



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# **MENETEMÄN KEHITYS TEOLLISEN ALFA-AMYLAASIEN TUOTANTOKANNAN TOTEAMISEKSI**

Sanna Peltola

Opinnäytetyö  
Kesäkuu 2016  
Laboratorioalan koulutusohjelma



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma

PELTOLA, SANNA:

Menetelmän kehitys teollisen alfa-amylaasientsyymin tuotantokannan toteamiseksi

Opinnäytetyö 41 sivua, joista liitteitä 6 sivua  
Kesäkuu 2016

---

Maltogeeninen alfa-amylaasi on teollisuudessa fermentoimalla valmistettava tärkkelystä hydrolysoiva entsyymi, jota käytetään leivontatuotteiden tuoreuden ylläpitämisessä. Euroopan Unionin asettaman lain mukaan uudet ja olemassa olevat elintarvike-entsyymit tulee rekisteröidä ennen kuin ne voidaan sisällyttää hyväksytyjen entsyymien luetteloon. Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto EFSA valvoo ja arvioi tätä rekisteröintiä, johon kuuluu muun muassa geenimuunnellun tuotantokannan turvallisuuden arviointi. Rekisteröinnin yhtenä osana tulee luotettavan menetelmän avulla osoittaa, että elintarvikekäyttöön tuleva entsyymituote ei sisällä sen omaa tuotantokantaa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää ja optimoida uudelle maltogeeniselle alfa-amylaasille sen tuotantokannan toteamismenetelmä, jota voidaan käyttää osana EFSA:lle tehtävää rekisteröintiä. Työn tarkoituksena oli määrittää tuotantokannan toteamismenetelmässä käytettävä optimaalinen entsyymipuolivalmistepitoisuus ja selvittää, voidaanko määritetystä puolivalmistepitoisuudesta havaita yksittäisiä tuotantokantasoluja. Kehitettyä menetelmää oli lopulta tarkoitus käyttää ensimmäiselle tehdasfermentoinnista saatavalle entsyymipuolivalmisteelle. Opinnäytetyö tehtiin teollisia entsyymejä valmistavalle Roal Oy:lle, missä työssä tutkittavaa maltogeenistä alfa-amylaasia valmistetaan.

Kaikissa menetelmäkehitysvaiheissa tuotantokantaa kasvatettiin ravintoliuoksessa lämpöravistelijassa, minkä jälkeen kasvu varmistettiin mikroskopoinnilla sekä maltogeenisen alfa-amylaasin tuotantokannan havaitsemiseen soveltuvilla kasvatusmaljoilla. Tuotantokantasolut kasvoivat kaikissa entsyymipuolivalmistepitoisuuksissa 0,1–5,0 % välillä, kun siirrostettujen solujen määrä oli 166000 pesäkkeen muodostavaa yksikköä. Tuotantokanta kasvoi myös 1 % puolivalmistepitoisuudessa, jossa pienin siirrostettu solumäärä oli alle 5 pesäkkeen muodostavaa yksikköä. Yksittäisiä tuotantokantasoluja pystyttiin havaitsemaan myös rinnakkaisella määrityksellä. Kehitetyn menetelmän avulla analysoidusta tehdasmittakaavan puolivalmisteesta ei havaittu tuotantokantasoluja.

Tämän opinnäytetyön avulla saatujen tulosten perusteella voidaan jatkossa kehittää luotettava menetelmä maltogeenisen alfa-amylaasin tuotantokannan toteamiseen, mikä voidaan esittää osana EFSA:n valvomassa rekisteröinnissä. Menetelmän herkkyyttä sekä taustamikrobien vaikutusta tulee sitä ennen vielä arvioida ja määrittää.

---

Asiasanat: maltogeeninen alfa-amylaasi, tuotantokanta, rekisteröinti

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Sciences

PELTOLA, SANNA:

Method Development for the Detection of the Production Strain in Industrially Produced Alpha-Amylase Enzyme

Bachelor's thesis 41 pages, appendices 6 pages

June 2016

---

Maltogenic alpha-amylase is an enzyme which can be industrially produced by fermentation. In the food industry it is used in bakery products as an anti-staling agent having the ability to hydrolyze starch. According to the law of the European Union, new and existing food enzymes must be registered before they can be included in the list of approved enzymes. The European Food Safety Authority EFSA is monitoring and evaluating this registration where risk assessment of genetically modified production strain is included. As part of the registration, it must be proved with a reliable method that the enzyme product does not contain its own production strain.

The aim of this study was to develop and optimize a reliable method for the detection of production strain in maltogenic alpha-amylase semifinal product that can be used as a part of the registration. The purpose was to determine the sample concentration of the semifinal product used in the detection method. In the second assay the purpose was to examine if single cells can be detected from the specified semifinal concentration. Finally, the objective was also to use the aforementioned method to analyze a sample of semifinal product produced in large scale fermentation. This thesis was done for the enzyme company Roal Ltd, where maltogenic alpha-amylase is produced.

The study was carried out by using the shake flask method to grow production strain cells in nutrient broth. The growth was confirmed by microscopy and by using selective agar plates. Production strain cells grew in all semifinal concentrations between 0,5–5,0 %, when the amount of cells was 166000 colony forming units. Single cells could also be detected from the 1 % semifinal concentration when the determination was carried out twice. The analyzed semifinal product produced in large scale fermentation proved to have no production strain cells.

The results obtained in this thesis can be used to develop a reliable method for the detection of production strain in maltogenic alpha-amylase enzyme. Before the EFSA registration the sensitivity of the method must be determined and the effect of background microbes need to be assessed.

---

Key words: maltogenic alpha-amylase, production strain, registration

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA.....	7
2.1	Teollisten entsyymien käyttökohteet .....	7
2.2	Tuotantokantojen valmistus .....	8
2.3	Teollisten entsyymien valmistusprosessi .....	9
2.3.1	Tuotantokannan esikasvatus.....	10
2.3.2	Fermentointi .....	11
2.3.3	Jälkikäsittely ja formulointi.....	12
2.4	Maltogeeninen alfa-amylaasientsyymi .....	13
2.5	<i>Bacillus subtilis</i> isäntäorganismina.....	14
2.6	Elintarvike-entsyymien rekisteröinti.....	14
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	16
3.1	RH11662 tuotantokanta ja sen kasvatus määrittäjä varten.....	16
3.2	RAI-entsyymipuolivalmistenäytteet .....	17
3.3	Ravistelupullojen, kontrollinäytteiden ja detektiomaljojen valmistus.....	17
3.4	RAI-entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittäjä.....	19
3.5	Tuotantokannan toteamisrajan määrittäjä 1 % RAI-entsyymipuolivalmistepitoisuudessa.....	20
3.6	Tuotantokannan toteamismenetelmä tehdasmittakaavan RAI-näytteelle	23
4	TULOKSET .....	25
4.1	RAI-entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittäjä.....	25
4.2	Tuotantokannan toteamisrajan määrittäjä 1 % RAI-entsyymipuolivalmistepitoisuudessa.....	27
4.3	Tuotantokannan toteamismenetelmä tehdasmittakaavan RAI-näytteelle	30
5	POHDINTA.....	31
	LÄHTEET.....	33
	LIITTEET .....	36
	Liite 1. Ravintoliuospullot RH11662 tuotantokannoille .....	36
	Liite 2. RH11662 tuotantokantasolujen pmy-määrittäjä PCA-maljauksella	37
	Liite 3. Difco™ Antibiotic Medium 3-ravintoliuos 224320 .....	38
	Liite 4. Cibacron Blue-perunatärkkelyksen ja Cibacron Blue Potato Starch detektiomaljojen valmistus .....	39

**ERITYISSANASTO**

Fermentointi	Bioprosessi, jossa mikro-organismia kasvatetaan entsyymien tuoton kannalta ideaalisissa olosuhteissa (tässä työssä)
Geenimuunneltu organismi	Mikro-organismi, jota on käsitelty suunnitellulla geenimuuntelulla. GMO, <i>Genetically Modified Organism</i>
Isäntäorganismi	Organismi, johon on geeniteknisin menetelmin siirretty geeni tai geenejä toisesta organismista
Klassisesti muunneltu organismi	Mikro-organismi, jota on käsitelty sattumanvaraisella geenimuuntelulla. CMO, <i>Classically Modified Organism</i>
Lyofilisaatti	Kylmäkuivattu solupelletti
Tuotantokanta	Klassisesti tai geneettisesti muunneltu mikro-organismi, jonka avulla entsyymiä tuotetaan
Ympärys	Bakteerikasvuston siirrostus

## 1 JOHDANTO

Entsyymit ovat solujen tuottamia proteiineja, jotka toimivat biologisina katalyytteinä nopeuttaen kemiallisia reaktioita. Teollisuudessa entsyymejä tuotetaan hallitussa ympäristössä fermentoimalla klassisia tai geenimuunneltuja mikro-organismeja eli tuotantokantoja. Teollisia entsyymejä hyödynnetään monissa eri valmistusprosesseissa, kuten esimerkiksi elintarviketeollisuudessa, missä tärkeystä hydrolysoivaa maltogeenistä alfa-amylaasia käytetään leivontatuotteiden tuoreuden ylläpitämisessä ja kuohkeuden lisääjänä.

Euroopan Unioni (EU) on vuonna 2008 asettanut lain, jonka mukaan uudet ja olemassa olevat elintarvike-entsyymit tulee rekisteröidä, ennen kuin ne voidaan sisällyttää hyväksytyjen entsyymien luetteloon. Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto (EFSA) valvoo ja arvioi tätä rekisteröintiä, johon kuuluu muun muassa entsyymien tuotantokannan turvallisuuden arviointi. Rekisteröinnin yhtenä osana tulee luotettavan menetelmän avulla osoittaa, että elintarvikekäyttöön tuleva entsyymituote ei sisällä sen omaa tuotantokantaa.

Työn tavoitteena on kehittää ja optimoida uudelle maltogeeniselle alfa-amylaasi entsyymipuolivalmisteelle (RAI) sen tuotantokannan toteamismenetelmä, jonka tuloksia käytetään osana EFSA:n rekisteröintiä. Työn tarkoituksena on määrittää tuotantokannan toteamismenetelmässä käytettävä optimaalinen puolivalmistepitoisuus ja selvittää, voidaananko määritetystä entsyymipuolivalmistepitoisuudesta havaita yksittäisiä tuotantokantatasoluja. Kehitettyä menetelmää on lopulta tarkoitus käyttää ensimmäiselle tehdasfermentoinnista saatavalle RAI-entsyymipuolivalmisteelle.









Tämä opinnäytetyö tehtiin teollisia entsyymejä valmistavalle Roal Oy:lle, jossa uusia entsyymituotantokantoja kehitetään jatkuvasti. Opinnäytetyön ohjaajana toimi projektikoordinaattori biotekniikan maisteri Sauli Toikka.

## 2 TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Teollisten entsyymien käyttökohteet

Entsyymit ovat solujen tuottamia proteiineja, jotka toimivat biologisina katalyytteinä nopeuttaen kemiallisia reaktioita ja estäen väärin tuotteiden syntymistä. Entsyymejä valmistetaan teollisesti hallitussa tehdasympäristössä ja niitä käytetään monilla teollisuuden aloilla, missä niiden etuina ovat tuotteiden myrkyttömyys, biohajoavuus ja tuotannossa saavutettava energian säästö. (Von Weymarn 2013.)

Teollisilla entsyymeillä on monia käyttökohteita (kuvio 1). Rehukäytössä entsyymeillä saadaan parannettua ravinnon sulavuutta ja siten kustannusten ja jätteiden määrää pienennettyä. Elintarviketeollisuudessa entsyymeillä pidennetään tuotteiden säilyvyyttä, parannetaan niiden koostumusta ja vahvistetaan värejä. Teknisiä entsyymejä käytetään tekstiiliteollisuudessa muun muassa farkkujen kivipesun korvaajana. Pesuaineteollisuudessa ne poistavat tahroja, mahdollistavat alhaisissa lämpötiloissa pesemisen ja auttavat säilyttämään vaatteiden kirkkauden. Metsäteollisuudessa entsyymeillä parannetaan paperin ominaisuuksia ja tehostetaan valkaisua. (Vehmaanperä 2013.) Entsyymien arvon markkinoilla määrää sen aktiivisuus, joka kertoo katalysoitujen reaktioiden määrän aikayksikössä (Suominen 2002, 53).

Rehu		Elintarvike			Tekniset			
		Leivonta	Juoma-teollisuus	Erityis-entsyymit	Tekstiilit	Pesuaine	Metsäteollisuus	Biomassa
								
Fyttaasi Ksylanaasi Beeta-glukanaasi	Ksylanaasi Amylaasi	Pektinaasi	Proteaaasi Fosfolipaasi	Sellulaasi Amylaasi Katalaasi	Proteaaasi Sellulaasi	Sellulaasi Ksylanaasi	Sellulaasi Ksylanaasi Beeta-glukosidaasi	
<b>Edut / käyttökohte:</b>								
<ul style="list-style-type: none"> <li>Fosforin vapauttaminen fytinistä</li> <li>Rehukustannusten alentaminen ja jätetuorman vähentäminen</li> <li>Rehun sulavuuden parantaminen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leivän tuoreuden säilyttäminen</li> <li>Leivän tilavuuden lisääminen</li> <li>Taikinan sitkon parantaminen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mehun sameuden poisto</li> <li>Mehusaannon parantaminen hedelmälihasta</li> <li>Voimakkaampi punaviinin väri</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lastenruokien sulavuuden parantaminen</li> <li>Ruokaöljyn jatkojalostus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Farkkupesun korvaaja</li> <li>-kankaan tunnun muokkaus</li> <li>Bioviimeistely: -nyppymisen ja nukkaantumisen esto</li> <li>-kankaan tunnun muokkaus</li> <li>-värien kirkkauden säilyttäminen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pesu alhaisessa lämpötilassa</li> <li>Tahranpoisto</li> <li>Nyppymisen estäminen</li> <li>Puuvilla-vaatteiden värien kirkkauden säilyttäminen</li> <li>Koneastianpesu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Paperin lujuusominaisuuksien parantaminen ja raaka-ainekäytön optimointi</li> <li>Energiasäästöt</li> <li>Valkaisun tehostaminen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lignoselluloosiläytteen biomassan hydrolyysi käymiskelpoiseksi sokereiksi</li> <li>Biokaasusovellukset</li> </ul>	

KUVIO 1. Teollisuudessa valmistettävien entsyymien käyttökohteita (Vehmaanperä 2013, muokattu)

## 2.2 Tuotantokantojen valmistus

Teollisuudessa entsyymejä valmistetaan erilaisten mikro-organismien eli tuotantokantojen avulla. Yleisimmin käytettyjä organismeja ovat *Trichoderma*- ja *Aspergillus*-suvun homeet sekä *Bacillus*-suvun bakteerit. Tuotanto-organismeja muokataan usein geeniteknikan avulla, jotta niiden entsyymien tuotto saadaan mahdollisimman suureksi. Muokkaamalla voidaan parantaa ja muuttaa myös muita entsyymien ominaisuuksia, kuten stabiiliisuutta, toiminta-aluetta tai katalyyttistä nopeutta. Tuotanto-organismien geneettinen muuntelu voi olla joko sattumanvaraista tai suunniteltua. (Aittomäki ym. 2002, 13–14.)

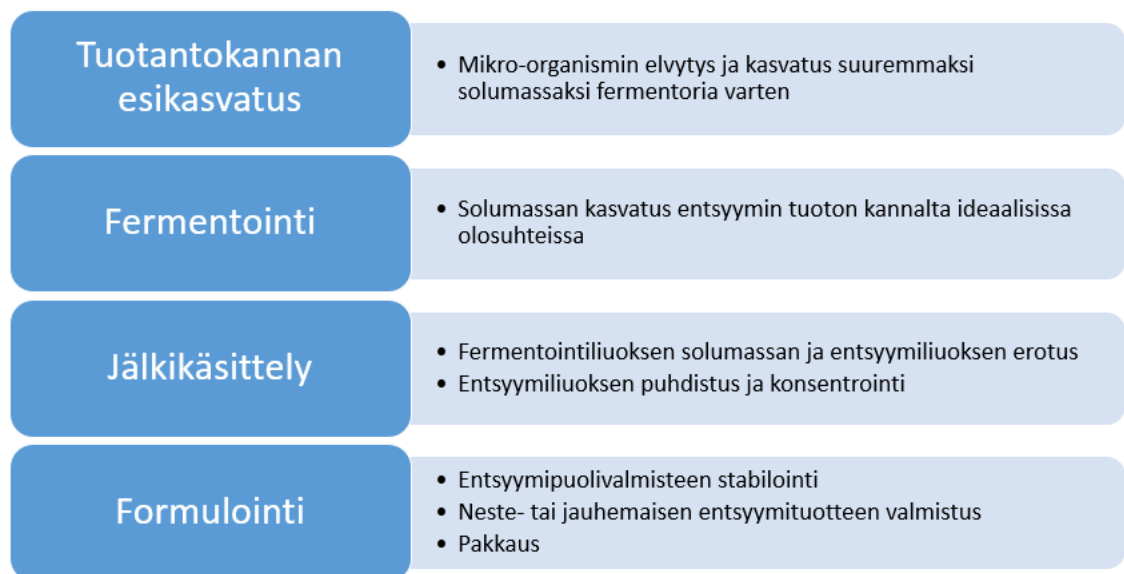
Sattumanvaraisesti muunneltuja organismeja kutsutaan klassisesti muunnelluiksi organismeiksi (CMO, *Classically Modified Organisms*). Klassisessa geneettisessä muuntelussa tuotanto-organismien geeneihin aiheutetaan sattumanvaraisia mutaatioita esimerkiksi säteilyn tai kemikaalien avulla. Tällöin organismi saadaan tuottamaan erilaisia entsyymien muunnelmia, joista voidaan valita tarkoitukseen parhaimmat. (Novozymes A/S 2013, 66.) Klassisten kantojen käyttö sellaisenaan entsyymituotannossa rajoittuu vain kannan luonnollisesti tuottamiin entsyymeihin. Klassisesti muunneltu tuotantokanta voi myös fermentoinnin aikana muodostaa lopputuotteelle haitallisia tai häiritseviä sivutuotteita, kuten happoja, toksiineja tai sivuaktiivisuuksia. Lisäksi tuotetun entsyymien aktiivisuus voi olla rajallinen. (Paloheimo, Piironen & Vehmaanperä 2011, 34.)

Klassisten tuotantokantojen rajoittavia ominaisuuksia kontrolloidaan suunnitellun geenimuuntelun avulla, jolloin tuotanto-organismiin voidaan esimerkiksi liittää useita haluttua entsyymiä koodaavia geenikopiota tai asettaa määrätty geeni vahvaan promoottorialueeseen. Toisaalta haitallisia yhdisteitä tai sivuaktiivisuuksia koodaavia genejä voidaan inaktivoida tai poistaa tuotantokannan genomista. Suunnitellun geenimuuntelun avulla valmistettua tuotantokantaa kutsutaan geneettisesti muunnelluksi organismiksi (GMO, *Genetically Modified Organism*). (Paloheimo, Piironen & Vehmaanperä 2011, 34.) Tuotantokannan valmistuksessa on myös hyvin yleistä siirtää haluttua entsyymiä tuottava geeni toisesta mikrobista eli luovuttajaorganismista isäntäorganismiin, jonka entsyymituotto on tehokasta. Suunnitellussa geenimuuntelussa käytettyjä menetelmiä kutsutaan yhdistelmä-DNA (rDNA, *recombinant DNA*)-tekniikoiksi. (Novozymes A/S 2013, 66.)



### 2.3 Teollisten entsyymien valmistusprosessi

Teollisen entsyymien valmistuksen tuotantoprosessi koostuu yksinkertaisimmillaan tuotantokannan esikasvatuksesta, fermentoinnista sekä sen jälkeisestä loppukäsittelystä (kuvio 2). Esikasvatuksessa tuotantokanta elvytetään ja kasvatetaan suuremmaksi solumassaksi fermentointia varten, missä solumassaa edelleen kasvatetaan entsyymien tuotannon kannalta ideaalisissa olosuhteissa (Aaltonen 2014, 2). Fermentointiliuoksen jälkikäsittely koostuu solumassan ja entsyymiliuoksen erotuksesta sekä tuoteliuoksen puhdistuksesta ja konsentroinnista. Jälkikäsittelystä saatavaa entsyymipuolivalmistetta formuloidaan tarvittavien stabilointi- ja säilöntäaineiden avulla, minkä jälkeen voidaan valmistaa käyttötarkoituksesta riippuen sopiva neste- tai jauhemainen entsyymituote. (Von Weymarn 2002, 183.)



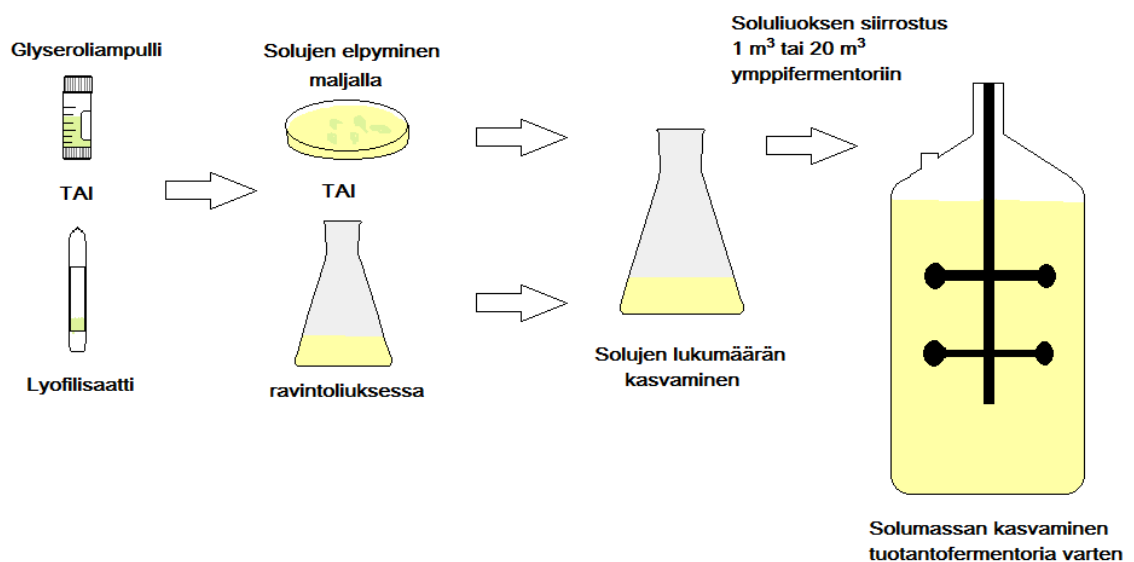
KUVIO 2. Teollisen entsyymivalmistuksen tuotantoprosessi

Entsyymien valmistusta tarkkaillaan koko tuotantoprosessin ajan sekä kemiallisesti että mikrobiologisesti. Kemiallisessa laadunvalvontaprosessissa seurataan fermentoinnin aikana muun muassa pelkistävien sokereiden pitoisuutta sekä proteiinien ja entsyymiaktiivisuuden määrää. Mikrobiologisen laadunvalvonnan tehtävänä on tarkkailla tuotantoprosessin, entsyymipuolivalmisteen ja lopputuotteiden aseptista puhtautta. Ennen fermentoinnin aloittamista tulee kaikkien kasvatusliuosten, raaka-aineiden sekä fermentoinnissa käytettävien laitteiden olla steriilejä, jotta voidaan kasvattaa vain yhtä mikro-organismia. (Von Weymarn 2002, 183; Aaltonen 2014, 8.)

### 2.3.1 Tuotantokannan esikasvatus

Esikasvatuksen tarkoituksena on saada tuotantokannan solut elpymään ja jakautumaan, jotta syntynyt biomassa voidaan siirtää tehdasmittakaavan fermentoriin edelleen kasvaamaan ja lopulta tuottamaan entsyymiä. Teolliseen entsyymivalmistukseen hyväksytyt tuotantokannat säilötään yleensä joko kylmäkuivattuina solupelletteinä eli lyofilisaatteina tai pakastettuina glyseroliampulleina, jotta ne pysyisivät mahdollisimman muuttumattomina säilytyksen ajan esikasvatukseen asti. (Von Weymarn 2002, 145.)

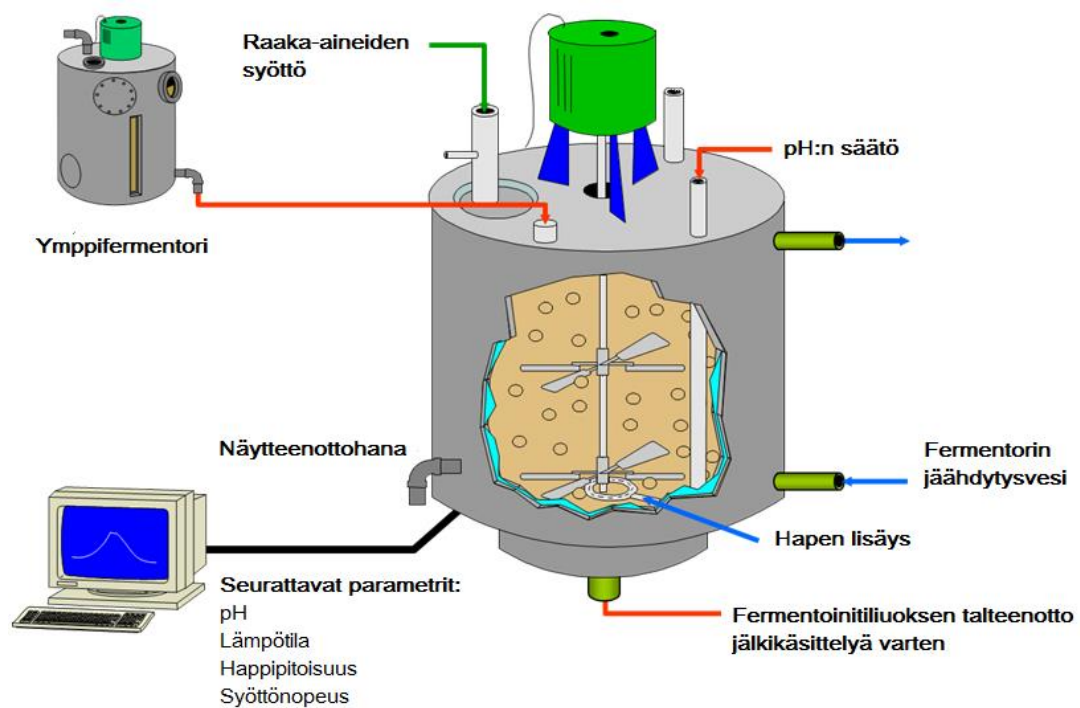
Esikasvatus (kuvio 3) aloitetaan sulattamalla glyseroliampulli tai valmistamalla lyofilisaatista solususpensio, josta tuotantokantasoluja siirrostetaan ensin soveltuvalla maljalla elpymään. Inkuboinnin jälkeen maljalla olevia tuotantokantapesäkkeitä siirrostetaan edelleen kannalle soveltuvaan ravintoliuokseen, jossa solujen lukumäärä saadaan kasvaamaan lämmössä ravistelukasvatuksen avulla. Siirrostus voidaan tehdä myös ampullista tai lyofilisaattisuspensiosta suoraan ravintoliuokseen, jossa solut ensin elpyvät ja alkavat sitten kasvaa. Ravistelukasvatus voi olla yksivaiheinen tai sitä voidaan jatkaa siirrostamalla solukasvustoa uuteen ravintoliuokseen jakautumaan edelleen. Solujen siirrostus suurempaan esikasvatustilavuuteen pyritään tekemään silloin, kun solut ovat eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. (Von Weymarn 2002, 145–147.) Ravistelukasvatuksen jälkeen esikasvatus siirretään eli ympätään laboratoriosta tehdastiloissa olevaan ympäfermentoriiin, joka on tilavuudeltaan joko  $1 \text{ m}^3$  tai  $20 \text{ m}^3$  kasvatussäiliö.



KUVIO 3. Tuotantokannan esikasvatuksen vaiheet

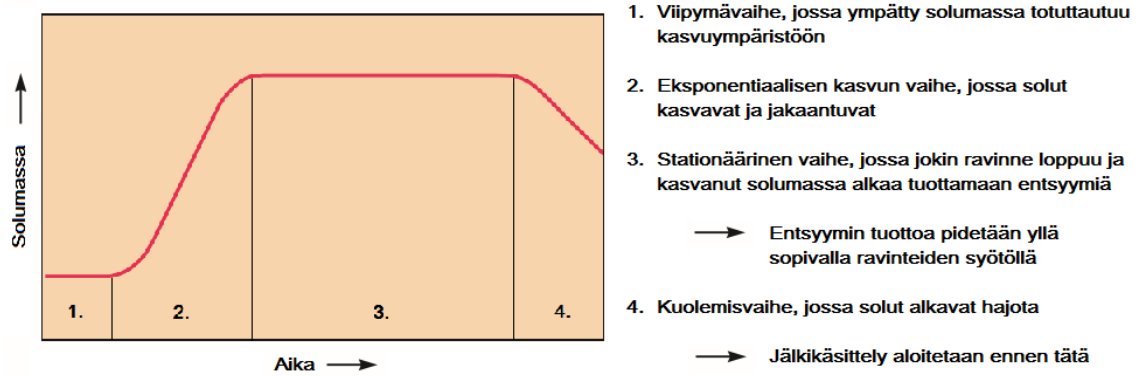
### 2.3.2 Fermentointi

Entsyymituotantokannan kasvatusta siirretään ympäri-fermentorista varsinaiseen tuotantofermentorin, joka on tyypillisesti tilavuudeltaan 100–150 m<sup>3</sup> (kuvio 4). Kasvatukseen käytettäviä yleisimpiä raaka-aineita ovat tärkkelys, glukoosi, mallasuute, hiivauute ja maissinliotusvedestä valmistettava jauhe, mistä solut saavat kasvuunsa tarvittavat hiili- ja typpilähteet sekä erilaiset mineraalit. Ravinteiden määrää ja kasvatuksen pH:ta seurataan ja säädellään koko fermentoinnin ajan. Tärkeää on myös oikean lämpötilan ja happipitoisuuden ylläpitäminen. (Aaltonen 2014.)



KUVIO 4. Yleiskuvaus ympäri- ja tuotantofermentorista (Aaltonen 2014, muokattu)

Entsyymien fermentointi tehdään usein panossyöttöprosessina, jonka kasvatuksen vaiheet on esitetty kuviossa 5. Tuotantokantaa fermentoidaan, kunnes solut ovat eksponentiaalisesta kasvuvaiheesta loppussa tai niiden hiililähde on loppumassa. Stationäärisen vaiheen aikana alkaa entsyymien tuotanto, jota ylläpidetään syöttämällä kasvatukseen raaka-aineita joko pulssina tai jatkuvana syöttönä. Entsyymien tuottoa jatketaan, kunnes kasvatukseen raaka-aineet ovat loppuneet, tavoiteltu entsyymiaktiivisuus on saavutettu tai kun biomassaa ei tuota enää entsyymiä. (Von Weymarn 2002, 125–130.)



KUVIO 5. Panossyöttöprosessin kasvatuksen vaiheet (Harley, Klein & Prescott 2002, 113; Von Weymarn 2002, 130, muokattu)

### 2.3.3 Jälkikäsittely ja formulointi

Entsyymintuoton jälkeen fermentointiliuos jäädytetään ja siirretään välisäilöön eli harvesteriin. Harvesterissa liuoksen pH:ta säädetään ja siihen lisätään säilöntäaineita, kuten antimikrobista natriumbentsoaattia. Ennen jälkikäsittelyä fermentointiliuokseen lisätään myös suodatuksen apuaineita ja flokkulantteja. (Whitehurst & van Oort 2009, 55.) Kiinteä aine eli solumassa poistetaan fermentointiliuoksesta yleensä painesuodatuksen avulla. Suodatinmateriaalin päälle muodostuu solumassasta sekä suodatuksen apuaineista kiinteä kakku, joka pysyy huokoisena ja nestettä läpäisevänä apuaineiden avulla. Kun fermentointiliuoksen kiintoainekoostumus on pienentynyt, jatketaan painesuodatusta esimerkiksi levysuodattimessa, joka kirkastaa liuosta ja poistaa pienempiä epäpuhtauksia, kuten haitallisia mikrobeja. (Von Weymarn 2002, 185–187.)

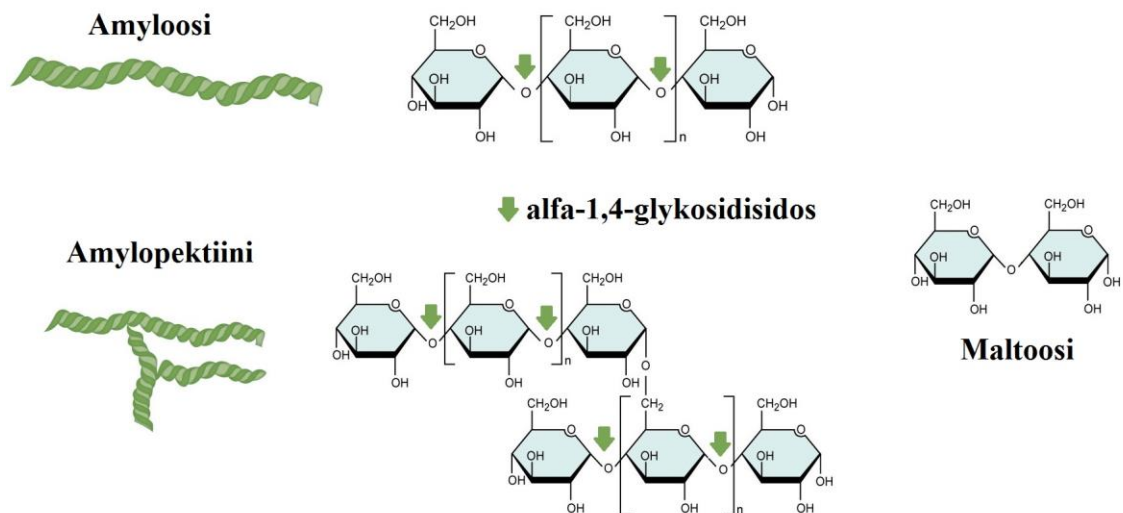
Entsyymiliuoksen konsentroituminen ja puhdistus tehdään usein ultrasuodatuksen avulla. Suodatuskalvojen huokoskoko on 1–20 nanometrin välillä, minkä vuoksi ne soveltuvat pienimolekyylisten yhdisteiden poistoon. Ultrasuodatuksessa välisäiliössä olevaa tuoteliiuosta pumpataan suodattimelle, josta sen läpäissyt ylimääräinen neste hylätään ja jäljelle jäänyt entsyymiliuos kierrätetään takaisin välisäiliöön. Tuoteliiuos konsentroituu, jos välisäiliöön ei lisätä nestettä poistetun tilalle. (Von Weymarn 2002, 187–188.) Jälkikäsittelyn läpikäynyttä tuoteliiuosta kutsutaan entsyymipuolivalmisteeksi.

Formuloinnissa puolivalmisteeseen lisätään stabilointi- ja säilöntäaineita, kuten suoloja tai sokerialkoholia. Tuotekonsentraatti spray-kuivataan jauhemaiseksi valmisteeksi tai jätetään nestemäiseksi. Tämän jälkeen valmisteeseen lisätään erilaisia raaka-aineita ja sen

pH:ta säädellään käyttötarkoituksesta riippuen. Valmistetut entsyymituotteet siivilöidään tai suodatetaan ennen pakkausta. (Von Weymarn 2002, 201–203.)

## 2.4 Maltogeeninen alfa-amylaasientsyymi

Maltogeeninen alfa-amylaasi (glukaani 1,4-alfa-maltohydrolaasi) on muun muassa *Bacillus stearothermophilus*-bakteerin tuottama hydrolaasientsyymi. Se katalysoi tärkkelysjuvässä olevien haarautumattoman amyloosipolymeerin ja haarautuneen amylopektiinipolymeerin sekä siihen liittyvien glukoosipolymeerien alfa-1,4-glykosididosten hydrolyysiä maltoosiksi (kuvio 6). Maltogeeninen alfa-amylaasi katkaisee maltoosiyksiköitä, kunnes amyloosipolymeeri on hajonnut tai kun amylopektiinipolymeerissä saavutetaan haarautunut kohta. (The Universal Protein Resource 2016.) Maltogeenista alfa-amylaasia kutsutaan eksogeeniseksi entsyymiksi, koska se toimii katkaisemalla maltoosiyksiköitä polymeeriketjun ei-pelkistävästä päästä (Sinnott 2007, 343).



KUVIO 6. Tärkkelyksen amyloosin ja amylopektiinin rakenne ja maltogeenisen alfa-amylaasin alfa-1,4-glykosididosten hydrolyysi maltoosiksi (The Pennsylvania State University 2016, muokattu)

Entsyymiteollisuudessa valmistettavaa maltogeenista alfa-amylaasia käytetään leivontatuotteiden tuoreuden ylläpitämisessä ja kuohkeuden lisääjänä. Tärkkelyksen hydrolyysissä muodostuneilla maltoosiyksiköillä on korkea vedenpidätyskyky, minkä avulla leivontatuote saadaan pysymään pehmeänä. Maltoosiyksiköiden muodostumisella estetään lisäksi jäähtymisen ja säilytyksen aikana tapahtuvat muutokset amyloosin ja amylopektiinin rakenteessa, mitkä aiheuttavat leivontatuotteiden kovettumista.

Korkeassa lämpötilassa leivonnin aikana vesi saa tärkkelyksen kiderakenteet rikkoutumaan, mikä näkyy liisteröitymisinä. Leivontatuotteen jäähtyessä ja säilönnän aikana liisteröitymisen seurauksena syntyneet amyloosin ja amylopektiinin rakenteet järjestäytyvät kokonaan uudelleen ja aiheuttavat tuotteen kovettumisen. Maltogeenien alfa-amylaasi pilkkoo tärkkelystä maltoosiksi jo liisteröitymisen aikana, mikä estää rakenteiden uudelleenjärjestäytymisen ennen kuin tuote jäähtyy. (Olesen 1991.)

## 2.5 *Bacillus subtilis* isäntäorganismina

*Bacillus subtilis* on aerobinen, itiöitä muodostava ja gram-positiivinen sauvabakteeri, jota esiintyy kaikkialla luonnossa. *Bacillus subtilis* on malliorganismi gram-positiivisten bakteerien tutkimuksessa ja sen genetiikkaa sekä fysiologiaa on tutkittu jo yli neljäkymmenen vuoden ajan. Sen geneettinen muokkaus on helppoa ja sillä on kyky tuottaa proteiineja solun ulkopuolelle suurina konsentraatioina. (Kunst & Ogasawara 1997, 249–250.) Itiönmuodostuksen vuoksi *Bacillus subtilis* kestää korkeita lämpötiloja, suolapitoisuuksia sekä happamia olosuhteita (National Center for Biotechnology Information 1997). Näiden ominaisuuksien vuoksi se on yleinen isäntäorganismi muun muassa entsyymiteollisuudessa. *Bacillus subtilis* voidaan käyttää myös elintarviketeollisuudessa, sillä se ei ole patogeeninen. (Boer & Diderichsen 1991, 1).

## 2.6 Elintarvike-entsyymien rekisteröinti

Entsyymejä, joita on käytetty elintarvikkeissa muuten kuin lisäaineina, ei ole aiemmin arvioitu tai säädelty Euroopan unionin (EU) tasolla. Jokainen jäsenmaa on omassa lainsäädännössään arvioinut ja säätänyt näiden entsyymien käyttöä ja ne ovat yleensä lukeutuneet elintarvikkeiden valmistuksen apuaineiksi. Kansallisten sääntöeroavaisuuksien vuoksi vuonna 2008 hyväksyttiin EU:n lainsäädäntö elintarvike-entsyymeistä, jonka tarkoituksena on lopulta luoda virallinen luettelo hyväksytyistä elintarvike-entsyymeistä EU:ssa. (European Food Safety Authority 2016.)

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (16.12.2008/1332) mukaan tulee kaikilta olemassa olevilta ja uusilta elintarvike-entsyymeiltä jättää lupahakemus Euroopan komis-

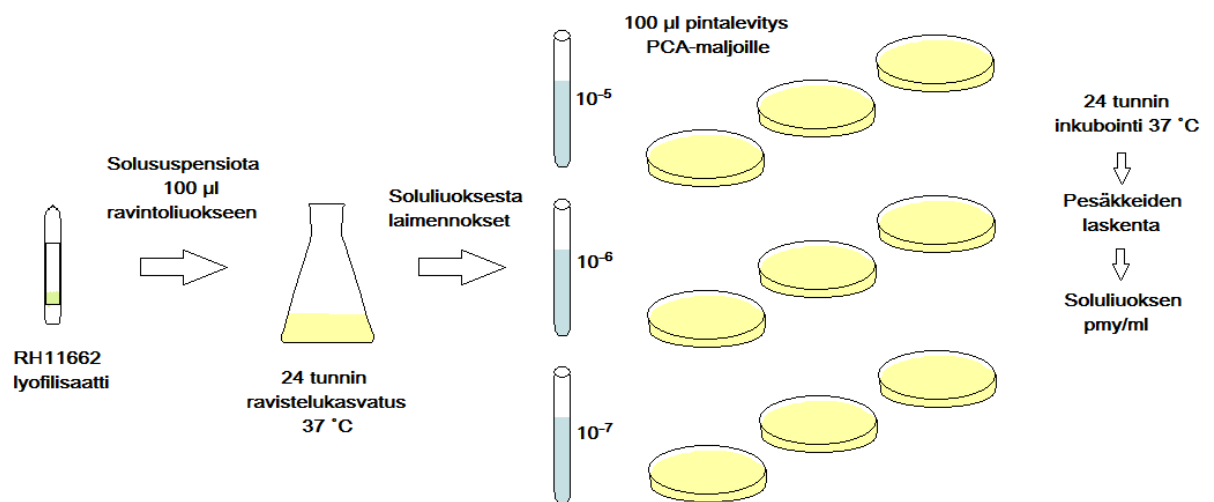
siolle, ennen kuin ne voidaan sisällyttää EU:n luetteloon. Euroopan elintarviketurvallisuusviraston (EFSA) tehtävä on opastaa hakemusmenettelyssä sekä tehdä lopullinen arviointi entsyymien turvallisuudesta Euroopan komission päätöstä varten. Luetteloon sisällyttämisen edellytyksenä on osoittaa tieteellisen näytön perusteella, että entsyymi ei vaaranna kuluttajien terveyttä. Entsyymille on tämän lisäksi oltava perusteltu teknologinen tarve, eikä sen käyttö saa johtaa kuluttajaa harhaan. (Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus 16.12.2008/1332.) Geenimuunnellun mikro-organismien avulla tuotetun elintarvike-entsyymien turvallisuutta arvioidaan hakemuksessa yksityiskohtaisesti isäntä- ja luovuttajaorganismien ominaisuuksien sekä tuotantokannan valmistuksen ja geneettisten muutosten kannalta. Hakemuksessa tulee esittää myös entsyymien valmistusprosessi sekä valmiin tuotteen ominaisuudet ja riskinarviointi. (EFSA 2011, 40–44.)

Entsyymien valmistusprosessia kuvatessa tulee hakemukseen esittää vaiheet, joilla elinkelpoiset jakautuvat tuotantokantasolut, itiöt ja yhdistelmä-DNA on poistettu tai inaktivoitu entsyymituotteesta. Tämä täytyy hakemuksessa myös osoittaa luotettavalla menetelmällä käyttäen kolmea toisistaan riippumatonta näyte-erää, jotka kukin analysoidaan kolmena rinnakkaisena. Menetelmässä vaadittava solujen elvytys- ja kasvatusvaihe tulee tehdä elatusaineessa, jonka ravintoaineet eivät anna solujen kasvulle erityistä etua tai haittaa. Vaihtoehtoisesti on käytettävä pidempää kasvatusaikaa kuin normaalien elinkelpoisten organismien kasvatuksessa. Analysoitavien näytteiden tulee olla vähintään koe-tehtaan tuotannosta, jolloin on ilmoitettava missä mittakaavassa valmistus on tehty. Analysoitaessa tulee ottaa huomioon myös näytteessä olevien muiden mikrobien vaikutus. (EFSA 2011, 19.)

### 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

#### 3.1 RH11662 tuotantokanta ja sen kasvatus määrityksiä varten

Maltogeenisen alfa-amylaasin tuotantokannan RH11662 isäntäorganismina on *Bacillus subtilis*-kanta, jota on muokattu klassisen geenimuuntelun avulla entsyymintuoton kasvattamiseksi. Isäntäkannan genomiin on lisäksi tehty suunnattuja mutaatioita sekä lisätty maltogeenista alfa-amylaasia koodaava geeni toisesta *Bacillus*-kannasta. Lyofilisaattina säilytystä RH11662 tuotantokannasta valmistettiin jokaista menetelmän kehitysvaihetta varten soluliuos, jonka pitoisuus määritettiin PCA-maljauksen avulla (kuvio 7). Soluliuoksen valmistus aloitettiin varsinaisia määrityksiä edeltävänä päivänä, jotta yön yli kasvaneet solut voitiin ympätä ravistelupulloihin.



KUVIO 7. RH11662 tuotantokannan soluliuoksen valmistus ja pmy-pitoisuuden määrittäminen

Lyofilisaatti avattiin steriilisti ja ampulliin lisättiin 500 mikrolitraa 0,9 % NaCl-liuosta. Solupelletin annettiin turvota nesteessä noin 30 minuuttia, minkä jälkeen seosta varovasti suspensioitiin siirrostussilmukalla. Solususpensiota lisättiin 100 mikrolitraa ravistelupulloihin, joissa oli RH11662 tuotantokannalle soveltuvaa ravintoliuosta (liite 1). Pulloja inkuboitettiin 24 tuntia 37 °C lämpöravistelijassa 150 rpm (*Revolutions Per Minute*, kierrosta minuutissa). Jokaisesta tuotantokannan ravistelukasvatuksesta valmistettiin seuraavana päivänä  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ja  $10^{-7}$  laimennokset 0,9 % NaCl-liuokseen ja näistä laimennoksista tehtiin 100 mikrolitran pintalevitys kolmelle PCA (Plate Count Agar)-maljalle. PCA-maljat siirrettiin 37 °C lämpökaappiin 24 tunniksi. Inkuboinnin jälkeen maljoilta laskettiin



pesäkkeet, minkä avulla saatiin selville tuotantokantasolujen pitoisuus eli pesäkkeen muodostavien yksiköiden määrä millilitrassa (pmy/ml) eri tuotantokantasoluliuoksissa. Tuotantokantasolujen pitoisuudet menetelmäkehityksen eri vaiheissa on koottu liitteeseen 2.

### **3.2 RAI-entsyymipuolivalmistenäytteet**

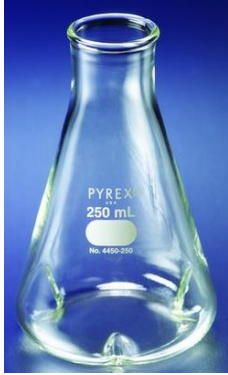
Entsyymipuolivalmiste saa Roal Oy:ssä näytetunnuksen H15, kun tarvittavat jälkikäsitelysuodatukset on tehty ja valmisteen puhtaus on arvioitu riittäväksi käyttötarkoitusta varten. Puolivalmiste saattaa suodatuksesta huolimatta sisältää joitain määriä mikrobeja, sillä jälkikäsitelyprosesseja ei tehdä steriileissä olosuhteissa. Jos bakteerimäärä on liian suuri ja tuote halutaan säilyttää nestemäisenä, voidaan jokin suodatuksesta toistaa. Jauhe-maisia tuotteita valmistettaessa käytetään spray-kuivausta, jolloin useimmat mikrobit kuolevat kuumennuksen aikana eikä uudelleen suodatusta tarvita. Mikrobiologisessa laadunvalvonnassa H15-näytteestä määritetään kokonaisbakteerit, kokonaiskoliformit sekä tuotantokanta.

Tuotantokantamenetelmän kehityksessä käytettiin Roal Oy:n koe-tehtaassa valmistettua RAI-puolivalmistetta, joka vastaa ominaisuuksiltaan suuren mittakaavan tehdasfermentoinnista saatavaa puolivalmistetta. Puolivalmiste sterilisuoatettiin Thermo Scientific Nalgene® Rapid Flow-suodatusyksikön läpi vakuumin avulla mahdollisten kontaminanttien poistamiseksi. Varsinaiseen tuotantokannan toteamismääritykseen käytettiin ensimmäistä tehdasmittakaavassa valmistettua RAI-puolivalmistetta sellaisenaan ilman suodatuksia.

### **3.3 Ravistelupullojen, kontrollinäytteiden ja detektiomaljojen valmistus**

Entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittämisessä sekä tuotantokannan toteamisrajan määrittämisessä käytettiin kaupallisesta Difco™ Antibiotic Medium 3-jauheesta valmistettua ravintoliuosta (liite 3), jota tehtiin pakkauksen ohjeesta poiketen pitoisuudeltaan kaksinkertaisena liuksena. Ravistelupullot valmistettiin lisäämällä tätä ravintoliuosta 12,5 millilitraa 250 millilitran ”haitallisiin” kartiokolveihin, joiden ominaisuutena on sisään-

päin muotoillut lovet lisäämässä liuoksen sekoitettavuutta (kuvio 8). Ravistelupullot autoklavoitiin 121 °C 15 minuuttia. Tuotantokannan toteamismenetytelmässä käytettiin edellä mainittua Antibiotic Medium 3- ravintoliuosta pitoisuudeltaan yksinkertaisena. Ravistelupullot valmistettiin lisäämällä 200 millilitraa ravintoliuosta haitallisiin litran kartiokolveihin, minkä jälkeen ne steriloiitiin autoklavoimalla.



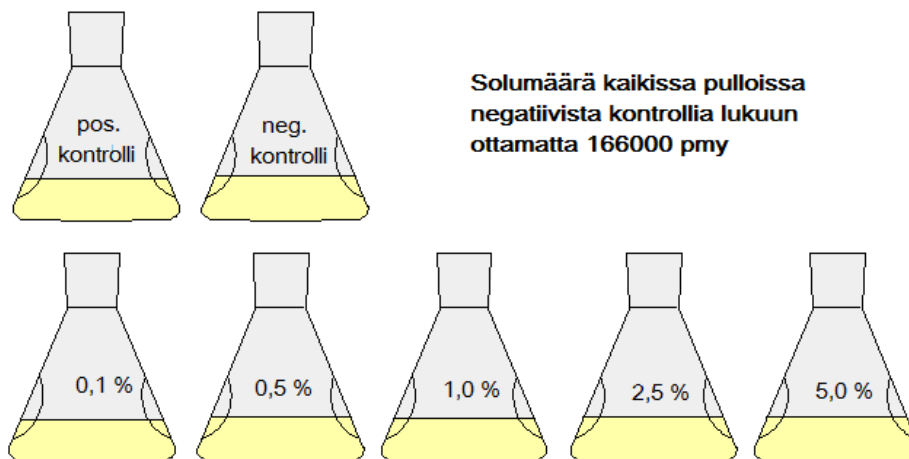
KUVIO 8. Ravistelupullo, jossa sisäänpäin muotoillut ”haitat” (Sigma-Aldrich 2016)

Puolivalmisteen pitoisuuden määrittelyssä sekä tuotantokannan toteamisrajan määrittelyssä käytettiin positiivista ja negatiivista kontrollinäytettä. Positiivisen kontrollin avulla varmistuttiin tuotantokannan kasvamisesta ja se toimi myös vertailunäytteenä mikroskoipoitaessa. Negatiivisen kontrollin avulla voitiin todeta mahdollinen työvälineistä tai reagensseista peräisin oleva kontaminaatio. Kontrollit valmistettiin lisäämällä ravistelupulloihin 12,5 millilitraa kaksinkertaista Antibiotic Medium 3 ravintoliuosta ja 12,5 millilitraa 0,9 % NaCl-liuosta. Tämän lisäksi positiiviseen kontrolliin lisättiin 100 mikrolitraa tuoretta RH11662 tuotantokannan  $10^{-1}$  tai  $10^{-2}$  solulaimennosta. Kontrollinäytteisiin pipetoidut määrät ja solupitoisuudet on esitetty määrittelysien yhteydessä taulukoissa 1 ja 2. Laimennoksien valmistukseen käytettiin 0,9 % NaCl-liuosta, jota valmistettiin punnitsemalla 9 grammaa NaCl:a ja liuottamalla se 1000 millilitraan MilliQ-vettä. Liuos autoklavoitiin 121 °C 15 minuuttia.

Tuotantokannan esiintymistä ja varmistusta varten käytettiin Cibacron Blue Potato Starch-maljoja (CBPS), jotka valmistettiin Roal Oy:n laadunvalvontalaboratorion menetelmäohjeen mukaisesti (liite 4). Alkuperäinen menetelmäohje on tarkoitettu kanamysiiniresistenssin sisältävän maltogeenisen alfa-amylaasin tuotantokannan havaitsemiseen. Kanamysiiniresistenssi on kuitenkin poistettu RAI-tuotantokannasta, mistä syystä agarin ei lisätty kanamysiiniä. Tuotantokannan toteamismenetytelmässä käytettiin lisäksi suurempia, halkaisijaltaan 150 millimetriä olevia maljoja.

### 3.4 RAI-entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittäminen

Entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittämisessä selvitettiin, onko RAI- puolivalmisteen määrällä vaikutusta tuotantokannan kasvuun. Kasvua estävä vaikutus oli havaittu joidenkin muiden bakteeripohjaisten entsyymipuolivalmisteiden kohdalla aiemmissa menetelmäkehitysprojekteissa. Viiteen ravistelupulloon pipetoitiin steriilisuodatettua koe- tehtaassa valmistettua RAI-puolivalmistetta siten, että sen pitoisuus oli ravintoliuoksessa 0,1 %–5,0 % välillä. Tämän jälkeen pulloihin lisättiin 0,9 % NaCl-liuosta, jotta niiden lopputilavuudeksi saatiin 25 millilitraa. Tuoreesta RH11662 tuotantokantaliuoksesta tehtiin  $10^{-2}$  laimennos, jota ympättiin ravistelupulloihin 100 mikrolitraa. Laskennalliseksi solumääräksi saatiin jokaiseen pulloon siis 166000 pmy (liite 2, taulukko 6). RAI-puolivalmisteen pitoisuuden määrittästä varten valmistetut ravistelupullot on esitetty kuviossa 9 ja niihin pipetoidut määrät taulukossa 1.



KUVIO 9. Ravistelupullot entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittämisessä

TAULUKKO 1. Ravistelupulloihin pipetoidut määrät RAI-puolivalmistepitoisuuden määrittystä varten

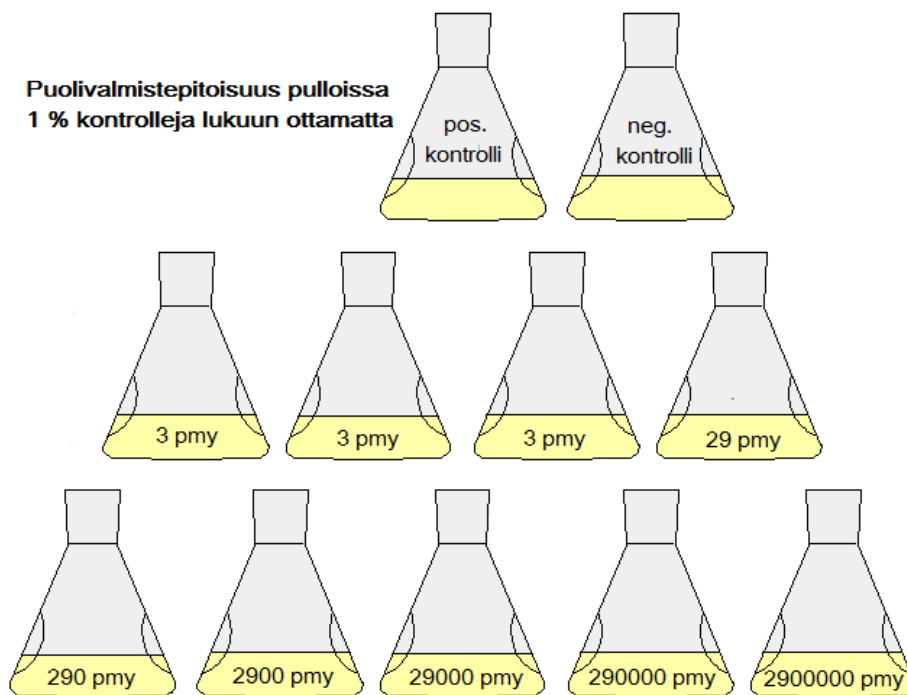
Näytepullo	RAI V- %	RAI V (ml)	0,9 % NaCl V (ml)	10 <sup>-2</sup> RH11662 pmy/0,1 ml
1	neg. kontrolli	0	12,500	0
2	pos. kontrolli	0	12,500	166000
3	0,1	0,025	12,475	166000
4	0,5	0,125	12,375	166000
5	1,0	0,250	12,250	166000
6	2,5	0,625	11,875	166000
7	5,0	1,250	11,250	166000

Ravistelupullot siirrettiin 37 °C lämpöön ja 150 rpm ravisteluun 24 tunniksi, minkä jälkeen tarkasteltiin ravintoliuoksen samentumista eli tuotantokantasolujen kasvua eri puolivalmistepitoisuuksissa. Kaikki samentuneet näytteet mikroskojettiin, jolloin tarkasteltiin tuotantokantasolujen morfologiaa. Samalla varmistettiin, ettei kontaminaatiota ole tapahtunut. Valituista näytteistä tehtiin maljahajotukset CBPS-maljoille, joita inkuboitiin 37 °C 16 tuntia. Vuorokauden +4 °C säilytyksen jälkeen tarkasteltiin maljoilta mahdollista kirkastumaa pesäkkeiden ympärillä. Ainoastaan tärkkelystä hydrolysoivaa entsyymiä tuottava mikrobikanta muodostaa kirkastuman CBPS-maljoille. Jos ravintoliuoksessa havaittiin samentumaa ja maljauksessa pesäkkeiden ympärille muodostui hydrolyysikehä, ei RAI-puolivalmisteella ole sen tuotantokannan kasvua estäviä ominaisuuksia tai niitä ei havaita, kun näytteen tuotantokantasolumäärä on vähintään 166000 pmy.

### 3.5 Tuotantokannan toteamisrajan määrittäminen 1 % RAI-entsyymipuolivalmistepitoisuudessa

Tuotantokannan toteamisrajan määrittämisen tavoitteena oli selvittää, voidaanko 1 % RAI-puolivalmistepitoisuudesta havaita yksittäisiä tuotantokantasoluja. Elintarvikeviraston (1997, 7–8) julkaiseman mikrobiologisten menetelmien validointiohjeen mukaan viisi solua on pienin pitoisuus, joka voidaan luotettavasti todeta. Puolivalmistepitoisuudeksi valittiin 1 %, koska siinä ei esiintynyt tuotantokannan kasvun estymistä edellisen määrittämisen perusteella.

Yhdeksään ravistelupulloon pipetoitiin steriilisuodatettua RAI-puolivalmistetta siten, että loppukonsentraatio oli kaikissa pulloissa 1 %. Ravistelupulloihin lisättiin 0,9 % NaCl-liuos, jotta niiden lopputilavuudeksi saatiin 25 millilitraa. Tuoreesta tuotantokantasoluoksesta, jonka pitoisuudeksi määritettiin  $2,9 \times 10^8$  pmy/ml (liite 2, taulukko 7), valmistettiin seitsemän sarjalaimennosta. Laimennoksien solumäärä laskettiin olevan  $10^1$ – $10^7$  pmy/ml välillä. Jokaista laimennosta pipetoitiin yhteen ravistelupulloon 100 mikrolitraa ja lisäksi suurinta laimennosta vielä kahteen pulloon. Toteamisrajan määrittämisessä käytetyt ravistelupullot on esitetty kuviossa 10. Taulukossa 2 on esitetty pulloihin pipetoidut määrät, soluliuksesta valmistetut laimennokset ja laskennallinen pmy määrä ravistelupulloissa.



KUVIO 10. Tuotantokannan toteamisrajan määrittämisessä käytetyt ravistelupullot

TAULUKKO 2. Pipetointitaulukko tuotantokannan toteamisrajan määrittämistä varten

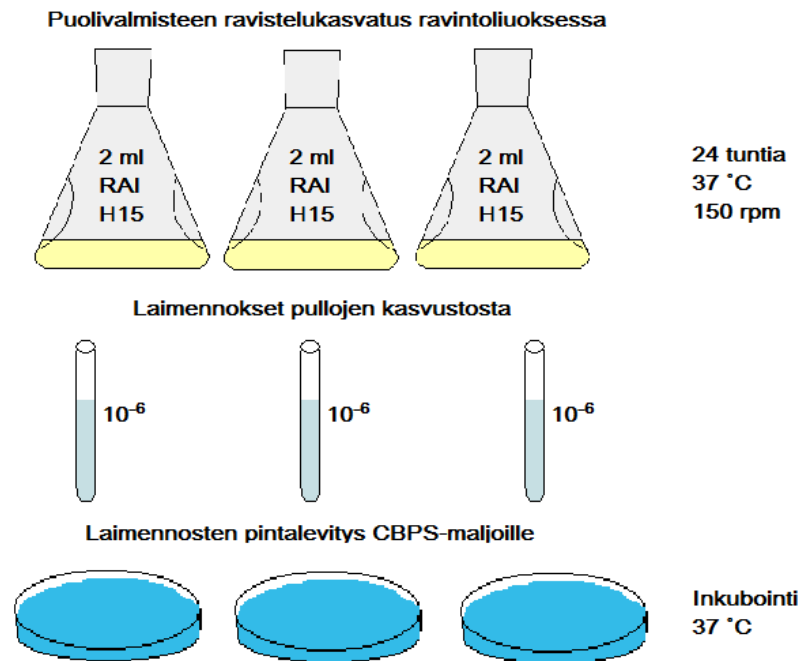
Näyte	RAI V- %	RAI V (ml)	0,9 % NaCl V (ml)	RH11662 laimennos	RH11662 pmy/0,1 ml
1	neg. kontrolli	0	12,5	0	0
2	pos. kontrolli	0	12,5	10 <sup>-1</sup>	2900000
3	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-1</sup>	2900000
4	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-2</sup>	290000
5	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-3</sup>	29000
6	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-4</sup>	2900
7	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-5</sup>	290
8	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-6</sup>	29
9	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-7</sup>	3
10	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-7</sup>	3
11	1,0	0,250	12,25	10 <sup>-7</sup>	3

Ravistelupulloja inkuboitettiin 24 tuntia 37 °C lämmössä ja 150 rpm ravistelussa. Tuotantokannan kasvua tarkasteltiin ravintoliuoksessa ja CBPS-maljoilla kuten puolivalmisteen pitoisuuden määrittämisessä (luku 3.4). Toteamisrajaksi määritettiin pienin ympätty solumäärä, joka aiheutti ravintoliuoksen samenenemisen ja joka maljauksessa sai aikaan hydrolyysikehän yksittäisten pesäkkeiden ympärille.

Tuotantokannan toteamisrajan määrittäminen 1 % RAI-pitoisuudessa toistettiin samoja työkentelytapoja noudattaen. Toistolla arvioitiin menetelmän herkkyyttä eli prosenttiosuutta määrittämisestä positiivisista tuloksista verrattuna virhenegatiivisiin ja todellisiin positiivisiin tuloksiin (The FEM Microbiology Action Team 2009, 18). Menetelmän herkkyyden arvioinnilla otettiin huomioon vähäiset vaihtelut tuotantokannan soluliuoksen pitoisuudessa (Elintarvikevirasto 1997, 8). Tuotantokantasoluliuos valmistettiin menetelmän toistoa varten uudelleen ja sen laskennalliseksi solupitoisuudeksi saatiin  $1,7 \times 10^8$  pmy/ml (liite 2, taulukko 8). Sarjalaimennokset olivat siis välillä  $1,7 \times 10^0$ – $1,7 \times 10^6$ .

### 3.6 Tuotantokannan toteamismenetelmä tehdasmittakaavan RAI-näytteelle

Elintarvike-entsyymien rekisteröintiä varten tehtävässä hakemuksessa tulee osoittaa luotettavan menetelmän avulla, että entsyymivalmisteessa ei esiinny sen valmistusprosessin suodatusvaiheiden jälkeen elinkelpoisia jakautuvia tuotantokantasoluja. Tuotantokannan toteamismenetelmä tehtiin yllä esitettyjen menetelmätestausten perusteella ensimmäiselle tehdasmittakaavan RAI-puolivalmistenäytteelle (kuvio 11).



KUVIO 11. Tuotantokannan toteamismenetelmän kasvatuksen ja maljauksen vaiheet

Määritettäväksi puolivalmistepitoisuudeksi ravintoliuoksessa asetettiin 1 %. Puolivalmistetta pipetoitiin kolmeen haitalliseen ravintoliuospulloon 2 millilitraa jokaiseen, minkä jälkeen ne laitettiin 150 rpm ravisteluun 37 °C lämpöön. 24 tunnin jälkeen kaikkien pullojen kasvatusliuokset mikroskoipoitiin ja niistä valmistettiin 10<sup>-6</sup> laimennokset maljausta varten. Kyseinen laimennos valittiin käytettäväksi, koska maljoille haluttiin yksittäisiä pesäkkeitä, joiden mahdollinen hydrolyysirengas voitiin havaita selkeästi. 10<sup>-6</sup> laimennosta käytettiin myös sen vuoksi, että tehdasmittakaavan puolivalmisteen tiedettiin mahdollisesti sisältävän tuotantokannan havaitsemista häiritseviä mikrobeja. Laimennoksista tehtiin 500 mikrolitran pintalevitys CBPS-maljoille, joita inkuboitiin 37 °C lämmössä 16 tuntia. Vuorokauden +4 °C säilytyksen jälkeen tarkasteltiin maljoilla mahdollisesti kasvavia pesäkkeitä. Jos yksittäisten pesäkkeiden ympärillä havaittiin hydrolyysikehä, todettiin ne tuotantokannaksi. Kirkastumien puuttuminen pesäkkeiden ympäriltä osoitti, että

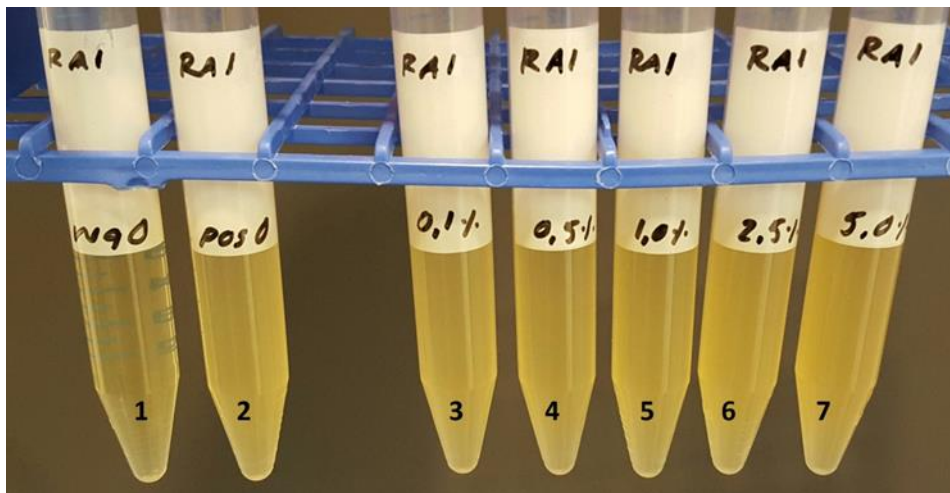
valmistusprosessin jälkikäsittelysuodattimet ovat olleet riittäviä elinkelpoisten jakautuvien tuotantokantasolujen poistamiseksi tuotteesta.



## 4 TULOKSET

### 4.1 RAI-entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittäminen

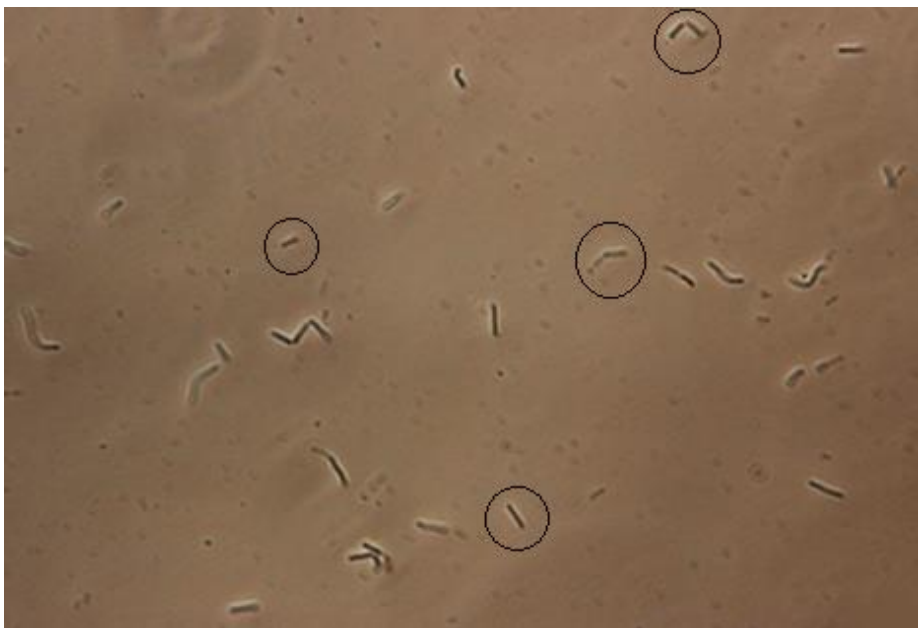
Kaikissa RAI-puolivalmistepitoisuuksissa sekä positiivisessa kontrollissa havaittiin selkeää samentumaa 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen (kuva 1), joten voidaan olettaa tuotantokannan kasvaneen ravintoliuoksessa. Negatiivinen kontrolli oli kirkas, eikä mikroskopiolla havaittu yhdessäkään näytteessä kontaminaatiota. Sen sijaan kaikissa näytteissä nähtiin RH11662 tuotantokannalle ominaisia sauvamaisia bakteereita (kuva 2 ja 3). Mikroskopian avulla huomattiin kuitenkin muutoksia tuotantokantabakteerien solumorfologiassa, kun liuokseen oli lisätty entsyymipuolivalmistetta. Muutos nähtiin vertaamalla positiivista kontrollinäytettä (kuva 2) ja näytettä, jossa RAI-puolivalmistepitoisuus on 1 % (kuva 3). Kuvassa 2 bakteerisolut ovat pidempiä ja ryhmittyneinä jonoiksi, kun taas kuvassa 3 ne ovat lyhempiä ja ryhmittyneinä pareittain tai yksittäin.



KUVA 1. Ravintoliuosten samentuminen 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen eri puolivalmistepitoisuuksissa

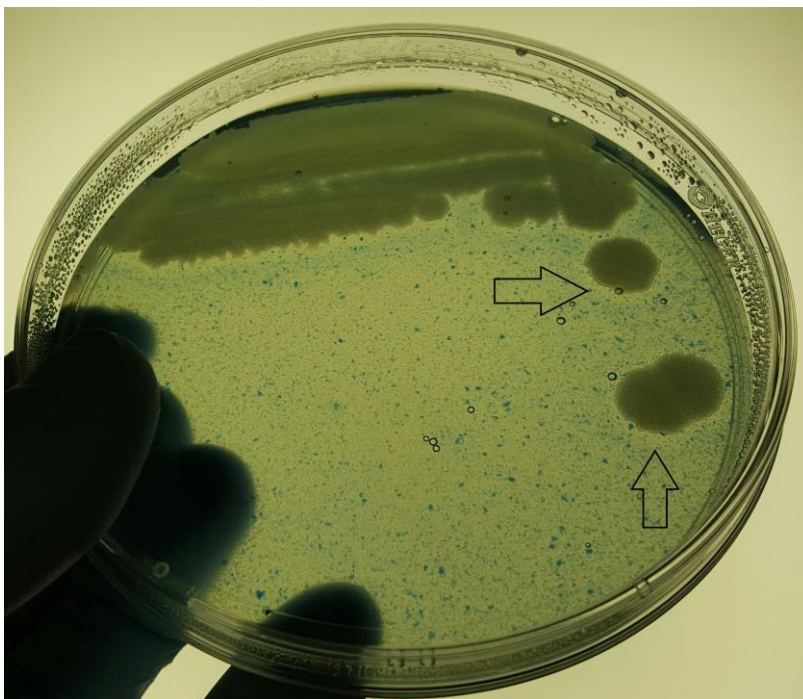


KUVA 2. 400x mikroskooppikuva positiivisesta kontrollinäytteestä 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen



KUVA 3. 400x mikroskooppikuva 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen 1 % RAI-puolivalmistepitoisuudessa

Maljahajotukset tehtiin näytteistä 2, 5 ja 7 CBPS-maljoille. Kaikilla maljoilla kasvoi 16 tunnin inkuboinnin jälkeen tuotantokannalle ominaisia pesäkkeitä, joiden ympärille muodostui kirkas hydrolyysikehä vuorokauden +4 °C säilytyksen jälkeen (kuva 4). Saatujen tulosten perusteella todettiin, että RAI-puolivalmisteella ei ole sen tuotantokannan kasvua estäviä ominaisuuksia tutkitulla pitoisuusalueella tai mahdollisia vaikutuksia ei havaita silloin kun tuotantokantasolumäärä näytteessä on vähintään 166000 pmy (taulukko 3).



KUVA 4. Näytteen 5 maljahajotus CBPS-maljalla 16 tunnin inkuboinnin ja 24 tunnin kylmäsäilytyksen jälkeen. Hydrolyysikehät pesäkkeiden ympärillä.

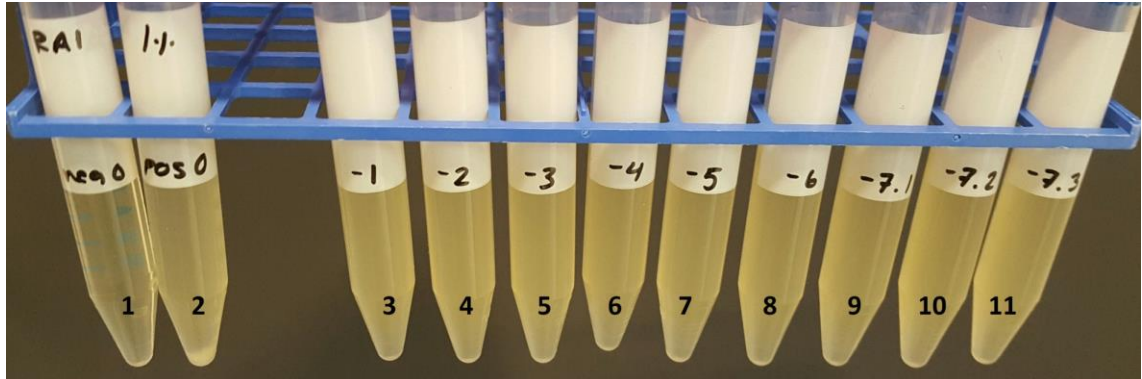
TAULUKKO 3. Tulokset puolivalmisteen pitoisuuden määrittämisessä

Näytepullo	RAI V- %	$10^{-2}$ RH11662 pmy/0,1 ml	Tuotantokannan kasvu
1	neg. kontrolli	0	ei kasvua
2	pos. kontrolli	166000	kasvua
3	0,1	166000	kasvua
4	0,5	166000	kasvua
5	1,0	166000	kasvua
6	2,5	166000	kasvua
7	5,0	166000	kasvua

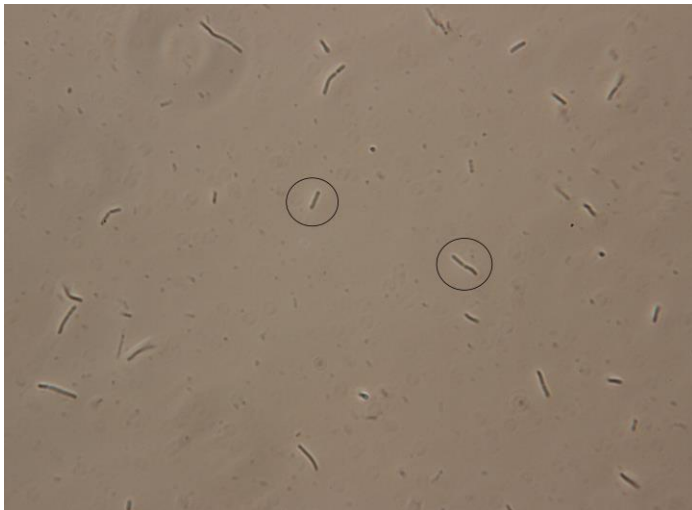
#### 4.2 Tuotantokannan toteamisrajan määrittäminen 1 % RAI-entsyymipuolivalmistepitoisuudessa

Kaikissa tuotantokantasolupitoisuuksissa sekä positiivisessa kontrollissa havaittiin samentumaa 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen (kuva 5). Mikroskoopissa kaikissa

näytteissä esiintyi sauvabakteereita, joiden morfologia muistutti puolivalmistepitoisuusmäärityksen 1 % pitoisuudessa nähtyjä tuotantokantasoluja. Kuvassa 6 on näyte, jossa ympätty solumäärä on noin 3 pmy. Näytteistä 2, 7, 9, 10 ja 11 tehtiin pintahajotukset CBPS-maljoille. Inkuboinnin ja kylmäsäilytyksen jälkeen kaikille maljoille muodostui pesäkkeitä, joiden ympärillä oli hydrolyysikehä.



KUVA 5. Ravintoliuosten samentuminen eri tuotantokantasolupitoisuuksissa 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen



KUVA 6. 400x mikroskooppikuva 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen näytteestä 9, jonka tuotantokantasolupitoisuus on 3 pmy

Tuotantokantasolujen toteamisrajaksi 1 % RAI-puolivalmistepitoisuudessa saatiin kokeen 1 perusteella määritettyä alle viisi tuotantokantasolua (taulukko 4). Rinnakkaisen määrityksen, kokeen 2 perusteella havaittiin myös tuotantokannan kasvu kaikissa solupitoisuuksissa (taulukko 5). Menetelmän herkkyyttä arvioitiin tarkastelemalla kokeen 1 ja 2 tuloksia yksittäisten ympättyjen solujen osalta. Positiivisten tulosten määrää verrattaessa virhenegatiivisten ja todellisten positiivisten tulosten määrään, saatiin menetelmän herkkyyden prosenttiosuudeksi määritettyä 100 %.

TAULUKKO 4. Tulokset tuotantokannan toteamisrajan määrittämisessä, koe 1

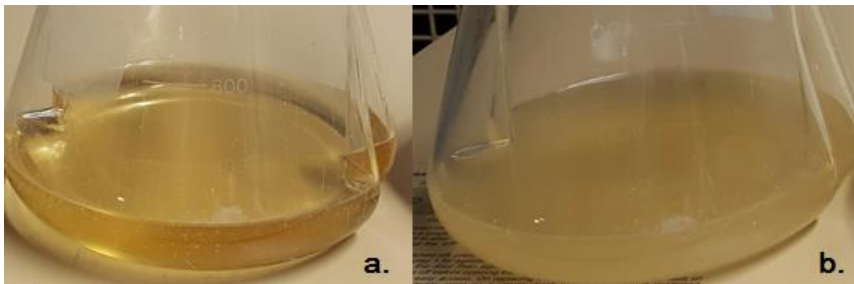
Näyte	RAI V- %	RH11662 laimennos	RH11662 pmy/0,1 ml	Tuotantokannan kasvu
1	neg. kontrolli	0	0	ei kasvua
2	pos. kontrolli	10 <sup>-1</sup>	2900000	kasvua
3	1	10 <sup>-1</sup>	2900000	kasvua
4	1	10 <sup>-2</sup>	290000	kasvua
5	1	10 <sup>-3</sup>	29000	kasvua
6	1	10 <sup>-4</sup>	2900	kasvua
7	1	10 <sup>-5</sup>	290	kasvua
8	1	10 <sup>-6</sup>	29	kasvua
9	1	10 <sup>-7</sup>	3	kasvua
10	1	10 <sup>-7</sup>	3	kasvua
11	1	10 <sup>-7</sup>	3	kasvua

TAULUKKO 5. Tulokset tuotantokannan toteamisrajan määrittämisessä, koe 2

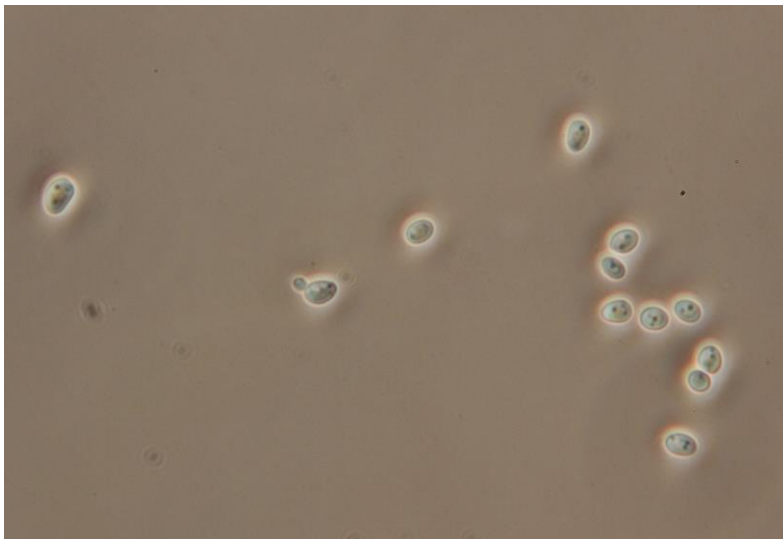
Näyte	RAI V- %	RH11662 laimennos	RH11662 pmy/0,1 ml	Tuotantokannan kasvu
1	neg. kontrolli	0	0	ei kasvua
2	pos. kontrolli	10 <sup>-1</sup>	1700000	kasvua
3	1	10 <sup>-1</sup>	1700000	kasvua
4	1	10 <sup>-2</sup>	170000	kasvua
5	1	10 <sup>-3</sup>	17000	kasvua
6	1	10 <sup>-4</sup>	1700	kasvua
7	1	10 <sup>-5</sup>	170	kasvua
8	1	10 <sup>-6</sup>	17	kasvua
9	1	10 <sup>-7</sup>	2	kasvua
10	1	10 <sup>-7</sup>	2	kasvua
11	1	10 <sup>-7</sup>	2	kasvua

### 4.3 Tuotantokannan toteamismenetelmä tehdasmittakaavan RAI-näytteelle

Ravintoliuoksen samentuminen havaittiin 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen kaikissa kolmessa ravistelupullossa (kuva 7). Mikroskopiassa samentumisen huomattiin aiheutuneen hiivasolujen kasvusta (kuva 8) eikä tuotantokannalle ominaisia tai muita bakteereita havaittu näytteistä. Hiivan esiintymisestä huolimatta kaikista ravistelupulloista tehtiin maljaukset CBPS-maljoille. Maljoilla nähtiin 16 tunnin 37 °C inkuboinnin sekä vuorokauden +4 °C jälkeen tuotantokantaa pienempiä pesäkkeitä, joiden ympärillä ei havaittu kirkastumaa. Tulosten perusteella todettiin, että tehdasmittakaavan RAI-puolivalmiste ei sisällä elävää RH11662 tuotantokantaa.



KUVA 7. Ravintoliuoksen samentuminen 24 tunnin ravistelukasvatuksessa. a. ravistelukasvatusta ennen. b. ravistelukasvatuksen jälkeen



KUVA 8. 400x mikroskooppikuva hiivasolujen kasvusta 24 tunnin ravistelukasvatuksen jälkeen 1 % tehdasmittakaavan RAI-puolivalmistepitoisuudessa

## 5 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää ja optimoida Roal Oy:n uudelle maltogeeniselle alfa-amylaasi entsyymipuolivalmisteelle sen tuotantokannan toteamismenetelmä, jonka tuloksia käytetään osana EFSA:n rekisteröintiä. Työn tarkoituksena oli määrittää tuotantokannan toteamismenetelmässä käytettävä entsyymipuolivalmistepitoisuus ja selvittää, voidaanko määritetystä entsyymipuolivalmistepitoisuudesta havaita yksittäisiä tuotantokantasoluja. Kehitettyä tuotantokannan toteamismenetelmää oli lopulta tarkoitus käyttää ensimmäisen tehdasfermentoinnista saadun RAI-entsyymipuolivalmisteen analysoinnissa.

Entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittämisessä tuotantokanta kasvoi kaikissa käytetyissä puolivalmistepitoisuuksissa. RAI-puolivalmisteella ei ole sen oman tuotantokannan kasvua estäviä ominaisuuksia tutkitulla pitoisuusalueella tai niitä ei havaita silloin kun tuotantokantasolumäärä näytteessä on vähintään 166000 pmy. Tulosten perusteella päädyttiin käyttämään 1 % RAI-puolivalmistepitoisuutta menetelmän toteamisrajan määrittämisessä.

Tuotantokannan toteamisrajan määrittämisavulla voitiin osoittaa, että 1 % RAI-puolivalmisteesta pystytään havaitsemaan yksittäisiä tuotantokantasoluja. Menetelmän toteamisrajaksi saatiin määritettyä viisi solua, mikä on Elintarvikeviraston validointiohjeen (1997, 7–8) mukaan pienin pitoisuus, joka voidaan luotettavasti todeta. Kahden rinnakkaisen määrittämisavun tulosten perusteella saatiin menetelmän herkkyudeksi 100 %. Rinnakkaisia määrittämisavuja tarvitaan kuitenkin enemmän, jotta menetelmän kykyä havaita vähäisiä vaihteluita tuotantokannan pitoisuudessa voidaan totuudenmukaisemmin arvioida.

Puolivalmisteen pitoisuuden ja tuotantokannan toteamisrajan määrittämisavujen tulosten perusteella laadittiin menetelmä tuotantokannan toteamiseksi RAI-entsyymipuolivalmisteesta. Testattaessa menetelmää ensimmäiselle tehdasmittakaavan fermentoinnista saatavalle RAI-entsyymipuolivalmisteelle havaittiin ravistelukasvatuksen jälkeen ravintoliuoksen samennemisen kaikissa kolmessa ravistelupullossa. Mikroskopoinnin ja maljauksien jälkeen todettiin, että samentuminen oli aiheuttanut hiiva, eikä entsyymipuolivalmisteessa esiinny sen omaa RH11662 tuotantokantaa.

Hiiwan esiintymisen puolivalmisteessa on todennäköisesti aiheuttanut näytteenotossa, säilytyksessä tai jälkikäsitteilyprosesseja ei tehdä steriileissä olosuhteissa, joten kontaminaatiot ovat mahdollisia. Hiiwan esiintyminen ei tässä vaiheessa entsyymituotteen valmistusta aiheuta suuria toimenpiteitä tai haittaa, koska nestemäiselle valmisteelle tehdään vielä suodatus ja jauhemaista tuotetta valmistettaessa hiivasolut kuolevat spray-kuivauksen aikana. Puolivalmisteessa olevien taustamikrobien vaikutusta tuotantokantasolujen havaitsemiseen tulisi arvioida vielä erikseen. Tunnetuista referenssimikrobeista voisi valmistaa näytetaustoja, joita siirrostettaisiin eri tuotantokantasolupitoisuuksiin. Tämän avulla voitaisiin selvittää, kykenevätkö tuotantokantasolut kasvamaan muiden mikrobien läsnä ollessa vai onko taustamikrobeilla kasvu tuotantokantaan nähden. Taustamikrobien vaikutusten arviointi lisäisi menetelmän luotettavuutta.

CBPS-maljoja käytettiin tässä työssä osoittamaan tärkkelyksen hydrolyysiä, koska agarია oli aiemmin käytetty samankaltaisten tuotantokantojen määrittämisessä. Työskentelyn aikana havaittiin agariin tarvittavan Cibacron Blue perunatärkkelyksen valmistuksen olevan monivaiheinen ja pitkä prosessi (liite 4), joka kestää yhteensä kaksi vuorokautta ja vaatii aktiivista työskentelyä useita tunteja. Tämän lisäksi perunatärkkelyksen sekoittuvuus agarია valmistettaessa oli huono, mikä hankaloitti maljojen lukemista. Tärkkelyksen hydrolyysin havaitsemiseen on käytetty jo vuodesta 1915 lähtien yksinkertaisempia tärkkelysmaljoja ja Gramin jodiliuosta, joka värjää maljalla olevan tärkkelyksen tumman siniseksi tai violetiksi. Hydrolyysiin kykenevien pesäkkeiden ympärille jää vaalea kehä, joka on helposti havaittavissa. Gramin jodiliuosta ja tärkkelysagarია on helposti saatavana kaupallisena, mutta ne voidaan myös itse valmistaa yksinkertaisen ohjeen mukaan. (Cheeptham & Lal 2012.) Perinteisen tärkkelysagarin ja Gramin jodiliuoksen käyttö CBPS-agarin sijaan säästäisi aikaa ja helpottaisi hydrolyysin havaitsemista.

Tämän opinnäytetyn avulla saatujen tulosten perusteella voidaan jatkossa kehittää luotettava menetelmä RAI-tuotantokannan toteamiseen, mikä voidaan esittää osana EFSA:n valvomassa rekisteröinnissä. Menetelmän herkkyyttä sekä taustamikrobien vaikutusta tulee sitä ennen vielä arvioida ja määrittää. Rekisteröintiä varten tarvitaan lisäksi kahden RAI-puolivalmiste-erän analysointi, jotka tullaan tekemään, kun RAI-tuotantokantaa taas fermentoidaan Roal Oy:ssä.



## LÄHTEET

- Aaltonen, H. 2014. Fermentoinnin yleiskuvaus. [Roal Oy:n M-Files tietokanta].
- Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. 2002. Bioprosessiteknikka. 1. painos. Helsinki: WSOY.
- Boer, A. S. & Diderichsen, B. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36 (1), 1–4.
- Becton, Dickinson and Company. 2009. Difco & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media. 2. painos. Maryland: BD.
- Cheeptham, N. & Lal, A. 2012. Starch Agar Protocol. [www-sivu]. Julkaistu 1.11.2012. Päivitetty 1.4.2013. Luettu 24.4.2016.  
<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3780-starch-agar-protocol>.
- EFSA. 2011. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. *EFSA Journal* 9(6), 19.
- Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus elintarvike-entsyymeistä 16.12.2008/1332.
- Elintarvikevirasto. 1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. [PDF]. Valvonta-sarja 2 (13), 1–12. Luettu 22.4.2016.  
[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike\\_ja\\_rehutatkimus/mibi/validointiohje\\_13\\_1997.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehutatkimus/mibi/validointiohje_13_1997.pdf).
- European Food Safety Authority. 2016. Food Enzymes: EU Framework. [www-sivu]. Luettu 3.4.2016. [http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodenzymes?&field\\_published\\_date\\_value\[min\]&field\\_published\\_date\\_value\[max\]&page=1#topic\\_framework\\_anchor](http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodenzymes?&field_published_date_value[min]&field_published_date_value[max]&page=1#topic_framework_anchor).
- Harley, J., Klein, D. & Prescott, L. 2002. Microbiology. 5. painos. New York: McGraw-Hill.
- Kunst, F. & Ogasawara, N. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *International weekly journal of science. Nature* 390, 249–256.
- Leisola, M. 2002. Biotekniikan erityiskysymyksiä. Teoksessa Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. (toim.) Bioprosessiteknikka. 1. painos. Helsinki: WSOY, 380–419.
- National Center for Biotechnology Information. 1997. *Bacillus subtilis*. Model organism for prokaryotic cell differentiation and development. [www-sivu]. Päivitetty 20.11.1997. Luettu 26.3.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/665>.
- Novozymes A/S. 2013. Enzymes at work. [PDF]. Päivitetty 8.3.2016. Luettu 8.3.2016. [http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes\\_at\\_work.pdf](http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes_at_work.pdf).

Ojamo, H. 2002. Käytännön sovellukset. Teoksessa Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. (toim.) Bioprosessitekniikka. 1 painos. Helsinki: WSOY, 78–115.

Olesen, T. 1991. Antistaling process and agent. Patentihakemus WO1991004669. [www-sivu]. Päivitetty 19.4.1991. Luettu 7.4.2016. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO1991004669&rec-Num=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>.

Paloheimo, M., Piironen, J. & Vehmaanperä, J. 2011. Xylanases and Cellulases as Feed Additives. Teoksessa Bedford, M. & Partridge, G. (toim.) Enzymes in Farm Animal Nutrition. 2. painos. Bodmin: MPG Books Group, 12–53.

Sigma-Aldrich Co. 2016. Pyrex® baffled Erlenmyer flask. [www-sivu]. Päivitetty 17.5.2016. Luettu 17.5.2016. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/cls4450250?lang=fi&region=FI>.

Sinnott, M.L. 2007. Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Structure and Mechanism. 2. painos. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Suominen, I. 2002. Solujen rakenne ja toiminta. Teoksessa Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. (toim.) Bioprosessitekniikka. 1. painos. Helsinki: WSOY. 20–77.

The FEM Microbiology Action Team. 2009. Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency. Microbiological Methods of Analysis. [PDF]. Julkaistu 7.10.2009. Luettu 29.5.2016. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/final\\_microbiology\\_method\\_guidance\\_110409.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf)

The Pennsylvania State University. 2016. Structure of Starches. [www-sivu]. Päivitetty 13.3.2016. Luettu 12.3.2016. [https://online.science.psu.edu/chem005\\_wd/node/7882](https://online.science.psu.edu/chem005_wd/node/7882).

The Universal Protein Resource. 2016. UniProtKB - P19531 (AMYM\_GEOSE). [www-sivu]. Julkaistu 1.2.1991. Päivitetty 20.1.2016. Luettu 9.3.2016. <http://www.uniprot.org/uniprot/P19531>.

Toikka, S. 2016. M040 Maltogeenisen bakteeriamylaasikasvatuksen alkuvaiheet (RAI). [Roal Oy:n M-Files tietokanta].

Toikka, S. 2014. M027 Tuotantokannan toteaminen bakteeriamylaasifermentaatiosta (RAH). [Roal Oy:n M-Files tietokanta].

Vehmaanperä, J. 2013. Teollisuusentsyymit – modernia bioprosessitekniikkaa. [PDF]. Päivitetty 9.10.2013. Luettu 15.4.2016. [http://www.finbio.net/download/biotech-week\\_2013/jari-vehmaanpera.pdf](http://www.finbio.net/download/biotech-week_2013/jari-vehmaanpera.pdf).

Von Weymarn, N. 2013. Entsyymit ja niiden tuotanto. [PDF]. Päivitetty 18.1.2013. Luettu 15.4.2016. <http://www.btnk.fi/files/pdf/weymarn.pdf>.

Von Weymarn, N. 2002. Valmistusprosessit. Teoksessa Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. (toim.) Bioprosessitekniikka. 1. painos. Helsinki: WSOY, 116–211.

Whitehurst, R. & van Oort, M. 2009. Enzymes in Food Technology. 2. painos. Iowa: John Wiley & Sons.

**LIITTEET**

## Liite 1. Ravintoliuospullot RH11662 tuotantokannoille (Toikka 2016, 2)

Saccharose	15 g
Soy Peptone	10 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
KCl	0,25 g
NaNO <sub>3</sub>	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g

Sekoitetaan aineosat 500 millilitraan Milli-Q vettä ja kuumennetaan kunnes, ne ovat liuenneet. Säädetään jäähtyneen liuoksen pH 7,2 ja jaetaan 30 ml ravintoliuosta 250 millilitran erlenmyer-pulloihin. Autoklavoidaan 121 °C 15 minuuttia.

## Liite 2. RH11662 tuotantokantasolujen pmy-määritykset PCA-maljauksella

TAULUKKO 6. RH11662 tuotantokannan pmy-määritys entsyymipuolivalmisteen pitoisuuden määrittystä varten

Laimennos	Malja I	Malja II	Malja III	Ka	RH11662
	pmy	pmy	pmy	pmy	pmy/ml
$10^{-5}$	108	89	88	95	$95 \times 10^6$
$10^{-6}$	18	26	17	20,3	$20,3 \times 10^7$
$10^{-7}$	1	3	2	2	$2,0 \times 10^8$

**RH11662 soluliouksessa  $1,66 \times 10^8$  pmy/ml**

TAULUKKO 7. RH11662 tuotantokannan pmy-määritys toteamisrajan määrittystä varten

Laimennos	Malja I	Malja II	Malja III	Ka	RH11662
	pmy	pmy	pmy	pmy	pmy/ml
$10^{-5}$	190	158	179	175,67	$176 \times 10^6$
$10^{-6}$	21	26	24	23,67	$24 \times 10^7$
$10^{-7}$	5	4	5	4,67	$5 \times 10^8$

**RH11662 soluliouksessa  $2,9 \times 10^8$  pmy/ml**TAULUKKO 8. RH11662 tuotantokannan pmy-määritys toteamisrajan määrittystä tois-  
toa varten

Laimennos	Malja I	Malja II	Malja III	Ka	RH11662
	pmy	pmy	pmy	pmy	pmy/ml
$10^{-5}$	156	149	236	180	$180 \times 10^6$
$10^{-6}$	22	23	25	23	$23 \times 10^7$
$10^{-7}$	0	0	3	1	$1 \times 10^8$

**RH11662 soluliouksessa  $1,7 \times 10^8$  pmy/ml**

Liite 3. Difco™ Antibiotic Medium 3-ravintoliuos 224320 (Becton, Dickinson and Company 2015, 52)

Koostumus litrassa valmista liuosta:

Beef Extract	1,5 g
Yeast Extract	1,5 g
Peptone	5,0 g
Dextrose	1,0 g
Sodium Chloride	3,5 g
Dipotassium Phosphate	3,68 g
Monopotassium Phosphate	1,32 g

Sekoitetaan 17,5 g jauhetta litraan Milli-Q vettä ja kuumennetaan, kunnes aineosat ovat liuenneet. Autoklavoidaan 121 °C 15 minuuttia.

Liite 4. Cibacron Blue-perunatärkkelyksen ja Cibacron Blue Potato Starch detektiomall-  
 jojen valmistus (Toikka 2014, 2-3)

1 (3)

Cibacron Blue-perunatärkkelys

Cibacron Blue-jauhe (04352 Fluka)	1 g
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> tai Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
Perunatärkkelys (85643 Fluka)	40 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	80 g
Metanoli	400 ml
MilliQ-H <sub>2</sub> O	4400 ml

Metallikori (1000 ml:n lasidekalle)

Magneettisekoittaja

Vesihaude 50–55 °C

Moottoroitu lapasekoittaja

Sintteri halkaisijaltaan 12,5 cm

Suodatinpaperi: glass microfiber filters CF/C (150mm)

Kaksi Petri-maljaa halkaisijaltaan 13,5 cm

Kaksi imupulloa

Vakuumpumppulaitteisto

Liuota 1,0 g Cibacron Blue-jauhetta 400 ml:n MilliQ-vettä 1000ml:n lasidekassa mag-  
 neettisekoittajan avulla. Anna sekoittua vähintään 20 min.

Lämmitä vesihaude 53 °C. Poista magneetti lasidekasta. Laita lasidekka metallikorissa  
 vesihauteeseen (metallikori pitää dekan paikoillaan vesihauteessa). Aseta moottoroitu la-  
 pasekoittaja vesihauteen ylle. Valitse lasidekkaan sopiva lapasekoittaja ja aseta sekoitus  
 2-2,5.

Lisää 40 g perunatärkkelystä pieni lusikallinen kerrallaan. Anna sekoittua muutama mi-  
 nuutti lisäysten välissä. Tämän jälkeen lisää 80 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ja Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> vähitellen, pieninä  
 annoksina.

(jatkuu)

Jatketaan sekoitusta vesihauteessa reagenssilisäysten jälkeen vielä 75 min. Sekoitusajan lopulla seos alkaa kuivua kasaan ja paksuuntuu, reunoille muodostuu vaahtoa (huomioi, että sekoitus sopivalla korkeudella).

Leikkaa sintteriin kaksi suodatinpaperia halkaisijaltaan 12,5 cm. Aseta suodatinpaperit sintteriin ja kokoa vakuumlaitteisto. (Suodatuksen voi suorittaa vain yhdellä suodatinpaperilla).

Suodata seos vakuumlaitteistolla täydellä vakuumivoimakkuudella. Suodatinpaperin päälle kerääntyy värjäätynyt perunatärkkelys (noin 1,5-2 cm kerros).

Pese suodatin 2-4 litralla MilliQ-vettä (4-8h). Laita vakuumi välillä pienelle, jotta suodattimelle kasaantuva perunatärkkelys ei tuki veden virtausta (varo rikkomasta suodatinpapereita).

Vaihda metanolia varten uusi imupullo. Pestään suodatin vielä 400ml:lla metanolia. Metanoli on myrkyllistä ja se kerätään ongelmajäteastiaan. Muista suojautua asianmukaisesti!

Kun metanoli on suodattunut, lopeta vakuumi ja pura laitteisto. Vie sintteri laminaari-kaappiin ja kaada perunatärkkelys Petri-maljalle. Irrota suodatinpaperit varovasti sintteristä pinsettien avulla ja aseta ne toiselle Petri-maljalle. Levitä perunatärkkelys tasaisesti Petri-maljoille kuivumisen edistämiseksi. Anna maljojen olla lämpökaapissa (esim. 40–50 °C) yön yli.

Kun tärkkelys on kuivunut, jauha se huumareessa hienommaksi ja kerää jauhe esim. 50 ml:n Falcon-putkeen. Säilytetään eksikaattorissa huoneenlämmössä. Värjätty tärkkelys on haitallista.

(jatkuu)



Detektiomaljat (CBPS+Km) - Maltogeenisen amylaasin tuottokanta

Peptone from soymeal (Merck 1.07212.0500)	10,0 g
Yeast extract (Sigma Y1625)	5,0 g
NaCl	8,0 g
Bacto Agar (BD 214010)	20,0 g
Cibacron Blue- perunatärkkelys	6,0 g
MilliQ-H2O	1000 ml

Liutetaan alustakomponentit (paitsi Bacto Agar) magneettisekoituksessa n. 800 ml:n MilliQ-vettä. Säädetään jäähtyneen liuoksen pH 7,0 - 7,5 1N NaOH:lla ennen agarin lisäämistä. Lisätään Bacto Agar, säädetään liuoksen volyymi 1 litraksi Milli-Q vedellä. Kuumennetaan magneettisekoituksessa, kunnes kaikki alustakomponentit ovat täysin liuenneet.

Siirretään alusta 100 ml erissä 250 ml pulloihin, autoklavoidaan 15 min 121 °C. Jäähdytetään agar n. 45 - 50 °C:n. Lisätään steriilisuodatettua kanamysiinikantaliuosta 0,1 ml / 100 ml alustaa. Sekoitetaan hyvin ja valetaan agar Ø 9 cm petrimaljoille laminaari-kaapissa, n. 20 ml/malja. (kanamysiinin loppukonsentraatio on 10 µg/ml). Annetaan maljojen pinnan kuivahtaa ennen näytteen pintalevitystä (tärkeää!). Maljojen ja agarin pitkäaikainen säilytys +4 °C tai kylmähuoneessa.