



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Tomi Myllynen

Esiarvio NIR-teknologian käytöstä fermentaation kontrolloimisessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

6.5.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Tomi Myllynen Esiarvio NIR-teknologian käytöstä fermentaation kontrolloimisessa 35 sivua + 2 liitettä 6.5.2019
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Lehtori Eija Koriseva Jatkuvan parantamisen asiantuntija Sauli Toikka
<p>Tässä insinööriyössä tehtiin esiselvitys NIR-teknologian hyödyntämisestä teollisen fermentointiprosessin kontrolloinnissa. Työn tavoitteena oli arvioida, voidaanko NIR (Near Infrared Spectroscopy) -menetelmää hyödyntäen saada luotettava analyttinen korrelaatio fytaasiaktiivisuuden ja kokonaisproteiinikonsentraation kasvulle fermentointiprosessin aikana. Toissijaisena tavoitteena oli selvittää, eroavatko perinteiseen märkäkemiaan perustuvalla kokonaisproteiinimääritysmenetelmällä saadut analyysitulokset merkittävästi kokonaistyyppimenetelmän tuloksista. Tämä insinööri työ tehtiin ROAL Oy:n toimeksiannosta.</p> <p>Esiselvityksen kohteeksi valittiin <i>Trichoderma reesei</i> -pohjaisen fytaasituotantokannan fermentointiprosessi. Referenssimenetelminä käytettiin ROAL:n prosessikontrollinnissa käyttämiä märkäkemiaan perustuvia fytaasiaktiivisuuden, kemiallisen kokonaisproteiinin (ProtB) ja kokonaistyyppimääritykseen perustuvan kokonaisproteiinin määritysmenetelmiä. NIR-näytespektrien mittaamiseen käytettiin Brukerin MPA-lähi-infrapunaspektrofotometriä ja IN271-transflektoanturia. Työssä käytettiin fermentaationäytteitä kolmesta eri teollisen mittakaavan fytaasifermentaatiosta.</p> <p>Fytaasituotantokannan fermentointinäytteille pystyttiin rakentamaan NIR-kalibrintimallit niin fytaasiaktiivisuudelle kuin kokonaisproteiinimäärälle. Kalibrintimallien sisäisessä validoinnissa tehdyt fytaasi- ja kokonaisproteiinimallien (kokonaistyyppimenetelmä) määrityskertoimet (R^2) olivat yli 95 %. ProtB-mallin määrityskerroin oli pyöristettynä 94 %. Hyvän NIR-mallin tunnusarvona on yli 90 % R^2. Ulkoista validointia ei pystytty tekemään laitteisto-ongelmien vuoksi.</p> <p>ProtB:n ja kokonaistyyppimenetelmän määritystulosten havaittiin korreloivan melko hyvin. Kokonaistyyppimenetelmän kokonaisproteiinitason havaittiin kuitenkin olevan keskimäärin 9,8 % korkeampi kuin ProtB-menetelmän analyysitaso.</p> <p>Insinööriyössä saavutettiin halutut tavoitteet. Esiarvion perusteella NIR-teknologiaa voidaan hyödyntää fytaasituotantokannan fermentaation seurannassa ja kontrolloinnissa fytaasiaktiivisuuden sekä kokonaisproteiinituotannon osalta.</p>	
Avainsanat	NIR, fermentaatio, <i>Trichoderma reesei</i> , entsyymi, proteiini

Author Title Number of Pages Date	Tomi Myllynen Preliminary Assessment of the Use of NIR Technology to Control Fermentation 35 pages + 2 appendices 6 May 2019
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio and Chemical technology
Professional Major	Bio and Food technology
Instructors	Eija Koriseva, Lecturer Sauli Toikka, Continuous Improvement Expert
<p>In this thesis, a preliminary study was made on the use of NIR technology in controlling the industrial fermentation process. The aim of the thesis was to evaluate whether the NIR (Near Infrared Spectroscopy) method can provide a reliable analytical correlation between the increase in phytase activity and total protein concentration during the fermentation process. The secondary objective was to determine whether the analytical results obtained by the total protein analyze based on conventional wet chemistry significantly differed from the results of the total nitrogen method. This thesis was commissioned by ROAL Oy.</p> <p>The process of fermentation of a phytase production base based on <i>Trichoderma.reesei</i> was selected as the subject of the preliminary study. Reference methods used were wet chemistry based phytase activity, chemical protein (ProtB) and total nitrogen protein analyzes that are used in ROAL's process control. The NIR sample spectra were measured using a Bruker MPA near-infrared spectrophotometer and an IN271 transflection sensor. Fermentation samples from three different industrial scale phytase fermentations were used in the thesis.</p> <p>For the phytase production fermentation samples, NIR calibration models could be constructed for both phytase activity and total protein. In the internal validation of the calibration models, the determination coefficients (R^2) of the phytase and total protein model (total nitrogen method) were over 95 %. The determination coefficient of the ProtB model was rounded to 94 %. R^2 of a good NIR model is over 90 %. External validation could not be performed due to hardware problems.</p> <p>The results of the ProtB and total nitrogen method were found to correlate quite well. However, the total protein level of the total nitrogen method was found to be, on average, 9.8 % higher than that of the ProtB method.</p> <p>The thesis achieved the desired goals. Result of this study indicated that NIR technology can be utilized for monitoring of phytase activity and total protein production during industrial fermentation process.</p>	
Keywords	NIR, fermentation, mold, enzyme, protein, OPUS

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	ROAL Oy:n fermentointiprosessi	2
2.1	ROAL Oy:n prosessin kuvaus	2
2.2	Lopputuotteet	4
2.3	Fytaasituotantokanta	5
3	NIR-teknologia	6
3.1	Elektromagneettinen säteily	6
3.2	NIR-perusteet	7
3.3	FT-NIR-spektrofotometria	9
3.4	NIR-tekniikan edut ja rajoitukset	12
4	Multivariatiivinen kalibrointimenetelmä	13
4.1	PLS-algoritmi	13
4.2	NIR-mallin rakentaminen	14
4.3	NIR-mallin sisäinen ja ulkoinen validointi	16
4.4	NIR-mallin päivitys	17
5	Materiaalit ja menetelmät	18
5.1	Näytteenottosuunnitelma	18
5.2	Fytaasiaktiivisuuden määrittäminen	19
5.3	Kemiallinen kokonaisproteiinin määrittäminen	20
5.4	Proteiinipitoisuuden määrittäminen tyypianalysaattorilla	21
5.5	NIR-mittaukset	22
5.5.1	MPA-lähi-infrapunaspektrofotometri	22
5.5.2	NIR-spektrien mittaukset IN271-anturilla	23
5.5.3	OPUS-analyysiohjelma	24
5.5.4	OPUS-analyysiohjelmiston asetukset	24
6	Tulokset	25
6.1	Kalibraatiosarjan referenssitulokset	25

6.2	Fytaasituotantokannan NIR-malli	26
6.3	Fytaasituotantokannan NIR-mallin sisäinen validointi	28
6.4	Fytaasituotantokannan NIR-mallin ulkoinen validointi	30
6.5	Fytaasituotantokannan ProtB ja kokonaistyyppimääritysten ero	31
7	Yhteenveto	33
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. IN271-anturin materiaalit, mitat, paine- ja lämpötila-alueet	
	Liite 2. Käyttöohje NIR-mallin rakentamiselle OPUS-analyysiohjelmistolla	

Lyhenteet

AFK	<i>Trichoderma.reesei</i> -pohjainen fytaasituotantokanta
ATR	Heikennetty kokonaisheijastuskyky
BIAS	Systemaattisen hajonnan keskiarvo oikean ja määritetyn arvon välillä
DSP	Down Stream Prosessing; jälkikäsittelyprosessi
FT-NIR	Fourier-muunnos-lähi-infrapunaspektrofotometria
H15	Nestemäinen entsyymipuolivalmiste
K15	Stabiloitu nestemäinen entsyymipuolivalmiste
NIR	Lähi-infrapuna
NIRS	Lähi-infrapunaspektrofotometria
RPD	Ratio of standard error of Performance to standard Deviation; suorituskyvyn standardivirheen ja keskihajonnan suhde
SNV	Standard Normal Variate; standardinormaalijakauma
R^2	Määrittyskerroin
r^2	Korrelaatiokerroin
RANK	PLS-muuttujien määrä
RMSECV	Sisäisen validoinnin keskimääräinen neliövirhe
RMSEP	Ennusteen keskimääräinen neliövirhe

1 Johdanto

Tämän insinööritoiminnan tarkoituksena oli arvioida, voidaanko NIR-teknologiaa soveltaa teollisen fermentointiprosessin kontrolloinnissa. Insinööritoiminta tehtiin yhteistyössä ROAL Oy:n bioteknisen tuotantolaitoksen kanssa. Tehdas sijaitsee Rajamäen teollisuusalueella.

ROAL tuottaa entsyymejä teollisuuden tarpeisiin suuressa mittakaavassa. Entsyymit tuotetaan fermentoimalla erilaisia mikrobituotantokantoja. Entsyymifermentaatio on aseptinen prosessi, jonka tuottavuus riippuu suuresti siitä, millä parametreillä fermentaatiota ohjataan. Fermentointiprosessia seurataan normaalisti sekundääristen parametrien, kuten hapenkulutuksen, hiilidioksidin tuoton, lämmöntuoton ja ravinnepulutuksen avulla. Fermentoinnin aikaisen entsyymituoton seuranta perustuu märkäkemiaan perustuviin entsyymiaktiivisuusmenetelmiin. Märkäkemiassa tutkittava entsyymi hajottaa substraattia puskuriliuoksessa. Muodostuvan hajoamistuotteen määrä riippuu tutkittavan entsyymin konsentraatiosta. Märkäkemian menetelmät perustuvat useimmiten fotometriaan. Entsyymin määrä näytteessä ilmoitetaan entsyymiaktiivisuutena.

Ongelma märkäkemian käytössä on aikaviive näytteenoton ja analyysituloksen saamisen välillä sekä menetelmien suuri tuloshajonta. Optimitilanteessa entsyymituottoa voitaisiin seurata reaaliajassa. Viimeaikaiset edistysaskeleet NIR-teknologiassa ovat mahdollistaneet multikomponenttianalyysin heterogeenisistä näytteistä. NIR-teknologian suurin etu on mahdollisuus in-line- ja on-line-analytiikkaan ilman erillistä näytekäsittelyä. Primäärin parametrin (entsyymituotto) reaaliaikainen seuranta voi mahdollistaa fermentointiprosessin tehokkaamman optimoinnin.

Tämän insinööritoiminnan ensisijainen tavoite oli selvittää, voidaanko NIR-teknologiaa hyödyntää heterogeenisten fermentaationäytteiden analytiikassa. Työssä käytettiin homeperäisen fytaasituotantokannan fermentointinäytteitä. NIR-spektrien ja märkäkemiallisten tulosten pohjalta rakennettiin NIR-mallit fytaasi- ja kokonaisproteiinipitoisuuksille. Mallien kyky ennustaa määritettäviä parametrejä todennettiin erillisillä validointinäytteillä. Työssä selvitettiin myös, eroavatko märkäkemiaan perustuvalla kokonaisproteiinimääritysmenetelmällä saadut tulokset kokonaistyyppimenetelmän tuloksista.

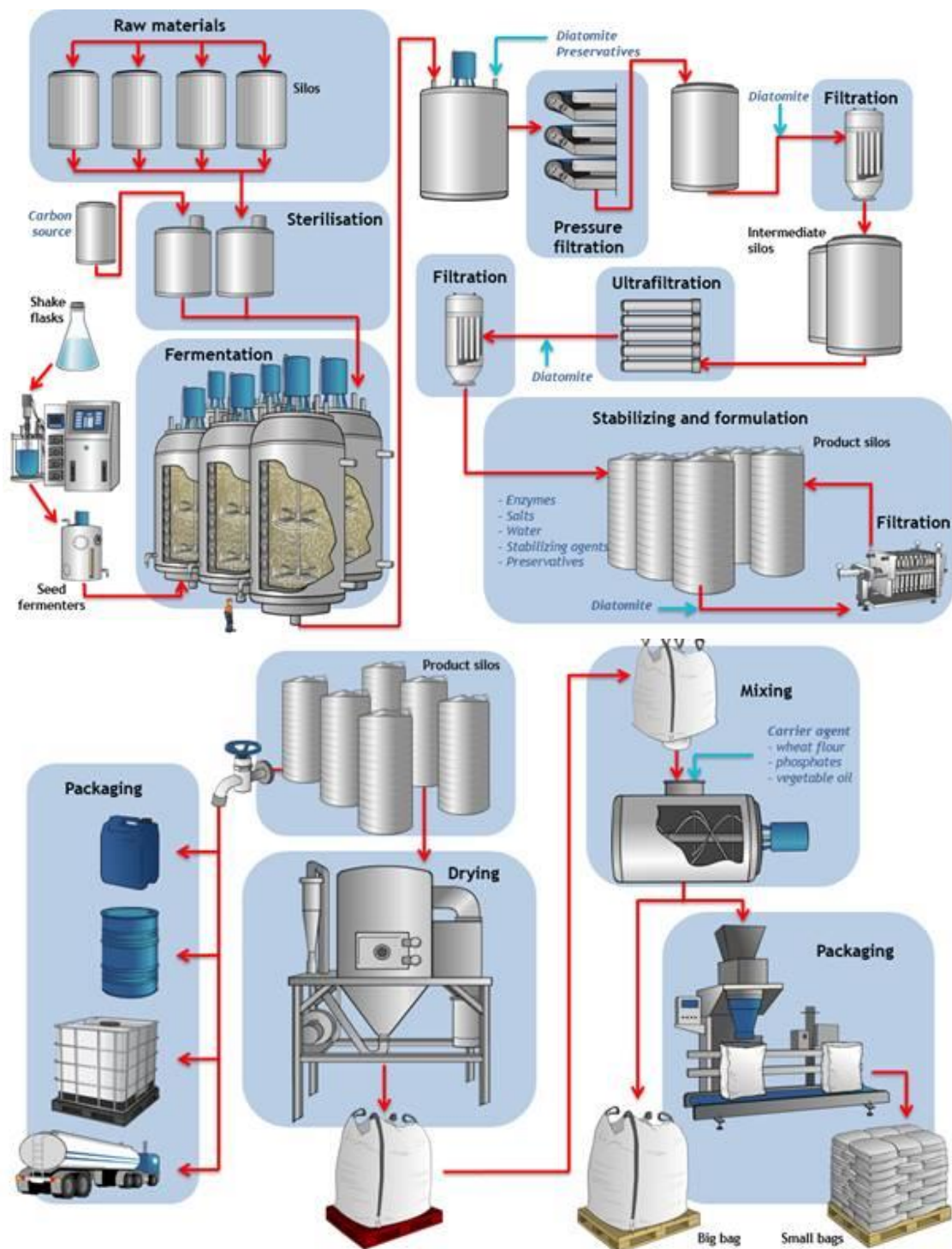
2 ROAL Oy:n fermentointiprosessi

2.1 ROAL Oy:n prosessin kuvaus

Entsyymifermentaatioissa tuotantomikrobeja kasvatetaan kontrolloidussa aseptisessä ympäristössä. ROAL:lla fermentoidaan bakteeri- ja homekantoja. ROAL:lla käytettävät tuotantokannat tuottavat entsyyminsä solun ulkopuolelle, mikä helpottaa entsyymien talteenottoa jälkikäsittelyssä. Jokaisella mikrobilajilla on omat fermentaatioprofiilinsa ja erityisvaatimuksensa. Fermentointiprosessin kesto vaihtelee suuresti fermentoitavan mikrobien tyypistä riippuen.

ROAL:n tuotantoprosessi voidaan karkeasti jakaa fermentaatio-, jälkikäsittely- ja lopputuotevalmistusvaiheisiin. Tuotantoprosessin vaiheet on esitelty kuvassa 1. Fermentointiprosessi aloitetaan ravistelemalla tuotantokantaa erlenmayer-pullossa. Kasvatus käynnistetään erikseen valmistetuista tuotantokantatallenteista. Tuotantokannan siirryttyä kasvuvaiheeseen, elinvoimainen kanta siirrostetaan steriilisti vaiheittain tuotantofermentoreihin. Fermentointiprosessissa tuotantokannalle syötetään steriilejä ravinteita, ilmaa sekä säädellään fermentointimassan lämpötilaa. Tuotantokannan kasvua seurataan monitoroimalla pH-, CO₂-, O₂-tasoja sekä fermentointialustan viskositeettia. Entsyymintuottoa seurataan fermentointialustasta otetuista näytteistä tehtävin kokonaisproteiini- sekä entsyymianalyysin.

Fermentointi lopetetaan, kun entsyymituotto loppuu. Tässä vaiheessa fermentointimassa jäädytetään ja siirretään välisäiliöön (harvesteriin). Harvesteriin siirron jälkeen on vuorossa jälkikäsittely (DSP), jossa mikrobimassa poistetaan suodattamalla ja entsyymivalmiste konsentroidaan. DSP:ssä entsyymiliuos suodatetaan vaiheittain käyttäen erilaisilla painesuodattimia. Mikrobimassan ja epäpuhtauksien poisto tapahtuu levy-, paine- ja kynttiläsuodattimilla. Entsyymiliuoksen konsentroidointi tapahtuu ultrasuodattimella. Ultrasuodatuksessa jälkikäsittelyliuoksesta poistetaan vettä ja suoloja. Muodostunut entsyymipuolivalmiste (H15) stabiloidaan. Stabiloitu entsyymipuolivalmiste (K15) voidaan käyttää joko sellaisenaan nestemäisten lopputuotteiden valmistuksessa tai se voidaan kuivata. Kuiviin lopputuotteisiin lisätään kantaja-aineita, kuten vehnäjauhoa. Lopputuotteet pakataan neste- ja jauhepakkauslinjoilla ja lähetään loppuasiakkaalle.



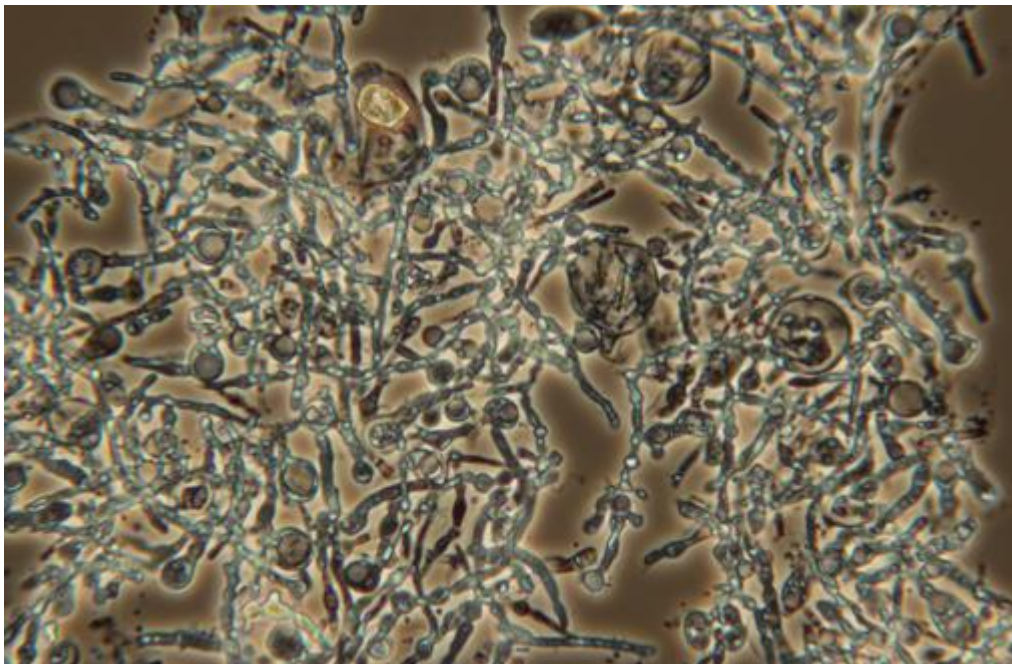
Kuva 1. ROAL:n fermentointi- ja jälkikäsittelyprosessi sekä lopputuotteiden valmistus. [1]

2.2 Lopputuotteet

ROAL Oy tuottaa entsyymejä elintarvike-, rehu-, tekstiili-, pesuaine- ja paperiteollisuuden käyttöön. ROAL:lla tuotetaan noin 20 eri entsyymityyppiä, pääosin sellulaaseja, fytaaseja ja lipaaseja. ROAL:n entsyymituotteita käytetään elintarviketeollisuudessa esimerkiksi mehujen kirkastamisessa sekä taikinan koostumuksen ja leivontalopputuotteen säilyvyyden parantamisessa. Rehuteollisuudessa entsyymejä käytetään rehun sisältämän fytaasin pilkkomisessa. Entsyymikäsittely parantaa rehun ravintoarvoa ja vähentää lannan mukana vapautuvan fosforin määrää. Tekstiili- ja paperiteollisuudessa käytetään mm. puuvilla- ja selluloosakuituja pilkkovia entsyymejä. Pesuaineteollisuus puolestaan tarvitsee proteaaseja ja lipaaseja lopputuotteissaan.

2.3 Fytaasituotantokanta

Tässä työssä tutkittu *Trichoderma reesei* -pohjainen filamenttihomekanta (AFK) on muokattu ylituottamaan bakteeriperäistä fytaasia (kuva 2). *T.reesei* -isäntäkannan ominaisuuksia (mm. proteiinintuoton parantaminen, proteaasintuoton esto, jne.) on paranneltu niin perinteisellä mutageneesillä kuin geeniteknisin menetelmin. Fytaasituotantokasetti on integroitu isäntäkannan genomiin. Fytaasientsyymi ekspressoidaan vahvan CBH1-promoottorin avulla. Kyseinen tuotantokanta voi erittää proteiineja fermentointialustaan jopa 100 g/l.

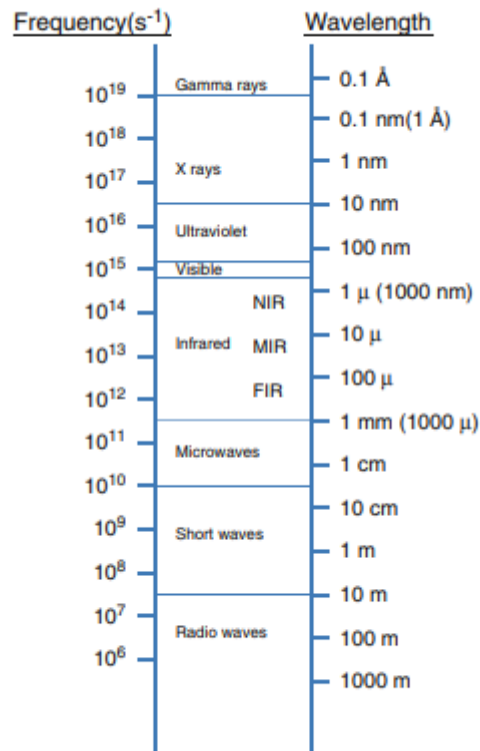


Kuva 2. Mikroskooppikuva fytaasituotantokannan fermentointinäytteestä. [1]

3 NIR-teknologia

3.1 Elektromagneettinen säteily

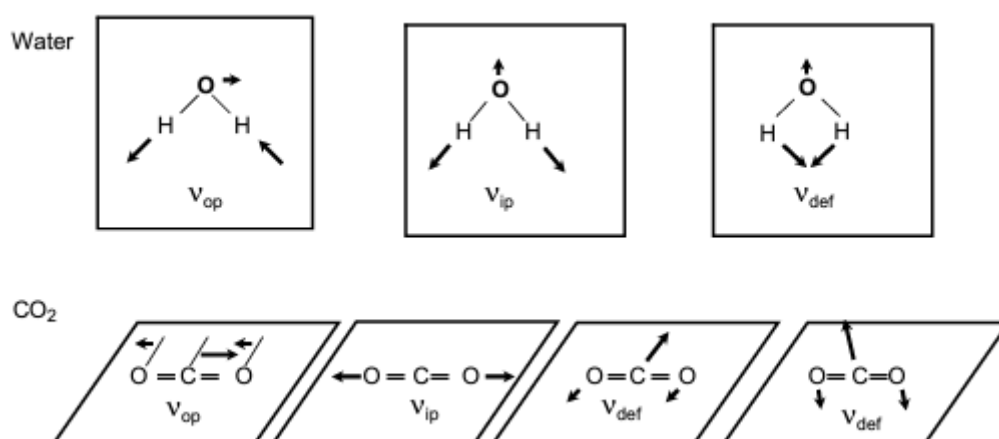
Elektromagneettisella säteilyllä tarkoitetaan elektromagneettisia aaltoja, jotka koostuvat nopeasti värähtelevistä magneetti- ja sähkökentistä. Elektromagneettisen aallon energiaa mitataan fotoneilla eli säteilykvanteina. Elektromagneettinen säteily on luokiteltu kahdeksaan eri luokkaan. Luokat on kuvattu kuvassa 3. Elektromagneettisen säteilyn nopeus on tyhjiössä noin $3,0 \cdot 10^8$ m/s eli valonnopeus (c). Säteilyn energian määrä perustuu sen aallonpituuteen: mitä lyhyempi aallonpituus on, sitä suurempi energia. [2, s.890-894]



Kuva 3. Elektromagneettisen säteilyn alue. [6, s.2]

3.2 NIR-perusteet

Lähi-infrapunaspektrofotometria (NIRS) perustuu orgaanisten yhdisteiden absorptioon ja emission mittaamiseen, kun näytteeseen syötetään $14285 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ aaltoluvun infrapunasäteilyä [4, s.2]. NIR-spektrofotometria perustuu NIR-säteilyn aiheuttamiin muutoksiin tutkittavan dipolisen molekyylin kovalenttisisidosten värähtelyssä. Pääsääntöisiä värähtelymuotoja ovat kierto, vääntyminen ja venyminen. Lineaarisilla molekyyleillä on enemmän mahdollisia liikeratoja kuin ei-lineaarisilla. Kuvassa 4 esitetään vesimolekyylin mahdolliset värähtelymuodot; asymmetrinen venyminen, symmetrinen venyminen, sekä saksiliike. Hiilidioksidilla puolestaan löytyy asymmetrisen ja symmetrisen liikkeen lisäksi kaksi eri versiota saksiliikkeestä. [6, s.3-4]

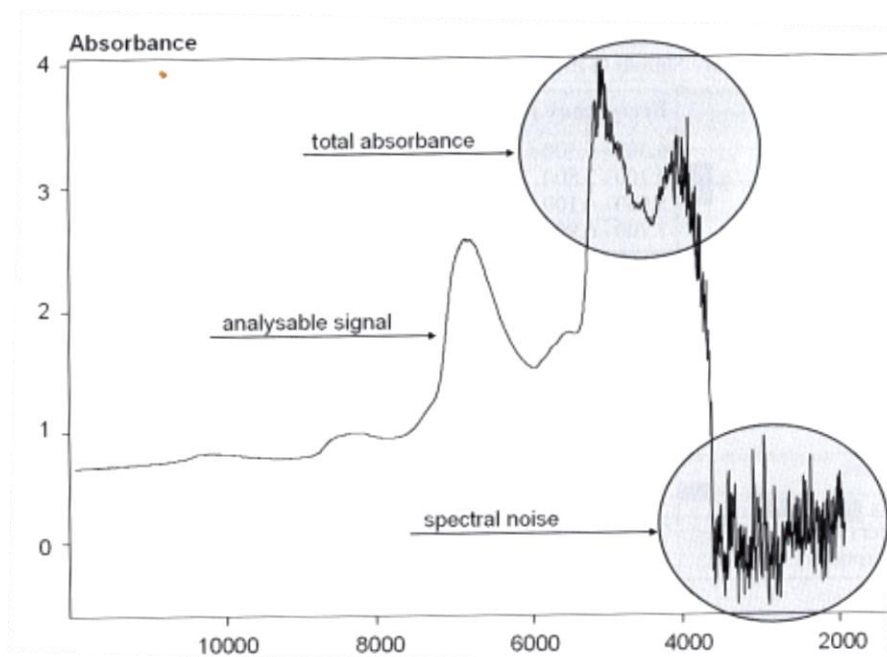


Kuva 4. Dipolisten yhdisteiden molekulaarinen liike. [s.9, 2]

NIR-tekniikassa käytettävä aaltolukualue määrittyy absorptiovasteen voimakkuuden mukaan. FT-NIR menetelmässä käytettävät resonanssialueet sijaitsevat yleensä 0,7–1,0 välisellä absorptioalueella. Menetelmässä voidaan käyttää resonanssialueita 2,5 absorbanssiarvoon saakka, jos 0,7–1,0 absorptioalueelta ei löydy kalibraatioon soveltuvia resonanssialueita. Yli 2,5:n absorbanssialueita ei pidä ottaa huomioon, koska ne kasvattavat kalibraation epävarmuutta. Instrumentin anturin lineaarisuus pitää varmistaa, jos aikomuksena on käyttää suurta absorptioaluetta. [5, s.40]

Kuvassa 5 on esitetty vedestä ajettu spektri aaltolukualueelta $12000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$. Totaallinen absorbanssialue spektrissä on aaltolukualueella $5200 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ja liian

pieni absorptioalue on aaltolukualueella 4000–2000 cm^{-1} . Käytettävä spektrin absorptioalue sijaitsee aallonlukualueella 8000–6000 cm^{-1} . [5, s.39-40]



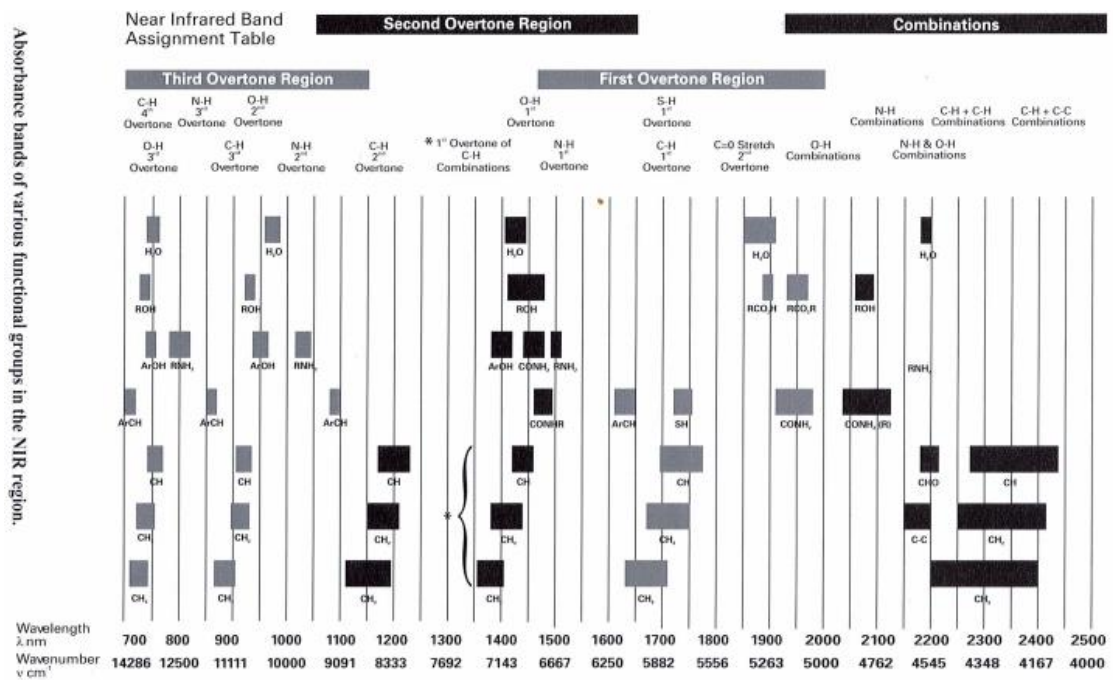
Kuva 5. NIR-spektri vedestä. [5, s.38]

Taulukosta 1 on esitelty erilaisten orgaanisten molekyylien funktionaalisten ryhmien absorptioalueet NIR-aallonpituus- ja aaltolukualueilla. Funktionaaliset ryhmät voivat reagoida monella eri aallonpituusalueella. Alueet voidaan jakaa neljään eri osa-alueeseen:

- ensimmäinen overtone-alue (n. 7000–5000 cm^{-1})
- toinen overtone-alue (n. 10000–6000 cm^{-1})
- kolmas overtone-alue (n. 14000–9000 cm^{-1})
- kombinaatioalue (n. 5200–4000 cm^{-1})

Overtone-alueilla tarkoitetaan funktionaalisten ryhmien absorptioalueita suhteutettuna niiden vastevoimakkuuteen. Jokaisella funktionaalisella ryhmällä on omat overtone- ja kombinaatioalueensa. Ensimmäisellä overtone-alueella ovat funktionaalisten ryhmien vahvimmat absorptiovasteet. Absorptiovaste heikkenee siirryttäessä toiselle ja kolmannelle overtone -alueelle. Kombinaatioalueen absorptiovaste on monissa tapauksissa myös vahva. Kombinaatioalueella resonoivat saman aikaisesti monet eri funktionaaliset ryhmät. [5, s.39-41, s.53-55]

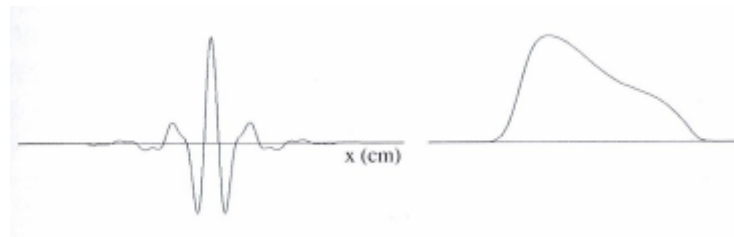
Taulukko 1. Absorbanssialueet eri funktionaalisille ryhmille. [5, s.41]



Spektriä tulkittaessa on löydettävä absorptioalueet, jotka korreloivat parhaiten määritetävän komponentin konsentraation kanssa. Taulukkoa 1 ja kuvaa 5 vertaamalla voidaan huomata, että veden ensimmäinen overtone-alue on liian korkea ja toinen overtone-alue on käytettävällä absorptioalueella. Oikeiden absorptioalueiden löytäminen kalibrointia varten määrittää kalibraatiomallin tarkkuuden ja käyttökelpoisuuden. Tämän takia spektrin tulkitseminen on tärkein ja aikaa kuluttavin asia NIR-spektroskopiassa. [5, s.53-55]

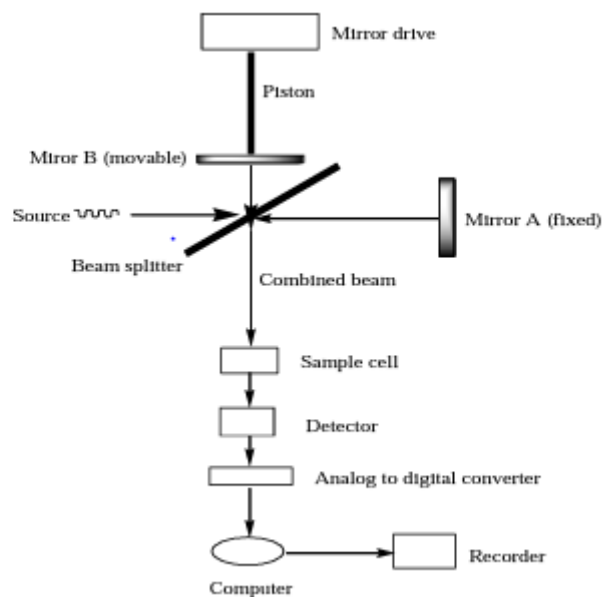
3.3 FT-NIR-spektrofotometria

FT-NIR eli Fourier-muunnos-lähi-infrapunaspektroskopiassa näytteen absorbanssi ja emissio interferogrammi muunnetaan Fourier-muunnosalgoritmia käyttäen tulkittavaksi spektriä (kuva 6). Tämä tehdään sen takia, koska FT-NIR menetelmä tuottaa paljon enemmän mittausdataa verrattuna perinteiseen spektrofotometriaan. [4, s.6, s.11]



Kuva 6. Interferogrammi ja siitä Fourier-muunnoksella tehty absorptiospektri. [7, s.11]

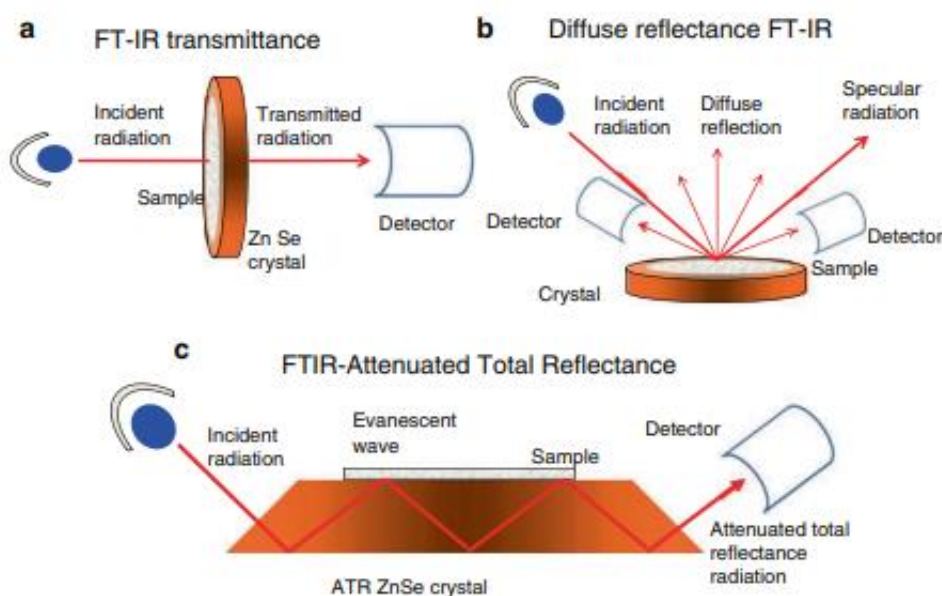
Tyypillinen FT-NIR-laitteiston rakenne on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. FT-NIR-spektrofotometrin kaavakuva. [4, s.3]

FT-NIR-spektrofotometriassa halutun aallonpituuden NIR-säteilyä suunnataan näyttöeseen. Tarvittava säteily tuotetaan käyttämällä laser- sekä NIR-säteilylähteitä. Tuotetun säteilyn aaltoluku säädetään haluttuun arvoon käyttämällä kahdesta peilistä ja säteenjakajasta muodostettua systeemiä. Kyseinen systeemi sisältää FT-NIR-spektrofotometrin ainoan liikkuvan osan, joka on NIR-säteilyn suuntaamiseen käytettävä peili. Liikkuvien osien vähäinen määrä mahdollistaa laitteiston kestävyuden ja tarkkuuden. Mittausmenetelmästä riippuva vaste mitataan käyttäen detektoria. Detektori tuottaa interferogrammin, joka muutetaan tietokoneella Fourier-algoritmia käyttäen tulkittavaksi spektriksi. [6, s.7-9]

NIR-spektrien mittaamiseen käytettävä menetelmä valitaan tutkittavan näytteen ominaisuuksien mukaan. Kuvassa 8 esitellään kolme päämenetelmää. Kaikissa menetelmissä NIR-säteily ohjataan ZnSe-kristallin lävitse detektorille. ZnSe-kristalliastioiden tai ikkunoiden tarkoituksena on joko säädellä säteilyn kulkemaa matkaa näytteessä tai eristää mittausrakenteisto ulkomaailmasta. Näin säilytetään standardiolosuhteet mittausrakenteiston sisällä. ZnSe-kristalleja käytetään, koska ionisidokset eivät reagoi NIR-säteilyn kanssa. ZnSe-kristallien käyttö mahdollistaa laadukkaan NIR-spektrin saannin tutkittavasta näytteestä. [6, s.8-9]



Kuva 8. a) Transmittanssi FT-IR b) Diffuusirefleksio FT-IR c) Heikennetty kokonaisheijastus FT-IR (ATR). [6, s.9]

FT-IR transmittanssimenetelmällä mitataan, kuinka paljon NIR-säteilyä jää näytteeseen eli paljonko näyte absorboi säteilyä eri aallonpituuksilla. Tämä menetelmä soveltuu näytteille, jotka päästävät NIR-säteilyä lävitseen. Tällaisia näytteitä ovat esimerkiksi nestemäiset tai osittain nestemäiset näytteet. Huomioitavaa on, että NIR-säteily ei käyttäydy kaikissa tapauksissa samalla tavalla kuin näkyvä valo. Mittaus tapahtuu yleensä käyttäen ZnSe-kristallikyvettä. [6, s.8-9]

Diffuusirefleksio FT-IR-menetelmällä mitataan, kuinka paljon NIR-säteily heijastuu näytteestä. Tätä menetelmää käytetään kiinteiden näytteiden analytiikassa. Vähäenerginen NIR-säteily ei tunkeudu syväälle kiinteään näytteeseen, joten kyseisellä menetelmällä

pystytään analysoimaan vain näytteen pintakerrosta. Näytteen mittaamisessa käytetään yleensä ZnSe-kristallista valmistettua petrimaljaa. [6, s.8-9]

Heikennetty kokonaisheijastus FT-IR eli ATR-menetelmässä NIR-säteily ohjataan useaan kertaan näytteeseen. Tämä pidentää säteilyn kulkemaa matkaa näytteessä vahvistaen näin näytteestä saatua vastetta. ATR-menetelmää käytetään nestemäisten näytteiden analysoinnissa, kun määritettävän yhdisteen pitoisuus on pieni. Mittaus tapahtuu yleensä erikoisvalmistetussa kyvetissä, jossa on NIR-säteilyä heijastavat sisäpinnat. [6, s.8-9]

3.4 NIR-tekniikan edut ja rajoitukset

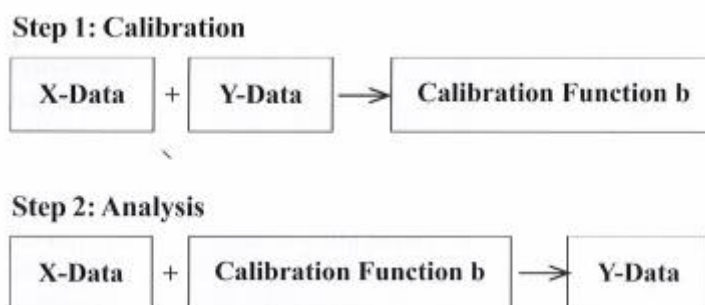
NIR on ei-hajottava tekniikka, joka mahdollistaa erittäin nopean orgaanisten yhdisteiden pitoisuuksien määrittämisen ilman näytteiden esikäsitteilyä. Näytteet voivat olla kiinteitä, nestemäisiä tai kaasumaisia. Menetelmä ei vaadi näytteiden punnitsemista, laimentamista tai reagoimista ulkopuolisen kemikaalin kanssa. [3, s.1]

NIR-mittauslaitteisto soveltuu prosessin seuraamiseen on-line- tai in-line-menetelmillä. NIR-teknologia on yhteensopiva multiparametriin määrittäisiin. Näytteestä voidaan yhden mittauksen avulla määrittää esimerkiksi proteiini-, rasva- ja hiilihydraattipitoisuus. Yhden NIR-mittauksen kesto on keskimäärin n. 15 sekuntia. NIR-laitteiston hinta ei ole teollisuuden mittakaavoissa kallis. NIR-tekniikan edut ovat huomattavat perinteisiin, useimmiten märkäkemiaan perustuviin analyysimenetelmiin verrattuna. [3, s.1]

NIR-tekniikalla on myös rajoituksensa. NIR-tekniikka ei sovellu epäorgaanisille näytteille eikä pienille pitoisuuksille ($C \leq 1000$ ppm). Lisäksi NIR-menetelmän käyttöönotto vaihe on erittäin työläs. NIR-mallin rakentamisen edellytyksenä on riittävän tarkka referenssi-analytiikka. NIR-mallin antama analyysituloks voi olla korkeintaan yhtä tarkka kuin käytetyn referenssimenetelmän antama tulos. NIR-mallin rakentamiseen tarvitaan vähintään 20 näytettä, jotka on analysoitu referenssimenetelmällä. NIR-mallit vaativat lisäksi jatkuvaa päivitystä, jotta ne pysyvät tarkkoina ja käyttökelpoisina. NIR on tekniikkana herkkä muutoksille näytteen kompositiossa. Kompositiomuutokset voivat vaikuttaa NIR-spekttriin vääristäen NIR-mallien antamia ennusteita. [3, s.1]

4 Multivariatiivinen kalibrointimenetelmä

Multivariatiivista kalibrointimenetelmää sovelletaan NIR-mallien rakentamiseen. Multivariatiivinen kalibrointimenetelmä on yksi kemometrian alalajeista, jota käytetään useiden eri komponenttien määrittämiseen näytteestä. Komponenttien määrittäminen toteutetaan muuttamalla spektrien alueet muuttujiksi ja vertaamalla kyseisiä muuttujia referenssitiloihin (kuva 9). Tämä tapahtuu NIR-teknologiassa PLS-algoritilla (ks. 4.1). Multivariatiivista kalibrointimenetelmää suositetaan nykyisin perinteisen spektrofotometrian sijaan, sillä multivariatiivinen kalibrointimenetelmä antaa usein tarkempia ja luotettavampia tuloksia pienemmällä vaivalla. Multivariatiivisen kalibroinnin parempi luotettavuus perinteisiin menetelmiin verrattuna johtuu siitä, että mitattavan määrän muutos voi näkyä spektrissä monilla eri aaltolukualueilla. Mahdollisten mittausta häiritsevien tekijöiden vaikutus voidaan näin minimoida. [5, s.3-7]



Kuva 9. Menetelmä aineen konsentraation selvittämiseksi. [5, s.4]

4.1 PLS-algoritmi

PLS-algoritmi eli pienimmän neliösumman menetelmä etsii tilastollisesti merkitseviä lineaarisia malleja annetusta referenssi- ja spektridatasta. Kyseistä algoritmia käytetään NIR-spektrometriassa paljon, koska se löytää pienimmätkin korrelaatiot NIR-spektrin ja referenssidatan väliltä. Menetelmä itsessään on erittäin työläs, mutta tietotekniikan kehityksen vuoksi sitä voidaan nykyään käyttää tehokkaasti. [5, s.7-11]

PLS-algoritmi perustuu spektridatan tiivistämiseen muuttujiksi, joita voidaan käyttää kalibroinnissa. PLS-algoritmin tuottamat muuttujat ovat luokiteltu numerollisesti laskevassa järjestyksessä. Muuttujien määrä määrittää, kuinka tarkasti spektrin muutokset otetaan

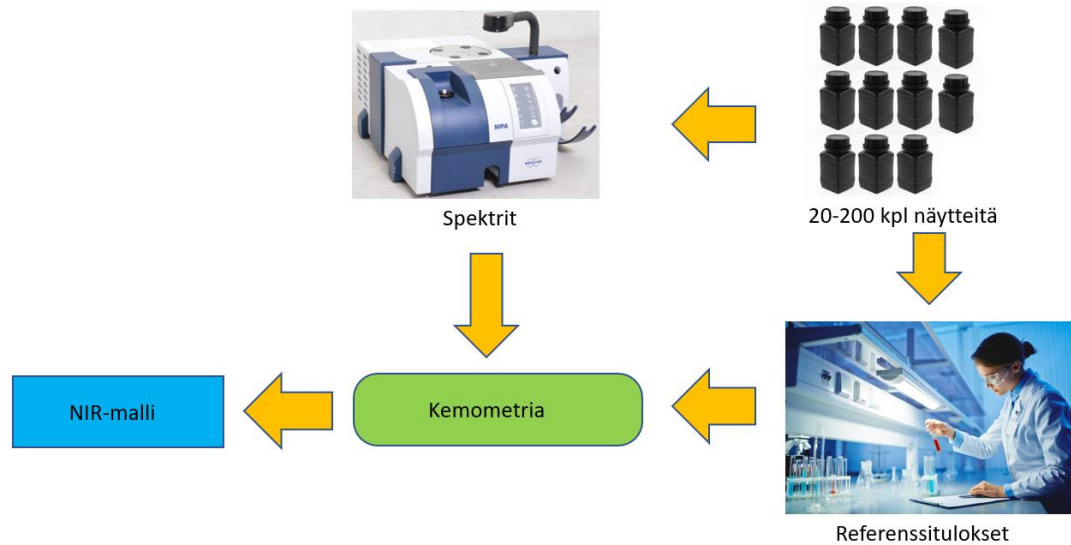
huomioon kalibroinnissa. Mitä enemmän PLS-muuttujia käytetään kalibroinnissa, sitä pienemmät spektrin muutokset analysointiohjelma ottaa huomioon. [5, s.7-11]

4.2 NIR-mallin rakentaminen

NIR-mallilla tarkoitetaan näytteiden NIR-spektrien ja referenssitulosten avulla rakennettua matemaattista funktiota. NIR-mallin rakentamiseen tarvitaan suuri määrä näytteitä (20–200 kpl), joista analysoidaan määritettävä suure referenssimenetelmällä sekä ajetaan NIR-spektrit (kuva 11). NIR-mallin tarkkuus korreloi kalibraationäytteiden määrän kanssa; mitä enemmän näytteitä, sitä tarkempi NIR-malli. Olosuhteiden pitää olla mahdollisimman standardisoidut mitattaessa NIR-spektrejä. Esimerkiksi lämpötilan muutokset aiheuttavat orgaanisissa molekyyleissä vetysidosten värähtelyä, mikä vaikuttaa NIR-spektreihin. NIR-mallin rakentaminen tapahtuu analysointiohjelmassa. Analyysiohjelma rakentaa NIR-mallin optimoimalla parhaimman mahdollisen kombinaation sille ehdotetuista esikäsittelyalgoritmeista ja aaltolukualueista. [5, s.26, s.53]

Hyvä NIR-spektri on

- mitattu standardiolosuhteissa
- hyvä signaali-kohinasuhde
- resonanssialueilla systemaattinen korrelaatiovaste mitattavaan suureen.
- haluttujen resonanssialueiden optimaalinen absorptiovaste on n. 0,7–1,0 välillä, mutta käyttökelpoinen alue on alle 2,5.



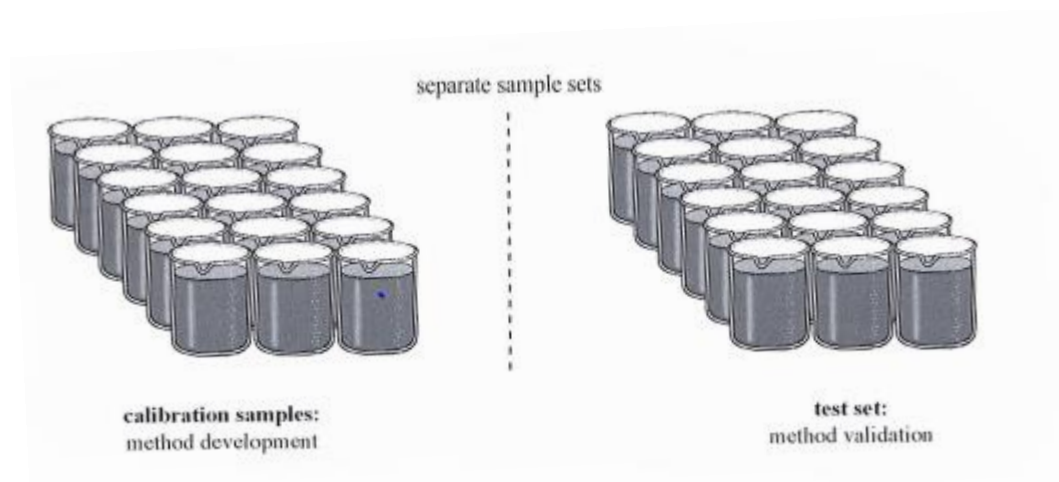
Kuva 10. NIR-mallin rakentaminen.

NIR-mallin rakentaminen analysointiohjelmissa alkaa mitattujen NIR-spektrien esikäsittelyllä. Selkeästi käyttökeltottomat spektrit seulotaan pois. Käyttökeltottomilla spektreillä tarkoitetaan muista spektreistä selkeästi poikkeavia yksilöitä. Poikkeamat voivat johtua esimerkiksi mittausvirheistä. Spektrien tarkistuksen jälkeen tulee käytettävien esikäsittelyalgoritmien sekä aaltolukualueiden valinta. Esikäsittelyalgoritmeja voi valita useita, mutta yleensä käytetään ensimmäisen ja toisen johdannaisen sekä standardinormaali-jakauman algoritmeja. Aaltolukualueiden valinta tapahtuu selvittämällä tutkittavan yhdisteen funktionaaliset ryhmät ja valitsemalla niiden resonanssivasteen mukaan aaltolukualueet (Taulukko 1). Analyysiohjelma optimoi annetuista asetuksista parhaimman mahdollisen kombinaation NIR-mallin rakentamiseen. [5, s. 35-36]

Analyysiohjelmisto käyttää optimoinnissa syntyneiden mallien paremmuusjärjestyksen määrittämisessä RMSECV:tä eli sisäisen validoinnin keskimääräistä neliövirhettä. Optimoinnista saaduista malleista valitaan paras sisäiseen validointiin. Sisäinen validointi suoritetaan, koska se antaa enemmän tilastollisia arvoja mallin todenmukaisuuden arviointiin. Saaduista arvoista tärkeimmät ovat R^2 eli määrityskerroin sekä RMSECV. Malli on hyvä, kun R^2 on yli 90 ja RMSECV on mahdollisimman pieni suhteessa määritettävän komponentin arvoihin. Validointiprosessi uusitaan, kunnes mallin tarkkuus ja todenmukaisuus on mittaustarkoitukseen riittävä. [5, s. 19-22]

4.3 NIR-mallin sisäinen ja ulkoinen validointi

Sisäisen validoinnin tarkoituksena on havaita ja poistaa kalibraatiosarjaan soveltumattomat näytteet (Outlier) NIR-mallista. NIR-mallin sisäinen validointi tapahtuu automaattisesti analysointiohjelmassa. Sisäisessä validoinnissa jokainen NIR-mallin luontiin käytetty näyte irrotetaan kalibraatiosarjasta ja analysoidaan erikseen mallia vastaan. Validoinnin jälkeen näyte joko poistetaan tai palautetaan kalibrointisarjaan. Validointia jatketaan, kunnes kaikki kalibraatiosarjan näytteen on kertaalleen käyty lävitse. Taulukoissa 7, 8 ja 9 on esimerkki sisäisen validoinnin tuottamista taulukoista. Tärkeimmät luvut kyseisessä taulukossa ovat R^2 ja RMSECV. Muita huomioitavia arvoja ovat RANK sekä BIAS. RANK kertoo PLS-algoritmin muuttujien määrän suhteessa RMSECV-arvoon. Käytettävien muuttujien määrä halutaan pitää mahdollisimman korkeana. RMSECV ei kuitenkaan saa kasvaa muuttujien lisäyksen seurauksena. BIAS kertoo systemaattisen hajonnan keskiarvon oikean ja määritetyn arvon välille, eli kuinka paljon malli ennustaa ylitse tai alitse määrittelevien kalibraatiosarjan näytteiden arvoja. Sisäinen validointi antaa arvion mallin tarkkuudesta, mutta ei täyttä varmuutta mallin todenmukaisuudesta. [5, s.14-15, s.71, s.78]



Kuva 11. Sisäisen ja ulkoisen validoinnin näytesarjat. [5, s.16]

Ulkoisessa validoinnissa varmistetaan NIR-mallin todenmukaisuus analysoimalla riittävä määrä tuntemattomia näytteitä (kuva 11). NIR-mallin ennustamien tulosten tulee olla samassa linjassa referenssitulosten kanssa. RMSECV muuttuu ulkoisessa validoinnissa

RMSEP-arvoksi, eli ennusteen keskimääräiseksi neliövirheeksi. RMSEP käyttäytyy samalla tavalla kuin RMSECV. [5, s.16-17]

NIR-ennustemalli ei mahdollista ekstrapolointia. NIR-mallilla pystytään analysoimaan vain näytteitä, joiden mitattava suure on kalibraatioalueella. Kalibraatioaluetta voidaan laajentaa lisäämällä näytteitä, jotka ovat mitattavan suureen osalta kalibraatioalueen ulkopuolella. Hyvän NIR-mallin R^2 on yli 95 % ja kalibraationäytemäärä on mahdollisimman suuri (yli 20 kpl). Malli ei saa sisältää useita selvästi kalibraatiosarjasta poikkeavia näytteitä (Outliers). Lisäksi kalibraatiosarjan mitattavien suureiden tulee olla jakautuneita tasaisesti koko kalibraatioalueelle. [5, s.48-51]

4.4 NIR-mallin päivitys

NIR-malli vaatii jatkuvaa ylläpitoa ja tarkastelua. Tarkastelun avulla voidaan havaita hitaasti tapahtuvia muutoksia mittausrakenteissa tai näytteessä sekä reagoida ajoissa näihin muutoksiin. Ylläpidon toimenpiteissä huomattavat muutokset voivat tarkoittaa tarvetta päivittää NIR-mallia. NIR-mallien ylläpidolle ei kuitenkaan voida asettaa yleispäteviä vaatimuksia. [5, s.49-51, 8, 9]

NIR-mallin päivityksessä lisätään useimmiten uusia näytteitä kalibrointisarjaan. Näin voidaan kasvattaa NIR-mallin ennustealuetta ja kompensoida pieniä muutoksia näytteiden koostumuksessa ilman uuden NIR-mallin rakentamista. Jos uudet kalibraationäytteet eroavat mallin luonnissa käytetyistä näytteistä liian paljon, on yhtenä vaihtoehtona kokonaan uuden NIR-mallin rakentaminen. NIR-mallin päivitys on pakollinen toimenpide, jos malli halutaan pitää tarkkana ja luotettavana. [5, s.49-51, 8, 9]

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Näytteenottosuunnitelma

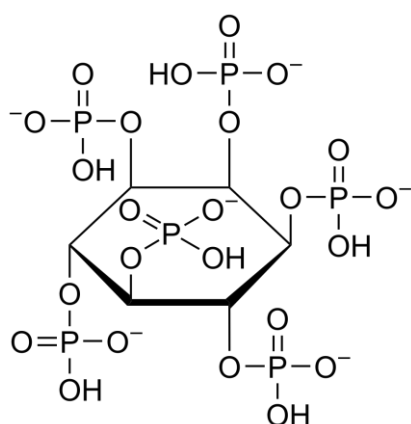
Työssä käytettiin AFK-fytaaasikasvatuksen fermentointinäytteitä. Näytteet otettiin pääfermentointivaiheesta 100–150 m³:n fermentoreista. Whole broth -näytteet (fermentointimassanäytteet) otettiin aseptisesti 250 ml:n muovipulloihin, joista ne siirrettiin huolellisen sekoituksen jälkeen 40 ml:n erissä 50 ml:n Falcon-putkiin. Whole broth -näytteestä säilöttiin myös n.10 ml supernatanttia 10 ml:n Falcon-putkiin. Supernatantti erotettiin sentrifugoimalla whole broth -näytettä 4000 rpm:ssä 10 minuuttia. Kaikki näytteet säilöttiin pakastamalla (-20°C). Säilötyt näytteet ovat listattu taulukossa 2.

Taulukko 2. Näytelistaus.

Fytaaasi	B5	B8	B11	B14	B17	B20	B23	B26	B29	B32
Kasvatus 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-
Kasvatus 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-
Kasvatus 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-
Kasvatus 4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Kasvatus 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

5.2 Fytaasiaktiivisuuden määrittäminen

Fytaasiaktiivisuuden määrittäminen suoritettiin ROAL Oy:n (B074) sisäisen menetelmän mukaisesti. Fytaasiaktiivisuus määritetään vapauttamalla fytaattisubstraatista epäorgaanista fosforia tunnetuissa määrittäolosuhteissa ja mittaamalla vapautuneen fosforin määrä. Entsyymien vapauttama fosfori muodostaa kompleksin molybdaatti- ja vanadaatti-ionien kanssa. Kompleksin aiheuttama värireaktio on mitattavissa spektrofotometrillä 415 nm:n aallonpituudella. Määrittäminen suoritetaan standardiolosuhteissa. [10]



Kuva 12. Fytaattimolekyylin kemiallinen rakennekaava.

Määrittämisessä yksi yksikkö fytaasia (FTU) on entsyymimäärä, joka vapauttaa määrittäolosuhteissa 1 μmol epäorgaanista fosforia minuutissa fytaattisubstraatista. Lämpötila analyysissä on 37 °C ja pH 5,50.

Työn kaikki fytaasiaktiivisuuden ja kemiallisen kokonaisproteiinin määrittäykset suoritettiin Freedom EVO -pipetointirobotilla (kuva 13). Freedom EVO -pipetointirobotti pystyy analysoimaan yhdessä ajossa 48 eri näytettä. Laitteisto sisältää säädettävän vesihauteen reaktiolämpötilojen saavuttamiseksi. Näytteiden esikäsittelyyn kuuluu niiden laimentaminen määrittäuskelpoisiin konsentraatioihin. Tämä tapahtuu käyttämällä Microlab 600 Series-puoliautomaattilaimenninta. Analyysitulokset lasketaan käyttämällä standardisuorlta saatuja konsentraatioarvoja ja kertomalla ne näytteen laimennoskertoimilla.



Kuva 13. Automaattinen Freedom EVO pipetointirobotti.

5.3 Kemiallinen kokonaisproteiinin määrittäminen

Kemiallinen kokonaisproteiinin määrittäminen eli ProtB suoritettiin ROAL Oy:n C005 sisäisen menetelmän mukaisesti. Menetelmä perustuu liukoisen proteiinin reagoimiseen indikaattorin (Coomassie Brilliant Blue G-250) kanssa. Kyseinen indikaattori reagoi emäksisten, aromaattisten aminohappotähteiden ja arginiinin kanssa. Indikaattorin reagoidessa absorbanssimaksimi muuttuu 465 nm:stä 595 nm:iin. Absorbanssi on mitattavissa spektrofotometrillä 595 nm:n aallonpituudella. Kokonaisproteiinin konsentraatio saadaan selville vertaamalla mitattua absorbanssia standardisuoraan ja kertomalla standardisuoralta saatu konsentraatio näytteen laimennuskertoimella. Määrittäminen suoritetaan standardiolosuhteissa. [11]

5.4 Proteiinipitoisuuden määrittäminen typpianalysaattorilla

Proteiinipitoisuuden määrittäminen typpianalysaattorilla suoritettiin ROAL Oy:n sisäisen R&D-menetelmän mukaisesti. Määrittäminen perustuu näytteen polttamiseen ja siitä vapautuvan typen mittaamiseen. Työssä käytettiin LECO FP628 -typpianalysaattoria (kuva 14). LECO FP628-polttouunin lämpötila on 950 °C. Määrittäminen tapahtuu punnitsemalla näytettä tinakuppeihin ja asettamalla ne typpianalysaattorin näytekiekkoon. Analysaattori toimii tästä eteenpäin automaattisesti. Mitatusta typpikonsentraatiosta lasketaan proteiinin kerrointa käyttämällä arvio näytteen alkuperäisestä proteiinimäärästä. Määrittämisessä käytetty proteiinin kerroin on 6,25. Arvo on määritetty kokeellisesti R&D-osastolla. [12]



Kuva 14. LECO FP628-typpianalysaattori.

5.5 NIR-mittaukset

5.5.1 MPA-lähi-infrapunaspektrofotometri

Brukerin MPA-lähi-infrapunaspektrofotometri soveltuu FT-NIR-mittauksiin. MPA:n voidaan liittää monipuolinen valikoima lisävarusteita, kuten transmittanssin, diffuusi reflektion ja heikennetyn kokonaisheijastuksen mittaamiseen tarvittavat anturit sekä laitteistot (kuva 5).

Insinööriyössä käytetty NIR-laitteisto sisälsi seuraavat mittausmoduulit:

1. näytelokero kyvetillä mittaamiseen (transmittanssi),
2. valokuitumoduuli anturilla mittaamiseen (esim. transflektio, ATR),
3. integroitu pyöritin kuivien näytteiden mittaamiseen NIR-mittauksiin soveltuvalta petrimaaljalta (diffuusirefleksio).



Kuva 15. Bruker MPA FT-NIR -spektrofotometri.

5.5.2 NIR-spektrien mittaukset IN271-anturilla

Insinööriyössä käytetyt NIR-spektrit mitattiin käyttämällä IN271-transflektoanturia (kuva 16). Kyseisen anturin tiedot löytyvät liitteestä 1. IN271-anturin mittauspää on 2 mm leveä ja mittaa näytteestä absorptiota ja emissiota. Tämä mahdollistaa tarkan NIR-spektrin saannin puolikiinteistä fermentointinäytteistä. Anturi kiinnitetään valokuitukaapelin avulla MPA-spektrofotometriin (kuva 15).



Kuva 16. IN271-transflektoanturi.

NIR-spektrien mittaus tapahtui siirtämällä 21 °C:n lämpötilaan temperoitu, hyvin sekoitettu, fermentointinäyte 50 ml:n dekanterilasiin ja upottamalla IN271-anturi kyseiseen näytteeseen. Temperoitua fermentointinäytettä sekoitettiin anturilla n. 3 sekuntia, jotta ilmakuplat poistuivat anturin mittauspäästä. Mittausaika oli 8 sekuntia. Jokaisesta näytteestä mitattiin kolme rinnakkaista spektriä. Anturi huudeltiin mittauksen välissä tislattulla vedellä ja kuivattiin kangasliinaa käyttäen. Mittauspäivän alussa mitattiin anturille uusi taustaspektri.

5.5.3 OPUS-analyysiohjelma

OPUS on Brukerin kehittämä analysointiohjelma värähtelyspektrofotometrialle. Analysointiohjelma muuntaa interferogrammit spektreiksi ja etsii niistä korrelaatioita konsentratiodatan avulla. OPUS sisältää monia eri datan esikäsittelyvaihtoehtoja ja on osittain automaattinen spektridatan käsittelyssä. Datan esikäsittelyalgoritmien valintaan ei ole valmiita ohjeita, parhainten soveltuva algoritmi pitää löytää kokeilemalla. Yksinkertaistettuna paras esikäsittelyalgoritmi on se, mikä antaa korkeimman määrityskertoimen sisäisessä validoinnissa. OPUS-analysointiohjelman lyhyt käyttöohje löytyy liitteestä 2.

5.5.4 OPUS-analyysiohjelmiston asetukset

Seuraavia OPUS-analyysiohjelmiston asetuksia käytettiin NIR-spektrien mittaamiseen fermentointinäytteistä (Taulukko 3).

Taulukko 3. OPUS-analyysiohjelmiston asetukset.

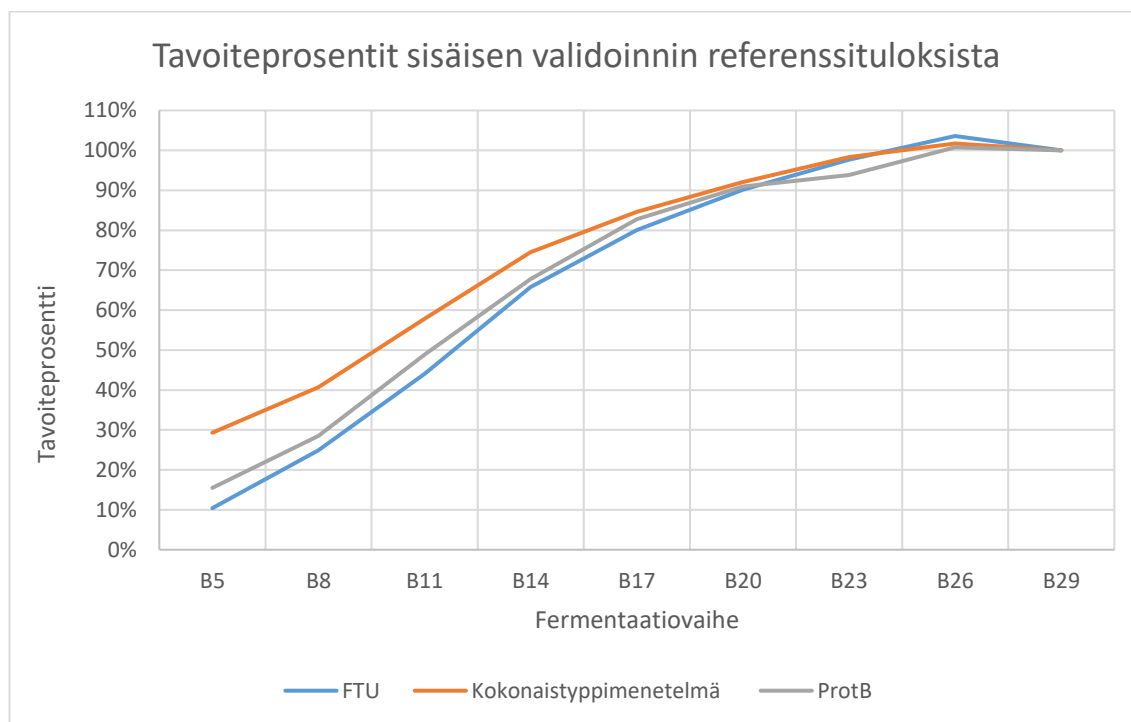
Acquisition Parameters	Values
Acquisition Mode	Double Sided, Forward-Backward
Sample Scan	16
Result Spectrum	Absorbance
Resolution	8
Signal Gain, Sample	x1
Optic Parameters Rf	Values
Preamplifier Gain Background	B
Background Measurement Channel	Fibre 2
Scanner Velocity	10 KHz
FT - Parameters	Values
Phase Resolution	32
Phase Correction Mode	Power Spectrum

6 Tulokset

6.1 Kalibraatiosarjan referenssitulokset

Taulukoissa 4 on esitetty tavoiteprosentit sisäisen validoinnin referenssituloksista.

Taulukko 4. Tavoiteprosentit sisäisen validoinnin referenssituloksista.



	FTU	Kokonaistyyppimenetelmä	ProtB
B5	10%	29%	15%
B8	25%	41%	28%
B11	44%	58%	49%
B14	66%	75%	68%
B17	80%	85%	83%
B20	90%	92%	91%
B23	98%	98%	94%
B26	104%	102%	101%
B29	100%	100%	100%

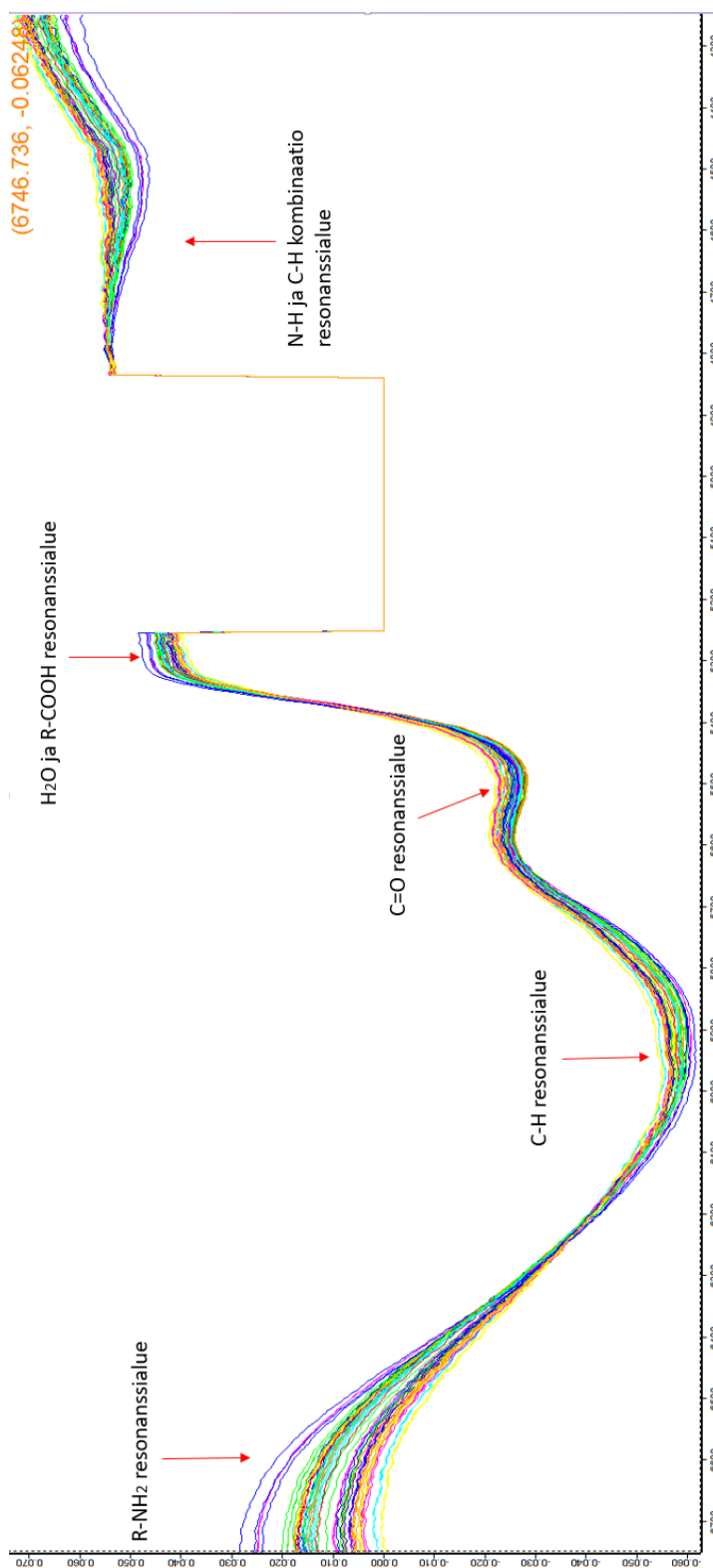
6.2 Fytaa situotantokannan NIR-malli

NIR-mallin kalibraatiosarjaan on käytetty 27 fermentointinäytettä kolmesta eri kasvatuksesta. NIR-spektrit on esikäsitelty SNV-algoritmillä. Aaltolukualueet 5800 cm^{-1} ja 4500 cm^{-1} ovat primäärisiä proteiinien resonanssialueita, joita on käytetty hyödyksi NIR-mallien rakentamisessa. Taulukossa 5 on esitetty kolme eri versiota fytaa situotantokannan malleista. Versiot eroavat toisistaan aaltolukualueittain.

Taulukko 5. Kolmen eri NIR-mallin vertailu.

Malli 1	Fytaasi	Kokonaistyyppi	ProtB
Aaltolukualueet	7502.1-4597.7	6101.9-4597.7	7502.1-4597.7
Rank	8	6	9 (käytetty 8 sijaan)
R ²	94,97	95,04	91,77
RMSECV	7,3%	5,6%	9,3%
RPD	4,47	4,49	3,49
Bias	0,4%	0,1%	0,4%
Malli 2	Fytaasi	Kokonaistyyppi	ProtB
Aaltolukualueet	6749.9-5253.4 ja 4833-4246.7	6749.9-5253.4 ja 4833-4246.7	6749.9-5253.4 ja 4833-4539.8
Rank	8	8	8
R ²	95,23	96,01	93,87
RMSECV	7,1%	5,1%	8,0%
RPD	4,59	5,03	4,5
Bias	0,5%	0,5%	0,5%
Malli 3	Fytaasi	Kokonaistyyppi	ProtB
Aaltolukualueet	9403.6-7498.2 6101.9-5446.2 4601.5-4246.7	9403.6-7498.2 6101.9-5446.2 4601.5-4246.7	9403.6-7498.2 6101.9-5446.2 4601.5-4246.7
Rank	5	5	5
R ²	91,75	93,19	88,75
RMSECV	9,3%	6,6%	10,9%
RPD	3,48	3,83	2,98
Bias	0,0%	0,2%	0,3%

Malli 2 valittiin, koska kyseisen mallin R² ja RMSECV-arvot olivat parhaimmat muihin malleihin verrattuna. Malli 2:n BIAS oli suurin kolmesta, mutta mittaussuureihin suhteutettuna pieni. Kuvassa 17 on esitetty Malli 2:n SNV-algoritmillä esikäsitellyt kalibraatiosarjan NIR-spektrit. Spektreihin on merkattu eri funktionaalisten ryhmien resonanssialueet.



Kuva 17. SNV-algoritmilla käsitellyn fytaasituotantokannan spektrien resonanssialueet nimettynä niitä vastaavina funktionaalisina ryhminä.

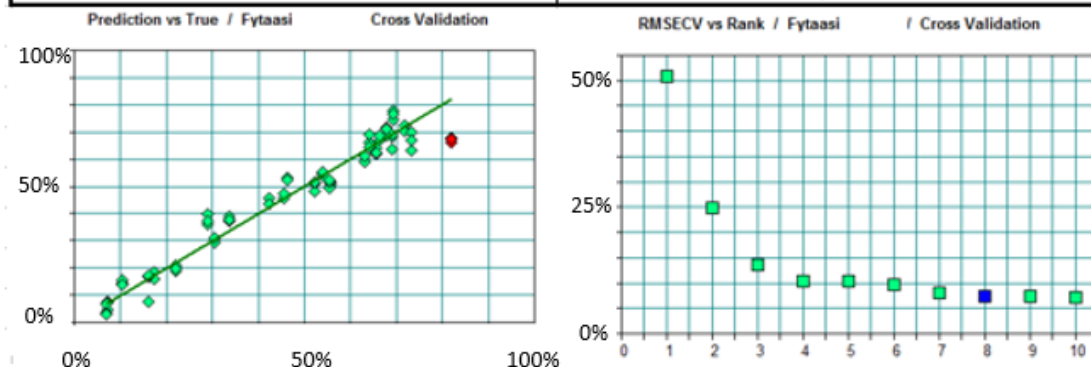
6.3 Fytaasituotantokannan NIR-mallin sisäinen validointi

Fytaasituotantokannan mallin sisäinen validointi suoritettiin kolmelle eri komponentille (taulukot 6, 7 ja 8). Fytaasi- ja kokonaistyyppimallin määrittyskerroin sisäisessä validoinnissa on yli 95 % ja ProtB:n määrittyskerroin on pyöristettynä 94 %.

Taulukoissa 6, 7 ja 8 nähdään yksi ulkopuolinen näyte (Outlier), joka on merkitty punaisella pisteellä. Ulkopuolinen näyte on jätetty kalibraatiosarjaan, koska poistamalla sen määrittysalue pienenee huomattavasti. Näytteen virheellisyyttä ei ole voitu myöskään todistaa, joten sen poistamiselle ei ollut riittäviä perusteita.

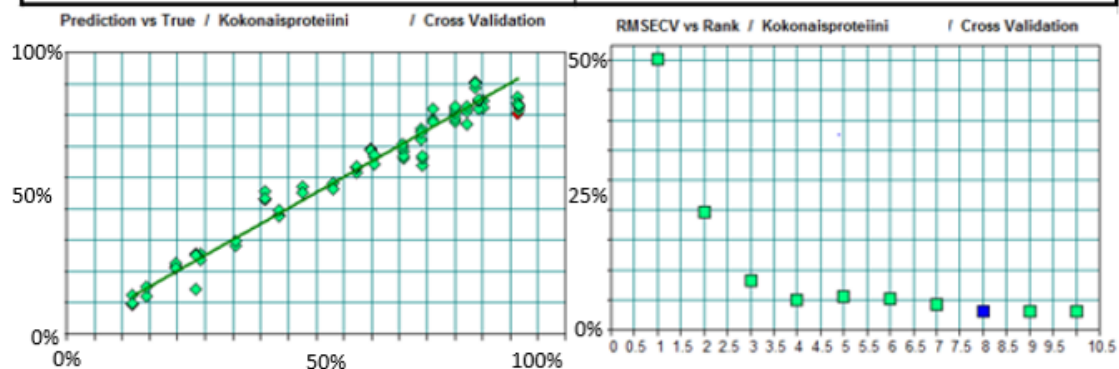
Taulukko 6. Fytaasimalli.

Malli	Fytaasi
Aaltolukalueet	6749.9-5253.4 ja 4833-4246.7
Esikäsittelyalgoritmi	SNV
Rank	8
Määrittyskerroin	95,23
RMSECV	7,3%
RPD	4,59
Bias	0,4%



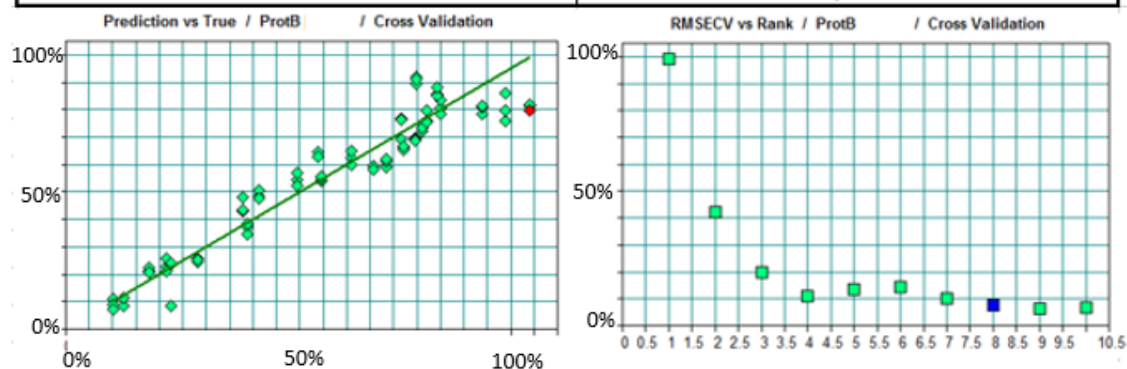
Taulukko 7. Kokonaistyyppimalli.

Malli	Kokonaistyyppi
Aaltolukualueet	6749.9-5253.4 ja 4833-4246.7
Esikäsittelyalgoritmi	SNV
Rank	8
Määrittyskerroin	96,01
RMSECV	5,1%
RPD	5,03
Bias	0,5%



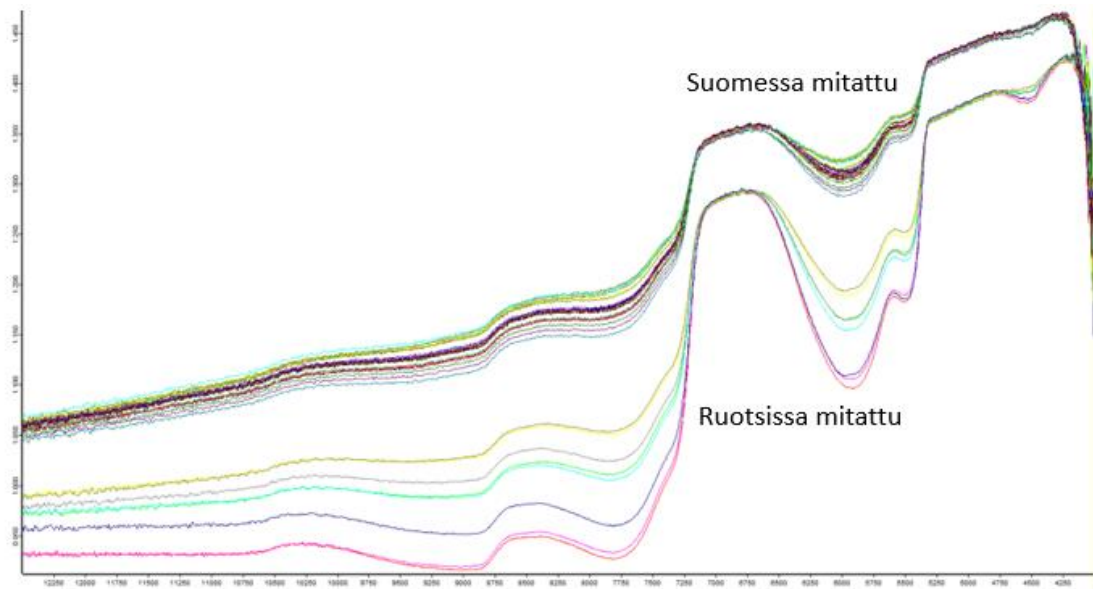
Taulukko 8. Kemiallisen proteiininmäärityksen (ProtB) malli.

Malli	ProtB
Aaltolukualueet	6749.9-5253.4 ja 4833-4539.8
Esikäsittelyalgoritmi	SNV
Rank	8
Määrittyskerroin	93,87
RMSECV	8,0%
RPD	4,5
Bias	0,5%



6.4 Fytaasituotantokannan NIR-mallin ulkoinen validointi

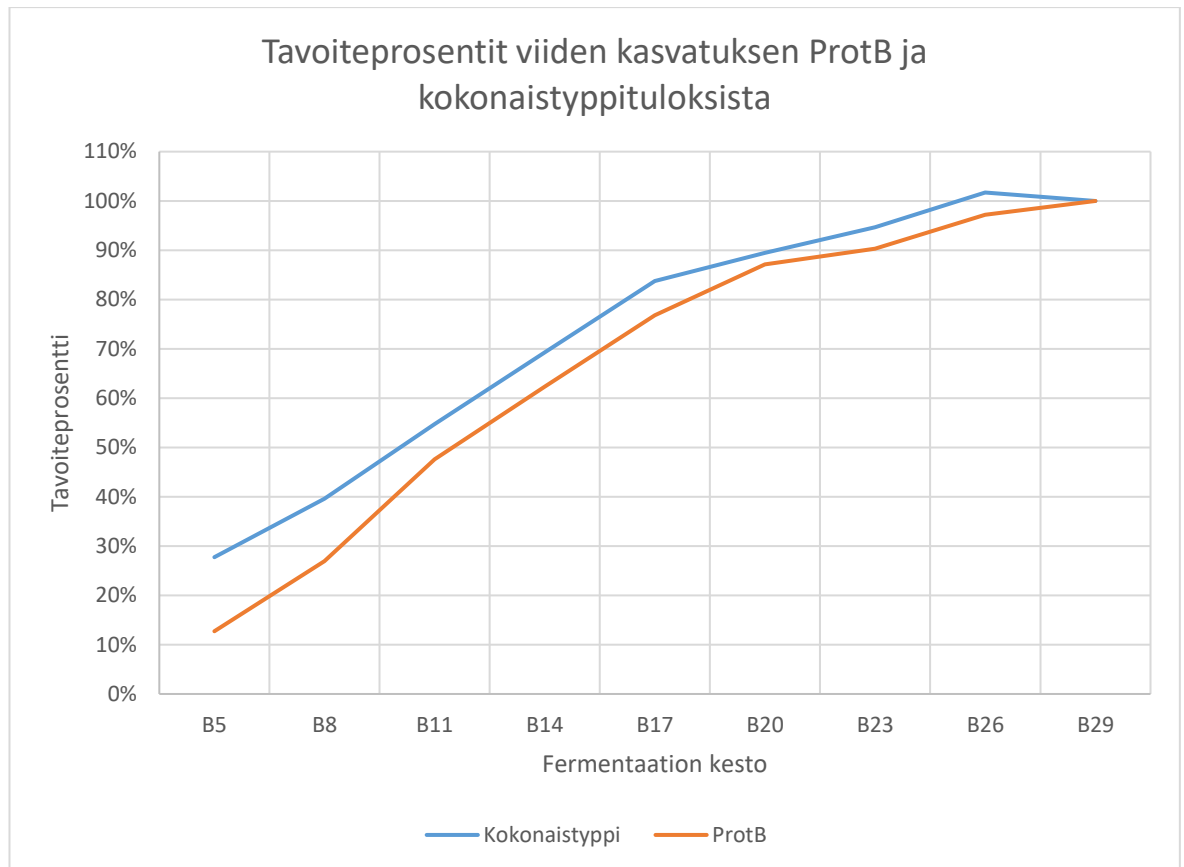
Fytaasituotantokannan NIR-mallista ei pystytty suorittamaan ulkoista validointia laitteisto-ongelmien vuoksi. Laitteisto-ongelmana oli Ruotsin ja Suomen lähi-infrapunaspektrofotometriä välinen tasoero. Suomen puoleinen MPA antoi huomattavasti korkeampaa tasoa kuin Ruotsin puoleinen MPA. Suomen puoleisen MPA:n mitaamassa spektreissä oli myös huomattavasti enemmän kohinaa (kuva 18). Molemmissa mittauksissa on käytetty samaa IN271-anturia. Tasoeron ja kohinan vuoksi Suomessa mitattuja spektrejä ei voitu käyttää Ruotsin spektreillä rakennetun NIR-mallin ulkoiseen validointiin. Mittausongelmaa ei saatu selvitettyä tähän insinöörityöhön varatun ajan puitteissa.



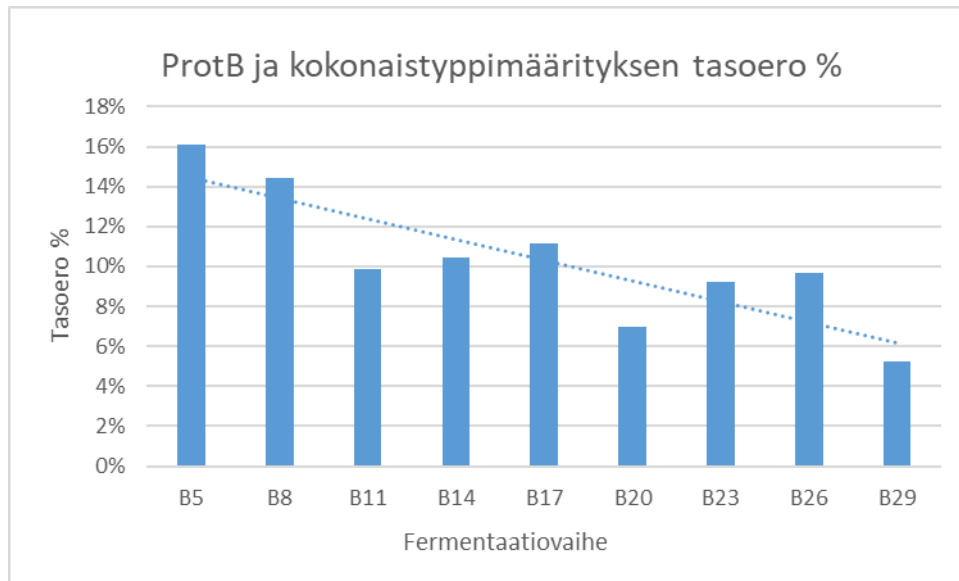
Kuva 18. Mitattujen NIR-spektrien tasoero Ruotsin ja Suomen välillä.

6.5 Fytaaistuotantokannan ProtB ja kokonaistyyppimäärittysten ero

ProtB:n ja kokonaistyyppimäärittelyn välillä havaittiin tasoeroa (kuva 19). Tasoeron trendi on laskeva fermentaation keston kasvaessa (kuva 20). Kokonaistyyppimäärittelyn taso on keskimäärin 9,8 % suurempi kuin ProtB:n. Menetelmien välinen korrelaatio on 97,75 % (taulukko 9).

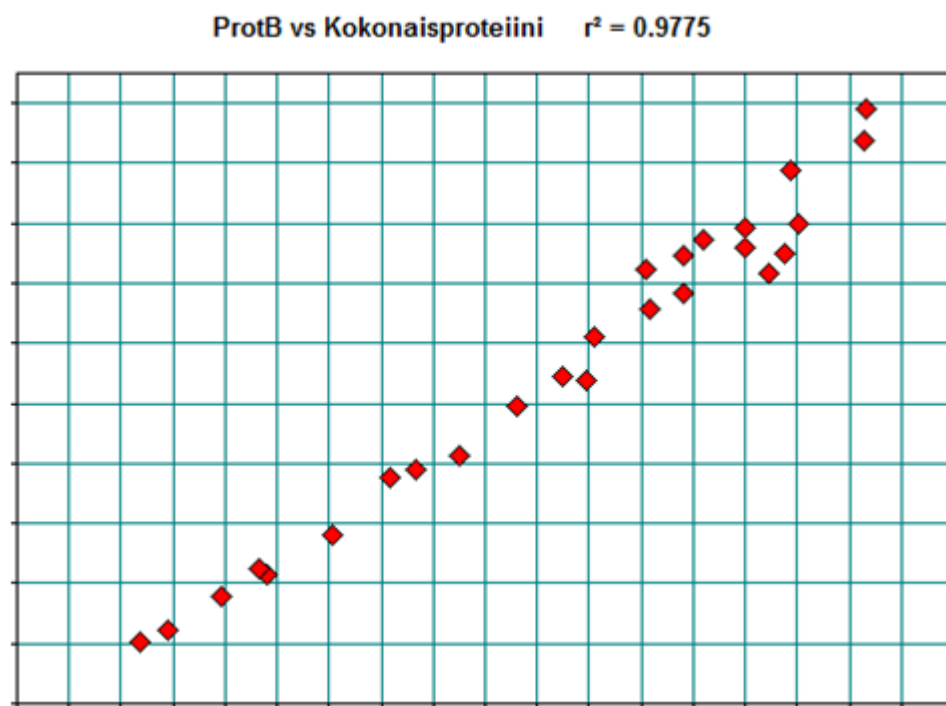


Kuva 19. Tavoiteprosentit viiden eri fermentaation ProtB- ja kokonaistyyppituloksista.



Kuva 20. Viiden eri fermentaation ProtB- ja kokonaistyyppimäärityksen tasoero %.

Taulukko 9. ProtB- ja kokonaistyyppimäärityksen kolmen fermentaation lineaarinen korrelaatiokerroin.



7 Yhteenveto

Reaaliaikainen orgaanisten yhdisteiden määrittäminen suljetuissa tuotantosysteemeissä on osa nykyaikaista bioteollisuutta. Tämän on mahdollistanut sekä NIR-teknologian kehitys että halpeneminen. NIR-teknologian suurin hyöty on kyky orgaanisten ja fysikaalisten suureiden analytiikkaan ilman näytekäsittelyä tai analysoitavan näytteen tuhoutumista. ROAL Oy:ssä ei ole aikaisemmin hyödynnetty NIR-teknologiaa.

Tämän insinööritoiminnan tavoitteena oli arvioida, voiko NIR-teknologiaa hyödyntää teollisen fermentaatioprosessin kontrolloinnissa. Fermentointiprosessin reaaliaikainen seuranta parantaa mahdollisuuksia prosessin optimointiin ja ilman erillistä näytteenottoa. Prosessioptimoinnin mahdollisia hyötyjä voivat olla esimerkiksi fermentoinnin saantoparannukset sekä mahdollisuus fermentoinnin oikea-aikaiseen lopettamiseen. Työn tavoitteena oli rakentaa NIR-malleja, joiden avulla voidaan seurata fytaasiaktiivisuuden ja kokonaisproteiinikonsentraation kehitystä suoraan *T.reesei*-pohjaisen tuotantokannan fermentointinäytteistä. NIR-mallin rakentamisessa käytettiin kolmesta fytaasikasvatuksesta saatua 27 fermentaationäytettä. Referenssianalytiikkana käytettiin ROAL:n rutiinimenetelmiä.

Työssä rakennettiin kolme erillistä NIR-mallia fytaasituotantokannan fermentointinäytteistä. Mallien rakentamisessa käytettiin eri aaltolukualueita välillä 12000–4000 cm⁻¹. Paras malli valittiin vertailemalla mallien määrittyskertoimia sekä RMSECV-arvoja. Malli 2 todettiin parhaimmaksi, koska kyseisen mallin määrittyskertoimet olivat suurimmat ja RMSECV-arvot pienimmät verrattuna muihin malleihin. Kyseisen NIR-mallin fytaasi- ja kokonaistyyppimallin R² sisäisessä validoinnissa oli yli 95 % ja ProtB:n oli pyöristettynä 94 %. Valittu malli korreloi siis erittäin hyvin kalibrointisarjan näytteiden kanssa. Malli 2:n ulkoista validointia ei voitu suorittaa laitteisto-ongelmien vuoksi. Laitteisto-ongelmat johtuivat kahden eri MPA-spektrofotometrin välisistä tasoeroista. Tasoeroja ei pystytty korjaamaan insinööritoiminnan aikana.

Työssä havaittiin, että fermentointinäytteiden kokonaisproteiinianalytiikassa käytetyt menetelmät (ProtB- ja kokonaistyyppimääritykset) antavat toisistaan huomattavasti eroavia tuloksia. Toisaalta kokonaisproteiinimäärän kasvun trendi korreloi molempia menetelmiä käytettäessä. Menetelmien välinen korrelaatio oli 97,75 %. Keskimäärin kokonaistyyppimäärityksen tasoero oli 9,8 % korkeampi kuin ProtB:n. Menetelmien välinen tasoero

pieneni, mitä suuremmaksi näytteiden kokonaisproteiinimäärä kasvoi. Tämä voidaan todennäköisesti selittää sillä, että kokonaistyyppimääritys laskee fermentaatioalustan tyyppiyhdisteet mukaan fermentaationäytteen kokonaisproteiinimäärään.

Insinööriyön tuloksia voidaan soveltaa fytaasituotantokannan on-line tai in-line seurannassa. NIR-tekniikan käyttöönotto vähentäisi lisäksi huomattavasti fermentaationäytteiden analysointitarvetta laadunvalvontalaboratoriossa. On-line seurannassa prosessityöntekijä voi mitata fermentaationäytteen suoraan näytteenoton jälkeen nykyisillä laitteilla. Tämä ei vaatisi pitkää perehdytystä ja nopeuttaisi huomattavasti analyysitulosten saantia fermentaationäytteistä. Optimitilanteessa NIR-anturit asennettaisiin suoraan fermentoreihin ja NIR-laitteisto liitettäisiin tehtaan automatiikkaan (in-line-analytiikka). Tämä mahdollistaisi jopa fermentaatioprosessin täyden automatisoinnin. Fermentointiaikojen lyhentymisen jo 5 % toisi huomattavia säästöjä fermentointikuluissa.

Insinööriyössä päästiin määriteltyihin tavoitteisiin. Saatujen tulosten mukaan NIR-tekniologiaa voidaan hyödyntää teollisen fermentaatioprosessin seurannassa. Menetelmien ulkoista validointia ei voitu suorittaa laitteisto-ongelmien vuoksi. ROAL:lla käytössä olevien kokonaisproteiinimenetelmien välillä havaittiin eroja. Tulosten perusteella tuotantolaitoksella käytettävä kokonaisproteiinimääritysmenetelmä (ProtB) soveltuu NIR-analytiikan referenssimenetelmäksi. Tätä esiselvitystä voidaan tulevaisuudessa käyttää pohjana NIR-mallien rakentamiseen homepohjaisten tuotantokantojen fermentointinäytteille.

Lähteet

- 1 ROAL Oy:n sisäinen materiaali. 2019. Suomi: Rajamäki.
- 2 Halliday, David; Resnick, Robert & Walker, Jearl. 2008. Fundamentals of physics. 8th edition. USA: John Wiley & Sons.
- 3 Larkin, Peter. 2011. Infrared and Raman Spectroscopy. USA: Elsevier.
- 4 Rees, Oliver. 2010. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. USA: Nova Science Publishers.
- 5 Conzen, Jörg-Peter. 2014. Multivariate Calibration. 3rd English version. Saksa: Bruker Optik GmbH.
- 6 Alvarez-Ordóñez, Avelino & Prieto Miguel. 2012. Fourier transform infrared spectroscopy in food microbiology. USA: Springer.
- 7 Davis, Sumner; Abrams, Mark; Brault, James. 2001. Fourier transform spectrometry. USA: Academic Press.
- 8 Animal feeding stuffs, cereal and milled cereal product – Guidelines for the application of near infrared spectrometry. Second edition 2017-08. ISO 12099. Switzerland: ISO copyright office.
- 9 Milk products – Guidelines for the application of near infrared spectrometry. First edition 2006-09-01. ISO 21543. Switzerland: ISO copyright office.
- 10 Fytaasin aktiivisuuden määrittäminen. Analytical method B074. 2018. ROAL.
- 11 Proteiinin määritys Tecan Freedom EVO:lla. Analytical method C005. 2018. ROAL.
- 12 Proteiinin pitoisuuden määrittäminen typpianalysaattorilla. 2017. ROAL

IN271-anturin materiaalit, mitat, paine- ja lämpötila-alueet

Materiaalit:

- Safiiri
- Ruostumaton teräs DIN 1.4404 (SS316L)
- Etyleenipropyleenidieenikumi

Anturin mitat:

- Ulkohalkaisija: 18 mm
- Pituus: 140 mm
- Pienin upotussyvyys: 10 mm
- Optimaalinen upotussyvyys: 37mm
- Säteilyn kulkema matka näytteessä: 2 mm (1 mm väli)

Paine- ja lämpötila-alue:

- Painealue: 10 bar, kestää tyhjiötä
- Lämpötila-alue: -20–140 °C

Käyttöohje NIR-mallin rakentamiselle OPUS-analyysiohjelmistolla

NIR-mallin rakentamisessa määritellään ensin määritettävät suureet, jotka syötetään analyysiohjelmaan. Esimerkissä (kuva 21) nähdään, kuinka kolme eri komponenttia on lisätty analyysiohjelmaan. Tässä vaiheessa voidaan myös määrittää haluttu desimaalimäärä mitä käytetään tuloksissa.

Load Method Components Spectra Parameters Validate Graph Report Store Method Optimize Settings

Add Component

Name Unit

Fytaasi FTU/g

Fytaasi [FTU/g]
Kokonaisproteiini [mg/g]
ProtB [mg/g]

Formatting in the Quant 2 analysis report

☐ Default settings (5 significant digits)

☒ Digits after the decimal point

0

Kuva 21. Määritettävien komponenttien lisääminen.

Analyysiohjelmistoon on syötettävä NIR-spektrien lisäksi referenssimenetelmällä saadut vertailutulokset. Kuvassa 22 nähdään, miten jokaisella NIR-spektrillä on omat kolme määritettävää suuretta. Tässä vaiheessa voidaan hylätä ”huonoja” spektrejä. ”Huono” spektri eroaa huomattavasti muista spektreistä ja on luultavasti syntynyt mittausvirheen seuraamuksena. Hylkäys tapahtuu valitsemalla spektri, joka halutaan hylätä ja valitsemalla Excluded (ulkopuolelle)-vaihtoehto. Kyseisessä vaiheessa voidaan myös valita, käytetäänkö spektrejä sisäisessä vai ulkoisessa validoinnissa. Calibration (kalibraatio) on sisäiselle validoinnille ja Test Set (testisarja) on ulkoiselle validoinnille.

Load Method Components Spectra Parameters Validate Graph Report Store Method Optimize Settings							
Add Spectra		Change Path		Copy Spectra		Window	
Set Sample Numbers		Set Data Set		Comp. Correlations		Print	
	Data Set	Sample	Path	File Name	Fytaasi	Kokonaispr	ProtB
1	Calibration	1	X:\QC\Laitte				
2	Calibration	1	X:\QC\Laitte				
3	Calibration	1	X:\QC\Laitte				
4	Calibration	2	X:\QC\Laitte				
5	Calibration	2	X:\QC\Laitte				
6	Calibration	2	X:\QC\Laitte				
7	Calibration	3	X:\QC\Laitte				
8	Calibration	3	X:\QC\Laitte				
9	Calibration	3	X:\QC\Laitte				
10	Calibration	4	X:\QC\Laitte				
11	Calibration	4	X:\QC\Laitte				
12	Calibration	4	X:\QC\Laitte				
13	Calibration	5	X:\QC\Laitte				
14	Calibration	5	X:\QC\Laitte				
15	Calibration	5	X:\QC\Laitte				
16	Excluded	6	X:\QC\Laitte				
17	Excluded	6	X:\QC\Laitte				
18	Excluded	6	X:\QC\Laitte				
19	Calibration	7	X:\QC\Laitte				
20	Calibration	7	X:\QC\Laitte				

Kuva 22. Mitattujen NIR-spektrien ja referenssitulosten lisääminen analysointiohjelmaan.

NIR-spektrit vaativat esikäsittelyä. Esikäsittelymenetelmillä pienennetään spektrien koon ja tehdään spektreistä näin helpommin luettavia analyysiohjelmistolle. Yleisimmät esikäsittelymenetelmät ovat standardinormaalijakauma (SNV), ensimmäinen johdannainen (first derivative) ja toinen johdannainen (second derivative). Kuvassa 23 nähdään kolme eri aaltolukualuetta, jotka on valittu spektristä. Nämä voidaan valita joko numeraalisesti tai graafisesti. Graafinen valinta tapahtuu valitsemalla Interactive Region Selection (interaktiivinen aluevalinta).

Load Method Components Spectra Parameters Validate Graph Report Store Method Optimize Settings

Graph page
Marker size: 16

Select preprocessing options for Optimize

- No spectral data preprocessing
- Constant offset elimination
- Straight line subtraction
- Vector normalization (SNV)
- Min-Max normalization
- Multiplicative scattering correction
- First derivative
- Second derivative
- First derivative + Straight line subtraction
- First derivative + Vector normalization (SNV)

Smoothing points: 25

Maximum test range:
8882.5 4247.1

Interactive Region Selection

☒ Run optimization in background

Method protection
☐ Store spectra in Quant 2 method file
Use this option only if you want to protect a method in the mode 'Enlarge method' or 'Change parameters'.

☒ User defined optimization regions

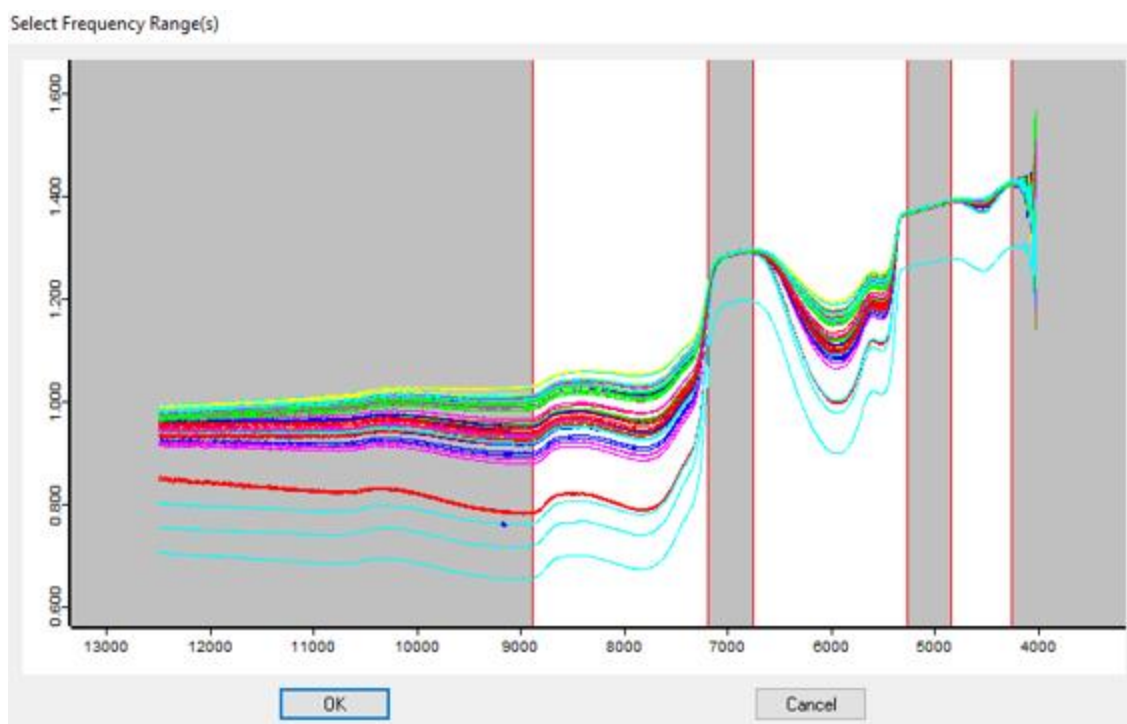
☒ NIR regions (max 5) ☐ A,B regions (max 10)

Interactive Region Selection

	from	to
1	6747.7	5256.2
2	4832.1	4247.2
3	8882.6	7186.4
4		
5		

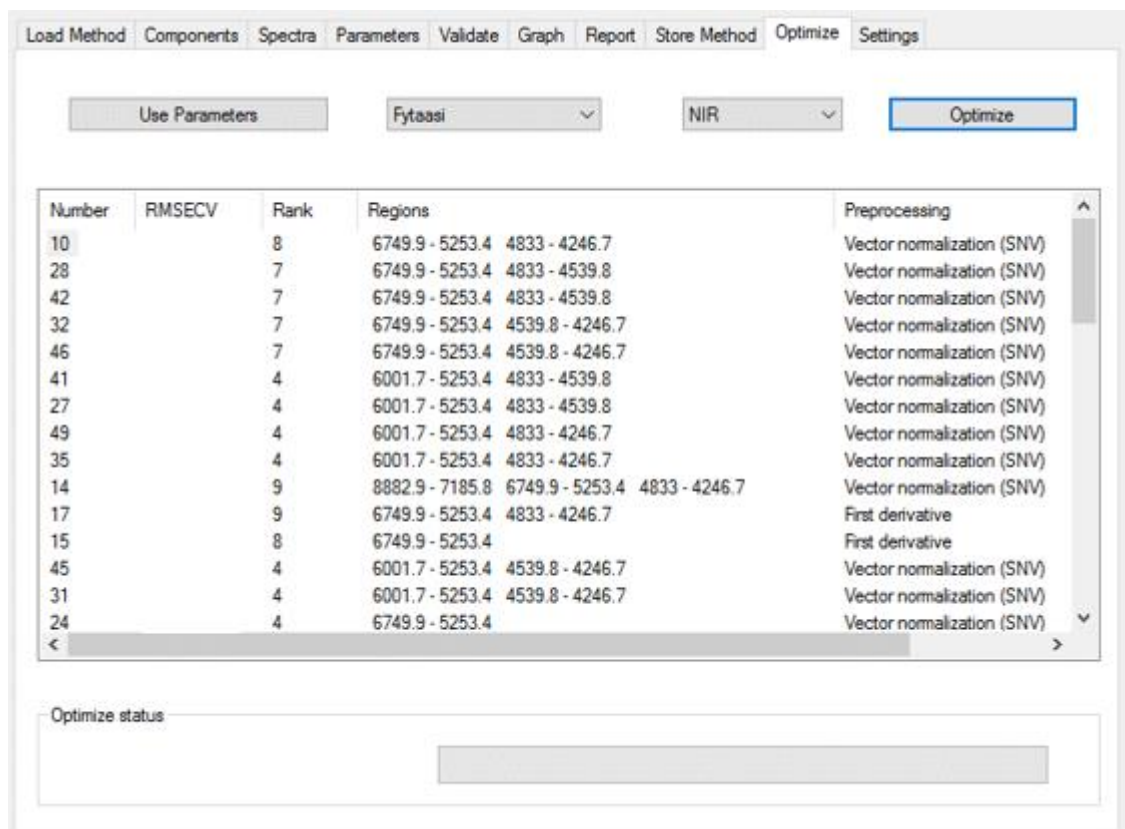
Kuva 23. Mallin esikäsittelymenetelmien ja analysoitavien aaltolukualueiden valinta.

Interactive Region Selection (interaktiivinen alue valinta) (kuva 24) ikkunassa on mahdollista valita aaltolukualueet visuaalisesti. Aaltolukualueiden valinnassa on otettava huomioon analysoitavien yhdisteiden funktionaalisten ryhmien resonanssiaaltolukualueet. Tässä tapauksessa tutkitaan entsyymejä eli proteiineja. Proteiinien resonanssiaaltolukualueet ovat aaltolukualueilla 5800 cm^{-1} ja 4500 cm^{-1} (taulukko 1). Aaltolukualue 8000 cm^{-1} on valittu varmuuden vuoksi, koska siinä näkyy myös lievä resonanssimuutos. NIR-mallien rakentaminen vaatii useiden eri aaltolukualueiden kokeilemista ennen kuin haluttu tarkkuus saavutetaan.



Kuva 24. Interaktiivinen aaltolukualueiden valinta NIR-spektristä.

Esikäsittelymenetelmien ja aaltolukualueiden valitsemisen jälkeen seuraa näiden parametrien optimointi. Käyttäjä valitsee, mikä suure halutaan optimoida. Esimerkissä on valittu fytaasi optimoitavaksi suureeksi. Painamalla Optimize-painiketta (Optimointi) analyysiohjelma määrittää parhaimmat NIR-mallit kyseiselle suureelle. Analysointiohjelma ottaa huomioon aikaisemmin valitut aaltolukualueet (kuva 24), mutta pystyy myös muokkaamaan niitä parhaan lopputuloksen saavuttamiseksi. Analysointiohjelma järjestää laskemansa mallit parhaimmasta huonompaan RMSECV mukaan. Esimerkissä analysointiohjelma on valinnut parhaimmaksi kalibrointimalliksi mallin numero kymmenen. Tässä kalibrointimallissa analysointiohjelma on ottanut huomioon kaksi aaltolukualuetta kolmesta, mitkä kuvassa 24 on esitetty. Lopuksi valitaan parhaimmaksi todettu kalibrointimalli ja painetaan Use Parameters -painiketta (käytä parametrejä).



Kuva 25. Mallin optimointi.

NIR-mallin optimoinnin jälkeen seuraa sisäinen validointivaihe. Kuvassa 26 nähdään sisäisen ja ulkoisen validoinnin parametri-ikkuna. Sisäinen validointi eli Cross Validation -vaiheessa valitaan komponentti, joka halutaan sisäisesti validoida optimoinnista saatujen parametrien mukaan. Ulkoisen validoinnin yhteydessä valitaan Test Set -vaihtoehto (testisarja). Tämä vaihtoehto käyttää mallin lopulliseen validaatioon ulkoisen validoinnin spektrejä, jotka ovat määritettävissä kuvassa 22.

Validation parameters

	Component	Max. Rank	Use
1	Fytaasi	10	<input checked="" type="checkbox"/>
2	Kokonaisproteiini	10	<input type="checkbox"/>
3	ProtB	10	<input type="checkbox"/>

Cross Validation

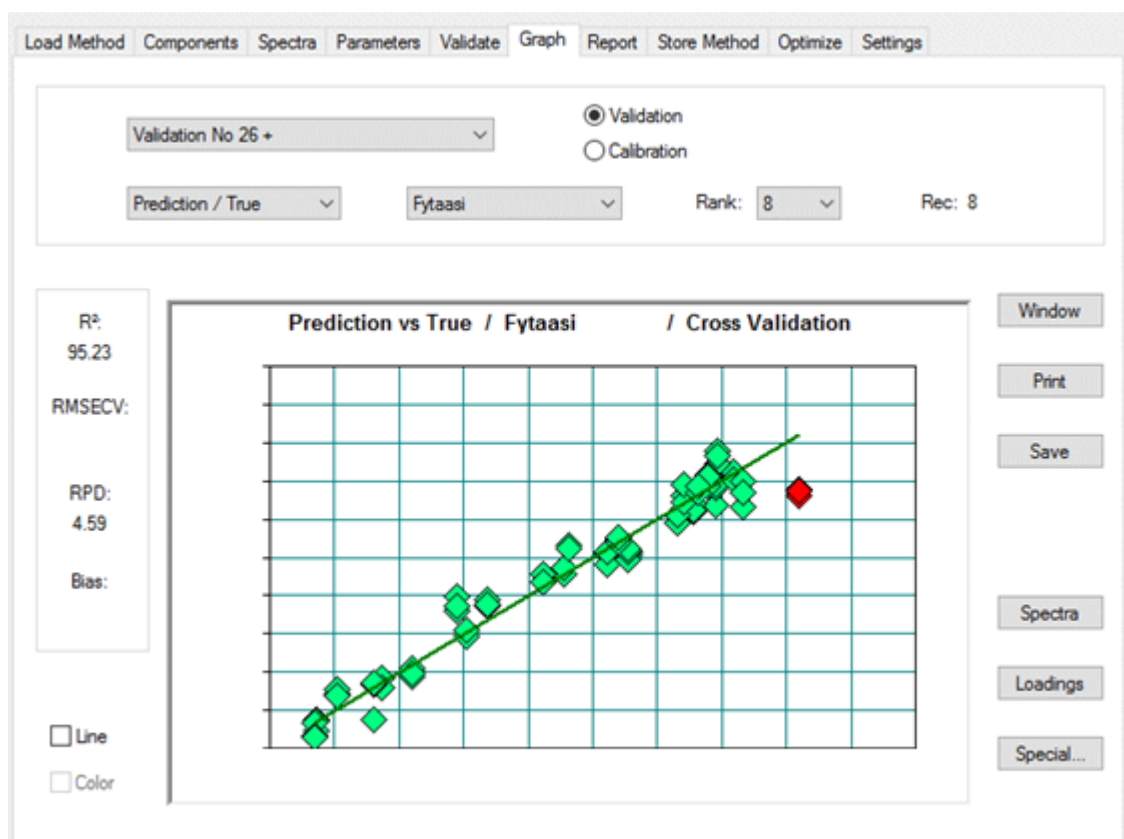
No. of samples leaving out: 1

Validate

Calculation status

Kuva 26. Sisäinen ja ulkoisen validoinnin parametrit.

Sisäisen tai ulkoisen validaation tuloksia pitää tarkastella. Tärkein tarkasteltava arvo on määrittyskerroin (R^2). Nyrkkisääntönä yli 90 %:n määrittyskerroin on hyvä ja yli 95 % on erittäin hyvä. Kuvan 27 fytaasimallissa on päästy yli 95 %:n määrittyskerroimeen. Määrittyskerrointa pienentää kolme ulkopuolista (Outlier) pistettä. Nämä näkyvät kuvassa 25 punaisina pisteinä. Analysointiohjelma on havainnut, etteivät nämä pisteet korreloi riittävästi rakennetun NIR-mallin kanssa. On otettava huomioon, että nämä pisteet kuitenkin vaikuttavat malliin ja ilman hyvää syytä niitä ei voi poistaa. Syy yksittäisen spektrin poistamiseen voi olla esimerkiksi märkäkemialla saatu epäluotettava tulos tai virheellisesti mitattu NIR-spektri. Kyseisissä tapauksessa ulkopuolisten pisteiden spektrit voidaan poistaa kuvassa 22 esitetyllä tavalla.



Kuva 27. Sisäisen tai ulkoisen validaation tarkastelu.