

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

**Toni Paasikallio**

**Bioreaktorikasvatusten monitorointi ja  
näytteenottolaitteen kehitys**

Insinööritö 10.4.2010

Ohjaaja: erikoistutkija Juha-Pekka Pitkänen  
Ohjaava opettaja: professori Heikki Ojamo

Tekijä Otsikko	Toni Paasikallio Bioreaktorikasvatusten monitorointi ja näytteenottolaitteen kehitys
Sivumäärä Aika	94 sivua 10.4.2010
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja Ohjaava opettaja	erikoistutkija Juha-Pekka Pitkänen professori Heikki Ojamo
<p>Insinööriyössä kehitettiin uutta bioreaktoreissa käytettävää näytteenottolaitteistoa, jolla voitaisiin suorittaa nopea dead-end-tyyppinen suodatus näytteenoton yhteydessä toistettavasti ja luotettavasti. Lisäksi selvitettiin kolmen eri in-situ on-line-mittalaitteiston soveltuvuutta panimohiivan käymisprosessin monitorointiin. In-situ on-line-mittalaitteiden tuloksia vertailtiin käymisprosessin aikana off-line-menetelminä mitattuihin optisen tiheyden arvoihin, hiivan kuivapainoihin sekä HPLC-analyyseihin. Määritettiin myös solunulkoisia adenosiinitrifostaatti- ja adenylaattikinaasipitoisuuksia yhden käymisprosessin osalta tarkoituksena selvittää hiivasolujen tilaa käymisprosessissa.</p> <p>Käymisprosessin seurantaan käytetyt mittalaitteet olivat lähi-IR-valon absorptioon perustuva TruCell2-solutiheysanturi, dielektriseen spektroskopiaan perustuva Biomass Monitor 220 sekä FT-NIR-mittausmekaniikkaan perustuva Matrix-F FT-NIR -spektrometri. Tulosten perusteella kaikki kolme mittalaitetta näyttäsivät soveltuvan käymisprosessissa biomassan monitorointiin. Lisäksi Matrix-F FT-NIR -spektrometri näyttäisi soveltuvan alustakomponenteista ainakin glukoosin, maltoosin, glyserolin ja etanolin monitorointiin.</p> <p>Solunulkoisissa adenosiinitrifostaatin mittauksissa havaittiin lievää kasvua käymisprosessin keskivaiheilla, mutta tulokset olivat vain suuntaa antavia mittausten menetelmästä johtuen. Adenylaattikinaasin mittauksissa ei havaittu muutoksia.</p> <p>Näytteenottolaitteiston yleinen toimivuus ja näytteenottosekvenssi saatiin luotettavammaksi ja näytteenoton jälkeinen höyrysterilointi turvallisemmaksi. Näytteenotto ilman suodatusta onnistui toistettavasti. Suodatuksen osalta kiintoaineen erotus ei onnistunut suunnitellulla tavalla, koska suodatinmateriaalit tukkeutuivat tai permeaattivuus jäi lähes olemattomaksi.</p> <p>Jatkokehityksen kannalta näytteenottolaitteen osalta tulisi keskittyä suodatuksen parantamiseen. Matrix-F FT-NIR -mittausten soveltuvuutta alustakomponenttien monitorointiin voitaisiin mahdollisesti parantaa käyttämällä useampia kalibrointipisteitä.</p>	
Hakusanat	bioreaktori, monitorointi, näytteenotto, mittaus, suodatus

Author Title	Toni Paasikallio Bioreactor monitoring and the development of a new sampling device
Number of Pages Date	94 10 April 2010
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor Supervisor	Juha-Pekka Pitkänen, Senior Research Scientist Heikki Ojamo, Professor
<p>The aim of this final year project was to develop a new sampling device which could provide fast, reproducible and reliable sampling from the bioreactor with dead-end filtration. Also three different in-situ on-line measuring devices for beer fermentation monitoring were evaluated. The measurements of in-situ on-line devices were compared to off-line method results like optical density values, cell dry weight values and HPLC analyses. In addition, extracellular adenosine triphosphate and adenylate kinase concentrations were determined from one of the fermentations to observe the condition of yeast in fermentation process.</p> <p>The devices used for fermentation monitoring were a TruCell2 Cell Density Sensor based on near infrared light absorption, a Biomass Monitor 220 based on dielectric spectroscopy and a Matrix-F FT-NIR spectrometer based on FT-NIR measurement technique. According to the results, all three devices appear to be suitable for biomass monitoring in beer fermentation. In addition, the Matrix-F FT-NIR spectrometer also appears to be suitable for monitoring glucose, maltose, glycerol and ethanol in the culture medium.</p> <p>Extracellular adenosine triphosphate measurements revealed a slight increase in the middle of the fermentation process but the results were only suggestive because of the measurement method used. Adenylate kinase measurements did not reveal any changes.</p> <p>The general functionality of the sampling device and the sampling sequence were improved. Also the safety of the steam sterilization phase after sampling was improved. Sampling without filtration was performed successfully, but the filtration did not work as planned because the permeate flow rate was very small or the filters got fully clogged.</p> <p>Further development of the sampling device should focus on improving the filtering performance. The Matrix-F FT-NIR results could be improved by using more calibration points.</p>	
Keywords	bioreactor, monitoring, sampling, measurement, filtration

## Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Johdanto .....	6
KIRJALLISUUSOSA.....	7
1 Bioprosessien monitorointi.....	7
2 Näytteenotto.....	8
3 Suodatus .....	11
3.1 Dead end -suodatus.....	13
3.2 Cross-flow-suodatus .....	14
4 Mittaustekniikka ja anturit.....	16
4.1 On-line-, at-line- ja off-line-menetelmät .....	17
4.2 Kemialliset anturit .....	18
4.3 Bioanturit .....	18
4.4 Optiset anturit.....	19
4.5 Spektroskooppiset menetelmät.....	20
4.5.1 Dielektrinen spektroskopia.....	23
4.5.2 Infrapunaspektroskopia.....	25
4.5.3 NIR-spektroskopia .....	27
4.6 Fluoresenssimenetelmät.....	29
4.7 HPLC .....	31
5 Yleiset kemialliset, fysikaaliset ja biologiset mittaukset .....	33
5.1 Kemialliset mittaukset .....	33
5.2 Fysikaaliset mittaukset .....	34
5.3 Biologiset mittaukset .....	35
5.3.1 Adenosiinitrifostaatti .....	38
5.3.2 Adenylaattikinaasi .....	39
TUTKIMUSOSA.....	40
6 Näytteenottolaite .....	40
7 Laitteet, materiaalit ja menetelmät.....	42

7.1	TruCell2-solutiheysanturi .....	42
7.1.1	Mittausten taltiointi LabVIEW-ohjelmalla .....	43
7.2	Biomass Monitor Model 220 .....	43
7.2.1	Biomass Monitor Model 220 -mittausten taltiointi .....	44
7.3	Matrix-F FT-NIR -spektrometri .....	45
7.4	ATP:n ja AK:n määrittäminen .....	45
7.5	Hiivan kuivapainojen määrittäminen .....	46
7.6	Optinen tiheys .....	46
7.7	Puhtausnäytteet .....	47
7.8	Automaattinen näytteenotto cross-flow-suodatuksella.....	47
8	Fermentoinnit.....	49
8.1	Käyminen TP03.....	49
8.2	Käyminen TP04.....	51
8.3	Käyminen TP05.....	52
8.4	Käyminen TP06.....	53
9	Tulokset ja tulosten tarkastelu .....	55
9.1	TP03.....	55
9.2	TP04.....	59
9.3	TP05.....	63
9.4	TP06.....	68
9.5	Sovitukset biomassamittausten välillä.....	71
9.6	ATP ja AK .....	78
9.7	FT-NIR-tulokset.....	80
10	Yhteenveto.....	81
	Lähteet.....	83
	Liitteet .....	88
	Liite 1: Näytteenottosekvenssi LabVIEW-ohjelmalla .....	88
	Liite 2: Lähi-IR-värialueet .....	89
	Liite 3: Finesse Curve Fitter .....	90
	Liite 4: TP05-käymisprosessin FT-NIR-mallit.....	91
	Liite 5: Käsittelemätön FT-NIR-spektri.....	93
	Liite 6: TruCell2-anturin virtasignaali jännitteeksi muutettuna .....	94

## Johdanto

Bioprosesseissa mittauksilla pyritään havainnoimaan organismin tai biomolekyylin toimintaa mahdollisimman tarkasti. Esimerkiksi tuotantoprosessin kannattavuuden, turvallisuuden, tuotteen laadun tai prosessin säädön sekä mallintamisen kannalta mittaukset ja niiden avulla saatava tieto ovat erittäin olennaisia tekijöitä. Suoritettavien mittausten tulisi olla tarkkoja ja toistettavia sekä kuvata reaktorissa vallitsevia olosuhteita häiritsemättä kuitenkaan prosessin toimintaa.

Modernit bioreaktoreissa käytettävät mittaustekniikat eivät välttämättä tarvitse erillistä reaktorista otettavaa näytettä, mutta silti useat analyysit bioprosessiteollisuudessa tehdään aikaa vievillä off-line-menetelmillä. Bioreaktoreissa käytettävien mittaus- ja näytteenottojärjestelmien tulisi kestää sterilointiolosuhteet ja prosessin aikana vallitsevat olosuhteen ilman riskiä reaktorin kontaminoitumisesta. Näytteenotossa esimerkiksi solujen, kiintoaineen tai nesteiden erotuksen tulisi tapahtua nopeasti ja aseptisesti, jotta otettu näyte vastaisi reaktorin olosuhteita ja jotta reaktori ei kontaminoituisi vierailta organismeilla tai kemikaaleilla näytteenoton aikana tai sen jälkeen.

Insinööriö tehtiin VTT:n (Valtion teknillinen tutkimuskeskus) bioprosessitekniikan osastolla liittyen Tekesin rahoittamaan BioControl-projektiin (1050/31/07). Työ koostui kahdesta osiosta, joista ensimmäisessä kehitettiin bioreaktorikasvatuksissa käytettävää näytteenottolaitetta, joka mahdollistaisi aseptisen näytteenoton etenkin korkean kuiva-ainepitoisuuden omaavissa kasvatuksissa, joissa normaali näytteenotto nestemäisenä virtauksena hanan ja putkiston kautta ei ole mahdollista. Näytteenottolaite mahdollistaisi myös näytteen suodattamisen näytteenoton yhteydessä ilman hukkanäytettä ja näytteenottolinjat voitaisiin steriloida höyryllä näytteenoton jälkeen. Toisessa osiossa selvitettiin kolmen eri in-situ on-line-mittalaitteen käyttökelpoisuutta panimohiivan käymisprosessin monitorointiin 10 litran fermenttorissa sekä vertailtiin on-line-mittauksia off-line-menetelminä tehtyihin mittauksiin. Lisäksi yhdestä käymisprosessista määritettiin adenosiinitrifostaatti (ATP)- ja adenylaattikinaasi (AK) -pitoisuudet tunnin välein otetuista näytteistä.

# KIRJALLISUUSOSA

## 1 Bioprosessien monitorointi

Halutun tuotteen muodostaminen biologisen systeemin biokemiallisten reaktioverkostojen kautta edellyttää systeemin kompleksisten vuorovaikutusten ymmärtämistä ja hallintaa. Biotekniikassa prosessien monitoroinnissa runsaimmin käytetyt mitta-anturit ovat bioreaktorin sisällä vallitsevien olosuhteiden määrittämiseen tarkoitettuja. Bioreaktoreissa useimmiten seurattuja parametreja ovat esimerkiksi pH, lämpötila, paine, nestetaso, vaahtoaminen, syöttöteho, liuennon hapen osapaine ja sekoituksen nopeus. Prosessissa tapahtuva hallitsematon muutos esimerkiksi pH:n, lämpötilan tai paineen osalta voi muuttaa solujen aineenvaihduntaa ja vaikuttaa näin merkittävästi prosessin tehokkuuteen sekä tuottavuuteen. Täysimääräisellä prosessin hallinnalla pyritään solujen kasvuympäristön hallintaan, jotta olosuhteet olisivat optimaaliset kasvun, biosynteesin ja jälkikäsittelyn kannalta. (Becker 2007: 250; Vojinović 2005: 1084.)

Bioprosesseissa esimerkiksi biomassan ja tuotteiden muodostumisen onnistuminen riippuu siis paljolti määrättyistä kasvuolosuhteista. Jotta nämä voidaan saavuttaa, on tärkeää ymmärtää, mitä prosessissa tapahtuu ja miten sitä hallitaan optimaalisten olosuhteiden säilyttämiseksi. Olosuhteiden seuranta vaatiikin jatkuvaa mittausta, jotta poikkeamat optimiolosuhteista voidaan korjata. Olosuhteiden seurannan lisäksi mittausseurannan avulla saadaan tietoa esimerkiksi prosessin etenemisestä ja mahdollisista epänormaaleista tapahtumista, kuten kontaminaatioista tai mikrobikannan heikkenemisestä. (Stanbury 1998: 215.)

Prosessin ymmärtämisen voidaan katsoa olevan hyvällä tasolla, kun kaikki kriittiset vaihtelevuutta aiheuttavat tekijät on tunnistettu ja selitetty; vaihtelu voidaan hallita prosessin avulla ja tuotteen laatua voidaan ennakoida tarkasti sekä luotettavasti. FDA:n (Food and Drug Administration, USA) vuonna 2004 asettaman prosessianalyttisten tekniikoiden ohjeistuksen (PAT-ohjeistus) mukaan tavoitteena olisi prosessin parempi ymmärrettävyys ja säädettävyys. (Guidance for industry 2004: 4 - 6.)

Uusia mittausjärjestelmiä etsitään ja sovelletaan jatkuvasti tutkimuskäyttöön. Niiden käyttöä teollisuuden prosesseissa rajoittavat lähinnä mittausjärjestelmien huono stabiilius, sterilointiongelmien sekä epätarkkuus. Tulevaisuudessa perinteisten bioprosesseissa mitattujen parametrien kuten substraattien, tuotteen ja biomassan konsentraation lisäksi tulee olemaan kasvava tarve uusille mittauksille. Esimerkiksi solujen aineenvaihdunnan mittaamiseen tarkoitettujen anturien kattavat vasta pienen osan solunulkoisista ja -sisäisistä yhdisteistä. (Becker 2007: 251.)

## 2 Näytteenotto

Bioprosesseissa näytteenoton tarkoituksena on saada edustava näyte, joka vastaa prosessivaiheen kokonaistilannetta. Näytteenotto ei saa vaarantaa prosessin mikrobiologista puhtautta, ja steriilin raja-alueen bioreaktorin sisällön ja ulkopuolen välillä tulee olla pysyvä myös silloin, kun näytteenottoa ei suoriteta. Fermentoreissa käytettävät erilliset näytteenottoportit ja näytteenottolaitteet tulee olla steriloitavissa ennen käyttöä sekä käytön jälkeen. Lisäksi tarvitaan hyvä mekaaninen suunnittelu ja käyttäjän kokemus, jotta steriilisyys voidaan varmistaa käytettäessä tällaisia laitteita. Monimutkaiset sekvenssit venttiilien käytössä voivat johtaa käyttövirheisiin.

(Stanbury 1998: 187 - 188; Vojinović 2005: 1084.)

Näytteenottomenetelmät voidaan jakaa kahteen osaan: in-situ- ja ex-situ-menetelmiin. In-situ-menetelmässä näytteen analysointi tapahtuu suoraan reaktorissa ilman näytteen poistamista reaktorin ulkopuolelle. Ex-situ-menetelmässä näyte vastaavasti poistetaan reaktorin ulkopuolelle erillistä analysointia varten. In-situ- ja ex-situ-näytteenottotavan valinta riippuu tavallisesti prosessissa käytettävien mittalaitteiden kyvystä kestää prosessin ympäristöä ja sterilointiolosuhteita. (Vojinović 2005: 1084.)

Fermentointituotteiden nopean ja tehokkaan erotuksen tai puhdistuksen tulisi olla mahdollisimman kustannustehokasta. Haluttu tuote voi olla esimerkiksi lämpöherkkä tai solunsisäinen, jolloin tuotteen tehokas talteenotto vaikeutuu. Tuotteen hyvän talteenoton tai puhdistamisen varmistamiseksi operaation nopeus voi olla ratkaiseva tekijä luon-

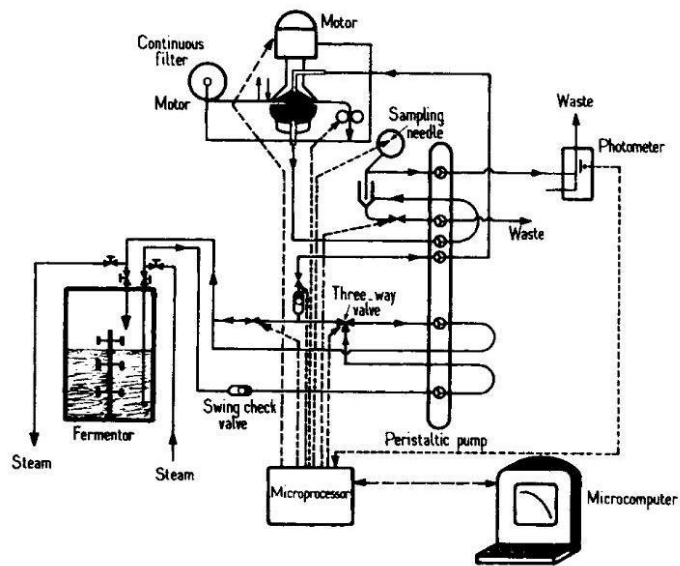


teeltaan epävakaiden tuotteiden kanssa. Näytteenottolaitteet ja erilaiset näytesilmukat ovat aina mahdollisia riskipaikkoja kontaminaatioille. Toisaalta in-situ-anturit, näytteenottimen pinnat ja suodattimet voivat likaantua tai pinnoille voi muodostua biofilmiä. Lisäksi ohivirtaussilmukat etenkin hitailla virtausnopeuksilla eivät välttämättä edusta reaktorin todellista tilannetta. Näytteenottojärjestelmän aiheuttama rasitus ja erilainen happipitoisuus voivat myös aiheuttaa muutoksia solujen aineenvaihduntaan ja vaikuttaa näin myöhempään analyysiin. Taulukossa 1 on esitetty erilaisten näytteenottoperiaatteiden etuja ja epäkohtia. (Känsäkoski 2006: 50; Stanbury 1998: 277 - 280.)

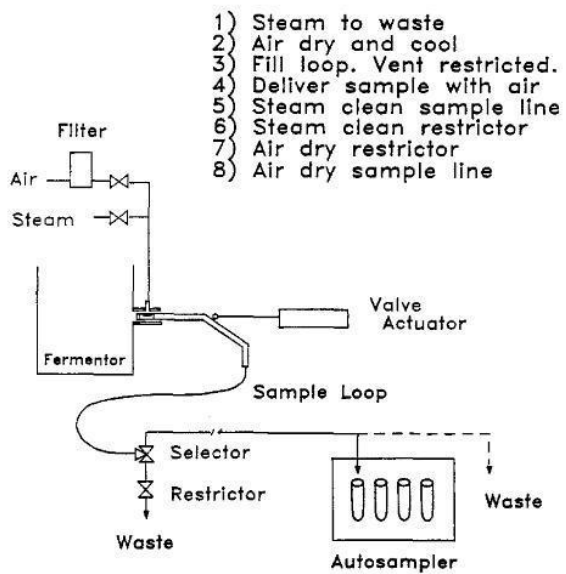
*Taulukko 1. Näytteenottoperiaatteiden etuja sekä epäkohtia (Olsson 1998).*

Principle	Advantages	Disadvantages
<i>Cell-containing sample</i> Direct withdrawal	Simple Macromolecular and intracellular components can be measured	Increased matrix effects Sample composition may change due to metabolic activity (unless an inactivation step is included in the sampling)
<i>Cell-free sample – liquid</i> In situ filtration	Low contamination risk Does not adversely affect the culture	Fouling of membrane Filter cannot be replaced Time delay of sampling Low permeate flow rate Increasing cell concentration
In situ dialysis	No sample loss Does not adversely affect the culture	Sample module cannot be replaced Requirement of a permeate flow complicates the technique No quantitative recovery – calibration required
Ex situ filtration	Filter can be replaced Fast response time High permeate flow rate	Risk of contamination is high Difficult to validate Shear stress imposed on the cells Nutrient limitation in the sample stream Increasing cell concentration
Ex situ dialysis	Membrane cassette can be replaced Large dialysis areas can be used No sample loss	Risk of contamination is high No quantitative recovery – calibration required
<i>Cell-free sample – gaseous</i> Diffusion over membrane	Low sample volume Fast	Conversion from gaseous to liquid concentrations difficult Restricted to volatiles

Mohamed ym. (1986) esittelivät laboratorioissa käytettäville fermentoreille pumpuilla toimivan automaattisen ja höyrysteriloitavan näytteenottojärjestelmän (kuva 1). Laitteisto sisälsi on-line-mittausjärjestelmän glukoosipitoisuuden määrittämiseksi. On-line-mittausta käytettiin myös glukoosin syötön säätelyyn takaisinkytkettynä menetelmänä hiivan panossyöttöfermentoinnissa tyydyttävien tuloksin. Reda ym. (1991) esittelivät höyrysteriloitavan, mäntätyyppisen ja paineilmalla toimivan automaattisen näytteenottojärjestelmän (kuva 2), joka voitiin ohjelmoida ottamaan myös useampia näytteitä automaattisesti.



Kuva 1. Kaaviokuva näytteenottojärjestelmästä (Mohamed 1986).



Kuva 2. Kaaviokuva näytteenottojärjestelmästä (Reda 1991).

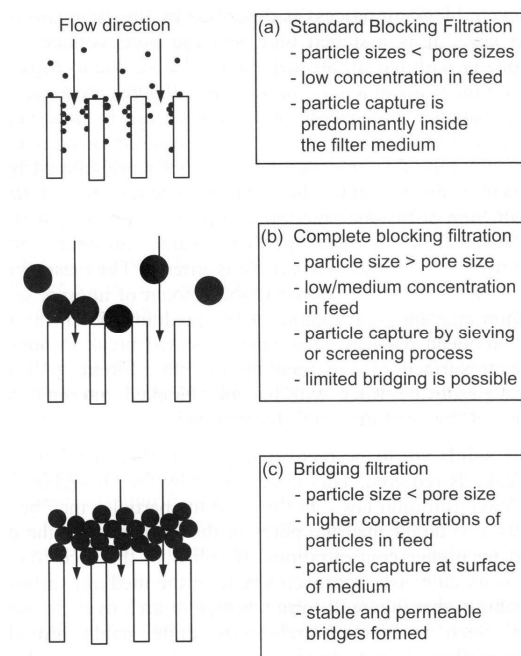
### 3 Suodatus

Erilaisia suodatusmenetelmiä voidaan käyttää nesteiden tai kaasujen puhdistukseen, kiinteiden aineiden talteenottoon sekä molempiin. Suodatus on yksi yleisimmin käytetyistä menetelmistä partikkelien erottamiseksi nesteistä ja kaasuista. Etenkin teollinen suodatus käsittää lukuisia erilaisia suodatusmenetelmiä ja laitteistoja. (Stanbury 1998: 281; Pihkala 1998: 42 - 43.)

Bioprosesseihin liittyvissä suodatuksissa kiintoaineen ja mikrobisolujen erottamiseen liuoksesta voidaan käyttää esimerkiksi nesteitä läpäiseviä suodatinmateriaaleja (väliaineita). Väliaineina voidaan käyttää esimerkiksi kankaita, selluloosaa, lasivillaa, synteettisiä kuituja sekä keraamisia ja metallista valmistettuja väliaineita. Etenkin huokoinen materiaali pidättää tehokkaasti kiinteät partikkelit, mutta päästää nesteet tai kaasun lävitse. Suodatusmateriaalin valinta riippuu suuresti suodatettavan aineen ominaisuuksista sekä prosessin olosuhteista. Hyvällä suodatinmateriaalilla tulisivatkin olla seuraavia ominaisuuksia käytetyn prosessin kannalta: prosessin paineen ja mekaanisen rasituksen sietokyky, prosessin lämpötilan ja käytettävien kemikaalien sietokyky, laaja partikkeleiden pidätyskyky, mahdollisimman pieni virtausvastus, kyky estää partikkeleiden kiihtuminen huokosiin sekä mahdollisen kiintoainekerroksen helppo erotettavuus. Lisäksi materiaali ei saisi turvota ollessaan kosketuksessa suodoksen tai pesuliuosten kanssa. (Aittomäki 2002: 185; Cheremisinoff 1998: 19; Stanbury 1998: 280.)

Suodatuksessa käytettävät väliaineet voidaan jakaa yleisesti kahteen luokkaan: ohutkerroksiin ja paksukerroksiin väliaineisiin. Ohutkerroksisissa väliaineissa kiintoainepartikkelit eivät tunkeudu väliaineen huokosten sisään, jolloin väliaineen läpäisevät vain huokoskoko pienemmät partikkelit. Partikkeleiden ollessa suodatinaineen huokosia suurempia muodostuu väliaineen pinnalle kerros, jota nimitetään usein suodoskakuksi. Ohutkerroksinen väliaine voi olla esimerkiksi suodinkangas tai suodatinpaperi. Paksukerroksisissa väliaineissa huokoskoko on läpimitaltaan suurempi kuin suodatettavat partikkelit, jolloin partikkelit kulkeutuvat väliaineen muodostamassa verkostossa ja pidättyvät seinämiin adsorption, kerrostumisen ja takertumisen vaikutuksesta. Paksukerroksisia väliaineita ovat esimerkiksi hiekkasuodattimet ja osa kennosuodattimista.

Näissä sovelluksissa kiintoainekonsentraatio on yleensä alhainen, jotta partikkelit pääsivät kulkeutumaan esteettömästi huokosiin (Wakeman 2005: 10). Paksukerroksisessa väliaineessa kiintoainepartikkelit jakaantuvat tasaisesti väliainekerrokseen, jolloin väliaine ei pääse tukkeutumaan ja näin estämään suodatusta. Kun suodatusta on jatkettu riittävän pitkään, kiintoaine voidaan erottaa väliaineesta pesemällä se vastavirtaan. Verkoston huokoskoon epätasaisuudesta johtuen paksukerroksisten väliaineiden pidätyskyky on tyypillisesti 90 - 99 %. Suodatuksen mekanismit on esitetty kuvassa 3. (Cheremisinoff 1998: 20; Pihkala 1998: 42 - 43; Wakeman 2005: 10.)

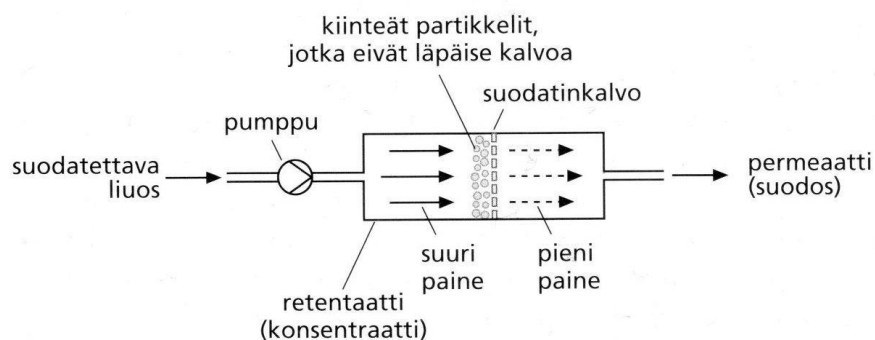


Kuva 3. Suodatuksen mekanismit (Wakeman 2005: 11).

Suodatustyyppit voidaan yleisesti jakaa kahteen luokkaan: perinteiseen (dead-end) ja tangentiaalivirtaukselliseen (cross-flow) suodatukseen. Suodatusprosessissa väliaineen läpäissyttä nestettä kutsutaan permeaatiksi tai suodokseksi ja läpäisemätöntä osaa retentaatiksi, konsentraatiksi tai suodatuskakuksi. Tarvittava voima nestemolekyylien kulkeutumiseen suodatinmateriaalin läpi saadaan aikaiseksi suodatinmateriaalin yli muodostuvalla paine-erolla. Paine-ero voidaan muodostaa painovoiman avulla, ja lisäksi paine-eroa voidaan säätää ja lisätä erilaisten syöttö- tai imupumppujen avulla. (Aittomäki 2002: 185.)

### 3.1 Dead end -suodatus

Dead end -suodatuksessa syöttövirtaus on kohtisuoraan suodatinpintaa kohden. Kiinteät partikkelit muodostavat suodatinmateriaalin päälle kiinteän kerroksen, mikä toimii samalla myös suodatusaineena (Pihkala 1998: 43). Kerroksen muodostumisen johdosta prosessista käytetään myös nimitystä kakkusuodatus (cake filtration). Dead end -suodatuksessa väliaineen vastakkaisille puolille muodostetaan paine-ero siten, että retentaatin puolella vallitsee suurempi paine kuin permeaatin puolella. Paine-eron muodostama työntövoima kasvaa verrannollisesti, mutta useimmissa tapauksissa suodatusnopeuden kasvu on hitaampaa suhteessa paine-eron kasvuun. Näin tapahtuu, koska paine-eron kasvaessa suodatinmateriaalin aukot ja suodatuskakku puristuvat kokoon ja samalla myös virtausvastus kasvaa. Suodatuskakan muodostuminen ja permeaatin saanto loppuvat, kun painehäviö kasvaa yhtä suureksi retentaattipuolen työntöpaineen kanssa. Suuresti kokoonpuristuvilla suodatuskakuilla ajava voima ja muodostuva vastus kasvavat lähes suhteessa toisiinsa, jolloin retentaattipuolen ja permeaattipuolen välisen paine-eron kasvulla on vain vähäinen vaikutus saantonopeuteen. Esimerkki dead end -suodatuksen periaatteesta on esitetty kuvassa 4. (Aittomäki 2002: 185 - 186; Cheremisinoff 1998: 10; Wakeman, 2005: 270.)

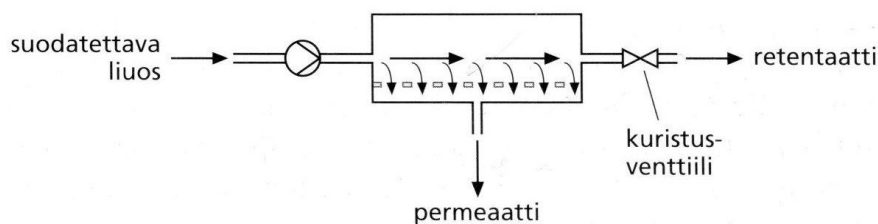


Kuva 4. Dead end -suodatuksen periaate (Aittomäki 2002: 185).

Bioprosesseissa käytettäviä dead end -tyyppisiä suodattimia ovat esimerkiksi vakuu-  
rumpusuodatin, levysuodatin ja Larox-suodatin. Lisäksi kalvosuodatusta voidaan käyt-  
tää dead end -sovelluksena (Wakeman, 2005: 270). Suodatusprosesseissa voidaan li-  
säksi käyttää erilaisia suodatusapuaineita, kuten esimerkiksi piimaata nopeuttamaan  
suodatusta sekä estämään suodatuskakun kokoonpuristumista ja suodattimen tukkeutu-  
mista. (Aittomäki 2002: 187.)

### 3.2 Cross-flow-suodatus

Cross-flow-suodatuksessa syöttövirtaus suuntautuu tangentiaalisesti eli suodatusväliai-  
neen suuntaisesti. Tällöin muodostuvan suodatuskakun kerroksen paksuutta rajoittavat  
syöttövirtauksen muodostamat leikkausvoimat, ja myös painehäviö suodatuskakun läpi  
on rajoittunut. Permeaattivuo vähenee suodatuskakun muodostuksen aikana, mutta saa-  
vuttaa äärellisen virtauksen suodatuskakun paksuuden tasaannuttua. Cross-flow-suoda-  
tuksessa paine-ero voidaan muodostaa esimerkiksi syöttöpumpulla ja retentaattipuolelle  
asetetulla kuristusventtiilillä. Cross-flow-suodatuksessa retentaattiliuos voidaan myös  
kierrättää takaisin suodattimeen suodatuksen tehostamiseksi. Esimerkki cross-flow-su-  
odatuksen periaatteesta on esitetty kuvassa 5. (Aittomäki 2002: 185; Wakeman 2005:  
270.)



*Kuva 5. Cross-flow-suodatuksen periaate (Aittomäki 2002: 185).*

Esimerkki cross-flow-suodatukselta on kalvosuodatus. Kalvosuodatuksessa suodatus-  
väliaineena käytetään puoliläpäisevien kalvoja, joiden huokoskoko määrää läpäisevät  
partikkelit ja molekyylit. Kalvomateriaaleina voidaan käyttää erilaisia synteettisiä po-  
lymeerejä, mutta myös keraamisia ja metallista valmistettuja kalvoja voidaan käyttää.  
Keraamiset tai esimerkiksi ruostumattomasta teräksestä valmistetut kalvot kestävät pe-

sua ja sterilointia polymeerikalvoja paremmin. Polymeerikalvojen pesu voi puolestaan olla hankalaa, ja kalvojen sterilointi tapahtuu usein kemikaaleilla. Kalvosuodatuksessa permeaattivuon heikentyminen voi johtua esimerkiksi kalvopintojen ja huokosten liikaantumista, kalvohuokosten puristumisesta kasaan paineen vaikutuksesta, kalvohuokosten tukkeutumisesta ja kalvomateriaalin hydrofiilisyyden alentumisesta. Bioprosessien suodatuksessa käsitellään tyypillisesti vettä sisältäviä suspensioita, jolloin hydrofiilisen kalvomateriaalin käyttö on suositeltavaa permeaattivuon parantamiseksi. (Aittomäki 2002: 186 - 188; Ojamo 2008: 45; Wakeman 2005: 7-8.)

Polymeerikalvojen läpäisevyys ilmoitetaan erotusraja-arvona (cut-off -arvo), koska kalvojen huokoskoko ei yleensä ole tasalaatuista. Erotusraja-arvolla tarkoitetaan molekyylipainoerotusrajaa (MWCO), jonka kalvo pidättää tietyn prosentin todennäköisyydellä. Valittavaksi suositellaan kalvoja, joiden MWCO on 3-5 kertaa pienempi kuin konsentroitavan komponentin molekyylikoko. (Aittomäki 2002: 188.)

Paineen avulla toimivat kalvosuodatustekniikat voidaan jaotella seuraavasti: mikrosuodatus (MF), ultrasuodatus (UF), nanosuodatus (NF) ja käänteisosmoosi (RO). Näissä prosesseissa paine-erot kasvavat siirryttäessä mikrosuodatukselta käänteisosmoosiin. Mikrosuodatuksessa erotettavien partikkeleiden koko vaihtelee välillä 0,1 - 20  $\mu\text{m}$  ja ultrasuodatuksessa välillä 1 nm - 0,1  $\mu\text{m}$ . Lisäksi MF- ja UF- tekniikoita voidaan käyttää myös dead end -sovelluksena. Nanosuodatuksessa ja käänteisosmoosisa vaikuttavat paineen lisäksi myös muut erotusmekanismit kuten kalvon affiniteetti tiettyjä suodatettavia komponentteja kohtaan. (Aittomäki 2002: 187 - 188; Wakeman 2005: 268 - 269.)

## 4 Mittaustekniikka ja anturit

Instrumentointi ja mittaustekniikka ovat olennaisia tekijöitä bioprosessin säädön, mallintamisen, tarkkailun, tuotteen laadun, viranomaisvalvonnan sekä turvallisuuden kannalta. Bioprosesseissa tyypillisiä perusmittauksia ovat esimerkiksi lämpötila, paine, pH, sekoitusnopeus ja poistokaasumittaukset. Perusmittausten avulla voidaan laskea prosessin tilaa kuvaavien muuttujien arvoja, kuten esimerkiksi liuenneen hapen pitoisuus, hapenkulutusnopeus, lämmöntuotto, hiilidioksidin tuottonopeus jne. Perusmittauksia yhdistelemällä mittaustietoa voidaan hyödyntää esimerkiksi prosessin säädössä, mallinuksessa, mittakaavan muutoksessa tai solujen aineenvaihdunnan tarkkailussa. Mittausjärjestelmässä mitta-anturi on kosketuksissa tai riittävän lähellä mitattavaa kohdetta. Anturin antama signaali johdetaan tarvittaessa mittamuuntimelle, joka vahvistaa signaalia paremmin häiriötä kestävään muotoon. Seuraavaksi signaali voidaan esikäsitellä kohinan ja mahdollisten häiriöiden suodattamiseksi ja johtaa siitä edelleen A/D-muuntimelle, jossa analoginen signaali voidaan muuttaa digitaaliseen muotoon tietokoneelle. Tietokoneelta mittaussignaalin sisältöä voidaan tulkita järkevässä muodossa. Mittaukseen soveltuvan mitta-anturin tulisi olla riittävän selektiivinen, herkkä ja spesifinen riippumatta mitattavasta analyytistä tai käyttösovelluksesta. Jatkuva signaali ja nopea vaste ovat toivottavia etenkin prosessin säädön kannalta. Lisäksi häiriönsieto ja kyky toimia mitattavassa prosessiympäristössä pidempiä aikoja ovat tärkeitä ominaisuuksia. (Aittomäki 2002: 212 - 215; Becker 2007: 252.)

Yleisiä vaatimuksia luotettavalle anturille ovat kalibroinnin mahdollisuus, lineaarisuus ja tarkkuus sekä alhaisissa että korkeissa solupitoisuuksissa. Bioreaktoreissa käytettävien antureiden tulisi lisäksi olla steriloitavia, lämpötilaa, painetta ja korroosiota kestäviä sekä biologisesti inaktiivisia. Lisäksi teollisissa käyttösovelluksissa anturin kalibroinnin tulisi olla pysyvä useamman fermentoinnin, steriloinnin ja puhdistuksen ajan. (Kiviharju 2008: 657.)

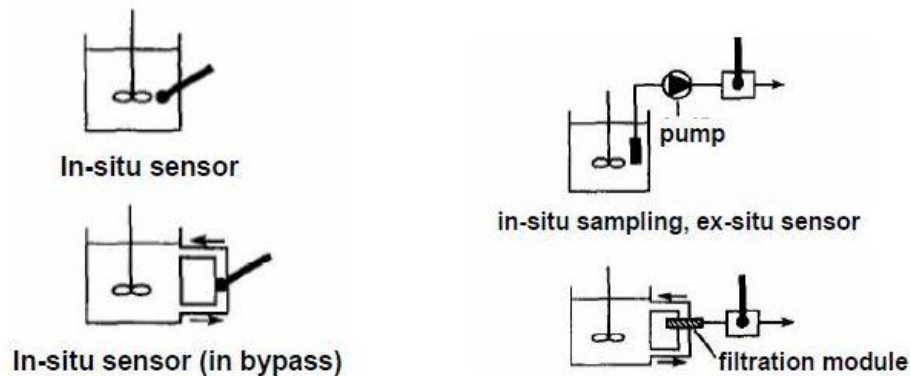


## 4.1 On-line-, at-line- ja off-line-menetelmät

Bioprosesseissa mittaaminen voidaan jakaa yleisesti off-line-, at-line- ja on-line- menetelmiin. Off-line- ja at-line-menetelmissä reaktorista otetaan manuaalisesti erillinen näyte reaktorin ulkopuolelle ja näyte analysoidaan prosessista erillään olevalla laitteistolla. Off-line-tapauksessa näytteen analysointi voi tapahtua esimerkiksi erillisessä laboratoriossa ja at-line-tapauksessa analysointi voidaan suorittaa prosessin läheisyydessä olevalla laitteistolla. On-line-menetelmissä toiminta on automatisoitu. Bioreaktorista tapahtuva näytteenotto, näytteen käsittely ja näytteen analysointi tapahtuvat siis automaattisesti eikä erillistä käsin tapahtuvaa näytteenottoa tarvita. On-line-menetelmät voidaan lisäksi jakaa in-situ (in-line)- ja ex-situ-menetelmiin riippuen mitta-anturin sijoituspaikasta prosessin yhteydessä. In-situ-tapauksessa mitta-anturi on suoraan kosketuksissa kasvatusliuokseen reaktorin sisällä ja varsinaista näytteenottoa ei välttämättä edes tarvita. Ex-situ-tapauksessa mitta-anturi ei ole suoraan kosketuksissa kasvatusliuokseen reaktorin sisällä, mutta anturi on sijoitettu reaktorin yhteyteen siten, että sillä on mittapiste prosessin yhteydessä. In-situ-tapauksessa saadaan useimmiten nopeampi mittaaminen sekä parempi takaisinkytkennän mahdollistava prosessin säätö. Ex-situ-tapausta käytetään esimerkiksi silloin, kun mitta-anturi ei kestä reaktorin vaatimia sterilointiolosuhteita. Kuvassa 6 on esitetty erilaisia bioreaktoreissa käytettäviä mitta- ja näytteenottotapoja. (Aittomäki 2002: 217; Junker 2006: 226; Kiviharju 2007: 561; Sikdar 1989: 186.)

Off-line-menetelmät mahdollistavat hyvin tarkan mittauksen, mutta puutteena on aika-viive näytteenoton ja analyysin välillä, jolloin tilanne ei välttämättä enää kuvaa reaktorissa vallitsevia olosuhteita. Off-line-menetelmiä käytetäänkin tavallisesti esimerkiksi matemaattisten mallien kehittämiseen. Reaaliaikaisemmilla in-situ- ja ex-situ-mittauksilla saadaan puolestaan suoraa tietoa prosessin tilasta, jolloin on mahdollista havaita mahdolliset poikkeamat ja suorittaa välittömiä korjaustoimenpiteitä prosessin aikana. Yleisesti käytössä olevia steriloitavia in-situ on-line-tyyppisiä antureita ovat esimerkiksi lämpötilan, pH:n ja liuenneen hapen osapaineen mitta-anturit. Yleisiä ongelmia in-situ-antureiden käytössä ovat proteiinien saostuminen ja biomateriaalin kertyminen anturin kosketuspinnalle. Tämä voi aiheuttaa esimerkiksi mittaustuloksen vääristymistä ja ns.

pohjaviivan ryömintää. (Aittomäki 2002: 217; Harms 2002: 124; Vojinović 2005: 1084 - 1085.)



Kuva 6. Bioreaktoreissa käytettäviä näytteenotto- ja mittaustapoja (Känsäkoski 2006: 49).

## 4.2 Kemialliset anturit

Kemialliset anturit perustustuvat abiottiseen eli elottomaan havaitsemisperiaatteeseen. Yleisesti käytettyjä ovat esimerkiksi sähkökemialliset anturit pH:n ja liuenneen hapen osapaineen mittauksessa. Kemiallisten antureiden herkkyys ja tarkkuus voivat parantua tulevaisuudessa esimerkiksi älykkäiden ja biomimeettisten materiaalien kehityksen myötä. Biomimeettiset materiaalit ovat syntetisoituja materiaaleja, jotka jäljittelevät biologisten komponenttien kuten entsyymien ja vasta-aineiden toimintaa. Älykkäät materiaalit voivat olla keraamisia, erilaisia seoksia tai polymeerejä, joilla on yksi tai useampi ominaisuus, joka muuttuu merkittävästi vasteena ärsykkeeseen. Tällaisia ominaisuuksia voivat olla esimerkiksi viskositeetti, tilavuus tai johtokyky. (Becker 2007: 253.)

## 4.3 Bioanturit

Bioantureissa mittaussysteemi sisältää havaitsemiseen tarkoitetun biokomponentin, jolla on kyky havaita aineita herkästi ja valikoivasti. Tähän mennessä kehitetyissä bioantureista suurimmassa osassa käytetään biokomponentteina vasta-aineita tai entsyymejä. Kehityssuuntana uusien biokomponenttien osalta on aptameerien ja hiilihydraattien

käyttö. Aptameereja ovat esimerkiksi lyhyet RNA- ja DNA-ketjut, joita voidaan muodostaa syntetisoimalla. Aptameerien etuina verrattuna vasta-aineisiin ovat niiden suurempi herkkyys ja sitoutumisaffiniteetti. Hiilihydraateilla puolestaan on tärkeä rooli solukalvon reseptoreina erilaisten molekyylien tunnistamisessa. Bioantureiden herkkyys ja tarkkuus on parempi kemiallisiin antureihin verrattuna, mutta häiriönsieto ja käyttöikä sekä etenkin steriloitavuus on huonompi. (Becker 2007: 252 - 253.)

Suurin ongelma in-situ-bioantureiden kehityksessä on käytettävien biomateriaalien, kuten entsyymien huono lämmönkestävyys. Bioantureille on mahdollista suorittaa autoklavointi siten, että lämpöherkkä entsyymi ja mittaussysteemi (esimerkiksi Clark-elektrodi) ovat omassa säiliössä, joka lisätään vasta autoklavoinnin jälkeen. Erottuminen kasvualustasta tapahtuu sterilointia kestävän puoliläpäisevän kalvon avulla. Mittauksessa analyysi diffundoituu kalvon lävitse ja reagoi entsyymin kanssa. Etuina ovat entsyymiä sisältävän säiliön uudelleentäyttö ja lineaarisen alueen laajentuminen. Haittana ovat kuitenkin huomattavasti kasvava vasteaika ja puoliläpäisevän kalvon likaantuminen tai hajoaminen. Kyseistä toimintaperiaatetta on sovellettu esimerkiksi glukoosin in-situ-mittausmenetelmänä glukoosin pitoisuuden ollessa korkeintaan 20 g/l. (Vojinović 2005: 1089.)

#### **4.4 Optiset anturit**

Optisten antureiden käyttö bioprosessien seurannassa ja säädössä on tullut jatkuvasti tärkeämmäksi. Optisten antureiden käytöllä voidaan vähentää esimerkiksi kontaminaation riskiä ja näytteen kulutusta, koska näytteenoton tarpeellisuus vähenee. Lisäksi optiset anturit mahdollistavat aineeseen tunkeutumattoman, ainetta tuhoamattoman, jatkuvan sekä useamman yhdisteen samanaikaisen seurannan. Myös paremman sterilointikestävyyden ansiosta kasvatusalustan kontaminaatiot ovat helpommin vältettävissä. Optiset systeemit eivät myöskään häiritse solujen aineenvaihduntaa, jolloin niitä on mahdollista käyttää elävissä organismeissa tehtävissä mittauksissa (in-vivo). Tähän mennessä yleisluontoista optista havaitsemismenetelmää ei ole onnistuttu kehittämään, koska erilaiset bioprosessit voivat olla erittäin monimutkaisia ja toisistaan poikkeavia. Useimmat

optiset anturit perustuvat UV-, IR- (FTIR, NIR, FT-NIR), Raman-, fluoresenssi- tai terahertsispektroskopiaan. (Becker 2007: 255.)

Optisten antureiden ongelmana on mittauksen herkkyys vääristymiselle, ja mittauksessa esiintyvä taustakohina on yleisempää verrattuna muihin mittausten menetelmiin. Mittauksen vääristymistä aiheuttavat esimerkiksi aineen adheesio, prosessin aikana muuttuva sameus sekä valon hajonta solujen pirstaleista ja kaasukuplista. Optisten in-situ-antureiden ongelmana on yleensä niiden rajoitettu mitta-alue. Lisäksi optista tiheyttä mittaavat anturit ovat herkkiä kaasukuplille ja kiintoaineelle. Optisilla antureilla ei voida myöskään erotella eläviä ja kuolleita soluja toisistaan tai solujen jäänteitä. (Vojinović 2005: 1086.)

## 4.5 Spektroskooppiset menetelmät

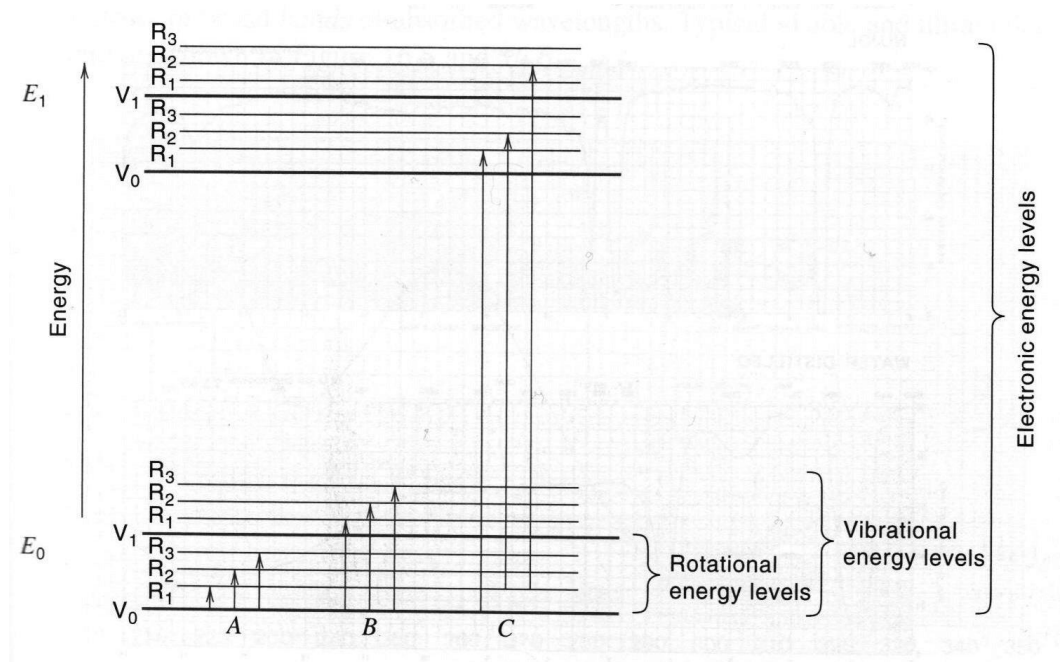
Spektroskooppiset analyysimenetelmät perustuvat sähkömagneettisen säteilyn ja aineen vuorovaikutukseen. Menetelmät voidaan jakaa emissio- ja absorptiomenetelmiin. Emissiomenetelmät perustuvat näytteen lähettämään säteilyyn ja absorptiomenetelmät aineen läpi kulkeneen säteilyn heikentymiseen. Spektroskooppiset analyysimenetelmät jaotellaan pääasiassa niissä käytetyn säteilyn perusteella röntgen-, uv-, näkyvän valon, infrapuna-, mikroaalto- tai radiotaajuus menetelmiin. (Toivonen 2007a: 1.)

Valon sähkömagneettinen spektri on hyvin laaja, ja siitä silmän havaitsema näkyvän valon osuus on vain hyvin kapea aallonpituusalue. Valon törmätessä aineeseen tapahtuu valossa olevilla aallonpituuksilla selektiivisesti valon läpäisyä (transmitted light), absorboitumista (absorbed light), sirontaa (scattered light) ja heijastumista (reflected light). Läpäissyt valo on uudelleenohjautumatonta valoa, jonka aallonpituus pysyy muuttumattomana, vaikka se olisi vuorovaikutuksessa aineen kanssa. Absorptiossa valon energiaa siirtyy molekyylille, mikä vaikuttaa molekyylin energiatiloihin. Sironnassa valo puolestaan muuttaa suuntaansa vuorovaikutuksesta aineen kanssa. Sironnassa voi tapahtua myös energian siirtymistä; lisäksi sirottuneen valon aallonpituus voi muuttua. Heijastuminen on samankaltaista kuin sironta, mutta heijastuneen valon aallonpituus on sama kuin tulevan valon. Partikkeleista aiheutuva sironta ja heijastuminen ovat riippu-

vaisia valon aallonpituuden sekä partikkeleiden dimensioiden ja orientaatioiden suhteesta. (Jacques 2003: 146.)

Säteilyn absorptiossa atomi tai molekyyli ottaa vastaan säteilykvantin, joka aiheuttaa elektronin siirtymisen korkeampaan viritystilaan säteilyenergian ollessa tarpeeksi suuri. Säteilykvantin energia riippuu säteilyn taajuudesta, ja energia on sitä suurempi, mitä lyhytaaltoisempaa säteily on. Muodostuva viritystila on yleensä lyhytaikainen ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  s), ja atomi tai molekyyli palaa takaisin perustilaan. Ylimääräinen energia purkautuu useimmiten lämpönä. Lisäksi elektronin palatessa perustilaan korkeammasta viritystilasta molekyyli lähettää säteilyä (Toivonen 2007a: 21). Kuvassa 7 on havainnollistettu sähkömagneettisen säteilyn absorptiovaikutusta.

(Toivonen 2007a: 2 - 5.)



**KUVA 7.** Kuvan energiatasokaaviassa on havainnollistettu molekyylien sähkömagneettisen säteilyn absorptiovaikutusta. Kohta A: rotaatiomuutokset, joita esiintyy esimerkiksi pitkillä aallonpituuksilla kuten kauko-IR- ja mikroaalto-alueilla, joissa säteilyn energia on varsin pientä. Kohta B: rotaatio-värähdysmuutokset, joita esiintyy esimerkiksi NIR-alueella, jolloin säteilyn suurempi energia riittää nostamaan molekyyliä korkeammille värähtelytasolle. Kohta C: rotaatio-värähtely-elektronisiirtymät, joita esiintyy esimerkiksi näkyvän valon ja ultravioletin alueilla. Näillä alueilla säteilyn aallonpituus on pienempi ja energia suurempi, jolloin energia riittää siirtämään molekyylin korkeammalle elektronitasolle. (Christian 2004: 461.)

Aineen aiheuttamaan absorptioon vaikuttavat mitattavan aineen laatu ja konsentraatio, lähetettävän säteen aallonpituus sekä säteen kulkema matka aineessa. Transmittanssi kuvaa aineesta lähtevän ja siihen tulevan säteen tehon (intensiteetin) suhdetta eli kertoo kuinka paljon säteestä kulkeutuu lävitse. Transmittanssi voi saada arvoja välillä 0 - 1. Täysin läpäisevän aineen transmittanssi saa arvon 1. Tällöin kaikki lähetetyt säteet kulkeutuvat aineen lävitse pidättymättä ja absorbanssi saa arvon 0. Vastaavasti transmittanssin saadessa arvon 0 kaikki säteet pidättyvät aineeseen. (Toivonen 2007a: 4 - 5.)

Absorptiomenetelmissä on voimassa Lambert-Beerin -laki (kaava 1), joka antaa arvon absorbanssille. Absorbanssi on yksikötön suure, millä saadaan selville, kuinka paljon lähetettyä valoa absorboituu aineeseen. (Toivonen 2007a: 5.)

$$A = \varepsilon b c \quad (1)$$

missä

A = absorbanssi

$\varepsilon$  = molaarinen absorptiokerroin ( $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), aineominaisuus jonka arvo riippuu aallonpituudesta

b = säteen kulkema matka (cm), esimerkiksi näytekyvetin paksuus

c = konsentraatio ( $\text{mol l}^{-1}$ )

Mikrobiologisissa kokonaissolutiheyden mittauksissa esiintyy usein myös valon sirontaa, ja mittauksesta käytetäänkin usein termiä OD-mittaus (optinen tiheys) absorbanssin sijaan. Mittaus perustuu enemmän valon sirontaan solujen pinnalta kuin varsinaiseen valon absorptioon (Aittomäki 2002: 29). Sironta aiheuttaa muutosta valon liikkeessä vaikuttamatta kuitenkaan voimakkaasti aallonpituuteen. Sirontaa aiheutuu esimerkiksi pienistä partikkeleista kuten soluista ja kaasukuplista, ja sironta kasvaa tavallisesti epälineaarisesti solukonsentraation ja sameuden kasvaessa. (Finesse 2007a: 92.)

#### 4.5.1 Dielektrinen spektroskopia

Dielektrisen spektroskopian menetelmä perustuu ehjän solukalvon yli muodostuvan sähkövarauksen eron mittaamiseen radiotaajuusalueella (RF) muodostetussa sähkökentässä (Känsäkoski 2006: 66). Menetelmällä voidaan mitata esimerkiksi kasvatusliemen johtokykyä ja kapasitanssia. Soluteiheyden osoittavina tekijöinä voidaan käyttää kapasitanssin muutosta tai suhteellista permittiivisyyttä. Suhteellinen permittiivisyys saadaan kapasitanssimittauksen ja mitta-anturista riippuvan fysikaalisen vakion avulla. Koska mitta-anturin antama signaali on tavallisesti heikko, tarvitaan anturin läheisyyteen yleensä esivahvistin. (Kiviharju 2008: 657.)

Kapasitanssia voidaan mitata eri taajuuksilla luomalla dielektrinen spektri solususpensioon. Dielektriseen spektriin vaikuttavat sekä solukonsentraatio että alustakomponentit. Dielektrisestä spektristä voidaan erottaa  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ja  $\delta$  -hajonta-alueet, joista  $\beta$ -hajonta-alueita suositellaan solujen muodon, koon ja tyyppin mittaamiseen. Tavallisesti sopiva mitaustaajuus on välillä 0,5 - 3 MHz. (Kiviharju 2008: 658.)

Muodostettaessa sähkökenttä soluja sisältävään vesiliuokseen positiivisesti varautuneet ionit liikkuvat sähkökentän mukaisesti ja negatiiviset ionit vastakkaiseen suuntaan. Liuoksessa ja solujen sisällä olevat positiiviset ja negatiiviset ionit liikkuvat esteettömästi sähkökentän mukaisesti, kunnes kohtaavat solukalvon, joka toimii eristävänä kerroksena estäen näin ionien liikettä muodostaen näin potentiaalieron. Tämä johtaa varauseron muodostumiseen tai solujen napojen polarisaatioon. Varuseroa kuvaava suure on kapasitanssi, ja solujen muodostama kapasitanssi riippuu muodostetun sähkökentän taajuudesta. Alle 0,1 MHz taajuuksilla solut ovat täysin polarisoituneet, koska varaukselliset ionit ehtivät saavuttaa solukalvon vastakkaiset varaukset ennen sähkökentän muodostumista ajaen näin ollen ulkopuolella olevia ioneja sähkökentän vastakkaiseen suuntaan. Tästä solujen polarisaatiosta aiheutuu suuri kapasitanssi, joka ei välttämättä kuvaa tilannetta oikein. Taajuuden noustessa yli 1 MHz harvemmat ionit ehtivät saavuttaa solukalvon ennen sähkökentän varautumista, jolloin solukalvon välinen polarisaatio on pienempi ja samalla kapasitanssi liuoksessa pienempi. 10 MHz tai suuremmilla taajuuksilla solukalvon polarisaation vaikutus on merkityksetön kokonaiska-

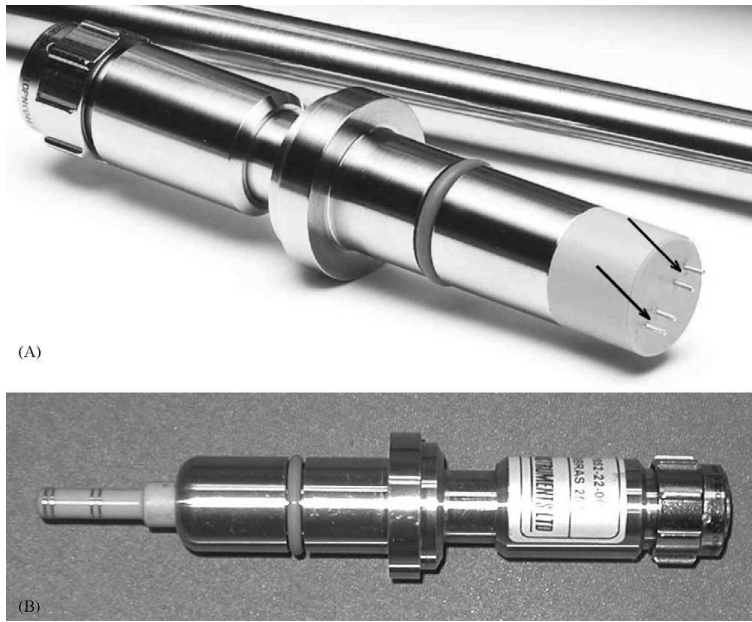
pasitanssiin, ja mahdollisen alustakomponenttien ja prosessiympäristön aiheuttamat vaikutukset voidaan yrittää selvittää. (Carvell 2006: 36- 37; Kiviharju 2007: 562.)

Dielektristä spektroskopiaa hyödyntävien mittalaitteiden on todettu olevan luotettavia esimerkiksi hiivan käymisprosessissa, ja suuri teollinen käyttöalue dielektriselle spektroskopiaalle onkin panimoteollisuus. Kaupallisten elektrodien käytössä on kuitenkin havaittu ongelmia polarisaation kanssa, kun johtokyky on suuri ja biomassapitoisuus alhainen. Tämän ongelman ratkaisuun on kehitetty induktiivinen dielektrinen spektroskopia, missä mitta-anturi sisältää rengasmaiset mittaaselektrodit. Kalibrointi on kuitenkin aina tarpeellinen anturia vaihdettaessa tai anturin geometrian muuttuessa. (Kiviharju 2008: 658 - 659.)

Kapasitanssimittauksia voidaan käyttää elinkykyisten solujen konsentraation määrittämiseen, ainetaseiden laskemiseen ja joissain tapauksissa muuttujana prosessin ohjauksessa. Kapasitanssiin suuresti vaikuttava tekijä on elinkykyisten solujen vahingoittumaton ulkoinen solukalvo, jolla on sähköä eristävä vaikutus. Mitattu kapasitanssi on suhteessa vahingoittumattoman solukalvon omaavien solujen tai elinkykyisen biomassan pitoisuuteen suspensiossa. Kapasitanssimittauksien vertailu tyypillisesti mikrobiologiassa käytettyjen mittausten kuten optisen tiheyden tai kuivapainon kanssa ei ole helppoa, koska edellä mainitut mittaustekniikat mittaavat tyypillisesti kiintoaineen kokonaisuutta eivätkä erottele elinkykyisiä soluja kuolleista. Erilaisten värjäysmenetelmien ja solulaskentamenetelmien avulla voidaan saada vertailukelpoisempia tuloksia kapasitanssimittausten kanssa, mutta nämä menetelmät ovat tavallisesti off-line-tyyppisiä. (Biomass Monitor 2005: 11, 31 - 33; Käsäkoski 2006: 66 - 67.)

Ferreira ym. (2005) mittasivat kapasitanssia on-line-mittauslaitteistolla (Aber Instruments Biomass Monitor 214M) *Streptomyces sp.*-bakteerin fermentoinnissa käyttäen kahta erilaista in-situ-tyyppistä mitta-anturia (kuva 8). Rengasmaisen mitta-anturin mittasignaalin todettiin olevan voimakkaampi ja herkempi verrattuna tappimallisen mitta-anturin signaaliin. Lisäksi tutkimuksessa todettiin kapasitanssimittauksen mahdollistavan on-line-mittauksen biomassan sekä spesifisen kasvunopeuden osalta.





Kuva 8. Kuvassa ylempänä (A) on esitetty tappimaiset mittauselektrodit ja alempana (B) rengasmaiset mittauselektrodit (Ferreira 2005).

#### 4.5.2 Infrapunaspektroskopia

Näkyvän valon ja mikroaaltoalueen väliin jäävän aallonpituuden sähkömagneettista säteilyä kutsutaan infrapunasäteilyksi (IR-säteily). Infrapunasäteily on luonteeltaan lämpösäteilyä, ja sen mittausalueet voidaan jakaa aallonpituuden mukaan kolmeen luokkaan: lähi-IR, keski-IR ja kauko-IR. Aallonpituusalueet on esitetty taulukossa 2. Infrapunaspektroskopian käyttöalueita ovat esimerkiksi orgaanisten yhdisteiden tunnistaminen ja erilaisten yhdisteiden kvantitatiivinen määrittäminen. (Toivonen 2007b: 1.)

Taulukko 2. Näkyvän valon ja IR-alueen aallonpituudet (Toivonen 2007b: 1).

	Aallonpituus ( $\mu\text{m}$ )	Aaltoluku ( $\text{cm}^{-1}$ )
Näkyvä valo	0,38 - 0,78	26300 - 12800
Lähi-IR (NIR)	0,78 - 2,5	12800 - 4000
Keski-IR	2,5 - 25	4000 - 400
Kauko-IR	25 - 1000	400 - 10

IR-spektroskopiassa spektrin tulkinnassa käytetään usein aaltolukua ( $\text{cm}^{-1}$ ), joka on aallonpituuden käänteisarvo. Aaltoluku ilmoittaa aaltojen lukumäärän senttimetriä

kohti. Jokaisella molekyylillä on tunnusomaiset värähtelyt ja siitä johtuva tunnusomainen IR-spektri, jota voidaan käyttää komponentin tunnistamiseen.

IR-spektrin täydellinen tulkinta on usein vaikeaa, mutta tulkintaa helpottavat tietokonepohjaiset spektrikirjastot ja hakuohjelmat. (Toivonen 2007a: 2; Toivonen 2007b: 1 - 6.)

IR-säteilyn energia on sen verran pientä, että se ei riitä siirtämään elektroneja orbitaalilta toiselle eli korkeampaan viritystilaan. IR-säteilyn energia aiheuttaakin muutosta sidosten värähtelyyn sekä molekyylin rotaatioon. Kun molekyylin dipolimomentti ja sidospituudet muuttuvat absorptioon vaikutuksesta, molekyylin värähtelyn amplitudi ja värähdystaajuus muuttuvat. Muutos voidaan nähdä infrapunaspektrissä tietyllä aaltoluvun alueella säteilyenergian absorptiona (Muurinen 2004: 79). Värähtelyn luonne voi olla taivutusta tai epäsymmetristä ja symmetristä venytystä. Värähtelyt voidaan lisäksi jaotella perus- ja ylivärähtelyihin. (Christian 2004: 461; Toivonen 2007b: 3, 21.)

Värähtelyistä symmetrinen venytys ei absorboi IR-säteilyä eikä näin ollen näy IR-spektrissä. Samanytimiset molekyylit, kuten  $O_2$ ,  $N_2$  ja  $H_2$ , eivät näy IR-spektrissä, koska niiden dipolimomentti on nolla. Eriytimisillä kaksiatomisilla molekyyleillä voidaan todeta spektri, koska niillä on sidospituudesta riippuva dipolimomentti. (Toivonen 2007b: 2; Muurinen 2004: 79.)

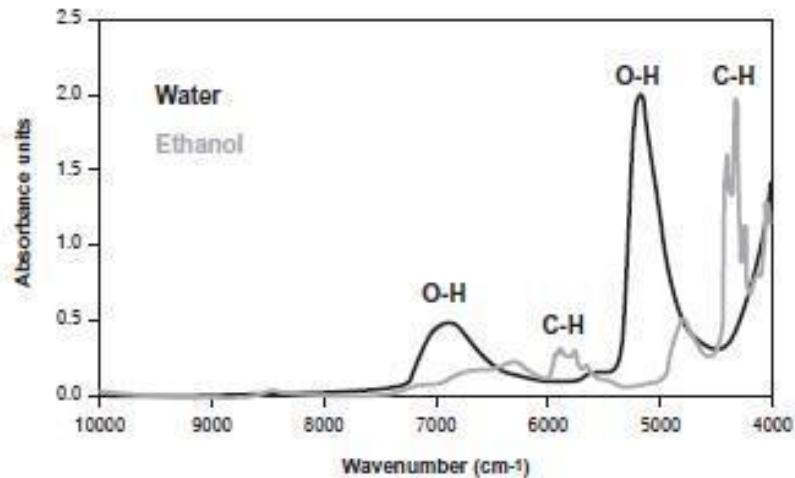
IR-spektroskopiassa näyte voi olla kiinteä, neste tai kaasu. Kiinteiden ja nestemäisten näytteiden osalta näytettä tulisi olla hyvin ohut kerros. Lisäksi IR-säteily ei läpäise lasia tai kvartsia. Bioprosesseissa IR-spektroskopiaa on tavallisesti käytetty at-line- tai on-line-menetelminä kasvatusalustaa kierrättämällä. NIR- ja MIR (keski-IR) -spektroskopiaa voidaan käyttää esimerkiksi glukoosin, glutamaatin, fruktoosin, glutamiinin, proliinin, ammoniakkin ja hiilidioksidin pitoisuuksien mittaamiseen. Näiden mittaamenetelmien kalibrointi voi kuitenkin olla monimutkaista. In-situ-menetelmänä MIR-spektroskopiaa voidaan käyttää solujen aineenvaihduntatuotteiden mittaukseen viskooseissa kasvatuksissa, joissa muiden menetelmien käyttö on rajoittunutta. (Kiviharju 2008: 660; Vojinović 2005: 1086.)

### 4.5.3 NIR-spektroskopia

Lähialueen infrapunaspektrometria-alueen (NIR - near infrared) säteilyn energia on pienempi kuin näkyvän valon alueella, mutta suurempi kuin keski-IR-alueella.

NIR-alueella absorptio aiheuttaa yli- ja kombinaatiovärähtelyitä. Ylivärähtelyt ovat perusvärähtelyiden monikertoja (1, 2 tai 3) ja perusvärähtelyä heikompia. Tästä syystä NIR-alueella ei ole selviä hyvin erottuvia piikkejä. NIR-absorption edellytyksenä on, että värähtelyssä siirtymä tapahtuu yhden tai useamman energiatason ylitse (Arkiomaa 2005: 19). Kombinaatiovärähtelyssä fotonin virittää samalla kertaa kaksi eri värähtelyä, jolloin aallonpituus saadaan komponenttien aaltolukujen summana tai erotuksena. NIR-alueen absorptioita eri ylivärähtelytasoilla ja aaltoluvuilla on esitetty liitteessä 2. (Toivoinen 2007b: 21.)

NIR-spektroskopiaa on viime aikoina käytetty in-situ-menetelmänä kuituoptisten antureiden avulla. Kuituoptiikan hyödyntäminen NIR-spektroskopiassa mahdollistaa suoran mittauksen näytteestä tai prosessivirrasta (Toivoinen 2007b: 22). In-situ-anturit ovat höyrysteriloitavia, mutta mittausten kannalta on raportoitu seuraavanlaisia ongelmia: kuituoptisten antureiden heikkous yli 2100 nm aallonpituuksilla; mittaustason asettaminen prosessin aikana; kaasukuplien ja lämpötilan vaikutus spektriin; anturin likaantuminen; sekoituksen aiheuttamat häiriöt (Känsäkoski 2006: 55). *Escherichia coli*n biomassan seurannassa kuituoptisten antureiden käytössä prosessista aiheutuvien häiriöiden on raportoitu olevan suuria yli 2000 nm aallonpituuksilla, ja sopivaksi aallonpituusalueeksi on havaittu noin 1500 nm (Kiviharju 2008: 660). Lisäksi kuituoptisten antureiden optisen mitta-aukon pituuden on havaittu olevan merkittävä tekijä mittauksen tarkkuudessa. Myös sekoitus ja ilmastus voivat vaikuttaa mittauksen pohjatasoon. NIR-analytiikka mahdollistaa oikeiden kalibrointina nopean, näytettä tuhoamattoman analyysin ilman näytteen erillisiä esikäsittelyjä myös kiinteitä näytteitä analysoitaessa. Tärkeitä mitattavia funktionaalisia ryhmiä ovat esimerkiksi -OH, -CH, -NH ja -SH -ryhmät. Etenkin orgaanisten yhdisteiden eri funktionaaliset ryhmät ovat tunnistettavissa niille tunnusomaisten värähdyslukujen avulla. NIR-menetelmiä voidaan käyttää esimerkiksi veden, alkoholien ja amiinien kvantitatiivisiin määrittäksiin. Esimerkki NIR-spektristä on esitetty kuvassa 9. (Arkiomaa 2005: 19 - 20; Kiviharju 2008: 660.)



Kuva 9. NIR-spektri vedestä ja etanolista (Jacques 2003: 147).

NIR-laitteissa voidaan käyttää myös FT-tekniikkaa (Fourier Transform), jolloin käytetään nimitystä FT-NIR (Fourier Transform Near Infrared). FT-NIR-laitteissa aallonpituusalueen erottamiseen käytetty heijastushila on korvattu liikkuvalla interferometrillä. Interferometrissä säde jaetaan kahteen osaan puoliläpäisevällä peilillä. Jaetuista säteistä toinen heijastuu kiinteästä peilistä ja toinen liikkuvasta peilistä, jolloin säteiden välille muodostuu matkaero riippuen liikkuvan peilin paikasta suhteessa kiinteään peiliin. Jos molemmat peilit ovat samalla etäisyydellä säteiden jakajaan nähden, tapahtuu säteiden vahvistuminen (Christian 2004: 500). Lisäksi säteet kulkeutuvat näytteen lävitse vasta säteiden jakaantumisen jälkeen, jolloin kaikki aallonpituudet kulkevat yhtä aikaa näytteen lävitse. Interferometrillä spektri saadaan mitattua nopeasti ja detektorille tulevan säteen intensiteetti on suuri, koska detektorille tulevaa säteily määrää ei rajoiteta kuten heijastushilassa. Interferometrillä saatua spektriä kutsutaan interferogrammiksi. (Toivonen 2007b: 12, 16, 22).

Lähi-infrapunaspektroskopia mahdollistaa substraattien ja tuotteiden valvonnan monissa teollisissa ja elintarvikkeisiin liittyvissä bioprosesseissa. Sitä voidaan käyttää monien muiden optisten menetelmien tavoin in-situ-, on-line-, at-line- sekä off-line-menetelminä. NIR-spektroskopiaa on käytetty esimerkiksi on-line-menetelmänä kasvatusalustaa kierrättämällä täysin automatisoidun prosessin säätöön maitohapon tuotannossa, jossa NIR-spektrin avulla saatiin tietoa biomassasta, glukoosista ja maitohaposta (Kiviharju 2008: 660). Lisäksi on-line NIR-menetelmiä on kehitetty epänormaalin fermentointipro-

sessin tunnistamiseen fermentoinnin alkuvaiheessa sekä erilaisiin maitohapon tuottoprosesseihin maitohapon, glukoosin ja biomassan mittaamiseen. In-situ NIR-spektroskopiaa on käytetty ennustemallien avulla maitohapon, etikkahapon, pH:n, ammoniakkin ja etanolin määrittämiseen ruoho- ja maissisäilörehusta (Becker 2007: 256). Kuituoptista in-situ NIR-menetelmää on käytetty glutamiinin, ammoniakkin, laktaatin ja glukoosin seurantaan CHO-solujen (kiinanhamsterin munasarjasolu) panossyöttökasvatuksessa (Vojinović 2005: 1087). Lyhytaaltoista NIR-spektroskopiaa (700 - 1100 nm) on puolestaan käytetty esimerkiksi etanolipitoisuuden mittaamiseen fermentointiprosessissa. (Becker 2007: 256; Vojinović 2005: 1086 - 1087.)

NIR-menetelmällä saatu analyttinen signaali on monimutkainen ja riippuvainen näytteen fysikaalis-kemiallisesta koostumuksesta. Tuloksiin ja analysointiin vaikuttavat koostumuksen lisäksi esimerkiksi näytteen hiukkaskoko, kosteus, lämpötila sekä käytetyt liuottimet. Jo näytteen hiukkaskoon vaihtelevuus voi aiheuttaa ei-haluttuja muutoksia NIR-spektriin. NIR-spektrometriassa tulosten tulkinnassa ja analysoinnissa käytetään laajalti hyväksi kemometrisiä eli tilastollisia ja matemaattisia menetelmiä. Spektristä voidaan esimerkiksi poistaa fysikaalisten ominaisuuksien aiheuttama tieto, jolloin saadaan luotettavampi kemiallinen tulos. Tulosten esikäsittely matemaattisin menetelmin ja tarkat kalibroinnit ovat erittäin tärkeitä tulosten luotettavuuden kannalta. (Arkiomaa 2005: 23 - 24.)

## 4.6 Fluoresenssimenetelmät

Fluoresenssimenetelmillä voidaan mitata molekyylin lähettämää säteilyä. Perustilassa oleva molekyyli absorboi ensin säteilyä UV- tai näkyvän valon alueella, jolloin elektroni siirtyy korkeampaan viritystilaan. Elektronin palatessa perustilaan molekyyli emittoi säteilyä, joka on pidempiaaltoista kuin virityssäteily. Menetelmä on kvantitatiivinen monille aineille, sillä emittoituneen säteilyn intensiteetti on usein verrannollinen molekyylin pitoisuuteen näytteessä. Lisäksi menetelmä voi olla hyvin selektiivinen, koska fluoresenssia esiintyy suhteellisen harvoilla aineilla. Fluoresenssi-ilmiön yleisnimitys on luminesenssi, joka voidaan jakaa fluoresenssi- ja fosforisenssi-ilmiöihin. Fluore-

senssi-ilmiössä emissio tapahtuu lähes välittömästi ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  s), kun taas fosforesenssi on luonteeltaan hitaampi ilmiö ( $10^{-4}$  - 10 s). (Toivonen 2007a: 21.)

Fluoresenssiin perustuvilla menetelmillä voidaan mitata esimerkiksi happea, pH:ta ja hiilidioksidia riippuen anturissa käytettävästä materiaalista. Fluoresoivien aineiden kuten NADH:n, NADPH:n, vitamiinien sekä tiettyjen aminohappojen mittaaminen bioprosessissa voi antaa tärkeää tietoa esimerkiksi solujen fysiologisesta tilasta. Biomassaan liittyviä mittauksia fluoresenssimenetelmin voidaan tehdä solun ulkopuolelta in-situ-menetelmänä esimerkiksi seuraamalla NADPH:n aiheuttamaa eksitaatiota ja emissiota tietyillä aallonpituuksilla, jolloin intensiteetin perusteella voidaan arvioida solutiheyttä. Menetelmä toimii vain eläville soluille ja on soveltuva vain jos solujen NADPH-pitoisuus pysyy muuttumattomana. Lisäksi erilaiset alustakomponentit voivat häiritä mittausta jos ne absorboivat tai emittoivat aallonpituuksilla 360 nm tai 450 nm. (Kiviharju 2008: 661; Vojinović 2005: 1087.)

Fluoresenssimenetelmistä, joissa käytetään yhtä aallonpituutta eksitaation ja toista aallonpituutta emission mittaamiseen, käytetään nimitystä 1D-fluoresenssi. 1D-fluoresenssia on käytetty in-situ-menetelmänä biomassan mittaamiseen, mutta menetelmän haittana ovat erilaisten alustakomponentit, jotka saattavat absorboida mittaukseen tarkoitetuilla eksitaatio- tai emissioaallonpituuksilla. Joitakin häiriötekijöitä voidaan kuitenkin poistaa käyttämällä 2D-fluoresenssi spektroskopiaa. 2D-fluorimetrialaitteilla voidaan mitata eri emissio- ja eksitaatioaallonpituuksia samanaikaisesti, mikä mahdollistaa useiden fluoresoivien aineiden mittaamisen samanaikaisesti. Menetelmän haittana reaaliaikaiseen mittaamiseen on se, että nykyisillä laitteilla mittaus kestää noin yhden minuutin. Lisäksi lämpötila, pH ja muut parametrit vaikuttavat fluoresenssispektriin, minkä takia tarvitaan kalibrointeja häiriöiden vähentämiseksi. Kemometriset menetelmät ovat tarpeellisia 2D-fluoresenssi-spektroskopiaa käytettäessä. (Kiviharju 2008: 661; Vojinović 2005: 1087.)

## 4.7 HPLC

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) on yleisesti käytetty analyysimenetelmä, joka muiden kromatografisten menetelmien tavoin mahdollistaa monen eri analyytin samanaikaisen mittaamisen. HPLC-tekniikkaa käytetään laajalti epäorgaanisten ja orgaanisten yhdisteiden erottamiseen, identifioimiseen ja kvantitoimiseen, ja sitä voidaan käyttää myös suurikokoisten orgaanisten molekyylin, kuten proteiinien, aminohappojen, lipidien ja lääkeaineiden kvantitatiiviseen analysoimiseen. Perusedellytyksenä HPLC-tekniikassa on se, että näyte saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen.

Nestekromatografialaitteiston pääkomponentteja ovat injektorin pumppu, kolonni ja detektorin. Näytettä syötetään injektorin kautta pumpun muodostaman korkean paineen alaisena olevaan, kapeissa kapillaareissa liikkuvaan nestefaasiin (eluenttiin). Pumppu pumppaa eluenttia tietyllä virtausnopeudella, ja injektoitaessa eluentti kulkee injektorin läpi kuljettaen näytteen mukanaan kolonniin. Kolonniin sisällä on stationaarifaasi, joka on paikallaan pysyvä, pienikokoisista partikkeleista muodostuva faasi. Yleisimmin nestekromatografisissa menetelmissä käytetty stationaarifaasi muodostuu silikapartikkeleista, joihin on kemiallisesti sidottu sopiva yhdisteryhmä. Näyte jakautuu omiksi vyöhykkeikseen kulkeutuessa eluentin mukana kolonniin läpi ja pidättäytyvät stationaarifaasiin eripituisiksi ajoiksi. Jokainen vyöhyke päätyy näin detektorille omia aikojaan. Detektorin lähettää saamansa signaalit tietokoneelle, ja näin muodostuu piikki kromatogrammiin. Mitä suurempi pinta-ala piikillä on, sitä suurempi on sen pitoisuus. Analyytin retentioaika kuvaa aikaa, joka analyytillä kuluu kolonniin läpi kulkeutumiseen. Se riippuu pääasiassa analyytin rakenteesta, koosta, kolonniin stationaarifaasista sekä käytetystä eluentista. Yleisin nestekromatografiassa käytetty detektorin on UV/VIS-detektorin, joka antaa vasteen yhdisteille, jotka absorboivat valoa uv- tai näkyvän valon aallonpituudella. UV/VIS-detektorin on suhteellisen herkkä eikä lämpötilan tai eluentin koostumuksen vaihtelut juurikaan häiritse detektointia.

UV/VIS-detektoreista diodirividetektori on monipuolisin. Sitä voidaan käyttää kuten tavallista UV-detektoria mittaamaan vain yhdellä aallonpituudella. Lisäksi sillä voidaan suorittaa mittauksia myös usealla aallonpituudella samanaikaisesti, jolloin saadaan useita kromatogrammeja. (Riekkola 2000: 136 - 138, 154 - 156.)

HPLC:n etuja ovat spesifisyys, herkkyys ja nopeat kromatografiset menetelmät. Lisäksi HPLC yhdessä nykyisten spektrofotometrinen tekniikoiden avulla voi mahdollistaa entistä tehokkaamman työkalun on-line-monitorointiin. Vaikka kaupallisia on-line HPLC-laitteistoja on ollut saatavilla pitkään, niiden käyttö reaaliaikaiseen monitorointiin on ollut vähäistä etenkin kemometrinen menetelmien käytön osalta. On-line HPLC:llä saadaan helposti hyvin suuri määrä mittaustietoa, jonka tehokas analysointi on edellytyksenä sille, että tulokset kuvastaisivat prosessin tilaa varsinaisen analyysin aikana. Käsittelemätön kromatografinen mittaustieto ei usein ole sinällään kelvollinen antamaan tarkkoja tuloksia, vaan usein tarvitaan esimerkiksi pohjatason korjaus, mittapiikin toteaminen ja integrointi. Yleensä vasta integroitu mittapiikki on kelvollinen käytettäväksi kemometrisiin menetelmiin. (Zhu 2007: 370 - 371, 377.)

Turner ym. (1993) esittelivät fermentointeihin soveltuvan on-line-menetelmän, mikä sisälsi HPLC-analyysin 20 minuutin analyysiajalla. Menetelmä sisälsi höyrysteriloitavan näytteenottolaitteen, mikrosentrifuugin kiintoaineen erotukseen sekä injektioitilamukaan HPLC:lle. Menetelmää käytettiin onnistuneesti *Escherichia coli* fermentoinnissa glukoosin ja asetaatin monitorointiin. Cheng ym. (2007) käyttivät onnistuneesti immobilisoituun sellulaasibioreaktoriin liitettävää HPLC-laitteistoa, joka sisälsi näytteenoton, näytteen laimentamisen, näytteen injektioita HPLC:lle sekä on-line HPLC-analyysin selluloosan hydrolyysin monitorointia varten. Näytteenotto tapahtui manuaalisesti ja näytteen laimennus joko on-line- tai off-line-menetelmänä. Laitteiston väitettiin lisäksi olevan kokonaisuudessaan muutettavissa täysin on-line-menetelmäksi.



## 5 Yleiset kemialliset, fysikaaliset ja biologiset mittaukset

Bioprosessimittaukset voidaan jakaa yleisesti kemiallisten, fysikaalisten ja biologisten muuttujien mittaamiseen. Kemialliset mittaukset ovat yksi tärkeimmistä osa-alueista biologisten prosessien tiedon keruussa, sillä lähes kaikkia biologisiin tapahtumiin liittyviä ilmiöitä voidaan havainnoida kemiallisten mittausten avulla. Fysikaaliset muuttujat vaikuttavat eniten solujen käyttäytymiseen ja prosessin kannattavuuteen, kun taas mittaamalla biologisia muuttujia saadaan tietoa solujen aineenvaihdunnasta ja kasvusta. (Aittomäki 2002: 212, 217, 229, 240.)

### 5.1 Kemialliset mittaukset

pH:n mittauksella saadaan tietoa liuoksen oksonium- ja hydroksidi-ionikonsentraatioista eli happamuudesta ja emäksisyydestä. Oksonium- ja hydroksidi-ionien konsentraatiot ovat yleensä joko hyvin suuria tai pieniä, ja tästä syystä pH:n ilmoittamisessa käytetään logaritmista asteikkoa. Happamuuden ja emäksisyyden mittaus ja säätö ovat hyvin keskeinen osa bioprosessia. Esimerkiksi fermentointiprosessissa aktiivisesti kasvavan viljelmän pH ei pysy vakiona, sillä monet solut tuottavat happoja aineenvaihdunnan sivutuotteina (Harms 2002: 124). Mikrobin optimaalinen kasvu riippuu suuresti pH:n hallinnasta. Lisäksi pH:n oikealla säädöllä kasvua voidaan myös estää. (Aittomäki 2002: 217; Laitinen 1982: 215; Stanbury 1998: 225.)

Liuenneen hapen mittauksella ei saada suoranaista liuenneen hapen pitoisuutta, mutta mittaus korreloi liuenneen hapen osapaineen kanssa, jolloin olosuhteet tiedettäessä saadaan osapaineen avulla selville liuoksessa olevan hapen konsentraatio. Hapen mittaus on yleistä, koska happi toimii usein rajoittavana substraattina solukasvulle johtuen hapen niukkaliukoisuudesta veteen (Harms 2002: 124). Useimmissa aerobisissa kasvatuksissa on oleellista, että liuenneen hapen määrä ei putoa liian alhaiseksi, koska elävät solut tarvitsevat happea aineenvaihduntareaktioitaan varten. Liuennut happi toimii esimerkiksi aineenvaihdunnassa vapautuneiden elektronien vastaanottajana. (Aittomäki 2002: 151, 221; Stanbury 1998: 222 - 223.)

Liuenneen hiilidioksidin mittaus muistuttaa suuresti pH:n mittausta. Liuenneen hiilidioksidin mitta-anturi voi esimerkiksi päästää hiilidioksidin läpi, jolloin pH:n tai jännitteen muutosta voidaan mitata kaasun kulkeutuessa anturissa olevaan bikarbonaattiliuokseen. Hiilidioksidilla on tärkeä merkitys, koska se on soluhengityksen tuote ja kykenee läpäisemään solukalvon vaikuttaen solunsisäiseen pH-arvoon (Harms 2002: 125). Hiilidioksidi on tärkeä tekijä etenkin eläinsolujen kasvatuksissa, koska eläinsolut tarvitsevat hiilidioksidia lisäravinteenaan (Harms 2002: 125; Vojinović 2005: 1085). Liian korkea hiilidioksidipitoisuus hidastaa kasvua ja vaikuttaa tuotteiden muodostukseen. (Aittomäki 2002: 224 - 225; Stanbury 1998: 226 - 227.)

Redox-mittaus on hapetus-pelkistysmittaus, jota käytetään pääasiassa anaerobisissa kasvatuksissa liuenneen hapen sijaan, kun tarvitaan tietoa esimerkiksi elektronin vastaanottajan aktiivisuudesta tai todella alhaisia happipitoisuuksia määritettäessä. Redox-mittauksella saadaan tietoa systeemin kyvystä luovuttaa tai vastaanottaa elektroneja, ja sitä voidaan käyttää jos halutaan varmistaa, että happea ei ole. (Aittomäki 2002: 227)

Tulo- ja poistokaasujen mittaamisella voidaan saada tietoa esimerkiksi solujen aineenvaihdunnasta. Mitattavia kaasukomponentteja ovat esimerkiksi happi ja hiilidioksidi. Lisäksi kasvatusliuoksesta voidaan mitata haihtuvia komponentteja ja arvioida niiden konsentraatioita. (Aittomäki 2002: 227)

## **5.2 Fysikaaliset mittaukset**

Lämpötilan säätö ja kontrollointi ovat bioprosessin kannalta yksi tärkeimmistä mitattavista parametreista. Lämpötilalla on tärkeä merkitys esimerkiksi kemiallisen reaktion nopeuteen, entsyymiaktiivisuuteen sekä solujen aineenvaihduntaan ja prosessin tuottavuuteen. (Aittomäki 2002: 230.)

Paineen mittaus bioreaktorista on tärkeää arvioitaessa reaktorin ilmatilassa olevien kaasujen ja kaasuuntuneiden haihtuvien komponenttien osapaineita. Bioreaktorin sterilointivaiheessa paineen mittaus on oleellista tarvittavan ylipaineen saavuttamisen todenta-

miseksi. Lisäksi aseptisuuden varmistamiseksi reaktorissa tulisi pitää ylipainetta. (Aittomäki 2002: 232.)

Sekoituksen avulla voidaan tehostaa bioreaktorin hapensiirtoa hajottamalla ilmakuplat pienemmiksi. Hapensiirrolla on merkittävä vaikutus aerobisissa mikrobikasvatuksissa, joissa aerobiset solut kuluttavat kasvatusliuokseen liuenneen hapen nopeasti. Tällöin liian heikko hapensiirtokyky rajoittaa solujen aineenvaihduntaa. Lisäksi oikealla sekoitusnopeudella voidaan estää tai vähentää mahdollisia konsentraatio- ja lämpötilagradienttien muodostumisia. Teollisissa prosesseissa sekoituksen tehon tarpeella voidaan vaikuttaa esimerkiksi prosessin kustannuksiin. (Aittomäki 2002: 234.)

Pinnankorkeuden avulla saadaan tietoa reaktorin täyttöasteesta, nestetilavuudesta tai mahdollisen vaahtopinnan tasosta. Vaahtoamista esiintyy etenkin voimakkaasti ilmastetuissa prosesseissa, jolloin pinnankorkeutta mittaamalla voidaan säädellä pinta-aktiivisuutta vähentävän vaahtonestoaineen syöttöä reaktoriin.

(Aittomäki 2002: 235 - 236.)

### **5.3 Biologiset mittaukset**

Bioprosessien biologisten mittausten kannalta biomassa on erittäin tärkeä prosessia kuvaava indikaattori. Biomassa kasvatetaan usein tietylle tasolle ennen halutun tuotteen muodostuksen indusointia tai solujen keräämistä. Solujen tilaa voidaan määrittää esimerkiksi seuraamalla ATP:n (adenosiinitrifostaatti) pitoisuuksia kasvualustasta tai solususpensiosta. Lisäksi aineenvaihdunnan ja kasvun mittaamiseen voidaan käyttää erilaisia fluoresenssimenetelmiä. Biomassan seurantaan on olemassa esimerkiksi seuraavia off-line-mittausmenetelmiä: solujen kuivapainon määrittäminen, sameuden mittaus spektrofotometrillä (OD), elävien solujen määrittäminen maljoilla, solujen laskeminen solulaskukammioissa. Biomassaa voidaan myös mitata in-situ on-line-ratkaisuin esimerkiksi sähköisin ja optisin menetelmin. Sähköiset menetelmät liittyvät usein kapasitanssiin tai permittiivisyyteen ja optiset menetelmät mittaavat pääasiassa valon sirontaa, absorptiota tai molempia. Fluoresenssimenetelmiä on myös käytetty biomassan määrittämiseen in-situ- ja ex-situ-sovelluksina, mutta in-situ-menetelmissä sekoitus, ilmastus, pH ja visko-

siteetti voivat aiheuttaa häiriöitä (Kiviharju 2007: 562). Lisäksi biomassaa voidaan arvioida erilaisten kasvukinetiikkaan perustuvien matemaattisten mallien, kemometrinen menetelmien, neuroverkkojen tai näiden yhdistelmien avulla (software sensors). Näissä sovelluksissa käytettävät muuttujat voivat perustua esimerkiksi poistokaasumittauksiin, emäskulutukseen tai muihin reaaliaikaisesti mitattaviin arvoihin. Erilaisia biomassan mittaamiselle soveltuvia tekniikoita on esitelty taulukossa 3. (Aittomäki 2002: 29, 241; Harms 2002: 124 - 125; Kiviharju 2008: 661 - 662.)

*Taulukko 3. Biomassan mittaamiseen soveltuvia tekniikoita (Kiviharju 2008).*

Method	Interference				Application		
	Solids	Gas bubbles	Conductivity	Medium composition	Single cell suspension	Filamentous	Immobilized
Optical density	+	t <sup>a</sup>	—	t	+	t	—
Dielectric spectroscopy	—	— <sup>b</sup>	— <sup>a</sup>	t	t	+	+
Infrared spectroscopy	+	+ <sup>c</sup>	—	t	+	t	—
Fluorescence spectroscopy	t	t	—	t	+	+	+
Software sensors	—	—	—	—	+	+	+

+ Significant interference or applicability possible, — no significant interference or not applicable, *t* testing required for every case specifically

<sup>a</sup> Depends on the probe type used

<sup>b</sup> No interference of gas bubbles when dual frequency measurement is used

<sup>c</sup> With fiber optic probes path length affects the amount of interference

Kokonaissolutiheyttä voidaan mitata spektrofotometrillä aallonpituudella 600 nm (OD600). Optisin menetelmin biomassaa voidaan mitata on-line-menetelmänä esimerkiksi valokuitujohdeanturin avulla. Optista tiheyttä mittaavat anturit ovatkin yleisesti käytettyjä in-situ-laitteita reaaliaikaiseen biomassan määrittämiseen. IR-spektroskopiaan perustuvissa at-line-menetelmissä parhain korrelaatio biomassalle on saatu aallonpituudella 2300 nm (Kiviharju 2008: 660). Suositeltavan mittausaallonpituusalueen määrittää mitattavan kohteen koko, ja alle 3 µm kokoisille voidaan käyttää näkyvän valon aallonpituutta. Suuremmille kohteille sopii paremmin lähi-IR-alue, jolloin useimpien kasvatustalustojen antama absorbanssi on pieni. Optista tiheyttä mittaavien menetelmien mitausvasteeseen vaikuttavat erilaiset morfologiset tekijät ja solutyypit. Lisäksi käytettäessä in-situ-antureita sekoitus ja ilmastus vaikuttavat bioreaktorissa muodostuvien ilmakuplien kokoon ja määrään, jotka voivat aiheuttaa merkittävää virhettä biomassan määrittämisessä. (Aittomäki 2002: 241; Kiviharju 2008: 659; Vojinović 2005: 1086.)

Koska optisilla antureilla ei saada selville solujen elinkykyä, voidaan kapasitanssimittauksia käyttää biomassan ja elinkyvyn mittaamiseen esimerkiksi in-situ- on-line-menetelmällä. Ehjä solukalvo toimii sähköä varaavana kondensaattorina ja kasvatusalustan kokonaiskapasitanssi kuvaa elävien solujen konsentraatiota. Kapasitanssiarvon kasvu aiheutuu tavallisesti solumäärän tai elinkykyisen biomassan konsentraation kasvusta sekä solujen keskimääräisen tilavuuden kasvusta. Kapasitanssin lasku aiheutuu tavallisesti solupitoisuuden alenemisesta solukuolemien johdosta tai solukoon pientymisen sekä kasvatusalustan laimentumisen vaikutuksesta. Lisäksi sekoituksen puutteellisuus saattaa aiheuttaa solujen laskeutumista kapasitanssia mittaavan anturin elektrodien mitauskentän ulkopuolelle. (Biomass Monitor 2005: 33; Vojinović 2005: 1088.)

Xiong ym. (2008) käyttivät korkean solupitoisuuden omaavassa *Saccharomyces cerevisiae* glutationin (GSH) panosyöttöfermentoinnissa kapasitanssimittaukseen perustuvaa in-situ-anturilla varustettua on-line mittauslaitteistoa (Aber Instruments Biomass Monitor 220) solujen elinkyvyn selvittämiseksi. Kapasitanssimittaukset tehtiin taajuusalueella 0,1 - 10 MHz ja saatuja tuloksia vertailtiin useisiin biomassan off-line-mittausmenetelmiin. Kapasitanssimittauksen todettiin olevan toimiva on-line-mittausmenetelmä biomassan arvioitiin. Tutkimuksessa selvitettiin myös kapasitanssimittauksen soveltuvuutta solujen spesifisen kasvunopeuden ( $\mu$ ) määrittämiseen at-line-menetelmänä. Spesifisen kasvunopeuden säätelyn on todettu olevan tärkeässä roolissa glutationin tuotossa (Xiong 2008).

Kiviharju ym. (2007) mittasivat alhaisen solupitoisuuden omaavissa kasvatuksissa useiden eri mikro-organismien biomassaa kahdella erilaisella in-situ on-line-menetelmän mahdollistavalla mittalaitteella. Mittalaitteet olivat lähi-IR-alueen valon absorption mittaukseen perustuva TruCell-solutiheysanturi (Finesse Instruments) sekä dielektriseen spektroskopiaan perustuva AberProbe-anturi kytkettynä Biomass Monitor 220 (Aber Instruments) -mittalaitteeseen. AberProbe-anturi sisälsi neljä rengasmaista elektrodia. Antureiden toimintaa tutkittiin solukasvatuksien kemiallisia olosuhteita muuttamalla ja fysikaalisia häiriöitä selvittämällä. Kemialliset muutokset perustuivat pH:n säädöllä aiheutettuihin johtokyvyn muutoksiin ja fysikaaliset häiriöt aiheutettiin sekoituksella ja korkealla ilmastuksella. Lisäksi on-line-mittauksia vertailtiin off-line-menetelmänä

määritettyihin solujen kuivapainoihin sekä optisen tiheyden mittauksiin aallonpituudella 600 nm. Tutkimuksessa TruCell-solustiheysanturin todettiin olevan luotettavampi ja helpommin soveltuva erilaisten organismien mittaukseen kuin dielektrisen spektroskopiaan perustuva anturi. Lähi-IR-alueella tapahtuva mittaus ei tosin ole soveltuva, jos kasvatusalusta ei ole kirkas ja etenkin jos prosessissa käytetään kiinteää alustaa mikro-organismien kasvualustana tai adsorbentteja. Dielektriseen spektroskopiaan perustuvan mittauksen todettiin olevan monimutkainen mutta lupaava menetelmä prosessin seuraamiselle, ja sillä voidaan saada tietoa ympäristön tai aineenvaihdunnan häiriöistä. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että molemmat anturityypit näyttivät menettävän mittaustarkkuutta ja suorituskykyä autoklaavikäsittelyjen yhteydessä.

### 5.3.1 Adenosiinitrifostaatti

Solut käyttävät ATP:n (adenosiinitrifosfaatti) hydrolyysissä vapautuvaa energiaa useisiin synteettisiin reaktioihin ja energiaa tarvitseviin prosesseihin. Solunsisäinen ATP-pitoisuus indikoi solun elinkykyä sekä energiavarausta, ja ATP:n pitoisuus vaihtelee riippuen solun fysiologisesta tilasta tai kasvuvaiheesta. ATP:n lisäksi myös solun ADP:n (adenosiinidifosfaatti) ja AMP:n (adenosiinimonofostaatti) pitoisuudet ovat tärkeitä. Solun yhteisistä ATP:n, ADP:n ja AMP:n pitoisuuksista voidaan käyttää nimitystä EC (adenylate energy charge), jota voidaan käyttää mittasuurena solun valmiudesta ylläpitää kasvuun ja elinkykyyn tarvittavia anabolia- ja ylläpitoreaktioita. EC voi saada arvoja välillä 0 - 1. EC-mittauksia voidaan käyttää fermentointiprosessin seurantaan, mutta menetelmän yleistymistä rajoittaa sen vaativuus ja mittaukseen tarvittava aika, koska myös ADP- ja AMP- pitoisuudet tulee mitata. (Guimarães 2008: 47 - 48; Sato 2000: 294)

Pelkkää ATP -pitoisuutta voidaan kuitenkin määrittää helposti käyttäen hyväksi tulikärpäsen bioluminesenssiä. Reaktiossa lusiferaasientsyymit katalysoivat hapen, ATP:n, lusiferiinin ja  $Mg^{2+}$  -ionien läsnä ollessa valoa muodostavan reaktion, jossa noin yksi fotoni emittoituu yhtä kulutettua ATP-molekyyliä kohden. Reaktiossa emittoituvien fotonien lukumäärää voidaan mitata luminometrillä. (Heggart 2000: 414; Ullmann's Encyclopedia 2003: 74 - 75)

Alfenore ym. (2003) käyttivät ATP:n bioluminesenssimittauksia selvittäessään eri *Saccharomyces cerevisiae* -hiivakantojen herkkyyttä niin sanottuja tappajatoksiineja erittäviin *Saccharomyces cerevisiae* -hiivakantoihin. Etenkin toksiinille herkät hiivakannat vahingoittuvat ja kuolevat toksiinin läsnä ollessa, jolloin esimerkiksi solunsisäinen ATP kulkeutuu kasvuliuokseen. Toksiineilla on merkittävä vaikutus eri hiivapopulaatioiden tasapainoon esimerkiksi viininvalmistuksessa. Tutkimuksessa todettiin vahingoittuneiden ja kuolleiden solujen määrän sekä ATP-pitoisuuksien kasvavan toksiinin vaikutuksesta etenkin toksiinille herkällä hiivakannoilla. Lisäksi ATP-mittausten perusteella yhden toksiineille herkäksi oletetun hiivakannan todettiin kestävän eri toksiineja. Sato ym. (2000) mittasivat *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan solunsisäisiä ATP-pitoisuuksia onnistuneesti on-line-menetelmänä riisiviinin (sake) mäsäyksessä ja havaitsivat esimerkiksi lämpötilan nostolla olevan ATP-pitoisuutta lisäävä vaikutus.

### 5.3.2 Adenylaattikinaasi

Adenylaattikinaasi (AK) katalysoi solun sisällä kahden ADP-molekyylin konversiota yhdeksi ATP-molekyyliksi ja yhdeksi AMP-molekyyliksi tai vastaavasti toisin päin. Ensimmäinen tehtävä reaktiolla on palauttaa solun AMP:tä ATP:ksi. Hiivasolujen ei ole raportoitu erittävän adenylaattikinaasia solun ulkopuolelle, jolloin sitä vapautuu vain vahingoittuneen solukalvon omaavista soluista. Näin ollen solunulkoista AK-pitoisuutta voitaisiin käyttää hiivasolujen hajoamisen indikaattorina. (Cameron-Clarke 2003: 152)

Cameron-Clarke ym. (2003) suorittivat olutfermentointeja ja mittasivat hiivasuspensioiden supernatanteista AK-aktiivisuuksia. Adenylaattikinaasin aktiivisuutta käytettiin hiivasolujen hajoamisen indikaattorina. Tutkimuksessa selvitettiin alustakomponenttien, hiivakannan, kantavierre-pitoisuuden, osmoottisen stressin ja etanolin vaikutuksia adenylaattikinaasin vapautumiseen. Tutkimuksessa todettiin, että suurempi osmoottisen stressi ei vaikuttanut adenylaattikinaasin vapautumiseen, mutta etanolin lisäys kasvun aikana nosti adenylaattikinaasin pitoisuutta.

## TUTKIMUSOSA

### 6 Näytteenottolaite

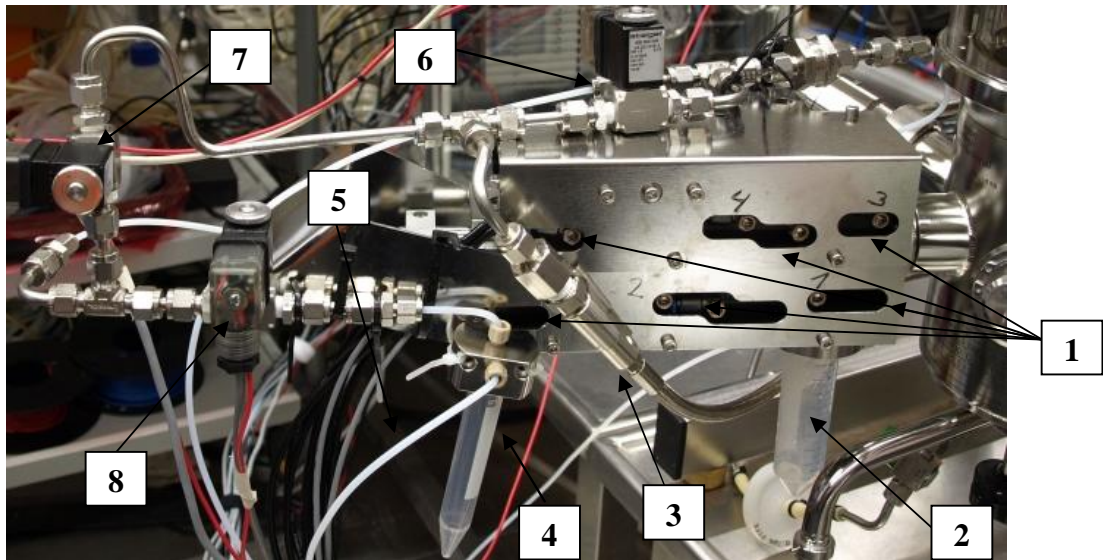
Näytteenottolaite koostuu kahdesta peräkkäin olevasta männästä sylinterin sisällä, joita ohjataan erillisillä pneumaattisilla sylintereillä. Otettaessa näytettä reaktorista, ulompi mäntä työnnetään reaktorin sisään ja näyte kuljetetaan mäntien välissä sylinterin sisään reaktorin seinämän ulkopuolelle. Näyte sylinterin sisässä voidaan tiputtaa suoraan koeputkeen käyttäen apuna kaasuvirtausta, tai näyte voidaan suodattaa. Näytteen suodattamiseksi männän varsi on sisältä ontto, ja uloimman männän etuosaan voidaan kiinnittää suodatin. Näytteen suodatuksessa sisempi mäntä puristetaan ulkomännässä olevaa suodatinta vasten, jolloin nestemäinen näyte saadaan erotettua onttoon putkeen männän varren sisään ja sieltä edelleen toiseen koeputkeen. Suodatusta voidaan tehostaa ime-mällä vakuumi onttoon putkeen. Näytteenottolaitteiston linjastot voidaan puhdistaa ja steriloidaan höyryllä. Lisäksi suodatin voidaan huuhtoa suodatuksen jälkeen vastakkaiseen suuntaan höyryllä mahdollisten tukkeutumien poistamiseksi.

Työssä testattiin piioksidista valmistettujen monikerrossuodattimien ja keraamisten suodattimien kelpoisuutta kiintoaineiden erotukseen. Monikerrossuodattimien nimellishuokoskoko oli  $0,3\ \mu\text{m}$  ja keraamisten suodattimien huokoskoko vaihteli  $0,2\ \mu\text{m}$  ja  $1,4\ \mu\text{m}$  välillä. Monikerrossuodattimia testattiin kahdessa erässä, joista jälkimmäinen erä sisälsi suodattimeen toteutettuja rakenteellisia muutoksia ensimmäisen erän testiha-vaintojen perusteella. Lisäksi keskityttiin parantamaan näytteenottolaitteen yleistä toimintavarmuutta. Toimintavarmuuden parannus sisälsi esimerkiksi laitteiston tiiviiden ja mäntien liikkuvuuden tehostamista erikokoisia O-renkaita testaamalla. Höyrytystä parannettiin muokkaamalla höyrylinjoja ja vaihtamalla venttiilejä. Lisäksi männän päässä olevaan kappaleeseen tehtiin muutoksia suodatuksen parantamiseksi tehostamiseksi. Näytteenottolaite on esitelty kuvissa 15 ja 16.

Näytteenottolaitteiston sylintereiden ja venttiilien toimintaa ohjattiin LabVIEW-ohjelmalla (National Instruments, USA) tehdyn sovelluksen avulla. Työssä paranneltiin jo

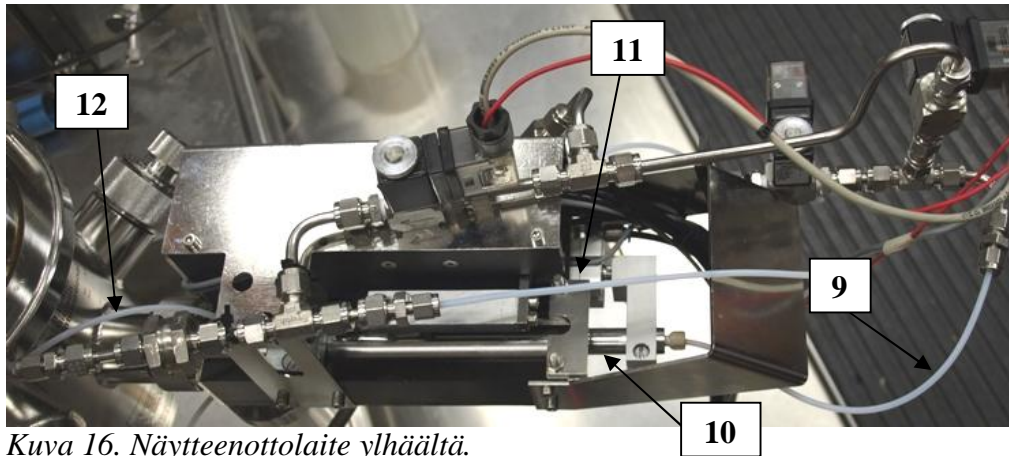


olemassa olevaa näytteenottosekvenssiä, jotta näytteenottosekvenssi olisi käyttäjäystävällisempi sekä toistettavissa varmatoimisesti ja turvallisesti. Kuva näytteenottosekvenssistä on esitetty liitteessä 1.



Kuva 15. Näytteenottolaitteen sivuprofiili.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1. Mäntien paineensäätöruuvit | 5. Paineilma / vakuumi   |
| 2. Koeputki kiintoaineelle    | 6. Venttiili höyryn ohjaamiselle   |
| 3. Höyrylinja                 | 7. Venttiili höyryn ohjaamiselle   |
| 4. Koeputki permeaatille      | 8. Venttiili höyryn, paineilman, vakuumin ja permeaattipuolen ohjaamiselle |



Kuva 16. Näytteenottolaite ylhäältä.

9. Permeaattilinja

10. Mäntä

11. Paineilma

12. Linja paineilmalle ja höyrylle näytteenottosylinteriin

## 7 Laitteet, materiaalit ja menetelmät

### 7.1 TruCell2-solutiheysanturi

TruCell2-solutiheysanturi (Finesse, USA) on optinen anturi, jota voidaan käyttää in-situ on-line-menetelmänä fermentointiprosesseissa solutiheyden mittaamiseen. Anturi mittaa 5 mm pituisen mitta-aukon lävitse lähetetyn 850 nm aallonpituudella olevan lähi-infrapunavalon absorptiota. Laitteistoon sisältyy mitta-anturin lisäksi lähetinyksikkö sekä johdinkaapeli anturin ja lähetinyksikön välille. Lähetinyksikölle voidaan antaa erilaisia asetuksia signaalin käsittelyä varten, ja yksiköstä saadaan analoginen 4-20 mA ulostulosignaali. (Finesse. 2007a: 13 - 20)

TruCell2-anturi soveltuu käytettäväksi prosesseissa, joiden käyttölämpötila vaihtelee välillä 15 - 45 °C. Anturille voidaan suorittaa in-situ-sterilointi. Valmistajan mukaan anturille voidaan suorittaa 40 minuutin sterilointi 134 °C:ssa vähintään 50 kertaa ja 30 minuutin sterilointi 121 °C:ssa 100 kertaa. Johdinkaapeli ja lähetinyksikkö eivät kestä sterilointia. (Finesse 2007a: 14; Finesse 2007b: 1)



Kuva 10. TruCell2-solutiheysanturi mittalaitteineen (Finesse 2007a).

### 7.1.1 Mittausten taltiointi LabVIEW-ohjelmalla

TruCell2-anturin mittaukset taltiointiin Excel-taulukkoon LabVIEW-ohjelmalla (National Instruments, USA) tehdyn sovelluksen avulla käyttäen NI USB 6009 -moduulia (National Instruments, USA). NI USB 6009 -moduuliin voidaan liittää 8 analogista sisääntuloa jännitteen mittausta varten sekä 2 analogista jännitteen ulostuloa esimerkiksi laitteiden ohjaamista varten. TruCell2-lähetinyksikön lähettämä virtasignaali (mA) jouduttiin muuttamaan jännitteeksi, jotta mittaukset oli mahdollista taltioida kyseistä moduulia käyttäen. Virtasignaali muutettiin jännitteeksi asettamalla  $220 \Omega$  vastus NI USB 6009 -moduuliin TruCell2-lähetinyksiköstä liitettyjen kaapelien sisääntulojen välille. Esimerkki sovelluksen toiminnasta on esitetty liitteessä 6.

## 7.2 Biomass Monitor Model 220

Biomass Monitor 220 -laitteella (Aber Instruments, UK) voidaan mitata on-line-menetelmänä kiintoainepitoisuudeltaan 0 - 90 % ja  $1 \times 10^5$  -  $999 \times 10^9$  solua/ml olevien liuosten kapasitanssia sekä johtokykyä. Mittauksessa käytettävä steriloitava in-situ anturi luo kasvatusliuokseen alhaisen voimakkuuden ja korkean taajuuden omaavan sähkökentän eri radiotaajuuksilla. Mittaus voidaan suorittaa radiotaajuuksilla 0,1 Mhz - 20 Mhz. Kapasitanssin mittausalue normaalilla mitta-anturilla on 0 - 400 pF/cm ja johtokyvyn 0 - 40 mS/cm. Täsmällinen kapasitanssin mittaus voidaan saavuttaa kun johtokyky ei ylitä 40 mS/cm. Laitteen mittaustarkkuus kapasitanssin osalta on 0,1 pF/cm ja

johtokyvyn osalta 0,1 mS/cm. Laitteeseen voidaan kytkeä myös useampia mitta-antureita. Laite on esitelty kuvassa 11. (Biomass monitor 2005: 29 - 30)



Kuva 11. Biomass Monitor 220 ja mitta-anturit (Carvell 2006).

### 7.2.1 Biomass Monitor Model 220 -mittausten taltiointi

Biomass monitor 220 -laite kytkettiin tietokoneeseen sarjaportin kautta, jotta kapasitanssin ja johtokyvyn mittausravot saatiin taltioitua reaaliaikaisesti tietokoneelle mittausten myöhempää käsittelyä varten. Tietokoneen ja Biomass monitor 220 -laitteen välille muodostettiin yhteys HyperTerminal -ohjelmalla, jonka avulla taltioitiin mitta-arvot tekstitiedostoon. Mittausväli oli 10 sekuntia, ja yhden mittauksen aikana laite rekisteröi in-situ-anturin kasvatusliuoksesta mittaaman kapasitanssin ja johtokyvyn seuraavilla taajuuksilla: 100 KHz, 193 KHz, 240 KHz, 299 KHz, 373 KHz, 465 KHz, 579 KHz, 722 KHz, 899 KHz, 1120 KHz, 1396 KHz, 1739 KHz, 2166 KHz, 2698 KHz, 3362 KHz, 4188 KHz, 5217 KHz, 6466 KHz, 8095 KHz, 10085 KHz, 12563 KHz, 15649 KHz ja 19494 KHz. Mittauksen jälkeen tekstitiedosto konvertoitiin Excel-taulukkoon mittaustulosten käsittelyä varten. Tulosten käsittelyssä esitettäväksi otettiin mittapiste aina 30 minuutin välein siten, että mittapisteksi laskettiin edeltävän minuutin aikana mitattujen pisteiden (6 mittapistettä) keskiarvot. Tällä menettelyllä oli tarkoitus pienentää mittauskohinan aiheuttamaan virhettä, jolloin mahdollisen yksittäisen mittausravon aiheuttama virhe jäisi pienemmäksi.

### 7.3 Matrix-F FT-NIR -spektrometri

Matrix-F FT-NIR -spektrometrillä (Bruker Optics, Saksa) voidaan mitata kiinteitä ja nestemäisiä näytteitä on-line-menetelmänä mittalaitteeseen liitettävän kuituoptysen in-situ steriloitavan anturin avulla. Laitteeseen voidaan liittää enimmillään 6 mitta-anturia. Laitteella voidaan mitata NIR-spektri aaltoluvuilla 12 800 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Mittausnopeudeksi ilmoitetaan 5 mittausta sekunnissa 8  $\text{cm}^{-1}$  tarkkuudella. Laite on esitelty kuvassa 12. Mittausten taltiointi suoritettiin laitteeseen liitetyllä tietokoneella käyttäen OPUS 6.0 -ohjelmistoa. (Matrix-F 2009)



Kuva 12. Matrix-F FT-NIR (Matrix-F 2009).

### 7.4 ATP:n ja AK:n määrittäminen

ATP- ja AK -pitoisuudet määritettiin Bio-Orbit 1253 luminometrillä (Bio Orbit Oy, Suomi) käyttäen kaupallista ATP-testiä (Molecular Probes, USA) ja adenyalaattikinaasille ToxiLight BioAssay -testiä (Lonza, USA). Mittauksissa käytettiin akryylistä valmistettuja mittakypettejä (Clinicon Acrylic Cuvette 2174-089, Ruotsi).

ATP:n mittauksissa näytteiden ja reaktioliuoksen lämpötilojen annettiin tasoittua huoneenlämpöiseksi ennen mittauksia. Mittakypettiin pipetointiin 200  $\mu\text{l}$  ATP-testin reaktioliuosta ja mitattiin reaktioliuoksen tausta. Tämän jälkeen lisättiin 10  $\mu\text{l}$  näytettä ja suoritettiin mittaus mahdollisimman nopeasti näytteen lisäyksen jälkeen. Lisäksi otettiin toinen mittalukema 10 sekuntia näytteen lisäyksen jälkeen tuloksen varmistamiseksi.

AK:n mittauksessa mittakyvettiin pipetoitiin 200 µl testin reaktioliuosta ja mitattiin reaktioliuoksen tausta. Tämän jälkeen lisättiin 10 µl näytettä ja suoritettiin ensimmäinen mittausta heti näytteen lisäyksen jälkeen ja toinen mittausta 5 minuutin reaktioajan jälkeen. Myös AK:n mittauksissa näytteiden ja reaktioliuoksen lämpötilojen annettiin tasoittua huoneenlämpöiseksi ennen mittauksia.

## 7.5 Hiivan kuivapainojen määrittäminen

Suodatinvälineet:

- Suodatinpaperi: Durapore membrane filters, 0,45 µm HV, Millipore
- Imupullo ja vesi-imu

Esipunnittu suodatinpaperin läpi suodatettiin 5 ml tislattua vettä, jotta paperi saatiin märäksi. Tämän jälkeen suodatettiin 20 ml näytettä, ja näytteen jälkeen 20 ml tislattua vettä suodatinpaperin ja kiintoaineen huuhtelemiseksi. Suodatuksen jälkeen suodatinpaperin massoineen annettiin kuivua lämpökaapissa (105 °C) vähintään 16 tuntia. Tämän jälkeen suodatinpaperin annettiin jäähtyä 30 minuuttia eksikkaattorissa ja punnittiin paperi massoineen.

## 7.6 Optinen tiheys

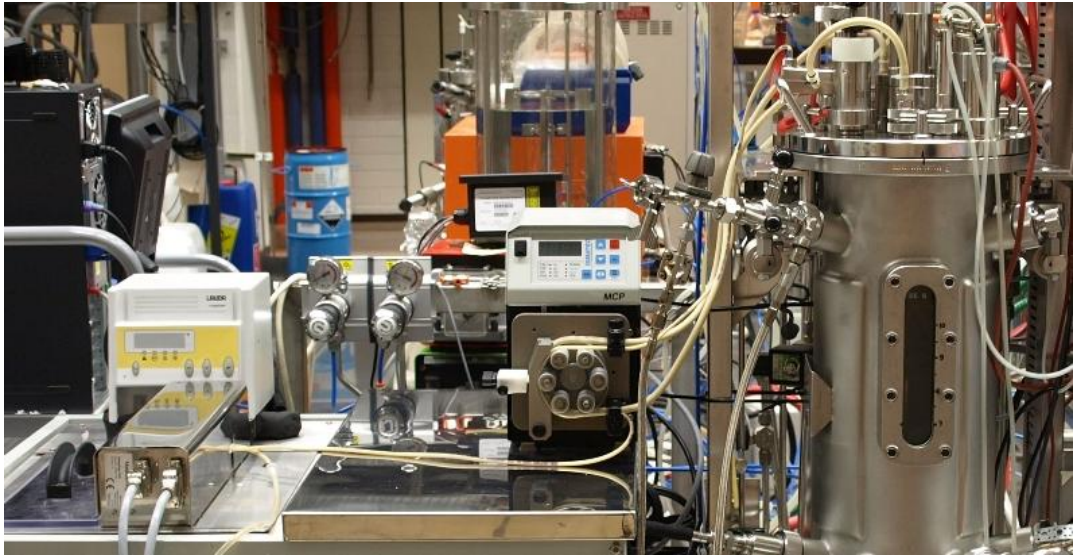
Näytteen solutiheyttä kuvaava optinen tiheys mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu UV-1201, USA) aallonpituudella 600 nm (OD600). Näytettä pipetoitiin mittakyvettiin ja mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä. Näytettä laimennettiin tarvittaessa vedellä. Laimennuksen katsottiin olevan sopiva, kun mitattu absorbanssi oli välillä 0,25 - 0,45. Tuloksena käytettiin kahden rinnakkaisen mittauksen keskiarvoa.

## 7.7 Puhtausnäytteet

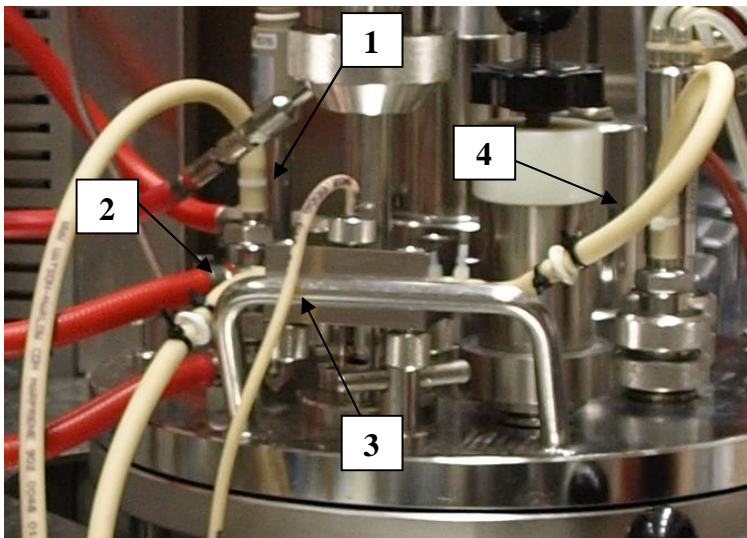
Näytettä pipetoitiin suhteessa 1:10 steriiliä fysiologista suolaliuosta sisältävään koeputkeen ja tehtiin laimennossarja, kunnes saavutettiin laimennospitoisuus  $10^{-5}$ . Jokaista laimennosta pipetoitiin 0,1 ml plate count- ja potato dextrose -agarmaljoille ja levitettiin. Maljoja inkuboitiin 30 °C:ssa vähintään kolme vuorokautta. Tarkistettiin silmämääräisesti pesäkkeet mahdollisten kontaminaatioiden todentamiseksi.

## 7.8 Automaattinen näytteenotto cross-flow-suodatuksella

Automaattinen näytteenotto cross-flow-suodatuksella asennettiin 10 litran Biostat C-DCU fermenttoriin (B. Braun Biotech International, Saksa). Laitteisto on esitelty kuvassa 13. Näytteenottoa koeputkiin ohjattiin Jipster -näytteenottokaruselliin (MediCel, Suomi) liitetyn tietokoneen kautta. Näytteenottokarusellin hauteessa käytettiin etanolia ja hauteen lämpötila pidettiin -30 °C:ssa. Suodatuslaitteisto koostui A-SEP cross-flow suodatusmoduulista (Applikon, Hollanti), jossa käytettiin 0,22 µm GV suodatinpaperia (Durapore membrane filters, Millipore, USA). Letkuina käytettiin marpene #13 ja #25 (Watson-Marlow, UK) ja pumppuna ISMATEC ISM 404 (Ismatec SA, Sveitsi). Työn aikana Jipster -näytteenottokarusellilla otettuja näytteitä ehdittiin analysoida HPLC:llä vain TP05 -käymisen osalta.



*Kuva 13. Automaattinen näytteenotto cross-flow-suodatuksella.*



*Kuva 14. Cross-flow-suodatus näytteen palautuksella fermenttoriin.*

- 1. Fermenttorista tuleva näytelinja pumpulle*
- 2. Näytelinja pumpulta suodattimelle*
- 3. Permeaattilinja (liitetty pumpulle)*
- 4. Retentantin palautus fermenttoriin*



## 8 Fermentoinnit

Fermentointien tarkoituksena oli selvittää in-situ mitta-anturein varustettujen Biomass Monitor 220- (Aber Instruments, UK), TruCell2- (Finesse, USA) sekä Matrix-F FT-NIR (Bruker Optics, Saksa) -laitteiden käyttökelpoisuutta hiivan käymisprosessin monitorointiin vaihtelevissa kasvuolosuhteissa. Fermentoinneissa käytettiin panimohiivaa (VTT A-63015) ja kasvualustaksi haettiin vierrettä Sinebrychoffilta. Suuret kiitokset Sinebrychoffille sekä erityisesti Kaisa Tapanille mahdollisuudesta saada vierrettä fermentointeihin.

Fermentoinnit suoritettiin kolmessa vaiheessa: ylöskasvatuksena, pääkasvatuksena ja käymisenä. Ylöskasvatus suoritettiin ravistelukasvatuksena ja pääkasvatus sekä käyminen in-situ-steriloitavissa fermentoreissa. Ylöskasvatukset suoritettiin ravistelupulloissa, pääkasvatukset 2 litran Biostat C-DCU fermenttorissa (B.Braun Biotech International, Saksa) ja käymiset 10 litran Biostat C-DCU fermenttorissa (B.Braun Biotech International, Saksa). Jokaista pääkasvatusta ja käymistä varten haettiin aina uusi erä tuoretta vierrettä. Käymisen aikana otetuista manuaalinäytteistä tehtiin HPLC-analyysit glukoosin, maltoosin, maltotriooosin, etanolin ja glyserolin määrittämiseksi ja Jipster -näytteenottokarusellin automaattisesti ottamat cross-flow suodattamat näytteet säilöttiin hauteesta pakkaseen myöhempiä analyyseja varten.

Käymisprosessien osalta alustakomponenteista glukoosin, maltoosin ja maltotriooosin kulutuksen ja etanolin muodostuminen näyttivät mukailevan Geen ja Ramirezin (1994) muodostamia mallinnuksia olutfermentoinneista.

### 8.1 Käyminen TP03

Ylöskasvatus:

Ylöskasvatuksessa pipetoitiin 100 ml steriiliä YPD-kasvualustaa (10 g l<sup>-1</sup> hiivauute, 20 g l<sup>-1</sup> peptoni, 20 g l<sup>-1</sup> dekstroosi) 250 ml:n erlenmeyerpulloon ja lisättiin 2 siirrostussilmukallista panimohiivaa kasvatusmaljalta. Hiivan annettiin kasvaa yön yli (noin 16 tuntia) ravistelijassa (200 rpm, 28 °C). Ravistelun jälkeen pipetoitiin erlenmeyerpullosta 50 ml hiivakasvustoa 100 ml:n siirrostuspulloon. Jäljelle jääneestä

alustasta mitattiin optinen tiheys spektrofotometrillä aallonpituudella 600 nm (OD600) alkutilanteen selvittämiseksi.

#### Pääkasvatus:

Steriloituun pääkasvatusfermenttoriin lisättiin 2 litraa kylmässä säilytettyä (alle 10 °C) vierrettä mahdollisimman aseptisesti. Sekoitusnopeudeksi asetettiin 400 rpm ja lämpötilaksi 24 °C. Vierteen lämpötilan annettiin tasoittua. Tämän jälkeen lisättiin 50 ml ylöskasvatuksen hiivaa siirrostuspullosta, ja laitettiin syöttökaasuksi ilmaa 0,4 l/min fermenttorin ilmatilaan. Hiivan annettiin kasvaa 48 tuntia, jonka jälkeen pysäytettiin sekoitus, jotta hiiva saataisiin laskeutumaan fermenttorin pohjalle. Samalla lämpötila säädettiin 10 °C:seen. Hiivan annettiin laskeutua noin 5 tuntia ennen siirtoa käymisfermenttoriin.

Siirrostuksen jälkeen havaittiin, että laskeutumisen aikana pääkasvatusfermenttorin pohjaventtiilin ympärille oli jäänyt selkeä kerros hiivaa. Käymisfermenttoriin ei siis saatu siirrettyä kaikkea laskeutunutta hiivaa.

#### Käyminen:

Steriloituun käymisfermenttoriin lisättiin mahdollisimman aseptisesti noin 10 litraa samaa kylmässä säilytettyä vierrettä kuin pääkasvatuksessa. Sekoitusnopeudeksi asetettiin 50 rpm ja lämpötilaksi 10 °C. FT-NIR-laitteisto asetettiin mittaamaan spektrit tietokoneelle 30 minuutin välein käyttäen OPUS 6.0 -ohjelmistoa. Automaattinen Jipster -näytteenottokaruselli asetettiin ottamaan näytteitä 30 minuutin välein. TruCell2-anturin mittaussväliksi asetettiin 10 minuuttia ja tiedonkeruu suoritettiin tietokoneella käyttäen LabVIEW-sovellusta. Aber-anturin mittaussväli oli 10 sekuntia ja tiedonkeruu suoritettiin tietokoneella.

Kun mittaukset oli käynnistetty ja mittausten ns. nollasso selvitetty, suoritettiin pääkasvatusfermenttorista pohjaventtiilin kautta rakennetun siirtolinjan avulla sedimentoidun hiivakasvuston siirto käymisfermenttoriin. Alustaa siirrettiin käymisfermenttoriin noin yhden litran verran. Siirron jälkeen käymisfermenttorin ilmatilaan asetettiin syöttökaasuksi typpeä 0,2 l:aa/min. Kasvatuksen aikana otettiin näytteitä manuaalisesti

pohjaventtiilin kautta tietyin väliajoin automaattisen näytteenoton lisäksi. Manuaali-näytteistä mitattiin OD600 ja kuivapaino sekä pakastettiin näytteet HPLC-analyysejä varten. Jipster -näytteenottokarusellin näytteet säilöttiin pakkaseen myöhempiä analyysjä varten. Hiivan annettiin käydä käymisfermenttorissa yhteensä 115,5 tuntia, minkä jälkeen suoritettiin hiivalle ”tappo” (10 minuuttia, 99 °C). Tapon jälkeen alustaa mitattiin uudelleen hetken aikaa, minkä jälkeen käymisfermenttori tyhjennettiin pohjaventtiilin kautta. Fermenttori pidettiin suljettuna tyhjennyksen jälkeen seuraavaa kasvatusta varten.

Käymisen aikana noin 70 tunnin kohdalla typen syöttö nostettiin 0,4 l:aan/min, jotta kaasuanalysointorille (Innova 1313, LumaSense, Tanska) saatiin parempi virtaus. Abermittauksissa esiintyi katkos 62 ja 66 kasvatustunnin välisenä aikana sekä 95,5 ja 97 tunnin välisenä aikana.

## 8.2 Käyminen TP04

Ylöskasvatus:

TP04:n yöskasvatus suoritettiin kuten käymisessä TP03.

Pääkasvatus:

Steriloituun pääkasvatusfermenttoriin lisättiin 2 litraa uutta kylmässä säilytettyä vierrettä mahdollisimman aseptisesti. Muilta osin TP04:n pääkasvatuksen aloitus suoritettiin samaan tapaan kuin TP03, mutta TP04:n osalta pääkasvatusaikaa lyhennettiin selvästi. Hiivan laskeuttaminen aloitettiin jo 22 tunnin kohdalla ja sen annettiin laskeutua 5 tunnin ajan. Lisäksi lämpötila pidettiin 24 °C:ssa koko laskeuttamisen ajan. Laskeuttamisen jälkeen alustaa poistettiin hitaasti näytteenottohanan kautta niin paljon kuin mahdollista. Fermenttorin pohjalle jäi tämän jälkeen noin 700 ml hiivaa alustoineen. Lisäksi juuri ennen siirtoa käymisfermenttoriin sekoitusnopeudeksi asetettiin 200 rpm pohjalle sedimentoituneen hiivan sekoittamiseksi.

Siirrostuksen jälkeen havaittiin, että pääkasvatusfermenttorin pohjaventtiilin ympärille ei ollut jäänyt hiivaa kuten TP03:n kasvatuksessa. Pääkasvatusfermenttorin näytteenot-

tohanasta otetun alustan joukossa oli kuitenkin jonkin verran hiivaa, joka ei ollut ehtinyt laskeutua pohjalle.

**Käyminen:**

Käymisfermenttoriin lisättiin noin 10 litraa samaa kylmässä säilytettyä vierrettä kuin TP04:n pääkasvatuksessa TP03:n käymisen jälkeen. Sekoitusnopeus, lämpötila ja mittaantureiden mittaussväli pidettiin samana kuin TP03:ssa. Näytteenottokarusellin cross-flow-suodatusosa vaihdettiin uuteen ja näytteenottoväli pidettiin samana. Pääkasvatusfermenttorista siirrettiin hiivakasvustoa noin 700 ml käymisfermenttoriin samalla tavalla kuin TP03:ssa. Siirrostuksen jälkeen typen syöttö asetettiin 0,4 l:aan/min fermenttorin ilmatilaan. Käymisen aikana otettiin näytteitä pohjaventtiilin kautta tietyin väliajoin ja tehtiin samat käsittelyt kuin TP03:ssa. Hiivan annettiin käydä yhteensä 186 tuntia, minkä jälkeen suoritettiin samanlainen ”tappo” ja tyhjennys kuin TP03:ssa. Fermenttori pidettiin suljettuna tapon jälkeen seuraavaa kasvatusta varten.

Käymisen aikana lämpötila nostettiin 140 tunnin 40 minuutin kohdalla 20 °C:seen prosessin nopeuttamiseksi. Lisäksi näytteenottokarusellin näytteenottoväli pidennettiin yhteen tuntiin 167 tunnin kohdalta eteenpäin.

### **8.3 Käyminen TP05**

**Ylöskasvatus:**

Ylöskasvatus suoritettiin kuten edellisissä kasvatuksissa.

**Pääkasvatus:**

Steriloituun pääkasvatusfermenttoriin lisättiin 2 litraa uutta kylmässä säilytettyä vierrettä mahdollisimman aseptisesti. Muilta osin pääkasvatuksen aloitus suoritettiin samaan tapaan kuin edellisissä kasvatuksissa mutta tehtiin muutoksia hiivan laskeuttamisaikaan. Laskeuttaminen aloitettiin noin 25 tunnin kohdalla ja hiivan annettiin laskeutua seuraavat 22 tuntia. Laskeuttamisen ajaksi sekoitus pysäytettiin ja lämpötila laskettiin 10 °C:seen. Laskeuttamisen jälkeen suoritettiin ylimääräisen alustan poisto sekä pohjalle jääneen hiivan siirto käymisfermenttoriin kuten TP04-kasvatuksessa.

#### Käyminen:

Fermenttoriin lisättiin noin 9 litraa samaa kylmässä säilytettyä vierrettä kuin pääkasvatuksessa mahdollisimman aseptisesti TP04:n käymisen jälkeen. Prosessin nopeuttamiseksi sekoitusnopeus asetettiin arvoon 200 rpm ja lämpötila pidettiin 20 °C:ssa alusta lähtien. Näytteenottokarusellissa pidettiin sama suodatinosa kuin TP04:ssa ja näytteenottovälinä pidettiin yksi tunti. Muilta osin olosuhteet ja mittaukset pidettiin samoina kuin edellisissä kasvatuksissa. Pääkasvatusfermentorista siirrettiin noin 700 ml hiivakastusta käymisfermenttoriin edellisten kasvatusten tapaan. Siirron jälkeen typhen syöttö asetettiin 0,4 l:aan/min fermentorin ilmatilaan. Kasvatuksen aikana otettiin näytteitä pohjaventtiilin kautta tietyin väliajoin ja tehtiin samat käsittelyt kuin edellisissä kasvatuksissa. Hiivan annettiin käydä yhteensä 164 tuntia, minkä jälkeen otettiin puhtausnäyte ja suoritettiin hiivan ”tappo” sekä fermentorin tyhjennys kuten edellisissä kasvatuksissa. Tyhjennyksen jälkeen fermenttori pidettiin suljettuna seuraavaa kasvatusta varten.

Käymisen alussa alustan joukkoon lisättiin vaahdonestoainetta edellisiä kasvatuksia enemmän pumpun väärästä ohjausasennosta johtuen. Noin 25 tunnin kohdalla sekoitus laskettiin arvoon 50 rpm sekä nostettiin takaisin arvoon 200 rpm noin 45 tunnin kohdalla, koska mitattujen OD-arvojen ja TruCell2-mittausten välisissä suhteissa havaittiin poikkeavuutta edellisiin kasvatuksiin verrattuna. Lisäksi noin 83 tunnin kohdalla TruCell2-anturin ja Aber-anturin tiedonkeruuta suorittava tietokone hajosi. TruCell2-anturin kohdalla reaaliaikaisen mittausseurannan sijaan jouduttiin siirtymään pistemittauksiin, mutta Aber-anturin tiedonkeruuta pystyttiin jatkamaan toisella tietokoneella noin 91 tunnin ja 30 minuutin kohdalta eteenpäin. Aber-anturin mittauksessa esiintyi toinen katkos 110 tunnin ja 116 tunnin välillä. Lisäksi Aber-anturin mittaus lopetettiin 138 tunnin kohdalla, koska mittalaitteisto jouduttiin luovuttamaan pois.

## 8.4 Käyminen TP06

#### Ylöskasvatus:

Ylöskasvatus suoritettiin kuten edellisissä kasvatuksissa.

### Pääkasvatus:

Steriloituun pääkasvatusfermenttoriin lisättiin 2 litraa uutta kylmässä säilytettyä vierrettä mahdollisimman aseptisesti ja pääkasvatus aloitettiin kuten aikaisemmissa kasvatuksissa. Hiivan laskeuttaminen aloitettiin 26 tunnin kohdalla ja annettiin laskeutua seuraavat 22 tuntia. Laskeuttamisen ajaksi sekoitus pysäytettiin ja lämpötila laskettiin 10 °C:seen. Laskeuttamisen jälkeen suoritettiin ylimääräisen alustan poisto ja pohjalle jääneen hiivan siirto käymisfermenttoriin kuten kahdessa edellisessä kasvatuksessa.

### Käyminen:

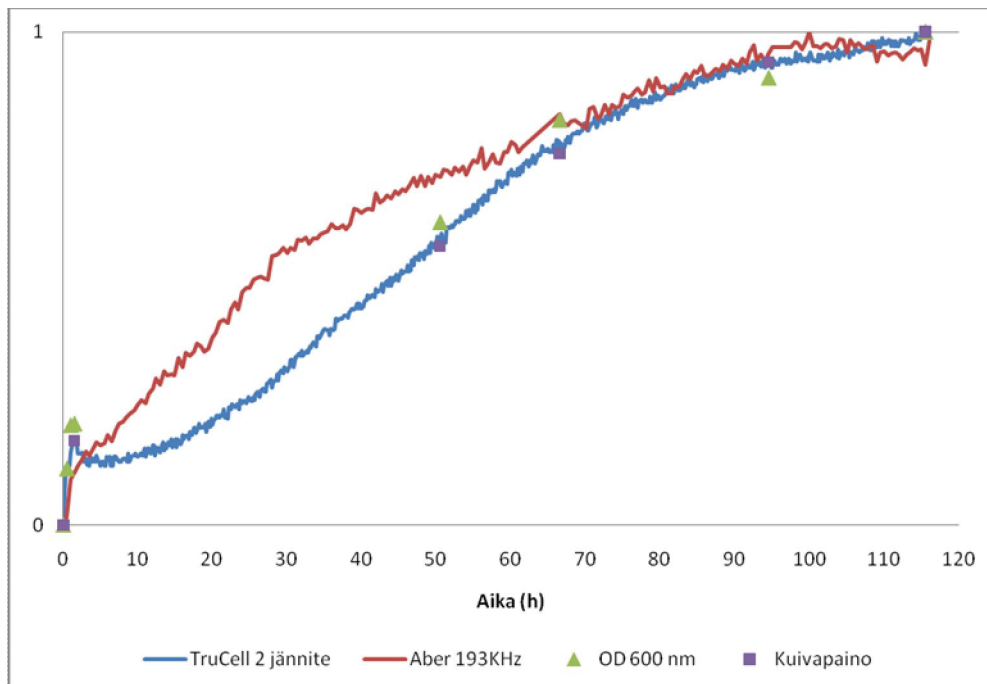
Fermenttoriin lisättiin noin 10 litraa samaa kylmässä säilytettyä vierrettä kuin pääkasvatuksessa mahdollisimman aseptisesti TP05:n käymisen jälkeen. Sekoitusnopeus asetettiin arvoon 200 rpm ja lämpötila pidettiin 20 °C:ssa alusta lähtien. Cross-flow-suodatuksen vaihdettiin uusi suodatusosa ja näytteenottovälinä pidettiin yksi tunti. Pääkasvatusfermenttorista siirrettiin noin 700 ml alustaa käymisfermenttoriin edellisten kasvatusten tapaan ja asetettiin typen syöttö 0,4 l:aa/min fermenttorin ilmatilaan. Kasvatuksen aikana otettiin näytteitä pohjaventtiilin kautta tietyin väliajoin ja tehtiin samat käsittelyt kuin edellisissä kasvatuksissa. Hiivan annettiin käydä yhteensä 452 tuntia, minkä aikana olosuhteita muutettiin. TruCell2-anturin reaaliaikainen tiedonkeruu saatiin käyntiin noin tunti kasvatuksen aloittamisesta. Kasvatuksen lopuksi otettiin puhtausnäyte.

Käymisen aikana noin 241 tunnin kohdalla aloitettiin alustan ilmastus nesteeseen syöttönopeudella 4 l:aa/min, koska hiivan kuivapainot ja TruCell2-anturin kasvukäyrä alkoivat laskea. Lisäksi sekoitusnopeus laskettiin 150 rpm:ään noin 335 tunnin kohdalla alustan voimakkaan vaahtoamisen takia.

## 9 Tulokset ja tulosten tarkastelu

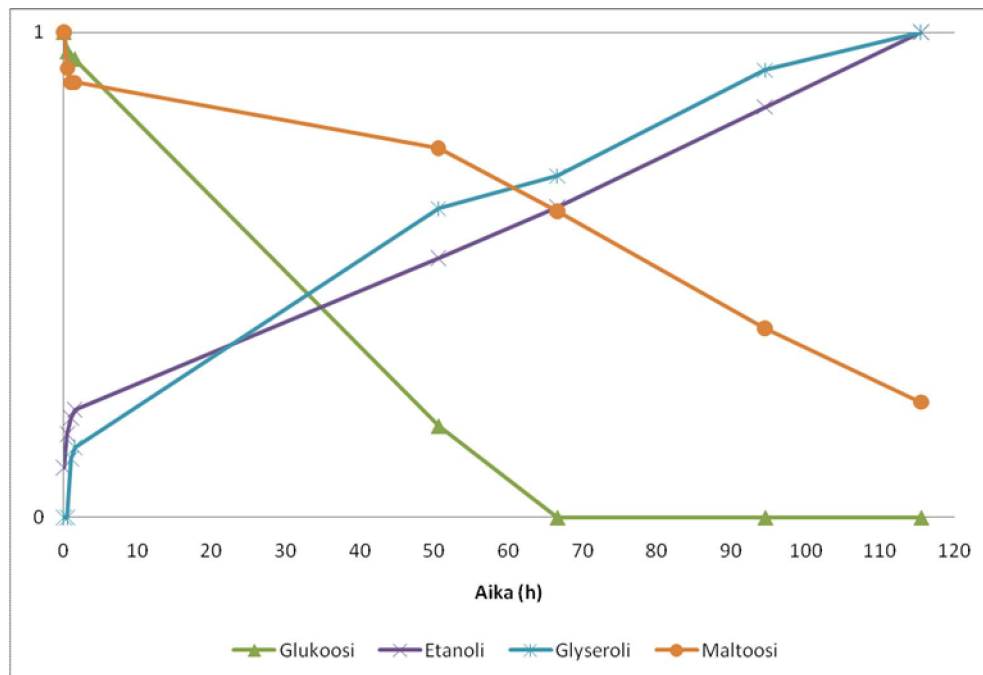
### 9.1 TP03

TP03-käymisprosessin biomassan mittaustulokset ja mittausten menetelmien vertailut on esitetty kuvassa 17. Manuaalinäytteiden HPLC-analyysit glukoosin, maltoosin, etanolin ja glyserolin osalta on esitetty kuvassa 18. Maltotriosisin osalta tuloksia ei ole esitetty, koska menetelmällä ei saatu tarpeeksi tarkkoja tuloksia. Kapasitanssimittausten tulokset on esitetty kuvissa 19 ja 20. Kuvassa 21 on esitetty johtokyvyn ja pH:n mittaukset.



Kuva 17. TP03-käymisen normalisoidut biomassan mittaukset ajan funktiona.

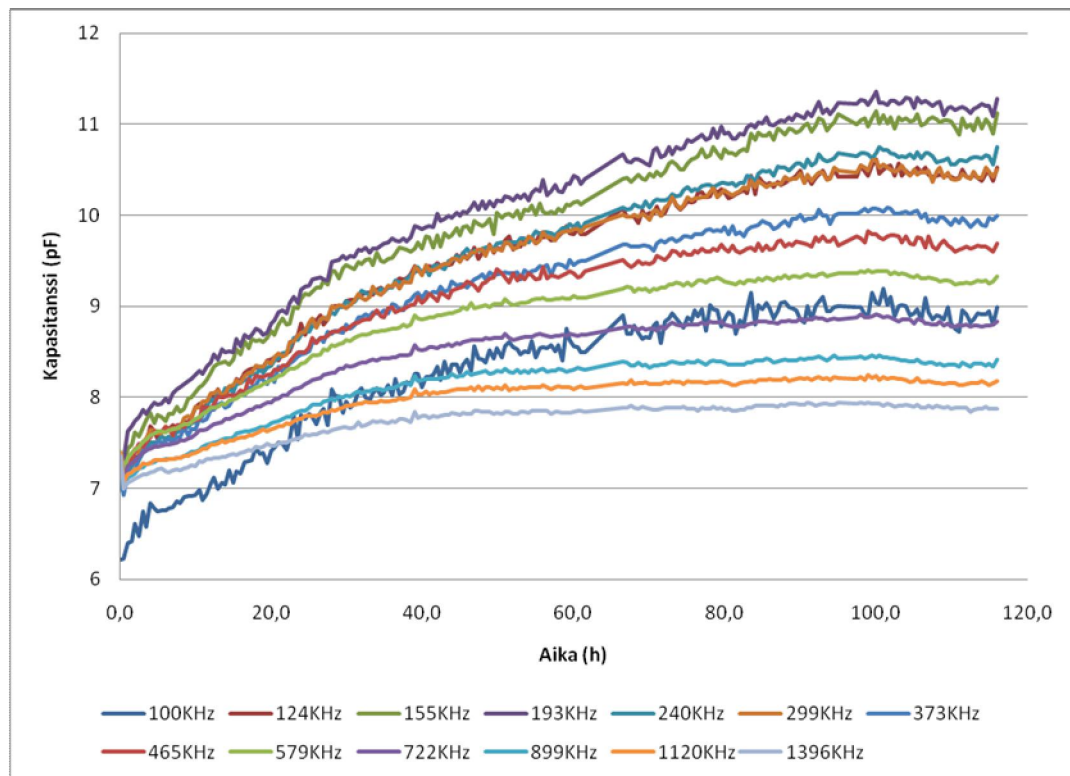
Kuvasta 17 havaitaan Aber-anturilla saadun kasvukäyrän olevan hieman poikkeava suhteessa muihin menetelmiin ensimmäisen 60 tunnin aikana. Tämä voi johtua Aber-anturin erilaisesta mittauseriauksesta, jolloin kasvuvaiheessa olevat solut voivat aiheuttaa voimakkaamman vasteen Aber-anturin mittaukseen.



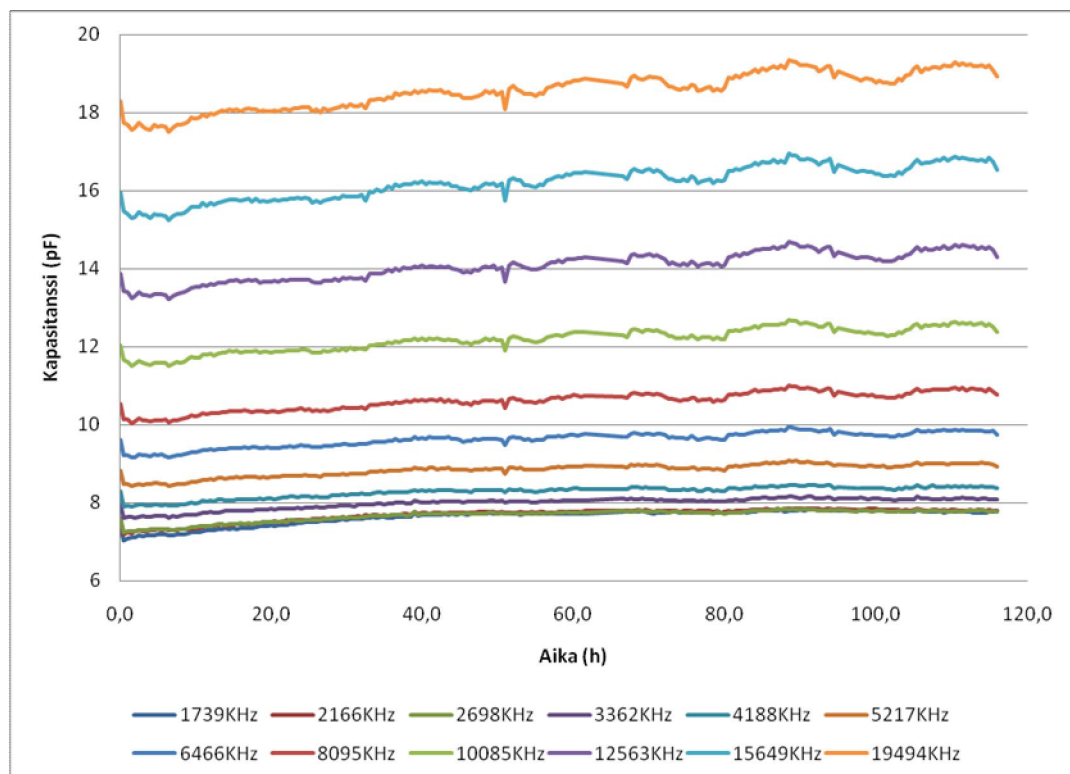
Kuva 18. TP03-käymisen normalisoidut HPLC-analyysitulokset ajan funktiona.

Kuvasta 18 voidaan todeta glukoosin loppuneen noin 65 tunnin kohdalla. Glukoosin loppumisen vaikutus näyttäisi olevan nähtävissä myös kuvassa 17, jolloin noin 65 tunnin jälkeen kasvukäyrän jyrkkyys näyttäisi laskevan hieman TruCell2-anturin mittauksessa. Aber-anturin mittauksessa kasvukäyrän tasaantuminen näyttäisi kuitenkin olevan nähtävissä jo noin 40 tunnin kohdalla. Glukoosin loppumisella ei näyttäisi olevan merkitystä etanolin tuottonopeuteen, koska maltoosia on vielä jäljellä. Biomassamittauksissa havaitaan lisäksi alkavaa tasoittumista noin 100 tunnin kohdalla, mikä on havaittavissa etenkin kapasitanssimittauksen osalta. Maltotriiosia oli jäljellä koko kasvatuksen ajan (tuloksia ei esitetty).



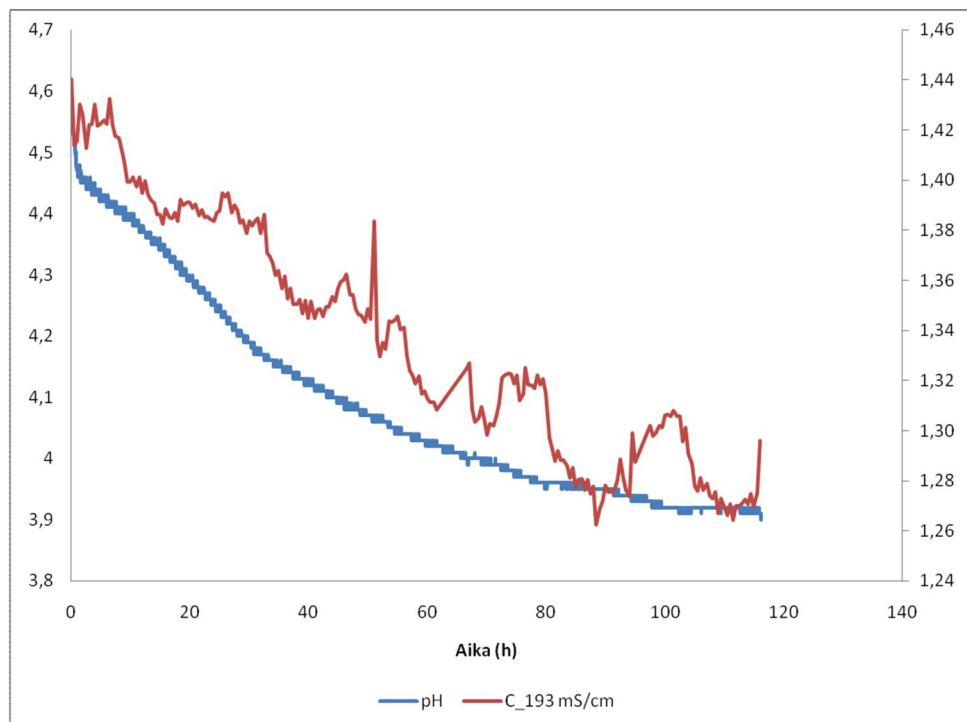


Kuva 19. TP03-kapasitanssimittaukset 100 KHz - 1396 KHz.



Kuva 20. TP03-kapasitanssimittaukset 1739 KHz - 19494 KHz.

Kapasitanssimittausten perusteella (kuvat 19 ja 20) voimakkain vaste kasvuun näyttäisi olevan taajuudella 193 KHz, joka nähdään kuvassa 19 ylimpänä olevana käyränä. Tästä syystä kyseinen taajuus valittiin esitettäväksi Aber-anturin mittaustuloksia vertailtaessa muihin mittausten menetelmiin. Lisäksi mittaustaajuuden kasvaessa vaste biomassaan näyttäisi heikkenevän ja lopulta häviävän lähes kokonaan tarpeeksi suurilla taajuuksilla (kuva 20).

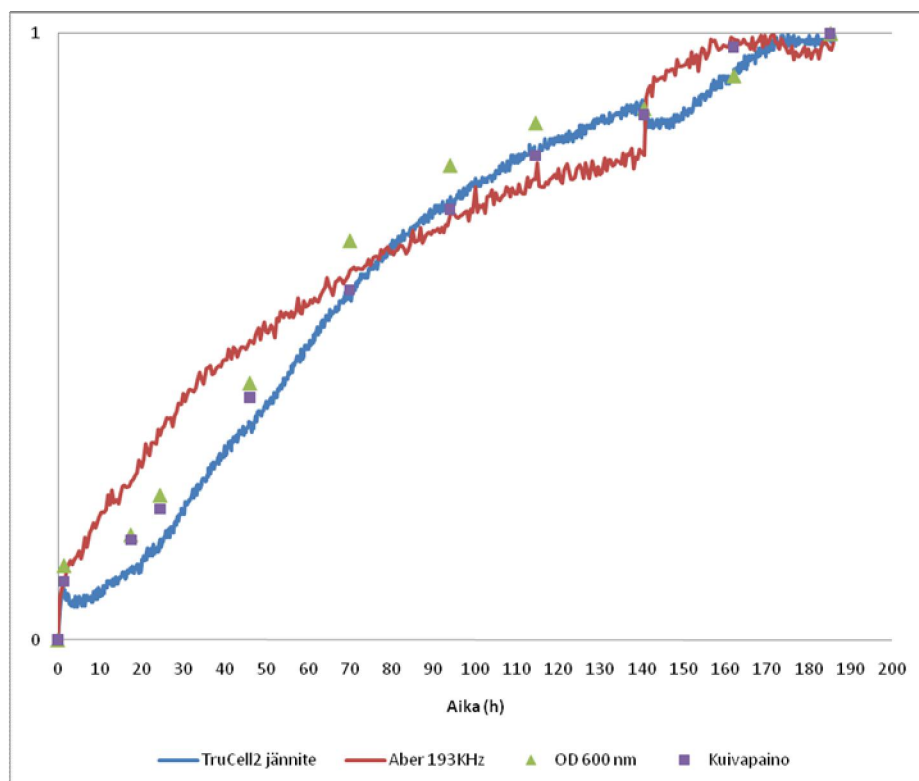


Kuva 21. TP03-käymisen johtokyvyn ja pH:n mittaukset.

Kuvasta 21 nähdään johtokyvyn ja pH:n muutokset. Johtokyvyn voidaan todeta laskevan pH-arvojen mukana, mutta johtokyky mittauksessa esiintyvien mittapiikkien syitä ei saatu selville. pH-arvossa tapahtuu myös tasoittuminen noin 100 tunnin jälkeen, jolloin myös biomassamittauksissa havaittiin tasoittumista.

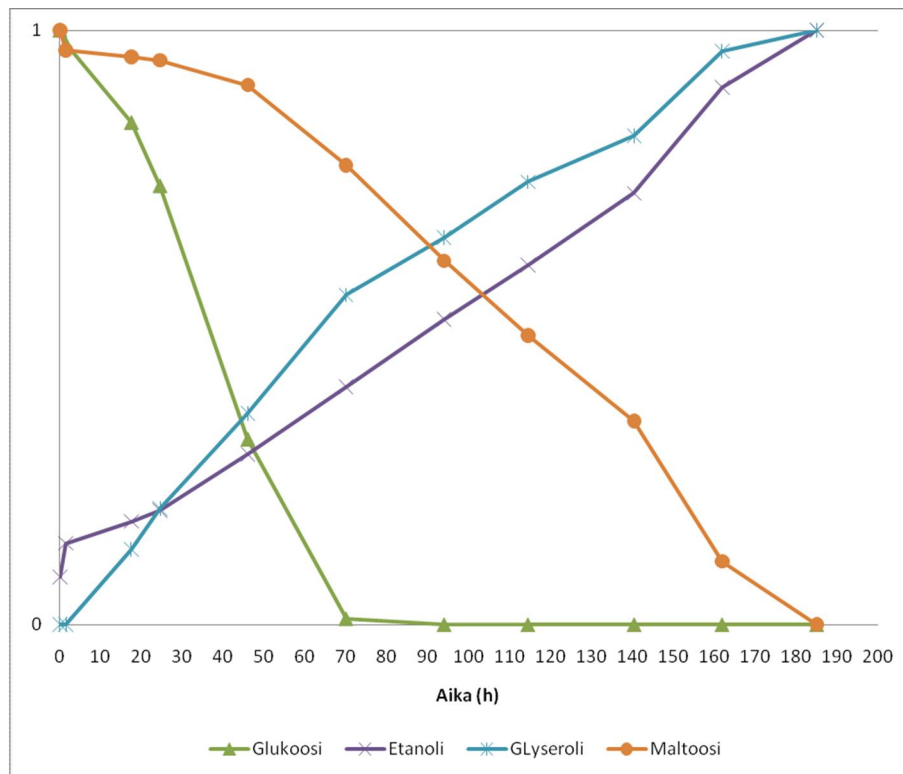
## 9.2 TP04

TP04-käymisprosessin biomassan mittaustulokset ja mittausten menetelmien vertailut on esitetty kuvassa 22. Manuaalinäytteiden HPLC-analyysit glukoosin, maltoosin, etanolin ja glyserolin osalta on esitetty kuvassa 23. Maltotriosisin osalta tuloksia ei ole esitetty, koska menetelmällä ei saatu tarpeeksi tarkkoja tuloksia. Kapasitanssimittausten tulokset on esitetty kuvissa 24 ja 25. Johtokyky-mittaus ja pH on esitetty kuvassa 26.



Kuva 22. TP04-käymisen normalisoidut biomassan mittaukset ajan funktiona. Lämpötila nostettiin 140 tunnin kohdalla 10 °C:sta 20 °C:seen.

Kuvasta 22 havaitaan jälleen poikkeavuutta Aber-anturin mittaustuloksissa verrattuna muihin menetelmiin. 140 tunnin kohdalla suoritettu fermenttorin lämpötilan nostamisen vaikutus on selvästi havaittavissa molemmilla antureilla, mutta vaikutukset ovat päinvastaiset.



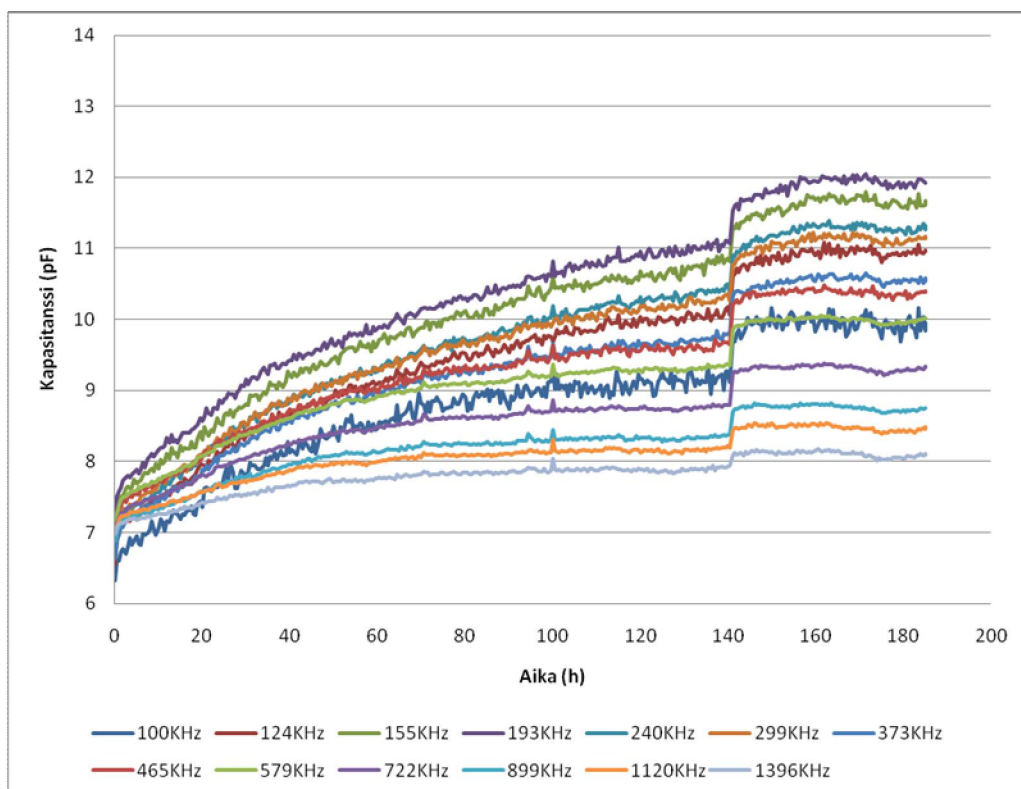
Kuva 23. TP04-käymisen normalisoidut HPLC-analyysitulokset ajan funktiona.

Kuvasta 23 nähdään, että glukoosi loppuu noin 70 tunnin kohdalla, jolloin kasvukäyrän jyrkkyys (kuva 22) näyttäisi tasaantuvan, etenkin TruCell2-anturilla. Toisaalta Aber-anturin kasvukäyrä loivenee jälleen noin 40 tunnin kohdalla. Tämä aikaisempi kasvukäyrän loiventuminen oli havaittavissa myös TP03-käymisessä (kuva 17). Glukoosin loppumisella ei näyttäisi olevan vaikutusta etanolin muodostumisnopeuteen.

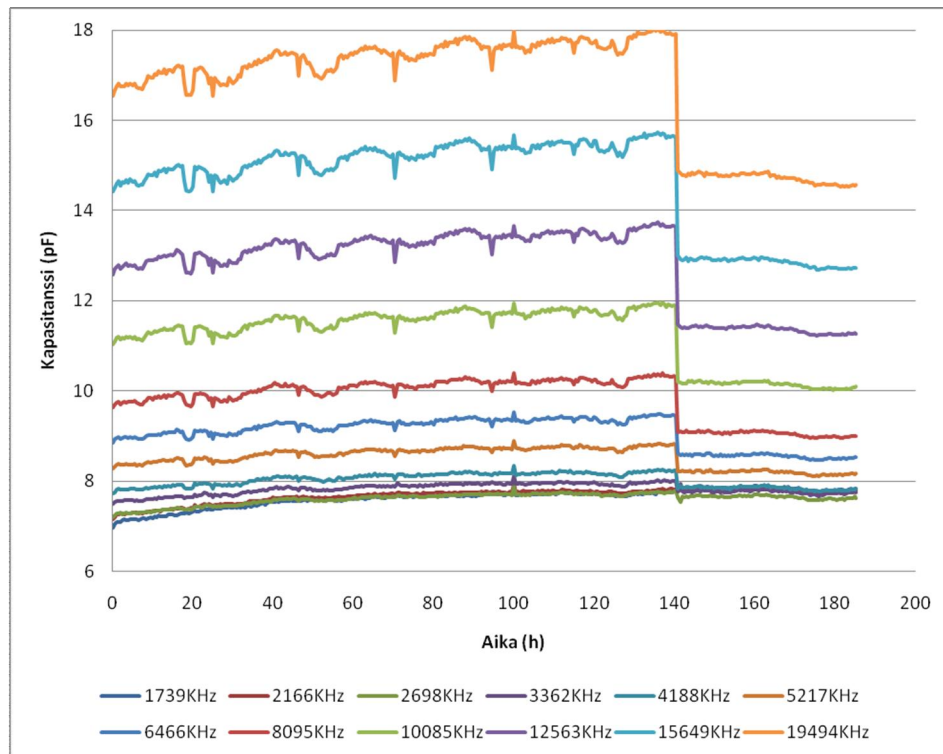
Aber-anturin mittausarvon nousu 140 tunnin kohdalla (kuva 22) voi mahdollisesti johtua siitä, että lämpötilan nostolla oli metaboliaa nopeuttava vaikutus ja sen seurauksen solukokoa suurentava vaikutus. Toisaalta Aber-anturin johtokykymittauksessa nähdään myös selkeä nousu 140 tunnin kohdalla (kuva 26), joten kapasitanssimittauksen muutos voi johtua myös tästä. Tämän syy-seuraussuhteen selvittäminen olisi vaatinut lisätutkimuksia. Lisäksi pH:n mittauksessa havaittiin nopea pudotus (kuva 26). TruCell2-anturin mittausarvon lasku voidaan mahdollisesti selittää kasvualustassa olevien komponenttien liukoisuuden lisääntymisellä korkeammassa lämpötilassa, jolloin kasvualustan sameus laskee. Lämpötilan muutoksen välitön vaikutus näyttäisi jäävän havaitsematta off-line-

menetelmillä, koska manuaalinäytteitä ei otettu tarpeeksi usein muutoksen havaitsemiseksi.

HPLC-analyysien perusteella 140 tunnin kohdalla tapahtunut lämpötilan nosto näyttäisi kiihdyttävän hiivasolujen maltoosin kulutusta ja toisaalta glyserolin sekä etanolin tuotonopeus näyttäisi kasvavan. Lisäksi kuvasta 23 nähdään, että maltoosi on loppunut varmasti 185 tunnin kohdalla, mutta jos edellisten maltoosipitoisuuksien perusteella kulutusnopeuden oletetaan olevan sama, voidaan arvioida maltoosin loppuneen mahdollisesti jo 175 tunnin kohdalla. Lisäksi noin 175 tunnin kohdalla molempien biomassantureiden mittauksessa on havaittavissa selvä tasaantuminen ja pH-mittauksessa havaitaan lievää nousua (kuva 26). Tämän perusteella voitaisiin arvioida, että 175 tunnin kohdalla hiivasolujen helposti kasvuun käyttämät ravinteet ovat loppuneet ja solumäärän kasvu on selvästi hidastunut tästä eteenpäin. Maltotriiosia olikin jäljellä enää hyvin vähän hiivan käytettäväksi käymisprosessin lopussa (tuloksia ei esitetty).

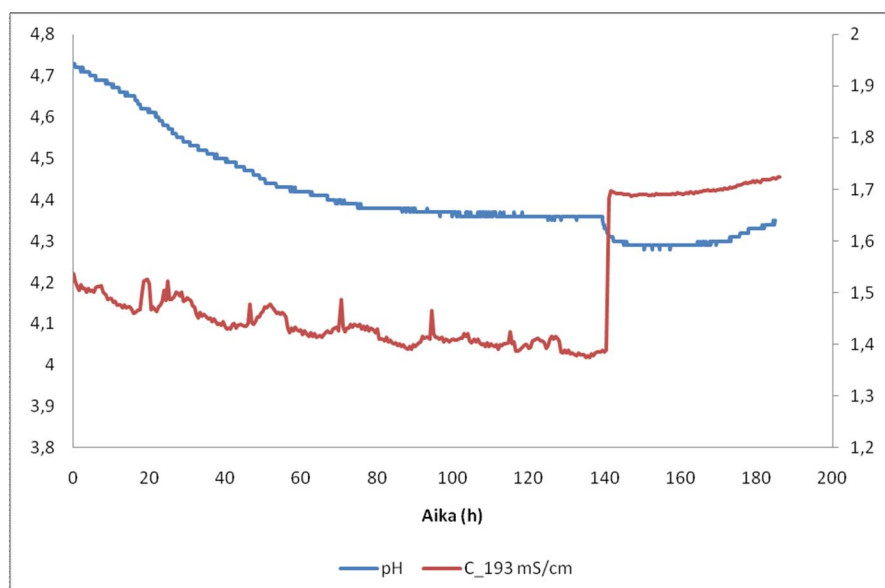


Kuva 24. TP04-kapazitanssimittaukset 100 KHz - 1396 KHz.



Kuva 25. TP04-kapazitanssimittaukset 1739 KHz - 19494 KHz.

Kuvista 24 ja 25 nähdään lämpötilan muutoksen selkeä vaikutus kapasitanssimittaukseen. Huomioitavaa on kuitenkin se, että suuremmilla taajuuksilla kapasitanssin muutos on laskeva (kuva 25).

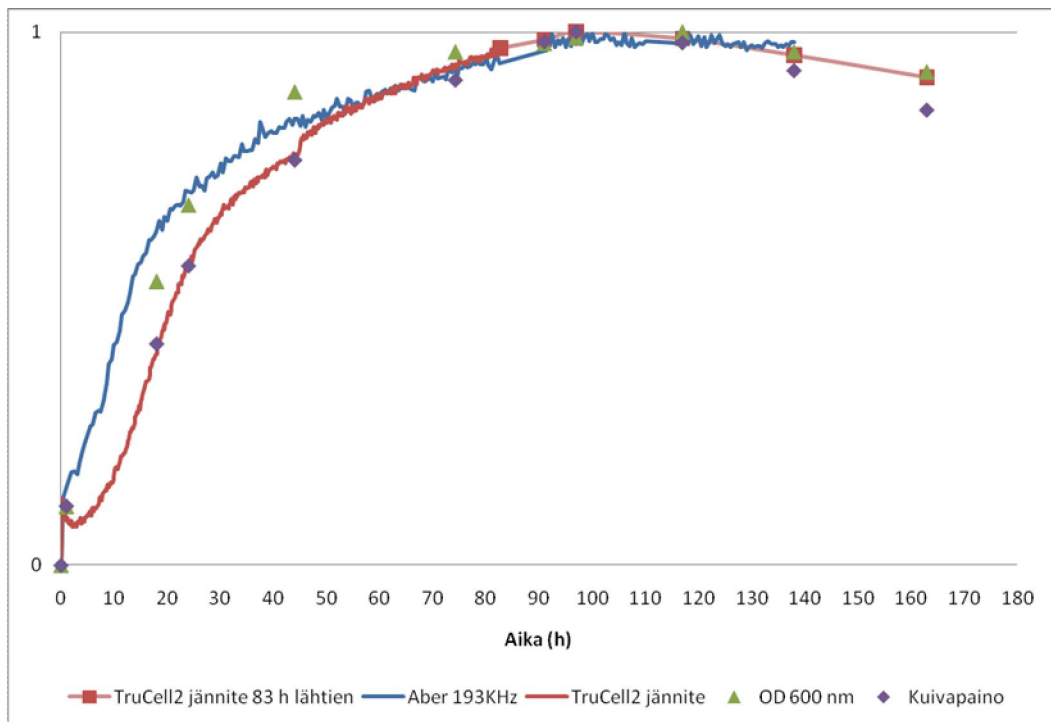


Kuva 26. TP04-käymisen johtokyvyn ja pH:n ja mittaukset.

TP04-johtokykymittauksessa (kuva 26) nähdään lämpötilan nostolla olevan johtokykyä nopeasti nostava vaikutus, mutta muille esiintyville mittapiikeille ei löytynyt selitystä. Vastaavasti lämpötilan nostolla näyttäisi olevan pH:ta laskeva vaikutus todennäköisesti metabolian nopeutumisen johdosta.

### 9.3 TP05

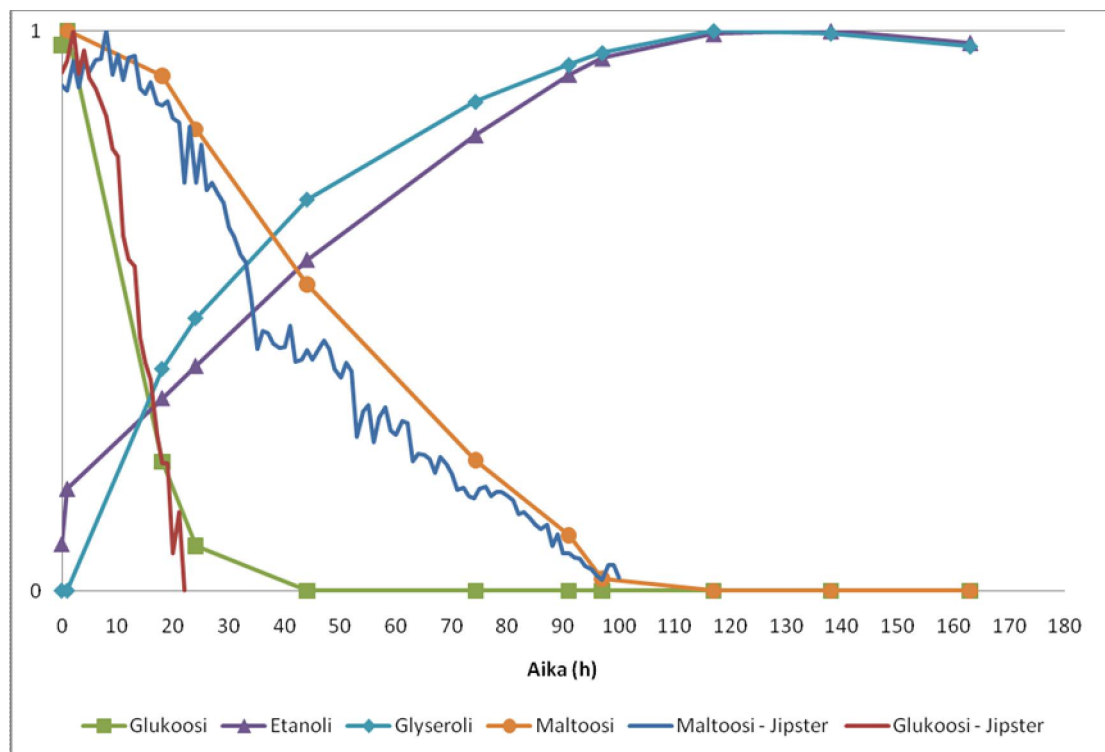
TP05-käymisprosessin biomassan mittaustulokset ja mittausten menetelmien vertailut on esitetty kuvassa 27. Manuaalinäytteiden HPLC-analyysit glukoosin, maltoosin, etanolin ja glyserolin sekä Jipster näytteenottokarusellin analyysit glukoosin ja maltoosin osalta on esitetty kuvassa 28. Kapasitanssimittausten tulokset on esitetty kuvissa 29 ja 30. Kuvassa 31 on esitetty johtokyky- ja pH-mittaukset. Puhtausnäytteissä ei todettu kontaminaatioita.



Kuva 27. TP5-käymisen normalisoidut biomassan mittaukset ajan funktiona. Tiedonkeruuta suorittavan tietokoneen hajoaminen tapahtui 83 tunnin kohdalla.

Kuvasta 27 nähdään, että Aber-anturin kasvukäyrä on selvästi TruCell2-anturin kasvukäyrää mukailevampi kuin kahdessa edellisessä kasvatuksessa. Tämä voi johtua mah-

dollisesti solujen suuremmasta kasvunopeudesta tai Aber-anturin paremmasta mittausvasteesta korkeammassa lämpötilassa, koska myös johtokyvyn mittaukset olivat tasaisempia. Suurempi kasvunopeus voidaan todeta lisäksi glukoosin ja maltoosin selvästi suuremmasta kulutusnopeudesta (kuva 28) verrattuna edellisiin käymisprosesseihin.



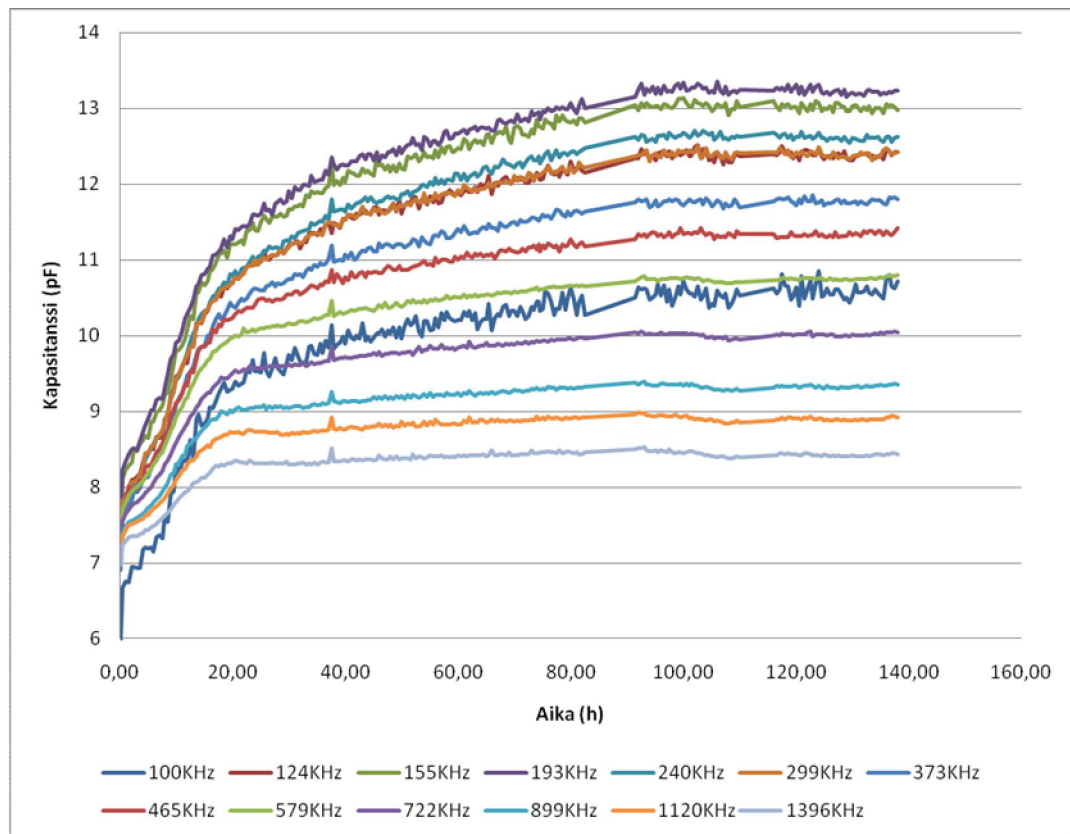
Kuva 28. TP05-käymisen normalisoidut HPLC-analyysitulokset ajan funktiona. Jipster-näytteet otettiin tunnin välein.

HPLC-analyysien perusteella glukoosin loppuminen on tapahtunut noin 25 - 30 tunnin kohdalla. Lisäksi TruCell2-anturin mittauksessa havaitaan kasvukäyrän loiventuminen näillä kohdin, mutta Aber-anturilla tasoittuminen näyttäisi alkavan jo noin 20 tunnin kohdalla. Myös pH:n mittauksessa tapahtuu selvä tasoittuminen samoihin aikoihin (kuva 31). Manuaalisesti otettujen näytteiden ja Jipster-näytteenottokarusellilla otettujen näytteiden HPLC-tuloksissa havaitaan ero etenkin maltoosin kohdalla. Laskevat trendit molempien osalta on kuitenkin varsin samantyyppisiä. Näytteenottokarusellin tulosten osalta maltoosilla havaitaan selvästi hajontaa tulosten välillä. Tämä voi johtua Jipster-näytteenoton aiheuttamasta virheestä tai käytetystä HPLC-menetelmästä. Virhettä näytteenottoon on voinut aiheutua permeaattilinjan liian vähäisestä huuhtelusta uudella näytteellä ennen varsinaisen näytteen ottamista koeputkeen. Lisäksi havaittiin, että

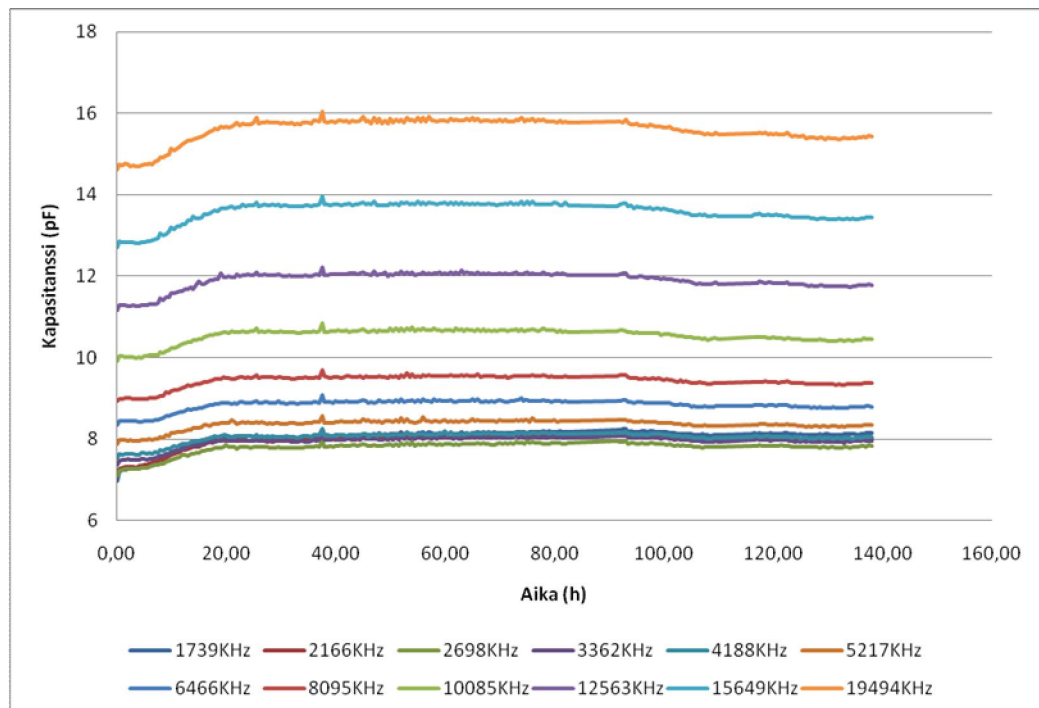


hauteessa oleviin koeputkiin oli joissain tapauksissa tiivistynyt hauteessa olevaa etanolia. Nesteen pääteltiin olevan etanolia, koska neste ei ollut jäänyt koeputken pohjalle sen ollessa hauteessa. Tiivistyneen nesteen määrä on todennäköisesti riippunut siitä, kuinka kauan koeputki on ehtinyt olla hauteessa. Kokonaisuudessaan yksittäinen koeputki ehti olla hauteessa enintään 24 tuntia. HPLC-analyyseissä maltoosin ja maltotrioo- sin mittapiikit olivat osittain päällekkäin, mikä hankaloitti tarkkojen tulosten aikaan- saamista. Toisaalta glukoosin osalta hajonta näytteiden välillä näyttäisi olevan paljon pienempi verrattuna maltoosiin. Tämän perusteella voitaisiin päätellä, että suurimman osan hajonnasta maltoosin osalta aiheuttaisi HPLC-analyysissä tapahtuva maltoosin ja maltotrioo- sin piikkien päällekkäisyys eikä niinkään näytteenotosta aiheutuva virhe. Työssä ei ehditty tutkia Jipster-näytteenoton toistettavuutta, mikä toisaalta olisi voinut olla varsin tarpeellista.

Glukoosin loppumisella ei näyttäisi edelleenkaan olevan merkitystä etanolin tuottono- peuteen (kuva 28). 45 tunnin kohdalla tehty sekoitusnopeuden noston takaisin 200 rpm:ään on nähtävissä TruCell2-anturilla (kuva 27). Biomassamittauksissa kaikilla me- netelmillä voidaan havaita selvä kasvun tasoittuminen noin 100 tunnin kohdalla kasvu- käyrän tasoittumisen johdosta. Tämä on selitettävissä maltoosin loppumisella samoihin aikoihin. Lisäksi pH-mittauksessa havaittiin hidasta alkavaa nousua 100 tunnin kohdalta eteenpäin (kuva 31). Huomioitavaa on, että noin 120 tunnin kohdalta eteenpäin Aber- anturin mittausarvot eivät lähde laskuun muiden mittausmenetelmien tavoin. Toisaalta maltotrioo- sin loppuminen tapahtuu vasta noin 130 - 140 tunnin kohdalla (tuloksia ei esitetty). Koska Aber-anturin mittalaite jouduttiin luovuttamaan pois noin 138 tunnin kohdalla, ei maltotrioo- sin loppumisen vaikutusta nähty kapasitanssimittauksissa.

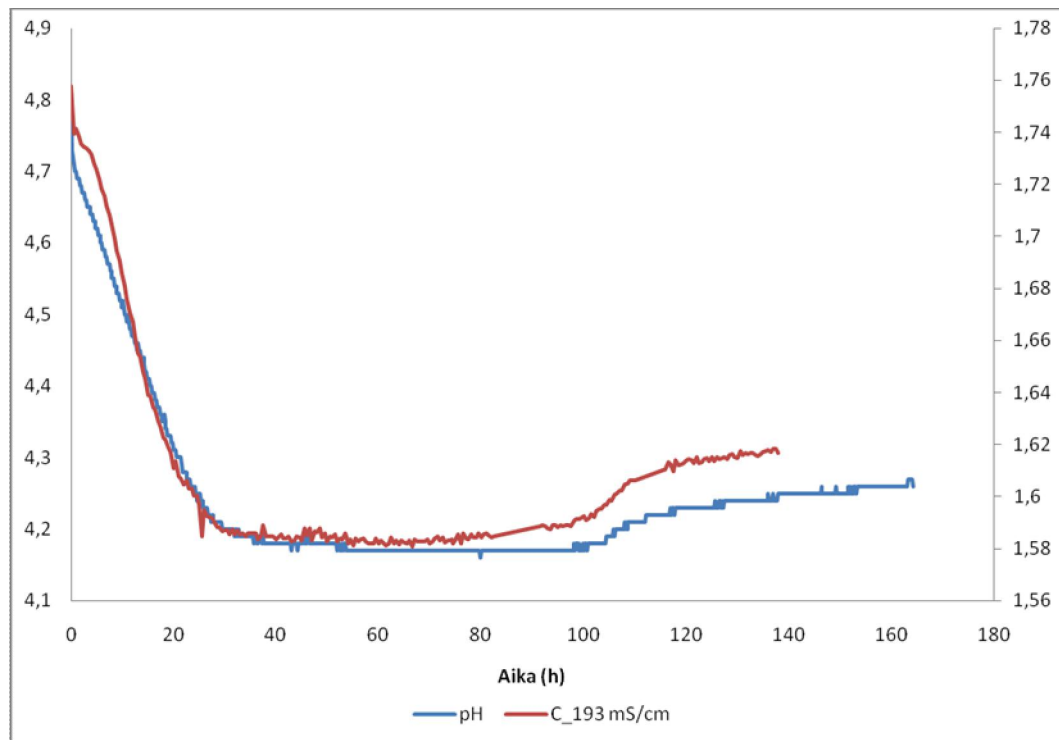


Kuva 29. TP05-kapasitanssimittaukset 100 KHz - 1396 KHz.



Kuva 30. TP05-kapasitanssimittaukset 1739 KHz - 19494 KHz.

Kapasitanssimittauksissa (kuvat 29 ja 30) ei ole havaittavissa uusia kasvuolosuhteiden häiriöistä tai muutoksista kertovia merkkejä.

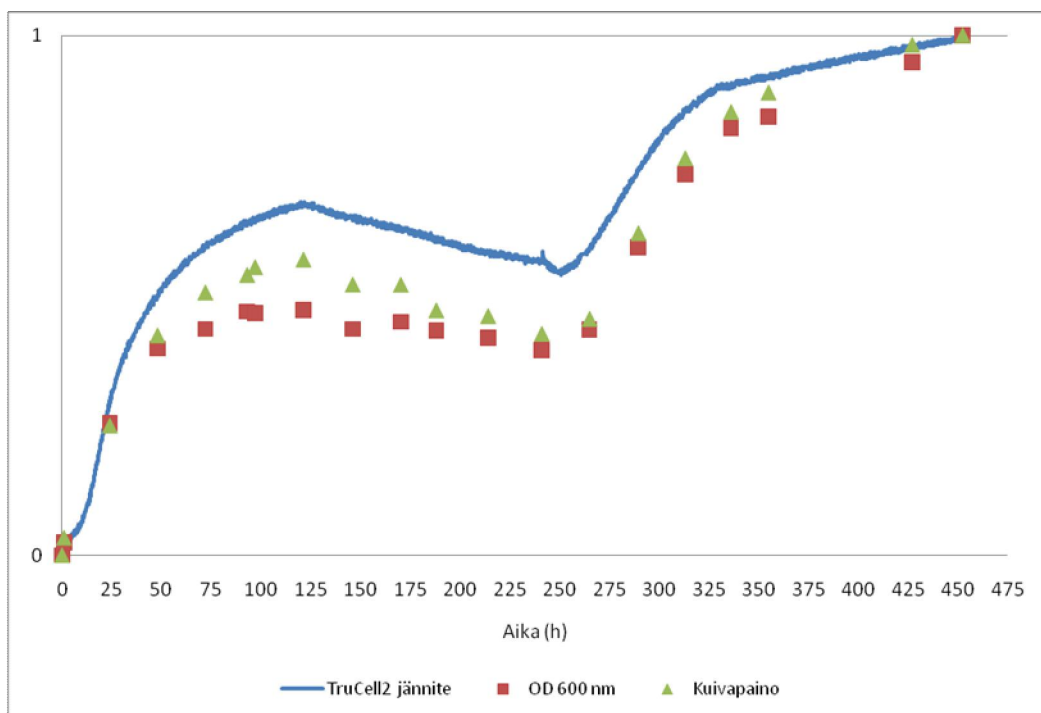


Kuva 31. TP05-käymisen johtokyvyn ja pH:n mittaukset.

Kuvasta 31 nähdään, että pH tasoittuu glukoosin loppumisen jälkeen noin 25 - 30 tunnin kohdalla. 100 tunnin kohdalla tapahtunut maltoosin loppunen näyttäisi myös olevan havaittavissa pH-mittauksesta lievänä pH-arvon kasvuna. Lisäksi johtokyky näyttäisi mukailevan pH:n muutoksia. Samalla havaitaan selkeä ero kahden edellisen kasvatuksen johtokykymittauksiin (kuva 21 ja 26) verrattuna. Tämän perusteella näyttäisi siltä, että lämpötilalla on merkittävä vaikutus Aber-anturin johtokykymittauksen tarkkuuteen.

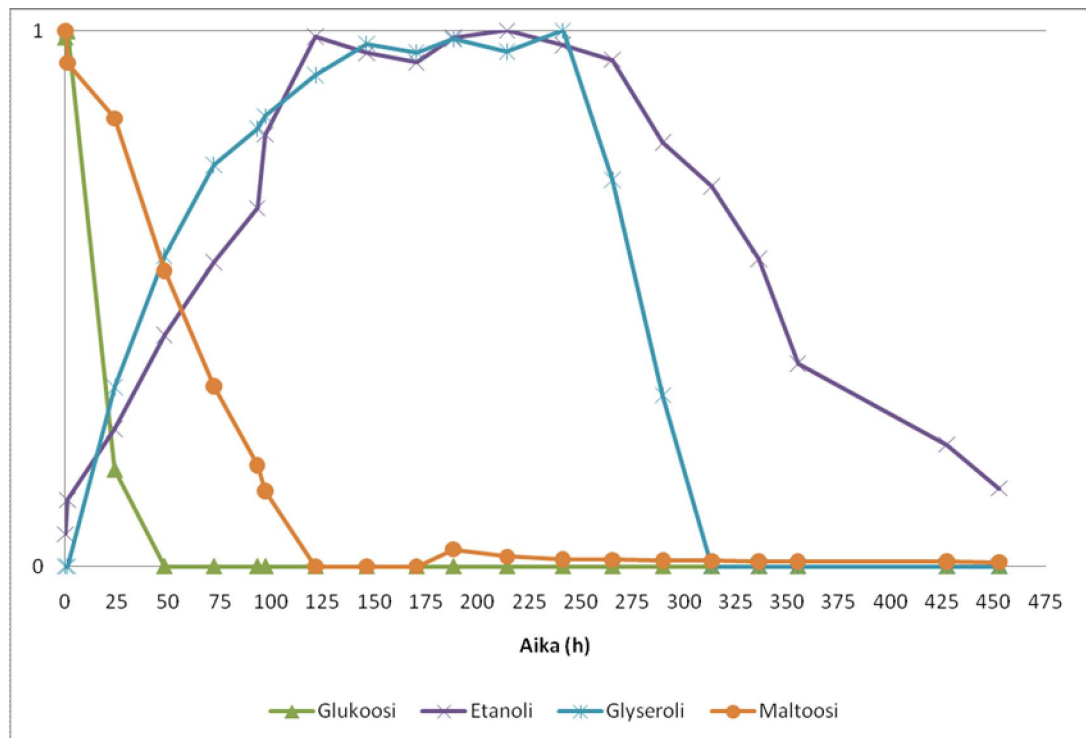
## 9.4 TP06

TP06-käymisen biomassan mittaustulokset ja mittausten menetelmien vertailut on esitetty kuvassa 32. Manuaalinäytteiden HPLC-analyysit glukoosin, maltoosin, etanolin ja glyserolin osalta on esitetty kuvassa 33. Maltotriiosin osalta tuloksia ei ole esitetty, koska menetelmällä ei saatu tarpeeksi tarkkoja tuloksia. pH-mittaus on esitetty kuvassa 34. Puhtausnäytteissä ei todettu kontaminaatioita.



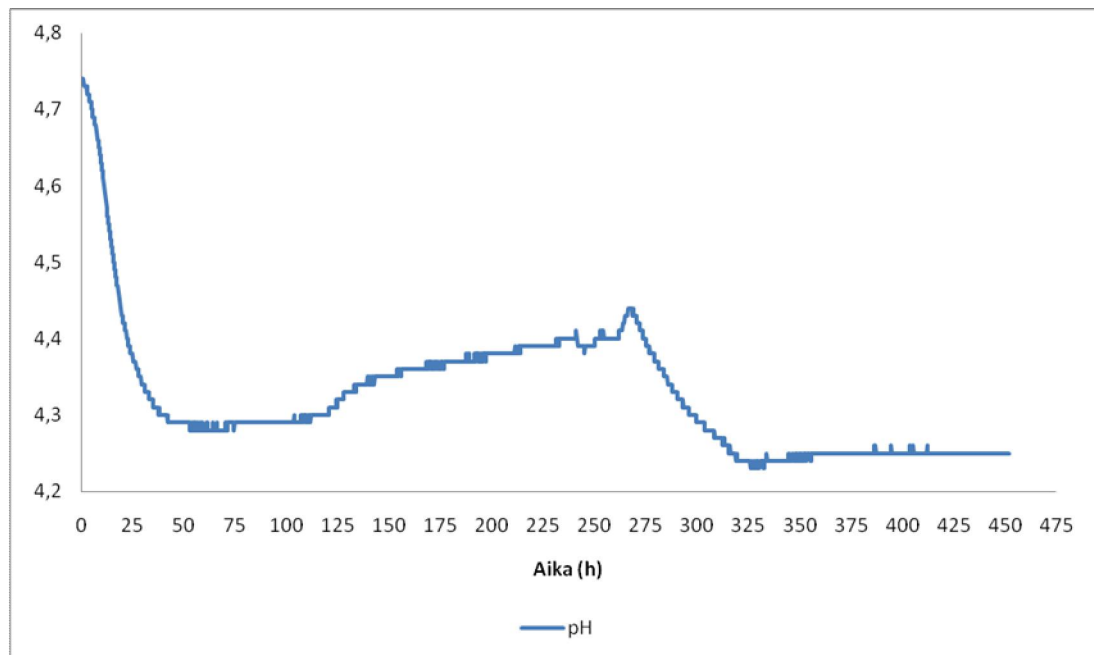
Kuva 32. TP06-käymisen normalisoidut biomassan mittaukset ajan funktiona. Ilmastus aloitettiin 241 tunnin kohdalla.

Kuvasta 32 nähdään, että TruCell2-anturin kasvukäyrä mukailee off-line -biomassamittauksia varsin hyvin koko kasvatuksen ajan. Lisäksi kaikissa biomassamittauksissa havaitaan lasku maltoosin loppumisen 125 tunnin jälkeen (kuva 33) ja jälleen kasvua ilmastuksen aloituksen jälkeen. Lisäksi TruCell2-anturin mittausten perusteella ilmastuksen aloitus näkyy pienenä piikkinä, mutta mittauksessa havaittava pysyvä nousu alkaa vasta noin 10 tuntia ilmastuksen aloittamisesta.



Kuva 33. TP06-käymisen normalisoidut HPLC-analyysitulokset ajan funktiona. Ilmastus aloitettiin 241 tunnin kohdalla.

HPLC-analyysien perusteella (kuva 33) glukoosin voidaan todeta loppuneen viimeistään 50 tunnin kohdalla, mutta loppuminen on voinut tapahtua jo aikaisemmin, koska biomassamittauksissa havaitaan jälleen kasvukäyrän loiventuminen. HPLC-analyysien mukaan maltoosi näyttäisi siis loppuneen noin 125 tunnin kohdalla, mikä voidaan havaita myös kasvukäyrästä. Maltotriooosi loppuu arviolta 170 - 180 tunnin kohdilla (tuloksia ei esitetty). Glyseroli- ja etanolipitoisuudet alkavat tasoittua 125 tunnin jälkeen ja molemmat alkavat laskea noin 250 tunnin kohdalla. Lasku johtuu ilmastuksen aloituksesta, koska hiiva kykenee käyttämään aerobisissa oloissa kasvuunsa etanolia ja glyserolia. Etanolin kulutusnopeus näyttäisi tosin laskevat 350 tunnin kohdalta eteenpäin ja samalla myös biomassamittauksissa havaitaan tasoittuminen.



Kuva 34. TP06-käymisen pH-mittaus ajan funktiona.

Kuvasta 34 nähdään, että pH-arvo laskee ja tasoittuu, kun glukoosi on käytetty. Noin 125 tunnin kohdalla maltoosi loppuu, mikä nähdään varsinaisessa pH-arvon loivana kasvuna 125 ja 275 tunnin välillä. Ilmastuksen aloitus ei näyttäisi aiheuttavan välitöntä muutosta pH:ssa, mutta pienehkö piikki ja sen jälkeen alkava lasku nähdään noin 270 - 325 tunnin välillä, jolloin myös etanolipitoisuus alkaa vähentyä ja biomassa nousta. 325 tunnin kohdalla havaitaan biomassamittauksissa tasoittumista, mutta pH pysyy kuitenkin stabiilina.

## 9.5 Sovitukset biomassamittausten välillä

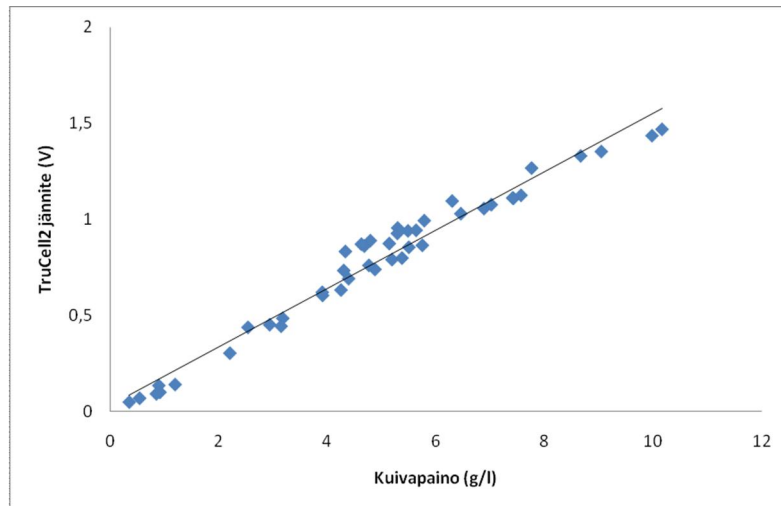
Käymisprosesseissa mitattujen biomassapitoisuuksien perusteella tehtiin sovituksia, joilla pyrittiin tekemään kalibrointi TruCell2-solutiheysanturin jännitesignaalin ja off-line-mittauksina suoritettujen hiivan kuivapainojen sekä OD600:n osalta. Kalibroinneissa käytettiin TruCell2-solutiheysanturin jännitesignaalin ja kuivapainojen sekä OD600:n arvoja. Muodostettiin lineaarinen sovitus (kuvat 35 ja 36), toisen asteen polynomisovitus (kuvat 37 - 40) sekä sovitus TruCell2-solutiheysanturin mukana toimittamalla Java-pohjaisella Curve Fitter -sovelluksella (kuvat 41 - 44). Curve Fitterin osalta mittalaitteen antama AU-lukema korvattiin tietokoneelle taltioidulla jännitesignaalilla. Biomass Monitor 220 -laitteen kapasitanssimittausten osalta ei tehty sovituksia, koska kuivapaino- ja OD600-mittauksilla ei voida erotella eläviä soluja.

TruCell2-solutiheysanturi käyttää mittauksessaan lähi-IR-valoa ja mittauksessa oletetaan suurimman osan optisen häviön mekanismeista muodostuvan valon sironnasta. Valon sironna etenkin suuremmilla solupitoisuuksilla kasvaa epälineaarisesti. Curve Fitter käyttää sovituksessaan Levenberg–Marquardt -algoritmia ja sovelluksen periaate sekä siinä käytetty funktio on esitetty liitteessä 3. Funktiossa vakio A kuvaa nollasta poikkeavaa arvoa (offset); vakio B sironnasta aiheutuvaa kerrointa (effective scattering coefficient); vakio C sironnan aiheuttamaa vakiota (scattering constant) ja vakio D kuvaa absorptiokerrointa (absorption coefficient). (Finesse 2007a: 91 - 94.)

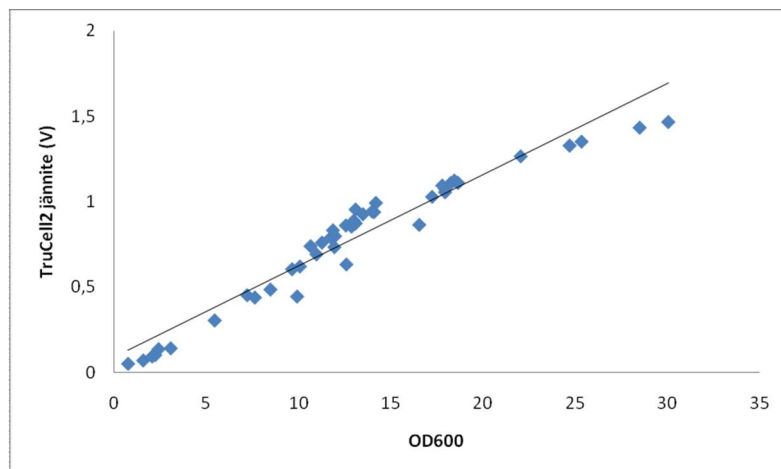
Jotta eri käymisprosessien mittaukset saataisiin mahdollisimman vertailukelpoisiksi, otettiin kaikissa mittaustuloksissa huomioon ns. nollassa. Nollataso saatiin selville mittaamalla käymisprosessissa käytettyä vierrettä ennen hiivan lisäämistä.

Curve Fitteriin syötettyjen mittaustulosten avulla saatiin vakiot (A, B, C, D), joiden perusteella oli mahdollista laskea hiivan kuivapainojen ja OD600:n arvot TruCell2-solutiheysanturin jännitesignaalin perusteella. Lasketut arvot saatiin ratkaisemalla funktiosta  $X_{PU}$  (liite 3).  $X_{PU}$  ratkaistiin käyttämällä Excelin solveria (ratkaisija) siten, että  $Y_{AU}$  (mitattu jännite), A ja B siirrettiin funktion oikealle puolelle ja laskettiin omaan soluun ("oikea puoli"). Muut tekijät siirrettiin funktion vasemmalle puolelle ja laskettiin omaan

soluun ("vasen puoli"). Solverissa muutettavaksi soluksi asetettiin ratkaistava  $X_{PU}$  -solu, ja kohdesoluksi valittiin "vasen puoli" -solu. Reunaehdoksi asetettiin "vasen puoli" ja "oikea puoli" -solut yhtä suuriksi.



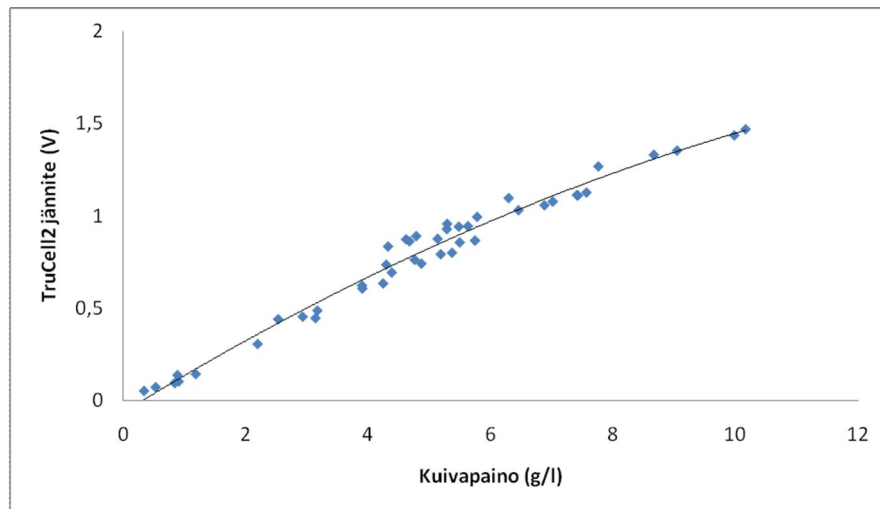
Kuva 35. Suora lineaarinen sovitus TruCell2-jännite kuivapainon funktiona.



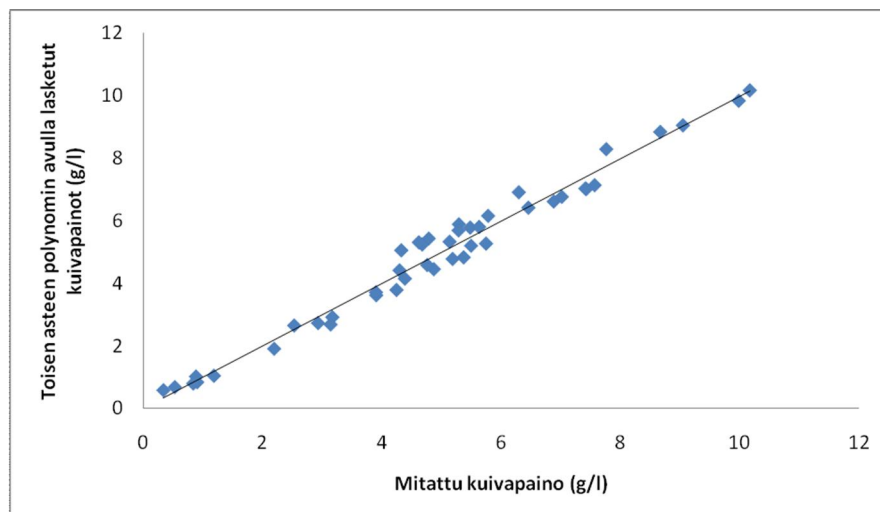
Kuva 36. Suora lineaarinen sovitus TruCell2-jännite OD600:n funktiona.

Kuvien 35 ja 36 perusteella nähdään, että alhaisilla solupitoisuuksilla lineaarinen sovitus vaikuttaisi hyvältä, mutta suuremmilla pitoisuuksilla epälineaarisuus alkaa näkyä, koska valon sironta kasvaa tavallisesti epälineaarisesti solukonsentraation ja sameuden kasvaessa. Lineaarinen sovitus näyttäisi kuitenkin olevan sopiva, kun kuivapainot ovat alle 8 g/l ja OD600-arvot alle 25.



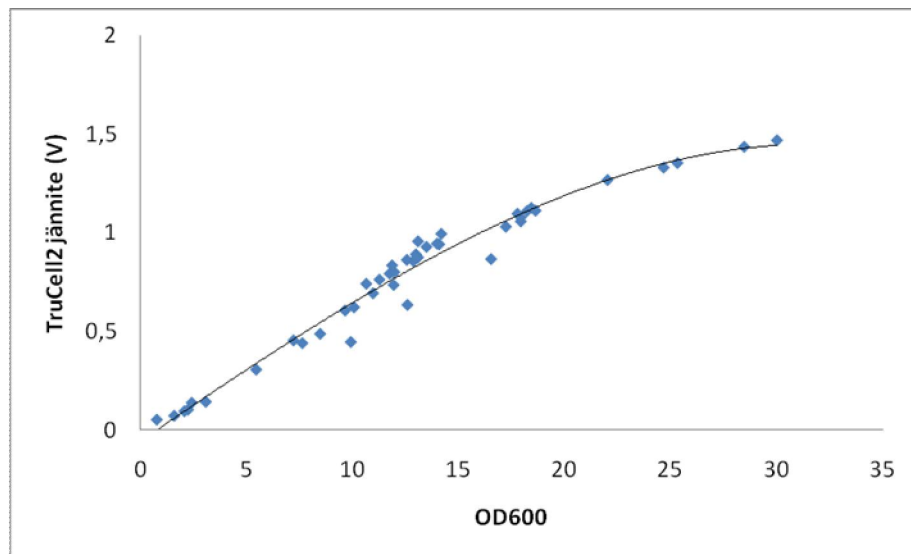


Kuva 37. Toisen asteen polynomisovitus TruCell2-jännite kuivapainon funktiona.

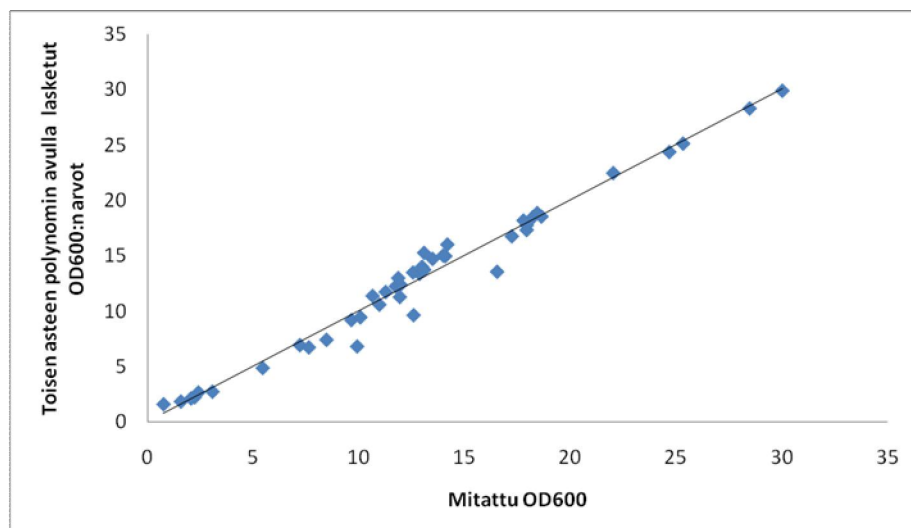


Kuva 38. Toisen asteen polynomisovituksen avulla lasketut kuivapainot mitattujen kuivapainojen funktiona.

Kuvien 37 ja 38 perusteella toisen asteen polynomisovitus näyttäisi paremmalta kuin lineaarinen sovitus koko mittausalueella.

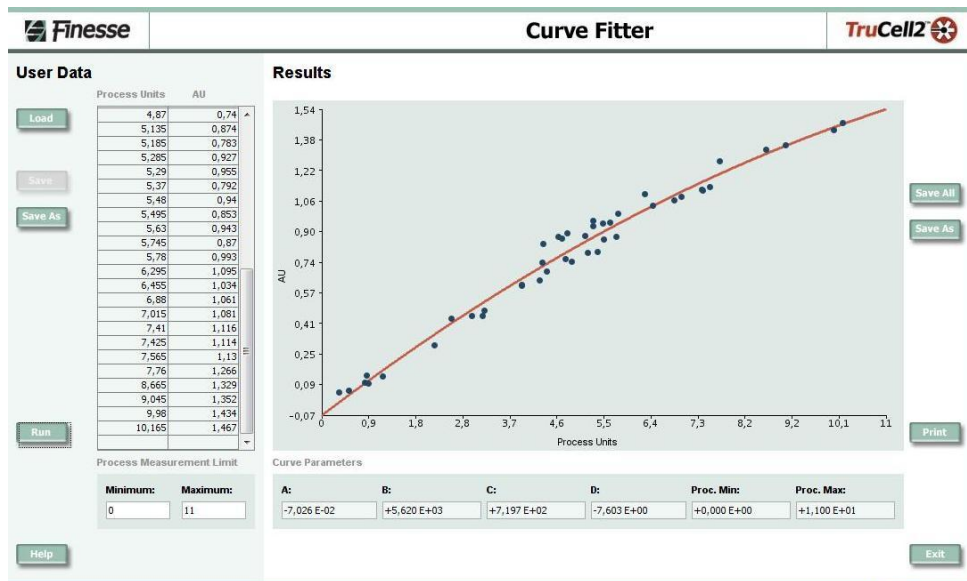


Kuva 39. Toisen asteen polynomisovitus TruCell2-jännite OD600:n funktiona.

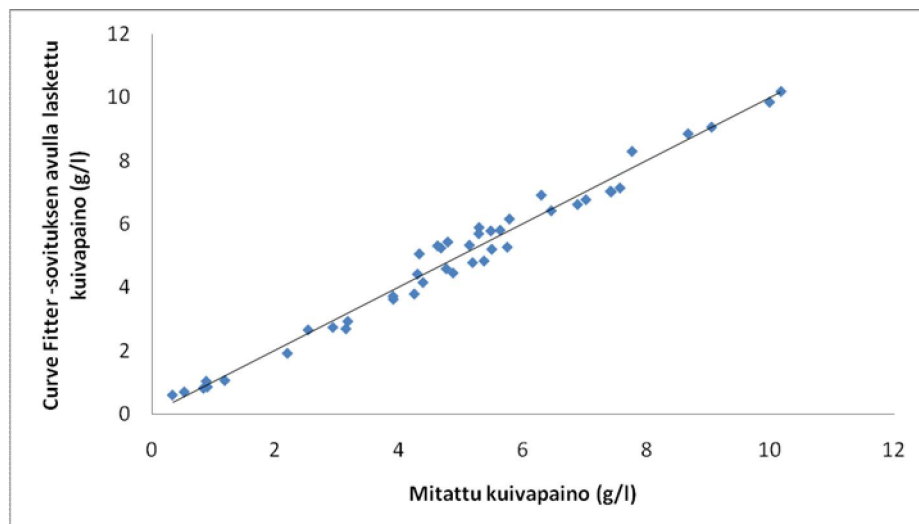


Kuva 40. Toisen asteen polynomin avulla lasketut OD600:n arvot mitattujen OD600-arvojen funktiona.

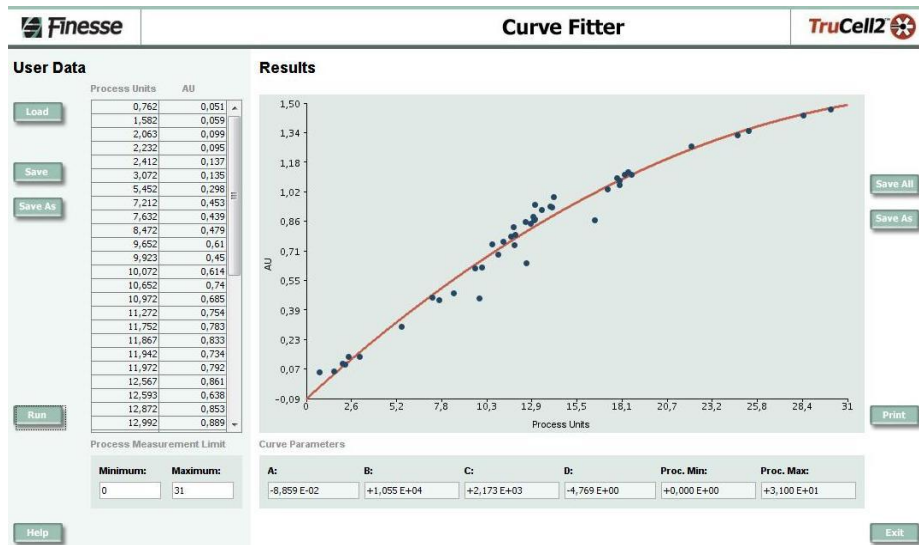
Kuvien 39 ja 40 perusteella toisen asteen polynomisovitus näyttäisi paremmalta myös OD600-arvoille kyseisellä mittausalueella. Kuvissa näkyvät kolme poikkeavaa mitta-pistettä ovat TP05-käymisprosessista ja johtuvat todennäköisesti suuremmasta vaahdonestoaineen määrästä käymisen aikana, tai vaihtoehtoisesti mittaajan tekemästä mit-tausvirheestä.



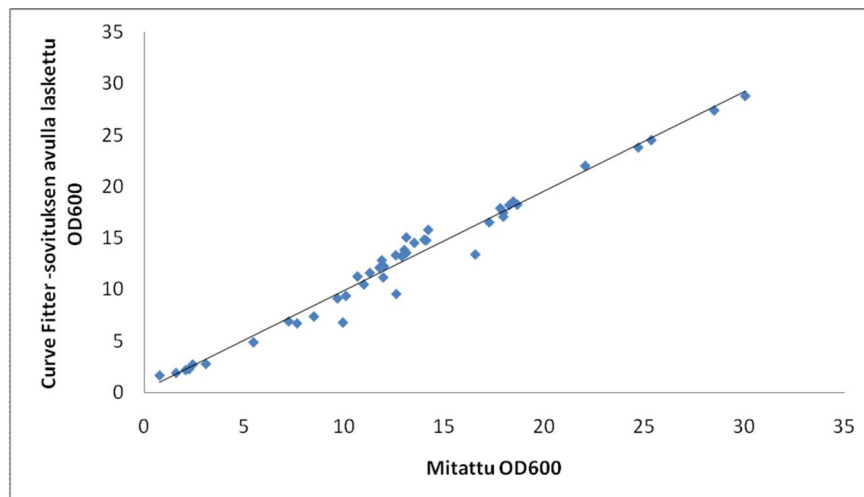
Kuva 41. Curve Fitter -sovitus TruCell2-jännitteen ja hiivan kuivapainon funktiona.



Kuva 42. Curve Fitter -sovituksen avulla lasketut kuivapainot mitattujen kuivapainojen funktiona.



Kuva 43. Curve Fitter -sovitus TruCell2-jännitteen ja OD600:n funktiona.

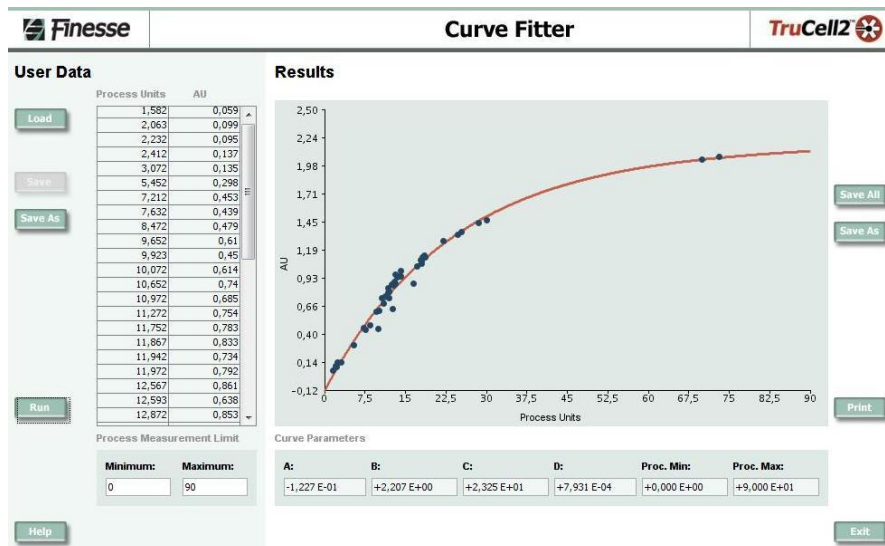


Kuva 44. Curve Fitter -sovituksen avulla lasketut OD600-arvot mitattujen OD600-arvojen funktiona.

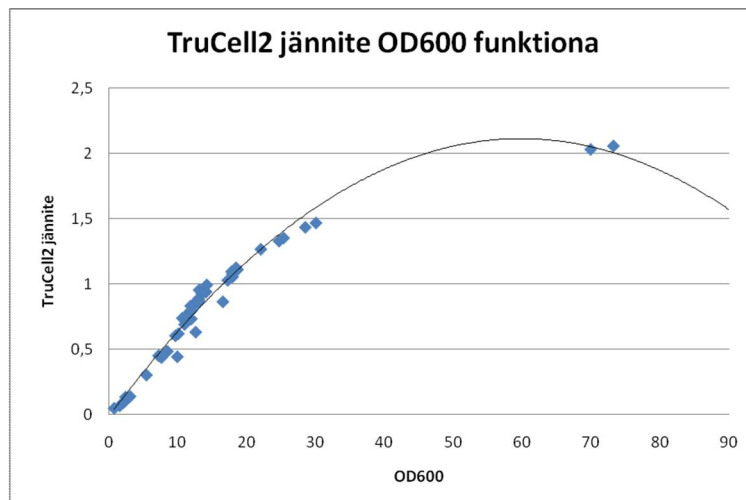
Kuvista 41, 42, 43 ja 44 nähdään, että sovitukset ovat varsin samankaltaisia kuin toisen asteen polynomisovitukset. Tässäkin tapauksessa sovitukset näyttävät lineaarisia sovituksia paremmilta.

Lisäksi kokeiltiin millainen sovitus OD600-arvojen ja TruCell2-jännitteen välille muodostuisi, kun mittaustuloksiin lisättiin sameuspitoisuudeltaan selvästi käymisprosesseja suurempia arvoja (kuvat 45 ja 46). Suuremmat arvot oli mitattu erillisestä aerobisesta hiivakasvatuksesta, jossa TruCell2-solutiheysanturin mittausta kokeiltiin ensimmäisiä kertoja. Sovitusta ei siis voida pitää vertailukelpoisena aikaisemmin esitettyihin kalib-

rointeihin, mutta sen avulla voidaan kuitenkin havainnollistaa polynomi- ja Curve Fitter-sovituksen mahdollista eroavaisuutta sameuden kasvaessa.



Kuva 45. TruCell2-jännite OD600:n funktiona korkeammilla mittausarvoilla Curve Fitter -sovituksena.

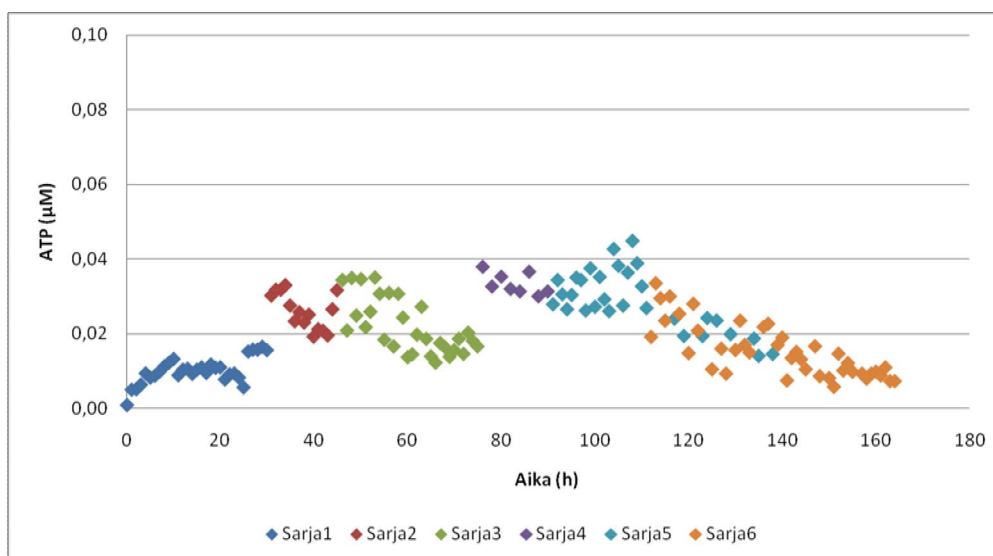


Kuva 46. TruCell2-jännite OD600:n funktiona korkeammilla mittausarvoilla toisen asteen polynomisovituksena.

Kuvien 45 ja 46 perusteella Curve Fitter -sovitus näyttäisi olevan parempi korkeammilla sameuspitoisuuksilla, koska toisen asteen polynomisovitus on saavuttanut huippunsa ja lähtee laskuun. Näin ei todellisuudessa tapahtuisi johtuen TruCell2-soluliheysanturin mittausperiaatteesta.

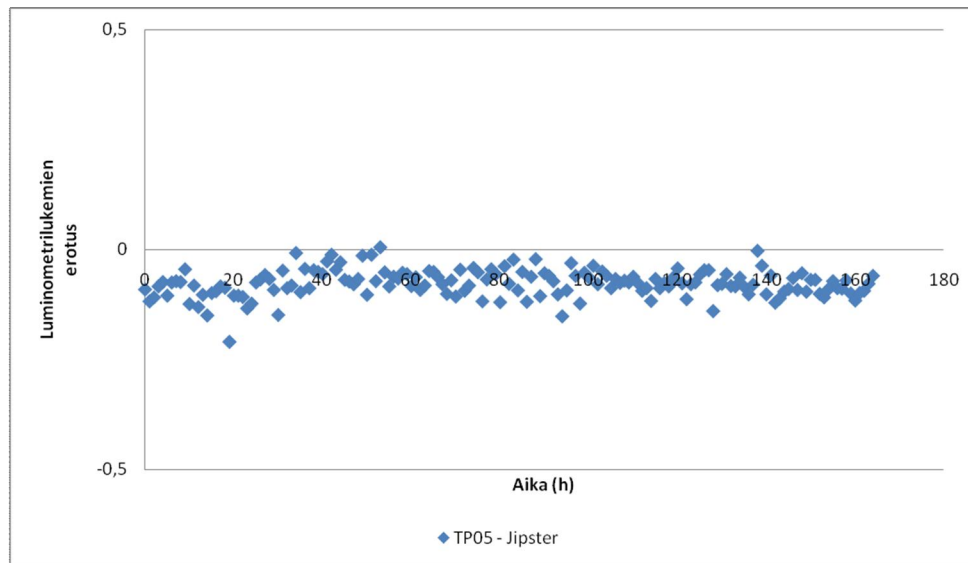
## 9.6 ATP ja AK

ATP- ja AK-mittaukset suoritettiin vain TP05:n Jipster-näytteiden osalta. ATP:n mittaustulokset on esitetty kuvassa 47 ja adenylaattikinaasin tulokset kuvassa 48. Molemmat määritykset tehtiin off-line-menetelminä manuaalisesti ja tästä syystä näytteet jouduttiin analysoimaan useammassa erässä. Ensimmäisen mittaussarjan jälkeen havaittiin, että ATP-testin reaktioliuoksen mittaussvaste laski selvästi jo tunnin sisällä valmistuksesta. Lisäksi adenylaattikinaasin määrittämisessä havaittiin varsinaisen reaktioliuoksen antaman taustan arvon olevan varsin suuri, ja taustan arvo kasvoi hieman reagenssin vanhentumisesta johtuvan virheen minimoimiseksi muiden mittaussarjojen määritykset suoritettiin satunnaistetussa järjestyksessä. Tuloksissa havaittiin tämän jälkeen suurta hajontaa etenkin ATP:n kohdalla, minkä takia tuloksia voidaan pitää vain suuntaa antavina.



Kuva 47. ATP:n mittaustulokset TP05:n Jipster-näytteiden osalta

Kuvasta 47 nähdään, että ATP-pitoisuus näyttäisi nousevat hieman kasvatuksen edetessä mutta kääntyy sitten laskuun noin 110 tunnin kohdalla, jolloin maltoosi on loppunut. Tulosten varmistamiseksi olisi kuitenkin tarvittu parempi ja nopeampi määrittämis menetelmä, koska reaktioliuoksen aktiivisuus laski nopeasti määrittysten aikana.



Kuva 48. Adenylaattikinaasin tulokset TP05:n Jipster-näytteiden osalta. Luminometrilukemien erotuksella tarkoitetaan 5 minuutin reaktioajan ja 0 minuutin reaktioajan mittaustulosten erotusta.

Kuvasta 48 nähdään, että 5 minuutin ja 0 minuutin reaktioaikojen erotukset ovat joko hyvin lähellä nollaa tai negatiivisia. Tämän perusteella voidaan todeta, että solunulkoisissa näytteissä AK-pitoisuuksissa ei esiintynyt merkittäviä muutoksia tai vaihtoehtoisesti käytetyllä määrittämissä menetelmällä ei pystytty havaitsemaan tarpeeksi pieniä AK-pitoisuuksia. Määrittämissä aikana havaittiin, että vierre todennäköisesti laskee AK:n havaitsemisrajaa, koska lisäämällä esimerkiksi 10 µl vierrettä reaktioliuokseen ja standardin joukkoon, saatu mitta-arvo 5 minuutin reaktioajan oli noin kaksi kertaa pienempi verrattuna arvoihin ilman vierteen lisäämistä.

Tulosten esittäminen kahden reaktioajan erotuksena tehtiin myös siitä syystä, että AK-testin reaktioliuoksen antama tausta oli varsin suuri, ja taustan arvo nousi reagenssin vanhetessa. Näin ollen päätettiin siihen, että adenylaattikinaasia todettiin esiintyvän kun 5 minuutin reaktioajan jälkeen mittauslukema oli noussut korkeammalle kuin näytteen lisäyksen jälkeen mitattu lukema (0 minuutin jälkeen).

## 9.7 FT-NIR-tulokset

FT-NIR-mittaustulokset käsiteltiin VTT:llä Lea Räsänen, Risto Hiukan ja Juha Kauniston toimesta. Mallinnuksessa käytettiin OPUS-ohjelmistoa (Bruker Optics, Saksa). Mallinnukset tehtiin TP05-käymisen manuaalinäytteiden perusteella glukoosin, maltoosin, etanolin, glyserolin ja biomassan osalta (liite 4). Tuloksista nähdään, että glukoosin ja biomassan osalta malli näyttäisi olevan vertailukelpoinen suhteessa muihin mittausten menetelmiin. Glukoosin loppuminen mallin mukaan näyttäisi tapahtuvan noin 25 tunnin kohdalla, minkä myös HPLC-analyysit osoittavat. Lisäksi muiden biomassamittausmenetelmien ohella, myös FT-NIR-biomassan mittauksessa on havaittavissa hiivan eri kasvuvaiheet. Toisaalta FT-NIR-mallissa solutiheys lähtee selvästi muita menetelmiä jyrkemmin laskuun noin 100 tunnin kohdalla todennäköisesti maltoosin loppumisen johdosta. FT-NIR-malleissa maltoosin, etanolin ja glyserolin osalta on havaittavissa selvä mittaushajonnan kasvu noin 50 tunnin jälkeen. Tämän johdosta esimerkiksi tarkkaa maltoosin loppumishetkeä ei voida todeta. Etanolin ja glyserolin osalta voidaan nähdä pitoisuuksien tasoittuminen, mutta tarkkoja arvoja ei voida esittää mallien perusteella. Hajonnan voimakas kasvu johtuu todennäköisesti liian vähäisistä kalibrointipisteistä, koska mallit tehtiin vain manuaalinäytteiden perusteella. Kunnollisen kalibrointien aikaansaantia vaikeuttaa lisäksi sokereiden NIR-spektrien voimakas päällekkäisyys (Arnold 2004: 2586). Paremmat tulokset olisi todennäköisesti saatu käyttämällä kalibrointipisteinä HPLC-analyysien tuloksia Jipste-näytteenottokarusellilla otetuista näytteistä, mutta tätä ei ehditty suorittaa työn aikana.

Liitteessä 5 on esitetty FT-NIR-spektrejä eräästä käymisprosessista. Spektreistä nähdään, että ilman kemometriaa erojen havaitseminen spektrien välillä olisi lähes mahdotonta.



## 10 Yhteenveto

Opinnäytetyössä kehitettiin uutta bioreaktoreissa käytettävää näytteenottolaitetta, selvitetiin kolmen eri in-situ on-line-mittalaitteen soveltuvuutta panimohiivan käymisprosessin monitorointiin vaihtelevissa kasvuolosuhteissa, ja mitattiin ATP- sekä adenylaattikinaasipitoisuuksia yhdestä kasvatuksesta. Käytettävät mittalaitteet olivat TruCell2-solutiheysanturi, Biomass Monitor 220 ja Matrix-F FT-NIR. Lisäksi saatuja mittaustuloksia vertailtiin off-line-menetelminä mitattuihin hiiva kuivapainoihin sekä optisen tiheyden arvoihin aallonpituudella 600 nm.

Näytteenottolaitteiston kehityksessä ratkaistiin laitteen tiiviytteen liittyviä ongelmia sekä parannettiin näytteenottosekvenssiä ja sterilointisekvenssin turvallisuutta. Suodatuksen osalta suodatuspinta-alaa saatiin nostettua ja paineen jakautuminen suodatinväliaineelle saatiin tasaisemmaksi männän päätykappaleeseen tehdyillä muutoksilla. Tasaisempi paineen jakautuminen antoi paremman kestävyuden monikerrossuodattimille, mutta ensimmäisen erän suodattimien rakenne oli liian heikko kestämään nesteiden suodatusta tarvittavilla paineilla. Toisen erän monikerrossuodattimissa paineen kestävyys oli parempi eikä rikkoontumisia enää tapahtunut. Kiintoaineen erotus monikerrossuodattimilla ei kuitenkaan onnistunut toivotulla tavalla. Suodatusta vastustavat voimat olivat liian suuria johtuen todennäköisesti joko suodatinmateriaalin hydrofobisuudesta tai suodatinmateriaalin tukkeutumisesta. Tapauksissa, joissa kiintoaineen erotus onnistui, permeaattivuo jäi kuitenkin olemattoman pieneksi. Kaasun puhallus monikerrossuodattimien läpi onnistui. Keraamisten suodattimien osalta solupartikkeleiden pidätys ei onnistunut tarpeeksi tehokkaasti tai suodatusta vastustavat voimat olivat liian suuria, jolloin ei saatu lainkaan permeaattia. Kaasujen puhallus keraamisten suodattimien läpi onnistui.

Korkean kuiva-ainepitoisuuden omaavissa kasvatuksista pelkän kiintoaineen näytteenotto onnistui hyvin ja näytteenotto oli toistettavissa. Kyseiset kasvatukset eivät tosin olleet luonteeltaan täysin aseptisia eikä tästä syystä näytteenoton aseptisuuden varmistamista tutkittu.

Työn aikana näytteenottolaitteen yleinen toimivuus saatiin tyydyttävälle tasolle, ja jatkokokehityksen kannalta tulisi keskittyä suodatinongelmien ratkaisuun sekä näytteenoton aseptisuuden varmistamiseen. Suodatusongelmien ratkaisuna voisi olla suodatinmateriaalin hydrofiilisyyden parantaminen, huokoskoon suurentaminen tai suodatuksen muuttaminen kaksiosaiseksi. Kaksiosaisessa suodatuksessa männässä oleva suodatin korvattaisiin pienemmän virtausvastuksen omaavalla esisuodattimella ja lopullinen partikkeleiden erotus nesteestä tapahtuisi myöhemmin cross-flow-suodatuksena. Tämä toisaalta pitkittäisi suodatusaikaa, jolloin näyte ei enää välttämättä olisi tarpeeksi edustava.

ATP:n osalta havaittiin pientä kasvua TP05-käymisen keskivaiheilla, mutta adenylaattikinaasin pitoisuuksissa ei havaittu muutoksia. Lisäksi molempien menetelmien mittauksien todettiin olevan vain suuntaa antavia, ja molempia määrittämenetelmiä tulisi kehittää paremmiksi luotettavien tulosten saamiseksi. Panimohiivan käymisprosessin monitorointiin käytettyjen mittalaitteiden: TruCell2, Biomass Monitor 220 ja Matrix-F FT-NIR todettiin soveltuvan in-situ on-line-mittaamiseen. TruCell2-solutiheysanturin ja Biomass Monitor 220 -laitteen todettiin soveltuvan biomassan mittaukseen. Lisäksi TruCell2-solutiheysanturin tulokset olivat vertailukelpoisia off-line-menetelmänä mitattujen OD600:n ja hiivan kuivapainojen kanssa.

Matrix-F FT-NIR -laitteen todettiin soveltuvan myös biomassan mittaamiseen, mutta kasvualustan komponenttien mittauksessa olisi tarvittu enemmän kalibrointipisteitä luotettavien mallinnusten saamiseksi. Paremmat mallit eri alustakomponenttien osalta voitaisiin todennäköisesti saada käyttämällä HPLC-tuloksia automaattisen cross-flow -suodatuksen avulla otetuista näytteistä, mutta kaikkien käymisprosessien näytteitä ei kuitenkaan ehditty analysoida HPLC:llä työn aikana. Työn aikana automaattisella cross-flow-suodatuksella otetut näytteet ehdittiin analysoida kokonaisuudessaan vain TP05:n osalta, mutta näillä tuloksilla ei ehditty muodostaa uusia FT-NIR-malleja.

## Lähteet

Alfenore, S., Delia, M-L., Strehaiano, P. 2003. Use of ATP measurements by bioluminescence to quantify yeast's sensitivity against a killer toxin. *Analytica Chimica Acta*.

Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. 2002. *Bioprosessitekniikka*. Porvoo: WSOY.

Arnold, M.A., Small, G.W., Xiang, D., Qui, J., Murhammer, D.W. 2004. Pure Component Selectivity analysis of Multivariate Calibration Models from Near-Infrared Spectra, *Analytical Chemistry*.

Arkiomaa, M. 2005. FT-NIR-analytiikan soveltaminen hillosokerin laadunvalvontaan. *Insinööriyö*. EVTEK-ammattikorkeakoulu.

Becker, T., Hitzmann, B., Muffler, K., Pörtner, R., Reardon K.F., Stahl, F., Ulber, R. 2007. Future aspects of bioprocess monitoring. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*.

Biomass Monitor. 2005. *Biomass Monitor Model 220 User Manual*.

Cameron-Clarke, A., Hulse, G.A., Clifton, L., Cantrell, I.C. 2003. The use of adenylate kinase measurement to determine causes of lysis in lager yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*.

Carvell, J.P., Dowd, J.E. 2006. On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing processes using radio-frequency impedance. *Cytotechnology*.

Cheng, C., Chang, K-C. 2007. Sampling, Dilution, and Loading Device-coupled High-Performance Liquid Chromatography Method for Successive On-line Analyses of Ma-

for Carbohydrate Products in Immobilized Cellulase Hydrolysate of Paper Cellulose. Analytical sciences.

Cheremisinoff, N.P. 1998. Liquid filtration. 2nd ed. USA: Butterworth-Heinemann.

Christian, G.D. 2004. 6th ed. Analytical Chemistry. USA: John Wiley & Sons.

Ferreira, A.P., Luis, M., Cardoso, J.P., Menez, J.C. 2005. Evaluation of a new annular capacitance probe for biomass monitoring in industrial pilot-scale fermentations. Journal of biotechnology.

Finesse. 2007a. Revision 2. TruCell2™ User Manual.

Finesse. 2007b. TruCell2™ Cell Density Sensor.

Gee, D.A., Ramirez, W.F. 1994. A flavour model for beer fermentation. Journal of the institute of brewing.

Guidance for industry. 2004. Guidance for industry PAT - A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. Food and Drug Administration (FDA).

Guimarães, P.M.R., Londesborough, J. 2008. The adenylate energy charge and specific fermentation rate of brewer's yeasts fermenting high- and very high-gravity worts. Yeast 2008.

Harms, P., Kostov, Y., Rao, G. 2002. Current opinion in biotechnology: bioprocess monitoring.

Heggart, H., Margaritis, A., Stewart, R.J., Pilkington, H., Sobczak, J., Russel, I. 2000. Measurement of brewing yeast viability and vitality: a review of methods. Technical Quarterly.

Jacques, K.A., Lyons, T.P., Kelsall, D.R. 2003. The Alcohol Textbook 4th Edition. England: Bath Press.

Junker, B.H., Wang, H.Y. 2006. Bioprocess monitoring and computer control: Key roots of the current PAT initiative. *Biotechnology and Bioengineering*.

Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., Eerikäinen, T. 2008. Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., Meskanen, E., Leisola, M., Eerikäinen, T. 2007. On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

Känsäkoski, M., Kurkinen, M., Von Weymarn, N., Niemelä, P., Neubauer, P., Juuso, E., Eerikäinen, T., Turunen, S., Aho, S., Suhonen, P. 2006. Process analytical technology (PAT) needs and applications in the bioprocess industry, Review. Oulu: VTT.

Laitinen, R., Toivojen, J. 1982. 15. muuttumaton painos. Yleinen ja epäorgaaninen kemia. Helsinki: Otatieto.

Matrix-F. 2009. Matrix-F FT-NIR Spectrofotometer specifications.

Mohamed, G., Evelyne, R., Engasser, J.M. 1986. An automated and sterilizable sampler for laboratory fermentors: application to the on-line control of glucose concentration. *Biotechnology and Bioengineering*.

Muurinen, M., Skarp, N. 2004. Oivaltamisen iloa laskennallisesta kemiasta. Pro-gradu tutkielma, Helsingin yliopisto, Kemian laitos.

Ojamo, H. 2008. Biotekniset yksikköprosessit. Luentomateriaali. Metropolia-ammattikorkeakoulu.

Olsson, L., Schulze, U., Nielsen, J. 1998. On-line bioprocess monitoring - an academic discipline or an industrial tool. Trends in analytical chemistry.

Pihkala, J. 1998. 3.-1 tarkistettu painos. Prosessitekniikan yksikköprosessit. Helsinki: Opetushallitus.

Reda, K.D., Thien, M.P., Feygin, I., Marcin, C.S., Chartrain, M.M., Creasham, R.L. 1991. Automatic whole broth multi-fermentor sampling. Journal of industrial microbiology.

Riekkola, M-J., Hyötyläinen, T. 2000. Kolonnikromatografia ja kapillaari-elektromiograatiotekniikat. Yliopistopaino; Helsinki.

Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, Ohba T. 2000. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. Journal of bioscience and bioengineering.

Sikdar, S.K., Bier, M., Todd, P. 1989. Frontiers in bioprocessing. USA: CRC Press.

Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. 1998. Principles of fermentation technology. 2nd ed. Great Britain: Butterworth-Heinemann.

Toivonen, J. 2007a. Epäorgaaninen ja analyttinen kemia: Spektroskopia. Luentomateriaali. EVTEK-ammattikorkeakoulu.

Toivonen, J. 2007b. Epäorgaaninen ja analyttinen kemia: IR-spektroskopia. Luentomateriaali. EVTEK-ammattikorkeakoulu.

Turner, C., Thornhill, N.F., Fish, N.M. 1993. A novel method for the on-line analysis of fermentation broth using a sampling device, microcentrifuge and HPLC. *Biotechnology Techniques*.

Ullmann's Encyclopedia. 2003. 6th edition. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Volume 12. Wiley-VCH.

Vojinović, V., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P. 2005. Real-time bioprocess monitoring Part I: In-situ sensors. *Sensors and actuators B*.

Wakeman, R., Tarleton S. 2005. Solid Liquid separation, Principles of industrial filtration. Great Britain: Elsevier.

Xiong, Z.Q., Guo, M.J., Guo, Y.X., Chu, J., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L. 2008. Real-time viable-cell mass monitoring in high-cell-density fed-batch glutathione fermentation by *saccharomyces cerevisiae* T65 in industrial complex medium. *Journal of bioscience and bioengineering*.

Zhu, L., Brereton, R.G., Thompson, R., Hopkins, P.L., Escott, R.E.A. 2007. On-line HPLC combined with multivariate statistical process control for the monitoring of reactions. *Analytica Chimica Acta*.

## Liitteet

### Liite 1: Näytteenottosekvenssi LabVIEW-ohjelmalla

The LabVIEW control panel for the sampling sequence is structured as follows:

- Start:** Input field (2), Status indicator (0).
- Resting unlocked:** Input field (2), Status indicator (0).
- Sampling 1/2:** Input field (5), Status indicator (0).
- Sampling 2/2:** Input field (5), Status indicator (0).
- Empty solid 1/5:** Input field (5), Status indicator (0).
- Empty solid 2/5:** Input field (10), Status indicator (0).
- Empty solid 3/5:** Input field (5), Status indicator (0).
- Empty solid 4/5:** Input field (10), Status indicator (0).
- Empty solid 5/5:** Input field (10), Status indicator (0).
- Break:** Input field (5), Status indicator (0).
- Wash position 1:** Input field (3), Status indicator (0).
- Wash 1/5 - sterilize:** Input field (210), Status indicator (0).
- Wash 2/5 - sterilize:** Input field (60), Status indicator (0).
- Wash 3/5 - sterilize:** Input field (5), Status indicator (0).
- Wash 4/5 - sterilize:** Input field (5), Status indicator (0).
- Wash 5/5 - sterilize:** Input field (30), Status indicator (0).

**Wash position 2:** Input field (10), Status indicator (0).

**Drying 1/3:** Input field (30), Status indicator (0).

**Drying 2/3:** Input field (90), Status indicator (0).

**Drying 3/3:** Input field (15), Status indicator (0).

**Closing:** Input field (5), Status indicator (0).

**Resting - secured:** Input field (3), Status indicator (0).

**Vaihe (Stage):** A large 'Start' button.

**Indicator Lights:**

- Festo:** Festo1, Festo2, Festo3, Festo4, Festo5.
- Steiger:** Steiger1, Steiger2, Steiger3, Steiger4, Steiger5, Steiger6, Steiger7, Steiger8.
- Valve:** Valve1, Valve2, Valve3, Valve4, Valve5, Valve6, Valve7, Valve8.

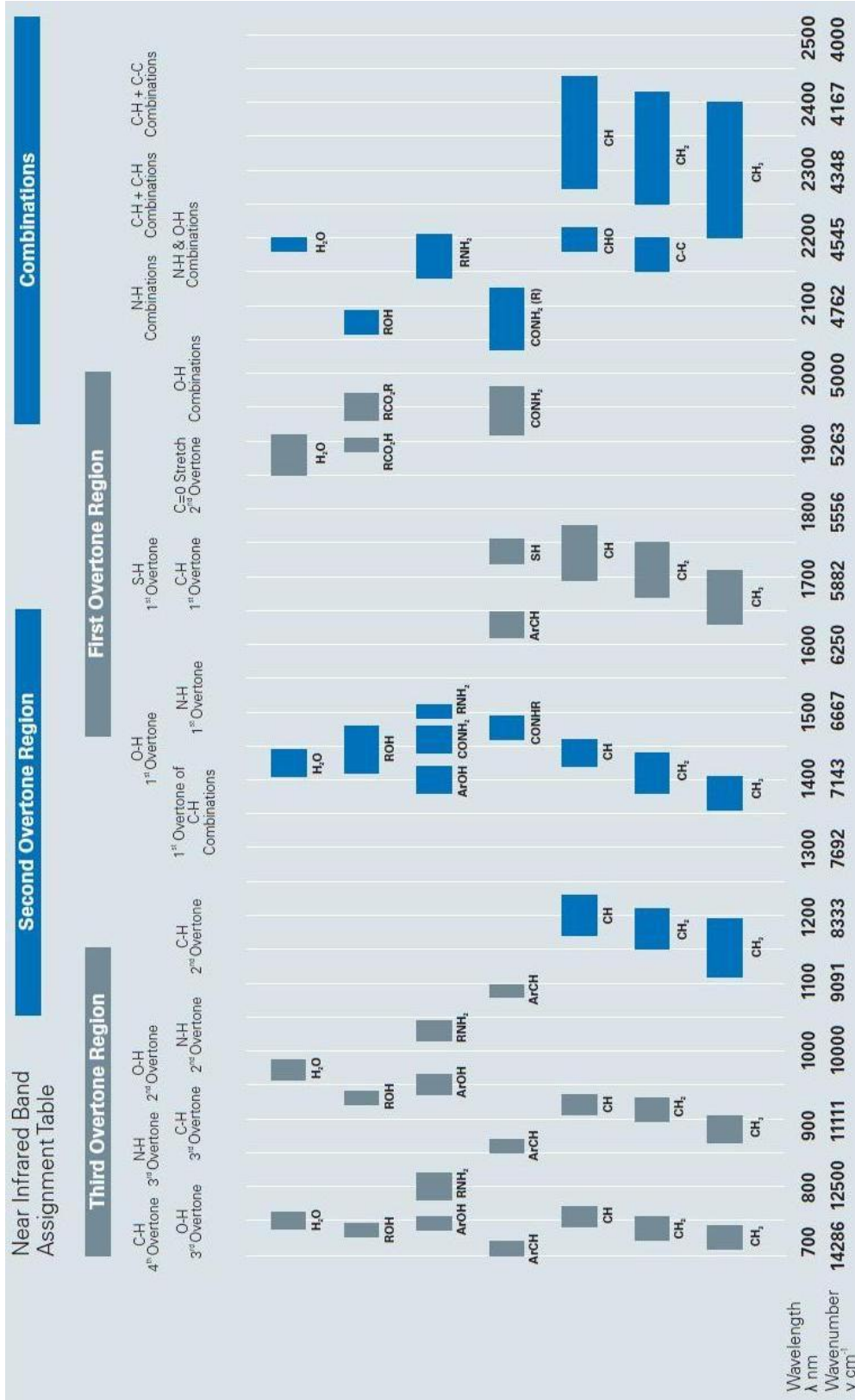
**Single sampler:** 'STOP' button, 'Close all' button, input field (0).

**Näytteenottoaika (Sampling time):** Digital clock showing '00:00:00 DD.MM.YYYY'.

**Lokitiedosto (Log file):** Text input field.



## Liite 2: Lähi-IR-värähtelyalueet



### Liite 3: Finesse Curve Fitter

This program is used to generate the parameters for the curve fit that the TruCell transmitter uses to convert raw AU data into user-defined process units. For example, it could be used to convert from raw AU to cell density (cells/mL), optical density (OD), or dry cell weight (mg/L).

Generally cells produce as much scattering as absorption, so the raw AU data will not follow Beer's Law in cellular media. In most cases, the relationship between raw AU and cell density will not be linear. Please refer to the application note entitled "Primer" for more details.

The program receives a file containing both AU and process data from a growth run, and fits that data to the equation:

$$y_{AU} = A + B \left( 1 - e^{-\frac{x_{PU}}{C}} \right) + D \cdot x_{PU}$$

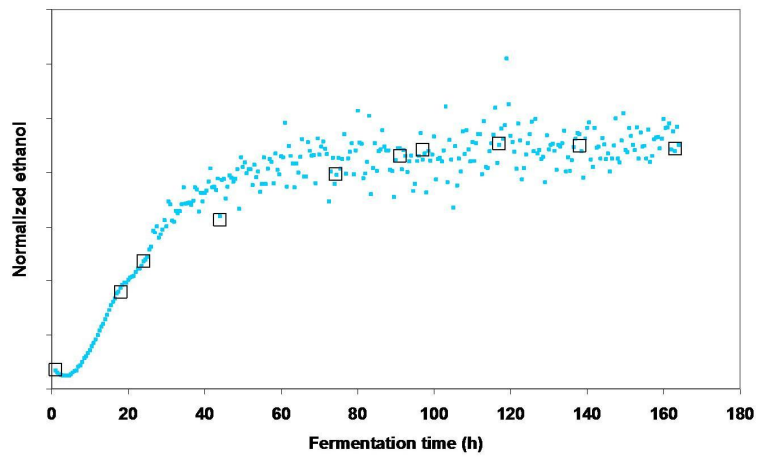
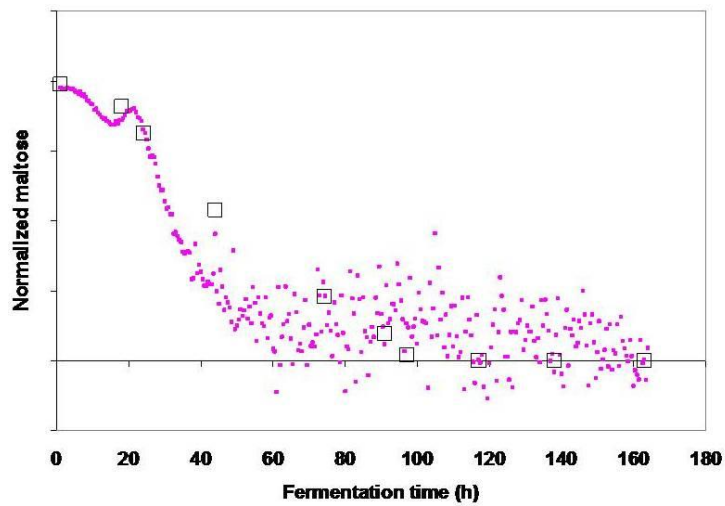
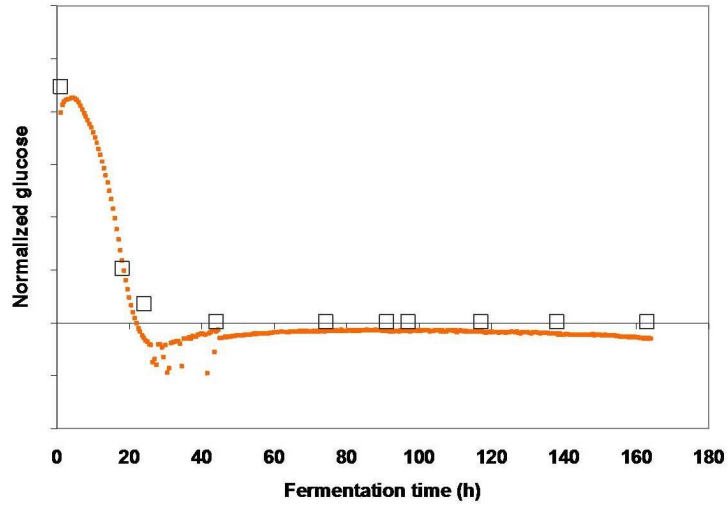
where  $x_{PU}$  is in the process units (PU) and  $y_{AU}$  is in AU.

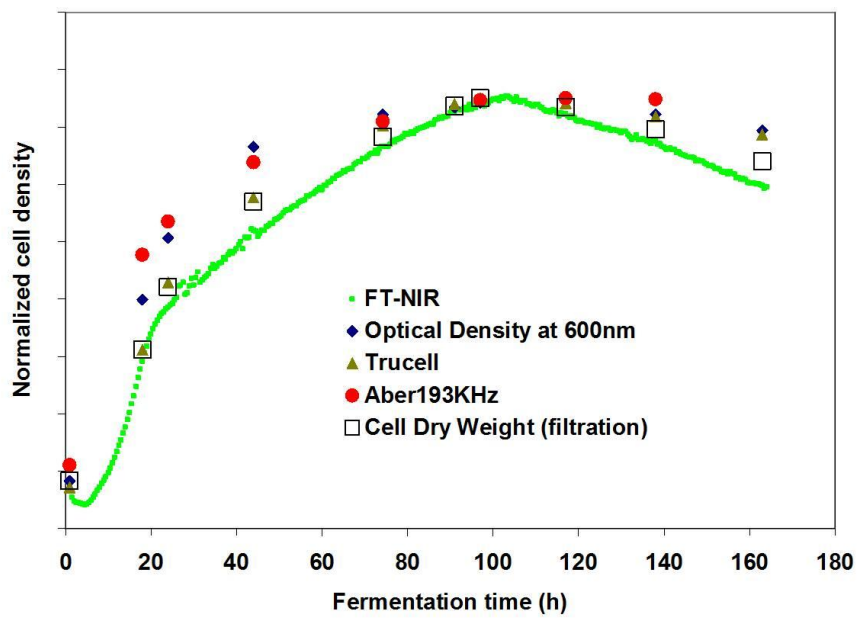
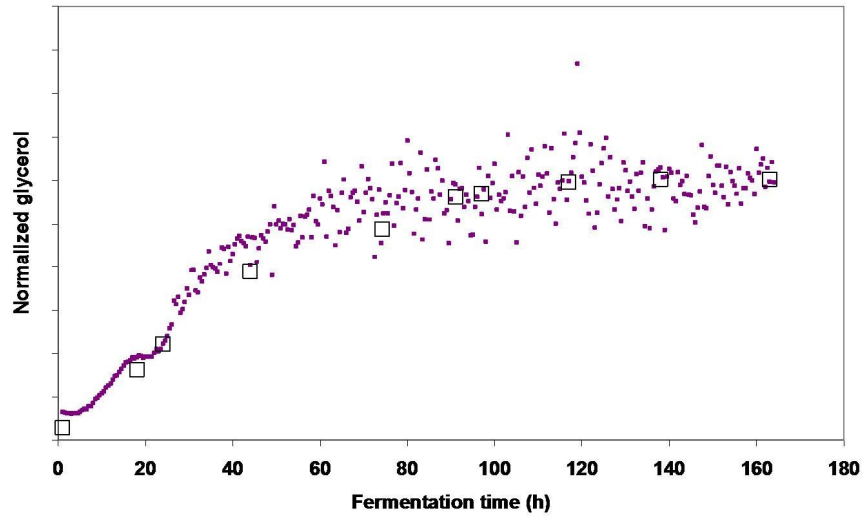
A Levenberg-Marquardt algorithm performs the curve fit. In order to improve accuracy, users should also supply minimum and maximum expected process values for their measurements. The plot range will automatically be set to these values (which are likely to be beyond the data range).

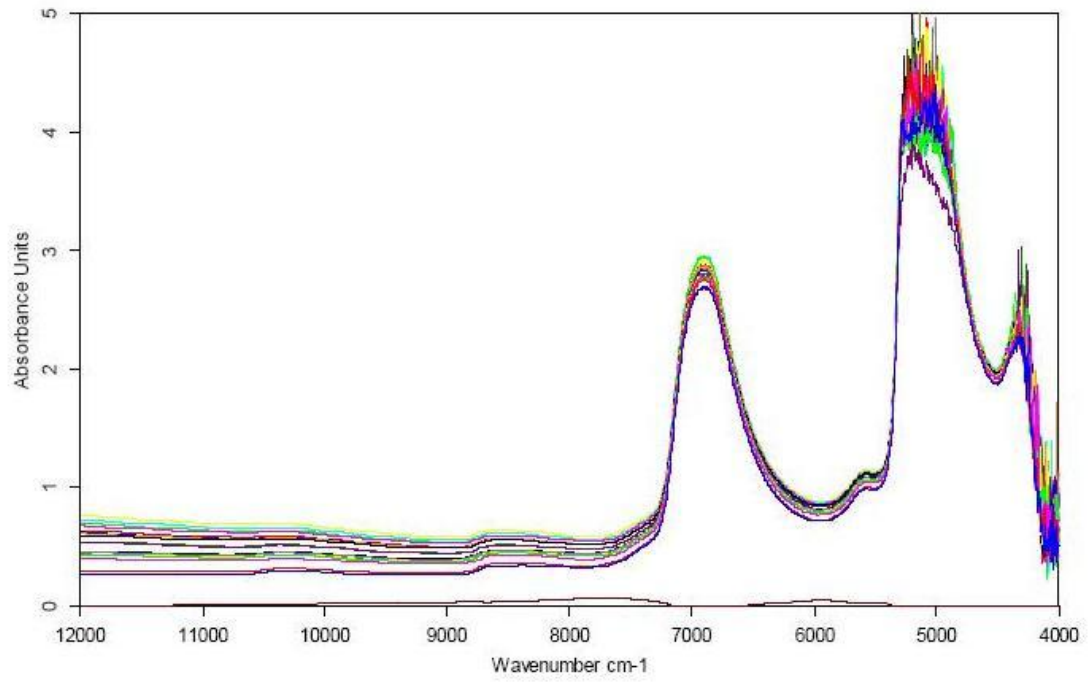
Process units are often very large units (such as millions of cells/mL). Such large numbers can generate problems for fitting algorithms, so our algorithm first scales the user data before fitting. This scaling maintains the maximum effective  $x_{PU}$ -value below 100. The scale factor is derived by taking  $\log_{10}(\text{processMax})$ . If this number is smaller than 2, a scale factor of unity is applied. However, if this number is greater than 2, the  $x_{PU}$ -values are divided by:

$$10^{\lceil \log_{10}(\text{processMax}) - 2 \rceil}$$

Inside the transmitter the curve fit is scaled using the same process.

**Liite 4: TP05-käymisprosessin FT-NIR-mallit**



**Liite 5: Käsittelymätön FT-NIR-spektri**

## Liite 6: TruCell2-anturin virtasignaali jännitteeksi muutettuna

TruCell2-anturin lähetinyksikön virtasignaali jännitteenä. Alla olevasta kuvasta nähdään reaaliaikaisesti mitatun mittausdatan muodostama kasvukäyrä ajan funktiona eräälle *Trichoderma*-suvun homeelle. Signaalin taltiointi suoritettiin LabVIEW-sovelluksella.

