

Nestemäisten entsyymituotteiden fysikaalinen desinfiointi

Joonas Laurell

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2019

Paperi-, tekstiili- ja kemiantekniikka
Kemiantekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Paperi-, tekstiili- ja kemiantekniikan koulutusohjelma
Kemiantekniikka

LAURELL, JOONAS:

Nestemäisten entsyymituotteiden fysikaalinen desinfiointi

Opinnäytetyö 27 sivua
Toukokuu 2019

Tässä opinnäytetyössä pyrittiin löytämään Roal Oy:n entsyymitehtaan jälkikäsitelyyn levysuodatuksen avuksi uutta teknologiaa puhdistamaan nestemäisiä entsyymituotteita mikrobeista. Kontaminoituneiden kasvatusliuoksien suodattaminen levysuodattimella on toisinaan hyvin haastavaa, joten mikrobeja tuhoavalle desinfiointimenetelmälle olisi käyttöä. Lisäksi se saattaisi mahdollistaa uusien säilöntäaineettomien tuotteiden valmistamisen.

Aluksi ajatuksena oli käsitellä näytteitä UV-C-säteilyllä, mutta sopivaa laitetoimitajaa etsiessä päädyttiin yritykseen, jolla oli UV-C-ledien lisäksi tarjolla uusi, näkyvän sinisen valon LED-teknologiaan perustuva desinfiointimenetelmä. Entsyymipuolivalmisteita alettiin käsitellä petrimaljoissa suljetuissa laatikoissa molemmilla tekniikoilla, ja testit vietiin loppuun pelkästään sinistä valoa käyttäen. Tutkimussuunnitelmaa jouduttiin muuttamaan, ja käsiteltäviä tuotteita karsimaan merkittävästi alkuperäisestä, koska haluttua tulosta eli merkittävää elävien mikrobien lukumäärän vähentämistä ei saatu aikaiseksi kummallakaan tekniikalla. Lisäksi entsyymiliuosten lämpenemisen aiheuttama haihtumien loi haasteita.

Haihtumisongelma ratkottiin rakentamalla sopiva jäähdytysalusta, jolloin laboratoriomittakaavan testit saatiin viimeistelyä. Tuloksissa oli jonkin verran vaihtelua keskenään, mutta lopputestit vahvistivat aiemmin tehdyt päätelmät, että käytyillä käsittelytekniikoilla ei saada tuotteita desinfioidua. Epäselväksi jäi, mikä ominaisuus käsiteltävissä tuotteissa estää mikrobien tuhoutumisen. Lisätutkimukset tulisi todennäköisesti toteuttaa suuremman mittakaavan mukaisella laitteistolla, missä entsyymiliuos virtaisi ohuena filminä, johon voisi johtaa ilmaa paremman kontaktin aikaansaamiseksi. Sinivaloteknologiaa voisi kuitenkin mahdollisesti käyttää ainakin pestyjen tuotesäiliöiden sisäpintojen desinfiointiin ja mikrobiologisen puhtauden ylläpitoon, mutta tämä vaatisi omat tutkimuksensa sen tehosta ja taloudellisuudesta.

Asiasanat: entsyymit, mikrobit, desinfiointi, UV-säteily, sinivalo

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Paper, Textile and Chemical Engineering
Chemical Engineering

LAURELL, JOONAS:
Physical Disinfection of Liquid Enzyme Products

Bachelor's thesis 27 pages
May 2019

The aim of this thesis was to find a new technology to aid the plate & frame filter with the cleaning of liquid enzyme products of microbes for Roal Ltd's enzyme plant's downstream process. Filtering contaminated growth mediums with a plate & frame filter can be extremely challenging at times, so there is a need for a microbe destroying disinfection method. Furthermore, it might enable the manufacturing of new products without preservatives.

At first, the plan was to expose the samples to UV-C radiation. However, while looking for a suitable supplier, a company offering a new disinfection method based on visible blue light LED technology in addition to the UV-C LEDs was chosen. The processing of semifinal products began in Petri dishes in closed boxes, using both techniques, and the tests were completed using only the blue light. The research plan had to be altered and the number of tested products significantly reduced as neither technique achieved the desired result, i.e. considerable reduction of microbes. In addition, the evaporation caused by the warming of the enzyme solutions created challenges.

The problem of the evaporation was solved by constructing a suitable cooling tray, which in turn enabled the finalization of the laboratory-scale tests. The results showed some variation, but final tests confirmed previously made conclusions: the processing techniques used are ineffective in disinfecting the products. It is still unclear which properties in the tested products prevented the destruction of microbes. Additional studies should likely be executed on a larger scale with equipment that enables the liquid enzymes to flow as a thin film upon which air could be conducted to achieve better contact. Nonetheless, blue light technology could possibly be utilized to disinfect the inner surface of washed containers and maintain microbiological cleanliness. However, these would require a separate study on their effectiveness and economic efficiency.

Key words: enzymes, microbes, disinfection, UV radiation, blue light

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	ENTSYYMIT	7
3	DESINFIOINTI	8
	3.1 UV-C-säteily	8
	3.2 Näkyvän sinisen valon teknologia	9
4	NÄYTTEIDEN ANALYSOINTI	10
	4.1 Fluoresenssimikroskopia.....	10
	4.2 Mikrobipesäkelukumäärän määrittäminen.....	10
	4.3 Entsyymiaktiivisuus	11
5	ESIVALMISTELUT JA TESTILAITTEISTO	13
	5.1 Käsiteltävät tuotteet ja analyysit	13
	5.2 Tapaaminen laitetoimittajan luona.....	14
6	ENTSYYMILIUOSTEN DESINFIOINTIKÄSITTELY JA TULOKSET ...	15
	6.1 Ensimmäiset testit laitetoimittajan kanssa	15
	6.2 Sinivalon jatkotestit eri pituisilla käsittelyajoilla.....	18
	6.3 Haihtuminen, muutokset ja jäähdytystestit	20
	6.3.1 Jäähdytystestit ja ratkaisu viimeisiin testeihin.....	21
	6.4 Lopputestit sinivalokäsittelyllä	23
7	POHDINTA	25
	LÄHTEET.....	27

LYHENTEET JA TERMIT

CFU	pesäkkeen muodostava yksikkö
CIP	prosessiteollisuuden pesujärjestelmä
DNA	deoksiribonukleiinihappo, solun geneettinen materiaali
inkubointi	hauduttaminen valvotuissa olosuhteissa
LED	valoa säteilevä puolijohdekomponentti
RNA	ribonukleiinihappo, solun geneettinen materiaali
ROS	reaktiiviset happiradikaalit
UV-C	ultraviolettisäteily, jonka aallonpituus on 100-280 nm

1 JOHDANTO

Opinnäytetyössä haluttiin tutkia vedenkäsittelyssäkin käytetyn UV-C-säteilyn soveltumista nestemäisten entsyymituotteiden desinfiointiin. Tällä hetkellä käytössä olevan levysuodattimen mikrobeja suodattava teho perustuu mahdollisimman tiheään suodatuspahvi/piimaa-yhdistelmään, mikä joillakin tuotteilla aiheuttaa haasteita ja näitä joudutaan suodattamaan useampaan kertaan erilaisilla yhdistelmillä. Pääasiallisesti tarve olisi käsitellä sellaisia puolivalmisteita, joihin ei lisätä säilöntäaineita fermentoidun kasvatusliuoksen jälkikäsittelyn alkaessa. Lisäksi tehokas desinfiointi saattaisi mahdollistaa myös uusien säilöntäaineettomien lopputuotteiden valmistamisen.

Tarkoituksena oli käsitellä puolivalmisteita ja lopputuotteita yksinkertaisesti, laboratoriomittakaavassa, sekä UV-C-säteilyllä että uudella näkyvän sinisen valon teknologialla, ja tutkia niiden vaikutusta käsiteltävään nesteeseen. Entsyymiliuoksista haluttiin saada merkittävästi vähennettyä eläviä mikrobisoluja niin, että käsittely ei vaikuta entsyymien ominaisuuksiin, aktiivisuuteen tai rakenteeseen.

Tavoitteena oli todeta desinfiointitapojen käyttökelpoisuus sekä toimivuus erilaisilla tuotteilla, ja esisuunnitella teknologian muuntamista tuotantomittakaavaan, jos se todetaan toimivaksi.

2 ENTSYIMIT

Entsyymit ovat proteiineja, jotka alentavat kemiallisten reaktioiden aktivointiin vaadittavaa energiaa ja sillä tavalla nopeuttavat niitä. Jo toista sataa vuotta entsyymejä on saatu eristettyä eläimistä, kasveista ja mikro-organismeista. Moderni geenitekniikka on mahdollistanut pelkästään haluttujen entsyymien tuottamisen teollisesti erilaisia tuottoisäntiä käyttämällä. Teollisuusentsyymien käyttö mahdollistaa loppukäyttäjälle muun muassa prosessien tehostamisen, tuotteiden laadun parantamisen ja energian sekä ympäristön säästämisen esimerkiksi tekstiili- ja elintarviketeollisuudessa. (Schmid, Schmidt-Dannert & Hammelehle 2016, 30,166,172).

2.1 Teollisten entsyymien valmistus Roalilla

Roal Oy:n teollisuusentsyymejä valmistava tuotantolaitos tutkimus- ja tuotekehitysosastoineen sijaitsee Rajamäen kylässä Nurmijärvellä. Yritys valmistaa entsyymejä rehu-, elintarvike-, leipomo-, tekstiili-, paperi- ja massateollisuuden tarpeisiin. Entsyymejä tuotetaan fermentoimalla *Trichoderma*- ja *Aspergillus*-hoimeita sekä *Bacillus*-bakteereja. Lopputuotteista yli 90 % menee vientiin, ja yrityksen liikevaihdosta 10 prosenttia käytetään tutkimukseen ja kehitykseen vuosittain. (Roal Oy 2019.)

3 DESINFIOINTI

Desinfiointiprosessi on sellainen, missä elävien mikrobien määrää saadaan vähennettyä pinnoilta ja käsitellyistä tuotteista. Se ei ole niin tehokas menetelmä kuin sterilointi, jolla voidaan tuhota elävät organismit ja bakteerien itiöt. Desinfiointitapoja on olemassa fysikaalisia ja kemiallisia. Fysikaalisia menetelmiä ovat höyry, kuumailma ja ionisoimaton säteily, kuten ultraviolettisäteily ja mikroaallot. Kemiallisia ovat muun muassa erilaiset alkoholit ja aldehydit, kuten etanoli ja formaldehydi. (McDonnell 2007, 55, 64, 79,165.)

Työssä käytettävät UV-C-säteily ja sininen valo ovat molemmat fysikaalisia menetelmiä.

3.1 UV-C-säteily

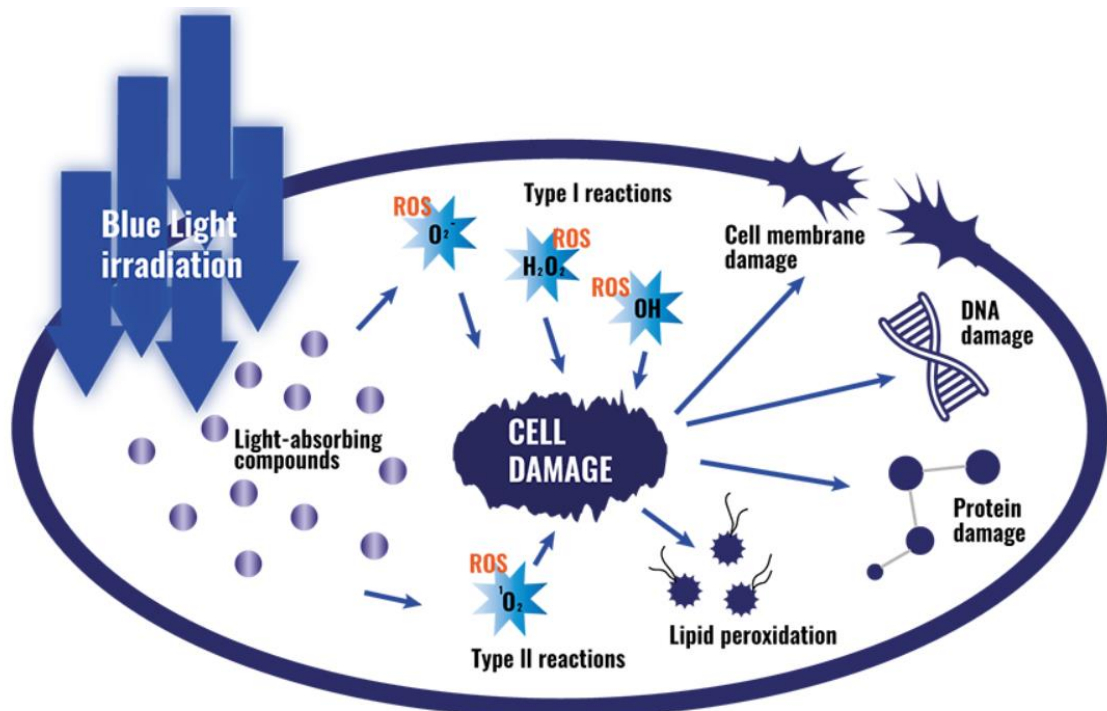
UV-C-säteily on lyhytaaltoisinta esiintyvää ultraviolettisäteilyä, jonka aallonpituudeksi on määritetty 100-280 nanometriä. Mikrobeihin vaikuttaa 200-280 nanometrinen aallonpituudet, eri pituuksilla eri tavoin, koska solujen erilaiset osat absorboivat säteilyn energiaa vaihtelevilla aallonpituuksilla. Tehokkaimmaksi on todettu 265 nanometriä, mikä absorboituu parhaiten nukleiinihappoihin ja rikkoo näin solujen DNA- tai RNA-juosteet, jolloin solut eivät kykene lisääntymään. Juuri tätä aallonpituutta hyödyntää testeissä käytetty UV-C-desinfiointimenetelmä, minkä on mahdollistanut uusi LED-teknologia. (Laihia, Pastila, Koulu, Auvinen, Hasan, Snellman, Kojo & Jokela N.d., 2, 4; McDonnell 2007, 65.)

Ultraviolettisäteilyä on hyödynnetty jo jonkin aikaa muun muassa juomaveden ja jäteveden käsittelyssä. Lisäksi sen käyttö on alkanut yleistyä myös elintarviketeollisuuden nesteiden, kuten prosessiveden, laimennettujen siirappien ja CIP-pe-sujen loppuhuuhteluvesien sekä suodatinlaitteistojen ja pakkauksien pintojen käsittelyssä. Ultraviolettisäteilyn etuna on sen kemikaalittomuus, eli esimerkiksi sillä käsiteltyyn veteen ei synny myrkkijä, epätoivottuja hajuja tai makuja. Nesteiden käsittelytarpeisiin on tarjolla erilaisia ultraviolettisäteilyä hyödyntäviä laitteistoja, joiden ominaisuudet riippuvat siitä, minkälaista nestettä halutaan käsitellä ja

kuinka paljon. Esimerkiksi vedessä olevat kiinteät partikkelit heikentävät menetelmän tehoa. (Halma PR N.d.; McDonnell 2007, 66-67.)

3.2 Näkyvän sinisen valon teknologia

Tietyn aallonpituuden omaava sininen valo kykenee aiheuttamaan erilaisille mikrobisoluille tuhoa. Valo absorboituu solujen sisäisiin, valoherkkiin yhdisteisiin, jolloin alkaa syntyä happiradikaaleja (ROS), jotka hyvin reaktiivisen luonteensa takia alkavat tehdä tuhojaan solun DNA:lle, RNA:lle, proteiinirakenteille ja solukalvolle. Kuviossa 1 on nähtävillä sinisen valon vaikutukset solun sisällä. (Led Tailor Innova7ion 2018, 6.)



KUVIO 1. Sinisen valon vaikutukset mikrobisolussa (Led Tailor Innova7ion 2018)

Toimintaperiaate on ollut tiedossa jo vuosikymmenien ajan, mutta viime aikoina kehittynyt LED-teknologia on mahdollistanut pelkästään juuri tietyn tehokkaan aallonpituuden käyttämisen. Tähän perustuvaa desinfiointitekniikkaa käytetään muun muassa puhdistilojen pintojen ja ilman puhdistamiseen mikrobeista. (Led Tailor Innova7ion 2018, 6.)

4 NÄYTTEIDEN ANALYSOINTI

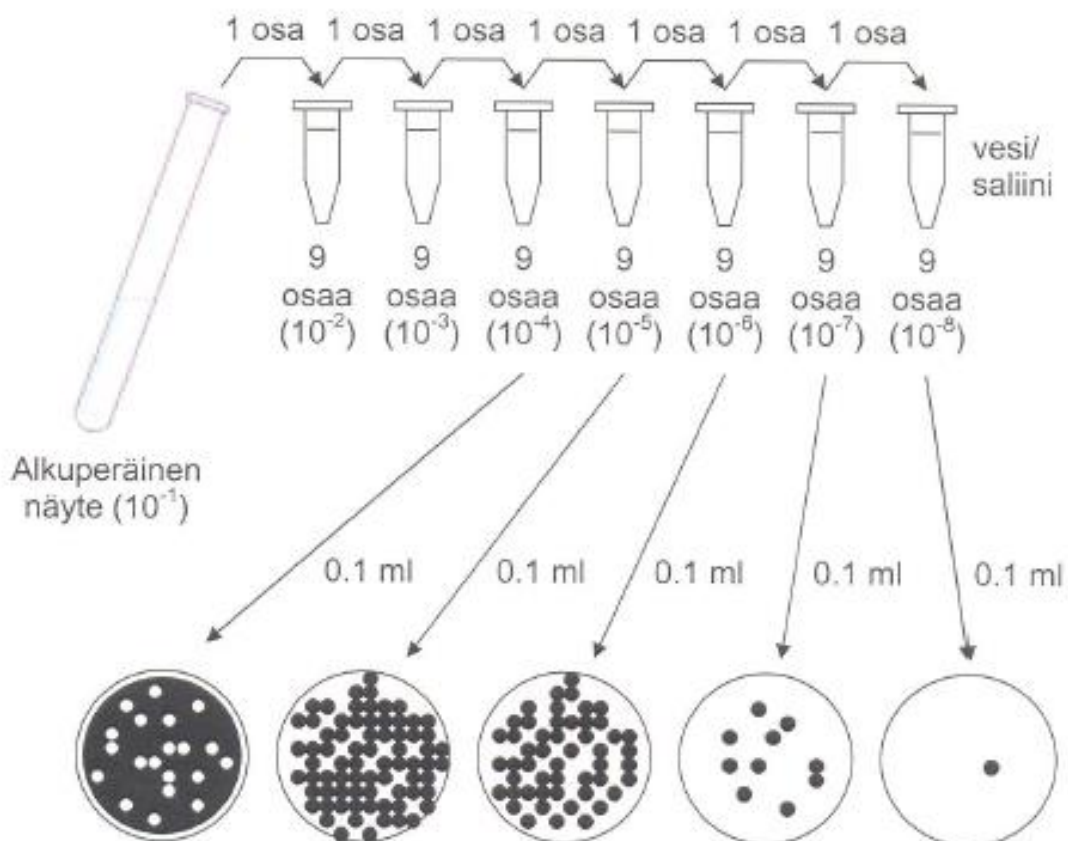
Käsiteltäviä näytteitä analysoitiin ensin fluoresenssimikroskoopilla, jolla voitiin arvioida karkeasti se, vähentykö elävien mikrobien lukumäärä, ja miten testausta jatketaan. Mikrobien lukumäärän tarkempi määrittäminen tehtiin viljelemällä näytteitä agarkasvatusalustoilla. Lisäksi viimeisten testien näytteistä määritettiin vielä entsyymiaktiivisuudet.

4.1 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssimikroskopia perustuu erilaisten fluoresoivien väriaineiden käyttöön, jotka näkyvät valon eri aallonpituuksilla. Työssä käytetyt väriaineet olivat SYTO9 ja propidiumjodidi, jotka molemmat sitoutuvat nukleiinihappoihin eli solujen DNA:han tai RNA:han. Näistä SYTO9-väri pystyy läpäisemään ehjänkin solukalvon, joten se värjää sekä elävät että kuolleet solut vihreäksi. Propidiumjodidi pääsee vain vaurioituneen solukalvon läpi, joten se värjää kuolevat ja kuolleet solut punaisiksi. Kun molempia väriaineita käytetään yhdessä näytteen analysoimiseksi, voidaan erottaa elävät ja kuolleet solut toisistaan, kun käytetään fluoresenssimikroskoopin valonlähteelle tiettyjä aallonpituuksia läpi päästäviä suodatimia. (Thermo Fisher Scientific 2014, 1.)

4.2 Mikrobipesäkelukumäärän määrittäminen

Näytteiden sisältämien mikrobipesäkkeiden tarkemman lukumäärän selvitys alkaa laimennussarjan tekemisellä, minkä laajuus riippuu näytteen arvioidusta mikrobimäärästä. Tavoitteena on saada kasvatusmaljalle erilleen laskettava määrä mikrobipesäkkeitä eli paljon mikrobeja sisältävää näytettä täytyy laimentaa enemmän. Laimentamista havainnollistaa kuvio 2 (Kanto 2015). (Sanders 2012)



KUVIO 2. Näytteen laimentaminen ja maljoille kasvaneet mikrobipesäkkeet eri laimennoksissa (Kanto 2015)

Laimennettuja näytteitä annostellaan maljahajotus- tai pintalevitystekniikoilla kasvatusmaljoille, jonka jälkeen maljoja inkuboidaan lämpökaapissa analyysille määritetyssä lämpötilassa tietty aika. Tämän jälkeen maljoille kasvaneet pesäkkeet voidaan laskea ja alkuperäisen näytteen pesäkelukumäärä voidaan määrittää laimennosten perusteella. Mikrobipesäkelukumäärälle käytetään yksikköä CFU/g tai CFU/ml eli pesäkkeen muodostava yksikkö grammaa tai millilitraa näytettä kohden. (Sanders 2012)

4.3 Entsyymiaktiivisuus

Entsyymiaktiivisuuden määrittäminen tapahtuu yleensä tutkimalla, paljonko reaktiossa kuluu substraattia tai siinä syntyy tuotetta tiettyssä ajassa. Yleensä analysointi tapahtuu spektrofotometrillä, jolla voidaan määrittää värillisen lopputuotteen intensiteetti, jota voidaan sitten verrata standardiin. (Lindström 2017, 14-15.)

Roal Oy:n valmistamien entsyymien aktiivisuuksien määrittämiseen on laadittu omat spesifiset analyysinsä, jotka ovat yrityssalaisuuden alaista tietoa, joten niitä ei käsitellä tässä opinnäytetyössä.

5 ESIVALMISTELUT JA TESTILAITTEISTO

Testien käytännön järjestelyjä suunniteltiin siltä pohjalta, että entsyymiliuoksien käsittely toteutetaan laboratoriomittaakaavassa. Käytettävät teknologiat vaativat ohuen nestepatjan tehokkaasti toimiakseen, joten petrimalja soveltui tehtävään parhaiten. UV-C-säteilylähdevaihtoehdolle tarvittiin sopiva kotelorakenne, joka pitäisi haitallisen säteilyn sisällään. Aiheesta ensimmäistä kertaa Roal Oy:n teknisen päällikön kanssa keskustellessa oli tullut puheeksi hiljattain julkaistu artikkeli, jossa kerrottiin uudesta sinistä valoa hyödyntävästä LED-teknologiasta, joka tuhoaa mikrobeja ilmasta ja pinnoilta. Teknologiaa tarjoavalla yrityksellä oli myös UV-C-säteilyä hyödyntävä desinfiointilaatikko, joka sopi täydellisesti testiin käyttöön.

5.1 Käsiteltävät tuotteet ja analyysit

Testeissä oli tarkoituksena paneutua lähinnä puolivalmisteiden käsittelyyn, koska siinä vaiheessa liukset ovat volyymeiltaan vielä kohtalaisia verrattuna lopputuotteisiin, ja siten myös helpommin käsiteltävissä. Kustakin kolmen eri tuottoisännän entsyymikannoista haluttiin saada yksi säilöntäainetta sisältämätön puolivalmiste mukaan käsittelyihin, jotta voitaisiin saada riittävän laaja kuva desinfiointin soveltuvuudesta eri tuotteilla. Lisäksi testeihin aiottiin sisällyttää jokin säilöntäaineton lopputuote.

Näytteiden mikrobimäärän karkeaan arvioimiseen heti käsittelyjen jälkeen käytettiin fluoresenssimikroskooppia ja tarkempaan määrittelyyn viljelyä laboratoriossa. Onnistuneesti desinfioiduista näytteistä määritettäisiin lisäksi entsyymiaktiivisuudet sekä varmistettaisiin entsyymiproteiinien eheys SDS-PAGE-geelites-teillä.

5.2 Tapaaminen laitetoimittajan luona

Laitetoimittajan luona arvioitiin erilaisten puolivalmiste- ja lopputuotenäytteiden perusteella, soveltuvatko liuokset käsiteltäviksi molemmilla tekniikoilla. Mittausten mukaan sinisen valon intensiteetti säilyi, kun se meni tumman ja samean puolivalmisteen läpi, joten laitetoimittaja rakensi sinisen valon teknologiaa hyödyntävän käsittelylaatikon UV-C-säteilylaatikon lisäksi.

Testejä varten valmisteltiin välineet eli sopivia steriilejä petrimaljoja, pipettejä ja koeputkia, jotta voitaisiin käsitellä näytteitä mahdollisimman aseptisesti. Lisäksi varmistettiin, että käsiteltyjä näytteitä päästään heti tutkimaan fluoresenssimikroskoopilla, minkä perusteella voidaan välittömästi päättää, miten testejä jatketaan.

6 ENTSYYMILIUOSTEN DESINFIOINTIKÄSITTELY JA TULOKSET

6.1 Ensimmäiset testit laitetoimittajan kanssa

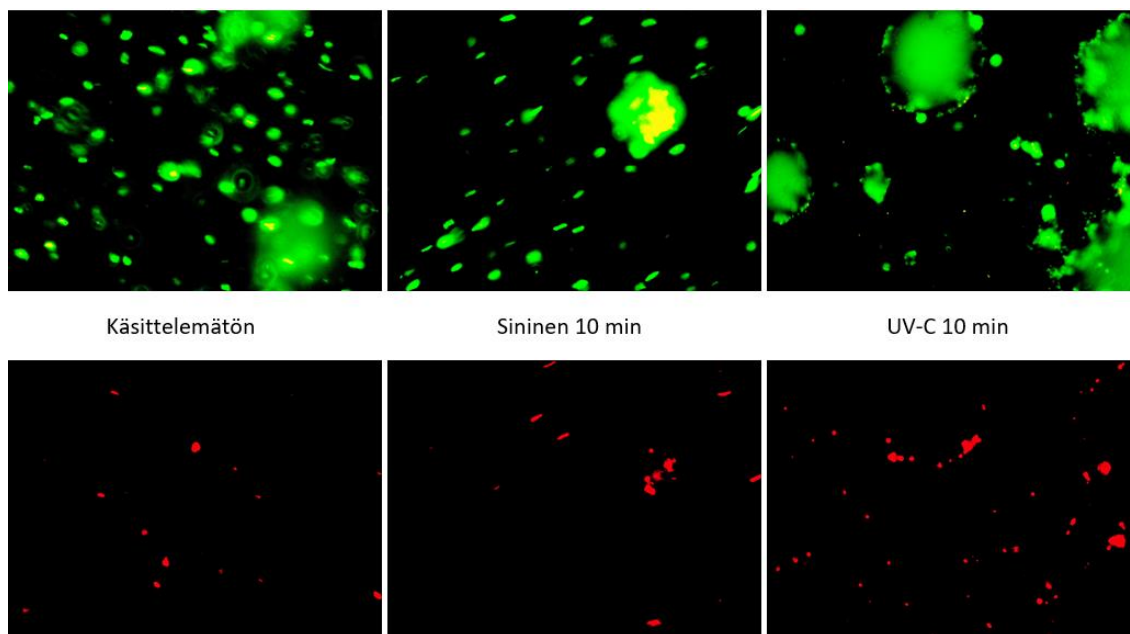
Testit aloitettiin käsittelemällä halkaisijaltaan 9 senttimetrin petrimaljalla 20 millilitraa melko tummaa puolivalmistetta, joka oli lisäksi normaalia sameampaa. Entsyymiliuos oli myös mikrobiologisesti erittäin kontaminoitunut, joten se soveltui erinomaisesti ensimmäiseen kokeeseen. UV-säteilyä ja sinivaloa varten oli omat näytteet, joita käsiteltiin 10 minuutin ajan suljetuissa desinfiointilaatikoissa (Kuva 1.).



KUVA 1. Sinivalodesinfiointilaatikko

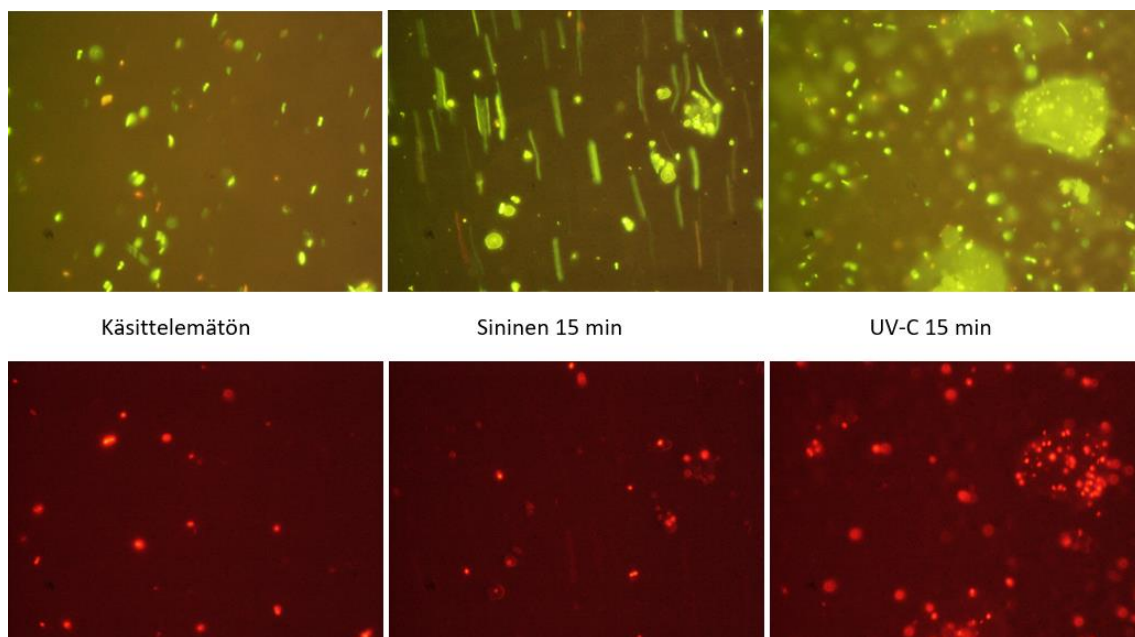
Lähtöajatus oli, että tässä ajassa molempien käsittelyjen pitäisi pystyä vähentämään merkittävästi eläviä mikrobeja ja tämän jälkeen voitaisiin lähteä hakemaan sopivaa annoskoko, jossa näyte saataisiin desinfioiduksi. Näytteitä haluttiin aluksi analysoida karkeasti fluoresenssimikroskoopilla, jolloin nähtäisiin, mihin suuntaan käsittelyaikaa tulisi muuttaa.

Mikroskoopilla oli nähtävissä hieman enemmän kuolleita mikrobisoluja käsitellyissä näytteissä verrattuna alkuperäiseen käsittelemättömään näytteeseen. Kuvassa 2 vihreällä aallonpituudella on nähtävissä elävät mikrobit ja punaisella kuolleet.



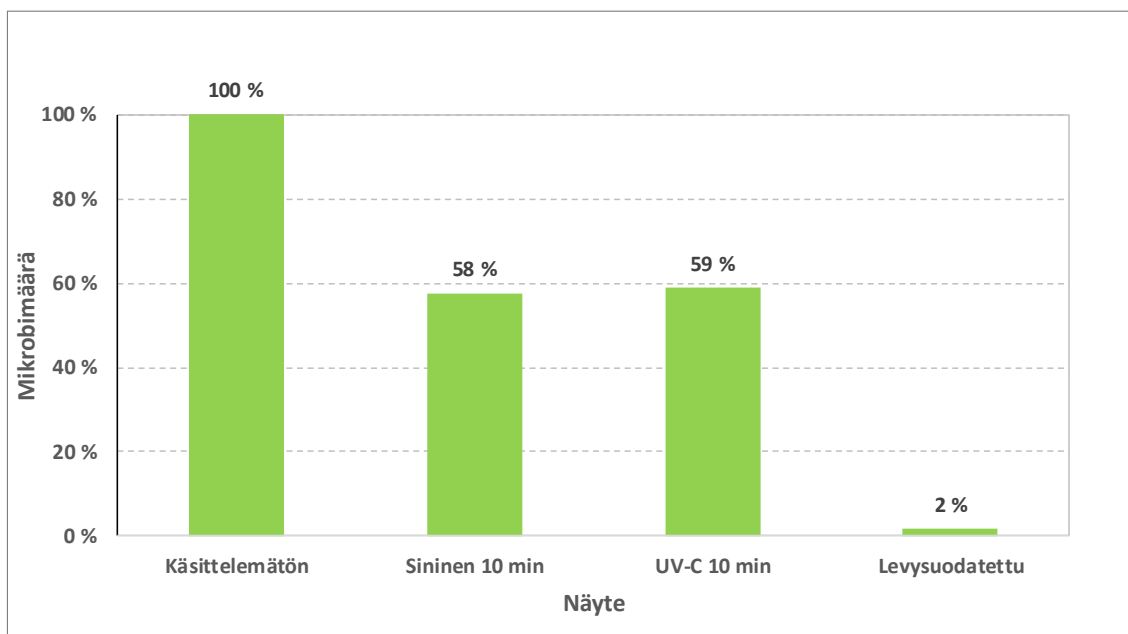
KUVA 2. Fluoresenssimikroskopia 10 minuutin käsittely

Tämän perusteella käsittelyaikaa kasvatettiin 15 minuuttiin ja näytemäärää pienennettiin noin 3 millilitraan käsittelyjen tehostamiseksi. Kuvan 3 perusteella voitiin päätellä kuolleiden solujen lisääntyneen, mutta ei merkittävästi.



KUVA 3. Fluoresenssimikroskopia 15 minuutin käsittely

10 minuutin näytteistä määritettiin puhtaudet QC-laboratoriossa, mutta 15 minuuttia käsitellyt pienemmät näytemäärät eivät riittäneet CFU-analyysien tekoon. Näytteiden mikrobipesäkemäärät (CFU/g) on esitetty kuviossa 3 suhteutettuna käsittelemättömän näytteen lähtötasoon, joka on 100 prosenttia. Verrokkina on tuotannossa useampaan kertaan levysuodatetusta, saman erän puolivalmis-teesta analysoitu mikrobimäärä, joka on huomattavasti alhaisempi kuin testeissä käytetyillä desinfiointimenetelmillä.

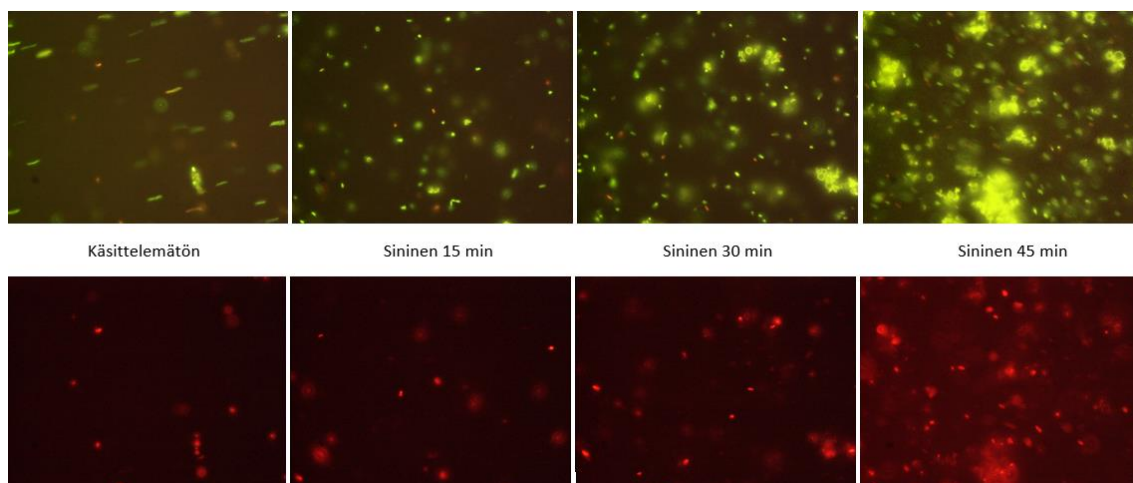


KUVIO 3. Käsiteltyjen näytteiden ja levysuodatetun näytteen mikrobipesäkelukumäärät suhteutettuna käsittelemättömään näytteeseen

Fluoresenssimikroskopiakuvat ja CFU-tulokset olivat näiden ensimmäisten testien perusteella melko yhteneväiset: molempien perusteella mikrobien lukumäärä väheni käsittelyn ansiosta. Teoriassa UV-C-säteilyn olisi pitänyt tuhota mikrobisolut lähes kokonaan 15 minuutin käsittelyssä, jos se pystyisi kunnolla läpäisemään koko nestekerroksen. Tästä syystä testejä ei enää jatkettu UV-C-säteilyllä. Sinivalolaatikko jäi kuitenkin jatkotesteihin, koska sen toimintamekanismissa käsittelyajan pidentämisen oletettiin edistävän elävien mikrobien vähentymistä.

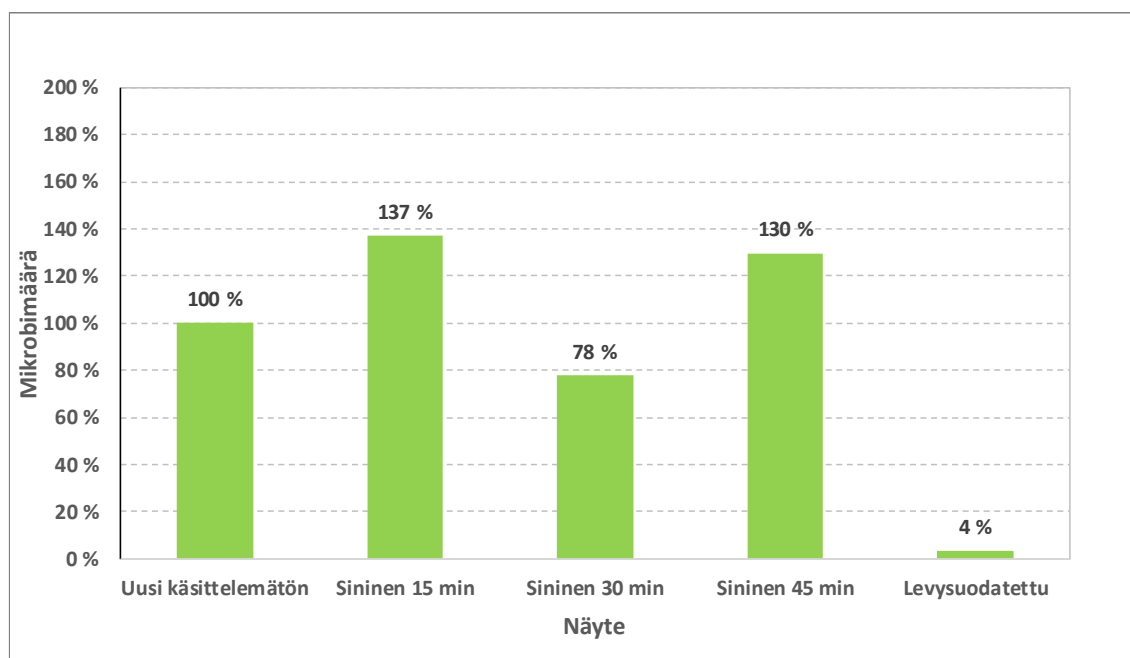
6.2 Sinivalon jatkotestit eri pituisilla käsittelyajoilla

Testejä jatkettiin käyttäen pelkkää sinivaloa, samalla puolivalmiste-erällä ja muuten samalla tavalla kuin aiemminkin, mutta käsiteltävän näytteen määrä nostettiin 15 millilitraan, jotta sitä riittäisi tarpeeksi CFU-analysien tekoon ja nestekerros ei kuitenkaan olisi turhan paksu. Lisäksi näytteitä sekoitettiin 5 minuutin välein mahdollisimman tasaisen käsittelyn aikaansaamiseksi. Kuvan 4 fluoresenssimikroskopioiden perusteella näytti siltä, että kuolleiden mikrobien määrä oli noussut, mutta myös elävien solujen määrä näytti lisääntyneen.



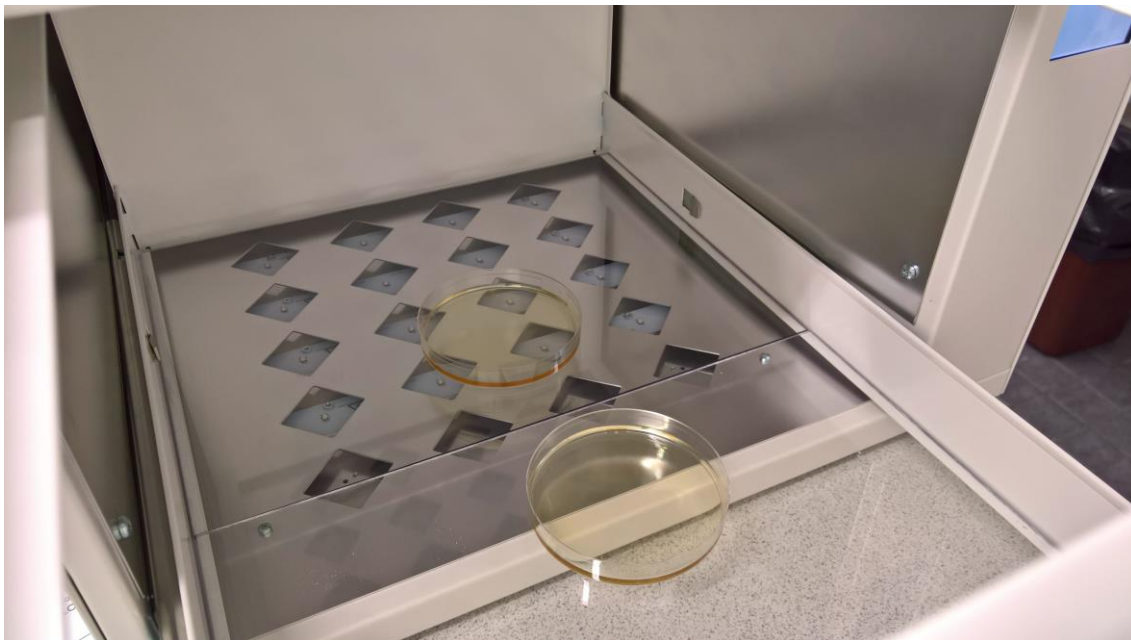
KUVA 4. Fluoresenssimikroskopia eri pituiset käsittelyt

CFU-analyysien tuloksissa oli jonkin verran vaihtelua verrattuna käsittelemättömään puolivalmisteeseen, kuten kuviosta 4 voidaan havaita. Kuitenkin niiden perusteella mikrobien määrä olisi pikemminkin kasvussa kuin vähentymään päin, mikä taas ei täsmännyt edellisten tulosten kanssa. Tähän saattoi olla syynä käsittelemättömien näytteiden välinen suuri ero niiden CFU-tuloksissa, mikä on voinut johtua esimerkiksi näytteen huonosta edustavuudesta tai sen virheellisestä analysoinnista.



KUVIO 4. Eri aikoja käsiteltyjen näytteiden ja levysuodatetun näytteen mikrobi-pesäkelukumäärät suhteutettuna käsittelemättömään näytteeseen

Mikroskopia- ja mikrobipesäkemäärätulosten perusteella tuli epäily siitä, että neste saattaisi haihtua käsittelyn aikana, koska valokäsittelyn suuri energiamäärä lämmittää liuosta ja koko laatikkoa huomattavasti ilman minkäänlaista jäähdytystä (kuva 5.).



KUVA 5. Käsittelylaatikon alkuperäinen testiasetus ilman jäähdytystä

Seuraavissa testeissä selvitettiin lämmön vaikutuksia käsiteltävään liuokseen ja lisättiin käsiteltävien näytteiden määrää, jotta tuloksista saataisiin luotettavampia.

6.3 Haihtuminen, muutokset ja jäähdytystestit

Haihtuvuuden testaamista varten valittiin käsiteltäväksi säilöntäaineettomat tummahko puolivalmiste ja hyvin vaalea lopputuote (kuva 6.), joiden molempien mikrobitasot olivat loppukäyttöön hyväksytyllä tasolla.



KUVA 6. Haihtuvuustestin puolivalmiste ja lopputuote

Näytteitä käsiteltiin 15 minuutin ajan, jolloin liuoksista haihtui noin 10-15 prosenttia, riippuen liuoksen tummuudesta: tummempi puolivalmiste sitoi enemmän valon energiaa ja tällöin myös haihtui enemmän kuin vaalea lopputuote. Lisäksi havaittiin, että liuokset samentuivat lämmitessään, mutta palautuivat viilennyksen jälkeen ennalleen. Tätä kokeiltiin myöhemmin käsittelemällä toista lopputuotetta suoraan lähes suljetussa koeputkessa, jolloin haihtuminen jäi vähäiseksi, mutta lämmön vaikutus liuoksen sameuteen oli merkittävä (kuva 7.).



KUVA 7. Jääkaappikylmä, 15 minuuttia sinivalokäsitelty ja uudelleen jäähdytetty lopputuote

Haihtuvuustestien näytteistä määritettiin myös mikrobimäärät, jotka noudattivat samaa kaavaa kuin edellisissäkin testeissä eli mikrobien määrä lisääntyi käsitellyissä näytteissä.

6.3.1 Jäähdytystestit ja ratkaisu viimeisiin testeihin

Lämmön aiheuttamien ongelmien takia käsiteltävien liuoksien jäähdyttämiseen täytyi kehittää jokin yksinkertainen ratkaisu, jotta voitiin saada mahdollisimman luotettavat tulokset lopullisista testeistä. Tässä vaiheessa myös käytetyn petrimaljan koko vaihdettiin halkaisijaltaan 14 senttimetriseen, käsiteltävän nestemäärän ja jäähdytyspinta-alan maksimoimiseksi. Käsitelylaatikko ei mahdollistanut mitään monimutkaista laitteistoa, joten jäähdytystä lähdettiin toteuttamaan kokeilemalla erilaisia jäähdytyspetejä.

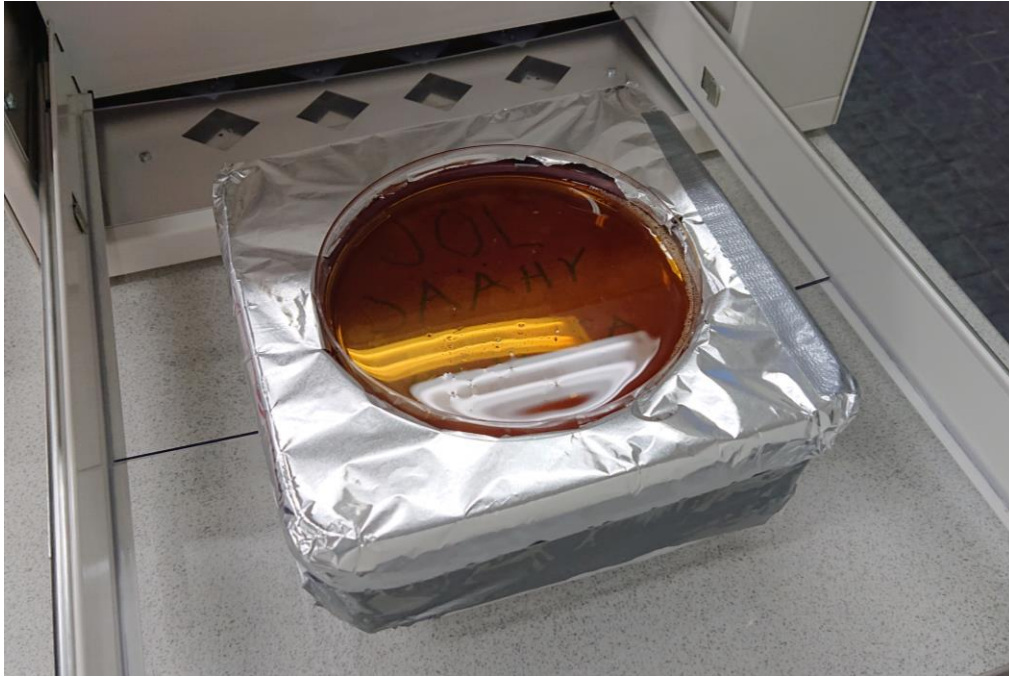
Ensimmäisenä petrimaljan alle aseteltiin tavallisia kylmäkalleja, jolloin 50 millilitran punnitusta puolivalmistenäytteestä oli hävinnyt 15 minuutin käsittelyn aikana vain noin 0,4 prosenttia, lämpötilan noustessa 12 celsiusasteesta 22:een. Kylmäkalleja ei pystynyt asettelemaan tasaisesti niin, että koko petrimaljan pohja olisi

jäähdytettynä, joten astiaan lisättiin vettä sopivasti jäähdytyksen tehostamiseksi. Tällä tavalla lämpötila nousi vain noin 5 celsiusasteella, haihtumisen pysyessä lähes samalla tasolla.

Jäähdytyspedin tehoa voitiin pitää riittävänä, koska haihtuminen oli huomattavasti vähäisempää verrattuna aiempiin testeihin. Lisäksi lämpenevissä liuoksissa esiintynyttä sameutumista ei enää tapahtunut. Riskinä oli kuitenkin, että käsiteltävän liuoksen sekaan joutuisi jäähdytysvettä tai petrimalja ei pysyisi paikoillaan epävakaan alustan päällä. Tämän takia täytyi rakentaa petrimaljalle sopiva jäähdytysalusta suljetulla rakenteella.

Aluksi jäädettiin vettä isossa rasiassa, jonka jälkeen jään päälle asetettiin petrimaljan kansi painon kera, ja lisättiin vettä niin, että kansi oli sopivasti upotettuna uutta pakastusta varten. Tämän päälle asetettu petrimalja jäähtyi lähes samalla kuin pelkillä kylmäkalleilla eli haihtuminen oli vähäistä, mutta nesteen lämpötila nousi. Kun kannen otti pois välistä, neste jäähtyi vielä tehokkaammin, ja jään sulassa vesi tehosti sitä entisestään, jolloin 30 minuutin käsittelyssä lämpötila nousi vain reilun asteen ja haihtuvuus oli 0,3 prosenttia.

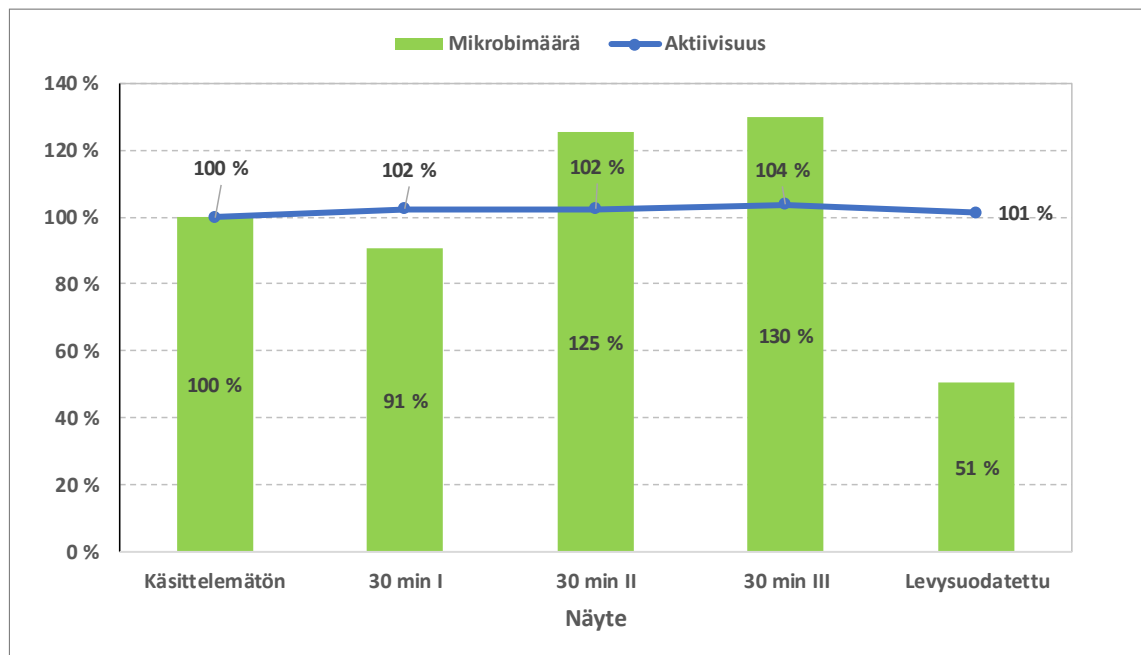
Lopullinen testi päädyttiin kuitenkin tekemään umpinaisella jäähdytysalustalla, jonka sisälle valmistettiin kalsiumkloridivesiliuos, jolla estettiin alustan muodon muuttuminen pakastettaessa veden jäätympistettä alentamalla. Tällä lopullisella alustalla tehty jäähdytystesti antoi riittävän hyvän tuloksen sen tehosta: 30 minuutin käsittelyn aikana tumman puolivalmisteen lämpötila nousi reilu 6 celsiusastetta, hävikin ollessa alle 0,2 prosenttia. Kuvassa 8 on nähtävillä lopputesteissä käytetty jäähdytysratkaisu.



KUVA 8. Lopputestien jäähdytysalusta isolle petrimaljalle

6.4 Lopputestit sinivalokäsittelyllä

Viimeisiä testejä lähdettiin tekemään sillä olettamalla, että jäähdytysratkaisu ei muuta sinivalokäsittelyn vaikutusta tuotteen mikrobilukumäärään, vaan edellisten testien tulokset saadaan vahvistettua mahdollisimman luotettavasti. Käsittelyyn otettiin hieman kontaminoitunut, stabiloimaton puolivalmiste. Puolivalmisteesta otettiin yksi käsittelemätön 0-näyte ja kolme erikseen käsiteltävää 50 millilitran näytettä. Isommalla petrimaljalla nestepatjan paksuus oli noin 3 millimetriä ja tasanaisen käsittelyn varmistamiseksi näytteitä sekoitettiin 5 minuutin välein. Näytteet punnittiin ennen 30 minuutin käsittelyä ja käsittelyn jälkeen, jotta voitiin todeta haihtumisen pysyvän vähäisenä. Näytteistä määritettiin mikrobilukumäärien lisäksi kyseisen puolivalmisteen entsyymiaktiivisuudet. Näistä analyyseistä saadut tulokset ovat nähtävillä kuviossa 5 suhteutettuna käsittelemättömän näytteen lähtötasoon.



KUVIO 5. Lopputestinäytteiden sekä levysuodatetun näytteen mikrobipesäkelukumäärät ja entsyymiaktiivisuudet suhteutettuna käsittelemättömään näytteeeseen

Tulokset olivat aiempien testien kanssa yhteneväisiä eli mikrobimäärissä ei nähty halutunlaista vähentymistä, vaan kahdessa näytteessä jopa merkittävää kasvua, vaikka käsitellyistä näytteistä haihtui keskimäärin vain 0,5 prosenttia. Aktiivisuudet ovat pysyneet lähes samoina, mutta käsitellyissä näytteissä voidaan havaita pientä haihtumisen mukaista kasvua. Koska ei voitu todeta mikrobien tuhoutuneen merkittävästi, päätettiin jättää lisäanalyytit eli entsyymien eheyden varmistavat SDS-page-geelitestit tekemättä.

7 POHDINTA

Nestemäisten entsyymituotteiden uusiin desinfiointitapoihin liittyi kovat odotukset ja käsittelytestejä suunniteltiin tehtäväksi sen mukaan, että tuotteista saadaan selkeästi vähennettyä eläviä mikrobeja, ja että tutkittavaksi jää lähinnä entsyymi-proteiinien eheyden varmistaminen. Pieni aavistus oli kuitenkin siitä, että entsyymiliuoksen ominaisuudet kuten tummuus, korkea taitekerroin ja sameus heikentävät UV-C-säteilyn sekä sinisen valon kykyä päästä nestepatjan läpi.

Suunnitelma alkoi muuttua heti ensimmäisistä testeistä lähtien, kun todettiin UV-C-säteily kykenemättömäksi desinfiomaan edes hyvin pientä määrää entsyymiliuosta merkittävällä säteilyannoksella, jonka kasvattamisella ei olisi ollut vaikutusta. Käsittelyä päätettiin jatkaa sinisellä valolla, koska fluoresenssimikroskoopiakuivissa voitiin nähdä kuolleiden mikrobisolujen määrän lisääntyvän käsittelyajan pidentyessä. Kuitenkin näytti myös siltä, että elävätkin solut olivat lisääntymään päin. Syy löytyi käsittelyn nostamasta lämpötilasta ja liuoksen merkittävästä haihtumisesta, mikä voitiin vahvistaa CFU-analyysien mikrobilukumäärätuloksista.

Sopivan käsittelyajan löytämisen sijaan, viimeisissä testeissä tutkittiin sopivaa jäähdytysratkaisua, jotta aiemmin saadut tulokset käsittelyn riittämättömästä tehosta saatiin luotettavasti vahvistettua. Samalla karsittiin loppunäytteille tehtäviä analyysejä, koska haluttuun tulokseen eli mikrobien merkittävään tuhoamiseen ei päästy. Viimeisistä käsittelyistä näytteistä määritettiin kuitenkin entsyymiaktiivisuudet, joihin ei tullut merkittäviä muutoksia.

Epäselväksi jäi se, mitkä tekijät vaikuttivat siihen, että eläviä mikrobeja ei saatu vähennettyä. Mahdollisia syitä voivat olla entsyymiliuoksien tumma väri ja kiintoainepitoisuus sekä nestekerroksen paksuus. Puolivalmisteissa on yleisesti esiintynyt hyvin monenlaisia mikrobeja, pääosin Bacillus-suvun bakteereja, hyvin rajuakin olosuhteita (sterilointi, kuivaus ja happamat liuokset) kestäviä ja itiöiviäkin lajeja, joten mikrobit ovat myös voineet olla liian kestäviä testimenetelmän olosuhteissa.

Sinisen valon osalta erikoista oli se, että elävien mikrobien lukumäärä vaikutti tulosten perusteella olevan jopa kasvussa. Tähän voi olla syynä näytekohtainen vaihtelu, mutta sen lisäksi epäilyttää, voiko valon vaikutusmekanismi toimia jopa mikrobisolujen lisääntymistä kiihdyttävänä tekijänä, koska osa energiasta absorboituu liuokseen ja mahdollisesti vain pieni osa vaikuttaa mikrobien valoherkkiin komponentteihin. Tämä saattaisi johtaa solun toimintaan tehostavasti sen sijaan, että se rikkoutuisi.

Mahdollisia jatkotutkimuksia ajatellen täytyisi selvittää, mikä entsyymiliuoksen ominaisuus estää mikrobien tuhoamisen näillä teknologioilla. Muuttuisiko vaikutus, jos käsittely tehtäisiin suuremman mittakaavan mukaisella testilaitteistolla, jossa nestemäinen entsyymi virtaisi jäähdytettynä, huomattavasti ohuempana filminä kuin sitä oli mahdollista käsitellä petrimaljalla. Myös laitteistoon johdetun ilman muodostamat ilmakuplat saattaisivat parantaa käsittelyn lopputulosta.

LED-teknologiaa hyödyntävälle siniselle valolle voisi kuitenkin olla käyttöä prosessissa toisella tavalla, mutta se vaatisi tietenkin omat tutkimuksensa. Pestyille säiliöille on määritetty tietyt puhtausajat, joiden jälkeen ne on pestävä uudelleen ennen kuin niihin voidaan siirtää puolivalmisteita tai lopputuotteita. Sinisellä valolla säiliöiden sisäpinnat pystyttäisiin mahdollisesti pitämään vapaana mikrobeista ennen seuraavaa käyttökertaa. Täytyisi kuitenkin ensin selvittää millainen puhtaus saavutettaisiin valodesinfioinnilla verrattuna ensimmäisen pesun ja uuden pesun jälkeisiin tilanteisiin sekä valodesinfioinnin kustannustehokkuus verrattuna uusiin pesuihin.

Tiukentuvista puhtausvaatimuksista johtuen, levysuodatuksen rinnalle olisi edelleen kysyntää jollekin uudelle, fysikaalisesti ilman kemikaaleja desinfioivalle tai jopa steriloivalle laitteistolle, mitä työssä tutkittiin. Se auttaisi haastavien, herkästi kontaminoituvien tuotteiden kanssa ja mahdollistaisi uusien säilöntäaineettomien tuotteiden tarjoamisen.

LÄHTEET

Halma PR. N.d. UV Disinfection In The Brewing And Beverage Industries. Artikkel. Luettu 11.4.2019 <http://halmapr.com/news/aquionics/uv-disinfection-in-the-brewing-and-beverage-industries/>

Kanto, P. 2015. Mikrobiologian harjoitustyöt. Työohje. Tampereen ammattikorkeakoulu. Tampere. Luettu 12.4.2019

Laihia, J., Pastila, R., Koulu, L., Auvinen, A., Hasan, T., Snellman, E., Kojo, K. & Jokela, K. N.d. UV-säteilyn biologisia ja terveydellisiä vaikutuksia. Luettu 11.4.2019.

<https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/ultravioletti-ja-lasers%C3%A4teily-kirja-luku-5.pdf/fb983d4c-7b22-4ce2-805b-ded87bcc8986>

Lindström, S. 2017. Ksylanaasiaktiivisuusmenetelmän automatisointimahdollisuuden selvittäminen. Energia- ja ympäristötekniikan koulutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö. Luettu 12.4.2019. <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2017060712823>

Led Tailor Innova7ion. 2018. Teknologiaesite. Luettu 11.4.2019. <http://ledtailor.fi/wordpress/wp-content/uploads/LTI-teknologiaesite.pdf>

McDonnell, G. E. 2007. Antisepsis, disinfection, and sterilization: Types, action, and resistance. Washington, D.C.: ASM Press. Luettu 11.4.2019. Vaatii käyttöoikeuden.

https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpADSTAR01/viewer-Type:toc//root_slug:antisepsis-disinfection-and

Roal Oy. 2019. Web-sivut. Luettu 10.4.2019. <https://www.roal.fi/>

Sanders, E. R. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. Luettu 12.4.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846335/>

Schmid, R. D., Schmidt-Dannert, C. & Hammelehle, R. 2016. Biotechnology: An illustrated primer. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. Luettu 10.4.2019. Vaatii käyttöoikeuden.

<https://www-dawsonera-com.libproxy.tuni.fi/abstract/9783527677566>

Thermo Fisher Scientific. 2014. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits. Käyttöohje. Luettu 12.4.2019 <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp07007.pdf&title=TEIWRSYjNDc7REVBRCambHQ7aSZ-ndDtCYWMmbHQ7L2kmZ3Q7TGlnaHQgQmFjdGVyaWFsIF-ZpYWJpbGI0eSBLaXRz>