

Essi Vaara

Rehun tärkkelyspitoisuuden määrittäminen polarimetrisellä menetelmällä

Opinnäytetyö

Syksy 2019

SeAMK Ruoka

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

SeAMK 

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: SeAMK Ruoka

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Tekijä: Essi Vaara

Työn nimi: Rehun tärkkelyspitoisuuden määrittäminen polarimetrisellä menetelmällä

Ohjaaja: Merja Kyntäjä

Vuosi: 2019

Sivumäärä: 47

Liitteiden lukumäärä: 1

Tässä opinnäytetyössä tavoitteena oli selvittää Ewersin polarimetrisen menetelmän soveltuvuus Valio Oy Seinäjoen aluelaboratorion käyttöön. Työ suoritettiin Valion aluelaboratoriossa.

Opinnäytetyössä tutkittiin aluelaboratoriolle saapuvien rehunäytteiden tärkkelyspitoisuuksia, testattiin suolahapon määrän vaikutusta mittaustuloksiin taloudellisesta näkökulmasta sekä haluttiin tietää, voiko Carrez I ja II -reagenssit korvata natrium-molybdaattireagenssilla menetelmän suorituksen nopeuttamiseksi. Työn kirjallisessa osuudessa perehdyttiin myös lehmän ruokintaan eläimen ruoansulatuksen kautta, tarkasteltiin tärkkelystä ja sen ominaisuuksia sekä perehdyttiin polarimetrin perusteisiin ja toimintaan.

Polarimetriseen tärkkelysmäärittämiseen löytyy useita eri vaihtoehtoja. Työssä keskitytään yleisimpään Ewersin polarimetriseen menetelmään, jonka Valion aluelaboratorio valitsi opinnäytetyön pohjaksi.

Näytteiden käsittely sujui helposti ja tarkasti sekä liuoksien ajo polarimetrillä oli nopeaa. Tulokset vastasivat referenssinäytteiden tuloksia vaikka käytössä oli eri suolahappopitoisuus tai reagenssi. Mittaustulokset olivat tasalaatuisia, mutta niihin kaivattaisiin lisää tarkkuutta.

Avainsanat: polarimetri, tärkkelys, hydrolyysi, keskihajonta, validointi

Thesis abstract

Faculty: School of Food and Agriculture

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Author/s: Essi Vaara

Title of thesis: Determination of Starch Content of Feed through Polarimetric Method

Supervisor(s): Merja Kyntäjä

Year: 2019

Number of pages: 47

Number of appendices: 1

The aim of this thesis was to determine the applicability of the Ewers polarimetric method to be used at the Valio Oy Seinäjoki Regional Laboratory. The work was carried out at Valio Regional Laboratory.

The study investigated the starch content of feed samples received at the regional laboratory, tested the effect of hydrochloric acid on the measurement results from an economic point of view, and aimed to gain knowledge of whether Carrez I and II reagents could be replaced by sodium molybdate reagent. The study also focused on feeding the cows through the digestion of the animal, by examining starch and its properties, as well as the basics and functions of the polarimeter.

There are many different options for polarimetric starch determination. The thesis focuses on the most common Ewers polarimetric method chosen by the Valio Regional Laboratory as the basis for the study.

Sample handling was easy and accurate and the solutions were run on the polarimeter quickly. The results were consistent with those of the reference samples, although different hydrochloric acid concentrations or reagents were used. The results of the measurements were of uniform quality, but more precision would be needed.

Keywords: polameter, starch, hydrolysis, standard deviation, validation

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluettelo.....	6
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	7
1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET.....	8
2 REHU JA TÄRKKELYS.....	9
2.1 Lehmän ruoansulatus.....	10
2.2 Lehmän ruokinta.....	11
2.3 Rehulaadut.....	12
2.4 Tärkkelyksen rakenne.....	13
3 EWERSIN POLARIMETRINEN MENETELMÄ.....	16
3.1 Polarimetrin toimintaperiaate.....	16
3.2 Menetelmän kuvaus.....	19
3.3 Reagenssit.....	20
3.4 Rehunäytteet.....	21
3.5 Menetelmän validointi.....	23
3.6 Satunnaisvirhe ja systemaattinen virhe.....	23
3.7 T-testi ja t-taulukkoarvo.....	24
4 TULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY.....	25
4.1 Rehunäytteiden tärkkelyspitoisuus.....	26
4.2 Mittausepävarmuus.....	27
4.3 Suolahapon määrän vaikutus mittaustulokseen.....	29
4.4 Reagenssi natriummolybdaatti.....	31
4.5 Ajan vaikutus mittaustuloksiin.....	34
4.6 Virhelähteet.....	35
5 YHTEENVETO.....	37
6 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA.....	39
LÄHTEET.....	40

LIITTEET.....	44
---------------	----

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. ADP450 -polarimetri.....	16
Kuva 2. Polarimetrin valon kulku.....	18
Kuva 3. Kyvetti 200 mm.	19
Kuva 4. Kokoviljanäytteitä ennen käsittelyä.	22
Kuvio 1. Ajan vaikutus mittaustuloksiin, Carrez I ja II.....	34
Kuvio 2. Ajan vaikutus mittaustuloksiin, natriummolybdaatti.	35
Taulukko 1. Tärkkelystyyppien ominaiskiertokyky.....	17
Taulukko 2. T-taulukko.....	24
Taulukko 3. Säilöviljan mittausepävarmuus.	28
Taulukko 4. Kokoviljan mittausepävarmuus.....	28
Taulukko 5. Maissin mittausepävarmuus.	29
Taulukko 6. Suolahapon määrän vaikutus, 70 ml.	30
Taulukko 7. Suolahapon määrän vaikutus, 50 ml.	31
Taulukko 8. Mittausepävarmuus, reagenssina natriummolybdaatti.....	32
Taulukko 9. Suolahappoa 70 ml, reagenssina natriummolybdaatti.....	33
Taulukko 10. Suolahappoa 50 ml, reagenssina natriummolybdaatti.....	33

Käytetyt termit ja lyhenteet

Amyloosi	Glukoosiyksiköistä rakentunut, suoria ketjuja.
Amylopektiini	Glukoosiyksiköistä rakentunut, haarautuneita ketjuja.
D-arvo	Rehun sulavan orgaanisen aineen osuus kuiva-aineessa.
iNDF	Rehun sulamattoman kuidun määrä.
Kuiva-aine	Rehun määrä joka jäisi jäljelle, kun vesi poistetaan.
NDF-kuitu	Rehun kokonaiskuitupitoisuus.
Polysakkaridi	Hiilihydraatti, joka koostuu kymmenistä yhteen liittyneistä monosakkarideista.
T-testi	Kuvaa näytteiden välillä olevaa eroa.
Tuhka	Rehun kivennäisainepitoisuus.

1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET

Lehmää pidetään Suomessa tärkeänä kotieläimenä, niiden tarkoitus on tuottaa lihaa ja maitoa ihmisten ravinnoksi. Ruokatieto yhdistys ry:n (2019) mukaan lehmien lukumäärä on vuosikymmenien aikana vähentynyt, mutta maitotuotusmäärät ovat kasvaneet huomattavasti. Tuotusmäärien kasvu viittaa eläinten parantuneisiin elinolosuhteisiin sekä hyvään ruokintaan. Lehmää ruokitaan säännöllisesti 2–10 kertaa päivässä ja ruoan miellyttävyyteen vaikuttaa rehun koostumus, maittavuus sekä sulavuus (Alasuutari, Manni & Rautala 2013, 12). Ruokinta on lehmän terveyden tärkein peruspilari, jonka avulla maidontuotanto pysyy halutulla tasolla ja laatu parhaana mahdollisena. Tämän takia rehun analysointia pidetään tärkeänä ja Valio Oy Aluelaboratorio haluaa tarjota tuottajilleen mahdollisimman hyvää palvelua. (Maunumaa 2019a.)

Toimeksiantajan esittely. Valio Oy Seinäjoen aluelaboratorio on 30 työntekijän laboratorio. Laboratorion toiminta jakautuu tuotantoa palvelemaan analytiikkaan sekä Valioryhmän osuuskuntia ja tuottajia palvelemaan analytiikkaan. (Maunumaa 2019c.)

Tuottajia palvelevissa laboratorioissa analysoidaan Valioryhmän tiloilta tulevia rehunäytteitä. Rehusta määritetään tällä hetkellä kuiva-aine, valkuainen, NDF-kuitu, D-arvo, sokeri, iNDF, tuhka ja säilönnällinen laatu sekä näihin tuloksiin pohjautuvia laskennallisia rehuarvoja. Rehusta on myös mahdollista määrittää kivennäisaineet. Analyysituloksia tuottajat käyttävät ruokinnan suunnittelun apuvälineenä. Tällä hetkellä Valiolle tulevat tärkkelysmäärityspyynnöt tehdään alihankintamäärityksinä. Valio on kiinnostunut myös laajentamaan analyysivalikoimaansa, mikäli se katsotaan palvelun tai kustannusten vuoksi kannattavaksi. (Maunumaa 2019c.)

Työn tavoitteet. Työn tavoitteena oli testata Ewersin polarimetrisen menetelmän soveltuvuus Valio Oy Seinäjoen aluelaboratorion käyttöön sekä tutkia rehun tärkkelyspitoisuuden määrittämistä yleisesti. Työssä selvitettiin polarimetrisen menetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta tärkkelyspitoisten näytteiden avulla. Työssä vertailtiin reagenssien toimivuutta ja määriä sekä näytteiden tekemiseen ja ajamiseen kuluva aikaa.

2 REHU JA TÄRKKELYS

Maidontuotannon kustannukset muodostuvat rehuista ja muista muuttuvista kustannuksista (Kyntäjä & Nokka 2010, 5). Ruokintaratkaisut vaikuttavat merkittävästi navettainvestointeihin sekä työ- ja konekustannuksiin. Navettarakennus sekä koneinvestoinnit antavat ruokinnalle raamit, jotka voivat vaikuttaa maidontuotantoon vuosien ajan. Ruokintasuunnitelman perustana on lehmien terveydenseuranta sekä karjanomistajan oma näkemys tilan tulevaisuudesta (Kyntäjä ym. 2010, 5).

Maidontuotannon taloudellisuutta voi parantaa huolellisella strategisella ruokintasuunnittelulla ja rehujen tuntemisella. Hyvin tehty suunnitelma ja suunnitelman toteutus, varmistaa ravintoaineiden riittävyyden ylläpitoon sekä hyvään tuotokseen. (Kyntäjä ym. 2010, 7.) Kyntäjä ym. (2010, 7) korostavat, että ruokinnan suunnittelussa huomioidaan eläinten hyvinvointi ja terveys, rehubudjetointi, pitkän tähtäimen suunnittelu sekä päiväkohtainen ruokintasuunnitelma.

Ruohonsyöjäeläimet tarvitsevat kuitua pysyäkseen terveinä. Suurin osa lehmän ajasta kuluu rehua syöden ja märehien. Märehtijöiden ruoansulatusprosessi pystyy sulattamaan hiilihydraatteja mikrobien avulla. Liian suurista rehuannoksista sekä liian korkeasta rehun tärkkelyspitoisuudesta voi aiheutua lehmille vakavia ruoansulatushäiriöitä ja ongelmia pötsin mikrobikannan kanssa. (Farmit.net. [Viitattu 2.12.2019])

BeMillerin ja Whistlerin(2009, 17) mukaan tärkeimpiä runsaasti tärkkelystä sisältäviä viljelykasveja ovat peruna, pavut, maissi, ohra, vehnä, ruis, riisi, kassava ja durra. Kasvit tuottavat glukoosia fotosynteesissä. Fotosynteesi eli yhteyttäminen on kemiallinen prosessi, jonka aikana kasvien viherhiukkaset käyttävät auringon valoa, hiilidioksidia ja vettä tuottamaan kasville hyödyntämiskelpoista energiaa. Yhteyttämistuotteita ovat glukoosi ja happi. Kasvit varastoivat glukoosia tärkkelysmuodossa energiaksi tulevaa kasvukautta varten. (Ruokatieto yhdistys ry 2019b.)

2.1 Lehmän ruoansulatus

Nauta pureskelee rehua vain sen verran, että se pystyy nielaisemaan sen. Koska lehmä pureskelee rehua vain vähän, märehtiminen on olennainen osa ruoan hienonnusta. Rehu kulkee suusta ruokatorven kautta pötsiin ja pötsistä takaisin suuhun aaltomaisten liikkeiden avulla. Takaisin suuhun palaavan märepalan lehmä jauhaa partikkelikooltaan pieneksi ja samalla rehuun sekoittuu sylkeä. (Manni 2013, 45.)

Lehmän ruoansulatus on ainutlaatuinen (Vanhatalo 2010, 19). Sillä on neljä mahaa, joiden avulla nauta pystyy käyttämään ruoasta saatavat ravintoaineet todella tehokkaasti. Pötsi on nielun ja ruokatorven jälkeen ensimmäinen mahoista. Pötsissä rehu on kerroksittain. Alin kerros koostuu painavimmasta hienojakoisesta rehumassasta, sitten tulee pötsineste, jonka yläpuolella sijaitsee karkearehukerros. Pötsineste koostuu bakteereista, alkueläimistä, sienistä ja arkkieläimistä (Hulsen & Aerden 2014, 8). Pötsin ylin kerros muodostuu kaasuista. Pötsin seinämät supistelevat noin minuutin välein sekoittaen rehumassaa, jolloin sulanein massa painuu jälleen mahan pohjalle ja muu massa siirtyy ylöspäin (Manni 2013, 46).

Mannin (2013, 46) mukaan sulanut hienojakoinen massa siirtyy pötsistä verkkomahaan. Hän toteaa pötsissä ja verkkomahassa ruoan hajotuksen tapahtuvan mikrobien avulla, eikä niissä erityy ruoansulatusentsyymejä. Pötsissä ja verkkomahassa rehusta imeytyy märehtijän elimistöön valkuaista, rasvahappoja, vitamiineja sekä kuitua. Verkkomahassa rehu hajoaa lisää ja massa siirtyy nopeasti seuraavaan mahaan, satakertaan. (Manni 2013, 47–48.)

Satakerran mahakalvojen läpi imeytyy nesteitä ja tämän vuoksi rehumassa muuttuu koostumukseltaan kiinteämmäksi. Veden lisäksi satakerrassa rehusta imeytyy jonkin verran kivennäisiä ja haihtuvia rasvahappoja. Puolikiinteä rehumassa siirtyy viimeiseen mahaan eli juoksutusmahaan. (Vanhatalo 2010, 21).

Juoksutusmahassa on normaalin yksimahaisen eläimen ruuansulatusentsyymejä ja suolahappoja, jotka sulattavat rehumassaa edelleen (Vanhatalo 2010, 21). Juoksutusmaha on hapan, jolloin pötsimikrobien elintoiminnot katkeavat ja niiden solunsisältö vapautuu mahan käyttöön. Ruokasula virtaa jatkuvana virtana satakerrasta juoksutusmahan läpi. Tämän mahan jälkeen rehumassa siirtyy suolistoon, joka on varsinainen ravintoaineiden imeytymispaikka. (Manni 2013, 49.)

2.2 Lehmän ruokinta

Lehmän ruokinta vaikuttaa saatuun maitotuotokseen, lehmän terveyteen sekä kestävyteen. Märehtijän ruoansulatusjärjestelmä on erikoistunut käyttämään kuitupi-toista ravintoa (Vanhatalo 2010, 13.) Ruokinta on siis monipuolinen ja haastava kokonaisuus. Onnistunut lehmän ruokinta alkaa huolellisesta suunnittelusta, jossa täytyy tietää eläinten energian ja ravintoarvojen tarve sekä rehujen rehuarvojen tuntemisesta. Huolellisen suunnittelun lisäksi ruokinnan sujuminen tarvitsee jatkuvaa seurantaa karjahavaintojen ja tuotosseurannan kautta. (Kyntäjä ym. 2010, 7.)

Lehmän maitotuotos ei ole vakio, se muodostuu vasteena käytettävissä olevien ravintoaineiden ja energian määrille (Jaakkola, Rinne & Nousiainen 2010, 11). Eläimet tarvitsevat ravintoa päivittäin. Rehu sisältää ravintoaineita kuten proteiineja, hiilihydraatteja, kivennäis- ja hivenaineita sekä vitamiineja. Kaikki rehut sisältävät myös vettä, mutta veden ja ravintoaineiden määrä voi vaihdella eri rehuissa huomattavasti. Ruoasta saatavat ravintoaineet ylläpitävät eläimen elimistön perustoimintoja, toimivat eläimen luuston, rasvakudoksen ja lihaksiston rakennusaineina. (Manni 2013, 42.)

Hiilihydraateista lehmä saa energiaa, jolla on suuri vaikutus eläimen maidontuotantoon. Pötsikäymisessä hiilihydraateista jää jäljelle haihtuvia rasvahappoja, jotka vastaavat 50–70 % lehmän päivittäisestä energian tarpeesta. Märehtijä saa loput päivittäisestä energiasta ohutsuolessa sulavasta tärkkelyksestä, valkuaisesta ja rasvasta. (Hulsen & Aerden 2014, 7). Rehun kokonaisenergiasta vain neljännes on käytettävissä maidontuotantoon ja noin kolmannes muuttuu lämmöksi. Lehmä menettää energiaa virtsan, sonnan ja käymiskaasujen muodossa. Liiallinen tärkkelys kuitenkin häiritsee lehmän pötsin toimintaa. (Jaakkola ym. 2010, 11.)

Valkuaisaineet ovat välttämättömiä kaikissa lehmän elintoiminnoissa. Valkuaisaineet eli proteiinit ovat eläimen elinten ja kudosten rakennusaineita. Jotta pötsimikrobit kasvavat, ne tarvitsevat energiaa ja valkuaista. Jos rehussa on liian vähän valkuaista, pötsikäyminen hidastuu. (Jaakkola ym. 2010, 11–12.)

Kivennäis- ja hivenaineita tarvitaan ruoansulatukseen, lihaksiston toimintaan, luuston rakennusaineiksi ja sikiön kasvuun. Kivennäisaineiden tarve on liitoksissa tuotoksen kasvuun. Kun tuotos kasvaa, lehmä tarvitsee enemmän kivennäisaineita. (Jaakkola ym. 13–14.)

Eläimen aineenvaihdunta tarvitsee vitamiineja. Ne vaikuttavat tuotoksen laatuun eli maidon laatuun. Vitamiinit ovat välttämättömiä eläimelle, mutta niiden määrällinen tarve on pieni verrattuna muihin ravintoaineisiin. (Jaakkola ym. 2010, 14–15.)

2.3 Rehulaadut

Rehun tuotannossa on huomioitava rehujen käyttötarkoitus sekä millaisille eläimille rehua syötetään (Rinne & Sairanen 2010, 16). Säilörehun laatu muodostuu korjuun aikana kasvimassan koostumuksesta sekä rehun säilönnästä. Sadonkorjuu vaikuttaa merkittävästi rehun ravintoaineiden määrään (Nousiainen, Niskanen, Kainulainen & Toivakka 2010, 71). Myös kasvilaji, kasvuolot, sää ja viljelytoimet vaikuttavat rehun laatuun. Säilönnän aikana tapahtuvat rehun muutokset täytyisi yrittää minimoida sekä varmistaa rehun turvallisuus eläimille. Rehun säilömiseen vaikuttavat säilömisympäristön kosteus, happipitoisuus ja lämpötila. (Jaakkola, Sairanen, Nousiainen & Rinne 2010, 87.)

Märehtijöiden ruokinnassa käytettävät rehut jaetaan väki- ja karkearehuihin. Karkearehut pääasiassa koostuvat lehmille tärkeästä kuidusta, joka edesauttaa pötsin toimintaa. Liian pieni kuitupitoisuus vähentää syljen eritystä ja märehtimistä. Toisaalta liiallinen kuitu rajoittaa rehun miellyttävyyttä syönnin kannalta ja ravintoaineiden saantia. (Rinne & Sairanen 2010, 16.) Pötsimikrobit ovat erittäin herkkiä reagoimaan pötsin pH:n vaihteluille. pH:n voimakas lasku aiheuttaa pötsin häiriöitä ja rehun sulatus laskee. Pötsin pH:n laskua aiheuttavat nopeasti sulavat tärkkelys, sokeri ja hiilihydraatit. Nopeasti sulavia ravintoaineita tulee siis rajoittaa ruokinnassa.

(Manni 2013, 61.) Karkearehuihin kuuluvat olki, heinä, kokoviljasäilörehu, säilörehu ja laidunruoho. Karkearehut sisältävät kasvin kortta, lehtiä ja siemeniä. (Rinne & Sairanen 2010, 16.)

Kokoviljasäilörehu sisältää niukasti valkuaista, sen sulaminen on hidasta ja rehun suositeltava määrä on 20–40% lypsylehmälle annettavasta karkearehusta. (Jaakkola 2010a, 68.) Ummessa oleville lehmille kokoviljasäilörehu voi silti toimia ainoana karkearehuna sopivan väkirehuannoksen kanssa, koska ummessa ollessaan ne tarvitsevat vähemmän energiaa. Lypsylehmien rehuannos koostuu yleensä noin 50 % nurmirehusta ja toinen puoli väkirehusta. Väki rehujen ansiosta lehmille pystytään lisäämään valkuaisen ja energian saantia. (Rinne & Sairanen 2010, 18.)

Väki rehussa käytetään jyviä ja siemeniä tai niiden osia. Osa väki rehujen raaka-aineista on myös peräisin perunasta ja sokerijuurikkaasta. Väki rehut koostuvat pääasiassa tärkkelyksestä, sokerista, rasvasta ja valkuaisesta. Viljan jyvät sisältävät paljon tärkkelystä, mutta eri viljalajien jyvien tärkkelyspitoisuuksilla on eroja. Viljalajien suurimmat erot ruokinnan kannalta ovat vehnän muita suurempi tärkkelyspitoisuus, kauran suurempi rasvapitoisuus ja kauran sekä ohran suurempi kuitupitoisuus. (Jaakkola 2010b, 69–71.)

2.4 Tärkkelyksen rakenne

Tärkkelys esiintyy pienissä, tiheissä erillisissä paketeissa ja näitä kutsutaan jyväsiksi. Jyväsiä on kasveissa kahdenlaisia, varastotärkkelyksiä ja yhteyttämistärkkelyksiä. Varastotärkkelys esiintyy kasvien varastosolukoissa yhteyttämistärkkelystä suurempina jyväsinä. Varastotärkkelys-solukkoja löytyy kasvien hedelmistä, siemenistä, mukuloista tai juurista. Yhteyttämistärkkelystä tavataan viherhiukkasia sisältävissä kasvinosissa, esimerkiksi lehdissä ja tärkkelysjyväset ovat pieniä. Kasvien eri lajityypeillä on erilaiset tärkkelysjyväset ja tärkkelyksen rakenne sekä koostumus ovat myös erilaisia. (Ross 2012, 109–112.)

Tärkkelysjiyvät koostuvat vuorottelevista amorfisista ja kristallimaisista kerroksista. Nämä kerrokset rakentuvat kerrostumiskeskuksen eli hilumin ympärille. Tätä rakennetta kutsutaan vuosirenkaiksi. Nämä kerrokset aiheuttavat optisen polarisaation, joka pystytään mittaamaan polarimetrillä. Amorfinen kerros koostuu pääasiassa amylopektiinistä ja amyloosista. (Lamberg 2016, 12.)

Amylopektiini on rakenteeltaan voimakkaasti haarautunut, kaksoispiraalisen rakenteen omaava polymeeri. Sen rakenne tekee siitä käytännöllisesti katsoen kylmään veteen liukenemattoman ja osittain kuumaan veteen liukeneva. Sitä on kuvattu yhdeksi suurimmaksi luonnossa esiintyväksi polymeeriksi ja sen osuus tärkkelyksessä on jopa 70–80 %. Amyloosi on rakenteeltaan lineaarinen ja molekyylikooltaan pienempi kuin amylopektiini. (Preiss 2004, 3.) Amyloosin osuus tärkkelyksestä vaihtelee 20–30 %. Kasvien juuret, mukulat, ytimet ja siemenet ovat tärkkelyksen varastoitumispaikkoja. Eniten tärkkelystä löytyy kasvin jyivistä, jopa 70 % jyvistä on tärkkelystä (Lamberg 2012, 10). Tärkkelys hajoaa muita polysakkarideja helpommin lehmän pötsissä, mutta eri kasvien tärkkelyksillä on eroja hajoamisessa (Hulsen & Aerden 2014, 38).

Tärkkelys sisältää amylopektiinin ja amyloosin lisäksi todella pieniä määriä mineraaleja, lipidejä ja proteiineja. Näiden kaikkien osuus tärkkelyksessä on alle 2 %. (Lamberg 2016, 5.) Amyloosipitoisuuden kasvaessa, myös lipidien määrä kasvaa. Tärkkelyksen lipidit vähentävät tärkkelyksen paisumista ja liukenemista, muodostamalla amyloosilipidikomplekseja. Tuhkan ja proteiinien määrät tärkkelyksessä ovat todella pieniä. Proteiinin uskotaan olevan tärkkelysjiyvän pinnalta eikä jyvän sisältä. (Lamberg 2016, 8–9.)

Lamberg (2016, 16) kertoo, että tärkkelys pystyy imemään itseensä todella runsaasti vettä, koska vesi pääsee tunkeutumaan helposti tärkkelyksen spiraalirakenteeseen. Lämpötila vaikuttaa myös huomattavasti tärkkelyksen vedensidontakykyyn. Kun lämpötilaa nostetaan, tärkkelyksen vedensidontakyky kasvaa ja tärkkelys alkaa turvota. Tärkkelyksen turvotessa, lämpötilan ja veden määrän lisääntyessä, osa polysakkarideista alkaa valua ulos tärkkelysjiyvistä. Tärkkelyksen liukeneminen vaihtelee 10–20 % 84–95 °C lämpötilassa. Amyloosi ja amylopektiini liukenevat ja poistuvat tärkkelysjiyvästä runsaassa vedessä. Amyloosi on herkempi lämmölle

kuin amylopektiini ja liukeneekin jo alle 70 °C:ssa. Amylopektiini liukenee vasta yli 90 °C lämpötilassa. (Ross 2012, 113–115.)

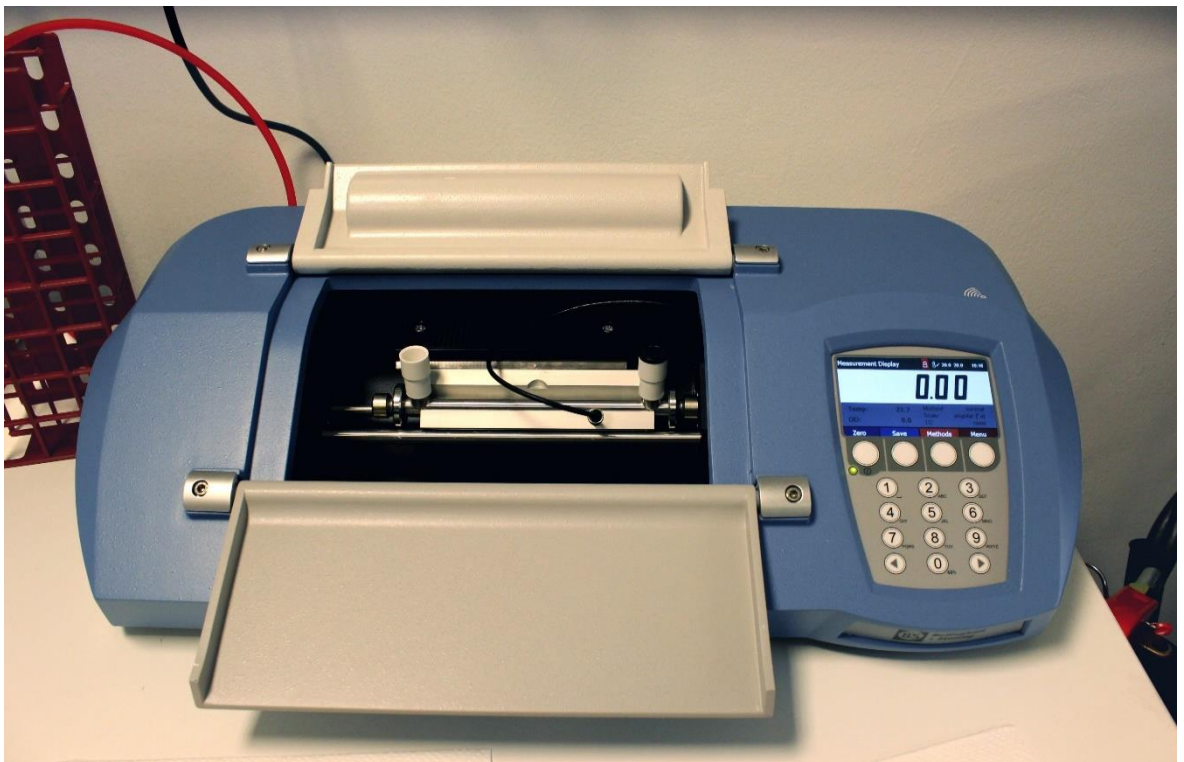
Tiettyyn lämpötilaan saakka tärkkelysjyväsien tilavuudenmuutos sekä veden imeytyminen ovat palautuvia ominaisuuksia. Kun lämpötila ylitetään, muutokset tärkkelysjyväsessä ovat pysyviä. Tätä tärkkelysjyväsien pysyvää muutoslämpötilaa kutsutaan liisteröitymislämpötilaksi. Tärkkelystä kuumennettaessa, amyloosi valuu jyväsistä liukseen muodostaen viskoosin geelin. Liuoksen viskositeetti suurentuu niin kauan, kun amylopektiini pysyy kasassa. Lämmitystä jatkettaessa amylopektiinimolekyylit alkavat irrota toisistaan ja liuoksen viskositeetti laskee. Viskositeetti laskee, kunnes tärkkelysjyväsien rakenne on liennut ja liuos on kolloidinen. Lämpötilaa pidettäessä vakiona, amyloosin ja amylopektiinin liuettua, liuoksen viskositeetti taantuu. Tätä kutsutaan pitolujuudeksi. Liuosta jäähdyttäessä, viskositeetti alkaa kasvaa. Amyloosi- ja amylopektiinimolekyylit kiteytyvät uudelleen, mutta vain osittain. (Ross 2012, 117–120.)

3 EWERSIN POLARIMETRINEN MENETELMÄ

Ewersin polarimetrisessä menetelmässä määritetään halutuista rehunäytteistä niiden tärkkelyspitoisuus. Menetelmä perustuu näytteen käsittelyyn suolahapolla, liuoksen kirkkaaksi suodattamiseen sekä näyteliuoksen optisen kiertokyvyn mittaamiseen polarimetrisesti. (Komission direktiivi 1999/79/EY.)

3.1 Polarimetrin toimintaperiaate

Teollisuusaloilla ja laboratoriolilla on usein käytössä digitaalisia polarimetrejä, jotka mahdollistavat suurien näytesarjojen mittaamisen yhden päivän aikana. Digitaalisen polarimetrin analysaattori sekä ilmaisimet ovat automaattisesti säädettäviä, joka nopeuttaa näytteen mittauksen kestoja useilla sekunneilla. (Krüss 2019.) Kuvassa 1 on käytössä ollut ADP450-polarimetri kansi auki ja sisällä näkyy kyvetti pidikkeessään sekä lämpötila-anturin mustajohhto.



Kuva 1. ADP450 -polarimetri.

Polarimetri on merkittävä laite kiraalisten eli optisesti aktiivisten aineiden ominaiskiertokyvyn määrittämisessä. Taulukossa 1 on erilaisten viljojen ominaiskiertokyvyt. Aineiden ominaiskiertokyvyn mittaamiseen vaikuttaa merkittävästi liuoksen lämpötila, mittaustemperatuurilämpötila, konsentraatio, liuotin sekä polarimetrin puhtaus (Anton Paar 2019). Polarimetri on laite, joka mittaa pyörimiskulmaa johtamalla polarisoitunutta valoa aktiivisen aineen läpi. Polarimetrin valonlähteenä on yleensä Na-lamppu (led), jonka aallonpituus on 589 nm (Maunumaa 2019a). Na-lamppu tuottaa monokromaattista säteilyä, joka värähtelee vain yhdessä suunnassa (Anton Paar 2019).

Taulukko 1. Tärkkelystyyppien ominaiskiertokyky (Komission direktiivi 1999/79/EY,[viitattu 15.11.2019]).

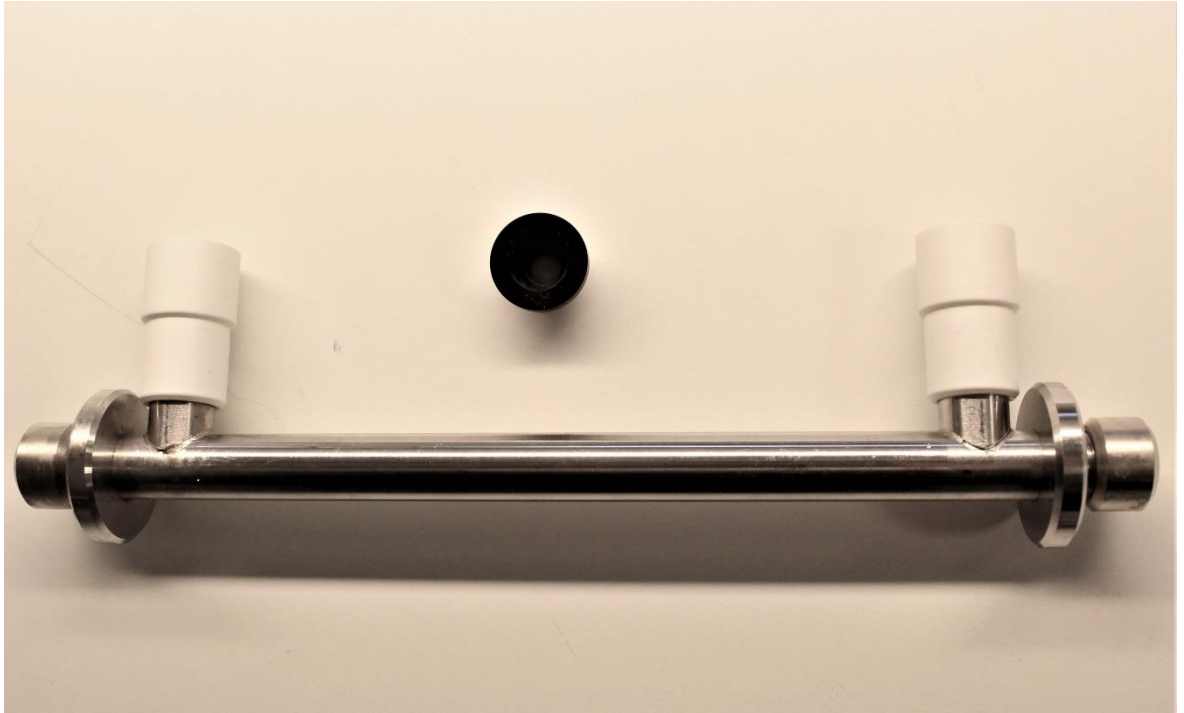
Tärkkelystyyppi	Ominaiskiertokyky
Riisi	185,9°
Peruna	185,7°
Maissi	184,6°
Vehnä	182,7°
Ohra	181,5°
Kaura	181,3°
Muut tärkkelysseokset	184,0°

Kuvassa 2 esitettiin polarimetrin valon kulku. Valonsäde lähtee valonlähteestä ja kulkee ensin polarisaattorin (polarisaatiosuodatin) läpi. Jos polarisoimaton valo osuu polarisaattoriin, vain se osa valosta voi kulkea sen läpi, joka värähtelee samalla tasolla kuin polarisaatiosuodatin on kohdistettu. Tätä tasoa kutsutaan polarisaatiotasoksi ja valoa kutsutaan polarisoiduksi tasoksi. Polarisoitu valo kulkee polarisaattorin jälkeen näytesolun läpi. (Anton Paar 2019.)



Kuva 2. Polarimetrin valon kulku (soveltaen Anton Paar 2019).

Näyte asetetaan valonsäteen tielle kyvetissä. Kuvassa 3 on 200 mm kyveti, joka oli tarkoitettu ADP450 -polarimetrissä käytettäväksi. Kyvetissä on kaksi yhdensuuntaista optista pintaa eli linssiä ja valonsäde kulkee kohtisuoraa niiden läpi (Niiranen & Jaarinen 2008, 58). Valon kulkiessa näytteen läpi sen intensiteetti pienenee. Intensiteetin pieneneminen on jokaiselle aineelle ominaista ja se kertoo valon aallonpituudesta, näytteen pitoisuudesta ja paksuudesta. Valo kulkee toisen polarisaattorin läpi analysaattorille. Jos näyte on optisesti passiivinen, polarisaattori ja analysaattori on suunnattu kohtisuoraan toisiinsa nähden. Jos näyte on optisesti aktiivinen, polarimetri pyörittää polarisaattoria, kunnes näyttekennon takana oleva polarisaatiotasoon on jälleen kohtisuorassa analysaattorin polarisaatiotasoon nähden. Tuloksena oleva pyörimisaste on suora näytteen optisen pyörimisen mitta. (Anton Paar 2019.)



Kuva 3. Kyveti 200 mm.

3.2 Menetelmän kuvaus

Rehunäytteet kuivattiin ja jauhettiin ennen Ewersin polarimetristä määrittystä. Jauhetut näytteet punnittiin vaa'alla, säilöviljaa 2 g, kokoviljaa 2 g ja maissia 5 g. Näytteet laitettiin mittapulloihin ja pulloihin lisättiin 50 ml 1,125 %:sta suolahappoa. Mittapullot siirrettiin kiehuvaan vesihauteeseen sekoituksen jälkeen. Jokaisen pullon kaulaan laitettiin mutteri, jotta pullot pysyivät pystyssä kiehuvaan vedessä. Mittapullot olivat vedessä 15 minuuttia. Kolmen ensimmäisen minuutin ajan pulloja sekoitettiin. Mittapulloja ei nostettu pois vedestä sekoituksen aikana. Sekoituksella varmistettiin suolahapon ja näytteen sekoittuminen ja hydrolyysin täydellinen tapahtuminen. Kiehumisen jälkeen näytteet jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi. Jäähdyneisiin näytteisiin lisättiin 5 ml Carrez I ja 5 ml Carrez II liuoksia, jotka saostavat suodoksesta pois rasvan ja valkuaisen. Viimeisissä määrittelyissä Carrez I ja II korvattiin 2 ml 12% natriummolybdaatti liuosta. Näytteet suodatettiin uusiin mittapulloihin suodatinpaperin ja suppilon avulla. Lopputuloksena oli kirkkaita näytteitä. Mittapullot siirrettiin noin 20 °C lämpöhauteeseen odottamaan analyysiä.

Ensin polarimetri nollattiin. Tässä käytettiin tislattua vettä, mutta olisi voitu käyttää kontrollinäytettä, joka sisältää suolahappoa sekä Carrez I ja II reagensseja. Polarimetrissä oli kyveti, joka oli 200 mm pitkä metallinen putki syöttöaukoilla. Kyvetin kummassakin päässä oli linssit, joiden läpi valonsäde kulki kohtisuoraa. Kyveti täytettiin tislatulla vedellä ja varmistettiin ettei kyvetissä ole ilmakuplia. Jos putkessa näkyi ilmakupla, se saatiin pois hitaasti putkea keinuttamalla. Kyveti asetettiin polarimetriin omaan telineeseensä, jonka jälkeen kyvetiin laitettiin lämpötila-anturi ja polarimetrin kansi suljettiin. Polarimetri suoritti mittauksen, jonka jälkeen painettiin Zero- näppäintä, jolloin laite nollaantui. Nollauksen jälkeen näytteet ajettiin yksi kerrallaan. Jokaisen näytteen jälkeen kyveti puhdistettiin tislatulla vedellä. Edellinen näyte voi kontaminoida seuraavan näytteen erityisesti pienillä pitoisuuksilla.

3.3 Reagenssit

Ewersin polarimetrisessä menetelmässä reagensseja ovat 1,125 % suolahappo HCl ja 30 % sinkkisulfaatti $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Carrez I) ja 15 % kaliumheksasyanoferraatti $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (Carrez II) liuokset (Institute of chemical technology). Vaihtoehtoisena reagenssina käytettiin 12 % natriummolybdaattiliuosta (Na_2MoO_4) korvaamaan Carrez I ja II reagenssit määrityksessä (Mäkelä 2019).

Suolahappo HCl on voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Se saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä. Suolahapon fysikaalinen olomuoto on vaaleankeltainen neste ja hajultaan katkera. (Käyttöturvallisuustiedote Suolahappo 2013, 1.) Suolahappoliuos valmistettiin 1 l mittapulloon lisäämällä ensin tislattua vettä, sitten 26,4 ml suolahappoa ja pullo täytettiin merkkiin asti tislatulla vedellä (Institute of chemical technology).

Sinkkisulfaatti (Carrez I) on hajuton, valkoinen ja kiteinen jauhe. Aine voi ärsyttää hengitysteitä ja keuhkoja (Käyttöturvallisuustiedote Sinkkisulfaattiheptahydraatti 2018, 4.) Sinkkisulfaattia punnittiin 53,4 g ja se liuotettiin tislattuun veteen. Carrez I liuos valmistettiin 100 ml mittapulloon (Institute of chemical technology).

Kaliumheksasyanoferraatti (Carrez II), toiselta nimeltään keltainen verilipeäsuola, on arkaa valolle ja se voi kehittää myrkyllistä kaasua hapon kanssa. $K_4[Fe(CN)_6]$ on keltainen kiteinen jauhe, joka on hajuton. (Käyttöturvallisuustiedote Kaliumheksasyanoferraatti(II) trihydraatti 2016, 4.) Carrez II punnittiin 17,2 g, se liuotettiin tislattuun veteen ja täytettiin 100 ml mittapullo merkkiin asti (Institute of chemical technology).

Natriummolybdaatti (Na_2MoO_4) on kiteinen valkoinen jauhe, joka on hajuton (Käyttöturvallisuustiedote Natriummolybdaatti dihydraatti 2018, 5). Natriummolybdaattia käytettiin vaihtoehtoisena reagenssina Carrez I ja II sijaan. Na_2MoO_4 -liuos valmistettiin 250 ml mittapulloon liuottamalla 30 g natriummolybdaattia tislattuun veteen ja täytettiin merkkiin asti (Institute of chemical technology).

Laboratoriossa työskennellessä noudatettiin yleisiä laboratorion turvallisuussäätöjä. Pukeuduttiin suojavaatetukseen, pidettiin kumihanskoja, liuokset tehtiin ja käsiteltiin vetokaapissa. (Maunumaa 2019a.)

3.4 Rehunäytteet

Valitut näytteet olivat kaikki erilaisia tärkkelyspitoisuuksiltaan ja näistä rehulaaduista tulee eniten tärkkelysmäärityspyyntöjä. Valittuja näytteitä oli 18. Kahdeksan säilöviljanäytettä, neljä kokoviljanäytettä ja kuusi maissinäytettä. Korsineen, jyvineen ja lehtineen säilöttävää rehua sanotaan kokosäilöviljaksi. Kokovilja on rakenteeltaan suurempaa mitä säilövilja. Yleisimmät viljalajit ovat kaura, ohra ja vehnä, mutta se voi sisältää myös palkokasveja ja valkolupiinia. Kuvassa 4 on käsittelemättömiä kokoviljanäytteitä. Maissin tärkkelys fermentoituu märehitjän pötsissä hitaammin kuin vehnän, ohran tai kauran. Maissilla pystytään korvaamaan jopa puolet karkearehusta, jos maissin laatu on erinomaista. Säilövilja sisältää paljon tärkkelystä, koska se koostuu pääasiassa hapolla säilötyistä kasvin jyivistä, murske- tai litistesäilötystä viljasta. (Maunumaa 2019c.)



Kuva 4. Kokoviljanäytteitä ennen käsittelyä.

Rehunäytteet kuivattiin kuivauskaapissa, jotta rehun rakenne saatiin mahdollisimman hienoksi. Säilöviljanäytteet 105 °C 18 tunniksi ja kokovilja sekä maissi 50 °C 18 tunniksi. Kuivumisen jälkeen näytteet jauhettiin myllyllä jauheeksi tulevia määriä varten. (Maunumaa 2019b.)

Ennen määriä päätettiin Viljavuuspalveluiden referenssituloksista, paljonko rehunäytteitä tarvittiin per määritys. Todettiin näytemääräksi säilöviljaa 2 g, kokoviljaa 2 g ja maissia 5 g. Maissin näytemäärä säilöviljaa ja kokoviljaa suurempi, koska referenssinäytteiden pitoisuudet maissille olivat todella pieniä. Näillä rehunäytteiden näytemäärillä saatiin tarpeeksi liuotettua tärkkelystä näytteeseen, jolla varmistettiin luotettavat mittaustulokset. Rehunäytteistä tehtiin rinnakkaismittauksia mittausten toistettavuuden selvittämiseksi. Näytteet punnittiin, analysoitiin samoissa mittaolosuhteissa, samalla menetelmällä ja laitteella. (Maunumaa 19a–c)

3.5 Menetelmän validointi

Jokaiseen laboratoriotulokseen on voitava luottaa. Lähes aina tuotannollisten ja oikeudellisten sekä ympäristön ja ihmisen terveyttä koskevien päätösten taustalla on laboratoriotutkimuksia ja analyysituloksia (Jaarinen & Niiranen 2008, 8). Osoittamalla mittausjärjestelmän kyky tuottaa oikeita tuloksia näytteille ja näytepitoisuuksille, saadaan tulosten oikeellisuus todennettua. Mittausjärjestelmä testataan validoinnilla. Validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jonka avulla varmennetaan analyysin ja analyysilaitteen sopivuus, suorituskkyky sekä tulosten oikeellisuus. Analyysin ja analyysilaitteen validointi suoritetaan vertaamalla käyttöön ottoon valittua menetelmää samoista näytteistä jo olemassa oleviin tuloksiin. Validoinnin tuloksena syntävä tieto ja olemassa oleva tieto kerätään yhteen ja niiden perusteella todetaan, onko menetelmä luotettava. (Jaarinen & Niiranen 2008, 8–13.)

3.6 Satunnaisvirhe ja systemaattinen virhe

Validoinnin tarkoituksena on tarkastella vertailumateriaalien avulla menetelmän pätevyys tuottaa oikeita tuloksia. Sen avulla selvitetään häiriöiden ja työtiloissa vallitsevien olosuhteiden muutokset. Tuloksien tarkkuus ja mittauksiin liittyvä kokonaisvirhe voidaan määrittää, kun tunnetaan satunnaisvirhe ja poikkeama eli systemaattinen virhe. (Jaarinen & Niiranen 2008, 30.)

Satunnaisvirhe on aina läsnä kaikissa tutkimuksissa ja sitä ei voida ennustaa etukäteen. Huolellisella työskentelyllä sekä vaikuttamalla vallitseviin olosuhteisiin, satunnaisvirhettä voidaan hallita. Satunnaisvirhe voi joko suurentaa tai pienentää mitaustulosta. Suorittamalla tarpeeksi rinnakkaismäärittäyksiä ja laskemalla tulosten keskihajonta, satunnaisvirheen suuruus voidaan määrittää. (Jaarinen & Niiranen 2008, 31.)

Poikkeama eli systemaattinen virhe vaikuttaa aina samalla tavalla. Systemaattinen virhe johtuu yleensä liuoksen virheellisyydestä, analyysilaitteen viasta tai olosuhteiden muutoksesta kesken määrittäyksen. Se voidaan määrittää käyttämällä tarkoitukseen sopivaa vertailumateriaalia, jonka oikeellisuus on varmistettu. (Jaarinen & Niiranen 2008, 34.)

Mittaustuloksiin vaikuttaa useita tekijöitä, joita ei voida kaikkia tuntea täysin tarkkaan. Kaikki mittaustulokset sisältävät tietyn vaihteluvälin, jota kutsutaan kokonaismittausepävarmuudeksi. Kokonaismittausepävarmuutta tarvitaan tulosten ja menetelmän luotettavuuden arviointiin sekä jäljitettävyyden aikaansaamiseen. (Finas 2016.) Raporteissa ilmoitettava kokonaismittausepävarmuuden vaihteluväli ilmoitetaan yleensä 95 % todennäköisyydellä (Jaarinen & Niiranen 2008, 34).

3.7 T-testi ja t-taulukkoarvo

T-testiä käytetään keskiarvojen vertailuun. T-testissä lasketaan t-arvo ja tätä lukua verrataan t-jakaumasta poimittuun raja-arvoon eli vapausastelukuun. Taulukossa 2 on esitetty vapausastelukuja. Vapausasteluku on yhtä pienempi kuin otoskoko n eli $n-1$. Esimerkiksi taulukossa 3 $t_{0.05}(7)$ on t-taulukkoarvo vapausasteella 7, jossa 7 on $n-1$ eli näytteitä on 8 miinus yksi. 05 tarkoittaa tarkasteltavaa todennäköisyyttä eli $100 - 5 = 95$ % todennäköisyydellä tämä väittämä pitää paikkansa.

Taulukko 2. T-taulukko (Maol 2010, 62).

Vapausasteluku	$p=0,05$
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228

Jos t-testin tulos on alle vapausastelukeman, systemaattista virhettä ei esiinny tuloksissa, jolloin kokonaismittausepävarmuus lasketaan pelkästään satunnaisvirheen kautta kaavalla 6. Jos t-testin tulos on yli vapausastelukeman systemaattinen virhe esiintyy mittauksissa ja mittausepävarmuus lasketaan kaavalla 7.

4 TULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY

Tuloksista tarkasteltiin määrytyksien oikeellisuus, vertaamalla saatuja tuloksia Viljavuuspalveluiden referenssituloksiin. Ewersin polarimetrisen menetelmän mukaan määrytyksen aikana suolahappoa piti lisätä 70 ml, mutta rinnakkaismäärytyksillä testattiin, riittääkö vain 50 ml suolahappoa toteuttamaan samat tulokset. Tukea suolahapon määrän vähentämiseen saatiin toisen laboratorion suorittamista määrytyksistä.

Carrez I ja II ovat yleisimmät reagenssit Ewersin polarimetrisessä menetelmässä. Haluttiin tietää, voisiko Carrez I ja II korvata natriummolybdaatilla, joka nopeuttaisi määrytyksen tekemistä ajallisesti, koska olisi vain yksi reagenssi lisättävänä kahden sijaan.

Menetelmässä ei kerrota, kauanko näytteet säilyvät mittauskelpoisina, joten 12 näytteellä testattiin ajan vaikutus näytteiden mittaustuloksiin. Näytteitä seisotettiin lämpöhauteessa kaksi tuntia ja polarimetrillä mitattiin ajan vaikutus näytteiden tuloksiin.

Mittaustuloksiin koottiin kaikki näytteiden punnitus- ja mittaustulokset, rehujen tärkkelyspitoisuudet, referenssinäytteen ja saadun tärkkelyspitoisuuden erotus, t-testi sekä kokonaismittausepävarmuus. Kaavat löytyvät liitteistä.

Tulososiossa esiintyvät lyhenteet ovat seuraavat:

rehulaji	on näytteen rehulaji
ref%	on referenssinäytteen Viljavuuspalveluiden tulos
m%(1)	on näytteen ensimmäinen oma mittaustulos
m%(2)	on näytteen toinen oma mittaustulos
m%ka	on omien mittaustulosten keskiarvo
d	on referenssinäytteen ja omien mittaustulosten keskiarvon erotus

dri(%)	on suhteellinen erotus
näyte, g	on näytteen punnitusmäärä
α_1	on näytteen havaittu kierto 200 mm polarimetriputkella
α_2	on rinnakkaisnäytteen havaittu kierto 200 mm polarimetriputkella

4.1 Rehunäytteiden tärkkelyspitoisuus

Rehunäytteiden tärkkelyspitoisuus m% laskettiin kaavalla 1. Kaavassa 1 viljatärkkelyksen ominaiskiertokyvyn α_D luku $184,0^\circ$ on taulukon 1 kohdasta *muut tärkkelysseokset*. Polarimetrillä havaittu kierto sekä itse punnittu näytteen määrä lisättiin valmiiseen kaavaan ja saatiin tärkkelyspitoisuusprosentti, joka ilmoitetaan tuottajalle g/kg ka. m%(1) on näytteen ensimmäinen mittaus ja m%(2) on saman näytteen vertailumittaus. m%ka arvoon on laskettu näiden kahden, m%(1) ja m%(2), keskiarvo.

Taulukossa 2 säilöviljanäytteiden m%(1) ja m%(2) mittaustulokset ovat hyvin samankaltaisia ja tasaisia. Näytteen 41241 omien mittaustulosten keskiarvoa verrattaessa saman näytteen referenssitulokseen, huomattiin omien mittaustulosten olevan 2,5 pienempi kuin referenssitulos. Näytteen 41503 omien mittaustulosten keskiarvo oli saman näytteen referenssitulosta 2,5 suurempi. Nämä poikkeamat saattavat johtua näytteiden otantakohtaan pitoisuuksista tai näyteliuoksen puhtaudesta.

Taulukossa 3 kokoviljanäytteiden m%(1) ja m%(2) tulokset ovat tasalaatuisia. Kokoviljanäytteiden tärkkelyspitoisuudet ovat pienempiä kuin säilöviljanäytteiden, joten mittavirheet näkyvät herkästi mittaustuloksissa. Näytteen 42138 m%ka mittaustulos on näytteistä ainoa, jonka tulos on alle referenssinäyteentuloksen.

Taulukossa 4 maissinäytteiden m%(1) ja m%(2) mittaustulokset ovat yhtenäisiä. Maissinäytteiden tärkkelyspitoisuudet olivat pienempiä kuin säilöviljanäytteiden ja kokoviljanäytteiden. Näytteiden 41379, 41697, 42168 mittaustuloksien m%ka ylittävät referenssinäyteidentulokset. Poikkeamat voivat tulla liuoksien puhtaudesta, rehunäytteiden otantakohtaan pitoisuuksista tai menetelmän suorituksen aikana tulleista mittavirheistä.

4.2 Mittausepävarmuus

Kokonaismittausepävarmuuden selvittämiseksi täytyi arvioida koko ketjun eri vaiheiden epävarmuudet. Kokonaismittausepävarmuuden selvittämiseksi täytyi saada tieto suhteellisesta erotuksesta, keskiarvosta, keskihajonnasta, t-testistä, satunnaisvirheestä sekä systemaattisesta virheestä.

Ennen mittausepävarmuuden laskemista täytyi saada tietää esiintyykö mittaustuloksissa systemaattista virhettä. Systemaattisen virheen arvioimiseksi laskettiin mittaustuloksen keskiarvon $m\%$ ja referenssituloksen $ref\%$ suhteellinen erotus $dri\%$ kaavalla 3. Suhteellisen erotuksen tuloksista laskettiin keskiarvo ka (kaava 4) ja keskihajonta s (kaava 5).

Suhteellisen erotuksen keskiarvon sekä keskihajonnan avulla laskettiin T-testi eli t-arvo. T-arvoa verrataan t-jakaumasta poimittuun raja-arvoon eli vapausastelukuun. Jos t-testin tulos on alle vapausastelukeman, systemaattista virhettä ei esiinny tuloksissa, jolloin kokonaismittausepävarmuus laskettiin pelkästään satunnaisvirheen kautta kaavalla 6. Jos t-testin tulos oli yli vapausastelukeman systemaattinen virhe esiintyy mittauksissa ja mittausepävarmuus lasketaan kaavalla 7.

Taulukossa 3 säilöviljanäytteitä oli kahdeksan kappaletta. T-testi oli laskettu kaavan 2 mukaan ja tulokseksi tuli 1,43. T-testiä ja vapausastelukua $t.05(7) = 2,365$ (taulukko 2) vertaamalla todettiin, että systemaattista virhettä ei esiinny näiden näytteiden tuloksissa. Koska systemaattista virhettä ei esiinny, mittausepävarmuus lasketaan pelkästään satunnaisvirheen avulla. Laajennettu epävarmuus 95 % luottamustasolla lasketaan kaavalla 3:

$$U = 2 * 1,46$$

$$U = 2,9 \text{ prosenttiyksikköä}$$

Säilöviljanäytteiden mittausepävarmuus on 2,9. Verratessa referenssinäytteitä ja omia mittaustuloksia, omat mittaustulokset poikkeavat maksimissaan 2,9:llä referenssinäytteiden tuloksista.

Taulukko 3. Säilöviljan mittausepävarmuus.

näytetunnus, säilövilja	ref%	m%(1)	m%(2)	m%ka	d(ref%- m%ka)	dri(%)
41069	45,1	45,2	45,5	45,35	-0,25	-0,55
41070	52,6	53,7	53,7	53,7	-1,10	-2,09
41241	54,7	51,7	52,7	52,2	2,50	4,57
41503	46,1	48,6	48,6	48,6	-2,50	-5,42
41937	41,7	42,7	43,4	43,05	-1,35	-3,24
42223	58,4	58,7	58,4	58,55	-0,15	-0,26
42742	53,2	54,3	53,7	54	-0,80	-1,50
42743	37,7	38,2	39,9	39,05	-1,35	-3,58
ka					-0,62	-1,51
s					1,46	2,99

Taulukossa 4 kokoviljanäytteitä oli neljä kappaletta. T-testi on laskettu kaavan 2 mukaan tulokseksi tuli 2,72. T-testiä ja vapausastelukua $t_{0.05}(3) = 3,18$ (taulukko 2) vertaamalla todettiin, että systemaattista virhettä ei esiinny näiden näytteiden tuloksissa. Koska systemaattista virhettä ei esiinny, mittausepävarmuus lasketaan pelkästään satunnaisvirheen avulla. Laajennettu epävarmuus 95 % luottamustasolla on:

$$U = 2 * 0,81$$

$$U = 1,6 \text{ prosenttiyksikköä}$$

Kokoviljanäytteiden mittausepävarmuus on 1,6. Verratessa referenssinäytteitä ja omia mittaustuloksia, omat mittaustulokset poikkeavat maksimissaan 1,6:lla referenssinäytteiden tuloksista.

Taulukko 4. Kokoviljan mittausepävarmuus.

näytetunnus, kokovilja	ref %	m%(1)	m%(2)	m%ka	d(ref%- m%ka)	dri(%)
42138	41,5	41,4	41,3	41,35	0,15	0,36
41849	20,0	21,7	21,6	21,65	-1,65	-8,25
42408	23,7	25,3	25,0	25,15	-1,45	-6,12
42617	17,4	18,6	18,5	18,55	-1,15	-6,61
ka					-1,03	-5,15
s					0,81	3,79

Taulukossa 5 maissinäytteitä oli kuusi kappaletta. T-testi on laskettu kaavan 2 mukaan tulokseksi tuli 1,58. T-testiä ja vapausastelukua $t_{0.05}(5) = 2,571$ (taulukko 2) vertaamalla todettiin, että systemaattista virhettä ei esiinny näiden näytteiden tuloksissa. Koska systemaattista virhettä ei esiinny, mittausepävarmuus lasketaan pelkästään satunnaisvirheen avulla. Laajennettu epävarmuus 95 % luottamustasolla on:

$$U = 2 * 1,43$$

$$U = 2,86 \text{ prosenttiyksikköä}$$

Maissinäytteiden mittausepävarmuus on 2,86. Verratessa referenssinäytteitä ja omia mittaustuloksia, omat mittaustulokset poikkeavat maksimissaan 2,86:lla referenssinäytteiden tuloksista.

Taulukko 5. Maissin mittausepävarmuus.

näytetunnus, maissi	ref %	m%(1)	m%(2)	m%ka	d(ref%- m%ka)	dri(%)
41376	23,5	23,7	23,0	23,35	0,15	0,64
41379	25,3	26,7	26,4	26,55	-1,25	-4,94
41697	34,0	31,3	31,8	31,55	2,45	7,21
42166	3,0	3,7	3,8	3,75	-0,75	-25,00
42168	11,9	13	13,8	13,4	-1,50	-12,61
42497	1,8	2,1	1,8	1,95	-0,15	-8,33
ka					-0,18	-7,17
s					1,43	11,15

4.3 Suolahapon määrän vaikutus mittaustulokseen

Ewersin polarimetrisessä menetelmässä suolahappoa käytettiin määrityksen aikana 70 ml, mutta haluttiin tietää, riittäisikö menetelmän suorittamiseen sekä tarkkoihin tuloksiin 50 ml suolahappoa, josta oli näyttöä toisen laboratorion suorittamista määrityksistä.

Taulukon 5 mittaustulokset tehtiin Ewersin polarimetrinen menetelmän mukaisesti käyttämällä 70 ml suolahappoa. Omat tulokset m%(1) olivat todella lähellä referenssituloksia ref%. Joissakin tuloksissa oli pieniä heittoja joko ylös- tai alaspäin, mutta ne voi johtua monista mittavirheistä, esimerkiksi mistä kohtaa näytettä oli otettu tai näytteen käsittelyn aikana tapahtuneesta virheestä.

Taulukko 6. Suolahapon määrän vaikutus, 70 ml.

rehulaji	näytetunnus	ref %	näyte, g	α_1	m% (1)	Erotus ref%-m%(1)	dri(%)
säilövilja	41069	45,1	2,0023	3,33	45,2	-0,1	-0,2
säilövilja	41070	52,6	2,0000	3,95	53,7	-1,1	-2,0
säilövilja	41241	54,7	2,0008	3,81	51,7	3,0	5,4
säilövilja	41503	46,1	2,001	3,58	48,6	-2,5	-5,5
säilövilja	41937	41,7	2,0002	3,14	42,7	-1,0	-2,3
säilövilja	42223	58,4	2,0007	4,32	58,7	-0,3	-0,5
säilövilja	42742	53,2	2,0008	4,00	54,3	-1,1	-2,1
säilövilja	42743	37,7	2,0012	2,81	38,2	-0,5	-1,2
kokovilja	42138	41,5	2,0009	3,05	41,4	0,1	0,2
kokovilja	41849	20	2,0009	1,60	21,7	-1,7	-8,6
kokovilja	42408	23,7	2,0002	1,86	25,3	-1,6	-6,6
kokovilja	42617	17,4	2,0007	1,37	18,6	-1,2	-6,9
maissi	41376	23,5	5,0017	4,37	23,7	-0,2	-0,7
maissi	41379	25,3	5,0015	4,93	26,7	-1,4	-5,5
maissi	41697	34	5,0000	5,77	31,3	2,7	8,1
maissi	42166	3	5,0012	0,68	3,7	-0,7	-22,8
maissi	42168	11,9	5,002	2,42	13,1	-1,2	-10,1
maissi	42497	1,8	5,0015	0,39	2,1	-0,3	-17,3
ka							-3,2
s							7,1

Taulukon 6 omat mittaustulokset ovat tehty pienentämällä suolahapon määrää 70 ml 50 ml. Omat tulokset m%(2) olivat lähellä referenssituloksia ref%. Joissakin tuloksissa oli pieniä heittoja, mutta ne voivat johtua rehunäyttein otantakohtasta, liuoksien puhtaudesta tai muista mittavirheistä.

Taulukoita 5 ja 6 verrataan toisiinsa. Erot eivät ole suuria referenssitulosten ref% ja omien mittaustulosten välillä. Kun suolahappoa oli 50 ml, referenssitulosten ja omien mittaustulosten erotukset olivat jopa keskimääräistä parempia kuin suolahapon määrän ollessa 70 ml.

Taulukoiden 5 ja 6 keskiarvot sekä keskihajonnat olivat todella lähellä toisiaan. Suolahappoa 70 ml keskiarvo oli -3,2 ja suolahappoa 50 ml keskiarvo oli -3,3. Keskihajonnat olivat 7,1 (suolahappoa 70 ml) ja 7,6 (suolahappoa 50 ml). Kun suolahappoa oli 50 ml, keskihajonta kertoi mittaustulosten olevan laajemmalle levinneet kuin suolahappoa ollessa 70 ml.

Taulukko 7. Suolahapon määrän vaikutus, 50 ml.

rehulaji	näytetunnus	ref%	rinnakkaisn, g	α_2	m% (2)	Erotus ref%-m%(2)	dri(%)
säilövilja	41069	45,1	2,0003	3,35	45,5	-0,4	-0,9
säilövilja	41070	52,6	2,0004	3,95	53,7	-1,1	-2,0
säilövilja	41241	54,7	2,0007	3,88	52,7	2,0	3,7
säilövilja	41503	46,1	2,0009	3,7	50,2	-4,1	-9,0
säilövilja	41937	41,7	2,0014	3,2	43,4	-1,7	-4,2
säilövilja	42223	58,4	2,0014	4,3	58,4	0,0	0,0
säilövilja	42742	53,2	2,0003	3,95	53,7	-0,5	-0,9
säilövilja	42743	37,7	2,0006	2,94	39,9	-2,2	-5,9
kokovilja	42138	41,5	2,0006	3,04	41,3	0,2	0,5
kokovilja	41849	20	2,0002	1,59	21,6	-1,6	-8,0
kokovilja	42408	23,7	2,0011	1,84	25,0	-1,3	-5,4
kokovilja	42617	17,4	1,9998	1,36	18,5	-1,1	-6,2
maissi	41376	23,5	5,0012	4,25	23,0	0,5	2,1
maissi	41379	25,3	5,0003	4,88	26,4	-1,1	-4,5
maissi	41697	34	5,0012	5,88	31,8	2,2	6,3
maissi	42166	3	5,0001	0,71	3,8	-0,8	-28,2
maissi	42168	11,9	5,0016	2,55	13,8	-1,9	-16,0
maissi	42497	1,8	5,0020	0,34	1,8	0,0	-2,3
ka							-3,3
s							7,6

4.4 Reagenssi natriummolybdaatti

Ewersin polarimetrinen menetelmän yhdessä versiossa Carrez I ja II korvattiin 2 ml natriummolybdaattia. Tätä haluttiin testata käytännössä, miten natriummolybdaatti toimisi yleisimpien reagenssien Carrez I ja II korvaajana. Yhden reagenssin lisääminen kahden sijaan nopeuttaisi menetelmän suorittamista ja säästäisi aikaa. Yhden päivän aikana saisi tehtyä enemmän määryksiä ja useammalle tuottajalle rehun tärkkelyspitoisuustulokset.

Taulukossa 8 rehunäytteiden omat mittaustulokset $m\%(1)$ ja $m\%(2)$ ovat hyvin samankaltaisia ja tasaisia. Näytteen 41069 omien mittaustulosten keskiarvoa $m\%ka$ verratessa saman näytteen referenssitulokseen $ref\%$, huomattiin omien mittaustulosten olevan 3 pienempi kuin referenssitulos. Tämä poikkeama saattaa johtua näytteen otantakohtaan pitoisuuksista.

Systemaattisen virheen arvioimiseksi laskettiin mittaustuloksen keskiarvon $m\%ka$ ja referenssituloksen $ref\%$ suhteellinen erotus $dri\%$ kaavalla 3. Suhteellisen erotuksen tuloksista laskettiin keskiarvo ka (kaava 4) ja keskihajonta s (kaava 5). Suhteellisen erotuksen keskiarvon sekä keskihajonnan avulla laskettiin t-arvo. T-arvoa verrataan vapausastelukuun. Taulukossa 8 näytteitä oli kuusi kappaletta. T-testi on laskettu kaavan 2 mukaan tulokseksi tuli 1,17. T-testiä ja vapausastelukua $t.05(5) = 2,571$ (taulukko 2) vertaamalla todettiin, että systemaattista virhettä ei esiinny näiden näytteiden tuloksissa. Koska systemaattista virhettä ei esiinny, mittausepävarmuus lasketaan pelkästään satunnaisvirheen avulla. Laajennettu epävarmuus 95 % luottamustasolla on:

$$U = 2 * 1,75$$

$$U = 3,5 \text{ prosenttiyksikköä}$$

Rehunäytteiden mittausepävarmuus on 1,75 kun natriummolybdaatti toimii reagenssina. Verratessa referenssinäytteitä ja omia mittaustuloksia, omat mittaustulokset poikkeavat maksimissaan 1,75:llä referenssinäytteiden tuloksista.

Taulukko 8. Mittausepävarmuus, reagenssina natriummolybdaatti.

näytetunnus	ref%	$m\%(1)$	$m\%(2)$	$m\% ka$	$d(ref\%-m\% ka)$	$dri(\%)$
41069	45,1	43,0	41,2	42,1	3,00	6,65
42223	58,4	59,5	58,8	59,15	-0,75	-1,28
41849	20,0	21,4	20,8	21,1	-1,10	-5,50
42408	23,7	25,1	26,1	25,6	-1,90	-8,02
41376	23,5	23,4	23,2	23,3	0,20	0,85
42166	3,0	4,2	4,2	4,2	-1,20	-40,00
ka					-0,29	-7,88
s					1,75	16,54

Taulukossa 9 suolahappoa oli 50 ml. Näytteessä 41069 ja 42408 oli suurimmat erot referenssinäytteiden tuloksiin ref%. On hyvin mahdollista, että suodatusvaiheessa valmiiseen liuokseen oli joutunut jauhettua näytettä tai näytteen tärkkelyspitoisuus oli ollut otantakohtasta suurempi kuin referenssinäytteenotokohdasta, jonka takia omat mittaustulokset olivat korkeampia kuin referenssitulokset.

Taulukko 9. Suolahappoa 70 ml, reagenssina natriummolybdaatti.

rehulaji	näytetunnus	ref %	punnittu, g	$\alpha 1$	m% (1)	erotus ref%-m%(1)
säilövilja	41069	45,1	2,0001	3,17	43,0	2,1
säilövilja	42223	58,4	1,9998	4,38	59,5	-1,1
kokovilja	41849	20,0	2,0026	1,58	21,4	-1,4
kokovilja	42408	23,7	2,0004	1,85	25,1	-1,4
maissi	41376	23,5	5,0005	4,17	23,4	0,1
maissi	42166	3,0	5,0006	0,78	4,2	-1,2

Taulukkoa 9 ja 10 vertaamalla toisiinsa, tulokset ovat samankaltaisia. Referenssinäytteen ref% ja omien mittaustulosten m% erotusta verratessa, taulukko 9 tulokset ovat tasaisempia kuin taulukko 10. Taulukossa 10 rehunäytteiden 41069 ja 42408 tulokset ovat suurempia kuin referenssinäytteen tulokset. Poikkeamat voivat johtua rehunäytteen otantakohtasta tai rehunäytteiden suodattamisesta.

Taulukko 10. Suolahappoa 50 ml, reagenssina natriummolybdaatti.

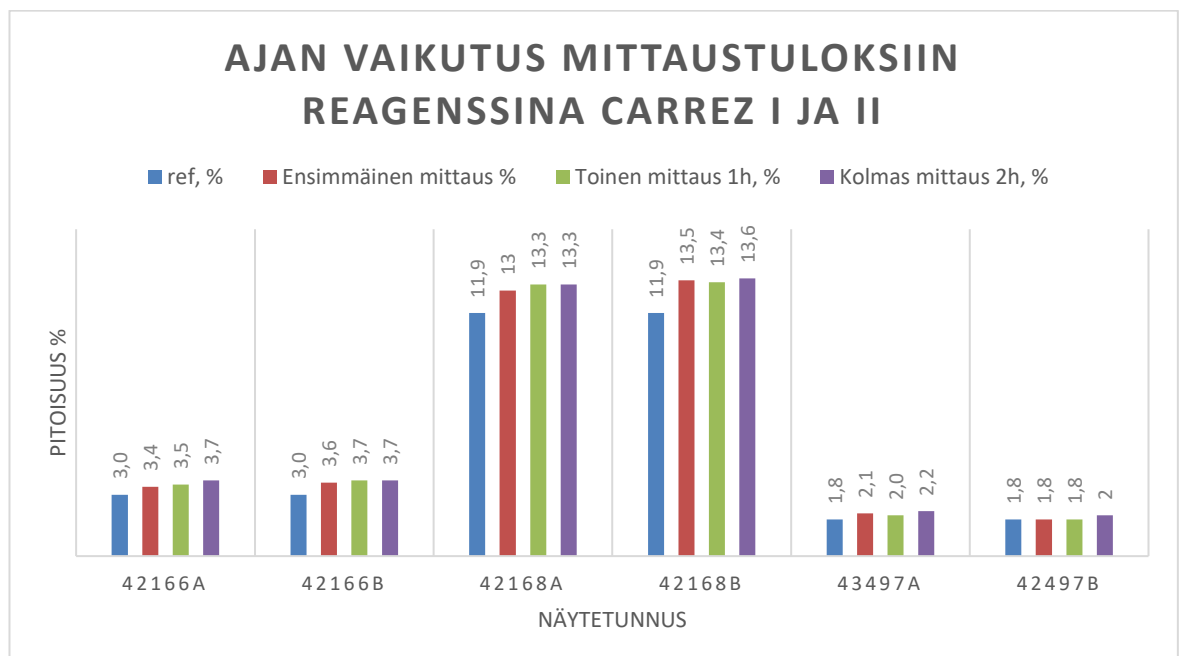
rehulaji	näytetunnus	ref %	rinnakkaisn, g	$\alpha 2$	m% (2)	erotus ref% ja m%(2)
säilövilja	41069	45,1	2,0006	3,03	41,2	3,9
säilövilja	42223	58,4	2,0011	4,33	58,8	-0,4
kokovilja	41849	20,0	2,0008	1,53	20,8	-0,8
kokovilja	42408	23,7	2,0006	1,92	26,1	-2,4
maissi	41376	23,5	4,9998	4,28	23,2	0,3
maissi	42166	3,0	5,0005	0,77	4,2	-1,2

Natriummolybdaatti teki sakasta karkeampaa ja suurempaa partikkelikooltaan kuin Carrez I ja II -reagenssit. Suodatus oli hieman helpompi natriummolybdaatin ollessa reagenssina, neste pääsi helpommin sakan läpi ja näytteen saanto oli suurempi kuin Carrez I ja II kanssa.

4.5 Ajan vaikutus mittaustuloksiin

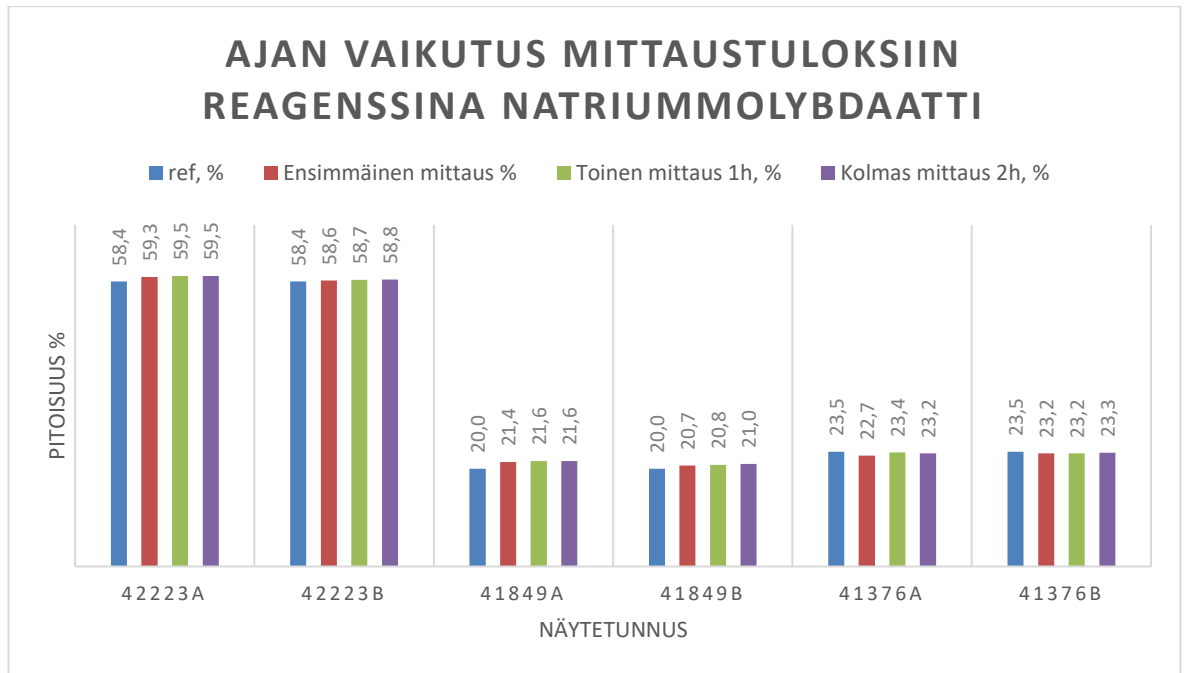
Ewersin polarimetrisessä menetelmässä ei mainita näytteiden säilymisaikaa, joten säilymisaika testattiin 12 näytteellä. Kuusi maissinäytettä tehtiin Carrez I ja II reagensseilla ja kuusi säilöviljanäytettä natriummolybdaattireagenssilla. Näytteitä pidettiin kaksi tuntia noin 20 asteisessa lämpöhauteessa. Kahden tunnin aikana näytteet mitattiin kolmeen kertaan. Ensimmäinen mittaus tehtiin heti liuosten valmistuttua, seuraava tunnin päästä ja viimeinen kahden tunnin päästä.

Näytteenä toimivan maissin tärkkelyspitoisuudet olivat pieniä, joten virheen riski oli suuri. Kuviossa 1 sininen referenssipylväs oli kokoajan pienempi kuin omat mittaustulokset. Omat mittaustulokset ovat kuitenkin todella tasaisia toisiinsa verrattaessa. Varsinkin 43497A ja rinnakkaisnäyte 42497B olivat kaikkina mittauskertoina samoissa pitoisuuksissa. Ajan kuluminen ei ole muuttanut näyteliuoksien pitoisuuksia radikaalisti. Referenssinäytteen keskihajonnaksi tuli 4,51 ja omien mittaustuloksien keskihajonnat olivat: ensimmäinen mittaus (0 min) 5,00, toinen mittaus (60 min) 5,05 ja kolmas mittaus (120 min) 5,02. Suodattamalla näyteliuokset toiseen kertaan olisi todennäköisesti päästy vielä lähemmäksi referenssinäytteiden tuloksia.



Kuvio 1. Ajan vaikutus mittaustuloksiin, Carrez I ja II.

Kuviossa 2 säilöviljanäytteiden tulokset olivat todella tasalaatuisia. Näytteiden tulokset olivat suurempia kuin referenssinäytteen tulokset, mutta toisiinsa verrattessa yhtenäisiä. Säilöviljanäytteiden tärkkelyspitoisuudet olivat suurempia kuin kuvion 1 maissinäytteiden ja suurempi tärkkelyspitoisuus ei ole niin herkkä mittavirheille kuin pienet pitoisuudet.



Kuvio 2. Ajan vaikutus mittaustuloksiin, natriummolybdaatti.

Aikaa mitattaessa reagenssit Carrez I ja II sekä natriummolybdaatti toimivat oletetulla tavalla. Saatujen tuloksien perusteella näytteet säilyvät ainakin tunnin ilman merkittäviä muutoksi. On kuitenkin suositeltavaa mitata näyteliuokset heti niiden valmistuttua, jotta tulokset olisivat mahdollisimman luotettavat.

4.6 Virhelähteet

Mittauksia ei voida suorittaa absoluuttisen tarkasti, vaan tulos on aina jonkin verran virheellinen. Vaikka välineet, aineet ja menetelmän suoritus tapahtuisi mahdollisimman tarkasti sekä puhtaasti, ne eivät mahdollista ehdottoman tarkkaa tulosta. Silti mittaustuloksia ei tarvitse pitää virheellisinä. (Keinänen, T. & Järvinen, M. 2014, 95.)

Näytteen punnitusmäärä vaikuttaa saatuun tulokseen sekä vaa'an nollaus. Liian pieni näytemäärä aiheutti näytteiden pitoisuuksiin vääristymiä. Kun säilöviljanäytteitä punnittiin 2 g, näytteiden tulokset olivat tarkempia entä silloin, kun näytettä oli vain 1 g. Vaaka täytyi muistaa nollata aina ennen näytteen punnitusta.

Kyvetin käytössä täytyi olla tarkka. Jo pieni määrä kyvetin huuhteluvettä tai edellistä näytettä, sai seuraavan näytteen pitoisuuden muuttumaan ja laite antoi virheellisesti näytteelle väärän pitoisuuden. Tämän virheen pystyi korjaamaan huuhtelemalla kyvetti ensin huuhteluviedellä ja sen jälkeen seuraavalla näytteellä, jonka jälkeen kyvetti vasta täytettiin oikeaoppisesti. Kyvetiä täytettäessä sinne voi ilmestyä ilmakuplia. Ilmakupla aiheuttaa tulokseen vääristymän, taittamalla valoa väärin ja antamalla väärän pitoisuuden näytteelle. Kuplat sai pois kyvetistä putkea hitaasti keinuttamalla, jolloin ilmakuplat poistuivat syöttöaukoista.

Tuloksen tarkkuuteen vaikuttaa myös suodoksen puhtaus. Jos näytteen sakkaa joutuu näytteen mukana kyvetiin, laite antaa väärän mittaustuloksen. Tämä johtuu siitä, että lampun tuottama valonsäde ei pääse kulkemaan suoraa näytteen läpi vaan se heijastuu sakasta väärin.

Määrityksessä käytettiin myös vaihtoehtoista reagenssia, natriummolybdaattia. Tuloksista olisi voinut tulla tarkempia, jos käytössä olisi ollut tuore natriummolybdaattireagenssi. Kyseinen määrityksessä käytetty natriummolybdaatti oli kauan auki ollut vanha purkki, joka todennäköisesti oli kontaminoitunut.

5 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli testata Ewersin polarimetrinen menetelmän soveltuvuus Valio Oy Seinäjoen aluelaboratorion käyttöön sekä tutkia rehun tärkkelyspitoisuuden määrittystä yleisesti. Tärkkelysrehunäytteet ovat tuottajien keräämiä näytteitä rehuista, joista halutaan tietää tärkkelyspitoisuus ruokintasuunnitelman tueksi.

Menetelmän näytteet oli kerätty Valio Oy Seinäjoen Aluelaboratorion jo analysoituista rehunäytteistä. Tärkeintä rehunäytteiden keräämisessä oli saada mahdollisimman erilaisia näytteitä Ewersin polarimetrinen menetelmän mittauksiin. Tutkittavia tärkkelysrehunäytteitä oli 18 ja ne olivat säilövilja-, kokovilja- sekä maissinäytteitä. Ennen määrittäviä päätettiin Viljavuuspalveluiden referenssituloksista, paljonko rehunäytteitä tarvittiin per määrittäminen. Todettiin näytemääräksi säilöviljaa 2 g, kokoviljaa 2 g ja maissia 5 g.

Tuloksista tarkasteltiin määrittämisen toteutuminen, vertaamalla saatuja tuloksia Viljavuuspalveluiden referenssituloksiin. Työssä selvitettiin polarimetrinen menetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta tärkkelyspitoisten näytteiden avulla. Työssä vertailtiin reagenssien toimivuutta ja määrittäminen sekä näytteiden tekemiseen ja ajamiseen kuluva aika.

Kokonaismittausepävarmuuden selvittämiseksi arvioitiin koko ketjun eri vaiheiden epävarmuudet. Ennen mittausepävarmuuden laskemista selvitettiin näytteiden suhteellinen erotus, keskiarvo, keskihajonta, t-testi, satunnaisvirhe sekä systemaattinen virhe. Kaikkien näytteiden tulokset sekä kokonaismittausepävarmuudet olivat todella hyviä ja tasalaatuisia.

Ewersin polarimetrinen menetelmän mukaan määrittämisen aikana suolahappoa piti lisätä 70 ml, mutta rinnakkaismäärittämisellä testattiin, riittääkö vain 50 ml suolahappoa toteuttamaan samat tulokset. Mittaustuloksista todettiin, että 50 ml suolahappoa riittää toteuttamaan hydrolyysin tapahtumisen.

Ewersin polarimetrisessä menetelmässä Carrez I ja II reagenssien tarkoituksena on saostaa näytestuodoksesta pois rasva ja valkuainen, jotka saattavat häiritä tärkkelyspitoisuusmäärittäminen. Viimeisissä määrittämisissä Carrez I ja II korvattiin 2 ml 12%

natriummolybdaatti liuosta. Natriummolybdaatti teki sakasta karkeampaa ja suurempaa partikkelikooltaan kuin Carrez I ja II -reagenssit. Suodatus oli hieman helpompi natriummolybdaatin ollessa reagenssina, neste pääsi helpommin sakan läpi ja näytteen saanto oli suurempi kuin Carrez I ja II kanssa. Mittaustulokset olivat positiivisia ja natriummolybdaatilla voidaan korvata Carrez I ja II -reagenssit.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Määrittäksessä päästiin selkeään lopputulokseen ja vastattiin opinnäytetyön tutkimusongelmaan. Ewersin polarimetrinen menetelmä on toimiva kokonaisuus, joka voisi jonain päivänä tulla Valio Oy Seinäjoen Aluelaboratorion käyttöön.

Näytteiden punnitsemismäärät olivat oikeita sekä näytteiden käsittely selkiytyi. Polarimetrin käyttö oli helppoa ja näytteiden tulokset näyttivät hyvältä. Menetelmän määrittäksen kesto oli noin puolitoista tuntia, mikä on Aluelaboratorion kannalta todella hyvä määrittäysaika.

Opinnäytetyön haasteeksi muodostui valitun aiheen vähäiset lähteet. Avoimia tutkimuksia tarkkelysmäärittäyksestä löytyi todella vähän, koska laboratoriot eivät jaa mielellään omia toimiviksi havaittuja menetelmiä julkisesti. Uskon, että tulevaisuudessa tarkkelysmäärittäksen potentiaalia voitaisiin hyödyntää paljon laajemmin kuin tällä hetkellä.

Menetelmän jatkotoimenpiteet. Opinnäytetyön tulosten pohjalta menetelmä on toimiva, mutta sitä kannattaa vielä kehittää eteenpäin. Näytteiden määrää voisi lisätä, jolloin näytteiden tulokset olisivat luotettavampia ja vertailukelpoisempia. Näytteiden suodatuksen voisi tehdä kahteen kertaan, jotta suodos olisi vielä puhtaampi ja tämä mahdollistaisi tarkemmat mittaustulokset. Tuore natriummolybdaatti voisi tuottaa vielä puhtaampia ja tarkempia tuloksia.

LÄHTEET

- Alasuutari, S., Manni, K. & Rautala, H. 2013. Lypsylehmän ruokinta ja hoito. Helsinki: Opetushallitus.
- Anton Paar. 2019. Basics of Polarimetry. [Verkkosivu]. [Viitattu 18.8.2019] Saatavana: <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-polarimetry/>
- BeMiller, J. & Whistler, R. (toim.) 2009. Starch: Chemistry and Technology. 3. painos. Elsevier Inc.
- Eliasson, A.-C. (toim.) 2004. Starch in Food- Structure, Function and Applications. Woodhead Publishing Limited.
- Farmit.net. Ei päiväystä. Pötsihäiriöt. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 18.8.2019]. Saatavana: <https://www.farmit.net/kotielain/lypsylehman/terveydenhuolto/potsihairiot>
- Finas. 2016. Mittausepävarmuus. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 10.12.2019]. Saatavana: <https://www.finas.fi/akkreditointi/jaljitettavyys/Sivut/Mittausepavarmuus.aspx>
- Haapasaari, M. & Puutio, T. 2017. Kysely säilörehunäytteiden volyymeista Valio Maitosuomen maitotilayrittäjille. [Verkkojulkaisu]. Seinäjoki: Seinäjoen ammattikorkeakoulu. Elintarvike ja maatalous, agrologin tutkinto-ohjelma. Opinnäytetyö. [Viitattu 11.2.2019]. Saatavana: https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/140735/Mira_Haapasaari.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hartojoki, J. 2015. Karkearehuanalyysit: Yleisohjeistus- ja rehuanalyysien tulkintaohjeistukset SeiLab Oy:lle. [Verkkojulkaisu]. Savonia ammattikorkeakoulu. Luonnonvara- ja ympäristöala, maaseutuelinkeinojen koulutusohjelma. Opinnäytetyö. [Viitattu 23.11.2019]. Saatavana: https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/103221/Hartojoki_Jenna.pdf;jsessionid=F8AFC656EC8C989D42F96B3F729C5E50?sequence=1
- Hietala, S. 2017. Yeast extractin viskositeetin tutkiminen. [Verkkojulkaisu]. Seinäjoki: Seinäjoen ammattikorkeakoulu. Elintarvike ja maatalousalan yksikkö, bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. [Viitattu 26.4.2019]. Saatavana: https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/133904/Hietala_Sara.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen, P., Simonen, S. & Kärhä P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Espoo: Mittaus- tekniikan keskus MIKES, Työ- ja elinkeinoministeriö TEM.

- Hulsen, J. & Aerden, D. 2014. Ruokintahavaintoja : käytännön opas terveiden ja tuottavien lypsylehmien ruokintaan. Vantaa: ProAgria Keskusten Liitto.
- Institute of chemical technology. Ei päiväystä. Determination of Starch Content (Ewers' Polarimetric Method). Analysis of food and natural products: laboratory exercise. [Verkojulkaisu]. [Viitattu 30.3.2019] https://web.vscht.cz/~ko-houtkj/ENG/LAPP_ANGL_POLARIMETRY_2012.pdf
- Jaakkola, S., Sairanen, A., Nousiainen, J. & Rinne, M. 2010. Säilöntä ja rehujen laatu. Teoksessa: S. Peltonen, T. Puurunen & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Nurmirehujen tuotanto ja käyttö. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto, 87–95.
- Jaakkola, S. 2010a. Karkearehut. Teoksessa: J. Kyntäjä, S. Nokka & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Lypsylehmän ruokinta. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto, 60- 68.
- Jaakkola, S. 2010b. Väkirehut ja lisäaineet. Teoksessa: J. Kyntäjä, S. Nokka & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Lypsylehmän ruokinta. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto, 69-73.
- Jaakkola, S., Rinne, M. & Nousiainen, J. 2010. Lehmän tärkeimmät ravintoaineet. Teoksessa: J. Kyntäjä, S. Nokka & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Lypsylehmän ruokinta. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto.
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.
- Keinänen, T. & Järvinen, M. 2014. Mittaustekniikka. 1. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Komission asetus (EY) N:o 121/2008, Eläinten ruokintaan käytettävien valmistaiden (CN-koodi 2309) tärkkelyspitoisuuden määrittämisestä.
- Komission direktiivi 1999/79/EY, Yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten annetun kolmannen komission direktiivin 72/199/ETY muuttamisesta.
- Krüss. 2019. How does a polarimeter actually work. [Verkkolähde]. [Viitattu 20.9.2019] Saatavana: <https://www.kruess.com/en/campus/polarimetry/what-is-a-polarimeter/>
- Kyntäjä, J. & Nokka, S. 2010. Ruokinta menestystekijänä. Teoksessa: J. Kyntäjä, S. Nokka & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Lypsylehmän ruokinta. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto.
- Kyntäjä, J., Nokka, S. & Harmoinen, T. (toim.) 2010. Lypsylehmän ruokinta. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto.

- Käyttöturvallisuustiedote Kaliumheksaasyanoferraatti(II) trihydraatti. 2016. Asetuksen (EY) N:o 1907/2006 mukaisesti. [Viitattu 9.11.2019]. Moniste.
- Käyttöturvallisuustiedote Natriummolybdaatti dihydraatti. 2018. Asetuksen (EY) N:o 1907/2006 (REACH) ja 2015/830/EU muutosten mukaisesti. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 9.11.2019]. Saatavana: https://www.carlroth.com/downloads/sdb/fi/0/SDB_0274_FI_FI.pdf
- Käyttöturvallisuustiedote Sinkkisulfaattiheptahydraatti. 2018. Asetuksen (EY) N:o 1907/2006 mukaisesti. [Viitattu 9.11.2019]. Moniste.
- Käyttöturvallisuustiedote Suolahappo. 2013. Asetuksen (EY) N:o 1907/2006 mukaisesti. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 9.11.2019]. Saatavana: https://www.tevella.fi/media/wysiwyg/tuoteohjeet/kayttoturvatieotteet/557858_ktt_1.pdf
- Lamberg, H. 2016. Tärkkelys ja tärkkelysteollisuus. [Verkkajulkaisu]. Jyväskylä: Jyväskylän yliopisto. Kemian laitos, soveltavan kemian osasto. Opinnäytetyö. [Viitattu 8.4.2019] Saatavana: <https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/48818/1/URN%3ANBN%3Afi%3Aju-201602181601.pdf>
- Manni, K. 2013. Ruokinnan perusteet. Teoksessa: S. Alasuutari, K. Manni & H. Rautala. (toim.) 2013. Lypsylehmän ruokinta ja hoito. Helsinki: Opetushallitus. 42–51
- Maunumaa, M-K. 2019a. Esimies. Valio Oy Aluelaboratorio. Haastattelu 25.2.2019.
- Maunumaa, M-K. 2019b. Esimies. Valio Oy Aluelaboratorio. Haastattelu 7.3.2019.
- Maunumaa, M-K. 2019c. Esimies. Valio Oy Aluelaboratorio. Haastattelu 12.3.2019.
- Mäkelä, H. 2018. Laborantti. Altia Oyj. Haastattelu 4.12.2018.
- Männistö, L. 2012. Ohratärkkelyksen elintarvikekäyttö. [Verkkajulkaisu]. Helsinki: Helsingin yliopisto. Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. Opinnäytetyö. [Viitattu 20.5.2019]. Saatavana: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/37063/Maisterin%20tutkielma,%20Laura%20Männistö.pdf?sequence=1>
- Nousiainen, J., Niskanen, H., Kainulainen, P & Toivakka, M. 2010. Korjuu. Teoksessa: S. Peltonen, T. Puurunen & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Nurmirehujen tuotanto ja käyttö. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto, 71–85
- Peltonen, S., Puurunen, T. & Harmoinen, T. (toim.) 2010. Nurmirehujen tuotanto ja käyttö. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto.

- Rinne, M. & Sairanen, A. 2010. Nurmirehut ruokinnassa. Teoksessa: S. Peltonen, T. Puurunen & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Nurmirehujen tuotanto ja käyttö. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto, 16-21.
- Ross, A.S. 2012. Starch in foods. Teoksessa: Wrolstad, R. 2012. Food Carbohydrate Chemistry. John Wiley & Sons Inc, 107–131.
- Ruokatieto yhdistys ry. 2019a. Lypsykarja tuottaa maitoa ja lihaa. [Verkkosivu]. [Viitattu 9.11.2019] Saatavana: <https://www.ruokatieto.fi/ruokakasvatus/ruokaketju-ruuan-matka-pelloilta-poytaan/maatila/kotielaimet/lypsykarja>
- Ruokatieto yhdistys ry. 2019b. Yhteyttäminen ja hengitys. [Verkkosivu]. [Viitattu 9.11.2019] Saatavana: <https://www.ruokatieto.fi/ruokakasvatus/ruokaketju-ruuan-matka-pelloilta-poytaan/luonto/kasvien-biologiaa/yhteyttaminen-ja-hengitys>
- Seppänen, R., Kervinen, M., Parkkila, I., Karkela, L. & Meriläinen, P. 2010. Maol taulukot. 2.–8. painos. Matemaattisten Aineiden Opettajien Liitto MAOL ry.
- Valio Oy, Seinäjoen Aluelaboratorio. 2014. Artturi- rehuanalyysi. [Verkkójulkaisu]. [Viitattu 8.4.2019] Saatavana: https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/ART-TURI2006_KEH_NAVIGOINTI/Hinnasto%202014%20rehut.pdf
- Vanhatalo, A. 2010. Ruoansulatus. Teoksessa: J. Kyntäjä, S. Nokka & T. Harmoinen. (toim.) 2010. Lypsylehmän ruokinta. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto, 19–26.
- Wrolstad, R.E. 2012. Food Carbohydrate Chemistry. John Wiley & Sons Inc.

LIITTEET

Liite 1. Määrityksissä käytetyt kaavat

LIITE 1. Määrittelyissä käytetyt kaavat.

Rehunäytteiden tärkkelyspitoisuus kaava:

$$x = \frac{100 \times 100 \times \alpha}{\alpha D \times 2 \times A} \quad (1)$$

missä

αD	on viljatärkkelyksen ominaiskiertokyky
α	on havaittu kierto 200 mm polarimetriputkella
100	on tulos halutaan prosentteina
100	on näytteen laimennuskerroin
2	on polarimetrin kyvetin pituus, dm
A	on näytteen paino, g
x	on tärkkelyspitoisuus, %

T-testi kaava:

$$t = \frac{d\%ka}{d\%s} \sqrt{n} \quad (2)$$

missä

$d\%ka$	on suhteellisen erotuksen keskiarvo
$d\%s$	on suhteellisen erotuksen keskihajonta
n	on näytteiden määrä

Suhteellinen erotus laskettiin kaavalla:

$$\text{dri}(\%) = \frac{\text{ref} - \text{m\%ka}}{\text{ref}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

missä

ref% on Viljavuuspalveluiden referenssitulos

m%ka on omien mittaustulosten keskiarvo

Keskiarvon kaava:

$$\text{keskiarvo} = \frac{\sum x}{n} \quad (4)$$

missä

x on näytteiden mittaustulokset yhteen laskettuna

n on näytteiden määrä

Keskihajonta kaava:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (5)$$

missä

x_i on mittaustulos

\bar{x} on mittaustulosten keskiarvo

Systemaattista virhettä ei esiinny, kokonaismittausepävarmuus laskettiin kaavalla:

$$U = 2 * ds \quad (6)$$

missä

ds on referenssinäytteen ja oman mittaustuloksen erotuksen keskihajonta

Systemaattinen virhe esiintyy, kokonaismittausepävarmuus laskettiin kaavalla:

$$U = \sqrt{((d\%ka)^2 + (t * d\%s)^2)} \quad (7)$$

missä

$d\%ka$ on suhteellisen erotuksen keskiarvo

$d\%s$ on suhteellisen erotuksen keskihajonta

t on keskiarvon vertailuluku