



Sara Saarikoski

Ympärysmenetelmän vaikutus sien en amylaasiaktiivisuuteen kiinto- ainefermentoinnin aikana

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

7.5.2024

Tiivistelmä

Tekijä:	Sara Saarikoski
Otsikko:	Ymppäysmenetelmän vaikutus sienen amylaasiaktiivisuuden kiintoainefermentoinnin aikana
Sivumäärä:	38 sivua
Aika:	7.5.2024
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat:	Lehtori Markus Räsänen, Tutkimus- ja tuotekehityspäällikkö Anniina Valtonen

Kiintoainefermentointi tarkoittaa mikrobien kasvatusprosessia, jossa käytetään kiinteitä raaka-aineita. Tämän työn kiintoainefermentointiprosessissa käytettiin filamenttientsientä (sieni A) ja raaka-aineena proteiinipitoisen palkokasvin ja viljaraaka-aineen seosta. Insinöörityön tavoitteena oli tutkia tilaajayrityksen, Biomush Oy, kolmen eri ymppäysmenetelmän vaikutuksia sienen amylaasiaktiivisuuteen. Lisäksi organismin kasvun nopeutta tarkasteltiin aistinvaraisesti.

Ymppäysmenetelmiksi valikoitui jauhoymppi, vesiympit (10^4 itiötä/g ja 10^5 itiötä/g) sekä myseeliympit (1-prosenttinen ja 10-prosenttinen). Sienen amylaasiaktiivisuutta tutkittiin agardiffuusiomenetelmällä sekä spektrofotometrisesti. Agardiffuusiomenetelmä varten valmistettiin elatusainetta, joka valettiin maljoille, sekä entsyymiuutetta jokaisesta ymppäysmenetelmästä eri aikapisteissä. Spektrofotometrisessä analyysissä entsyymiuutetta lisättiin reaktiosubstraattiin ja reaktiossa vapautunut glukoosi mitattiin Megazyme-sakkarooši-glukoosikitillä.

Ymppäysmenetelmien kasvunopeuden tarkastelussa havaittiin eroja, mutta jauhoymppi ja vesiympit 10^5 itiötä/g osoittivat erinomaista kasvua 48 tunnin fermentoinnin jälkeen. Agardiffuusiomenetelmässä entsyymien hajottama substraatti muodosti agarin pinnalle kehän IPI-liuoksen lisäämisen jälkeen. Spektrofotometrisesti määritettyjen amylaasiaktiivisuuksien tulokset ilmoitettiin U/g kuiva-ainetta kohti ja tuloksista tehtiin aktiivisuuskuvaaja. Molempien menetelmien perusteella vesiympit 10^5 itiötä/g osoitti suurinta amylaasiaktiivisuutta 48 tunnin fermentoinnin jälkeen.

Tuloksien avulla yritys voi valita amylaasiaktiivisuuden perusteella ymppäysmenetelmän kiintoainefermentointiprosessiin. Tässä työssä vesiympit 10^5 itiötä/g ja jauhoymppi osoittivat korkeimpia amylaasiaktiivisuuksia, joiden perusteella ne olisivat optimaalisimmat ymppäysmenetelmät yrityksen kiintoainefermentointiprosessiin.

Avainsanat: kiintoainefermentointitekniikka, SSF, filamenttientsieni, amylaasiaktiivisuus, agardiffuusiomenetelmä, spektrofotometrinen analyysi

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Sara Saarikoski
Title: Effect of Inoculation Method on Fungal Amylase Activity During Solid-State Fermentation
Number of Pages: 38 pages
Date: 7 May 2024

Degree: Bachelor of Engineering
Degree Programme: Biotechnology and chemical engineering
Professional Major: Biotechnology and food engineering
Supervisors: Markus Räsänen, University Lecturer, Anniina Valtonen, R&D Manager

Solid-state fermentation is a microbial cultivation process using solid raw materials. In this process a filamentous fungus (Fungus A) was used and a mixture of protein-rich legume and cereal as raw material. The aim of this engineering thesis was to investigate the effects of three different inoculation methods on fungal amylase activity. In addition, the growth rate of the organism was examined by sensory analysis.

The inoculation methods selected were flour inoculum, aqueous inoculum (10^4 spores/g and 10^5 spores/g) and mycelial inoculum (1 % and 10 %). The fungal amylase activity was studied by the agar diffusion method, where the medium was prepared and poured into Petri dishes, and enzyme extracts of each sample at different time points were prepared. For spectrophotometric analysis the enzyme extract was added to the reaction substrate, and the glucose released during the reaction was measured with Megazyme-sucrose-glucose kit.

In the visual examination, differences of the growth rate were observed between every inoculum type, but the flour inoculum and the aqueous inoculum containing 10^5 spores/g showed excellent growth after 48 h of fermentation. In the agar diffusion method, the substrate degraded by the enzyme formed a clear zone on the surface of the agar after the addition of IPI solution. Spectrophotometrically determined amylase activities were presented in U/g per dry weight, and an activity curve was constructed from the results. Based on both methods, the aqueous inoculum containing 10^5 spores/g showed the highest amylase activity after 48 hours of fermentation.

The results will allow the company to select the best inoculation method based on the highest amylase activity for their solid-state fermentation process. In this thesis aqueous inoculum containing 10^5 spores/g showed the highest amylase activities, which would make it the most optimal inoculation method.

Keywords: Solid-state fermentation, SSF, filamentous fungus, amylase activity, agar diffusion method, spectrophotometric analysis

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	BioMush Oy	2
3	Fermentointimenetelmät	3
3.1	Nestefermentointitekniikka – Submerged Fermentation (SmF)	4
3.2	Puolikiinteiden aineiden fermentointitekniikka	5
3.3	Kiintoainefermentointitekniikka – Solid-State Fermentation (SSF)	6
3.3.1	Raaka-aineiden valinta	6
3.3.2	Yleisimmät fermentointiorganismit	7
4	Filamenttisienen entsyymitoiminta	10
5	Sienten amylaasiaktiivisuuden tutkiminen ja määrittäminen	11
5.1	Agardiffuusiomenetelmä	12
5.2	Spektrofotometriset menetelmät	13
6	Materiaalit	14
6.1	Ympörien valmistaminen	14
6.2	Kiintoainefermentointiprosessi	15
6.3	Kosteuspitoisuuden määrittäminen	16
6.4	Agardiffuusiomenetelmä	16
6.4.1	Maljojen valmistus amylaasiaktiivisuuden määrittämiseen	16
6.4.2	Entsyymiutteen valmistus	17
6.4.3	Näytteiden inokulointi maljoille	17
6.5	Amylaasiaktiivisuuden määrittäminen spektrofotometrisesti	17
7	Tulokset ja pohdinta	19
7.1	Ympärysmenetelmän vaikutus kasvunopeuteen	19
7.2	Kasvatusten kosteuspitoisuus	22
7.3	Ympärysmenetelmän vaikutus entsyymiaktiivisuuksiin	23
7.3.1	Amylaasiaktiivisuus agardiffuusiomenetelmällä	23
7.3.2	Amylaasiaktiivisuuden määrittäminen spektrofotometrisesti	26
8	Johtopäätökset	29

Lyhenteet

ATP: *Adenosine triphosphate*. Adenosiinitrifosfaatti.

FEB: *Fermented enzymatically bioactive mass*. Fermentoitu entsyymiaktiivinen biomassa.

GN-vuoka: *Gastronom container*. Gastronom-mitoitusvuoka.

IPI-liuos: *Iodine Potassium Iodide*. Jodikaliumjodidi-liuos.

RO-vesi: *Reverse osmosis*. Käänteisosmoosivesi.

SmF: *Submerged Fermentation*. Nestefermentointitekniikka.

SSF: *Solid-State Fermentation*. Kiintoainefermentointitekniikka.

1 Johdanto

Fermentointi on tunnettu luonnollinen tekniikka, jossa elintarvike hapatetaan mikrobien avulla. Mikrobit voivat olla elintarvikkeissa luontaisesti esiintyviä, tai niitä voidaan lisätä prosessiin. Fermentointia on käytetty tuhansia vuosia esim. alkoholijuomien ja leivän valmistamiseen. Monet muutkin tärkeät teollisuuden tuotteet, kuten jogurtti, juusto ja kahvi, ovat fermentointitekniikalla valmistettuja. Fermentoinnissa voidaan käyttää kiinteitä tai nestemäisiä raaka-aineita. Nestefermentointitekniikka (SmF) on prosessi, jossa mikro-organismit kasvattavat ja hajottavat substraatteja runsaan vapaan veden läsnä ollessa. Sitä käytetään laajalti sitruunahapon tuotannossa ja entsyymien, antibioottien sekä biopolttoainesten valmistuksessa. [1; 2.]

Kiintoainefermentointi tarkoittaa mikrobien kasvatusprosessia, jossa käytetään kiinteitä raaka-aineita. Kiintoainefermentointi sai alkunsa elintarvikefermentoinnista Aasiassa, missä *Penicillium rouquefortii* -bakteeri oli yhteydessä juustonvalmistukseen, sekä Egyptissä, missä valmistettiin leipää kiintoainefermentointiprosessin avulla ennen ajanlaskun alkua. Vuosien varrella kiintoainefermentointitekniikkaa on hyödynnetty etikan valmistuksessa, kompostoinnissa sekä kiinteiden jätteen käsittelyssä ja primaaristen aineenvaihduntatuotteiden tuottamisessa, esim. entsyymit ja orgaaniset hapot. [3, s. 3–4.]

Kiintoainefermentointitekniikka on historiallisesti tunnettu jo vuosisatojen ajan, mutta se on saanut vasta viime vuosikymmeninä lisää huomiota elintarvike-, rehu- ja polttoaineteollisuudessa. Tämä johtuu siitä, että kiintoainefermentoinnilla huomattiin olevan suuremmat edut verrattuna nestefermentointitekniikkaan. Näitä etuja ovat esimerkiksi tehokkaampi tuottavuus, pienempi jätevesien muodostuminen ja yksinkertaisemmat fermentointilaitteet. Nykyisiä sovelluskohteita ovat esim. entsyymien, orgaanisten happojen, biotorjunta-aineiden, aromiyhdisteiden sekä sekundaaristen aineenvaihduntatuotteiden, kuten antibioottien, tuottaminen. Haasteina kiintoainefermentoinnissa on huomattu olevan monimutkaiset skaalausvaiheet sekä vaikeudet prosessiparametrien seurannassa ja valvonnassa. [3, s. 4, 13, 302.]

Sienten tiedetään tuottavan monipuolisesti eri entsyymeitä kuten amylaaseja, proteaaseja ja lipaaseja. Kiintoainefermentoinnissa etenkin amylaasit ovat tärkeitä koska ne auttavat tärkkelyksen hajottamisessa ja muuttavat monimutkaiset hiilihydraatit yksinkertaisemmiksi sokereiksi. Esimerkiksi β -amylaasin pilkkouksessa tärkkelystä pienemmiksi molekyyleiksi syntyy maltoosia, jonka maltaasi puolestaan pilkkoo kahdeksi glukoosimolekyyliksi. Amylaasit ovat tärkeitä, sillä niillä on kyky säilyttää n. 80 % entsyymiaktiivisuudestaan suhteellisen korkeissa lämpötiloissa sekä ne ovat edelleen aktiivisia happamissa ja neutraaleissa olosuhteissa. Tämä tekee niistä käyttökelpoisen erilaisissa teollisissa sovelluksissa kuten taikinan valmistuksessa elintarviketeollisuudessa. [4; 5.]

Insinööriyön tavoitteena oli tutkia tilaajayrityksen, Biomush Oy:n, eri ympäysmenetelmien vaikutuksia salassa pidettävän sien (sieni A) amylaasiaktiivisuuteen. Ympäyksellä tarkoitetaan mikro-organismien siirrostusta aseptisesti kasvualustaan ja ympäällä kasvatusalustaan siirrettyjä mikro-organismeja.

Amylaasiaktiivisuutta tutkittiin, koska kiintoainefermentoinnissa käytetyt raaka-aineet sisältävät paljon tärkkelystä ja haluttiin tutkia mikä ympäysmenetelmä tuottaa eniten amylaasia pilkkoen tärkkelystä. Työssä käytettiin kolmea ympäysmenetelmää: jauhoymppi, jossa itiöt levitettiin kiintoaineeseen jauhon mukana, vesiympä, jossa itiöt lisättiin ensin veteen ja sen jälkeen kiintoaineeseen sekä myseeliympä, jossa sientä kasvatettiin ensin liuoskasvatuksena ja lisättiin sen jälkeen kiintoaineeseen. Ympäysmenetelmät valittiin työhön kirjallisuuden perusteella. Tässä työssä amylaasiaktiivisuutta tutkittiin sekä agardiffuusio- menetelmällä että spektrofotometrisesti. Lisäksi organismien kasvun nopeutta tarkasteltiin aistinvaraisesti.

2 BioMush Oy

Biomush Oy on suomalainen startup-yritys, joka hyödyntää elintarviketeollisuuden sivuvirtoja ja käyttää kiintoainefermentointitekniikkaa valmistaakseen nestemäistä makutuotetta. Organisaatio on perustettu vuonna 2021, ja se työllistää tällä hetkellä yhdeksän henkilöä. Toiminta sijoittuu vielä pieneen koetehtaa-

seen, joka käsittelee noin kaksi tonnia elintarviketeollisuuden sivuvirtoja kuukausittain. Prosessin avulla saadaan aikaan noin neljä tonnia nestemäistä makuuainetta. Tuotannossa valmistetaan tällä hetkellä Meatless Umami Bouillon ja Soyless Umami Sauce -tuotteita, jotka valmistetaan hyödyntämällä lähtökohtaisesti kotimaisia elintarviketähteiden sivujakeita. Raaka-aineina käytetään vihannesten kuoria, hennettä, härkäpapua, kauraa ja panimomäskiä. Meatless Umami Bouillon -tuotetta voidaan käyttää lihaliemen tapaan ja Soyless Umami Sauce -tuotetta soijakastikkeen tapaan. [6.]

Tavoitteena organisaatiolla on luoda kestävämpi tulevaisuus, joten yritys on ratkaissut erittäin helposti pilaantuvien kosteiden sivuvirtojen haasteet hyödyntämällä sienifermentointia. Kiintoainefermentointitekniikalla on todettu olevan myönteisiä vaikutuksia elintarviketeollisuuteen sekä ympäristöön, siksi tämä teknologia suunniteltiin muuttamaan nämä hyödyntämättömät resurssit arvokkaiksi hyödykkeiksi. Organisaatiossa on myös keskitytty innovointiin ja yritys on kehittänyt uudenlaisen bioreaktorin, jonka ansiosta ne tulevat kaksinkertaistamaan tuotantokapasiteettinsa vuoden 2025 loppuun mennessä. [6.]

Tällä hetkellä organisaatio tarjoaa elintarviketeollisuuden toimijoille teknologisen ratkaisun, jonka avulla syötävistä sivuvirroista saadaan arvokkaita ja täysin luonnollisia aromikomponentteja. Ne ovat kestäviä ja lisäävät miellyttävän maun monenlaisiin tuotteisiin. Teknologiaa voidaan kuitenkin soveltaa vaihtoehtoisin proteiineihin, biokomposiittimateriaaleihin ja biomassan esikäsittelyyn erilaisissa sovelluskohteissa. [6.]

3 Fermentointimenetelmät

Fermentointi on käymisprosessi, jossa solut saavat energiaa ilman happea. Tämän lisäksi fermentointinimitystä käytetään bioteknisten aerobisten prosessien yhteydessä, jossa soluhengitys tapahtuu sytoplasmassa ja mitokondriossa. Sen avulla tuotetaan esim. entsyymejä hapettomassa tai hapellisessa ympäristössä, kasvatusta voi tapahtua nesteessä tai kiinteällä alustalla ja yleensä kasvuympä-

ristönä toimii bioreaktori. Hapettomassa fermentoinnissa käytetään yleensä hiivoja ja bakteereita, kun hapellisessa fermentoinnissa voidaan käyttää filamenttisentä, hiivoja ja bakteereita. Fermentointimenetelmiä on neste- ja kiintoainefermentointitekniikat sekä puolikiinteiden aineiden fermentointitekniikka. [7.]

3.1 Nestefermentointitekniikka – Submerged Fermentation (SmF)

Nestefermentointitekniikka (SmF) on tyypillinen teollinen prosessi, jossa mikro-organismeja kasvatetaan nestemäisessä väliaineessa sekoittavassa säiliöreaktorissa halutun tuotteen tuottamiseksi. Tätä menetelmää suositellaan teolliseen entsyymituotantoon suuressa mittakaavassa, koska sitä on helppo valvoa ja mikrobit kasvavat paremmin kuin kiintoainefermentoinnissa. Tuotanto tapahtuu suurissa fermentoreissa, joiden tilavuus vaihtelee käsittelyn ja vaatimusten mukaan. SmF mahdollistaa tärkeimpien reaktioparametrien, kuten pH:n, lämpötilan, vaahdon ja ilmastoinnin online-ohjauksen ilman lämpö- ja aineensiirto-ongelmia. [2.]

Fermentointi voidaan tehdä kolmella eri kasvatusmenetelmällä tai niiden yhdistelmällä: panos-, syöttöpanos- ja jatkuvassa kasvatuksessa. Panoskasvatuksessa mikro-organismit kasvavat kontrolloiduissa olosuhteissa vakiotilavuudessa. Menetelmässä fermentoriin syötetään valmiiksi tuotettu siirrostee ja solut kasvavat tuottaen tuotteen, minkä jälkeen fermentointi lopetetaan ja tuote otetaan talteen. Panoskasvatukseen kuuluu kahdeksan vaihetta, joita ovat viipymävaihe, kiihtyvä kasvu, eksponentiaalinen (logaritminen) kasvu ja hidastuva kasvu, stationäärivaihe, kiihtyvä kuolema ja eksponentiaalinen kuolema sekä selviytymis- ja kuolemisvaihe. [2; 8.]

Syöttöpanoskasvatus on suljettu viljelyjärjestelmä, joka aloitetaan panoksena. Siihen lisätään ravinteet määrätyn ajan kuluttua ja syöttö lopetetaan fermentorin täytyttyä. Mikro-organismia inkuboidaan tietyn ajan verran, jonka jälkeen fermentointi lopetetaan. Kasvatusmenetelmää käytetään yleensä suuren solutiheyden viljelyyn, jolloin biomassaa kertyy enemmän kuin panoskasvatuksessa. Sovelluskohteita ovat esim. entsyymien ja leiviniivan tuotto. [2; 8.]

Jatkuva kasvatus aloitetaan panosfermentointina. Fermentoinnissa kasvatettu mikro-organismi kasvaa esim. sekoitussäiliössä ja siihen lisätään jatkuvasti substraattia, ravinteita ja kasvuliuosta sitä mukaa, kun tuotetta poistetaan, jolloin työskentelytilavuus on vakio. Kasvatusta voidaan jatkaa käytännössä viikoista vuosiin. Sovelluskohteita on esim. yksisoluproteiinien (single cell protein) tuotto. [2; 8.]

Nestefermentointitekniikkaa käytetään laajalti teollisessa bioteknologiassa erilaisten biotuotteiden kuten antibioottien, entsyymien esim. amylaasin, selluloosan ja proteaasin tuotantoon, orgaanisten happojen esim. sitruunahapon, maitohapon ja etikkahapon tuotantoon sekä biopolttoaineiden tuottamisessa. Mikro-organismeina käytetään sieniä ja bakteereja. [2.]

3.2 Puolikiinteiden aineiden fermentointitekniikka

Puolikiinteiden aineiden fermentoinnissa vapaan nesteen pitoisuutta on lisätty ravinteiden saatavuuden ja fermentoinnin hallinnan helpottamiseksi. Tyypillisesti tällaisessa fermentointimenetelmässä vesipitoisuuden tulee olla alle 30–40 m-%, veden aktiivisuus yli 0,95, aerobisessa systeemissä käytössä on jatkuva alhaisen voimakkuuden sekoitus, tarkka lämpötilan ja veden aktiivisuuden säätö sekä lämmönvaihto ja pH:n suora mittaus. Lisäksi lämpötila, pH, biomassatyyppi ja ominaisuudet kuten hiukkasten halkaisija ja pinta-ala ovat oleellisia puolikiinteiden aineiden fermentoinnin onnistumisessa. [9; 10; 11.]

Puolikiinteiden aineiden fermentointia voidaan käyttää, kun halutaan yhdistää vapaan nesteen pitoisuus välttämättömien ravinnevirtojen varmistamiseksi sekä olosuhteet, jossa raaka-ainetta voidaan käyttää suurina pitoisuuksina. Sen avulla voidaan tuottaa esim. öljyä, joka soveltuu käytettäväksi biodieselin tuotannon raaka-aineena sekä sellulolyyttisiä entsyymejä käyttämällä maataloustuotteiden jätteitä, kuituja tai muita materiaaleja, joita voidaan käyttää hiilen ja energian lähteenä sienille. [11; 12; 13.]

3.3 Kiintoainefermentointitekniikka – Solid-State Fermentation (SSF)

Kiintoainefermentointi tarkoittaa mikrobien kasvatusprosessia, jossa käytetään kiinteitä raaka-aineita vapaan veden puuttuessa tai lähes puuttuessa. Substraattissa on kuitenkin oltava riittävästi kosteutta mikro-organismien kasvun ja aineenvaihdunnan tukemiseksi. Se on vaihtoehto nestefermentointitekniikalle lisäarvotuotteiden kuten antibioottien, yksisoluisten proteiinien, entsyymien, orgaanisten happojen, bitorjunta-aineiden, biopolttoaineiden, monityydyttymättömien rasvahappojen (PUFA) ja aromien tuotannossa. Kiintoainefermentointitekniikassa mikro-organismeina käytetään perinteisesti filamenttisia sieniä, hiivoja sekä bakteereita, ja käsitellään raaka-aineita, jotka ovat kiinteitä ja sisältävät vain vähän kosteutta. [14.]

Kiintoainefermentointitekniikassa tulee ottaa huomioon tekijät, jotka vaikuttavat mikrobien kasvuun ja aktiivisuuteen. Näitä ovat mikro-organismien ja raaka-aineen valinta, raaka-aineen esikäsittely, sen hiukkaskoko, kosteus ja veden aktiivisuus, suhteellinen kosteus, ympin tyyppi ja koko, fermentoituvan aineen lämpötila, aineenvaihduntalämmön poistaminen, viljelyaika, SSF-ympäristön tasalaatuisuuden säilyttäminen sekä hapen kulutuksen nopeus ja hiilidioksidin kehittymisaste. [3, s. 13.]

3.3.1 Raaka-aineiden valinta

Kiintoainefermentointitekniikassa tulisi olla käytössä kiinteä huokoinen matriisi, jotta mikrobit voivat kasvaa helposti kiinteän aineen ja kaasun rajapinnalla. Tavallisimpia käytettyjä raaka-aineita ovat viljanjyvät (riisi, vehnä, ohra ja maissi) palkokasvien siemenet, vehnäleseet, lignoselluloosamateriaalit (oljet, sahanpurut ja puulastut) sekä erilaiset kasvi- ja eläinmateriaalit. [15; 16.]

Kiinteän aineen ja kaasun rajapinnassa tulee olla oikeat olosuhteet, jotta elinympäristö olisi optimaalinen home-, hiiva- tai bakteeriviljelmien nopealle kasvulle puhtas- ja sekaviljelminä. Kiinteän matriisin tulisi olla mekaanisilta ominai-

suuksiltaan puristuksen kestävä ja siedettävä hellävaraista sekoittamista fermentointiprosessin edellyttämällä tavalla. Veden aktiivisuuden tulisi olla suhteellisen korkea kiinteän aineen ja kaasun rajapinnalla, jotta biokemialliset prosessit olisivat nopeat. Happea, muita kaasuja ja aerosoleja sisältävän ilmaseoksen tulisi virrata suhteellisen alhaisessa paineessa, ja fermentoinnin homogeenisuuden takaamiseksi raaka-aineen sekoituksesta tulisi huolehtia. Lisäksi kiintoaineprosessissa käytetyn raaka-aineen koostumus tulisi olla mikrobikasvulle suotuisa sisältäen kasvulle tärkeitä ravintoaineita, kuten hiilihydraatteja, rasvoja, proteiineja ja vitamiineja. Lisäksi tulisi varmistaa, että raaka-aine ei sisällä kasvua rajoittavia tekijöitä tai aineita kuten suuria määriä suolaa. [15; 16.]

3.3.2 Yleisimmät fermentointiorganismit

Bakteerit, hiivat ja filamenttisienet voivat kasvaa kiinteillä alustoilla, joten niitä voidaan käyttää SSF-prosesseissa. Filamenttiset sienet soveltuvat parhaiten SSF-menetelmään, ja ne ovat hallitsevassa asemassa useissa tutkimuksissa, sillä niillä on monipuolinen ja tehokas entsyymituotanto kuten α -amylaasin, sellulaasien ja ksylanaasien tuotanto sekä kyky hyödyntää kompleksisia raaka-aineita. Bakteereja käytetään pääasiassa kompostointiin, säilörehun valmistukseen ja joihinkin elintarvikeprosesseihin, esim. maitohappobakteereita käytetään maitotuotteiden kuten jogurtin ja juustojen valmistuksessa. Hiivoja voidaan käyttää etanolin ja elintarvikkeiden tai rehun tuotantoon, mutta filamenttiset sienet ovat kuitenkin tärkein SSF-prosessissa käytettävä mikro-organismiryhmä. [15; 16.]

Sienet menestyvät hyvin epäsuotuisissa elinympäristöissä sekä äärimmäisissä ympäristöolosuhteissa niiden tehokkaan entsyymijärjestelmän ja aineenvaihduntansa ansiosta. Ne saavat energiansa orgaanisten yhdisteiden hajottamisesta, ja ne hajottavat solunulkoisesti erittyvien entsyymien avulla polymeerisiä yhdisteitä ennen monomeerien hyödyntämistä hiilen ja energian lähteenä. Niiden kyky tuottaa solunulkoisia entsyymejä on sienen selviytymisen kannalta tärkeää, sillä ne hajottavat ja muuttavat monimutkaisia yhdisteitä yksinkertaisiksi

tuotteiksi. Sienet osallistuvat ei-toivottujen aineiden ja yhdisteiden (esim. pesuaineet ja torjunta-aineet) biologiseen hajottamiseen ja muuttavat ne vaarattomiksi, siedettäväksi tai hyödyllisiksi tuotteiksi. Vesi on ehdottoman tärkeää sienien aineenvaihdunnalle, ja kaikki olosuhteet, jotka vähentävät veden saataavuutta, vaikuttavat haitallisesti solujen fysiologiaan. [17; 18.]

Filamenttisienille tyypillinen kasvutapa antaa merkittävän edun yksisoluisiin mikro-organismeihin verrattuna kiinteiden substraattien kolonisaatiossa ja käytävissä olevien ravinteiden hyödyntämisessä. Kasvatusprosessissa voidaan hyödyntää puhtasviljelmiä tai sekaviljelmiä. Filamenttisienet soveltuvat erinomaisesti kasvamaan alhaisemminkin kosteuspitoisuuksissa, kun taas bakteerit ja hiivat vaativat korkeamman kosteuspitoisuuden kasvaakseen. [15; 16.]

Tässä työssä keskitytään etenkin filamenttisienten hyödyntämiseen kiintoainefermentoinnissa. Elintarvikekelpoisia ja -hyväksytyjä filamenttisieniä voidaan hyödyntää esim. elintarvike- ja juomateollisuudessa. [19.]

Aspergillus-suvun sieniä kuten *Aspergillus oryzae* ja *Aspergillus niger* -kantoja on jo pitkään hyödynnetty elintarvikkeiden valmistuksessa. *A. oryzae* -sientä käytetään tyypillisesti japanilaisessa fermentointiteollisuudessa kuten mison (papujuustomauste), shoyun (soijakastike), saken ja etikan tuotannossa. *A. oryzae* voi kuitenkin tuottaa erilaisia mykotoksiineja, jos fermentointi jatkuu pidempään kuin näiden mikrobien tuottamiseen tavallisesti tarvittava aika. *A. niger* -sientä käytetään leivän- ja oluenvalmistuksessa, ja se pystyy myös hajottamaan muovia. [20; 21; 22.]

Aspergillus-suvun sienten optimaaliset kasvuolosuhteet ovat 20–35 °C, pH 2–6, ja kasvaakseen ne vaativat yli 0,8:n vesiaktiivisuuden. Se ei kykene kasvamaan yli 44 °C lämpötilassa ja voi itää pH:n ollessa 2–8. *Aspergillus*-suvun sieni tarvitsee korkean suhteellisen kosteuden (70–90 %) fermentoinnin aikana kasvaakseen, ja sen kasvu estyy vasta 4 %:n NaCl-pitoisuuksissa. [21; 23; 24.]

Aspergillus-suvun sienten on todettu tuottavan kiintoainefermentoinnissa erilaisia hydrolyyttisiä entsyymejä, kuten amylaaseja, proteaaseja ja lipaaseja, ja ne

tuottavat monia solunulkoisia entsyymejä, jotka hajottavat hiilihydraatteja, polypeptidejä ja nukleiinihappoja. *Aspergillus*-suvun sienet ovat myös tärkeitä orgaanisten yhdisteiden, kuten glutamiinihapon ja monien teollisten entsyymien, kuten glukoamylaasin, α -amylaasin ja sellulaasin lähteitä, joita käytetään tärkkelyksen käsittelyssä, leivonnassa, pesuaineiden valmistuksessa ja panimotoiminnassa maailmanlaajuisesti. *Aspergillus*-suvun sienet tuottavat tarvittavia entsyymejä raaka-aineiden muuttamiseksi helpommin sulaviksi komponenteiksi, ja ne vaikuttavat fermentoitujen tuotteiden väriin, makuun, aromiin ja koostumukseen. *Aspergillus*-suvun elintarvikekelpoisten sienten tuoreen viljelmän tai konidion väri voi olla kellanvihreä tai tumma riippuen kannasta. Ne tuoksuvat makealta ja hiivaiselta sekä ne maistuvat umamiselta ja karvaalta. [20; 21; 25; 26; 27.]

Rhizopus-suvun sieniä on käytetty fermentoinnissa elintarvikkeiden valmistamisessa, etenkin *Rhizopus oryzae* ja *Rhizopus oligosporus* -kantoja. *R. oligosporus* on yleisesti turvallisena pidetty home, jolla on kyky hyödyntää erilaisia hiililähteitä kasvussaan, ja sitä on jo pitkään käytetty Indonesiassa ihmisravinnoksi tarkoitetun tempehin valmistuksessa. *Rhizopus oryzae* -kanta hyödynnetään esimerkiksi entsyymien tuotannossa, orgaanisten happojen synteessissä sekä fermentoitujen elintarvikkeiden käytössä. [28; 29.]

Rhizopus-suvun homeet kasvavat parhaiten pH:n ollessa 5–7, lämpötilassa 25–35 °C ja suhteellisen kosteuden ollessa 85–95 %. Suolapitoisuus inhiboi kasvua pitoisuuden noustessa yli 0,5 % w/v, joka tarkoittaa massaprosenttia tilavuutta kohden. [30.]

Rhizopus-suvun sienten on todettu tuottavan kiintoainefermentoinnissa erilaisia entsyymejä kuten proteaaseja, amylaaseja ja sellulaaseja. *Rhizopus*-suvun kannat tuottavat maitohappoa aerobisesti glukoosista, ksyloosista tai sakkaroosista ja muuttavat tärkkelystä tai tärkkelyspohjaisia raaka-aineita maitohapoksi. Lisäksi sitä hyödynnetään muidenkin aineenvaihduntatuotteiden, kuten etanolin ja fumaarihapon valmistuksessa. [29; 31.]

4 Filamenttisiienen entsyymitoiminta

Sienientsyymejä käytetään useissa eri sovelluksissa, kuten elintarvikkeiden, rehujen, sellun ja paperin, tekstiilien, pesuaineiden, juomien sekä biopolttoaineiden tuotannossa. Entsyymejä tuotetaan yleensä rutiininomaisesti yhden kannan fermentoinnilla, mutta yhteisviljelmää on tutkittu esim. *Aspergillus nigerin* ja *A. oryzae* -kantojen yhteiskasvatus on johtanut monimutkaisempaan entsyymiprofiilin osoittamiseen. Tällaiset sekaviljelmät voivat tuottaa optimaalisempia entsyymiseoksia, joita voidaan käyttää esimerkiksi biopolttoaineiden tuotannossa. [32.]

Entsyymiaktiivisuus tarkoittaa nopeutta, jolla entsyymi katalysoi tiettyä reaktiota. Se määräytyy entsyymin aktiivisen alueen, substraatin pitoisuuden ja reaktioolosuhteiden mukaan. Entsyymit ovat biologisia katalyyttejä, jotka nopeuttavat biokemiallisia reaktioita elävissä organismeissa. Niitä voidaan ottaa soluista ja käyttää katalysoimaan monenlaisia kaupallisesti tärkeitä prosesseja. Niillä on tärkeä rooli esimerkiksi makeutusaineiden tuotannossa ja antibioottien modifiointissa. Katalyytteina entsyymejä tarvitaan vain hyvin pieninä pitoisuuksina, ja ne nopeuttavat reaktioita kuluttamatta itseään reaktion aikana. Tavallisesti entsyymejä kuvataan siten, että ne pystyvät katalysoimaan substraattimolekyylejä ja muuttamaan ne tuotemolekyyleiksi. [33.]

Entsyymit toimivat optimaalisesti tietyissä olosuhteissa, jotka maksimoivat niiden reaktionopeuden. Reaktionopeus kasvaa substraattipitoisuuden kasvaessa, kunnes saavutetaan kyllästymispiste, jossa kaikki käytettävissä oleva entsyymi työstää substraattia. Reaktionopeus on myös optimaalinen tietyssä lämpötilassa ja pH:ssa. Äärimmäisissä lämpötiloissa ja pH-arvoissa entsyymi saattaa denaturoitua tai sen muoto muuttuu rakenteellisesti niin, ettei se pysty tunnistamaan substraattia tai katalysoimaan reaktiota. [34.]

Sen lisäksi, että entsyymit ovat erittäin tehokkaita katalyyttejä, niillä on myös huomattava spesifisyys, sillä ne yleensä katalysoivat vain yhdenlaisten tai useiden samantyyppisten substraattimolekyyliden muuntamista tuotemolekyyleiksi.

Joillakin entsyymeillä on ryhmäspesifisyys, esimerkiksi emäksinen fosfataasi voi poistaa fosfaattiryhmän useista eri substraateista. Toisilla entsyymeillä on paljon suurempi spesifisyys, jota kutsutaan absoluuttiseksi spesifisyydeksi. Esimerkiksi glukoosioksidaasi on lähes täysin spesifinen substraatilleen, β -D-glukoosille, eikä se käytännössä toimi lainkaan muiden monosakkaridien kanssa. [33.]

Työssä tutkittavat amylaasit ovat hydrolyyttisiä entsyymejä, jotka vaikuttavat lineaarisiin amyloosiketjuihin hajottamalla 1,4- α -d-glykosididoksia, jolloin monimutkaiset hiilihydraatit muuttuvat yksinkertaisemmiksi sokereiksi. Amylaasin pilkkoessa tärkkelystä pienemmiksi molekyyleiksi syntyy maltoosia, jonka maltaasi puolestaan pilkkoo kahdeksi glukoosimolekyyliksi. Tämän lisäksi tärkkelyksen pilkkominen voi vaikuttaa elintarvikkeissa aromien muodostumiseen.

Amylaasientsyymit luokitellaan kolmeen pääluokkaan niiden kolmiulotteisen rakenteen, reaktiomekanismien ja aminohapposekvenssien perusteella. Pääluokat ovat α -, β - ja γ -amylaasit, joista jokainen kohdistuu hiilihydraattimolekyylin eri kohtiin. α -amylaasia esiintyy ihmisissä, eläimissä, kasveissa ja mikrobeissa, kun taas β -amylaasia esiintyy pääasiassa mikrobeissa ja kasveissa. γ -amylaasia voi esiintyä sekä eläimissä että kasveissa. [35; 36.]

5 Sienten amylaasiaktiivisuuden tutkiminen ja määrittäminen

Sienten amylaasiaktiivisuutta voidaan tutkia spektrometrisesti kuten dinitrosalisylihappomenetelmällä (DNS-menetelmä), jonka avulla voidaan mitata pelkistävien sokerien kokonaismäärä hydrolyytissä. DNS on emäksinen reagenssi, joka kiinnittyy pelkistäviin sokereihin, jonka jälkeen voidaan havaita värimuutoksia absorptiolla 540 nm:ssä. Nelson-Somogyi-menetelmää käytetään pelkistävän sokerin mittaamiseen käyttäen kuparireagensseja ja arsenolmolibdaattia. Menetelmän toimintaperiaatteena on arsenomolibdaatin kanssa reagoiva kuparioksidi, joka pelkistyy molybdeenisiniseksi, ja sininen väri mitataan absorbanssina. [37.]

Sienten entsyymiaktiivisuuden tutkimisessa voidaan myös hyödyntää maljaviljelymenetelmää. Tässä työssä kiinnostavia entsyymejä ovat amylaasit ja menetelmäksi valikoitui agardiffuusiomenetelmä. Suhteellinen entsyymiaktiivisuus voidaan arvioida maljalta siihen syntyvän kirkkaan vyöhykkeen muodostumisella ja kasvulla vyöhykkeen halkaisijan avulla. [37.]

5.1 Agardiffuusiomenetelmä

Agardiffuusiomenetelmiä on käytössä useita: agarkuoppa-, agarlevy- ja agartulppadiffuusiomenetelmät. Agarkuoppadiffuusiomenetelmää käytetään laajalti kasvien tai mikrobiutteiden antimikrobisen aktiivisuuden arviointiin. Menetelmän tarkoituksena on levittää koko agarin pinnalle mikrobiymppeä ja maljan keskellä olevaan reikään inokuloidaan antimikrobista ainetta tai uuteliuosta. Maljoja inkuboidaan sopivissa olosuhteissa testattavan mikro-organismin mukaan, jolloin antimikrobinen aine diffundoituu agaralustaan ja estää testattavan mikrobikannan kasvua. [38.]

Agarlevydiffuusiomenetelmää käytetään monissa kliinisen mikrobiologian laboratorioissa rutiininomaisessa mikrobilääkeherkkyystestauksessa. Menetelmässä agarmaljoille inokuloidaan testattavaa mikro-organismin standardoitua ymppeä. Seuraavaksi agarin pinnalle asetetaan suodatinpaperikiekot, jotka sisältävät testattavaa yhdistettä halutussa pitoisuudessa. Maljoja inkuboidaan sopivissa olosuhteissa, jolloin antimikrobinen aine diffundoituu agariin ja estää testattavan mikro-organismin itämistä ja kasvua. Tämän jälkeen mitataan inhibitiokasvuvyöhykkeiden halkaisijat. [38.]

Agartulppadiffuusiomenetelmää käytetään usein mikro-organismien välisen antagonismin osoittamiseksi. Menetelmässä kiinnostuksen kohteena olevasta kannasta tehdään viljelmä ja sillä tehdään maljan pinnalle juovia. Inkuboinnin aikana mikrobisolujen erittämät molekyylit diffundoituvat agaralustaan, minkä jälkeen agar irrotetaan aseptisesti steriilillä korkkiporakoneella. Se asetetaan toisen maljan agarin pinnalle, johon on aiemmin istutettu testattava mikro-organismi.

nismi. Näin aineet diffundoituvat tulpasta agarmediumiin. Tämän jälkeen mikro-
bien erittämien molekyylien antimikrobinen aktiivisuus voidaan havaita esto-
vyöhykkeenä agartulpan ympärillä. [38.]

Amylaasin esiintymistä mikro-organismiviljelmissä on tutkittu sovelletulla Wiis-
manin menetelmällä. Siinä entsyymiliuosta laitettiin agarkuoppiin tai se levitettiin
agarin pinnalla olevien steriilien paperikiekkojen päälle. Niiden annettiin inkuboi-
tua valvotuissa lämpötila- ja aikaolosuhteissa. Inkuboinnin jälkeen maljoille lisät-
tiin jodiliuosta, joka toi näkyviin vyöhykkeet näytteen ympärille osoittaen tärkke-
lyksen hydrolyysin. [39.]

5.2 Spektrofotometriset menetelmät

Jokainen kemiallinen yhdiste absorboi tai heijastaa valoa sähkömagneettisen
spektrin aallonpituuksilla. Kun valo kulkee minkä tahansa liuoksen läpi, osa siitä
absorboituu. Spektrofotometriset tekniikat perustuvat sähkömagneettisen sätei-
lyn ja aineen välisiin vuorovaikutuksiin. Spektrofotometria mahdollistaa sekä
laadullisen että määrällisen analyysin. Aineen konsentraation kasvaessa valon
absorptio lisääntyy ja valon läpäisy vähenee. Se on yksi käytetyimmistä analyyt-
tisistä havaitsemismenetelmistä eri sovellusaloilla, koska se on helppokäyttöi-
nen, tarkka ja edullinen tekniikka. Sitä käytetään yhtenä sienten amylaasiak-
tiivisuuden tutkimisessa. [40.]

Spektrofotometrisissä tekniikoissa mittausvalon aallonpituusalue on noin 200–
900 nm. Analysoitava näyteliuos laitetaan kyvetiin, jossa on kaksi samansuun-
taista suoraa pintaa. Näiden välimatka on kyvetin paksuus (valotien pituus). Ky-
vetin paksuus on yleensä 10 mm, mutta se voi olla pienempi, jos näyte absorboi
valoa voimakkaasti, ja suurempi, jos näyte absorboi valoa heikosti. Kyvetin ja
liuottimen tulee läpäistä mittausvaloa. Liottimen täytyy liuottaa tutkittava yhdiste
ja vastata haluttuja mittausolosuhteita. Valitun aallonpituuden valo menee ky-
vetissä olevaan näytteeseen. Mitä suurempi näytteen konsentraatio on, sitä
enemmän valosta absorboituu näytemolekyyleihin. Mittauksessa käytetään siksi
absorbanssia, koska se on suoraan verrannollinen konsentraatioon. [41.]

6 Materiaalit

Työssä tutkittiin kolmen eri ympypäysmenetelmänvaikutusta sienen A amylaasiaktiivisuuteen. Ympypäysmenetelmiä olivat jauhoymppi, jossa itiöt levitettiin kiintoaineeseen jauhon mukana, vesiympppi, jossa itiöt lisättiin ensin veteen ja sen jälkeen kiintoaineeseen, sekä myseeliympppi, jossa sientä kasvatettiin ensin liuoskasvatuksena ja lisättiin sen jälkeen kiintoaineeseen.

Amylaasiaktiivisuuden määrittämistä varten näytteitä otettiin eri aikapisteistä: 0 tuntia, 18 tuntia ja 24 tuntia ympypäyksen jälkeen sekä valmiista fermentoidusta entsyymiaktiivisesta biomassasta (FEB) noin 48 tuntia fermentoinnin aloittamisesta. Kasvua arvioitiin visuaalisesti skaalalla 0–+++.

6.1 Ymppien valmistaminen

Esiympit valmistettiin kolmessa osassa. Esiymppi tarkoittaa ennen varsinaista tutkimusta valmistettua viljelmää. Ensin aloitettiin myseeliymppien valmistus ja seuraavaksi vesiymppien sekä jauhoymppien. Jauhoymppi valmistettiin punnitsemalla hernejauhoja 500 g Gastronom-mitoitusvuokiin (GN-vuoka), jotka ovat uuniin sopivia astioita. Ne kuivasteriloitiin 140 °C:ssa niin kauan, kun hernejauhot saavuttivat 85 °C:n lämpötilan. Jauhot jäähdytettiin 40–50 °C:n, sen jälkeen siihen lisättiin itiöt (10^8 itiötä/g). Itiöt sekoitettiin tasaisesti jauhojen sekaan, minkä jälkeen ne olivat valmiita ympypäystä varten.

Myseeliympin kasvatusliemi valmistettiin valmiista FEB:stä, jota oli fermentoitu n. 48 tuntia. Valmiista FEB:tä punnittiin 100 g, joka sekoitettiin 900 g:aan vettä. Seos keitettiin 60 °C:ssa 20 minuutin ajan Thermomixillä, minkä jälkeen se suodatettiin suodatinkankaan läpi. Suspensio kaadettiin Schott-pulloon ja autoklavoitiin 121 °C:ssa 15 min ajan. Kasvatusliemeen lisättiin 0,5 g itiöitä (10^8 itiöitä/g) ja inkuboitiin 5 vuorokautta huoneenlämmössä magneettisekoitajassa. Kuvassa 1 oikealla valmis myseeliymppi. Kasvatuksen saanto oli 30 g kosteaa myseeliä per litra, joka määritettiin kosteusanalysointorilla. Myseeliymppiä varten kokeiltiin raaka-aineseoksen kokonaispainosta (1,0 kg) 1 %:n ja 10 %:n

märkápainoja. Kasvatuslientä punnittiin 1-prosenttiseen myseeliymppiin 10 g ja 10-prosenttiseen myseeliymppiin 100 g.



Kuva 1. Vesi- ja myseeliympit

Työssä valmistettiin kaksi vesiymppiä (kuva 1 vasemmalla). Ensimmäiseen vesiymppiin punnittiin 0,05 g itiöitä ja toiseen 0,5 g itiöitä, sillä vesiymppien tavoiteitiöpitoisuudet olivat 10^4 itiötä/g raaka-ainetta ja 10^5 itiötä/g raaka-ainetta, ja itiöjauhon määrä laskettiin raaka-ainekiloa kohden. Itiöt lisättiin 10-prosenttiseen suodatettuun glyseroliliuokseen (10 ml) itiöiden sekoittumisen helpottamiseksi.

6.2 Kiintoainefermentointiprosessi

Fermentoinnissa käytettiin filamenttisientä, josta käytetään tässä työssä nimeä Sieni A, ja raaka-aineena toimi proteiinipitoisen palkokasvin ja viljaraaka-aineen seos. Raaka-aineseosta punnittiin 1 kg GN-vuokiin, jotka steriloidtiin uunissa. Tämän jälkeen niiden annettiin jäähtyä 40–50-asteiseksi ja niihin lisättiin ennalta määritetty määrä filamenttisientä eri ympäysmenetelmin. Vuokat siirrettiin fer-

mentoitumaan noin kahdeksi vuorokaudeksi. Fermentoinnin olosuhteet olivat jokaisen ympäysmenetelmän kohdalla samat. Fermentointilämpötila kasvatuksen aikana oli 30 °C, suhteellinen kosteus 80 % ja fermentoinnin kesto n. 48 tuntia. Mittaukset tehtiin jokaisesta ympäysmenetelmästä otetuista yksistä näytteistä.

6.3 Kosteuspitoisuuden määrittäminen

Näytteiden kosteuspitoisuus tuli määrittää entsyymiaktiivisuuslaskuja varten. Kosteuspitoisuus määritettiin punnitsemalla foliovoat, joihin laitettiin 10 g näytettä. Ne kuivattiin Klarstein Master Jerky -kuivurissa, minkä jälkeen foliovoat punnittiin kuivattujen näytteiden kanssa. Foliovoakien ja kuivattujen näytteiden painot vähennettiin alkuperäisestä massasta ja tulokseksi saatiin näytteiden märkápainot. Näiden perusteella pystyttiin määrittämään näytteiden kosteuspitoisuudet.

6.4 Agardiffuusiomenetelmä

6.4.1 Maljojen valmistus amylaasiaktiivisuuden määrittämiseen

Amylaasiaktiivisuuden määrittämiseksi valmistettiin Abdel-Raheemin ja Shearin (42, s. 4) tutkimuksen perusteella elatusainetta 2 l pulloon, joka sisälsi

- 2 g/l tärkkelystä
- 1 g/l peptonia
- 1 g/l hiivauutetta
- 20 g/l agaria.

Pullo täytettiin tislattulla vedellä 1 l:aan asti ja alusta autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuutin ajan, minkä jälkeen jokaiselle petrimaljalle valettiin n. 20 ml elatusainetta. Maljat säilöttiin jääkaapissa kasvatuksen aloittamiseen asti. [42.]

6.4.2 Entsyymi uutteen valmistus

Näytteistä eristettiin entsyymi uute ennen inokuloimista maljoille. Uute valmistettiin Cardoso n ym. (43, s. 4) artikkelin perusteella pienin muokkauksin. Entsyymi uute valmistettiin punnitsemalla 1 g jauhettua FEB:tä 15 ml:n Falcon-putkeen, johon lisättiin 9 ml käänteisosmoosivettä (RO-vesi). Liuosta inkuboitiin 4 °C:ssa 30 minuutin ajan koko ajan käsin sekoittaen. Tämän jälkeen liuos sentrifugoitiin 6 500 g:llä 5 minuutin ajan. Lopuksi supernatantti steriilisuodatettiin ruiskuodattimen läpi 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin.

6.4.3 Näytteiden inokulointi maljoille

Entsyymi uutetta pipetoitiin maljoille tehtyihin kuoppiin 50 µl (kuopan halkaisija 0,5 cm) ja maljoja inkuboitiin yhden vuorokauden ajan 45 °C:ssa. Lisäksi reaktion toimivuus varmistettiin positiivisella kaupallisella amylaasientsyymiliuoksella (AB Enzymes Gammafungase, jonka ilmoitettu aktiivisuus on 1 300 AZ/g) ja negatiivisella (RO-vesi) kontrollilla. Tämän jälkeen maljoille pipetoitiin 2 ml 1-prosenttista vesipitoista jodikaliumjodidiliuosta (IPI-liuos). IPI-liuoksen lisääminen maljalle johtaa kirkkaiden kehien ilmaantumiseen näytteiden ympärille, mikä osoittaa tärkkelyksen hydrolyysin. Aktiivisuus määritettiin mittaamalla viivoittimella muodostuneen kirkaskehän halkaisija.

6.5 Amylaasiaktiivisuuden määrittäminen spektrofotometrisesti

Amylaasiaktiivisuus määritettiin lisäämällä valmistettua entsyymi uutetta 1-prosenttiseen tärkkelysliuokseen, joka toimii reaktiosubstraattina. Reaktiossa vapautunut glukoosi mitattiin Megazyme-sakkarosi-glukoosikitillä. Kitissä käytetään puhdasta glukoosioksidaasia, peroksidaasia ja β-fruktosidaasia. Sitä käytetään D-glukoosin ja sakkarosin spesifiseen mittaamiseen esim. elintarvikkeista. Yksi amylaasiyksikkö määritettiin entsyymimääräksi, joka vapautti tärkkelyksestä 1 µmol/min D-glukoosia. 1-prosenttinen tärkkelysliuos valmistettiin 0,05 M natriumfosfaattipuskuriin, joista tehtiin hydrolyysinäytteet. Nämä val-

mistettiin ja muokattiin työhön sopiviksi Debin ym. (44, s 154) tutkimuksen perusteella. Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista mittausta satunnaisvirheitä aiheuttavien tekijöiden poissulkemiseksi.

1-prosenttinen tärkkelysliuos 0,05 M natriumfosfaattipuskuriin valmistettiin punnitsemalla 0,5 g perunatärkkelystä 100 ml:n dekantterilasiin. Siihen lisättiin 2,5 ml 1 M natriumfosfaattipuskuria ja sekoitettiin tasaiseksi. 47,5 ml tislattua vettä kiehautettiin, kaadettiin tärkkelystahnaan ja sekoitettiin, kunnes kaikki tärkkelys oli liuennut. Tuloksena oleva liuos oli hieman samea. Tärkkelysliuoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ennen käyttöä.

Reaktioseos koostui 1-prosenttisestä tärkkelysliuoksesta, jota oli 1,35 ml ja entsyymiutteesta, jota oli 0,15 ml. Reaktiot tehtiin 1,5 ml:n Eppendorf -putkiin ja ne inkuboitiin + 45 °C:ssa 30 minuutin ajan. Reaktio inaktivoitiin kuumentamalla putket 10 minuutin ajan + 95 °C:ssa. Tämän jälkeen ne sentrifugoitiin 10 000 g:ssä 2 minuutin ajan. Liuos säilytettiin pakkasessa myöhempiä analyysejä varten. Reaktion toimivuus varmistettiin positiivisella sekä negatiivisellä kontrollilla. Positiivinen kontrolli valmistettiin tärkkelysliuoksesta sekä kaupallisesta amylaasientsyymiliuoksesta (AB Enzymes Gammafungase). Negatiivikontrollissa käytettiin RO-vettä entsyymiutteen sijasta.

Amylaasiaktiivisuus määritettiin spektrofotomerisesti. Reaktiossa vapautunut glukoosi mitattiin seuraamalla Megazyme-sakkaroosi-glukoosikitin ohjeita. Ohjeesta poiketen reaktion kokonaistilavuutena käytettiin 0,85 ml. Absorbanssit koottiin MegaCalc-laskuriin, joka laskee vapautuneen glukoosin määrät (g/l) [45].

Näytteiden kuiva-ainepitoisuus laskettiin kosteuspuitoisuustulosten perusteella kaavalla 1.

$$\text{Kuiva - ainepitoisuus} = 100 \% - \text{kosteuspitoisuus} (\%) \quad (1)$$

Entsyymiaktiivisuuslaskut laskettiin Chisti ym. (46) artikkelin perusteella (kaava 2), mihin tarvittiin edellä mainittujen kuiva-ainepitoisuuksien lisäksi inkubointiaika alkuperäisessä uutossa (30 min) ja ympäysmenetelmien vapautuneen glukoosin määrät (g/l).

$$\text{Amylaasiaktiivisuus } U = \frac{\frac{\text{vapautunut glukoosi}}{l}}{\frac{30 \text{ min}}{(1 - \text{kuiva-ainepitoisuus})}} \quad (2)$$

Laskuissa oletuksena oli 45 °C:n lämpötila.

7 Tulokset ja pohdinta

7.1 Ympäysmenetelmän vaikutus kasvunopeuteen

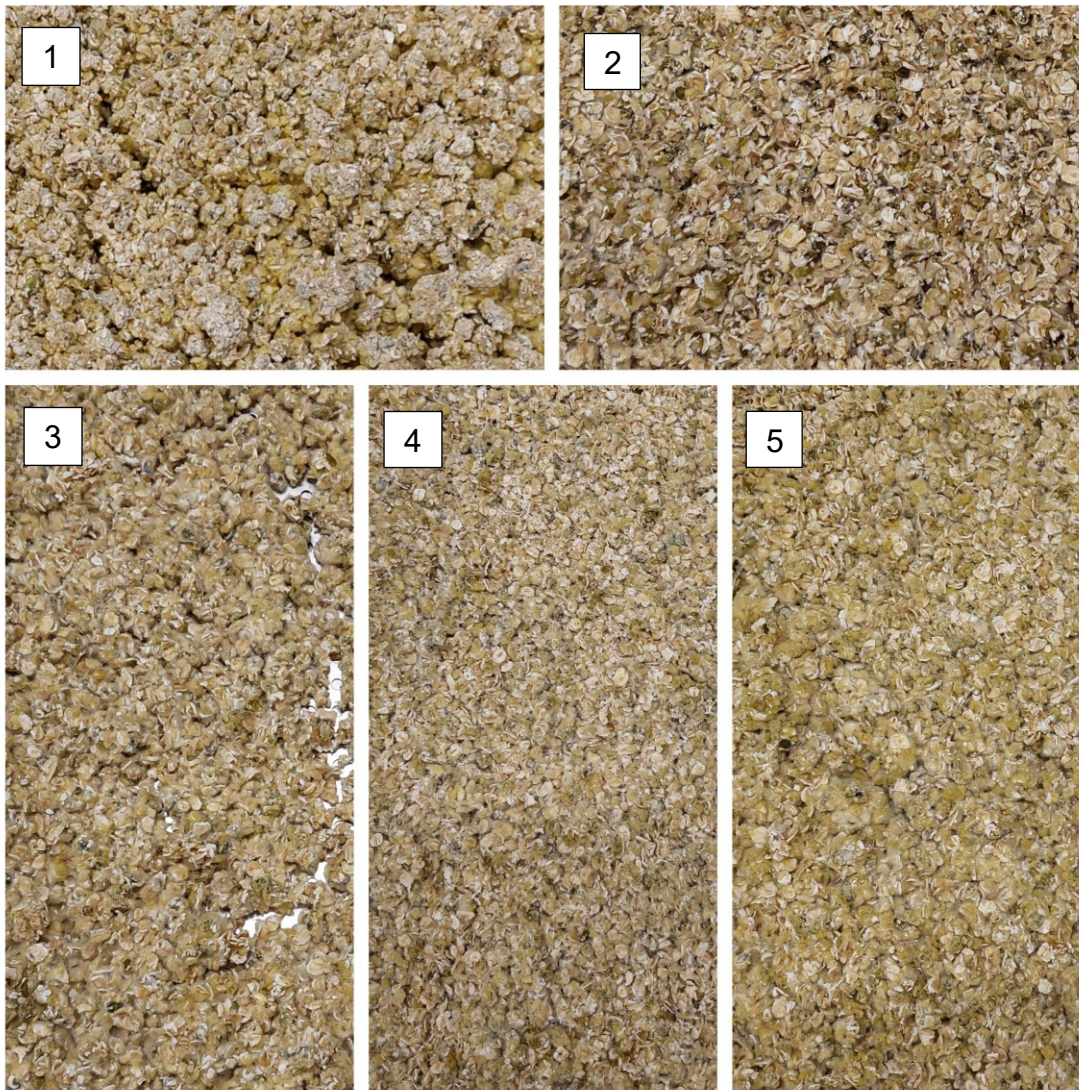
Ympäysmenetelmien vaikutuksia kasvunopeuteen ja sienirihman määrään tutkittiin aistinvaraisesti (visuaalisesti). Taulukossa 1 havainnoidaan eri ympäysmenetelmien kasvunopeutta eri aikapisteissä asteikolla 0–+++ (0=ei kasvua, +=kohtalaista kasvua, ++=hyvää kasvua ja +++=erinomaista kasvua)

Taulukko 1. Sienen kasvu kuvattuna asteikolla 0–+++ , jossa 0 tarkoittaa, että kasvua ei ole tapahtunut lainkaan, + kohtalaista kasvua, ++ hyvää kasvua ja +++ erinomaista kasvua.

	0 h	18 h	24 h	48 h
Jauhoymppi	0	+	++	+++
Vesiymppi 10 ⁴ itiötä/g	0	0	+	+
Vesiymppi 10 ⁵ itiötä/g	0	+	++	+++
1-prosenttinen myseeliymppi	0	0	+	+
10-prosenttinen myseeliymppi	0	0	+	++

Taulukon 1 avulla voidaan hahmotella visuaalista kasvunopeutta asteikolla 0–+++ . Fermentoinnin edetessä huomattiin, että selkeää kasvua havaittiin vasta 24 tuntia fermentoinnin jälkeen. Jauhoymppi sekä vesiympä 10⁵ itiötä/g osoittivat kasvua jo 18 tunnin jälkeen. Nämä osoittivat myös kahden vuorokauden fermentoinnin jälkeen erinomaista kasvua verrattuna muihin ympäysmenetelmiin. Aminin ym. (47, s. 3) artikkelissa tutkittiin *A. niger* -sienen, joka on vertailukelpoinen sienä A:n kanssa, kasvunopeutta ja todettiin, että 1–3 päivän sisällä kasvatuksen aloituksesta solut alkavat jakautua ja muuttua aktiivisemmiksi, mikä on linjassa tässä työssä havaitun kasvun kanssa.

Ensimmäisen vuorokauden fermentoinnin jälkeen myseeli- ja vesiympäiden valmiit FEB:t osoittivat vain hieman vaaleaa kasvustoa verrattuna jauhoseokseen. Kasvunopeudessa ei tässä vaiheessa näkynyt huomattavia eroja. Noin 48 tunnin fermentoinnin jälkeen valmiissa kasvustoissa oli huomattavia eroja. 1-prosenttinen myseeliympä ja vesiympä 10⁴ itiötä/g jäivät hieman raaoiksi eli olivat pääsääntöisesti vain vaalean kasvuston peitossa. 10-prosenttinen myseeliympä ja vesiympä 10⁵ itiötä/g kasvoivat huomattavasti paremmin, ja niissä näkyi vihertävää kasvustoa. Kuvasta 2 voidaan erottaa eri ympäysmenetelmien vaikutukset kasvunopeuteen 48 tuntia fermentoinnin jälkeen.



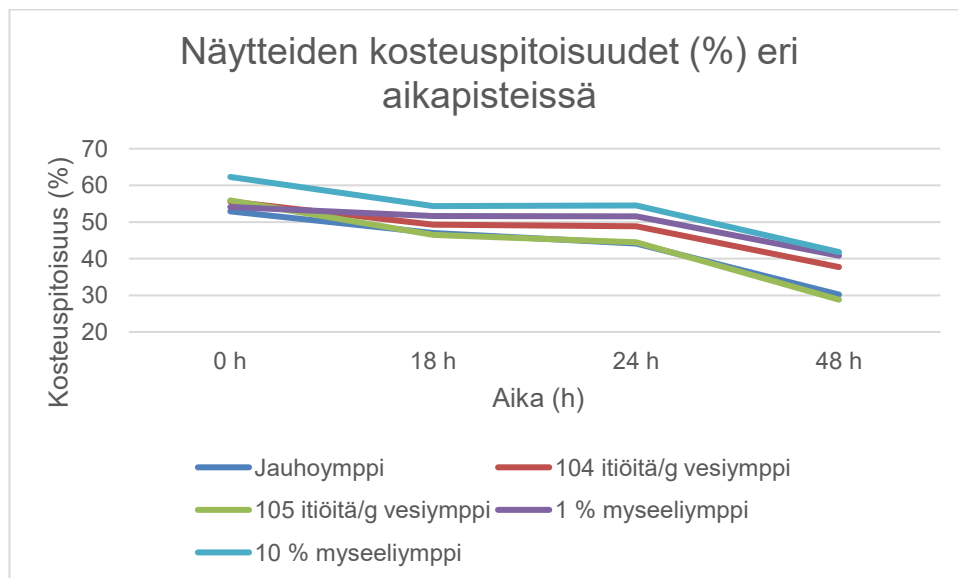
Kuva 2. 1. Jauhoymppi 2. 1-prosenttinen myseeliymppi 3. 10-prosenttinen myseeliymppi 4. Vesiymppi 10^4 itiötä/g ja 5. Vesiymppi 10^5 itiötä/g ympäysmenetelmien kasvustot 48 tuntia fermentoimisen jälkeen.

Visuaalisen tarkastelun perusteella havaittiin, että rihmaston määrä vaihteli eri ympäysmenetelmien välillä. Vesiymppi 10^5 itiötä/g rihmaston määrä oli suurin jauhoymppin lisäksi. 1-prosenttisen myseeliymppin ja vesiymppin 10^4 rihmastojen määrät olivat vähäisiä ja ne olisivat tarvinneet useamman tunnin lisääikää, jotta kasvusto olisi ollut tarpeeksi runsasta jatkokäsittelyä varten. 10-prosenttisen myseeliymppin rihmaston määrä oli lähes yhtä runsas kuin vesiymppin 10^5 itiötä/g. Näistä esiympäisistä parhaiten kasvoi jauhoymppi.

Nämä erot voivat johtua ympäristyypistä, lämpötilasta ja kosteuspitoisuudesta kuten Gowthaman ym. (48, s. 306–309) totesivat artikkelissaan. Ympäristyypeillä voi olla erilaiset optimaaliset olosuhteet, vaikka käytössä olisikin sama sienikanta, esim. jauhoymppi kasvoi tämän työn olosuhteissa paremmin kuin vesiyymppi 10^4 itiötä/g. Lämpötilan säätö on voinut vaikuttaa eroihin, sillä prosessin aerobisesta luonteesta johtuva suuri lämmöntuotto ei häviä helposti kiintoaineen huonon lämmönjohtavuuden takia. [48.]

7.2 Kasvatusten kosteuspitoisuus

Kosteuspitoisuus (%) kertoo veden prosenttiosuuden ainesosuksessa, ja mitä suurempi tämä arvo on, sitä kosteampi seos on. Työssä toimineesta kiintoaineesta määritettiin kosteuspitoisuudet entsyymiaktiivisuuslaskuja varten. Kuvasta 3 nähdään pitoisuuksien erot eri näytteiden välillä eri aikapisteissä.



Kuva 3. Näytteiden kosteuspitoisuudet eri aikapisteissä.

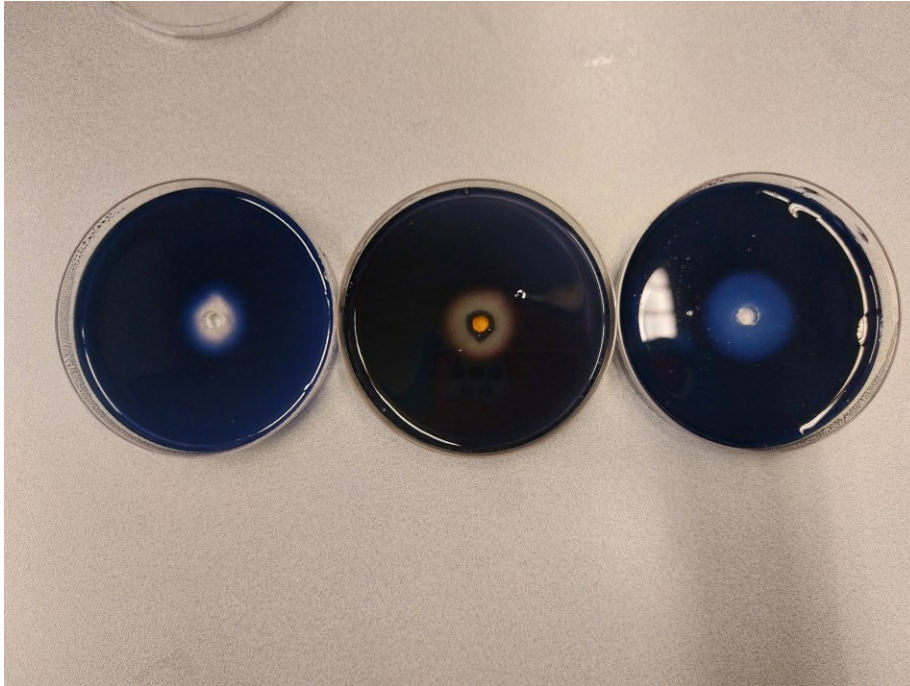
Jauhoymppin lähtötilanne oli muihin näytteisiin verrattuna kuivin, kun taas 10-prosenttinen myseeliymppi kostein. Tämä johtui siitä, että jauhoymppi ei sisältänyt lainkaan kosteutta, kun 10-prosenttinen myseeliymppi oli 100 ml nestettä. Samasta syystä sen kosteuspitoisuus on muita näytteitä suurempi jokaisessa

aikapisteessä. Vesiympin 10^5 itiötä/g kosteuspitoisuus laski 48 tunnin fermentoinnin aikana eniten, ja vesiympin 10^4 itiötä/g sekä 1-prosenttisen myseeliympin kosteuspitoisuudet vähenivät lähes samassa tahdissa. Gomes ym. (49, s. 521–526) artikkelissa oletettiin kiintoaineen kuivumisen lisääntyvän fermentoinnin edetessä johtuvan sienien aineenvaihduntatoiminnasta, mikä voisi myös selittää tässä työssä havaitut tulokset. Kosteuspitoisuus oli lähes jokaisella näytteellä eri, vaikka fermentointitilan kosteuspitoisuus oli 80 %. Optimaalinen kosteustaso tulisi säilyttää koko prosessin ajan, sillä liian alhainen kosteuspitoisuus vähentää mikrobien kasvua ja entsyymien stabiiliutta. Liian korkeat kosteuspitoisuudet taas johtavat kaasunsiirron rajoittumiseen ja bakteerien aiheuttamaan kilpailuun [49].

7.3 Ympärysmenetelmän vaikutus entsyymiaktiivisuuksiin

7.3.1 Amylaasiaktiivisuus agardiffuusiomenetelmällä

Agardiffuusiomenetelmässä entsyymien hajottama substraatti muodosti agarin pinnalle kirkkaan kehän, kun maljoille lisättiin IPI-liuosta (kuva 4). Maljat luettiin mittaamalla kehän halkaisija viivoittimella.



Kuva 4. Maljoille kehittyneet kehät IPI-liuoksen lisäämisen jälkeen. Kuvassa vasemmalta oikealle vesiymppin 10^5 itiötä/g näytteet 18 tuntia, 24 tuntia ja 48 tuntia fermentoimisen jälkeen.

Kuvan 4 maljoilla nähdään esimerkki muodostuneista vyöhykkeistä 18 tuntia, 24 tuntia ja 48 tuntia fermentoimisen jälkeen. Kuvasta voidaan havaita amylaasiaktiivisuuden lisääntyvän, mitä pidemmälle kasvatusta päästään.

Jokaisella maljalla, jossa entsyymiaktiivisuutta tapahtui, havaittiin kehät IPI-liuoksen lisäämisen jälkeen. Niiden halkaisijat mitattiin viivoittimen avulla, ja saadut tulokset on koostettu taulukkoon 2. Jokaisen näytteen kohdalla amylaasiaktiivisuus lisääntyi, mitä pidemmälle fermentointia edettiin. Balin ym. (50) mukaan sienen amylaasiaktiivisuus lisääntyi fermentointiajan pidentyessä ja suurin amylaasiaktiivisuus osoitettiin $35\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 6 vuorokauden fermentoinnin jälkeen. Artikkelin tulokset selittävät tämän työn menetelmän tulokset, sillä amylaasiaktiivisuuden havaittiin kehien halkaisijoiden perusteella lisääntyvän fermentointiajan pidentyessä. Tasaisinta aktiivisuuden lisääntymistä osoittivat jauhoymppi ja vesiymppi 10^5 itiötä/g. Tässä työssä fermentointi tapahtui $30\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 48 tunnin ajan.

Taulukko 2. Maljoilla esiintyvien kehien halkaisijoiden mitat senttimetreinä eri aikapisteissä.

Ymppäysmenetelmä	0 h	18 h	24 h	48 h
Jauhoymppi	0 cm	2,3 cm	2,5 cm	2,6 cm
Vesiymppeä 10 ⁴ itiötä/g	0 cm	0 cm	1,7 cm	2,6 cm
Vesiymppeä 10 ⁵ itiötä/g	0 cm	2,2 cm	2,4 cm	2,7 cm
1-prosenttinen myseeliymppi	0 cm	1,8 cm	2,4 cm	2,6 cm
10-prosenttinen myseeliymppi	1,2 cm	1,8 cm	2,2 cm	2,4 cm

Taulukon 2 halkaisijoiden perusteella voidaan päätellä, että amylaasiaktiivisuutta on tapahtunut lähes jokaisella maljalla 0 tunnin jälkeen ja aktiivisuus lisääntyi kasvun edetessä. Amylaasiaktiivisuuden lisääntyminen jokaisen ympäysmenetelmän kohdalla on ollut suhteellisen tasaista, mutta 10-prosenttinen myseeliymppi ja vesiymppeä 10⁴ itiötä/g erottuivat joukosta. 10-prosenttisessä myseeliympissä amylaasiaktiivisuutta on ollut läsnä heti ympäyksen jälkeen ja on lisääntynyt tasaisesti eri aikapisteissä. Abdullah ym. (51) osoittivat ympin määrällä (% v/v), lämpötilalla ja fermentointiajalla olevan vaikutusta amylaasiaktiivisuuteen. % v/v tarkoittaa tilavuusprosenttia. Suurempi ympin määrä tuottaa korkeampia aktiivisuuksia, joten tämän työn tulokset ovat sen suhteen yhteneväiset Abdullah ym. (51) tutkimuksen kanssa. Artikkelissa optimaalinen fermentointilämpötila ja -aika olivat 30 °C ja 72 tuntia, ja tulokset tukivat tämän työn tuloksia. Jo myseeliympin esikasvatuksessa voi muodostua amylaasiaktiivisuutta, joten aktiivisuutta havaittiin jo nollanäytteessä. Rameshan ym. (52, s. 1213) tutkimuksessa kasvatettiin sientä nestemäisessä kasvatusalustassa seitsemän vuorokauden ajan eri lämpötiloissa, ja huoneenlämmössä kasvatettu sieni osoitti mittauksissa amylaasiaktiivisuutta. Tämä selittää 10-prosenttisen myseeliympin aktiivisuuden jo nollanäytteessä.

Vesiympissä 10^4 itiötä/g aktiivisuus on alkanut vasta 18 tuntia fermentoinnin jälkeen, ja on silloinkin ollut alhaisempaa kuin muiden ympäysmenetelmien kohdalla. Lisäksi vesiympin 10^4 itiötä/g amylaasiaktiivisuus on 24 tunnin jälkeen tehnyt suurimman nousun verrattuna muihin ympäysmenetelmiin. Bashirin ja Mustaphan (53, s. 428) tutkimuksen perusteella ympin määrällä oli merkitystä sienen amylaasiaktiivisuuteen. Artikkelissa osoitettiin amylaasiaktiivisuuden olevan alhaisempaa, kun ympin määrä oli pienempi. Artikkelissa todettiin aktiivisuuden käynnistyneen vasta 24 tunnin kuluttua fermentoinnista, mikä voi selittää vesiympin 10^4 itiötä/g aktiivisuuden tulokset eri aikapisteissä.

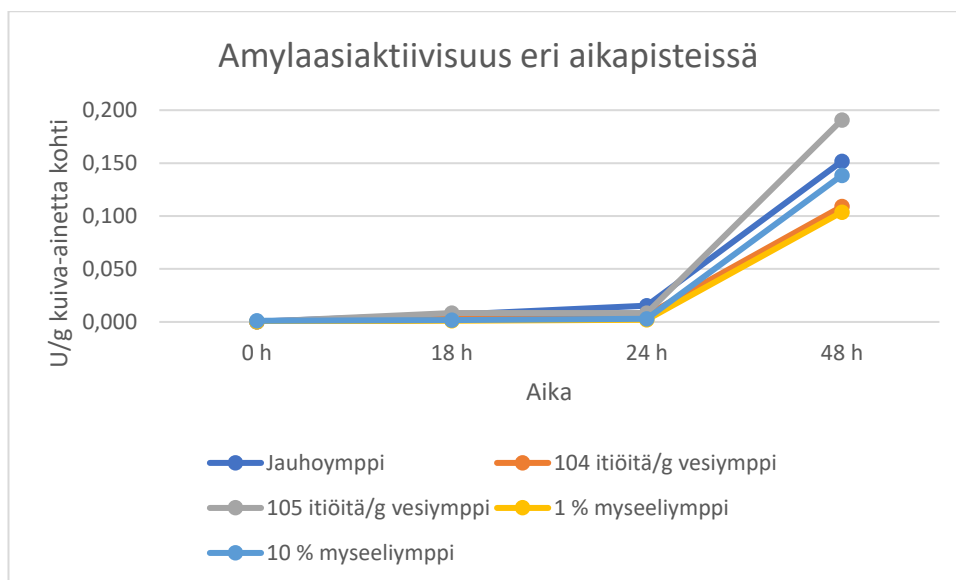
Tulosten erot eivät olleet merkittäviä, sillä amylaasiaktiivisuus lisääntyi suhteellisen tasaisesti jokaisen ympäysmenetelmän kohdalla. Lisäksi samoissa aikapisteissä, ympäysmenetelmästä riippumatta, halkaisijoiden koot olivat hyvin lähellä toisiaan. Menetelmän perusteella voidaan melko tarkasti tulkita aktiivisuutta ja aktiivisuuden eroja sen suhteen, lisääntyykö aktiivisuus ajan myötä, sillä maljalle kehittyneen kirkkaan vyöhykkeen koon perusteella voidaan tulkita amylaasin aktiivisuutta eri aikapisteissä ja eri ympäysmenetelmien välillä. Pelkästään tämä menetelmä ei sovellu määrittämään, kuinka paljon amylaasi on pilkkonut tärkkelystä.

48 tuntia fermentoinnin jälkeen vesiymppi 10^5 itiötä/g osoitti suurinta amylaasiaktiivisuutta ja 10-prosenttinen myseeliymppi pienintä. Muiden ympäysmenetelmien viimeisiltä maljoilta mitattiin samankokoiset halkaisijat, joten amylaasiaktiivisuuden todettiin olevan niillä samaa suuruusluokkaa. Voidaan siis todeta tämän menetelmän perusteella vesiympin 10^5 itiötä/g olevan amylaasiaktiivisuuden suhteen optimaalisin esiymppi.

7.3.2 Amylaasiaktiivisuuden määrittäminen spektrofotometrisesti

Filamenttisienen entsyymiaktiivisuutta tutkittiin fermentointiajan ja ympäysmenetelmän perusteella kiintoainefermentoinnissa. Amylaasiaktiivisuus määritettiin Megazyme-sakkaroosi-glukoosikitillä spektrofotometrisesti, ja tulokset on ilmoitettu U/g kuiva-ainetta kohti, mikä tarkoittaa 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ D-glukoosia per g kuiva-

ainetta. Tuloksista tehtiin aktiivisuuskuvaaja (kuva 5) eri ympäysmenetelmien aikapisteissä olevien amylaasiaktiivisuuksien hahmottamiseksi. Jokaiselle näytteelle tehtiin kolme mittausta. Reaktion toimivuus varmistettiin positiivisella (kaupallinen amylaasientsyymiliuos, AB Enzymes Gammafungase), jota annosteltiin valmistajan ohjeen mukaan ja negatiivisella (RO-vesi) kontrollilla.



Kuva 5. Ympäysmenetelmien amylaasiaktiivisuus eri aikapisteissä.

Kuvasta 5 nähdään amylaasiaktiivisuuden olevan korkeimmillaan jokaisen ympäysmenetelmän kohdalla 48 tunnin fermentoinnin jälkeen. Suurin amylaasiaktiivisuus 48 tunnin fermentoinnin jälkeen havaittiin vesiymppin 10^5 itiötä/g kohdalla, joka oli 0,191 U/g. Jauhoymppin amylaasiaktiivisuus oli 0,152 U/g ja ylsi lähes yhtä suureksi kuin vesiymppin 10^5 itiötä/g aktiivisuus. Jauhoymppin ja vesiymppin 10^5 itiötä/g amylaasiaktiivisuus lisääntyi koko fermentoinnin ajan lähes samalla nopeudella, mutta 18–24 tunnin välillä oli vain pieniä eroja. Amylaasiaktiivisuuden tarkat arvot eri aikapisteissä löytyvät taulukosta 3.

Taulukko 3. Amylaasiaktiivisuuden (U) tarkat arvot eri aikapisteissä.

Ymppäysmenetelmä	0 h	18 h	24 h	48 h
Jauhoymppi	0,000 U/g	0,007 U/g	0,015 U/g	0,152 U/g
Vesiymppi 10 ⁴ itiötä/g	0,000 U/g	0,003 U/g	0,007 U/g	0,109 U/g
Vesiymppi 10 ⁵ itiötä/g	0,000 U/g	0,008 U/g	0,009 U/g	0,191 U/g
1-prosenttinen myseeliymppi	0,000 U/g	0,001 U/g	0,002 U/g	0,104 U/g
10-prosenttinen myseeliymppi	0,001 U/g	0,002 U/g	0,003 U/g	0,139 U/g

Lisäksi erojen selkeyttämiseksi eri ymppäysmenetelmien rinnakkaismittauksista määritettiin keskihajonnat. Jauhoymppin keskihajonnat olivat 0 tunnin kodalla 0 U/g, 18 tunnin sekä 24 tunnin kohdalla 0,001 U/g ja 48 tunnin kodalla 0,005 U/g. Vesiymppin 10⁴ itiötä/g keskihajonnat olivat 0 tunnin, 18 tunnin sekä 24 tunnin kodalla 0 U/g ja 48 tunnin kodalla 0,002 U/g. Vesiymppin 10⁵ itiötä/g keskihajonnat olivat 0 tunnin kodalla 0 U/g, 18 tunnin sekä 24 tunnin kohdalla 0,001 U/g ja 48 tunnin kodalla 0,020 U/g. 1-prosenttisen myseeliymppin keskihajonnat olivat 0 tunnin, 18 tunnin sekä 24 tunnin kodalla 0 U/g ja 48 tunnin kodalla 0,014 U/g. 10-prosenttisen myseeliymppin keskihajonnat olivat 0 tunnin kodalla 0,001 U/g, 18 tunnin sekä 24 tunnin kohdalla 0 U/g ja 48 tunnin kodalla 0,042 U/g.

Kuvan 5 ja taulukon 3 perusteella havaittiin, että jokaisen ymppäysmenetelmän amylaasiaktiivisuus lisääntyi tasaisen hitaasti 24 tuntiin asti, jonka jälkeen ne lisääntyivät huomattavasti. Tämä voi johtua fermentointilämpötilasta (30 °C) ja prosessin aerobisesta luonteesta johtuvasta suuresta lämmöntuotosta. Visuaalisen tarkastelun ja tämän menetelmän perusteella kasvu on todennäköisesti kiihtynyt 24 tunnin tienoilla lämmöntuoton takia, mikä voi selittää amylaasiaktiivisuuden lisääntymisen tämän aikapisteen jälkeen [49].

10-prosenttinen myseeliymppi osoitti jo 0 tunnin kohdalla lievästi suurempaa aktiivisuutta verrattuna muihin ymppäysmenetelmiin, mutta 18–24 tuntien välillä sen aktiivisuus oli kaikkia muita matalampi paitsi 1-prosenttistä myseeliymppiä

ja lopulta sen aktiivisuus oli kolmanneksi suurin. 1-prosenttisen myseeliympin aktiivisuus oli koko kasvatuksen ajan matalin. 10-prosenttisen myseeliympin alhainen amylaasiaktiivisuus on voinut johtua sen suuremmasta kosteuspitoisuudesta verrattuna muihin ympäysmenetelmiin. Liian korkea kosteuspitoisuus voi johtaa raaka-aineen paakkuuntumiseen ja kaasun tilavuuden vähenemiseen, mikä voi aiheuttaa vähäistä hapen siirtymistä ja tällä tavoin estää amylaasiaktiivisuuden kehittymistä [54]. 1-prosenttisen myseeliympin alhaiset aktiivisuudet voisi selittää itiöiden vähäinen määrä.

Suurinta amylaasiaktiivisuutta osoittivat jauhoymppi ja vesiympin 10^5 itiötä/g vaihtelevasti. Vesiympin 10^4 itiötä/g aktiivisuus liikkui vesiympin 10^5 itiötä/g ja 1-prosenttisen myseeliympin aktiivisuuksien puolivälissä 24 tuntiin asti, kunnes 10-prosenttisen myseeliympin aktiivisuus kasvoi sen ohi.

Vesiympin 10^5 itiötä/g korkeimman amylaasiaktiivisuuden voisi selittää sillä, että ympissä olevien itiöiden ja veden määrät ovat olleet optimaalisimmat verrattuna muihin ympäysmenetelmiin. Abdullahin ym. (55, s. 6) sekä Castillon ym. (56) tutkimuksissa todettiin, että riittävällä vesipitoisuudella kiintoainefermentointiprosessin raaka-aineessa ja itiöiden määrällä ympissä on tärkeä rooli monien entsyymien biosynteesissä ja erittymisessä. Vesiympin 10^5 itiötä/g ja jauhoympin erona oli ympien sisältämä vesipitoisuus, joten raaka-aineeseen lisätyn veden määrä ympin mukana on voinut edistää entsyymiaktiivisuutta.

8 Johtopäätökset

Työn tavoitteena oli tutkia eri ympäysmenetelmien vaikutusta sienen amylaasiaktiivisuuteen kiintoainefermentointiprosessin aikana. Fermentoinnissa käytettiin filamenttisientä (sieni A) ja raaka-aineena toimi proteiinipitoisen palkokasvin ja viljaraaka-aineen seos. Amylaasiaktiivisuutta tutkittiin, sillä käytetty raaka-aine sisältää paljon tärkkelystä ja sen avulla tärkkelys saadaan pilkottua pienemmiksi yksinkertaisimmiksi sokeriyhdisteiksi. Tuloksien avulla yritys voi

valita amylaasiaktiivisuuden perusteella ympäysmenetelmän kiintoainefermentointiprosessiin. Amylaasiaktiivisuutta tutkittiin agardiffuusiomenetelmällä sekä spektrofotometrisesti.

Amylaasiaktiivisuutta havaittiin jokaisessa näytteenottoajankohdassa. Aktiivisuus lisääntyi hitaasti ja tasaisesti näytteenottoajankohdan edetessä 0–24 tuntien välillä. Suurin muutos tapahtui kuitenkin vasta 24–48 tuntien välillä, jossa aktiivisuus on tehnyt reilun harppauksen jokaisen ympäysmenetelmän kohdalla.

Merkittäviä eroja eri ympäysmenetelmien amylaasiaktiivisuuksissa havaittiin vesiymppin 10^5 itiötä/g ja 1-prosenttisen myseeliymppin välillä, joissa 1-prosenttisen myseeliymppin aktiivisuus oli huomattavasti lievempää kuin vesiymppin 10^5 itiötä/g. Vesiymppi 10^4 itiötä/g osoitti myös alhaisia aktiivisuuksia, mutta ei niin heikkoja kuin 1-prosenttinen myseeliymppi. Jauhoymppin ja vesiymppin 10^5 itiötä/g tulokset olivat samaa suuruusluokkaa keskenään samoin kuin vesiymppin 10^4 itiötä/g ja 1-prosenttisen myseeliymppin. 10-prosenttisen myseeliymppin tulokset vaihtelivat agardiffuusiomenetelmän ja spektrofotometrisen menetelmän välillä. Käytettyjen laitteiden esim. vaakojen tarkkuudet vaihtelivat, jotka ovat voineet olla yhdenlaisia virhelähteitä. Agardiffuusiomenetelmässä halkaisijan koko mitattiin viivoittimella, joka ei ole kovin tarkka tapa mitata. Näiden lisäksi menetelmien toteuttamisessa on voinut tapahtua inhimillisiä sekä systemaattisia virheitä. Systemaattiset virheet ovat voineet johtua esim. olosuhteiden vaihteluista.

Agardiffuusiomenetelmä ja spektrofotometrinen menetelmä eivät antaneet samanlaisia tuloksia. Agardiffuusiomenetelmässä jauhoymppi, vesiymppi 10^4 itiötä/g ja 1-prosenttinen myseeliymppi osoittivat 48 tunnin fermentoinnin jälkeen samansuuruisia amylaasiaktiivisuutta, kun taas spektrofotometrisesti mitattuna vesiymppin 10^4 itiötä/g ja 1-prosenttinen myseeliymppin aktiivisuudet olivat samaa luokkaa ja jauhoymppin huomattavasti niitä suurempaa. Lisäksi 10-prosenttinen myseeliymppi olisi agardiffuusiomenetelmän perusteella osoittanut matalinta amylaasiaktiivisuutta, mutta spektrofotometrisesti ollut kuitenkin kolmanneksi suurinta.

10-prosenttisen myseeliympin amylaasiaktiivisuus todettiin molemmissa menetelmissä alkaneen jo 0 tunnin jälkeen suurempana kuin muiden ymppäysmenetelmien. Lisäksi vesiympin 10^4 itiötä/g amylaasiaktiivisuus alkoi agardiffuusio-menetelmän perusteella vasta 24 tunnin kodalla, mutta spektrofotometrisesti sen aktiivisuus on ollut 0–24 tuntien välillä suurempaa kuin kummankaan myseeliympin. Muutoin 0–24 tuntien välillä erot ovat olleet niin pieniä molemmissa menetelmissä, että niiden tulokset voidaan tulkita lähes samankaltaisina.

Työn tuloksien perusteella voidaan päätellä, että ymppityypillä, vesipitoisuudella, lämpötilalla ja fermentointiajalla on vaikutusta amylaasiaktiivisuuteen. Amylaasiaktiivisuuden roolia aromiyhdisteiden muodostumisessa on tutkittu vain vähän, mutta sen uskotaan vaikuttavan siihen. Tästä syystä tuloksista voidaan päätellä ymppäysmenetelmällä olevan vaikutusta amylaasiaktiivisuuksiin ja näin lopputuotteen aromiin. Tuloksia voidaan hyödyntää yrityksen kiintoainefermentointiprosessin ymppäysmenetelmän valitsemisessa korkeimman amylaasiaktiivisuuden perusteella. Lisäksi tuloksista voi olla hyötyä esim. jatko-tutkimuksia varten.

Tuloksia tarkastellessa huomattiin, että 24–48 tuntien välillä tapahtui amylaasiaktiivisuuden kiihtymisvaihe. Tälle tai 18–24 tuntien aikavälille olisi hyvä saada yksi aikapiste lisää, jotta kiihtymisvaihe voidaan määritellä paremmin. Lisäksi fermentointiaikaa voisi pidentää tiettyjen ymppäysmenetelmien kuten 1-prosenttisen myseeliympin ja vesiympin 10^4 itiötä/g kohdalla rihmaston määrän kasvamisen tutkimiseksi. Fermentointia voisi jatkaa myös tutkimusmielessä yli 48 tuntia amylaasiaktiivisuuden lisääntymisen tai laantumisen selvittämiseksi.

Tutkimusta voisi jatkaa valikoimalla ymppäysmenetelmä ja tutkia lämpötilan, pH:n ja eri hiililähteiden vaikutusta amylaasiaktiivisuuteen kiintoainefermentointiprosessissa. Lisäksi muitakin mahdollisia ymppäysmenetelmiä voisi tutkia ja kokeilla, soveltuvatko ne paremmin prosessiin. Työn perusteella parhaiten amylaasiaktiivisuutta osoittavia ymppäysmenetelmiä voisi tutkia tarkemmin,

jotta yrityksen olisi helpompi valita näiden kahden väliltä ymppäysmenetelmä kiintoainefermentointiprosessiinsa.

Tässä työssä vesiymppi 10^5 itiötä/g ja jauhoymppi osoittivat korkeimpia amylaasiaktiivisuuksia, joiden perusteella ne olisivat optimaalisimmat ymppäysmenetelmät yrityksen kiintoainefermentointiprosessiin. Molempien ymppäysmenetelmien amylaasiaktiivisuus lisääntyi fermentoinnin edetessä samalla nopeudella, mutta vesiymppi 10^5 itiötä/g osoitti sekä agardiffuusiomenetelmässä että spektrofotometrisessä analyysissä suurinta amylaasiaktiivisuutta 48 tunnin jälkeen fermentoinnin aloittamisesta. Molempien menetelmien toteuttaminen vie aikaa, mutta agardiffuusiomenetelmässä vuorokauden inkubointiaika voi olla rajoittava tekijä, jos maljoja ei kykene lukemaan seuraavana päivänä. Tämän työn spektrofotometrisen analyysin voi tehdä yhden työpäivän aikana, joten se on helpompi toteuttaa. Parhaimmaksi ymppäysmenetelmäksi valikoituisi edellä mainittujen seikkojen takia vesiymppi 10^5 itiötä/g, ja molemmat menetelmät puoltavat vesiymppin 10^5 itiötä/g paremmuutta 48 tunnin fermentoinnin jälkeen. Toisaalta jauhoymppin amylaasiaktiivisuuden lisääntyminen on tasaisempaa koko kasvatuksen ajan ja valmiin FEB:n aktiivisuus on vain hieman alhaisempi vesiymppiin 10^5 itiötä/g verrattuna.

Lähteet

- 1 Maicas, Sergi. 202. The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*. Vol 8, s. 1142.
- 2 Neerja, Thakur; Sheetal & Tek Chand, Bhalla. 2023. Chapter 18 – Enzymes and their significance in the industrial bioprocesses. *Basic Biotechniques for Bioprocesses and Bioentrepreneurship*, s. 273-284.
- 3 Larroche, Christian; Pandey, Ashok & Soccol, Carlos Ricardo. 2008. *Current Developments in Solid-State Fermentation*. New York: Springer Science.
- 4 Breslin, Paul & Peyrot des Gachons, Catherine. 2019. Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. *Current diabetes reports*. Vol 16, s. 102.
- 5 Saxena, Rajshree & Singh, Rajni. 2011. Amylase Production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol 42, s. 1334–1342.
- 6 Pioneering Sustainable Solutions for Valuing Food Waste. Verkkoaineisto. Biomush Ltd. <<https://biomush.fi/>>. Luettu 27.12.2023.
- 7 Ghanta, Rebeca & Mandal, Samir. 2022. *Pharmaceutical Chemistry and Production: An Introductory Textbook*. Bentham Science Publishers.
- 8 Fermentoinnin toteutustavat. Verkkoaineisto. MyCourses Aalto. <https://mycourses.aalto.fi/pluginfile.php/922633/mod_resource/content/1/3.%20Kasvatusmenetelm%C3%A4t.pdf>. Luettu 21.4.2024.
- 9 Machado, Isabel; Rodríguez-Couto, Susana & Teixeira, José. 2013. Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. *Journal of Biotechnology*. Vol 165, s. 195-200.
- 10 Cesar De Carvalho, Júlio; Pandey, Ashok & Vandenberghe, Luciana. 2020. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. Vol 1, s 3.
- 11 Alves Asevedo, Estefani; Carvalho Pimentel, Vanessa; Dantas Oliveira, Sérgio; Eduardo de Araújo Pailha, Carlos; Ribeiro de Macedo, Gorete; Rodrigues de Araújo, Fernanda & Silvino dos Santos, Everaldo. 2018. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Vol. 6, s. 937-944.

- 12 Aggelis, G.; Economou, Ch.N.; Makri, A.; Pavlou, S. & Vayenas, D.V. 2010. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Technology*. Vol 101, s. 1385-1388.
- 13 Blando, Frederica; Bleve, Gianluca; De Rinaldis, Gianluca, Durante, Miriana; Gadaleta Caldarola, Carlo; Majorano, Gabriele; Mita, Giovanni; Palamà, Ilaria Elena; Patruno, Valeria; Perbellini, Ezio; Ramires, Francesca Anna & Vitucci, Santa. 2022. The Controlled Semi-Solid Fermentation of Seaweeds as a Strategy for Their Stabilization and New Food Applications. *Foods*. Vol 11, s. 28111.
- 14 Canto-Robertos, Manuel; Moreno-Andrade, Ivan; Ponce-Caballero, Carmen; Quintal-Franco, Carlos & Vega-De Lille, Marisela. 2022. Fungal solid-state fermentation of food waste for biohydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 47, s. 30062.
- 15 Sagar, Aryal. 2022. Solid State Fermentation (SSF). *Verkkoaineisto. Microbe Notes*. <<https://microbenotes.com/solid-state-fermentation-ssf/>>. Luettu 4.1.2024.
- 16 Mienda, Bashir & Idi, Ahmad. 2011. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications. An overview. *Research in Biotechnology*. Vol 2, s. 21-26.
- 17 Anbu, Periasamy; Azariah, Hilda & Gopinath, Subash. 2004. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*. Vol 46, s. 119–126.
- 18 Walker, Graeme & White, Nia. 2018. *Introduction to Fungal Physiology Biology and Applications*. Third Edition. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- 19 Allikian, Katherine; Harrison, Mark; O'Hara, Ian; Self, Rachel; Speight, Robert; Strong, Peter James & Szewczyk, Edyta. 2022. Filamentous fungi for future functional food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol 76.
- 20 Katsuya, Gomi; Masayuki, Machida & Osamu, Yamada. 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *National Library of Medicine*. Vol. 15, s. 173-183.
- 21 K. Gomi. 2014. ASPERGILLUS: *Aspergillus oryzae*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. s. 92-96.

- 22 Chen, Feng; Hao, Sun; Lee, Bolim; Ni, Hui; Wang, Yaqi; Zhang, Liang-zhen & Zheng, Fuping. 2017. Food Science and Biotechnology. Vol 26, s. 611-622.
- 23 Doelle, Horst; Greenfield, Paul & Mitchell, David. 1988. Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 28, s. 598-602.
- 24 What Koji needs to grow and how to provide for its needs. 2017. Verkkoaineisto. Fermentation culture. <<https://www.fermentationculture.eu/what-koji-needs/>>. Luettu 5.1.2024.
- 25 Robinson, Peter K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem. Vol 59, s. 1–2.
- 26 Chang, P.-K.; Gomi, K. & Horn, B.W. 2014. ASPERGILLUS. Introduction. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). s. 77–82.
- 27 Garrad-Cole, Holly. 2020. Koji: The funky mold driving delicious. Verkkoaineisto. Fine Dining Lovers. <<https://www.finedininglovers.com/article/koji-funky-mold-driving-delicious>>. Luettu 11.1.2024.
- 28 Fanani, Marizal; Kisworini, Afrilia; Millati, Ria; Niklasson, Claes; Taherzadeh, Mohammad; Wainaina, Steven & Wikandari, Rachma. 2020. Utilization of food waste-derived volatile fatty acids for production of edible *Rhizopus oligosporus* fungal biomass. Bioresource Technology. Vol 310.
- 29 Ghosh, Barnita & Ray, Rinarani. 2011. Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A review. Journal of Applied Sciences. Vol 11.
- 30 Mitchell, D.A.; Doelle, H.W. & Greenfield, P.F. 1988. Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 1988. Vol. 28, s. 598–602.
- 31 Edebo, L.; Lennartsson, P.R. & taherzadeh, M.J. 2014. *Rhizopus*. Encyclopedia of Food Microbiology. Second Edition, s. 284-290.
- 32 Wösten, Han. 2019. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. Current Opinion in Biotechnology. Vol 59, s. 65-70.
- 33 Robinson, Peter K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem. Vol 59, s. 1–2.

- 34 Klucevsek, Kristin. 2024. Enzyme Activity. Definition & Functions. Verkkoaineisto. Study.com. <<https://study.com/academy/lesson/video/function-of-enzymes-environmental-effects.html>>. Luettu 19.3.2024.
- 35 Breslin, Paul & Peyrot des Gachons, Catherine. 2019. Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. Current diabetes reports. Vol 16, s. 102.
- 36 Akinfemiwa, Ololade; Muniraj, Thiruvengadam & Zubair, Muhammad. 2023. Amylase. Verkkoaineisto. StatPearls Publishing. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557738/>>. Luettu 25.1.2024.
- 37 Ahmadi, Yassin; Dilmaghani, Azita; Far, Babak & Khosroshani, Ahmad. 2020. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. Advanced Pharmaceutical Bulletin. Vol 10, s. 350-358.
- 38 Balouiri, Mounyr; Ibnsouda, Saad & Sadik, Moulay. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. Vol 6, s. 71-79.
- 39 Kossack, Carl; Stark, Egon; Tetrault, Philip & Wellerson, Ralph. 1953. Bacterial Alpha Amylase Paper Disc Tests on Starch Agar. Applied Microbiology. Volume 1, s. 236-243.
- 40 Ojeda, C.; Pavón, M. & rojas, F. 2019. Spectrophotometry. Biochemical Applications. Encyclopedia of Analytical Science. Third Edition, s. 205-213.
- 41 Niiranen, Jukka. 2021. Spektrometria perusteet ja UV-Vis. 2. Luentomoniste. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 42 Abdel-Raheem, A. & Shearer, C.A. 2002. Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. Fungal Diversity. Vol 11, s. 4.
- 43 Cardoso, Vernoica; Cedrola, Sabrina; Godoy, Mateus; Junior, Athaya; Mansoldo, Passos; Mansur, Maria & Vermelho, Alane. 2020. A microplate assay for extracellular hydrolase detection. Journal of Microbiological Methods. Vol 175, s. 4.
- 44 Deb, Promita; Mohsina, Kaniz; Sarker, Palash; Sayem, Abu & Talukdar, Saimon. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. Springerplus. Vol. 2, s 154.

- 45 Mega-Calc Data Calculator. Verkkoaineisto. Megazyme Sucrose/D-Glucose Assay Kit. <<https://www.megazyme.com/sucrose-d-glucose-assay-kit>>. Luettu 4.4.2024.
- 46 Chisti, Yusuf; Chuichulcherm, Sinsupha; Chutmanop, Jarun & Srinophakun, Penjit. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation using agroindustrial substrates. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. Vol 83, s. 1012–1018.
- 47 Aminin, A.; Rejeki, D. & Suzery, M. 2018. Preliminary Study of *Hyptis pectinata* (L.) Poit Extract Biotransformation by *Aspergillus niger*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Vol 349.
- 48 Gowthaman, M.K.; Krishna, Chundakkadu & Moo-Young, M. 2001. Fungal solid state fermentation – and overview. Applied Mycology and Biotechnology. Vol. 1, s. 305-352.
- 49 Gomes, J.; Gururaja; R.; Kumar, D.; Lakshmi, S.; Suryanarayan, S. & Valera, H.R. 2005. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. Enzyme and Microbial Technology. Vol 37, s. 521-526.
- 50 Bali, Vrinda; Mangla, Jyoti; Sharma, Lovleen; Singh, Sanamdeep & Singh, Shalini. 2014. Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. BioMed research international. Vol. 2014.
- 51 Abdullah, Roheena; Iqtedar, Mehwish; Naz, Samia & Shaheen, Naeema. 2014. Optimization of Cultural Conditions For The Production of Alpha Amylase By *Aspergillus Niger* (Btm-26) In Solid State Fermentation. Pakistan Journal Of Botany. Vol. 46.
- 52 Ramesha, A.; Savitha, J.; Srinivas, C. & Sunitha V.H. 2012. Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. Isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. Brazilian Journal of Microbiology. Vol 43, s. 1213-1221.
- 53 Bashir, Tihamiyu & Mustapha, Abdulsalam. 2022. Optimizing α -amylase Production from locally Isolated *Aspergillus* species Using Selected Agro Waste as Substrate. Bioscience Biotechnology Research Communications. Vol 15, s. 424-430.
- 54 Gangadharan, Dhanya; Nampoothiri, Madhavan; Sivaramakrishnan, Swetha & Soccol, Carlos. 2007. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. Journal of Scientific & Industrial Research. Vol 66, s. 621-626.

- 55 Abdullah, B.; Faradhiba, F.; Listyaningrum, E. & Maftukhah, S. 2018. Effect of some variable in cellulase production by *Aspergillus niger* ITBCC L74 using solid state fermentation. *Materials Science and Engineering*. Vol 316, s. 1-8.
- 56 Castillo, Francisco; De la Cruz-Quiroz, Reynaldo; Hernandez-Castillo, Daniel; Itzel López-López, Lluvia; Noé Aguilar, Cristóbal; Rodriguez-Herrera, Raúl & Roussos, Sevastianos. 2016. Solid-State Fermentation in a Bag Bioreactor: Effect of Corn Cob Mixed with Phytopathogen Biomass on Spore and Cellulase Production by *Trichoderma asperellum*. E-kirja. IntechOpen.

