



Elisa Järvenpää

Sivuvirtaustestin soveltuvuus maito- proteiinijäämien havaitsemiseen kasvirasvapuolivalmisteista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

24.4.2023

Tiivistelmä

Tekijä:	Elisa Järvenpää
Otsikko:	Sivuvirtaustestin soveltuvuus maitoproteiinijäämien havaitsemiseen kasvirasvapuolivalmisteista
Sivumäärä:	41 sivua + 2 liitettä
Aika:	24.4.2023
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat:	Projektityöntekijä Elina Lievonen Elintarviketurvallisuusvastaava Jenni Malkki Yliopettaja Jukka Niiranen

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko kaupallinen sivuvirtaustestimenetelmä maitotuotteiden allergeenien, kaseiinin ja β -laktoglobuliinin jäämien määrittämiseen kasvirasvapuolivalmisteista. Sivuvirtaustestimenetelmän käyttöönoton myötä toimeksiantajayritys saisi oman laboratorion käyttöön suoritusajaltaan nopean, helpokäyttöisen ja edullisen menetelmän maidon proteiinijäämien havaitsemiseen kasvirasvapuolivalmisteista. Sivuvirtaustestillä on tarkoitus korvata toimeksiantajayrityksen pääkonttorilla sijaitsevan laboratorion suorittamat vastaavat määritykset.

Sivuvirtaustestin soveltuvuutta selvitettiin suorittamalla analyyseja kasvirasvapuolivalmisteille A ja B. Ensimmäisenä ajopäivänä molemmista kasvirasvapuolivalmisteista tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä, jonka lisäksi valmistettiin myös positiiviset kontrollinäytteet, jotka lähetettiin pääkonttorin laboratorioon tarkempaa kaseiinipitoisuuden määrittystä varten. Toisena ajopäivänä poikettiin sivuvirtaustestin työhajeista siten, että pidennettiin sekä näytteen uuttoaikaa uuttopuskuriliuoksessa että sekoitusaikaa. Toisena ajopäivänä määrittäviä suoritettiin vain kasvirasvapuolivalmisteella A. Lisäksi työssä tutkittiin laitteiston pintojen puhtautta tuotekontaktipinnoista pintasivelytestillä pesujen jälkeen, ennen tuotannon aloitusta kahtena ajopäivänä.

Sivuvirtaustestimenetelmä ei soveltunut maidon proteiinijäämien havaitsemiseen kasvirasvapuolivalmisteista A ja B. Rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden määritykset sivuvirtaustestillä epäonnistuivat, sillä testiliuskoihin ei muodostunut testin onnistumisen ilmaisevaa kontrolliviivaa havaintoalueelle. Pintasivelynäytteiden osalta työ onnistui, ja tulosten perusteella voidaan todeta laitteiston pinnoilta havaittujen proteiinijäämien pitoisuuksien olevan vaihtelevia.

Työn tavoitteet saavutettiin. Sivuvirtaustestin soveltuvuus selvitettiin, ja pintasivelynäytteet otettiin onnistuneesti. Pintasivelynäytteiden tulosten perusteella pintapesujen tehokkuutta voitaisiin tarkastella, mutta tulosten luotettava arviointi vaatisi pidemmän aikavälin tarkastelujakson. Tulevaisuudessa toimeksiantajayritys voisi selvittää ELISA-testin käyttöönoton mahdollisuutta tai vaihtoehtoisesti keskittää allergeenien hallinnan pintasively- ja loppuhuuhtelunäytteisiin.

Avainsanat: sivuvirtaustesti, pintasivelynäyte, allergeeniturvallisuus, maitoproteiini

Abstract

Author:	Elisa Järvenpää
Title:	Applicability of Lateral Flow Test for the Determination of Milk Protein Residues from Vegetable Fat-Based Semi-Finished Products
Number of Pages:	41 pages + 2 appendices
Date:	April 24 th , 2023
Degree:	Bachelor of Engineering
Degree Programme:	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major:	Biotechnology and Food Engineering
Supervisors:	Elina Lievonen, Project Manager Jenni Malkki, Food Safety Manager Jukka Niiranen, Principal Lecturer

The purpose of the thesis was to find whether a commercial lateral flow test method is suitable for the determination of milk product allergens, casein and β -lactoglobulin residues from vegetable fat-based semi-finished products. With the introduction of the lateral flow test method, the commissioning company would have its own laboratory use a quick, easy-to-use and inexpensive method for detecting milk protein residues in vegetable fat-based semi-finished products.

The applicability of the lateral flow test was determined by performing analyzes on vegetable fat-based semi-finished products A and B. On the first day, four parallel determinations were made of both vegetable fat-based semi-finished products. Positive control samples were also prepared and sent to the head office laboratory for a more precise determination of the casein content. On the second day, the instructions for the lateral flow test were deviated from in such a way that both the extraction time of the sample in the extraction buffer solution and the mixing time were extended. In addition, the cleanliness of the equipment-product contact surfaces was examined with a surface protein residue test after washing before the start of production.

The lateral flow test method was not suitable for the detection of milk protein residues from vegetable fat-based semi-finished products A and B. The determinations of parallel and positive control samples with the lateral flow test failed, because the test strips did not form a control line indicating the success of the test in the observation area. Regarding the surface protein residue samples, the testing was successful and on the basis of the results, it can be stated that the concentrations of protein residues observed on the surfaces of the equipment were variable.

The objectives of the thesis were achieved. The applicability of the lateral flow test was determined, and surface protein residue samples were successfully taken. On the basis of the results of surface protein residue samples, the effectiveness of surface washing could be examined, but a reliable evaluation of the results would require a longer-term review period. In the future, the commissioning company could examine the possibility of introducing an ELISA test or, alternatively, focus the management of allergens on surface swabbing and final rinse samples.

Keywords: Lateral Flow Test, Allergen Management, Milk Protein

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Maidon allergeenit	2
2.1	Maidon proteiinikoostumus	2
2.1.1	Kaseiinit	3
2.1.2	Heraproteiinit	4
2.2	Maitoallergia	5
3	Allergeenien hallinta elintarviketuotannossa	7
4	Proteiinijäämäanalytiikan menetelmät	10
4.1	Immunokromatografinen sivuvirtaustesti	11
4.2	ELISA-menetelmä	14
5	Materiaalit ja menetelmät	15
5.1	Menetelmien vertailu	15
5.2	Näytteet	17
5.3	Kaupallinen sivuvirtaustestimenetelmä	18
5.3.1	Laitteet ja välineet	19
5.3.2	Työohjeet kiinteille näytteille	19
5.3.3	Tulosten tulkinta	20
5.4	Kaupallinen pintasivelytesti	20
5.4.1	Työohjeet	21
5.4.2	Tulosten tulkinta	22
6	Kokeellinen osa	22
6.1	Näytteenottosuunnitelma	22
6.2	Positiivisten kontrollinäytteiden valmistus	24
6.3	Sivuvirtaustestien analyysit	25
7	Tulokset ja tulosten tarkastelu	27
7.1	Ensimmäisen ajopäivän tulokset	27
7.1.1	Sivuvirtaustestit	27
7.1.2	Pintasivelynäytteet	31
7.2	Toisen ajopäivän tulokset	32
7.2.1	Sivuvirtaustestit	32
7.2.2	Pintasivelynäytteet	34
8	Yhteenveto	36

Liitteet

Liite 1: Positiivisten kontrollinäytteiden A1_K ja B1_K punnitustulokset

Liite 2: Näytteiden A1, A2 ja B1 rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden määritysten punnitustulokset

Lyhenteet

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points. Elintarviketeollisuuden laadunhallintajärjestelmä.
IgE	Immunoglobuliini E -vasta-aine.
LFT	Lateral Flow Test. Immunokromatografinen sivuvirtaustesti.

1 Johdanto

Elintarvikkeen valmistusprosessissa on tavoitteena, että kuluttajille päätyy tuotteita, jotka sisältävät vain siihen kuuluvia ainesosia. Ilmoittamattomat allergiaa aiheuttavien aineiden jäämät elintarvikkeissa voivat aiheuttaa vakavia oireita allergisille henkilöille, ja siksi on tärkeää, että allergiaa ja intoleransseja aiheuttavat ruoka-aineet merkitään selkeästi elintarvikkepakkauksiin. EU:n direktiivit ja Suomen lainsäädäntö edellyttävät, että yleisimmät allergiaa ja yliherkkyyksiä aiheuttavat ruoka-aineet merkitään elintarvikkepakkauksiin selkeästi muusta ainesosaluettelosta erottuvalla tavalla. [1, s. 65–66.] Maito on yksi yleisimmistä allergiaa ja yliherkkyyksiä aiheuttavista ruoka-aineista etenkin lapsilla ja vauvoilla, mutta sitä esiintyy myös aikuisilla [2].

Elintarvikkeiden turvallisuuden kannalta elintarviketeollisuuden tuotantolaitoksissa on tärkeää ehkäistä tuotteiden ja raaka-aineiden allergeenien ristikontaminaatioita. Allergeenien hallinta on osa elintarviketurvallisuuden omavalvontasuunnitelmaa. Elintarvikkeiden allergeenikontaminaatioita hallitaan riskinarvioinnilla, jonka avulla kartoitetaan tuotteen raaka-aineiden kuljetuksen, säilytyksen ja valmistusprosessin aikana syntyvät kontaminaatiovaarat. Elintarviketuottajat käyttävät analyttisiä menetelmiä apuna noudattaakseen allergeenimerkintöjä koskevia lakeja sekä havaitakseen ristikontaminaatioita ja puutteet hygienian laadussa. [1, s. 65; 3.]

Tämän insinööritoiminnan toimeksiantajana toimi elintarvikkeita valmistava yritys. Työn tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko kaupallinen sivuvirtaustestimenetelmä maitoproteiinijäämien havaitsemiseen kasvirasvapuolivalmisteista. Toimeksiantajayrityksen tiloissa kasvirasvapuolivalmisteita valmistetaan samoissa tiloissa ja linjoilla kuin maitopohjaisia tuotteita, eikä maidon jäämien päätymistä maidottomiin tuotteisiin ole voitu kokonaan sulkea pois. Tämän vuoksi maitoproteiinijäämiä on tarkkailtava kasvirasvapuolivalmisteita tuotettaessa. Tavoitteena on, että sivuvirtaustestillä korvataan nykyinen näytteiden analysointi toimeksiantajayrityksen pääkonttorilla sijaitsevassa akkreditoidussa laboratorioissa, sillä

kasvirasvapuolivalmisteiden proteiinijäämäanalyysit haluttaisiin jatkossa suorittaa toimeksiantajayrityksen omassa laboratoriossa. Sivuvirtaustestien käyttöönoton myötä yrityksen laboratorioon saataisiin yksinkertainen ja nopea menetelmä kasvirasvapuolivalmisteiden proteiinijäämämäärityksiin. Sivuvirtaustestimenetelmän etuna olisi se, että analyysin tulos saadaan jo tuotantovaiheessa. Mikäli allergeenijäämiä havaitaan, tuotanto voidaan pysäyttää, millä ehkäistään hävikkiä sekä korjaavat toimenpiteet voidaan toteuttaa viipymättä.

Insinööriyön alussa vertailtiin kahta yleisesti elintarviketeollisuuden käytössä olevaa maidon proteiinijäämien havaitsemiseen soveltuvaa kaupallista pikatestimenetelmää. Vertailtavat menetelmät olivat sivuvirtaustesti ja ELISA-testi. Menetelmät ovat immunologisia ja perustuvat proteiinien tunnistamiseen näytteestä [4]. Soveltuvuuskokeisiin analyysimenetelmäksi valittiin sivuvirtaustesti. Menetelmä perustuu immunologiseen reaktioon testiliuskalla, ja se on spesifinen kaseiinille ja β -laktoglobuliinille, jotka ovat maidon suurimpia proteiini- luokkia, kattaen yhteensä 89,3 % maidon proteiineista [5; 6, s. 23]. Sivuvirtaustestillä analysoitiin kasvirasvapuolivalmisteita kahtena tuotantopäivänä. Lisäksi insinööriyön yhteydessä tutkittiin laitteiston tuotekontaktipinnoilta proteiinijäämiä pintasivelytestillä, pesujen onnistumisen ja hygienian tason selvittämiseksi.

2 Maidon allergeenit

2.1 Maidon proteiinikoostumus

Lehmänmaito sisältää monipuolisesti ravintoaineita, ja se on tärkeä proteiinien lähde [7]. Ravitsemuksellisesti maitoproteiinit ovat korkealaatuisia, sillä ne sisältävät kaikkia elimistölle välttämättömiä aminohappoja [8]. Maidossa on proteiinia noin 3,5 g/100 g. Maidon proteiinit jaetaan liukeneviin heraproteiineihin, liukenemattomiin kaseiineihin ja kalvoproteiineihin niiden fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Maidon proteiineista 79,5 % on kaseiinia ja 19,3 % heraa. Kalvoproteiineja maidossa on vain 1,2 %. [9; 6, s. 23.] Hera on maidon kirkas osa, joka perinteisesti erottuu maidosta juuston valmistuksessa. Heraa ei käytetä suoraan sellaisenaan, vaan sen eri jakeet erotellaan ja niillä jokaisella

on oma käyttötarkoituksensa. Hera voidaan jaotella laktoosiksi, heraproteiiniksi ja mineraaleiksi eli maitosuolaksi. Kaseiinia taas löytyy pääasiassa vain kovista juustoista ja rahkasta, sillä hera on erottunut pois valmistusprosessissa. [10.]

2.1.1 Kaseiinit

Suurin osa maidon proteiineista on kaseiineja. Kaseiineja on neljää erilaista proteiinityyppiä, jotka ovat α_1 -kaseiini, α_2 -kaseiini, β -kaseiini sekä κ -kaseiini. [6, s. 23.] Lehmänmaidosta löytyy eniten β -kaseiinia ja α_1 -kaseiinia, kattaen yhteensä 77 % kaseiineista. Kaseiiniproteiinit eroavat toisistaan fosforipitoisuuden, konsentraation, aminohappokoostumuksen, isoelektrisen pisteen ja molekyyli-painon suhteen. [11.] Kaseiinia esiintyy maidossa monimutkaisina molekyyli-ryhminä, joita kutsutaan miselleiksi. Nämä misellit koostuvat kaseiinimolekyyleistä eli submiselleistä ja kalsium- sekä epäorgaanisista fosfaatti-ioneista. Kaseiinit tunnetaan fosfoproteiineina, sillä fosfaattiryhmät ovat esteröityneet kaseiineihin hydroksyyli-ryhmän kautta. Fosforihappo taas sitoo kalsiumia ja nämä sidokset edesauttavat kaseiinien yhdistymistä miselleiksi. [12.] Misellit antavat maidolle sen ominaisen valkoisen värin. Keskipokoinen miselli koostuu noin neljästä sadasta viiteensataan submisellistä. [6, s. 24.]

Misellit pysyvät koossa kalsiumfosfaattisiltojen ja submisellien välisten hydrofobisten vuorovaikutusten ansiosta. Lisäksi misellien pinnassa sijaitsevat κ -kaseiinit stabiloivat misellien rakennetta tehden niiden pinnasta vesiliukoisen, kun taas misellin sisus on hydrofobinen. [6, s. 24.] Kaseiinit saostuvat helposti maidosta erilaisilla menetelmillä, kuten hapolla tai entsyymejä sisältävällä juoksuttimella. Juoksuttimen tärkein entsyymi on kymosiini. Kymosiini on proteolyttinen entsyymi, joka hajottaa misellin vesiliukoisen pinnan, jolloin miselli muuttuu rasvaliukoiseksi. Rasvaliukoiset misellit alkavat tarttua toisiinsa ja muodostavat verkoston, johon tarttuvat maidon sisältämät rasvapisarat. Tämän seurauksena syntyy hyytelö, joka erottuu vesiliukoisesta herasta. Kaseiinin voi saostaa maidosta myös hapolla neutraloimalla misellin pinnan negatiivisen varauksen, minkä seurauksena misellit eivät enää hylji toisiaan niin voimakkaasti. Kaseiini alkaa saostua maidosta, kun pH laskee alle 4,6. [12, s. 17–18.] Kaseiinit eivät

tuhoutu normaalisissa pH:ssa kuumennuksella, sillä kaseiineilla ei ole tertiäärisiä rakenteita, joten niissä on vain vähän avautuvia rakenteita [13].

2.1.2 Heraproteiinit

Heraproteiineista puhutaan yleisesti maidon seerumiproteiineina, sillä kaseiinin saostuessa maidosta pois jäljelle jää seerumi, joka sisältää maidon vesiliukoisien osien, johon hera kuuluu. Heraproteiinit ovat joukko maidon proteiineja, joilla on vain vähän yhteisiä ominaisuuksia lukuun ottamatta niiden vesiliukoisuutta pH:ssa 4,6. Useimmat heraproteiinit ovat pallomaisia molekyylejä, joissa on organisoituneet sekundaariset ja tertiääriset rakenteet, minkä seurauksena ne tuhoutuvat helposti kuumennettaessa. [6, s. 26; 12.] Heraproteiineja ovat β -laktoglobuliini, α -laktalbumiini, naudan seerumialbumiini, immunoglobuliini, laktoferriini sekä laktoperoksidaasi [11]. Heraproteiinit sisältävät kysteiinitähteitä sisäisinä disulfidiltoina [12]. Lehmänmaidon hera koostuu pääosin β -laktoglobuliinista ja α -laktalbumiinista ja niiden osuus kokonaisuudesta on yhteensä 77 % [11].

β -laktoglobuliineista tunnetaan 8 erilaista muotoa, ja ne pystyvät sitomaan ja kuljettamaan monenlaisia molekyylejä, kuten rasvahappoja ja retinolia. β -laktoglobuliinilla on kaksi disulfidiltaa, ja se voi esiintyä maidossa erilaisilla kvaternäärisillä rakenteilla riippuen proteiinin ympäristöolosuhteista, kuten pH:sta tai lämpötilasta. [11; 14, s. 156.] α -laktalbumiinista tiedetään kaksi erilaista muotoa, se sisältää kolme disulfidiltaa ja se on tärkeä osakomponentti laktoosin synteesissä lehmän utareessa [11].

Heraproteiinit eivät saostu entsyymien tai hapon vaikutuksesta samoin kuten kaseiinit, mutta heraproteiinit tuhoutuvat helposti kuumennuksella. Heraproteiinin denaturoituminen alkaa 65 asteessa, ja lähes kaikki hera on saostunut lämpötilan noustessa 90 asteeseen. Heraa voidaan kuitenkin saostaa myös karboksimeetyyliselluloosalla. [15; 6, s. 26.]

2.2 Maitoallergia

Antigeenit ovat aineita (mikro-organismeja, hiukkasia, soluja tai molekyyliä), jotka voivat laukaista immuunivasteen ja käynnistää vasta-aineiden tuotannon. Allergeenit ovat sellaisia antigeenejä, jotka voivat aiheuttaa allergia- tai yliherkkyysreaktioita [16.] Ruoka-allergiassa allergeenilla tarkoitetaan ruoan tiettyä proteiinia, joka aiheuttaa allergisen reaktion. Ruoan pääasiallisia allergeeneja ovat eläin- ja kasvikunnan proteiinit. Ruoka-aineen korkea proteiinipitoisuus kasvattaa ruoka-ainejäämän laukaiseman anafylaksian riskiä. Reaktion laukaiseva määrä allergeenia on tyypillisesti kymmeniä tai jopa satoja milligrammoja. Elintarviketeollisuuden tarpeisiin on määritetty kynnysarvoja proteiinimäärille, jotka laukaisevat anafylaksian kaikkein herkimmille henkilöille. Herkkyyskynnystä kuvataan ED-arvolla (eliciting dose) sen mukaan, kuinka suuri osa allergisista reagoi tähän proteiinimäärään. Maidolle allergisten tyypillinen ED 5 -arvo on 4–5 mg, toisin sanoen 5 % allergisista reagoi näin pieneen proteiinimäärään. [2.]

Maitoallergiassa maidon proteiinit aiheuttavat oireita potilaalle. Maidosta tunnetaan noin 30 allergeenia, joita on sekä kaseiinissa että heraproteiinissa. [17.] Maitoallergialla voi olla monenlaisia oireita lievästä suuallergiasta tai nokkosihottumasta vakaviin hengenvaarallisiin systeemisiin reaktioihin, kuten anafylaktiseen sokkiin tai keuhkoastmaan. Ihmisen altistuessa maidolle ensimmäisen kerran maidon proteiinien epitoopit sitoutuvat immuunijärjestelmän tuottamiin spesifisiin IgE (immunoglobuliini E) -vasta-aineisiin. Tämä reaktio laukaisee ihmisen immuunipuolustuksen, jonka seurauksena henkilö saa oireita. [2.] Maitoproteiiniallergia on kliinisesti erotettavissa laktaasin puutteen aiheuttamasta laktoosi-intoleranssista [18]. Tavallisimmin anafylaksia ilmenee imeväisikäisen lapsen syödessä lehmänmaitoa ensimmäisen kerran. Mitä suurempi on maidolle spesifisen IgE:n pitoisuus, sitä todennäköisemmin maito aiheuttaa oireita. Ainut tapa ehkäistä maidosta aiheutuvia allergisia oireita on välttää maitoa ja maitotuotteita. [2.]

Maitoproteiiniallergia on yksi yleisimmistä allergioista erityisesti vauvoilla ja lapsilla, ja sitä esiintyy 0,5–5 %:lla väestöstä eri ikä- ja maantieteellisissä ryhmissä. Vaikka useimmat lapset kasvavat lopulta maitoallergiansa yli, joillakin se säilyy aikuisikään asti. [18.]

Kuten kaikkia allergioita, lehmänmaitoallergiaa on kahden tyyppistä: välitöntä ja viivästynyttä. Välittömän tyyppin allergia indusoituu pääasiassa IgE-luokan vasta-aineiden laukaiseman mekanismin kautta, ja se on yleisin maitoallergian aiheuttava mekanismi. IgE-välitteisen allergian oireet alkavat lähes välittömästi maidon nauttimisen jälkeen. Viivästyneen tyyppin allergia on T-soluvälitteistä, ja sen oireiden kehittyminen kestää tunnista jopa useisiin vuorokausiin maidon nauttimisesta. [11.]

Lehmänmaidon pääallergeeneja ovat kaseiinit, etenkin α_1 -kaseiini, β -laktoglobuliini sekä α -laktalbumiini. Maidon allergisoivin proteiini on β -laktoglobuliini, aiheuttaen 66 % kaikista maidon aiheuttamista allergioista. β -laktoglobuliinin ja α_1 -kaseiinin korkea allergisuus johtuu siitä, että niille ei löydy vastinetta ihmisen maidosta. Heraproteiineista myös immunoglobuliinien, naudan seerumiproteiinien ja laktoferrinin on todettu aiheuttavan allergiaa. Useimmat maitoallergiaa sairastavat henkilöt ovat kuitenkin herkistyneet useammalle kuin yhdelle maidon proteiinille. [11.]

Maidon jalostus ja siihen lisättävät muut raaka-aineet voivat aiheuttaa proteiinien konformaation tai epitooppien muutoksia, mikä voi johtaa allergeenien immunologisiin muutoksiin [19]. Epitooppien muutokset vaikuttavat proteiinien allergeenisuuteen ominaisuuksiin, joko tuhoamalla tai muodostamalla täysin uusia epitooppeja. Epitooppien tuhoutuminen voi vähentää proteiinien allergeenisuutta tai toisaalta uusien epitooppien synty voi jopa kasvattaa sitä. Maidon jalostuksen vaikutusta kokonaisuudessaan elintarvikkeen allergeenisuuteen on kuitenkin hankala arvioida, ja tutkimuksia aiheesta on varsin vähän. On kuitenkin tutkittu, että kuumennus, painekäsittely, entsyymaattinen hydrolyysi ja maitohappokäyminen voivat vähentää maidon allergeenisuutta. [11; 14, s. 160.] Tutkimuksissa on selvinnyt esimerkiksi, että lehmänmaitoallergisista potilaista noin 70 %

sietää voimakkaasti kuumennettua maitoa. Kaseiini on lehmänmaidon stabiili allergeeni, sillä kuumennus ei vähennä kaseiinin allergeenisuutta, koska kaseiinin epitooppi kestää kuumennuksen. β -laktoglobuliini ja α -laktalbumiini taas eivät kestä voimakasta kuumennusta tai ruoansulatusta, sillä niiden allergeenisuus perustuu globulaariseen eli pallomaiseen rakenteeseen. Tästä syystä herkistyminen kaseiinille liittyy vaikeampiin oireisiin ja anafylaksiariskiin. [11; 2.]

3 Allergeenien hallinta elintarviketuotannossa

Elintarvikkeiden valmistusprosessi on monimutkainen prosessi, joka koostuu useista tekijöistä, kuten materiaalin hankinnasta, prosessoinnista, laitteiden ja muiden resurssien tehokkaasta käytöstä sekä tuotteen muotoilusta. Allergeenien hallinta edellyttää integroitua lähestymistapaa, jossa otetaan huomioon kaikki nämä tekijät koko toimitusketjussa raaka-aineiden toimittajista vähittäismyyjiin ja viime kädessä kuluttajaan. Allergeenien hallinta koskee siis koko toimitusketjua maatilalta loppukuluttajalle ja edellyttää kattavaa tietoa allergeeneista kaikista näistä vaiheista. Allergeenien hallinta edellyttää huolellista allergeenien käsittelyä elintarvikkeiden valmistuksessa, jotta allergiset kuluttajat voivat tehdä turvallisia valintoja. Allergeeniriskejä voi esiintyä kaikissa elintarvikkeiden valmistusprosessin vaiheissa, jotka voidaan tiivistää suunnitteluun, hankintaan, valmistukseen ja toimitukseen. [20.]

Suunnitteluvaiheessa tärkeimpiä näkökohtia ovat tuotteen koostumus ja ainesosien erittely. Esimerkiksi uuden allergeenia sisältävän tuotteen suunnittelussa on arvioitava kriittisesti, onko allergeeni välttämätön ainesosa elintarvikkeessa. Voidaan myös pohtia, onko olemassa raaka-ainevaihtoehtoa, jossa ei olisi kyseistä allergeenia. [20.] Tehdas- ja laitesuunnittelu ovat toimenpiteitä, jotka voidaan toteuttaa osana pidemmän aikavälin suunnitelmaa. Kaikissa uusissa tehtaissa tai uuden linjaston käyttöönotossa on otettava huomioon allergeenien hallintavaatimukset jo suunnitteluvaiheessa. Keskeisiä huomioita suunnittelussa on, että laitteet ovat helposti puhdistettavissa paikoillaan tai vaihtoehtoisesti purettavissa puhdistusta varten. Laitteistossa tulee myös välttää teräviä

kulmia tai halkeamia, joihin materiaali voi kerääntyä ja sitä kautta vapautua tuotteisiin, joihin se ei kuulu. [20.]

Hankintavaiheessa tärkeintä on saada toimittajalta kattavat, tarkat ja luotettavat tiedot ainesosista ja varmistaa, että tekniset tiedot ovat asianmukaisia, sillä raaka-aine voi kontaminoitua jo alkutuotannossa. Esimerkiksi samassa tuotantotilassa käsiteltävä allergeeni voi tahattomasti kontaminoida toisen raaka-aineen ilmaitse tai pinnan välityksellä. Toisaalta raaka-aine on voinut kontaminoitua jo pellolla. Elintarvikeyrityksen on siksi tärkeää selvittää raaka-aineidensa kasvatusta-, jalostus- ja säilytysolosuhteet. [21; 20.]

Elintarvikkeen valmistusvaihe on vaihe, johon elintarvikevalmistaja voi itse vaikuttaa kaikkein eniten, mutta se on mahdollisesti myös vaiheista monimutkaisin. Tehtaan suunnittelun ja toiminnan yksityiskohtainen tuntemus on välttämätöntä allergeenien menestyksekkäälle hallinnalle. Erityisesti silloin, jos tehdas on suunniteltu ennen kuin allergeeneja pidettiin elintarviketurvallisuuskysymyksenä. Kriittisiä tekijöitä ovat allergeenien ristikontaminaatoriskien tunnistaminen ja järjestelmien suunnittelu niiden poistamiseksi tai minimoimiseksi. [20.] Allergeenin ristikontaminaatiosta puhutaan silloin, kun elintarvikkeeseen on päätenyt allergeenia esimerkiksi kontaminoituneen raaka-aineen kautta.

Elintarvikeketjussa on tavoitteena, että kuluttajille päätyy tuotteita, jotka sisältävät vain siihen kuuluvia ainesosia. Elintarvikeketjuun ei saa myöskään päätyä tuotteita ilman asianmukaisia pakkausmerkintöjä allergeeneista. Ilmoittamattomat allergiaa aiheuttavien aineiden jäämät elintarvikkeissa voivat aiheuttaa ongelmia allergisille henkilöille, koska silloin he altistuvat allergeenille tietämättään. Kuluttajien turvallisuuden parantamiseksi yleisimmät allergiaa ja intoleransseja aiheuttavat ruoka-aineet tulee Suomessa EU:n direktiivien myötä säädetyin lain velvoittamana merkitä elintarvikepakkauksiin. Maito on yksi yleisimmistä allergiaa ja yliherkkyyksiä aiheuttavista ruoka-aineista, ja se tulee merkitä pakkauksiin selkeästi muusta ainesosaluettelosta erottuvalla tavalla, jotta se on helposti huomattavissa. [1, s. 70; 21.]

Elintarvikepakkauksissa käytetään paljon myös ”saattaa sisältää” -merkintöjä. ”Saattaa sisältää” -merkintöjä lisätään pakkauksiin ilmoittamaan tuotteessa olevista mahdollisista allergeeneista, jotka ovat voineet päätyä tuotteeseen kontaminaation seurauksena. Kyseinen merkintä tulee ilmoittaa pakkauksessa vain silloin, kun kaikki mahdollinen on tehty allergeenin pääsyn estämiseksi elintarvikkeeseen, mutta silti näistä toimista huolimatta tuotteesta on toistuvasti pystytty analyttisesti määrittämään allergeenijäämiä. [1, s. 70.]

Allergeenien hallinta on osa elintarvikeyrityksen omavalvontasuunnitelmaa. Allergeenien hallinta vaatii elintarvikeyritykseltä riskinarviointia esimerkiksi kontaminaatiovaarojen havaitsemiseksi. Omavalvontasuunnitelma koostuu HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) -järjestelmästä ja tukijärjestelmästä, joista allergeenien hallinta kuuluu tukijärjestelmiin. Tukijärjestelmän avulla yritys näyttää, että allergeeneihin liittyvät riskit ovat hallinnassa. [22.] Elintarviketuottajat käyttävät analyttisiä menetelmiä apuna noudattaakseen allergeenimerkintöjä koskevia lakeja, havaitakseen ristikontaminaatiot ja puutteet hygienian laadussa. Allergeenien hallinnassa onkin haasteena erilaisten elintarvikematriisien analysoinnin vaikeus. Tahatonta allergeenia on voinut päätyä tuotteeseen niin pieni määrä, ettei sitä havaita analyysimenetelmällä tai määrittäykseen otettu näyte ei ole välttämättä edustava näyte. Lisäksi haasteita luo puutteellinen lainsäädäntö koskien allergeenien raja-arvoja. Esimerkiksi maidolle tällaisia raja-arvoja ei ole pystytty vielä asettamaan [2].

Allergeenien ristikontaminaatioita pyritään minimoimaan myös hyvällä tuotantohygienialla ja ajojärjestyksen sekä pesujen suunnittelulla. Esimerkiksi jokaiselle allergeenille tulee olla vain niiden käsittelyyn tarkoitetut merkityt työvälineet. [23.] Lisäksi allergeeneja sisältävät raaka-aineet tulee varastoida niille merkittyihin paikkoihin varastossa, eikä allergeeneja tai niitä sisältäviä raaka-aineita tule varastoida päällekkäin. [3.] Puhdistusta voidaan pitää HACCP-suunnitelman valvontatoimenpiteenä. Ennen käyttöönottoa puhdistusprosessi on validoitava ja todennettava. Tämä tarkoittaa, että ennen elintarvikkeen valmistuksen aloittamista, puhdistusmenettely ja -menetelmä on validoitava sen varmistamiseksi, että ne todella ovat tehokkaita allergeenien poistamiseksi vaaditussa määrin.

Puhdistusprosessia on seurattava säännöllisesti sen varmistamiseksi, että se toimii suunnitellusti. Erilaisten analyttisten todentamismenetelmien, kuten lopputuotteiden testauksen tai pintojen puhtauden tarkkailun avulla saatavat lisätiedot auttavat varmistamaan, että puhdistussuunnitelma on tehokas. [20.]

Pesujen onnistumista testataan tuotannossa jatkuvasti erilaisilla allergeenijäämätesteillä. Elintarvikehuoneiston on lähdettävä välittömästi korjaaviin toimenpiteisiin, mikäli allergeenijäämiä havaitaan toistuvasti raja-arvot ylittäviä määriä tuotteissa, laitteistojen pinnoilla tai loppuhuuhteessa pesujen jälkeen. Silloin on tarpeen tarkastella pesujen ja puhdistuksen tehokkuutta allergeenien eliminoinemiseksi. Lisäksi on otettava huomioon tuotteen mahdollinen kontaminoituminen tuotteen valmistusprosessin eri vaiheissa. Esimerkiksi epäpuhtaat välineet tai pinnat voivat aiheuttaa tuotteen kontaminaation. Lisäksi tuotannon henkilöstön on noudatettava huolellisuutta ja hygieenisiä tuotantotapoja, jotta vältetään tahattomat allergeenikontaminaatiot. [23; 20.]

4 Proteiinijäämäanalytiikan menetelmät

Allergeenianalytiikassa on olennaista, että menetelmä on hyvin spesifinen tutkitavalle allergeenille, toteamisrajat ovat matalia ja että menetelmä soveltuu monille eri näytematriiseille. Tämä asettaa haasteita menetelmän valinnalle ja menetelmän toimivuuden toteamiselle. Menetelmän valinnassa on myös tärkeää pohtia, mitä halutaan tutkia ja kuinka tarkkoja tuloksia analyysiltä halutaan.

Elintarviketeollisuuden tarpeisiin on kehitetty monenlaisia valmiita pikatestimenetelmiä, jotka on suunniteltu havaitsemaan joko yhden tai useamman kohdeantigeenin. Markkinoilla on myös testejä, jotka havaitsevat pinnoilta yleisesti kaikki proteiinijäämät, joilla voidaan selvittää hygienian tasoa puhdistuksen jälkeen.

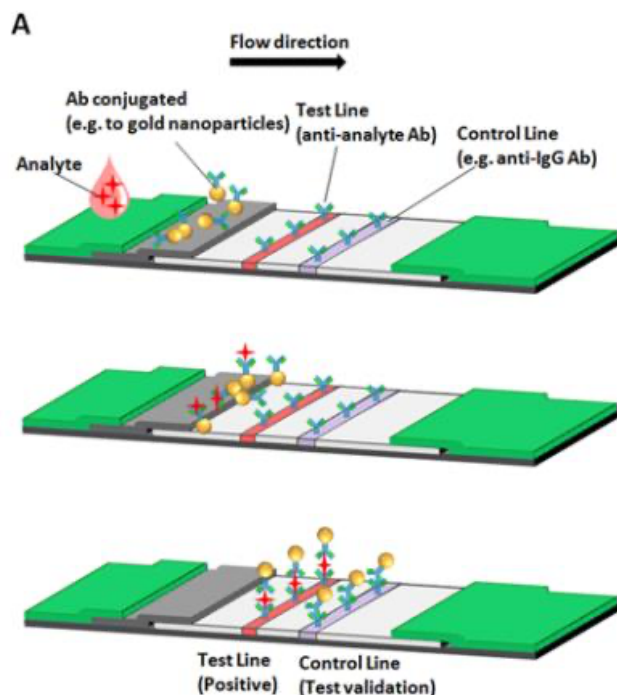
Yleisimpiä immunologisia allergeenianalytiikan menetelmiä maitoproteiinijäämille ovat ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) -menetelmät ja LFT (Lateral Flow Test) -sivuvirtaustestit, joita kutsutaan myös pikatesteiksi.

Menetelmät perustuvat proteiinien tunnistamiseen näytteestä. Allergeenianalytiikassa käytetään myös PCR (Polymerase Chain Reaction) -menetelmää, mutta maidon jäämien havaitsemiseen se ei sovellu, sillä nämä matriisit eivät usein sisällä tarpeeksi DNA:ta. [19.]

4.1 Immunokromatografinen sivuvirtaustesti

Kvalitatiivinen immunologinen sivuvirtaustesti (LFT) on yksi yleisimmistä immunokromatografisista pikatestimenetelmistä, jota käytetään allergeenien tunnistamiseen elintarvikkeista. Sivuvirtaustesti on yksinkertainen laite, joka on suunniteltu havaitsemaan kohdeanalyytin läsnäolo tai puuttuminen. Immunokromatografian käsite on yhdistelmä kromatografiaa (näytteen komponenttien erottelu perustuen eroihin niiden liikkumisessa kalvoa pitkin) ja immunokemiallisia reaktioita. Immunologiset määritykset perustuvat vasta-aineiden ja antigeenien väliseen vuorovaikutukseen. [4.]

Sivuvirtaustestien periaate on yksinkertainen. Mahdollista kohdeanalyyttiä sisältävä nestemäinen näyte kulkeutuu kapillaari-ilmion vaikutuksesta testiliuskan erilaisten vyöhykkeiden läpi. Vyöhykkeisiin on kiinnittyneenä molekyylejä, joiden kanssa kohdeanalyytti voi olla vuorovaikutuksessa. Tyypillinen sivuvirtaustestiliuska koostuu taustakortille asennetuista limittäin olevista kalvoista. Kuvassa 1 on kuvattu tyypillinen sivuvirtaustestiliuskan rakenne ja näytteen kulkeutuminen pitkin testiliuskaa.



Kuva 1. Tyypillinen sivuvirtaustestiliuska, jossa esitetään näytteen kulkeutuminen testiliuskassa. Punainen viiva on testiviiva, joka ilmaisee positiivisen tuloksen. Harmaa viiva on kontrolliviiva, joka ilmaisee testin onnistuneen. Virtaus-suunta vasemmalta oikealle. [24.]

Tutkittava näyte asetetaan ensin testiliuskan päässä olevalle näytetyynylle, joka on kyllästetty pinta-aktiivisilla aineilla ja puskurisuoloilla, jotka tekevät näytteestä sopivan testiliuskan tunnistusmekanismeja kohtaan. Näyte kulkeutuu seuraavaksi konjugaatin irroitustyynyn läpi, joka sisältää kohdeanalyytin spesifisiä vasta-aineita, jotka ovat konjugoituneet värillisiin tai fluoresoiviin hiukkasiin. Yleisimpiä kohdeanalyytin leimaamiseen käytettäviä aineita ovat kolloidinen kulta ja lateksimikropallot. Tämän jälkeen kohdeanalyytti ja siihen sitoutunut konjugoitu vasta-aine kulkeutuvat testiliuskan havaintoalueelle. Havaintoalue on huokoista, yleensä nitroselluloosaa, joka sisältää linjoihin immobilisoituja vasta-aineita tai antigeeneja, joiden tehtävänä on reagoida konjugoituun vasta-aineeseen sitoutuneen kohdeanalyytin kanssa. Näytteen analyytin tunnistus havaintoalueella johtaa testiviivan muodostumiseen testilinjalla, ja kontrolliviiva osoittaa nesteen oikean virtauksen testiliuskan läpi. Testiliuskan toisessa päässä

olevan imutyynyn tarkoitus on poistaa ylimääräiset reagenssit sekä estää nesteen takaisinvirtaus. [24.]

Sivuvirtaustestit ovat pikatestejä, joiden tulos saadaan yleensä 10–15 minuutissa. Tulos tulkitaan visuaalisesti testiliuskaan muodostuvista viivoista. Ensimmäinen viivoista on kontrolliviiva, joka ilmaisee testin toimivuuden. Näytteen sisältäessä tarpeeksi tutkittavaa analyyttiä muodostuu testiliuskaan kaksi viivaa ja tulos tulkitaan positiiviseksi. Pelkkä kontrolliviiva tarkoittaa negatiivista tulosta, jolloin kohdeanalyyttiä ei ole havaittu. Mikäli yhtään viivaa tai vain positiivisen tuloksen ilmaiseva viiva muodostuu, testi on epäonnistunut. [4.]

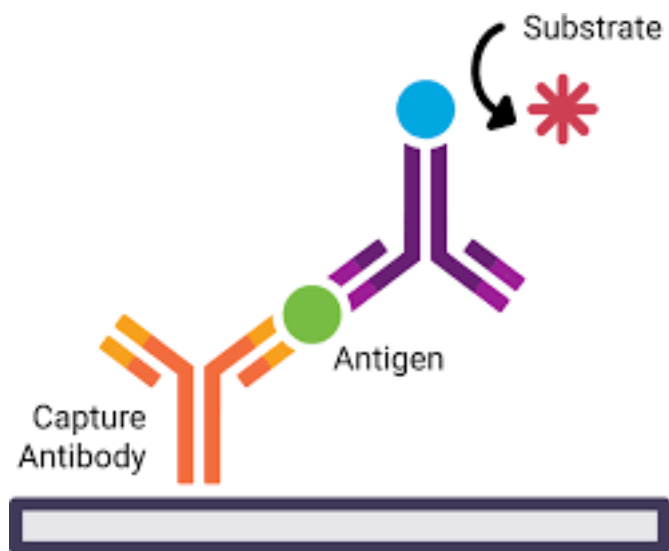
Menetelmän spesifit vasta-aineet vastaavat analyytin tunnistamisesta ja testiliuskaan muodostuvasta signaalista. Testiviivan värin voimakkuus korreloi tutkitavan analyytin määrää näytteessä. Testin tuloksen tulkinnan helpottamiseksi testiliuskoissa hyödynnetään usein tummia sävyjä, jotka erottuvat hyvin vasten testiliuskan valkoista membraania. [24.]

Sivuvirtaustestin tuloksen tulkitsee testin suorittava henkilö, ja henkilön vastuulla on tulkita testin tulos oikein. Huolimatta tulosten yksinkertaisesta tulkintavasta tulosten tulkinta ei aina ole yksiselitteistä. Sivuvirtaustestien tulosten tulkinta on täysin riippuvainen testin tuloksen tulkitsijasta. Tulosten tulkintaan voi vaikuttaa testin tuloksen tulkinta-aika, valaistus ja testiä suorittavan henkilön näkökyky. Menetelmän kritiikki kohdistuukin juuri tulosten tulkintaan. Heikon testiviivan tulkinta on hankalaa ja voi johtaa väriin tuloksiin. Tulos ei myöskään siirry automaattisesti tietokoneelle, jolloin syntyy myös tuloksen kirjausvirheen mahdollisuus. Tulosten tulkinnallisia ongelmia on pyritty ratkaisemaan erilaisilla lukulaitteilla, jotka tulkitsevat testin tuloksen. Tulosten oikeellisuuden kannalta on erittäin tärkeää, että testin suorittaja on tutustunut testin käyttöohjeisiin, suorittaa testin virkeänä ja huolellisesti sekä tarpeeksi kirkkaassa valaistuksessa.

4.2 ELISA-menetelmä

ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys on käytetyin tekniikka ruoka-allergeenien havaitsemiseksi raaka-aineesta tai lopputuotteesta. Menetelmä on kuoppalevypohjainen määritystekniikka, jonka tärkein elementti on erittäin spesifinen vasta-aine-antigeenivuorovaikutus. ELISA-testit ovat erittäin herkkiä ja niitä käytetään yleensä immunologisten aineiden määrittämisessä. [25.]

ELISA-menetelmiä on neljää erilaista, joista sandwich ELISA on kaupallisista menetelmistä yleisin, sillä se on herkkydeltään muita parempi. Lisäksi sandwich ELISAssa antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen on muita menetelmiä vahvempaa. Muita ELISA-menetelmiä ovat suora, epäsuora ja kilpaileva ELISA. Menetelmät eroavat toisistaan sitoutuvien komponenttien määrässä. Sandwich ELISAn toimintaperiaate perustuu vasta-aineisiin, jotka pyrkivät vangitsemaan näytteessä olevan kohdeantigeenin kahden samankaltaisen vasta-ainekerroksen väliin muodostaen ”voileivän”. [25.] Kuvassa 2 on esitetty sandwich ELISAn toimintaperiaate.



Kuva 2. Sandwich ELISAn toimintaperiaate perustuu vasta-aineiden ja antigeenin vuorovaikutukseen [26].

Sandwich ELISAssa kuoppalevyn pohjaan on kiinnittynyt kohdeantigeeniä vastaan suunnattu vasta-aine (Capture Antibody), johon näytteessä mahdollisesti oleva antigeeni sitoutuu. Tämän jälkeen kuopat pestään, jolloin poistuu kaikki näytteen sitoutumattomat komponentit. Seuraavaksi kuoppiin lisätään entsyymikonjugoitu vasta-aine, joka sitoutuu antigeenin toiseen sitoutumiskohtaan ja kuopat pestään uudelleen. Tämän jälkeen lisätään vielä entsyymin substraatti, jonka entsyymi muuttaa havaittavaksi signaaliksi ja kuopat pestään jälleen. Substraatin signaalin absorptio voidaan mitata ja muuntaa numeeriseksi arvoksi. Antigeenin pitoisuus on suoraan verrannollinen värin intensiteettiin. ELISA-testien tulokset luetaan spektrofotometrillä, luminometrillä tai fluorometrillä riippuen käytetystä substraatista. [27.]

Kaupallinen sandwich ELISA-menetelmä

Tämän insinööriyön puitteissa tarkasteltava kaupallinen sandwich ELISA -menetelmä on suunniteltu tarkan kaseiinipitoisuuden määrittämiseen näytteestä. Testi suoritetaan 96-kuoppaisella levyllä, ja testissä käytettävä entsyymi on peroksidaasi. Menetelmällä voidaan havaita kaseiinijäämiä raaka-aineista, valmiista tuotteista sekä nesteistä. Testin tulos voidaan lukea fotometrisesti 450 nm:ssä, ja sen toteamisraja on 0,05 ppm kaseiinia. [28.]

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Menetelmien vertailu

Sivuvirtaus- ja ELISA-testeillä on omat etunsa ja haasteensa, mutta kummankin kohdalla nousee ongelmaksi se, että tulos voi olla virheellisesti positiivinen, jos tutkittavassa näytteessä on tutkittavan proteiinin kaltaisia proteiineja. Lisäksi prosessointi voi vaikeuttaa kohdeproteiinin havaitsemista, sillä proteiinit voivat prosessoinnin seurauksena reagoida muiden näytteen komponenttien kanssa ja muuntua niin ettei vasta-aine enää tunnista kohdeantigeeniä. Erityisesti proteiineja muokkaavia prosesseja ovat kuumennus, fermentointi sekä hydrolysointi. [11.]

Sopivan analyysimenetelmän valinta kasvirasvapuolivalmisteille on osoittautunut hankalaksi, sillä niiden matriisien on todettu häiritsevän menetelmän toimivuutta [29]. Lisäksi kasvirasvapuolivalmisteiden massan ominaisuudet ovat hankalat testien suorittamisen kannalta. Massat ovat hyvin viskooseja sekä niiden suhteellinen rasvapitoisuus on korkea, jolloin niiden käsittely on hankalaa sekä ne liukenevat huonosti uuttopuskuriliuokseen etenkin jäähtyneinä [29].

Sivuvirtaustestit ovat yksinkertaisia, nopeita ja helppoja suorittaa, eikä niiden käyttäminen yleensä vaadi mitään erityistä osaamista tai lisälaitteita. Sivuvirtaustestit ovat osoittautuneet testauksissa tarkoiksi, ne ovat hyvin spesifejä tutkittavalle analyyttille sekä niillä on varsin matalat toteamisrajat. Menetelmä on myös suhteellisen edullinen, mitä edesauttaa myös se, että menetelmän suorittaminen vie vain vähän laborantin työaika. Sivuvirtaustestit ovat myös turvallisia, sillä niiden käyttö ei yleensä vaadi vaarallisia reagensseja. Lisäksi sivuvirtaustestien etuna on se, että niillä saadaan tulos jo tuotantovaiheessa. Näin mikäli sivuvirtaustestillä havaitaan allergeenijäämiä, tuotanto voidaan pysäyttää ja korjaavat toimenpiteet voidaan aloittaa välittömästi. Menetelmän haittapuolia ovat tulosten tulkinnanvaraisuus sekä tulosten merkintävirheet.

Sivuvirtaustesteillä on kuitenkin yleensä korkeammat toteamisrajat verrattuna ELISA-menetelmään, mutta sivuvirtaustestit soveltuvatkin hyvin elintarviketuotantolaitoksissa allergeenijäämien rutiinitarkastuksiin. Jos rutiinitarkastuksissa ilmenee positiivisia tuloksia, näytteet olisi hyvä tutkia matalamman toteamisrajan omaavalla kvantitatiivisella testillä. Vaikka ylityksiä ei tulisi allergeenien määrissä, kvalitatiivisen tai puolikvantiivisen testin tulokset on vahvistettava määrääjain kvantitatiivisella testillä, joka suoritetaan ulkopuolisessa laboratoriossa [5].

ELISA-menetelmän hyviä puolia ovat testin tarkka kvantitatiivinen tulos sekä objektiivinen tulosten tulkinta. Menetelmä on kuitenkin sivuvirtaustesteihin verrattuna työlämpi, hitaampi suorittaa sekä kalliimpi. Nykyiseen tilanteeseen verrattuna eli näytteiden lähetykseen yrityksen pääkonttorilla sijaitsevaan laboratorioon tutkittavaksi toimeksiantajayrityksen omassa laboratoriossa suoritettava

ELISA-menetelmä antaisi tuloksen huomattavasti nopeammin, reilussa tunnissa. Menetelmän suoritus vaatii kuitenkin lisälaitteita laboratoriolta. ELISA-testien suorituksessa on myös suurempi mahdollisuus esimerkiksi mittaus- tai pipetointivirheelle, sillä työvaiheita on enemmän, kuin sivuvirtaustestissä. ELISA-menetelmissä käytetään myös yleensä terveydelle haitallisia reagensseja, joiden käsittelyssä tulee huomioida käyttäjän turvallisuus.

5.2 Näytteet

Menetelmien vertailun perusteella soveltuvuustesteihin valittiin sivuvirtaustestimenetelmä. Sivuvirtaustestimenetelmän soveltuvuutta maidon proteiinijäämien havaitsemiseen tutkittiin kahdella eri kasvirasvapuolivalmisteella, jotka koodattiin kirjaimin A ja B. Kasvirasvapuolivalmisteet ovat juustoa jäljitteleviä kasvipohjaisia ja maidottomia elintarvikkeita. Kasvirasvapuolivalmisteiden pääkomponentit ovat kookosöljy, rypsiöljy ja perunatärkkelys. Kasvirasvapuolivalmisteita valmistetaan samalla linjalla, kuin maitopohjaisia tuotteita. Maitopohjaisia ja kasvipohjaisia tuotteita ei ajeta samoina ajopäivinä, ja linja pestään ennen kasvirasvapuolivalmisteiden ajoa. Kyseisten valmiiden kasvirasvavalmisteiden pakkausmerkinnöissä on maininta ”saattaa sisältää maitoa”.

Molempia kasvirasvapuolivalmisteita ajettiin kumpanakin ajopäivänä, joina analyysjä tehtiin. Lisäksi molempina ajopäivinä otettiin pintasivelynäytteitä laitteen tuotekontaktipinnoista ennen ajojen aloitusta. Näytteenottosuunnitelmassa luvussa 6.1 on tarkemmin kuvattu näytteenottoa.

Sivuvirtaustestillä saatuja rinnakkaisnäytteiden tuloksia verrattiin toimeksiantajayrityksen pääkonttorin laboratoriossa ELISA-menetelmällä saatuihin tuloksiin, joiden perusteella arvioitiin sivuvirtaustestien tulosten luotettavuutta. Pääkonttorin laboratoriossa analysointimenetelmänä oli kaupallinen sandwich ELISA -menetelmä, joka on eri valmistajalta kuin ELISA-menetelmä, jota opinnäytetyön yhteydessä tarkasteltiin. Kyseisellä menetelmällä voidaan määrittää näytteen tarkka kaseiinipitoisuus. Menetelmän havaintoraja on 1 mg/kg kaseiinia.

5.3 Kaupallinen sivuvirtaustestimenetelmä

Tämän insinööriyön puitteissa tarkasteltava sivuvirtaustesti perustuu immu-noanalyysiin, joka yhdistää kaseiinille ja β -laktoglobuliinille spesifisiä vasta-ai-neita. Sillä voidaan havaita kyseisiä maidon proteiineja monista erilaisista elin-tarvikematriiseista sekä ympäristönäytteistä. Määritys on spesifinen kaseiinille ja β -laktoglobuliinille, eikä se ristireagoi muiden maitoproteiinin kanssa. Val-mistajan mukaan näytteen tulee sisältää yli 2,5 ppm kaseiinia ja β -laktoglobuliinia yhteensä, jotta tulos on positiivinen. Toisin sanoen määrityksen havaintoraja on 2,5 ppm. Menetelmällä voidaan havaita kyseisiä maidon proteiineja pinnoilta, valmiista elintarvikkeista sekä nesteistä. Kyseinen sivuvirtaustestimenetelmä noudattaa ISO 22000-, BCR Food- ja IFC Food -standardien ja HACCP-riskiar-viointiperiaatteen asettamia vaatimuksia allergeenijäämien hallintaan. [5.]

Sivuvirtaustestipakkaus sisälsi määrityksessä tarvittavat reagenssit ja ohjeet nii-den käyttöön analyysissä.

Huomioitavaa:

- Kaikki komponentit tulee säilyttää 2–25 °C:ssa.
- Kaikki komponentit tulee säilyttää alkuperäisessä pakkauksessaan käyttöhetkeen asti.
- Älä koske liuskan valkoiseen päähän.
- Älä käytä liuskaa, jos se on rikki tai vaurioitunut.
- Kaikki testisarjan osat ovat kertakäyttöisiä; älä käytä niitä uudelleen.
- Älä käytä testiliuskoja viimeisen käyttöpäivän jälkeen. [5.]

Näytteet, jotka ovat rakenteeltaan erittäin viskooseja, tiheitä tai omaavat kor-kean rasvapitoisuuden, voivat kulkeutua virheellisesti pitkin kromatografiakal-voa, mikä vaikuttaa määritystulokseen aiheuttaen testi- ja kontrolliviivojen vai-menemisen tai katoamisen. Siksi on tärkeää välttää pipetoimasta näytteen ras-vakerrosta kuoppaliuskan kaivoon. [5.]

5.3.1 Laitteet ja välineet

Määrittämissä tarvittavat välineet ja laitteet ovat

- sivuvirtaustestipakkaus
- vaaka (herkkyys 0,1 g)
- koeputkiravistelijä (ei pakollinen)
- ajastin.

Sivuvirtaustestipakkauksen sisältö on koottu taulukoon 1.

Taulukko 1. Sivuvirtaustestipakkauksen sisältö [muokaten lähteestä 5].

Komponentti	10 kpl pakkaus
Suljettu säiliö, joka sisältää 10 kpl immunokromatografia-tikkuja	1
Pullo, joka sisältää 60 ml uuttoliuosta, käyttövalmis	1
Pienet keltaiset pipetit 1 ml	10
Suuret läpinäkyvät pipetit 3 ml	10
Tyhjät näyteputket	10
8-kuoppainen mikrotiitteriliuska	2
Mikrotiitterilevy	1
Vanupuikkoja pintanäytteenottoa varten	10

5.3.2 Työohjeet kiinteille näytteille

Sivuvirtaustestimenetelmän työohjeet kiinteille näytteille ovat seuraavanlaiset:

1. Punnitse 0,5 g näytettä pakkauksen mukana toimitettuun näyteputkeen. Lisää 4,5 ml uuttoliuosta läpinäkyvällä pipetillä.
2. Ravista vähintään 20 sekuntia koeputkiravistimella homogenisoitumisen varmistamiseksi. Vaihtoehtoisesti voit ravistaa putkea voimakkaasti käsin. Anna levätä 2 minuuttia, jotta kiintoaineet laskeutuvat.

3. Lisää keltaisella pipetillä 10 tippaa supernatanttia puhtaaseen, käyttämättömään mikrotiitteriliuskan kuoppaan. Jos näytteessä on paljon rasvaa, vältä supernatantin rasvakerroksen ottamista.
4. Avaa testiliuskoja sisältävä säiliö juuri ennen määrittämisen suorittamista, ja ota vain tarvittava määrä liuskoja. Sulje säiliö välittömästi.
5. Työnnä testiliuskan valkoinen pää pystysuoraan näyteuutetta sisältävään kuoppaan ja odota 10 minuuttia, jotta tulos on luettavissa. Älä koske tai poista testiliuskaa kuopasta odotellessasi testitulosta. [5.]

5.3.3 Tulosten tulkinta

Testin tulos on positiivinen, jos kaksi punaista viivaa ilmestyy: yksi kontrollivyöhykkeellä ja yksi testivyöhykkeellä. Testiviivan värin intensiteetti voi vaihdella, mutta se ei välttämättä ole verrannollinen näytteen maitoproteiinipitoisuuteen. Testin tulos on negatiivinen, jos vain yksi punainen viiva on selvästi näkyvässä kontrollialueella. Jos punaista viivaa ei näy kontrollialueella, testi on virheellinen. Mikäli testi on virheellinen, testi tulee toistaa toisella testiliuskalla, tarkistaa näytteen oikea käsittely ja testausmenettely sekä viimeinen käyttöpäivä ja säilytysolosuhteet. [5.]

5.4 Kaupallinen pintasivelytesti

Pintasivelytesti on yleisesti kaikkien proteiinijäämien havaitsemiseen puhdistetuilta pinnoilta tarkoitettu analyysimenetelmä, eikä se ole spesifi mitään tiettyä allergeenia kohtaan. Pintasivelytestillä voidaan havaita 30 minuutin inkubaatioajalla 37 asteessa 3 µg:n pitoisuus proteiinia. Menetelmänä se on edullinen, helppo suorittaa sekä melko nopea, sillä tulokset saadaan puolessa tunnissa. Pintasivelytestillä saadaan kvalitatiivinen tulos, eikä sitä ole tarkoitettu tarkan proteiinipitoisuuden määrittämiseen. Testin tulos on riippuvainen ajasta ja lämpötilasta, ja tulos tulkitaan värinmuutoksena. [30.]

Kyseinen pintasivelytesti on ollut toimeksiantajayrityksellä aiemmin käytössä pintojen puhtauden tarkkailussa.

Pintasivelytestiputket sisälsivät kaikki analyysissa vaadittavat reagenssit.

Huomioitavaa:

- Pintasivelytestiputkien tulee antaa tasaantua huoneenlämpötilaan (21–25 °C) ennen käyttöä.
- Pintasivelytestiputket tulee säilyttää 2–25 °C:ssa.
- Hyvin alhaisilla proteiinijäämätasoilla, kun värin intensiteetti on heikko (harmaa), tulee olla varovainen tulosten tulkinnassa. Vertailu negatiivisen kontrollin kanssa on silloin suotavaa. [30.]

Määrityksessä tarvittavat laitteet ja välineet ovat

- pintasivelytestiputket
- inkubaattori tai lämpökaappi (37 °C)
- ajastin.

5.4.1 Työohjeet

Pintasivelytestin työohjeet ovat seuraavanlaiset:

1. Pidä pintasivelytestiputkesta tiukasti kiinni, kierrä ja vedä vanupuikko irti testiputkesta. Testiputken sisäpuolella saattaa näkyä kondensoitumista; tämä on normaalia. Vanupuikkokärki on kostutettu valmiiksi näytteen keräämisen maksimoimiseksi.
2. Pyyhi perusteellisesti 10 x 10 cm:n alue tyypillisen tasaisen pinnan saamiseksi. Epäsäännöllisillä pinnoilla varmista, että näytteenottotekniikka pysyy yhtenäisenä jokaisessa testissä, ja pyyhi riittävän suuri alue edustavan näytteen ottamiseksi.
3. Laita vanupuikko takaisin testiputkeen pyyhkäisyn jälkeen.
4. Aktivoi pintasivelytestiputki pitämällä siitä lujasti kiinni ja käyttämällä peukaloa ja etusormea murra Snap-Valve-venttiili taivuttamalla eteen- ja taaksepäin. Purista korkin säiliötä kahdesti, jolloin kaikki neste poistuu testiputkeen.
5. Huuhtelee vanupuikkoa nesteessä ravistamalla testiputkea 5–10 sekuntia.

6. Inkuboi 37 °C:ssa 30 minuuttia.
7. Kun aika on kulunut, tulkitse tulos vertaamalla liuoksen väriä putken etiketissä olevaan väritaulukkoon. [30.]

5.4.2 Tulosten tulkinta

Pintasivelytestiputkessa olevan liuoksen väri ja aika, jolloin värinmuutos tapahtuu, osoittavat proteiinijäämien pitoisuudet näytteessä. Vertaamalla liuoksen väriä putken etiketissä olevaan taulukkoon, voidaan tehdä arvio pinnan puhtautta. Nopeampi ja tummempi värinmuutos kertoo suuremmasta määrästä proteiinijäämiä testatulla pinnalla. Inkubaatiota ei tarvitse jatkaa, jos väri muuttuu purppuraiseksi jo ennen testiajan päättymistä. Vihreä väri tarkoittaa negatiivista tulosta, jolloin proteiinijäämiä ei ole havaittu. Harmaa väri kertoo mahdollisesta pienestä määrästä proteiinijäämiä. Purppura väri kertoo positiivisesta testituloksesta, jolloin proteiinijäämiä on löytynyt pinnalta. [30.]

6 Kokeellinen osa

6.1 Näytteenottosuunnitelma

Näytteenotolla varmistetaan, että tuote vastaa tavoiteltua laatua. Näytteenottosuunnitelma tulee tehdä näytteen edustavuuden varmistamiseksi. Näyte on edustava silloin, kun sen perusteella voidaan tehdä luotettavia arvioita tuotteen ominaisuuksista, josta näyte on otettu. [31.] Näytteenottajalla tulee olla riittävä asiantuntemus näytteiden ottamiseen, käsittelyyn ja säilytykseen, jotta analyysin tuloksia voidaan pitää luotettavina. Lisäksi näytteenottajan ja näytteet analysoivan henkilön tulee noudattaa tarkasti valmistajan antamia ohjeita analyysin suorittamisessa. Valmistaja on validoinut sivuvirtaustestimenetelmän useille eri elintarvikematriiseille, ja siksi on perusteltua suorittaa verifiointi, joka on validointia kevyempi menettely. Verifiointilla laboratorio osoittaa osaavansa käyttää menetelmää valmistajan ohjeen mukaisesti, varmistaa tulosten oikeellisuuden sekä määrittää kvalitatiivisen menetelmän toteamisrajan. [32.]

Toimeksiantajayrityksen laboratoriossa suoritettujen sivuvirtaustestien tuloksia verrataan toimeksiantajayrityksen pääkonttorin laboratoriossa ELISA-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Tuloksia vertaamalla saadaan selvitettyä systemaattista virhettä. Näytteitä pyritään ottamaan pääkonttorin laboratorion tutkimuksiin samaan aikaan ja samaan tapaan kuin sivuvirtaustestien rinnakkaismäärittäjä varten, eli yksi näyte kasvirasvapuolivalmiste-erän ajon aloituksessa. Positiiviset kontrollinäytteet lähetetään myös analysoitavaksi pääkonttorin laboratorioon, ja tulosten perusteella saadaan kontrollinäytteiden tarkka proteiinipitoisuus.

Näytteet otetaan kasvirasvapuolivalmisteen erän tuotannon aloituksessa ensimmäisestä massasta, mikä on kulkeutunut laitteiston läpi. Tärkeää on ottaa näytteet mahdollisimman samalla tavalla, kuin kasvirasvapuolivalmisteita ajetaan. Molemmat tutkittavat kasvirasvapuolivalmisteet pakataan laatikoihin, joten näytteet otetaan näyterasioihin. Oleellista kuitenkin on, että massa kulkeutuu läpi koko laitteiston, jolloin massa kulkeutuu kaikkien mahdollisten kontaminaatiopaikkojen ohi.

Kasvirasvapuolivalmisteiden näytteenottosuunnitelma on koottuna taulukkoon 2. Molempina ajopäivinä tuotannossa on kaksi kasvirasvapuolivalmistetta, jotka on koodattu kirjaimin A ja B. Näytteitä otetaan niin, että molempina ajopäivinä kustakin kasvirasvapuolivalmisteesta otetaan yksi näyte ajon aloituksessa. Jokaisesta näytteestä tehdään neljä rinnakkaismäärittystä. Lisäksi jokaiseen määritysryhmään otetaan mukaan positiivinen kontrollinäyte, jonka valmistus on eritelty luvussa 6.2.

Taulukko 2. Kasvirasvapuolivalmisteiden näytteenottosuunnitelma. Näytteet on koodattu kirjaimin A ja B. Kasvirasvapuolivalmisteita A ja B valmistetaan kumpakin ajopäivänä.

	Näyte	Näytteenottoaika	Näytetyyppi
Ajopäivä 1.	A1	Annostelu pakkauskoneella	Näyterasia
	B1	Annostelu pakkauskoneella	Näyterasia
Ajopäivä 2.	A2	Annostelu pakkauskoneella	Näyterasia
	B2	Annostelu pakkauskoneella	Näyterasia

Laitteiston pintasivelytestien näytteenottosuunnitelma on taulukossa 3. Pesujen tehokkuutta maidon allergeenien poistamiseksi selvitetään ottamalla pintasivelynäytteitä pakkauskoneen annostelunokasta, pakkauskoneen massasuppilosta, pitkän massaputken sisältä, keittimestä sekä keittimen suppilosta pesujen jälkeen, ennen tuotannon aloitusta. Näytteenottopaikoista keitin pestään kierto-ohjelmalla ja se sijaitsee yhdessä keittimen suppilon kanssa keittosalissa. Pakkauskoneen suppilo, -annostelunokka, sekä pitkä massaputki ovat pakkaamon puolella, ja ne pesevät pintapesuilla manuaalisesti laitospesijä, samoin kuten keittimen suppilonkin.

Taulukko 3. Laitteiston pintasivelytestien näytteenottosuunnitelma. Näytteenottopaikat on koodattu kirjaimin F, G, H, I ja J.

	Näyte	Näytteenottopaikka	Näytetyyppi
Ajopäivä 1.	F1	Pakkauskoneen annostelunokka	Sively
	G1	Pakkauskoneen suppilo	Sively
	H1	Pitkä massaputki	Sively
	I1	Keitin	Sively
	J1	Keittimen suppilo	Sively
Ajopäivä 2.	F2	Pakkauskoneen annostelunokka	Sively
	G2	Pakkauskoneen suppilo	Sively
	H2	Pitkä massaputki	Sively
	I2	Keitin	Sively
	J2	Keittimen suppilo	Sively

Näytteenotossa, näytteiden esikäsittelyssä sekä analysoinnissa tulee huomioida maidon mahdolliset kontaminaatoriskit. Välineiden, pintojen ja vaatteiden tulee olla puhtaita ja on käytettävä kertakäyttökäsineitä. Laboratorion työpinnat tulee puhdistaa vähintään 60-prosenttisella etanolilla ennen määrittäisiä.

6.2 Positiivisten kontrollinäytteiden valmistus

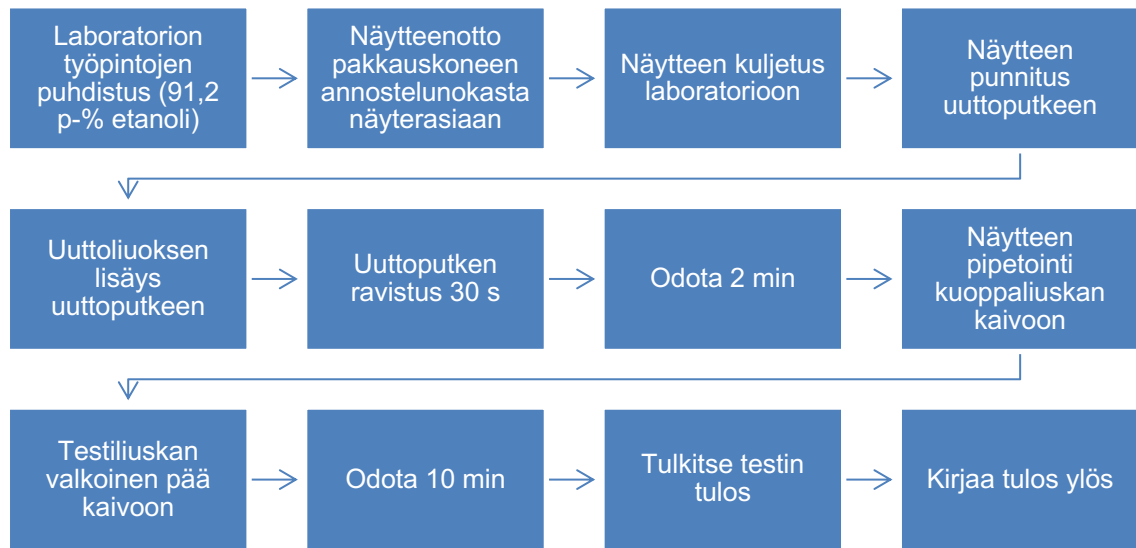
Positiiviset kontrollinäytteet valmistetaan samasta kasvirasvapuolivalmisteen näytteestä, josta tehdään rinnakkaismäärittäykset ja maitopohjaisesta sulatejuustosta. Kontrollinäytteen kaseiinin ja β -laktoglobuliinin yhteispitoisuudeksi

halutaan 3 ppm, jotta sivuvirtaustestillä saataisiin varmemmin positiivinen tulos. Positiiviset kontrollinäytteet lähetetään pääkonttorin laboratorioon tarkempaa analyysia varten, jotta saadaan näytteen tarkka kaseiinipitoisuus.

Positiivinen kontrollinäyte valmistetaan dekanterilasiin, jonka tilavuus on vähintään 250 ml. Näytekomponenteista kasvirasvapuolivalmisteen tulee olla lämmin, jotta sen koostumus on juoksevaa, jotta sulatejuusto on mahdollista sekoittaa siihen. Valmistus aloitetaan sekoittamalla 0,1 g kontaminanttia eli maitopohjaista sulatejuustoa 0,9 g:aan kasvirasvapuolivalmistetta. Tämän jälkeen dekanterilasiin punnitaan kasvirasvapuolivalmistetta erissä, kunnes näytteessä on 243,9 g kasvirasvapuolivalmistetta. Lisäykset ovat suuruudeltaan 9 g, 90 g, 72 g ja 72 g. Positiivisten kontrollinäytteiden valmistuksen punnitustulokset ovat liitteessä 1. Lisäysten välissä seosta sekoitetaan 2 minuuttia käsin lusikalla, homogeenisen seoksen saavuttamiseksi. Viimeisen lisäyksen jälkeen seosta sekoitetaan vielä 4 minuuttia. Tämän jälkeen näyte analysoidaan sivuvirtaustestimenetelmän työohjeiden mukaan. Jokaisen näytesarjan positiivinen kontrollinäyte valmistetaan saman menettelytavan mukaan.

6.3 Sivuvirtaustestien analyysit

Kasvirasvapuolivalmisteiden näytteet otetaan suoraan linjastolta näyterasioihin. Näyterasian kanteen merkitään tuotenumero, näytenumero, näytteenottopäivä ja -kellonaika. Näyterasiat suljetaan kansilla välittömästi näytteenoton jälkeen. Näytteet kuljetetaan toimeksiantajayrityksen laboratorioon analyysia varten. Näytteiden analysointi suoritetaan lähes välittömästi näytteenoton jälkeen, jotta näytteet eivät ehdi jäähtyessään jähmettyä täysin. Näin vältetään näytteiden esikäsitteily, joka olisi aikaa vievää sekä mahdollisesti myös ongelmallista, sillä jäähtyneen kasvirasvapuolivalmisteen liukenevuus uuttopuskuriliuokseen on todettu olevan heikkoa [29]. Kasvirasvapuolivalmisteiden analysointiprosessin työvaiheet on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Kasvirasvapuolivalmisteiden analysointiprosessin työvaiheet.

Näytteiden analysointi suoritettiin pääosin sivuvirtaustestipakkauksen työohjeen mukaan, joka on kuvattu luvussa 5.2.2. Tarkkuuden maksimoimiseksi työohjeista poikettiin käyttämällä automaattipipettiä uuttopuskuriliuoksen mittauksessa. Lisäksi menetelmästä poiketen ensimmäisenä ajopäivänä näytettä ja uuttopuskuriliuosta sisältävää uuttoputkea ravistettiin jokaisen näytteen kohdalla 30 sekuntia, sillä kasvirasvapuolivalmisteet eivät olleet täysin liuenneet uuttopuskuriliuokseen vielä 20 sekunnin ravistuksen jälkeen. Vielä 30 sekunnin ravistuksen jälkeenkin näyteputken pohjaan jäi ohut kalvo kasvirasvapuolivalmistetta, vaikka muuten seos näytti silmämääräisesti homogeeniselta.

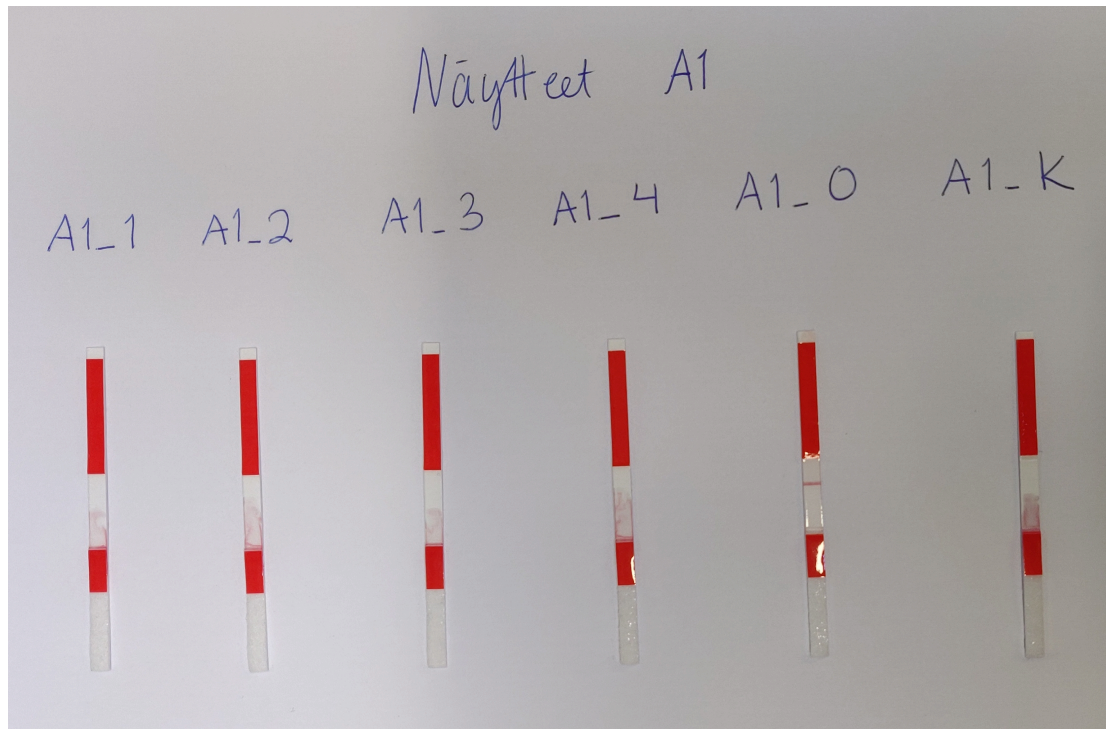
Toisena ajopäivänä testin työohjeista poikettiin pidentämällä uuttoaikaa sekä ravistusaikaa. Näytteen punnituksen ja uuttopuskuriliuoksen mittauksen jälkeen näyteputkea ravistettiin ensin minuutin ajan, jonka jälkeen sen annettiin levätä 4 minuuttia. Tämän jälkeen jatkettiin työohjeen mukaan, eli näyteputkea ravistettiin 20 sekuntia, jonka jälkeen sen annettiin levätä 2 minuuttia. Tällä tavoiteltiin kasvirasvapuolivalmisteen parempaa liukenemistä uuttopuskuriliuokseen, jolloin näyte myös mahdollisesti kulkeutuisi paremmin pitkin testiliuskaa. Näytteiden punnitustulokset löytyvät liitteestä 2.

7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

7.1 Ensimmäisen ajopäivän tulokset

7.1.1 Sivuvirtaustestit

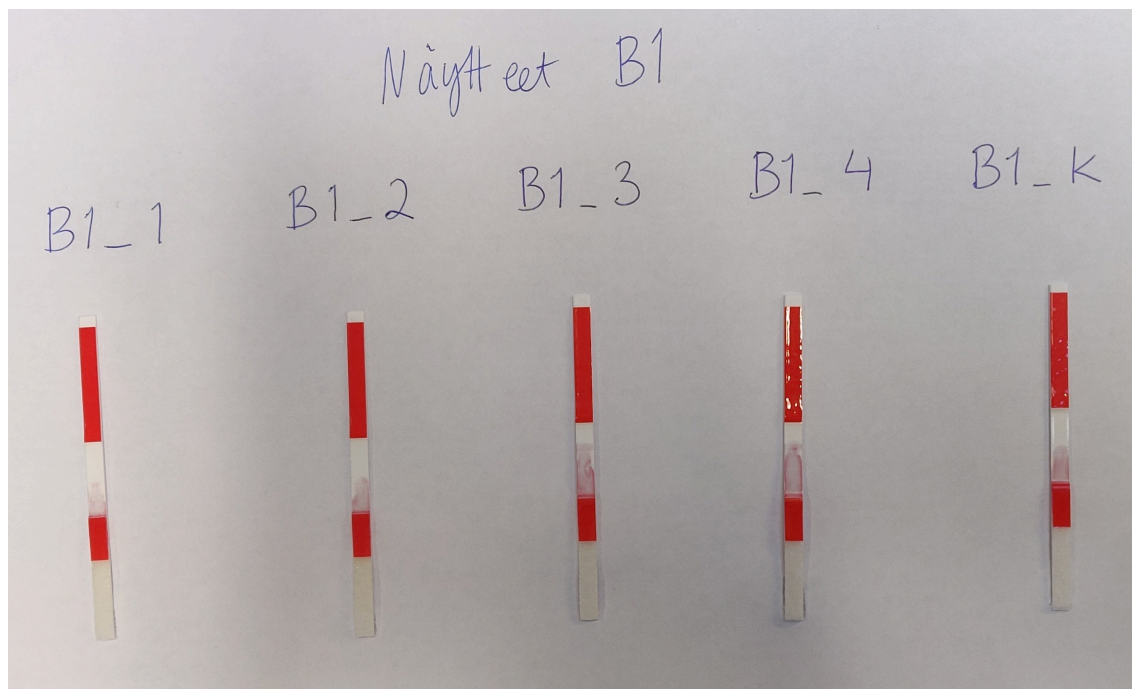
Ensimmäisen ajopäivän kasvirasvapuolivalmisteiden A1 ja B1 rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden määritykset sivuvirtaustestillä epäonnistuivat. Sivuvirtaustestillä ei saatu valideja tuloksia kasvirasvapuolivalmisteiden A1 tai B1 rinnakkaisnäytteillä, sillä testiliuskoihin ei muodostunut testin onnistumisen ilmaisevaa kontrolliviivaa havaintoalueelle. Näytteiden A1 ja B1 rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden määrityksissä supernatantit eivät kulkeutuneet testiliuskan havaintoalueen loppuun asti, vaan nesteen kulkeutuminen pysähtyi kaikissa testeissä jo havaintoalueen puolen välin kohdille, kuten kuvista 4 ja 5 voidaan nähdä. Testin onnistumisen kannalta on erittäin tärkeää, että neste kulkeutuu testiliuskan loppuun asti. Ongelmaa ei voinut aiheuttaa liian vähäinen näytemäärä, sillä näytettä jäi kuoppien kaivoon jokaisessa määrityksessä vielä testin suorittamisen jälkeen. Sivuvirtaustestipakkauksen päiväys oli 30.6.2024.



Kuva 4. Ensimmäisen ajopäivän kasvirasvapuolivalmisteiden A1 rinnakkaismäärittysten ja positiivisen kontrollinäytteen sekä nollanäytteen määrittysten tulokset sivuvirtaustestillä. Nollanäytteen A1_0 testiliuskassa on nähtävissä kontrolliviiva, joka ilmaisee testin onnistumisen ja negatiivisen tuloksen. Rinnakkaismäärittysten ja positiivisen kontrollinäytteen testiliuskoissa ei ole nähtävissä kontrolliviivoja, joten testit ovat epäonnistuneet.

Testien epäonnistuminen on voinut johtua monesta eri syystä. Sivuvirtaustestin käyttöohjeessa mainitaan erikseen, että jos näyte sisältää paljon rasvaa tai se on hyvin viskoosia tai tiheää, supernatantti voi kulkeutua väärin pitkien testiliuskan kalvoa. Tämä voi vaikuttaa testin tulokseen, joko vaimeilla testiviivoilla tai niin ettei testiviivoja muodostu ollenkaan testiliuskan havaintoalueelle. Kasvirasvapuolivalmisteiden rakenne on hyvin viskoosia ja suhteellinen rasvaprosentti on korkea, mikä on voinut aiheuttaa ongelmia testin suorituksessa. Tämän lisäksi kasvirasvapuolivalmisteiden liukenevuus uuttopuskuriliuokseen oli melko huonoa, jolloin näyte on voinut jäädä uuttoliuokseen kolloidiseksi. Kolloidisten liuosten pintajännitys on tyypillisesti suuri, jolloin testiliuskan näytetyynyn sisältämät pintajännitystä alentavat vaikutukset eivät ole olleet tarpeeksi voimakkaita. Tähän ongelmaan yksi ratkaisu voisi olla voimakkaampi sekoitus näytteen uuttovaiheessa. Määrittelyssä sekoitus tehtiin käsin ravistamalla, mutta

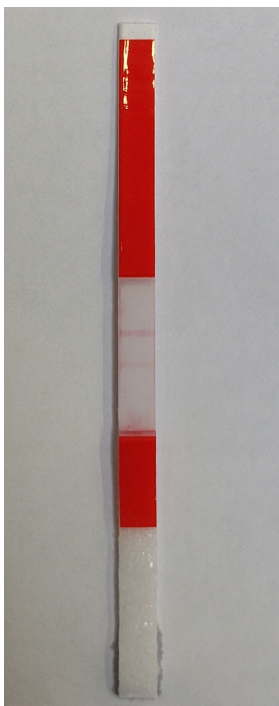
valmistaja suosittelee koeputkiravistelijaa. Toinen ratkaisu voisi olla pidempi uuttoaika, jolloin uuttopuskuriliuoksella olisi pidempi aika erottaa näytteen sisältämä mahdollinen maitoproteiini näytteen muista komponenteista.



Kuva 5. Ensimmäisen ajopäivän kasvirasvapuolivalmisteen B1 rinnakkaismäärittysten ja positiivisen kontrollinäytteen määrittymisen tulokset sivuvirtaustestillä. Määrittymiset epäonnistuivat, sillä testiliuskoissa ei ole nähtävissä kontrolliviivoja.

Kasvirasvapuolivalmisteiden A1 ja B1 rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden määrittysten epäonnistumisten takia testiliuskojen toimivuutta testattiin nollanäytteellä ja varmasti maitoproteiinia sisältävällä näytteellä. Nollanäyte A1_0 analysoitiin samalla tavalla kuin muutkin näytteet, mutta ilman näytettä pelkällä uuttopuskuriliuoksella. Nollanäytteellä menetelmällä saatiin negatiivinen tulos, joka on nähtävissä kuvassa 4. Testi onnistui ja tulos oli negatiivinen, sillä testiliuskassa oli näkyvissä kontrolliviiva. Varmasti maitoproteiinia sisältävä näyte A1_P oli maitopohjainen sulatejuusto, jolla saatiin menetelmällä positiivinen tulos, joka on nähtävissä kuvassa 6. Tulos oli positiivinen, sillä testiliuskassa oli näkyvissä sekä kontrolliviiva että testiviiva. Positiivinen tulos kertoo siitä, että näytteessä on kaseiinia ja β -laktoglobuliinia yhteensä vähintään 2,5 ppm. Negatiivinen tulos kertoo siitä, että kaseiinia ja β -laktoglobuliinia ei ole näytteessä tai

sitä on yhteensä alle 2,5 ppm. Tulokset olivat odotettuja ja niiden perusteella voidaan olettaa testien toimivan, kuten niiden kuuluukin.



Kuva 6. Varmasti maitoproteiinia sisältävän näytteen A1_P tulos sivuvirtaustestillä. Ylempi viiva on kontrolliviiva, joka ilmoittaa testin onnistumisen ja alempi viiva on testiiviiva, joka ilmaisee positiivisen tuloksen, jolloin näytteestä on löytynyt kaseiinia ja β -laktoglobuliinia.

Positiiviset kontrollinäytteet A1_K ja B1_K lähetettiin tutkimuksiin toimeksiantajayrityksen pääkonttorilla sijaitsevaan laboratorioon, missä niistä selvitettiin näytteiden sisältämä tarkka kaseiinipitoisuus ELISA-menetelmällä. Positiivisen kontrollinäytteen A1_K kaseiinipitoisuus oli määrittämisen mukaan 37 mg/kg, joka on 37 ppm. Positiivisen kontrollinäytteen B1_K kaseiinipitoisuus oli 30 mg/kg, joka on 30 ppm. Tavoiteltu kaseiinin ja β -laktoglobuliinin yhteispitoisuus näytteissä oli 3 ppm, jotta se olisi havaittavissa sivuvirtaustestillä, jonka havaintoraja valmistajan mukaan on 2,5 ppm. Positiivisten kontrollinäytteiden A1_K ja B1_K kaseiinipitoisuudet olivat yli kymmenkertaisia tavoiteltuun määrään verrattuna. Tämä on voinut johtua lasku- tai punnitusvirheestä tai sekoituksen riittämättömydestä. Virheen alkuperää on hankala löytää, mutta joka tapauksessa positiivisten kontrollinäytteiden määrittämisen epäonnistumisen takia, ei näytteiden

korkealla kaseiinipitoisuudella ole merkitystä työn kannalta, sillä ei ole tuloksia, joihin ELISA-menetelmällä saatuja tuloksia verrattaisiin.

7.1.2 Pintasivelynäytteet

Ensimmäisen ajopäivän laitteiston pintasivelynäytteiden tulokset ovat taulukossa 4. Pintasivelytestien päiväykset olivat 14.3.23.

Taulukko 4. Ensimmäisen ajopäivän laitteiston pintasivelynäytteiden tulokset eri näytteenottoaikoista pintasivelytestillä.

	Näyte	Näytteenottoaika	Näytetyyppi	Proteiinijäämä
Ajopäivä 1.	F1	Pakkauskoneen annostelunokka	Sively	Positiivinen
	G1	Pakkauskoneen suppilo	Sively	Negatiivinen
	H1	Pitkä massaputki	Sively	Positiivinen
	I1	Keitin	Sively	Negatiivinen
	J1	Keittimen suppilo	Sively	Positiivinen

Pintasivelytestillä saaduista tuloksista näytteet G1 ja I1 olivat negatiivisia, mutta etenkin näytteen G1 väri oli harmaanvihreä, jolloin näytteessä oli mahdollisesti pieniä määriä proteiinijäämiä, mutta valmistajan mukaan tulos luetaan kuitenkin negatiiviseksi. Näytteet F1, H1 ja J1 olivat positiivisia, eli näytteistä löytyi proteiinijäämiä, ja ne olivat väriltään purppuraisia. Näytteet H1 ja F1 olivat vahvoja positiivisia (tumma purppura), eli näytteissä oli proteiinijäämiä. Näyte J1 oli väriltään harmaa, eli näyte sisälsi hyvin pieniä määriä proteiinijäämiä. Positiivinen tulos kertoo siitä, että tutkitulla pinnalla on proteiinijäämiä vähintään 3 µg. Negatiivinen tulos kertoo siitä, että pinnalla ei ole proteiinijäämiä tai niitä on alle 3 µg. Tulosten oikeellisuuteen on voinut vaikuttaa pintasivelytestien vanha päiväys. Testien tulokset eivät tämän takia ole täysin luotettavia, vaan tuloksissa saattaa olla vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia.

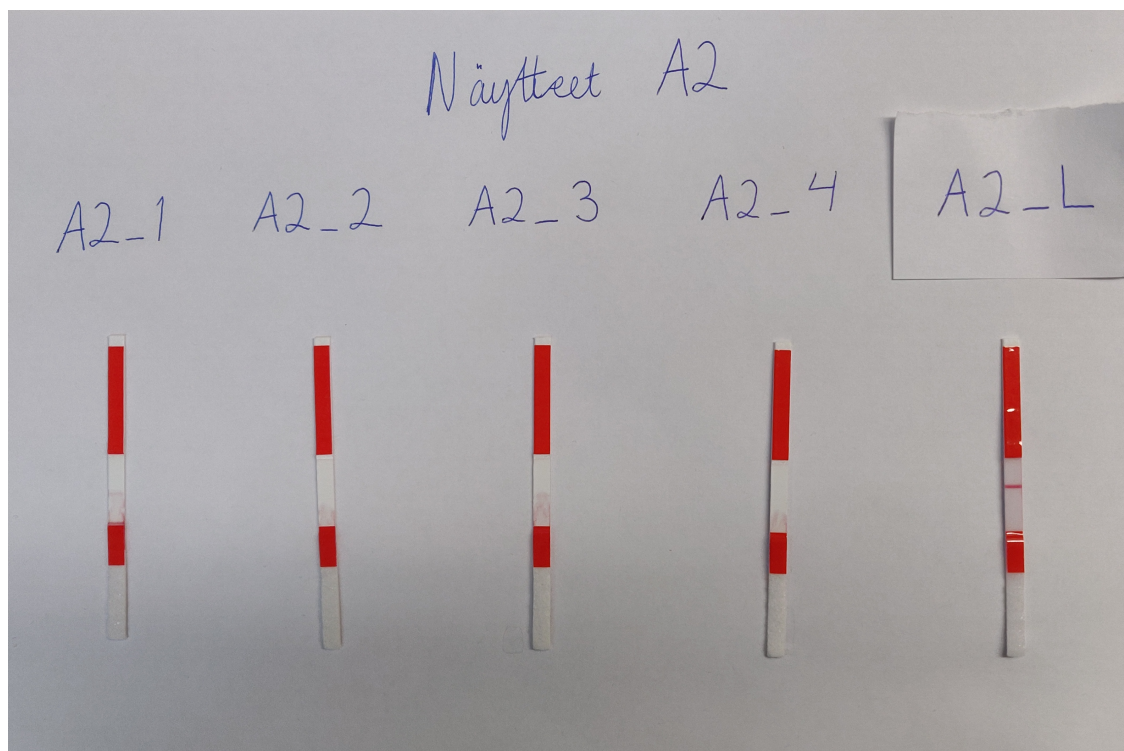
Ajopäivän ensimmäisen kasvirasvapuolivalmisteen A1 kaseiinijäämäpitoisuus ajon aloituksessa otetusta massasta oli yrityksen pääkonttorin laboratorion ELISA-menetelmällä saatujen tulosten mukaan 1 mg/kg.

Kasvirasvapuolivalmisteen A1 valmistuksessa käytettyjen laitteiston osien pinnoilta positiivisia tuloksia saatiin keittimen suppilosta ja pakkauskoneen annostelunokasta, mistä proteiinijäämät ovat voineet päätyä massaan. Kasvirasvapuolivalmisteen A1 ajon lopetuksessa otetusta näytteestä ei löytynyt pääkonttorin laboratorion ELISA-menetelmällä saatujen tulosten perusteella kaseiinijäämiä testin havaintorajan (1 mg/kg) ylittäviä määriä. Tulosten perusteella massan seasta on todettu kaseiinijäämiä vain ajon aloituksessa, mikä kertoo siitä, että kaseiinijäämät ovat luultavasti päätyneet massan sekaan laitteiston tuotekontaktipinnoilta. Tätä teoriaa vahvistaa se, ettei kaseiinijäämiä löytynyt ajon lopetuksessa, jolloin massaa on virrannut laitteiston osien läpi usean tunnin ajan, jolloin massa on niin sanotusti huuhdellut laitteistossa olevat kaseiinijäämät mukaansa.

7.2 Toisen ajopäivän tulokset

7.2.1 Sivuvirtaustestit

Uutto- ja ravistusajan pidentäminen ei auttanut sivuvirtaustestin suorituksessa, sillä menetelmän muutoksista huolimatta testiä ei saatu onnistumaan rinnakkaismäärittäyksissä kasvirasvapuolivalmisteella A2. Supernatantit eivät kulkeutuneet testiliuskan havaintoalueen loppuun asti, eikä havaintoalueelle muodostunut kontrolliviivoja, joten toisen ajopäivän rinnakkaismäärittäykset epäonnistuivat, kuten kuvasta 7 nähdään. Toisen ajopäivän ensimmäisen kasvirasvapuolivalmisteen A2 rinnakkaismäärittäysten ja ensimmäisen ajopäivän määrittäysten epäonnistumisten takia, määrittäykset päätettiin lopettaa. Toisena ajopäivänä ei suoritettu määrittäyksiä kasvirasvapuolivalmisteelle B2, eikä valmistettu positiivisia kontrollinäytteitä A2_K ja B2_K näytteenottosuunnitelman mukaan. Sivuvirtaustestipakkauksen päiväys oli 30.6.2024.



Kuva 7. Toisen ajopäivän kasvirasvapuolivalmisteen A2 rinnakkaismäärittysten ja laimennetun näytteen tulokset sivuvirtaustestillä. Laimennetun näytteen A2_L testiliuskassa on nähtävissä kontrolliviiva, mikä tarkoittaa onnistunutta testiä ja negatiivista tulosta. Rinnakkaismäärittykset epäonnistuivat, sillä testiliuskoissa ei ole nähtävissä kontrolliviivaa.

Toisena ajopäivänä kokeiltiin laimentaa näytettä A2, tavoitteena saada se kulkeutumaan sivuvirtaustestiliuskan havaintoalueen loppuun asti. Näytettä A2 laimennettiin ionivaihdettuun veteen suhteessa 1:10. Näytettä A2 punnittiin kannelliseen purkkiin 1 g, jonka jälkeen purkkiin punnittiin 10 g ionivaihdettua vettä. Purkkia ravistettiin, kunnes seos oli homogeenista, minkä jälkeen näyte analysoitiin sivuvirtaustestillä työohjeen mukaan. Tulos oli negatiivinen, kuten kuvasta 7 voidaan nähdä, sillä testiliuskassa on nähtävissä kontrolliviiva. Laimentamalla alkuperäistä näytettä myös näytteen mahdollinen maidon proteiini jäämämääritys pienenee niin ettei sitä voida havaita enää kyseisellä sivuvirtaustestillä. Siksi tulos ei ole merkittävä, vaikka tämä olikin ainut kasvirasvapuolivalmistetta sisältävä näyte, jolla testi saatiin onnistumaan. Luultavasti alkuperäisen näytteen laimennus vaikutti siihen, etteivät kasvirasvapuolivalmisteen ominaisuudet häirinneet enää sivuvirtaustestin suoritusta.

Vertailtaessa ensimmäisen ja toisen ajopäivän tuloksia toisena ajopäivänä supernatantit kulkeutuivat testiliuskoja pitkin jopa huonommin kuin ensimmäisen ajopäivän testeissä. Kuvissa 4 ja 5 olevissa näytteiden A1 ja B1 rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden testiliuskoissa supernatantit ovat kulkeutuneet pidemmälle testiliuskan havaintoalueella, ja näytteet ovat myös aiheuttaneet tummemman punaisen värireaktion, kuin kuvan 7 näytteen A2 rinnakkaismääri-tyksissä. Kuvassa 7 olevissa näytteen A2 rinnakkaismääri-tyksissä testiliuskoissa supernatantit ovat kulkeutuneet vain lyhyen matkan testin havaintoal-ueella ja punainen väri on haaleampi. Tämä on voinut johtua siitä, että pidempi uutto- ja ravistusaika on liuottanut enemmän kasvirasvapuolivalmistetta uutto-puskuriliuoksen sekaan, mikä taas on häirinnyt entistä enemmän testin suori-tusta.

7.2.2 Pintasivelynäytteet

Toisen ajopäivän laitteiston pintasivelynäytteiden tulokset ovat taulukossa 5. Pintasivelytestien päiväykset olivat 15.8.23.

Taulukko 5. Toisen ajopäivän laitteiston pintasivelynäytteiden tulokset eri näytteenottoaikoista pintasivelytestillä.

	Näyte	Näytteenottoaika	Näyte-tyyppi	Proteiini-jäämä
Ajopäivä 2.	F2	Pakkaus koneen annoste-lunokka	Sively	Negatiivinen
	G2	Pakkaus koneen suppilo	Sively	Negatiivinen
	H2	Pitkä massaputki	Sively	Negatiivinen
	I2	Keitin	Sively	Negatiivinen
	J2	Keittimen suppilo	Sively	Positiivinen

Toisena ajopäivänä käytettiin pintasivelytestejä, joiden päiväys ei ollut vielä um-peutunut. Pintasivelytesteillä saaduista tuloksista J2 oli positiivinen, ja se oli vä-riltään harmaa, jolloin se sisälsi pieniä määriä proteiinijäämiä. Näytteet F2, G2, H2 ja I2 olivat väriltään virheitä, mikä tarkoittaa negatiivista tulosta, eli tutkituilla pinnoilla ei ollut proteiinijäämiä yli 3 µg.

Vertailtaessa ensimmäisen ja toisen ajopäivän aikana otettuja pintasivelynäytteitä ensimmäisenä ajopäivänä saatiin enemmän ja vahvempia positiivisia tuloksia. Tämä on voinut johtua joko siitä, että ensimmäisenä ajopäivänä käytettiin vanhentuneita pintasivelytestejä tai laitteiston eri puhtaustasosta.

Taulukko 6. Laitteiston pintasivelynäytteiden tulokset molempina ajopäivinä eri näytteenottopaikoista pintasivelytestillä.

Näyte	Ajopäivä 1.	Ajopäivä 2.
F	Positiivinen	Negatiivinen
G	Negatiivinen	Negatiivinen
H	Positiivinen	Negatiivinen
I	Negatiivinen	Negatiivinen
J	Positiivinen	Positiivinen

Yhteistä molempina ajopäivinä otetuille näytteille on se, että keittimen suppilosta otetut näytteet J1 ja J2 olivat molemmat positiivisia, kuten taulukosta 6 nähdään. Yhteistä on myös se, että kumpanakin ajopäivänä pakkauskoneen suppilosta ja keittimestä otetut näytteet G1 ja G2 sekä I1 ja I2 olivat negatiivisia. Näytteiden F ja H tulokset vaihtelivat eri ajopäivinä. Näytteenottopaikoista keitin (I) pestään kiertopesuohjelmalla ja kaikki muut näytteenottopaikat pestään manuaalisesti. Negatiiviset tulokset keittimestä molempina ajopäivinä kertovat kiertopesuohjelman tehokkuudesta poistaa proteiinijäämät.

Pintasivelynäytteiden tulosten perusteella pintapesujen tehokkuutta voitaisiin tarkastella, sillä ensimmäisen ja toisen ajopäivän tulosten vaihtelevuus viittaa pintapesujen tason vaihtelevaan laatuun. Tämä kuitenkin vaatisi pidempää tarkastelujaksoa, sillä tulokset ovat vain kahdelta ajopäivältä, ja ensimmäisenä ajopäivänä käytettiin pintasivelytestejä, joiden päiväys oli umpeutunut 16 päivää ennen testien suorittamista. Tulevaisuudessa toimeksiantajayritys voisi järjestää pidemmän aikavälin tarkastelujakson, jossa tutkittaisiin laitteiston pintojen puhtausta pintasivelytestillä. Pidemmän tarkastelujakson tulosten perusteella voitaisiin luotettavammin arvioida tarvetta tehostaa pesuja tai esimerkiksi korostaa huolellisen pesun tärkeyttä laitospesijöille.

Kasvirasvapuolivalmisteen A2 ajon aloituksessa otetusta näytteestä ei löytynyt pääkonttorin laboratorion ELISA-menetelmällä saatujen tulosten perusteella kaseiinijäämiä testin havaintorajan (1 mg/kg) ylittäviä määriä. Tulos on yhteneväinen pintasivelynäytteiden tulosten kanssa, sillä pintasivelynäytteillä saatiin vain yksi heikko positiivinen tulos toisena ajopäivänä. Tulokset edelleen vahvistavat teoriaa siitä, että kaseiinijäämät päätyvät kasvirasvapuolivalmisteen massan sekaan laitteiston tuotekontaktipinnoilta.

8 Yhteenveto

Insinööriyön tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko kaupallinen sivuvirtaustestimenetelmä maidon allergeenien, kaseiinin ja β -laktoglobuliinin jäämien havaitsemiseen kasvirasvapuolivalmisteista. Tavoitteena oli korvata sivuvirtaustestillä kyseiset toimeksiantajayrityksen pääkonttorin laboratoriossa suoritettavat määritykset, jotta menetelmän käyttöönoton myötä määritykset olisi mahdollista suorittaa toimeksiantajan omassa laboratoriossa. Uuden määritysmenetelmän käyttöönoton myötä toimeksiantajayritys saisi oman laboratorion käyttöön nopean, helppokäyttöisen ja edullisen menetelmän maidon proteiinijäämien havaitsemiseen kasvirasvapuolivalmisteista. Tämän lisäksi työssä tutkittiin laitteiston tuotekontaktipintoja pintasivelytestillä.

Työn alussa tehtiin vertailua kahdesta elintarviketeollisuudessa laajasti käytössä olevasta maidon allergeenin jäämien havaitsemiseen soveltuvasta menetelmästä sekä kahdesta kaupallisesta testipakkauksesta, jotka pohjautuvat kyseisiin menetelmiin. Menetelmät olivat sivuvirtaustesti ja sandwich ELISA -testi, joista selvityksen jälkeen soveltuvuuskokeisiin valittiin sivuvirtaustesti. Sivuvirtaustestin soveltuvuutta selvitettiin suorittamalla analyyssejä kasvirasvapuolivalmisteille A ja B kahtena ajopäivänä.

Ensimmäisenä ajopäivänä molemmista kasvirasvapuolivalmisteista tehtiin neljä rinnakkaismääritystä. Tämän lisäksi valmistettiin positiiviset kontrollinäytteet, jotka lähetettiin toimeksiantajayrityksen pääkonttorilla sijaitsevaan laboratorioon tarkempaa kaseiinipitoisuuden määritystä varten. Ensimmäisen ajopäivän

rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden määritykset epäonnistuivat, joten toisena ajopäivänä poikettiin sivuvirtaustestin työohjeista siten, että pidennettiin sekä näytteen uuttoaikaa uuttopuskuriliuoksessa että sekoitusaikaa. Muutoksilla pyrittiin saamaan näytteestä ja uuttopuskuriliuoksesta homogeenisempi seos, jotta se kulkeutuisi paremmin sivuvirtaustestiliuskalla. Menetelmän muutoksista huolimatta sivuvirtaustestiä ei saatu onnistumaan kasvirasvapuolivalmisteella A2.

Sivuvirtaustestin toimivuutta testattiin nollanäytteellä, varmasti maitoproteiinia sisältävällä näytteellä ja laimentamalla kasvirasvapuolivalmistetta ionivaihdettuun veteen, jolloin testi saatiin onnistumaan. Laimennetun näytteen testin onnistuminen oli sinänsä positiivinen asia, mutta laimentamalla näytettä testin havaintoraja kärsii. Pintasivelynäytteiden tulosten perusteella pintapesujen tehokkuutta voitaisiin tarkastella, sillä tulokset osoittivat pintapesujen laadun vaihtelua. Tämä vaatisi kuitenkin pidemmän aikavälin tarkastelujakson, jotta tulosten perusteella voidaan luotettavammin arvioida pintapesujen tehostamistarvetta.

Ensimmäisenä ja toisena ajopäivänä kasvirasvapuolivalmisteille A1, B1 ja A2 suoritettujen sivuvirtaustestien tulosten perusteella sivuvirtaustestimenetelmä ei sovellu kyseisten kasvirasvapuolivalmisteiden maitoperäisen kaseiinin ja β -laktoglobuliinin jäämien havaitsemiseen. Kasvirasvapuolivalmisteet A ja B ovat todennäköisesti rakenteellisilta ominaisuuksiltaan liian viskooseja ja rasvaisia, jotta niitä on mahdollista analysoida kyseisellä sivuvirtaustestillä. Tulevaisuudessa toimeksiantajayritys voisi selvittää, löytyisikö markkinoilta sivuvirtaustestiä, joka soveltuisi paremmin viskoosien ja rasvaisten elintarvikkeiden maitoproteiinijäämien analysointiin. Vaihtoehtoisesti toimeksiantajayritys voisi selvittää, olisiko ELISA-menetelmä mahdollista ottaa käyttöön omassa laboratoriossa.

Koska kasvirasvapuolivalmisteiden analysointi osoittautui ongelmalliseksi tämän opinnäytetyön yhteydessä, toimeksiantajayrityksessä voitaisiin jatkossa keskittää kasvirasvapuolivalmisteiden allergeenien hallinta pintasivelynäytteisiin ja pesujen loppuhuuheteisiin. Pintasivelynäytteiden järjestelmällinen ottaminen strategisista paikoista olisi toimeksiantajayritykselle suhteellisen helppo aloittaa, sillä

kyseiset testit toimivat ja niitä on aiemminkin käytetty yrityksen tiloissa. Sivuvirtaustestiä toimeksiantajayritys voisi yrittää hyödyntää pesujen loppuhuuhteiden analysoinnissa, sillä sivuvirtaustesti havaitsi kaseiinin- ja β -laktoglobuliinin jäämät oikein näytteistä, jotka eivät sisältäneet kasvirasvapuolivalmistetta.

Lähteet

- 1 Elintarviketieto-opas elintarvikevalvojille ja elintarvikealan toimijoille. 2019. Ruokaviraston ohje 17068/2.
- 2 Mäkelä, Mika; Kivistö, Juho & Kukkonen, Anna Kaarina. 2021. Laukaisevat allergeenit ja anafylaksia. Verkkoaineisto. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 137(11):1137-44. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo16257>> Luettu 12.2.2023.
- 3 Wanhalinna, Viivi. 2021. Allergeenien hallinta elintarviketuotannossa. Verkkoaineisto. Kehittyvä elintarvike. <<https://kehittyvaelintarvike.fi/artikkelit/teemajutut/hygienia-laadunhallinta-tuoteturvallisuus/allergeenien-hallinta-elintarviketuotannossa/>>. Luettu 13.2.2023.
- 4 Creative diagnostics 2009 – 2020b. Immunochromatography Guide. Verkkoaineisto. <<https://www.creative-diagnostics.com/Immunochromatography-guide.htm>>. Luettu 9.2.2023.
- 5 Hygiena AlerTox Sticks Total Milk. Käyttöohje. Verkkoaineisto. <<https://cdn.brandfolder.io/VZSMQ4LE/at/cb9xp4rnnhpt6jc5tm54j9rt/AlerTox-Sticks-Total-Milk-English.pdf>>. Luettu 9.3.2023.
- 6 Bylund, G. 2003. Dairy processing handbook. (2nd rev. ed.). Tetra Pak Processing Systems.
- 7 Maidon proteiinit. Verkkoaineisto. Maitotieto. <<https://www.maitotieto.fi/tietoa-maidosta/maidon-proteiinit.html>>. Luettu 12.2.23.
- 8 Kautiainen, Hanna. 2022. Proteiinien laaduissa on eroja. Verkkoaineisto. Valio Oy. <<https://www.valio.fi/hyvinvointi/proteiinien-laaduissa-on-eroja/>>. Luettu 12.2.2023.
- 9 Maidon proteiinissa on hyvä koostumus. Verkkoaineisto. Maitotieto. <<https://www.maitotieto.fi/tietoa-maidosta/maidon-proteiinit/maidon-proteini-koostumus>>. Luettu 12.2.2023.
- 10 Kuinka hera muuttui hylkiöstä halutuksi? 2021. Verkkoaineisto. Valio Oy. <<https://www.valio.fi/ruoka/kuinka-hera-muuttui-hylkiosta-halutuksi/>>. Luettu 18.2.2023.
- 11 Lajnaf, Roua; Feki, Sawsan; Attia, Hamadi; Ayadi, Mohamed Ali & Mas-moudi, Hatem. 2022. Chapter 5: Characteristics of Cow Milk Proteins and the Effect of Processing on Their Allergenicity. Teoksessa: Narongsak

- Chaiyabutr. Milk Protein – New Research Approaches. IntechOpen. London, United Kingdom.
- 12 Hallén, Elin. 2008. Coagulation Properties of Milk. Doctoral Thesis. Verkkoaineisto. Swedish University of Agricultural Sciences. <https://pub.epsilon.slu.se/1879/1/EH_kappa_EH.pdf>. Luettu 16.3.23.
 - 13 Caira, Simonetta; Pizzano, Rosa; Picariello, Gianluca; Pinto, Gabriella; Cuollo, Marina; Chianese, Lina & Addeo, Francesco. 2012. Allergenicity of Milk Proteins. Teoksessa: Hurley, Walter L. Milk Protein. IntechOpen. London, United Kingdom.
 - 14 Monaci, M.; Tregoat, V.; van Hengel, A.J. & Anklam, E. 2006. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. European Food Research Technology 223, s. 149–179.
 - 15 Maidon kemiaa. Verkkoaineisto. Milkworks. <<https://milkworks.fi/maidon-kemiaa/#heraproteiini>>. Luettu 16.3.2023.
 - 16 Lönnrot, Maria. 2021. Allergiat. Lääkärikirja Duodecim. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00561>>. Luettu 19.2.2023.
 - 17 Lehmänmaitoallergia. Verkkoaineisto. Maitotieto. <<https://www.maitotieto.fi/tietoa-maidosta/maidon-proteiinit/lehmanmaitoallergia>>. Luettu 19.2.2023.
 - 18 Hygiena AlerTox Sticks Casein. Käyttöohje. Verkkoaineisto. <<https://cdn.brandforder.io/VZSMQ4LE/at/24ss2hq3mgzt8794hztvn377/AlerTox-Sticks-Casein-Manual.pdf>>. Luettu 24.1.2023.
 - 19 Tuppo, L.; Giangrieco, I.; Tamburrini, M.; Alessandri, C.; Mari, A. & Ciardello, M. A. 2022. Detection of Allergenic Proteins in Foodstuffs: Advantages of the Innovative Multiplex Allergen Microarray-Based Immunoassay Compared to Conventional Methods. Foods. 11(6), 878.
 - 20 Lelieveld, Huub; Andersen, Veslemøy & Motarjemi, Yasmine. 2023. Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry. E-kirja. Yhdysvallat: Elsevier Science.
 - 21 Allergeenit korostetusti esiin. 2021. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/pakkausmerkinnat/allergeenit/>>. Luettu 19.2.2023.

- 22 Elintarvikehuoneiston omavalvonta. 2018. Verkkoaineisto. Evira. <<https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-yhteiset-vaatimukset/omavalvonta/omavalvontaohje-toimijoille-2018.pdf>>. Luettu 5.3.2023.
- 23 Jackson, L. S.; Al-Taher, F. M.; Moorman, M.; DeVries, J. W.; Tippet, R.; Swanson, K. M.; Fu, T. J.; Salter, R.; Dunaif, G.; Estes, S.; Albillos, S. & Gendel, S. M. 2008. Cleaning and other control and validation strategies to prevent allergen cross-contact in food-processing operations. *Journal of food protection*, 71(2), s. 445–458.
- 24 Koczula, M; Katarzyna & Gallotta, Andrea. 2016. Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*, 60(1), s. 111–120.
- 25 Alhaji, Mandy & Farhana, Aisha. 2023. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- 26 ELISA. Verkkoaineisto. LI-COR Biosciences. <<https://www.lifecor.com/bio/applications/elisa>>. Luettu 4.3.2023.
- 27 Overview of ELISA. Verkkoaineisto. ThermoFisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>>. Luettu 4.3.2023.
- 28 Hygiena AlerTox ELISA Allergen. Käyttöopas. Verkkoaineisto. <<https://cdn.brandfolder.io/VZSMQ4LE/at/sqfnf3cv4xtmv33v8psrg44j/ins-alertox-elisa-allergen-manual-rev-d-en.pdf>>. Luettu 15.2.2023.
- 29 Malkki, Jenni. 2023. Elintarviketurvallisuusvastaava, Toimeksiantajayritys, Vantaa. Teams-keskustelu. 9.3.2023.
- 30 AllerSnap Rapid Protein Residue Test. Käyttöohje. Verkkoaineisto. <<https://cdn.brandfolder.io/VZSMQ4LE/at/ng8mc9m4xzsh44mkc82k5qgw/Instructions-AllerSnap-Rapid-Protein-Residue-Test.pdf>>. Luettu 24.1.2023.
- 31 Elintarvikemikrobiologian validointi ja verifiointi – käytössä olevat menettelyt. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriot/ajankohtaista-vertailulaboratoriotoinnasta/aikaisemmat-tiedotteet/elintarvikemikrobiologian-validointi-ja-verifiointi--kaytossa-olevat-menettelyt/>>. Luettu 7.3.23.

Positiivisten kontrollinäytteiden A1_K ja B1_K punnitustulokset

Taulukko 1. Positiivisen kontrollinäytteen A1_K valmistuksen punnitustulokset. Positiivinen kontrollinäyte valmistettiin kasvirasvapuolivalmisteeseen A1 massasta ja maitopohjaisesta sulatejuustosta.

Näyte	Kasvirasvapuolivalmiste A	Kontaminantti
A1_K	0,9011	0,1033
	9,0014	
	90,0552	
	72,03	
	72,02	

Taulukko 2. Positiivisen kontrollinäytteen B1_K valmistuksen punnitustulokset. Positiivinen kontrollinäyte valmistettiin kasvirasvapuolivalmisteeseen B1 massasta ja maitopohjaisesta sulatejuustosta.

Näyte	Kasvirasvapuolivalmiste B	Kontaminantti
B1_K	0,9087	0,1068
	8,9537	
	90,2199	
	72,01	
	72,06	

Näytteiden A1, A2 ja B1 rinnakkais- ja positiivisten kontrollinäytteiden määritysten punnitustulokset

Taulukko 1. Näytteiden A1, B1 ja A2 punnitustulokset.

Näyte	Rinnakkais- ja kontrollimääritykset	Punnitustulos
A1	A1_1	0,5046
	A1_2	0,5107
	A1_3	0,507
	A1_4	0,5126
	A1_K	0,5015
	A1_P	0,5128
B1	B1_1	0,5165
	B1_2	0,509
	B1_3	0,5086
	B1_4	0,5128
	B1_K	0,511
A2	A2_1	0,502
	A2_2	0,5102
	A2_3	0,505
	A2_4	0,5121