

Daniel Lappalainen

Väriinpoisto entsyymiliuoksesta aktiivihieillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Kemiantekniikka

Insinöörityö

29.5.2018

Tekijä Otsikko	Daniel Lappalainen Väriinpoisto entsyymiliuoksesta aktiivihieillä
Sivumäärä Aika	38 sivua + 6 liitettä 29.5.2018
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Kemiantekniikka
Ohjaajat	Lehtori Eija Koriseva Suunnittelu ja kehitys Arni Kujala
<p>Työssä tutkittiin, kuinka aktiivihieili poistaa väriä kahdesta entsyymiliuoksesta. Samalla selvitettiin, missä vaiheessa tuotantoprosessia aktiivihieiltä kannattaisi lisätä liuoksen sekaan. Insinööriyössä entsyymiliuoksia ei esitelty tarkemmin, vaan niihin viitattiin ainoastaan A- ja B-entsyymiliuoksina.</p> <p>Laboratoriotyöt aloitettiin A-entsyymiliuoksella, jonka avulla saatiin selville aktiivihieilen optimaalisin sekoitusaika entsyymissä. Kokeista havaittiin, että aktiivihieille riittää 30 minuutin sekoitusaika ja tulosta hyödynnettiin B-liuoksen kokeissa.</p> <p>B-entsyymiliuoksen kokeissa tehtiin kolme koe-erää, joissa tutkittiin eri aktiivihieilipitoisuuksien vaikutusta väriin, kuiva-aineen pitoisuuteen ja viskositeettiin.</p> <p>Ensimmäisellä erällä aktiivihieilikäsittely tehtiin tuotantoprosessin alkuvaiheessa, eli fermentoinnista saatuun vierteeseen, ja siitä prosessi simuloitiin konsentroituihin saakka. Toisessa koe-erässä aktiivihieili sekoitettiin valmiiksi konsentroituihin entsyymiliuokseen ja viimeisessä koe-erässä sekoitus tehtiin stabiloituun eli pakkausta vaille olevaan entsyymiliuokseen.</p> <p>Erien koetuloksia tutkittiin ja selville saatiin, että suurin värin muutos entsyymiliuokseen saatiin viimeisellä erällä 4 m- % aktiivihieilipitoisuudella, jossa L*-arvoksi mitattiin 93. Kokeista saatiin myös selville, että aktiivihieilikäsittely nopeutti entsyymiliuoksen konsentroitua huomattavasti ja näin myös koko tuotantoprosessi saadaan nopeammaksi.</p> <p>Tuloksia ei kuitenkaan voi vielä soveltaa varsinaiseen tuotantoon, koska työssä oli tehty vasta ensimmäiset testit. Työ antaa hyvän pohjan toistokokeita sekä jatkotutkimuksia varten.</p>	
Avainsanat	Entsyymiliuos, aktiivihieili, konsentointi, suodatus, väri

Author Title	Daniel Lappalainen Removing color from enzyme solution with activated carbon
Number of Pages Date	38 pages + 6 appendices 29 May 2018
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio- and chemical engineering
Professional Major	Chemical engineering
Instructors	Eija Koriseva, Lecturer Arni Kujala, Engineering and Development
<p>The aim of the study was to see how activated carbon effects the color of two different enzyme solutions. The task was to remove color and define at which stage the production process the activated carbon could be inserted. The work was conducted with two different enzyme solutions, referred as enzyme solutions A and B.</p> <p>The laboratory work was started with an enzyme solution A, to determine optimal mixing time for activated carbon in the enzyme. The results of this experiment showed that with 30 minutes of mixing, the full benefit of active carbon was obtained, and longer time did not affect the color change anymore. This mixing time was utilized in enzyme solution B experiments.</p> <p>Three experimental batches were made with the B enzyme solution, giving different amounts of activated carbon in every batch. From every sample color, dry matter and viscosity was monitored.</p> <p>The first batch, activated carbon was added in the whole broth that came from fermentation. With this batch, the entire production process was simulated until concentration. In the second batch, activated carbon was added after the concentration to see how activated carbon reacts with highly concentrated B enzyme solution. And in the final batch activated carbon was added to the stabilized B enzyme solution.</p> <p>The results were analyzed and found that the largest change of color in the enzyme solution was obtained in the third batch with 4 % of activated carbon, where L * value was 93. The experiments also found that the activated carbon treatment accelerates concentration of the enzyme solution considerably, thereby also the whole production process is faster.</p> <p>However, the results cannot yet be applied to the actual production. The problem was the limited amount of B-enzyme solution and its stability. This means that further studies and repetition of tests should be made.</p>	
Keywords	Enzyme solution, activated carbon, concentration, filtration, color

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Aktiivihiihi	1
2.1	Rakenne ja ominaisuus	2
2.2	Aktiivihiihien luokittelut ja käyttökohteet	2
2.2.1	Jauhemainen aktiivihiihi	3
2.2.2	Rakeinen aktiivihiihi	3
3	Entsyymi	4
3.1	Kaupallinen sovellus entsyymillä	4
3.1.1	Tekstiiliteollisuus	4
3.1.2	Elintarviketeollisuus	5
3.1.3	Tekniset sovellukset	5
3.1.4	Rehuteollisuus	5
3.2	Roalin toiminta	6
4	Kokeiden suunnittelu	6
4.1	Laboratoriotöiden kulku	6
4.2	Aktiivihiihien partikkelikoon mittaus	6
4.3	Suodatuspahvin valinta	7
4.4	Työturvallisuus	7
5	Menetelmät ja mittauslaitteet	8
5.1	A-entsyymiliuoksen suodatus	8
5.2	B-entsyymiliuoksen suodatus	8
5.3	Ultrasuodatus	9
5.4	Väriin ja kirkkauden mittaus	9
5.5	Viskositeetin mittaaminen	10
5.6	Kuiva-aineen analysointi	11
6	A-entsyymiliuoksen kokeet	11
6.1	Entsyymiliuoksen käsittely	11

6.2	Sekoituskokeet ajoilla 30 ja 120 minuuttia	12
6.3	Sekoitusajan tarkennuskoe	16
7	B-entsyymiliuoksen kokeet	18
8	Ensimmäinen erä	19
8.1	Soluerotus ja kirkastussuodatus	19
8.1.1	Soluerotus	20
8.1.2	Kirkastussuodatus	21
8.1.3	Mittaustulokset	22
8.2	Konsentroidi	24
8.2.1	Konsentroidin aikaerot	25
8.2.2	Mittaustulokset ja niiden erot eri koevaiheissa.	26
9	Toinen erä	28
9.1	Väri	28
9.2	Kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti	30
10	Kolmas erä	31
10.1	Väri	32
10.2	Kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti	33
11	Yhteenveto	34
	Lähteet	38

Liitteet

Liite 1. Työohje A-entsyymiliuoksen kokeet 30 minuutin ja 120 minuutin sekoitusajoilla

Liite 2. Työohje A-entsyymiliuoksen kokeet 2,5 m- %:n aktiivihiliannostuksella

Liite 3. Työohje B-entsyymiliuoksen ensimmäinen erä

Liite 4. Työohje B-entsyymiliuoksen toinen erä

Liite 5. Työohje B-entsyymiliuoksen kolmas erä

Liite 6. A-entsyymiliuoksen sekoitusajan tarkennuskokeiden mittaustulokset

Lyhenteet ja käsitteet

Adsorptio	Adsorptio on fysikaalinen prosessi, jossa kaasu tai neste muodostaa ohuen kalvon kiinteään aineen pintaan.
AC	Activated carbon. Lyhenne aktiivihielelle.
CIELAB	Väriavaruus, jossa kolmen akselin saadaan värille arvot.
Da	Dalton. Molekyylin massaa kuvaava yksikkö.
L*-arvo	CIELAB väriavaruudessa pysty akseli, joka kuvaa valoisuutta.
m- %	Massaprosenttia kuvaava yksikkö.

1 Johdanto

Insinöörityön aiheena on selvittää, kuinka hyvin aktiivihiihi poistaa väriä entsyymiliuoksesta. Työn tilasi Rajamäellä sijaitseva bioteknologia-alan yritys, Roal Oy, joka on erikoistunut teollisuusentsyymien valmistukseen. Työn kokeellinen osuus toteutettiin yrityksen laboratoriotalossa tutkimus- ja tuotekehitysosastolla formulointiyksikössä.

Tämän insinöörityön tavoitteina on selvittää, missä vaiheessa tuotantoprosessia ja kuinka paljon olisi hyödyllisintä sekoittaa aktiivihiihtä entsyymiliuoksen sekaan, jotta värinpoisto olisi mahdollisimman tehokasta. Työssä käytetään kahta eri entsyymiliuosta, joita ei esitellä tarkemmin, vaan niihin viitataan ainoastaan entsyymiliuoksina A ja B.

Teoreettisessa osassa tarkastellaan yleisesti aktiivihiihtä, sen ominaisuuksia ja mitä käyttökohteita sille on. Entsyymeistä käydään läpi lyhyesti, kuinka ne toimivat ja millaisia kaupallisia sovelluksia niille tällä hetkellä on. Suurimmaksi osaksi opinnäytetyö koostuu kuitenkin kokeellisesta osasta.

Kokeellisessa osassa käsitellään kahta eri entsyymiliuosta. A-liuosta käytetään kokeisiin, joissa selvitetään optimaalinen sekoitusaika ja B-liuosta kokeisiin, jossa tutkitaan, missä vaiheessa tuotantoa ja kuinka paljon aktiivihiihtä pitää lisätä, jotta saadaan haluttu väri nestemäiselle entsyymiliuokselle.

2 Aktiivihiihi

Aktiivihiihi on suodatinaine eli adsorbentti. Hiili pystyy luonnostaan jo sitomaan orgaanisia aineita itseensä, ja kun hiili aktivoidaan, sen adsorptiokykyä saadaan parannettua entistä enemmän. Aktivointi tehdään yleensä kemiallisesti poistamalla aktivointikemikaalilla raaka-aineesta kosteus. Aktivoinnissa hiilen rakenne muuttuu huokoisemmaksi ja hiilen pinta-ala kasvaa, mistä johtuu myös adsorptiokyvyn kasvu. Yksi gramma aktiivihiihtä voi olla pinta-alaltaan jopa 500 m² ja pystyy sitomaan erittäin hyvin orgaanista materiaalia pinnalleen. [1, s.2, 17–18.]

2.1 Rakenne ja ominaisuus

Aktiivihili on raaka muoto grafiitista, jolla on amorfinen rakenne. Se on erittäin huokoinen, ja huokosten koko vaihtelee suuresti, näkyvistä huokosista molekyylin kokosiin huokosiin. Aktiivihielessä olevat atomien kokoiset välit ovat niin pieniä, ettei hiilen huokoisuuden heterogeenisyyttä, muotoa tai adsorptio-ominaisuutta pysty tarkasti kuvailemaan. Mutta esim. aktivoitu puuhiili sisältää suuren määrän mikrohuokosia, joiden säde on 2 nanometriä tai vähemmän. Mesohuokosten säde vaihtelee 2–50 nanometriin ja makrohuokosten säde taas 50–2 000 nanometriin. Erilaisten huokoskokojen ja pintaoksidien sekä funktionaalisten ryhmien vuoksi aktiivihieksen adsorptio-ominaisuudet vaihtelevat suuresti, ja niiden avulla voidaan valita haluttu adsorptiokyky. Mesohuokosia omaava aktiivihili soveltuu parhaiten väripigmenttien adsorptioon. [2; 3, s.5–6.]

Sopiva aktivointilämpötilan alentaminen ja aktivointiajan lyheneminen edistävät mekaanista lujuutta hiilessä, mutta tällöin adsorptiokyky heikkenee. Adsorptiokyvyn parantamiseksi on taas nostettava aktivointilämpötilaa ja lisättävä aktivointiaikaa, mikä puolestaan johtaa hiilen mekaaniseen heikentymiseen. Siksi on otettava huomioon aktiivihieksen käyttötarkoitus, jotta voidaan valita oikea aktiivihieksityyppi. Käytetty aktiivihili on helppo regeneroida uudelleenkäyttöä varten, ja näin voidaan välttää turhaa ympäristön saastuttamista. [3, s. 25.]

2.2 Aktiivihieksien luokittelut ja käyttökohteet

Aktiivihieksistä on monia eri valmisteita, kuten rae, monoliitti, nanoputket, pelletit ja jauhe. Tässä insinööriyössä on tarkoitus poistaa liuoksesta väriä, mihin soveltuu parhaiten jauhemainen aktiivihili. [1, s. 2.]

Aktiivihieksen adsorptiokyky riippuu pinta-alasta, huokosrakenteesta, polaarisuudesta, liukoisuudesta ja adsorbaattien, eli aine joka tarttuu aktiivihieksen pinnalle, molekyylikoosta. Adsorbaatin diffuusio on tärkeä tekijä, sillä hiukkaset kulkeutuvat hiilen ulkokerroksesta hiilen sisällä oleviin huokosiin pinta- ja huokosdiffuusion avulla ja jäävät kiinni. [4.]

2.2.1 Jauhemainen aktiivihiihi

Jauhemaisella aktiivihiihilellä eli PAC:llä (Powdered Activated Carbon) tyypillinen partikkelikoko on alle 1 mm, ja yleisimmät arvot ovat suunnilleen 1,5–2,5 µm. Normaalisti tätä käytetään sellaisissa sovelluksissa, joissa adsorbaatilla, eli aineella jonka tarkoitus on tarttua hiilen pintaan, on ongelmia sitoutua hiilen huokosiin. Samoin myös, jos käsittely-aika raemuotoisella aktiivihiihilellä on liian pitkä, niin PAC:lla saadaan adsorptio tapahtumaan nopeammin. [3, s. 34–35.]

Nestefaasin kanssa on yleensä käytössä sekoitusastia, jotta adsorptio olisi tehokkaampi. Hiilen tyyppi, kosketusaika liuoksen kanssa ja hiilen määrä riippuvat halutusta puhdistuksen asteesta. Aktiivihiihi erotetaan myöhemmin laskeuttamalla tai suodattamalla seos. Usein suodatuksessa käytetään suodatintukea, kuten piimaata. [3, s. 34–35.]

Kaasuvirtauksissa jauhetta lisätään kaasuvirran sekaan, missä jauhe on pneumaattisesti kuljetettu ja suodatettu levy- ja kehyslaitteilla tai sähköstaattisilla saostimilla. Tyypillisesti jauhemaista aktiivihiihiltä käytetään teollisuus- ja yhdyskuntajäteveden käsittelyssä, värinpoistossa ja elintarviketeollisuudessa. [3, s. 34–35.]

2.2.2 Rakeinen aktiivihiihi

Rakeisella aktiivihiihilellä hiukkaskoko on yleensä 1–5 mm ja sitä käytetään tavallisesti prosesseissa, joissa on rae-peti. Rae-peti tarkoittaa tilannetta, jossa rakeet on pakattu johonkin astiaan ja suodatettava liuos ajetaan siitä läpi. Rae-peti aiheuttaa virtaukseen painepudotuksen. Jauheella se olisi erittäin suuri ja siten lähes mahdoton toteuttaa. Granuuleilla tai rakeilla painehäviö pysyy kohtuullisena. Rakeen etu jauheeseen verrattuna on pienempi painehäviö sekä se, että sitä voidaan regeneroida tai aktivoida uudelleen enemmän kuin kerran. Aktiivihiihi regeneroidaan aluksi kuivaamalla sitä, jonka jälkeen rae kuumennetaan todella kuumaksi, jotta adsorptoitunut orgaaninen materiaali hiihlessä hajoaisi ja huokokset saataisiin puhtaaksi. Regeneroinnin jälkeen aktiivihiihi on uudestaan käytettävissä. [3, s. 35–37.]

3 Entsyymi

Biologiset prosessit, joita esiintyy kaikissa elävissä organismeissa, ovat kemiallisia reaktioita, joista suurin osa on entsyymien säätelemiä. Suuret entsyymit ovat aminohappo- ketjuja, joissa aminohappojen järjestys määrittää proteiinin rakenteen ja sen ominaispiirteet. Ilman entsyymejä monet luonnossa tapahtuvat reaktiot olisivat liian hitaita eivätkä välttämättä edes tapahtuisi havaittavalla nopeudella. Entsyymit osallistuva solujen aineenvaihdunnan kaikkiin osatekijöihin, jossa suuret ravintoainemolekyylit, kuten proteiinit, hiilihydraatit ja rasvat, hajoavat pienemmiksi molekyyleiksi. [5.]

Entsyymeillä on myös teollisia ja lääketieteellisiä sovelluksia. Viinin fermentointi, leivän leivonta ja oluen valmistus ovat olleet jo pitkään tuttuja, mutta vasta 1800-luvulla näiden reaktioiden on ymmärretty johtuvan entsyymien katalyyttisestä aktiivisuudesta. Entsyymien käyttö on kasvanut yhä enemmän teollisissa prosesseissa, joissa niiden avulla saadaan mittavia energiasäästöjä. [5.]

3.1 Kaupallinen sovellus entsyymillä

Bioteknologian kehityksen myötä entsyymiteollisuus on huomattavasti kasvanut. Entsyymejä käytetään laajasti tekstiili-, rehu-, elintarvike- ja teknisessä teollisuudessa. Entsyymit toimivat matalissa lämpötiloissa ja kuumennettaessa ne menettävät aktiivisuutensa toisin kuin valtaosa teollisuuden katalyyteistä. Entsyymit ovat hyvin spesifisiä. Ne valitsevat aktiivisen kohdan muodon ja funktionaalisten ryhmien avulla tietynlaiset reaktiokumppanit. Tästä johtuen entsyymit ovat erikoistuneet katalysoimaan vain yhtä haluttua reaktiota, kun taas epäorgaaniset katalyytit ja orgaaniset katalyytit voivat katalysoida monenlaisia reaktioita. Yksi entsyymien hyvä ominaisuus on energian säästö, koska entsyymien katalysoimat reaktiot eivät vaadi korkeita paineita tai lämpötiloja. Monia teollisuudessa käytettyjä katalyyttejä onkin pyritty suunnittelemaan entsyymien kaltaisiksi. [6.]

3.1.1 Tekstiiliteollisuus

Entsyymejä käytetään laajasti tekstiiliteollisuudessa, jossa niiden tarkoitus on parantaa tuotantomenetelmiä ja tekstiilin viimeistelyä. Entsyymien avulla kankaiden langat päällystetään usein tärkkelyksellä, mikä estää niiden rikkoutumista kudottaessa. Farkkujen viimeistelyssä käytetään sellulaaseja, joiden avulla farkut saavat muodikkaan kivetetytyn

ulkonäön, joka oli perinteisesti tuotettu hohkakivien hankaustoiminnan avulla. Sellulaaseja käytetään myös melko usein puuvillakankaan sileyden ja värin kirkkauden parannuksissa. Proteaasientsyymejä käytetään villan käsittelyyn ja raakasilkin höyrystämiseen. [6.]

3.1.2 Elintarviketeollisuus

Suurin osa entsyymiteollisuudesta kuuluu kuitenkin elintarvikepuolelle. Leivontateollisuudessa entsyymejä käytetään taikinan koostumuksen ja leivän säilyvyyden parantamiseen. Juuston teossa käytetään entsyymejä maidon hyytymiseen ja alkoholiteollisuudessa esim. olueen mäskäyksessä. Viineissä ja mehuissa saadaan entsyymin avulla parempaa näköä ja hajua tuotteelle. [6.]

3.1.3 Tekniset sovellukset

Teknisiä entsyymejä käytetään pesuaineissa ja paperiteollisuudessa. Pesuaineissa käytetään sellulaasin lisäksi proteaasia, jonka avulla saadaan pesuaineelle tehokkaampi tahranpoisto-ominaisuus ja estetään kankaan nyppyntyymistä. Samalla myös säilytetään vaatteiden värin kirkkautta ja mahdollistetaan alhaisten lämpötilojen pesuja. Paperiteollisuudessa sellulaasilla tavoitellaan paperin lujuusominaisuuksien parantamista ja raaka-ainekäytön optimointia. [6.]

3.1.4 Rehuteollisuus

Rehuteollisuudessa on tarkoitus optimoida tuotantoeläinten ravintoaineiden saantia. Entsyymien avulla saadaan paremmat ravintoarvot rehuraaka-aineissa ja pystytään vähentämään ympäristökuormitusta. Yleisimmät entsyymit ovat fytaaseja, jotka edistävät rehun hyötysuhdetta eläimen ravitsemisessa ja korvaavat lisäfosforin tarvetta. Ksylaasin, sellulaasin ja β -glukanaasin avulla saadaan parannettua rehun ravintoarvoja. [7.]

3.2 Roalin toiminta

Roal valmistaa kuukaudessa n. 1 000 000 kg entsyymejä, jotka menevät teollisuuden käyttöön. Näiden avulla teollisuudessa voidaan säästää energiaa sekä suojata ympäristöä paremmin. Roal Oy perustettiin vuonna 1991. Sen omistaa Altia Oyj ja Associated British Foods yhdessä puoliksi. Liikevaihdosta jopa 10 % menee tutkimukseen ja tuotekehitykseen, minkä ansiosta uusia entsyymejä kehitetään ja parannetaan jatkuvasti. [8.]

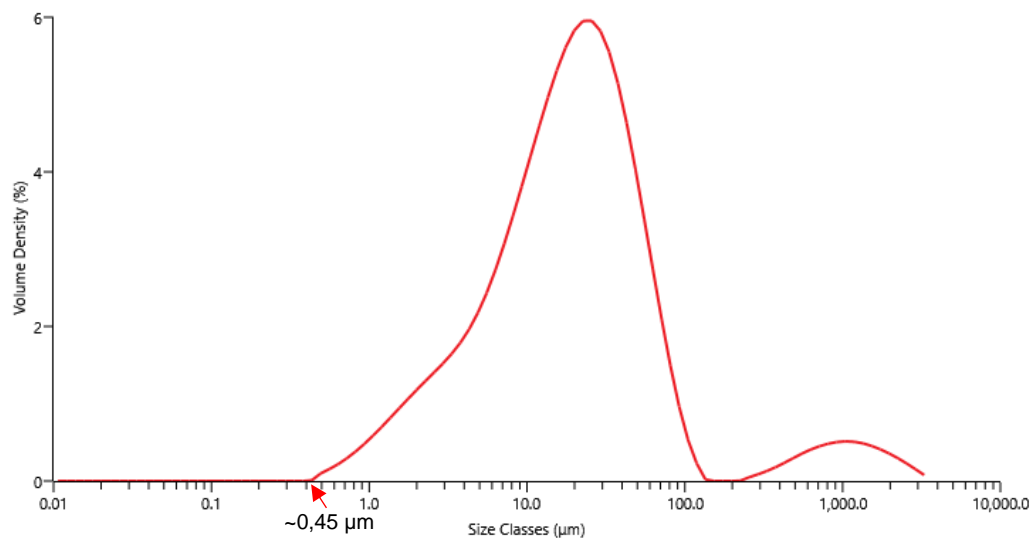
4 Kokeiden suunnittelu

4.1 Laboratoriotöiden kulku

Työssä käsiteltiin kahta entsyymiliuosta, jotka olivat väriltään hyvin samankaltaisia. Ensimmäisellä liuoksella (A-entsyymiliuos) oli tarkoitus määrittää sopiva aktiivihillen sekoitus/vaikutus aika, jota sovellettiin myöhemmin B-entsyymiliuoksen kokeissa. B-liuoksella tavoite oli määrittää aktiivihillen annostuksen määrä sekä se, missä vaiheessa tuotantoprosessia sitä kannattaisi lisätä entsyymiliuoksen sekaan.

4.2 Aktiivihillen partikkelikoon mittaus

Ennen entsyymikokeita oli aktiivihillijauheen partikkelikoko mitattava, jotta suodatuksissa osattaisiin valita oikeanhuokoista pahvia. Jauheen partikkelikoko mitattiin Malvern Panalyticalin Mastersizer 3000 -partikkelinmittauslaitteella, joka laserdiffraktion avulla pystyy mittaamaan 10 nm:n kokoisesta partikkelista 3,5 mm:n kokoiseen saakka. Laite analysoi mittausdatan ja laskee hiukkaskokojakauman. Työssä käytetylle aktiivihillijauheelle selvitettiin, että pienin partikkelikoko jauheessa oli n. 0,45 μm ja suurin osa partikkeleista oli kokoa 19,1 μm . Jakauma näkyy kuvassa 1.



Kuva 1. Aktiivihiilen hiukkaskokojakauma mitattu Mastersizer 3000 -laitteella. [9.]

4.3 Suodatuspahvin valinta

Aktiivihiilen partikkelikoon mittausten perusteella on suodatuksissa käytettävä mikro-koluokan suodatuspahvia, joka pystyy suodattamaan n. 0,45 µm:n kokoisia partikkeleja pois. Suodatinpahviksi valittiin Eatonin valmistama BECOPAD 170, jonka huokoisuustaso on 0,2–0,4 µm, eli sopiva aktiivihiilijauheen suodatukseen.

4.4 Työturvallisuus

Jatkuva altistuminen entsyymeille on vaarallista, ja herkistyneelle henkilölle voi esimerkiksi kehittyä ihottumaa tai ilmetä nuhan oireita työn aikana. Pahimmassa tapauksessa herkistyneelle henkilölle voi jopa kehittyä astma.

Insinööriyössä käsitellyt entsyymit olivat proteaasia, eli hajottavia entsyymejä, joiden käsittelyssä pitää olla erityisen varovainen. Kaikki työt tehtiin ohjeiden mukaisesti ja koikoiden jälkeen työpiste siivottiin tarkasti mahdollisilta entsyymiroiskeilta.

Töitä tehdessä noudatettiin yrityksen työturvallisuuskäytäntöjä, kuten suojalasien ja käsineiden käyttöä. Mahdollisen aerosolialtistuksen välttämiseksi kaikki entsyymiä sisältävät liuokset käsiteltiin vetokaapissa tai kohdepoiston alla. Laboratoriossa on myös tehokas ilmanvaihto sekä säännöllinen ilmanlaadun tarkkailu.

5 Menetelmät ja mittauslaitteet

5.1 A-entsyymiliuoksen suodatus

A-entsyymiliuoskokeissa käsiteltiin pieniä annoksia, joten suodatuksissa oli käytettävä koottavaa suodatinsuppiloa. Suppilo koostuu kolmesta osasta: suppilo, suodatuspaperin pesä ja runko, jossa on pumpulle tarkoitettu letkuliitäntä. Koottu suppilo liitetään pumpuun, joka muodostaa alipaineen ja pakottaa suppilossa olevan nesteen siirtymään koepulloon suodatuspahvin läpi. Suppilossa käytetään Millipore MF™-membrane filters -suodatinpahvia, jonka huokoskoko on 0,45 µm.

5.2 B-entsyymiliuoksen suodatus

Isompien näytteiden suodatukset tehtiin laboratoriossa Seitzin-suodattimella, jonka tilavuus on 2 litraa. Suodatuslaitteiston pohjaosan päälle asetetaan suodatinpahvi ja pohjaosa ruuvataan kiinni suodattimeen. Laitteen yläpäästä syötetään 2 baarin paineella ilmaa, kunnes näyte on saatu suodatettua kokonaan pois säiliöstä.

Suodatuksissa simuloitiin painesuodatusta ja kirkastussuodatusta. Tehtaan painesuodattimessa käytetään Larox-kangasta, jonka tarkoituksena on erottaa suuret solut pois entsyymivierteestä. Samasta kankaasta leikattiin sopivan kokoisia kappaleita, joiden läpi suodatettiin B-entsyymivierrettä erässä yksi. Kirkastussuodatuksessa käytettiin BECO 170 -pahvia, jonka huokoskoko on 0,2–0,4 µm.

5.3 Ultra-suodatus

Ultra-suodatuksessa käytettiin kalvo-suodatusmenetelmää, jossa liuoksen komponentteja erotettiin toisistaan suodattamalla puoliläpäisevän kalvon läpi suurella paineella. Kalvojen huokoskoot vaihtelevat käyttötarkoituksesta riippuen, mutta tässä työssä käytettiin 10 000 Da huokoskokoa. [10, s.1.]

Paineen avulla painettiin liuosta kalvoa vasten, jolloin pienet komponentit pääsivät huokosten läpi. Läpäissyt suodos, eli permeaatti, kerättiin erilliseen säiliöön ja näin saatiin ultra-suodattimen läpi virtaava entsyymi konsentroitumaan. Entsyymiä kierrätettiin laitteistossa niin pitkään, että saavutettiin haluttu konsentroitumiskerroin nesteelle. [10, s. 1; 11, s.1–8.]

Ultra-suodatusta käytettiin tässä insinööri-työssä B-entsyymiliuoksen konsentroituihin. Käytössä oli VivaFlow 200 -laitteisto, johon kuuluu pinta-alaltaan 200 cm²:n kokoinen puoliläpäisevän kalvon sisältävä kasetti, painemittari ja liuoksen kierrättämiseen tarvittavat letkut. Liuoksen pumppaamiseen käytettiin letkupumppua ja suodatuksen nopeuttamiseksi kasetteja oli käytössä kaksi rinnakkain kytkettynä.

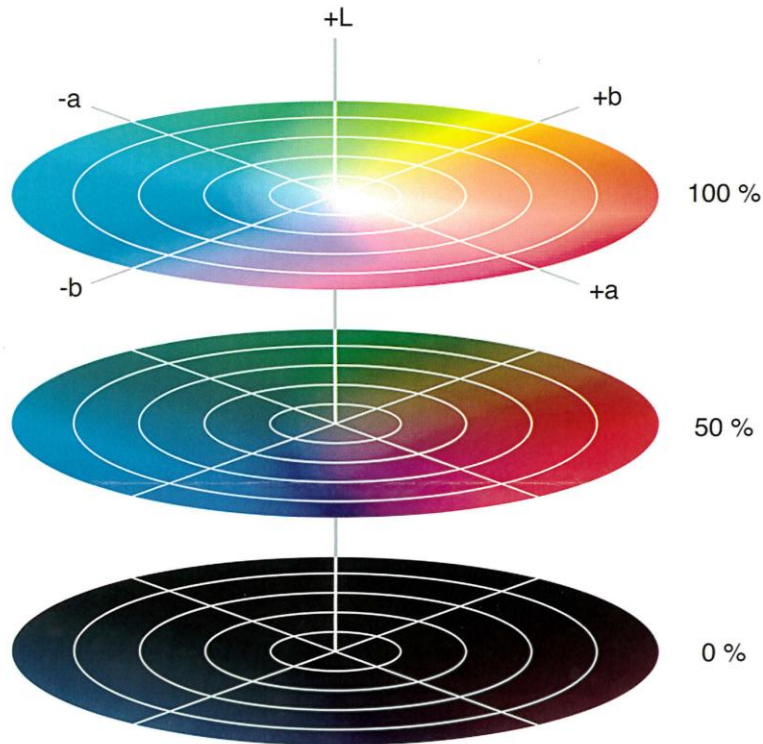
5.4 Väri- ja kirkkauden mittaus

Väri- mittauksissa käytettiin Konica Minolta CM-5 -spektrofotometriä, jonka toimintaperiaate perustui valoon. Mittaus alkoi, kun xenon-lampusta lähtevä valo hajosi lasipalloon ja valaisi näytteen. Sensori havaitsi näytteen läpi kulkeneen sekä siitä sironneen valon. Aallonpituusalueella 360–740 nm:n oleva valo jaettiin 10 nm:n komponentteihin ja signaalit käsiteltiin laitteen omassa prosessointipiirissä. Laite muunsi mittaustulokset digitaaliseen muotoon ja esitti ne integroidulla näytöllä. [12.]

Jokaisen mitattavan näyteliuoksen piti olla puhdas, jotta väritulos olisi hyväksyttävä, joten jokainen näyte suodatettiin 0,22 µm:n ruiskusuodattimella kyvetiin. Kyveti asetettiin tämän jälkeen sille tarkoitettuun kammioon. Tulokset saatiin CIELAB-muodossa eli väriavaruudessa (Kuva 2), jossa oli kolme akselia: L* (mittaa valoisuutta), a* (mittaa punaisen ja vihreän alueen) ja b* (mittaa sinisen ja keltaisen alueen). L* saa arvoja väliltä 0,0–100,0, kun taas a*- ja b*-arvot ovat sekä positiivisia että negatiivisia.

Insinööriyössä keskitytään vain mittauksista saatuihin L^* -arvoihin, joita vertaillaan näytteen kesken. [12; 13.]

$L^*a^*b^*$ color space



Kuva 2. CIELAB väriavaruus $L^*a^*b^*$.

5.5 Viskositeetin mittaaminen

Työssä seurattiin aktiivihiihien vaikutusta viskositeettiin. Käytössä oli mittauslaite nimeltään Anton Paar SVM™ 3001 -viskosimetri, jonka toiminta perustui Couette-mittausperiaatteeseen sekä integroituun tiheysmittaussoluun. Viskositeetin mittaussolu sisälsi vakionopeudella pyörivän putken, joka täytettiin näytteellä. Pyörivässä mittausputkessa oli vapaasti kelluva magneetti, jonka avulla näytteen leikkausvoimat ohjasivat roottoria ja hidastivat sen pyörimistä. Kun roottori saavutti tasapainonopeuden, saatiin nesteen viskositeetti selville. Laite laski samalla kinemaattisen viskositeetin automaattisesti näytteen dynaamisesta viskositeetista ja tiheydestä. [14.]

Mitattava näyte ajettiin ruiskun avulla laitteen putkia pitkin mittauskammioon, jonka jälkeen laite aloitti mittauksen ja ilmoitti tulokset sisäänrakennetulle kosketusnäytölle. [14.]

5.6 Kuiva-aineen analysaattori

Kuiva-aineen analysaattorilla seurattiin aktiivihiilen vaikutusta entsyymien pitoisuuteen. Kokeissa käytetty analysaattorin malli oli Ohaus MB23, joka mittasi kuiva-aineen pitoisuutta 0,3 %:n tarkkuudella. [15.]

Laitteen vaa'alle sijoitettiin metallilautanen ja pahvi, johon tiputettiin entsyymiä tippa kerrallaan, kunnes näytteen painoksi saatiin n.1,2 g. Laitteen kuivausparametrit olivat 105 °C ja 10 min, ja jokaisesta näytteen mittauksesta tehtiin kaksi rinnakkaismittausta, joista lopuksi kirjattiin keskiarvo ylös.

6 A-entsyymiliuoksen kokeet

6.1 Entsyymiliuoksen käsittely

A-entsyymiliuos oli soluvapaa ja valmiiksi käsitelty sekä stabiloitu. A-entsyymiliuoksella oli tarkoitus haarukoida sopiva sekoitusaika, jota voitaisiin käyttää B-entsyymiliuoksen kokeissa. Aktiivihiihlä lisättiin taulukon 1 mukaisesti eri massaprosenttipitoisuuksia näytteisiin. Eli aloitettiin referenssistä ja nostettiin puoli prosenttia lisää aktiivihiihlä jokaiseen näytteeseen.

Taulukko 1. Näytteiden aktiivihiihlipitoisuudet massaprosenteina.

	Näyte1	Näyte2	Näyte3	Näyte4	Näyte5	Näyte6	Näyte7	Näyte8	Näyte9
Aktiivihiihlen pitoisuusn-%	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0

Ensimmäiseen testiin valittiin kaksi sekoitusaikaa, 30 min ja 120 min. Näin voitiin alustavasti tutkia, kuinka mittaustulokset erosivat ja kuinka kokeita kannatti jatkaa.

6.2 Sekoituskokeet ajoilla 30 ja 120 minuuttia

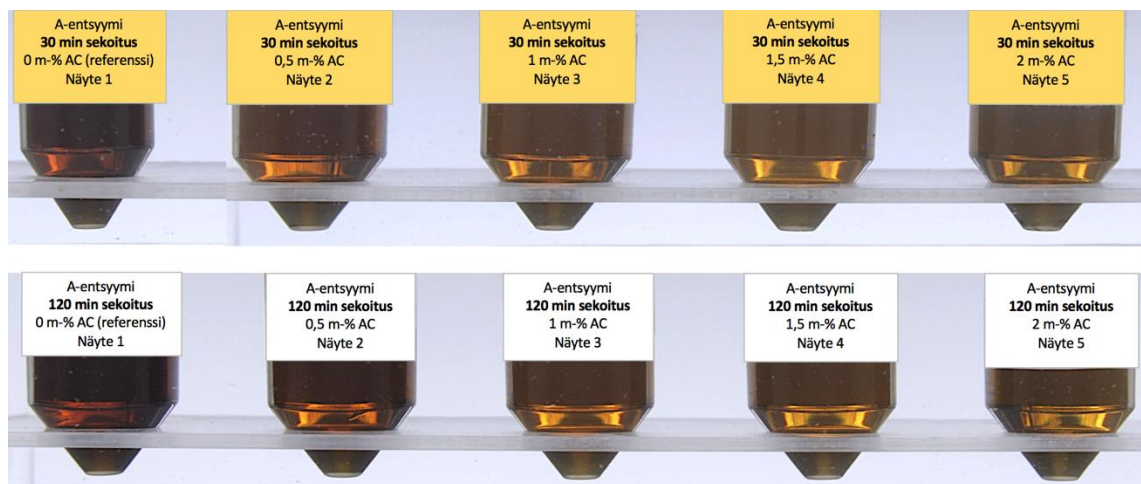
Kummallekin sekoitusajalle tehtiin yhdeksän näytteen koesarja, jonka tulokset vertailtiin keskenään. Aktiivihiihen pitoisuudet olivat massaprosentteja ja annostukset tehtiin 50 ml:n kokoiisiin Falcon-koeputkiin, joihin oli lisätty taulukon 2 mukaisesti A-liuosta ja aktiivihiihtä (AC).

Taulukko 2. Aktiivihiihen ja A-entsyymiliuoksen massat näytteissä.

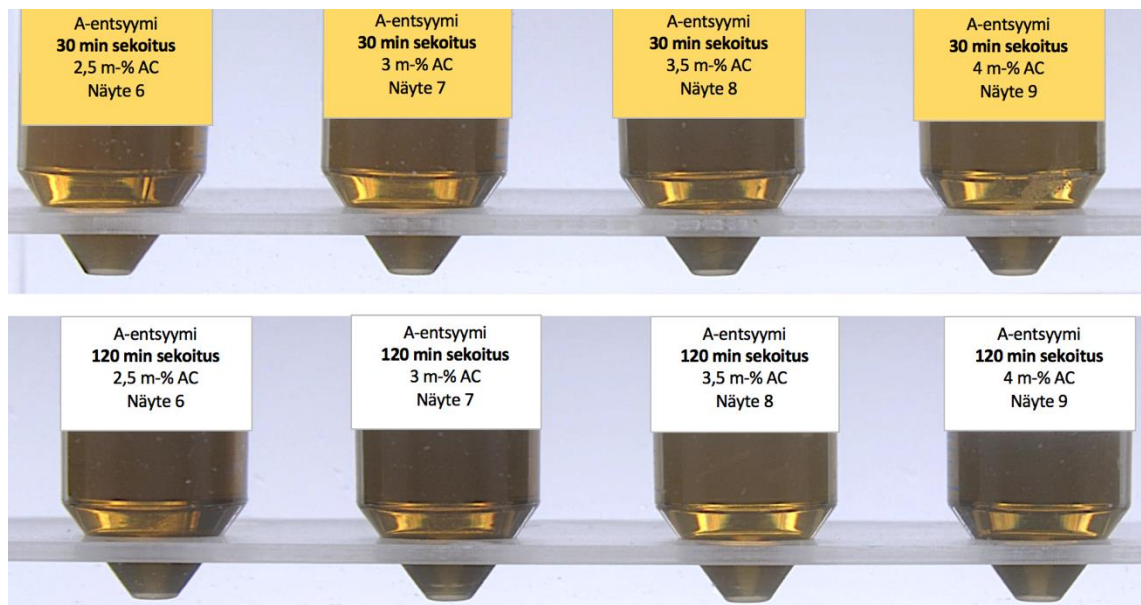
Aktiivihiihen lisätty massa 30 ja 120 minuutin sekoituksissa			
Näyte	Aktiivihiihen pitoisuus (m-%)	A-entsyymiliuoksen massa (g)	AC:n massa (g)
1	0,0	40,0	0,0
2	0,5	40,0	0,2
3	1,0	40,0	0,4
4	1,5	40,0	0,6
5	2,0	40,0	0,8
6	2,5	40,0	1,0
7	3,0	40,0	1,2
8	3,5	40,0	1,4
9	4,0	40,0	1,6

Näytesarjat asetettiin automaattiseen sekoittimeen, joka pidettiin 12 °C:n lämpötilassa, ja vuorotellen jokainen näyte suodatettiin Millipore MF™-membrane filters 0,45 µm:n suodattimen läpi.

Näytteistä mitattiin väri, pH, kuiva-aineen pitoisuus, viskositeetti sekä tiheys. Saadut tulokset taulukoitiin ja niistä piirrettiin kuvaajat, joiden avulla tutkittiin kummankin sekoitusajan tuloksia.

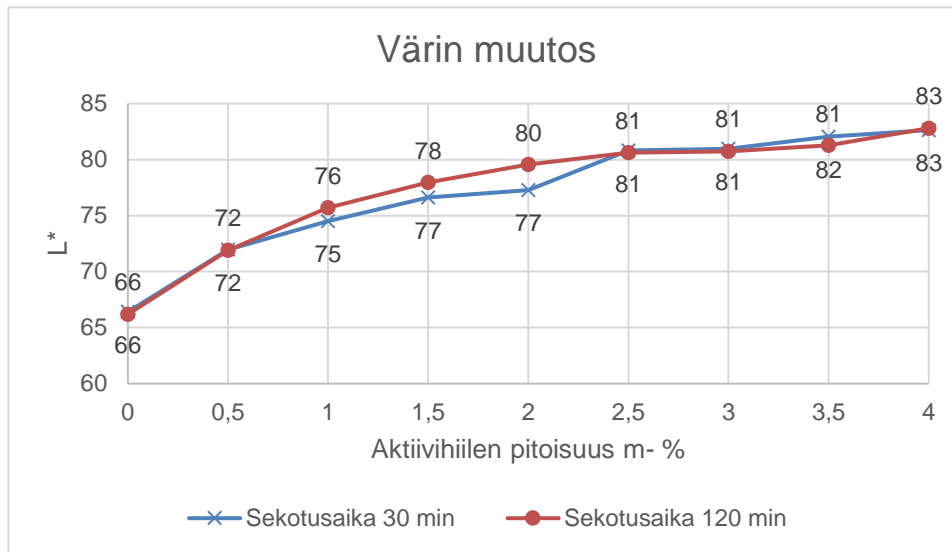


Kuva 3. Värierot 30 ja 120 minuutin sekoitusajoilla A-entsyymissä (näytteet 1–5).



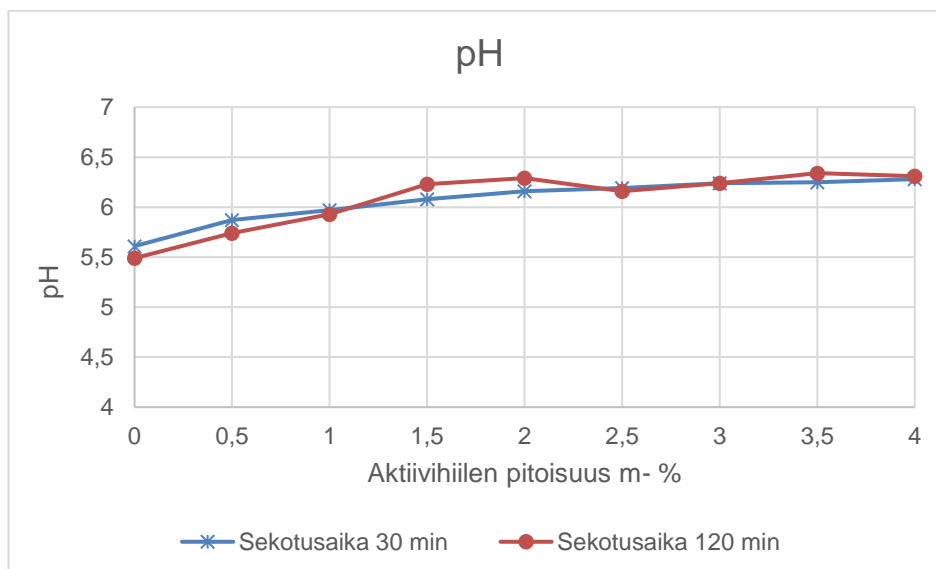
Kuva 4. Värierot 30 ja 120 minuutin sekoitusajoilla A-entsyymissä (näytteet 6–9).

Värianalyysissä, kuten kuvista 3 ja 4, huomaa, että visuaalinen muutos on melkein huomaamaton. Vasta 2,5 m-%:n aktiivihiihiannoksen jälkeen alkaa entsyymiliuoksen tummuus kadota. Kuvan 5 käyristä saadaan värimuutos kuitenkin havaittua helpommin, sillä referenssin L^* -arvo on 66, mutta aktiivihiihellä se saadaan nostettua ja näytteellä 9 kummallakin sekoitusajalla L^* -arvo saadaan 83:een.



Kuva 5. Entsyymiliuoksen väri aktiivihillen pitoisuuden funktiona sekoitusajoilla 30 min ja 120 min.

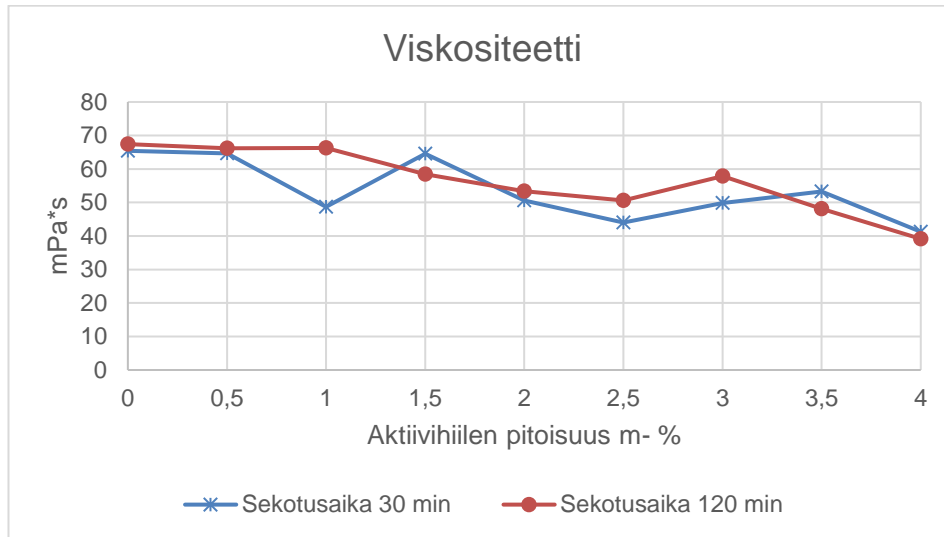
Aktiivihillen eri sekoitusajat eivät vaikuttaneet pH:n mittaustuloksiin. Kummallakin ajalla pH pysyi 5,5–6,5 välillä, eikä 30 minuutilla ollut 120 minuuttiin eroa tuloksissa (kuva 6).



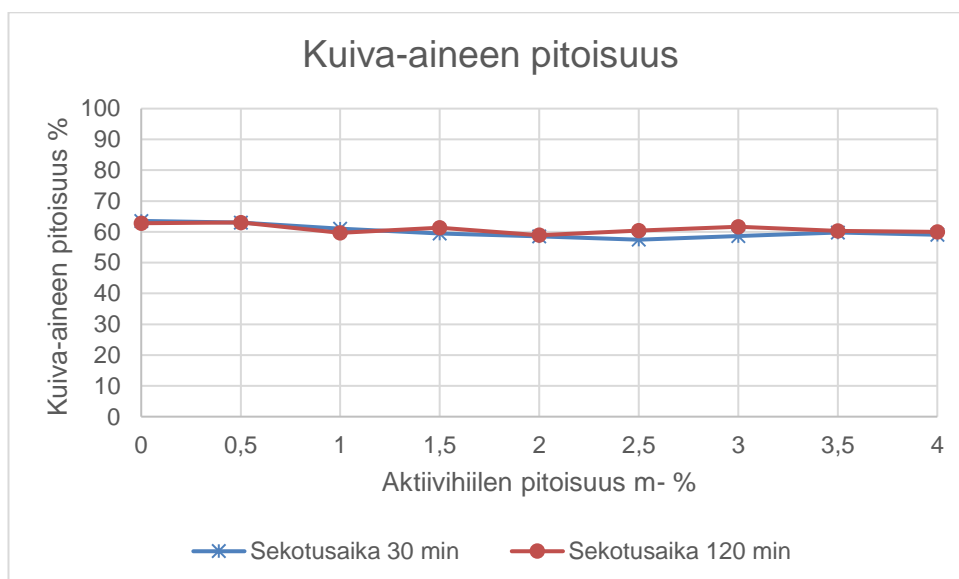
Kuva 6. Entsyymiliuoksen pH, sekoitusajoilla 30 min ja 120 min aktiivihillen pitoisuuden funktiona.

Alla olevasta kuvasta 7 havaitaan viskositeetille laskeva trendi. Viskositeetti oli hyvin samanlainen eri sekoitusajoilla, mutta aktiivihillen määrä vaikutti liuokseen selkeästi. Näytteillä 9 kummallakin sekoituksella entsyymiliuoksen viskositeetti oli laskenut noin 30

mPa-s referenssiin verrattuna. Aktiivihiihi ei vaikuttanut nesteen tiheyteen, eikä kuiva-aineen pitoisuuteen, sillä jokaisella näytteellä oli tiheys $1,2 \text{ g/cm}^3$ ja kuiva-aineen pitoisuus (kuva 8) n. $62 \% \pm 2 \%$.



Kuva 7. Entsyymiliuoksen viskositeetti 30 minuutin ja 120 minuutin sekoitusajoilla aktiivihiihen pitoisuuden funktiona.



Kuva 8. Entsyymiliuoksen kuiva-aineen pitoisuus 30 minuutin ja 120 minuutin sekoitusajoilla aktiivihiihen pitoisuuden funktiona.

Tuloksista saatiin selville, että 2,5 m- %:n aktiivihiilipitoisuuden jälkeen värin L*-arvo ei enää noussut merkitsevästi, joten seuraavissa kokeissa jatkettiin valitsemalla tämä pitoisuus vakioksi kaikille näytteille ja tutkittiin tarkemmin sekoituksen vaikutusta entsyymien väriin.

6.3 Sekoitusajan tarkennuskoe

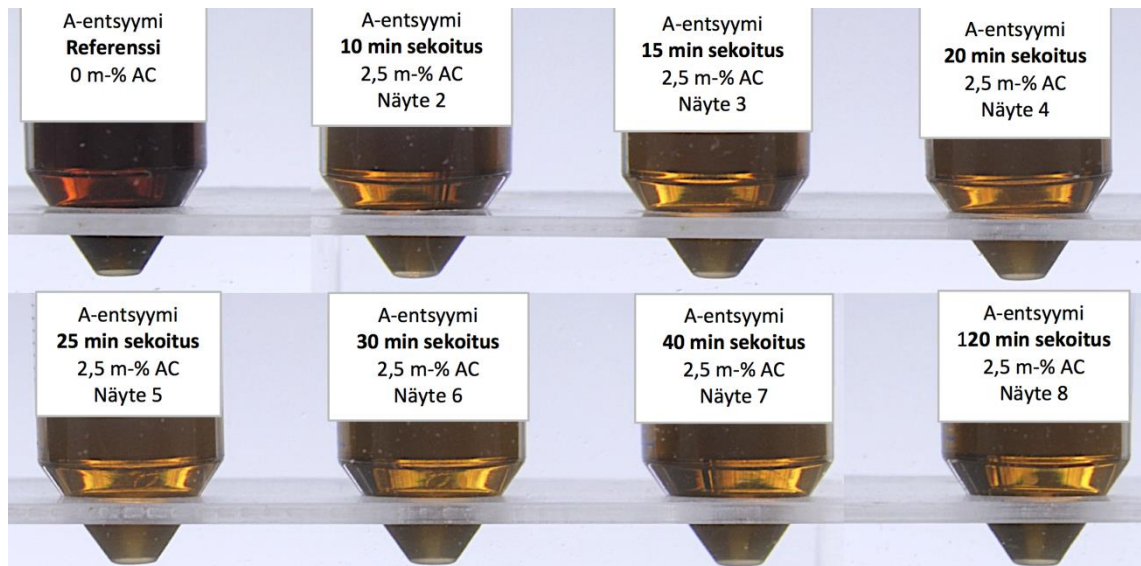
Tarkennuskokeella selvitettiin optimaalisin vaikutusaika aktiivihiilelle entsyymiliuoksessa. Sekoituksen ei pidä olla liian lyhyt, mutta ei myöskään turhan pitkä. Vakioksi päätettiin 2,5 m- %:n aktiivihiilipitoisuus, jolla suoritettiin sama suodatuskoe kuin edellisissä kokeissa, mutta muutettiin vain sekoitusaikoja näytteillä. Saatuja tuloksia vertailtiin toisiinsa.

Näytteitä oli yhteensä 8, joita toistettiin kolme kertaa ja tuloksista laskettiin koefiiri. Tuloksista analysoitiin värin L*-arvoa ja sen muutosta. Näytteet oli tehty 50 ml:n Falcon-koeputkissa, joihin annosteltiin taulukon 3 mukaan entsyymiä ja aktiivihiiltä.

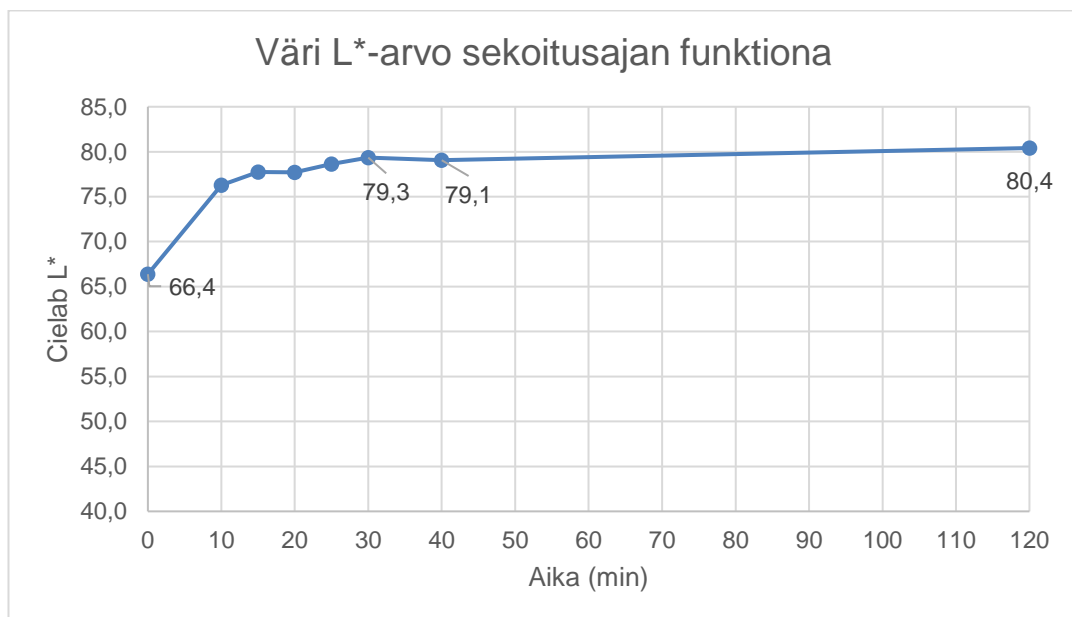
Taulukko 3. Entsyymien ja aktiivihiilen annostukset näytteissä.

Näyte	A-entsyymi (g)	Aktiivihiili (g)	Aktiivihiili m-%
1 (referenssi)	40	0	0,0
2-8	40	1	2,5

Sekoitusaikoja oli yhteensä seitsemän: 10 min; 15 min; 20 min; 25 min; 30 min; 40 min ja 120 min. Jokainen näyte suodatettiin suppilon avulla käyttäen 0,45 µm:n huokoista suodatinpaperia.



Kuva 9. Värierot näytteillä 1–8 eri sekoitusajoilla.



Kuva 10. Entsyymiliuoksen värin L*-arvo sekoitusajan funktiona.

Kuvasta 9 ei havaittu visuaalisesti selkeää värimuutosta eri sekoitusajoilla, mutta spektrofotometrillä mitattujen L*-arvojen avulla (kuva 10) voitiin selvittää sopiva vaikutusaika aktiivihieille. Koevirheeksi L*-kokeille saatiin $S_E = 0,99$, joka voi johtua muun muassa aktiivihieiden annosteluepätarkkuudesta ja väriä mittaavasta spektrofotometriästä. Koevirhe laskettiin kaavalla

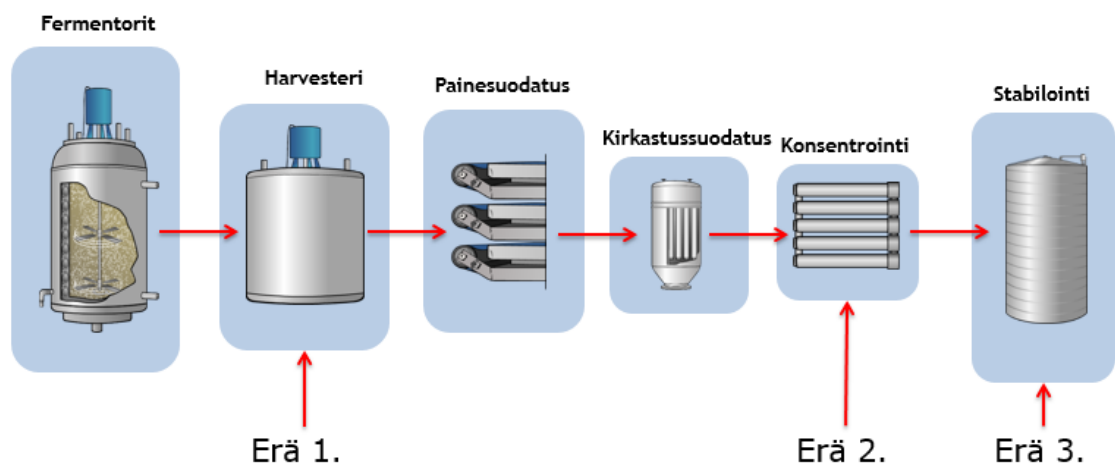
$$S_E = \sqrt{\frac{v_1 S_1^2 + v_2 S_2^2 + \dots + v_8 S_8^2}{v_E}} \quad (1)$$

jossa $S_1 \dots S_8$ ovat kokeiden otoskeskihajonnat ja $v_1 \dots v_8$ ovat kokeisiin liittyvät vapausasteet. Jokainen koe toistettiin kolme kertaa, joten jokaisen kokeen vapausaste on $v = n - 1 = 3 - 1 = 2$. Koevirheen vapausaste lasketaan $v_E = v_1 + v_2 + \dots + v_8 = 16$. Mitä tulokset näkyvät liitteessä 6.

Sekoitusajakokeiden avulla selvitettiin, että 30 min jälkeen värin L^* -arvo ei enää muuttunut merkittävästi. Näiden tulosten perusteella aktiivihieksen sekoitusajaksi päätettiin valita kaikissa tulevissa kokeissa 30 minuuttia. Tässä ajassa aktiivihiehi ehtii vaikuttaa tarpeeksi entsyymiliuoksessa olevaan värinpigmentiin.

7 B-entsyymiliuoksen kokeet

Entsyymien tuotantoprosessi alkaa, kun kasvatettu entsyymivierre siirretään fermentorista isoon harvesteriin. Harvesterista prosessi jatkuu painesuodattimeen, missä erotetaan solut pois liuoksesta. Siitä jatketaan kirkastussuodatukseen, minkä avulla poistetaan pienimmätkin epäpuhtaudet ja saadaan kirkasta entsyymiliuosta. Suodatusten jälkeen entsyymiliuos konsentroidaan ultrasuodattimen avulla ja siirretään säiliöön, jossa konsentroidu entsyymi stabiloidaan ja pakataan myytäväksi tuotteeksi.



Kuva 11. Havainnollistava kuva B-entsyymillä simuloivasta prosessista ja missä kohtaa aktiivihiekkikoetta tehdään.

B-entsyymiliuksella tutkittiin, missä vaiheessa entsyymien tuotantoa aktiivihieillä saisi parhaimman värinpoistotuloksen. Kokeita tehtiin kolmessa eri erässä (kuva 11), jossa jokaisessa erässä aktiivihiehiä lisättiin tuotantoprosessin eri vaiheisiin ja lopussa vertailtiin tuloksia.

Ensimmäisessä erässä aktiivihiehiä lisättiin suoraan solujen sekaan, eli tuotannossa se kuvaisi harvesteria, josta juuri kasvatettu entsyymivierre lähtisi suodatukseen. Kokeissa entsyymiliuosta käsiteltiin samalla tavalla kuin tehtaalla normaalisti konsentroidiin saakka. Tässä seurattiin värin lisäksi myös, kuinka paljon aktiivihiehiä hidastaisi tai nopeuttaisi tuotantoa.

Toisessa erässä käytettiin konsentroitua B-entsyymiliuosta, jota käsiteltiin eri aktiivihiehiannoksilla ja suodatettiin liuos kirkkaaksi. Erässä kaksi oli tavoitteena tutkia, kuinka aktiivihiehiä onnistuu adsorptioimaan väripigmenttejä konsentraatista ja miten tulokset eroavat ensimmäisen erän tuloksista. Kolmannessa erässä aktiivihiehiä annoksia lisättiin stabiloituun B-entsyymiliuokseen ja samalla tavalla siitä seurattiin värin muutosta. Kaikkien erien näytteistä mitattiin ja seurattiin viskositeetin muutosta sekä kuiva-aineen pitoisuutta.

8 Ensimmäinen erä

8.1 Soluerotus ja kirkastussuodatus

Entsyymiliuokseen lisättävä aktiivihiehiin määrä piti olla realistinen, joten päätettiin, ettei ylitetä 2 m-%:n aktiivihiehiin annostuksen määrää ensimmäisen erän kokeissa. Näytteitä tehtiin viisi kappaletta, joihin annosteltiin seuraavat aktiivihiehiipitoisuudet: 0 m-%, 0,5 m-%, 1 m-%, 1,5 m-% ja 2 m-%.

Kaikissa kokeissa soluerotuksen apuaineena käytettiin 4 m-% piimaata, sekoitusaika oli 30 minuuttia ja lämpötila 8 °C. Piimaata lisättiin vain soluerotteluvaiheessa, jossa sen tarkoitus oli nopeuttaa suodatusta.

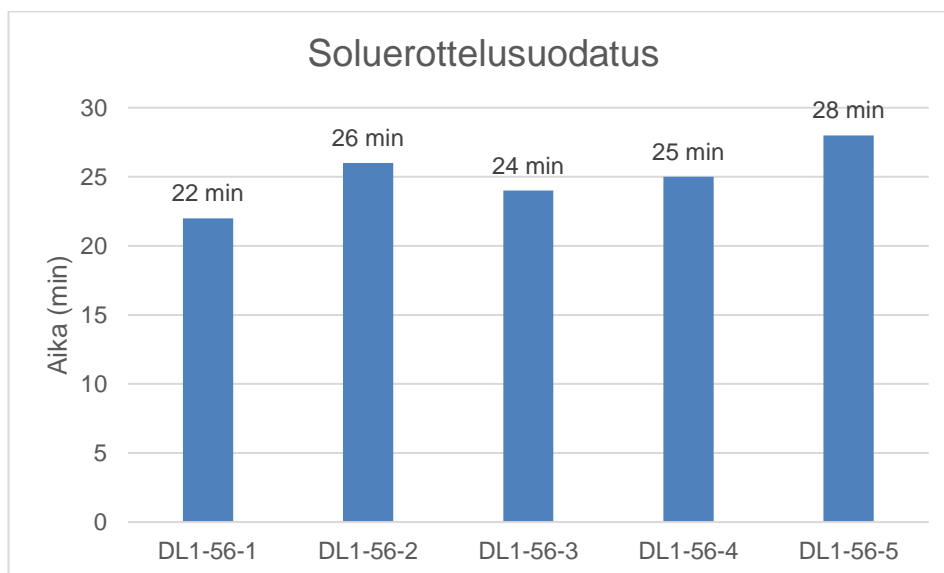
8.1.1 Soluerotus

Näytteitä valmistettiin 1000 g:n sarjoissa taulukon 4 mukaisesti: dekanterilasiin mitattiin 1000 g:aa entsyymiliuosta, haluttu aktiivihiiilen määrä ja piimaata. Annokset sekoitettiin magneettisekoittimella kylmähuoneessa, jotta entsyymien lämpötila pysyisi samana sekoituksen aikana.

Taulukko 4. Ensimmäisen erän näytteiden nimet, sekä lisättyjen aineiden massat.

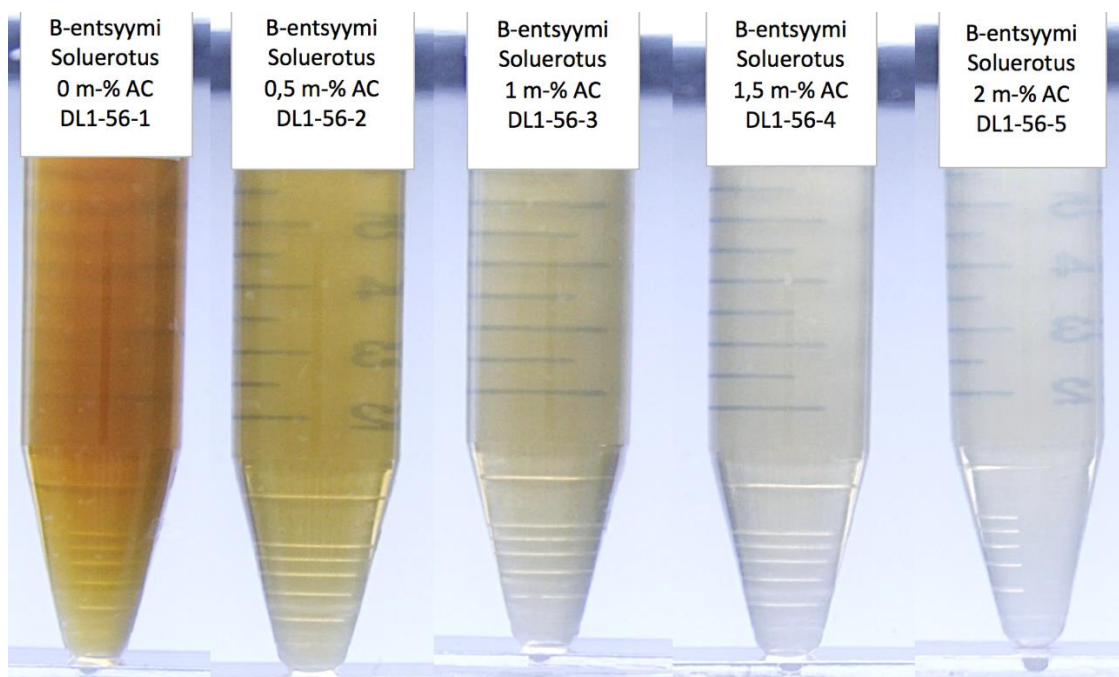
Näyte	Massat (g):			
	Aktiivihiiilen määrä	B-entsyymi	Piimaa	AC
DL1-56-1	0,0	1000	40	0
DL1-56-2	0,5	1000	40	5
DL1-56-3	1,0	1000	40	10
DL1-56-4	1,5	1000	40	15
DL1-56-5	2,0	1000	40	20

Suodatus hidastui sitä enemmän, mitä isompi annos aktiivihiihlä oli solujen sekaan lisätty, mutta kuten kuvasta 12 huomataan, ero ei ollut suuri. Pahimmillaan suodatus hidastui kuudella minuutilla. Syynä hidastumiseen oli kankaan tukkeutuminen aktiivihiiilen takia.



Kuva 12. Soluerottelun painesuodatuksen ajat

Visuaalisesti (kuva 13) aktiivihiiiliannoksilla oli selkeä ero värissä.

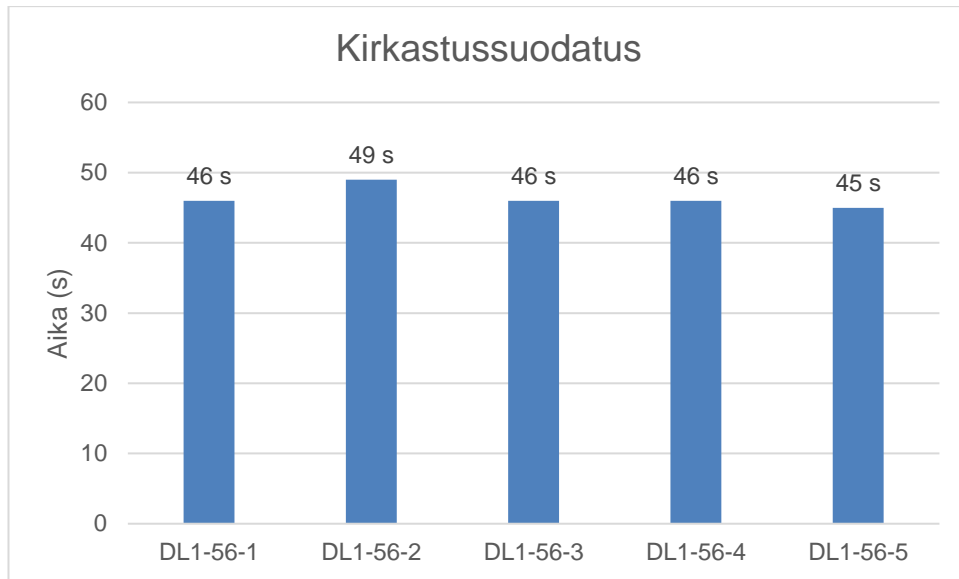


Kuva 13. Näytteiden DL1-56-1...5 valokuva soluerotuksen jälkeen

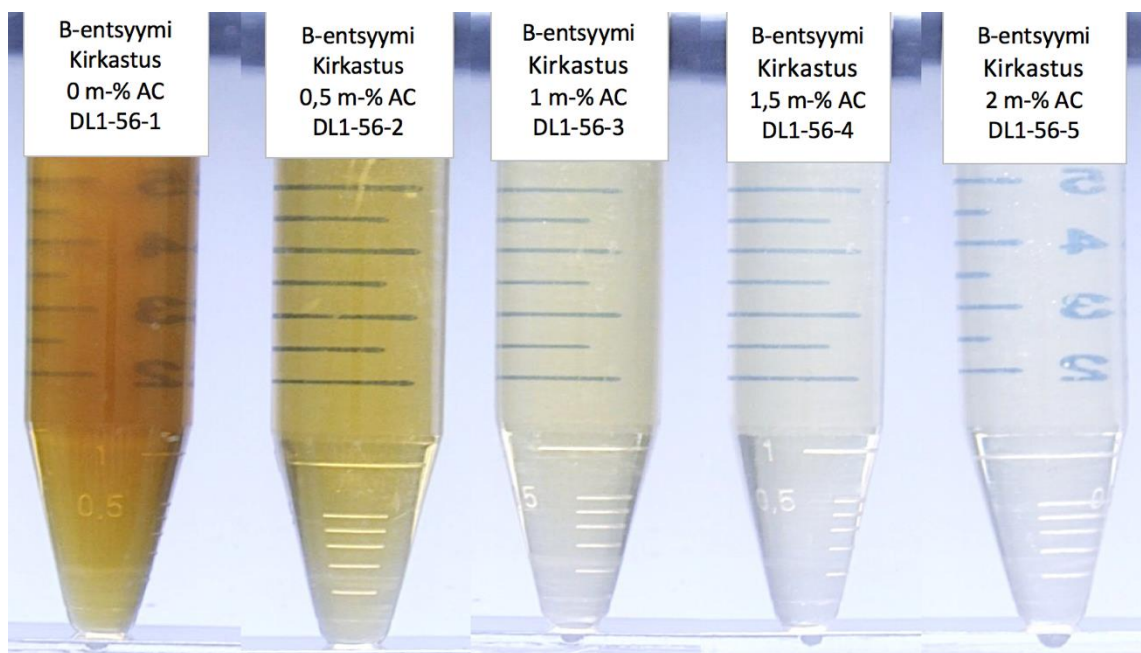
Kuvasta (kuva 13) havaittiin myös, että aktiivihiilen pienimmät hippuset pääsivät suodatuskankaan läpi, jonka takia näyte näyttää tummemmalta. B-entsyymiliuoksen keltaisuus hävisi selkeästi sitä paremmin, mitä suurempi hiiliannos oli näytteeseen lisätty.

8.1.2 Kirkastussuodatus

Kirkastuksessa käytettiin BECO 170 -pahveja, joiden avulla entsyymin sameus ja loput aktiivihiilestä saatiin suodatettua pois. Aktiivihiili ei vaikuttanut enää suodatukseen kuluneeseen aikaan, sillä jokaisen kokeen suodatus oli saatu valmiiksi alle minuutissa, kuten kuvassa 14 on havainnollistettu. Visuaalisesti (kuva 15) B-entsyymiliuos saatiin 2 m-%:n AC-annoksella melkein veden näköiseksi nesteeksi ja erittäin kirkkaaksi.



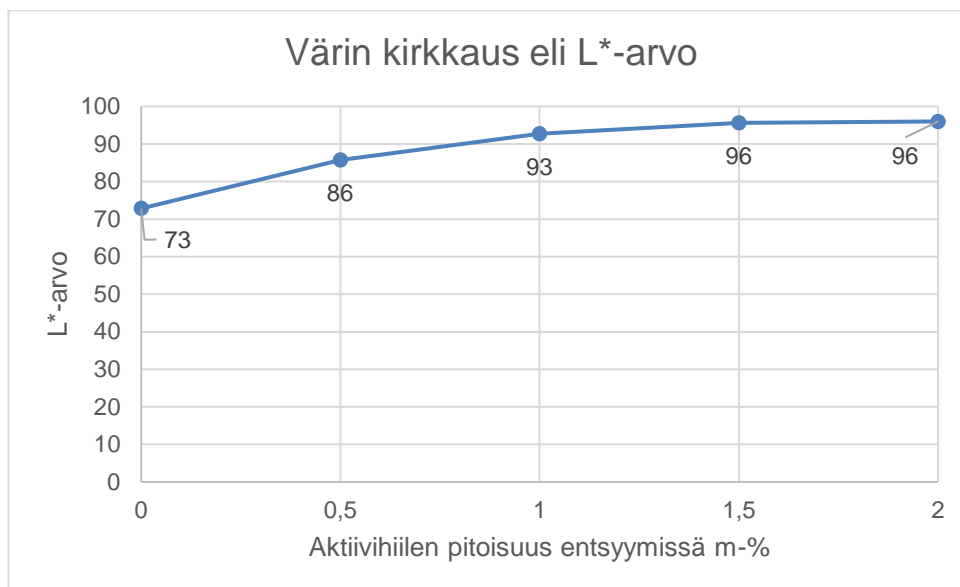
Kuva 14. Kirkastussuodatuksiin kulunut aika jokaiselle näytteelle.



Kuva 15. Näytteiden DL1-56-1–DL1-56-5 valokuva kirkastussuodatuksen jälkeen.

8.1.3 Mittaustulokset

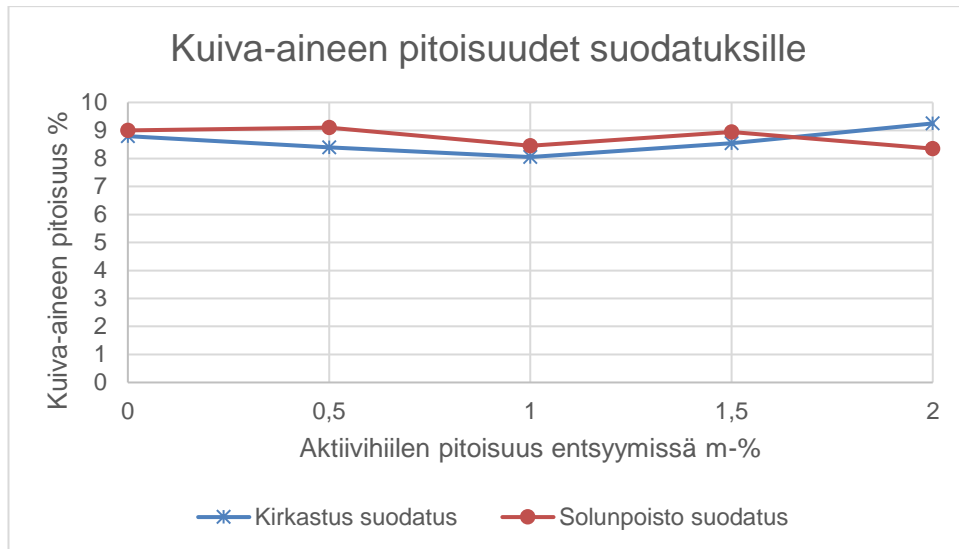
Värien mittauksissa otettiin huomioon vain L^* -arvo, joka kertoo nesteen kirkkaudesta. Kuvan 16 käyrästä nähdään, että aktiivihili ei enää adsorboi liuoksessa olevia väripigmenttejä 1 m-%:n aktiivihiliannostuksen jälkeen. Kahdella viimeisellä aktiivihilien annoksella L^* -arvo oli 96, mikä on todella lähellä puhtaan veden arvoa.



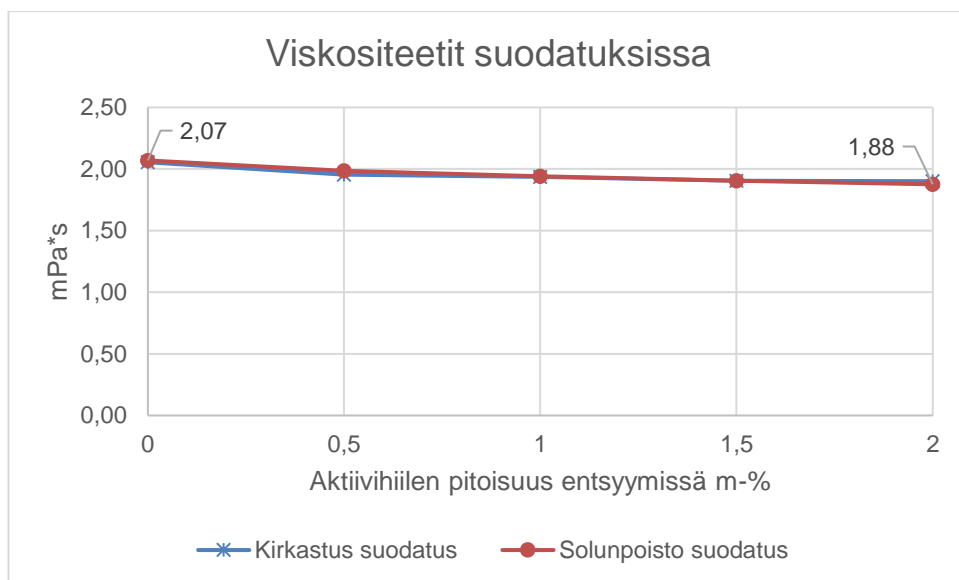
Kuva 16. Kirkastussuodatuksen jälkeen mitattu L*-arvo aktiivihillen pitoisuuden funktiona.

Kuiva-ainepitoisuutta mitattiin suodatusten jälkeen ja se pysyi tasaisena n. 8 %:n ja 9 %:n välissä (kuva 17.), mutta painesuodatuksen käyrä oli hieman korkeammalla kuin kirkastussuodatuksen käyrä, koska soluerottelun kangas ei suodattanut kokonaan aktiivihiltä pois. Ero ei kuitenkaan ollut suuri.

Viskositeetti laskee aktiivihillen määrän kasvaessa (kuva 18), mutta solunpoiston ja kirkastuksen tuloksilla ei ollut eroja. Viskositeetin arvo putoaa enimmillään vain 0,19 mPa*s.



Kuva 17. Kuiva-aineen pitoisuudet solunpoiston jälkeen ja kirkastussuodatuksen jälkeen aktiivihiiilen pitoisuuden funktiona.



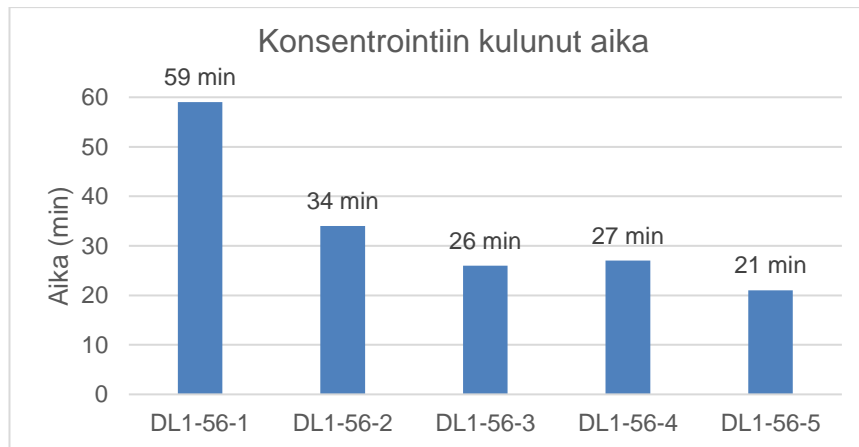
Kuva 18. Viskositeetti solunpoiston jälkeen ja kirkastussuodatuksen jälkeen aktiivihiiilen pitoisuuden funktiona.

8.2 Konsentroidi

Työtä jatkettiin kokeista DL1-56-1–DL1-56-5 konsentroidimalla niitä 2,5-kertaiseen pitoisuuteen ja mittaamalla niistä väri, kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti uudestaan, sekä vertaamalla niitä suodatuksista saatuihin tuloksiin. Jokaisen kokeen annos oli painoltaan 400 g, jotta tuloksista voitaisiin ottaa aikaa ja vertailla keskenään.

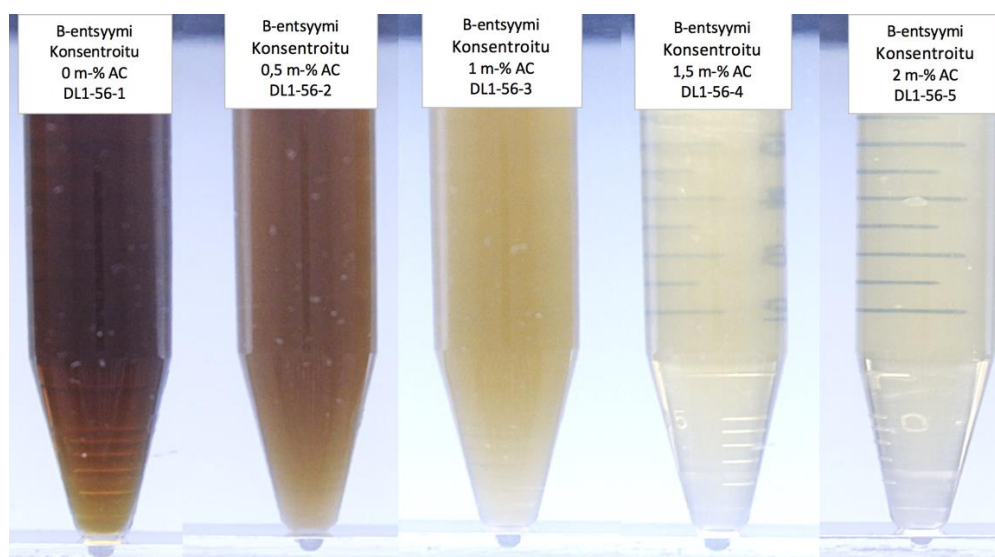
8.2.1 Konsentroidinnin aikaerot

Kuvan 19 pylvästaulukosta havaittiin, kuinka konsentroidinti nopeutui selkeästi, mitä suurempi määrä aktiivihiltä oli entsyymiin lisätty. Pelkästään jo 0,5 m-%:n aktiivihilen pitoisuudella saatiin konsentroiditumisaika melkein puolet nopeammaksi.



Kuva 19. Konsentroidintiajat kokeille DL1-56-1...5.

Näytteistä nähdään konsentroidinnin jälkeen entsyymiliuoksissa selkeä tummeneminen ja sameneneminen (kuva 20). Näytteillä oli silti selkeä väriero ja DL1-56-4 sekä DL1-56-5 olivat konsentroidinninkin jälkeen hyvin kirkkaita. Sameus ei kuitenkaan vaikuttanut Konica Minolta CM-5 -spektrofotometrillä mitattuihin L*-arvoihin, koska jokainen näyte oli suodatettu ruiskusuodattimen läpi ennen mittauksia.

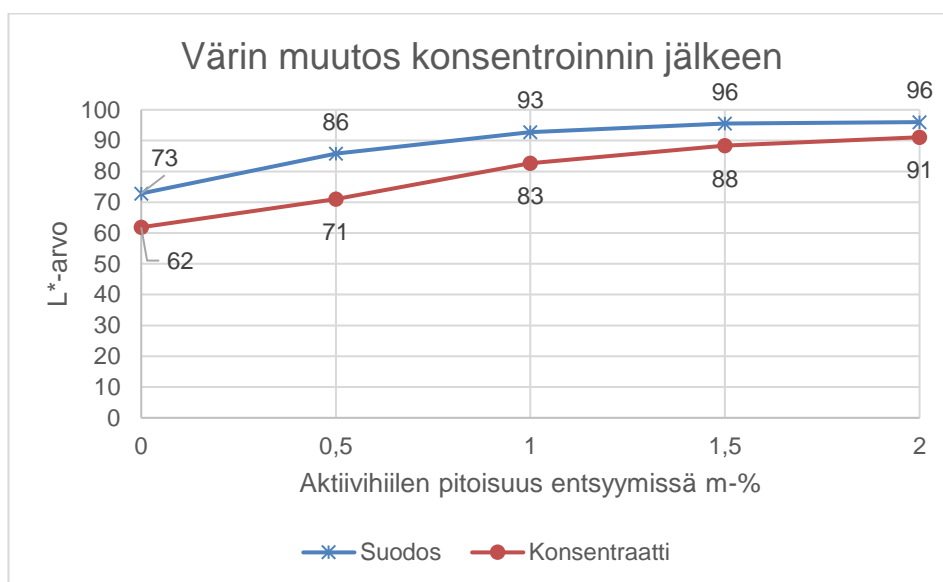


Kuva 20. Koekeiden DL1-56-1...5 valokuva konsentroidinnin jälkeen.

8.2.2 Mittaustulokset ja niiden erot eri koevaiheissa.

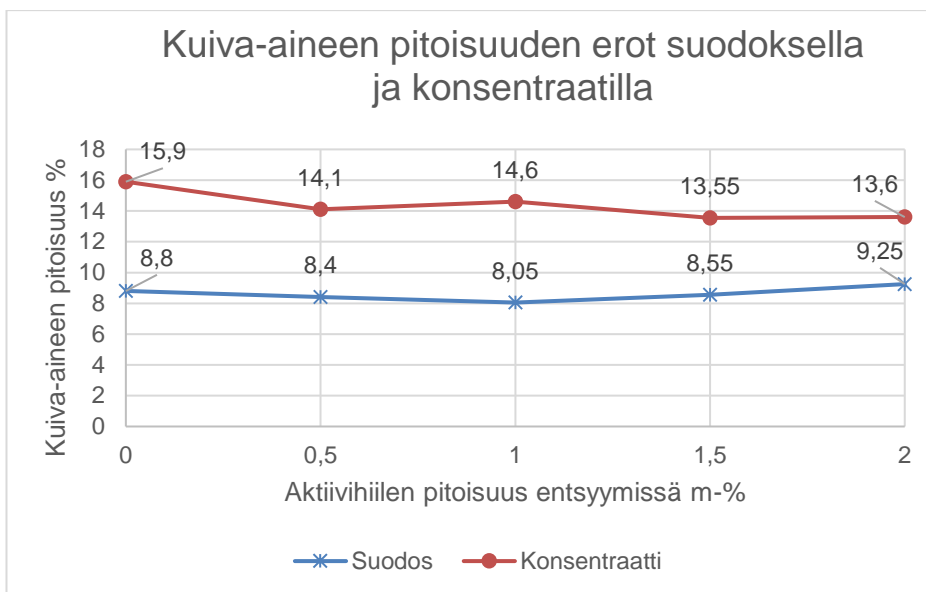
Konsentroitujen ja suodosten mittaustulosten vertailulla oli tarkoitus selkeyttää mittakaavan hahmottamista ja sitä, kuinka paljon aktiivihillen vaikutus entsyymiliuoksessa muuttuu, kun neste konsentroidaan.

Kuvan 21 käyristä nähtiin, että konsentroinnin jälkeen jokaisen näytteen L*-arvo laski, mutta laskuerot eivät olleet jokaisella näytteellä yhtä suuret. Otetaan esimerkiksi DL1-56-1 eli referenssi, jonka L*-arvo laski konsentroinnin jälkeen 11 yksikköä. Mutta viimeisellä näytteellä (DL1-56-5) L*-arvo laski vain viisi yksikköä, eli yli puolet vähemmän kuin referenssillä. Aktiivihilli annoksella 2 m-%:n entsyymiliuos pysyi melkein yhtä värittömänä ja kirkkaana kuin kirkastussuodatuksen jälkeen.



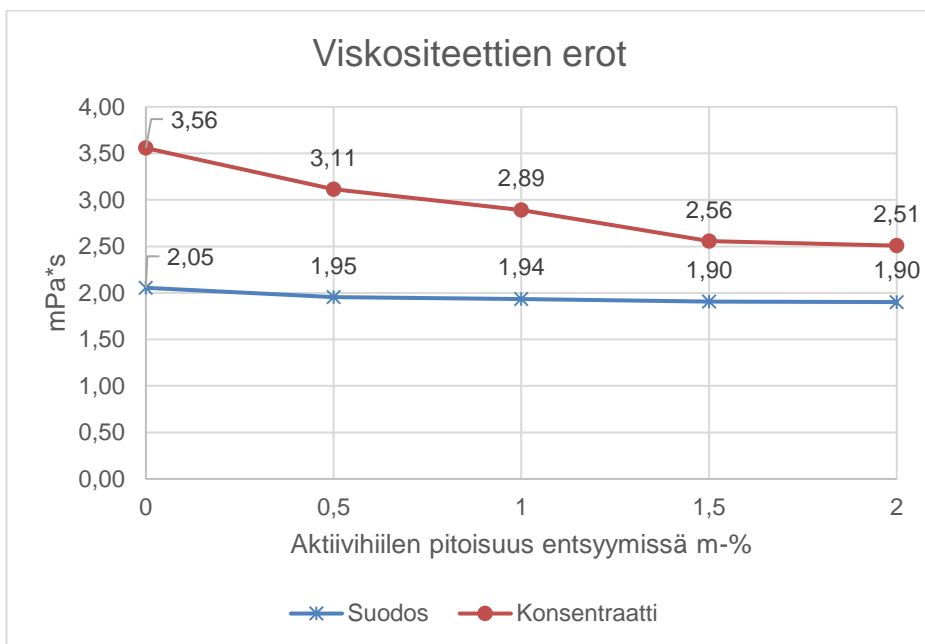
Kuva 21. Konsentraatin ja suodoksen värin L*-arvot aktiivihillen pitoisuuden funktiona.

Konsentraatissa aktiivihillen pitoisuuden vaikutus kuiva-aineeseen ja viskositeettiin oli selkeämpi. Kuiva-aineen pitoisuus (kuva 22) laski suurimmillaan jopa 2,3 %:a referenssiin verrattuna, kun taas ennen konsentroitua aktiivihillen pitoisuuden vaikutusta ei näkynyt kuiva-aineen pitoisuuksissa.



Kuva 22. Kuiva-aineen pitoisuuksien erot suodoksella ja konsentraatilla eri aktiivihiilen pitoisuuden funktiona.

Viskositeetissä huomattiin sama ilmiö kuin kuiva-aineen pitoisuudella. Ennen konsentrointia aktiivihiilen vaikutus entsyymiliuoksen viskositeettiin oli todella pieni ja merkitsemätön, mutta konsentroitua aktiivihiilen vaikutus näytteen viskositeettiin on selkeämpi ja viimeisellä näytteellä (2 m-%) viskositeetti laski 1,05 mPa*s referenssiin verrattuna.



Kuva 23. Konsentraatin ja suodoksen viskositeetti aktiivihiilen pitoisuuden funktiona.

Erässä yksi oli päästy 1 m- %:n aktiivihiihipitoisuudella hyviin värituloksiin, jonka jälkeen värin L*-arvo vain nousi mitä enemmän aktiivihiihtä liuoksessa käytettiin. Aktiivihiihten huomattiin vaikuttavan entsyymiliuoksen kuiva-aineen pitoisuuteen sekä viskositeetin, mikä voi vaikuttaa entsyymin toimintaan ja laatuun liikaa.

9 Toinen erä

Toinen erä oli soluvapaata ja valmiiksi konsentroitua B-entsyymiliuosta. Väripigmentit konsentroituvat saman verran kuin itse entsyymi, joten aktiivihiihtien suuruus mas-saprosentteina piti olla suurempi kuin erässä yksi.

Taulukko 5. Toinen erä konsentroitua B-entsyymiä.

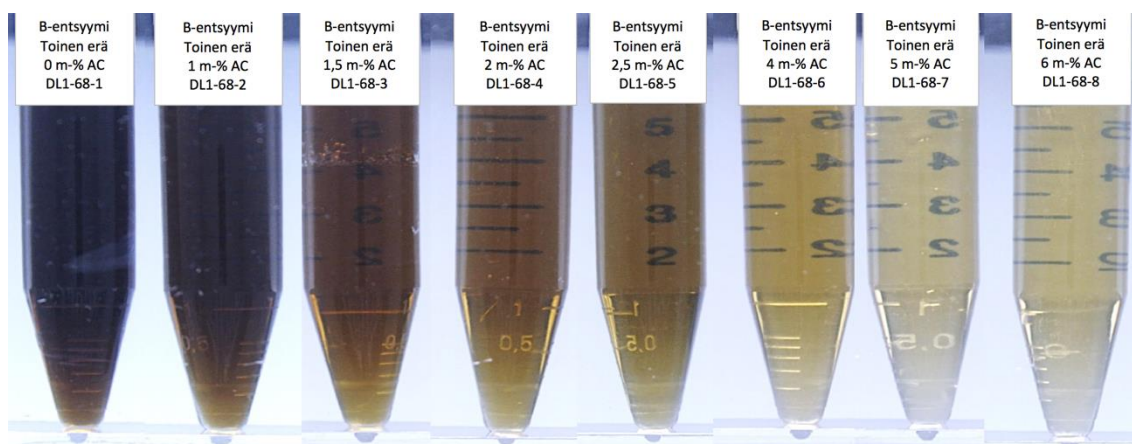
Koe	Aktiivihiihtien-%	B-entsyymi(g)	Aktiivihiihtien(g)
DL1-68-1	0,0	1000	0
DL1-68-2	1,0	1000	10
DL1-68-3	1,5	1000	15
DL1-68-5	2,0	1000	20
DL1-68-7	2,5	1000	25
DL1-68-8	4,0	1000	40
DL1-68-9	5,0	1000	50
DL1-68-10	6,0	1000	60

Valmistettiin taulukon 5:en mukaan 8 koetta käyttäen dekanterilaseja, joissa entsyymiin lisätty aktiivihiihtä sekoitettiin 30 min kylmähuoneessa magneettisekoittimen avulla ja suodatettiin käyttäen vain BECO 170 -pahveja.

Jokaisesta kokeesta mitattiin väri, viskositeetti ja kuiva-aineen pitoisuus, joiden avulla seurattiin aktiivihiihtien vaikutusta. Tuloksia verrattiin ensimmäisen erän kanssa ja tutkittiin, saako aktiivihiihtestä enemmän hyötyä, kun sitä lisätään tässä kohtaa tuotantoprosessia.

9.1 Väri

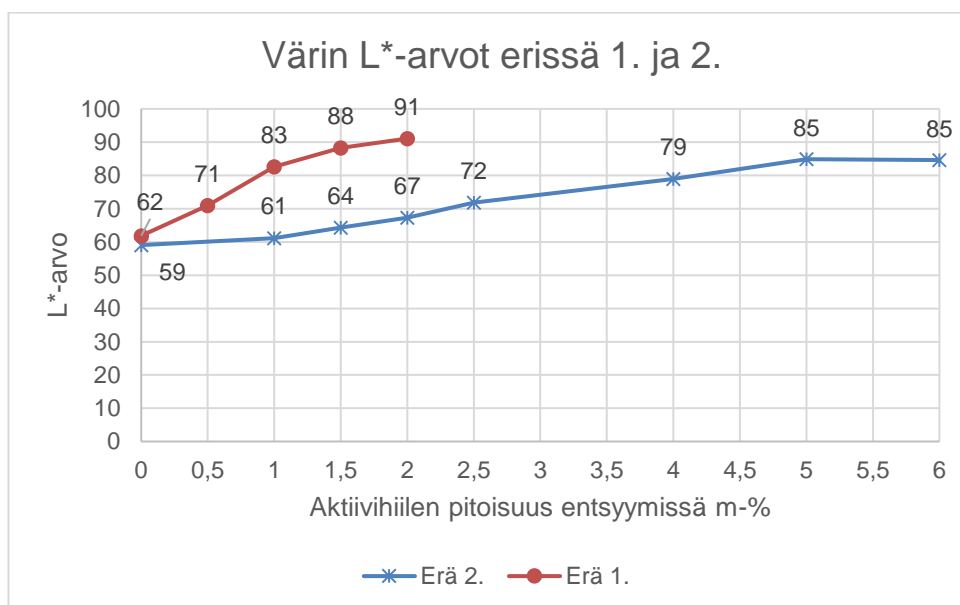
Visuaalisesti kuvasta 24 näkyi, että vasta kokeessa DL1-68-6, joka sisälsi 4 m- % aktiivihiihtä, alkoi värin tummuus vähentyä selvästi.



Kuva 24. Toisen erän B-entsyymi näytteet DL1-68-1–DL1-68-10.

Värin kuvaajasta (Kuva 25) havaitaan, että toisen erän L^* -arvo nousi 5 m-% annostukseen saakka, jonka jälkeen se pysyi vakiona. Eli hiilen väripigmentin adsorptiokyvyn huippu oli saavutettu.

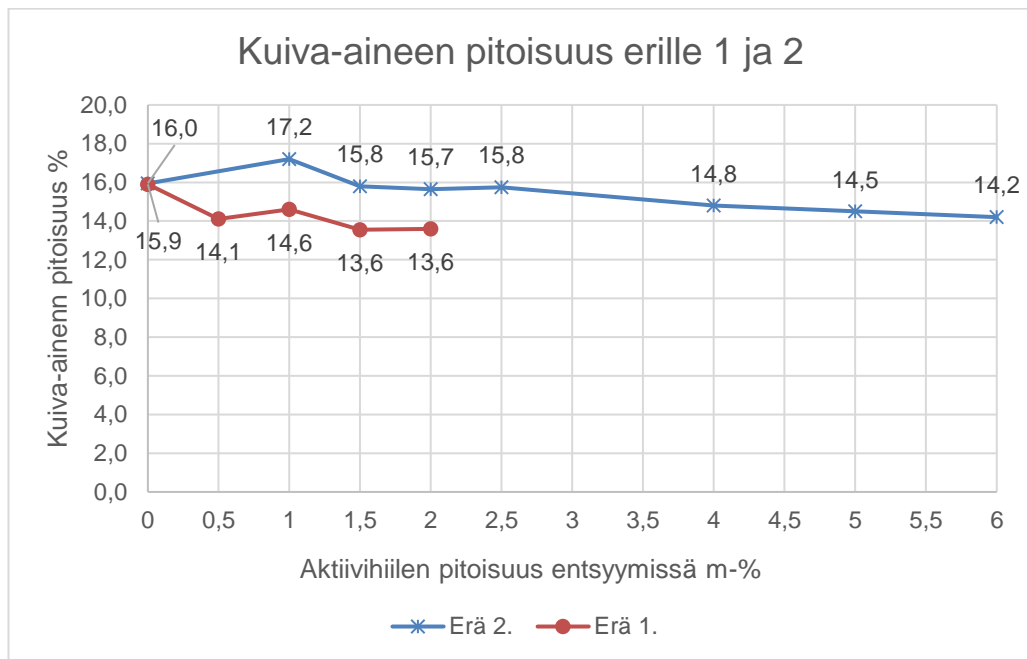
Tuloksista voitiin päätellä, että konsentroidun B-entsyymiliuoksen väripigmentit olivat sitoutuneet tiukemmin entsyymiin. Voi olla, että pidempi käsittelyaika aktiivihieillä voisi ehkä parantaa L^* -arvoa, mutta 30 min sekoituksessa 5 m-%:n annostuksella päästiin korkeimpaan L^* -arvoon, eikä annoksen suurentaminen enää näyttänyt auttavan.



Kuva 25. Värin L^* -arvon mittaukset ensimmäiselle ja toiselle erälle aktiivihieilipitoisuuden funktiona.

9.2 Kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti

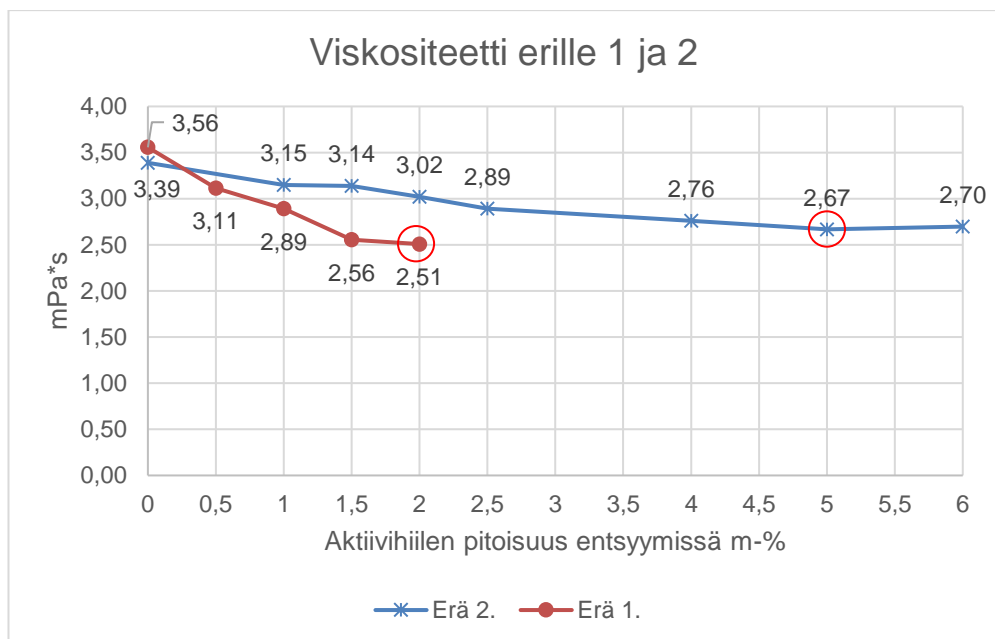
Kuiva-aineen pitoisuudessa näkyi toisella erällä samankaltainen laskeva trendi kuin ensimmäisessä erässä (kuva 26), aktiivihiihen annoksen suurenemisesta seuraa kuiva-aineen pitoisuuden lasku. Aktiivihiihiannoksilla oli konsentraatin kuiva-aineelle selkeästi pienempi vaikutus kuin ensimmäisen erän tuloksilla. Suurimmillaan pitoisuus laski 1,8 % referenssiin verrattuna, eikä todennäköisesti vaikuta entsyymien aktiivisuuteen yhtä paljon kuin ensimmäisessä erässä.



Kuva 26. Kuiva-aineen pitoisuuden mittaukset ensimmäisessä ja toisessa erässä aktiivihiihilitoitoisuuden funktiona.

Viskositeetti käyttäytyi samalla lailla kuin kuiva-aineen pitoisuus, eli käyrä laski, mitä enemmän aktiivihiihiltä oli näytteissä käytetty (kuva 27).

Kun tuloksia verrattiin ensimmäiseen erään, niin todettiin, että viskositeetti käyttäytyy aivan kuten ensimmäisellä erällä. Katsotaan käyristä esimerkiksi 5 m-%:n aktiivihiihen pitoisuus konsentraatilla. Tämän pitoisuus vastaa lähes ensimmäisen erän 2 m-%:n aktiivihiihen pitoisuutta. Kuvaajan (Kuva 27) käyristä ympyröidyistä pisteistä havaittiin, että näiden viskositeetti on melkein sama.



Kuva 27. Viskositeetti mittaukset ensimmäiselle ja toiselle erälle aktiivihiihi pitoisuuden funktiona.

Toisen erän kokeissa saatiin selville, että konsentroidusta B-entsyymistä on huomattavasti vaikeampaa poistaa väripigmenttejä aktiivihiiilen avulla. Suurin L*-arvo saavutettiin vasta 5 m-%:n aktiivihiiilen annoksella, eikä sitä suuremmalla annoksella enää ollut vaikutusta. Kun aktiivihiihiannokset suhteutettiin ensimmäiseen erään, niin huomattiin, että viskositeetti laskee saman verran, mutta kuiva-aineeseen aktiivihiihi ei konsentraatissa vaikuta yhtä paljon kuin fermentorin vierreessä.

10 Kolmas erä

Kolmannessa erässä aktiivihiihlä sekoitettiin stabiloituun B-entsyymiliuokseen. Mittaustuloksista vain värin L*-arvoa vertaillaan edellisten erien tuloksiin, koska entsyymien stabiilointi vaikuttaa kuiva-ainepitoisuuteen ja viskositeettiin huomattavasti.

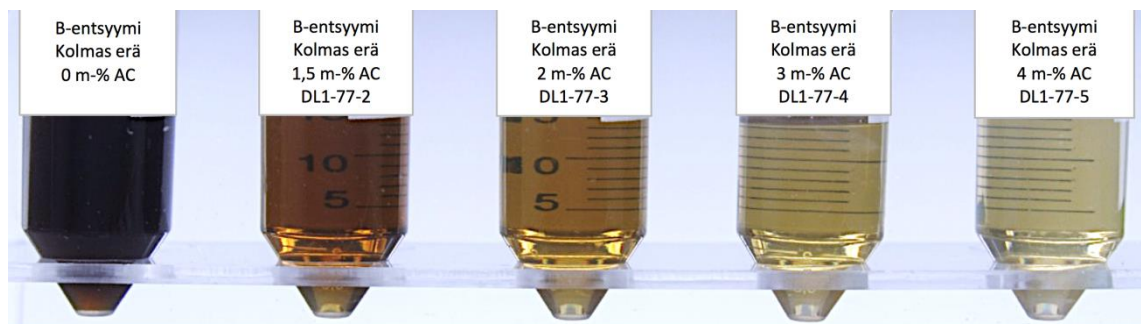
Aktiivihiihiannokset tehtiin taulukon 6:en mukaisesti, jossa jokaisen erän annos on 600 g:a ja suodatus tehtiin kuten edellisissä erissä. Suodatuksessa käytettiin BECO 170 -suodatinpahveja ilman piimaan lisäystä.

Taulukko 6. Erä kolme, stabiloidun entsyymien ja aktiivihiilen annostukset.

Massat (g):			
Koe	Aktiivihiilen-%	B-entsyymi	Aktiivihiili
DL1-77-1	0,0	600	0
DL1-77-2	1,5	600	9
DL1-77-3	2,0	600	12
DL1-77-4	3,0	600	18
DL1-77-5	4,0	600	24

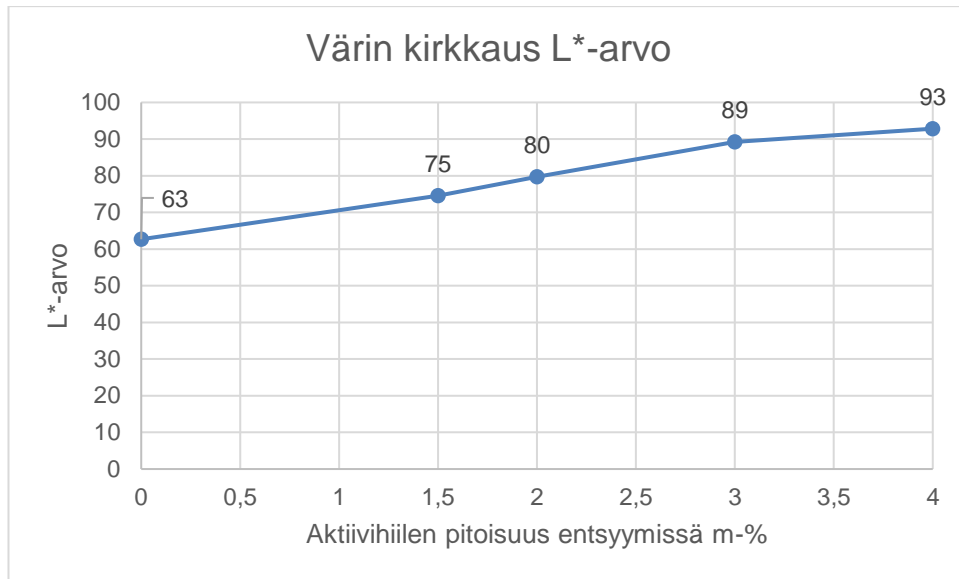
Jokainen näyte punnittiin dekantterilasiin ja sekoitettiin 30 min magneettisekoittimen avulla kylmähuoneessa, minkä jälkeen aktiivihiili suodatettiin pois ja näytteistä mitattiin värin L*-arvoa, mutta vain kolmesta ensimmäisestä kokeesta mitattiin kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti.

10.1 Väri



Kuva 28. Kolmannen erän näytteet DL1-77-1...5.

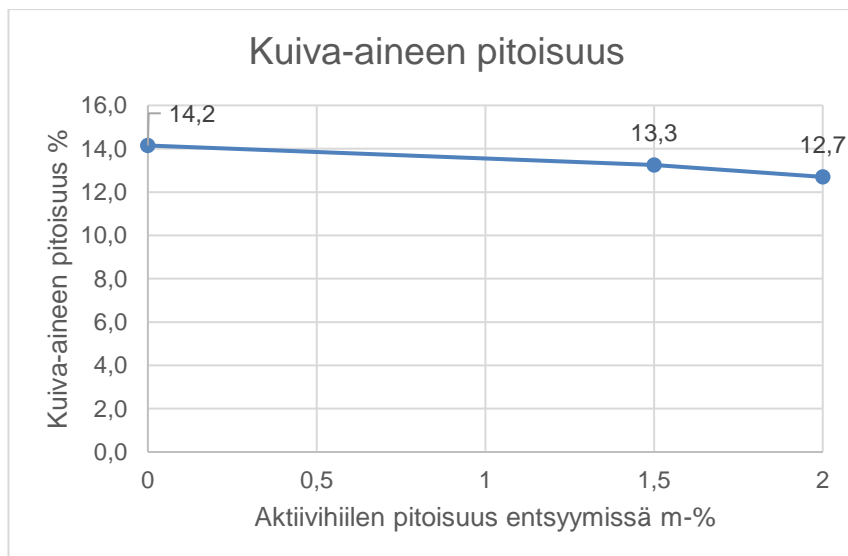
Aktiivihiili saa värin pois stabiloidusta entsyymiliuoksesta huomattavasti helpommin kuin erässä kaksi, jossa B-entsyymiliuos oli konsentroitunut, mutta ei stabiloitu. Visuaalisesti (Kuva 28) nähdään sitä selkeämpi väriero referenssiin verrattuna, mitä isompi aktiivihiilen annos oli näytteeseen lisätty. Seuraavasta esitetystä kuvaajasta (kuva 29) huomataan, että entsyymiliuoksen väripigmentit sitoutuvat aktiivihiileen hyvin. Aktiivihiilipitoisuudella 4 m-% päästään jo melkein värittömään nesteeseen, jolla L*-arvo on yli 90.



Kuva 29. Kolmannen erän näytteistä mitatut L*-arvot aktiivihiiilen pitoisuuden funktiona

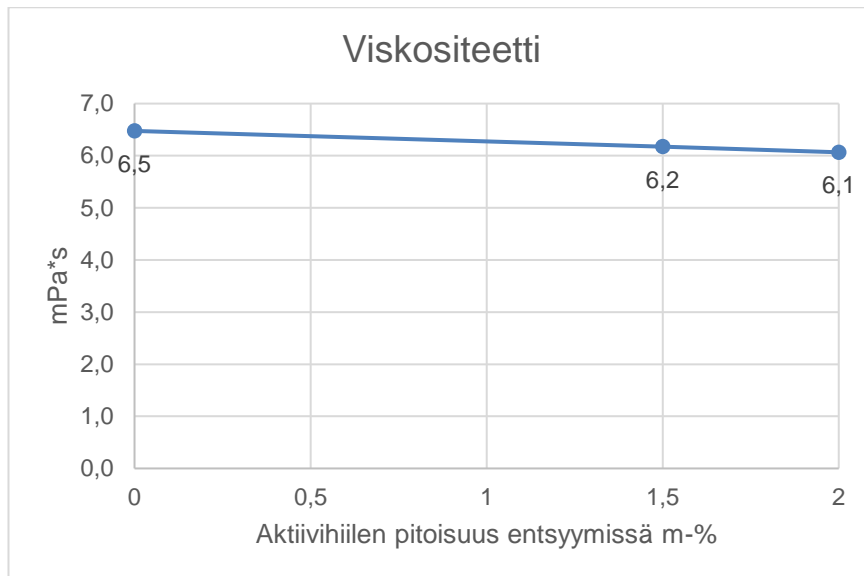
10.2 Kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti

Mittaukset tehtiin vain 2 m-%:n aktiivihiihiannos näytteeseen saakka. Kuiva-aineen pitoisuus laski kolmannella näytteellä 1,5 %:a, mikä on merkittävä määrä näin pienellä asteikolla ja aktiivihiiilen määrällä. (Kuva 30)



Kuva 30. Kuiva-aineen pitoisuus kolmannessa erässä aktiivihiiilen pitoisuuden funktiona.

Erässä kolme viskositeetti laski vähän 2 m- %:n aktiivihiihen annoksella ja huomataan selkeä laskeva trendi (Kuva 31). Kuten edellisistä eristä oli huomattu, niin voitiin olettaa, että mitä suurempi aktiivihiihi annos entsyymiin lisätään, sitä enemmän viskositeetti ja kuiva-aineen pitoisuus laskevat.

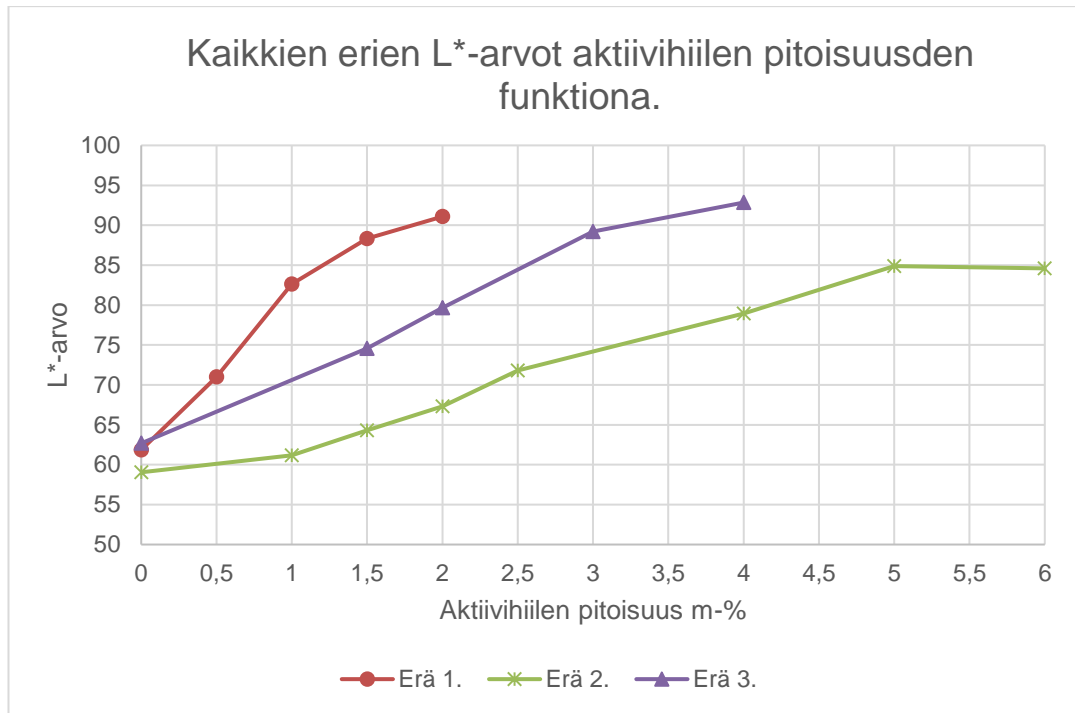


Kuva 31. Viskositeetti kolmannessa erässä aktiivihiihen pitoisuuden funktiona.

11 Yhteenveto

A-entsyymiliuoksella tehtyjen kokeiden avulla määritettiin sopiva aktiivihiihen sekoitus-aika, jonka piti olla mahdollisimman lyhyt, mutta tarpeeksi tehokas poistamaan värin. Lyhyellä sekoitusajalla säästetään aikaa tuotannossa. Kokeissa selvisi, että optimaalisiin sekoitukseen kuluva aika on 30 minuuttia, jonka jälkeen aktiivihiihi ei adsorptoi väripigmenttejä entsyymiliuoksesta, eikä Cielab-spektrofotometrillä mitattu L*-arvo nouse merkittävästi.

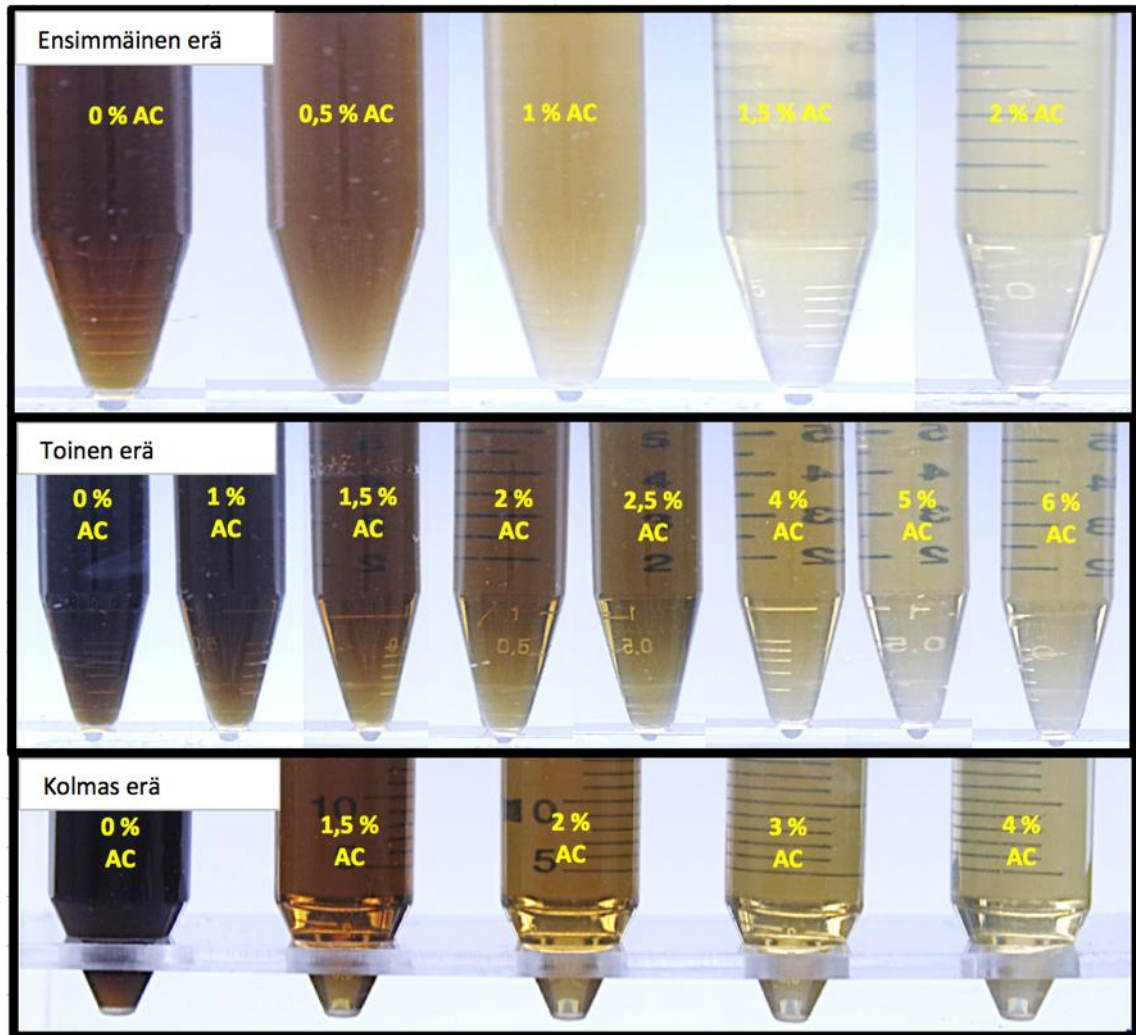
B-entsyymiliuos kokeissa aktiivihiihiltä lisättiin entsyymiliuoksen sekaan kolmessa eri tuotantoprosessin vaiheessa. Ensimmäisessä entsyymierässä aktiivihiihi lisättiin prosessin alussa solujen sekaan. Toisessa erässä aktiivihiihi lisättiin konsentroidin jälkeen ja kolmannessa erässä aktiivihiihi lisättiin valmiiseen tuotteeseen. Jotta tuloksia voitiin vertailla erien 2 ja 3 kanssa, ensimmäiselle erälle suoritettiin solupoisto- ja kirkastussuodatus sekä konsentroidin. Ensimmäistä ja toista erää ei konsentroidin jälkeen stabiloitu. Ainoastaan kolmas erä oli stabiloitua entsyymiliuosta.



Kuva 32. Yhteen vedetty erien L*-arvot aktiivihiihlen pitoisuuden funktiona.

Kuvasta 32 näkee, että parhaimman tuloksen saa, kun aktiivihiihlä lisätään kolmanteen erään, jolloin suurimmalla aktiivihiihlien pitoisuudella saadaan L*-arvoksi 93. Huonoiten väri saatiin pois toisesta erästä, missä 5 m- %:n aktiivihiihlipitoisuuden jälkeen väri ei enää muuttunut ja L*-arvoksi jäi 85:een. Ensimmäisessä erässä väripigmentit saatiin pois hyvin ja 2 m- %:lla saatiin L*-arvoksi 91.

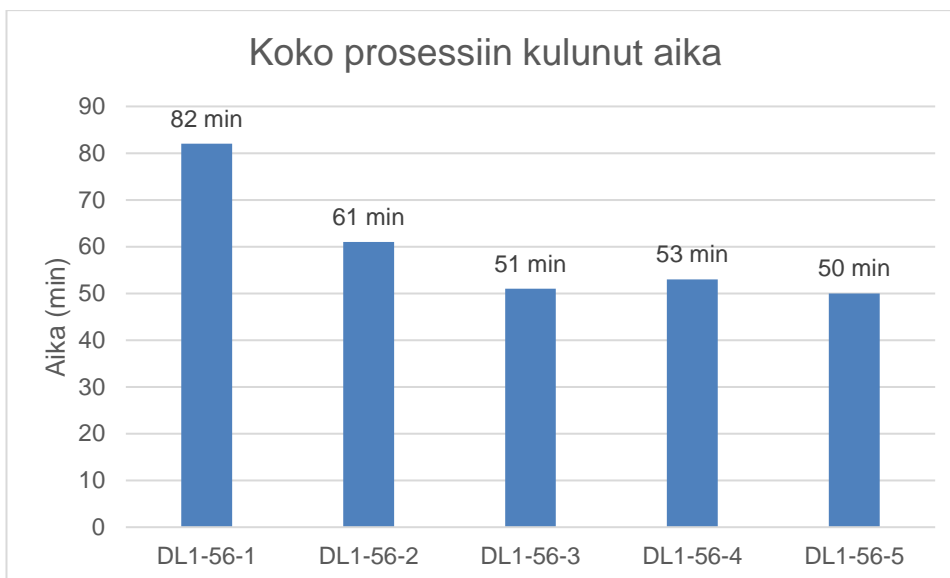
Visuaalisesti kuvasta 33 huomataan, että ensimmäisen erän konsentraatit ovat sameampia kuin muista eristä saadut kokeet. Syynä tähän oli entsyymivierteen liian alhainen pH-arvo, mikä aiheuttaa sameutta, mutta värin mittauksessa sameus ei vaikuta L*-arvoon, joten kuvaajassa (kuva 32) kaikkien erien L*-arvot ovat kelvollisia tuloksia.



Kuva 33. Jokaisen erän loppunäytteiden kuvat, jossa keltaisella näkyy aktiivihiilen annos määrä.

Kokeellisella työllä saatiin selville, että aktiivihiiltä kannattaa tuotannossa lisätä harvesteriin vierteen sekaan samalla lailla kuten erässä 1. tehtiin. Lisäämällä 2 m- % aktiivihiiltä saatiin entsyymiliuoksesta keltainen väri melkein kokonaan pois ja L*-arvoksi 91. Aktiivihiili myös nopeutti entsyymin konsentroitintia 2,8 kertaa nopeammaksi, minkä ansiosta koko simuloitu tuotantoprosessi (Kuva 34) oli nopeampi aktiivihiilen ansiosta. Hiilen lisääminen prosessin alussa myös helpottaa tuotantoa, koska ylimääräisiä suodatuksia ei jouduta tekemään.

Huonona puolena on, että entsyymiliuoksen viskositeetti ja kuiva-aineen pitoisuus laskivat, mikä mahdollisesti vaikutti myös entsyymin rakenteeseen ja sen laatuun. Entsyymivierrettä käsitellään tuotannossa hyvin isoina määrinä, joten 2 % aktiivihiiltä siitä mäsasta on kustannusten kannalta kallista.



Kuva 34. Erässä yksi, jokaiselle näytteelle suodatuksissa ja konsentroinnissa kulunut aika yhdistettynä.

Toinen vaihtoehto on lisätä aktiivihiltä stabiloituun entsyymiliuokseen, kuten erässä kolme tehtiin. Aktiivihillen 4 m- %:n annostuksella saatiin L*-arvoksi 93. Stabiloidun entsyymiliuoksen eli lopputuotteen määrä on huomattavasti pienempi kuin prosessin alussa olevan vierteen, jolloin 4 % siitä massasta ei ole iso määrä, mutta ongelmana on tuotannon hidastuminen ylimääräisen suodatuksen takia, jossa vaarana on myös entsyymiliuoksen laimentuminen ja siitä aiheutuvat ylimääräiset kustannukset.

Huonoin vaihtoehto on lisätä aktiivihiltä konsentroinnin jälkeen (erä 2.), koska korkein saatu L*-arvo oli 85, mikä onnistui vasta 5 m- %:n aktiivihillen annostuksella. Aivan kuten erässä kolme, prosessi hidastuu ylimääräisen suodatuksen takia ja vaarana on myös entsyymien laimentuminen.

Kaikista mittauksista huomattiin, että aktiivihilli laskee liuosten viskositeettia ja kuiva-aineen pitoisuutta. Vaikka laskut olivat pieniä, eivätkä välttämättä vaikuta entsyymiliuoksen lopputuotteeseen, niin tieto on silti arvokasta ja hyvä ottaa huomioon.

Tämän työn tärkeimmät päätavoitteet saavutettiin, mutta aihe vaatii vielä lisätutkimusta. Saadut tulokset tarjoavat hyvän pohjan jatkotutkimukselle, jossa voitaisiin selvittää entsyymien vanhentumisen ja lämpötilan vaikutusta väriin. Ongelmana työssä oli rajallinen entsyymien määrän saatavuus kokeita varten, sekä entsyymien säilyvyys, jonka takia B-entsyymiliuos kokeista ei voinut tehdä toistoja.

Lähteet

1. Pulkkinen, Matti. 2010. Aktiivihiihen aktivointi, regenerointi ja käyttö. Insinööriyö. Keski-pohjanmaan Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
2. Activated carbon Properties. 2017. Verkkoaineisto. Chemical Book. <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9418149.htm>. Luettu 21.12.2017
3. Menéndez-Díaza, J. A.; Martín-Gullón, I. 2006. Types of carbon adsorbents and their production. Teoksessa Bandosz, T. (ed.). Activated carbon surfaces in environmental remediation (Interface science and technology series, 7) 2006, s. 1–48. ELSEVIER.
4. Harris, Peter; Liu, Zheng; Suenaga, Kazu. 2008. Imaging the atomic structure of activated carbon. Verkkoaineisto. Iopscience. <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/20/36/362201/meta>> 12.8.2016. Luettu 21.12.2017.
5. Boren, Esa. 2015. Entsyymit. Oppimateriaali verkossa. Otavan opisto. <http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi2/02_solun_biomolekyylit/05_entsyymit>.
6. Bhav, Patel. 2014. Commercial applications of enzymes. Verkkoaineisto. Sciencenutshell. <<http://www.sciencenutshell.com/commercial-applications-enzymes/>>. Päivitetty 27.9.2014. Luettu 2.1.2018.
7. Roal Oy:n rehuentsyymit. 2018. Yrityksen verkkoaineisto. Roal Oy <http://www.roal.fi/tuotteet_ja_osaaminen/rehuentsyymit.html>. Luettu 2.1.2018.
8. Roal yritysesittely. 2017. Yrityksen sisäinen dokumentti. Luettu 18.4.2018
9. Mastersizer ohjelmisto. Partikkelimitaus laitteen ohjelmiston antama kuvaaja.
10. Hiltunen, Salla. 2007. Proteiinien erotus ultrasuodatuksella. Tekniikan kandidaatintyö. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Doria-tietokanta.
11. Lutz, Herb. 2015. Ultrafiltration for Bioprocessing. E-kirja. Elsevier.
12. Spectrofotometer CM-5 Instructin manual. Konica Minolta. Valmistajan tarjoama laitteen käyttöohjeet.
13. McClements, David. 2009. CHAPTER 4 – Biopolymers in food Emulsions. Teoksessa Modern Biopolymer Science. 2009, s. 129–166. Academic press.
14. Stabinger Viscometer™ Series. 2017. Laitteen esite, s. 4.

15. Ohaus MB23-25. Quick start guide. Käyttöohje.

Työohje A-entsyymiliuoksen kokeet 30 minuutin ja 120 minuutin sekoitusajoilla

Työssä käytetään 50 ml:n kokoisia Falcon-koeputkia 9 kpl yhdelle sekoitusajalle. Asetetaan yksi koeputki kerrallaan vaa'alle ja taulukon 1 mukaan lisätään entsyymiliuosta sekä aktiivihiilijauhetta.

Taulukko 1. Massat.

Näyte	Aktiivihiilen ² pitoisuus ¹ (m-%)	Entsyymin ² massa ¹ (g)	Aktiivihiilen ² massa ¹ (g)
1	0,0	40	0,0
2	0,5	40	0,2
3	1,0	40	0,4
4	1,5	40	0,6
5	2,0	40	0,8
6	2,5	40	1,0
7	3,0	40	1,2
8	3,5	40	1,4
9	4,0	40	1,6

Jotta sekoitusaika olisi kaikilla näytteillä yhtä pitkä, pitää ottaa suodatukseen kuluva aika huomioon. Suodatukseen kuluva aika on asetettu 15 minuutiksi, eli tämän perusteella aloitetaan näytteestä 2 ja 15 min välein asetetaan seuraava näyte sekoittimeen (taulukko 2). Näytettä 1 eli referenssiä ei tarvitse sekoittaa.

Jokaisen näytteen annetaan sekoittua 30 min 12°C lämpötilassa koeputkisekoittimessa, ja suodatetaan suppilon ja pumpun avulla käyttäen Millipore MF™-membrane filters -pahvia, jonka huokoskoko 0,45 µm:ä.

Taulukko 2. Esimerkki, missä järjestyksessä näytteet asetetaan sekoittimeen ja otetaan pois sekoittimesta.

Sekotus aika 30 min		
Sisään	Näyte	Ulos
8:00	2	8:30
8:15	3	8:45
8:30	4	9:00
8:45	5	9:15
9:00	6	9:30
9:15	7	9:45
9:30	8	10:00
9:45	9	10:15

Suodatuksen jälkeen näytteistä mitataan samana päivänä väri, viskositeetti, kuiva-aineen pitoisuus, pH ja tiheys.

Sama koe toistetaan, mutta sekoitusaika on 120 min.

Työohje A-entsyymiliuoksen kokeet 2,5 m- %:n aktiivihiiliannostuksella

Työssä käytetään 50 ml kokoisia Falcon-koeputkia, joihin jokaiseen mitataan saman ver-
ran entsyymiä ja jauhemaista aktiivihiiltä vaa'an avulla. Vakiona kaikilla näytteillä on se-
koituslämpötila (12 °C) ja 2,5 m- %:n aktiivihiilen annostus. (Taulukko 1)

Taulukko 1. Entsyymin ja aktiivihiilen määrä.

Näyte	A- entsyymiä (g)	Aktiivihiili (g)
1	40	0
2-8	40	1

Aktiivihiiltä sisältävät näytteiden sekoitusajat esitetään taulukossa 2. Referenssiä, eli
näytettä jossa ei ole aktiivihiiltä, ei sekoiteta ollenkaan.

Taulukko 2. Näytteiden sekoitusajat

Näyte	Aika (min)
1	0 (referenssi)
2	10
3	15
4	20
5	25
6	30
7	40
8	120

Näytteet suodatetaan suppilon ja pumpun avulla käyttäen Millipore MF™-membrane fil-
ters -pahvia, jonka huokoskoko on 0,45 µm. Niistä mitataan pelkästään väri.

Työohje B-entsyymiliuoksen ensimmäinen erä

Kokeita tehdään yhteensä 5 kpl, josta jokainen koe aluksi suodatetaan Larox-kankaan läpi, sen jälkeen suodatetaan uudestaan BECO 170 -pahvien läpi ja lopuksi konsentroidaan 2,5-kertaiseksi.

Jokaisella kokeella vakiona on lämpötila ja sekoitusaika. Ainoastaan aktiivihilipitoisuudet muuttuvat.

Aktiivihili pitoisuudet, piimaata ja entsyymit mitataan taulukon mukaisesti vaa'an avulla dekantterilasiin, ja sekoitetaan magneettisekoittimella 30 min jääkaapissa.

Koe	Massat (g):			
	Aktiivihilien määrä	B-entsyymi	Piimaa	AC
1	0,0	1000	40	0
2	0,5	1000	40	5
3	1,0	1000	40	10
4	1,5	1000	40	15
5	2,0	1000	40	20

Ensimmäisessä suodatuksessa käytetään larox-kangasta, jolla suodatetaan entsyymin solut pois ja piimaan tarkoitus on nopeuttaa suodatusta. Kangas leikataan oikean kokoiseksi ja asetetaan Seitzin-suodattimeen. Suodatukseen kulunut aika otetaan ylös ja näytteistä mitataan väri, kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti.

Samalle näytteelle tehdään uusi suodatus, tällä kertaa piimaata ei enää käytetä. Samalla suodattimella suodatetaan, mutta BECO 170 -suodatuspahvilla, jonka tarkoitus on saada entsyymistä kirkasta ja suodattaa aktiivihili kokonaan pois. Suodatukseen kulunut aika otetaan ylös ja kokeista mitataan väri, kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti.

Suodatusten jälkeen puhdas näyte konsentroidaan kahdella Sartorius Vivaflow 200 -moduulilla, joiden kalvon läpäisykoko on 10 000 Da. Konsentroiintiin kulunut aika otetaan ylös ja näytteistä mitataan väri, kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti.

Kaikkien kokeiden mittaustulokset, sekä mitatut ajat vertaillaan keskenään.

Työohje B-entsyymiliuoksen toinen erä

Kokeita tehdään yhteensä 8 kpl. Tarkoituksena on lisätä eri aktiivihiihiannoksia valmiiksi konsentroituihin entsyymiliuokseen ja suodattaa se puhtaaksi.

Aktiivihiihen vaikutusaika entsyymiliuoksessa on 30 min ja sekoitus tehdään jääkaapissa.

Jokaiseen näytteeseen lisätään 1000 g:a entsyymiliuosta ja alla näkyvän taulukon mukainen aktiivihiihimäärä.

Koe	Aktiivihiihiän-%	B-entsyymi(g)	Aktiivihiihi(g)
1	0,0	1000	0
2	1,0	1000	10
3	1,5	1000	15
4	2,0	1000	20
5	2,5	1000	25
6	4,0	1000	40
7	5,0	1000	50
8	6,0	1000	60

Kaikki näytteet, paitsi referenssi (näyte 1), suodatetaan Seitzin- suodattimella, jossa suodatuspahvina käytetään BECO 170.

Suodoksista mitataan väri, kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti.

Työohje B-entsyymiliuoksen kolmas erä

Kokeita tehdään yhteensä 5 kpl. Tarkoituksena on lisätä eri aktiivihiliannoksia valmiiksi stabiloituun entsyymiliuokseen ja suodattaa se puhtaaksi.

Aktiivihilien vaikutusaika entsyymissä on 30 min ja sekoitus tehdään jääkaapissa.

Jokaiseen näytteeseen lisätään 600 g:a entsyymiliuosta ja alla näkyvän taulukon aktiivihili määrä.

Koe	Aktiivihiliin-%	Entsyymi(g)	Aktiivihili(g)
1	0,0	600	0
2	1,5	600	9
3	2,0	600	12
4	3,0	600	18
5	4,0	600	24

Kaikki näytteet, paitsi referenssi (näyte 1), suodatetaan Seitzin- suodattimella, jossa suodatuspahvina käytetään BECO 170.

Suodoksista mitataan väri, kuiva-aineen pitoisuus ja viskositeetti.

A-entsyymiliuoksen sekoitusajan tarkennuskokeiden mittaustulokset

Aika (min)	Väri L*	toisto L*	toisto L* 2	Vapausaste	Keskihajonta
0	66,40	66,4	66,34	2	0,04
10	76,93	77,00	74,91	2	1,19
15	78,54	77,57	77,10	2	0,73
20	78,41	77,87	76,79	2	0,83
25	79,72	77,55	78,65	2	1,09
30	81,14	78,33	78,57	2	1,56
40	80,06	78,57	78,53	2	0,87
120	80,62	79,43	81,18	2	0,89

Vapaus aste	2	v_i
Koevirheen vapausasteet	16	v_e

S_e	0,99
-----	------

