

Opinnäytetyö (AMK) / (YAMK)  
Biotekniikka ja elintarviketekniikka  
Biotekniikka  
Valmistumisvuosi  
2012

Annika Järvinen

# POISTOKALA, SEN PROTEIINIT JA KALAJAUHO



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Kesäkuu 2012 | 50

Jukka Kaitaranta, yliopettaja; Anne Norström, opettaja

Annika Järvinen

## POISTOKALA, SEN PROTEIINIT JA KALAJAUHO

Proteiinit ovat tärkeitä molekyylejä, jotka osallistuvat solussa erilaisiin toimintoihin. Kala on hyvä proteiini-lähde ja kalaproteiinia saadaan maailmanlaajuisesti teollisuuden tarpeisiin useista pelagisista kaloista. Tämä tutkimus keskittyy etsimään uusia menetelmiä, joiden tavoitteena on pyrkiä vähentämään Turun saariston vähäarvoisten kalojen käyttöä vain eläinten rehuna. Työssä tutkittiin myös kalaproteiinin erotusta ja karakterisointia rehu-tuotannon raaka-aineena.

Työn suoritus koostuu kahdesta osasta: analyysit hapotetusta kalamassasta ja kalamassan spraykuivaus. Ensimmäisessä osassa karakterisoitu kalamassa analysoitiin. Analyysit sisälsivät mm. pH saostuksen. Toisessa osassa hapotettu kalamassa spraykuivattiin kalajauhoksi. Kalajauhosta analysoitiin keskimääräiset koostumukset. Aminohappomääritykset lähetettiin analysoitavaksi ulkopuoliselle yritykselle.

Hapotetun kalamassan liukenematon kuiva-ainepitoisuus muuttui säilytyksen aikana kemiallisen ja entsyymaattisen aktiivisuuden ansiosta. Proteiinit saostuivat pH:ssa 5,5 ja tätä tietoa voidaan mahdollisesti hyödyntää teollisuudessa kalajauhon tuotannossa.

Kalajauhoa tuotettiin spraykuivauksen avulla hapotetusta kalamassasta. Työssä onnistuttiin tuottamaan hyvin proteiinipitoista kalajauhoa, jonka kuiva-ainepitoisuus oli 93 %.

Tutkimus osoitti, että laadukasta kalajauhoa voidaan tuottaa spraykuivauksella Itämeren ja sen lahtien vähäarvoisista kalajajeista.

ASIASANAT:

Poistokala, proteiini, SDS-PAGE, kalajauho

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2012 | 50

Jukka Kaitaranta, Principal Lecturer; Anne Norström, Lecturer

Annika Järvinen

## LOW-VALUE FISH, IT'S PROTEINS AND FISH MEAL

Proteins are important molecules that are involved in various cell functions. Fish is rich in protein and fish protein is industrially obtained from several pelagic fish worldwide. This study focused on finding new applications for low-value fish from the Turku Archipelago sea with the aim to reduce the use of fish as such as animal feed. The separation and characterization of fish protein as raw material for animal feed production was studied.

The study consists of two parts: analysis of acidified fish mass and spray drying of acidified fish. In the first part the characteristics of fish mass were analyzed including the pH precipitation of protein. In the second part the acidified fish mass was spray dried into fish meal. The average composition of fish meal was analyzed. The amino acid analyses were sent to an external company.

The dry solids content of acidified fish mass changed continuously during the storage period due to chemical and enzymatic activity. Proteins were maximally precipitated at pH 5.5 and this property can potentially be applied to the industrial manufacturing of fish meal.

Fish meal was produced from the acidified fish mass by spray drying. High-protein fish meal was achieved having a dry solids content of about 93 per cent. This study proved that quality fish meal can be produced by spray drying from acidified low-value fish species caught from the Baltic Sea and its gulfs.

### KEYWORDS:

Low-value fish, protein, SDS-PAGE, fish meal

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 KALA RAVINTONA JA VALKUAISLÄHTEENÄ</b>	<b>9</b>
2.1 Kalastus	9
2.2 Kala elintarvikkeena	10
2.2.1 Kalan ravintokoostumus ja käyttö	10
2.2.2 Kalaproteiini ja sen ominaisuudet	11
2.3 Kalajauho	14
2.3.1 Kalajauho ja sen käyttö	14
2.3.2 Kalajauhon valmistaminen	15
<b>3 TYÖSSÄ KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSIT</b>	<b>18</b>
3.1 Työssä käytetyt laitteet	18
3.1.1 Sigma Laboratory Centrifuges	18
3.1.2 Multiscan RC	18
3.1.3 Spraykuivauspilotti Mobbille Minor <sup>TM</sup> Basic	19
3.1.4 Orion Research 420A+ pH/MV/Lämpömittari	20
3.1.5 Kjeltec Auto Distillation Unit	20
3.1.6 Digestion System 2000	21
3.2 Työssä käytetyt reagenssit	21
3.2.1 Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesigeeli	21
3.2.2 Muut reagenssit ja liuokset	21
<b>4 TYÖN SUORITUKSESSA KÄYTETYT MENETELMÄT</b>	<b>22</b>
4.1 Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesi	22
4.2 Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen	24
4.3 Proteiinimääritys	24
4.4 Raakaproteiinimääritys	24
4.5 Spraykuivaus	26
<b>5 KOKEELLINEN OSUUS</b>	<b>27</b>
5.1 Proteiinipitoisuuden määrittäminen Bradford-menetelmällä	28
5.2 Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen	32
5.3 Raakaproteiinin määrittäminen poistokalasta	36

5.4 Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesi (SDS-PAGE)	40
5.5 Spraykuivaus	42
<b>TULOSTEN YHTEENVETO JA PÄÄTELMÄT</b>	<b>45</b>
<b>6 LÄHTEET</b>	<b>48</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Käytetyt reagenssit, liuokset ja niiden valmistus.  
 Liite 2. Massavirta-diagrammi.  
 Liite 3. Syöttönopeus-diagrammi.

## KUVAT

Kuva 1. Aminohapon rakenne. R= aminohapon sivuketju.	12
Kuva 2. Lihaspoteiinin käyttäytyminen eri olosuhteissa.	14
Kuva 3. Kalajauhon valmistuskaavio.	16
Kuva 4. Spraykuivauksella tuotettu kalajauho.	17
Kuva 5. Spraykuivauspilotti toimintavalmiudessa ja kuivaamassa kalajauhoa etuastiaan.	19
Kuva 6. SDS-PAGE-ajolaitteisto.	23
Kuva 7. Kalamassa murskauksen jälkeen.	28
Kuva 8. Bioradin Precision Plus Protein Dual markerin raitojen koot.	41
Kuva 9. Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesi.	42
Kuva 10. Kuva spraykuivatun kalajauhon värierioista.	44

## KUVIOT

Kuvio 1. Kalajauhon hintakehitys lokakuusta 2011- huhtikuuhun 2012.	16
Kuvio 2. Proteiinin pitoisuus ei sentrifugoidusta näytteessä eri pH-alueilla Bradford-menetelmällä mitattuna.	30
Kuvio 3. Proteiinin liukoisuus Bradford-menetelmällä.	32

## TAULUKOT

Taulukko 1. Standardin laimennustaulukko.	29
Taulukko 2. Proteiinipitoisuus Bradford-menetelmällä.	29
Taulukko 3. Proteiinipitoisuus Bradford-menetelmällä.	31

Taulukko 4. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalamassasta.	33
Taulukko 5. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalamassasta ennen spraykuivausta.	34
Taulukko 6. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalajauhon ensimmäisestä erästä.	34
Taulukko 7. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen uudesta kalamassasta ennen spraykuivausta.	35
Taulukko 8. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalajauhon toisesta erästä.	36
Taulukko 9. Raakaproteiinitulokset käsittelemättömästä massasta.	37
Taulukko 10. Raakaproteiinin määrittäminen supernatantista.	38
Taulukko 11. Raakaproteiinin määrittäminen kalajauhon ensimmäisestä erästä.	39
Taulukko 12. Raakaproteiinin määrittäminen kalajauhon toisesta erästä.	39

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö oli osa Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RTKL) johtamaa Tekes-hanketta, ”Fish-in-use”-projektia. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia proteiineja ja niiden erotusta poistokalasta, jonka määrä kasvaa koko ajan vesistöjen rehevöitymisen ansiosta. Vesistöjen rehevöityminen on runsasta erityisesti Suomenlahden ja Saaristomeren rannikkoalueilla. Poistokalastuksen on tarkoitus parantaa Itämeren tilaa, sillä kalastuksen kautta vesistöistä poistuu runsaasti rehevöittäviä ravinteita. Lisäksi poistokalastus tekee tilaa elintarvikkeena hyödynnettäville kalalajeille.

Vähäarvoisen kalan pyynnillä on suuri vaikutus ravinteiden poistossa ja näin ollen myös vesialueiden rehevöitymisen ehkäisemisessä. Tuhat tonnia lahnaa ja särkeä sisältää noin 7–8 tonnia fosforia ja 27–28 tonnia typpeä. Jos poistokalaa pyydetään 10 000 tonnia, niin saalis sisältää noin 75 tonnia fosforia. Kyseinen määrä on puolet Suomelle määritetystä 150 tonnin fosforikuormituksen vähentämistavoitteesta, johon Suomi on sitoutunut HELCOMin toimintaohjelmassa (Etelä-Suomen Kalatalousohjelma 2011).

Suomessa ei ole kalajauhoteollisuutta, koska se vaatisi suurta ja tasaista raaka-ainevirtaa. Merkittävässä kalastusta rajoittavissa maissa vähempiarvoisia kaloja hyödynnetään kalajauhona rehuutuotantoon. Koko ajan kehitellään uusia menetelmiä kalojen tehokkaaseen keräämiseen ja käsittelyyn. Tässä työssä käytetyssä menetelmässä poistokalat säilötään kalastuksen jälkeen muurahaishapolla. Hapotettu kalamassa sopii sellaisenaan turkiseläinten rehun raaka-aineeksi (Thorkelsson ym, 2009).

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen mukaan särkikalojen pyyntipotentiali on rannikkovesissä 5–10 miljoonaa kiloa. Lisäksi Suomessa syntyy kalan perkauksen ja jalostuksen sivutuotteita noin 20 miljoonaa kiloa, joten raaka-ainetta on tarjolla kalajauhoteollisuuteen tarpeeksi. Suuri osa särkikaloista ja perkausjätteistä käytetään nykyisin hyödyksi sellaisenaan turkiseläinten rehuna.

Kalaproteiinin ja sen käyttöön liittyviä tutkimuksia on tehty maailmalla lukuisia, mutta ne ovat keskittyneet aina paikallisiin kalakantoihin, jotka eivät vastaa Suomen olosuhteita. Suomen vesistöissä on runsaasti vähäarvoisia särkikaloja, kun taas muualla maailmassa on paljon muita kalakantoja. Tutkimusten tuloksia ei voi suoraan verrata tosiinsa, sillä jokaisella kalalajilla on sille ominainen ravintokoostumus, mikä vaikuttaa käsittelymahdollisuuksien valintaan ja tuoteominaisuuksiin. Kalat luokitellaan usein niiden rasvapitoisuuksien mukaan. Särkikalat kuuluvat puolirasvaiseen kalaryhmään (Lehtinen ym, 1999).

Tässä työssä keskitytään tutkimaan Suomen vesistöjen poistokaloja ja niiden hyödyntämistä muutenkin kuin rehukäytössä. Opinnäytetyössä tutkitaan poistokalaproteiinin ominaisuuksia rehuraaka-aineena. Nykyään särkikaloja, jotka muodostavat merkittävän osan poistokaloista, käytetään joissain määrin turkiseläinten rehuna. Rehuraaka-aineen hinta on kuitenkin niin alhainen, ettei särkikalojen pyynti ole taloudellisesti kannattavaa ilman tukia. Opinnäytetyössäni tutkittavana ja karakterisoitavana raaka-aineena käytetään muurahaishappoon säilöttyjä poistokaloja.



## 2 KALA RAVINTONA JA VALKUAISLÄHTEENÄ

### 2.1 Kalastus

Maailman merikalasaalis on kasvanut merkittävästi 1950-luvulta, jolloin FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) alkoi keräämään tilastotietoja kalataloudesta. Maailman koko kalasaalis oli 1950-luvulla vain 19,3 miljoonaa tonnia. Kalasaalis on kasvanut 163 miljoonaan tonniin vuoteen 2009 mennessä. Merisaalis oli 1950-luvulla 16,7 miljoonaa tonnia ja se käsitti 86 % koko maailman kalasaaliista. Meri- ja sisävesikalastus ovat molemmat lisääntyneet huomattavasti 1950-luvusta uuden teknologian ansiosta. Nykyisin 49 % kalasaaliista on kalastettu mereltä (Global Overview of Marine Fishery Resources [online, viitattu 11.5.2012]).

Suurimmat kalasaaliit, 55 % koko kalasaaliista, saadaan Tyyneltävaltamereiltä. Tyynenvaltameren luoteisosista pyydetään noin neljännes kalasaaliista ja kaakkois- ja läntisestä keskiosasta kummastakin noin 15 % kalasaaliista. Pohjoisesta Atlantista kalastetaan noin kymmenesosa kalasaaliista ja Itäisestä Intianvaltamereistä 7 %. Kolme maailman kalastetuinta lajia ovat anjovis, Chilen piikkimakrilli ja Etelä-Amerikan sardiini (Global Overview of Marine Fishery Resources [online, viitattu 11.5.2012]).

Kalastussaaliiden perusteella maailman suurimmat valtiot olivat vuonna 2008 Kiina, Peru, Indonesia, Yhdysvallat, Japani, Chile, Venäjä, Filippiinit ja Myanmar. Nämä maat kalastivat enemmän kuin puolet maailman tuotannosta (World review of fisheries and aquaculture [online, viitattu 11.5.2012]). Viidenneksi kalastetuin laji koko maailmassa on mustakitaturska, jota kalastetaan 1,5 miljoona tonnia vuodessa. Syvänmeren kalasaaliista 35 % on mustakitaturskaa, jota käytetään mm. kalajauhon tuotannossa raaka-aineena. Mustahuotrakalaa kalastetaan vuodessa 135 000 tonnia kuten myös Patagonian lestikalaa ja yhdessä niiden kalasaaliit käsittävät noin 15 % syvänmeren kalasaaliista. Hokkia ja grönlanninpallasta kalastetaan yhteensä

kymmenesosa koko syvänmeren kalasaaliista (Global Overview of Marine Fishery Resources [online, viitattu 11.5.2012]).

Suomen EU- jäsenyyden myötä suomalaiset ammattikalastajat ovat joutuneet sopeutumaan yhteismarkkinoilla noudatettavaan säännöksiin ja direktiiveihin. Lisäksi kilpailu on kasvanut, kun kalamarkkinat ovat vapautuneet EU:n alueella. Kalastusta ja pyydysten käyttöä koskevat säännökset eivät ole muuttuneet, vaan ne perustuvat edelleenkin Kansainvälisen Itämeren Kalastuskomission suosituksiin (Hemilä [online, viitattu 11.5.2012]).

Suomessa on nykyisin vain vähän ammattikalastajia. Merialueella on noin 1300 ammattikalastajaa ja järviolueella 200 ammattikalastajaa. Suomen merialueella on käytössä 3900 kalastusalusta. Kalastusaluksista vain 54 kpl on yli 21 metriä pitkiä. Tärkeimmät saaliskalat ovat merialueella siika, silakka, kilohaili, lohi, turska ja kuha. Sisävesialueiden pääsaaliskala on muikku. Ammattikalastuksen vuosittainen kokonaissaalis on 120 miljoonaa kiloa ja saaliin arvo on 33 miljoonaa euroa (Jordas ym, [online, viitattu 11.5.2012]).

Ammattikalastus on ollut viime vuosina koko ajan laskusuunnassa. Kalastajien lukumäärä on pienentynyt ja kalastajien keski-ikä nousee koko ajan. Ammattikalastajien määrä tulee laskemaan myös jatkossa. Ammattikalastukseen elinkeinona Suomessa ovat vaikuttaneet EU-jäsenyys, elintarviketuotannon trendit ja yhteiskunnalliset muutokset. Ammattikalastajilta vaaditaan enemmän taloudellista panostusta sekä uusia tietoja, taitoja ja toimintamuotoja (Jordas ym, [online, viitattu 11.5.2012]).

## 2.2 Kala elintarvikkeena

### 2.2.1 Kalan ravintokoostumus ja käyttö

Kala ravintona sisältää runsaasti terveellisiä rasvahappoja, A- ja D-vitamiineja ja kivennäisaineita kuten magnesiumia ja kalsiumia (Lehtinen ym, 1999). Kala on hyvin rautapitoista ja kalan rasva on koostumukseltaan öljymäistä

monityydyttymättömien rasvahappojen vuoksi. Kalan ravintoarvo on suuri verrattuna kalan energiamäärään (Arvo ym, 2010). Kokonainen kala sisältää keskimäärin 6 % proteiinia tuorepainosta (Parkkinen ym, 2006). Kalan syöntiä tulisi lisätä, sillä se on suositeltavaa ravintoa. Kalan hyödylliset rasvahapot vähentävät sydän- ja verisuonitautiriskiä todistetusti (Evira 2012).

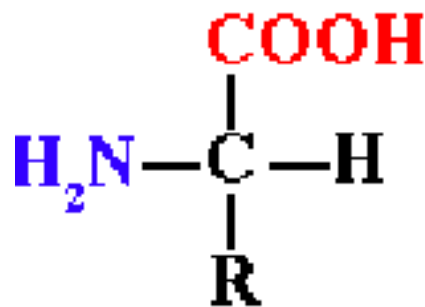
Suomessa kuluttajat suhtautuvat kalaan erittäin positiivisesti. Noin puolet suomalaisista syö kalaa viikoittain ja 12 % syö kalaa useamminkin. Suomalaisten mielestä kalan parhaita ominaisuuksia ovat hyvä maku ja terveellisyys. Lisäksi suomalaiset arvostavat erityisesti kalan tuoreutta ja tasaista saatavuutta. Nykyään suomalaiset kuluttajat haluavat myös tietää, mistä heidän ostamansa kalat on pyydetty. Kuluttajat arvostavat lisääntyvässä määrin lähellä tuotettua ruokaa (Jordas ym, [online, viitattu 11.5.2012]).

Kalan kysyntä on aika ajoin suurempaa kuin sen tarjonta. Sitä vastoin eri kalalajien kysyntä ja tarjonta eivät aina kohtaa, sillä luonto asettaa omat rajoituksensa. Ammattikalastajille on jatkossa suuri haaste pyytää laadukasta kalaa, joka olisi kuluttajien toivomusten mukaista (Jordas ym, [online, viitattu 11.5.2012]).

### 2.2.2 Kalaproteiini ja sen ominaisuudet

Proteiinit eli valkuaisaineet ovat tärkeitä molekyylejä, jotka ylläpitävät elämää. Kaikki kemialliset reaktiot, jotka mahdollistavat elämisen, ovat entsyymi-proteiinien katalysoimia. Proteiinimolekyylit osallistuvat soluissa erilaisiin tärkeisiin toimintoihin kuten molekyylin kuljetukseen solujen sisälle ja solusta ulos, lihasten supistumiseen, solujen pintarakenteen tunnistukseen, hormonitoimintoihin, vasta-aineiden muodostumiseen ja soluorganellien rakentamiseen (Turpeenoja 1999). Aikuisen ihmisen painosta 15 % on proteiinia (Peltosaari ym, 2002). Kalastuksella tuotetaan 16 prosenttia maailman proteiinin tarpeesta (Production & Consumption Of Fishmeal [online, viitattu 19.3.2012]).

Proteiineilla on suuri molekyylipaino. Proteiinit muodostuvat aminohapoista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa peptidisidoksin. Proteiinit ovat kolmiulotteisesti taipuneita ja poimuttuneita polymeerejä. Jokainen aminohappo muodostuu karboksyyli-ryhmästä ja aminoryhmästä, jotka ovat sitoutuneita keskuksihiiliatomiin. Keskuksihiiliatomiin ovat kiinnittyneet myös vetyatomi ja jokaiselle aminohapolle ominainen sivuketju (R). Proteiineissa esiintyvien aminohappojen sivuketjut vaihtelevat niin, että aminohappo on pooliton, ionisoituva tai polaarisuus (Turpeenoja 1999). Aminohapon rakenne on kuvattuna kuvassa 1.



Kuva 1. Aminohapon rakenne. R= aminohapon sivuketju (Solunetti [online, viitattu 03.03.2012]).

Tavallisesti proteiinimolekyyli sisältää 100–300 aminohappoa. Proteiinimolekyylit rakentuvat geenien ohjeiden mukaisesti. Kun aminohapot liitetään peptidisidoksilla toisiinsa, muodostuu pitkä polypeptidiketju, jossa on tarkalleen määrätty sekvenssi eli aminohappojärjestys (Turpeenoja 1999). Aminohappoja on 20 erilaista ja ne muodostavat lukemattomia erilaisia proteiineja (Peltosaari ym, 2002). Proteiinit ovat muodoltaan pallomaisia tai kuitumaisia (Parkkinen ym, 2006).

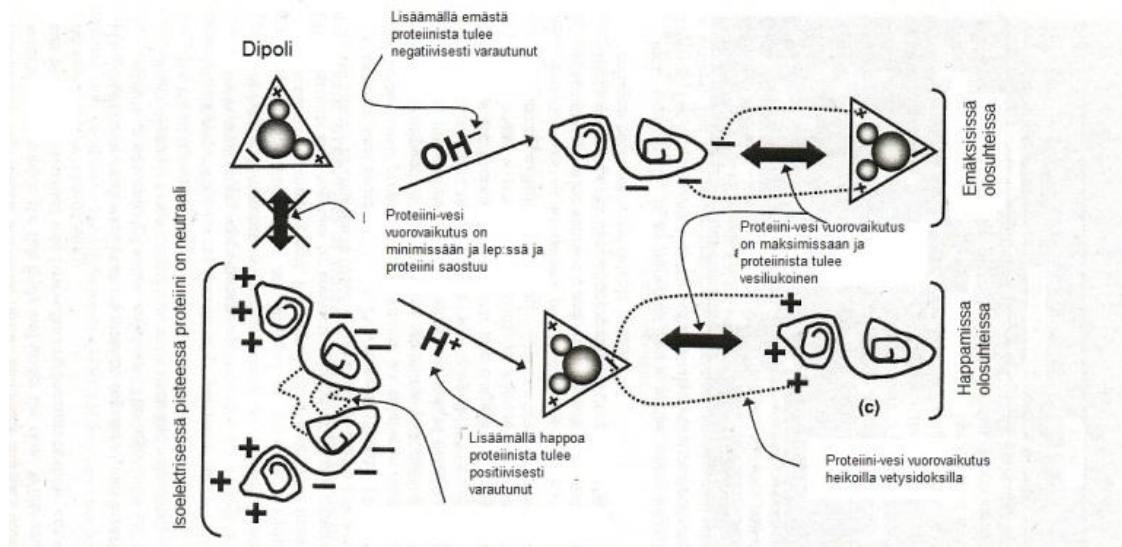
Proteiinit, jotka saadaan ruuasta, pilkkoutuvat ruuansulatuksessa aminohapoiksi, jonka jälkeen ne imeytyvät ohutsuolesta verenkiertoon. Aminohappoja syntyy elimistössä myös, kun kudospoteiini hajoaa solukoiden ja kudosten uusiutuessa. Nämä aminohapot muodostavat yhdessä aminohappovaraston, josta elimistö saa tarpeen tullen tarvittavat aminohapot proteiinien muodostamiseen. Osa aminohapoista on välttämättömiä ja ne on saatava ravinnosta. Ihmiselle välttämättömiä aminohappoja on kymmenen. Elimistö ei

pysty valmistamaan tarvitsemiaan proteiineja, jos ruuassa ei ole kaikkia välttämättömiä aminohappoja, vaikka ruuassa olisikin paljon proteiineja. Ei-välttämättömiä aminohappoja elimistö taas pystyy tarvittaessa muodostamaan muista aminohapoista, kunhan materiaalia on riittävästi (Parkkinen ym, 2006).

Proteiinien laatu on tärkeä asia. Proteiinien määrä ja laatu on otettava huomioon, kun arvioidaan eri elintarvikkeita proteiinien lähteinä. Suomessa ja muissa maissa, joissa on korkea elintaso, syödään paljon runsasproteiinisia elintarvikkeita ja näin saadaan proteiineja riittävästi ravinnosta. Vain jotkut erikoisryhmät kuten pitkäaikaissairaat saattavat saada liian vähän proteiineja ravinnosta. Kehitysmaissa proteiinin puute on ongelma, kun ruokaa on muutenkin niukasti. Proteiinin puute johtaa pitkällä aikavälillä vakaviin sairauksiin. Tästä syystä on alettu kehittämään uusia proteiinin lähteitä (Parkkinen ym, 2006).

Kala sisältää erilaisia proteiineja, joita ovat mm. lihasfibrilli proteiinit ja tukikudosproteiinit. Lihasfibrillejä on kalan lihassa 3-5 %. Fibrillissä on peräkkäin noin 2  $\mu\text{m}$  pituisia sarkomeereja, jotka ovat lihaksen supistuva osa. Tukikudoksessa proteiinit ovat liukenemattomia väkevässä suolaliuoksessa. Kun lämpötila on 60-70 °C, kollageenikuidut kutistuvat yhteen kolmasosaan alkuperäisestä pituudestaan. Kollageenista tulee 80 C<sup>o</sup>:ssa vesiliukoista (Shahidi 2007).

Isoelektrinen piste on tärkeä tekijä lihasproteiinien vesiliukoisuudessa. Kalaproteiinin isoelektrinenpiste on pH 5,5:ssä. Proteiini saostuu isoelektrisessä pisteessä. Isoelektrisessä pisteessä proteiinin elektrostaattinen varaus on nolla. Isoelektrisessä pisteessä proteiini-vesi vuorovaikutus on minimissään, kun taas proteiini-proteiini vuorovaikutus heikoilla vetysisoksilla on maksimissaan aiheuttaen proteiinin saostumisen (Shahidi 2007). Kuvassa 2 on kuvattu lihasproteiinin käyttäytymistä isoelektrisessä pisteen molemmiin puolin.



Kuva 2. Lihasproteiinin käyttäytyminen eri olosuhteissa (Shahidi 2007).

Suomalaiset saavat proteiinia noin 100 g vuorokaudessa. Proteiinien osuus energiansaannista on noin 10–15 %. Ruuan proteiinimäärän tulisi kattaa 10–20 % päivittäisestä energiamäärästä. Ihmisen koko vaikuttaa proteiinin tarpeeseen. Keskimäärin ihmisen tulee saada proteiinia 50–75 g vuorokaudessa. Proteiinia on 15 g sadassa grammassa kalafilettä. Kala ravintona sisältää kaikki tarvittavat aminohapot (Parkkinen ym, 2006).

## 2.3 Kalajauho

### 2.3.1 Kalajauho ja sen käyttö

Kalajauho on ruskeaa jauhoa, jota valmistetaan kalasta. IFFO (The International Fishmeal and Fish Oil Organisation) on arvioinut, että vuonna 2009 75 % kaloista, joita käytettiin kalajauhon raaka-aineena, olivat pelagisia lajeja. Pelagiset lajit elävät valtamerissä meren pinnalla. Niiden pääasiallisena ravintona on plankton. Useimmat pelagiset lajit ovat myös rasvaisempia kuin muut kalalajit. Pelagisia lajeja pyydetään noin 90 miljoonaa tonnia vuodessa ja siitä kolmasosa käytetään kalajauhoksi loput 60 tonnia vuodessa syödään

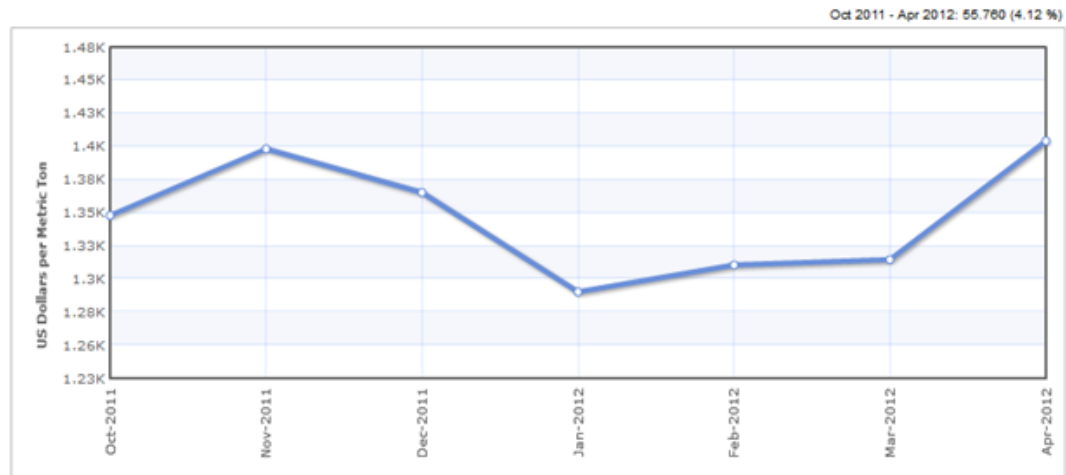
tuoreeltaan, pakastetaan tai säilötään (Production & Consumption Of Fishmeal [online, viitattu 19.3.2012]).

Kalajauho sisältää tyypillisesti 60–72 % proteiinia, 10–20 % tuhkaa ja 5–12 % rasvaa, josta suurin osa on rasvahappoja kuten omega-3-rasvahappoja. Nykyään kalajauhoa käytetään pääasiassa rehujen tuotantoon. Kalajauhon maailmanlaajuinen tuotanto on keskittynyt vain muutamille maille, jotka yhdessä tuottavat 80 % maailman kalajauhoista. Nykyään Peru on maailman suurin kalajauhon tuottaja. Perun jälkeen tulee Kiina, Chile ja sen jälkeen pohjoismaista Norja, Tanska ja Islanti. Maat tuottavat yhteensä noin 6,3 miljoonaa tonnia kalajauhoa vuosittain (Production & Consumption Of Fishmeal [online, viitattu 19.3.2012]).

Valtamerialojen kannat ovat ehtymässä liikakalastuksen vuoksi ja tämä vaikuttaa myös Suomen tilanteeseen (Alder ym, 2008). Tästä seuraa, ettei eläinrehujen raaka-aineeksi käytetyn kalajauhon määrää voida lisätä (Naylor ym, 2009). Eläinravinnon kysyntä kuitenkin lisääntyy koko ajan väestömäärän kasvaessa ja elintason noustessa. Vesiviljely perustuu teollisiin rehuihin ja teollisten rehujen tärkeä raaka-aine on kalajauho. Vesiviljelyrehuja halutaan kehittää globaalisti ja siksi etsitäänkin koko ajan uusia proteiinin lähteitä (Tacon ym, 2008).

### 2.3.2 Kalajauhon valmistaminen

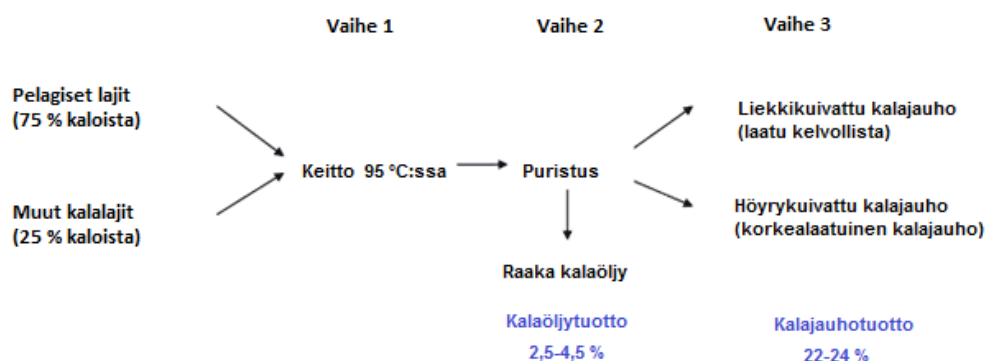
Kalajauho valmistetaan joko kokonaisesta kalasta tai perkuujätteistä keittämällä, kuivaamalla, puristamalla ja jauhamalla kalajauhoksi. Kalajauhoa käytetään esim. turkiseläinten rehun ainesosana, sillä se sisältää monipuolisesti valkuaisaineita ja aminohappoja. Rehuvolyymeihin nähden kalajauhon käyttö rehuvalmistuksessa raaka-aineena on pieni, sillä kalajauho on kallista (Etelä-Suomen Kalatalousohjelma 2011). Tuhat kiloa kalajauhoa maksaa tällä hetkellä 1400 USD (Indexs Mundi [online, viitattu 15.5.2012]). Kuviossa 1 on esitetty viimeaikainen kalajauhon hinnan kehitys.



Kuvio 1. Kalajauhon hintakehitys lokakuusta 2011- huhtikuuhun 2012. (USDtn, Indexs Mundi [online, viitattu 15.5.2012].

Kalajauhon tuotantoprosessia voidaan karkeasti kuvata kolmella eri vaiheella: ensin kala on tarkastettava, puhdistettava ja sen jälkeen kala keitetään noin 95 °C:ssa. Tämän prosessin avulla kalamassa pastöroidaan. Prosessin avulla saadaan myös proteiinit ja öljyt helpommin erotetuksi. Keitetty kala puristetaan, jotta suurin osa jäljellä olevasta nesteestä saataisiin pois. Sen jälkeen materiaali kuivataan myyntivalmiiksi jauhoksi. Kuvassa 3 on esitetty kalajauhon valmistuskaavio.

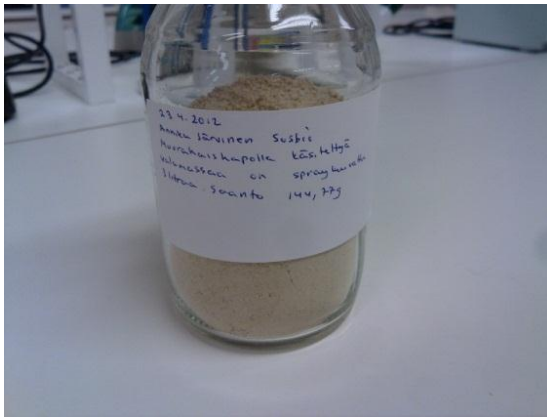
### Kalajauhon ja kalaöljyn valmistus



Kuva 3. Kalajauhon valmistuskaavio (Production & Consumption Of Fishmeal [online, viitattu 22.5.2012]).



Kalajauho voidaan jakaa neljää tuoteryhmään. Korkealaatuinen kalajauho, jota käytetään pienimuotoisissa vesiviljely-yksiköissä, on yksi kalajauhon tuoteryhmistä. Seuraava on alhaisessa lämpötilassa tuotettu kalajauho, joka valmistetaan höyrykuivauksella ja se on helposti sulavaa. Se sopii erityisesti lohen viljelyyn ja porsaiden ravinnoksi. Perusjauho on yksi tuoteryhmistä ja sisältää 66–68 % proteiinia. Kelvollinen jauholaatu sisältää vähemmän proteiineja kuin perusjauho (Production & Consumption Of Fishmeal [online, viitattu 19.3.2012]). Kuvassa 4 on kuvattu tässä työssä valmistettua spraykuivattua kalajauhoa, joka on valmistettu happosäilötystä poistokalamassasta.



Kuva 4. Spraykuivauksella tuotettu kalajauho.

## 3 TYÖSSÄ KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSIT

### 3.1 Työssä käytetyt laitteet

Työssä käytettiin laboratorion yleislaitteita kuten analyysivaakoja, lavaravistelijaa, lämpökaappia, eksikkaattoria ja pipettejä. Milli-Q-vedenpuhdistusjärjestelmä oli myös hyvin paljon käytössä, sillä Milli-Q-vedenpuhdistusjärjestelmät tuottavat ultrapuhdasta vettä, jota käytettiin liuosten ja näytteiden valmistuksessa. Laitteet kalibroitiin ennen käyttöä ja käytön jälkeen laitteet puhdistettiin.

#### 3.1.1 Sigma Laboratory Centrifuges

Sigma Laboratory Centrifuges 6K15 on suurikapasiteettinen pöytäseentrifugi, jossa on sisäänrakennettu jäähdytysjärjestelmä. Laitteessa on huoltovapaa harjaton moottori ja tarkka nopeuden esivalinta ja näyttö. Kierrosnopeuden voi säätää 100–13500 kierrokseen minuutissa. Kierrosnopeuden tarkkuus on 1 rpm. Laite toimii erittäin sujuvasti myös suurimmalla kierrosnopeudella (Operating Manual Sigma Laboratory Centrifuges 03/06).

#### 3.1.2 Multiscan RC

Multiscan RC on kahdeksankanavainen, pystysuoraa valoa käyttävä fotometri. Se on suunniteltu fotometristen ja agglutinaatioiden mittaukseen tietokoneen avustuksella. Valon lähteenä on halogeenilamppu, joka on varustettu alumiinipäällystetyllä heijastimella. Laite kykenee mittaamaan aallonpituudella 340–700 nm. Valo kulkee koko näytteen läpi laitteen sisällä. Pystysuorassa fotometrissä valon absorptio on suhteellinen absorboivan aineen valon määrään kuopassa (Operation Manual Labsystem Multiscan CR 1997).

### 3.1.3 Spraykuivauspilotti Mobbille Minor™ Basic

MOBILE MINOR™ Basic on laboratoriospraykuivausrumpu, joka riittää pienen mittakaavan sumutuskuivaukseen liuoksesta, suspensioista tai emulsioista. Vakiomalli on täysin varustettu ja yksinkertainen asentaa. Laitteella voidaan testata spraykuivausta elintarvike- ja kemianteollisuuden näytteistä. Se on suunniteltu täyttämään kansainväliset terveyst- ja turvallisuusmääräykset ja täyttää kaikki toiminnalliset vaatimukset. Valmis jauhe kerätään talteen yhdestä pisteestä (Operational Manual Niro MOBILE MINOR™ Basic 2004).

MOBILE MINOR™ Basicin kapasiteetti alkaa 0,5 kg/h ja korkeimmillaan laite pääsee 110 kg/h kapasiteettiin. Laite sisältää myös FSDTM:n eli fluidisoituvan spraykuivaimen, joka on suunniteltu tuottamaan agglomeroitua jauhetta. Laitteeseen on mahdollista ostaa myös erillisiä lisäosia kuten erilaisia suuttimia (Operational Manual Niro MOBILE MINOR™ Basic 2004 ). Kuvassa 5 on spraykuivauspilotti Mobbille Minor Basic toimintavalmiudessa.



Kuva 5. Spraykuivauspilotti toimintavalmiudessa ja kuivaamassa kalajauhoa etuastiaan.

### 3.1.4 Orion Research 420A+ pH/MV/Lämpömittari

Orion 420A on pöydälle asetettava mittari. Orion 420A antaa mitattavan aineen pH:n nopeasti ja tarkasti. Laite sopii hyvin erilaisille laitoksille ja laboratorioille. Laitteen kalibrointi on nopeaa ja helppoa. Laite käyttää kalibroinnissa sisäänrakennettua automaattista puskurintunnistusta, sisäänrakennettua puskuri-/lämpötilataulukkoa ja laite laskee automaattisesti elektrodin kulmakertoimen ja esittää sen. Laite kykenee mittaamaan pH:n -2 ja 19,999 väliltä ja lämpötilan -5.0 °C to 105.0 °C väliltä (Operational Manual 3.2.4 Orion Research 420A+ pH/MV/Lämpömittari 2001).

### 3.1.5 Kjelttec Auto Distillation Unit

Kjeltec™ 2200 Auto Distillation Unit on turvallinen automaattitisluslaite. Laite on varustettu niin, että se tukee tarkkojen tulosten saantia. Laite on mahdollista ohjelmoida uudelleen virheen sattuessa. Reagenssin kuljetuksessa auttavat tarkat pumput, jotka toiminta on erittäin vakaata. Laitteessa on erillinen tisleen lämpöanturi, joka lopettaa laitteen toiminnan, mikäli laite havaitsee, että tulokset ovat epäluotettavia (Tecator Manual Kjelttec™ 2200 Auto Distillation Unit 1981).

Kjeltec™ 2200 tarjoaa uudet standardit turvalliselle Kjeldahl-tislaamiselle. Laitteessa on useita turvallisuusominaisuuksia, joita ovat mm. huppu, reagenssitaso ja turvaovi. Näytteitä ei tarvitse uudelleen laimentaa laitetta varten, vaan laite käyttää teknologiaa, joka lisää sekoittamisen turvallisuutta ja vähentää eksotermisen (alkali-happo) reaktion vaikutusta. Turvaovi ja tippakaukalo ovat helposti puhdistettavissa käytön jälkeen. Käyttökustannukset ovat myös alhaiset ja laite on rakennettu materiaaleista, jotka kestävät syövyttäviä reagensseja (Tecator Manual Kjelttec™ 2200 Auto Distillation Unit 1981).

### 3.1.6 Digestion System 2000

Digestion System 2000 on opetuskäyttöön tarkoitettu polttolaite. Laitteeseen kuuluu polttokoneisto, ohjausjärjestelmä ja savunpoisto. Laitetta voidaan käyttää näytteen poltossa 50–440 °C:n välillä. Poltossa syntyvät typpikaasut poistetaan polton aikana ja laite yhdistetään usein sopivaan titraus- ja tisluslaitteeseen (Tecator Service Manual 2200 Digestion Unit 1997).

## 3.2 Työssä käytetyt reagenssit

### 3.2.1 Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesigeeli

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesiajossa (SDS-PAGE) käytettiin valmiita Bioradin Mini-PROTEAN TGX 10 % geelejä, joissa on kymmenen 30 µl:n näytekuoppaa. Geeli asetetaan ajolaitteeseen ja geelin pohjassa vihreä tarranauha poistetaan. Geeli on heti valmis käytettäväksi ajossa.

Mini-PROTEAN TGX -geelit perustuvat Laemmlin järjestelmään, joka lisää geelimatriisin vakautta. Geelit säilyvät yksittäinpakattuina yli 12 kuukautta. Geelin avulla voidaan suorittaa SDS-PAGE ajo lyhimmillään 15 minuutissa. Geeleistä on saatavilla eri pitoisuuksia ja kaikki geelit soveltuvat 20-100 kDa molekyylipainoalueelle (Bio-Rad [online, viitattu 07.06.2012]).

### 3.2.2 Muut reagenssit ja liuokset

Työssä käytetyt reagenssit olivat ainakin analyysilaatuisia. Kaikki liuokset ja laimennokset valmistettiin työn alussa. Liuoksia säilytettiin jääkaapissa ja tarvittavat laimennokset valmistettiin juuri ennen käyttöä. Kaikissa liuoksissa käytettiin Milli-Q-vettä. Käytetyt liuokset, reagenssit ja niiden valmistus on esitetty liitteessä 1.

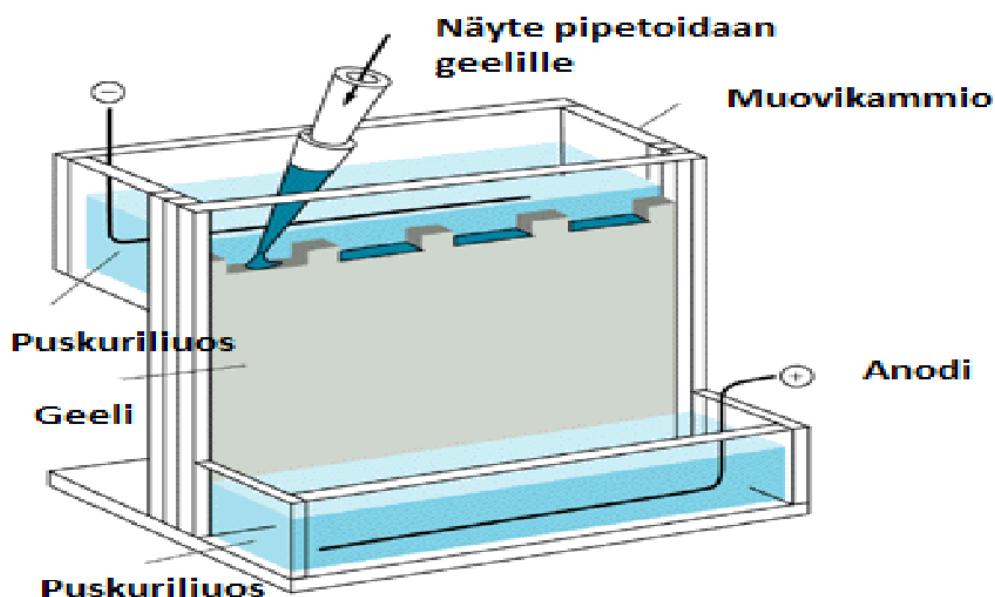
## 4 TYÖN SUORITUKSESSA KÄYTETYT MENETELMÄT

### 4.1 Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesi

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesi eli SDS-PAGE on hyvä menetelmä tarkastella ja tunnistaa proteiini puhdistuksen aikana. SDS-PAGEa käytetään molekyylipainon, tavallisesti proteiinien molekyylipainojen arvioimisessa. SDS-PAGE erottelee sähkökentässä proteiinit niiden koon ja muodon mukaan. Proteiineilla on aminohappokoostumuksen mukaan positiivinen tai negatiivinen varaus (Deutscher 1990).

SDS-molekyyleillä on negatiivinen varaus liukoisessa muodossa ja siksi tutkinnan kohteena oleva proteiiniliuos käsitellään aluksi kuumalla SDS:llä (natriumdodekyylisulfaatilla), jotta proteiinit saataisiin negatiivisesti varautuneiksi. SDS on anioninen detergentti, joka tuhoaa proteiinien sekundaari- ja tertiäärirakenteen. SDS suoristaa proteiinit ja saa ne erottumaan geelillä niiden molekyylipainon mukaan. Proteiiniliuokseen lisätään usein väriainetta, jotta proteiinin etenemistä geelillä pystytään tarkkailemaan elektroforeesiajon aikana (Deutscher 1990).

Koska proteiinit ovat negatiivisesti varautuneita, ne kulkevat sähkövirran vaikutuksesta positiivista napaa kohti kiinteässä väliaineessa. Kiinteänä väliaineena on analyysissä käytössä polyakryyliamidigeeli. Suljettu virtapiiri saadaan aikaan geelin ympärille käyttämällä puskuriliuosta, joka johtaa sähköä. Pienemmät proteiinit liikkuvat polyakryyliamidigeelissä nopeammin kuin suuremmat proteiinit eli mitä suurempi proteiini on, sitä hitaammin se liikkuu geelissä (Deutscher 1990). Kuvassa 6 on SDS-PAGE-laitteisto.



Kuva 6. SDS-PAGE-ajolaitteisto (Wagner 2005).

Jotta proteiinit saataisiin näkyville geelissä, geeli täytyy värjätä. Proteiinit saadaan näkyville värjäämällä geeli väriaineella, joka sitoutuu proteiini-rakenteeseen. Yleisesti käytetty väriaine proteiinien havaitsemiseen on 0,1 % Coomassie Blue – väriä, 40 % metanoli- ja 10 % jäätikkaliuoksessa tilavuuden suhteen. Väri kiinnittyy vain proteiineihin, vaikka geeli värjäytyy kauttaaltaan. Geelistä poistetaan ylimääräinen väriaine vesiliuoksella, joka sisältää 7 % metanolia ja 7 % etikkahappoa. Tässä työssä väriaineena käytettiin Coomassie Brilliant Blue:ta, jolla saadaan näkyviin vyöhykkeet, jotka sisältävät proteiinia noin 2 µg (Deutscher 1990).

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesin ajossa on olemassa erilaisia geelejä (Deutscher 1990). Jokaisella geelillä on tietty akryyliamidikonsentraatio, joka erottelee proteiinit geelille ominaisen erottelukyvyn mukaan. SDS-geeli valitaan proteiinin mukaan (Laemmli 1970).

## 4.2 Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen

Menetelmän avulla on tarkoitus määrittää kalamassan kuiva-ainepitoisuus. Homogenoitua näytettä punnitaan noin 10 grammaa tarkasti kuivattuun ja punnittuun haihdutusmaljaan. Näyte levitetään ohueksi kerrokseksi. Paino merkitään muistiin 1 mg tarkkuudella. Näytettä kuivataan 4 tuntia 105 °C:ssa lämpökaapissa, jäädytetään vakiopainoon eksikkaattorissa ja punnitaan. Painohäviö lasketaan prosentteina tuorepainosta. Kuiva-ainepitoisuus on kuivan massan paino ilmoitettuna prosentteina märän massan painosta (EN 12880, oppimateriaalit [online, viitattu 19.3.2012]).

## 4.3 Proteiinimääritys

Menetelmä perustuu Coomassie Brilliant Blue – väriaineen sitoutumiseen proteiiniin. Näytteen absorptiomaksimi siirtyy 465 nm:sta 595 nm:iin, kun väriaine kiinnittyy proteiiniin. Proteiiniin sitoutuvan värin intensiteetti mitataan spektrifotometrisesti. Mittaukset tehdään kuoppalukulaitteella, jonka tehtävänä on mitata näyteliuoksen absorbanssit. Näytteen proteiinipitoisuus lasketaan standardisuoran avulla (Bradford 1976).

## 4.4 Raakaproteiinimääritys

Proteiinit koostuvat aminohapoista, joissa on runsaasti typpeä. Elintarvikkeissa on myös paljon muita yhdisteitä kuten vapaita aminohappoja, peptitidit, amiinit, amideja, nukleiinihappoja, fosfolipidejä, aminosokereita, ureaa, vitamiineja, nitraatteja ja nitriittejä. Kaikki typpeäsisältävät yhdisteet tulevat mukaan myös Kjeldahl-määrityksessä ja siksi tulosta sanotaan raakaproteiiniksi. Elintarvikkeiden raakaproteiinipitoisuus saadaan määrittämällä Kjeldahlilla typpipitoisuus, jonka jälkeen lasketaan raakaproteiinipitoisuus kertomalla typpipitoisuus valitulla kertoimella, joka riippuu elintarvikkeesta (Opetushallitus-Elintarvikeanalyysit [online, viitattu 19.3.2012]).



Kjeldahl-määritys koostuu kolmesta työvaiheesta, jotka ovat poltto rikkihapossa, vesihöyrytisläus ja titraus. Orgaaninen aine hapetetaan rikkihapolla hiilidioksidiksi, vedeksi ja ammoniakiksi. Ammoniakki sitoutuu rikkihappoliuoksessa ammoniumsulfaatiksi ja hiilidioksidiksi kun taas vesi ja rikkidioksidi haihtuvat polton aikana pois. Haihtuvat komponentit imeytyvät 1 M NaOH-liuokseen, jossa on indikaattorina metyleeninpunainen (Opetushallitus-Elintarvikeanalyysit [online, viitattu 19.3.2012] ).

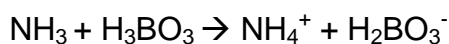
Tislauksessa indikaattorina käytetään bromkresolivihreä-metyleeninpuna-indikaattoria, jonka väri on happamassa pH:ssa punainen ja emäksisessä väri on sininen tai vihreä. Boorihappo on heikko happo ja ammoniakin läsnä ollessa boorihapossa oleva  $\text{H}_2\text{BO}_3^-$  on vahva emäs, joten sitomisliuoksen väri muuttuu tislauksen yhteydessä punaisesta siniseksi tai vihreäksi (Opetushallitus-Elintarvikeanalyysit [online, viitattu 19.3.2012] ).

Divevetyboraatti-ioni-ammoniakkiliuos titrataan suolahapolla, jonka pitoisuus tunnetaan tarkasti. Titrauksessa vihreä tai sininen liuos muuttuu takaisin punaiseksi. Titrauskulutuksesta lasketaan typhen määrä milligrammoissa ja prosentteina alkuperäisestä näytteestä. Tulos muutetaan raakaproteiiniksi proteiinikertoimella, joka vaihtelee elintarvikkeen mukaan. Kalalla kerroin on 6,25 (Peltosaari ym, 2002).

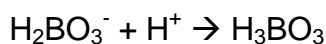
Poltto:



Neutralointi ja lisläus:



Titraus:



#### 4.5 Spraykuivaus

Spraykuivaus on menetelmä, jonka avulla voidaan valmistaa kuivaa jauhetta nesteestä tai lietteestä kuuman ilman avulla. Spraykuivauksen avulla voidaan kuivata jauhoksi monia lämpöherkkiä materiaaleja kuten lääkkeitä tai elintarvikkeita. Spraykuivauksessa kuivattava liete tai neste ohjataan pumpun avulla spraykuivaimen suuttimeen. Suuttimen ansiosta liete tai neste dispergoituu haluttuun pisarakokoon. Sen jälkeen pisarat ohjautuvat kuivauskammioon, jossa pisarat kuivuvat kuuman ilman vaikutuksesta. Kuivauskammioista jauho ohjautuu sykloniin ja sieltä keräysastiaan (Mujumdar 2006).

## 5 KOKEELLINEN OSUUS

Työn lähtömateriaalina käytettiin muurahaishapolla säilöttyä poistokalamassaa. Kalastuksen jälkeen kalat pilkottiin ja murskattiin massaksi murskaimella. Sen jälkeen kalat laitettiin ämpäriin ja käsiteltiin 5 % muurahaishapolla. Kalat muuttuvat muurahaishappokäsittelyssä kemiallisen ja entsyymaattisen toiminnan ansiosta juoksevaksi massaksi. Entsyymaattista toimintaa ei pysäytetä missään vaiheessa vaan kalamassa muuttuu koko ajan juoksevammaksi ja liukeamaton kuiva-ainepitoisuus pieneni koko ajan. Kalamassaa säilytettiin jääkaapissa ja vain tarvittava määrä näytettä otetaan käyttöön. Hapotettu kalamassa esikäsiteltiin ennen varsinaisia analyysejä sentrifugilla. Sentrifugi erottelee kalamassasta supernatantin ja kiintoaineen.

Varsinaiset kokeet tässä työssä tehtiin teollisesta prosessista RKTL:n ohjeistuksessa tuotetulle hapotetulle kalamassalle. Poistokalamassa oli osa isompaa hapotettua erää jota säilöttiin kontissa. Itse tutkittavaa näytettä, jota työssä käytettiin, säilytettiin koko ajan jääkaapissa 10 litran kanisterissa, josta otettiin aina tarvittava määrä analyyseihin. Analyyseissä käytettiin koko ajan samaa hapotettua kalamassaerää. Kontissa oleva kalamassa koki säiden vaihteluita enemmän ja ehti kertaalleen jäätyä ennen analyysejä. Kuvassa 7 on kuva laboratoriossa valmistetusta kalamassasta ennen hapottamista.



Kuva 7. Kalamassa murskauksen jälkeen.

### 5.1 Proteiinipitoisuuden määrittäminen Bradford-menetelmällä

Kalamassa sentrifugoitiin ennen määrittämistä 15 minuutin ajan nopeudella 8000 G 20 °C:ssa. Supernatantit otettiin talteen proteiinimäärittämistä varten. Analyysillä haluttiin testata proteiinin liukoisuutta eri pH-alueilla. Kalamassan pH säädettiin pH 4-8:aan 2 M NaOH-liuoksella ennen laimennoksia ja Bradford-ajoa.

Jokaisesta pH:sta määritettiin kuusi eri näytettä. Rinnakkaisia näytteitä oli neljä kappaletta ja ne määritettiin 96-kuoppalevyllä pipetoituna Bradford-menetelmällä. Standardit valmistettiin BSA-liuoksesta (Bovine Serum Albumin-liuos), jonka proteiinikonsentraatio oli 1000 µg/ml. Ensin testattiin standardialuetta 0-900 µg/ml, mutta todettiin, että menetelmä toimii parhaiten, kun standardisuora kattaa alueen 0-500 µg/ml ja väriainetta käytetään 200 µl/näyte.

Tässä analyysissä BSA-liuosta valmistettiin ensin 1000 µl, josta pipetoitiin alla olevan taulukon mukaan suoraan kuoppalevyllä 10 µl. Standardien laimennos esitetään taulukossa 1. Kuoppalevyllä lisättiin 200 µl väriainetta standardien päälle. Väriaine valmistettiin sekoittamalla 1 osa BioRad Protein Assay Dye

reagent concentrate -väriainetta ja 4 osaa vettä. Itse näytettä laimennettiin ennen analyysiä 1:100 käyttäen käänteisosmoosivettä apuna laimennoksessa. Näytettä pipetointiin 10 µl kuoppiin ja lisättiin 200 µl väriainetta näytteiden päälle. Kuoppalevyä ravisteltiin 30 sekuntia lavaravistelijassa ja väriaineen annettiin vaikuttaa 5 minuutin ajan ennen ajoa. Näytteet ajettiin tunnin kuluessa värin lisäyksestä. Taulukossa 2 on esitetty proteiinipitoisuus Bradford-menetelmällä mg:aa näyteliuoksessa. Kuviossa 2 on esitetty proteiinisaanto kuvaajana.

Taulukko 1. Standardin laimennustaulukko.

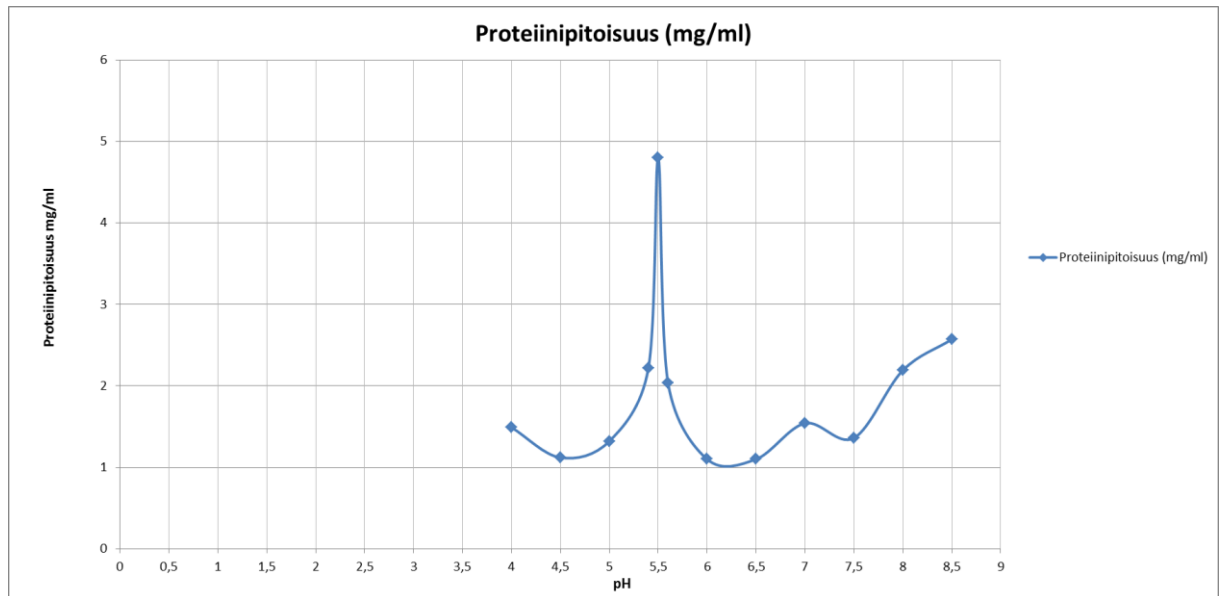
Standardit	Konsentraatio	V(BSA)	V(Vesi)
0	0 µg/ml	0 µl	1000 µl
1	100 µg/ml	100 µl	900 µl
2	200 µg/ml	200 µl	800 µl
3	300 µg/ml	300 µl	700 µl
4	400 µg/ml	400 µl	600 µl
5	500 µg/ml	500 µl	500 µl

Taulukon mukaisesti valmistettiin standardiliuos BSA:sta joka kerran ennen Bradford-ajoja. Standardisuora valmistettiin joka kerta uudestaan ennen ajoja. Standardisuoran mukaan laskettiin aina erikseen näytteiden proteiinipitoisuus.

Taulukko 2. Proteiinipitoisuus Bradford-menetelmällä.

pH	Proteiinipitoisuus (mg/ml)
4	1,49
4,5	1,12
5	1,32
5,4	2,22
5,5	4,80
5,6	2,04
6	1,10
6,5	1,10
7	1,54
7,5	1,36
8	2,19
8,5	2,57

Bradford-ajot pH 4-8,5 analysoitiin kahteen otteeseen. Tulokset eivät eronneet toisistaan huomattavasti. Kuviossa 2 on esitetty taulukon 2 tulokset kuvaajana.



Kuvio 2. Proteiinin pitoisuus ei sentrifugoidusta näytteessä eri pH-alueilla Bradford-menetelmällä mitattuna.

Kalaproteiini saostuu pH 5,5:ssä. Kalaproteiinin isoelektrinen piste on tässä pH:ssa. Isoelektrisessä pisteessä proteini-proteiini vuorovaikutus heikoilla vetysidoksilla on vahvimmillaan ja tämä saattaa johtaa proteiinien aglomeroitumiseen. Tässä työssä proteiinien aglomeroituminen selittää suuren proteiinipitoisuuspiikin pH 5,5:ssä, vaikka teoriassa proteiinien pitäisi olla saostuneita pH 5,5:ssä. Aggregoitumista tapahtuu eniten isoelektrisen pisteen läheisyydessä. Aglomeroitumista näkyminen tuloksissa voidaan välttää sentrifugoimalla näytteet pH:n muutoksen jälkeen. Tällöin aglomeroituneet proteiinit sentrifugoituvat ja supernatanttiin jää jäljelle vain liukoisessa muodossa olevat proteiinit. Hapotetusta kalamassasta tehtiin myös uusi proteiinipitoisuuden määrittäminen käyttäen Bradford-menetelmää ja sentrifugoimalla supernatantti pH:n säädön jälkeen.

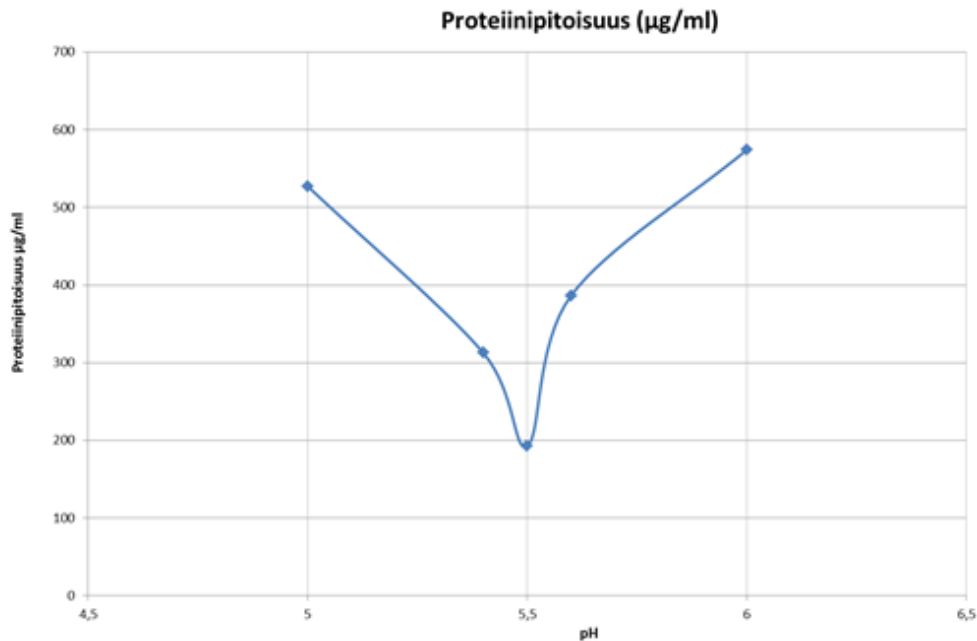
Lähtömateriaalina käytettiin hapotettua kalamassaa, joka sentrifugoitiin ennen määrittystä 15 minuutin ajan nopeudella 8000 G 20 °C:ssa. Supernatantit otettiin talteen proteiinimäärittystä varten. Analyysillä haluttiin testata proteiinin liukoisuutta eri pH-alueilla ja kalaproteiinin isoelektrisessä pisteessä. Kalamassan pH säädettiin pH 5-6:aan 2 M NaOH-liuoksella ennen laimennoksia ja Bradford-ajoa.

Sentrifugoinnin jälkeen supernatanttien pH:t tarkistettiin. Supernatanteista tehtiin 1:2 laimennokset Bradford-ajoa varten. Rinnakkaisia näytteitä oli neljä kappaletta ja ne määritettiin 96-kuoppalevyille pipetoituna Bradford-menetelmällä. Standardit valmistettiin BSA-liuoksesta (Bovine Serum Albumin-liuos), jonka proteiinkonsentraatio oli 1000 µg/ml. Standardisuoran pitoisuus kattoi alueet 0-500 µg/ml ja väriainetta käytettiin 200 µl/näyte.

Standardisuora valmistettiin taulukon 1 mukaisesti. Analysoitavaa näytettä ja standardia pipetoitiin suoraan kuoppalevyille 10 µl/kuoppa. Kuoppalevyille lisättiin 200 µl väriainetta standardien ja näytteiden päälle. Väriaine valmistettiin sekoittamalla 1 osa BioRad Protein Assay Dye reagent Concentrate -väriainetta ja 4 osaa vettä. Laimennoksissa ja standardisuoran teossa käytettiin Milli-Q-vettä. Kuoppalevyä ravisteltiin 30 sekuntia lavaravistelijassa ja väriaineen annettiin vaikuttaa 5 minuutin ajan ennen ajoa. Näytteet ajettiin tunnin kuluessa värin lisäyksestä. Taulukossa 3 on esitetty proteiinipitoisuus Bradford-menetelmällä µg:aa näyteliuoksessa. Kuviossa 3 on esitetty proteiinipitoisuus kuvaajana.

Taulukko 3. Proteiinipitoisuus Bradford-menetelmällä.

pH	Proteiinipitoisuus (µg/ml)
5	527,5
5,4	312,9
5,5	192,8
5,6	386,4
6	574,0



Kuvio 3. Proteiinin liukoisuus Bradford-menetelmällä.

Tämän analyysin tulokset osoittavat kalaproteiinin isoelektrisen pisteen olevan pH 5,5:ssä. Isoelektrisessä pisteessä proteiini saostuu. Mitä lähempänä isoelektristä pistettä ollaan, sitä vähemmän liuennutta proteiinia on näytteessä. Mitä kauempana ollaan isoelektrisestä pisteestä, sitä enemmän näytteessä on liukoista proteiinia, joka näkyy Bradford-menetelmällä mitattuna.

## 5.2 Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen

Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen tapahtuu standardin EN12880 mukaisesti. Työn tarkoituksena oli määrittää kalamassan kuiva-ainepitoisuus. Kuiva-ainepitoisuudella tarkoitetaan sitä painoa, mikä jää jäljelle näytteestä, kun näytteestä on poistettu vesi. Tämä tapahtuu kuivaamalla homogenoitua näytettä tietyssä lämpötilassa vakio painoon. Kuiva-ainepitoisuus ilmoitetaan prosentteina tuorepainosta. Näytettä sentrifugoitiin ennen määrittystä 15 minuutin ajan nopeudella 8000 G 20 °C:ssa. Supernatantti otettiin talteen analyysia varten. Sentrifugoitua näytettä punnittiin noin 10 grammaa tarkasti



kuivattuun ja punnittuun haihdutusmaljaan. Haihdutusmaljojen annettiin olla 105 °C:ssa yön yli ja niiden annettiin jäähtyä eksikkaattorissa. Näyte levitettiin haihdutusmaljaan ohueksi kerrokseksi. Paino merkittiin muistiin 1 mg tarkkuudella. Näytettä kuivattiin 4 tuntia 105 °C:ssa lämpökaapissa, jonka jälkeen näytettä jäähdytettiin eksikkaattorissa yön yli ja punnitus tapahtui seuraavana päivänä. Taulukossa 3 esitetään punnitustulokset. Painohäviö eli kosteus laskettiin prosentteina tuorepainosta.

$$\text{Kosteus\% (näyte)} = \frac{a - b}{a} \cdot 100\%$$

a = näytteen massa ennen kuivausta

b = näytteen massa kuivauksen jälkeen

Kuiva-ainepitoisuus = 100% - Kosteus%

Taulukko 4. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalamassasta.

Näyte	Tyhjä haihdutusmalja (g)	Näyte ennen kuivausta (g)	Näyte + haihdutusmalja kuivauksen jälkeen (g)	Kuivattu näyte (g)	Kosteus (%)	Kuiva-ainepitoisuus (%)
1	52,315	7,840	53,688	1,372	82,5	17,5
2	72,884	9,900	68,552	1,710	82,3	17,7
3	67,050	8,384	74,063	1,502	82,1	17,9
4	60,857	7,958	62,279	1,442	81,9	18,1
5	73,315	9,166	75,009	1,694	81,5	18,5
6	76,914	9,847	78,788	1,874	80,9	19,1
7	60,835	8,047	62,030	1,195	85,1	14,9
8	73,312	9,338	74,756	1,444	84,5	15,5
9	76,904	9,155	78,480	1,576	82,8	17,2

Kuiva-ainepitoisuus määritettiin heti opinnäytetyön alussa ennen muita analyysejä. Taulukossa 4 on esitetty kalamassan kuiva-ainepitoisuudet. Kuiva-ainepitoisuus oli näytteissä keskimäärin 17 %. Kuiva-ainepitoisuus kuitenkin muuttuu sen mukaan mitä kauemmin kalamassaa on säilytetty kontissa hapottamisen jälkeen, sillä entsyymaattisen toiminnan asioista kalamassa muuttuu koko ajan juoksevammaksi. Kuiva-ainepitoisuus mitattiin uudestaan

kalamassasta vielä ennen kalajauhon valmistusta, sillä spraykuivaimen käytössä on hyvin tärkeää tietää kuiva-ainepitoisuus, jotta syöttönopeus ja ilmanpaine voidaan määrittää.

Taulukko 5. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalamassasta ennen spraykuivausta.

Näyte	Tyhjä haihdutusmalja (g)	Näyte ennen kuivausta (g)	Näyte + haihdutusmalja kuivauksen jälkeen (g)	Kuivattu näyte (g)	Kosteus (%)	Kuiva-ainepitoisuus (%)
1	73,340	9,331	74,360	1,020	89,1	10,9
2	60,870	8,698	61,980	1,110	87,2	12,8
3	76,980	8,513	77,940	0,960	88,7	11,3

Kuiva-ainepitoisuus määritettiin uudestaan noin kolmen kuukauden jälkeen. Taulukossa 5 on esitetty kalamassan kuiva-ainepitoisuus ennen spraykuivausta. Kuiva-ainemäärityksen jälkeen hapotetusta kalamassasta tehtiin spray-kuivaimella kalajauhoa. Kolmen rinnakkaisen haihdutusmaljan kuiva-ainepitoisuus oli keskimäärin 12 %. Työ suoritettiin standardin EN12880 mukaan. Työssä käytettiin lähtömateriaalina samaa sentrifugoitua poistokalamassaa kuin aiemminkin kerroilla. Kalamassaa säilytettiin jääkaapissa 10 litran kanisterissa koko ajan. Kuiva-ainepitoisuuden perusteella pystyttiin laskemaan spraykuivauksen saanto, kun tiedettiin kuinka paljon lähtömateriaalia syötettiin spraykuivaimeen.

Taulukko 6. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalajauhon ensimmäisestä erästä.

Näyte	Tyhjä haihdutusmalja (g)	Näyte ennen kuivausta (g)	Näyte + haihdutusmalja kuivauksen jälkeen (g)	Kuivattu näyte (g)	Kosteus (%)	Kuiva-ainepitoisuus (%)
1	17,14	1,358	18,39	1,25	7,95	92,05
2	16,041	1,235	17,17	1,129	8,58	91,42
3	15,88	1,138	16,92	1,04	8,61	91,39

Spraykuivatun kalajauhon kuiva-ainepitoisuus määritettiin heti spraykuivauksen jälkeen. Kalajauhon kuiva-ainepitoisuus kolmella rinnakkaisella maljalla punnittuna oli keskimäärin 92 % (taulukko 6). Työ suoritettiin standardin EN12880 mukaan. Analyysin mukaan spraykuivatun kalajauhon kuiva-ainepitoisuus oli korkea ja tavoite kuivasta jauhosta saavutettiin. Kuiva-ainepitoisuudella on suora yhteys jauhon mikrobiologiseen säilyvyyteen.

Taulukko 7. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen uudesta kalamassasta ennen spraykuivausta.

Näyte	Tyhjä haihdutusmalja (g)	Näyte ennen kuivausta (g)	Näyte + haihdutusmalja kuivauksen jälkeen (g)	Kuivattu näyte (g)	Kosteus (%)	Kuiva-ainepitoisuus (%)
1	16,963	5,866	18,346	1,383	76,2	23,8
2	16,088	5,675	17,608	1,52	73,2	26,8
3	15,556	6,646	17,136	1,58	76,2	23,8

Ennen toista spraykuivauserää hapotettua kalamassaa hankittiin lisää. Uuden kalamassan kuiva-ainepitoisuus oli selvitettävä spraykuivausta varten. Kuiva-ainepitoisuus määritettiin kolmen rinnakkaisen näytteen avulla. Kuiva-ainepitoisuus oli keskimäärin 25 % (taulukko 7), jonka perusteella laskettiin spray-kuivauksen teoreettinen saanto kalajauhelle. Työ suoritettiin standardin EN12880 mukaan. Työn suorittamiseen käytettiin kalamassaa, jota oli säilötty isommassa kontissa kauemmin kuin ensimmäisessä spraykuivauksessa käytettyä kalamassaa. Kuiva-ainepitoisuus oli kaksinkertainen verrattuna ensimmäisen spraykuivauserän kalamassaan.

Taulukko 8. Kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kalajauhon toisesta erästä.

Näyte	Tyhjä haihdutusmalja (g)	Näyte ennen kuivausta (g)	Näyte + haihdutusmalja kuivauksen jälkeen (g)	Kuivattu näyte (g)	Kosteus (%)	Kuiva-ainepitoisuus (%)
1	15,899	1,716	17,494	1,595	7,10	92,9
2	16,115	2,299	18,253	2,138	7,0	93,0
3	16,98	1,986	18,824	1,844	7,10	92,9

Kalajauhon kuiva-ainepitoisuus määritettiin heti spraykuivauksen jälkeen. Kuiva-ainepitoisuus laskettiin kolmen rinnakkaisen näytteen avulla. Kuiva-ainepitoisuus kalajauholla oli keskimäärin 93 % (taulukko 8). Työ suoritettiin standardin EN12880 mukaan. Analyysin mukaan spraykuivatun kalajauhon kuiva-ainepitoisuus oli korkea. Kuiva-ainepitoisuus ei eronnut huomattavasti ensimmäisestä spraykuivauserästä saatuihin tuloksiin.

### 5.3 Raakaproteiinin määrittäminen poistokalasta

Työn tarkoituksena oli määrittää kalamassan kokonaistyyppi Kjeldahlmenetelmän avulla. Työohje perustuu opetushallituksen antamaan ohjeeseen kokonaistyyppien määrittämisestä. Työssä käytettävät välineet puhdistettiin 10 % suolahapolla ja huuhdeltiin käänteisosmoosivedellä.

Hapotettua kalamassaa punnittiin noin 1 g tarkasti parafilmin avulla polttoputkeen. Referenssiksi punnitaan 0,1 g ammoniumsulfaattia. Putkiin lisättiin varovasti 20 ml väkevää rikkihappoa ja yksi Kjeltabs katalyytiksi. Ennen putkien asettamista märkäpolttolaitteeseen tarkistettiin, että kaasuletku oli ehjä, jonka jälkeen se yhdistettiin imupulloon, jossa oli 1M NaOH-liuosta ja metyylinpunaista indikaattoria. Putket laitettiin polttolaitteeseen, joka oli esilämmitetty 440 °C:een. Putkia sekoitettiin varovasti alussa ennen märkäpolttolaitteeseen asettamista. Onnistuneeseen polttoon kului aikaa 1-2

tuntia ja nesteen tuli kiehua koko ajan. Kun neste muuttui kirkkaaksi, lopetettiin poltto ja annettiin polttoputkien jäähtyä.

Kun putket olivat jäähtyneet polton jäljiltä, näytteet tislattiin. Tislauslaitteisto puhdistettiin vedellä ennen varsinaista tislausta. Puhdistuksen jälkeen asetettiin polttoputki tislauslaitteistoon ja etuastiaan laitettiin 4 % boorihappoa, jossa oli indikaattori valmiina. Boorihappoa laitettiin niin paljon, että etuastiaan tuleva letkun pää oli nesteen sisällä. Tislauslaitteistossa putkiin lisättiin 32 % NaOH-liuosta 60 ml, jonka jälkeen näytettä tislattiin 5-10 minuuttia. Taulukossa 4 on esitetty proteiinitulokset käsittelemättömästä kalamassasta ja taulukossa 5 on esitetty proteiinitulokset esikäsitellystä kalamassasta.

Tislauksen jälkeen näytteet titrattiin 0,1 M HCl:llä. Tämän jälkeen laskettiin hapon kulutuksen perusteella typen määrä milligrammoina ja prosentteina alkuperäisen näytteen määrästä. Se muutetaan raakaproteiiniksi proteiinikertoimella, joka on kalalla 6,25 (Peltosaari ym, 2002).

$$m_{\text{mg}}(\text{typpi}) = 14,007 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \times (V_{\text{ml}}(\text{HCl}_{\text{näyte}}) - V_{\text{ml}}(\text{HCl}_{\text{blankki}})) \times c(\text{HCl}) \frac{\text{mmol}}{\text{ml}}$$

$$m - \%(\text{typpi}) = \frac{m_{\text{mg}}(\text{typpi})}{m_{\text{mg}}(\text{näyte})} \times 100$$

$$\text{Raakaproteiininäyte} = 6,25 \times m - \%(\text{typpi})$$

$$\text{Ammoniumsulfaattisaanto} - \% :$$

$$\text{Saanto} - \% = \frac{m - \%(\text{typpi})}{21,2\%} \times 100$$

Taulukko 9. Raakaproteiinitulokset käsittelemättömästä massasta.

Näyte (nro)	Paino (g)	m (typpi) (mg)	m-%(typpi)	Raakaproteiini %
1	1,036	10,65	1,028	6,42
2	1,063	9,38	0,883	5,52
3	1,051	11,84	1,126	7,04
4	1,040	11,98	1,152	7,20
Ammoniumsulfaatti	0,105	22,13	21,077	99,4

Analyysissä käytettiin referenssinä ammoniumsulfaattia. Referenssin eli vertailuarvon perusteella voidaan arvioida onko tulos luotettava ja onko kaikki typpi palanut polton aikana. Tulosta voidaan pitää luotettavana mikäli ammoniumsulfaatin saannoksi saadaan yli 99 %:a. Ammoniumsulfaatin saanto oli 99,4 % (taulukko 9). Tämän tuloksen valossa voidaan kalamassan raakaproteiinin tuloksia pitää luotettavina. Näyte numero 2 putkea käytettiin putkien vähyyden vuoksi myös laitteen alkupuhdistukseen ja tämä vaikutti varmasti osaltaan tuloksen oikeellisuuteen. Putkessa numero 2 oli myös eniten näytettä polttovaiheessa, joten kaikki typpi ei ehtinyt palamaan muiden putkien näytteiden tahdissa. Putkea numero 2 ei lasketa kokonaisproteiinituloksissa mukaan. Raakaproteiinisaahto oli keskimäärin 7 % laskettuna kolmen rinnakkaisen näytteen kesken (taulukko 9).

Seuraavaksi kokonaisproteiinin määrittäminen tehtiin sentrifugoidusta supernatantista täysin saman ohjeen mukaan.

Taulukko 10. Raakaproteiinin määrittäminen supernatantista.

Näyte (nro)	Paino (g)	m (typpi) (mg)	m-%(typpi)	Raakaproteiini %
1	1,039	12,25	1,170	7,37
2	1,042	12,95	1,240	7,77
3	1,090	12,39	1,130	7,10
4	1,055	11,55	1,090	6,84
Ammoniumsulfaatti	0,1	23,32	21,01	99,1

Analyysissä käytettiin referenssinä ammoniumsulfaattia. Ammoniumsulfaatin saannoksi saatiin 99,1 %:a (taulukko 10). Tämän tuloksen valossa voidaan kalamassan raakaproteiinin tuloksia pitää luotettavina. Hapotetun kalamassan sentrifugoidusta supernatantista määritettiin raakaproteiinisaahto Kjeldahlmenetelmällä. Supernatantin raakaproteiinisaahto oli keskimäärin 7 % laskettuna neljän rinnakkaisen näytteen tuloksista (taulukko 10). Tulos ei eroa huomattavasti käsittelemättömän kalamassan raakaproteiinisaahtosta.

Taulukko 11. Raakaproteiinin määrittäminen kalajauhon ensimmäisestä erästä.

Näyte (nro)	Paino (g)	m (typpi) (mg)	m-%(typpi)	Raakaproteiini %
1	0,745	69,33	9,30	58,10
2	0,785	63,73	8,11	50,74
3	0,761	69,33	9,11	56,94
4	0,806	69,33	8,60	53,76
Ammoniumsulfaatti	0,113	23,81	21,07	99,0

Hapotettua kalamassaa spraykuivattiin kalajauhoksi ja spraykuivatusta kalajauhosta tehtiin raakaproteiinimäärittäminen. Referenssinä käytetyn ammoniumsulfaatin saanto oli 99,0 % (taulukko 11). Spraykuivatussa kalajauhossa oli noin 55 % raakaproteiinia laskettuna neljän rinnakkaisen näytteen kesken (taulukko 11). Saanto oli hyvä, sillä teollisuudessa tuotettu kalajauho sisältää tyypillisesti 60–72 % proteiinia ja se tuotetaan täysin optimoitu prosessilla, joka ei vastaa työssä käytettyä menetelmää.

Taulukko 12. Raakaproteiinin määrittäminen kalajauhon toisesta erästä.

Näyte (nro)	Paino (g)	m (typpi) (mg)	m-%(typpi)	Raakaproteiini %
1	0,918	81,94	8,92	55,80
2	0,928	78,43	8,47	52,99
3	0,950	83,34	8,77	54,83
4	1,000	55,32	5,53	34,57
Ammoniumsulfaatti	0,108	22,83	21,14	99,0

Uudesta kalamassanäytteestä tehtiin toinen spraykuivauserä kalajauhoa. Kalajauhosta määritettiin raakaproteiinipitoisuus. Referenssinä käytettiin ammoniumsulfaattia. Ammoniumsulfaatin saanto oli 99,0 % (taulukko 12). Kalajauhon raakaproteiinisäntä oli noin 55 % laskettuna kolmen rinnakkaisen näytteen kesken (taulukko 12). Näytettä numero neljä ei otettu huomioon tuloksissa, sillä putkessa numero 4 oli eniten näytettä polttovaiheessa ja kaikki

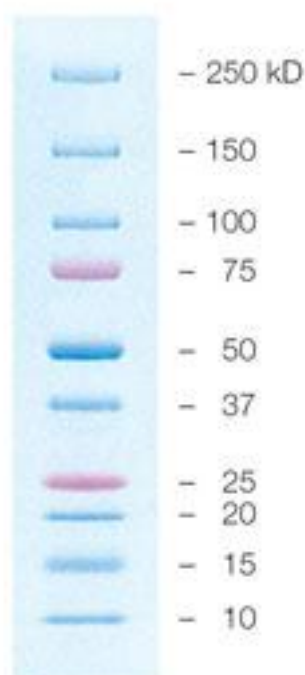
typpi ei ehtinyt palamaan muiden putkien näytteiden tahdissa. Putkea, jossa näyte 4 oli polttovaiheessa, käytettiin laitteen alkupuhdistukseen ja tämä vaikutti varmasti osaltaan tuloksen oikeellisuuteen. Saanto oli hyvä eikä se poikennut huomattavasti ensimmäisen spraykuivauserän kalajauhon kokonaisproteiinisaannosta.

#### 5.4 Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesi (SDS-PAGE)

Työ aloitettiin sentrifugoimalla hapotettua kalamassanäytettä 8000 G 20 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen supernatantti otettiin talteen. Supernatantista tehtiin analyysiä varten 1:10, 1:30, 1:50 ja 1:100 laimennokset. Näytteet valmistettiin niin, että kuusinkertaista näytepuskuria (6 x Laemmli Sample Buffer) lisättiin 7 µl ja näytettä 35 µl, jonka jälkeen ne sekoitettiin toisiinsa ja keitettiin lämpöhauteessa 100 °C, 8 min ajan, jotta saatiin aikaan proteiinien denaturoituminen. Lämpöhaudekäsittelyn jälkeen näyte sentrifugoitiin ennen kuin seosta pipetoitiin geelille. Näytepuskurina käytettiin Bioradin 6 X Laemmliä, jossa oli mukana diklooridifenyylitrikloorietaania.

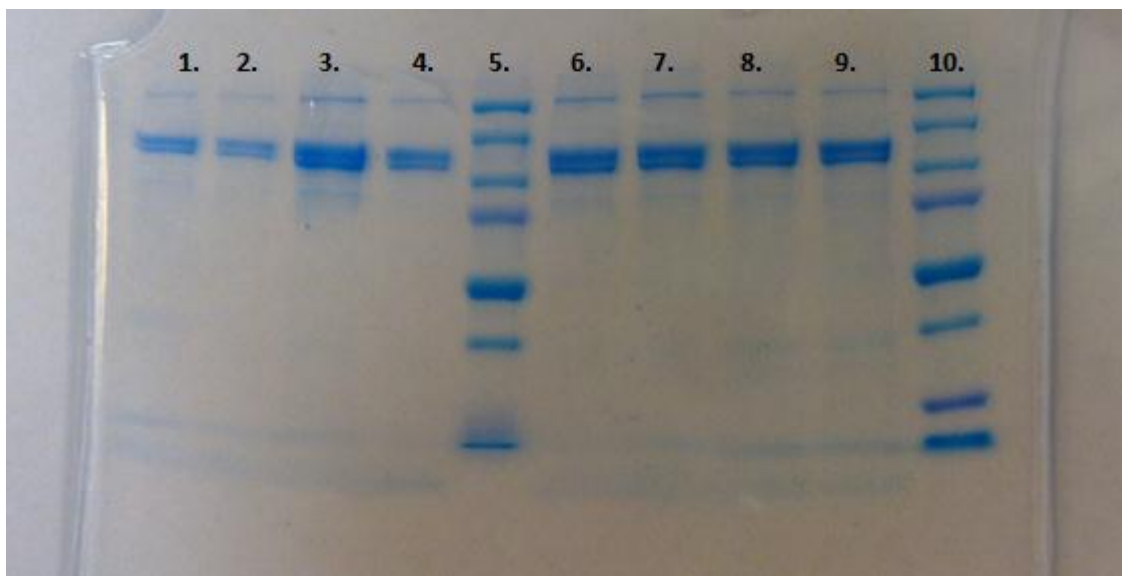
Markkeria (Precision Plus Protein Dual Color Standards) pipetoitiin 10 µl kahteen kuoppaan ja jokaista laimennosta näytteestä pipetoitiin 25 µl ja 15 µl eri kuoppiin. Näytettä ajettiin 200 V kohti positiivista napaa (punainen punaiseen ja musta mustaan). Kaikki näytteet ja markkeri ajettiin valmiille 10 %:lle SDS-page geelille 200 V:n jännitteellä. Markkerina käytettiin Bioradin Precision Plus Protein Dual-väriä. Kuvassa 8 on esitetty markkerin raitojen koot.





Kuva 8. Bioradin Precision Plus Protein Dual markerin raidat (Bio-Rad [online, viitattu 26.4.2012].

Ajon lopettamisen jälkeen geeliä huuhdottiin vedellä 3 X 10 min. Tämän jälkeen geeliä värjättiin tunnin ajan. Värjäyksen jälkeen geeliä huuhdottiin jälleen vedellä 3 X 10 min. Kaikki laimennokset käyttäytyivät geelillä samalla tavalla. Vertailun vuoksi ajo toistettiin kolme kertaa samoilla näytelaimennoksilla eikä geelien välillä havaittu merkittäviä eroja. Vertailumarkeriin nähden laimennosten raidat eli bändit olivat havaittavissa 250 kD ja 125 kD kohdalla. Havaittavat proteiinit saattavat olla gelatiinia eli liivatetta (GEA Filtration. [online, viitattu 21.5.2012]). Kuvassa 9 on esitetty yhden geelin ajon tulos.



Kuva 9. Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidielektroforeesi. Markkerit ovat kuvassa merkattu numeroin 5 ja 10. Muut raidat ovat rinnakkaisia eri laimennoksilla. Raidat 1-2 ovat 1:10 laimennokset näytteestä, 3-4 ovat 1:30 laimennoksen raidat, 6-7 ovat 1:50 laimennokset ja 1:100 laimennokset näytteestä ovat raidat 8-9.

### 5.5 Spraykuivaus

Työn tarkoituksena oli valmistaa spraykuivaimen avulla hapotetusta kalamassasta kalajauhoa, jonka proteiinipitoisuus olisi mahdollisimman korkea. Työn suoritukseen vaikuttavat asiat olivat ulostulolämpötila, sisääntulolämpötila ja kuiva-ainepitoisuus sekä syöttönopeus. Liitteessä 2 ja 3 on esitetty taulukoita, joiden avulla laskettiin haluttu syöttönopeus.

Lähtömateriaalina käytettiin sentrifugoitua kalamassaa, jota laimennettiin vedellä. Vesi haihtuu spraykuivauksen aikana eikä vaikuta tuotteeseen. Ensimmäisessä spraykuivauksessa syötetyn kalamassan kuiva-ainepitoisuus oli 11,6 %. Laimennoksen jälkeen kuiva-ainepitoisuus oli 5,8 %, sillä sentrifugoitua kalamassaa oli noin litra ja sitä laimennettiin litralla tislattua vettä. Kalamassaa oli laimennettava vedellä, koska kalamassa on hyvin viskoosia sentrifugoinnin jälkeen. Laimennoksen jälkeen pumpattavuus parani. Sentrifugoinnin jälkeen kalamassa suodatettiin vielä 0,800 µm halkaisijaltaan olevan siivilän läpi, jotta voitaisiin olla varmoja siitä, että partikkelit ohittaisivat spraykuivaimen suuttimen.

Liian suuret partikkelit saattaisivat tukkia suuttimen ja näin haitata kalajauhon tuotantoa.

Laitteen kokoamisen jälkeen käynnistettiin spraykuivaimen puhallin ja lämmitin. Sisääntulolämpötila säädettiin 120 °C:een ja paineilmamittari 60 %:iin ja paine 2 bar. Proteiinit denaturoituvat noin 60 °C:ssa, joten ulostulolämpötilaksi tavoiteltiin 45 °C, jottei liian korkea lämpötila tuhoaisi proteiineja kalajauhosta. Liian alhainen lämpötila vaikuttaisi kalajauhon kuiva-ainepitoisuuteen niin, että kalajauho jäisi kosteaksi. Spraykuivaimen pumppu käynnistettiin, kun haluttu ulostulolämpötila saavutettiin. Tämän jälkeen laitteiston sumuttimeen ohjattiin tislattua vettä 2,2 rpm, kunnes ulostulolämpötila oli vakaa. Tämän jälkeen tislattu vesi vaihdettiin kalamassaksi. Ulostulolämpötilaa säädettiin muuttamalla pumpun nopeutta. Paineilma pidettiin koko ajan vakiona, jotta sumutus olisi tasaista. Painetta vähentämällä hiukkaskoko suurenee ja päinvastoin. Tuote kerättiin lasiastiaan, joka sijaitsi syklonin alla.

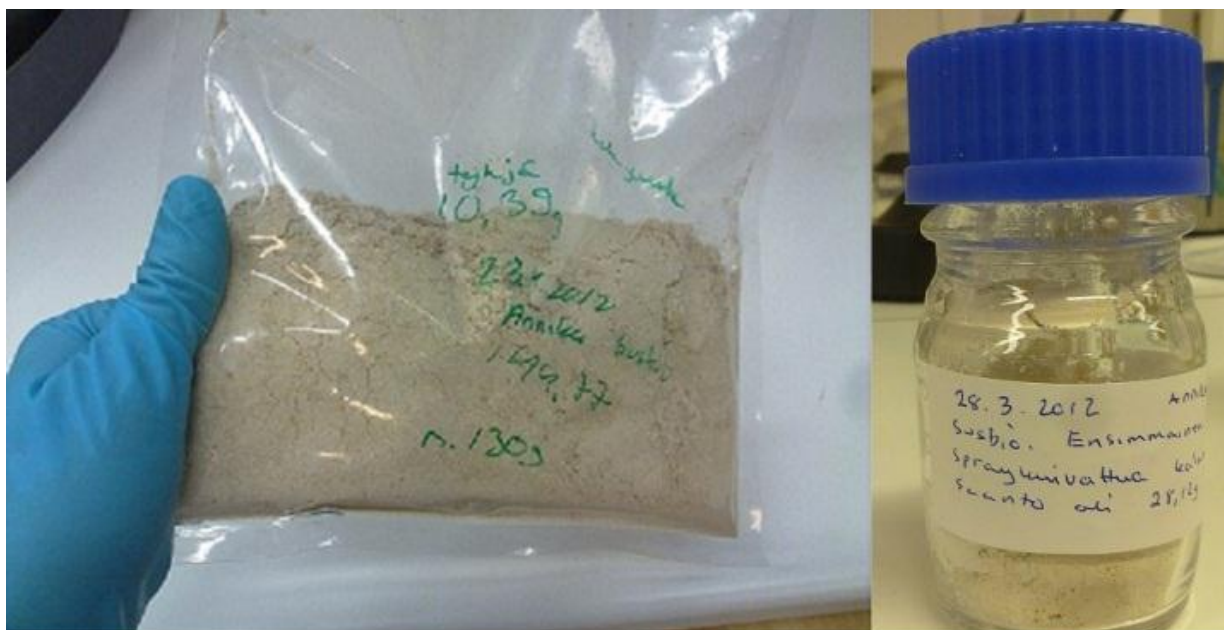
Jauheastia vaihdettiin uuteen, kun tuote oli sumutettu onnistuneesti jauhoksi. Tämän jälkeen syöttö vaihdettiin taas tislattuun veteen. Ulostulolämpötila pidettiin vakiona ja laitetta käytettiin tislattulla vedellä vielä noin 5-10 min. Sen jälkeen ilmanlämmitin sammutettiin ja sisääntulolämpötila asetettiin nolnaan. Puhaltimen annettiin vielä pyöriä 5 minuuttia ja pysäytettiin pumppu. Kun ulostulolämpötila on alle 50 °C, kammion kannen voi avata pneumaattisella nostolaitteella. Laitte pysäytettiin ja puhdistettiin.

Ensimmäisen spraykuivauksen teoreettinen saanto oli 116 grammaa kalajauhoa, mutta talteen saatiin ainoastaan 28,1 grammaa. Suurin osa kalajauhosta jäi putkistoihin tai päättyi suodattimen kautta huoneilmaan. Kalajauho oli väriltään haalean ruskeaa ja rakenteeltaan kuivaa, tasalaatuista ja jauhomaista.

Toinen erä kalamassaa spraykuivattiin saman ohjeen mukaan, mutta materiaalina oli kalamassa, jota oli säilötty isommassa kontissa kauemmin kuin ensimmäisessä spraykuivauksessa käytettyä kalamassaa. Syötetyn kalamassan kuiva-ainepitoisuus oli 24,8 % ja laimennoksen jälkeen kuiva-

ainepitoisuus oli 12,4 %. Sentrifugoitua kalamassaa oli noin 1,5 l ja sitä laimennettiin 1,5 litralla tislattua vettä. Tavoitteena oli saada talteen yli 100 grammaa kalajauhoa, joten lähtömateriaalia oli oltava 1,5-kertaisesti ensimmäiseen erään verrattuna. Sentrifugoinnin jälkeen laimennettu kalamassa suodatettiin vielä 0,800 µm suodattimen läpi niin kuin aiemmallakin kerralla. Spraykuivaimen sisääntulolämpötila säädettiin 120 °C:een, paineilmamittari 60 %:iin, paine 2 bariin ja ulostulolämpötilaksi tavoiteltiin 45 °C. Pumpun nopeutta voitiin nostaa 5,5 rpm:ään, joka oli noin kaksinkertainen verrattuna ensimmäiseen erään. Tämä tehtiin, koska syötettävän näytteen kuiva-ainepitoisuus oli kaksinkertainen verrattuna ensimmäiseen spraykuivauserään.

Toisen spraykuivauksen teoreettinen saanto oli 375 grammaa kalajauhoa, mutta talteen saatiin 144,8 grammaa. Suuri osa kalajauhosta jäi putkistoihin tai päätyi suodattimen kautta huoneilmaan. Verrattuna ensimmäiseen spraykuivauserään kalajauho oli väriltään tummemman ruskeaa. Värieron voi havaita kuvasta 10.



Kuva 10. Kuva spraykuivatun kalajauhon värierioista. Kuvassa vasemmalla on kuva toisesta spraykuivauserästä ja oikealla ensimmäisestä erästä.

## TULOSTEN YHTEENVETO JA PÄÄTELMÄT

Kokeellinen osuus koostuu kahdesta toisistaan erillistä osasta: analyysit hapotetusta kalamassasta ja kalamassan spraykuivaus. Ensimmäisessä osassa tutkittiin kalamassan ominaisuuksia ja käyttäytymistä eri pH-alueilla. Toisessa osassa hapotetusta kalamassasta tehtiin kalajauhoa ja sen ominaisuuksia tutkittiin.

Kalamassasta määritettiin kuiva-ainepitoisuus, joka muuttui koko ajan entsyymaattisen toiminnan ansiosta. Kalamassan kuiva-ainepitoisuus oli kuitenkin hyvin tärkeä määrittää myöhempiä analyysejä varten. Kuiva-ainepitoisuutta tarvittiin myös spraykuivauksen tekemiseen. Spraykuivatun kalamassan eli kalajauhon kuiva-ainepitoisuus oli korkea (93%) ja spraykuivausta voidaan pitää siltä osin onnistuneena. Kuiva-ainepitoisuus vaikuttaa tuotteiden säilyvyyteen, sillä mitä enemmän kosteutta tuotteet sisältävät, sen helpommin ne pilaantuvat.

Analyysit toistettiin pariin otteeseen eikä tuloksissa havaittu suuria poikkeamia. Kalamassa saostui pH 5,5:ssä. Tässä pH:ssa on kalaproteiinin isoelektrinen piste. Isoelektrisessä pisteessä proteiinia on näytteessä vähiten liukoisessa muodossa. Tätä tietoa voidaan käyttää hyödyksi teollisuudessa.

Kalamassasta ja spraykuivatusta kalajauhosta määritettiin raakaproteiini. Työssä käytettiin referenssinä ammoniumsulfaattia, jotta voitaisiin olla varmoja analyysitulosten luotettavuudesta. Ammoniumsulfaatin saanto oli kaikissa analyyseissä hyvä ja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Spraykuivauksen tuloksena saadun kalajauhon raakaproteiini oli molemmissa erissä yli 50 %. Tulos oli hyvä, sillä spraykuivauslaitetta ei oltu optimoitu vain kalajauhon tuotantoon vaan laitetta käytettiin yleisillä asetuksilla, jotka saatiin taulukosta kuiva-ainepitoisuuden perusteella. Teollisuudessa muilla valmistusmenetelmillä valmistetun kalajauhon proteiinipitoisuus vaihtelee 60-72 % välillä.

Tässä työssä ei pyritty optimoimaan kalajauhon tuotantoa vaan tarkoituksena oli testata onko kalajauhon tuottaminen kyseisellä spraykuivauspilotilla (Mobile

Minor Basic) teknisesti mahdollista. Kalamassan spraykuivaus kalajauhoksi onnistui hyvin. Lähtömateriaalina oli kaksi vähän erilaista hapotettua kalamassaa. Molemmat olivat peräisin samasta erästä, mutta niitä oli säilytetty loppuvaiheessa vähän eri tavalla. Kalamassan lähtökuiva-ainepitoisuus oli tärkeä tekijä spraykuivauksessa. Molemmista spraykuivauseristä saatiin kuiva-ainepitoisuudeksi yli 92 % ja kalajauhon proteiinipitoisuudeksi yli 50 %. Haasteena oli saada talteen mahdollisimman paljon kalajauhoa, sillä pienessä mittakaavassa toteutettuna kuivattavaa massaa kertyi laitteen putkistoihin eikä kaikkea kalajauhoa saatu talteen keräysastiaan. Kalajauhon partikkelikoko oli myös hyvin pientä ja osa kalajauhosta ohitti keräysastian päätyen suoraan suodattimeen ja sen kautta huoneilmaan. Tämä voidaan teollisuudessa ratkaista käyttämällä erilaisia suuttimia ja spraykuivauslaitteistoa. Valitettavasti erilaisten suuttimien hankkimiselle ei ollut taloudellisia lähtökohtia tämän työn osalta. Kalajauhon kertymistä putkistoihin voidaan pienentää suhteessa teoreettiseen saantoon ajamalla suurempia eriä ja näin vähentää hävikkiä suhteessa saantoon.

Molempien spraykuivauserien tuloksena saatiin tasalaatuista ja kuivaa kalajauhoa, jonka proteiinipitoisuus oli korkea. Visuaalisesti arvioituna kalajauhoerät poikkesivat toisistaan vain värin perusteella. Tämä johtunee siitä, että hapotettua kalamassaa on säilytetty eri tavalla. Toista analysoitavaa kalamassanäytettä oli säilytetty kauemmin kontissa ja se ehti kertaalleen jäätyä ennen spraykuivausta ja kuiva-ainemääritystä. Vaikka tätä hapotettua kalamassaa oli säilytetty kontissa kauemmin, sen kuiva-ainepitoisuus oli korkeampi.

Teollisessa käytössä hapotettua kalamassaa kannattaa käyttää hyödyksi mahdollisimman pian hapotuksen jälkeen. Kalajauhoa pystytään tuottamaan spraykuivauksella hapotetusta kalamassasta ilman, että pH tarvitsee muuttua lainkaan. Hapotetun kalamassan pH:n muuttamiseen tarvitaan työvoimaa ja raaka-aineita, jotka tuottavat lisäkustannuksia, joten voi olla taloudellisesti kannattavampaa tuottaa kalajauhoa hapotetusta kalamassasta ilman pH:n säätöä. Täytyy myös ottaa huomioon myös se, että pH:n säätäminen tiettyyn

pH-arvoon suuressa mittakaavassa on haasteellista. Erot proteiinisaannossa eri pH-pitoisuuksien välillä eivät ole korkeat, mutta pH 5,5:ssä proteiini on saostunut eikä se ole liukoisessa muodossa. Analyseissä ei selvitetty tapahtuuko pH-saostuksessa kalamassalle jotain muita muutoksia. Tämä tulisi selvittää ennen kuin pH-saostusta alettaisiin hyödyntää.

## 6 LÄHTEET

Alder J., Campbell, B., Karbouzi, V., Kaschner, K., Pauly, D., (2008) Forage fish: from ecosystem to markets. *Annual Review of Environment and Resources* 33, ss.153-166.

Aro, A., Mutanen, M., Uusitupa, M., (2010) Ravitsemustieto, ss. 75-82. WS Bookwell Oy, Porvoo.

Bradford, M.M., (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **72**: 248–254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3, PMID 942051.

Bio-Rad, Bio-Radin Mini-PROTEAN TGX Precast Gels [online, viitattu 07.06.2012], Saatavilla www-muodossa: [http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br\\_category.jsp?BV\\_SessionID=@@@@1889928313.1339062868@@@@&BV\\_EngineID=cccfdgmdifjkjcfngcfkmdhkkdfll.0&divName=Life+Science+Research&loggedIn=false&serviceLevel=Lit+Request&lang=German&csel=AT&catLevel=5&catOID=41604&isPA=false&categoryPath=Catalogs%2fLife+Science+Research%2fElectrophoresis%2fPrecast+Gel+Systems%2fMini-PROTEAN+TGX+Precast+Gels](http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp?BV_SessionID=@@@@1889928313.1339062868@@@@&BV_EngineID=cccfdgmdifjkjcfngcfkmdhkkdfll.0&divName=Life+Science+Research&loggedIn=false&serviceLevel=Lit+Request&lang=German&csel=AT&catLevel=5&catOID=41604&isPA=false&categoryPath=Catalogs%2fLife+Science+Research%2fElectrophoresis%2fPrecast+Gel+Systems%2fMini-PROTEAN+TGX+Precast+Gels)

Bio-Rad, Bio-Radin Precision Plus Protein Dual markerin bändien koot [online, viitattu 26.4.2012], Saatavilla www-muodossa: <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/LSR/SKU/1610374/Precision+Plus+Protein+Dual+Color+Standards>

Deutscher, M., (1990) *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*, Academic Press inc., 182, ss. 425-434. San Diego, California 92101.

Evira, (2012) Kalan syöntisuositukset [online, viitattu 11.5.2012], Saatavilla www-muodossa : <http://www.evira.fi/portal/51466>

FAO, (2010) World review of fisheries and aquaculture [online, viitattu 11.5.2012], Saatavilla www-muodossa: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e01.pdf>

GEA Filtration Gelatin Processing Aids [online, viitattu 21.5.2012], Saatavilla www-muodossa: [http://www.geafiltration.com/library/gelatin\\_processing\\_aid.asp](http://www.geafiltration.com/library/gelatin_processing_aid.asp)

Hemilä, K., EU ja suomalainen ammattikalastus [online, viitattu 11.5.2012], Saatavilla www-muodossa: <http://www.sakl.fi/julkaisut/ammattikalastus/>

Index Mundi, Fishmeal Monthly Price - US Dollars per Metric Ton [online, viitattu 15.5.2012], Saatavilla www-muodossa: <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal>

Jordas, K., Kara R., Ammattikalastus Yritystoimintaa Luonnon Ehdolla [online, viitattu 11.5.2012], Saatavilla www-muodossa: <http://www.sakl.fi/julkaisut/ammattikalastus/>

Laemmli, U., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685.

Lehtinen, M., Peltonen, H., Talvinen, P., (1999) *Ruuanvalmistuksen käsikirja*. ss. 59-65. WSOY- Kirjapainoyksikkö, Porvoo.



Mujumdar, A., (2006). Handbook of Industrial Drying. CRC Press, Cambridge England.

Orjala, M., (2011) Poistokalastusjärjestelmän puitteissa pyydettyjen vähäarvoisten kalojen hyödyntämismahdollisuudet. Etelä-Suomen Kalatalousohjelma (ESKO).

Operational Manual, (2004) Niro MOBILE MINOR™ Basic .

Operating Manual, (2008) Sigma Laboratory Centriguges 6K15.

Operation Manual , (1997) Labsystem Multiscan CR.

Operational Manual, (2001) Orion Research 420A+ pH/MV/Lämpömittari, 3.2.4.

Opetushallitus, Elintarvikeanalyysit [online, viitattu 19.3.2012], Saatavilla [www-muodossa: http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit.html](http://www.muodossa: http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit.html)

Opetushallitus, Elintarvikeanalyysit kosteusprosentti [online, viitattu 19.3.2012], Saatavilla [www-muodossa: http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit\\_kosteus.html](http://www-muodossa: http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit_kosteus.html)

Parkkinen, K., Serti, P., (2006) Avain ravitsemukseen. 1. painos, ss.82-89. Otavan Kirjapaino Oy, Keuruu.

Peltosaari, L., Raukola, H., Partanen, R., (2002) Ravitsemustieto. ss. 61-62. Otavan Kirjapaino Oy, Keuruu.

Solunetti, Proteiinit [online, viitattu 03.03.2012], Saatavilla [www-muodossa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien\\_aminohapot/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_aminohapot/2/)

Shahidi, F., (2007) Maximising the value of marine by-products. ss. 107-163. CRC Press, Cambridge England.

Tacon, AGJ., Metian, M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture 285, 146-158. Thorkelsson G, Kristinsson HG, 2009. Bioactive peptides from marine source. State of Art. Report to Nora fund. Skyrsla Matis 14-09, ISSN1670-7192. Tofte HE, Seliusen J, 2009. Pereddiksyre som alternativt konserveringsmiddel i fiskeensilasje. Rubin Rapport nr. 165.

Tecator, (1997) Service Manual 2200 Digestion Unit.

Tecator, (1981) Service Manual Kjeltex™ 2200 Auto Distillation Unit.

Tem, (2010) Älykäs ja vastuullinen luonnonvaratalous. Valtioneuvoston luonnonvaraselonteko eduskunnalle. Työ- ja elinkeinoministeriön julkaisuja. Energia ja ilmasto.

The Fish Site, Production & Consumption Of Fishmeal (tammikuu 2012) [online, viitattu 19.3.2012]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.thefishsite.com/articles/1288/production-consumption-of-fishmeal](http://www.thefishsite.com/articles/1288/production-consumption-of-fishmeal)

The Fish Site, Global Overview of Marine Fishery Resources (toukokuu 2012) online, viitattu 11.5.2012], Saatavilla [www-muodossa: http://www.thefishsite.com/articles/1361/global-overview-of-marine-fishery-resources](http://www.thefishsite.com/articles/1361/global-overview-of-marine-fishery-resources)

Thorkelsson, G., Kristinsson, HG. (2009) Bioactive peptides from marine sources. State of Art. Report to the Nora fund. Skýrsla Matis 14-09, ISSN1670-7192.

Thermo Electron Corporation, (1997) Operation manual LabSystem Multiscan CR. Version 6.0.

Turpeenoja, L., (1999) Biokemiaa, 3. painos, ss. 85-88. Tummavuoren Kirjapaino Oy, Vantaa.

Wagner, K., (2005) Bioinformatics [online, viitattu 19.3.2012], Saatavilla [http://www.muodossa:\\_\\_\\_\\_\\_http://www.google.fi/imgres?num=10&um=1&hl=fi&client=firefox-a&hs=Hr4&rls=org.mozilla:fi:official&biw=1252&bih=570&tbm=isch&tbnid=P\\_gU1nHhgWTyqM:&imgrefurl=http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html&docid=0zwdMyjtF-3wDM&imgurl=http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/gifs/sds\\_page2.gif&w=307&h=317&ei=LtuWT8j-LafP4QTJkt1G&zoom=1&iact=hc&vpx=561&vpy=131&dur=459&hovh=115&hovw=111&tx=90&ty=108&sig=102057011413615985352&sqi=2&page=1&tbnh=115&tbnw=111&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:3,s:0,i:68](http://www.muodossa:_____http://www.google.fi/imgres?num=10&um=1&hl=fi&client=firefox-a&hs=Hr4&rls=org.mozilla:fi:official&biw=1252&bih=570&tbm=isch&tbnid=P_gU1nHhgWTyqM:&imgrefurl=http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html&docid=0zwdMyjtF-3wDM&imgurl=http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/gifs/sds_page2.gif&w=307&h=317&ei=LtuWT8j-LafP4QTJkt1G&zoom=1&iact=hc&vpx=561&vpy=131&dur=459&hovh=115&hovw=111&tx=90&ty=108&sig=102057011413615985352&sqi=2&page=1&tbnh=115&tbnw=111&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:3,s:0,i:68)

## **KÄYTETYT REAGENSsit , LIUOKSET JA NIIDEN VALMISTUS**

### **KOKONAISPROTEIINI ANALYYSIN REAGENSsit:**

NaOH: Fisher Scientific, batch. 1086046

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: Merck, batch. 1.00165.0500

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: J.T.Baker, lot. 0304530021

Bromkresolivihreä, TT, 020811

Metyleeninpunainen, TT, 060511

### **MUUT REAGENSsit:**

NaOH: VWR Prolabs, batch. 08A140038

Bovine Serum Albumin: Bovogen Biologicals

Dye Reagent Concentrate, Biorad Protein Assay

pH 4 –puskuri: Oy Chemical AB, erä 210611

pH 9 –puskuri: Oy Chemical AB, erä 121010

Long Shelf Life Precas 10 % Gels: Mini-Protean TGX, lot. 4000062932

6 x Laemmli Sample Buffer + DDT

10 x SDS-PAGE Running Buffer

1 x SDS-PAGE-puskuri valmistettiin laimentamalla 10 x SDS-PAGE-puskuria 1 : 10 mittalasilaskuudella.

## **PROTEIINIT:**

Precision Plus Protein Dual Color Standards: Biorad Control, lot. 310009913

### **32 paino-% NaOH-liuos**

320 g NaOH

NaOH liuotettiin 680 ml:aan tislattua vettä jäähauteessa.

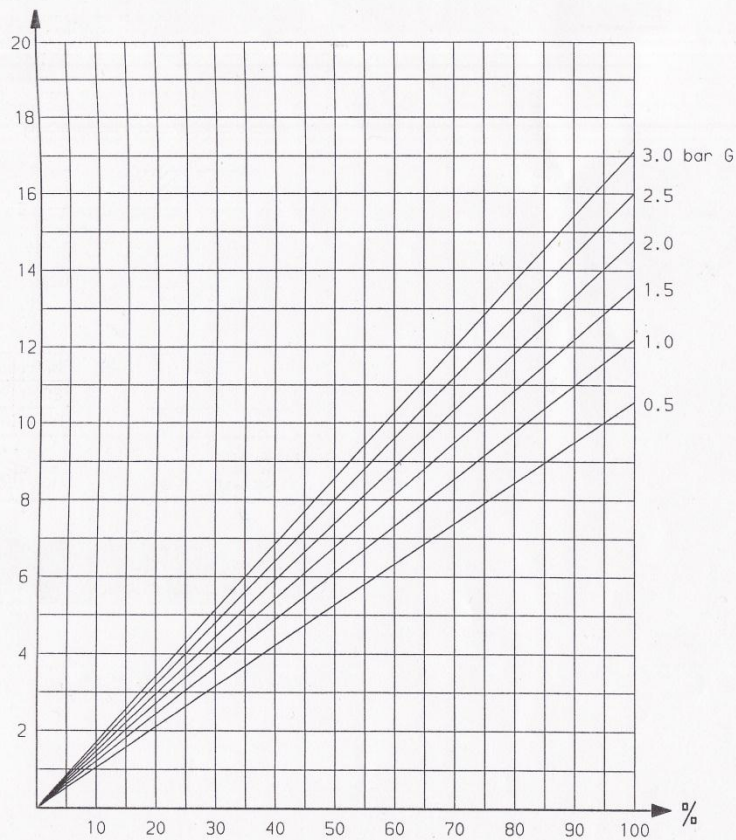
### **4 % H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-liuos**

40 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

5 ml indikaattoriliosta

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> liuotettiin litraan tislattua vettä. Liuokseen lisättiin 5 ml indikaattoriliuosta ennen täyttöä. Indikaattoriliuos sisälsi 10 ml bromkresolivihreää ja 2 ml metyleeninpunaista.

# MASSAVIRTADIAGRAMMI



MASS-FLOW DIAGRAM FOR  
COMPRESSED AIR AT 20°C.  
FOR FLOW METER:

FP-1/2-27-G-10/80, GNSVT 45

MASSESTROM-DIAGRAMM FÜR  
KOMPRIMIERTE LUFT BEI 20°C.  
FÜR DURCHFLUSS-MESSER TYP:

FP-1/2-27-G-10/80, GNSVT 45

DIAGRAMME DÉBIT MASSIQUE  
POUR AIR COMPRIMÉ À 20°C.  
DÉBIMÈTRE:

FP-1/2-27-G-10/80, GNSVT 45

A	FRANSK TEKST TILFØJET	LM	LM	OBS	1996-09-19	MASS-FLOW DIAGRAM	Scale	1:	
	FIRST ISSUE	OBS	OBS	BJ	1993-11-04	MASSESTROM-DIAGRAMM	Format	A3	
Rev	Description	Creat	Check	Appr	Date	DIAGRAMME DÉBIT MASSIQUE	Category	3	
		Niro A/S Gladsaxevej 305 DK-2860 Soeborg Denmark Tel +45 3954 5454 Fax +45 3954 5800						This document is COPYRIGHTED by and is the property of Niro, all rights to copyright, patented or patentable design or invention being reserved. It must not be copied (in whole or in part), used for manufacture or disclosed to others without prior written consent of Niro.	
							Document No	Rev	
							126260	A	

# SYÖTTÖNOPEUS-DIAGRAMMI

