niiden on todettu toimivan tehokkaina kohtina bioaktiivisten aineiden immobilisaatiossa eli liikkumisen etenemisen estäjinä. Tämä on todettu myös keratiinisienien kohdalla, joihin eräässä tutkimuksessa lisättiin lysotsyymejä bioaktiivisena aineena kiinnittämällä ne sieneen disulfidi- ja tioeetterisidoksilla. Tutkimuksessa todettiin, että kemiallisen sidoksen valinnalla oli merkitystä, sillä lysotsyymit vapautuivat huomattavasti hitaammin keratiinisienestä, jossa oli käytetty tioeetterisidoksia. [1]

Keratiinia on sekoitettu myös kitosaanin kanssa, jolloin on saatu aikaan sienirakenne, jota on tutkittu käytettäväksi kudosteknologiassa. Näiden materiaalien yhdistelmällä mekaanisia ominaisuuksia voidaan parantaa, sekä niiden avulla antibakteeriset ominaisuudet paranevat. [7] Keratiinin ja kitosaanin yhdistelmämateriaali on myös osoittanut potentiaalia soluviljelyissä [6].

3.5 Mikrokapselit ja nanopartikkelit

Keratiinimikrokapseleita valmistetaan kapselointimenetelmällä, jossa jokin vaikuttava aine suljetaan kapselin sisälle. Kapseli koostuu keratiinikuoresta, ja sen sisällä olevasta ytimestä. [7] Kuoriosaan valittu materiaali toimii eri tavalla riippuen käytettävästä sovelluskohteesta [17]. Kapseloinnin tavoitteena on suojata ytimen sisällä olevia aineita, toimia säätelevänä tekijänä aineen vapauttamisessa sekä parantaa säilyvyysaikaa [7]. Mikrokapselien kykyä vapauttaa aineita ytimestä tietyn ajanjakson ajan voidaan käyttää hyödyksi lääkeaineiden annostelujärjestelmissä erilaisten sairauksien hoidossa [17].

Kapseleiden lisäksi keratiinista on valmistettu nanopartikkeleita, joita on tutkittu käytettäväksi lääkeaineiden annostelussa kapseleiden tapaan. Nanopartikkeleiden etuina lääkkeiden annosteluun on niiden suuri pinta-ala, säädeltävä biohajoavuus, sekä helppo toiminnallisuus. [18] Keratiininanopartikkeleihin on myös adsorboitu metalli-ioneja, muun muassa hopeaioneja, jolloin on saatu aikaan antimikrobisia nanohiukkasia. Antimikrobisuuden uskotaan johtuvan metalli-ionien kyvystä estää bakteerisolujen toiminnallisuus niiden ollessa kontaktissa keskenään. Tutkimuksen mukaan keratiininanopartikkelit, joihin oli adsorboitu metalli-ioneja, osoitti voimakasta aktiivisuutta bakteerien tuhoamisessa. Antimikrobisen tehokkuuden vaikutus riippuu kuitenkin metalli-ionien tyypistä sekä altistusajasta. [19]

Keratiinista on valmistettu rekombinanttinanopartikkeleita, joiden on todettu olevan potentiaalinen vaihtoehto haavojen hoidossa. Eräässä tutkimuksessa rekombinanttiproteiineja valmistettiin käyttämällä ihmisen hiuksista peräisin olevien keratiiniproteiinien geenejä. Nämä geenit lisättiin plasmidin DNA:han eli bakteerisolun geneettiseen osaan, jonka jälkeen muokattu plasmidi siirrettiin E. coli-bakteerien joukkoon. Nämä bakteerit alkoivat tuottaa rekombinanttikeratiinia. Rekombinanttinanopartikkelit valmistettiin käyttäen ultraäänidispersiota. Haavojen hoidossa nanopartikkelit muodostavat kudosmatriisin kanssa nanosidoksia, joiden avulla haavojen sulkeutuminen ja paraneminen nopeutuu. Tehdyn tutkimuksen mukaan rekombinanttikeratiininanopartikkelit edistivät solujen kulkeutumista ja lisääntymistä haavan alueella, minkä vaikutuksesta haavan paraneminen nopeutui. [20]

4. UUTTOMENETELMÄT

Keratiinin uuttamiseen on vuosikymmenien varrella kehitetty useita menetelmiä. Koska keratiinilla on rakenteessaan useita vetysidoksia ja kovalenttisia disulfidisidoksia, liuotus- ja uuttomenetelmissä käytetään kovia kemiallisia tai fysikaalisia olosuhteita, jotta nämä sidokset saadaan katkeamaan [10] [18]. Uuttomenetelmät voidaan jakaa kemiallisiin, fysikaalisiin ja biologisiin menetelmiin. Kemialliset menetelmät jaetaan pelkistämiseen, hapetukseen, hydrolyysiin, sulfitolyysiin ja ioniliuosten käyttöön. Fysikaalisia menetelmiä ovat höyryräjäytys, ylikuumennetun veden käyttö ja mikroaaltosäteilytys. Biologisiin menetelmiin kuuluu mikrobiset ja entsymaattiset menetelmät. [21] Uutosta tai liuotuksesta saaduilla lopputuotteilla on menetelmästä riippuen erilaiset ominaisuudet [17].

4.1 Kemialliset menetelmät

4.1.1 Pelkistäminen

Keratiinin vakaa rakenne johtuu disulfidisidoksista, joita pelkistetään tiolia sisältävien kemikaalien avulla. Tioleja on käytetty pelkistysprosesseissa jo 1930-luvulla. Esimerkkejä pelkistävistä aineista, joita on käytetty erityisesti villakeratiinin pelkistysprosesseissa, ovat natriumtioglykolaatti ja tioglykolihappo. [10] Periaatteena pelkistyksessä on, että pelkistävä aine katkoo disulfidisidoksia, ja tämän reaktion seurauksena muodostuu tioliryhmä [22]. Pelkistettyjä keratiineja kutsutaan kerateiineiksi [21].

Tutkimuksien mukaan pH-tason vaihtelu vaikuttaa suuresti keratiinin pelkistymisasteeseen. Eräässä tutkimuksessa villan pelkistymistä tutkittiin vaihtelevissa pH-arvoissa ja eri pitoisuuksilla pelkistäjäainetta. Havaittiin, että pelkistymistä tapahtui vain pH-tason ollessa vähintään 10,5 tai korkeampi ja myös liukeneminen lisääntyi, kun pH oli vähintään 11. Tiolien käytön avulla jo pH-tasolla 2 havaittiin suuria määriä proteiinien uuttumista lämpötilassa 50–60 °C. Samalla kuitenkin havaittiin haitallisen lantioniinin muodostumista, mikä johtui käsittelylämpötilasta. Myöhemmissä tutkimuksissa ilmeni, että merkaptoetanolin (MEC) käytön avulla villakeratiinin uuton saanto oli jopa 75 %. Huonoja puolia merkaptoetanolissa kuitenkin ovat sen myrkyllisyys ja korkea hinta. [11]

Denaturointiaineena on käytetty ureaa tai tioureaa pelkistysprosessissa, sillä niiden avulla pystytään parantamaan keratiinin liukoisuutta veteen katkaisemalla vetysidoksia polypeptidiketjujen välillä [21]. Suurilla pitoisuuksilla urea turvottaa keratiinirakennetta,

jolloin se heikentää hydrofobisten sidosten muodostumista polypeptidiketjussa ja edistää pelkistävän aineen toimintaa [2]. Suuri haaste denaturointiaineiden käytössä on keratiinin hajoaminen. Tutkimuksien mukaan liian korkeat lämpötilat tai pH-ympäristö aiheuttavat keratiinin rakenteen hajoamisen ja lantioniinin muodostumisen. [11]

Pelkistämisessä on käytetty pinta-aktiivisena aineena natriumdodekyylisulfaattia (SDS), jonka avulla on nopeutettu uuttoa, sekä lisätty uutetun keratiinin vakautta vesiliuoksissa [2]. Vuonna 1996 tehdyssä tutkimuksessa keratiinia uutettiin urean, 2-merkaptoetanolin ja SDS:n avulla, jolloin saannoksi saatiin 45–50 %. Uutetun keratiinin joukossa oli kuitenkin pieni määrä SDS:ää, koska näiden välille muodostui kompleksi. [11] Myöhemmin todettiin, että verrattaessa anionisia pinta-aineita, kuten SDS, neutraaleihin ja kationisiin pinta-aineisiin, anioniset pinta-aineet toimivat tehokkaammin pelkistysprosessissa [10]. Keratiinin uuttoon pelkistämällä on kehitetty ”Shindai”-menetelmä. Menetelmässä tiourea, urea ja merkaptoetanolin yhdistelmällä on pystytty poistamaan proteiineja tehokkaammin kuoresta ja saatu yli 65 % saanto. Tiourea lisäys paransi keratiinin erottumista ja uuton saantoa. [10]

4.1.2 Hapetus

Keratiinin uutto hapettamalla on yksi vanhimmista tavoista uuttaa keratiinia. Hapettavina aineina on käytetty peretikkahappoa, vetyperoksidia, permuurahaishappoa ja kaliumpermanganaattia. Näiden aineiden avulla disulfidisidokset saadaan osittain katkeamaan ja kystiini hapettuu kysteiinihappojäämiksi. Hapetusmenetelmiä käytetään pääosin uutettaessa keratiinia hiuksista ja villasta. [21]

Hapetettuja keratiineja kutsutaan keratooseiksi. Keratoosit on mahdollista erotella niiden fraktioiden mukaan riippuen niiden liukoisuudesta eri pH-arvoissa. Tämä tarkoittaa sitä, että muun muassa α- ja β-keratiinit on mahdollista erotella toisistaan. Keratiinin uutossa hapettamalla on myös haittapuolia. Näitä ovat muun muassa pitkä prosessiaika ja tarve suurille määrille hapettavia aineita. Lisäksi keratoosit hajoavat hydrolyyttisesti nopeasti hapetuksen jälkeen. [21] Tutkimuksien mukaan keratiini ei myöskään täysin liukene liuoksissa. Liukenematon keratiini on useimmissa tutkimuksissa koostunut β-keratiinista. Saadut keratiiniliuokset ovat muodostuneet α-keratiinista. Liukoisuuseroja on käytetty hyväksi valmistettaessa muun muassa geelejä lääketieteellisiin sovelluksiin, sillä niiltä vaaditaan hyviä liukoisuusominaisuuksia. Huonosti liukenevat β-keratiinit saostettiin ja erottiin säätämällä liuoksen pH emäksiseksi. α-keratiinit eroteltiin pH-arvon ollessa hieman hapan. [11]

Eräässä tutkimuksessa keratiinia on hapetettu 2-prosenttisella peretikkahapolla 30 tunnin ajan. Tämän jälkeen suoritettiin mieto ammoniakkikäsittely ja saostaminen vetykloridilla. [11] Tutkimuksessa havaittiin, että peretikkahappo toimii hapettajana hapettaen keratiinin disulfidisidoksia kysteiinihapoksi. Tämä kysteiinihappo sisältää sivuryhmässään funktionaalisen sulfonihapporyhmän. Sivuketjuissa nämä sulfonaattiryhmät voivat muodostaa vesiliukoisia komplekseja. Tutkimuksien mukaan myös muiden hapettajien hapetusreaktioiden seurauksena muodostuu reaktiotuotteena sulfonaatteja. [2]

Verrattaessa hapetusmenetelmää muihin uuttomenetelmiin, saaduilla keratooseilla on erilaisia ominaisuuksia, mitkä johtuvat disulfidisidosten muuttumisesta sulfonaateiksi [23]. Muihin menetelmiin verrattuna suurena haittapuolena on kystiinin hapettuminen kysteiinihapoksi käytettäessä peretikka- tai permuurahaishappoa. Happojen vaikutus voi myös tuhota aminoasyylejä. [11]

4.1.3 Hydrolyysi

Hydrolyysiä voidaan tehdä sekä happamissa että emäksisissä olosuhteissa. Prosessin saantoon vaikuttaa moni tekijä, kuten pH, lämpötila ja reaktioaika. Vaikuttavia tekijöitä ovat myös hapon tai emäksen tyyppi ja niiden määrä hydrolyysissä. [6]

Hydrolyysissä keratiiniproteiineja kuumennetaan joko väkevässä happamassa tai emäksisessä liuoksessa. Tämä saa aikaan hydrolyysin, joka rikkoo sidoksia sekä proteiinien sisällä että ketjujen välillä. [21] Happohydrolyysin on todettu olevan tehokas menetelmä, mutta siitä saatu saanto on heikkoa. Tämä johtuu aminohappojen hajoamisesta hydrolyysiprosessin kuumennuksen yhteydessä. Aminohappojen hajoamista emäshydrolyysissä tapahtuu vähemmän. [6] Happohydrolyysissä käytettyjä happoja ovat muun muassa rikkihappo, peretikkahappo ja suolahappo [21].

Emäshydrolyysi on happohydrolyysiä käytetympi menetelmä. Eräässä tutkimuksessa keratiiniproteiineja kuumennettiin 80 °C lämpötilassa 3 tunnin ajan 2-prosenttisessa natriumhydroksidiliuoksessa, jolloin saanto oli 25 % [6]. Natriumhydroksidin määrää liuoksessa on mahdollista vähentää lisäämällä sen joukkoon esimerkiksi natriumsulfidia. Tutkimuksen mukaan tämä liuos hajotti villaa nopeammin puolen tunnin aikana verrattuna puhtaaseen natriumhydroksidiliuokseen. Haittapuolena oli korkean rikkipitoisuuden omaavan jäännösvillan muodostuminen. [10] Toisessa tutkimuksessa saatiin liuos, jonka proteiinikoostumus oli 90,3%, käyttämällä 0,15 molaarisen kaliumhydroksidin ja 0,05 molaarisen natriumhydroksidin sekoitusta 120 °C:n lämpötilassa [22].

Emäshydrolyysissä on myös haittapuolia. Menetelmässä tarvitaan suuri määrä emäskemikaaleja ja lisäksi tarvitaan happoja neutralointivaiheeseen ja saostamiseen. Proteiiniketjun runko rikkoutuu emäksien ja korkeiden käsittelylämpötilojen takia. Sidoksien hajoaminen voi myös aiheuttaa pahanhajuisen emäksisen sulfidin hajun. [11] Näiden syiden vuoksi emäshydrolyysiä ei voida käyttää kaupallisella tasolla kovin laajasti.

4.1.4 Sulfitolyysi

Sulfitolyysissä keratiiniproteiinien rikkiryhmiin lisätään sulfiitteja, joiden tarkoituksena on katkoa ketjujen välisiä disulfidisidoksia ja estää niiden muodostumisen [22]. Disulfidisidokset hajoavat kysteiinitioliksi ja kysteiini-S-sulfonaattianioniksi. Yleisiä sulfiitteja, joita sulfitolyysissä on käytetty ovat natriumsulfaatti, bisulfiitti ja disulfiitti [11]. Parametrejä, joiden avulla sulfitolyysin saantoon voidaan vaikuttaa ovat lämpötila, pH, käsittelyaika sekä käytetyn sulfiitin pitoisuus. [21] Sulfitolyysiä käytetään pääosin villakeratiinin uuttamisessa [11].

Sulfitolyysiprosessissa voidaan käyttää apuna myös denaturoivia aineita, kuten ureaa tai pinta-aktiivisia aineita, kuten natriumdodekyylisulfaattia (SDS) lisäämään keratiinin liukoisuutta. Näillä saantoa voidaan parantaa. [21] Jos apuaineita ei käytetä, sulfitolyysireaktio ei välttämättä tapahdu kokonaan loppuun asti, sillä sulfitolyysi on reaktiona palautuva. Apuaineiden avulla disulfidisidokset katkeavat melkein kokonaan. Eräässä tutkimuksessa uutettiin keratiinia pelkän natriumsulfidin avulla ja verrattiin tätä uuttoon, jossa natriumsulfidin kanssa käytettiin ureaa ja SDS:ää. Pelkän natriumsulfidin avulla keratiinin liukenemisen saanto oli 62 % vuorokauden aikana, mutta urean ja SDS:n avulla tulos parani ja uuttonopeus kasvoi. [11]

Tutkimuksien perusteella on huomattu, että käytetyn sulfiitin konsentraatio on kriittinen tekijä saannon kannalta. Eräässä tutkimuksessa käytettiin 0,2 molaarista natriummetabisulfiittia, jolloin saannoksi saatiin 87,6 % pH:n ollessa 6,5. Pitoisuuden noston seurauksena saanto ja molekyylipaino pienenivät keratiinirakenteen hajoamisen takia. Tutkimuksessa päädyttiin 0,2–0,3 molaarisen natriummetabisulfiitin olevan optimaalinen, kun keratiinia uutetaan sulfitolyysillä. Pitoisuus voi vaikuttaa myös liuoksen pH-arvoon. On huomattu, että dinatriumsulfaattiliuos nostaa mahdollisesti pH:n jopa arvoon 14. Liian korkea pH voi rikkoa proteiinirakenteen runkoa. Korkea pitoisuus voi siis johtaa pH-arvon nousuun, jolloin rakenne hajoaa. [11]

Tutkimuksen mukaan sulfitolyysi oli tehokkain menetelmä, kun sitä verrattiin pelkistämiseen, hapettamiseen ja hydrolyysiin samanlaisissa tutkimusolosuhteissa uutettaessa lampaanvillaa. Sulfitolyysillä saatiin myös suurin saanto ja se on näistä menetelmistä vaarattomin. Vaarattomuus johtuu menetelmässä käytettyjen sulfiittien vähäisestä myrkyllisyydestä verrattuna muiden menetelmien kemikaaleihin. Lisäksi sulfiitit ovat edullisempia. [21]

4.1.5 Ioniliuokset

Ioniliuokset koostuvat orgaanisista suurikokoisista kationeista ja orgaanisista tai epäorgaanisista anioneista. Erilaisia anioneita, joita ioniliuoksissa on käytetty ovat booritetrafluoridit, bromi-ionit, heksafluorofosfaatit ja erilaiset kloridi-ionit. Näistä tutkimuksien mukaan kloridia sisältävät ioniliuokset ovat tehokkaimpia. [10] Ioniliuosten tavoitteena on katkoa vetysidoksia keratiiniproteiinien välillä, mikä onnistuu liuosten korkean polaarisuuden ansiosta. Polaarisuuden kasvaessa myös keratiinin saanto kasvaa lisääntyneen liukoisuuden ansiosta [11]. Ioniliuoksissa on käytetty lisänä natriumsulfaattia apuna katkomaan keratiinirakenteen disulfidisidoksia. Tämä edistää keratiinin liukenemista ioniliuokseen. [24] Ioniliuoksien käyttö on tutkimuksien mukaan yksi miedoimmista kemiallisista menetelmistä keratiinin uutossa [25].

Ioniliuoksilla on monia hyviä puolia. Niillä on korkeat sulamis- ja kiehumispisteet, hyvä lämpö- ja kemiallinen stabiilisuus, sekä alhainen höyrynpaine. Lisäksi ne ovat kierrätettäviä, syttymättömiä, sekä niillä on korkea ionijohtavuus. Ioniliuokset toimivat myös vihreinä liuottimina muun muassa katalysaattoreissa. [10] Lämpötilan nosto laskee liuoksen viskositeettia, mikä edistää ionien kulkeutumista liuoksessa. Tästä syystä keratiinin liukeneminen nopeutuu. Liian korkea lämpötila kuitenkin rikkoo keratiiniproteiinin rakennetta ja tuhoaa joitain aminohappoja, kuten kysteiiniä. [11] Ioniliuoksien käyttöön liittyy myös haittapuolia. Prosessissa lämpötilan säätelyn tulee olla tarkkaa ja raaka-aineen lisäys tulee tehdä pieni määrä kerrallaan. Liuotus tulee myös tehdä inertissä ympäristössä, esimerkiksi typen läsnä ollessa. Prosessista saatu keratiini ei myöskään ole vesiliukoista. [11] Liuottamisen jälkeen keratiini tulee saostaa liuoksesta esimerkiksi veden, metanolin tai etanolin avulla [2].

Tutkimuksissa on määritetty optimaaliset olosuhteet keratiinin uuttoon erityisesti höyhenistä. Liuotus suoritetaan 90 °C lämpötilassa ja prosessin kesto on 60 minuuttia. Ioni-

liuoksessa tulee olla 20 painoprosenttia vettä ja 10 painoprosenttia natriumsulfiittia nestemäisessä muodossa. Nesteen ja höyhenien painosuhde on 20. Näillä olosuhteilla höyheniä liukeni 96,7 %, josta saatiin 75,1 % keratiinin saanto. [24]

4.2 Fysikaaliset menetelmät

4.2.1 Höyryräjäytys

Perusmekanismina höyryräjäytyksessä (SE) on altistaa uutettava materiaali korkean paineen omaavalle kyllästetylle höyrylle jaksoissa 1–10 minuutin ajan suljetussa tilassa. Lämpötila on välillä 180–230 °C. [6] Höyry kulkeutuu materiaalin rakenteen sisään ja prosessin loppuvaiheessa paine lasketaan vastaamaan ilmanpainetta, minkä seurauksena aiheutuu räjähdystä vastaava hajoaminen ja materiaalin rakenteellinen repeäminen [21]. Parametrit, jotka vaikuttavat prosessin saantoon ovat lämpötila, prosessin kesto, hiukkaskoko ja kosteuspitoisuus prosessin aikana [10]. Höyryräjäytysmenetelmän tavoitteena on katkoa keratiinirakenteen vety- ja disulfidisidoksia.

Prosessin etuina ovat matalat kustannukset sekä lyhyet käsittelyajat. Tästä seuraa vähäinen energiankulutus. Verrattuna muihin uuttomenetelmiin, höyryräjäytyksessä ei käytetä kovia kemiallisia olosuhteita, minkä ansiosta ympäristöhaitat ovat vähäiset. Koska kemikaaleja ei käytetä, ei myöskään synny kemikaalijäämiä keratiiniin. [26] Prosessin haittapuolet ovat kuitenkin merkittäviä. Tutkimuksien mukaan liian korkea paine johtaa siihen, että disulfidisidokset vaurioituvat, mutta eivät välttämättä katkea. Paineen nosto aiheuttaa myös kiteisyyden pienenemistä sekä suurta kysteiinipitoisuuden alenemista. Nämä tekijät yhdessä aiheuttavat sen, että saanto ei ole laadukasta. [21] Myös korkea lämpötila aiheuttaa proteiiniketjun vaurioitumista. Yleisesti tätä menetelmää käytetäänkin enemmän esikäsittelymenetelmänä, jota seuraa jokin toinen käsittely, esimerkiksi happo- tai emäshydrolyysi. Esikäsittelyn avulla voidaan parantaa saantoa sitä seuraavassa käsittelyssä. [26]

Höyryräjäytyksestä on kehitetty lisäksi edistyneempi muoto, höyryvälähdysräjäytystekniikka (SFE), jota käytetään myös esikäsittelymenetelmänä. Höyryvälähdysräjäytyksen avulla prosessin käsittelyaikaa ja lämpötilaa voidaan alentaa. Lisäksi menetelmän avulla keratiinimateriaalin liukeneminen on tehokkaampaa veteen ja muihin liuottimiin. Myös tässä menetelmässä haittapuolena on kysteiinipitoisuuden suuri aleneminen. [10] Eräässä tutkimuksessa höyryvälähdysräjäytyksellä esikäsiteltyä höyhenkeratiinia uutettiin emäshydrolyysillä, jolloin keratiinin saannoksi saatiin 42,78 % [27]. Toinen muoto

perinteisestä höyryräjäytyksestä on suuritiheyksinen höyryräjäytys (HDSF), jonka merkittävin ero perinteiseen höyryräjäytykseen on kineettisen energian synty prosessissa eikä termokemiallinen reaktio, joka syntyy perinteisessä prosessissa [28]. Tämän menetelmän avulla rakenteessa olevat disulfidisidokset saadaan katkeamaan vaurioitumatta, minkä ansiosta uuton saannosta saadaan suurempi [29].

4.2.2 Ylikuumennetun veden käyttö

Ylikuumennetulla vedellä viitataan tilaan, jossa vesi kuumennetaan yli sen kiehumispisteen (100°C) ja pidetään alle 374°C, joka on veden kriittinen piste. Paine pidetään tietyssä arvossa prosessin ajan. Vesi on prosessissa nestemäisessä olomuodossa. Näissä olosuhteissa veden polaarisuus alenee, minkä vuoksi sitä voidaan käyttää uuttoliuottimena esimerkiksi keratiinin uuttoprosessissa. Verrattaessa ylikuumennetun veden käyttöä muihin uuttomenetelmiin, sen on todettu olevan taloudellisempi, tehokkaampi ja puhtaampi menetelmä. Lisäksi menetelmä on ympäristöystävällinen eikä sisällä myrkyllisiä kemikaaleja. [30] Saantoon vaikuttavia tekijöitä ovat lämpötila, prosessin kesto ja keratiinimateriaalin suhde liuottimeen. [31]

Kun keratiinia uutetaan ylikuumennetun veden avulla, tapahtuu keratiinin hajoamista oligopeptideiksi. Eräässä tutkimuksessa villakeratiinia uutettiin ylikuumennetulla vedellä 170°C lämpötilassa, 7 baarin paineessa tunnin ajan ja tuloksena oli, että villakuidut liukenivat veteen melkein kokonaan. Toisessa tutkimuksessa tehdyn vertailun perusteella ylikuumennetun veden käytöllä saatiin yhtä suuri saanto kuin kemiallisilla menetelmillä, kuten hapetuksella. [21] Merkittävänä haittapuolena menetelmässä on se, että korkeiden lämpötilojen takia jotkin aminohapot hajoavat sekä lisäksi saatujen peptidimolekyylien moolimassa alenee. [31]

Eräässä tutkimuksessa ylikuumennetun veden käyttö yhdistettiin ultrasuodatukseen, minkä avulla pyrittiin tehokkaampaan epäpuhtauksien poistoon ja keratiinihydrolysaatin saantiin. Lämpökäsittely tehtiin kahdessa vaiheessa. Ensimmäisen vaiheen tavoitteena oli rikkoa keratiinirakenteen vetysidoksia 140°C lämpötilassa. Toisessa vaiheessa lämpötilaa nostettiin, jolla pyrittiin disulfidisidoksien katkaisemiseen ja keratiinin liukenemiseen. Tuloksena oli parempi saanto, kuin pelkän ylikuumennetun veden käytössä. Saanto oli myös vastaava muihin kemiallisiin menetelmiin verrattaessa. [21]

4.2.3 Mikroaaltosäteilytys

Mikroaaltosäteilytyksessä uutettavaan materiaaliin kohdistetaan mikroaaltosäteilyä, joka saa aikaan sen, että materiaalin molekyylit adsorboivat itseensä energiaa säteilystä. Tämä johtaa massan tai liuoksen nopeaan lämpötilan nousuun. Tällöin uuttoon tarvittava aktivointienergia on pienempi. Kuumenemiseen tarvittava aika on vain sekuntien murto-osa, mikä tekee uuttomenetelmästä tehokkaan ja nopean. [6] Menetelmän tavoitteena on säteilyn avulla lämmittää ainoastaan liuotinta ja siihen liuennutta ainetta, jolloin prosessointiaika lyhenee ja lämpö kulkeutuu tasaisesti materiaaliin. Mikroaaltojen taajuus on välillä 0,3-300 gigahertsiä ja aallonpituus on 1mm-1m [32].

Eräässä tutkimuksessa keratiinia uutettiin mikroaaltosäteilyllä, jonka teho oli 150–570 wattia lämpötilassa 180°C. Prosessin kesto oli 7 minuuttia, ja saannoksi saatiin n. 60 %. [10] Mikroaaltosäteilytystä käytetään myös apuna muissa menetelmissä, koska se nopeuttaa prosessia ja tehostaa sitä. Mikroaaltosäteilytystä on käytetty muun muassa ylikuumennetun veden kanssa 180 °C lämpötilassa 30 minuutin ajan, jolloin saannoksi saatiin 31% [6]. Tutkimuksen mukaan myös mikroaaltosäteilytyksen käyttö emäshydrolyysin apuna on tuottanut 26 mg/ml keratiinin saannon [21].

Mikroaaltosäteilytyksessä on monia etuja. Säteilyn avulla prosessi tapahtuu nopeasti, ja materiaalin lämmitys on tehokasta. Tutkimuksien mukaan verrattaessa mikroaaltosäteilytystä muihin perinteisiin lämmitysmenetelmiin, kemialliset reaktiot tapahtuvat jopa 1000 kertaa nopeammin. Mikroaaltosäteilytyksen avulla on mahdollista saada suurempi saanto, ja saannossa ei ole suuria määriä reaktion sivutuotteita. Tämä johtaa puhtaampaan tulokseen. Saanto voi olla jopa niin puhdasta, että erillistä puhdistusta ei tarvita. Koska mikroaaltosäteilytyksessä lämmitetään ainoastaan materiaalia, eikä laitetta, energiasäästöt ovat merkittäviä. Mikroaaltosäteilytys on myös mahdollista tehdä kokonaan ilman liuottimia, minkä takia prosessista ei synny jätettä liuottimien suhteen. [32] Menetelmässä on myös haittapuolia. Merkittävimpänä haittapuolena on joidenkin aminohappojen hajoaminen säteilytyksen ja korkean käsittelylämpötilan takia. Eräässä tutkimuksessa villakeratiinin kysteiinipitoisuus putosi 9,4 mooliprosentista 0,5 mooliprosenttiin 90 minuutin käsittelyssä. [10]

4.3 Biologiset menetelmät

Biologisiin menetelmiin kuuluvat mikrobiset ja entsymaattiset menetelmät. Niissä käytetään keratinaaseja, joiden tuotannosta vastaa erilaiset bakteerit ja mikro-organismit. Keratinaasien eli mikrobiproteaasien tehtävänä on hydrolysoida keratiinia ja toimia katalyyttinä hajoamisreaktioissa. [10] Reaktion seurauksena keratiini hajoaa vesiliukoisiksi peptideiksi ja aminohapoiksi [21]. Erilaisia mikro-organismeja keratiinin uuttamiseen on tutkittu laajasti, mutta tehokkaimmiksi on todettu keratinofiiliset sienet ja aktinomykeetit, joilla on kyky hajottaa keratiini kokonaisuudessaan. Tutkimuksissa on myös löydetty tiettyjä bakteerilajeja, jotka hajottavat joko α- tai β-keratiinia. [10] Ei ole kuitenkaan mahdollista uuttaa keratiinia kokonaan tällä menetelmällä, koska muuten keratiiniproteiini hajoaisi [11]. Hydrolysaation reaktiotuotteiden ominaisuuksiin on mahdollista vaikuttaa entsyymien valinnalla, prosessiajan säätelyllä, lämpötilan ja pH:n optimoinnilla sekä vaihtelemalla entsyymin ja keratiinin suhdetta [28].

Keratiinien hajoamista mikrobien ja entsyymien avulla kutsutaan keratinolyysiksi [11]. Hajoaminen tapahtuu kahdessa vaiheessa, joista ensimmäinen on sulfitolyysi ja toinen on proteolyysi. Ensimmäisessä vaiheessa keratiinirakenteen disulfidisidokset katkotaan reduktaasientsyymin avulla ja tioliryhmä vapautuu. Toisen vaiheen aikana proteaasientsyymi hajottaa keratiinin, minkä seurauksena keratiini hajoaa peptideiksi ja aminohapoiksi. [21] Eräässä tutkimuksessa käytetiin seosta, jossa oli bakteereja 16 eri sienikannasta, jolloin peptidimolekyylien liukenemistulokseksi saatiin 50 % 21 vuorokauden jälkeen [10].

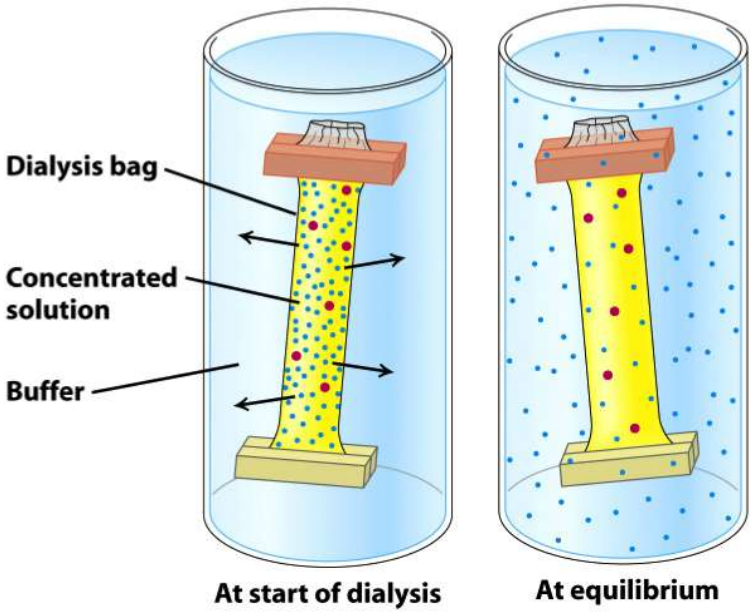
Mikrobisten ja entsymaattisten menetelmien on todettu olevan taloudellisin menetelmä hajottamaan keratiineja verrattaessa muihin menetelmiin [22]. Entsyymien käyttö on ympäristöystävällistä ja turvallista, sillä prosessi on mahdollista suorittaa ilman kemikaaleja, miedoissa reaktio-olosuhteissa. Prosessi ei myöskään aiheuta keratiiniproteiinin rungolle vaurioita. [11] Haittapuolina entsymaattisissa prosesseissa on entsyymien korkea hinta ja pitkä prosessiaika, minkä takia niitä ei käytetä laajalti teollisuudessa [29].

5. PUHDISTUSMENETELMÄT

Uutto- ja liuotusmenetelmien tuloksena saatu keratiini tulee puhdistaa, jotta se saadaan eroteltua muista komponenteista, kuten epäpuhtauksista [33]. Näin pystytään ylläpitämään keratiinin laatu, jotta sen käyttö erilaisissa sovelluksissa on mahdollista. Lääketieteessä käytettävillä luonnonpolymeereillä on tarkat puhtaus- ja laatuvaatimukset, joiden avulla varmistetaan materiaalien ja tuotteiden turvallisuus, tehokkuus, laatu ja johdonmukaisuus. Puhdistusmenetelmien tavoitteena on säilyttää proteiinimateriaalin oma rakenne ja toiminnallisuus. [34] Proteiinien kohdalla puhdistusmenetelmät pohjautuvat fraktiointitekniikoihin, joissa erottelu perustuu komponenttien liukoisuus- ja kokoeroihin, varaukseen sekä sitoutumiskykyyn. Yleisiä menetelmiä proteiinien puhdistukseen ovat dialyysi, ultrasuodatus, saostus, kromatografiset menetelmät, sentrifugointi sekä elektroforeesi. [35] Usein käytössä on useampi menetelmä, jotta päästään haluttuun puhtaustasoon.

5.1 Dialyysi

Dialyysimenetelmä perustuu molekyylien diffuusioon puoliläpäisevän kalvon läpi. Diffuusiolla tarkoitetaan molekyylien siirtymistä liuoksessa suuremmasta pitoisuudesta pienempään. Dialyysissä puhdistettava materiaaliliuos suljetaan dialyysikalvon- tai pussin sisään, joka upotetaan puskuriin tai liuokseen. [36] Periaatteena on, että pienet molekyylit pystyvät kulkeutumaan kalvon läpi, mutta suuret molekyylit, kuten keratiiniproteiinit eivät [37]. Pieniä molekyylejä ovat muun muassa suolat tai muut epäpuhtaudet [38]. Prosessi jatkuu, kunnes tasapaino pitoisuuksissa on saavutettu [36]. Kuvassa 4 esitetään dialyysimenetelmän periaate.



Kuva 4. Dialyysiprosessi alussa sekä tasapainotilassa [35]

Dialyysiprosessin tuloksiin vaikuttaa diffuusion tehokkuus. Siihen vaikuttavia tekijöitä ovat lämpötila, proteiiniliuoksen konsentraatio sekä moolimassa, sekä dialyysikalvon pinta-ala ja paksuus. Lämpötilan nosto ja suurempi konsentraatio edistävät diffuusiota, kun taas moolimassan kasvu hidastaa diffuusiota, sillä molekyylien on vaikeampi liikkua. [36] Dialyysin jälkeen proteiinin puhdistukseen käytetään usein jotain toista menetelmää lisäksi, sillä yksin dialyysillä ei välttämättä saavuteta riittävää puhtausastetta [37].

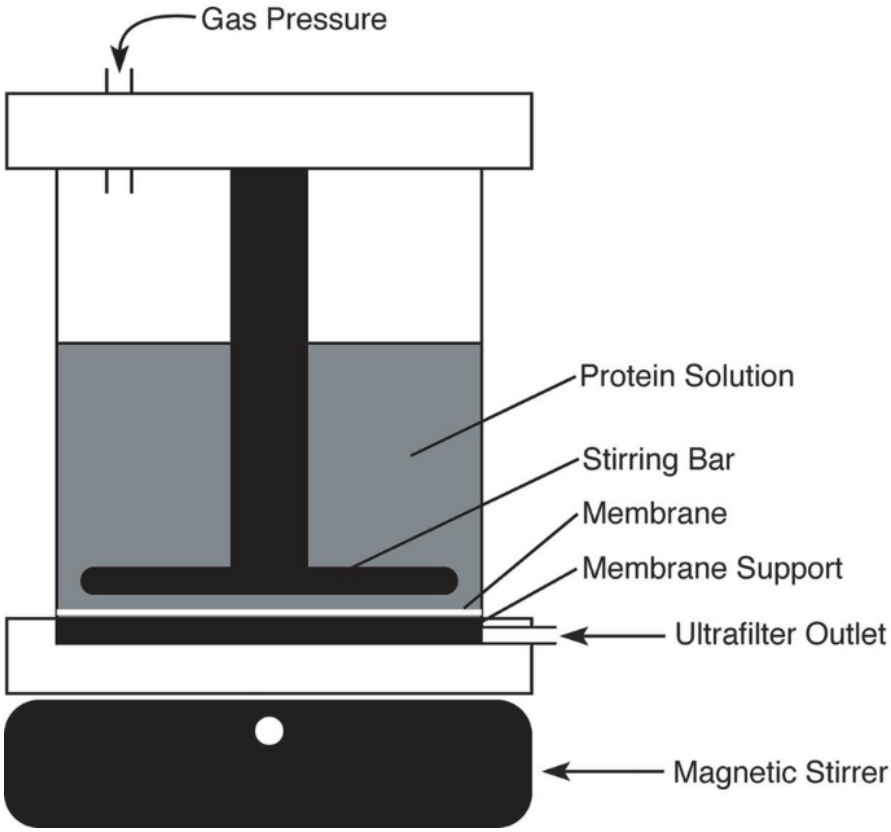
Dialyysiprosessissa käytetyt dialyysikalvot- tai pussit on yleensä valmistettu regeneroidusta selluloosasta tai selluloosaesteristä [36]. Puskuria tai liuosta tulee olla prosessissa jopa 500–1000-kertainen määrä puhdistettavaan materiaaliliuokseen verrattuna. Pienien molekyylien diffuusion lisäksi, puskuri tai käytetty liuos diffundoituu kalvon sisälle. [38] Etuina dialyysimenetelmässä on sen hellävaraisuus ja tehokkuus [34], mutta myös yksinkertaisuus [38]. Menetelmä ei vaurioita itse proteiinia [34]. Haittapuolina dialyysissä on sen hitaus, sillä puhdistusprosessi kestää vähintään 12 tuntia. Prosessin aikana käytetty puskuri tai muu liuos tulee myös vaihtaa vähintään kerran puhdistuksen aikana, jotta kaikki mahdolliset epäpuhtaudet saadaan poistettua. [38]

5.2 Ultrasuodatus

Ultrasuodatus perustuu molekyylien liikkeeseen puoliläpäisevän kalvon läpi paineen tai keskipakovoiman vaikutuksesta molekyylien kokoerojen perusteella [37]. Jotta ultra-

suodatus voidaan tehdä, liuoksen molekyylien kokoero tulee olla vähintään yhtä kertaluokkaa erikokoisia sekä molekyylipainon tulee olla välillä 1–1000 kilodaltonia [39]. Ultrasuodatusta voidaan käyttää sekä liuoksen puhdistamiseen, mutta myös suodattamatta jääneen liuoksen talteenottoon [39]. Kuten dialyysinkin kohdalla, ultrasuodatuksen jälkeen tehdään usein jokin toinen puhdistuskäsittely halutun puhtausasteen saamiseksi [40].

Menetelmässä puhdistettava proteiiniliuos asetetaan suodatusyksikköön, johon kohdistetaan paine. Sekoituksen aikana liuos suodattuu kalvon läpi paineen vaikutuksesta, jolloin liuokseen jää ainoastaan siihen liuenneet proteiinit. Suodattuneet molekyylit ovat kokoluokaltaan pienempiä kuin kalvon huokoskoko. [38] Kuvassa 5 on esitetty ultrasuodatuksen suodatusyksikkö. Kuvassa oleva ”ultrafilter outlet” kuvaa laitteen osaa, johon suodattuneet molekyylit päätyvät. Erona dialyysiin on se, että ajavana voimana ei ole konsentraatioero kalvon eri puolilla, vaan paine [39]. Ultrasuodatuksessa käytettävät kalvot ovat hydrofobisia, eli ne hylkivät vettä. Kalvoja valmistetaan muun muassa polysulfonista sekä polyeetterisulfonista. [37]



Kuva 5. Ultrasuodatusyksikkö [38]

Ultrasuodatusprosessia on mahdollista nopeuttaa muun muassa lämpötilan nostolla. Lämpötilan nosto tehostaa diffuusiota ja alentaa viskositeettia. Myös pH:n säätely vaikuttaa prosessiin, mutta se vaikuttaa proteiinin rakenteeseen eikä nopeuteen. [40] Kun saavutetaan pH:n suhteen isoelektrinen piste, eli pH-arvo, jossa proteiinilla ei ole nettovarausta liuoksessa [38], joissain tilanteissa proteiini saattaa saostua. Tämä heikentää virtausta liuoksessa. [40]

Etuna ultrasuodatuksessa on dialyysin tapaan menetelmän hellävaraisuus. Muita etuja ovat tehokkuus sekä se, että prosessissa on mahdollista sekä konsentroida että poistaa suoloja liuoksista. [37] Suurin etu ultrasuodatuksessa verrattuna muihin menetelmiin on suuri tuotteiden läpimeno kalvon läpi, mikä viittaa tehokkuuteen [41]. Dialyysiin verrattuna ultrasuodatus on nopeampi menetelmä [38].

5.3 Saostaminen

Saostamismenetelmien periaatteena on lisätä proteiiniliuoksen joukkoon jotain reagenssia tai muuttaa prosessiparametrejä, jolloin proteiini saostuu kiinteäksi ja se voidaan erotella liuoksesta. Menetelmä perustuu proteiinien liukoisuuteen. [42] Saostamismenetelmät voidaan jakaa isoelektriseen saostamiseen, orgaanisella liuottimella saostamiseen sekä suolausmenetelmään [37].

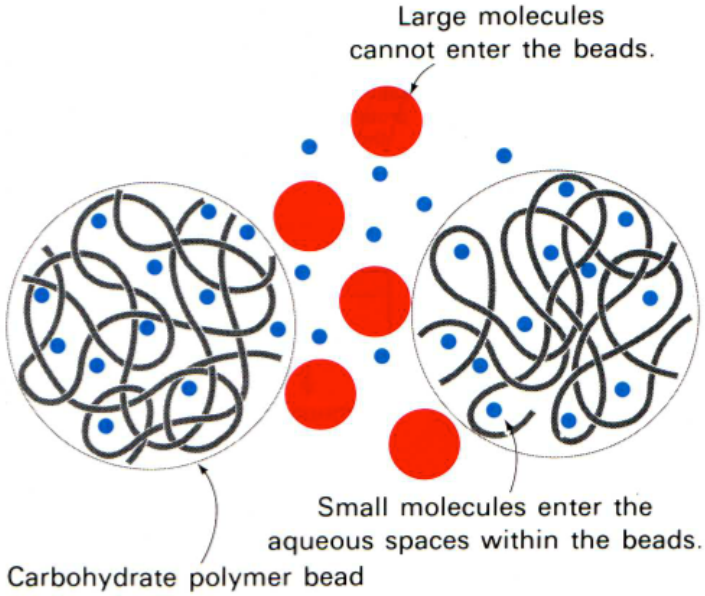
Isoelektrisessä saostamisessa proteiinien erottelu liuoksesta tapahtuu isoelektrisessä pisteessä, eli siinä pH-arvossa, jossa proteiinien liukoisuus on alhaisin [37], ja proteiinilla ei ole nettovarausta liuoksessa. Kyseisessä pisteessä proteiinimolekyylien välillä ei ole varauksista johtuvaa hylkimistä, jolloin ne yhdistyvät ja muodostavat saostuman. Merkittävin parametri, joka vaikuttaa isoelektriseen saostamiseen on pH-arvo. [38] Orgaanisia liuottimia, kuten etanolia tai asetonia, lisätään vesiliuoksiin, jolloin liuoksen dielektrisyysvakio alenee. Tällöin proteiinit eivät liukene enää yhtä hyvin liuoksessa, ja tapahtuu saostumista. [42] Liuoksen lämpötila kohoaa sekoitettaessa vettä ja orgaanista liuotinta keskenään, joten prosessi suoritetaan 0°C alapuolella, jotta proteiinit eivät tuhoudu. Suolausmenetelmässä proteiiniliuokseen lisätään suoloja, kuten ammoniumsulfaattia. [38] Suolan pitoisuutta liuoksessa nostetaan asteittain, jolloin proteiinit, joiden liukoisuus on matalampi saostuvat. Parametrejä, joilla voidaan vaikuttaa suolausmenetelmän tuloksiin ovat käytetty suola ja sen konsentraatio liuoksessa. [34]

Saostusmenetelmien etuina on niiden edullisuus ja yksinkertaisuus. Tuloksena saatujen proteiinisaostumien on tutkimuksien mukaan myös todettu säilyvän stabiilissa muodossa, kun niitä on varastoitu pitkään. Haittapuolena on prosessiparametrien, kuten pH:n ja lämpötilan säätely riittävän tarkasti, jotta saostuma voi muodostua. Myös proteiinin ja liuottimen sekä saostusaineen ominaisuudet vaikuttavat saostuman muodostumiseen. [42]

5.4 Kromatografiset menetelmät

Kromatografisia menetelmiä käytetään usein jonkin muun puhdistusmenetelmän jälkeen [37]. Kromatografia muodostuu kahdesta faasista, liikkuvasta sekä liikkumattomasta, eli stationäärisestä faasista. Liikkuva faasi muodostuu nestemäisestä tai kaasumaisesta komponentista. Liikkumaton faasi muodostuu kiinteästä aineesta, joka on usein rakenteeltaan huokoinen tai nestekerroksesta, jota kiinteä kantaja-aine on adsorboinut. Periaatteena menetelmässä on, että liikkuva faasi pyrkii erottamaan halutut komponentit liikkumattomasta faasista. Kromatografiset menetelmät on mahdollista jakaa pylväskromatografiaan ja ohutkerroskromatografiaan niiden toteutustavan perusteella. [43] Yleisimmät kromatografiset menetelmät proteiinien puhdistukseen ovat geelisuodatus-, ioninvaihto-, sekä affiniteettikromatografia [35] [38].

Geelisuodatuskromatografia perustuu molekyylien kokoeroihin, ja se suoritetaan pylväsmäisessä matriisissa. Matriisissa on huokoisia polymeeristä valmistettuja palloja, jotka ottavat sisäänsä pieniä molekyylejä, jolloin suuret molekyylit, kuten keratiinimolekyylit, kulkeutuvat matriisissa nopeammin. [43] Kuvassa 6 on esitetty, miten pienet molekyylit (siniset) kulkeutuvat polymeeripallojen sisään, mutta suuret molekyylit (punaiset), eivät pysty kulkeutumaan pallojen sisään, jolloin ne suodattuvat ensin.



Kuva 6. Geelisuodatuskromatografian periaate [35]

Ioninvaihtokromatografia perustuu molekyylien varauksiin, sekä sähköstaattisiin voimiin rakenteessa [44], ja se suoritetaan pylväsmäisessä matriisissa [43]. Prosessin alussa puhdistettava keratiiniliuos laitetaan kulkemaan matriisin läpi, jolloin proteiinit adsorboituvat kiinteään tukimateriaaliin, jota kutsutaan ioninvaihtimeksi. Muut molekyylit eivät imeydy ja kulkeutuvat pois liuoksesta. [38] Lopulta imeytyneet keratiiniproteiinit vapautetaan muuttamalla liuoksen pH-arvoa tai ionipitoisuutta [43].

Affiniteettikromatografia suoritetaan aiempien kromatografimenetelmien tapaan pylväsmatriisissa [43]. Matriisin joukossa on ligandiryhmiä, jotka ovat sitoutuneet kovalenttisesti matriisin rakenteeseen [38]. Affiniteetilla tarkoitetaan molekyylien kykyä reagoida toistensa kanssa ja muodostaa komplekseja [45], ja tässä menetelmässä se viittaa puhdistettavien keratiiniproteiinien kykyyn reagoida ligandien kanssa ja kiinnittyä niihin. Molekyylit, jotka eivät kiinnity ligandeihin poistuvat matriisista, jolloin jäljelle jää vain keratiiniproteiinimolekyylit. [44] Proteiinit irrotetaan ligandeista vähentämällä affiniteettia niiden välillä, joko säätämällä pH-arvoa tai lämpötilaa, tai lisäämällä suolan tai ligandin pitoisuutta [38].

5.5 Sentrifugointi

Sentrifugointi perustuu liuoksessa olevien molekyylien koko-, muoto- ja tiheyseroihin ja se suoritetaan keskipakovoiman avulla. Sentrifugointilaitetta pyöritetään kiinteän akselin ympäri ja siihen kohdistetaan keskipakovoima, joka on kohtisuorassa akselia vastaan.

Vaikuttavana voimana on keskipakovoiman lisäksi painovoima, jonka vaikutuksesta massaltaan erisuuruiset molekyylit painuvat liuoksen pohjalle eri aikoina. Liuoksessa olevat tiheydeltään suuremmat molekyylit kulkeutuvat pyörimisakselista poispäin kohti laitteen reunoja, kun taas tiheydeltään pienemmät molekyylit kulkeutuvat akselia kohti. [46] Sentrifugointi voidaan jakaa eri menetelmiin, joissa erottelu perustuu molekyylien eri ominaisuuksiin, kuten tiheyteen. Menetelmiä ovat suurnopeussentrifugointi, differentiaalinen sentrifugointi, gradienttisentrifugointi sekä isopykninen sentrifugointi. [34]

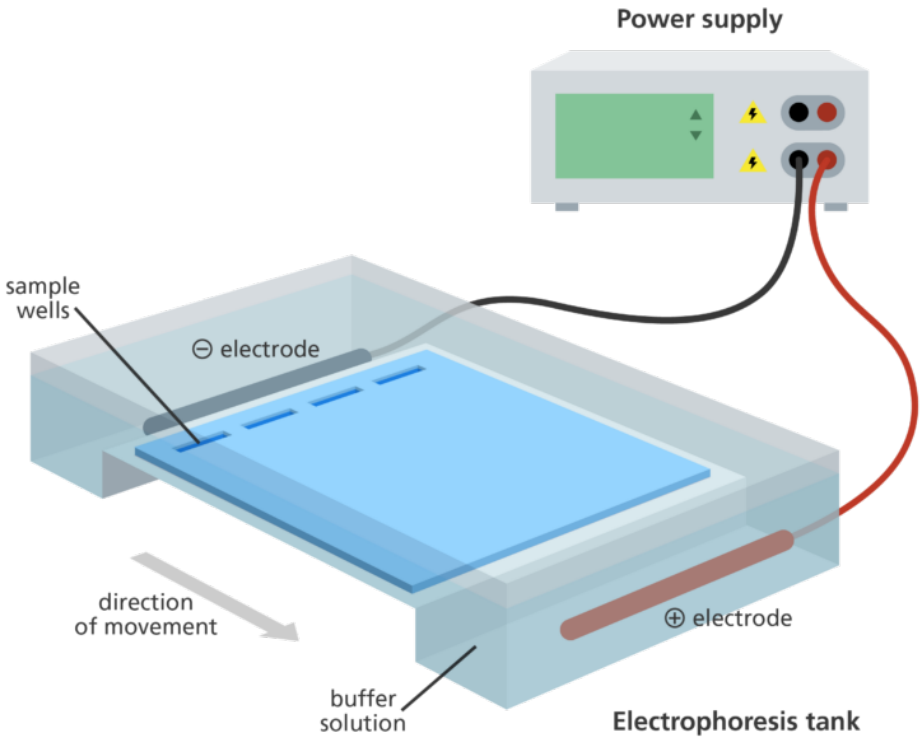
Molekyylien kulkeutumiseen ja laskeutumiseen voimien vaikutuksesta vaikuttaa moni tekijä. Laskeutumisnopeuteen vaikuttaa sekä molekyylien koko että tiheysero molekyylien ja liuoksen välillä. Kun viskositeetti, eli liuoksen virtausta vastustava voima, kasvaa niin laskeutumisnopeus pienenee. Kun taas painovoiman vaikutus kasvaa, myös molekyylien laskeutumisnopeus kasvaa. Myös pyörimisnopeus vaikuttaa tehokkuuteen, sillä nopeuden nostaminen kaksinkertaiseksi nostaa keskipakovoiman vaikutuksen nelinkertaiseksi. Keskipakovoima suurenee myös silloin, kun etäisyys keskiakselin ja laitteen reunojen välillä kasvaa. [47] Haasteita prosessissa ovat pienet aggregaattipartikkelikoot sekä saostuman vesipitoisuus ja kokoonpuristuvuus. Jotta nämä haasteet voidaan ylittää, prosessissa tarvitaan korkeita sentrifugivoimia. [42]

Menetelmässä etuna on nopeus. Laitteen nopean pyörimisen ansiosta molekyylien erottelu tapahtuu tehokkaammin kuin pelkän painovoiman vaikutuksesta. Nopeus voi olla jopa 500–20000 kierrosta minuutissa. Etuina on myös turvallisuus ja monipuolisuus. Laitteella on mahdollista erotella erilaisia näytteitä, kuten proteiiniliuoksia, ja konsentroida näytteitä sekä suodattaa ja huuhdella näyteliuoksia. Sentrifugoinnissa on myös haittapuolia. Menetelmä aiheuttaa korkeita kustannuksia, sillä sentrifugointilaite itsessään on kallis. [48] Itse prosessin suorittaminen on kuitenkin edullista. Haittapuolena on suuri energiankulutus, sekä vaikeus erotella kevyitä hiukkasia toisistaan. [49]

5.6 Elektroforeesi

Elektroforeesi perustuu varattujen molekyylien liikkeeseen liuoksessa sähkökentässä. Erottelu tapahtuu nopeuserojen perusteella. [37] Menetelmässä kationit, eli positiivisesti varautuneet molekyylit kulkeutuvat katodille, eli negatiiviselle navalle ja vastaavasti anionit, eli negatiivisesti varautuneet molekyylit kulkeutuvat anodille eli positiiviselle navalle [50]. Proteiinien puhdistuksessa yleisesti käytetty elektroforeesimenetelmä on vyöhykeelektroforeesi. Menetelmässä proteiini erottuu kaistoiksi niiden kuljettua kiinteän polymeerigeelin läpi puskuriliuoksessa. Geeli on usein valmistettu polyakryyliamidista. [38]

Elektroforeesilaitteeseen kuuluu kaksi puskuriliuossäiliötä sekä polymeerigeelimatriisi. Lisäksi tarvitaan virtalähde, joka tuottaa laitteeseen halutun sähkökentän. Puskuriliuoksen avulla muokataan liuoksen pH-arvoa, ja johdetaan sähkövirta geeliin. [38] Kuvassa 7 on esitetty elektroforeesilaite. Laitteessa proteiinit kulkeutuvat negatiiviselta elektrodilta positiiviselle elektrodille eri nopeuksilla. Proteiiniliuoksen joukkoon lisätään väriainetta, jonka avulla on mahdollista seurata proteiinien kulkeutumista liuoksessa ja geelin sisällä, sekä varmistaa proteiinien erottuminen [38]. Prosessi voidaan suorittaa sekä horisontaali- että vertikaalisuunnassa [50].



Kuva 7. Elektroforeesilaite [51]

Proteiinien varautuminen negatiivisesti tai positiivisesti riippuu liuoksen pH-arvosta, sekä proteiinin isoelektrisestä pisteestä. Varautuminen määräytyy sen mukaan, onko liuoksen pH-arvo yli vai alle proteiinin isoelektrisen pisteen. Negatiivinen varaus muodostuu, kun pH-arvo ylittää isoelektrisen pisteen, ja vastaavasti positiivinen varaus muodostuu, kun pH on alle isoelektrisen pisteen. [38] Molekyylien nopeuteen vaikuttaa se, kuinka suuri ero pH-arvon ja isoelektrisen pisteen välillä on [37]. Menetelmään vaikuttaa myös muut tekijät. Sähkökentän jännite sekä varauksen suuruus vaikuttavat siihen, kuinka suuri siirtymä proteiinilla on sähkökentässä. Siirtymä on sitä suurempi, mitä suuremmat kyseiset parametrit ovat. Proteiinimolekyylin ominaisuudet, kuten koko ja muoto, vaikuttavat mat-

kaan, jonka proteiini kulkee polymeerigeelissä. Mitä suurempi molekyyli on, sitä enemmän se aiheuttaa kitkaa geelissä, jolloin proteiinin kulkeutuminen geelissä on hitaampaa. Polymeerigeelin huokoisuus vaikuttaa myös proteiinin liikkumiseen, sillä suuremmalla huokoskoolla proteiinien liikkuminen on helpompaa kuin pienellä huokoskoolla. [38]

6. YHTEENVETO

Tämän kandidaatintyön tavoitteena oli tutkia keratiinipohjaisten tuotteiden käyttökohteita lääketieteessä sekä perehtyä uutto- ja puhdistusmenetelmiin, joiden avulla keratiini saadaan raaka-aineeksi lääketieteeseen. Keratiini on proteiini, jonka lähteenä ovat ihmisellä hiukset, kynnet ja iho sekä muilla selkärankaisilla muun muassa villa, höyhenet ja sorkkamaiset ruumiinosat. Rakenteessaan keratiinilla on useita vety- ja disulfidisidoksia johtuen sen proteiiniketjussa olevista useista kysteiiniaminohapoista. Sidosten ansiosta keratiini on materiaalina stabiilimpi ja jäykempi kuin muut proteiinit, ja muiden proteiinien tavoin keratiini on bioyhteensopiva ja biohajoava tietyissä olosuhteissa. Lääketieteen sovelluksissa nämä ominaisuudet ovat tärkeitä.

Keratiinista valmistettuja tuotteita lääketieteen sovelluksiin ovat hydrogeelit, kalvot, nanokuidut, sienet sekä mikrokapselit ja nanopartikkelit. Näitä on tutkittu käytettäväksi muun muassa haavojen hoidossa, kudosteknologiassa sekä lääkeaineiden annostelujärjestelmissä. Keratiinipohjaisten tuotteiden etuna on niiden kyky edistää solujen kiinnittymistä, lisääntymistä ja kulkeutumista haavojen hoidossa ja kudosteknologiassa. Lääkeaineiden annostelujärjestelmissä keratiinipohjaisilla tuotteilla on kyky imeä lääkeainetta itseensä ja vapauttaa sitä hallitusti.

Keratiinin uuttoon tutkittuja menetelmiä on useita, ja ne on koottu taulukkoon 1. Uuttomenetelmien tavoitteena on katkoa keratiinin rakenteessa olevia vety- ja disulfidisidoksia. Menetelmät voidaan jakaa kemiallisiin, fysikaalisiin ja biologisiin menetelmiin. Näistä kemialliset voidaan jakaa pelkistämiseen, hapetukseen, hydrolyysiin, sulfitolyysiin ja ioniliuoksien käyttöön. Fysikaalisiin menetelmiin kuuluu höyryräjäytys, ylikuumennetun veden käyttö sekä mikroaaltosäteilytys. Biologisiin menetelmiin kuuluvat mikrobiset ja entsymaattiset menetelmät.

Taulukko 1. Yhteenveto uuttomenetelmistä

Menetelmä	Kemikaali/ vaikuttava aine	Saanto	Saantoon vaikuttavat tekijät	Huomiot
Pelkistäminen	tiolit, esim. natriumtioglykolaatti, tioglykolihappo	MEC: 75 % tiourea, urea ja MEC: > 65 % urea, 2-MEC ja SDS: 45–50 %.	pH, lämpötila, apuaineet (denaturointi- ja pinta-aktiiviset aineet)	MEC:n myrkyllisyys keratiinin rakenteen mahdollinen hajoaminen korkean pH:n tai lämpötilan vaikutuksesta
Hapetus	hapettajat esim. peretikkahappo, permuurahaishappo	-	pH, keratiinin liukenevuus	fraktioiden erottelu, pitkät prosessiajat, keratoosien nopea hajoaminen aminohappojen tuhoutuminen happojen vaikutuksesta
Hydrolyysi	hapot, esim. rikkihappo emäkset, esim. NaOH	2 % NaOH: 25 % 0,15M KOH + 0,05M NaOH: 90,3 % proteiinikoostumus	pH, lämpötila, reaktioaika, happo/emäs ja sen määrä	ei kaupallisella tasolla, vaatii suuret määrät happoa/emästä + neutralointivaihe
Sultifolyysi	sulfiitit, esim. natriumsulfaatti, bisulfiitti ei yhtä vaarallisia	NaS: 62 % → NaS+urea+SDS: > 62 %	sulfiitin pitoisuus, pH, lämpötila, käsittelyaika, apuaineiden käyttö	kemiallisista menetelmistä tehokkain ja vaarattomin, palautuva reaktio
Ioniliuokset	ioniliuos: orgaaniset kationit + orgaaniset/epäorgaaniset anionit	optimaalisissa olosuhteissa (90°C, 60min, 20 p-% vesi, 10 p-% NaS, nesteen ja höyhenien painosuhde 20): 75,1 %	polaarisuus → liukenevuus, lämpötila, määritetty optimaaliset olosuhteet	kloridi-ioniliuokset tehokkaimpia yksi miedoimmista menetelmistä, vaatii inertin ympäristön
Höyryräjäytys	kyllästetty höyry	usein ei ole laadukasta, usein esikäsittelymenetelmä, jotta saataisiin suurempi saanto	lämpötila, prosessin kesto, hiukkaskoko ja kosteuspitoisuus	ei kemikaaleja, paine aiheuttaa proteiinin vaurioitumisen ja kysteiinipitoisuuden alenemisen
Ylikuumennetun veden käyttö	vesi nestemäisenä lämpötilassa 100–374°C	170°C, 7bar, 1 h: villakuidut liukenivat lähes kokonaan	lämpötila, prosessin kesto, keratiinin ja liuottimen suhde	taloudellisempi, tehokkaampi ja puhtaampi kuin muut, ei kemikaaleja, aminohappojen hajoaminen haittana, yhdistäminen muihin menetelmiin saannon parantamiseksi
Mikroaaltosäteilytys	mikroaaltosäteily	150-570W, 180°C, 7 min: n.60 %	säteilyn taajuus ja aallonpituus, lämpötila	reaktioiden nopeus jopa 1000-kertainen verrattuna muihin, ei tarvetta liuoksiin, aminohappojen hajoaminen lämpötilan ja säteilyn vaikutuksesta
Mikrobiset & entsymaattiset	keratinaasit (erityisesti keratinofiiliset sienet ja aktinomykeetit)	16 eri sienikantaa, 21 vrk: peptidimolekyylien liukeneminen 50 %	entsyymi, prosessiaika, lämpötila, pH, entsyymin ja keratiinin suhde	ei voida uuttaa kokonaan → keratiiniproteiinin hajoaminen, taloudellisin, ei kemikaaleja, ei vaurioita proteiinirunkoa

Verrattaessa kemiallisia menetelmiä keskenään, niistä tehokkain ja vaarattomin on sulfitolyysi. Siinä käytetyt kemikaalit eivät ole yhtä myrkyllisiä kuin muissa kemiallisissa menetelmissä ja saannon on todettu olevan yhtä hyvä. Fysikaalisia menetelmiä verrattaessa, ylikuumennetun veden käyttö on todettu taloudellisimmaksi, puhtaimmaksi ja tehokkaimmaksi menetelmäksi. Fysikaalisia menetelmiä käytetään usein joko esikäsittelymenetelmänä tai yhdessä jonkin muun menetelmän kanssa, jotta saataisiin suurempi saanto. Kaikista menetelmistä ympäristöystävällisin ja turvallisin on kuitenkin mikrobisten ja entsymaattisten menetelmien käyttö. Tässä menetelmässä ei käytetä kemikaaleja eikä se myöskään vaurioita itse proteiiniketjua. Menetelmässä käytetyt entsyymit ovat kuitenkin kalliita ja prosessi on ajallisesti pitkä, joten kyseistä menetelmää ei käytetä kovin laajalti. Tulevaisuudessa tämän menetelmän käyttö voi kuitenkin lisääntyä merkittävästi ympäristötietoisuuden kasvaessa ja teknologioiden kehittyessä.

Puhdistusmenetelmien avulla keratiiniliuoksesta poistetaan muut komponentit, kuten epäpuhtaudet tai erilaisia suoloja. Erottelu perustuu liuoksen molekyylien koko-, varaus- tai liukoisuuseroon tai sitoutumiskykyyn. Puhdistusmenetelmiä proteiinien puhdistuksessa ovat dialyysi, ultrasuodatus, saostaminen, kromatografiset menetelmät, sentrifugointi ja elektroforeesi. Tehokkaimmaksi näistä on todettu ultrasuodatus, sillä se on menetelmänä hellävarainen, nopea sekä siinä tuotteiden läpimeno on suurta.

LÄHTEET

[1] J. G. Rouse and M. E. Van Dyke, "A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications," *Materials*, vol. 3, no. 2, pp. 999–1014, 2010, doi: 10.3390/ma3020999.

[2] A. Sarma, "Biological importance and pharmaceutical significance of keratin: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 219, pp. 395–413, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.002.

[3] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, and M. A. Meyers, "Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 76, pp. 229–318, 2016, doi: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.

[4] H. H. Bragulla and D. G. Homberger, "Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia," *J. Anat.*, vol. 214, no. 4, pp. 516–559, 2009, doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.

[5] J. McKittrick, P.-Y. Chen, S. G. Bodde, W. Yang, E. E. Novitskaya, and M. A. Meyers, "The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin," *JOM*, vol. 64, no. 4, pp. 449–468, 2012, doi: 10.1007/s11837-012-0302-8.

[6] C. R. Chilakamarry *et al.*, "Extraction and application of keratin from natural resources: a review," *3 Biotech*, vol. 11, no. 5, p. 220, 2021, doi: 10.1007/s13205-021-02734-7.

[7] E. Ranjit, S. Hamlet, R. George, A. Sharma, and R. M. Love, "Biofunctional approaches of wool-based keratin for tissue engineering," *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, vol. 7, no. 1, p. 100398, 2022, doi: 10.1016/j.jsamd.2021.10.001.

[8] J. Qiu, C. Wilkens, K. Barrett, and A. S. Meyer, "Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function," *Biotechnol. Adv.*, vol. 44, p. 107607, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107607.

[9] "Overview of Dermatophytoses - Dermatologic Disorders," MSD Manual Professional Edition. [Online]. Available (12.4.2024): https://www.msdmanuals.com/professional/dermatologic-disorders/fungal-skin-infections/overview-of-dermatophytoses

[10] S. Feroz, N. Muhammad, J. Ratnayake, and G. Dias, "Keratin - Based materials for biomedical applications," *Bioact. Mater.*, vol. 5, no. 3, pp. 496–509, 2020, doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.04.007.

[11] A. Shavandi, T. H. Silva, A. A. Bekhit, and A. E.-D. A. Bekhit, "Keratin: dissolution, extraction and biomedical application," *Biomater. Sci.*, vol. 5, no. 9, pp. 1699–1735, 2017, doi: 10.1039/C7BM00411G.

[12] F. V. Borbolla-Jiménez *et al.*, "Films for Wound Healing Fabricated Using a Solvent Casting Technique," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 7, Art. no. 7, 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15071914.

[13] W. Ye, M. Qin, R. Qiu, and J. Li, "Keratin-based wound dressings: From waste to wealth," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 211, pp. 183–197, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.216.

[14] Z. S. Thompson, N. P. Rijal, D. Jarvis, A. Edwards, and N. Bhattarai, "Synthesis of Keratin-based Nanofiber for Biomedical Engineering," *J. Vis. Exp. JoVE*, no. 108, p. 53381, 2016, doi: 10.3791/53381.

[15] K. Katoh, T. Tanabe, and K. Yamauchi, "Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4255–4262, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.018.

[16] A. Tachibana, Y. Furuta, H. Takeshima, T. Tanabe, and K. Yamauchi, "Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation," *J. Biotechnol.*, vol. 93, no. 2, pp. 165–170, 2002, doi: 10.1016/S0168-1656(01)00395-9.

[17] H. Rajabinejad, A. Patrucco, R. Caringella, A. Montarsolo, M. Zoccola, and P. D. Pozzo, "Preparation of keratin-based microcapsules for encapsulation of hydrophilic molecules," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 40, pp. 527–532, 2018, doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.07.039.

[18] C. Ferroni and G. Varchi, "Keratin-Based Nanoparticles as Drug Delivery Carriers," *Appl. Sci.*, vol. 11, no. 20, Art. no. 20, 2021, doi: 10.3390/app11209417.

[19] "Eco-friendly antimicrobial nanoparticles of keratin-metal ion complex," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, p. 110068, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.110068.

[20] F. Gao *et al.*, "Recombinant Human Hair Keratin Nanoparticles Accelerate Dermal Wound Healing," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, no. 20, pp. 18681–18690, 2019, doi: 10.1021/acsami.9b01725.

[21] S. Perta-Crisan, C. Ursachi, S. Gavrilas, F. Oancea, and F. Munteanu, "Closing the Loop with Keratin-Rich Fibrous Materials," *Polymers*, vol. 13, p. 1896, 2021, doi: 10.3390/polym13111896.

[22] C. R. Holkar, S. S. Jain, A. J. Jadhav, and D. V. Pinjari, "Valorization of keratin based waste," *Process Saf. Environ. Prot.*, vol. 115, pp. 85–98, 2018, doi: 10.1016/j.psep.2017.08.045.

[23] R. C. de Guzman, M. R. Merrill, J. R. Richter, R. I. Hamzi, O. K. Greengauz-Roberts, and M. E.

Van Dyke, “Mechanical and biological properties of keratose biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, pp. 8205–8217, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.054.

[24] Y. Ji, J. Chen, J. Lv, Z. Li, L. Xing, and S. Ding, “Extraction of keratin with ionic liquids from poultry feather,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 132, pp. 577–583, 2014, doi: 10.1016/j.seppur.2014.05.049.

[25] R. K. Donato and A. Mija, “Keratin Associations with Synthetic, Biosynthetic and Natural Polymers: An Extensive Review,” *Polymers*, vol. 12, no. 1, p. 32, 2019, doi: 10.3390/polym12010032.

[26] C. V. T. Rigueto *et al.*, “Extraction and improvement of protein functionality using steam explosion pretreatment: advances, challenges, and perspectives,” *J. Food Sci. Technol.*, 2023, doi: 10.1007/s13197-023-05817-w.

[27] Y. Zhang, W. Zhao, and R. Yang, “Steam Flash Explosion Assisted Dissolution of Keratin from Feathers,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 3, no. 9, pp. 2036–2042, 2015, doi: 10.1021/acssuschemeng.5b00310.

[28] I. Chukwunonso Ossai, F. Shahul Hamid, and A. Hassan, “Valorisation of keratinous wastes: A sustainable approach towards a circular economy,” *Waste Manag.*, vol. 151, pp. 81–104, 2022, doi: 10.1016/j.wasman.2022.07.021.

[29] W. Zhao, R. Yang, Y. Zhang, and L. Wu, “Sustainable and practical utilization of feather keratin by an innovative physicochemical pretreatment: high density steam flash-explosion,” *Green Chem.*, vol. 14, no. 12, pp. 3352–3360, 2012, doi: 10.1039/C2GC36243K.

[30] R. M. Smith, “Extractions with superheated water,” *J. Chromatogr. A*, vol. 975, no. 1, pp. 31–46, 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(02)01225-6.

[31] H. Rajabinejad, M. Zoccola, A. Patrucco, A. Montarsolo, G. Rovero, and C. Tonin, “Physicochemical properties of keratin extracted from wool by various methods,” *Text. Res. J.*, vol. 88, no. 21, pp. 2415–2424, 2018, doi: 10.1177/0040517517723028.

[32] D. Tiwari and S. Talreja, “Green Chemistry and Microwave Irradiation Technique: A Review,” *J. Pharm. Res. Int.*, vol. 34, pp. 74–79, 2022, doi: 10.9734/JPRI/2022/v34i39A36240.

[33] “All about Methods of Purification,” Unacademy. [Online]. Available (18.3.2024): https://unacademy.com/content/neet-ug/study-material/chemistry/all-about-methods-of-purification/

[34] “What Is Protein Purification? Definition, Methods, & More.” [Online]. Available (21.3.2024): https://www.excedr.com/resources/what-is-protein-purification-definition-methods-and-more

[35] “Protein Purification Methods.”. [Online]. Available (18.3.2024): https://comis.med.uvm.edu/vic/coursefiles/MD540/MD540-Protein_Methods_Learning_Module_10400_593281210/Protein-methods/Protein_Methods_print.html

[36] T. P. Man, “Dialysis in Protein Research: Understanding the Basics.” [Online]. Available (21.3.2024): https://info.gbiosciences.com/blog/bid/197555/dialysis-in-protein-research-understanding-the-basics

[37] S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, and H. Cong, “Recent advances on protein separation and purification methods,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 284, p. 102254, 2020, doi: 10.1016/j.cis.2020.102254.

[38] D. M. Smith, “Protein Separation and Characterization Procedures,” in *Food Analysis*, S. S. Nielsen, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 431–453. doi: 10.1007/978-3-319-45776-5_24.

[39] “Protein Sample Ultrafiltration.” [Online]. Available (22.3.2024): https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-concentration-and-buffer-exchange/protein-sample-ultrafiltration

[40] P. Schratter, “Purification and Concentration by Ultrafiltration,” in *Protein Purification Protocols*, P. Cutler, Ed., Totowa, NJ: Humana Press, 2004, pp. 101–116. doi: 10.1385/1-59259-655-X:101.

[41] J. R. Machado, E. E. Severo, J. M. G. de Oliveira, J. da C. Ores, A. Brandelli, and S. J. Kalil, “One-Step Ultrafiltration Process for Separation and Purification of a Keratinolytic Protease Produced with Feather Meal,” *Int. J. Chem. Eng.*, vol. 2018, p. e6729490, 2018, doi: 10.1155/2018/6729490.

[42] C. W. Morris, “Protein Precipitation for the Purification of Therapeutic Proteins”. [Online]. Available (27.3.2024): https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10084934/3/Morris_10084934_thesis.pdf

[43] “solunetti: Kromatografia.” [Online]. Available (28.3.2024): https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kromatografia/

[44] O. Coskun, “Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY,” *North. Clin. Istanb.*, 2016, doi: 10.14744/nci.2016.32757.

[45] “Chemical & Electron Affinity | Summary & Definition | Chemistry Revision.”, 2024. [Online]. Available (29.3.2024): https://alevelchemistry.co.uk/definition/affinity/

[46] B. Anders, “Principle, Applications and Types of Centrifugation”. [Online]. Available (30.3.2024): https://www.longdom.org/open-access-pdfs/principle-applications-and-types-of-centrifugation.pdf

[47] "Centrifugation Basics." [Online]. Available (30.3.2024): https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-pulldown/centrifugation-basics

[48] Kalstein, "What are the advantages and disadvantages of using laboratory centrifuges?," Kalstein. [Online]. Available (1.4.2024): https://kalstein.us/blog/2023/03/02/what-are-the-advantages-and-disadvantages-of-using-laboratory-centrifuges/

[49] "Centrifuges: Types, Classifications, Applications, and Benefits." [Online]. Available (1.4.2024): https://www.iqsdirectory.com/articles/centrifuge.html

[50] "solunetti: Elektroforeesi." [Online]. Available (2.4.2024): https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/elektroforeesi/1/

[51] "What is gel electrophoresis?" [Online]. Available (2.4.2024): https://www.yourgenome.org/theme/what-is-gel-electrophoresis/