

Opinnäytetyö (YAMK)

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2020

Pauliina Prokkola

**NIR- JA RAMAN-
TEKNOLOGIOIDEN
SOVELTUVUUS ENTSYYSMIEN
KITEYTYS- JA
SAOSTUSPROSESSIEN
MONITOROINTIIN**

Pauliina Prokkola

NIR- JA RAMANTEKNOLOGIOIDEN SOVELTUVUUS ENTSYMIEN KITEYTYS- JA SAOSTUSPROSESSIEN MONITOROINTIIN

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli arvioida NIR- ja raman-spektroskopiamenetelmien soveltuvuutta entsyymien kiteytys- ja saostusprosessien monitorointiin ja samalla verrata teknologioita toisiinsa. Kokeiden avulla haluttiin selvittää, voidaanko teknologioista saada lisäarvoa näiden prosessien seurannassa.

NIR ja raman ovat laajasti käytettyjä niin tutkimuksessa kuin teollisuudessakin. Menetelmien suurin hyöty on, että näytettä ei tarvitse esikäsitellä ennen mittausta, vaan mittaus voidaan tehdä jopa suoraan prosessista sopivalla anturilla.

Saostus tehtiin pienessä mittakaavassa entsyymillä 1 ja kiteytys entsyymillä 2. Kummastakin prosessista otettiin näytteitä, joista analysoitiin entsyymiaktiivisuus referenssiksi prosesseista mitatuille NIR- ja raman-spektreille. Kiteytetty materiaali käytettiin edelleen liukoisuuskokeisiin, jotka tehtiin koeputkissa. Saostuskokeita tehtiin myös erikseen koeputkissa. Kaikki koeputkinäytteet mitattiin sekä NIR- että raman-laitteistolla. Koeputkinäytteistä mitattujen spektrien ja analysoitujen referenssiarvojen avulla rakennettiin kalibroitimalleja, joita voisi käyttää kyseisten prosessien monitorointiin.

NIR-spektreistä saatiin rakennettua mallit sekä kiteytys- että saostusprosessin liukoiselle aktiivisuudelle. NIR-mittausanturin ongelmien takia kaikkien koeputkikokeiden spektrit mitattiin kyveteissä ja lasiastioissa. Ennen sitä prosesseista oli mitattu spektrit anturilla, joten mallit eivät ennustaneet järkevästi prosesseja erilaisesta mittaustavasta johtuen.

Raman-kalibroitimalli rakennettiin liukoiselle aktiivisuudelle ja se ennusti kiteytysprosessin trendin riittävän hyvin. Sen sijaan saostusprosessille ei saatu rakennettua järkevää raman-kalibroitimallia ja prosessin muutosten todettiin tapahtuvan liian nopeasti raman-spektrien mittausaikaan nähden. Raman-spektrejä tarkastelemalla voitiin kuitenkin saada tietoa esimerkiksi proteiinien rakenteista ja molekyyli muutoksista, joten tutkimukseen raman voisi tässä tapauksessa olla hyödyllinen.

Tulosten perusteella kumpaakin teknologiaa voidaan käyttää kummassakin prosessissa, mutta tässä tapauksessa raman ei tuo lisäarvoa saostusprosessin monitorointiin.

ASIASANAT:

lähi-infrapunaspektroskopia, NIR, raman-spektroskopia, kiteytys, saostus, entsyymi

MASTER'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical Engineering and Biotechnology

2020 | 60 pages

Pauliina Prokkola

FEASIBILITY OF NIR- AND RAMAN TECHNOLOGIES FOR MONITORING OF ENZYME CRYSTALLIZATION AND PRECIPITATION PROCESSES

The aim of this thesis was to assess the feasibility of raman- and NIR-technologies for monitoring of enzyme crystallization and precipitation process but also to compare the technologies. The tests were carried out to see, if these technologies could add value for monitoring the processes in question.

NIR and raman are widely used in the research and industry fields. The biggest advantage of these methods is that samples don't need preparation and with a suitable probe the measurements can be done straight from the process.

The precipitation tests were done with enzyme 1 and the crystallization tests with enzyme 2. Samples were taken to analysis from both of the processes to get reference data for the measured NIR and raman spectrums. The crystallized enzyme material was used further for solubility tests, which were carried out in test tubes. The precipitation tests were also carried out in test tubes. The spectrums of all test tube samples were measured with NIR and raman devices. The analyzed reference values and measured spectrums were used to build calibration models for monitoring of the crystallization and precipitation processes.

The models for soluble activity of the precipitation and crystallization processes were built successfully with measured NIR-spectrums. Due to problems with the NIR probe, the spectrums of the test tube samples were measured in cuvettes and glass vials. As the processes were measured with the probe, the calibration models did not fit due to different measurement methods.

The raman calibration model for soluble activity predicted the trend of the crystallization process sufficiently. Instead, a reasonable raman calibration model for precipitation could not be built and the changes were found to be too quick in the process compared to the measurement time of the raman spectrum. Raman spectrums can provide information for example of protein structures and molecule changes, so raman could be feasible for research purposes in this case.

Results show that both of the technologies are feasible for both of the processes, but in this case raman does not add value for monitoring of the precipitation process.

KEYWORDS:

Near infrared spectroscopy, NIR, raman spectroscopy, crystallization, precipitation, enzyme

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	8
1 JOHDANTO	9
2 LÄHI-INFRAPUNASPEKTROSKOPIA (NIRS)	10
2.1 Periaate	10
2.2 Mittaaminen	11
2.3 Spektrien käsittely	13
2.4 Sovellukset	14
3 RAMAN-SPEKTROSKOPIA	15
3.1 Periaate	15
3.2 Mittaaminen ja spektrin käsittely	16
3.3 Sovellukset	17
3.4 Proteiinien ja polysakkaridien komplekseista	19
4 MALLINTAMINEN	21
4.1 Yhden muuttujan mallinnus	21
4.2 Monimuuttujamallinnus	22
4.3 Mallien validointi	22
4.3.1 Sisäinen validointi	22
4.3.2 Ulkoinen validointi	23
5 KITEYTYSPROSESSI	24
5.1 Periaate	24
5.2 Proteiinien kiteytys	25
5.3 Muut sovellukset	26
6 SAOSTUSPROSESSI	27
6.1 Periaate	27
6.1.1 Agglomeraatio	27
6.1.2 Kypsyminen	28
6.2 Sovellukset	28

7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
7.1 Laitteistot	30
7.2 Saostuskokeet koeputkissa	32
7.3 Saostus pienessä mittakaavassa	34
7.4 Liukoisuuskokeet koeputkissa	35
7.5 Kiteytys pienessä mittakaavassa	36
8 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT	39
8.1 Saostuskokeet	39
8.1.1 Saostuskokeet koeputkissa, raman-mittaukset	40
8.1.2 Saostuskokeet koeputkissa, saostus polysakkaridi B:llä	45
8.1.3 Saostus dekantterilasissa, raman-mittaukset	47
8.1.4 Saostuskokeet koeputkissa, NIR-mittaukset	49
8.1.5 Saostus pienessä mittakaavassa, NIR-mittaukset	50
8.2 Liukoisuuskokeet ja kiteytys	52
8.2.1 Liukoisuuskokeet koeputkissa, raman-mittaukset	52
8.2.2 Kiteytys dekantterilasissa, raman-mittaukset	53
8.2.3 Liukoisuuskokeet koeputkissa, NIR-mittaukset	55
8.2.4 Kiteytys pienessä mittakaavassa, NIR-mittaukset	56
9 YHTEENVETO	58
LÄHTEET	60

KUVAT

Kuva 1. NIR-kombinaatio ja -ylivärähtelyalueet (Roal 2020).	10
Kuva 2. Monokromaattori (lighttrans.com 2020).	11
Kuva 3. Michelsonin interferometri (Larkin, P. 2011:31).	12
Kuva 4. Yleiset raman spektrometrin komponentit a) Dispersiivinen spektrometri ja b) Fourier-muunnos- (FT) spektrometri (Vandenabeele, P. 2013:63).	16
Kuva 5. Bruker MPA-laite NIR-mittauksiin.	31
Kuva 6. Kaiserin raman-laitteisto (kosi.com 2020).	31
Kuva 7. Saostuskomponentit ja entsyymi 1 sekoitettuna koeputkiin: ennen sentrifugointia (alla) ja sentrifugoinnin jälkeen (yllä).	33
Kuva 8. Saostus Reactor-Ready-laitteistolla.	34
Kuva 9. Kiteytys Reactor-Ready -laitteistolla.	37

KUVIOT

Kuvio 1. Valotien pituuden vaikutus etanolin NIR-spektriin. Pystyakselilla absorbanssi ja vaakakselilla aaltoluku (cm^{-1}). (Bruker 2017.).....	13
Kuvio 2. Raman ja Rayleigh-sironta (Larkin, P. 2001).....	15
Kuvio 3. Polysakkaridi A-vesiliuosten raman-spektrit.	41
Kuvio 4. Saostus koeputkissa: näytteiden raman-spektrit ennen sentrifugointia.....	41
Kuvio 5. Saostus koeputkissa: näytteiden supernatanteista mitatut raman-spektrit.....	42
Kuvio 6. Polysakkaridi A:n vesiliuoksen ja saostusputkinäyte 3:n raman-spektrit.	43
Kuvio 7. Raman-spektrit saostuksen koeputkinäytteistä ennen sentrifugointia: eri polysakkaridi A-aktiivisuussuhteet.	43
Kuvio 8. Raman-kalibrointimalli entsyymiaktiivisuudelle.	44
Kuvio 9. Kalibrointimalli ja testinäytteet (siniset pisteet).	45
Kuvio 10. Sentrifugoimattomien polysakkaridi B:llä saostettujen näytteiden raman-spektrit.....	46
Kuvio 11. Polysakkaridi B, suhdeluku 3000. Punainen on sentrifugoimaton näyte ja violetti sen supernatantti.	46
Kuvio 12. Entsyymi 1:n saostus polysakkaridilla A ja B, suhdeluku 4500.	47
Kuvio 13. Saostuksen aikana mitatut raman-spektrit.....	48
Kuvio 14. Saostusputkikokeiden NIR-spektrit.....	49
Kuvio 15. NIR-kalibrointimalli saostusputkikokeiden perusteella.	50
Kuvio 16. Normalisoidut saostusprosessista mitatut NIR-spektrit.....	51
Kuvio 17. Liukoisuuskokeiden perusteella rakennettu raman-kalibrointimalli (piikin integrointi).....	53
Kuvio 18. Liukoisen aktiivisuuden ennuste kiteytysprosessin aikana.....	54
Kuvio 19. Kiteytyksen raman-spektrit.	55
Kuvio 20. Liukoisuusputkikokeista tehty NIR-kalibrointimalli, ristikkäisvalidointi.	56
Kuvio 21. Kalibrointimalli kiteytyksen NIR-spektreistä.	57

TAULUKOT

Taulukko 1. Proteiineille ominaiset raman-siirtymät (Kuhar, N. et al. 2018).	19
Taulukko 2. Koematriisi saostuskokeille koeputkissa, polysakkaridilla A	32
Taulukko 3. Saostus polysakkaridi B:llä, koematriisi.	33
Taulukko 4. Koematriisi liukoisuuskokeille koeputkissa.	36
Taulukko 5. Saostusputkinäytteet.	40
Taulukko 6. Polysakkaridi B, saostusnäytteet.	45
Taulukko 7. Saostus dekantterilasissa.	48
Taulukko 8. Saostus Reactor-Ready-laitteistolla.	51
Taulukko 9. Liukoisuuskokeet putkissa, analyysitulokset.	52
Taulukko 10. Kiteytys dekantterilasissa.	54

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

CCD detector	charge-coupled device, yleinen detektori spektroskopiassa
CSD	Crystal size dimension
FT	Fourier-muunnos (Fourier-transform)
Liukoisuusputket	Koeputket, joissa tehtiin entsyymikiteiden liukoisuuskokeita
MLR	Moninkertainen lineaarinen regressio (Multiple Linear Regression)
NIR(S)	Lähi-infrapuna spektroskopia (near-infra-red spectroscopy)
PLS	Pienimmän neliösumman menetelmä (partial least squares)
RMSEP	residual mean square error of prediction
RMSECV	residual mean square error of cross validation
RPD	Residuaalien ennusteen hajonta (residual prediction deviation)
raman	raman-spektroskopia, perustuu raman-sirontaan
saostusputket	Koeputket, joissa tehtiin saostukseen liittyviä kokeita
SNV	Normalisointiin käytettävä funktio (Standard Normal Variate)
U	Entsyymiaktiivisuuden yksikkö per gramma

1 JOHDANTO

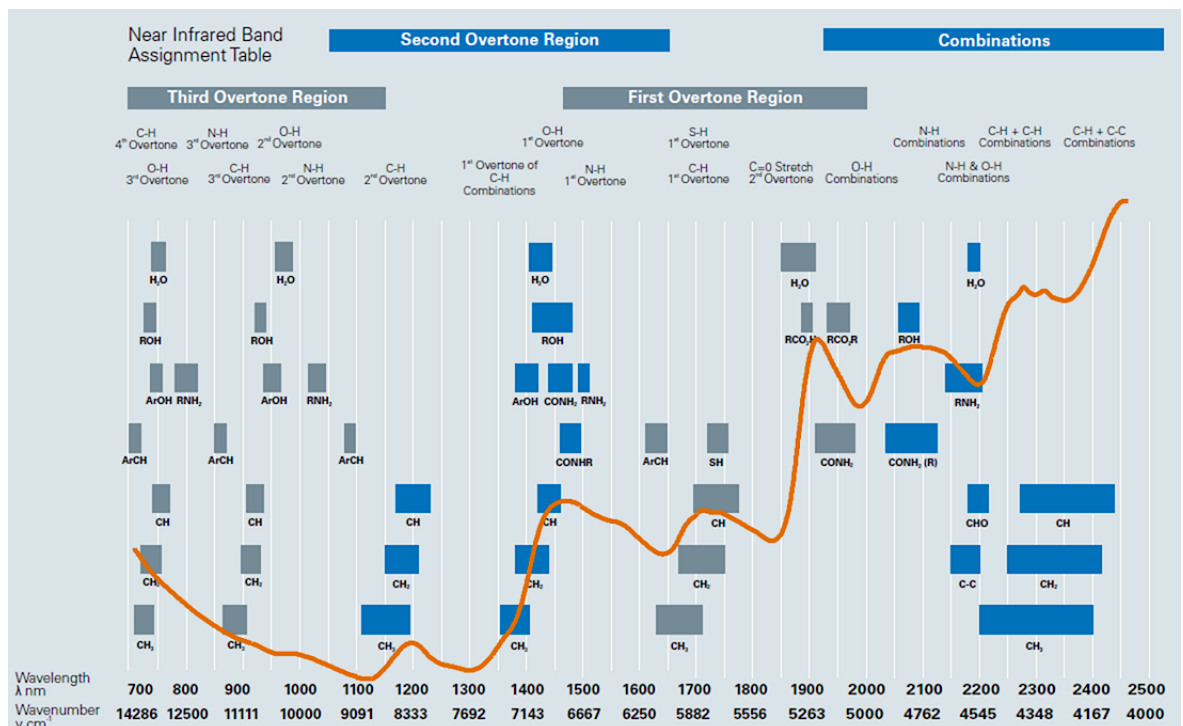
NIR- ja raman-spektroskopiamenetelmiä käytetään laajasti prosessien seurannassa sekä tutkimustyössä, ja niiden soveltuvuudesta erilaisiin prosesseihin on tehty paljon tutkimuksia. Näitä kyseisiä värähtelyspektroskopian menetelmiä käytetään muun muassa tulleissa aineiden tunnistukseen, prosesseissa halutun tuotteen pitoisuuden seurantaan sekä esimerkiksi jätteiden lajittelussa. Kuitenkin tutkittavan aineen ominaisuudet ja sen matriisit vaikuttavat merkittävästi siihen, millä tavoin näitä spektroskopiamenetelmiä voidaan hyödyntää. Menetelmien selkein hyöty on se, että mittauksen voi tehdä suoraan prosessissa tai näytteelle ilman sen suurempaa esikäsittelyä. Mittauksia varten vaaditaan ensin riittävä pohjatyö, jotta menetelmät antavat riittävän hyviä tuloksia. Tarvitaan siis riittävästi näytteitä, joista mitataan referenssimenetelmällä halutut suureet ja niitä vastaan rakennetaan malli, joka lopulta validoidaan mallin ulkopuolisilla näytteillä. Kuitenkin näiden spektroskopiamenetelmien soveltuvuutta voidaan arvioida jo pienemmilläkin näytemäärillä. Lisäksi pelkästään spektrejä tarkastelemalla voidaan saada arvokasta tietoa näytteestä tai prosessista.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata ja verrata NIR- sekä raman-spektroskopiamenetelmien käyttöä entsyymien kiteytys- ja saostusprosessien monitoroinnissa. Koeputkikokeista mitattujen spektrien avulla haluttiin rakentaa kemometrisia NIR- ja raman-ennustemalleja, joita voisi käyttää kyseisten laboratoriomittakaavan prosessien monitoroinnissa. Malleilla tarkoitetaan tässä työssä NIR- ja raman-kalibrointimalleja. Kalibrointimallit tehdään niin, että valituista näytteistä mitataan entsyymiaktiivisuus sekä spektrit kummallakin laitteella, jonka jälkeen tietokoneohjelma etsii spektreistä korrelaatioita mitattuihin arvoihin ja muodostaa kalibrointimallin, joka on käytännössä kalibrointisuora. Sen avulla tuntemattomien näytteiden spektreistä voi tietokoneohjelman avulla laskea entsyymiaktiivisuuden. Mallien rakentamisen lisäksi tarkasteltiin NIR- ja raman-spektroskopiamenetelmien eroja, käyttökelpoisuutta sekä mahdollisia hyötyjä kiteytys- ja saostusprosessien osalta. Kumpaakin prosessia testattiin vain yhdellä entsyymillä, joten soveltuvuus muiden entsyymien osalta on tarkistettava erikseen: saostukseen liittyvät kokeet tehtiin entsyymillä 1 ja kiteytykseen liittyvät kokeet entsyymillä 2.

2 LÄHI-INFRA-PUNASPEKTROSKOPIA (NIRS)

2.1 Periaate

Lähi-infrapunaspektroskopia, jota kutsutaan yleisesti NIR-spektroskopiaksi, perustuu sähkömagneettisen säteilyn absorboitumiseen: Infrapunasäteilyn absorboituminen molekyylien sidoksiin saa ne värähtelemään (Siesler, H. 2002). Jos molekyylin sähköinen dipolimomentti muuttuu värähtelyn aikana, voi molekyyli absorboida infrapunataajuudella. Värähtelytyylejä on monia erilaisia, myös hyvin yksinkertaisilla molekyyileillä. Symmetrinen värähtely on heikompaa kuin epäsymmetrinen värähtely ja näin ollen muun muassa laajasti eri alkuaineryhmiä sisältävät sidokset värähtelevät voimakkaammin. Mitä suurempi dipolimomentin muutos on, sitä voimakkaampi on absorptio. (Stuart, B. H. 2004:29-31.) NIR-spektroskopia mittaa molekyylien laajoja ylivärähtelyalueita sekä yhdistelmäsidoksia ja nämä on esitetty kuvassa 1. (Roal 2020). Koska energia on verrannollinen absorption taajuuteen, joka on verrannollinen aaltolukuun, ylivärähtelyn taajuus on kaksi kertaa perusvärähtelyn aaltoluku. (Stuart, B. H. 2004:31.)

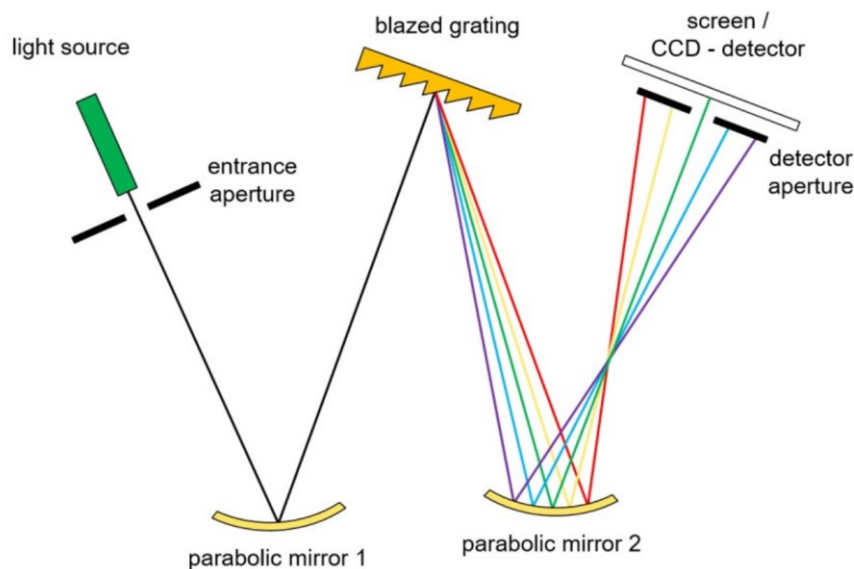


Kuva 1. NIR-kombinaatio ja -ylivärähtelyalueet (Roal 2020).

Tämän opinnäytetyön kannalta kiinnostavimmat värähtelyalueet ovat proteiinialueet, joita löytyy aaltolukualueilta noin 4500–5000 cm^{-1} , 6500 cm^{-1} sekä 10000 cm^{-1} .

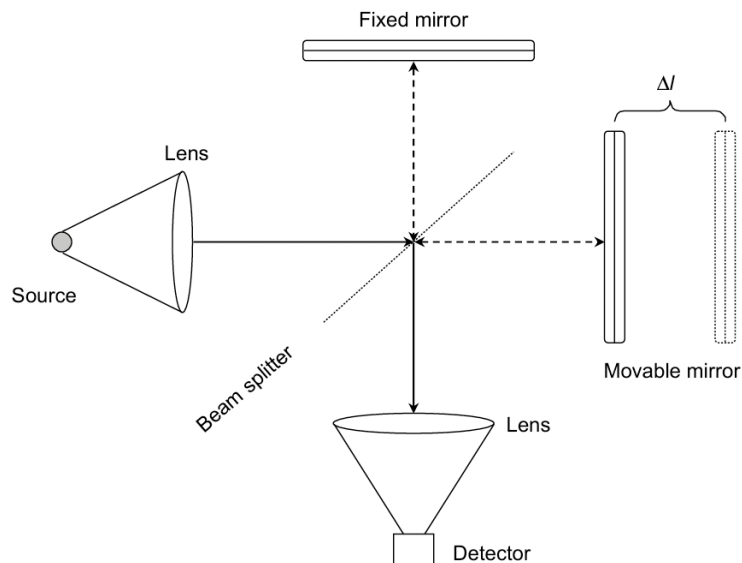
2.2 Mittaaminen

Lähi-infrapuna-absorptiossa emittoitunut valo kerätään ja kohdistetaan laitteeseen, joka erottelee aallonpituudet. Dispersiivisissä spektrometreissä käytetään monokromaattoria ja Fourier-muunnos-laitteissa (FT-) sen sijaan interferometriä. Monokromaattori koostuu useasta osasta: siinä on tulevalle valolle rako, josta valo pääsee diffraktiohilalle, josta se heijastuu peiliin, joka puolestaan keskittää dispersoituneen valon ulostulorakoon. Diffraktiohila voi olla esimerkiksi jokin levy, jossa on rakoja tai uurteita yhtä kaukana toisistaan. Osuessaan hilaan valo dispersoituu eli hajoaa. Monokromaattorin toiminta on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Monokromaattori (lighttrans.com 2020).

Interferometreista yleisin on Michelsonin interferometri, joka sisältää valonsäteen jakajan sekä kiinteän ja liikkuvan peilin. Jakaja jakaa säteen kulkemaan sekä kiinteän että liikkuvan peilin kautta ja palaamaan takaisin jakajan kautta detektorille, jossa valonsäteiden interferenssikuvio havaitaan. (Larkin, P. 2011:27-31.) Toimintaperiaate on esitetty kuvassa 3.



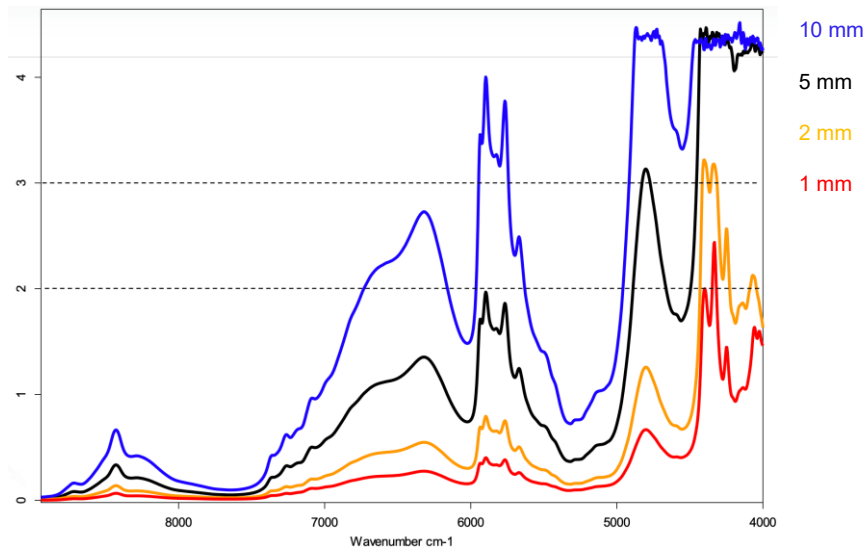
Kuva 3. Michelsonin interferometri (Larkin, P. 2011:31).

FT-laitteissa on monia hyviä puolia verrattuna perinteiseen dispersiiviseen laitteeseen, ja siksi sen suosio on ollut kasvussa (Larkin, P. 2011:27). Esimerkiksi se kerää paljon suuremman määrän fotoneita, havaitsee valon kaikki aallonpituudet kerralla ja siinä on suuri aaltolukutarkkuus, joka tarkoittaa suurempaa resoluutiota. NIR-mittauksessa kerätään yleensä absorptiospektri diffuusio-heijastus- tai transmissiomittauksella. (Siesler H. 2002:61.)

Hyvän spektrin mittaaminen on tärkeintä analysoinnin ja mallinnuksen kannalta ja se saadaan aikaan oikeilla mittaasetuksilla. NIR-mittauksia varten on löydettävä näytteelle sopiva mittaustapa ja valotien pituus. Ne riippuvat näytteen ominaisuuksista kuten olomuodosta, sameudesta tai viskositeetista. Näytteestä riippuen säädetään sopivaksi resoluutio, esivahvistus (preamp gain), mittausaika, signaali-kohinasuhde (S/N) ja taustamittaustapa. Tausta mitataan yleisimmin ilmaa vasten. Resoluutiota muuttamalla voidaan vähentää kohinaa ja saada aikaan nopeampia mittauksia esimerkiksi prosessisovelluksissa. Sitä muutetaan myös, jos signaali on heikko detektorilla tai signaali-kohinasuhde on huono. (Bruker 2017.)

Valotien pituus valitaan näytteen ominaisuuksien ja siitä haluttavan informaation perusteella. Kuvion 1 perusteella nähdään, että kasvattamalla valotien pituutta, spektrin informaatio ja käyttökelpoiset alueet siirtyvät vasemmalle. Totaaliabsorbanssialueita ei voi käyttää spektrin tulkintaan, sillä ne ovat niitä alueita, joilla valo ei päädy ollenkaan detektorille asti. Signaali-kohinasuhteen ollessa lähellä nollaa, on spektri

totaaliabsorbanssialueella. Totaaliabsorbanssin tunnistaa spektrikuvaajassa suuresta kohinasta, kuten alla olevassa kuvassa sininen ja musta spektri absorbanssin ollessa yli 4. (Bruker 2017.)



Kuvio 1. Valotien pituuden vaikutus etanolin NIR-spektriin. Pystyakselilla absorbanssi ja vaaka-akselilla aaltoluku (cm^{-1}). (Bruker 2017.)

2.3 Spektrien käsittely

NIR-spektrejä esikäsitellään ennen mallintamista tai tulkintaa. Ohjelmistosta riippuen käsittelyn voi tehdä alusta loppuun manuaalisesti tai helpotetusti ohjelman valmiiden vaihtoehtojen avulla. Spektreistä pyritään poistamaan kohinaa sekä käsittelemään niin, että spektreissä tapahtuvat muutokset ovat selkeästi havaittavissa. Kohinaksi kutsutaan signaalia, joka ei sisällä mitään relevanttia informaatiota ja sitä esiintyy luontaisesti kaikissa spektroskopian menetelmissä. Kohinaa voivat olla esimerkiksi fluoresenssi ja taustasignaalin häiriöt. Kohina voi pahimmillaan aiheuttaa tulosten vääristymistä. (Vandenabeele, P. 2013:95.) Yleisiä esikäsitelyjä ovat ensimmäinen ja toinen derivaatta sekä normalisointiin käytettävä funktio SNV (standard normal variate). SNV:n avulla normalisoidaan spektri vähentämällä jokaisesta spektristä sen oma keskiarvo ja jakamalla tulos spektrin omalla keskihajonnalla. Käsittelyn jälkeen jokaisen spektrin keskiarvo on 0 ja keskihajonta 1. (RNIR 2020.)

2.4 Sovellukset

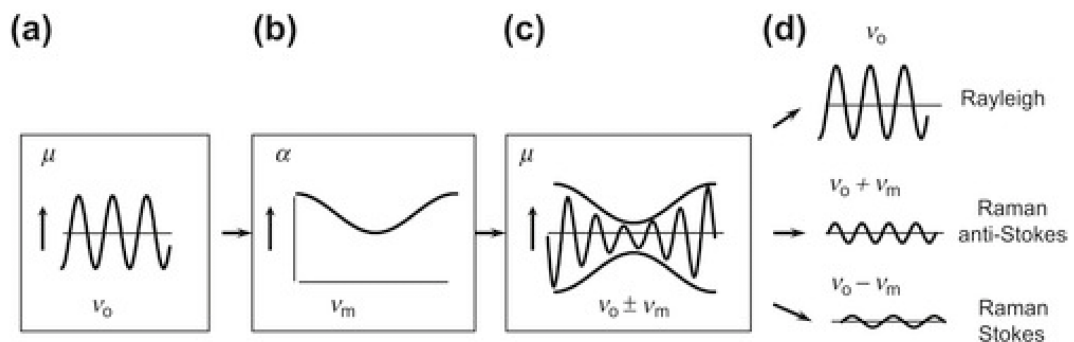
NIR-spektroskopia on laajasti käytetty menetelmä eri kemian sovelluksissa. Menetelmän suurin etu on se, että käytännössä sillä voidaan analysoida minkälaisia näytteitä tahansa (Stuart, B. H. 2004:21). NIR-spektroskopia sopii todella hyvin sekä yksinkertaisten että monimutkaisempien molekyylien tutkimiseen. OH- ja NH-ryhmät sekä niiden ylivärähtelyt ja kombinaatiot näkyvät voimakkaasti juuri NIR-alueella, 14000-4000 cm^{-1} . NIR-spektroskopiaa hyödynnetään esimerkiksi molekyylien vetysidosten tutkimisessa ja näin ollen vesi on ollut NIR-tutkimusten kohteena jo vuosikymmeniä. (Siesler H. 2002:179-198.)

NIR-tekniikkaa hyödynnetään myös polymeeriteollisuudessa raaka-aineiden ladunvalvonnassa sekä itse valmistusprosessissa. Polymeerit ovat rakenteeltaan ihanteellisia NIR-spektroskopialle, sillä niissä on suhteellisen yksinkertainen tukiranka, joka sisältää alifaattisia, olefiinisia tai aromaattisia CH-ryhmiä ja lisäksi funktionaalisia ryhmiä, kuten -CH, -NH, -COOH. NIR on tuonut paljon hyötyä myös polymeerijätteen lajitteluun. NIR-spektroskopialla voidaan erittäin nopeasti tunnistaa erilaiset polymeerit jätevirrasta riippumatta niiden muodosta tai etiketeistä lajittelutarkkuuden ollessa 98-99%. Uudemmat NIR-sovellukset keskittyvät enemmän analyttiseen puoleen, sillä instrumentit ja ohjelmistot ovat kehittyneet ja dataa voidaan käsitellä entistä nopeammin ja useilla eri tekniikoilla, kuten monimuuttujamallinnuksella. Potentiaali on suuri prosessien in-line-mittauksien toteuttamiseen NIR:n avulla niin kemianteollisuudessa kuin maataloudessakin. Yksi esimerkki on petrokemianteollisuus, jossa on onnistuttu parantamaan prosessin stabiiliisuutta sekä sekoitustarkkuutta, joka on tuonut mittavia rahallisia säästöjä. (Siesler H. 2002: 213, 247.)

3 RAMAN-SPEKTROSKOPIA

3.1 Periaate

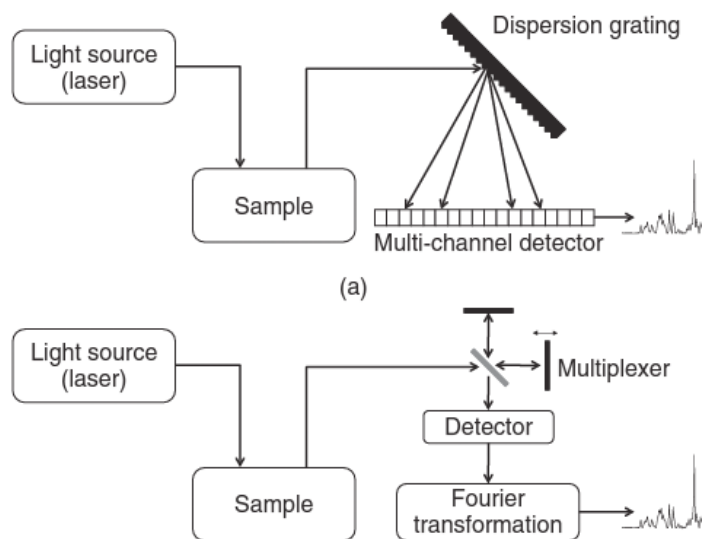
Raman-spektroskopia on yksi värähtelyspektroskopian tekniikka siinä missä IR-spektroskopiakin. Kuitenkin raman-spektroskopia perustuu ramansirontaan: Sähkömagneettinen säteily saa molekyylin värähtelemään, ja mikäli värähtely aiheuttaa muutoksia polaritavuudessa, voidaan raman-taajuudet havaita. (Larkin, Peter 2011:21.) Raman-spektroskopiassa mitataan siis värähtelyn taajuuden muutosta verrattuna tulevan valon taajuuteen ja tavallisesti aallonpituusero esitetään aaltolukuna. Aallonpituuserosta puhutaan myös ramansiirtymänä. Valon fotonien sironta on tavallisesti Rayleigh-sirontaa, eli elastista, jolloin fotonin energia ei muutu. Vain hyvin pieni osa sironnasta on ramansirontaa, jossa siroavan fotonin energia muuttuu. Jos fotoni luovuttaa energiaa molekyylille, puhutaan raman stokes-sironnasta. Jos taas fotoni ottaa energiaa vastaan molekyyliltä, puhutaan raman anti-stokes-sironnasta. (Ferraro, J. R. 2003:15.) Klassinen selite raman-ilmilölle on esitetty kuviossa 2. Kohdassa a tuleva valon säteily saa dipolin värähtelemään fotonin taajuudella ν_0 . Kohdassa b molekulaarinen värähtely voi muuttaa polaritavuutta α , joka muuttaa dipolin värähtelyn amplitudin taajuutta ν_m . Tästä seurauksena on kohdassa c amplitudimukautunut värähtely. Tällainen moduloitunut aalto voidaan matemaattisesti ratkaista kohdassa d kolmeen vakaaseen amplitudikomponenttiin, joiden taajuudet ovat ν_0 , $\nu_0 + \nu_m$ sekä $\nu_0 - \nu_m$. Nämä molekyylin dipolimomentin värähtelyt voivat emittoida elektromagneettista säteilyä näillä samoilla taajuuksilla, joita kutsutaan Rayleigh-sironnaksi sekä raman anti-stokes ja raman stokes-sironnaksi. (Larkin, Peter 2001.)



Kuvio 2. Raman ja Rayleigh-sironta (Larkin, P. 2001).

3.2 Mittaaminen ja spektrin käsittely

Raman-spektrofotometreja on kahdenlaisia: Fourier-muunnos- tai dispersiivinen. Raman-spektrometri koostuu yleensä laser-valonlähteestä, keruuoptiikasta, monokromaattorista tai interferometrasta ja detektorista (kuva 4). Optiikan materiaali sekä detektorin tyyppi riippuvat pitkälti laserin aallonpituudesta. Dispersiivisessä laitteessa tuleva valo hajotetaan esimerkiksi diffraktiohilalla, josta säteet ohjautuvat detektorille, josta puolestaan saadaan ulos spektrin signaali. Fourier-muunnos-laitteessa puolestaan hilan tilalla on Michelsonin interferometri, joka koostuu säteen jakajasta ja yhdestä kiinteästä sekä yhdestä liikkuvasta peilistä. (Larkin, P. 2011:27-28.)



Kuva 4. Yleiset raman spektrometrin komponentit a) Dispersiivinen spektrometri ja b) Fourier-muunnos- (FT) spektrometri (Vandenabeele, P. 2013:63).

Raman-spektrejä yleensä esikäsitellään ensin, jotta niistä saadaan selkeitä ja sopivia joko mallinnusta tai tulkintaa varten. Esikäsitelytoiminnot ovat hyvin tavallisia kaikissa spektroskopiamenetelmissä ja niitä ovat esimerkiksi kohinan vähentäminen (smoothing), pohjaviivan korjaus ja derivointi. Ohjelmistosta riippuen esikäsitelytoiminnot voidaan toteuttaa hyvinkin automatisoidusti. Derivaatan käyttäminen korostaa kohinaa voimakkaasti, joten silloin sitä on välttämätöntä vähentää. Kohinan vähentäminen täytyy kuitenkin tehdä varoen, sillä tärkeä informaatio voidaan menettää, jos spektriä ”siloitetaan” liikaa. (Ferraro, J. R. 2003:268.)

Yksi yleisimmistä toiminnoista kohinan vähentämiseen on Savitsky-Golay-menetelmä. Se voidaan ajatella niin, että jokainen kohta korjatussa spektrissä on alkuperäisen spektrin vierekkäisten pisteidenpainotettu keskiarvo. Molemmin puolin kohdepistettä sisällytetään yhtä suuri määrä datapisteitä keskiarvoon, jolloin pisteitä on yhteensä pariton määrä. Menetelmä käyttää valittavaa epälineaarista polynomista funktiota molemmin puolin kohdepistettä, joka voi olla kvadraattinen, kuutiollinen tai neljännen asteen funktio. Yleensä ohjelmiston käyttäjä valitsee funktion tyyppin ja datapisteiden määrän itse. (Ferraro, J. R. 2003:268.)

Raman spektrien kaarevia ja kallistuvia taustan häiriöitä voidaan vähentää derivaatalla. Toinen derivaatta on usein sopiva, sillä symmetrisen piikin keskikohta säilyy samana, vaikka derivaatta kääntää sen negatiiviselle puolelle. Samalla negatiivinen piikki on paljon terävämpi ja kaareva tausta häviää. (Ferraro, J. R. 2003:269.)

Kun käytetään ramania oikeassa kemiallisessa prosessissa, saattavat spektrien taustat vaihdella hyvinkin paljon mittausten välillä. Derivaatan ja kohinan poiston sijaan eri spektrien kaarevia taustoja voidaan vähentää myös SNV-tekniikalla. SNV lasketaan jokaisen aallonpituuden kohdalla erikseen jokaiselle spektrille ja taustaa ei näin ollen poisteta vaan se muutetaan hyvin samanlaiseksi jokaiselle spektrille. (Ferraro, J. R. 2003:274.)

Mallinnustapoja on erilaisia, esimerkiksi piikin integrointi, mekanistinen malli ja monimuuttujamallinnus. Piikin integrointi perustuu nimensä mukaisesti piikin pinta-alan analysointiin. Mitä suurempi pinta-ala, sen suurempi pitoisuus. Spektreistä valitaan piikki, joka edustaa haluttua pitoisuutta. Tuntemattomien näytteiden piikkien pinta-aloja verrataan tunnettuun pinta-alaan ja näin voidaan määrittää pitoisuus.

3.3 Sovellukset

Raman-tekniologiaa käytetään nykyisin laajasti eri kemian sovelluksiin ja tutkimukseen. Fluoresenssin aiheuttamat häiriöt rajoittivat ramanin käyttöä laboratorioissa monia vuosia, kunnes kehitettiin FT-raman, joka toimii NIR-alueella vähentäen fluoresenssiongelmaa. Lisäksi nopea kehitys laitteistojen ja ohjelmistojen osalta 2000-luvulla on edistänyt raman-tekniikan käyttöä. (Ferraro, J. R. 2003:267.)

Raman-sirontaa tapahtuu sekä kiinteästä että nestemäisestä faasista sekä näiden välisestä vuorovaikutuksesta. Heterogeenisissä prosesseissa, kuten kiteytyksessä tai

saostuksessa, molempien faasien ominaisuudet on otettava huomioon raman-spektroskopiaa sovellettaessa. Liuottimen koostumus vaikuttaa suuresti raman-spektriin. Vesi saattaa olla hyvä vaihtoehto, sillä ramanin laserin aallonpituudesta riippuen sironta saattaa olla veden osalta hyvin heikkoa. Jotkut liuottimet taas osoittavat voimakasta raman-sirontaa ja voivat hankaloittaa ramanin soveltamista, varsinkin jos taustan vähentäminen muusta spektristä ei ole mahdollista. Kiinteän faasin ominaisuuksista muun muassa partikkelien koko ja muoto vaikuttavat raman-sirontaan. Partikkelien ominaisuudet skaalavat eri tunnusomaisien piikkien signaalin intensiteettejä, kun taas kiinteän faasin koostumus johtaa erilaisiin signaaleihin tunnusomaisilla raman-siirtymäalueilla. Tästä syystä ramania on useimmin käytetty kiinteän faasin koostumuksen tutkimiseen. On myös väitetty, että riippuen käytetystä optiikasta ramanissa, partikkelikokojen vaikutukset olisivat erilaisia. (Chianese, A. & Kramer, H. 2012:94-95.)

Jokaisella biomolekyylillä on tyypillinen spektri, ns. oma ”sormenjälki”, josta sen voi tunnistaa. Kaikkien yksityiskohtien huomaaminen sekä spektrin analysointi vaatii kuitenkin paljon harjoittelua, mutta voi antaa arvokasta lisätietoa esimerkiksi näytteen rakenteesta tai dynamiikasta. Perustavanlaatuisia tutkimuksia biomolekyyleistä on tehty ramanin avulla. Raman-spektroskopian avulla voidaan tutkia proteiinien sekundäärisiä rakenteita. Monet värähtelymuodot mahdollistavat peptidin rakenteen tutkimisen. Useat tunnusomaiset taajuusalueet (bands) liittyvät CONH-ryhmiin, joita kutsutaan amideiksi. Amidi I ja III alueet ovat yleisimmin käytettyjä proteiinien sekundäärisen rakenteen arvioimisessa. (Kuhar N. et al. 2018.) Monen proteiinin rakennesensitiivisen amidi III-alueen raman-spektrien on huomattu olevan erilaisia riippuen siitä, onko proteiini kiteenä, liukoisena liuoksessa vai hienojakoisena jauheena. (J.L. Lippert et al. 1975.) Proteiineille ominaiset raman-siirtymät on esitelty taulukossa 1.

Taulukko 1. Proteiineille ominaiset raman-siirtymät (Kuhar, N. et al. 2018).

Contributing group	Frequency (cm ⁻¹)	Assignment
Backbone	1670–1680	β turn, random structure, Amide I
	1660–1670	β sheet, Amide I
	1650–1655	α helices, Amide I
	1630–1635	β sheet, Amide I
	1550	Amide II
	1270–1300	α helices, Amide III
	1240–1250	Random structure, Amide III
	1230–1240	β sheet, Amide III
Disulphide	505–515	GGG conformation
	520–530	GGT, GTG conformation
	540–545	TGT conformation
Side chain	1615, 830, 643	Tyrosine
	850/830	Hydrogen bonding state of tyrosine
	1550, 1010, 750	Tryptophan
	880/1361	Ring environment of indole ring of tryptophan
	1360/1340	Hydrophobicity marker for tryptophan
	1609, 1205, 1003	Phenylalanine

Amidi III:lle tunnusomaisia rakenteiden piikkejä voi havaita alueella n. 1200-1300 cm⁻¹ ja amidi I rakenteet voidaan paikantaa alueella n. 1630-1680 cm⁻¹. Myös hiilihydraattien rakenteita voidaan tutkia, vaikka sitä hankaloittaa monomeeriyksikköjen samankaltaisuus polymeeriketjuissa. Kuitenkin erilaiset vetysidokset sekä rengasmuodot antavat tunnusomaisia piikkejä raman-spektriin. (Kuhar, N. et al. 2018.)

3.4 Proteiinien ja polysakkaridien komplekseista

Proteiinien ja polysakkaridien komplekseja on tutkittu myös ramanin avulla. Proteiinien ja polysakkaridien kompleksit ovat usein seurausta kahden vastakkaisvarautuneen biopolymeerin välisestä interaktiosta eli vuorovaikutuksesta. Kun proteiinia ja

polysakkaridia sekoitetaan proteiinin isoelektrisen (pI) pisteen lähellä tai alapuolella, muodostuu komplekseja useissa proteiini-polysakkaridisysteemeissä. Mekanismin ajatellaan johtuvan kaksivaiheisesta rakenteen muuttumisesta yhdessä liukoisten ja liukenemattomien kompleksien kanssa. Liukoiset kompleksit muodostuvat ensin lähellä kriittistä pH:ta ja liukenemattomat kompleksit sekä koaservaatit sen jälkeen, kun pH laskee lähelle proteiinin isoelektristä pistettä. Myös pH:ssa, joka on isoelektrisen pisteen yläpuolella, voi muodostua liukoisia komplekseja positiivisesti varautuneen proteiinialueen ja anionisen polysakkaridin välillä. (Zhang et al. 2012.) pH:n lisäksi interaktiot ovat vahvasti riippuvaisia proteiini-polysakkaridisuhteesta sekä ionivahvuudesta koaservaatio-prosessissa (Chourpa, I. et al. 2006).

4 MALLINTAMINEN

Sekä NIR- että raman-spektroskopiassa käytetään samanlaisia matemaattisia menetelmiä kalibrointimallien luomiseen. Mallia varten tarvitaan referenssimenetelmällä analysoidut tulokset näytteistä, joista on mitattu spektrit. Spektreistä valitaan alueita, joita kalibrointimallissa halutaan käyttää. Tietokoneohjelma etsii matemaattisten menetelmien avulla korrelaatioita referenssiarvojen ja valittujen spektrialueiden väliltä ja muodostaa kalibrointimallin. Sen perusteella tietokone voi laskea tuntemattomalle näytteelle tuloksen.

4.1 Yhden muuttujan mallinnus

Yksi tapa tehdä kvantitatiivinen kalibrointi spektriin perustuen on yhden muuttujan mallinnus. Esimerkiksi tarkasteltavan analyytin konsentraatio halutaan saada selville spektrin absorbanssin voimakkuuden perusteella. Silloin valitaan aallonpituus, josta löytyy mitattujen spektrien absorbanssihuippu ja muodostetaan käyrä mitattuja konsentraatioita vasten. Saatu funktio mahdollistaa siten konsentraation laskemisen tuntemattomista näytteistä. Tämä on riittävä tapa, jos tutkitaan yhtä komponenttia yhdellä aallonpituudella. Kahden tai useamman komponentin määrittämiseen käytetään useampia aallonpituusalueita, jotka ovat tyypillisiä kullekin komponentille. Usein kuitenkin yhden muuttujan mallinnuksessa on monta heikkoa kohtaa:

- a) Analyytin konsentraatio korreloi vain spektrin yhden kohdan kanssa, jolloin tuntemattoman näytteen spektrin rakenteen sopivuutta kalibrointidataan ei voida arvioida.
- b) Hyvä monikomponenttikalibraatio vaatii riittävän piikkihuippujen erottelun toisistaan, mutta monissa tapauksissa se ei ole mahdollista, varsinkaan NIR-spektroskopiassa.
- c) Useamman komponentin tapauksissa kalibroinnista saatu lineaarinen funktio ei kuitenkaan aina ole todellisuudessa sopiva, sillä molekyylien sisäiset voimat sekä lämpötila voivat aiheuttaa vääristymiä spektreihin.

Siksi monimuuttujamallinnus voi useissa tapauksissa olla parempi vaihtoehto. Monimuuttujamallinnuksen menetelmiä ovat muun muassa moninkertainen lineaarinen regressio (multiple linear regression, MLR), pääkomponenttiregressio (principal component

regression, PCR) sekä osittainen pienimmän neliösumman menetelmä (partial least square, PLS). (Conzen, J-P. 2014, 3-7.)

4.2 Monimuuttujamallinnus

Monimuuttuja kalibroinnissa yhdistetään mitatut referenssiarvot suureen määrään vastaavien mitattujen spektrien informaatiota. Siten voidaan saavuttaa suurempi tarkkuus. PLS-kalibrointi on yksi käytetyimmistä menetelmistä kemometrinen mallien luonnissa. Sitä varten on mitattava suuri määrä näytteitä, jotta näytteiden spektrien informaatiota voidaan verrata vastaaviin mitattuihin tutkittavan aineen konsentraatioihin. Matemaattisesti ajatellen datapisteiden muutokset kirjataan datamatriisiin ja niille luodaan ominaisvektorit, joita kutsutaan faktoreiksi tai pääkomponenteiksi. Nämä sisältävät kaiken tarvittavan informaation tutkittavasta aineesta, jolloin niitä voidaan käyttää konsentraatioiden ennustamiseen. Suurten datasettien analyttisesti merkittävä informaatio siis tiivistetään faktoreihin. PLS-kalibroinnissa ominaisvektorit järjestetään alenevaan järjestykseen niin, että ensimmäiset faktorit kuvaavat pääasiallisia sekä tärkeimpiä muutoksia tutkitussa spektrissä. Korkeampiin faktoreihin edetessä ne edustavat lähinnä spektrin kohinaa ja häiriötekijöitä. Siksi faktorien oikean määrän valitseminen on tärkeää: jos niitä on liian vähän, spektrin rakenteellisia muutoksia ei havaita riittävän hyvin. Jos faktoreita taas on liikaa, myös spektrin kohina yrittää ennustaa muutoksia konsentraatiossa. (Conzen, J-P. 2014: 7-9.)

4.3 Mallien validointi

Rakennettu malli täytyy aina validoida, jotta sen hyvyttä voidaan arvioida. Siihen on kaksi tapaa, joita ovat sisäinen ja ulkoinen validointi. Kaikissa tapauksissa olisi parasta suorittaa molemmat, mutta sisäisellä validoinnilla päästään jo hyvin alkuun.

4.3.1 Sisäinen validointi

Sisäinen validointi toteutetaan niin sanotulla ristivalidoinnilla. Siinä yksittäiset näytteet otetaan pois kalibrointisetistä ja jäljelle jääneillä näytteillä perustetaan malli, jota vasten poistetut näytteet analysoidaan ja saatuja arvoja verrataan todellisiin. Kalibroinnista ulkopuolelle jätettyjen näytteiden määrän voi itse valita, mutta on tärkeää, että näytteitä

jää malliin sen verran, ettei malli muutu liikaa alkuperäisestä. Siksi alle 50 näytteen datasetistä ei suositella irrotettavaksi kuin yksi näyte kerrallaan. Koko datasetti arvioidaan irrottamalla ja palauttamalla jokainen näyte, yksittäin tai useamman ryhmissä. Kun jokainen näyte setissä on analysoitu kerran, voidaan laskea ristikkäisvalidoinnin ennusteen keskivirhe (root mean square error of cross validation, RMSECV). Mitä pienempi virhe, sitä parempi malli. Kaikki nämä vaiheet on pitkälti automatisoitu spektroskopiaohjelmistoissa. (Conzen, J-P. 2014: 14-15.)

4.3.2 Ulkoinen validointi

Ulkoinen validointi toteutetaan yleensä sisäisen validoinnin jälkeen. Sitä varten tarvitaan toinen, niin kutsuttu testisetti näytteitä, jotka analysoidaan luotua mallia vasten. Luotu malli siis pysyy muuttumattomana koko validoinnin ajan, eli siitä ei poisteta näytteitä. Mallin antamia tuloksia näytteille verrataan todellisiin mitattuihin tuloksiin ja sen perusteella voidaan laskea ennusteen keskivirhe (root mean square error of prediction, RMSEP). Mitä pienempi virhe, sen parempi malli. Sisäisen ja ulkoisen validoinnin pitäisi johtaa vertailukelpoisiin tuloksiin, muutoin malliin tarvitaan lisää näytteitä ennustettavuuden parantamiseksi. (Conzen, J-P. 2014:16.)

Jo esitettyjen RMSEP ja RMSECV lisäksi on muitakin tunnuslukuja, joilla mallien hyvyttä voidaan arvioida.

- a) R^2 eli selitysaste. Mitä paremmin mallissa käytetyt spektrit korreloivat todellisten konsentraatioiden kanssa, sen parempi on kalibrointisuoran selitysaste. Mitä lähempänä selitysaste on 100 prosenttia, sen parempi on kalibrointisuora.
- b) RPD eli residuaalien ennusteen hajonta (residual prediction deviation) on referenssiarvojen hajonnan (SD) ja bias-korjatun validoinnin kerkivirheen (SEP_{bias}) osamäärä. Näin ollen, mitä suurempi RPD, sitä parempi malli.

5 KITEYTYSPROSESSI

5.1 Periaate

Kiteytys toimii sekä puhdistus- että erotusmenetelmänä monille eri materiaaleille ja siitä voidaan puhua myös faasimuutoksena, jolloin kiteytyvä tuote erottuu liuoksesta. Liuos puolestaan on seos, joka koostuu kahden tai useamman aineen yhdestä homogeenisestä faasista. Liuos on kylläinen, kun siihen on liuennut maksimimäärä liuotettavaa ainetta. Tätä konsentraatiota kutsutaan liukoisuudeksi ja silloin liuos on tasapainotilassa liuottimen ja liuotettavan aineen suhteen. Kiteytymiseen vaaditaan kuitenkin liuoksen ylikylläisyytilä, jolloin liuos on myös metastabiili. Jokainen liuos voi olla vain tiettyyn pisteeseen asti ylikylläinen, ennen kuin se muuttuu epästabiiliksi. Juuri tämä ylikylläisyysalue on se, jossa kiteytyminen tapahtuu. Kun ylikylläisyys on saavutettu, molekyylit alkavat liittyä yhteen ja muodostaa rykelmiä tai konsentraation heilahteluja. Tätä vaihetta kutsutaan kiteytymisen aluksi, eli nukleaatioksi. Volmerin (1939) ja Nielsenin (1964) klassisen teorian mukaan rykelmien muodostuminen jatkuu niin kutsutulla lisäysmenetelmällä, kunnes niiden kriittinen koko on saavutettu. Nukleaatiota seuraa kiteytyksen toinen perusvaihe, kiteiden kasvu. Kiteet kasvavat ylikylläisessä liuoksessa liuotetun aineen molekyyleillä. (Myerson, A. 2002:16-33.)

Kun kiteytyminen alkaa, supersaturaatio voidaan vapauttaa/purkaa nukleaation ja kiteiden kasvun yhdistelmällä. Nukleaatioasteen suhde kiteiden kasvuun kontrolloi kiteen kokoa ja kokojakaumaa ja on siksi erittäin tärkeä aspekti, joka on otettava huomioon teollisessa kiteytysprosessissa. (Myerson, A. 2002:43-44.)

Nukleaatio voidaan jakaa primääriseen ja sekundääriseen nukleaatioon. Primäärinen nukleaatio tapahtuu ilman kidepintoja, kun taas sekundäärinen vaatii aktiivisesti kiteisiä pintoja. Primäärinen jaetaan edelleen homogeeniseen ja heterogeeniseen nukleaatioon. Homogeeninen nukleaatio on perusta monille teorioille, vaikka sitä ei käytännössä juurikaan tapahdu. Liuenneet epäpuhtaudet aiheuttavat puolestaan heterogeenisen nukleaation ja ylikylläisyys saavutetaan silloin yleensä matalammassa pitoisuudessa. (Myerson, A. 2002:44-46.)

Ylikylläisessä liuoksessa olevista kiteistä seuraa sekundäärinen nukleaatio. Muodostuneet kiteet katalysoivat nukleaatioilmiötä ja siksi se voi tapahtua matalammassa ylikylläisyytilässä. Sekundäärinen nukleaatio on kuitenkin vielä melko huonosti ymmärretty,

vaikka sen kinetiikasta ja mekanismista on tehty useita tutkimuksia. Monet teoriat ehdottavat, että se johtuu joko siemenkiteestä tai rajakerroksesta kasvavan kiteen lähellä. (Myerson, A. 2002:44-47.)

Nukleaatiota seuraa kiteiden kasvu, jossa pienet kidealkiot kasvavat suuremmiksi, kun niihin kiinnittyy liuotettavan aineen molekyylejä. Kiteiden kasvunopeus voidaan ilmaista monella eri tavalla. Usein kasvu on ilmaistu kiteen jonkin dimension muutoksena aikaan nähden. (Myerson, A. 2002:53-54.)

5.2 Proteiinien kiteytys

Kiteytys on yksinkertainen ja tehokas tapa puhdistaa yksittäinen proteiini liuoksesta. Proteiinien kiteytys on tärkeä osa esimerkiksi lääketeollisuudessa, kun valmistetaan pienimolekyylisiä lääkkeitä, mutta myös teollisten entsyymien puhdistuksessa ja formuloinnissa. Entsyymit ovat rakenteellisesti proteiineja. Proteiinilla on taipumus kiteytyä paremmin, jos sen rakenne on jäykkä ja pallomainen. Proteiineja voidaan kiteyttää säätämällä proteiiniliuoksen pH:ta ja melko pienetkin muutokset pH:ssa vaikuttavat merkittävästi proteiinin liukoisuuteen. Usein 0,5 pH-yksikköä riittää muuttamaan liukoisuutta huomattavasti. Yleinen kiteytysstrategia on säätää proteiiniliuoksen pH:ta hyvin lähelle isoelektristä pistettä, jolloin molekyylin liukoisuus on usein kaikkein pienimmillään. Proteiinikiteen kasvuille tarvittavat olosuhteet ovat vain niillä pH-arvoalueilla, joissa proteiini säilyttää laskostuneen muotonsa. (Myerson, A. 2002:267-275.)

Proteiinien kiteytyksessä yksi pitkään käytetty tapa on elektrolyytin lisäys liuokseen, joka aiheuttaa proteiinin erottumisen kiinteäksi faasiksi. Elektrolyytin konsentraation kasvattaminen kasvattaa ionivahvuutta ja näin myös proteiinin liukoisuutta. Myös synteettisten polymeerien käyttö, erityisesti polyetyleeniglykolin, on lisääntynyt kiteytyksen avustavana lisäaineena. (Myerson, A. 2002:275-277.)

Proteiineja voidaan kiteyttää monessa eri lämpötilassa, mutta yleisimmät ovat huoneenlämpötila, noin 25 celsiusastetta, sekä viileä, noin 4 celsiusastetta. Proteiinien kiteytys on mahdollista myös korkeammissa lämpötiloissa, jos proteiini kestää sitä denaturoitumatta. Moni proteiini denaturoituu yli 40 celsiusasteessa, mutta jotkut proteiinit sen sijaan saattavat kiteytyä helpommin korkeassa lämpötilassa. Kuitenkin, jotta lämpötila olisi tehokas keino kontrolloida nukleaation ja kiteiden kasvun suhdetta, täytyy proteiinin liukoisuuden muuttua huomattavasti lämpötilaa muuttamalla. (Myerson, A. 2002:269-279.)

5.3 Muut sovellukset

Kiteytymenetelmiä on käytössä esimerkiksi lääketeollisuudessa sekä elintarvike- ja bioteollisuudessa. Lääketeollisuudessa kiteytysprosessina on perinteisesti käytetty panosprosessia lääkaineiden puhdistamiseen. Panoskiteytyksessä tyypillisesti lähtömateriaalit laitetaan sekoitussäiliöön, josta otetaan loppumateriaali ulos joko jatkuvana virtana tai yhdellä kertaa. Tiukoista lakisäädöksistä johtuen prosessien täytyy olla tarkasti hallittuja ja yksityiskohtaisesti dokumentoituja, jotta voidaan taata tuotteen yhdenmukaisuus joka erässä. Tärkeää on hallita morfologiaa, puhtautta ja partikkelikokojakaumaa. (Myerson, A. 2002:127,261.)

Monet elintarvikekomponentit kiteytyvät ja yleisimpiä ja samalla tärkeimpiä näistä ovat sokerit, lipidit, tärkkelykset sekä jää. Kiteinen muoto on tärkeää elintarvikkeen laadun, säilyvyyden sekä koostumuksen kannalta. Kiteistä muotoa kontrolloidaan muun muassa manipuloiden tuotteen koostumusta ja valmistusprosessin tai säilytyksen olosuhteita. Kiteytymisen peruseräiteiden ymmärtäminen on tärkeässä roolissa elintarvikkeiden kiteytysprosesseja muokattaessa ja usein tavoitteena on luoda kiteytyksen avulla tietynlainen koostumus tai ulkonäkö tuotteelle. Kiteytys on kuitenkin usein hankalaa kompleksisessa elintarvikeollisuudessa, sillä todella monet muuttajat vaikuttavat lopputulokseen. Lisäksi elintarvikkeille on asetettu paljon tiukkojakin rajoituksia, jotka esimerkiksi estävät tai rajoittavat joidenkin ainesosien käyttöä kiteytysprosessin muokkaamisessa. Yksi esimerkki kiteiden rakenteen ja koon vaikutuksesta tuotteen laatuun on jäätelö. Siinä halutaan kiteiden olevan pieniä ja samankokoisia, sillä liian suuret kiteet tekevät suutuntumasta karhean. Nukleaatio onkin kiteytyksen vaiheista tärkeimmässä roolissa, kun halutaan vaikuttaa kiteiden kokojakaumaan. (Myerson, A. 2002:287-290.)

6 SAOSTUSPROSESSI

6.1 Periaate

Saostus on oikeastaan yksi tapa tehdä kiteytys. Sillä tarkoitetaan usein nopeaa kiteytymistä ja toisinaan se viittaa myös peruuttamattomaan kiteytysprosessiin. (Mullin, J. W. 2001:315.) Saostus muodostaa suhteellisen nopeasti niukkaliukoisen kiinteän faasin liuoksen nestefaasista (Myerson, A. 2002:156). Ominaista saostukselle on sen käynnistyminen ylikylläisessä liuoksessa, jolloin muodostuu hyvin nopeasti kidealkioita ja niistä edelleen suuria määriä pienikokoisia primäärikiteitä. Kahden kiteytyksen perusvaiheen lisäksi saostuksessa tapahtuu kaksi toissijaista vaihetta, jotka yleensä vaikuttavat perusteellisesti kiteiseen lopputuotteeseen: agglomeraatio ja kypsyminen. Agglomeraatio tapahtuu usein kidealkioiden muodostumisen jälkeen. Kypsymisvaiheella sen sijaan tarkoitetaan kaikkia sakan muodostumisen jälkeisiä peruuttamattomia muutoksia. Yksi yleisimmistä saostustavoista on kahden reagoivan liuoksen sekoittaminen toisiinsa mahdollisimman nopeasti. (Mullin, J. W. 2001:315.)

Saostuksella on monia tärkeitä erityispiirteitä. Sakka muodostuu suhteellisen korkeissa ylikylläisyysolosuhteissa ja se on usein niukkaliukoista sekä siihen ei yleensä vaikuta liuotettavan aineen kiteiden läsnäolo liuoksessa. Korkeasta ylikylläisyydestä johtuen sakka koostuu suuresta määrästä suhteellisen pieniä kiteitä. Tämä mahdollistaa sekundääristen prosessien ilmenemisen, kuten Ostwaldin kypsymisen ja agglomeraation. (Myerson, A. 2002:148.)

6.1.1 Agglomeraatio

Agglomeraatiolla tarkoitetaan pienten partikkeleiden taipumusta kerääntyä yhteen. Usein pienet partikkelit ($<1 \mu\text{m}$) voivat tarttua toisiinsa pysyvästi, jos Van der Waalsin voima ylittää gravitaatiovoiman. Pysyvää tarttumista heikentää selvästi varauksen stabiilisuus lyofobisissa systeemeissä. Agglomeraation esiintyvyys voi vaikuttaa merkittävästi saostusprosessin tulokseen. (Myerson, A. 2002:149.)

6.1.2 Kypsyminen

Heterogeeninen systeemi on termodynaamisesti epästabiili ennen kuin sen vapaa energia saavuttaa miniminsä. Se johtuu siitä, että laajasta rajapinnasta vapautuu energiaa, jota voidaan vähentää pienentämällä rajapinnan alaa. Ostwald (1901) kuvasi ensimmäisenä tämän prosessin, ja prosessi on nimetty hänen mukaansa Ostwaldin kypsymiseksi. Ero liukoisuudessa vapaiden partikkeleiden ja kiinteän faasin välillä on kyseisen prosessin kantava voima perustuen tunnettuun Gibbs-Thomsonin yhtälöön, jonka mukaan aineen liukoisuus kasvaa, kun kiteiden koko pienenee. Konsentraatiogradientti, joka johtuu liukoisuuserosta, saa liuotettavan materiaalin kulkeutumaan liuksen (solution phase) läpi pienemmistä kiteistä kohti suurempia, jolloin liuotettava aine saostuu suuremmiksi partikkeleiksi. Yleisesti ottaen Ostwaldin kypsymisprosessi vähentää kiteiden määrää ja kasvattaa niiden keskimääräistä kokoa sekä laajentaa partikkelikokojakaumaa. (Myerson, A. 2002:143, Mullin, J. W. 2001:320.)

6.2 Sovellukset

Monet sakan tärkeät ominaisuudet ovat luonteeltaan fysikaalisia. CSD (crystal size distribution) eli kiteiden kokojakauma on saostusprosessin tuotteen tärkein ominaisuus. Myös kiteiden morfologialla on vaikutusta ja etenkin prosessin jälkeisissä vaiheissa, kuten suodatuksessa tai kuivauksessa. Toiset huomioitavat ominaisuudet ovat kemiallisia, kuten kiteiden puhtaus tai epäpuhtaudet. Lisäksi on varmistuttava siitä, että kiteiden ominaisuudet ovat valmistuserästä toiseen samat, eli prosessi tuotteineen on toistettavissa. Teollisissa saostusprosesseissa on kuitenkin edelleen haasteita, esimerkiksi suurempaan mittakaavaan siirtymisessä. (Myerson, A. 2002:141.)

Saostusta käytetään valmistusprosessina esimerkiksi lääketeollisuudessa, väri- ja pigmenttiteollisuudessa sekä jäteveden käsittelyssä (Myerson, A. 2002:141). Yksi saostustapa on niin sanottu jatkuvasyöttöinen saostus. Siinä syötetään jatkuvana virtana reagensseja sekoitussäiliöön, josta poistetaan samalla saostustuotetta, jotta reaktiivilavuus pysyy vakiona. Näin saadaan yleensä muodoltaan yhteneväisiä, mutta eri kokoisia partikkeleita. (Myerson, A. 2002:158.)

Toinen ja yleisin tapa on panossaostus. Se jaetaan kahteen perustyyppiin: yksittäissyöttöön (single-feed) ja tuplasyöttöön (double-feed). Yksittäissyötössä toinen reaktion

lähtöaineista laitetaan säiliöön, jossa on sekoitus ja toista syötetään säiliöön tietyn ajan. Tuplasyötössä kahta reaktion lähtöaineista syötetään säiliöön, jossa on alun perin tietty määrä liuotinta (solvent) tietyssä olosuhteessa. Reaktioainetta voidaan syöttää jatkuvasti tasaisena virtana tai kiihtyvään tahtiin ajan kuluessa. Syöttövirtauksen asetuksella, eli mihin tahtiin syöttö tapahtuu, voi olla suuri merkitys saostustuotteen ominaisuuksiin kuten CSD:hen. (Myerson, A. 2002:158.)

7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Kokeellinen osuus suoritettiin sekä laadunvalvonnan että tutkimuksen tiloissa Roal Oy:ssä. Raman-laitteisto asennettiin ulkopuolisen tahon toimesta Pilot-halliin, jossa kaikki kokeet suoritettiin. Laadunvalvonnan NIR-laitteistoa käytettiin sekä tutkimuksen tiloissa suoraan pienen mitan prosessissa että laadunvalvonnassa erillisten näytteiden mittaamiseen.

Tarkoituksena oli rakentaa NIR- ja raman-kalibrointimallit saostukselle sekä kiteytykselle koeputkissa toteutettavien kokeiden avulla. Tämän jälkeen malleja ja tekniikoiden soveltuvuutta voitiin testata ja/tai täydentää laboratoriomittakaavan prosesseissa. Lisäksi raman-spektreistä etsittiin viitteitä muutoksista molekyyliessä ja niiden komplekseissa saostuskokeissa. Saostukseen liittyvät kokeet tehtiin entsyymillä 1 ja kiteytykseen liittyvät kokeet entsyymillä 2. Kokeiden tulokset on esitelty kappaleessa 8.

7.1 Laitteistot

Saostus- ja kiteytysprosessi toteutettiin pienessä mittakaavassa Radleysin Reactor-Ready Duo Lab-laitteistolla. Laitteistossa on rinnakkain kaksi samanlaista reaktorisysteemiä. Yksi systeemi koostuu sekoittimesta ja lasisesta reaktorista, joissa vesivaipan lämpötilaa voidaan kontrolloida. Reaktoriin voidaan asettaa myös erilaisia antureita tarpeen mukaan. (Radleys.com 2020.) Kuitenkin ainoastaan NIR-laite voitiin siirtää mittaamaan Reactor-Ready-laitteistolla toteutettuja prosesseja, mutta raman-laitteiston sijainnin vuoksi raman-mittaukset prosesseista voitiin toteuttaa vain Pilot-hallissa dekantterilasissa ilman lämpötilakontrollia eli huoneenlämmössä. Kuvat koejärjestelyistä on esitetty jäljempänä kuvissa 8–10.

NIR-mittauksiin käytettiin Brukerin MPA-laitetta (kuva 5), jossa mittaukset voidaan suorittaa kyvetissä, anturilla (probe) tai erikokoisissa lasiastioissa heijastusmittauksena. Anturina oli Brukerin transflexion probe type IN271 2 millimetrin valotiellä. Anturi meni kuitenkin valitettavasti epäkuuntoon kokeiden aikana juuri saostus- ja kiteytysprosessimitausten jälkeen, joten koeputkimittakaavan näytteet jouduttiin mittaamaan kyveteissä ja lasiastioissa. Mittauksissa käytetty kyveti oli läpimitaltaan 2 mm ja soveltui helposti pipetoitaville näytteille. Lasiastiaa käytettiin erittäin sameille ja tahnamaisille näytteille. Resoluutio sekä spektrien mittausten lukumäärä asetettiin näytteille sopivaksi.



Kuva 5. Bruker MPA-laite NIR-mittauksiin.

Raman-mittauksia varten hankittiin testikäyttöön Kaiserin RXN2 785 nm-laitteisto neljällä anturilla. Kuitenkin ensimmäisten mittauksien yhteydessä ilmeni, että näyttemateriaalit fluoresoivat voimakkaasti, eivätkä spektrit näin ollen olleet käyttökelpoisia. Ratkaisuna laitteisto vaihdettiin Kaiserin RXN2 1000 nm-laitteistoon (kuva 6), koska fluoresointia voidaan vähentää huomattavasti suuremmalla aallonpituudella (Larkin P. 2011:32). Mittaukset tehtiin yhdellä anturilla (probe). Mittausparametrit optimoitiin herkästi fluoresoiville näytteille sopivaksi: materiaali altistettiin laserille yhden sekunnin ajan ja raman-sirontaa kerättiin 300 sekuntia. Mittaukset tuli tehdä valolta suojattuna, koska raman-spektreihin tulee häiriötä ulkopuolelta tulevasta valosta.



Kuva 6. Kaiserin raman-laitteisto (kosi.com 2020).

7.2 Saostuskokeet koeputkissa

Entsyimin saostusprosessin erilaisia olosuhteita toteutettiin koeputkissa vaihdellen entsyimin ja polysakkaridi A:n suhdetta sekä puskurin pitoisuutta. Ensin putkiin punnittiin puskurikomponentit, vesi sekä polysakkaridi A ja sekoitettiin hyvin. Viimeisenä lisättiin entsyymi 1 yhteen putkeen kerrallaan ja sekoitettiin voimakkaasti ravistamalla. Sakka muodostui välittömästi entsyimin lisäyksen jälkeen, mutta sen ulkonäkö ja koostumus vaihtelivat riippuen komponenttien suhteista. Yksittäisten komponenttien spektrit mitattiin myös mallinnusta varten: polysakkaridi A sekä entsyymi 1 ja näiden eripitoiset vesiliuokset. Näin oli helpompi päätellä spektrien piikeistä, mitä ne mahdollisesti edustivat. Samat näytteet mitattiin sekä raman- että NIR-laitteistolla. Taulukossa 2 on esitelty koematriisi saostusputkille.

Taulukko 2. Koematriisi saostuskokeille koeputkissa, polysakkaridilla A

Näyte	Polysakkaridi A (m-%)	Asetaattipuskuri (M)	Entsyymiliuos (m-%)	Suhde (aktiivisuus : mg polysakkaridi A)
1	1,33	0,05	28,5	1 500
2	0,80	0,05	28,5	2 500
3	0,57	0,05	28,5	3 500
4	0,44	0,05	28,5	4 500
5	0,28	0,05	28,5	7 000
6	0,20	0,05	28,5	10 000
7	0,57	0,025	28,5	3 500
8	0,57	0,050	28,5	3 500
9	0,57	0,100	28,5	3 500
10	0,57	0,150	28,5	3 500
11	0,57	0,200	28,5	3 500
12	0,57	0,250	28,5	3 500

Spektrit mitattiin saostetuista koeputkinäytteistä noin tunnin seisotuksen jälkeen. Tämän jälkeen putket sentrifugoitiin ja spektrit mitattiin uudestaan pelkästään supernatantista. NIR-spektrit mitattiin lasiastioissa heijastusmittauksena ja sentrifugoidut näytteet kyvetissä. Kuvassa 7 nähdään esimerkkinä ylhäällä saostusputkia ennen sentrifugointia ja alla sentrifugoinnin jälkeen, joista on jo poistettu osa supernatantista.



Kuva 7. Saostuskomponentit ja entsyymi 1 sekoitettuna koeputkiin: ennen sentrifugointia (alla) ja sentrifugoinnin jälkeen (yllä).

Saostusta testattiin myös toisella polysakkaridilla (B), mutta näytteet mitattiin vain ramanilla, koska haluttiin tarkastella nimenomaan raman-spektrin muutoksia. Polysakkaridi B saostus tehtiin myös entsyymillä 1. Koematriisi on esitetty taulukossa 3.

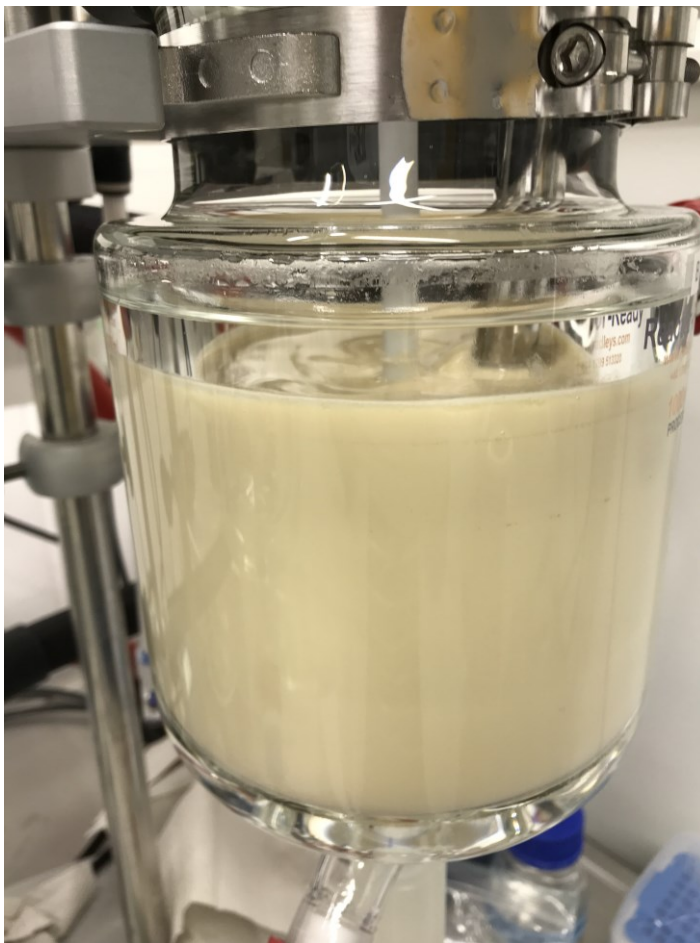
Taulukko 3. Saostus polysakkaridi B:llä, koematriisi.

Näyte	Polysakkaridi B (m-%)	Asetaattipuskuri (M)	Entsyymiliuos (m-%)	Suhde (aktiivisuus: mg polysakkaridi B)
1B	1,33	0,05	28,5	1 500
2B	0,66	0,05	28,5	3 000
3B	0,50	0,05	28,5	4 000
4B	0,44	0,05	28,5	4 500
5B	0,40	0,05	28,5	5 000

Puskuri pidettiin näissä kokeissa vakiona ja vain aktiivisuuden ja polysakkaridi B:n suhdetta muutettiin. Spektrit mitattiin putkista vastaavasti kuin polysakkaridi A-kokeissa.

7.3 Saostus pienessä mittakaavassa

Kuvassa 8 on esitetty koejärjestely Reactor-Ready-laitteistolla, josta mitattiin samaan aikaan NIR-spektrejä. Reaktorissa on kuvassa polysakkaridi A:lla saostettua entsyymi 1-liuosta, keskellä sekoitin ja oikealla NIR-anturi.



Kuva 8. Saostus Reactor-Ready-laitteistolla.

Saostus toteutettiin huoneen lämmössä lisäämällä reaktoriin ensin entsyymi 1-liuos. Sen kaadettiin saostuskomponenteista tehty liuos, joka koostui asetaattipuskurista sekä polysakkaridi A:sta. Saostusliuosta sekoitettiin voimakkaasti nopeudella 270 rpm. Saostuksen kaikkien komponenttien yhteismäärä oli 1 kg. Näytteitä otettiin ennen saostusta, sen aikana ja lopuksi. Saostus kesti kokonaisuudessaan noin 75 minuuttia. Näytteet tuli

sentrifugoida välittömästi näytteenoton jälkeen, paitsi lopetusnäyte. Näytteistä analysoitiin märkäkemialla liukoinen entsyymiaktiivisuus sekä loppunäytteestä kokonaisaktiivisuus. Liukoinen entsyymiaktiivisuus määritettiin sentrifugoidun näytteen supernatantista.

Raman-mittauksia varten saostus tehtiin foliolla suojatussa dekanterilasissa, johon oli kiinnitetty sekoitin. Näytteiden otto suoritettiin samoin kuin NIR-mittausten kanssa.

7.4 Liukoisuuskokeet koeputkissa

Kiteytysprosessin eri olosuhteiden mallinnusta varten tehtiin sarja liukoisuuskokeita putkissa viidessä eri pH:ssa sekä kolmella eri entsyymiaktiivisuustasolla. Liukoisuuskokeilla voitiin tarkastella puskurin pH:n vaikutusta kiteiden liukoisuuteen ja entsyymin liukoiseen aktiivisuuteen. Varsinainen kiteytysprosessi tälle entsyymille (entsyymi 2) toteutetaan säätämällä entsyymiliuoksen pH:ta. Kiteytetty entsyymimassa saatiin aiemmin tehdystä pienen mittakaavan kiteytyksestä, joka tehtiin NIR-mittauksia varten. Koematriisi on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Koematriisi liukoisuuskokeille koeputkissa.

Näyte	Puskurin pH	aktiivisuus (U)
1	3,80	350000
2	4,20	350000
3	4,60	350000
4	5,00	350000
5	5,60	350000
6	3,80	450000
7	4,20	450000
8	4,60	450000
9	5,00	450000
10	5,60	450000
11	3,80	550000
12	4,20	550000
13	4,60	550000
14	5,00	550000
15	5,60	550000

Liukoisuusputket sekoitettiin kylmähuoneessa viikonlopun yli ennen spektrien mittauksia, jotta liukoisuus olisi tasapainotilassa. Spektrit mitattiin sekä raman- että NIR-laitteistolla, jonka jälkeen putket sentrifugoitiin ja spektrit mitattiin uudelleen pelkästä supernatantista. NIR-spektrit mitattiin lasiastioissa ja sentrifugoiduista näytteistä kyvetissä.

7.5 Kiteytys pienessä mittakaavassa

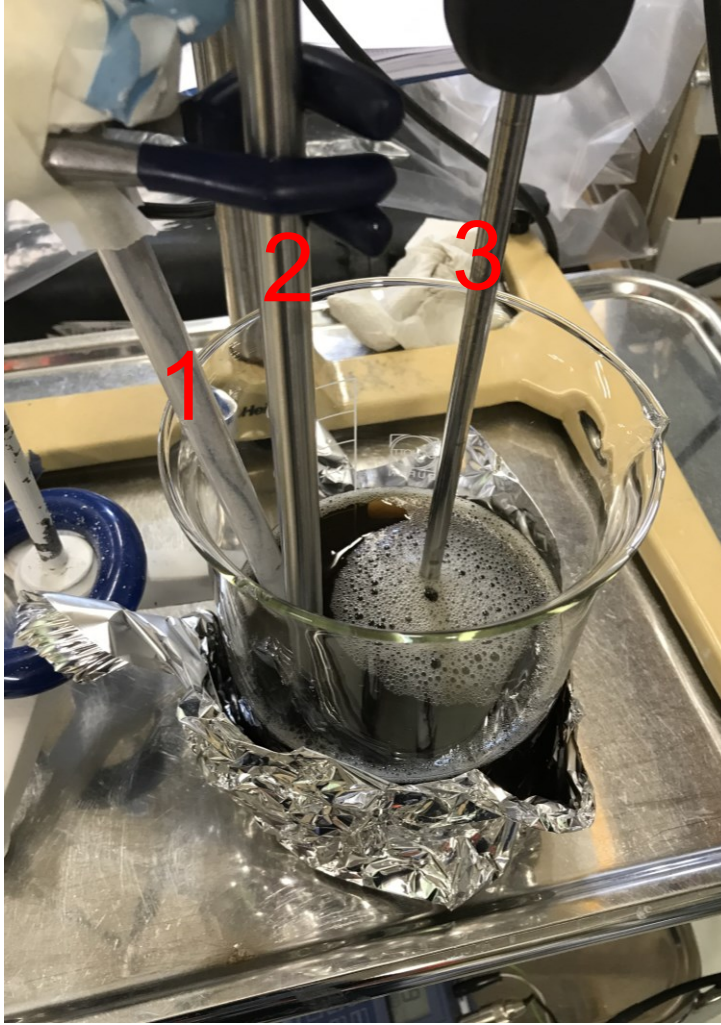
Samoin kuin saostusmittausten kanssa, pienen mittakaavan kiteytyksen NIR-mittaukset toteutettiin Reactor-Ready-laitteistolla tehdystä kiteytyksestä 10 °C:een lämpötilassa (kuva 9) ja raman-mittaukset huoneenlämmössä dekantterilasissa mimikoidusta kiteytyksestä (kuva 10). Tämän kiteytyksen kannalta lämpötilan kontrollia oleellisempaa oli pH:n muutos, joten kiteytyksen pystyi hyvin tehdä myös huoneen lämmössä. Kiteytys

tehtiin hitaasti pH:ta säätämällä, jotta saatiin muodostumaan kiteitä pelkän sakan sijasta. Kiteytys aloitettiin aamulla säätämällä varovasti pH:ta parin minuutin välein 40 % (w/w) sitruunahapolla pH 4.8:aan asti. Tämän jälkeen liuksen annettiin sekoittua kolme tuntia. Kolmen tunnin aikana liukseen alkoi muodostua kiteitä ja väri alkoi muuttua vaaleammaksi. Tämän jälkeen pH:ta säädettiin vielä varovasti parin minuutin välein pH 4.5:een asti. Sen jälkeen liuos jätettiin sekoittumaan tunniksi, jonka jälkeen pH säädettiin vielä 3.8:aan asti. Tämä jälkeen liuos sai jäädä sekoittumaan yön yli. Seuraavana aamuna pH vielä tarkistettiin ja säädettiin tarvittaessa 3.8:ksi. Näytteitä otettiin sopivissa väleissä ja ne tuli sentrifugoida heti näytteenoton jälkeen. Näytteistä analysoitiin liukoinen entsyymiaktiivisuus sentrifugoidusta supernatantista.



Kuva 9. Kiteytys Reactor-Ready -laitteistolla.

Liuoksen ulkonäköä pystyi seuraamaan Reactor-Ready-laitteistossa. Sen sijaan huoneenlämmössä toteutettu kiteytys tehtiin dekantterilasissa, ja se täytyi jälleen peittää foliolla raman-mittauksen takia, joten ulkonäön tarkkailu oli vain ajoittaista.



Kuva 10. Kiteytys dekanterilasissa. 1. pH-anturi 2. raman-anturi. 3. sekoitin.

Sekoitus pidettiin tasaisena koko kiteytysprosessin ajan, mutta lämpötilaa ei voitu kontrolloida dekanterilasissa. Alussa liuos oli viileää ja lämpötila kohosi prosessin aikana huoneen lämpötilaan.

8 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT

NIR-mittauksista oli jo etukäteen jonkin verran kokemusta yrityksen laadunvalvontaosastolla, sen sijaan raman-laitteistosta ja sillä mittaamisesta ei. Näytteistä johtuen mittaustilparametreja jouduttiin muuttamaan ramanin osalta niin, että yksi mittaus kesti viisi minuuttia, jotta saatiin tarpeeksi hyvä signaali. NIR-laitteistolla yksi mittaus saatiin suoritettua noin 15 sekunnissa.

8.1 Saostuskokeet

Saostuskokeista saatiin vaihtelevia tuloksia entsyymillä 1. Raman-spektreistä tehtiin mielenkiintoisia havaintoja: niistä pystyi havaitsemaan saostuksen aikana tapahtuvien molekyyli muutosten mahdollisesti aiheuttamat erot spektreissä. Spektrejä on tarkasteltu jäljempänä eri kokeiden tulosten yhteydessä muun muassa vertaamalla taulukossa 1 esitettyihin raman-siirtymiin. Saostusputkikokeiden näytteet sekä mitatut spektrit on numeroitu ja selitetty taulukossa 5. Saostusprosessin varsinaiseen monitorointiin ramanmittaukset eivät tässä tapauksessa kuitenkaan tuoneet lisäarvoa, sillä entsyymiliuoksen fluoresointiherkkyyden takia mittausaikaa jouduttiin pidentämään ja prosessissa muutokset tapahtuivat kuitenkin melko nopeasti.

Taulukko 5. Saostusputkinäytteet.

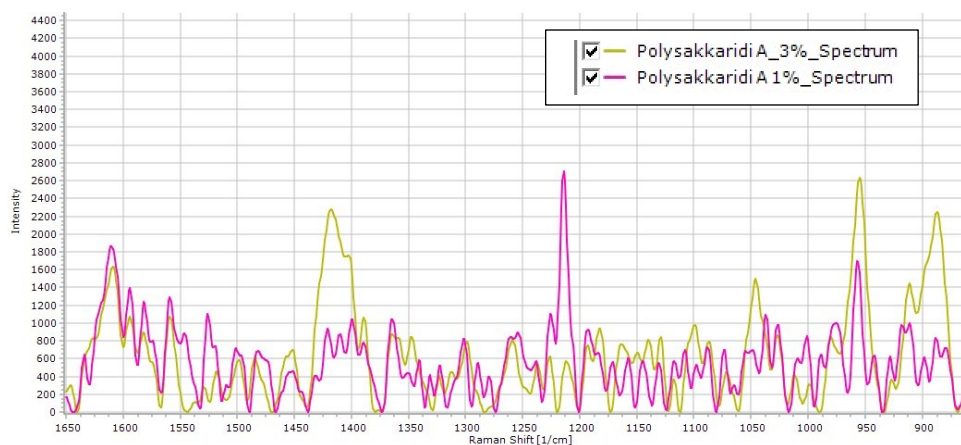
Näyte	Suhdeluku (aktiivisuus:mg poly- sakkariidi A)	Puskurin pitoisuus (M)	Spektri (sentrifugoimaton)	Spektri (sentrifugoitu, su- pernatantti)
1	1500	0,05	Precip in tubes_0001	Precip after centri- fugation_0001
2	2500	0,05	Precip in tubes_0002	Precip after centri- fugation_0002
3	3500	0,05	Precip in tubes_0003	Precip after centri- fugation_0003
4	4500	0,05	Precip in tubes_0004	Precip after centri- fugation_0004
5	7000	0,05	Precip in tubes_0005	Precip after centri- fugation_0005
6	10000	0,05	Precip in tubes_0006	Precip after centri- fugation_0006
7	3500	0,025	Precip in tubes_0007	Precip after centri- fugation_0007
8	3500	0,05	Precip in tubes_0008	Precip after centri- fugation_0008
9	3500	0,1	Precip in tubes_0009	Precip after centri- fugation_0009
10	3500	0,15	Precip in tubes_0010	Precip after centri- fugation_0010
11	3500	0,2	Precip in tubes_0011	Precip after centri- fugation_0011
12	3500	0,25	Precip in tubes_0012	Precip after centri- fugation_0012

NIR-mittauksia ei voitu toteuttaa alkuperäisen suunnitelman mukaan pelkästään anturilla, joten rakennettuja malleja ei suoraan saatu ennustamaan itse prosessia. Saostuksesta saatu spektridata ei suoraan istunut putkikokeiden avulla rakennettuihin malleihin. Lisäksi muun tyyppinen NIR-anturi voisi sopia paremmin saostusprosessiin, sillä nyt 2 mm rakoon kertyi herkästi sakkaa ja valo läpäisi heikosti näytteen.

8.1.1 Saostuskokeet koeputkissa, raman-mittaukset

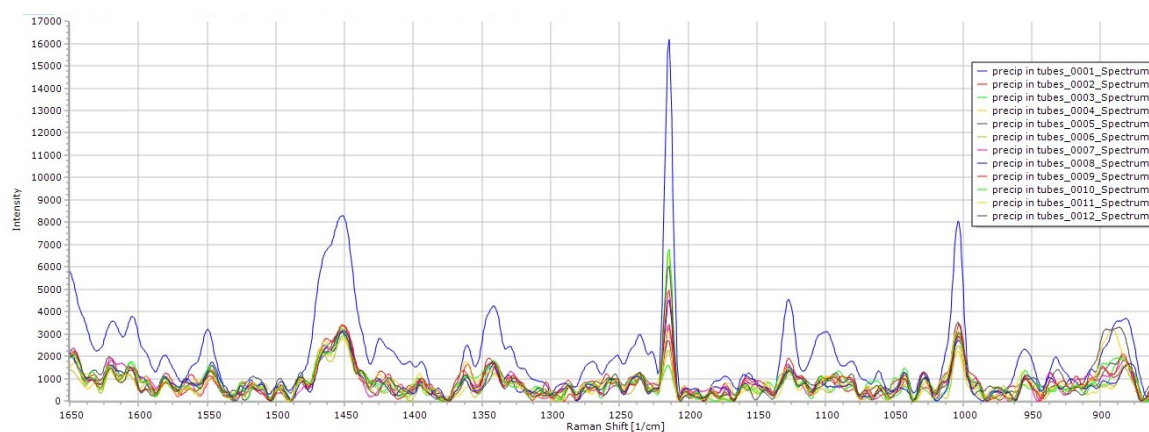
Piikkien tulkintaa varten mitattiin polysakkariidi A:n vesiliuoksen spektrit. 1 %- ja 3 % -liuoksien spektrit on esitetty kuviossa 3. Spektreissä on melko paljon kohinaa, mutta niistä voi havaita eroja: 1 % -liuoksella on kohdassa voimakas 1214 cm^{-1} piikki ja sen

vieressä kohdassa 1235 cm^{-1} hieman pienempi sivupiikki, kun taas 3 % -liuoksella vastaavissa kohdissa on kaksi toistensa kanssa yhtä suurta piikkiä.



Kuvio 3. Polysakkaridi A-vesiliuosten raman-spektrit.

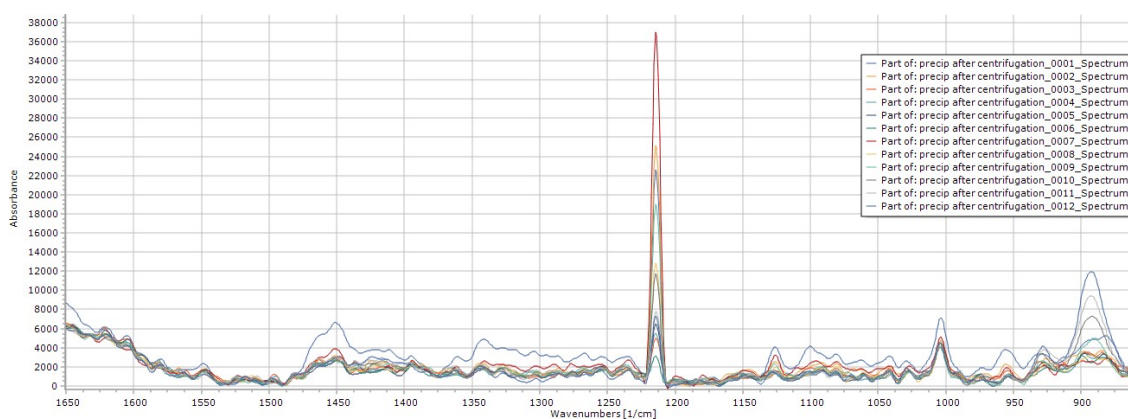
Saostusputkista mitatuista spektreistä saatiin paikannettua mahdolliset proteiinipiikit, jotka edustivat tässä tilanteessa entsyymiaktiivisuutta. Aiempien fermentointikokeiden perusteella osattiin etsiä korrelaatiota aktiivisuuden alueelta $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Sen lisäksi kohdassa n. 1000 cm^{-1} havaittu piikki näytti myös korreloivan aktiivisuuden kanssa ja tämä on tyypillinen kohta fenyylialaniinille. Spektreissä oli paljon kohinaa, joten niitä täytyi esikäsitellä reilusti. Kuviossa 4 on esitelty saostusputkinäytteiden raman-spektrit ennen sentrifugointia. Kohdassa 1550 cm^{-1} on tyypillisesti amidi II ja 1002 cm^{-1} fenyylialaniini sekä alueella $1600\text{--}1700$ vesi ja amidi I-rakenteet.



Kuvio 4. Saostus koeputkissa: näytteiden raman-spektrit ennen sentrifugointia.

Kuviossa 5 on esitetty spektrit saostusputkinäytteiden supernatanteista. Amidi I ja II sekä fenyylialaniinin piikit ovat hieman matalampia supernatantinäytteissä, sillä aktiivisuutta

jää sakkaan ja liukoinen aktiivisuus on näin ollen pienempi. Molemmissa kuvissa ensimmäinen spektri (sininen) erottuu selvästi muista korkeammalla intensiteetillä monissa kohdissa. Kyseisessä näytteessä suhdeluku on 1500, eli siinä polysakkaridi A:n määrä on suurin kaikista näytteistä, mutta myös liukoinen aktiivisuus on analyysituloksen mukaan suurin. Kyseisen näytteen ulkonäkö poikkesi hieman muista näytteistä, sillä sakka ei meinannut erottua sentrifugoinnin jälkeenkään, vaan koko näyte oli hyvin paksua ja väriltään valkoista. Tämä voi selittää korkeimman aktiivisuuden, koska sakka ei varsinaisesti erottunut liukoisesta osasta. Muissa näytteissä valkoinen sakka erottui selvästi lähes kirkkaasta, hieman kellertävästä supernatantista.

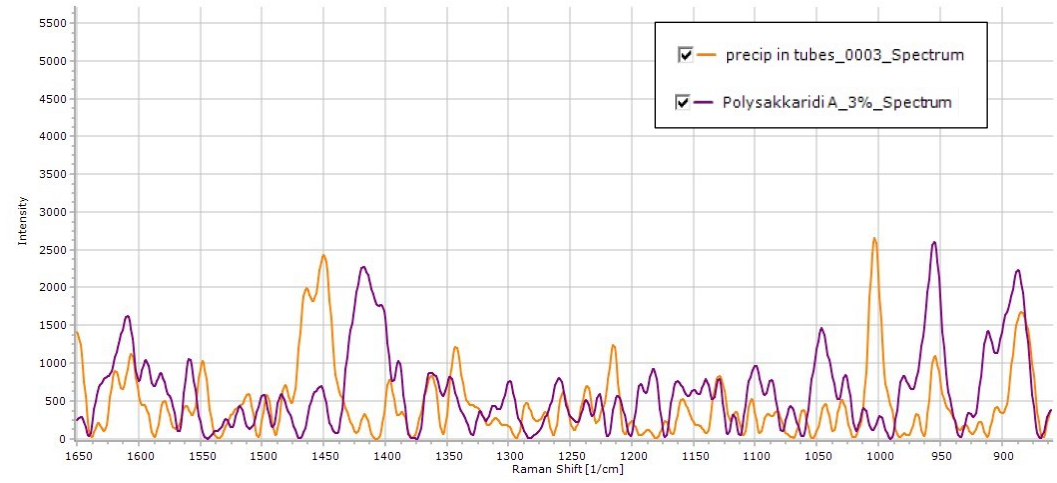


Kuvio 5. Saostus koeputkissa: näytteiden supernatanteista mitatut raman-spektrit.

Hieman yllättäen näytteissä näkyy voimakas piikki kohdassa n. 1214 cm^{-1} ja se on kaikkein voimakkain sentrifugoidun näytteen 7 supernatantissa ja matalin sentrifugoimattomassa näytteessä 3. Vastaavaa ei kuitenkaan ollut nähtävissä pelkässä entsyyminäytteessä, mutta entsyymin vesilaimennoksissa piikki tuli hieman näkyviin. Polysakkaridi A:n vesiliuoksissa piikki oli havaittavissa (kuvio 3), mutta ei läheskään yhtä voimakkaana. Samassa kohdassa esiintyi piikki myös liukoisuusputkien supernatanttinäytteiden spektreissä. Niissä kokeissa kuitenkin käytettiin eri entsyymiä ja puskuria. Aluksi pohdittiin sameuden vaikutusta, mutta suuri osa sentrifugoitujen näytteiden supernatanteista oli kuitenkin melko kirkkaita, samoin kuin polysakkaridi A:n vesilaimennokset. Etsimisestä huolimatta piikin 1214 cm^{-1} aiheuttajaa ei varmuudella saatu selville.

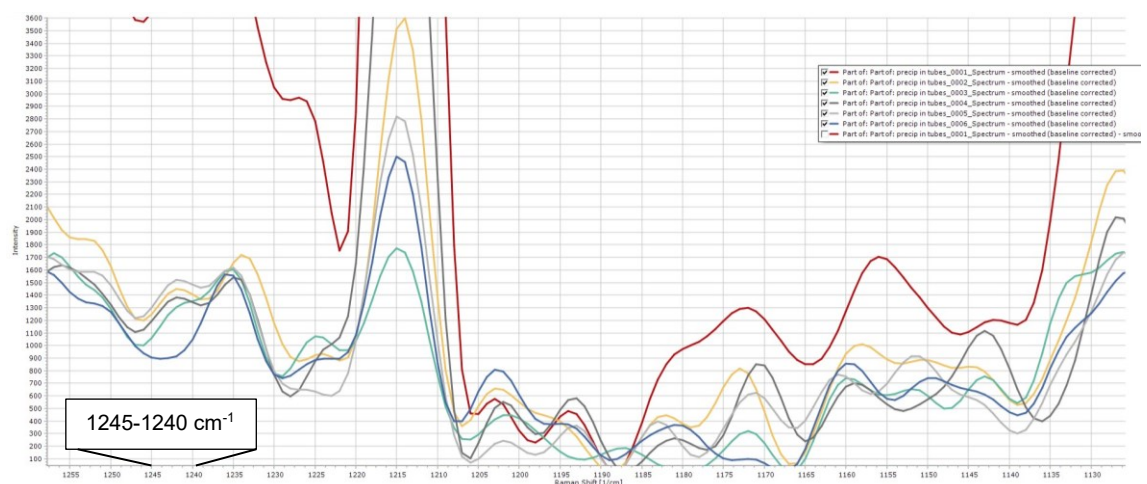
Kuviossa 6 on verrattu polysakkaridi A:n vesiliuoksen ja sentrifugoimattoman saostusputkinäytteen numero 3 raman-spektrejä. Näytteellä 3 on proteiinalueella entsyymistä johtuen voimakas piikki kohdassa 1000 cm^{-1} , kun taas polysakkaridilla vastaavassa kohdassa on hyvin pieni piikki. Polysakkaridilla on sen sijaan kohdissa $1175\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ ja

1400–1440 cm^{-1} piikit, mutta ne eivät näy vastaavasti saostusnäytteessä. Tästä voi päätellä polysakkaridin muodostaneen komplekseja entsyymien kanssa, eikä sitä näin ollen ole samalla tavalla vapaana liuoksessa.



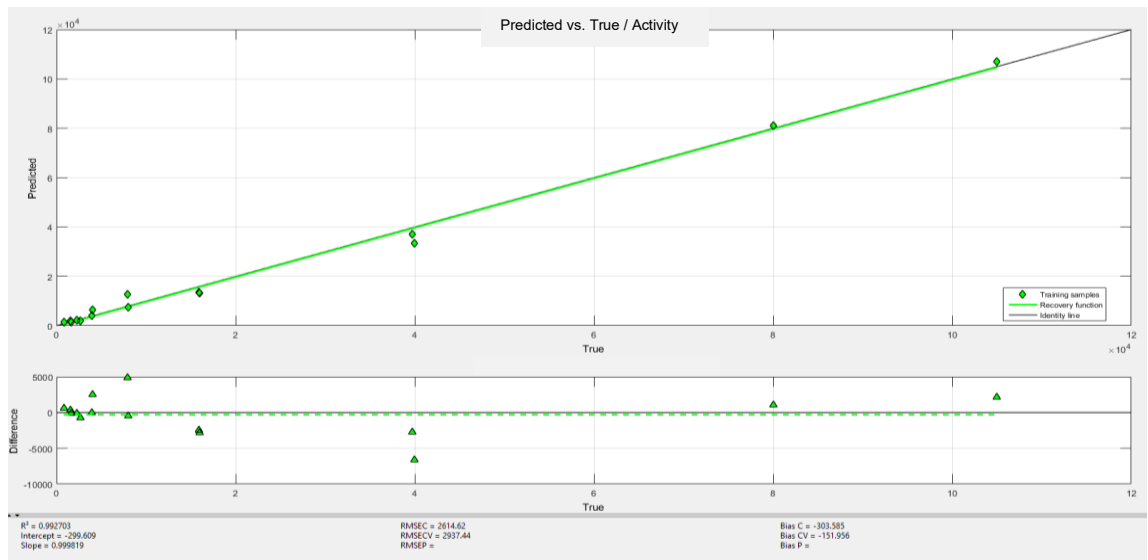
Kuvio 6. Polysakkaridi A:n vesiliuoksen ja saostusputkinäyte 3:n raman-spektrit.

Kuviossa 7 on esitetty osa sentrifugoimattomien saostusputkien 1–6 spektreistä, joissa siis muuttujana oli aktiivisuuden ja polysakkaridi A:n suhde. Spektreistä voidaan nähdä, että suhdeluvulla 10000 ei ole lainkaan piikkiä kohdassa 1240–1245 cm^{-1} , kun taas muilla suhdeluvuilla on jonkinlainen piikki. Suhdeluku 10000 sisältää kaikista pienimmän määrän polysakkaridi A:ta. Aiemmin taulukossa 1 esiteltujen proteiinialueiden perusteella kyseessä voisi olla amidi III alue.

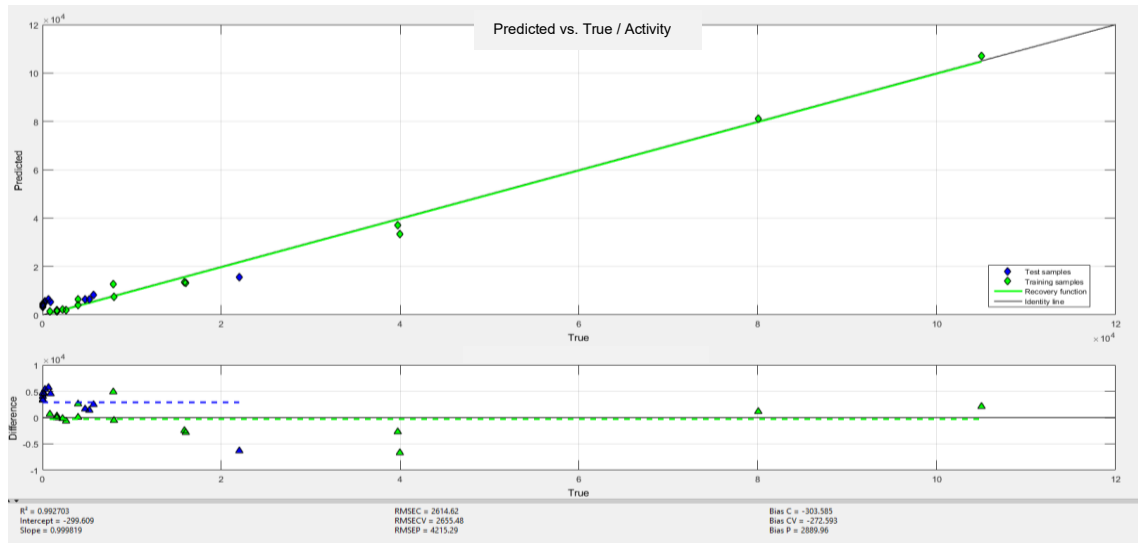


Kuvio 7. Raman-spektrit saostuksen koeputkinäytteistä ennen sentrifugointia: eri polysakkaridi A-aktiivisuussuhteet.

Putkikokeiden spektrien avulla ei kuitenkaan saatu rakennettua hyvää mallia saostukselle. Sen sijaan materiaalina käytetyn entsyymien eri laimennosten spektreistä saatiin rakennettua malli, jolla voi ennustaa aktiivisuutta. Testinäytteinä mallille käytettiin putkikokeiden supernatanttinäytteitä, jotka edustivat siis liukoista aktiivisuutta eri saostusolosuhteissa. Kuviossa 8 on esitetty malli entsyymiaktiivisuudelle, joka on rakennettu entsyymimateriaalin vesilaimennoksista ja jäljempänä kuviossa 9 mukana ovat testinäytteet. Kuvissa vaaka-akselilla on mitattu aktiivisuusarvo ja pystyakselilla ennustettu aktiivisuusarvo. Pääosin malli ennustaa hieman korkeampaa tulosta testinäytteille, kuin mitä todellisuudessa on mitattu. Vaikka näytteitä oli lukumäärällisesti vähän, ennuste on silti todella hyvä mallin selitysasteen ollessa 99,3 %.



Kuvio 8. Raman-kalibrintimalli entsyymiaktiivisuudelle.



Kuvio 9. Kalibrointimalli ja testinäytteet (siniset pisteet).

8.1.2 Saostuskokeet koeputkissa, saostus polysakkaridi B:llä

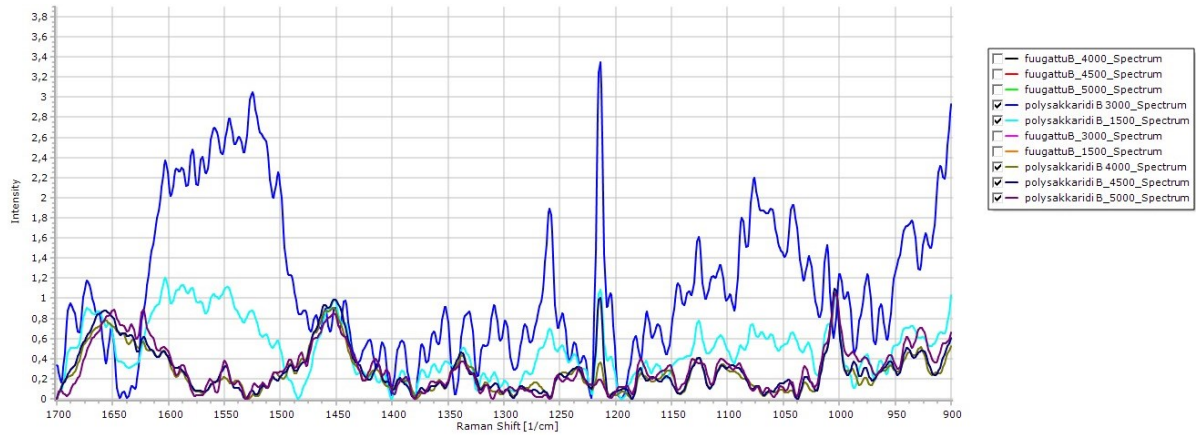
Polysakkaridi B:llä saostetuista näytteistä mitattiin vain raman-spektrit. Taulukkoon 6 on kerätty tiedot näytteistä sekä niiden spektreistä.

Taulukko 6. Polysakkaridi B, saostusnäytteet.

Näyte	spektri (sentrifugoimaton)	spektri (sentrifugoitu, supernatantti)	Suhde (aktiivisuus:mg po- lysakkaridi B)
1B	polysakkaridiB_1500	fuugattuB_1500	1500
2B	polysakkaridiB_3000	fuugattuB_3000	3000
3B	polysakkaridiB_4000	fuugattuB_4000	4000
4B	polysakkaridiB_4500	fuugattuB_4500	4500
5B	polysakkaridiB_5000	fuugattuB_5000	5000

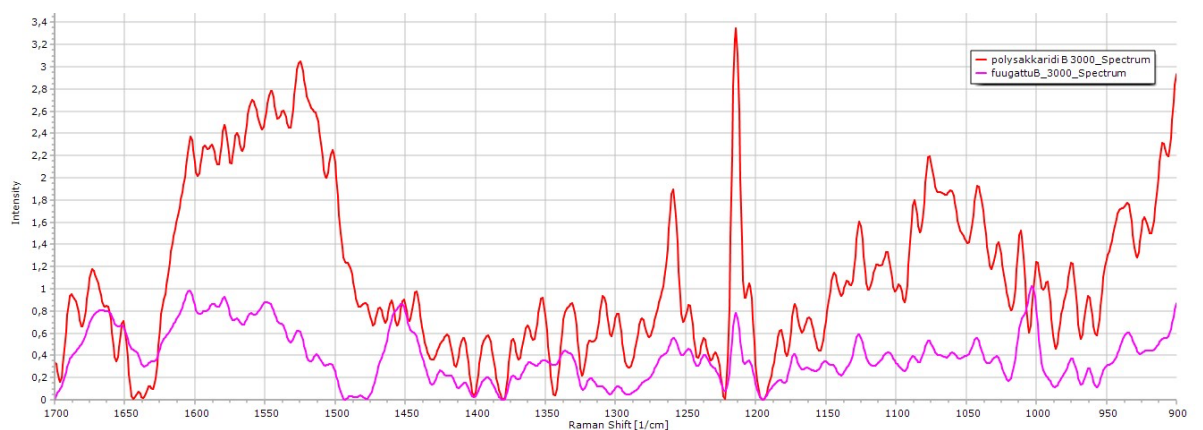
Kuvioissa 10 on esitetty sentrifugoimattomien näytteiden mitatut raman-spektrit. Spektreissä oli hieman enemmän häiriötä ja kohinaa kuin mittauksissa polysakkaridilla A. Raman-intensiteetti on voimakkaimmillaan, kun polysakkaridi B:n ja aktiivisuuden suhde on 3000. Kyseisen näytteen sakka oli ulkonäöltään hieman pumpulimaista ja ilmavampaa kuin muilla näytteillä ja spektrin kohina voi johtua osittain siitäkin. Kohdassa 1550 cm^{-1}

(amidi II) on kaikissa spektreissä jonkinlainen piikki, mutta sen intensiteetti on pienin, kun suhdeluvut ovat suurimmillaan (4000–5000).



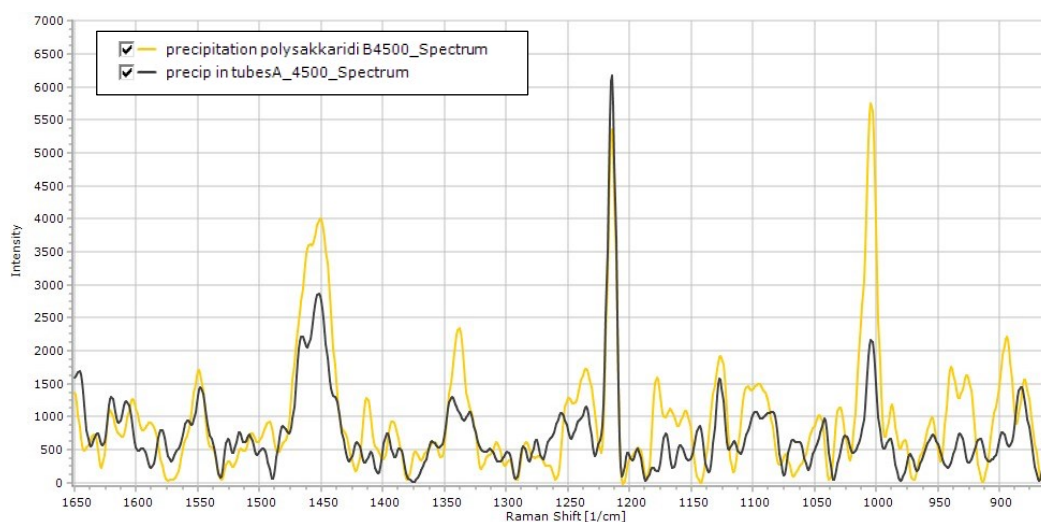
Kuvio 10. Sentrifugoimattomien polysakkaridi B:llä saostettujen näytteiden raman-spektrit.

Mielenkiintoisia ovat näytteet 1B ja 2B, koska ne poikkeavat kolmesta muusta, jotka puolestaan näyttävät hyvin samalta spektrien suhteen. Kuviossa 11 on esitetty näytteen 2B (suhdeluku 3000) spektrit sentrifugoimattomasta näytteestä sekä sen supernatantista. Spektrissä esiintyy jälleen melko paljon kohinaa. Aktiivisuuden kanssa korreloiva piikki kohdassa noin 1000 cm^{-1} on hieman siirtynyt sentrifugoinnin jälkeen vasemmalle ja piikkuhuippu on selkeästi eri kohdassa kuin ennen sentrifugointia. Myös kohdan $1400 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ piikki selkeytyy sentrifugoinnin jälkeen.



Kuvio 11. Polysakkaridi B, suhdeluku 3000. Punainen on sentrifugoimaton näyte ja violetti sen supernatantti.

Kuviossa 12 on esitetty saostusnäytteet 4 ja 4B. Aktiivisuus-polysakkaridisuhde on molemmissa 4500. Kuvioista nähdään, että polysakkaridilla A saostetussa näytteessä liukoista aktiivisuutta näyttäisi olevan vähemmän, sillä piikit proteiinikohdissa n. 1000 cm^{-1} sekä $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ovat selvästi matalammat. Spektrien muodot ovat hyvin samanlaiset ja vain joitakin eroja löytyy, esimerkiksi kohdassa 1425 cm^{-1} , mutta ne eivät ole proteiinirakenteiden kannalta kiinnostavia alueita.



Kuvio 12. Entsyymi 1:n saostus polysakkaridilla A ja B, suhdeluku 4500.

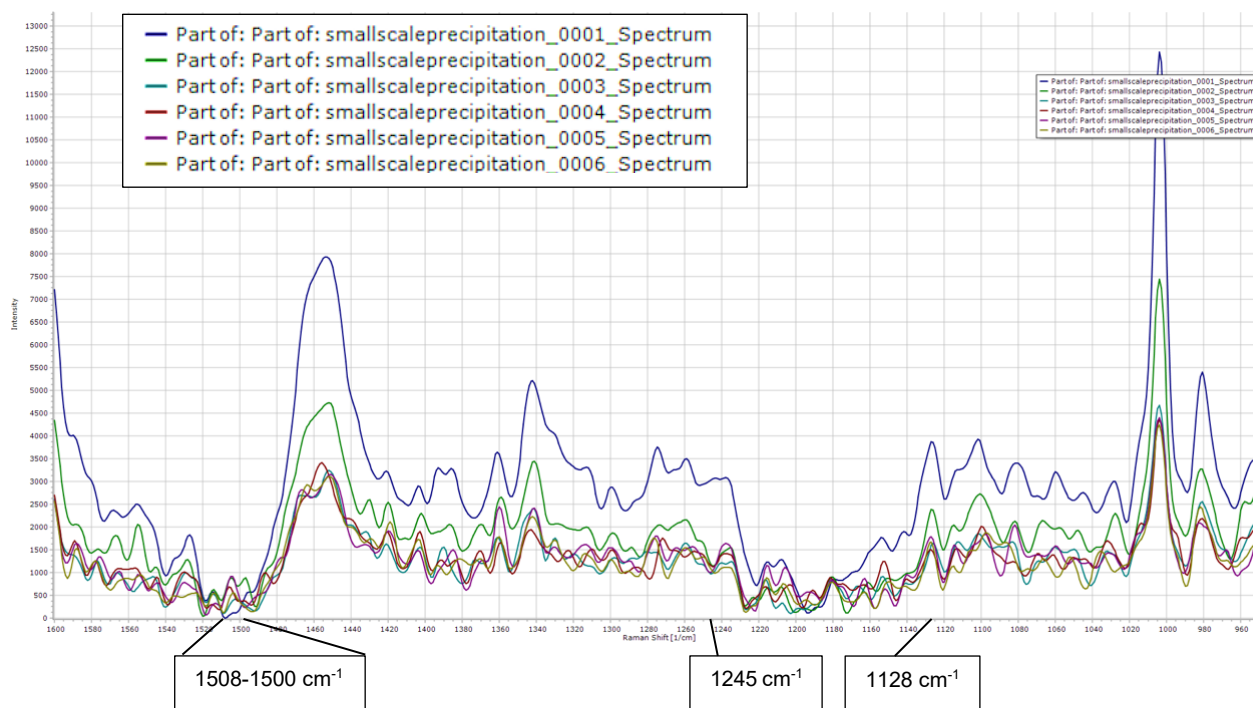
8.1.3 Saostus dekanterilasissa, raman-mittaukset

Saostusreaktio tapahtui hyvin nopeasti ja yksi raman-mittaus tuotti spektrin vasta reilun kuuden minuutin päästä, joten nopeita muutoksia sillä ei ehtinyt havaitsemaan. Saostusliuos fluoresoi herkästi, joten raman-mittauksen asetukset oli säädetty sen mukaan, eikä mittausta ollut mahdollista nopeuttaa. Näin ollen päädyttiin siihen tulokseen, että raman-mittaus ei tuo merkittävää lisäarvoa itse prosessin seurantaan. Sillä voi kuitenkin tutkia mahdollisia molekyyli muutoksia, joita saostusreaktio aiheuttaa. Saostuksen ajalta mitattiin spektrit ja otettiin näytteet neljästä kohdasta analyysia varten. Analyysitulokset on esitetty taulukossa 7. Siitä nähdään, että heti saostuksen ensimmäisessä näytteessä on enää hyvin pieni osa kokonaisaktiivisuudesta liukoisena jäljellä. Loppuosa aktiivisuudesta on sakassa. Pelkän entsyymi 1-liuoksen aktiivisuus ennen saostusta oli noin 26000 U ja saostusliuoksen totaaliaktiivisuus lopussa 25500 U. Entsyymiaktiivisuus pysyy siis käytännössä samana liuoksessa, suurin osa vain on sakassa.

Taulukko 7. Saostus dekanterilasissa.

Näyte	Liukoinen entsyymiaktiivisuus (%)
1. Entsyymi 1 ennen saostusta	100
2. Aloitus	5,6
3. Spektri 3, 15 min	0,9
4. Spektri 6, 30 min	1,0
5. Loppunäyte, 60 min	1,1

Saostuksen spektristä voidaan havaita mahdollisia molekyyli muutoksia prosessin edetessä. Kuviossa 13 nähdään kaikki saostuksen aikana mitatut spektrit, ylin (sininen) on prosessin alusta ja alin (keltainen) lopusta.



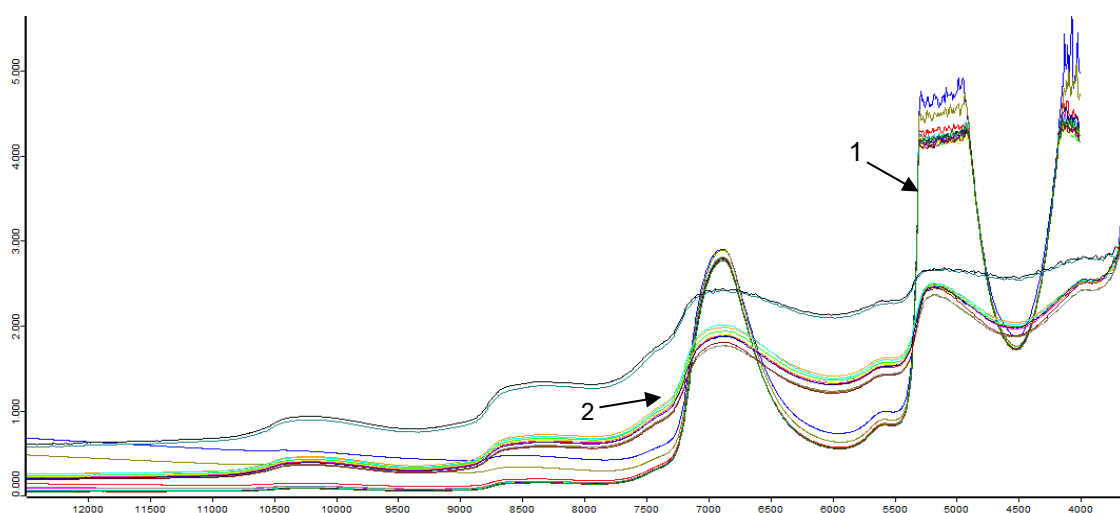
Kuvio 13. Saostuksen aikana mitatut raman-spektrit.

Raman-siirtymän n. 1245 cm^{-1} kohdalla voidaan katsoa piikin häviävän lähes kokonaan prosessin edetessä. Tämä vastaisi jälleen amidi III -aluetta. Noin $1500\text{--}1508\text{ cm}^{-1}$ kohdalla ei ole lähes ollenkaan piikkiä ensimmäisen mittauksen aikana prosessin alussa. Sille kohdalle kuitenkin muodostuu hyvin nopeasti piikki, jonka paikka hieman vaihtelee

sekä intensiteetti laskee prosessin loppua kohden. Kohdassa 1128 cm^{-1} on piikki koko prosessin ajan (c-c-stretching).

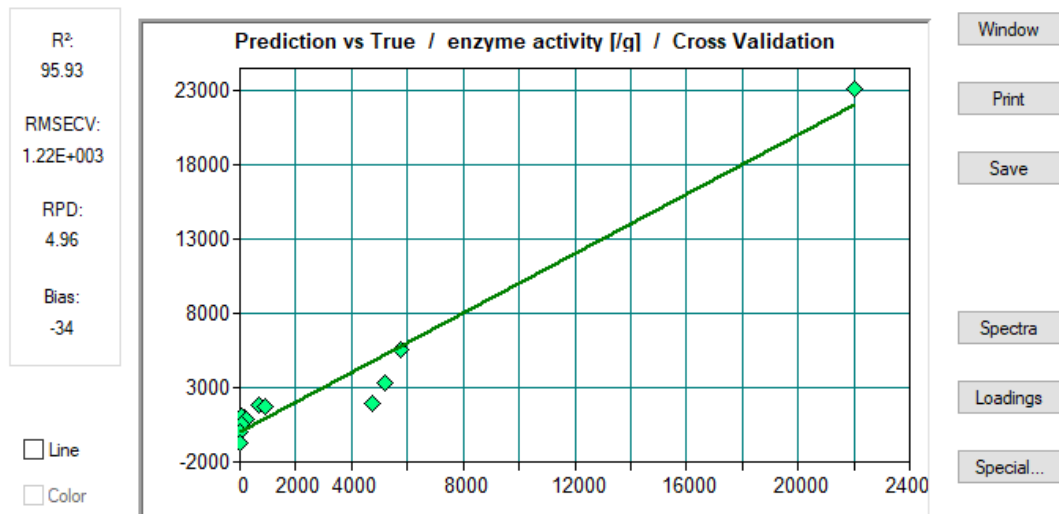
8.1.4 Saostuskokeet koeputkissa, NIR-mittaukset

Saostusputkista mitatut käsittelemättömät NIR-spektrit on esitetty kuviossa 14. Spektreistä erottaa eri tavoin mitatut näytteet: sentrifugoitujen näytteiden supernatantit (merkitty kuvioon numerolla 1) mitattiin kyveteissä ja niissä veden piikit ovat voimakkaasti havaittavissa kohdissa n. 7000 cm^{-1} ja 5000 cm^{-1} . Lasiastiassa ennen sentrifugointia mitattujen näytteiden spektrit kulkevat hieman eri tavoin alempana (merkitty kuvioon numerolla 2).



Kuvio 14. Saostusputkikokeiden NIR-spektrit.

NIR-mallinnus saostusputkien supernatanttinäytteistä onnistui melko hyvin. Kuviossa 15 on esitetty yhden mallin ristikkäisvalidointikuvaaja. Mallin selitysaste on menetelmälle hyvä, n. 96 %. RPD-arvo on myös melko korkea ja sen perusteella malli on hyvä. Kuitenkin mallissa on kokonaisuudessaan vain vähän näytteitä, ja kokemuksen perusteella todelliseen hyvään malliin tarvittaisiin useita kymmeniä näytteitä.



Kuvio 15. NIR-kalibrintimalli saostusputkikokeiden perusteella.

Jotta malli olisi parempi, pitäisi siihen saada lisää näytteitä tasaisesti koko aktiivisuusalueelta. Nyt mallissa on vain yksi korkean aktiivisuuden näyte ja loput suhteellisen matalia. Toinen vaihtoehto olisi tehdä erillinen malli vain matalammille aktiivisuuksille. NIR-mallilla ei voi kuitenkaan ekstrapoloida, joten malli toimii vain sillä aktiivisuusalueella, jolle se on rakennettu.

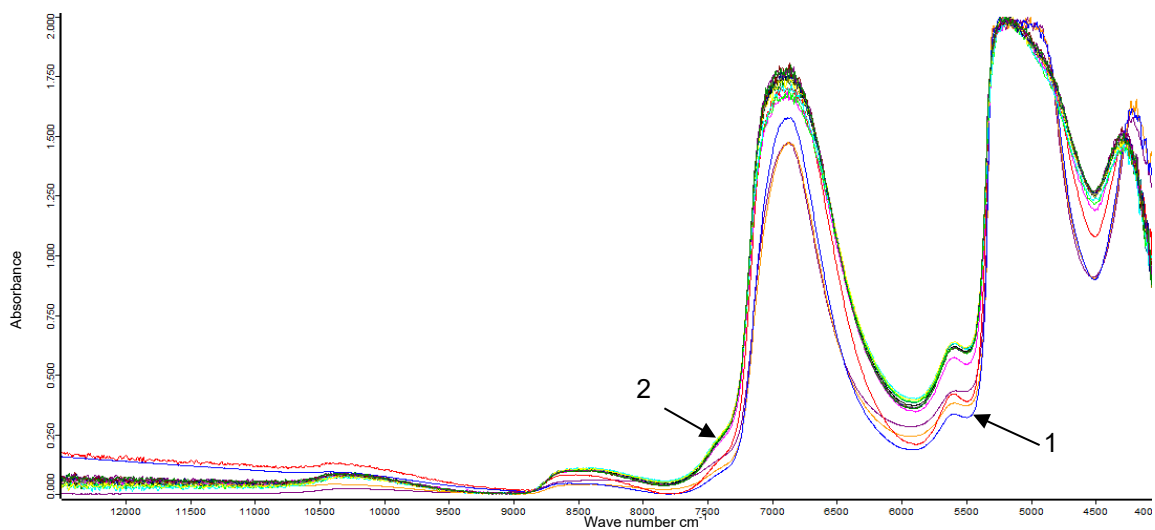
8.1.5 Saostus pienessä mittakaavassa, NIR-mittaukset

Saostuksen aikana kerättiin näytteitä sopivissa väleissä analysointia varten ja spektrit mitattiin myös aina näytteenoton yhteydessä. Analysoidut aktiivisuustulokset on esitetty taulukossa 8. Niistä nähdään, että liukoinen aktiivisuus putoaa heti saostusprosessin alussa ja jää sen jälkeen tasaiseksi. Suurin osa aktiivisuudesta on siis sakassa. Entsyymiaktiivisuus saostusliuoksessa oli lopussa 25034 U. Lähtöaktiivisuus oli sama kuin dekanterilisaostuksessa, sillä materiaalina oli sama entsyymi 1.

Taulukko 8. Saostus Reactor-Ready-laitteistolla.

Näyte	Liukoinen entsyymiaktiivisuus (%)
Entsyymi 1 ennen saostusta	100
Aloitus	1,5
3 min	0,5
30 min	0,6
45 min	0,7
60 min	0,7
Loppu, 75 min	0,6

Saostuksen aikana mitatut, normalisoidut NIR-spektrit on esitetty kuviossa 16: pystyakselilla on absorbanssi ja vaaka-akselilla aaltoluku (cm^{-1}). Sininen spektri on entsyymi 1 ennen saostusta (merkitty kuvioon numerolla 1) ja vihreät spektrit saostuksen lopusta (merkitty kuvioon numerolla 2). Spektreissä on havaittavissa melko paljon kohinaa. Suuri piikki noin 7000 cm^{-1} kohdalla on veden aiheuttama.



Kuvio 16. Normalisoidut saostusprosessista mitatut NIR-spektrit.

Kuitenkin selkeät eroavaisuudet saostusprosessin aikaisissa spektreissä on havaittavissa kohdissa 4500 (N-H kombinaatioalue), 5500–6500 (N-H ylivärähtelyt, C-H ylivärähtelyt) ja $7500\text{--}8500 \text{ cm}^{-1}$.

8.2 Liukoisuuskokeet ja kiteytys

Myös kiteytyskokeista entsyymillä 2 saatiin vaihtelevia tuloksia. Kiteytysprosessi on paljon pitkäkestoisempi verrattuna saostusprosessiin, joten raman-mittauksista saatu hyöty oli suurempi kuin saostuksessa. Liukoisuusputkikokeiden raman-spektreillä saatiin rakennettua jonkinlainen kalibrointimalli kiteytysprosessille, joka ennustaa liukoisen aktiivisuuden trendin. Liukoisuusputkikokeiden mitatut liukoiset aktiivisuudet on esitetty taulukossa 9. Näitä tuloksia käytettiin kalibrointimallin luomisessa.

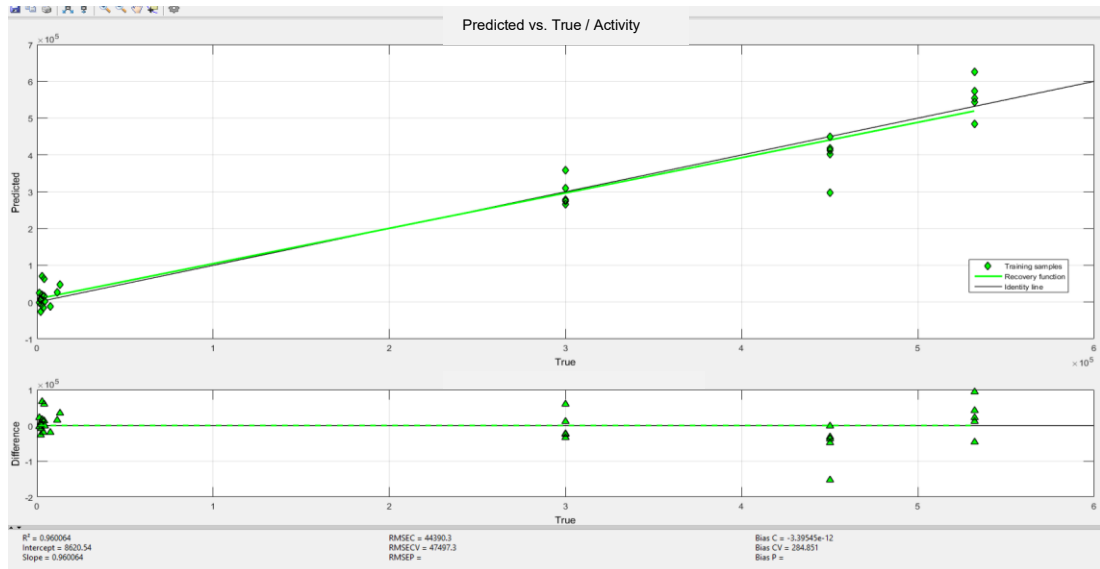
Taulukko 9. Liukoisuuskokeet putkissa, analyysitulokset.

Näyte	Puskurin pH	Kokonaisaktiivisuus (U)	Analysoitu liukoisen aktiivisuus (%)
1	3,8	350000	0,43
2	4,2	350000	0,44
3	4,6	350000	0,64
4	5	350000	1,25
5	5,6	350000	3,69
6	3,8	450000	0,48
7	4,2	450000	0,46
8	4,6	450000	0,54
9	5	450000	0,88
10	5,6	450000	2,55
11	3,8	550000	0,53
12	4,2	550000	0,54
13	4,6	550000	0,64
14	5	550000	0,75
15	5,6	550000	0,14

8.2.1 Liukoisuuskokeet koeputkissa, raman-mittaukset

Liukoisuuskokeiden koeputkista mitattujen spektrien avulla kokeiltiin mallintamista parilla eri tekniikalla, piikin integroinnilla sekä mekanistisella menetelmällä (hard modeling). Malleista tuli kohtalaisen hyviä ja ne olivat melko samanlaisia molemmilla tekniikoilla. Kuviossa 17 on esitetty piikin integrointiin perustuva kalibrointimalli. Kyseisessä mallissa selitysaste on hyvä, noin 96 %. Alhaisempien aktiivisuuksien rykelmässä on kuitenkin nähtävissä melko paljon hajontaa ja malli kaipaisikin lisää näytteitä hieman tasaisemmin

koko aktiivisuusalueelta. Nyt malli nimittäin voi vääristää liikaa matalampien aktiivisuuksien tuloksia.



Kuvio 17. Liukoisuuskokeiden perusteella rakennettu raman-kalibrointimalli (piikin integrointi).

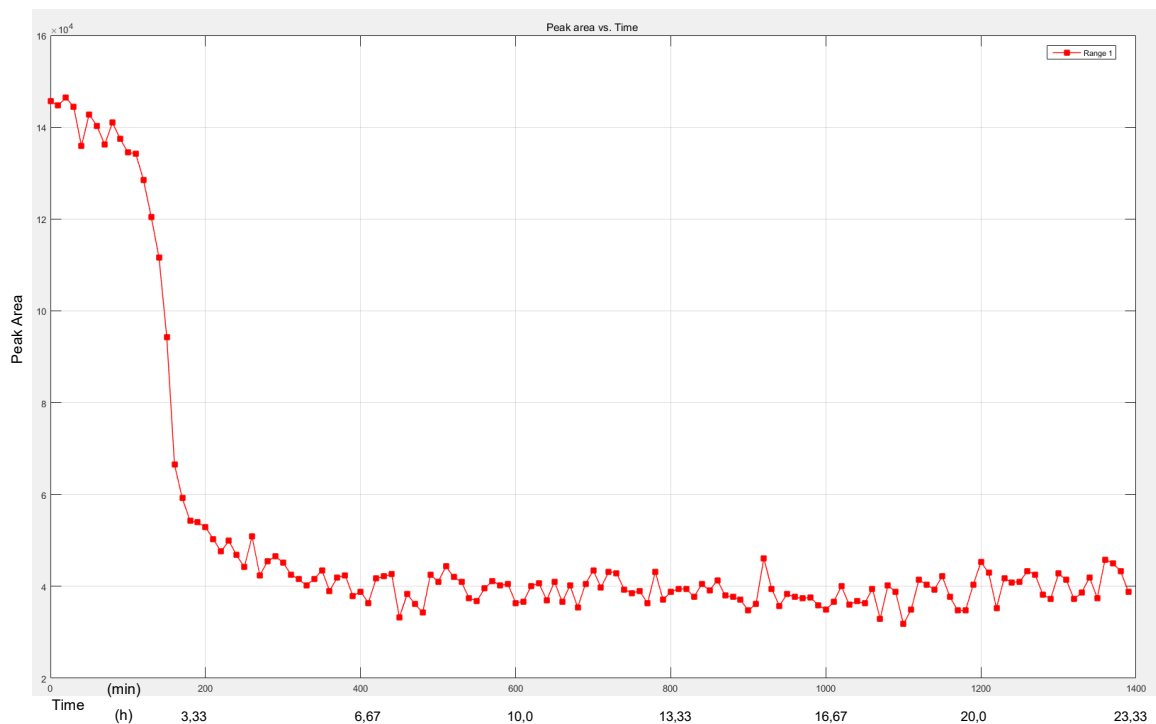
8.2.2 Kiteytys dekanterilasissa, raman-mittaukset

Kiteytyksen ajalta saatiin kerättyä yhteensä 8 näytettä aktiivisuusanalyysiin. Raman-laitte mittasi spektrejä automaattisesti 10 minuutin välein. Taulukossa 10 on esitetty liukaisen aktiivisuuden muutokset sekä mitatut pH-arvot. Liukoinen aktiivisuus lähtee laskemaan prosessin edetessä ja pysyy lopulta melko tasaisesti matalalla, eli aktiivisuus on pääasiassa kiteissä.

Taulukko 10. Kiteytys dekantterilasissa.

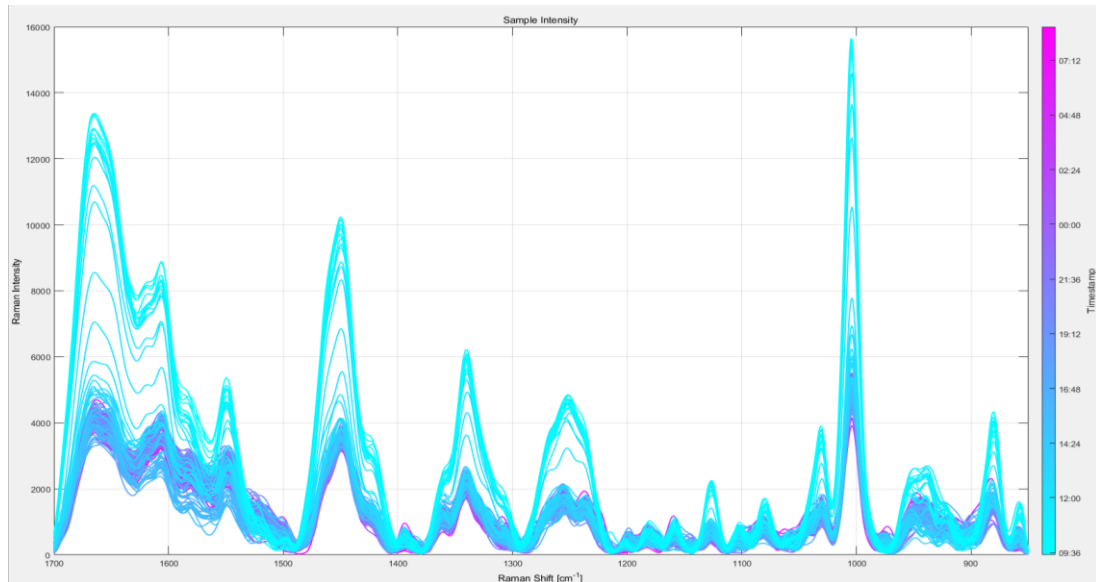
Näyte	pH	Liukoinen aktiivisuus (%)
0 h	6,51	100
0,52 h	5,02	95
1,05 h	4,78	80
2,72 h	4,93	23
4,1 h	4,51	9
5,27 h	4	5
5,57 h	3,8	6
21,18 h	3,85	3

Liukoisuuskokeiden spektrien avulla saatiin rakennettua malli piikkien pinta-alaan perustuen liukoiselle aktiivisuudelle. Aktiivisuus korreloi piikin alaen useassa kohdassa, mutta tässä käytettiin piikkiä alueella noin 1000 cm^{-1} . Kun kiteytyksen spektrit analysoitiin mallia vasten, saatiin aikaan kuvion 18 mukainen trendi, joka kuvastaa piikin pinta-alan muutosta ajan kuluessa. Piikin pinta-ala alkaa selvästi pienentyä siinä vaiheessa, kun kiteitä alkaa muodostua liukseen enemmän.



Kuvio 18. Liukoisen aktiivisuuden ennuste kiteytysprosessin aikana.

Kuviossa 19 on esitetty kaikki kiteytyksen aikana mitatut esikäsitellyt spektrit. Prosessin alussa spektrien piikit ovat korkeampia (vaaleansinisellä) ja piikit madaltuvat prosessin edetessä (lila). Piikin koko korreloi liukoisen aktiivisuuden kanssa hyvin kohdissa noin 1000 cm^{-1} ja $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$.

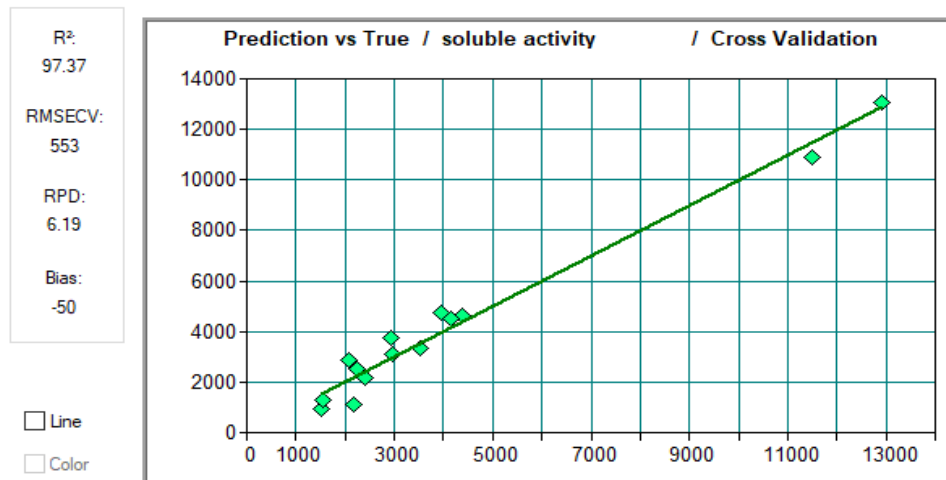


Kuvio 19. Kiteytyksen raman-spektrit.

Itse kiteytysprosessin referenssinäytteillä mallintaminen onnistui myös hyvin ja mallin selitysaste olikin 99,77 %. Kuitenkin malli perustui vain kuuteen näytteeseen, joten sitä ei voi pitää luotettavana, mutta se antaa suuntaa sille, että kiteytysprosessin voisi saada mallinnettua hyvin liukoisen aktiivisuuden osalta, kun näytteitä olisi riittävästi.

8.2.3 Liukoisuuskokeet koeputkissa, NIR-mittaukset

Liukoisuuskokeiden avulla saatiin rakennettua kalibrointimalli liukoisen aktiivisuuden ennustamiselle. Mallilla ei kuitenkaan saatu järkeviä aktiivisuusennusteita kiteytyksen spektreistä, sillä kiteytys mitattiin anturilla ja mallin spektrit kyveteissä anturin hajottua. Mallissa käytettiin sentrifugoitujen koeputkinäytteiden spektrejä ja aktiivisuustuloksia. Kuviossa 20 on esitetty mallin ristikkäisvalidointikuvaaja. Kuvaajan selitysaste on hyvä, 97,37 %. Samoin RPD-arvo on korkea, joka kertoo vahvasta mallista. Mallissa on kuitenkin suhteellisen vähän näytteitä. Vahvaan malliin tarvittaisiin enemmän näytteitä ja koko halutulta aktiivisuusalueelta. Vaihtoehtoisesti voi myös tehdä eri mallit eri aktiivisuustasoille.



Kuvio 20. Liukoisuusputkikokeista tehty NIR-kalibrointimalli, ristikkäisvalidointi.

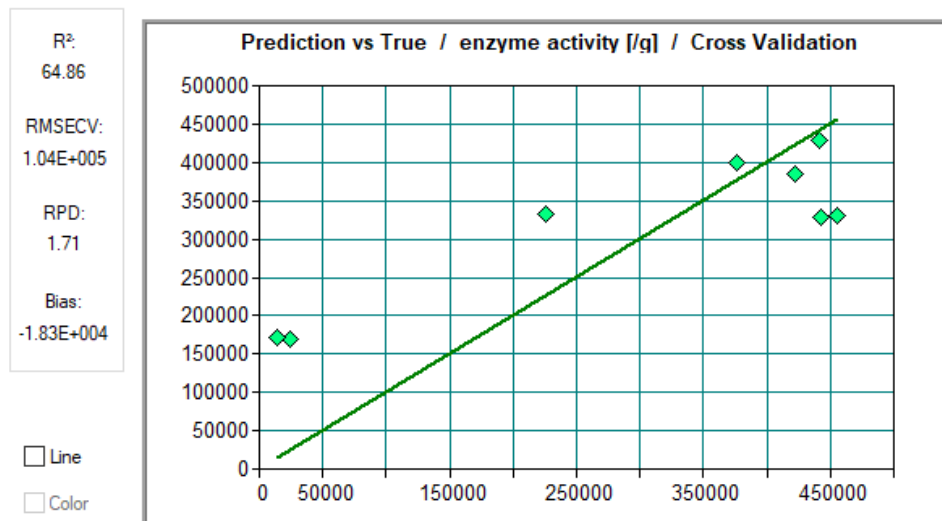
8.2.4 Kiteytys pienessä mittakaavassa, NIR-mittaukset

Taulukosta 11 nähdään, että liukoinen aktiivisuus lähtee laskemaan prosessin edetessä ja pH:ta alaspäin säädettyä, kuten oli tarkoituskin. Kuitenkin liukoinen aktiivisuus näyttäisi nousevan takaisin lähtöpisteeseen näytteessä 7, mutta tämän voidaan olettaa analyysivirheeksi. Se voi johtua esimerkiksi siitä, jos entsyymikiteitä on jäänyt näytteen sentrifugoinnista huolimatta.

Taulukko 11. Kiteytys Reactor-Ready-laitteistolla.

Näyte	pH	Liukoinen aktiivisuus (%)
1. Entsyymi ennen kiteytystä	6,54	100
2. 0 h	6,54	100
3. 0,27 h	5,27	103
4. 0,7 h	4,80	85
5. 2,07 h	4,81	96
6. 2,53 h	4,85	51
7. 3,45 h	4,51	100
8. 4,62 h	4,11	5
9. 6,27 h	3,82	3
10. 24,15 h	3,83	2

Kiteytysprosessia ei siis saatu ennustettua liukoisuusputkikokeiden NIR-mallilla, sillä ne mitattiin kyvetissä ja itse prosessia seurattiin anturilla. Anturilla mitatuista spektreistä ei myöskään saatu muodostettua järkevää mallia, sillä ohjelman mukaan referenssinäytteiden tulokset korreloivat huonosti mitattujen spektrien kanssa. Kuviosta 21 nähdään, että sovitettu kalibrointisuora ei kulje lähes ollenkaan pisteiden kautta ja siksi korrelaatiokerroin on huono, vain 64,86 %. Lisäksi RPD luku on alle 2, joka kertoo huonosta mallista.



Kuvio 21. Kalibrointimalli kiteytyksen NIR-spektreistä.

9 YHTEENVETO

Kaikki mittaukset eivät sujuneet suunnitellusti. NIR-anturin hajoaminen kesken kokeiden vaikutti tuloksiin siltä osin, että malleja jouduttiin rakentamaan alkuperäisestä suunnitelmasta poiketen kyveti- ja lasiastiamittauksia vasten putkikokeista, joissa tarkoitus oli käyttää anturia. Näin anturilla mitattuja kiteytys- ja saostusprosesseja ei voitu suoraan testata malleja vasten. Kuitenkin suuntaa antavat kalibrintimallit onnistuttiin rakentamaan saostusputkinäytteiden sekä liukoisuuskokeiden NIR-spektrien avulla. Kiteytys ja saostusprosesseihin voisi mahdollisesti sopia paremmin jonkin muun tyyppinen NIR-anturi, kuin nyt käytetty transflection probe 2 mm:n valotiellä. Tämä on perusanturi Brukerin mukaan kaikille lietteille ja emulsioille sekä esimerkiksi fermentointeihin. Brukerilta löytyy antureita myös heijastusmittauksiin, jota saostuksen tai kiteytyksen kaltaisessa sovelluksessa voisi kokeilla. Diffuusioheijastus-anturia (diffuse reflectance probe) Bruker suosittelee kiinteille aineille, lietteille sekä läpinäkymättömille nesteille. Anturi kuitenkin on itsessään kätevin ja paras vaihtoehto prosessin monitoroinnissa, sillä mittaukset saadaan tehtyä suoraan reaktorista. Erillinen näytteiden otto ja mittaus NIR-laitteella muulla tavoin voisi myös olla vaihtoehto, mutta tällöin mittausdata ei tule reaaliajassa ja vaaditaan näytteenottaja sekä mittaja. NIR-mittausten tuloksia ei siis täysin saatu kaikilta osin hyödynnettyä.

Raman-laitteiston osalta mittaukset sujuivat pääosin ongelmitta, vaikka laitetta ei voinutkaan siirtää pois Pilot-hallista Reactor-Ready-mittauksia varten, vaan prosessi piti suorittaa laboratoriovälineillä ja ilman lämpötilakontrollia. Raman-laitteisto oli testikäytössä, kuten sen ohjelmistokin ja ohjelmistolisenssien umpeutuminen aiheutti omat haasteensa. Mitattuja spektrejä kuitenkin pystyy vielä tarkastelemaan muilla ohjelmilla, kuten NIR-laitteiston OPUS-ohjelmalla, mutta luotuja malleja ei pysty tarkastelemaan tai muokkaamaan. Liukoisuusputkinäytteistä mitattujen raman-spektrien avulla onnistuttiin luomaan kalibrintimalli kiteytysprosessille, joka ennustaa liukoisen aktiivisuuden trendin prosessin aikana. Myös entsyymiaktiivisuudelle saatiin rakennettua kalibrintimalli entsyymi 1:n vesiliuosten perusteella. Sen sijaan saostusprosessin varsinaiseen monitorointiin ramanista ei koettu olevan hyötyä, sillä prosessissa muutokset tapahtuivat melko nopeasti ja spektrien mittaus kesti siihen nähden liian kauan. Raman-kalibrintimallia ei rakennettu saostusprosessille. Raman-spektrejä tutkimalla voidaan kuitenkin saada lisätietoa molekyyli muutoksista saostuksessa, joten tutkimusmielessä ramanista voi olla hyötyä.

Tämän työn tulosten perusteella raman-teknologialla on potentiaalia tuoda lisähyötyä ki-teytysprosessin monitorointiin sekä saostusprosessin tutkimiseen. Ramanin hyvänä puolena on spektrin piikkien suora korrelaatio analyytin pitoisuuden kanssa, jolloin piikin koosta voidaan heti tehdä päätelmiä. Mittauksissa käytetty anturi myös sopi kaikkien näytteiden mittaukseen.

NIR-teknologialla voidaan saada käyttökelpoisia spektrejä molemmista prosesseista, mutta erilainen anturi antaisi mahdollisesti parempia tuloksia. Nyt käytössä olleen anturin valotie oli 2 mm, joten niin pieneen rakoon pääsi kertymään kidettä sekä sakkaa proses-sien aikana. Mallinnusta ei anturimittauksiin perustuen päästy tekemään, mutta erillisen näytteenoton ja muiden mittaustapojen avulla prosessien monitorointi on mahdollista myös NIR-tekniikalla. Tällöin kuitenkin sen tuottama lisäarvo jäisi pieneksi. NIR-tekno-logian hyöty ramaniin verrattuna oli lyhyt mittausaika ja se, ettei näytteitä tarvitse suojata valolta mittauksen aikana.

Lopputuloksena voi sanoa, että työssä pystyttiin selvittämään NIR-ja raman-teknologioi-den käyttökelpoisuutta valittujen prosessien osalta. Sen sijaan mallien rakentamisessa ja testauksessa onnistuttiin vain osittain.

LÄHTEET

Bruker Corporation, NIR-koulutusmateriaali, koulutusseminaari 2017.

Conzen, Jörg-Peter, Multivariate Calibration, Bruker Optik GmbH, 2014

Chianese, A., Chianese, A., & Kramer, H. J. M. (2012). Industrial crystallization process monitoring and control. Wiley-VCH.

Chourpa, I., Duce, V., Richard, J., Dubois, P., & Boury, F. (2006). Conformational Modifications of α Gliadin and Globulin Proteins upon Complex Coacervates Formation with Gum Arabic as Studied by Raman Microspectroscopy. *Biomacromolecules*, 7(9), 2616-2623. 10.1021/bm060131d3 Ferraro, J. R., Brown, C. W., & Nakamoto, K. (2003). Introductory Raman Spectroscopy. Academic Press.

Kim, D., & Cho, B. (2015). Rapid monitoring of the fermentation process for Korean traditional rice wine 'Makgeolli' using FT-NIR spectroscopy //doi-org.ezproxy.turkuamk.fi/10.1016/j.infrared.2015.09.007

Kosi.com. Viitattu 25.5.2020. https://kosi.com/na_en/products/raman-spectroscopy/raman-analyzers/raman-rxn2-1000-analyzer.php

Kuhar, N., Sil, S., Verma, T., & Umapathy, S. (2018). Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials. *RSC Advances*, 8(46), 25888-25908. 10.1039/C8RA04491K

Larkin, P. (2011). Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. Elsevier.

Lighttrans.com-nettisivusto. Viitattu 12.11.2020. <https://www.lighttrans.com/applications/optical-metrology/monochromators.html>

Lippert, J. L., Tyminski, D., & Desmeules, P. J. (1976). Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 98(22), 7075-7080. 10.1021/ja00438a057

Myerson, A. S., & Myerson, A. S. (2002). Handbook of industrial crystallization (2nd ed ed.). Butterworth-Heinemann.

Radleys.com-nettisivusto. Viitattu 12.11.2020. <https://www.radleys.com/range/reactor-ready-duo-lab-reactor/>

RNIR-nettisivusto. Viitattu 25.5.2020. <https://guifh.github.io/RNIR/SNV.html>

Roal Oy, yrityksen sisäinen NIR-esitysmateriaali 2020.

Siesler, H. W., & Siesler, H. W. (2002). Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications. Wiley-VCH.

Stuart, B. H. (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Wiley.

Vandenabeele, P. (2013). Practical Raman spectroscopy: an introduction. Wiley.

Zhang, S., Zhang, Z., Lin, M., & Vardhanabhuti, B. (2012). Raman Spectroscopic Characterization of Structural Changes in Heated Whey Protein Isolate upon Soluble Complex Formation with Pectin at Near Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 12029-12035. 10.1021/jf303780c