
**FYTAASIAKTIIVISUUSMENETELMIEN
KEHITYS JA VALIDOINTI**



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Hämeenlinna, 30.10.2015

Jenni Mäenpää

Jenni Mäenpää



Hämeenlinna
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Elintarviketekniikka

Tekijä	Jenni Mäenpää	Vuosi 2015
Työn nimi	Fytaaasiaktiivisuusmenetelmien kehitys ja validointi	

TIIVISTELMÄ

Entsyymit toimivat arvokkaina työkaluina rehuteollisuudessa, kun optimoidaan tuotantoeläinten ravintoaineiden saantia. Entsyymit lisäävät rehu-raaka-aineiden ravintoarvoa ja vähentävät ympäristökuormitusta. Rehuteollisuudessa yleisimmin käytetty entsyymi on fytaasi.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Roal Oyn laadunvalvontalaboratoriossa keväällä 2015. Tutkimuksen tavoitteena oli saada tietoa substraattivaihdoksen aiheuttamista muutoksista FTU-menetelmässä ja varmistaa menetelmän toimivuus sekä luotettavuus. Validoinnin myötä menetelmästä tutkittiin lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus. PPU-menetelmän osalta tarkistettiin substraattivaihdoksen takia menetelmän antama entsyymiaktiivisuuden tulostasoa. Tutkimus oli osa Roalin ja yhteistyölaboratorioiden entsyymiaktiivisuutta mittaavien menetelmien harmonisointia.

FTU-menetelmä todettiin lineaariseksi ja tarkaksi. Tulosten perusteella menetelmän toistettavuus ja uusittavuus ovat hyvällä tasolla. Tuloksia verrattiin aikaisempaan validointiin ja havaittiin, että menetelmä toimii edelleen tarkoituksenmukaisesti. Validoinnin tulokset huomioitiin Roalin laadunvalvontalaboratoriossa. Uuden substraatin myötä menetelmän entsyymiaktiivisuustason havaittiin laskevan noin viisi prosenttia ja tämän myötä tehtiin uudistuksia tuotehallinnointiin. PPU-menetelmässä substraattivaihdos ei vaikuttanut entsyymiaktiivisuuden tulostasoon. FTU-menetelmässä tutkittiin substraatin vaikutusta kalibrointisuorassa. Tulosten perusteella näytteiden entsyymiaktiivisuustasossa ei havaittu muutosta. Harmonisoinnin myötä kaikki Roalin yhteistyölaboratoriot ottivat kalibrointisuorassa käyttöön substraatin. Roalin laadunvalvontalaboratorio otti substraatin käytön kalibrointisuorassa käyttöön kesäkuussa 2015.

Avainsanat rehuentsyymi, entsyymiaktiivisuus, fytaasi, validointi

Sivut 39 s. + liitteet 4 s.

Hämeenlinna
Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering
Food Engineering

Author	Jenni Mäenpää	Year 2015
Subject of Bachelor's thesis	In-house method development and validation for phytase activity	

ABSTRACT

Enzymes work as valuable tools in animal feed industry when optimizing the intake of nutrients of farm animals. Enzymes increase the nutritional value of the feed raw materials and reduce the environmental burden. The most used enzyme in animal feed industry is phytase.

This Bachelor's thesis was completed at the Roal Ltd. quality control laboratory in spring 2015. The aim of the thesis was to obtain information on the changes caused by the substrate change in FTU method and ensure the viability and reliability of the method. The validation examined linearity, accuracy, repeatability, reproducibility and measurement uncertainty of method. The result level of the enzyme activity was examined in PPU-method because of changing the substrate. This thesis was a part of the project of harmonizing enzyme activity measuring methods in Roal and its cooperation laboratories.

FTU method was found to be linear and accurate. Based on the results the repeatability and reproducibility of the method are at a good level. The results were compared to the previous validation and it was found out that the method still works as intended. The results of validation were taken into account in Roal quality control laboratory.

After the usage of the new substrate the enzyme activity level of the method was found to decrease about five percent and as a result of this follow-up actions were necessary in the product management. In the PPU method the substrate change had no effect on the enzyme activity level. In the FTU method the effect of the substrate in the standard straight was studied. According to the results no change in the enzyme activity level of the samples took place. After the harmonization all Roal's cooperation laboratories introduced the substrate into their standard straight. Roal quality control laboratory introduced it in June 2015.

Keywords animal nutrition enzyme, enzyme activity, phytase, validation

Pages 39 p. + appendices 4 p.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	ENTSYYMIT	2
2.1	Teolliset entsyymit	3
2.2	Fytaasi	3
3	MENETELMÄN VALIDOINTI.....	5
3.1	Validoinnissa määritettävät parametrit.....	5
3.1.1	Selektiivisyys ja spesifisyys	6
3.1.2	Lineaarisuus ja mittausalue	6
3.1.3	Havaitsemis- ja määrittäysraja	7
3.1.4	Tarkkuus ja oikeellisuus	8
3.1.5	Toistettavuus.....	9
3.1.6	Uusittavuus	9
3.1.7	Mittausepävarmuus.....	10
3.1.8	Häiriönkestävyys	11
3.2	Tilastolliset testit	12
3.2.1	T-testi.....	12
3.2.2	F-testi	13
3.2.3	Anova	13
4	KOKEELLINEN OSIO.....	14
4.1	Fytaasiaktiivisuuden mittaus FTU-menetelmällä.....	14
4.1.1	Harmonisointi	14
4.1.2	Ring-testi	15
4.1.3	Uuden substraatin vaikutus mittausepävarmuuteen	15
4.1.4	Uuden substraatin vaikutus analytiikkaan	16
4.2	Fytaasiaktiivisuuden mittaus PPU-menetelmällä.....	16
4.3	Materiaalit ja menetelmät.....	16
4.3.1	Entsyymiaktiivisuuden mittaukset.....	17
4.3.2	Näytteiden esikäsittely.....	17
4.3.3	Fytaasiaktiivisuuden mittaus FTU-menetelmällä.....	18
4.3.4	Fytaasiaktiivisuuden mittaus PPU-menetelmällä.....	20
5	TULOKSET	23
5.1	Fytaasiaktiivisuuden määrittäminen FTU-menetelmällä.....	23
5.1.1	Lineaarisuus ja alue	23
5.1.2	Havaitsemis- ja määrittäysraja	26
5.1.3	Tarkkuus	26
5.1.4	Toistettavuus.....	27
5.1.5	Uusittavuus	28
5.1.6	Mittausepävarmuus.....	30
5.1.7	Häiriönkestävyys	30
5.1.8	Substraattitestaus	31
5.1.9	Suoran testaus	32
5.2	Fytaasiaktiivisuuden määrittäminen PPU-menetelmällä.....	34

5.2.1	Substraattitestaus	34
5.2.2	PPU/FTU-kerroin	35
6	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	36
	LÄHTEET	38

Liite 1	T-TESTIN TULOKSET
Liite 2	ANOVAN TULOKSET

LYHENTEET

ANOVA	Analysis of Variance, Varianssianalyysi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
FTU	Fytaasiaktiivisuusyksikkö
<i>g</i>	Putoamiskiihtyvyys. $1 g = 9,81 \text{ m/s}^2$
Myselli	Fermentorista otettu solumassanäyte
PPU	Fytaasiaktiivisuusyksikkö
Ring-testi	Laboratorioiden välinen vertailutesti
RO	Reverse Osmosis, Käänteisosmoosi
TCA	Trikloorietikkahappo

1 JOHDANTO

Rehuteollisuudessa entsyymit toimivat arvokkaina työkaluina optimoitaessa tuotantoeläinten ravintoaineiden saantia. Entsyymit lisäävät rehuraaka-aineiden ravintoarvoa ja vähentävät ympäristökuormitusta. Rehuteollisuudessa yleisimmin käytetty entsyymi on fytaasi. (Eerola 2015, 83.) Fytaasin käyttö rehuissa vapauttaa orgaanisesti sidottua fosforia kasviperäisissä rehuissa ja edistää siten rehun hyötysuhdetta eläinten ravitsemuksessa. Fytaasi myös korvaa lisäfosforin tarpeen ja samalla ympäristöön lannan mukana tuleva fosforikuorma vähenee merkittävästi. (Koivunen, 2013.) Entsyymien määrän mittana käytetään sen aktiivisuutta. Entsyymien aktiivisuus kertoo sen katalysoimien reaktiotapahtumien määrän aikayksikössä. (Aittomäki, Eerikäinen, Leisola, Ojamo, Suominen & von Weymarn 2002, 53.) Teollisuusentsyymien yleinen hinnoitteluperuste on entsyymien aktiivisuus.

Entsyymiaktiivisuutta mitataan laboratoriossa. Kemiallisen mittaustutkimuksen validointi on tärkeä kemiallisen analyysin antamien tulosten luotettavuuden kannalta. Validointi on tarpeellista tehdä esimerkiksi silloin, kun käytössä olevaa menetelmää uudistetaan tai validoitua menetelmää käytetään toisessa laboratoriossa. (Ehder 2005, 25–26.) Tutkimuksen tarkoituksena oli validoida FTU-menetelmä substraattivaihdon vuoksi. Validoinnin myötä menetelmästä tutkittiin lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus.

Tutkimuksen tavoitteena oli saada tietoa substraattivaihdon aiheuttamista muutoksista FTU-menetelmässä ja varmistaa menetelmän toimivuus sekä luotettavuus. PPU-menetelmän osalta tarkistettiin substraattivaihdon takia menetelmän antama entsyymiaktiivisuuden tulosarvo. Tutkimus oli osa Roalin ja yhteistyölaboratorioiden entsyymiaktiivisuutta mittaavien menetelmien harmonisointia. Tutkimus tehtiin Roal Oyn laadunvalvontalaboratoriossa keväällä 2015.

2 ENTSYYMIT

Proteiinit ovat suuria bio- tai makromolekyylejä, jotka koostuvat yhdestä tai useammasta pitkästä aminohappoketjusta. Proteiinit hoitavat soluille tärkeitä tehtäviä ja toimivat aineiden kuljettajina, viestin vastaanottajina ja rakennusaineina. Entsyymiproteiinit edesauttavat kemiallisia reaktioita ja vasta-aineproteiinit osallistuvat taudinaiheuttajien torjuntaan. Solun tuomassa oleva perintöaine eli DNA ohjaa proteiinien valmistusta. (Opetushallitus, n.d.)

Proteiinien tehtävät voidaan jakaa kolmeen ryhmään tehtäviensä mukaan: rakenneproteiinit, viestiproteiinit ja entsyymit. Entsyymit katalysoivat solun aineenvaihduntareaktioita ja ovat hyvin tehokkaita kemiallisten reaktioiden katalyytteinä. Ne voivat nopeuttaa reaktioita jopa 10^{17} -kertaisesti. Ilman entsyymejä reaktiot olisivat niin hitaita, että elävien solujen toiminta ei olisi mahdollista. Entsyymikatalyysissä entsyymit nopeuttavat kemiallisia reaktioita, mutta eivät muuta reaktion tasapainoa. Esimerkiksi laktaasientsyymillä laktoosi saadaan pilkottua glukoosiksi ja galaktoosiksi.

Laktoosi + H₂O ↔ glukoosi + galaktoosi (Aittomäki ym. 2002, 50–52.)

Entsyymien toimintaa reaktion katalyyttinä kutsutaan entsyymiaktiivisuudeksi. Reaktio tapahtuu aina tiettyssä kohtaa entsyymiä. Kohtaa kutsutaan entsyymien aktiiviseksi keskuksiksi. Entsyymien substraatti on reaktion lähtöaine ja sitoutuu aktiiviseen keskukseseen. Reaktion tapahduttua lopputuote irtaantuu entsyymistä. Entsyymien katalysoimiin reaktioihin osallistuu usein enemmän kuin yksi substraatti. Entsyymit ovat hyvin spesifisiä ja hyväksyvät substraatikseen vain tiettyjä molekyylejä. Spesifisyyden vuoksi entsyymien katalysoimat reaktiotuotteet ovat tarkkaan ennalta määrättyjä. Ominaisuutta voidaan hyvin hyödyntää monissa bioteknisissä prosesseissa. Tulevaisuudessa toivotaan pystyttävän valmistamaan tiettyyn tarkoitukseen sopivia entsyymejä, vaikka luontaisia entsyymejä tähän tarkoitukseen ei löytyisi lainkaan. Esimerkiksi muovipolymeerien hajotukseen sopivia entsyymejä. (Aittomäki ym. 2002, 52–53.)

Aktiivisuuden määrittäminen tapahtuu määrittämällä kuluneen substraatin tai muodostuneen lopputuotteen määrä aikayksikössä. Kvantitatiivisissa määrittämissä menetelmissä liuoksessa, elektrodissa tai paperiliuskalla oleva entsyymi reagoi substraatin kanssa. Määrittämissä menetelmissä reaktiot ovat spesifisiä ja ennalta tunnettuja. (Aittomäki ym. 2002, 106.)

Entsyymien aktiivisuutta käytetään usein yhtenä teollisuusentsyymien hinnoitteluperusteista. Teollisuusentsyymeitä käytetään esimerkiksi mehuja juomateollisuudessa. Tärkeimpiä sovelluksia on hedelmien ja kasvien uuton tehostaminen pektinaaseilla. Pektinaasit rikkovat kuoriosien solujen pektiinejä, jolloin isompi osa raaka-aineesta saadaan hyödynnettyä ja niiden käytöllä saadaan aikaan myös kirkkautta tai sopivaa sameutta. (Eerola 2015, 83.)

2.1 Teolliset entsyymit

Teollisia entsyymeitä valmistetaan esimerkiksi tekstiili-, tärkkelys-, meijeri-, elintarvike- ja rehuteollisuuteen. Kaupallisia entsyymejä on mikrobien ohella eristetty myös kasveista sekä eläinmateriaaleista. (Aittomäki ym. 2002, 113.) Esimerkiksi juuston juoksutuksessa käytettävää renniiniä on perinteisesti eristetty vasikoiden mahasta. Nykyään kymosiiniksi kutsuttua entsyymiä tuotetaan mikrobikasvatuksella. (Aittomäki ym. 2002, 90.) Entsyymien tuottajina käytetään esimerkiksi *Aspergillus*- ja *Trichoderma*-suvun homeita, *Bacillus*-suvun bakteereita sekä *Saccharomyces Cerevisiae* -hiivaa (Aittomäki ym. 2002, 113).

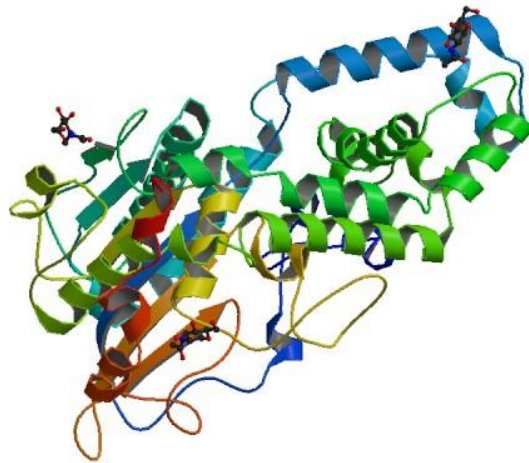
Käyttötarkoitukseen sopivan entsyymin identifioiminen on tärkeä vaihe ennen entsyymin valmistamista. Entsyymien käyttöominaisuudet vaikuttavat valmistuskustannuksiin. Tärkeitä ominaisuuksia ovat optimaaliset pH- ja lämpötila-alueet, jotka entsyymi tarvitsee toimiakseen, sekä entsyymin kasvualustan spesifisyys, jotta voidaan välttyä muilta reaktioilta. Kasvu- alustana pyritään käyttämään halpoja raaka-aineita, jotta entsyymin hinta pysyy kohtuullisena. (Beniwal & Sharma 2014, 18.)

Teollisesti entsyymejä tuotetaan mikrobisoluilla suurissa bioreaktoreissa ja hallituissa tehdasympäristöissä. Kustannustehokas tuotanto perustuu tuototosojen nostamiseen satunnaisella mutageneesillä, geenitekniikalla ja proteiinien hienosäädöllä. Tuotantoprosessiin kuuluu entsyymien tuoton lisäksi puhdistus-, konsentroidi- ja formulointivaiheet. Näiden kaikkien optimointia ja seuranta tehdään vastaamaan entsyymituotteiden standardisointia ja asiakasvaatimuksia. Entsyymituotteiden markkinoille asettaminen edellyttää monivaiheisia rekisteröintitoimenpiteitä ja viranomaisten hyväksyntää. (Eerola 2015, 83.)

Rehuteollisuus on käyttänyt jo 1970-luvulta lähtien rehujen polymeerisiä komponentteja ja hajottavia entsyymejä rehujen lisäaineina. Tällaisia entsyymejä ovat ksylanaasit, glukanaasit ja proteaasit. Myöhemmin on kehitetty myös fytaasi-entsyymejä, joiden avulla voidaan vähentää karjankasvatuksen fosforipäästöjä. (Aittomäki ym. 2002, 115.) Suurin syy siirtyä perinteisistä kemiallisista ratkaisuista entsyymitekнологiaan liittyy kustannustehokkuuteen ja ympäristöystävällisyyteen. Entsyymien käyttö mahdollistavat kestävä kehitys: ne laskevat prosessien lämpötiloja, säästävät energiaa sekä vähentävät jätekuormaa. (Eerola 2015, 83.)

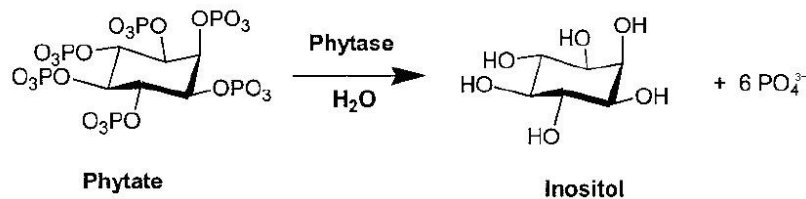
2.2 Fytaasi

Fytaasi (myo-inositoliheksakisfosfaatti-fosfohydraasi) katalysoi fosfaatin vapautumista fytaatista (myo-inositoliheksakisfosfaatti). Fytaatti on tärkein fosforin muoto ja sitä on pääasiassa viljanjyvissä sekä palko- ja öljyaskeissa. (Pandley, Webb, Soccol & Larroche 2006, 359.) Fytaasin 3D-rakenne on havainnollistettu kuvassa 1 (s. 4).



Kuva 1. Fytaasin 3D-rakenne (Oakley, 2010.)

Fytiinihappo on pääasiallinen orgaanisen fosforin komponentti maaperässä ja se esiintyy kalium- ja magnesiumsuoloina eli fytaattina. Fytaattiin on sitoutuneena suurin osa kasvien fosforista ja se edustaa 50–80 % kokonaisfosforista. (Pandley ym. 2006, 360.) Eläimet eivät pysty hyväksikäyttämään tehokkaasti fytaattiin sitoutunutta fosforia. Eläinten ruoansulatelimistössä ei ole tarpeeksi fytaasi-entsyymiä, joka katalysoi orgaanisten molekyylien sisältämien fosforihappoesteriryhmien hydrolyysiä. Kuvassa 2 on havainnollistettu fytaasin toimintaa. Fytiinifosforin käyttökelpoisuus vaihtelee esimerkiksi siipikarjalla 0–50 %:iin.



Kuva 2. Fytaasin toiminta periaate (Challenge Group, 2004.)

Eläimelle käytettävissä olevan fosforin määrää rehussa voidaan parantaa lisäämällä rehuun joko epäorgaanista fosforia tai fytaasi-entsyymiä. Lisäämällä rehuun fytaasia saadaan fytiinihappoon sitoutuneesta fosforista mahdollisimman paljon eläimen käyttöön ja fosforin kokonaissulavuus paranee. Ulosteen kautta ympäristöön kulkeutuvan fosforin määrä pienenee ja rehun hinta pysyy samana tai jopa hieman alenee. (Koivunen, 2013.) Fytaasin vaikutus fosforin sulavuuteen riippuu pH:sta, fytaasin käyttömäärästä, fosforin konsentraatiosta, lämpökäsittelystä, rehun raaka-aineiden esikäsittelystä ja muiden metalli-ionien läsnäolosta ravinnossa. (Pandley ym. 2006, 360.)

Fytaasientsyymit voidaan jakaa toimintamekanisminsa mukaan kahteen ryhmään, 3-fytaaseiksi ja 6-fytaaseiksi. 3-fytaasit (myo-inositolihexakisfosfaatti-3-fosfohydraasit) hydrolysoivat ensiksi fosfaatti-ryhmän ja 6-fytaasit (myo-inositolihexakisfosfaatti-6-fosfohydraasit) hajottavat ensimmäiseksi esteri-ryhmän. (Koivunen, 2013.) 3-fytaasit on tuotettu mikrobeilla, kun taas 6-fytaasit ovat eristetty kasveista (Pandley ym. 2006, 360). Fytaasiyksikkö (FTU) kertoo fytaasin aktiivisuudesta. Fytaasiyksikkö kuvaa sitä entsyymin määrää, joka tarvitaan vapauttamaan yhden mikromoolin epäorgaanista fosforia minuutissa 5,1 millimolaarisesta natriumfytaatista pH:ssa 5,5 ja 37 °C:n lämpötilassa. (Koivunen, 2013.)

3 MENETELMÄN VALIDOINTI

Ehderin (2005) mukaan kemiallisen mittausmenetelmän validointi on tärkeä kemiallisen analyysin antamien tulosten luotettavuuden kannalta. Mittausmenetelmästä arvioidaan epävarmuuden lisäksi muita osa-alueita varmistamaan, että se on tieteellisesti pätevä olosuhteissa, jossa sitä käytetään. Kemiallisen mittausmenetelmän validointi on menettely, jolla osoitetaan analyttisen menetelmän sopivuus aiottuun käyttötarkoitukseen.

Validoinnissa on olennaista, että siinä arvioidaan mittausmenetelmän suorituskykyä ja soveltuvuutta tiettyyn tarkoitukseen. Validoinnissa tulee huomioida esimerkiksi farmaseuttisissa tai elintarvikkeisiin liittyvissä määrityksissä viranomaisvaatimukset. Menetelmän validointi liitetään usein kehitysvaiheeseen ja monet validointiin liittyvät mittausmenetelmän suorituskykyä ilmaisevat parametrit arvioidaan tavallisesti osana menetelmän kehitystä. Validointia tarvitaan usein myös mittausepävarmuuskomponentteja määrittäessä.

Kemiallinen mittausmenetelmä tulee validoida, kun on tarpeellista todentaa, että sen suorituskykyparametrit ovat riittäviä tietyn analyttisen ongelman ratkaisemiseen. Validointi on tarpeen esimerkiksi, kun kehitetään uutta menetelmää, käytössä olevaa menetelmää uudistetaan tai sen käyttötarkoitusta laajennetaan tai validoitua menetelmää käytetään toisessa laboratoriossa. (Ehder 2005, 25–26.)

3.1 Validoinnissa määritettävät parametrit

Validoinnissa määritettävät parametrit ovat selektiivisyys/spesifisyys, lineaarisuus, havaitsemisraja ja määritysraja, toistettavuus/uusittavuus, oikeellisuus/saanto, herkkyys, häiriöalttius ja stabiilisuus. Validointituloksista voidaan laskea mittausepävarmuus. (Saari, 2010.) Tilastollisten menetelmien avulla voidaan arvioida kuinka hyvin testeistä saadut tulokset voidaan yleistää perusjoukon tuloksiksi ja arvioida menetelmän luotettavuutta (Holopainen & Pulkkinen 2013, 165).

3.1.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Mittausmenetelmän spesifisyys on menetelmän kyky mitata vain tutkittavaa analyyttiä. Selektiivisellä menetelmällä voidaan määrittää tietty analysoitava aine tai aineet monikomponenttisessa seoksessa siten, että muut komponentit eivät häiritse määritystä. (Ehder 2005, 27.)

Selektiivisyys on menetelmän kyky määrittää tarkasti ja spesifisesti tutkittava analyytti, kun näytematriisissa esiintyy muita komponentteja määrätyissä testiolosuhteissa (Ehder 2005, 27).

Menetelmä on spesifinen, kun se on täysin selektiivinen. Silloin pystytään määrittämään tarkasti analyytin saanto sekä määrittämään analyysiä häiritsevät tekijät. Tutkimuksen selektiivisyys (tarkkuus) kasvaa sen mukaan, mitä spesifisempi (tarkempi) määritysmenetelmä on. (Ehder 2005, 27.) Menetelmän tarkkuuskokeilla pystytään selvittämään taustatekijöiden aiheuttama systemaattinen virhe (Saari, 2010).

3.1.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuudella tarkoitetaan analyyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio tulosten ja näytteiden tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Lineaarisuustutkimusten avulla määritetään myös analyysimenetelmän luotettava mittausalue, jolla voidaan saavuttaa hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys. Lineaarinen alue on yleensä laajempi kuin mittausalue. (Ehder 2005, 28.)

Korrelaatiokertoimella kuvataan muuttujien välisen yhteyden voimakkuutta. Yleisimmin käytetty korrelaatiokerroin on Pearsonin korrelaatiokerroin, jonka myös Excel-taulukkolaskentaohjelma laskee. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 233–234.) Korrelaatiokerroin lasketaan kaavalla 1.

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

r = kalibrointisuoran korrelaatiokerroin

x = kalibrointiin käytettyjen liuoksen pitoisuuksien keskiarvo

y = kalibrointiin käytettyjen liuosten mittaussignaalin tasojen keskiarvo (Niiranen & Jaarinen 2008, 20.)

Korrelaatiokertoimen merkitsevyyttä tutkiessa peruskysymys on milloin korrelaatiokertoimen poikkeama nolasta on niin suuri, ettei sen voida katsoa johtuvan pelkästään sattumasta. Tämän selvittämiseksi korrelaatiokertoimen arvo yleensä testataan. Korrelaatiokertoimen merkitsevyys voidaan testata valmiin taulukon avulla. Otokokoa vastaavaa kriittistä arvoa verrataan korrelaatiokertoimen arvoon. Kriittinen arvo r määräytyy vapausasteista n , merkitsevyydestä l ja erehtymisriskistä α . Jos laskettu korrelaatiokertoimen itseisarvo on pienempi, kuin taulukossa oleva kriittinen arvo ei voida osoittaa, että muuttujien välillä vallitsisi negatiivinen tai positiivinen korrelaatio. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 242–244.)

Korrelaatiokertoimen arvo on aina $-1:n$ ja $+1:n$ välillä oleva reaaliluku. Jos korrelaatiokertoimen arvo on lähellä ykköstä, muuttujien välillä on voimakas positiivinen lineaarinen yhteys. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 234, 245.)

Mallin hyvyys vaikuttaa siihen, kuinka luotettavina sen avulla laskettuja tuloksia voidaan pitää. Yksi tapa arvioida tulosten luotettavuutta on laskea selityskerroin R^2 , joka mittaa mallin kykyä kuvata selitettävän muuttujan vaihtelua. Selityskerroin ilmaisee, kuinka monta prosenttia selitettävän muuttujan y arvojen vaihtelusta voidaan selittää muuttujan x avulla. Jos selityskerroin on suuri, muuttuja x yksin selittää muuttujan $y:n$ arvojen vaihtelusta, jolloin malli kuvaa hyvin aineistoa. Mallin hyvyys lasketaan kaavalla 2.

$$R^2 = r^2 * 100 \% \quad (2)$$

r = korrelaatiokerroin (Holopainen & Pulkkinen 2013, 277–278.)

3.1.3 Havaitsemis- ja määrittämissrajat

Havaitsemisraja on tutkittavan yhdisteen pienin pitoisuus, joka voidaan tutkia luotettavasti (Saari, 2010). Analysoitavan aineen havaitsemisrajan määrittäminen perustuu taustan hajonnan tutkimiseen analysoimalla nollanäytteitä toistuvasti. Nollanäytteiden rinnakkaismäärittämisen perusteella lasketaan taustalle keskiarvo ja keskihajonta. Havaitsemisraja on analysoitavan aineen pitoisuus, jonka vaste vastaa nollanäytteen vasteiden keskiarvoa lisättynä kolminkertaisella keskihajonnalla (95 % todennäköisyydellä). Havaitsemisraja analyysille mitatun vasteen tai määritetyn pitoisuuden tulee olla niin suuri, ettei sen voida katsoa johtuvan taustan satunnaisvaihtelusta. Havaitsemisraja lasketaan kaavalla 3.

$$\text{Havaitsemisraja} = \bar{x} + 3 * s \quad (3)$$

\bar{x} = nollanäytteen keskiarvo

s = nollanäytteen keskihajonta (Ehder 2005, 29.)

Määrittämissraja on kvantitatiivisen määrittämisen pitoisuusraja tutkittavassa näytteessä mitattuna (Saari, 2010). Määrittämissraja todetaan käyttäen sopivaa mittanormaalia tai varmennettua vertailumateriaalia. Tavallisesti suositellaan 6–10 mittauksen toistamista ja käytetään kalibrointikäyrän alhaisinta pistettä. Useimmiten määrittämissrajojen katsotaan olevan 5, 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonta. Määrittämissraja lasketaan kaavalla 4.

$$\text{Määrittämissraja} = \bar{x} + 10 * s \quad (4)$$

\bar{x} = nollanäytteen keskiarvo

s = nollanäytteen keskihajonta (Ehder 2005, 30.)

3.1.4 Tarkkuus ja oikeellisuus

Menetelmän validoinnissa pyritään määrittämään tulosten tarkkuus arvioimalla sekä systemaattista että satunnaisvirheitä. Menetelmän tarkkuutta tarkastellaan mittauksen oikeellisuutta ja toistotarkkuutta tutkimalla.

Oikeellisuus määritetään vertaamalla menetelmällä saatuja mittaustuloksia tiettyyn referenssiarvoon, joka on saatu tunnetusta vertailumateriaalista tai toisen tunnetun menetelmän avulla. (Ehder 2005, 35.) Menetelmän oikeellisuus kertoo ainoastaan systemaattisen virheen eli se kertoo, kuinka oikea mitattu tulos on. Mittauksen oikeellisuus ilmaistaan yleensä poikkeamana eli systemaattisena virheenä. Poikkeama on mitattavan suureen mittaustuloksen ja todellisen arvon välinen ero. (Ylitalo 2012, 25.)

Vertailuarvoilla tulisi olla jäljitettävyyden kansainvälisiin mittanormaaleihin. Ideaalinen vertailumateriaali olisi sertifioitu, mahdollisimman lähellä tutkittavaa näytettä oleva matriisipohjainen vertailumateriaali. Niiden saatavuus on useimmiten kuitenkin rajoitettua. Validoinnissa voidaan käyttää myös itse tehtyjä vertailumateriaaleja, mutta niiden tulisi pohjautua sertifioituihin vertailumateriaaleihin. Mittauksen oikeellisuutta voidaan tutkia myös osallistamalla laboratorioiden välisiin vertailumittauksiin. (Ehder 2005, 35.)

Menetelmän tarkkuutta tutkitaan z-arvon avulla. Z-arvo yhtenäistää laboratorioiden tuloksia, jolloin keskinäinen vertailu mahdollista. Laboratorioiden pätevyyttä arvioidaan vertaamalla laboratorion saaman tuloksen ja vertailun järjestäjän asettaman vertailuarvon eroa järjestäjän asettamaan tulosten hajonnan tavoitearvoon. Menetelmän oikeellisuutta analysoitaessa hyväksyttävänä rajana pidetään $|z| \leq 2$. Z-arvo lasketaan kaavalla 5.

$$z = \frac{x_i - X}{s_p} \quad (5)$$

x_i = yksittäisen laboratorion tulos

X = vertailuarvo näytteen pitoisuudelle

s_p = tulosten arvioinnissa asetetun hajonnan tavoitearvo (Leivuori, 2014.)

Analyysimenetelmän tarkkuuden arvioimiseen voidaan käyttää t-testiä (kaava 6).

$$\text{Testisuure } t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (6)$$

\bar{x} = tulosten keskiarvo

μ = vertailumateriaalille ilmoitettu arvo

s = tulosten keskihajonta

n = tulosten lukumäärä (Holopainen & Pulkkinen 2013, 182.)

Luottamusväli ilmaisee otoksesta laskettuun tunnuslukuun sisältyvän virhemarginaalin valitulla luottamustasolla. Luottamusväli lasketaan kaavan 7 avulla.

$$\mu = \bar{x} \pm t_{0,05} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \quad (7)$$

μ = todellinen arvo

\bar{x} = tulosten keskiarvo

s = tulosten keskihajonta

$t_{0,05}$ = kaksisuuntaisen t-jakauman arvo 95 %:n luottamustasolla, kun vapausasteiden lukumäärä on $n - 1$

n = tulosten lukumäärä (Holopainen & Pulkkinen 2013, 167.)

3.1.5 Toistettavuus

Toistettavuus (r) tarkoittaa täsmällisyyttä, joka saavutetaan, kun määrittäminen tehdään toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä saman tekijän toimesta ja samoilla laitteilla, reagensseilla sekä lämpötiloilla. Toistettavuus määritetään tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä erityyppisistä näytteistä eri pitoisuuksilla. Yleensä näytesarjojen sisäinen vaihtelu on näytesarjojen välistä vaihtelua pienempää. Mikäli sarjojen välinen hajonta on merkittävästi suurempi kuin sarjojen sisäinen hajonta, sarjojen välillä esiintyy todellista vaihtelua. (Ehder 2005, 37.)

Toistettavuus (r) lasketaan kaavoilla 8 ja 9. s_r -arvo on toistettavuuden variaatiokerroin ja kuvaa hajonnan suuruutta prosentuaalisesti.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (8)$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \% \quad (9)$$

s = keskihajonta

\bar{x} = näytteiden keskiarvo

n = näytteiden lukumäärä (Magnusson, Näykk, Hovind & Krysel 2012, 14.)

3.1.6 Uusittavuus

Uusittavuus (R) eli bias tarkoittaa sitä täsmällisyyttä, joka saavutetaan, kun mittaukset tehdään samasta näytteestä, samalla menetelmällä eri laboratorioissa eri laitteiden välillä. Uusittavuutta tutkitaan tietyn analyysimenetelmän standardisoinnin yhteydessä laboratorioiden välisin vertailukokein.

Laboratorion käyttämän menetelmän sisäistä uusittavuutta (R_w) voidaan tutkia tekemällä samasta näytteestä useita määrittäyksiä pitkän ajan kuluessa, jos näyte on stabiili. (Ehder 2005, 37.)

Uusittavuus (R) lasketaan kaavoilla 10 ja 11. s_R -arvo on uusittavuuden variaatiokerroin ja kuvaa hajontaa prosentuaalisesti.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (10)$$

$$s_R = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \% \quad (11)$$

s = keskihajonta

\bar{x} = näytteiden keskiarvo

n = näytteiden lukumäärä (Magnusson ym. 2012, 14.)

3.1.7 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on mittaustulokseen liittyvä parametri, joka kuvaa mittaussuureen arvojen oletettua vaihtelua. Mittausepävarmuustietoja tarvitaan, kun halutaan arvioida onko mittaustuloksen tarkkuus riittävä esim. päätöksen teon kannalta tai vertaillessa eri laboratorioiden tuloksia keskenään. Mittausepävarmuus kertoo kvantitatiivisen arvion niistä rajoista, joiden sisäpuolella mittaustuloksen oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä. (Ehder 2005, 18.)

Mittausepävarmuus koostuu useasta mittausepävarmuuden osa-alueesta. Mittausepävarmuuden laskemiseksi tarvitaan bias-arvon, toistettavuuden ja vertailunäytteen mittausepävarmuudet.

Bias-arvon mittausepävarmuus $u(\text{bias})$ saadaan laskettua RMS_{bias} -arvosta, joka lasketaan kaavalla 12 ja vertailumateriaalin mittausepävarmuudesta $u(\text{Cref})$, joka lasketaan kaavalla 13. Vertailumateriaalin mittausepävarmuus on laskettu 95 %:n suuruisella luottamustasolla.

$$RMS_{\text{bias}} = \sqrt{\frac{\sum (\text{bias}_i)^2}{n}} \quad (12)$$

$$u(\text{Cref}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (13)$$

s = keskihajonta

n = otos (lkm.)

Bias-arvon mittausepävarmuus $u(\text{bias})$ lasketaan kaavalla 14.

$$u(\text{bias}) = \sqrt{RMS_{\text{bias}}^2 + u(\text{Cref})^2} \quad (14)$$

$u(\text{Cref})$ = vertailunäytteen mittausepävarmuus

Laboratorion sisäisen uusittavuuden mittausepävarmuus $u(R_w)$ lasketaan kaavalla 15.

$$u(R_w) = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \% \quad (15)$$

s = keskihajonta

\bar{x} = keskiarvo

Toistettavuuden mittausepävarmuus $u(r)$ lasketaan kaavalla 16.

$$u(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (16)$$

\bar{x} = näytteiden keskiarvo

n = näytteiden lukumäärä

Menetelmän mittausepävarmuus u_c lasketaan kaavalla 17.

$$u_c = \sqrt{u(r)^2 + u(R_w)^2 + u(bias)^2} \quad (17)$$

$u(r)$ = toistettavuuden mittausepävarmuus

$u(R_w)$ = laboratorion sisäisen uusittavuuden mittausepävarmuus

$u(bias)$ = bias-arvon mittausepävarmuus (Magnusson ym. 2012, 8.)

Analyttisessä kemiassa mittaustulokseen liittyvä lopullinen mittausepävarmuus ilmaistaan yleensä laajennettuna epävarmuutena (U). U saadaan kertomalla yhdistetty mittausepävarmuus u_c kertoimella $k = 2$. Tämä vastaa likimain 95 %:n suuruista luotettavuusväliä. Mittausepävarmuusrajojen sisällä on noin 95 % tuloksista. (Ehder 2005, 19.) Laajennettu mittausepävarmuus lasketaan kaavalla 18.

$$U = 2 * u_c \quad (18)$$

U_c = mittausepävarmuus (Magnusson ym. 2012, 8.)

3.1.8 Häiriönkestävyys

Menetelmän häiriönkestävyyttä ja toimintavarmuutta testataan laboratoriossa aiheuttamalla analyysiin pieniä, todellisissa tilanteissa esiintyviä muutoksia ja tarkkailemalla niiden vaikutuksia. Tutkimuksessa on valittava näytteen esikäsittelyyn, puhdistukseen ja määrittelyyn liittyviä tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa mittaustuloksiin. Näitä tekijöitä voivat olla

- määrittelyn suorittava henkilö
- reagenssien, liuottimien, vertailumateriaalien sekä näyteliuosten lähde ja ikä
- lämpötila
- pH-arvo
- muut laboratoriolle tyypilliset tekijät.

Näitä muutoksia on muunneltava sellaisessa kertaluokassa, joka vastaa laboratoriossa yleensä esiintyviä poikkeamia. Huomattavasti mittaustuloksiin vaikuttaville tekijöille tehdään lisäkokeita. Tulosten perusteella voidaan päättää tekijän hyväksyttävät rajat ja huomattavasti tuloksiin vaikuttavat tekijät on ilmoitettava selkeästi menetelmäkuvauksessa. Periaatteena on useiden muutosten tekeminen samaan aikaan. (Ehder 2005, 33.)

3.2 Tilastolliset testit

Tilastollisen päättelyn tavoitteena on luotettavien johtopäätösten tekeminen perusjoukosta otoksen perusteella. Tilastollisen päättelyn avulla pyritään arvioimaan kuinka hyvin otoksesta saadut tulokset voidaan yleistää perusjoukon tuloksiksi. Ensimmäinen luotettavien johtopäätösten edellytys on, että tutkimus on tehty tieteelle hyväksytyjen kriteerien mukaan. Tulosten tarkkuus riippuu tiettyyn rajaan saakka otoksen koosta. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 165.)

Tilastolliset testit ovat apuvälineitä, jotka helpottavat johtopäätösten tekoa tilanteessa, jossa käytettävissä oleviin tietoihin sisältyy epävarmuutta (Ylitalo 2013, 29). Tilastollisia testejä tehtäessä päätetään nollahypoteesi (H_0) ja vastahypoteesi (H_1) eli kysymykset, joihin testeillä haetaan vastausta. Nollahypoteesia pidetään totena, kunnes toisin todistetaan. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 176.) Esimerkiksi nollahypoteesina oletetaan, että koesarjojen keskiarvot eivät poikkea toisistaan ja vastahypoteesina oletetaan, että koesarjojen keskiarvot poikkeavat toisistaan (Ylitalo 2013, 29). Seuraavaksi poimitaan perusjoukosta yksi tai useampia otoksia. Sen jälkeen päätetään merkitsevyystaso ja lasketaan testisuure. Luottamustaso on 1 – merkitsevyystaso. Kun testisuure on laskettu, verrataan sen arvoa taulukkoarvoihin. Lasketun arvon ja taulukkoarvon perusteella tehdään johtopäätös, jolloin nollahypoteesi joko hyväksytään tai hylätään. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 176.)

Testiä tehtäessä ei yleensä tiedetä poikkeako kokeellinen tulos oikeasta arvosta positiiviseen vai negatiiviseen suuntaan. Tällöin valitaan kaksisuuntainen testi. Jos tiedetään, että kokeellinen tulos poikkeaa oikeasta arvosta joko positiiviseen tai negatiiviseen suuntaan, testi tehdään yksi suuntaisena. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 177.)

Tilastollisen päättelyn avulla ei voida sanoa varmasti, että jokin hypoteesi on tosi tai epätosi, vaan ainoastaan millä todennäköisyydellä hypoteesin hylkääminen kannattaa. Kaikki testit eivät sovi kaikille muuttujille, esimerkiksi muuttujan mitta-asteikko vaikuttaa testien valintaan. (Nousiainen, 2010.)

3.2.1 T-testi

T-testi vertaa normaalijakautuneiden satunnaismuuttujien keskiarvoja. Yksisuuntaisessa testissä tutkitaan, onko kahdella ryhmällä eroja, ja kaksisuuntaisessa testissä testataan lisäksi, minkä suuntainen ero on. (Nousiainen, 2010.) T-testi noudattaa Studentin t-jakaumaa vapausastein $f = n -$

1 nollahypoteesin ollessa voimassa. Testi tehdään laskemalla t-arvo kaavalla 19, jossa s^2 lasketaan kaavalla 20. Tulosta verrataan halutulla merkitsevyystasolla Studentin t-jakaumasta saatuun kriittiseen arvoon.

$$\text{Testisuure } t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \quad (19)$$

$$\text{jossa } s^2 = \frac{(n_1-1) \cdot s_1^2 + (n_2-1) \cdot s_2^2}{(n_1-1) + (n_2-1)}, \quad (20)$$

noudattaa t-jakaumaa vapausastein $f = n_1 + n_2 - 2$, jos nollahypoteesi on tosi. (Holopainen & Pulkkinen 2013, 182.)

3.2.2 F-testi

F-testi on t-testin ohella eräs tilastotieteen keskeisistä testeistä. F-testi vertailee kahden menetelmän varianssit yhtä suuriksi. Testissä nollahypoteesina oletetaan varianssien olevan yhtä suuriksi. Testi tehdään laskemalla testisuure ja verrataan tulosta halutulla merkitsevyystasolla F-tilustaulukosta saatuun kriittiseen arvoon. Jos lasketun testisuuren arvo on suurempi kuin taulukkoarvo, nollahypoteesi hylätään valitulla riskitasolla. F-testillä verrataan menetelmien toistotarkkuutta. (Ylitalo 2012, 30.) Testisuure F lasketaan kaavalla 21.

$$\text{Testisuure } F_0 = \frac{s_1^2}{s_2^2} \sim F, \quad (21)$$

noudattaa F-jakaumaa vapausastein $v_1 = n_1 - 1$ ja $v_2 = n_2 - 1$. (Rantakylä 2014)

3.2.3 Anova

Varianssianalyyssissä (ANOVA, analysis of variance) verrataan ryhmien välisiä keskiarvojen vaihteluja. Vaihtelua mitataan varianssilla. Varianssianalyysi tutkii, selittääkö selittävä muuttuja selitettävän muuttujan käyttäytymistä. Selitettävän muuttujan arvojen on noudatettava normaalijakaumaa. Otosten on oltava riippumattomia ja satunnaisia, jolloin muuttujien varianssit ovat yhtä suuriksi eri ryhmissä. Selitettävän muuttujan on oltava mitta-asteikollinen, jotta siitä voi laskea keskiarvon A varianssin. Selittävästä muuttujasta pitää pystyä muodostamaan luokkia, joten sen on oltava järjestys- tai luokitteluasteikollinen.

Yksisuuntaisessa varianssianalyyssissä vertaillaan yhden selitettävän muuttujan suhteen, kaksisuuntaisessa varianssianalyyssissä tehdään vertailua kahden selitettävän muuttujan suhteen. Kovarianssianalyyssissä on myös useampia selittäviä muuttujia, mutta niiden on oltava välimatka- tai suhteasteikollisia. Vertailu tehdään p-arvon avulla. Jos p-arvo on alle valitun merkitsevyystason, nollahypoteesi hylätään. Toisin sanoen muuttujien välillä oletetaan olevan tilastollista eroa. (Nousiainen, 2010.)

4 KOKEELLINEN OSIO

Roal Oyn laadunvalvontalaboratoriossa tutkitaan fytaaasiaktiivisuutta kahdella menetelmällä, FTU- ja PPU-menetelmällä. Tutkimuksen tavoitteena oli saada tietoa substraattivaihdoksen aiheuttamista muutoksista FTU-menetelmässä ja varmistaa menetelmän toimivuus sekä luotettavuus. Tutkimus oli osa Roalin ja yhteistyölaboratorioiden entsyymiaktiivisuutta mittaavien menetelmien harmonisointia. Tutkimus tehtiin Roal Oyn laadunvalvontalaboratoriossa keväällä 2015.

FTU-menetelmä on hyvin herkkä menetelmä ja sen takia häiriöaltis. Häiriöalttiutta pyrittiin tutkimaan validoinnin ohella ja löytämään toimintatapoja, joilla menetelmästä saataisiin stabiilimpi. FTU-menetelmä oli validoitu vuonna 2012. Tutkimuksessa ei uusittu kaikkia validoinnin osaluueita.

PPU-menetelmässä käytettiin samaa substraattia, kuin FTU-menetelmässä. Substraattivaihdoksen myötä myös PPU-menetelmässä vaihtui käytettävä substraatti. Substraattivaihdoksen myötä PPU-menetelmän luotettavuus ja toimivuus tarkastettiin. Tutkimus painottui FTU-menetelmään, koska pienimuotoisissa testeissä oli saatu tulokseksi, ettei PPU-menetelmässä tapahdu aktiivisuustason muutosta.

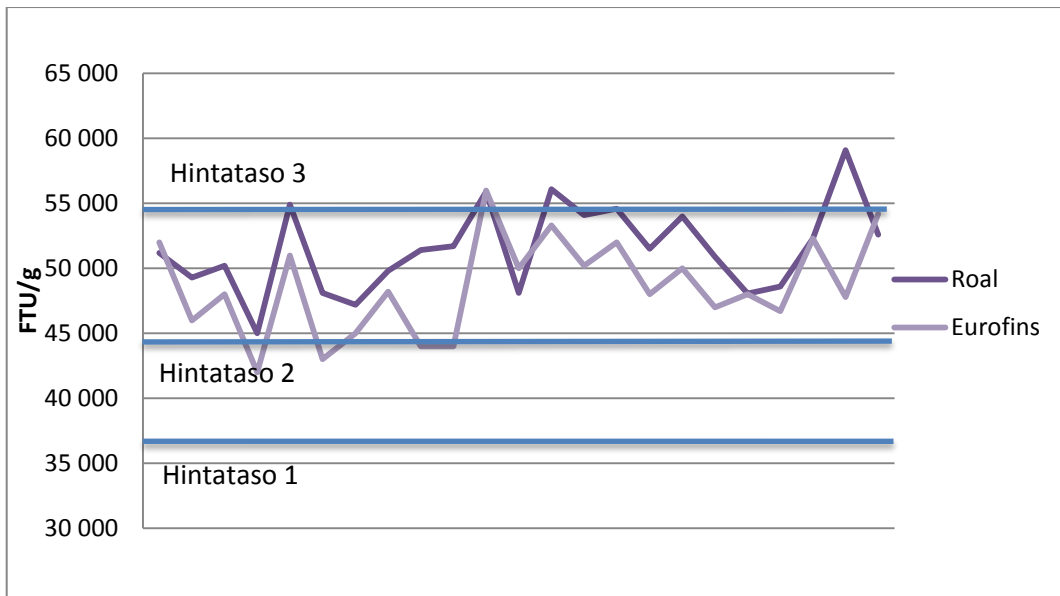
FTU-menetelmän herkkyyden vuoksi Roalin laadunvalvontalaboratoriossa oli määritetty PPU/FTU-kerroin, jolloin näytteet voidaan analysoida PPU-menetelmällä ja kertoimen avulla muuttaa tulokset FTU/g yksikköön. PPU/FTU-kerroin tarkistettiin substraattivaihdoksen myötä.

4.1 Fytaaasiaktiivisuuden mittaaminen FTU-menetelmällä

Harmonisoinnin myötä järjestettiin ring-testi sekä Inter Laboratory Analyst Technical and Quality -konferenssi. Suurin muutos FTU-menetelmässä oli substraatin vaihdos ja sen myötä tutkittiin uuden substraatin vaikutus menetelmän mittauserävarmuuteen ja analytiikkaan.

4.1.1 Harmonisointi

Fytaaasiaktiivisuusmääriä tekevät useat Roalin yhteistyölaboratoriot mm. AB Vista, ESC ja Eurofins. Entsyymituotteiden hinnoittelu perustuu aktiivisuustasoon. Roalin laadunvalvontalaboratoriossa aktiivisuustaso oli korkeampi, kuin muissa laboratorioissa. Kuvio 1 (s. 15) havainnollistaa entsyymiaktiivisuuden tasoeroa. Muut laboratoriot olivat ottaneet uuden substraatin käyttöön aikaisemmin ja tasoeron oletettiin johtuvan substraattivaihdoksesta. Menetelmä päätettiin harmonisoida kaikkien yhteistyölaboratorioiden kesken.



Kuvio 1. Entsyymiaktiivisuustason ero

4.1.2 Ring-testi

Laboratorioiden välisessä vertailumittauksessa on kaksi tai useampia laboratorioita, jotka suorittavat samasta näytteestä ennalta määrätyissä olosuhteissa tehdyt testaukset. Laboratorio voi kontrolloida analyysimenetelmensä toimintakykyä omiin ja ulkoisiin vaatimuksiin nähden osallistumalla oman alansa laboratorioiden välisiin vertailututkimuksiin. Vertailumittausten avulla voidaan tarkastella mittausmenetelmien toistettavuutta ja uusittavuutta laboratorioiden välillä sekä systemaattisia virheitä. (Ehder 2005, 39.)

Roalilla ring-testi järjestettiin harmonisoinnin yhteydessä. Testiin osallistuivat Roalin laadunvalvontalaboratorion lisäksi useat yhteistyölaboratoriot. Testissä analysoitiin kolme näytettä (jauhe-, granula- ja nestenäyte) 5.3 ja 13.3.2015. Näytteet analysoitiin kolmena rinnakkaismäärityksenä, niistä laskettiin keskiarvo ja tulokset lähetettiin ring-testin järjestäjälle. Ring-testin tuloksista tarkasteltiin menetelmän hajontaa eri laboratorioiden välillä. Tulokset julkaistiin Inter Laboratory Analyst Technical and Quality-konferenssissa.

4.1.3 Uuden substraatin vaikutus mittausepävarmuuteen

Harmonisoinnin tarkoituksena on yhdenmukaistaa kaikissa yhteistyölaboratorioissa käytettävät menetelmät. Roalin laadunvalvontalaboratoriossa otettiin testiin uusi substraatti, joka oli jo käytössä muissa laboratorioissa. Uusi BioChemin valmistama fytaattisubstraatti EE 05501 (phytic acid dodeca sodium salt) eränumeroa D197-16 korvasi vanhan substraatin, joka oli Sigman valmistama fytaattisubstraatti (phytic acid sodium salt hydrate) eränumeroa BCBF5728V. Substraatin vaihdos oli väistämätön, koska Sigma lopetti fytaattisubstraatin valmistuksen.

4.1.4 Uuden substraatin vaikutus analytiikkaan

Substraattitestausta toteutettiin analysoimalla samassa näytesarjassa näytteet uudella ja vanhalla substraatilla. Testiin otettiin mahdollisimman laajalajaisesti näytteitä; kasvatusnäytteitä, puolivalmisteita ja eri aktiivisuustason omaavia tuotteita. Tutkimuksessa määritettiin uuden ja vanhan substraatin antama entsyymiaktiivisuuden tasoero.

Substraattitestausta suoritettiin analysoimalla samassa näytesarjassa näytteet uudella ja vanhalla substraatilla FTU-menetelmäohjeen mukaisesti. Testauksessa olleille näytteille laskettiin substraattien välinen prosentuaalinen ero ja kaikkien näytteiden keskimääräinen ero.

Fytaaasiaktiivisuutta mitataan kahdella menetelmällä yhteistyölaboratorioiden sisällä. Roalilla oli käytössä entsyymien fytaaasiaktiivisuuden määrittämiseen tarkoitettu menetelmä ja ESC-laboratoriolla oli rehussa käytetyn entsyymien fytaaasiaktiivisuuden mittaamiseen tarkoitettu menetelmä. Menetelmät ovat lähes identtiset. Erona oli kalibrointisuorassa käytetty liuos. Roalin laadunvalvonta laboratorio käytti kalibrointisuorassaan puskuriliuosta ja ESC-laboratorio substraattia. Harmonisoinnin myötä Roalin laadunvalvontalaboratoriossa testattiin suoran muutosta, kun puskuriluoksen tilalla käytettiin substraattia.

Näytteiden tuloksia tarkasteltiin tilastollisin menetelmin. Näytesarjoja verrattiin keskenään ja tuloksista laskettiin t-testi sekä ANOVA.

4.2 Fytaaasiaktiivisuuden mittaaminen PPU-menetelmällä

Harmonisoinnin myötä myös PPU-menetelmässä otettiin uusi substraatti testaukseen. Uusi substraatti on myös BioChemin valmistama fytaatisubstraatti EE 05501 (pyhtic acid dodeca sodium salt) eränumeroa D197-16. Vanha substraatti oli Sigman valmistama fytaatisubstraatti (phytic acid sodium salt hydrate) eränumeroa BCBF5728V. Substraatti on sama, jota käytetään FTU-menetelmässä.

Substraatin vaikutusta analytiikkaan tutkittiin substraattitestauksella. Substraattitestausta suoritettiin samalla tavalla kuin FTU-menetelmässä. Näytteet analysoitiin uudella ja vanhalla substraatilla PPU-menetelmäohjeen mukaisesti. Testauksessa olleille näytteille laskettiin substraattien välinen prosentuaalinen ero ja kaikkien näytteiden keskimääräinen ero. Näytteiden tuloksia tarkasteltiin tilastollisin menetelmin. Uuden ja vanhan substraatin eroja verrattiin keskenään t-testillä.

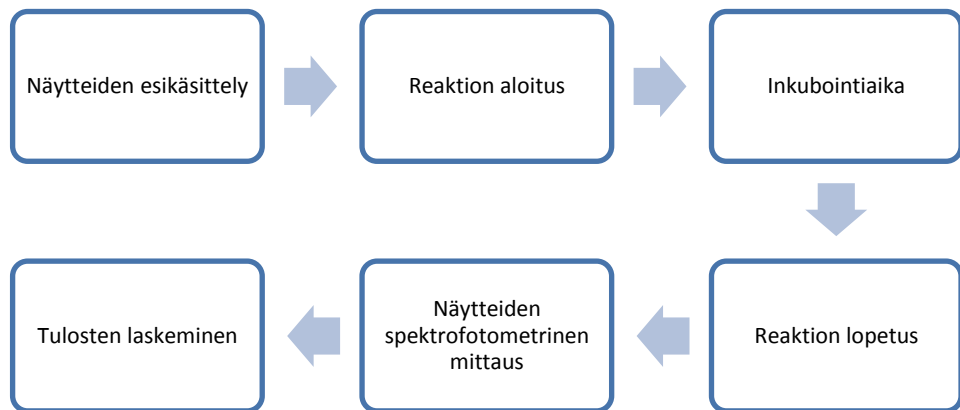
4.3 Materiaalit ja menetelmät

Työssä käytetyt materiaalit ja menetelmät on esitelty seuraavassa kappaleessa. Menetelminä käytettiin pääasiassa standardoituja menetelmiä sekä yrityksen käytössä olevia käytänteitä. Roalin laadunvalvonta laboratorio toimi ISO 17025 -standardin mukaisesti.

4.3.1 Entsyymiaktiivisuuden mittaukset

Entsyymien määrän mittana käytetään sen aktiivisuutta, joka kertoo entsyymien katalysoimien reaktiotapahtumien määrän aikayksikössä. Usein käytössä oleva entsyymiaktiivisuusyksikkö on (U), joka määrittellään tuotteen muodostumisnopeutena $\mu\text{mol min}^{-1}$. SI-järjestelmän mukainen yksikkö on katal, kat. Sen yksikkö on mol s^{-1} . Katalin lukuarvo on usein hyvin pieni, jolloin käytetään (U)-yksikköä. (Aittomäki ym. 2002, 53.)

Aktiivisuutta mitataan joko määrittämällä kuluneen substraatin määrä tai syntyneen lopputuotteen määrä aikayksikössä. Lopputuotteen mittaus on yleensä tarkempi ja herkempi, koska on helpompi mitata aineen syntymistä kuin sen pitoisuuden alenemista. (Aittomäki ym. 2002, 53.) Entsyymiaktiivisuusmittaukset voidaan jakaa päävaiheisiin kuvion 2 mukaisesti.



Kuvio 2. Entsyymiaktiivisuusmittauksen päävaiheet

Entsyymiaktiivisuusmittaukset aloitetaan näytteen esikäsittelyllä luvun 4.2.2 mukaisesti. Ennen työn aloittamista valmistetaan substraatti. Reaktio aloitetaan normaalisti lisäämällä laimennettu näyte substraattiin. Näytettä inkuboidaan menetelmäohjeen mukaisesti tietty aika tietyssä lämpötilassa. Reaktio lopetetaan lisäämällä entsyymireaktion pysäyttävää reagenssia. Näytteet käsitellään menetelmäohjeen mukaisesti ennen spektrofotometriä. Näytteet mitataan UV-VIS-spektrofotometrillä muodostuneen värikompleksin spesifisellä aallonpituudella.

4.3.2 Näytteiden esikäsittely

Nestemäiset entsyymit punnittiin tarkasti, noin 0,25 g näytettä 25 ml:n mittapulloon. Mittapullo täytettiin merkkiin sitraatti- tai natriumasetaattipuskurilla menetelmän mukaan ja näyte sekoitettiin huolellisesti puskuriliuokseen. Kuivat entsyymit punnittiin tarkasti, noin 0,50 g näytettä 50 ml:n mittapulloon. Mittapullo täytettiin puskuriliuoksella merkin alapuolelle, näyte sekoitettiin huolellisesti magneettisekoittajalla 20–30 minuuttia huoneenlämpötilassa ja täytettiin merkkiin puskuriliuoksella. Kuivat entsyymit punnittiin jauhemaisten entsyymien käsittelytilassa. Suojavarus-

teina käytettiin kertakäyttöistä hengityssuojainta, hiusverkkoa, suojatakia, suojalaseja ja suojakäsineitä.

Kasvatusnäytteet valmistettiin joko sentrifugoimalla mysellistä suoraan B32-näyte tai C01-näyte punnitsemalla tarkasti noin 10,0 g myseliä 100 ml mittapulloon, täyttämällä natriumasetaattipuskurilla merkkiin ja sekoittamalla. Kasvatusnäytteet sentrifugoitiin 10 minuuttia 2 700 g. Näytteet laimennettiin näytteelle ominaisella laimennoksella laimentajalla koeputkisiin ja sekoitettiin koeputkisekoittajalla.

4.3.3 Fytaaasiaktiivisuuden mittaus FTU-menetelmällä

FTU-menetelmä perustuu epäorgaanisten fosfaattiryhmien vapautumiseen natriumfytaatista fytaasientsyymien vaikutuksesta. Natriumfytaatti ja fytaasientsyymiä inkuboidaan, minkä jälkeen muodostunut väri mitataan spektrofotometrillä. Värillinen liuos syntyy molybdaatti- ja vanadaatti-ionien muodostaessa kompleksin epäorgaanisen fosforin kanssa.

Menetelmä soveltuu fytaaasiaktiivisuuden määrittämiseen entsyymivalmisteista, vitamiini- ja mineraalipremikseistä sekä rehuista. Menetelmä ei ole spesifinen fytaasille, joten muut fosfaasit voivat suurentaa tulosta. Työ vaatii fosfaatittomat astiat. Yksi yksikkö fytaasia (FTU) on entsyymimäärä, joka määritysolosuhteissa vapauttaa 1 μmol epäorgaanista fosforia minuutissa 37 °C:ssa, pH:ssa 5,5.

Reagenssit ja työturvallisuus

Fytaasin määrittämisessä käytetään 0,25 M natriumasetaattipuskuria, jonka pH on 5,5. Reaktio pysäytetään pysäytysreagenssilla, joka sisältää 22,75-prosenttista typpihappoa, ammoniumvanadaatin kantaliuosta ja ammoniumheptamolybdaatin kantaliuosta. Fytaasin määrittämistä varten valmistettiin päivittäin valmistettavat liuokset pysäytysreagenssi ja natriumfytaattisubstraatti, jonka pH säädetään 100-prosenttisellä etikkahapolla.

Ammoniumvanadaatti on myrkyllistä nieltynä, aiheuttaa silmä-ärsytystä sekä ärsyttää ihoa ja hengityselimiä. Ammoniumvanadaattia sisältävät liuokset käsiteltiin vetokaapissa ja hävitettiin ongelmajätteen käsittelyn mukaisesti. Ammoniumvanadaatti punnittiin vetokaapissa jauhemaisten entsyymien käsittelytilassa ja suojaimina käytettiin kertakäyttöisiä hengityssuojaimia, hiusverkkoa, suojatakia, suojalaseja ja suojakäsineitä.

Typpihappo ja etikkahappo ovat voimakkaasti ihoa syövyttäviä ja silmiä vaurioittavia. Sitruunahappo ärsyttää voimakkaasti silmiä. Työskennellessä vältettiin höyryn hengittämistä ja varottiin kemikaalien joutumista iholle ja silmiin. Työskennellessä käytettiin työtakkia, suojalaseja ja hanskoja. Vahvoja happoja käsiteltiin vetokaapissa. Analyysissä syntyvä jäte hävitettiin Roalin jätehuoltosuunnitelman mukaisesti.

Laitteet

Fytaasin aktiivisuusmäärittämisessä käytetyt laitteet:

- Termostoitu vesihaude (Julabo MB)
- Spektrofotometri (Shimadzu UV-1601)
- Koeputkisekoittaja (Vortex)
- Sentrifugi (VWR Mega Star 3.0)
- Magneettisekoittaja (Starlab)
- Näytteen laimentaja (Hamilton microlab)
- Analysivaaka (Mettler Toledo XP204)
- pH-mittari (WTW pH 521)

Suoritus

Fytaasin määrittäminen tehtiin kolmena rinnakkaismäärittämisnä. Työ aloitettiin pipetoimalla 2,0 ml natriumfytaattisubstraattia kahteen muoviseen sentrifuugiputkeen. Temperoitiin sekä substraattiputkia että entsyymilaimennoksia 10 minuuttia 37 °C:ssa vesihauteessa. Reaktio aloitettiin sekuntikelloa käyttäen pipetoimalla 1 ml laimennettua näytettä 15 sekunnin välein toiseen substraattiputkeen ja sekoitettiin. Näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa tasan 60 minuuttia ja reaktio pysäytettiin lisäämällä 2,0 ml pysäytysreagenssia ja sekoitettiin.

Nollanäyte valmistettiin pipetoimalla ensin pysäytysreagenssia 2,0 ml ja 1,0 ml entsyymilaimennosta temperoituun substraattiputkeen ja sekoitettiin.

Väriin annettiin muodostua putkissa 20 minuuttia huoneenlämmössä. Putket sentrifugoitiin 10 minuuttia 2 700 g. Näytteiden absorbanssi mitattiin nollanäytettä vastaan spektrofotometrillä aallonpituudella 415 nm. Näytteelle ja nollanäytteelle saadun absorbanssierotuksen tulee olla 0,4–1,1. Nollanäytteiden absorbanssin tasoa seurataan ja luotettava taso on alle 0,080.

Kalibrointisuoran valmistaminen

Standardien kantaliuos oli 7,2 mM kaliumfosfaattiliuosta, josta oli tehty kolme standardilaimennosta (0,72; 1,08 ja 1,44 µmol/ml) puskuriliuokseen. Kalibrointisuoran pisteet valmistettiin taulukon 1 (s. 20) mukaisesti kahtena rinnakkaismäärittämisnä sentrifuugiputkissa.

Taulukko 1. Kalibrointisuoran valmistaminen

	Kalibrointisuora
Std. 0	3 ml puskuria + 2 ml STOP
Std. 1	1 ml std. 1 + 2 ml puskuria + 2ml STOP
Std. 2	1 ml std. 2 + 2 ml puskuria + 2ml STOP
Std. 3	1 ml std. 3 + 2 ml puskuria + 2ml STOP

Väriin annettiin muodostua putkissa 20 minuuttia huoneenlämmössä. Putket sentrifugoitiin 10 minuuttia 2 700 g. Spektrofotometri nollattiin standardinollaa vastaan. Kalibrointisuoran pisteet mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 415 nm. Spektrofotometri laskee keskiarvon rinnakkaismääritysten absorbansseille, kulmakertoimen ja leikkauspisteen, suoran korrelaatiokertoimen (R^2) sekä piirtää suoran kuvaajan.

Laskeminen

Näytteen absorbanssista vähennetään nollanäytteelle saatu absorbanssi ja vastaava aktiivisuus (FTU/ml) luetaan kalibrointisuoralta. Tulos kerrotaan laimennoskertoimella.

Näytteiden tuloksia laskiessa käytettiin AutoLims-ohjelmaa. Ohjelma laskee suoran kulmakertoimen ja leikkauspisteen, punnituksen, laimennostilavuuden, laimennoskertoimen ja näytteen sekä nollanäytteen absorbanssin perusteella näytteen entsyymiaktiivisuuspitoisuuden (FTU/g).

4.3.4 Fytaasiaktiivisuuden mittaus PPU-menetelmällä

PPU-menetelmä perustuu epäorgaanisten fosfaattiryhmien vapautumiseen fytiinistä fytaasientsyymien vaikutuksesta. Näytteessä oleva fytaasi hydrolysoi substraattina olevaa fytiiniä (inositoliheksafosfaattia), jolloin vapautuu fosfaattiryhmiä. Fytiiniä ja fytaasientsyymiä inkuboidaan, minkä jälkeen suoritetaan värinmuodostus erillisessä reaktiossa. Vapautuneen epäorgaanisen fosforin määrittäminen perustuu fosfomolybdaattikompleksin pelkistyksessä muodostuvaan väriin.

Menetelmä soveltuu fytaasiaktiivisuuden määrittämiseen entsyymivalmisteista, vitamiini- ja mineraalipremikseistä sekä rehuista. Menetelmä ei ole spesifinen fytaasille, joten muut fosfataasit voivat suurentaa tulosta. Työ vaatii fosfaatittomat astiat. Yksi yksikkö fytaasia (PPU) on entsyymimäärä, joka määrittelyolosuhteissa vapauttaa 1 μ mol epäorgaanista fosforia minuutissa 37 °C:ssa, pH:ssa 5,5.

Reagenssit ja työturvallisuus

Fytaasin määrittämisessä käytetään 0,2 M natriumsitraattipuskuria, jonka pH on 5,0. Reaktio pysäytetään 15-prosenttisella TCA-liuoksella. Värimuodostus tehdään C-reagenssilla, joka sisältää 1 M rikkihappoa, askorbiinihappoa ja ammoniummolybdaatin kantaliuosta. Fytaasin määrittämistä varten valmistettiin päivittäin valmistettavat liuokset C-reagenssi ja natriumfytaattisubstraatti, jonka pH säädettiin 0,2 M sitruunahapolla.

Trikloorietikkahappo (TCA) ja väkevä rikkihappo ovat voimakkaasti ihoa syövyttäviä ja silmiä vaurioittavia. Sitruunahappo ärsyttää voimakkaasti silmiä. Työskentelyn aikana vältettiin pölyn, höyryn ja sumun hengittämistä sekä varottiin kemikaalien joutumista iholle ja silmiin. Henkilökohdaisina suojaimeina käytettiin työtakkia, suojakäsineitä, suojalaseja ja tarvittaessa hengityssuojainta. Vahvat hapot käsiteltiin vetokaapissa. TCA-jäte kerättiin talteen ja hävitettiin vaarallisena jätteenä.

Laitteet

Fytaasin aktiivisuusmäärittämisessä käytetyt laitteet:

- Termостоitu vesihaude (Julabo MB)
- Spektrofotometri (Shimadzu UV-1601)
- Koeputkisekoittaja (Vortex)
- Sentrifugi (VWR Mega Star 3.0)
- Magneettisekoittaja (Starlab)
- Näytteen laimentaja (Hamilton microlab)
- Analyysivaaka (Mettler Toledo XP204)
- Vaaka (Mettler Toledo XS4002S)
- pH-mittari (WTW pH 521)

Suoritus

PPU-analyysi suoritetaan kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa suoritetaan hydrolyysi ja toisessa vaiheessa värimuodostusreaktio.

Hydrolyysi

Fytaasin määrittäminen tehtiin kolmena rinnakkaismäärittämisnä. Työ aloitettiin pipetoimalla 1,0 ml entsyymilaimennosta kahteen koeputkeen. Substraattia temperoitiin 37 °C:ssa vesihauteessa 10 minuuttia ja entsyymilaimennoksia viisi minuuttia. Reaktio aloitettiin lisäämällä 1,0 ml temperoitua substraattia sekuntikelloa käyttäen 15 sekunnin välein entsyymilaimennokseen ja sekoitettiin. Näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa tasan 15 minuuttia ja reaktio pysäytettiin lisäämällä 2,0 ml 15-prosenttista TCA-liuosta ja sekoitettiin. Näytteet jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi ennen värimuodostusreaktiota.

Nollanäyte valmistettiin pipetoimalla ensin 2,0 ml 15-prosenttista TCA-liuosta ja 1,0 ml substraattia entsyymilaimennokseen ja sekoitettiin. Näyttenollia ei inkuboitu vesihauteessa.

Vapautunut ortofosfaatti

Hydrolyysin jälkeen näytteistä tehtiin 1:10 laimennos vedellä hiosputkiin. Hiosputkiin lisättiin 4,0 ml C-reagenssia, sekoitettiin, lisättiin hioskorkit ja inkuboitiin 50 °C:ssa 20 minuuttia. Näytteet jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi ja sekoitettiin. Näytteiden absorbanssi mitattiin nollanäytettä vastaan spektrofotometrillä aallonpituudella 820 nm. Näytteelle ja nollanäytteelle saadun absorbanssierotuksen tulee olla välillä 0,1–1,0. Nollanäytteiden absorbanssin tasoa seurataan ja luotettavataso on alle 0,060.

Kalibrointisuoran valmistaminen

Standardien kantaliuos oli 9,0 mM kaliumfosfaattiliuosta, josta oli tehty kolme standardilaimennosta (0,045; 0,090 ja 0,0225 mM) puskuriliuokseen. Kalibrointisuoran pisteet valmistettiin taulukon 2 mukaisesti kahtena rinnakkaisnäytteenä hiosputkissa.

Taulukko 2. Kalibrointisuoran valmistaminen

	Kalibrointisuora
Std. 0	4 ml vesi + 4 ml C-reagenssi
Std. 1	4 ml std. 1 + 4 ml C-reagenssi
Std. 2	4 ml std. 2 + 4 ml C-reagenssi
Std. 3	4 ml std. 3 + 4 ml C-reagenssi

Hiosputkiin lisättiin 4,0 ml C-reagenssia, sekoitettiin, suljettiin hioskorkkeilla ja inkuboitiin 50 °C:ssa 20 minuuttia. Näytteet jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi ja sekoitettiin. Spektrofotometri laski suoralle kulmakertoimen, leikkauspisteen ja suoran korrelaatiokertoimen (R^2) sekä piirsi suoran kuvaajan.

Laskeminen

Näytteen absorbanssiarvosta vähennetään nollanäytteelle saatu absorbanssi ja vastaava aktiivisuus (PPU/ml) luetaan kalibrointisuoralta. Tulos kerrotaan laimennoskertoimella.

Näytteiden tuloksia laskiessa käytettiin AutoLims-ohjelmaa. Ohjelma laski suoran kulmakertoimen, leikkauspisteen, punnituksen, laimennostilavuuden, laimennoskertoimen ja näytteen sekä nollanäytteen absorbanssin perusteella näytteen entsyymiaktiivisuuspitoisuuden (PPU/g).

5 TULOKSET

5.1 Fytaasiaktiivisuuden määrittäminen FTU-menetelmällä

FTU-menetelmästä tutkittiin validointia varten uuden substraatin vaikutuksia analytiikkaan. Menetelmästä tutkittiin uusittavuus, toistettavuus, tarkkuus, lineaarisuus ja mittausepävarmuus. Aiemmassa v. 2012 tehdyssä validoinnissa oli tutkittu lisäksi havaitsemis- ja määrittämissrajat sekä häiriönkestävyyttä. Näitä osa-alueita ei tutkittu validoinnin yhteydessä.

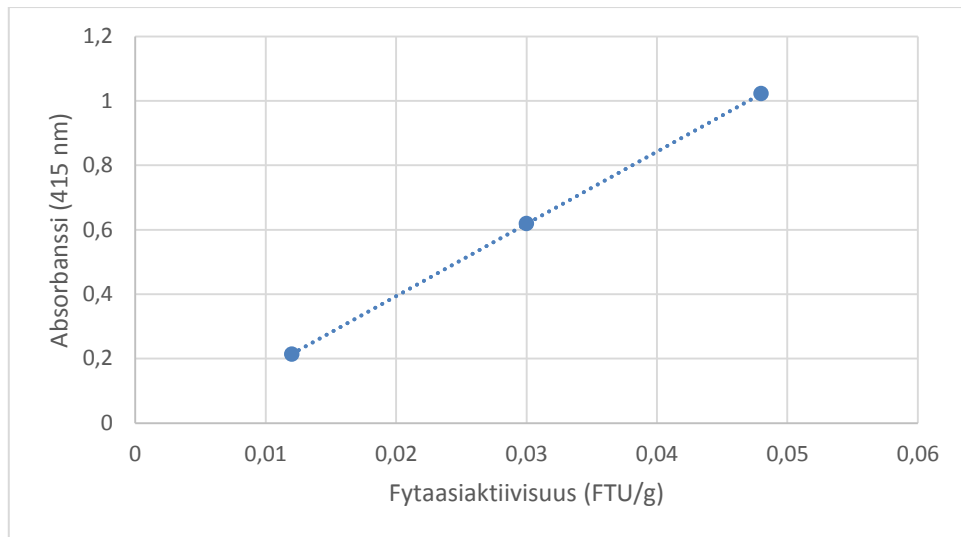
Menetelmän kalibrointisuoran valmistuksessa testattiin käyttää puskurin sijaan substraattia ja sen vaikutuksia tutkittiin. Harmonisoinnin myötä FTU-menetelmässä otettiin käyttöön uusi substraatti ja tutkittiin vaihdoksen aiheuttamia muutoksia näytteiden fytaasiaktiivisuustasoissa.

5.1.1 Lineaarisuus ja alue

Alkuperäisessä menetelmäohjeessa kalibrointi suoritetaan 11 pisteellä (0,3; 0,48; 0,6; 0,72; 1,08; 1,44; 1,8; 2,16; 2,88; 3,6 ja 7,2 $\mu\text{mol/ml}$). Standardien kantaliuos on 7,2 mM kaliumfosfaattiliuos. Roalin laadunvalvontalaboratoriossa kalibrointisuora tehdään kolmella pisteellä (0,72; 1,08 ja 1,44 $\mu\text{mol/ml}$). Kalibrointipisteiden tulokset ovat taulukossa 3 ja suora esitetty kuviossa 3 (s. 24). Kalibrointisuoran määrittäystä ei testattu kaikilla pisteillä validoinnin yhteydessä.

Taulukko 3. Kalibrointisuoran tulokset

Fosfaatti ($\mu\text{mol/ml}$)	Fytaasi aktiivisuus (FTU/ml)	Absorbanssi
0,72	0,012	0,2157
1,08	0,018	0,3532
1,44	0,024	0,4977



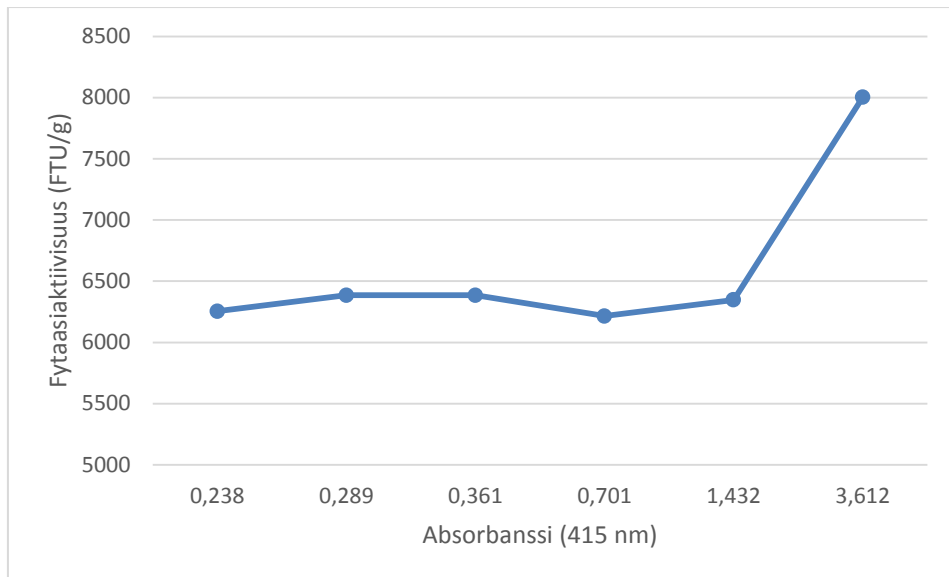
Kuvio 3. Kalibrointisuoran kuvaaja

Roalin menetelmäohjeen mukaisesti tehdyn kalibrointisuoran korrelaatiokerroin $r = 1,000$. Otoskoko $n = 3$ vastaava kriittinen arvo on 1,000, kun merkitsevyystaso kaksisuuntaisessa testissä on 1 %. Koska laskettu korrelaatiokertoimen arvo on yhtä suuri kuin taulukossa oleva kriittinen arvo ($1,000 = 1,000$), edellä olevan perusteella voidaan osoittaa, että absorbanssiarvojen ja standardiliuosten pitoisuuden välillä on positiivinen korrelaatio 99 % luottamustasolla. Tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä.

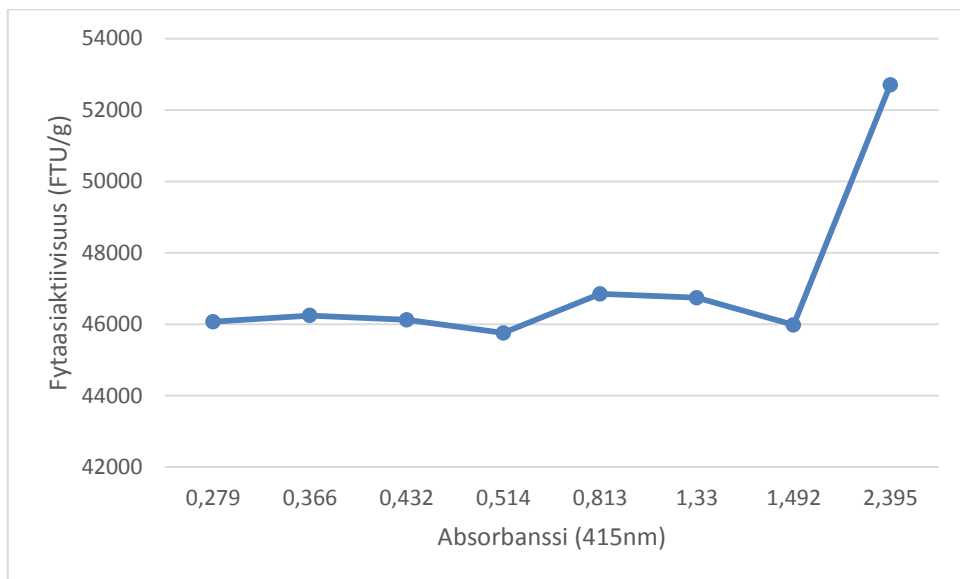
Kalibrointisuoran korrelaatiokertoimesta saadaan selityskertoimeksi kaavalla 2 (s. 7) 100 %. Kalibrointisuoraa vasten laskettuja tuloksia voidaan pitää luotettavina.

Lineaarinen alue

Substraatti vaihdoksen myötä menetelmän lineaarinen alue tutkittiin. Lineaarista aluetta tutkittiin laimentamalla samaa näytettä eri laimennoksien, jolloin saatiin absorbanssiarvoja laajalta alueelta. Testiin valittiin vertailunäyte ja nestemäinen näyte, jolloin saatiin tutkittua lineaarisuutta eri aktiivisuustason omaavista näytteistä. Vertailunäytteen lineaarisuuden tulokset havainnollistettu kuviossa 4 (s. 25) ja nestemäisen näytteen tulokset ovat kuviossa 5 (s. 25).



Kuvio 4. Vertailunäytteen lineaarisuustesti. Vertailunäytteen lineaarinen absorbanssi-alue on välillä 0,240–1,430.



Kuvio 5. Nestemäisen näytteen lineaarisuustesti. Nestemäisen näytteen lineaarinen absorbanssi-alue on välillä 0,280–1,490.

Tutkimuksesta saadut kuvaajat eivät ole täysin lineaarisia, mutta tulosten hajonta kuuluu menetelmän mittausepävarmuuden sisään, jolloin voidaan olettaa tulostason olevan lineaarinen. Tutkimuksen perusteella menetelmän lineaarinen alue on absorbanssialueella 0,3–1,4. FTU-menetelmäohjeessa mittausalueeksi annetaan absorbanssiarvot välillä 0,4–1,0. Mittausalue on laaja eikä sitä ole tarvetta muuttaa.

5.1.2 Havaitsemis- ja määritysraja

Havaitsemis- ja määritysraja oli määritelty vuonna 2012 tehdyssä validoinnissa eikä sitä uusittu. Havaitsemis- ja määritysrajaa oli tutkittu määrittämällä absorbanssi lämpökäsitellystä vehnäjäuhosta, jota käytetään kantaja-aineena monissa entsyymeissä. Näytteitä oli 12 ja yksi tekijä analysoi ne kahtena erillisenä päivänä. Näytteet analysoitiin normaalin näytteen tapaan ja tulokset laskettiin kalibrintisuoralta, joka oli valmistettu samana päivänä. Havaitsemisraja laskettiin kaavalla 3 (s. 7) ja määritysraja kaavalla 4 (s. 7). Kooste tuloksista on taulukossa 4.

Taulukko 4. Havaitsemis- ja määritysrajan testin tulokset

Näyte	n	Keskiarvo ± keskihajonta	Havaitsemisraja	Määritysraja
Vehnäjauho	12	0,415 ± 0,018	0,47	0,6

Havaitsemis- ja määritysrajat olivat 0,47 FTU/g ja 0,6 FTU/g. Entsyymit ovat tyypillisesti voimakkaasti konsentroituja, joten rajoilla on käytännön merkitystä vain, jos määritetään entsyymien sivuaktiivisuuksia. (Piironen 2012, 6.)

5.1.3 Tarkkuus

Tarkkuutta eli mitatun tuloksen ja oikean arvon läheisyyttä tutkittiin laskemalla z-arvo kaavalla 5 (s. 8). Arvon laskemiseen käytettiin ring-testin tuloksia. Kokonaishajonnan tavoitteeksi 95 %:n luottamustasolla ($2 \cdot s_p$) asetettiin 15 %, joten $s_p = 7,5$ %. Tulokset on esitetty taulukossa 5. Oikeana arvona (viitearvo) käytettiin ring-testin kaikkien osallistujien välistä keskiarvoa.

Taulukko 5. Ring-testin tulokset

Näyte	Roal QC	Viitearvo	z-arvo
Vertailunäyte	6 296 ± 181	6 352	- 0,118
Granulanäyte	6 028 ± 146	6 037	- 0,092
Nestenäyte	6 000 ± 166	5 934	0,148
Jauhenäyte	51 476 ± 1 128	51 756	- 0,072

FTU-menetelmän z-arvot ovat välillä - 0,118–0,148. Menetelmän oikeellisuutta analysoitaessa hyväksyttävänä rajana pidetään $|z| \leq 2$. Tulosten perusteella menetelmän tarkkuus on hyväksyttävä.

Menetelmän tarkkuuden arvioimiseen käytettiin myös t-testiä. T-testi laskettiin kaavalla 6 (s. 8). Nollahypoteesina oletettiin, että näytesarjojen ar-

vot eivät eroa toisistaan. T-testin laskemiseen käytettiin Roalin laadunvalvontalaboratorion ring-testin tuloksia ja viitearvona käytettiin ring-testin viitearvoja.

Taulukossa 6 on nähtävissä t-testin tulokset. Näytteistä lasketut t-testin arvot olivat pienempiä, kuin t-testin kriittinen arvo kaksisuuntaisessa testissä 1 % merkitsevyystasolla vapausastein 5, joka on 6,869. T-testin mukaan Roalin tulos ring-testissä ei poikkea viitearvosta 99 % luottamustasolla. Tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä.

Taulukko 6. t-testin tulokset

Näyte	t-testin arvo
Vertailunäyte	- 0,6918
Granulanäyte	- 0,0176
Nestenäyte	0,8890
Jauhenäyte	- 0,5551

Ring-testissä olleille näytteille tehtiin myös luottamusvälitarkastelu. Luottamusvälitarkastelussa laskettiin kaavan 7 avulla, mille alueelle todellinen arvo sijoittuu 95 %:n todennäköisyydellä. Tulokset laskettiin taulukon 5 tuloksista (s. 26) vapausastein 6. Luottamusvälitarkastelun tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Luottamusvälitarkastelun tulokset

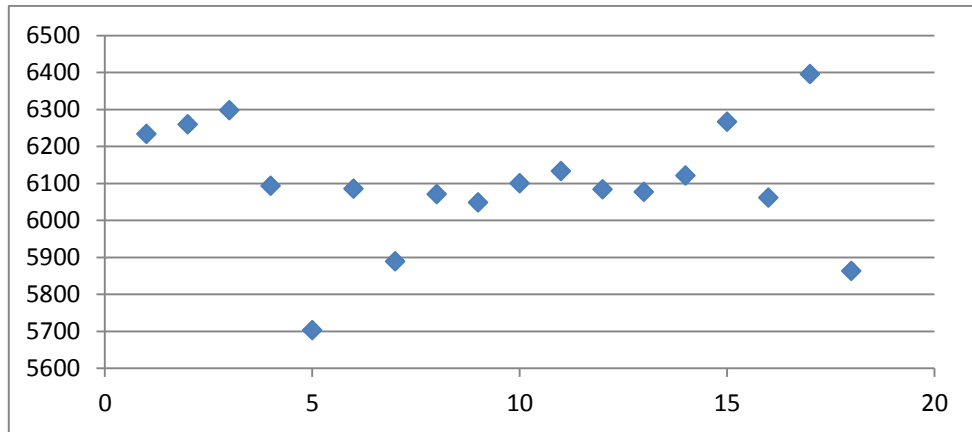
Näyte	Luottamusväli	Viitearvo
Vertailunäyte	6 296 ± 143	6 352
Granulanäyte	6 028 ± 117	6 037
Nestenäyte	6 000 ± 132	5 934
Jauhenäyte	51 476 ± 895	51 756

Luottamusvälitarkastelun mukaan Roalin laadunvalvontalaboratorion ring-testin tulosten todelliset arvot sijoittuvat luottamusvälin osoittamille väleille. Viitearvot sisältyvät tälle välille, jolloin voidaan todeta, että luottamusvälitarkastelun mukaan menetelmä on tarkka.

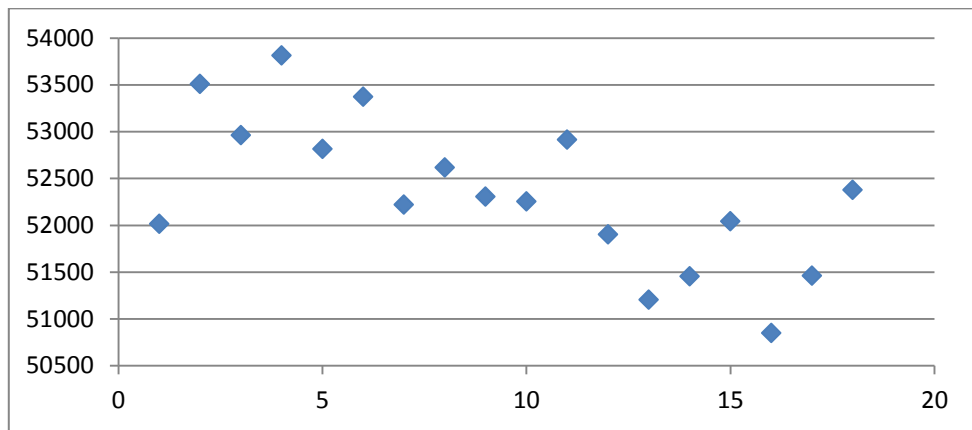
5.1.4

Toistettavuus

Menetelmän toistettavuutta tutkittiin analysoimalla sama näyte 18 kertaa samassa sarjassa ja saman tekijän tekemänä. Tutkimuksessa analysoitiin vertailunäyte ja nestemäinen näyte. Toistettavuuskokeiden hajontakuviot ovat kuvioissa 6 ja 7 (s. 28). Toistettavuus (r) laskettiin kaavoilla 8 ja 9 (s. 9). s_r -arvo on toistettavuuden variaatiokerroin ja kuvaa mittausepävarmuutta prosentuaalisesti. Tulokset on esitetty taulukossa 8 (s. 28).



Kuvio 6. Vertailunäytteen toistettavuus tulokset



Kuvio 7. Nestenäytteen toistettavuus tulokset

Taulukko 8. Toistettavuustestin tulokset

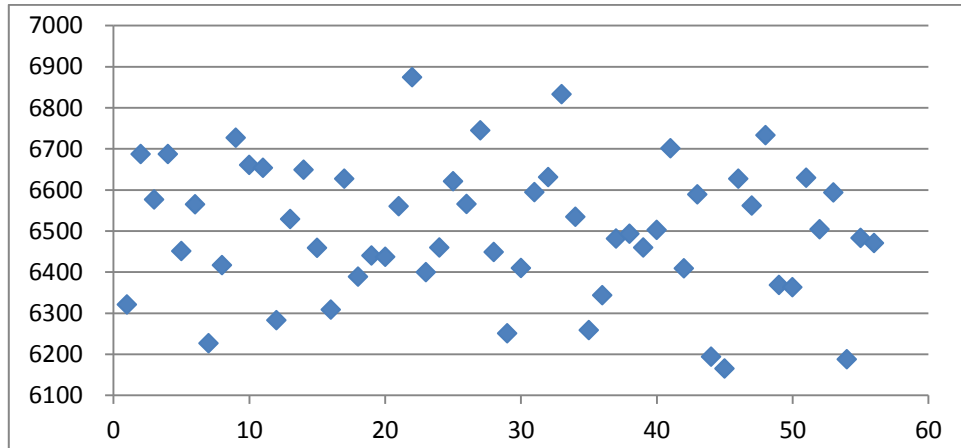
Näyte	n	FTU/g	s_r
Vertailunäyte	18	6 099 ± 165	2,7 %
Nestenäyte	18	52 337 ± 808	1,5 %

Toistettavuustulosten keskihajonta on alle 5 % ja se vastaa muiden entsyymiaktiivisuusanalyysien hajontaa. Toistettavuus on hyvällä tasolla ja se myös vastaa aikaisempaa v. 2012 tehdyn validoinnin tuloksia.

5.1.5 Uusittavuus

Laboratorion sisäinen uusittavuus (R_w) laskettiin FTU-menetelmän kontrollikortin tuloksista ja laboratorioiden välinen uusittavuus (R) laskettiin

ring-testin tuloksista kaavoilla 10 ja 11 (s. 10). s_r - ja s_R -arvot ovat uusittavuuden variaatiokertoimia ja kuvaavat menetelmän hajontaa. FTU-menetelmän kontrollikortin tuloksien hajontakuviot on kuviossa 8. Kontrollikortista poimittiin tutkimukseen arvot, jotka olivat hälytysrajojen sisäpuolella eli analyysi oli onnistunut. Tulokset on esitetty taulukoissa 9 ja 10.



Kuvio 8. FTU-menetelmän kontrollikortin tulokset

Taulukko 9. Laboratorion sisäisen uusittavuuden tulokset

Näyte	n	FTU/g	s_r
Vertailunäyte	55	6 502 ± 163	2,5 %

Laboratorion sisäinen uusittavuus voidaan tulkita hyväksi, kun sitä verrataan vastaaviin muilla entsyymiaktiivisuusmenetelmillä saatuihin tuloksiin sekä aikaisempaan v. 2012 tehdyn validoinnin tuloksiin.

Taulukko 10. Laboratorioiden välisen uusittavuuden tulokset

Näyte	n	FTU/g	s_R
Vertailunäyte	16	6 352 ± 362	5,7 %
Granulanäyte	16	6 037 ± 296	4,9 %
Nestenäyte	16	5 934 ± 332	5,6 %
Jauhenäyte	16	5 175 ± 2256	4,3 %

Ring-testin tuloksien perusteella laboratorioiden välinen uusittavuus voidaan tulkita riittäväksi. Se on noin 2 x laboratorion sisäinen uusittavuus ja siten karkeasti tulkittavissa samalle tasolle kuin kokonaismittaasepävarmuus (Eerola, haastattelu 29.9.2015).

5.1.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus koostuu useasta mittausepävarmuuden osa-alueesta. Mittausepävarmuuden laskemiseksi tarvitaan bias-arvon, toistettavuuden ja vertailunäytteen mittausepävarmuudet. Mittausepävarmuuden laskemiseen käytettiin Roalin käyttämää mittausepävarmuuden laskentataulukkoa, joka perustuu Nordtestin Calculation of Measurement uncertainty in environmental laboratories -ohjeeseen (kaavat 12–18 s. 11). Tulokset laskettiin Excell-laskentaohjelmalla. Mittausepävarmuus laskettiin taulukon 11 mukaisista standardiepävarmuuksista.

Taulukko 11. Mittausepävarmuuden laskemiseen käytetyt standardiepävarmuudet

Toistettavuus $u(r)$	165
Uusittavuus $u(R_w)$	163
Bias-arvo $u(\text{bias})$	288

Menetelmän mittausepävarmuus on 12 %, joka on hyväksyttävällä tasolla suhteessa muihin entsyymiaktiivisuusanalyysiin.

5.1.7 Häiriönkestävyys FTU-menetelmän häiriön kestävyttä oli tutkittu vuonna 2012 tehdyssä validoinnissa eikä sitä uusittu.

Näytteen stabiilisuus

Liuotetun näytteen häiriönkestävyys määriteltiin analysoimalla näyte uudelleen huoneenlämpötilassa pitämisen jälkeen. Tulokset on esitetty taulukossa 12.

Taulukko 12. Näytteen stabiilisuus

Aika	Fytaaasiaktiivisuus (FTU/g)
Välittömästi	7 456 ± 139
2h	7 607 ± 61
4h	7 471 ± 46
Yön yli	7 474 ± 67

Fytaaasiaktiivisuuden muutosta ei havaittu, kun näytettä oli pidetty huoneen lämpötilassa yön yli.

Värireaktion stabiilisuus

Fytaasin määrittämisessä reaktio pysäytetään pysäytysreagenssilla, joka muodostaa värin. Pysäytysreagenssin lisäyksen jälkeen värin annetaan muodostua 20 minuuttia. Näytteestä analysoidaan fytaaasiaktiivisuus mitaamalla muodostunut väri spektrofotometrillä.

Testillä tutkittiin, kuinka värin voimakkuuteen vaikuttaa, mikäli näytteitä ei mitata heti sentrifugointivaiheen jälkeen. Tulokset taulukossa 13 havainnollistavat värin muutosta.

Taulukko 13. Värireaktion stabiilisuus

Aika	Nollanäytteen absorbanssi	Näytteen absorbanssi	Fytaaasiaktiivisuus FTU/g	Osuus heti mitatusta (%)
Heti	0,032	0,696	46 833 ± 1 183	100,0
30 min	0,042	0,699	46 407 ± 1 189	99,1
1 tunti	0,056	0,705	45 917 ± 1 153	98,0
2 tuntia	0,085	0,712	44 895 ± 1 255	96,9
3 tuntia	0,106	0,734	44 576 ± 1 379	95,2

Tulosten perusteella näytteen värissä ei havaittu selkeää muutosta. Nollanäytteiden absorbanssi kasvaa enemmän kuin näytteiden absorbanssi, jolloin absorbanssien erotus kasvaa ja näytteen aktiivisuustaso näyttää laskevan. Näytteet suositellaan mitattavaksi heti sentrifugointivaiheen jälkeen. (Piironen 2012, 8.)

5.1.8 Substraattitestaus

Tutkimuksessa analysoitiin näytteet uudella ja vanhalla substraatilla sekä entsyymiaktiivisuustasolle laskettiin prosentuaalinen erotus. Substraattitestauksen tulokset ovat taulukossa 14.

Taulukko 14. Substraattitestauksen tulokset

	n	FTU/g Vanha subst.	FTU/g Uusi subst.	Erotus (%)
Vertailunäyte	8	3 646	3 498	-4,24
Kasvatusnäyte 1	13	34 869	33 423	-4,21
Kasvatusnäyte 2	6	92 233	86 443	-6,74
Nestenäyte 1	9	55 429	52 666	-5,31
Nestenäyte 2	5	6 065	5 754	-5,51
Jauhenäyte	4	53 431	50 260	-6,30
Granulanäyte	8	6 388	6 113	-4,53

Tuloksista havaitaan, että vanhan ja uuden substraatin välinen erotus on keksimäärin noin – 5 %. Tuotespesifikaatiossa huomioitiin analyysitason muutos muutos.

5.1.9 Suoran testaus

Substraatin vaikutusta kalibrintisuorassa testattiin kahtena päivänä 2. ja 3.5.2015. Testissä kalibrintisuora valmistettiin taulukon 15 mukaisesti. Näytteiden tuloksia tarkasteltiin tilastollisin menetelmin. Näytesarjoja verrattiin keskenään ja niille laskettiin tilastollisia tunnuslukuja t-testillä sekä ANOVA. Nollahypoteesina oletettiin, että näytesarjojen keskiarvot eivät poikkea toisistaan.

Taulukko 15. Kalibroi- ja vertailusuoran valmistaminen

	Normaalisuora	Vertailusuora
Std. 0	3 ml puskuria + 2 ml STOP	1 ml puskuria + 2 ml substraattia + 2 ml STOP
Std. 1	1 ml std. + 2 ml puskuria + 2ml STOP	1 ml std. + 2 ml substraattia + 2ml STOP
Std. 2	1 ml std. + 2 ml puskuria + 2ml STOP	1 ml std. + 2 ml substraattia + 2ml STOP
Std. 3	1 ml std. + 2 ml puskuria + 2ml STOP	1 ml std. + 2 ml substraattia + 2ml STOP

Normaali- ja vertailusuora valmistettiin FTU-menetelmäohjeen mukaisesti kahtena rinnakkaismäärityksenä ja niistä laskettiin keskiarvo.

Taulukon 16 tuloksista havaitaan, että substraattia sisältävän suoran absorbanssit ovat hieman korkeammat, kun puskuria sisältävän suora. Kalibrintinollien ero oli 0,040.

Taulukko 16. Puskuria ja substrattia sisältävien suorien absorbanssiarvot 2.5.2015

	Konsentraatio (mg/l)	Abs. (puskuri)	Abs. (substraatti)
Std. 1	0,012	0,214	0,225
Std. 2	0,030	0,619	0,628
Std. 3	0,048	1,022	1,029

Testissä oli mukana vertailunäyte, kaksi kasvatusnäytettä sekä nestenäyte. Spektrofotometri nollattiin kalibrintisuoran nollanäytteellä ja määritettiin suora. Näytteet mitattiin sekä puskuria sisältävää suoraa että substraattia sisältävää suoraa vastaan. Näytteet mitattiin kolmena rinnakkaismäärityksenä, joista laskettiin keskiarvo. Näytteiden tulokset ovat taulukossa 17 (s. 33).

Taulukko 17. Näytteiden tulokset 2.5.2015

	Normaalisuora (FTU/g)	Vertailusuora (FTU/g)	Ero (%)
Vertailu	6 337	6 280	0,89
Kasvatusnäyte 1	35 740	35 442	0,83
Kasvatusnäyte 2	81 943	81 214	0,66
Nestenäyte	55 448	55 081	0,89

Näytteiden fytaaasiaktiivisuuspitoisuudet eroavat noin 0,82 % normaalista tehtyä ja vertailusuoraa vasten laskettaessa. Ero on niin pieni, että voidaan katsoa sen johtuvan analyysihajonnasta.

Suoran testauksen arvioimiseen käytettiin t-testiä. Nollahypoteesina oletettiin, että näytesarjojen arvot eivät eroa toisistaan. T-testi tehtiin Excelin t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances avulla. T-testi laskettiin kaavalla 19 (s. 13). Testin tulokset on esitetty taulukossa 18 sekä liitteessä 1.

Taulukko 18. t-testin tulokset. P-arvo kuvaa erehtymisriskiä, jos nollahypoteesi hylätään.

Näyte	t-testin arvo	P(T<=t)
Vertailunäyte	0,5810	0,5869
Kasvatusnäyte 1	0,2807	0,7929
Kasvatusnäyte 2	0,3497	0,7442
Nestenäyte	0,1175	0,9122

T-testin arvoiksi saatiin laskemalla 0,1175–0,5810. Näytteistä lasketut t-testin arvot olivat pienempiä, kuin t-testin kriittinen arvo 1 % merkitsevyystasolla vapausastein 4, joka on 4,6041. T-testin mukaan normaalisuoran ja vertailusuorien näytteiden arvot eivät eroa toisistaan. Tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä.

Suorien arvioimiseksi käytettiin myös varianssianalyysiä pienen otoskoon vuoksi. ANOVAn arvoiksi saatiin laskemalla 0,014–0,348. Näytteistä lasketut ANOVAn arvot olivat pienempiä, kuin kriittinen arvo 1 % merkitsevyystasolla, joka on 21,1978. ANOVAn mukaan normaalisuoran ja vertailusuorien näytteiden arvot eivät eroa toisistaan. Tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä. ANOVA tehtiin Excelin ANOVA: Single Factor avulla. ANOVAn tulokset ovat taulukossa 19 (s. 34) sekä liitteessä 2.

Taulukko 19. ANOVAn tulokset. P-arvo kuvaa erehtymisriskiä, jos nollahypoteesi hylätään.

Näyte	ANOVA	P
Vertailunäyte	0,348	0,5869
Kasvatusnäyte 1	0,079	0,7929
Kasvatusnäyte 2	0,122	0,7442
Nestenäyte	0,014	0,9122

5.2 Fytaaasiaktiivisuuden määrittäminen PPU-menetelmällä

Harmonisoinnin myötä FTU-menetelmässä otettiin käyttöön uusi substraatti. PPU-menetelmässä käytettiin samaa substraattia, kuin FTU-menetelmässä, jolloin myös PPU-menetelmän substraatti vaihtui. PPU-menetelmässä tutkittiin vaihdoksen aiheuttamia muutoksia näytteiden fytaaasiaktiivisuus tasoissa. Pienimuotoisten testien jälkeen todettiin, ettei PPU-menetelmän fytaaasiaktiivisuustaso muutu, jolloin menetelmää ei validoitu uudelleen.

5.2.1 Substraattitestaus

Substraattitestaus toteutettiin analysoimalla samassa näytestarjassa näytteet uudella ja vanhalla substraatilla. Tulokset on esitetty taulukossa 20.

Taulukko 20. Substraattitestin näytemäärät, tulokset ja uuden ja vanhan substraatin entsyymiaktiivisuustason ero prosentteina.

	n	PPU/g Vanha subst.	PPU/g Uusi substr.	Ero (%)
Vertailunäyte	5	7 365	7 420	0,30
Kasvatusnäyte	2	33 813	33 759	-0,18
Puolivalmiste	1	203 289	199 590	-1,85
Nestenäyte	6	5 865	5 899	0,58
Jauhenäyte	2	6 312	6 420	-1,12

Uuden ja vanhan substraatin välinen aktiivisuusero oli keskimäärin – 0,45 %. Testauksen perusteella voidaan olettaa, ettei substraattien välillä ole eroa. Tulosten perusteella päätettiin, ettei menetelmää testata mittausepävarmuuteen liittyen.

Substraattitestauksen näytteiden eron arvioimiseen käytettiin myös t-testiä. T-testi laskettiin kaavalla 6 (s. 8). Nollahypoteesina oletettiin, että uuden

ja vanhan substraatin antaman tulostason välillä ei ole eroa. T-testin laskemiseen käytettiin substraattitestauksen tuloksia (taulukko 20).

Taulukosta 21 havaitaan, että näytteistä lasketut t-testin arvot olivat pienempiä, kuin t-testin kriittinen arvo kaksisuuntaisessa testissä 1 % merkitsevyystasolla näytteelle ominaisella vapausasteella. T-testin mukaan uuden ja vanhan substraatin antaman tulostason välillä ei ole eroa 99 % luottamustasolla. Tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä.

Taulukko 21. PPU-menetelmän substraattitestauksen näytemäärät, t-testin arvo sekä kriittinen arvo 99 % luottamustasolla vapausastein n-1.

Näyte	n	t-testin arvo	$t_{kr}(0,01;n)$
Vertailunäyte	15	- 0,7177	2,642
Kasvatusnäyte	6	0,0871	3,365
Puolivalmiste	3	0,6420	6,965
Nestenäyte	18	- 1,2227	2,567
Jauhenäyte	6	- 0,9583	3,365

5.2.2 PPU/FTU-kerroin

PPU- ja FTU-menetelmä ovat fytaasin määrittämissä menetelmissä ja niiden välille voidaan määrittää kerroin. PPU/FTU-kerroin oli määritetty Roalin laadunvalvontalaboratoriossa. Kerrointa voidaan käyttää tilanteissa, joissa näytteet joudutaan analysoimaan PPU-menetelmällä ja antamaan tulos FTU/g-yksikössä. Kahden kasvatuksen B32- ja C01-näytteistä määritettiin fytaaasiaktiivisuus PPU- ja FTU-menetelmillä. Tulokset ovat taulukossa 22.

Taulukko 22. PPU/FTU-kerroin testin tulokset

	PPU/g	FTU/g	Suhde
Kasvatus 1 B32	30 849 ± 1 423	40 674 ± 1 104	0,758
Kasvatus 1 C01	27 191 ± 1 001	35 356 ± 1 559	0,769
Kasvatus 2 B32	29 910 ± 1 299	40 949 ± 1 792	0,730
Kasvatus 2 C01	26 683 ± 1 150	35 638 ± 1 974	0,749

Tuloksista laskettiin PPU/FTU-kerroin. Kerroin oli samaa luokkaa, kuin vanhalla substraatilla eli 0,75.

PPU/FTU-kertoimen tarkastelussa käytettiin F-testiä. Testillä haluttiin selvittää PPU- ja FTU-menetelmien vertailukelpoisuutta. F-testi vertaa ovatko kahden menetelmien varianssit yhtä suuria ja sen myötä menetelmien toistotarkkuutta. Testissä nollassa oletettiin varianssien olevan

yhtä suuria. F-testi laskettiin kaavalla 21 (s. 13). F-testin tulokset on esitetty taulukossa 23.

Taulukko 23. F-testin tulokset

	F-testi
Kasvatus 1 B32	1,6601
Kasvatus 1 C01	2,4243
Kasvatus 2 B32	1,9035
Kasvatus 2 C01	2,9469

F-testin arvoiksi saatiin 1,6601–2,9469. Näytteistä lasketut F-testin arvot olivat pienempiä, kuin F-testin kriittinen arvo 1 % merkitsevyystasolla vapausastein 4, joka on 99. F-testin mukaan normaalisuoran ja vertailusuorien näytteiden varianssit eivät poikkea toisistaan 99 % luottamustasolla. Tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä.

F-testin tuloksen perusteella FTU- ja PPU-menetelmien varianssit ovat yhtä suuria ja sen myötä menetelmien toistotarkkuudet eivät poikkea toisistaan.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää substraattivaihdoksen aiheuttamia muutoksia FTU- ja PPU-menetelmissä. Tutkimus painottui FTU-menetelmään, joka validoitiin uudelleen. FTU-menetelmästä tutkittiin validointia varten uusittavuus, toistettavuus, tarkkuus, lineaarisuus ja mittausepävarmuus. Aiemmassa validoinnissa oli tutkittu lisäksi havaitsemis- ja määritysrajat sekä häiriönkestävyyttä. Menetelmän kalibroitaisuoran valmistuksessa testattiin käyttää puskurin sijaan substraattia ja sen vaikutuksia menetelmään tutkittiin. FTU- ja PPU-menetelmissä tutkittiin substraattivaihdoksen aiheuttamia muutoksia näytteiden fytaaasiaktiivisuustasoihin. Lisäksi määritettiin PPU/FTU-kerroin.

FTU-menetelmä validoitiin substraattivaihdoksen myötä uudelleen. Menetelmän spesifisyyttä ei tässä työssä määritetty, koska tiedettiin, että menetelmä ei ole spesifinen fytaasille. Muut fosfataasit vääristävät tulosta ja tästä syystä työ vaatii fosfaatittomat astiat. Menetelmän fosfaattiherkkyys tuo analytiikkaan haasteita ja sitä tarkasteltiin validoinnin yhteydessä. Fosfaattiherkkyttä vähentäviä toimintatapoja löydettiin, mutta ne vaativat vielä lisää selvitystä, jotta menetelmästä saataisiin stabiilimpi.

Menetelmän lineaarisuutta tutkittaessa todettiin, että kalibroitaisuoraa vasten laskettuja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Lineaarisen alueen testeissä havaittiin, että tulosten perusteella menetelmän lineaarisesta absorbanssialueesta olisi mahdollista laajentaa, mutta siihen ei ole tarvetta riittävän laajan lineaarisen alueen vuoksi. 2012 validoinnissa määritettyjä havaitsemis- ja määritysrajoja ei määritetty uudelleen. Entsyymit ovat tyypil-

lisesti voimakkaasti konsentroituja, joten havaitsemis- ja määritysrajoilla on käytännön merkitystä vain, jos määritetään entsyymien sivuaktiivisuuksia.

Menetelmän tarkkuus on z-arvon mukaan hyväksyttävä. Tulosten perusteella menetelmän toistettavuus ja uusittavuus ovat hyvällä tasolla, kun niitä verrataan vastaaviin tuloksiin muilla entsyymiaktiivisuusmenetelmillä. Menetelmän mittausepävarmuus oli hyväksyttävällä tasolla. Tutkimuksen tuloksia verrattiin aikaisempaan validointiin ja havaittiin, että menetelmä toimii edelleen tarkoituksen mukaisesti. Validoinnin tulokset huomioitiin Roalin laadunvalvontalaboratoriossa.

Substraattivaihdoksen myötä FTU-menetelmän entsyymiaktiivisuuden tulostaso laski noin viisi prosenttia. Roalin laadunvalvontalaboratorion FTU-menetelmän entsyymiaktiivisuusanalyysien tulostaso oli noin viisi prosenttia korkeampi kuin ESC-laboratorion. ESC-laboratorio käytti uutta substraattia analyyseissä, joten tulostason pitäisi yhtenäistyä substraattivaihdoksen myötä. Tuotehallinnoinnissa tehtiin muutoksia entsyymiaktiivisuustason laskun myötä. PPU-menetelmässä substraattivaihdos ei vaikuttanut entsyymiaktiivisuuden tulostasoon, jolloin ei tarvittu vastaavia toimenpiteitä tuotehallinnoinnin osalta, kuin FTU-menetelmässä.

PPU/FTU-kerroin tarkistettiin substraattivaihdoksen myötä ja sen havaittiin olevan sama, kuin edellisessä tutkimuksessa. FTU- ja PPU-menetelmien variansseja tarkastellessa todettiin, että varianssit ovat yhtä suuria ja sen myötä menetelmien toistotarkkuudet eivät poikkea toisistaan. Tuloksen myötä PPU/FTU-kerrointa voidaan käyttää harkitusti Roalin laadunvalvontalaboratorion fytaaasiaktiivisuusanalytiikan tukena.

FTU-menetelmässä tutkittiin substraatin vaikutusta kalibroitaisuorassa. Tulosten perusteella näytteiden entsyymiaktiivisuustasossa ei havaittu muutosta. Harmonisoinnin myötä kaikki Roalin yhteistyölaboratoriot ottivat kalibroitaisuorassa substraatin käyttöön. Osa yhteistyölaboratorioista käytti jo aikaisemmin tätä tapaa analytiikassaan. Roalin laadunvalvontalaboratorio otti substraatin käyttöön kalibroitaisuorassa kesäkuussa 2015.

Yhteenvedona voidaan todeta, että tutkimuksen tavoite saavutettiin. Tutkimuksessa saatiin tietoa substraattivaihdoksen aiheuttamista muutoksista FTU-menetelmässä ja pystyttiin varmistamaan menetelmän toimivuus sekä luotettavuus. PPU-menetelmän osalta saatiin tietoa, ettei menetelmän antamassa fytaaasiaktiivisuustasossa tapahtunut muutoksia substraattivaihdoksesta johtuen. FTU-menetelmän osalta olisi kuitenkin syytä tutkia lisää fosfaattiherkkyydestä johtuvien haasteiden syitä ja saada menetelmästä stabiilimpi tämän myötä.

LÄHTEET

- Aittomäki E., Eerikäinen T., Leisola M., Ojamo H., Suominen I. & von Weymarn N. 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo
- Beniwal, V. & Sharma, A. 2014. Industrial Enzymes: Trends, Scope and Relevance. USA. Viitattu 1.7.2015. Saatavissa Ebrary-tietokannassa: <http://site.ebrary.com.ezproxy.hamk.fi/lib/hamk/reader.action?ppg=28&docID=10895197&tm=1440497698329>
- Challenge Group. Phytase 2004. Viitattu 6.6.2015
<http://www.challenge.com.cn/english/uploadfile/200710/20071015075336160.jpg>
- Eerola, S. 2015. Entsyymit pyörittävät maailmaa. Teoksessa Kallio, H. & Metsämarttila, A. (toim.) 45 vuotta pohjoismaista elintarviketutkimusta Turun yliopistossa. Turku: Multiprint Oy, 83.
- Ehder, T. 2005. Kemian metrologian opas J6/2005. Helsinki: Mittatekniikan keskus. Viitattu 8.5.2015
http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j6_05_b5_nettiin.pdf
- Holopainen M. & Pulkkinen P. 2013. Tilastolliset menetelmät. Helsinki: WSOY.
- Koivunen E. 2013. Fytaasi parantaa fosforin hyötykäyttöä. Viitattu 9.6.2015
https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/Tietosiilo/Tietokortit/tk_fytaasi%20siipikarjalle%20valmis.pdf
- Leivuori, M. 2014. Onnistunut vertailumittaus. Viitattu 30.9.2015
http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/tapahtumat/labra/laba2014/onnistunut_vertailumittaus__mirja_leivuori.pdf
- Magnusson B., Näykk T., Hovind H. & Krysel M. 2012. Calculation of Measurement uncertainty in environmental laboratories. Viitattu 5.6.2015
<http://www.nordtest.info/index.php/technical-reports/item/handbook-for-calculation-of-measurement-uncertainty-in-environmental-laboratories-nt-tr-537-edition-3.html>
- Niiranen, J. & Jaarinen, S. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Nousiainen, P. 2010. Tilastolliset testit. Viitattu 28.5.2015
https://docs.google.com/document/d/11J-pJfpCIgOEAJqEnkkyg_6JDcDpX7Sk3_5paZ6gW6s/edit

Oakley, A.J/RCSB Protein Data Bank 2010. Aspergillus Niger Phytase. Viitattu 30.6.2015
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3k4p>

Opetushallitus n.d. Solun toiminnalle tärkeät orgaaniset yhdisteet. Viitattu 23.8.2015
<http://www02.oph.fi/etalukio/biologia/kurssi2/orgaaniset.html>

Pandley A., Webb C., Soccol C., Larroche C. 2006. Enzyme Technology. Viitattu 9.6.2015
Saatavissa Google Books -tietokannassa:
<https://books.google.fi/books?id=x13NiCGHMT8C&lpg=PA370&dq=phytase&pg=PP1#v=onepage&q&f=true>

Piironen, J. 2012. In-house method validation for phytase activity

Rantakylä, P. 2014. F-testi. Biometria opintojakson kurssimateriaali. Hämeen ammattikorkeakoulu

Saari, L. 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus. Viitattu 15.5.2015
http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoriot toiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf

Ylitalo, A. 2012. CRP- määrittämenetelmän validointi. Oulun seudun ammattikorkeakoulu. Laboratorioalan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Viitattu 15.5.2015
<http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2012110714981>

HAASTATTELUT

Eerola, S. 2015. Quality Control Manager. Roal Oy. 29.9.2015

T-TESTIN TULOKSET

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
Vertailunäyte

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	6336,666667	6280,333333
Variance	13346,333333	14004,333333
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	0,589986561	
P(T<=t) one-tail	0,293458233	
t Critical one-tail	3,746947388	
P(T<=t) two-tail	0,586916466	
t Critical two-tail	4,604094871	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
Kasvatusnäyte 1

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	35739,66667	35442
Variance	1692329,333	1681671
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	0,280684397	
P(T<=t) one-tail	0,396435968	
t Critical one-tail	3,746947388	
P(T<=t) two-tail	0,792871936	
t Critical two-tail	4,604094871	

T-TESTIN TULOKSET

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
Kasvatusnäyte 2

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	81942,66667	81214
Variance	6176830,333	6845637
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	0,349738056	
P(T<=t) one-tail	0,372086419	
t Critical one-tail	3,746947388	
P(T<=t) two-tail	0,744172839	
t Critical two-tail	4,604094871	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
Nestenäyte

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	55448	55081,33333
Variance	14409391	14827625,33
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	0,117453384	
P(T<=t) one-tail	0,456081111	
t Critical one-tail	3,746947388	
P(T<=t) two-tail	0,912162221	
t Critical two-tail	4,604094871	

ANOVAN TULOKSET

Anova: Single Factor
Vertailunäyte

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	3	19010	6336,667	13346,33
Column 2	3	18841	6280,333	14004,33

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	4760,167	1	4760,167	0,348084	0,586916	21,19769
Within Groups	54701,33	4	13675,33			
Total	59461,5	5				

Anova: Single Factor
Kasvatusnäyte 1

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	3	107219	35739,67	1692329
Column 2	3	106326	35442	1681671

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	132908,2	1	132908,2	0,078784	0,792872	21,19769
Within Groups	6748001	4	1687000			
Total	6880909	5				

ANOVAN TULOKSET

Anova: Single Factor
Kasvatusnäyte 2

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	3	245828	81942,67	6176830
Column 2	3	243642	81214	6845637

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	796432,7	1	796432,7	0,122317	0,744173	21,19769
Within Groups	26044935	4	6511234			
Total	26841367	5				

Anova: Single Factor
Nestenäyte

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	3	166344	55448	14409391
Column 2	3	165244	55081,33	14827625

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	201666,7	1	201666,7	0,013795	0,912162	21,19769
Within Groups	58474033	4	14618508			
Total	58675699	5				