



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Noora Keskinen

Entsyymifermentoinnin proteiinimäärityksen lineaarisuuden tarkistus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööriyö

21.5.2021

Tekijä Otsikko	Noora Keskinen Entsyymifermentoinnin proteiinimäärityksen lineaarisuuden tarkistus
Sivumäärä Aika	32 sivua + 6 liitettä 21.5.2021
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	lehtori Carola Fortelius-Sarén laadunvalvonnan asiantuntija Päivi Kaartinen laadunvalvontalaboratorion tiiminvetäjä Pauliina Prokkola
<p>Insinööriä tehtiin Roal Oy:lle, joka on teollisia entsyymejä valmistava yritys. Työn tavoitteena oli tarkistaa proteiinimäärityksen lineaarinen mittausalue erälle entsyymifermentoinnille. Tutkittavan fermentoinnin tuloksissa on suuri hajonta niin eri kasvatuksien kuin saman kasvatuksen eri vaiheiden välillä.</p> <p>Proteiinimäärityksen lineaarisuus haluttiin määrittää uudelleen kyseiselle fermentoinnille, sillä näitä fermentointeja on usein. Proteiinipitoisuudet määritetään päivittäin fermentoinneista, jotta voidaan seurata niiden etenemistä. Mittausten uusinnosta ja tulosten epävarmuudesta aiheutuva haitta on selkeä.</p> <p>Työssä tutkittiin kolmea eri fermentointia (F1, F2 ja F3) ja niiden neljää eri vaihetta (B8, B14, B23 ja B32). Tutkittavalle fermentoinnille on määritetty kapeampi mittausalue kuin muille yrityksen fermentoinneille proteiinipitoisuusmäärityksessä. Työssä tutkittiin lineaarisuutta muilla fermentoinneilla käytössä olevalla laajemmalla mittausalueella. Bradford-proteiinipitoisuusmäärityksen teki nesteenkäsittelyrobotti Tecan Freedom EVO - 200.</p> <p>Tutkittavalle fermentoinnille löydettiin uusi laajempi lineaarinen mittausalue. Laajemman mittausalueen johdosta mittaustulosten epävarmuudesta ja analyysien uusinnosta aiheutuva haitta saatiin minimoitua.</p> <p>Lisäksi insinööriyössä tarkasteltiin lyhyesti fermentoinnin C01-vaiheen myseelinäytteen laimentamista Milli-Q-veteen. Tällä hetkellä C01-vaiheen näytteille tehdään alkulaimennos mittapullossa puskuriin. Kaksi täysin eri fermentointia otettiin tutkittavaksi, ja molemmat fermentoinnit laimennettiin niille soveltuviin puskureihin sekä Milli-Q-veteen. Lyhyellä tarkastelulla huomattiin Milli-Q-laimentamisen vaikuttavan tuloksiin. C01-vaiheen näytteiden laimentamista puskuriin päätettiin jatkaa. Tulokset olivat suuntaa antavia.</p>	
Avainsanat	entsyymi, proteiinipitoisuuden määrittäminen, lineaarinen mittausalue

Author Title	Noora Keskinen Checking the Linearity of the Protein Assay for Enzyme Fermentation
Number of Pages Date	32 pages + 6 appendices 21 May 2021
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Carola Fortelius-Sarén, Senior Lecturer Päivi Kaartinen, Quality Control Specialist Pauliina Prokkola, Quality Control Laboratory Team Leader
<p>The thesis was done for Roal Oy, a company that manufactures industrial enzymes. The aim of this thesis was to check the linearity of the protein assay for enzyme fermentation. The fermentation under study has a large variance in results both between different cultures and different stages of the same culture.</p> <p>Linearity of the protein assay had to be re-determined for the fermentation because these fermentations are frequent. Protein concentrations are determined daily from fermentations to monitor their progress. The repetition of the measurements and the uncertainty of the results cause a significant disadvantage.</p> <p>Three different fermentations (F1, F2 and F3) and their four stages (B8, B14, B23 and B32) were studied. The fermentation under study has a narrower measuring range than other fermentations in the company in the protein content determination. The linearity was checked with a wider absorbance range used with other fermentations. The Bradford protein content assay was performed by a Tecan Freedom EVO 200 fluid handling robot.</p> <p>A new wider linear measuring range was found for the fermentation under study. Due to the new wider measurement range, the disadvantage caused by the uncertainty of the measurement results and repetitions of the assay was minimized.</p> <p>In addition, the thesis also briefly examined the dilution of the mycelial sample in C01 stage of fermentation in Milli-Q-water. Currently C01 stage samples are initially diluted in volumetric flasks to buffer. Two completely different fermentations were examined. Both fermentations were diluted in appropriate buffers as well as Milli-Q-water. It was found that Milli-Q dilution affects the results. It was decided to continue diluting the C01 stage samples in buffers.</p>	
Keywords	enzyme, determination of protein content, linear measuring range

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teolliset entsyymit	2
3	Proteiinipitoisuuden määrittäminen	5
3.1	Määrittäminen tarkoitus Roalilla ja eri menetelmien valintaperusteet	5
3.2	Bradford-proteiinipitoisuusmäärittäminen	6
3.3	Vaihtoehtoiset proteiinipitoisuuden määrittämenetelmät	7
3.3.1	Suora spektrofotometrinen määrittäminen	7
3.3.2	Biuret-menetelmä	8
3.3.3	Lowry-menetelmä	8
3.3.4	Bikinkoniinihappo (BCA) -menetelmä	9
4	Materiaalit ja menetelmät	10
4.1	Lineaarisuuden määrittäminen fermentoinnille Bradford-määrittäyksessä	10
4.1.1	Näytteiden käsittely ennen mittauksen aloittamista	11
4.1.2	Työn kulku	12
4.1.3	Lineaarisuuden määrittäminen ja korrelaatio	13
4.2	Nesteenkäsittelyrobotin (Tecan Freedom EVO -200) toimintaperiaate	14
4.3	Laimentaminen Milli-Q-veteen puskurin sijasta	15
5	Tulokset	17
5.1	Mahdollisten lineaaristen mittausalueiden määrittäminen kuvaajista	17
5.2	Fermentointien eri vaiheiden välistä vertailua	19
5.3	Korrelaation tarkastelu valituilla alueilla	19
5.4	Mahdollisten uusien lineaarisuusalueiden vertailua alkuperäiseen	22
5.5	Hajonnan tarkastelu eri absorbanssipisteissä	23
5.6	Vesi- ja puskurilaimentamisen vaikutukset tuloksiin	26
6	Tulosten tarkastelu	26
7	Yhteenveto	28

Liitteet

Liite 1. Bradford-proteiinimäärityksen työohje Tecan Freedom EVO:lla

Liite 2. Otanta raakadatasta fermentointi 2:n vaiheen B23 mittaustuloksista

Liite 3. Eri fermentointien kuvaajien vertailua tietyissä fermentoinnin vaiheissa

Liite 4. Eri vaiheiden kuvaajien vertailua tietyssä fermentoinnissa

Liite 5. Suorien sovitus eri fermentointien ja niiden vaiheiden kuvaajille

Liite 6. Box and Whisker Plot -kuvaajat eri absorbanssipisteille

Lyhenteet

BCA *Bicinchoninic acid, Bikinkoniinihappo.* Menetelmä, jossa määritetään proteiinipitoisuus näytteestä.

RSD *Relative Standard Deviation.* Suhteellinen keskihajonta.

1 Johdanto

Entsyymien käyttö teollisuuden prosesseissa aikaansaa säästöjä mm. raaka-aine- ja energiakuluissa. Kustannussäästöjen lisäksi entsyymit biokatalyytteina tarjoavat ympäristöystävällisemmän vaihtoehdon kemiallisia katalyyttejä käyttäville teollisuudenaloille. [1.] Entsyymien kysyntä biokatalyytteinä teollisuuden prosesseissa kasvaa vuosivuodelta, koska ne ovat valikoivia, tehokkaita, ekologisia ja vaarattomampia kuin kemialliset katalyytit [2].

Työn toimeksiantaja oli Rajamäellä sijaitseva teollisia entsyymejä valmistava yritys, Roal Oy. Rajamäellä valmistetaan jauhemaisia ja nestemäisiä entsyymejä eri teollisuuden alojen tarpeisiin. Tuotantotehtaan läheisyydessä sijaitsee lisäksi tutkimus- ja tuotekehitysosasto, jossa kehitetään sekä jo nykyisiä molekyyliä että tutkitaan uusia geenejä. Tämä insinööriyö tehtiin tuotantolaitoksen yhteydessä toimivassa laadunvalvontalaboratoriossa.

Insinööriyön aiheena oli proteiinipitoisuuden määrittämenetelmän lineaarisen mittausalueen tarkistus eräälle entsyymifermentoinnille. Proteiinipitoisuuden määrittämenetelmänä toimi Bio-Rad:n Bradford-menetelmään perustuva määrittäminen. Fermentoinneista tutkitaan päivittäin proteiinipitoisuudet. Tutkimalla fermentointien proteiinipitoisuuksia, voidaan seurata fermentointien etenemistä entsyymien määrän lisääntyessä fermentoreissa. Tietyn fermentoinnin tuloksissa on suuri hajonta niin eri kasvatusten kuin saman kasvatuksen eri vaiheiden välillä. Lineaarinen mittausalue haluttiin määrittää uudelleen kyseiselle fermentoinnille, sillä näitä fermentointeja on usein. Mittausten uusinoista ja tulosten epävarmuudesta aiheutuva haitta on selkeä.

Työssä tutkittiin kolmea fermentointia (F1, F2 ja F3) ja niiden neljää eri vaihetta (B8, B14, B23 ja B32). Fermentoinneista tehtiin kattava määrä eri laimennuksia lineaarisen mittausalueen määrittämiseksi. Bradford-reaktion suoritti nesteenkäsittelyrobotti, Tecan Freedom EVO -200. Näytteet mitattiin spektrofotometrillä. Tulosten käsittely ja laskenta suoritettiin käyttäen Exceliä. Lineaarinen mittausalue on alue, johon absorbanssin halutaan osuvan mitattaessa näytteitä.

Lisäksi insinööriyössä tarkasteltiin puskuri- ja vesilaimentamisen vaikutusta tuloksiin. Tutkittavat näytteet olivat fermentointien vaiheen C01 myseelinäytteitä. Proteiinimäärityksessä C01-vaiheen näytteille tehdään alkulaimennos mittapulloon. Laimentamiseen käytetään kullekin fermentoinnille soveltuvaa puskuria. Insinööriyössä haluttiin tarkastella, miten alkulaimentaminen Milli-Q-vedeen puskurin sijasta vaikutti tuloksiin. Milli-Q-veden käyttö vähentäisi puskurin kulutusta ja säästäisi aikaa.

2 Teolliset entsyymit

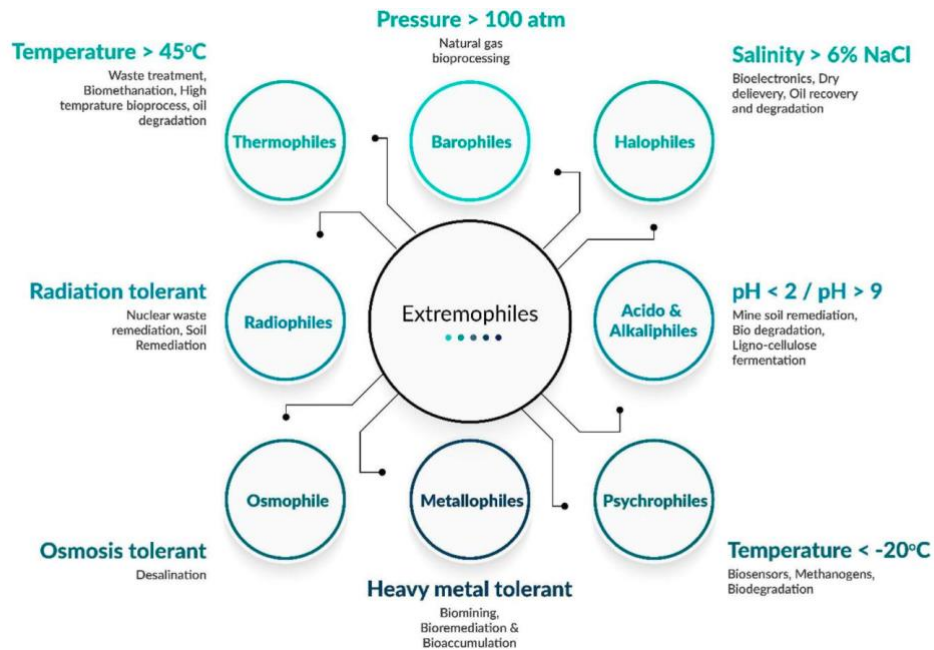
Entsyymien maailmamarkkinoiden liikevaihto oli vuonna 2019 noin 9,9 miljardia euroa [3]. Roal Oy kuuluu kansainvälisten entsyymimarkkinoiden viiden suurimman entsyymivalmistajan joukkoon [4]. Erilaisia entsyymejä on markkinoilla runsaasti, ja entsyymiteknologian kehitys on nopeaa [2]. Perinteiset entsyymit kestävät huonosti teollisia prosesseja, joten esimerkiksi äärimmäisissä ympäristöolosuhteissa kasvavia mikro-organismeja tutkitaan kestävämpien entsyymien löytämiseksi. Ominaisuuksia, joihin entsyymeissä halutaan kehitystä, ovat mm. hyvä lämmön- ja suolankesto, aktiivisuus alhaisessa lämpötilassa ja laajemmalla pH-alueella sekä entsyymien toimintaa estävien inhibiittorien sieto. Entsyymeistä pyritään kehittämään entistä spesifisempiä, kestävämpiä, tehokkaampia ja helpommin käsiteltäviä. [5.]

Entsyymit ovat välttämättömiä monissa biokemian reaktioissa, joissa energia muutetaan tehokkaasti muodosta toiseen. Entsyymit ovat katalyytteja, jotka toimivat solun aineenvaihdunnan reaktioiden vauhdittajina. Entsyymit toimivat lisäämällä reaktionopeutta itseään kuluttamatta. Reaktion nopeuttaminen perustuu entsyymien kykyyn alentaa reaktion tarvittavaa aktivaatioenergiaa. Entsyymit ovat erittäin spesifisiä ja tehokkaita katalyytteja. Jo melko pienet määrät entsyymiä nopeuttavat reaktiota jopa 10^7 – 10^{14} -kertaisesti vaikuttamatta kuitenkaan katalysoimansa reaktion termodynamiikkaan tai reaktiotasapainoon. [6.]

Suuri osa teollisista prosesseista on riippuvaisia kemiallisista katalyyteista. Kemialliset katalyytit sisältävät usein myrkyllisiä yhdisteitä ja liuottimia, mikä voi vaarantaa katalyyttien kanssa työskentelevää henkilökuntaa ja olla haitaksi ympäristölle [7]. Kemialliset katalyytit halutaan korvata mahdollisimman ekologisilla, tehokkailla ja turvallisilla biokatalyyteillä. [2.]

Entsyymejä valmistetaan niin homeissa, bakteereissa kuin hiivoissa. Roal Oy:n ydinosaamiseen kuuluu *Trichoderma*-, *Aspergillus*- ja *Bacillus*-fermentoinnit [8]. Globaaleilla markkinoilla 60 % entsyymeistä tuotetaan homeissa, 26 % bakteereissa ja 4 % hiivoissa. Eläimistä ja kasveista eristettävät entsyymit ovat vähenemään päin. Mikrobit soveltuvat entsyymien teolliseen tuotantoon, sillä ne tuottavat korkeita proteiinipitoisuuksia nopeasti ja halvoilla raaka-aineilla. Lisäksi mikrobeja on helppo muokata geneettisesti ylituottamaan entsyymejä ja estämään haitallisten entsyymien tuotto kokonaan. [5; 9, s. 112–114.]

Suurin osa teollisista entsyymeistä on tuotettu mesofiilissä mikro-organismeissa. Mesofiilisten mikro-organismien optimaalinen kasvulämpötila on 20–45 °C:ssa. Mesofiilistä perää olevat entsyymit kestävät huonosti korkeita lämpötiloja ja äärimmäisiä pH-arvoja. [2.] Entsyymien toiminnalle optimaalisimmat olosuhteet ovat usein samat entsyymejä tuottavan mikro-organismien kanssa. Jotkin mikro-organismit elävät äärimmäisissä olosuhteissa, kuten korkeissa lämpötiloissa ja suolapitoisuuksissa sekä hyvin happamissa ja emäksissä olosuhteissa. Tällaiset mikro-organismit, ekstremofiilit, tuottavat termo- ja kemostabiileja entsyymejä. Kuvassa 1 on ekstremofiilisten organismien luokittelua luokkiin, kuten, termofiilit, asidofiilit ja halofiilit. [7.]



Kuva 1. Ektremofiilisten organismien luokittelua. Ektremofiiliset organismit elävät äärimmäisissä ympäristöolosuhteissa. Olosuhteiden perusteella niitä voidaan luokitella luokkiin, kuten termofiilit, halofiilit ja asidofiilit. [7.]

Entsyymiteknologiassa keskitytään tällä hetkellä mm. mesofiilisissa mikro-organismeissa tuotettujen entsyymien muokkaamiseen teollisia prosesseja paremmin sietävämmiksi. Termofiilisissa ja hypertermofiilisissa mikro-organismeissa tuotettujen entsyymien ominaisuudet vastaavat paremmin teollisten prosessien vaatimiin olosuhteisiin. Termofiilisten mikro-organismien optimaalinen kasvulämpötila on 50–80 °C:ssa. Termofiilisissa ja hypertermofiilisissa mikro-organismeissa tuotetun biomassan määrä on alhainen, yleensä korkeintaan 2 g/l. Tämän takia entsyymejä yleensä tuotetaan mesofiilisissa mikrobeissa, joihin on siirretty termofiilisiä entsyymejä koodaavia geenejä. [2.] Ongelmana termofiilisten entsyymien tuottamisessa mesofiilisissa mikro-organismeissa on entsyymien tuoton lisääminen. Lisäksi isäntämesofiilit eivät usein tuota entsyymien aktiivista muotoa. [7.]

3 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

3.1 Määrittämisen tarkoitus Roalilla ja eri menetelmien valintaperusteet

Roalilla proteiinipitoisuus määritetään päivittäin, jotta voidaan tarkkailla fermentointien etenemistä. Entsyymit ovat kemialliselta rakenteeltaan proteiineja, lukuun ottamatta katalyyttistä RNA:ta [9, s. 52]. Proteiinimäärittämisen avulla voidaan tarkkailla entsyymien tuottoa fermentoinneissa.

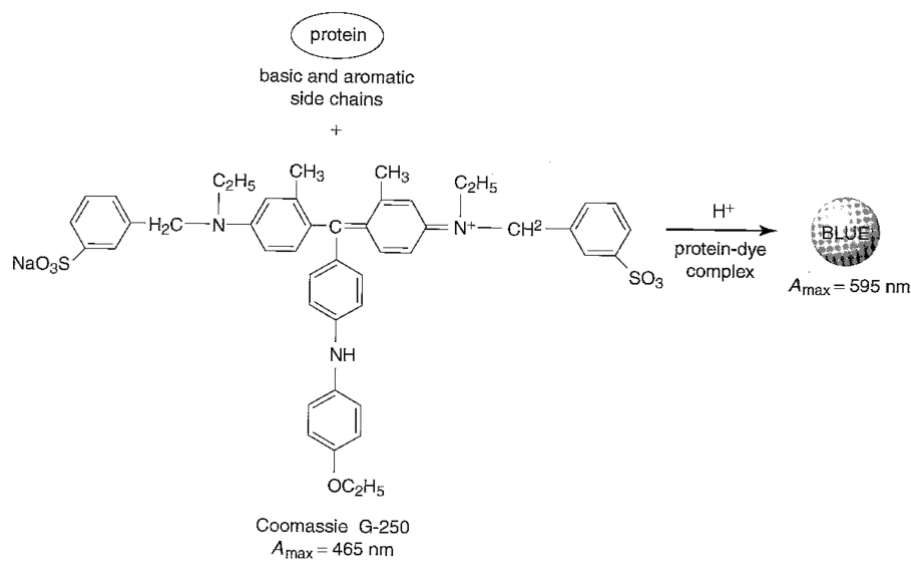
Proteiinipitoisuuden määrittämenetelmiä on useampia, ja sopivan menetelmän valintaan vaikuttaa mm. proteiinimäärittämenetelmän yhteensopivuus näytteen kanssa. Määrittämiseen valitaan usein menetelmä, jota varten näytettä täytyy esikäsitellä mahdollisimman vähän [10, s. 77]. Muita menetelmän valintaan vaikuttavia tekijöitä ovat mm. analysoidavan proteiinin määrä, määrittämiseen käytettävä aika, haluttu tarkkuus ja reaktiota häiritsevät aineet. [11.] Roalilla päivittäin käytettävä proteiinipitoisuuden määrittämenetelmä perustuu Bradford-menetelmään [12]. Yrityksessä on käytössä myös muita proteiinipitoisuuden määrittämenetelmiä, joita ei kuitenkaan käytetä päivittäin laadunvalvonta-analyseissa.

Viisi entsyyminäytteille soveltuvaa proteiinipitoisuuden määrittämenetelmää ovat mm. suora spektrofotometrinen määrittäminen, Biuret-, Lowry-, Bikinkoniinihappo (BCA)- ja Bradford-menetelmä [13]. Eroa määrittävien proteiinien tuloksiin aiheuttaa eri proteiinien aminohapposekvenssi, isoelektrinen piste (pI), sekundäärinen rakenne, tiettyjen sivuketjujen läsnäolo tai proteesiryhmät [10, s. 98]. Edellä mainitut menetelmät ovat yleisimmin käytettyjä menetelmiä proteiinipitoisuuden määrittämiseen, mutta myös muita määrittämenetelmiä löytyy.

Jos kokonaisproteiinien määrä näytteessä on suuri, esimerkiksi 5–160 mg/ml, paras vaihtoehto on Biuret-menetelmä. Jos proteiinkonsentraatio on pieni, esimerkiksi 1–2000 µg/ml, soveltuvat BCA, Lowry- tai Bradford-menetelmät parhaiten määrittämenetelmiksi. Lowry-menetelmä kannattaa valita, jos näyte sisältää pelkistimiä tai kuparia kelatoivia reagensseja. Pesuaineita sisältäville näytteille hyvä vaihtoehto on BCA-menetelmä. [10, s. 77.]

3.2 Bradford-proteiinipitoisuusmääritys

Bradford on yksi käytetyimmistä proteiinkonsentraation määrittämismenetelmistä. Menetelmä perustuu väriaineen, Coomassie Brilliant Blue G-250, sitoutumiseen proteiiniin happamissa olosuhteissa. Sitoutuminen perustuu Van der Waalsin voimiin ja hydrofobisiin vuorovaikutuksiin. [14.] Kuvassa 2 on havainnollistus Bradford-reagenssin toimintaperiaatteesta. Kuvassa näytetään, kuinka reagenssin liittyessä proteiinin emäksisiin ja aromaattisiin sivuketjuihin absorptiosimaksimi vaihtuu.



Kuva 2. Kuvaus Bradford-määrityksen toimintaperiaatteesta, jossa reagenssin liittyessä proteiinin emäksisiin ja aromaattisiin sivuketjuihin absorptiosimaksimi vaihtuu [10, s. 90].

Väriaine sitoutuu pääasiassa emäksisiin ja aromaattisiin aminohappotähteisiin, erityisesti arginiiniin [15]. Väriaine on punaisen ruskea proteiinin puuttuessa, jolloin absorptiosimaksimi on 470 nm. Kun väriaine pääsee vuorovaikutukseen proteiinin kanssa, se muuttuu siniseksi, ja sen absorptiosimaksimi vaihtuu 595 nm:iin. Mittaamalla näytteen absorptio 595 nm:ssa, voidaan määrittää proteiinipitoisuus. Bio-Rad-proteiinimäärityksen standardina voi toimia joko naudan seerumin tai naudan- γ -globuliinin. [16.] Bio-Rad-standardimenetelmä soveltuu käytettäväksi näytteille, jotka ovat proteiinkonsentraatioltaan 200–1 400 $\mu\text{g/ml}$ [17].

Menetelmä on yksinkertainen, ja sille löytyy erilaisia variaatioita riippuen proteiinipitoisuudesta. Menetelmän haittapuolena on, että määrittystä häiritsevät monet detergentit, flavonoidit ja emäksiset puskurit. Coomassie Brilliant Blue G-250 –väriagenssilla on kolme absorboivaa varianttia. Punainen väri on kationinen, vihreä neutraali ja sininen anioninen. Häiriölähteet vakauttavat vihreät neutraalit värilajit sitoutumalla siihen tai vaikuttamalla määrittymisen pH-arvoon. Sen lisäksi, että häiriöt voivat aiheutua kemikaalien liittymisestä väriaineeseen, kemikaalit voivat olla myös vuorovaikutuksessa proteiinien kanssa haitaten reaktiota. [18.]

Menetelmä on yleisesti käytetty, nopea ja edullinen. Menetelmässä ei myöskään käytetä syövyttäviä reagensseja. Toisaalta se ei ole kovin herkkä, ja tulokseen vaikuttavat erot eri proteiinien kyvyssä sitoa väriä. Väriin sidonnan määrään vaikuttaa emäksisten aromaattisten aminohappotähteiden osuus proteiinissa. Lisäksi muutkin yhdisteet kuin proteiinit voivat sitoa väriä aiheuttaen epäluotettavuutta tulokseen. [19, s. 129.]

3.3 Vaihtoehtoiset proteiinipitoisuuden määrittämenetelmät

Insinööriyössä tarkasteltiin myös muita proteiinipitoisuuden määrittämenetelmiä, jotta huomattaisiin, ovatko muut menetelmät toimintaperiaatteiltaan soveltuvampia tutkittaville fermentointinäytteille. Insinööriyön tarkoituksena ei kuitenkaan ole ensisijaisesti löytää korvaavaa menetelmää.

3.3.1 Suora spektrofotometrinen määrittäminen

Yksinkertaisin tapa määrittää proteiinin konsentraatio liuoksessa on mitata liuoksen absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Tätä menetelmää kutsutaan suoraksi spektrofotometriseksi määrittäykseksi. Aromaattiset aminohapot, kuten tyrosiini ja tryptofaani, absorboivat UV-valoa suhteessa niiden pitoisuuksiin [11]. Määrittäminen soveltuu parhaiten tapauksiin, joissa näytettä halutaan edelleen tutkia. Mittaus ei tuhoa proteiineja eikä erityisiä reagensseja tarvita. Lisäksi mittaus on nopea ja helppo suorittaa. [19, s. 130.]

Määrityksen haittapuolena on mittausta häiritsevät nukleiinihapot, jotka absorboivat myös 280 nm:ssa. Mittaamalla näyte lisäksi joko 260 tai 235 nm:ssa voidaan tuloksen virhettä yrittää korjata absorptiosuhteen avulla käyttäen korjauskertoimia. Määritys ei sovellu proteiiniseoksille johtuen eri proteiinien aminohappokoostumuksen poikkeavuudesta. Eri proteiinien absorptio pitoisuusyksikköä kohti vaihtelee 5-kertaisesti tai enemmän, riippuen aromaattisten aminohappojen osuudesta. [19, s. 130.]

Aminohappojen absorptioon mittaamisen lisäksi peptidisidoksia voidaan mitata aallonpituudella 190–210 nm proteiinipitoisuuden määrittämiseksi. Mitattaessa näytteitä 190–210 nm:ssa häiritseviä tekijöitä on enemmän, mutta määrittäminen on herkempi. [19, s. 130.]

3.3.2 Biuret-menetelmä

Biuret-menetelmässä kupari-ionit (Cu^{2+}) reagoivat vähintään kaksi peptidisidosta sisältävien yhdisteiden kanssa alkaalisissa olosuhteissa. Kun proteiiniliuos reagoi Biuret-reagenssin kanssa, syntyy purppura kompleksi. Näyte mitataan spektrofotometrillä aallonpituusalueella 540–560 nm. Reagoivien peptidisidosten määrä on verrannollinen mitatun absorbanssin kanssa. [19, s. 128.]

Menetelmän etuna on, että reaktio perustuu peptideihin, jotka ovat yhteisiä kaikille proteiineille eikä aromaattisiin sivuryhmiin, kuten Bradford-menetelmässä. Menetelmä on nopea, yksinkertainen ja edullinen. Menetelmä sopii käytettäväksi proteiinipitoisuuden ollessa 5–160 mg/ml [10, s. 95]. Eri proteiinien välillä olevaa eroa värinmuodostuksessa pidetään pienempänä kuin muissa menetelmissä. Myöskään pinta-aktiiviset aineet, eli detergentit, eivät vaikuta reaktioon. Menetelmän heikkoutena on yhteensopimattomuus yleisten pelkistimien kanssa. Lisäksi suuret hiilihydraatti- ja rasvapitoisuudet voivat aiheuttaa sameutta liuokseen. Menetelmä ei myöskään ole kovin herkkä. [11; 19, s. 128.]

3.3.3 Lowry-menetelmä

Lowry-menetelmä seuraa Biuret-menetelmän periaatteita, mutta reaktion detektioherkkyttä lisätään reagenssin avulla. Ensimmäisessä reaktiossa kupari-ionit

pelkistyvät emäksissä olosuhteissa muodostaen kompleksin peptidien kanssa, kuten Biuret-menetelmässä. Seuraavaksi reaktioon lisätään fosfomolybdeeni-fosfovolframihappoa, joka tunnetaan myös nimellä Folin-Ciocalteu-reagenssi. Reagenssi pelkistyy kupari-peptidisidoskompleksilla, joka aiheuttaa värimuutoksen siniseksi. Reaktiossa aromaattiset aminohapot hapettuvat. Absorbanssi mitataan spektrofotometrillä aallonpituusalueella 500–750 nm. Näyte mitataan 750 nm:ssa, jos mitattava proteiinipitoisuus on pieni. Mitattaessa 500 nm:ssa herkkyys ei ole yhtä korkea ja aallonpituus soveltuu parhaiten suurten proteiinipitoisuuksien mittaukseen. [13; 19, s. 128–129.]

Lowry-menetelmä on herkempi havaitsemaan pienempiä proteiinipitoisuuksia kuin Biuret-menetelmä. Menetelmä on 10–20 kertaa herkempi kuin suora spektrofotometrinen määrittäminen ja 100 kertaa herkempi kuin Biuret-menetelmä [19, s. 129]. Lowry-menetelmä soveltuu näytteille, joissa proteiinipitoisuus on 1–1500 µg/ml [10, s.95]. Menetelmän vaatii kuitenkin enemmän aikaa kuin muut määrittäykset. Lisäksi monet yhdisteet joita käytetään yleisesti proteiinien puskureissa, kuten detergentit, hiilihydraatit, glyseroli ja EDTA (*etyleenidiamiinitetraetikkahappo*), häiritsevät Lowry-määrittäystä. [13; 20.]

3.3.4 Bikinkoniinihappo (BCA) -menetelmä

Bikinkoniinihappo (BCA) -menetelmä seuraa Lowry-menetelmän toimintaperiaatteita, mutta reagenssina toimii bikinkoniinihappo. Ensin proteiinien peptidisidokset pelkistävät Cu^{+2} -ionit Cu^{+} -ioneiksi alkaalisissa olosuhteissa, kuten Biuret-menetelmässä. Seuraavaksi bikinkoniinihappomolekyylit kelatoivat Cu^{+} -ionien kanssa muodostaen purppuranvärisen kompleksin, joka absorboi voimakkaasti valoa 562 nm:ssa. Aallonpituudella 562 nm absorbanssi on lineaarinen proteiinikonsentraatiolle välillä 20–2000 µg/ml. [21.]

BCA-menetelmän hyötynä on määrittäksen sopivuus useiden pinta-aktiivisten aineiden kanssa, jopa 5 %:iin (v/v) saakka [10, s.95]. BCA-menetelmässä reaktioon osallistuvat peptidisidokset, jotka ovat yhteisiä kaikille proteiineille. Menetelmä on kuitenkin melko hidas: analyysin valmistuminen kestää noin 30 minuutista kahteen tuntiin. [22.]

Menetelmän toinen heikkous on, että menetelmää saattaa häiritä mm. pelkistävät sokerit, EDTA ja lipidit [13].

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Lineaarisuuden määrittäminen fermentoinnille Bradford-määrittäyksessä

Tutkittavan entsyymifermentoinnin proteiinipitoisuuden määrittäminen tuloksissa on suuri hajonta niin eri kasvatusten kuin saman kasvatuksen eri vaiheiden välillä. Kyseiselle fermentoinnille on määritetty proteiinimäärittämenetelmässä kapeampi lineaarinen mittausalue kuin muille yrityksen fermentoinneille.

Bradford-määrittäyksen näytteet mitataan spektrofotometrillä. Työssä haluttiin määrittää absorbanssialue, jossa mittausalue oli lineaarinen. Määrittämistä varten fermentointinäytteistä tehtiin kattava määrä laimennuksia. Tuloksista tehtiin kuvaajia, joissa x-akselilla oli näytteen konsentraatio ja y-akselilla mitattu absorbanssiarvo. Kuvaajan alue, joka oli mahdollisimman lineaarinen eli suora, sovittiin lineaarisiksi mittausalueiksi.

Nykyinen käytössä oleva lineaarinen mittausalue on absorbanssialueella 0,4–0,5. Tälle välille absorbanssin halutaan osuvan mitattaessa näytteitä. Muilla yrityksen fermentoinneilla mittausalue on absorbanssialueella 0,3–0,8. Kapeamman mittausalueen takia määrittäminen täytyy usein uusien absorbanssiarvojen osuessa nykyisen käytössä olevan mittausalueen ulkopuolelle. Lisäksi tuloksissa on paljon hajontaa, vaikka määrittäyksessä näytteen absorbanssiarvo saataisiin osumaan halutulle alueelle. Tutkittavaa fermentointia haluttiin tarkastella muille fermentoinneille soveltuvalla laajemmalla absorbanssialueella proteiinimäärittäyksessä.

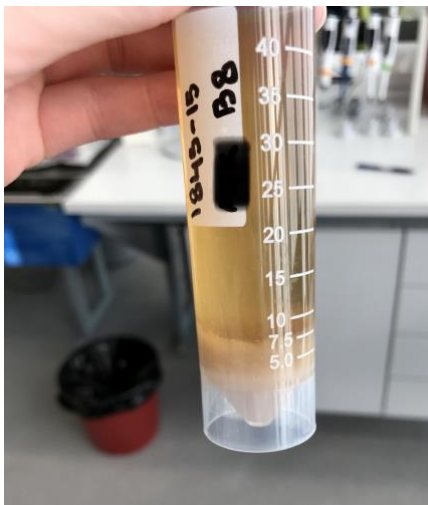
Työssä tutkittiin kolmea eri fermentointia (F1, F2 ja F3), ja jokaisesta fermentoinnista tutkittiin neljää eri fermentoinnin vaihetta (B8, B14, B23 ja B32). Kunkin vaiheen näytteet on otettu eri ajankohdista fermentointia. B8-vaiheen näyte on otettu fermentoinnin alkuvaiheesta, vaiheiden B14 ja B23 näytteet ovat otettu fermentoinnin keskivaiheelta ja B32-vaiheen näyte on otettu fermentoinnin loppuvaiheesta. Eri vaiheita tutkittiin, jotta

nähtäisiin, kuinka paljon fermentoinnin eri vaiheet vaikuttavat määrittelyn lineaarisuuteen. Määrittelyn suoritti nesteenkäsittelyrobotti Tecan Freedom EVO -200. Robotti suorittaa laboratorion erilaisia analyyseja pipetoimalla käsiteltäviä reagensseja ja näytteitä.

4.1.1 Näytteiden käsittely ennen mittauksen aloittamista

Fermentointinäytteet sentrifugoitiin niin, että myseelimassa saatiin erotettua näytteestä. Näytteitä sentrifugoitiin 4000 rpm (revolutions per minute) 10 minuuttia. Jatkolaimennokset tehtiin supernatantista Milli-Q-veteen.

Yön yli näytteitä seisottaessa näyteputkien pohjalle oli kertynyt vielä sakkaa. Kuvassa 5 on esitettyinä näytepullojen pohjalle kertynyt sakka yön aikana. Näytteet sentrifugoitiin vielä toisen kerran. Useammasta sentrifugoinnista huolimatta näyteputkien pohjalle saattoi kertyä lisää sakkaa. Näytteet olisi pitänyt sentrifugoida suuremmilla kierrosnopeuksilla. Sakka näytteessä saattaa vaikuttaa nesteenkäsittelyrobotin toimintaan ja spektrofotometriseen määrittelyyn.



Kuva 3. Näytepullojen pohjalle kertynyt sakka yön yli seisottaessa.

Näytteiden laimentamiseen käytettiin Hamiltonin Microlab 600-laitetta. Laite imi näytettä ja laimensi sen Milli-Q-veteen. Kahden ensimmäisen fermentoinnin näytteille tehtiin seitsemän erilaista laimennusta niin, että pitoisuuksilla päästiin absorbanssialueelle 0,3–

0,8. Kolmatta fermentointia mitattaessa laimennuksia tehtiin vielä useampia, jotta nähtiin tarkemmin lineaarisuusalueet.

Näytteet pyrittiin laimentamaan kahdelle ensimmäiselle fermentoinnille niin, että mitatut absorbanssiarvot olivat 0,3; 0,4; 0,45; 0,5; 0,6; 0,7 ja 0,8. Jokaiselle eri fermentoinnille ja niiden eri vaiheille määritettiin omat laimennussuhteet, jotta päästiin haluttuihin absorbanssiarvoihin. Absorbanssialueelle 0,4–0,5 haluttiin keskittyä hiukan enemmän, koska se on nykyinen lineaarisuusalue.

4.1.2 Työn kulku

Kun näytteet oltiin käsitelty ja laimennettu haluttuihin pitoisuuksiin, kaadettiin näytteet robotille soveltuviin koeputkiin ja suoritettiin reaktio. Näytteet mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm. Liitteessä 1 on Bradford-määrityksen työohje nesteenkäsittelyrobotilla Roalilla. Työvaiheet etenivät seuraavasti:

1. Näytteiden sentrifugointi.
2. Näytteiden laimentaminen Milli-Q-vedellä haluttuihin laimennussuhteisiin.
3. Näytteiden kaataminen nesteenkäsittelyrobotille soveltuviin koeputkiin.
4. Reaktion suorittaminen nesteenkäsittelyrobotilla.
5. Näytteiden mittaaminen spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm.
6. Tulosten käsittely Excelissä.

Nesteenkäsittelyrobotti tarvitsi reaktioon laimennetut näytteet, mikrokyvettirasian ja Bio-Rad-väriagenssin. Standardisuora ajetaan vain avattaessa uusi kantaliuospulla reagenssin valmistukseen. Tarkoituksena oli käyttää samaa standardisuoraa kaikille mittauksille, mutta reagenssia kului odotettua enemmän. Tämän takia osa näytteistä mitattiin käyttäen uutta standardisuoraa.

Kun nesteenkäsittelyrobotti oli suorittanut pipetoinnin suoraan mikrokyvetteihin, näytteiden absorbanssiarvot mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm. Jokaisesta vaiheesta saatiin neljä erillistä mittaustulosta. Näytteestä tehtiin kaksi erillistä

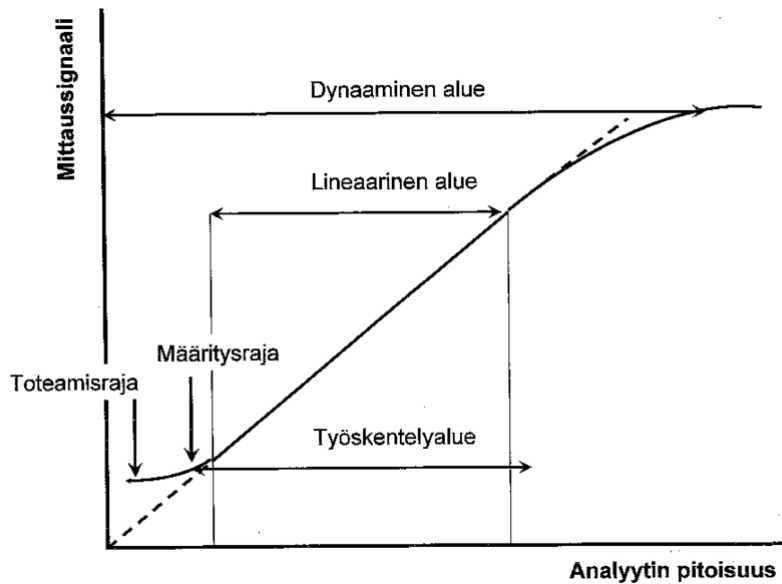
laimennosta, joista robotti teki edelleen kaksi laimennosta. Tulokset käsiteltiin Excelissä. Kokonaisproteiinimäärä saatiin selville, kun verrattiin mitattua absorbanssiarvoa standardisuoraan ja kerrottiin suoralta luettu konsentraatio näytteen laimennuskertoimella.

Yhteen proteiinimääritykseen nesteenkäsittelyrobotille mahtuu maksimissaan 48 näytettä. Jokaisen päivän ensimmäiseen ajoon otettiin mukaan yksi nollanäyte ja kaksi vertailua, eli paikkoja fermentoinnin näytteille yhdessä ajossa oli noin 45 kpl. Yhdessä ajossa mitattiin yleensä yhden fermentoinnin kahden eri vaiheen näytteet. Jokaiseen ajoon otettiin mukaan nollanäyte. Mittaukset toistettiin kolme kertaa. Toistot tehtiin eri päivinä, jotta tuloksiin saatiin päivien välistä vaihtelua.

Mitattavia näytteitä arvioitiin ennen työn aloittamista olevan kaiken kaikkiaan noin 1580 kpl. Nesteenkäsittelyrobotti teki jokaiselle näytteelle yhden rinnakkaisen, joten näytteitä tarvitsi valmistaa ajoihin noin 790 kpl. Kaiken kaikkiaan ajoja nesteenkäsittelyrobotilla arvioitiin tulevan yhteensä noin 18 kpl. Osa ajoista ei kuitenkaan onnistunut mitattavan absorbanssiarvon osuessa väärälle alueelle tai vertailun epäonnistuessa. Liitteessä 2 on otanta raakadatasta fermentointi 2:n vaiheen B23 mittaustuloksista.

4.1.3 Lineaarisuuden määrittäminen ja korrelaatio

Mittausalueen lineaarisuudella tarkoitetaan lineaarista korrelaatiota tulosten ja näytteestä tutkittavien aineiden välillä mittalaitteen herkkyyden ollessa vakio. Tällöin määrätty pitoisuuden muutos aiheuttaa mittaussignaalisissa saman suuruisen muutoksen koko pitoisuusalueella. Lineaarisuus määritetään yleensä vähintään viidestä eri tutkittavan aineen pitoisuudesta. [23, s. 18–19.]



Kuva 4. Analyysimenetelmän lineaarisella alueella tulosten ja näytteestä tutkittavien aineiden välillä on lineaarinen korrelaatio mittauslaitteen herkkyyden ollessa vakio [23, s. 19].

Analyysimenetelmän lineaarisuutta voidaan tutkia mm. määrittämällä kuvaajalle sovitettuun suoraan korrelaatiokertoimen neliö, R^2 . Kahden muuttujan välisen riippuvuuden astetta voidaan kutsua korrelaatioksi. Korrelaation ollessa voimakasta voidaan toisen muuttujan arvoista päätellä toisen muuttujan arvot melko täsmällisesti. Korrelaatiokertoimen ollessa 0 muuttujien välillä ei ole lineaarista riippuvuutta. Vastaavasti arvon ollessa $+1/-1$ muuttujien välillä on joko positiivinen tai negatiivinen korrelaatio. Korrelaatiota tarkastellessa käytetään usein myös korrelaatiokertoimen neliötä, joka kertoo prosentuaalisesti, kuinka paljon selittävä muuttuja selittää selitettävän muuttujan varianssista. Korrelaatiokertoimen neliötä kutsutaan myös selitysasteeksi. [24.]

4.2 Nesteenkäsittelyrobotin (Tecan Freedom EVO -200) toimintaperiaate

Bradford-määrittäksen suoritti nesteenkäsittelyrobotti Tecan Freedom EVO -200. Tecan Freedom EVO on nesteidenkäsittelyrobotti, jonka työtason moduuleja muokkaamalla voidaan suorittaa erilaisia laboratorioissa tehtäviä analyysejä. Roalin nesteidenkäsittelyrobotissa on kahdeksan pipetointikärkeä. Pipetointikärjet ovat kiinni

nesteidenkäsittelykädessä (LiHa, liquid handling arm). Proteiinipitoisuusmäärityksen kannalta tärkeimmät moduulit ovat näyte-, reagenssiastia- ja kyvetteline. [25.]

Tecanin jokaisessa pipetointikärjessä on nestepinnan tunnistus. Nestepinnan tunnistus perustuu kapasitanssin muutokseen. Pipetoinnilla siirretään tietty määrä nestettä paikasta toiseen. Nestepinnantunnistuksen ansiosta pipetinkärki uppoaa nesteeseen vain hiukan, jolloin kärjen kontaminoituminen nesteestä jää mahdollisimman pieneksi. Kuvassa 4 on esitetty Roalilla oleva nesteenkäsittelyrobotti. [25.]



Kuva 5. Nesteenkäsittelyrobotti Tecan Freedom EVO -200, joka on käytössä Roalilla.

4.3 Laimentaminen Milli-Q-veteen puskurin sijasta

Insinöörityössä tarkistettiin myös, miten C01-vaiheen näytteen laimentaminen Milli-Q-veteen puskurin sijasta vaikutti proteiinipitoisuusmäärityksen tuloksiin. Fermentointinäyte vaiheesta C01 käsitellään myseeleineen historiallisista syistä. Vaiheen C01 näyte käsitellään myseeleineen, jotta voidaan määrittää koko kasvatuksen proteiinipitoisuus.

Roalilla ei löydy dokumentointia puskurilaimentamisen syihin. Syitä halutaan tarkastella, koska laimentaminen on aikaa ja rahaa kuluttavaa.

Näyte punnittiin tarkasti mittapulloon, laimennettiin puskurilla sekä Milli-Q-vedellä ja sentrifugoitiin siten, että myseelimassa saatiin erotettua liuoksesta. Tästä supernatantista tehtiin edelleen tarvittavat jatkolaimennokset. Kuvassa 3 on C01-vaiheen myseelinäyte laimennettuna (1:10) mittapullossa puskuriiin ja siitä sentrifugoitu näyte.



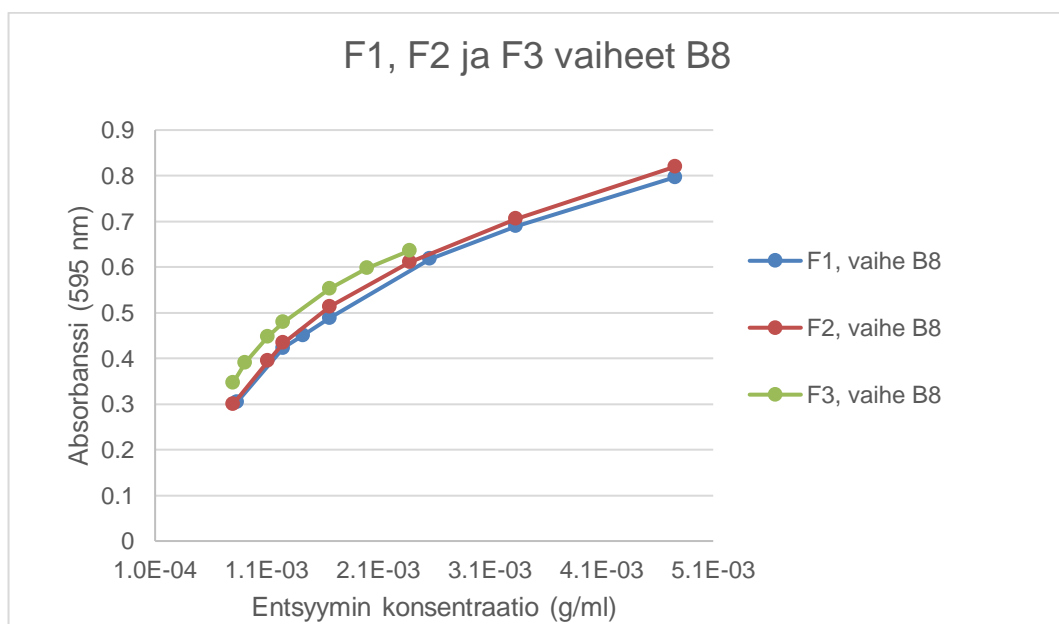
Kuva 6. Havainnollistus, kuinka fermentoinnin C01-vaiheen näytteen käsittely etenee myseelinäytteen laimentamisesta mittapullossa sentrifugoituun analysoitavaan näytteeseen.

Eroa vesi- ja puskurilaimennuksessa tarkasteltiin kahdesta fermentoinnista. Eroa tutkittiin myös täysin eri fermentoinnista kuin insinööriyössä tutkittavista fermentoinneista. Eron tutkimiseen otettiin neljä rinnakkaista sekä Milli-Q-veteen että puskuriiin laimennettua näytettä.

5 Tulokset

5.1 Mahdollisten lineaaristen mittausalueiden määrittäminen kuvaajista

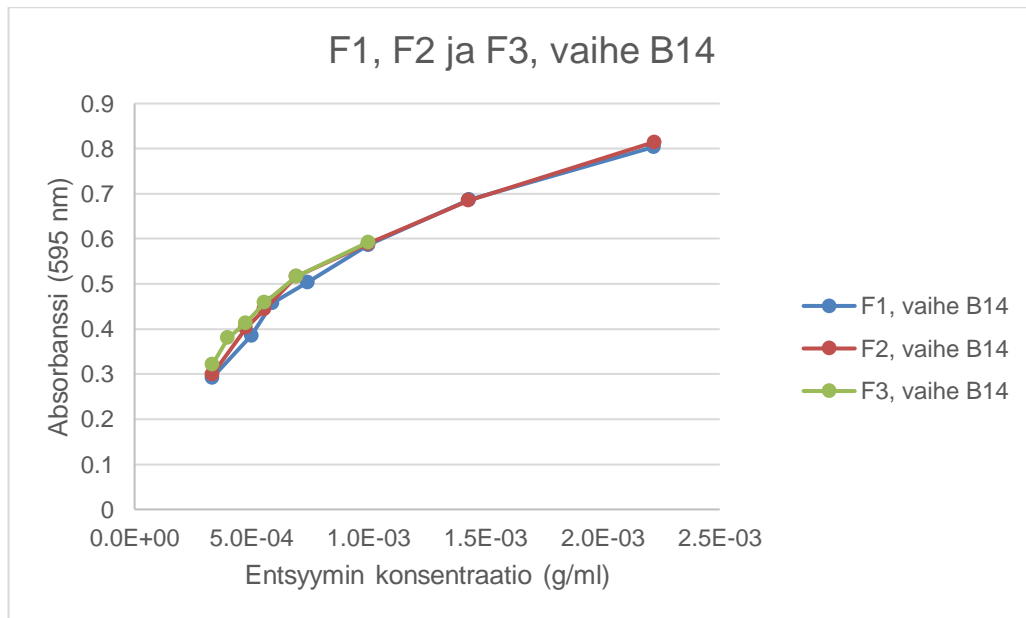
Kuvassa 7 on fermentointien vaiheiden B8 tulokset. Mahdollisia lineaarisia mittausalueita on useampia jokaisella fermentoinnilla. Fermentoinnilla 1 lineaarinen mittausalue on kuvasta katsottuna B8-vaiheella mahdollisesti noin absorbanssialueilla 0,4–0,6 ja 0,6–0,8. Fermentoinnilla 2 vaiheen B8 näytteen lineaariset mittausalueet ovat mahdollisesti sekä absorbanssialueella 0,3–0,5 että absorbanssiarvon ollessa välillä 0,5–0,8.



Kuva 7. Fermentointien vaiheiden B8 lineaarisen mittausalueen testaus. Kuvaajasta katsottuna mahdolliset lineaariset mittausalueet ovat fermentointi 1:llä absorbanssialueilla 0,4–0,6 ja 0,6–0,8 sekä fermentointi 2:lla 0,3–0,5 ja 0,5–0,8.

Kolmannen fermentoinnin lineaarista mittausaluetta tutkittiin jokaisesta vaiheesta, mutta toistoja tehtiin kaksi kolmen sijasta. Kahden ensimmäisen fermentoinnin tutkimisen jälkeen huomattiin, että selkeää lineaarista mittausaluetta ei kyseiselle fermentoinnille proteiinimäärityksessä ole. Tämän takia fermentointi 3:n kuvaajat poikkeavat myös tutkittavilta mittausalueiltaan muista fermentoinneista. Tutkittaessa kolmatta fermentointia keskityttiin absorbanssialueeseen 0,3–0,5 tekemällä runsaasti eri laimennuksia, jotta kuvaajaan saataisiin mahdollisimman monta pistettä.

Fermentointi 1:llä mahdollisia lineaarisia mittausalueita B14-vaiheelle on kaksi kuvasta 8 katsottuna: absorbanssialueilla 0,3–0,45 ja 0,45–0,8. Fermentointi 2 lineaarisetalueet vaikuttavat olevan absorbanssialueilla 0,3–0,5 ja 0,5–0,8. Fermentointi 3 lineaarinen mittausalue on absorbanssialueella 0,3–0,5.



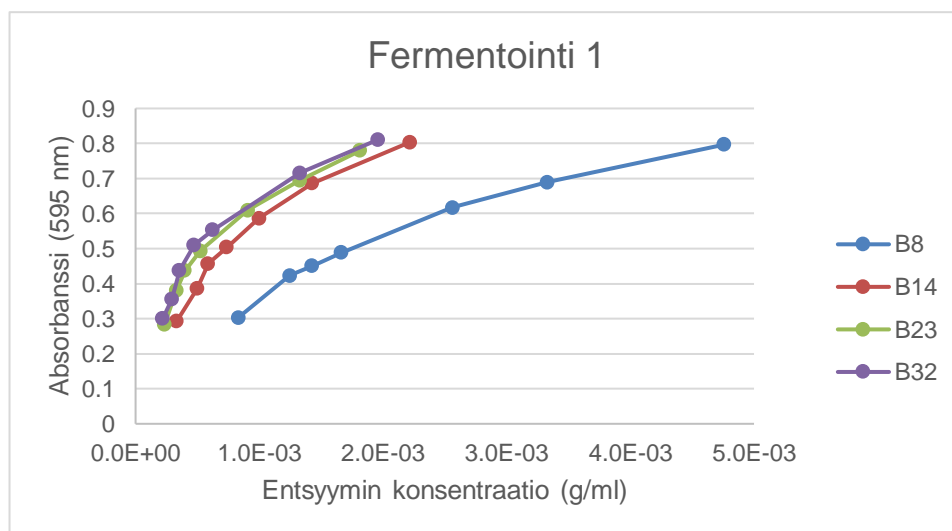
Kuva 8. Fermentointien vaiheen B14 lineaarisen mittausalueen testaus. Mahdollisia lineaarisuusalueita on useampia eri fermentoinneilla.

Vaiheiden B23 ja B32 lineaarisuusalueet ovat mahdollisesti 0,3–0,45 ja 0,45–0,8 fermentoinneilla 1 ja 2 (liite 3). Fermentoinnilla 3 lineaarisuusalueet ovat mahdollisesti vaiheille B23 ja B32 absorbanssialueilla 0,3–0,45 ja 0,45–0,6 (liite 3).

Absorbanssiarvon 0,45 kohdalla tapahtuu usein lineaarisuusalueen vaihdos. Tämä saattaa kuitenkin johtua tiheämmästä mittauspisteiden määrästä tässä kohtaa kuvaajaa. Absorbanssiarvo ei ollut myöskään aina juuri 0,45, vaan esimerkiksi 0,42. Tästä syystä on vaikea vetää johtopäätöksiä, lineaarisen mittausalueen alusta tai lopusta tässä absorbanssipisteessä.

5.2 Fermentointien eri vaiheiden välistä vertailua

Kuvassa 9 vertaillaan eri vaiheiden kuvaajia keskenään. Fermentointi 1 on otettu esimerkiksi, mutta myös fermentointien 2 ja 3 kuvaajat käyttäytyvät samalla tavalla (liite 4). Fermentointi 1:n eri vaiheiden kuvaajia verratessa huomataan, että vaiheiden B14, B23 ja B32 kuvaajat ovat muodoltaan samanlaisia. Vaiheen B8 kuvaaja poikkeaa muiden vaiheiden kuvaajien muodosta. B8-vaiheen kuvaajan muoto poikkeaa muista, koska fermentointi on tässä vaiheessa melko alussa. Entsyymien määrä näytteessä on pieni ja mukana on muitakin komponentteja, mikä saa kuvaajan poikkeamaan muista.

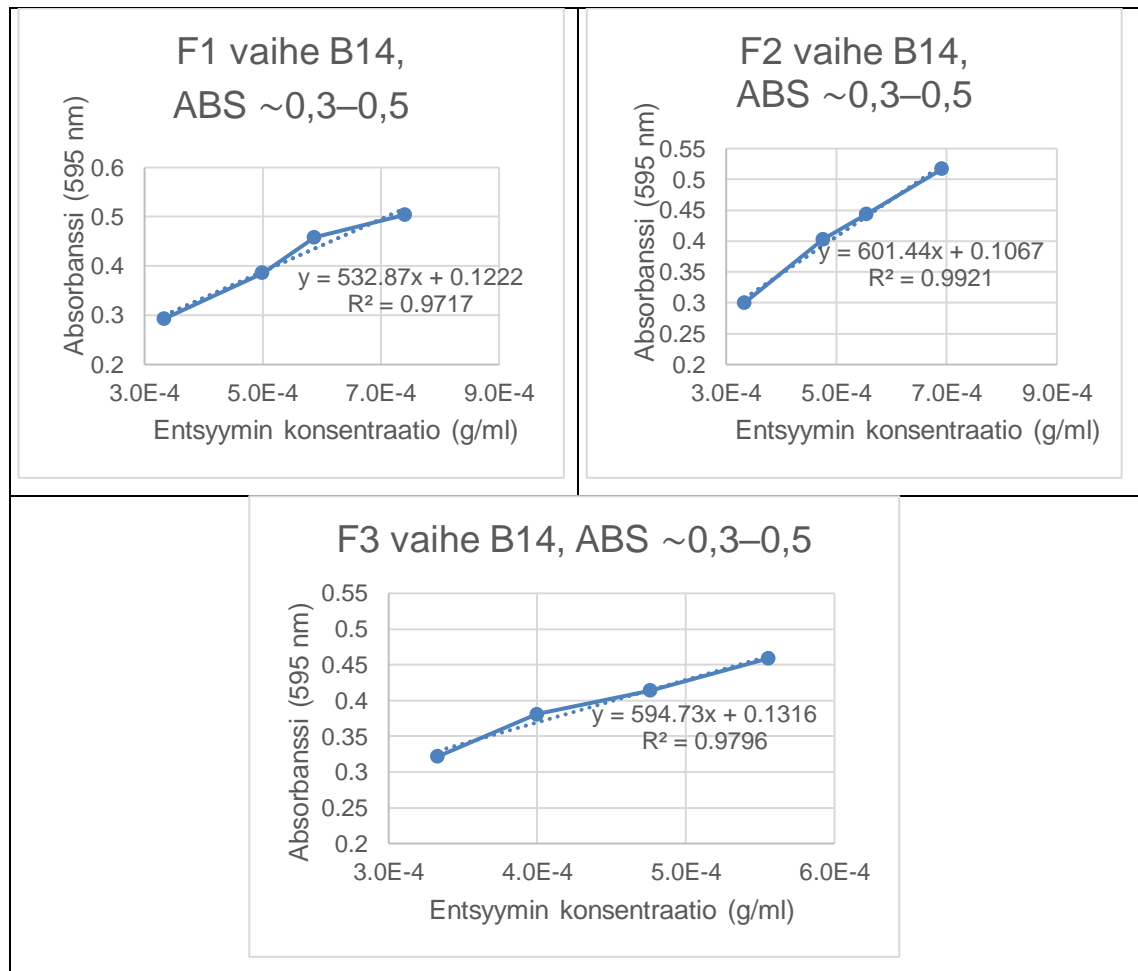


Kuva 9. Fermentointi 1:n kaikkien vaiheiden kuvaajat koottuna. B8-vaiheen kuvaaja poikkeaa muiden vaiheiden kuvaajista.

5.3 Korrelaation tarkastelu valituilla alueilla

Edellä olevien kuvaajien perusteella valittiin lähemmin tarkasteltaviksi lineaarisuusalueiksi alueet, joissa absorbanssiarvot sijoittuivat 0,3–0,5 ja 0,5–0,8. Jokaisen fermentoinnin eri vaiheille määritettiin omat suorat ja korrelaatiokertoimen neliöt erikseen edellä mainituille kahdelle eri absorbanssialueelle.

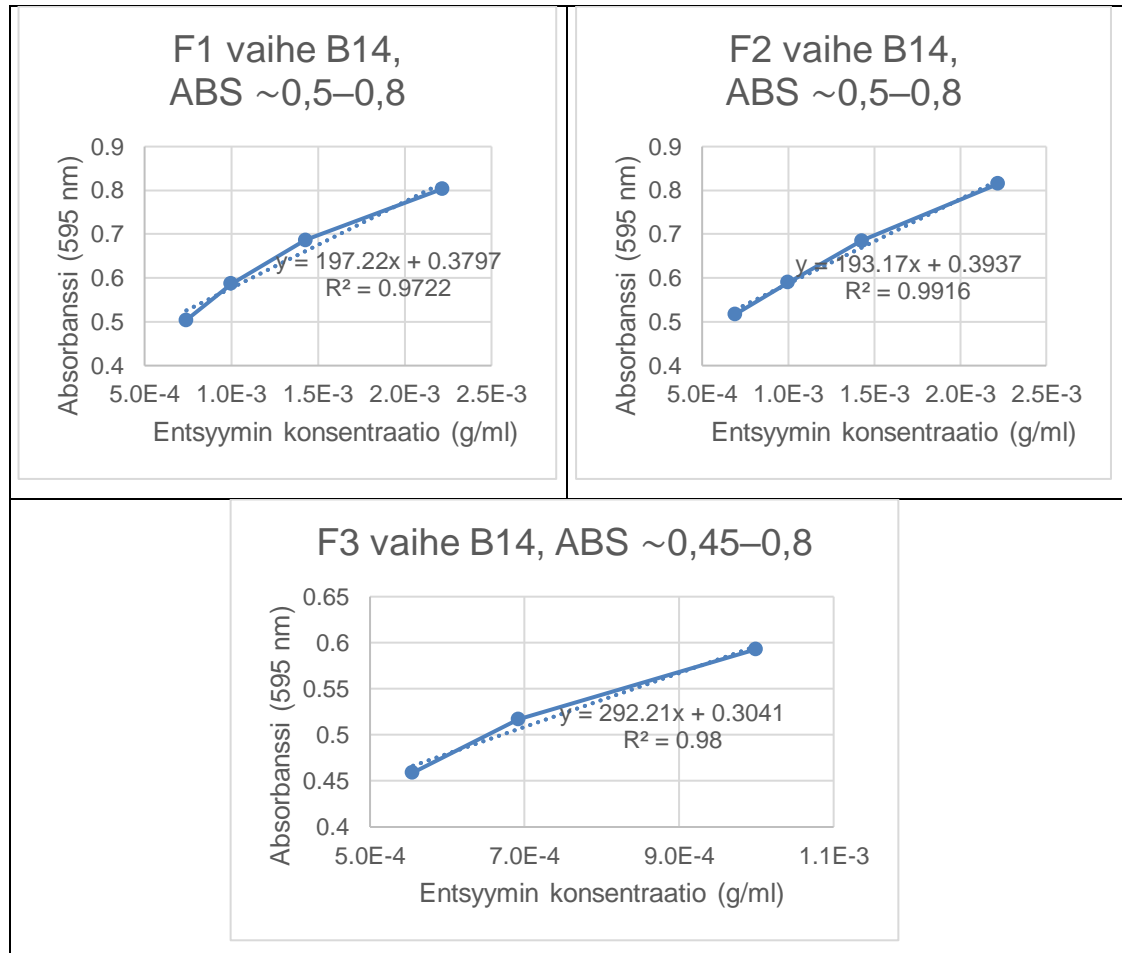
Kuvassa 10 on esitettyä eri fermentointien vaiheiden B14 absorbanssialueelle 0,3–0,5 sovitetut suorat ja niiden arvot sekä selitysasteet. Absorbanssialueen 0,3–0,5 suoran kulmakertoimen arvoissa esimerkiksi fermentointien 1 ja 2 välillä on 11 %:n ero. Selitysasteet (R^2) fermentoinneille oli 0,97–0,99.



Kuva 10. Kaikkien fermentointien sovitetut suorat B14-vaiheessa absorbanssialueella noin 0,3–0,5. Selitysasteet ovat fermentoinneilla välillä 0,97–0,99.

Absorbanssialueen 0,5–0,8 (kts. kuva 11) suoran kulmakertoimen arvoissa eri fermentointien välillä on maksimissaan 11 %:n ero. Molemmilla absorbanssialueilla suoran selitysasteet ovat samaa luokkaa toistensa kanssa, ero niiden välillä on 0,05 %. Selitysasteissa löytyy vain pieniä eroja fermentointien 1 ja 2 välillä molemmissa absorbanssialueissa. Fermentointien 1 ja 2 selitysasteiden ero on molemmissa absorbanssiväleissä noin 2 %. Selitysasteiden sama taso ($R^2 = 0,97–0,99$) eri absorbanssialueiden välillä osoittaa, että molemmilla alueilla on melko vahva lineaarinen

riippuvuus muuttujien välillä. Suorien arvot ovat myös samaa tasoa eri fermentointien 1 ja 2 välillä. Fermentointi 3:n suoran arvot poikkeavat muiden fermentointien suorien arvoista. Tämä johtuu siitä, että mittauspiste absorbanssiarvossa 0,45 on otettu mukaan kuvaajaan mittauspisteiden vähäisen määrän takia.

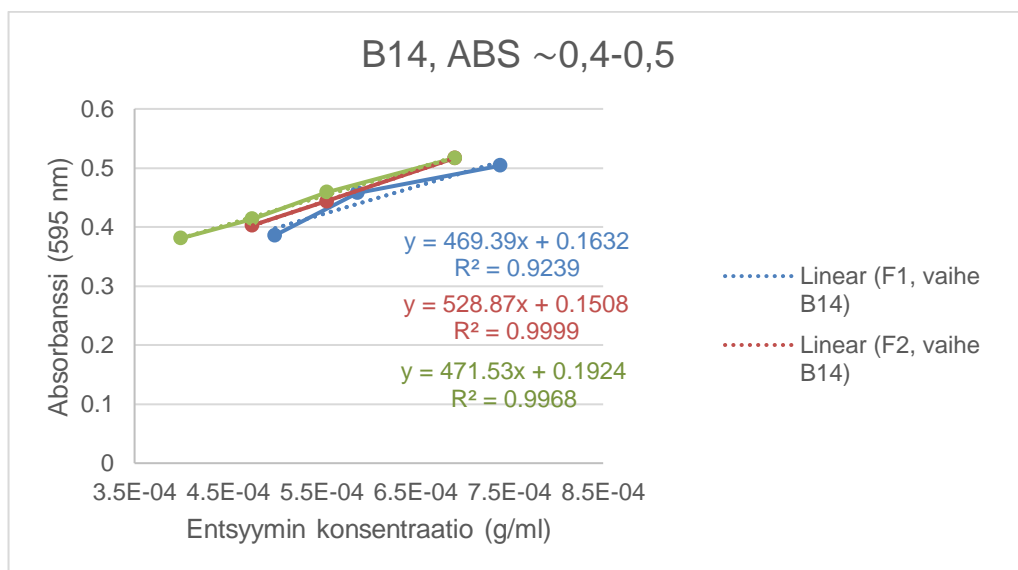


Kuva 11. Kaikkien fermentointien sovitetut suorat B14-vaiheessa absorbanssialueella ~0,5-0,8. Selitysasteet suorille ovat 0,97-0,99.

Verrattaessa B23 suorien (liite 5) arvoja B14 vaiheelle tehdyn suoran arvoihin huomataan kulmakertoimien erojen olevan 7–14 %. Erot vaiheille B14 ja B32 tehtyjen suorien (liite 5) kulmakertoimien välillä ovat 2–37 %. Verratessa B14 vaiheelle tehtyjä suoraa vaiheen B8 suoran arvoihin (liite 5) huomataan eron olevan suurta. Kulmakertoimissa erot ovat 51–59 %. Selitysasteet ovat kuitenkin samaa luokkaa fermentointien välillä samassa fermentoinnin vaiheessa.

5.4 Mahdollisten uusien lineaarisuusalueiden vertailua alkuperäiseen

Kuvassa 12 on sovitettu suora absorbanssialueelle noin 0,4–0,5. Mietittäessä kahden tarkasteltavaksi otetun lineaarisen mittausalueen välillä, voidaan verrata sovitettujen suorien arvoja nykyisin käytössä olevan absorbanssirajan välille sovitetun suoran arvoihin. Suoran arvot absorbanssialueella 0,3–0,5 ovat lähempänä alkuperäiselle alueelle sovitetun suoran arvoihin. Tällä välillä suoran kulmakertoimen arvot poikkeavat alkuperäisen alueen sovitetun suoran arvoista 12–20 %, kun taas absorbanssialueella 0,5–0,8 erot ovat 38–63 %. Leikkauspisteissä erot ovat samaa luokkaa.



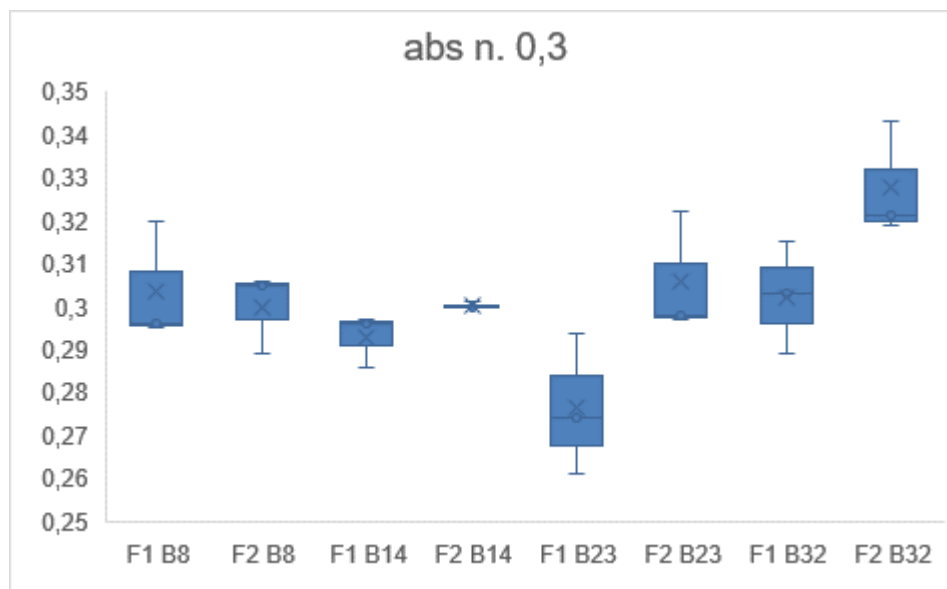
Kuva 12. Kuvaajassa on kaikkien fermentointien sovitetut suorat B14-vaiheessa absorbanssialueella noin 0,4–0,5. Tämä absorbanssialue on nykyinen lineaarinen mittausalue. Selitysasteet (R²) F2 ja F3 ovat hyvät, noin 0,99.

Jos suoran sovitti jokaisen fermentoinnin B14-vaiheen koko mittausalueelle absorbanssialueella 0,3–0,8, selitysasteet olivat jokaisella suoralla noin 0,92–0,95 (liite 5). Tämä on huonompi selitysaste kuin kahdella edellä tarkastellulla absorbanssialueella. Suora sovitettiin myös absorbanssialueelle 0,3–0,6, jolloin selitysasteet eri fermentoinneille vaiheessa B14 olivat välillä 0,93–0,96 (liite 5). Tästä voi päätellä, että mahdollinen lineaarinen mittausalue on joko absorbanssialueella 0,3–0,5 tai 0,5–0,8.

Mietittäessä kahden lineaarisuusalueen välillä, voidaan verrata sovitettujen suorien arvoja nykyisin käytössä olevan absorbanssirajan välille sovitetun suoran arvoihin. Suoran arvot absorbanssialueella 0,3–0,5 ovat lähempänä alkuperäiselle alueelle sovitetun suoran arvoihin. Tällä välillä suoran kulmakertoimen arvot poikkeavat alkuperäisen alueen sovitetun suoran arvoista 12–20% B14-vaiheessa, kun taas absorbanssialueella 0,5–0,8 erot ovat 38–63 %. Leikkauspisteissä erot ovat samaa luokkaa.

5.5 Hajonnan tarkastelu eri absorbanssipisteissä

Kuvassa 13 on esitettyä Box and Whisker Plot -kuvaajat fermentointien 1 ja 2 kakkien vaiheiden absorbanssiarvoista kohdassa 0,3. Kuvaajat on tehty Excelissä. Boksit kuvaajassa kertovat, kuinka moni tuloksista osuu kvartaali 1:lle ja 3:lle. Maksimi- ja minimiarvot näkyvät bokseista lähtevinä viivoina (whisker). Viiva boksin sisällä kertoo tulosten mediaanin ja ruksi tulosten keskiarvon. Fermentointi 3 ei otettu mukaan hajontojen vertailuun, koska laimennukset poikkesivat jonkin verran kahdesta edellisestä fermentoinnista.



Kuva 13. Box and Whisker Plot -kuvaaja fermentointien 1 ja 2 kaikkien vaiheiden absorbanssiarvoista kohdassa, jossa absorbanssiarvo on noin 0,3. Kuva kertoo eri fermentointien ja niiden vaiheiden mitattujen absorbanssiarvojen hajonnoista absorbanssiarvon ollessa noin 0,3.

Absorbanssiarvojen hajonnat vaihtelevat jonkin verran eri vaiheiden välillä sekä eri fermentointien välillä samassa vaiheessa. Jokaisen fermentoinnin eri vaiheet laimennettiin eri laimennussuhteilla, jotta saavutettiin haluttu absorbanssiarvo. Kuvasta 13 näkee, että kaikkia laimennussuhteita ei valittu kovin tarkasti, koska eroa absorbanssiarvoissa löytyy eri fermentointien samojen vaiheiden välillä. Kuvasta 13 huomataan myös, että hajonta on pienintä vaiheessa B14.

Jokaiselle absorbanssipisteelle tehtiin omat Box and Whisker Plot -kuvaajat (liite 6). Eri absorbanssipisteillä hajonta oli samaa luokkaa. Hajonta kohdassa absorbanssipisteessä 0,45 oli suurinta. Kuvaajista huomataan myös, että hajontojen ero eri fermentointien välillä samassa vaiheessa on suurta.

Taulukossa 1 on vertailtu suhteellisia keskihajontoja (RSD, Relative Standard Deviation) tulosten välillä. Erot eri vaiheiden välillä suhteellisessa keskihajonnassa eivät ole suuria. Vaiheessa B14 on vähiten hajontaa eri toistojen välillä. Tämä huomattiin myös Box and Whisker Plot -kuvaajista. Verratessa eroja suhteellisessa keskihajonnassa eri absorbanssiarvojen kohdalla, huomataan yleisesti hajonnan olevan suurempaa mitä matalampi absorbanssiarvo on. Tämä johtuu siitä, että absorbanssiarvon ollessa matalampi myös entsyymin määrä näytteessä on pienempi. Tällöin pienetkin erot laimentaessa entsyymin määrässä aiheuttaa suurempia eroja absorbanssiarvoissa.

Taulukko 1. Suhteellisten keskihajontojen vertailua eri absorbanssipisteissä fermentointien ja niiden vaiheiden välillä.

~ Abs	Fermentointi	RSD%(B8)	RSD%(B14)	RSD%(B23)	RSD%(B32)
~0,3	F1	4,7	2,1	5,9	4,3
	F2	3,2	0,2	4,8	4,1
	F3	-	3,7	-	3,1
~0,4	F1	3,2	2,1	3,5	5,6
	F2	2,4	0,0	2,7	2,0
	F3	-	3,1	1,1	2,4
~0,45	F1	4,0	2,2	1,4	4,6
	F2	1,1	1,7	3,7	1,2
	F3	-	3,0	1,1	1,7
~0,5	F1	3,0	1,7	2,1	2,8
	F2	1,7	1,1	2,8	2,0
	F3	-	2,7	1,2	3,6
~0,6	F1	2,8	0,9	1,2	2,1
	F2	0,3	3,8	0,7	1,1
	F3	-	2,7	3,3	-
~0,7	F1	0,7	1,3	2,2	3,0
	F2	0,9	3,5	1,3	1,4
	F3	-	-	-	-
~0,8	F1	1,7	0,8	1,3	0,6
	F2	1,2	2,8	1,9	1,6
	F3	-	-	-	-

Eroja vaiheiden suhteellisissa keskihajonnoissa löytyy eri fermentointien välillä. Kaikkien vaiheiden suhteellisten keskihajontojen keskiarvo on F1 noin 23 % suurempi kuin F2:lla. Tämä ero voi johtua näytteessä olevista häiritsevistä komponenteista, esimerkiksi suuremmasta määrästä myseelisakkaa fermentointi 1:n näytteissä, joka ei ole poistunut sentrifugoimalla.

5.6 Vesi- ja puskurilaimentamisen vaikutukset tuloksiin

Puskuri- ja vesilaimentamisen eroa tutkittiin fermentointi 2:n ja täysin eri entsyymifermentoinnin C01-vaiheen näytteestä. Kutsutaan tätä eri entsyymifermentointia nimellä fermentointi 4. Taulukosta 2 huomataan, että erot fermentointi 2 puskuri- ja vesilaimennuksen välillä ovat 18 %. Puskuriin laimentaminen antaa korkeampaa proteiinipitoisuus (mg/ml) tulosta. Myös fermentointi 4 puskuriin laimentaminen antaa korkeampaa tulosta kuin veteen laimentaminen, mutta ero näiden kahden laimentamisen välillä on 6 %.

Taulukko 2. Puskuri- ja vesilaimentamisen tuloksiin vaikuttavan eron tarkistaminen.

	Laimennus puskuriin	Laimennus veteen	Ero tuloksissa puskuri- ja vesilaimentamisen välillä (%)
Fermentointi 2 (Proteiinipitoisuus mg/ml)	107,9	89,0	18 %
	108,3	88,3	18 %
Fermentointi 4 (Proteiinipitoisuus mg/ml)	142,7	134,0	6 %

6 Tulosten tarkastelu

Lineaarinen mittausalue testattiin muilla fermentoinneilla käytössä olevalla laajemmalla absorbanssialueella ja todettiin, ettei kyseiselle fermentoinnille sovi muiden fermentointien laajempi mittausalue. Tämän laajemman mittausalueen sisältä löytyi kaksi lineaarisuusaluetta. Nämä alueet olivat absorbanssiväleillä 0,3-0,5 ja 0,5-0,8. Alueiden lineaarisuutta tarkasteltiin sovittamalla näille kuvaajien alueille suorat ja tarkastelemalla selitysasteita. Lisäksi hajontaa tarkasteltiin eri absorbanssipisteissä.

Tarkasteltavaksi otetuista kahdesta alueesta huomattiin, että molemmat alueet soveltuivat yhtä hyvin uudeksi lineaarisuusalueeksi selitysasteen avulla katsottuna. Uudeksi lineaariseksi mittausalueeksi päätettiin ottaa absorbanssialue 0,3–0,5. Nykyinen lineaarisuusalue on absorbanssialueella 0,4–0,5. Absorbanssialueen 0,3–0,5 suoran arvot vastasivat paremmin nykyiselle välille sovitetun suoran arvoja kuin toisen tarkasteltavaksi otetun välin suoran arvot. Tällä perusteella uudeksi lineaariseksi mittausalueeksi valittiin absorbanssialue 0,3–0,5.

Hajontaa tarkasteltaessa huomattiin, että mitä pienempi absorbanssiarvo oli, sitä suurempi hajontakin oli. Tämä johtuu siitä, että absorbanssiarvon ollessa matala myös entsyymien määrä näytteessä on vähäinen. Erot hajonnoissa eivät kuitenkaan olleet kovin suuria.

Hajontaa tuloksille saattoi aiheuttaa myös käytetyn standardisuoran vaihtuminen kesken mittauksien. Fermentointi 1 vaiheet B8–B23 mitattiin käyttäen vanhaa suoraa. Loput näytteet mitattiin uudella suoralla. Tarkoituksena oli käyttää samaa standardisuoraa kaikille mittauksille, mutta reagenssia kului odotettua edemmän. Suora uusitaan, kun uusi reagenssipullo avataan. Suhteellisia hajontoja tarkasteltaessa huomattiin hajonnan olevan suurempaa kaikissa vaiheissa fermentointi 1:n näytteillä kuin fermentointi 2:n näytteillä.

Lineaariset mittausalueet olivat samoja eri fermentointien vaiheiden välillä. Tuloksista kuitenkin huomattiin, että B8-vaiheen kuvaaja oli erilainen muiden vaiheiden kuvaajiin verrattuna. Tämä johtuu siitä, että fermentointi on tässä kohtaa vielä melko alussa ja entsyymiä on tästä syystä vasta vähän näytteessä.

Työssä huomattiin, ettei nykyiselle käytössä olevalle lineaariselle mittausalueelle ole perusteita. Laajempi mittausalue absorbanssialueella 0,3–0,5 soveltuu käyttöön yhtä hyvin. Laajemman mittausalueen ansiosta uusintojen määrä vähenee, kun suurempi määrä laimennussuhteita soveltuu käytettäväksi määrittämisessä. Huomattiin myös, että tarvetta toiselle proteiiniipitoisuusmäärittämiselle kyseiselle fermentoinnille ei ole.

Yrityksessä päätettiin, ettei vesi- ja puskurilaimennusta tutkita enempää, minkä takia toistoja ei suoritettu. Huomattiin, että laimentaminen puskurin sijasta Milli-Q-veteen vaikuttaa tuloksiin. Toistojen ja näytteiden vähäisen määrä takia, nämä tulokset ovat suuntaa-antavia. Päätettiin, että jatketaan C01-vaiheen näytteen laimentamista puskuriin.

7 Yhteenveto

Insinööriyössä tarkastettiin erään entsyymifermentoinnin Bradford-proteiinimäärityksen lineaarinen mittausalue. Lineaarisuutta tarkasteltiin kolmesta fermentoinnista ja niiden neljästä eri vaiheesta. Roalilla määritetään päivittäin fermentoinneista proteiinipitoisuus, jotta voidaan tarkkailla fermentointien etenemistä entsyymien määrän kasvaessa.

Huomattiin, ettei nykyiselle lineaariselle mittausalueelle ole perusteita ja lineaarisuusalue päätettiin vaihtaa laajemmaksi. Tuloksia mitattaessa absorbanssiarvon halutaan jatkossa osuvan absorbanssialueelle 0,3–0,5. Aikaisempi absorbanssialue oli 0,4–0,5. Laajempi mittausalue helpottaa laimennussuhteiden päättämistä, ja uusintoja tulee vähemmän laajemman mittausalueen ansiosta. Uusinoista aiheutuva haitta saadaan siis minimoitua insinööriyön tulosten johdosta.

Insinööriyössä tarkasteltiin myös vaihtoehtoisia proteiinipitoisuusmääritysmenetelmiä. Työn tarkoituksena ei kuitenkaan ollut ensisijaisesti löytää korvaavaa menetelmää. Tutkittava proteiinipitoisuusmenetelmä perustuu Bradford-määritykseen. Tiedetään kuitenkin, että Bradford-määritys soveltuu insinööriyössä tutkitun entsyymien proteiinipitoisuuden määrittämiseen. Mahdollisesti tutkitussa fermentoinnissa on joitakin Bradford-reaktiota häiritseviä komponentteja, kuten detergentejä ja flavonoideja. Muissa menetelmissä on omat heikkoutensa, kuten BCA-määrityksessä sen pitkä kesto. Bradford-määritys soveltuu parhaiten käytettäväksi proteiinipitoisuuden määrittämiseen Roalilla, koska muidenkin fermentointien proteiinipitoisuudet mitataan käyttäen tätä menetelmää.

Insinööri työ koettiin merkitykselliseksi yrityksessä, koska mittaustulosten epävarmuudesta ja uusinoista aiheutui haittaa. Työssä onnistuttiin löytämään uusi lineaarinen mittausalue entsyymifermentoinnille proteiinimäärityksessä. Jälkikäteen mietittynä fermentointi 3 olisi ollut hyvä samalla tavalla kuin aiemmat fermentoinnit.

Lähteet

- 1 Industrial enzymes. 2019. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www-sciencedirect-com.ezproxy.metropolia.fi/science/article/pii/B9780444640468001488>>. Luettu 3.1.2021.
- 2 Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. 2019. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852419301877>>. Luettu 4.1.2021.
- 3 Enzyme market size, share, global industry report, 2020-2027. 2020. Verkkoaineisto. Grand view research. <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>>. Luettu 10.10.2020
- 4 Maailmanluokan entsyymitekologiaa. Verkkoaineisto. Roal. <<https://www.roal.fi>>. Luettu 17.10.2020.
- 5 Kärenlampi, Sirpa. 2020. Uusia entsyymejä ja elintarvikesovelluksia tulossa käyttöön. Verkkoaineisto. Kehittyvä elintarvike. <<https://kehittyvaelintarvike.fi/artikkelit/teemajutut/valmistus-ja-lisaaineet-tuotekehitys/uusia-entsyymeja-ja-elintarvikesovelluksia-tulossa-kayttoon/>>. 29.4.2020. Luettu 10.10.2020
- 6 Entsyymit. Verkkoaineisto. Solunetti. <<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/entsyymit1/2/>>. Luettu 16.9.2020.
- 7 Recent advancements in the synthesis of novel thermostable biocatalysts and their applications in commercially important chemoenzymatic conversion processes. 2020. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www-sciencedirect-com.ezproxy.metropolia.fi/science/article/pii/S0960852420318320#b0340>>. Luettu 3.1.2021.
- 8 Roal tuotteet & osaaminen. Verkkoaineisto. Roal. <<https://www.roal.fi/tuotteet-osaaminen/>>. Luettu 22.9.2020.
- 9 Aittomäki, Esa; Eerikäinen, Tero; Ojamo, Heikki; Suominen, Ilari; Von Weymarm, Niklas. 2002. Bioprosessitekniikka. 1. painos. Porvoo: WS Bookwell Oy 2002.
- 10 Wrolstad, Ronald E.; Acree, Terry E.; Decker, Eric A.; Penner, Michael H.; Reid, David S.; Schwartz, Steven J.; Shoemaker, Charles F.; Smith, Denise M. & Sporns, Peter. 2005. Handbook of food analytical chemistry. 1. painos. United States of America: Wiley.

- 11 Overview of protein assay methods. Verkkoaineisto. Thermo Fisher. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-assays.html>>. Luettu 4.9.2020.
- 12 Bradford, Marion M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www-sciencedirect-com.ezproxy.metropolia.fi/science/article/abs/pii/0003269776905273>>. Luettu 1.5.2021.
- 13 Protein quantitation. 2012. Verkkoaineisto. Labome. <<https://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>>. Päivitetty 7.10.2020. Luettu 10.10.2020.
- 14 Bradford Assay. Verkkoaineisto. Thermo Fisher. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bradford-assays.html?icid=linchpin14-bradford-assays2>>. Luettu 21.9.2020.
- 15 Bio-Rad Protein Assay. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>>. Luettu 7.9.2020.
- 16 Bradford Assay. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <<https://www.bio-rad.com/featured/en/bradford-assay.html>>. Luettu 7.9.2020.
- 17 Bio-Rad Protein Assay. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/product/bio-rad-protein-assay?ID=d4d4169a-12e8-4819-8b3e-ccab019c6e13>>. Luettu 8.9.2020.
- 18 Protein Assay. Verkkodokumentti. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1069.pdf>. Luettu 8.9.2020.
- 19 Mattila, Pirjo; Piironen, Vieno & Ollilainen, Velimatti. 2001. Elintarvikekemian ja –analytiikka. Helsinki: Yliopistopaino.
- 20 Lowry Protein assay. 2019. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/lowry-protein-assay>>. Luettu 19.9.2020.
- 21 Micro Bicinchoninic Acid (BCA) protein assay. Verkkoaineisto. VWR. <<https://fi.vwr.com/store/product/14442667/micro-bicinchoninic-acid-bca-protein-assay>>. Luettu 19.9.2020.

- 22 BCA Assay and Lowry Assays. Verkkoaineisto. Thermo Fisher.
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?ef_id=Cj0KCQjwtZH7BRDzARIsAGjbK2ZR1LV4rOO7unzxjBP36_-O1OM11fabBrOaUTLaN732DYEm1jK8OkaAhZDEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!436793335166!e!!g!!bca%20assay%20thermo&cid=bid_pca_sbu_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con&gclid=Cj0KCQjwtZH7BRDzARIsAGjbK2ZR1LV4rOO7unzxjBP36_-O1OM11fabBrOaUTLaN732DYEm1jK8OkaAhZDEALw_wcB>. Luettu 20.9.2020.
- 23 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 24 Korrelaatio ja riippuvuusluvut. 2004. Verkkoaineisto. KvantiMOTV.
<<https://www.fsd.tuni.fi/menetelmaopetus/korrelaatio/korrelaatio.html>>. Päivitetty 28.1.2004. Luettu 1.3.2021.
- 25 Tecan Schweiz AG. 2005. Operating manual. Doc. No. 392886 V.1.4. Switzerland: Tecan Schweiz AG.

Bradford-proteiinimäärityksen työohje Tecan Freedom EVO:lla



C - Biochemical analyses

Sivu 1 (7)

Versio 5

Tunnus C005

Päivämäärä 26/10/2020

8:50 AM

C005 PROTEIINIMÄÄRITYS TECAN FREEDOM EVO:LLA

Päivämäärä	Lyhyesti mitä muutettiin	Kuka teki muutokset
7.1.2020	-pH:n säätö ennen analyysiä tietyillä kasvatuksilla	Pauliina Saarinen
26.10.2020	Näytekesittelyt tarkennettu, abs-rajoja tarkennettu, työturvallisuus tuotu ohjeen alkuun ja lisätty maininta käyttöturvallisuustiedotteisiin tutustumisesta ja metanolin haitallisuudesta.	Pauliina Prokkola

1 Toiminnan tarkoitus

Bio-Rad proteiininmääritysmenetelmässä näytteessä oleva proteiini reagoi värireagenssin kanssa, jolloin Coomassie Brilliant Blue G-250:n absorptiomaksimi muuttuu 465 nm:stä 595 nm:iin. Mitatun värin absorbanssi on verrannollinen proteiinkonsentraatioon. Coomassie Brilliant Blue G-250 väri sitoutuu pääasiassa emäksisten ja aromaattisten aminohappotähteiden, erityisesti arginiinin kanssa. Värireaktio tapahtuu mikrokyveteissä ja mittausta suoritetaan spektrofotometrillä.

2 Laajuus

Menetelmä soveltuu liukaisen proteiinin konsentraation määrittämiseen mm. fermentaationäytteistä. Tulos riippuu määritettävien proteiinien laadusta (voi poiketa esim. Lowry-menetelmällä saaduista tuloksista). Menetelmä ei sovellu fermentointinäytteille, joiden proteiinkonsentraatio on erittäin pieni, esim. RXO, RXM ja RXK.

Ohjeessa on lisäksi menetelmäkuvaus Bio-Rad Proteiini määrityskitin ohjeiden mukaan tehtävästä manuaalisesta proteiininmäärityksestä. Manuaalimenetelmää voidaan käyttää, jos Tecan Freedom EVO laitteisto ei ole käytettävissä.

3 Vastuut

Työn suorittaja on velvollinen seuraamaan tämän ohjeen uusinta versiota ja tutustumaan tässä analyysissä käytettävien kemikaalien käyttöturvallisuustiedotteisiin ennen työn aloitusta. Ohjeen päivitysvastuussa ovat dokumentin tarkistuskierrossa nimetyt laadunvalvontalaboratorion vastuhenkilöt. Tarkistetun ohjeen hyväksyy laadunvalvontapäällikkö.

4 Työturvallisuus

Tutustu tässä analyysissä käytettävien kemikaalien käyttöturvallisuustiedotteisiin ennen työn aloitusta. Värireagenssi sisältää mm. metanolia ja fosforihappoa. Reagenssin käsittelyssä tulee noudattaa erityistä huolellisuutta ja varovaisuutta sekä suojautua asianmukaisesti. Värireagenssi laimennetaan vetokaapissa. Värireagenssi on myrkyllistä ja

Major Version 5 effective on 26/10/2020



C - Biochemical analyses

Sivu 2 (7)
Versio 5
Tunnus C005
Päivämäärä 26/10/2020
8:50 AM

syttävää, ihoa voimakkaasti syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Se on myös haitallista hengitettynä ja voi vahingoittaa elimiä.

5 Toiminta

Laitteet

Spektrofotometri, aallonpituus 595 nm
Nesteenkäsittelyrobotti Tecan Freedom EVO/200

Reagenssit

Kaikkien reagenssien valmistukseen sekä suorituksen eri vaiheissa käytetään ionivaihdettua vettä, Milli-Q tai vastaava.

1. Värireagenssi

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad No. 500-0006, säilytetään kylmähuoneessa). Käyttöliuos: Reagenssi laimennetaan veteen 1:2 ja suodatetaan Whatman no. 1 suodatinpaperin läpi. Laimennettu värireagenssi säilytetään valolta suojattuna. Pullon kylkeen merkitään teipillä voimassa olevan standardisuoran arvot.

2. Proteiinistandardi

Standardina käytetään härän plasman gammaglobuliinia (Bio-Rad Protein Assay Standard I, No. 500-0005). Kantaliuos valmistetaan liuottamalla jauhe 20 ml:aan vettä. Reagenssipullon kyljessä lukee proteiinikonsentraatio liuotuksen jälkeen. Liuotettua kantaliuosta säilytetään pakkasessa.

Kantaliuksesta tehdään 1:10 jatkolaimennos veteen ja laimennetaan edelleen seuraavasti:

Proteiini ml	ioniv. vesi ml	% alku- peräisestä
1,92	1,68	5,33 %
1,68	1,92	4,67 %
1,44	2,16	4,00 %
1,20	2,40	3,33 %
0,96	2,64	2,67 %
0,72	2,88	2,00 %
0,48	3,12	1,33 %
0,24	3,36	0,67 %

Standardisuoraa ajettaessa käytetään kolmea rinnakkaista. Nollanäytteenä käytetään vettä. Suora tehdään aina silloin, kun valmistetaan värireagenssi uudesta pullosta tai siirrytään käyttämään uutta proteiinistandardia.

Major Version 5 effective on 26/10/2020



C - Biochemical analyses

Sivu	4 (7)
Versio	5
Tunnus	C005
Päivämäärä	26/10/2020 8:50 AM

Näytteiden laimentaminen

Huom! ASA, ASD ja ACD -kasvatuksissa säädetään pH ennen analysointia. Kaadetaan myseelinäytettä dekkiaan ja säädetään pH 6.0 - 7.0 1 M NaOH:lla. Sentrifugoidaan ja erotetaan supernatantti.

Jauhemaisista näytteistä, nestemäisistä tuotteista ja kasvatusnäytteiden D- ja H-vaiheista tehdään 1/100 alkulaimennos punnitsemalla ja C01-näytteistä 1/10 alkulaimennos punnitsemalla. C01-näyte täytetään merkkiin puskurilla, muut vedellä ja tehdään sopiva jatkolaimennos veteen. Muut nestemäiset näytteet voidaan laimentaa suoraan ilman alkupunnitusta.

Näytteet laimennetaan veteen siten, että absorbanssiksi saadaan 0,3–0,8. AFK-kasvatuksella absorbanssien tulee toistaiseksi osua välille 0,4-0,5. Sakkaiset näytteet tulee sentrifugoida 10 min 4000 rpm ennen laimentamista.

Määrittäminen

Näytteet laimennetaan ja kaadetaan EVO:n lasiputkiin. Näytemäärän tulee olla vähintään n. 3,0 ml. Näyteputket laitetaan näyte/standarditelineeseen (kts. Täyttöjärjestys EVO:n kansiossa kuvasta "Näyte/Standarditeline"). Mikäli standardeja ei ajeta, laitetaan ykkösnäytteen paikalle reagenssinolla (vesiputki). Telineeseen/yhteen ajoon mahtuu kaikkiaan 48 putkea (nolla + vertailu + 45 näytettä + vertailu). Täytetään värireagenssi- ja pesuaineastiat (Liite1, kuva "Reagenssiastiat"). Yksi astiallinen (100 ml) värireagenssia riittää yhteen täyteen ajoon (standardit + 48 näytettä).

Asetetaan kyvettilaatikot/kyvetit paikoilleen (kts. EVO:n kansion kuva "Työpöytä" sekä Liite 1, "Kyvettiteline 1"). Proteiiniohjelma käyttää kolmea ensimmäistä riviä standardeille, näytteet täytetään alkaen viidennestä rivistä. Näin ollen ensimmäiseen kyvettitelineeseen mahtuu 24 rinnakkaista näytettä, loput täytetään toiseen kyvettitelineeseen.

Kun tarvittavat asetukset työpöydällä ovat valmiina, avataan ohjelma "Proteiini Biorad Evo". Mikäli aloitustoimenpiteet on jo suoritettu, käynnistetään ohjelma (RUN). Laite ilmoittaa, kun reaktiot ovat valmiina mitattaviksi. Voidaan poistua päävalikkoon (Cancel).

Mitataan reaktiot reagenssinollaa vastaan spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm. Standardeja mitattaessa siirretään tulokset Excel-laskentataulukkoon [ProtB EVO laskenta](#), joka löytyy DMS:stä. Näytteissä absorbanssien tulee osua välille 0,3-0,8.

Tecan Freedom EVO:n käyttöohjeet (L021) löytyvät QMS:stä.

Liitteet

Liite 1, Reagenssiastiat ja Kyvettiteline 1

Major Version 5 effective on 26/10/2020



C - Biochemical analyses

Sivu 5 (7)

Versio 5

Tunnus C005

Päivämäärä 26/10/2020
8:50 AM

6 Manuaalimenetelmän kuvaus

Tarvittavat materiaalit:

- Spektrofotometri, aallonpituus 595 nm
- Kyvettejä: valotien pituus 1 cm (mikrokyvettejä)
- koeputkia
- Koeputkiteline
- Vortex sekoittaja
- Whatman #1 suodatinpaperi tai vastaava sekä suppilo värireagenssin valmistukseen
- mittapulloja, pipettejä, astioita reagenssien valmistukseen ja säilytykseen
- Pipettejä, tilavuudet välillä 50 µl and 5.0 ml

1. Värireagenssi

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad No. 500-0006, säilytys kylmähuoneessa). Käyttöliuos: Reagenssi laimennetaan veteen 1:5 ja suodatetaan Whatman no. 1 suodatinpaperin läpi. Valmis värireagenssi säilytetään valolta suojattuna. Pullon kylkeen merkitään teipillä voimassa olevan standardisuoran arvot.

2. Proteiinistandardi

Standardina käytetään härän plasman gammaglobuliinia (Bio-Rad Protein Assay Standard I, No. 500-0005). Kantaliuos valmistetaan liuottamalla jauhe 20 ml:aan vettä. Reagenssipullon kyljessä lukee proteiinikonsentraatio liuotuksen jälkeen. Liuotettua kantaliuosta säilytetään pakkasessa.

Laimennetaan kantaliuosta vedellä seuraavasti:

Laimennos	Proteiiniliuosta (µl)	Vettä (µl)
2/10	100	400
3/10	150	350
4/10	200	300
5/10	250	250
6/10	300	200

Standardit tehdään normaalisti kahtena tai kolmena rinnakkaisena. Nollanäytteenä käytetään vettä.

Major Version 5 effective on 26/10/2020



C - Biochemical analyses

Sivu 6 (7)

Versio 5

Tunnus C005

Päivämäärä 26/10/2020
8:50 AM

Standardimenetelmä

1. Valmista värireagenssi. Mikäli avaat sitä varten uuden pullon, mittaa myös uusi standardisuora.
2. Valmista standardista kolmesta viiteen laimennosta sen mukaan, mitä proteiineja mitataan. Mittausalue on 0,2 - 0,9 mg/ml, tavoite 0,2 - 0,5 mg/ml.
3. Pipetoi 50 µl jokaista standardipistettä puhtaaseen, kuivaan koeputkeen.
4. Lisää 2,5 ml laimennettua värireagenssia ja sekoita hyvin.
5. Inkuboi huoneenlämmössä 10-15 minuutin ajan. Absorbanssit nousevat seisotuksena aikana; näytteitä ei saa seisottaa yli 30 minuuttia.
6. Mittaa absorbanssit aallonpituudella 595nm vettä vastaan.

7 Tallenteet

Tulokset tallennetaan LIMS-järjestelmään.

8 Ympäristö- ja energianhallintänäkökohdat

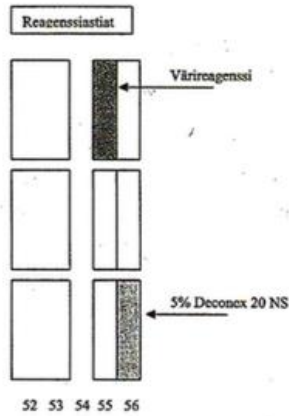
Kaikki toiminnassa syntyvä jäte hävitetään Roalin jätehuolto suunnitelman mukaisesti. Käytettyä värireagenssia ei saa kaataa viemäriin vaan se on toimitettava ongelmajätelaitokselle.

9 Viitteet

Bradford, M., Anal.Biochem., 72, 284 (1976)
Reisner, A. H., Nemes, P. ja Bucholtz, C., Anal.Biochem., 64,509 (1975)
Fazakes de St. Groth, S. et al., Biochem. Biophys. Acta, 71, 377 (1963)
Sedmack, J. J. ja Grossberg, S. E., Anal. Biochem., 79, 544 (1977)
Compton, S. J. ja Jones, C. G., Anal. Biochem., 151, 369 (1985)
Bio-Rad Protein Assay käyttöohje
Käyttöturvallisuustiedote Coomassie Brilliant Blue G-250
Käyttöturvallisuustiedote Methanol

Major Version 5 effective on 26/10/2020

Liite 1. Reagenssiastiat ja Kvettiteline 1




Major Version 5 effective on 26/10/2020

Kvettiteline 1

0	0	0		N1 1	N1 2		
Sr1	Sr1	Sr1		N2 1	N2 2		
Sr2	Sr2	Sr2		N3 1	N3 2		
Sr3	Sr3	Sr3		N4 1	N4 2		
Sr4	Sr4	Sr4		JNE			
Sr5	Sr5	Sr5					
Sr6	Sr6	Sr6					
Sr7	Sr7	Sr7					
Sr8	Sr8	Sr8					

Signatures:

Controlled Document Content Approved:	I hereby state that I have found no errors in the contents of this controlled quality document, and thus the document is ready for release.	
Name:	Paajanen, Irene BSG\ipaajanen <i>Paajanen Irene</i>	Title: Quality Control and Environmental Manager
Electronically Signed in		Timestamp 2020-10-26 06:50:36 (UTC+00:00)

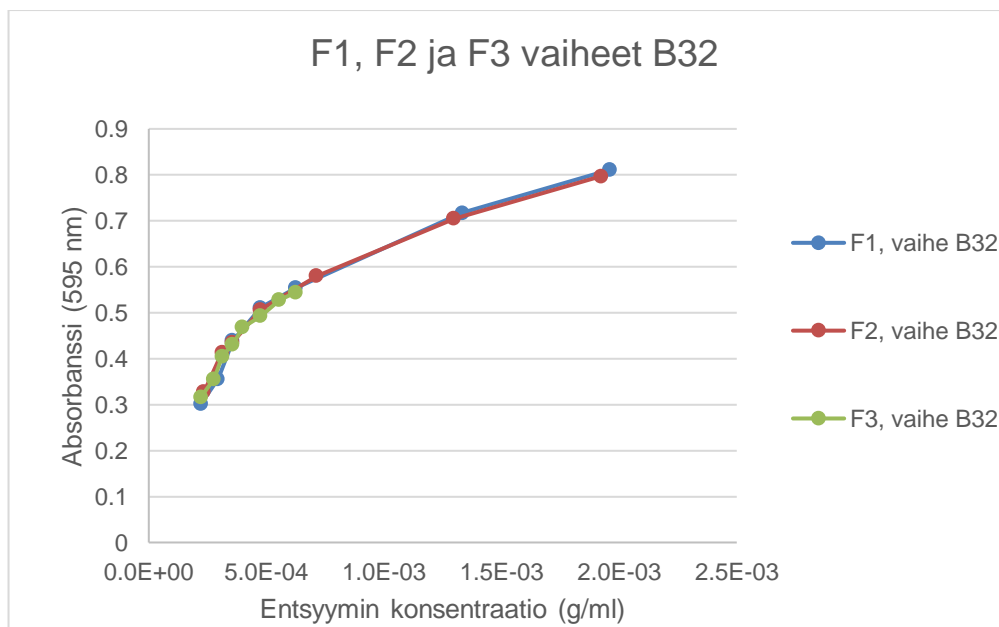
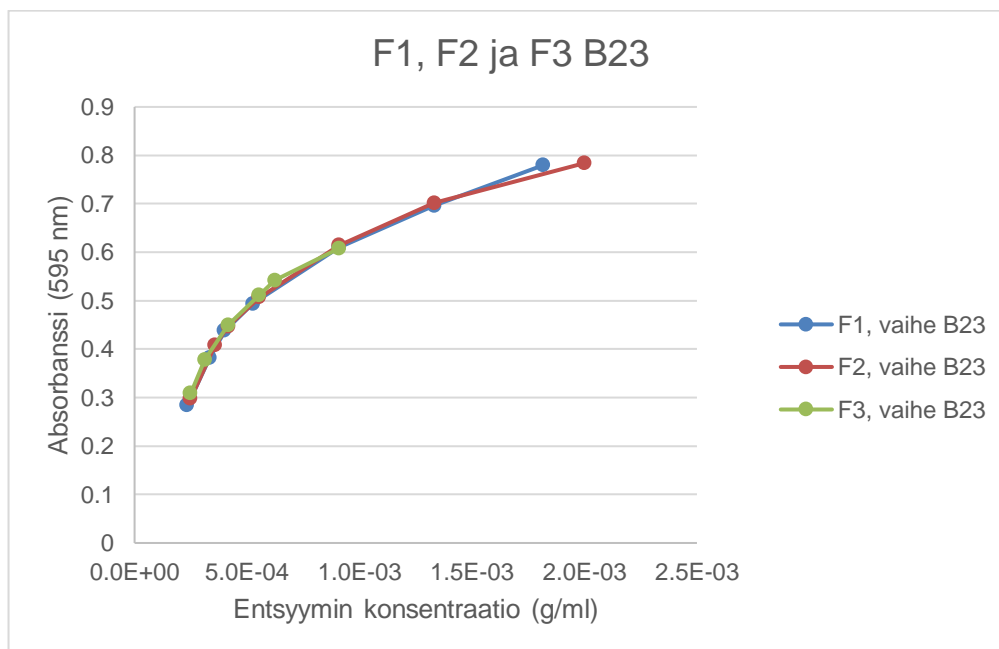
Major Version 5 effective on 26/10/2020

Otanta raakadastasta fermentointi 2:n vaiheen B23 mittaustuloksista

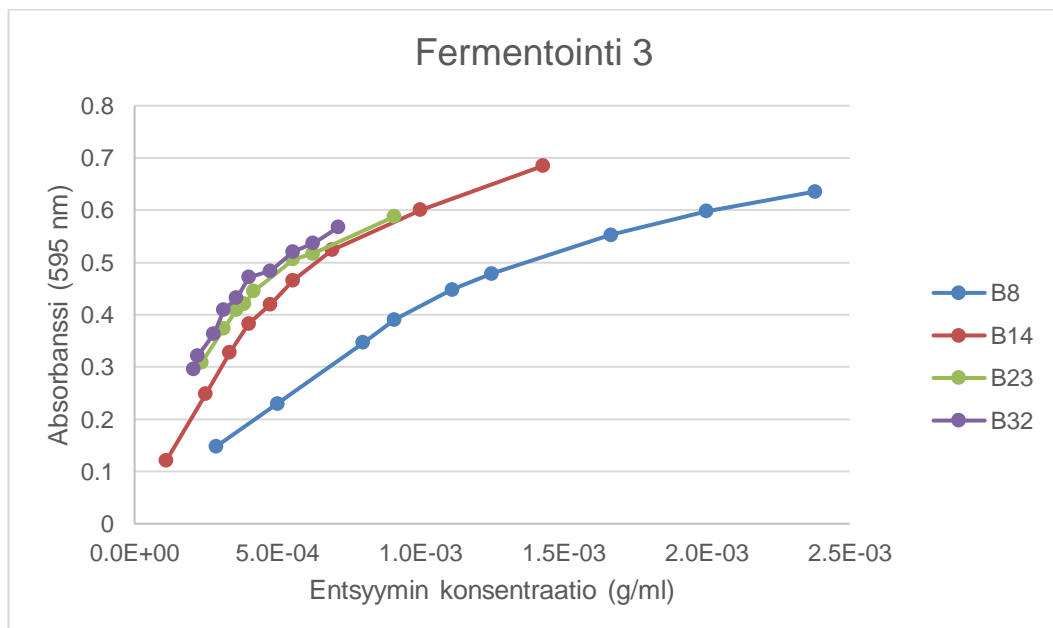
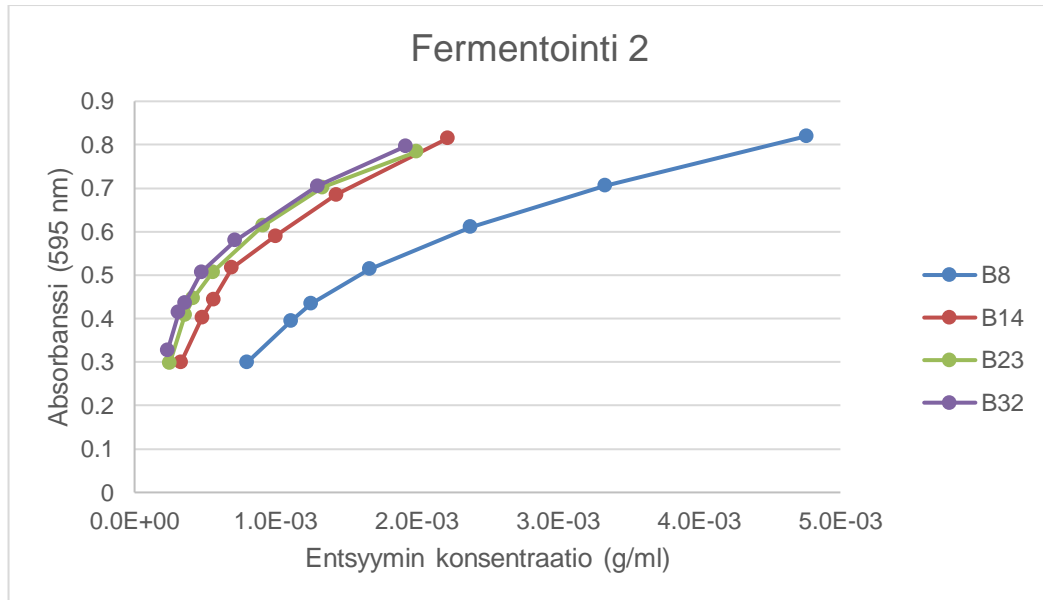
MITTAUSDATA F2 B23			
1. mittausten toisto			
16.9.2020 Vertailu: 86,8 mg/ml			
abs595	laimennus	absKa	prot.pit. mg/ml
0,327	4000		
0,296	4000		
0,291	4000		
0,272	4000	0,297	44,8
0,420	2800		
0,405	2800		
0,401	2800		
0,387	2800	0,403	51,6
0,443	2400		
0,440	2400		
0,431	2400		
0,407	2400	0,430	48,6
0,491	1800		
0,489	1800		
0,495	1800		
0,492	1800	0,492	44,0
0,603	1100		
0,600	1100		
0,619	1100		
0,612	1100	0,609	35,5
0,716	750		
0,703	750		
0,679	750		
0,692	750	0,698	28,8
0,774	500		
0,783	500		
0,782	500		
0,776	500	0,779	21,9

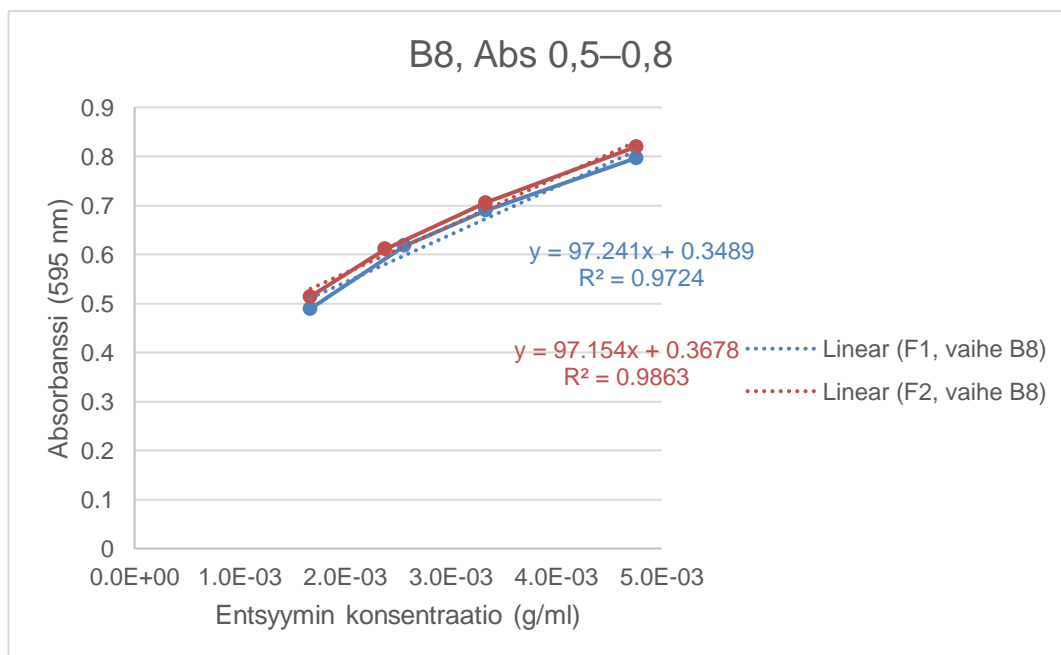
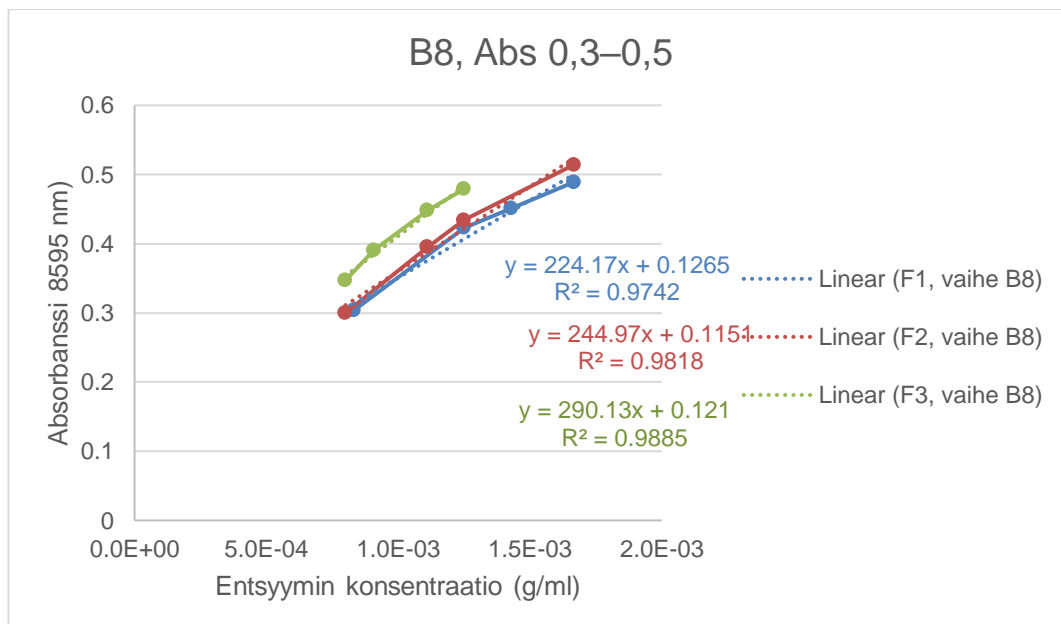
MITTAUSDATA F2 B23			
2. mittauksen toisto			
17.9.2020 Vertailu: 86,6 mg/ml			
abs595	laimennus	absKa	prot.pit. mg/ml
0,302	4000		
0,310	4000		
0,287	4000		
0,292	4000	0,298	45,2
0,422	2800		
0,423	2800		
0,407	2800		
0,394	2800	0,412	53,2
0,451	2400		
0,435	2400		
0,460	2400		
0,450	2400	0,449	51,7
0,530	1800		
0,503	1800		
0,529	1800		
0,518	1800	0,520	47,4
0,632	1100		
0,613	1100		
0,611	1100		
0,617	1100	0,618	36,3
0,698	750		
0,704	750		
0,684	750		
0,694	750	0,695	28,6
0,798	500		
0,780	500		
0,788	500		
0,788	500	0,789	22,2

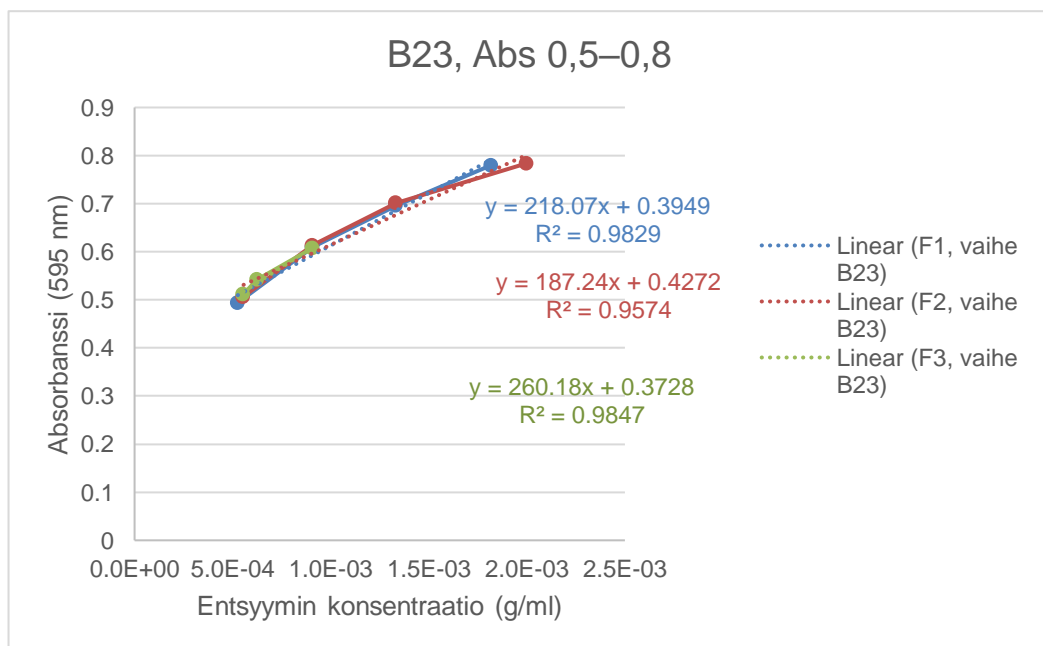
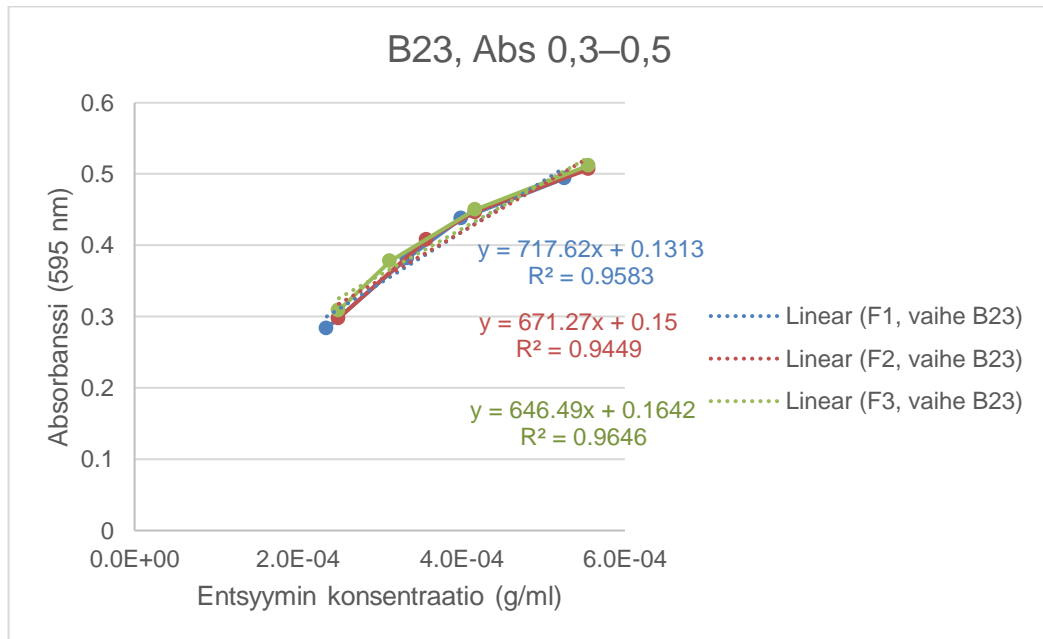
MITTAUSDATA F2 B23				
3. mittauksen toisto				
22.9.2020 Vertailu:mg/ml 91,1				
abs595	laimennus	absKa	prot.pit. mg/ml	
0,33	4000			
0,319	4000			
0,321	4000			
0,316	4000	▼	0,322	57,6
0,432	2800			
0,422	2800			
0,431	2800			
0,416	2800	▼	0,425	59,3
0,466	2400			
0,454	2400			
0,470	2400			
0,461	2400	▼	0,463	56,7
0,504	1800			
0,514	1800			
0,505	1800			
0,511	1800	▼	0,509	47,9
0,623	1100			
0,609	1100			
0,610	1100			
0,617	1100	▼	0,615	36,9
0,722	750			
0,710	750			
0,711	750			
0,706	750	▼	0,712	29,9
0,791	500			
0,812	500			
0,821	500			
0,813	500	▼	0,809	26,4

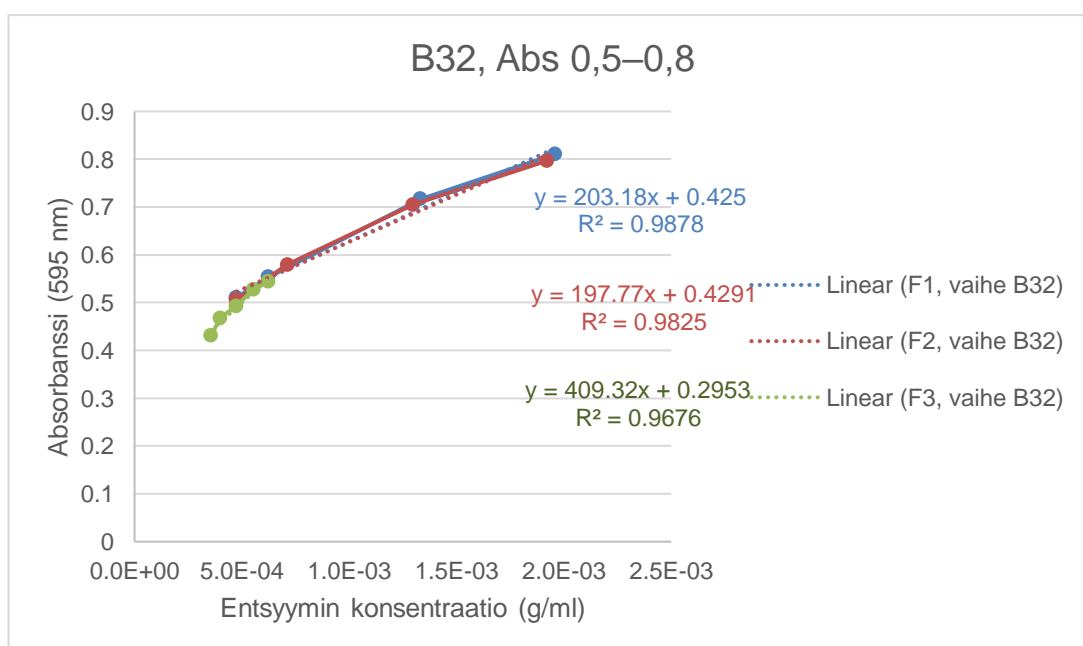
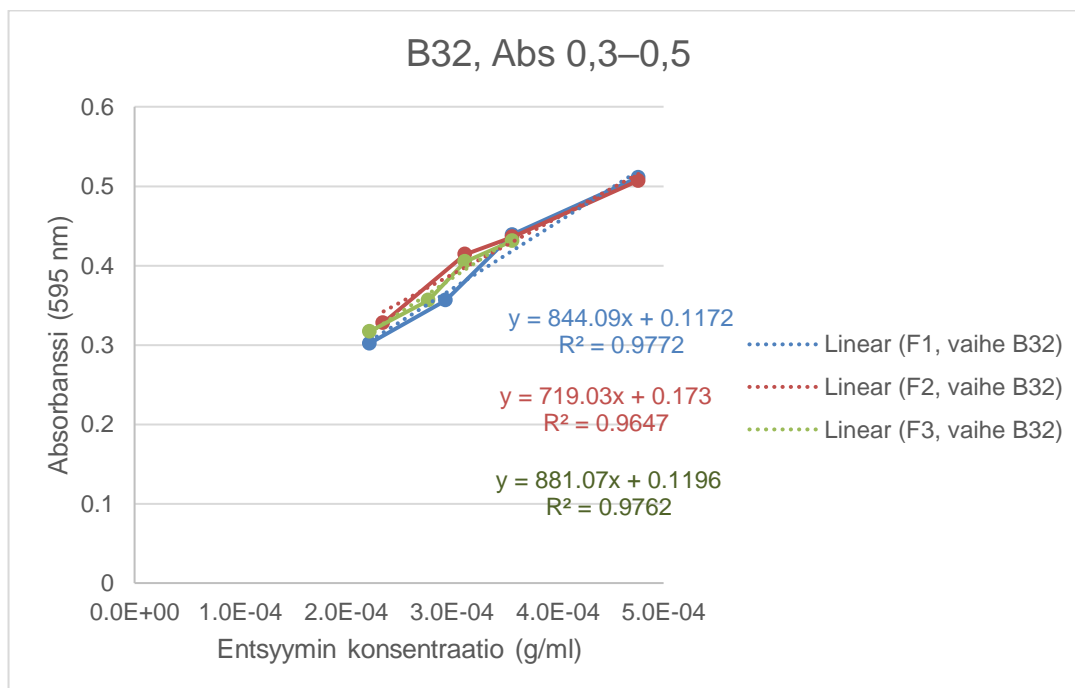
Eri fermentointien kuvaajien vertailua tietyissä fermentoinnin vaiheissa

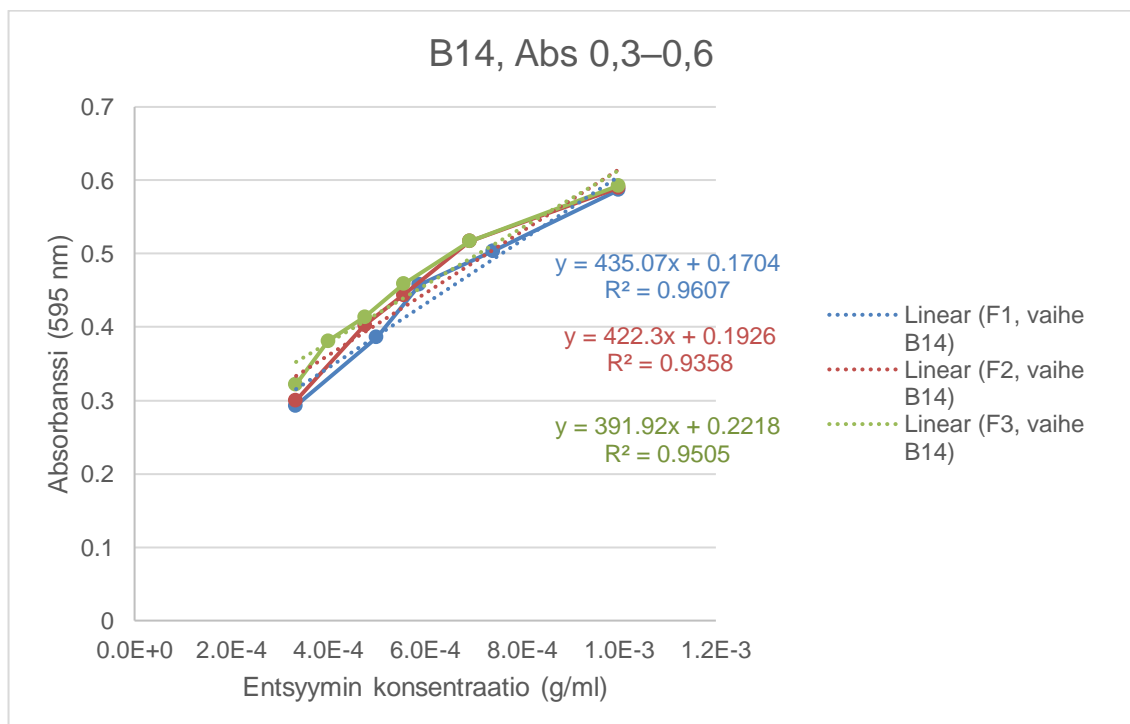
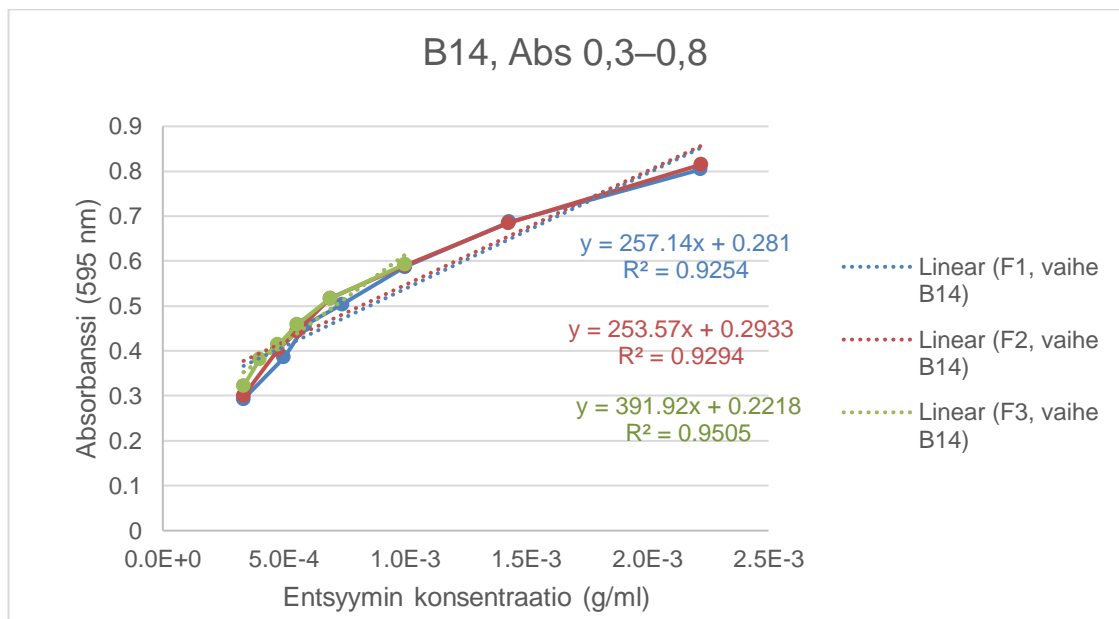
Eri vaiheiden kuvaajien vertailua tietyssä fermentoinnissa



Suorien sovitus eri fermentointien ja niiden vaiheiden kuvaajille







Box and Whisker Plot -kuvaajat eri absorbanssipisteille

