

Tapio Flinck

# Fytaasianalytiikan automatisointi

---

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

4.12.2016

Tekijä(t) Otsikko	Tapio Flinck Fytaaasianalytiikan automatisointi
Sivumäärä Aika	30 sivua + 1 liitettä 4.12.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biotekniikka
Ohjaaja(t)	Yliopettaja, Kari Salmi Laboratorion työnjohtaja, Päivi Kaartinen
<p>Työn tarkoituksena oli selvittää, onko fytaasi-entsyymianalyysi mahdollista siirtää Tecan Freedom EVO -pipetointirobotille suoritettavaksi. Työn tilasi Roal Oy ja työ suoritettiin Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa. Tulokset analysoitiin R-ohjelmalla.</p> <p>Työhön sisältyi myös analyysiohjelman luominen Tecan Freedom evon omalla ohjelmointi-työkalulla.</p> <p>Analyysin siirtäminen vähentää reagenssien kulutusta ja lisää työergonomiaa. Myös riskiä altistua haitallisille aineille voidaan vähentää, kun aineita ei tarvitse käsitellä muutoin kuin reagensseja valmistettaessa.</p> <p>Tuloksissa todettiin, että Tecan Freedom EVO -pipetointirobotti antaa suuremman hajonnan analyysissään, kuin jos analyysi tehdään käsin. Tosin pipetointirobotin hajonnan luottamusvälit osuvat tämänhetkisen analyysin luottamusvälien sisälle. Luottamusvälien perusteella analyysi voidaan siirtää pipetointirobotille.</p>	
Avainsanat	Fytaasi, Entsyymi, Automatisointi

Author(s) Title	Tapio Flinck Phytase analysis automation
Number of Pages Date	30 pages + 1 appendices 4 December 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Kari Salmi, Pricipal Lecturer Päivi Kaartinen, Laboratory Supervisor
<p>The aim of this thesis project was to transfer manual phytase-enzyme analyse to Tecan Freedom EVO pipetting robot. The project was commissioned by Roal Oy and research part of the project was made in the quality control laboratory of Roal Oy. Data were analyzed with the R program.</p> <p>This project also involved programing a new protocol for Tecan freedom EVO.</p> <p>Transferring the analysis process to a pipetting robot reduces the use of reagents and other waste and improves working ergonomics. It also reduces the risk for exposure of harmful chemicals when laboratory workers do not have to handle chemicals as much as they used to.</p> <p>After the data were analyzed an assumption was made that the phytate enzyme analysis could be transferred to the pipetting robot. Although the robotic analysis gave a large statistical variation that manual analysis, the confidence intervals of this variation fall within those of the present manual analysis. Therefore, is safe to say that the analysis process can be transferred to the robot.</p>	
Keywords	phytase, enzyme automation

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Fytaasi	2
2.1	Fytaasin ominaisuudet	2
2.2	Fytaasin käyttö ja sovellukset	3
3	Fytaasin määrittäminen	4
3.1	FTU-analyysi	4
3.2	Työturvallisuus	4
3.3	Näytteiden esikäsittely	4
3.4	Fytaasin määrittäminen	5
4	Tecan Freedom EVO	6
4.1	EVO:n rakenne	6
4.2	Pipetointi	7
4.2.1	Nestepinnan tunnistus	7
4.2.2	Tukoksen tunnistaminen	8
5	Käytännön osuus	10
5.1	Testiasetus	10
5.2	FTU-ohjelma EVOlle	10
5.3	FTU-ohjelman rakenne	10
5.4	Ohjelman testauksessa ilmenneet ongelmat	11
6	Tulokset ja matemaattinen tarkastelu	13
6.1	Hypoteesit	13
6.2	P-arvo	13
6.3	Tulokset	16
6.4	T-testi ja T-arvo	20
6.5	Systemaattinen virhe	24
6.6	Luottamusvälit	25
7	Johtopäätökset ja pohdintaa	27
	Lähteet	29

## Liitteet

Liite 1. Fytaasin aktiivisuuden määrittäminen

## Lyhenteet

FTU Fytaaasiaktiivisuusyksikkö

g Putoamiskiihtyvyys

LIHA Nesteenkäsittely-yksikkö (liquid handling arm)

## 1 Johdanto

Fytaaasi on yksi paljon käytetty entsyymi rehuteollisuudessa. Se pilkkoo rehun fytiinihappoa, jolloin siitä vapautuu orgaanisia fosforiryhmiä. Nämä fosforiryhmät imeytyvät paremmin karjaeläinten suolistossa ja vähentävät tarvetta lisätä fosforia eläinten rehuun.

Roal Oy on yksi maailman suurimmista entsyymintuottajista, ja yritys on perustettu vuonna 1991 silloisen Alkon ja saksalaisen Röhm GmbH:n toimesta. Roal Oy tuottaa monenlaisia entsyymejä, muun muassa elintarvike-, tekstiili- ja rehuentsyymejä. (Roal Oy)

Tässä insinööriyössä oli tarkoituksena siirtää fytaasientsyymianalyysi koneelliseksi. Työ tehtiin Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa ja tuloksia analysoitiin R-ohjelmalla, joka on matemaattinen analyysiohjelma. R on vapaasti netistä ladattava vapaan lähdekoodin ohjelma, jonka avulla on helppo tehdä analyysijä matemaattisesta datasta.

Fytaasientsyymianalyysi on siitä haastava tutkimuskohde, että se on erittäin herkkä muillekin fosforijäämille kuin ainoastaan analyysissä syntyvälle fosforille. Näin esimerkiksi pesuaineissa tai muissa analyysissä käytettävä fosfori voi kontaminoida analyysin ja vääristää tuloksia huomattavasti. (Qvirist, ym. 2015)

Automatisointi hyödyttää laadunvalvontalaboratoriota monella tavalla. Ensinnäkin tarvittavien reagenssien määrä vähenee, koska pipetointirobotti pystyy tekemään analyysin pienemmällä määrällä reagensseja. Myös haitallisille reagensseille altistumisen riski pienenee, kun reagensseja ei tarvitse käsitellä muutoin kuin niitä valmistettaessa.

Automatisoinnin myötä pystytään vähentämään myös syntyvän jätteen määrää, koska analyysi on mahdollista suorittaa lasista valmistetuissa koeputkissa. Käsintehdyssä analyysissä on käytetty muovisia kertakäyttöisiä koeputkia.

## 2 Fytaaasi

### 2.1 Fytaasin ominaisuudet

Fytaaasi on ollut yksi rehuteollisuuden keskeisemmistä entsyymeistä jo pitkään. Sen avulla voidaan parantaa rehusta hyödynnettävissä olevien ravinteiden saantia. Fytaaasilla on myös muita myönteisiä ominaisuuksia. Se muun muassa vähentää ympäristökuormitusta, kun rehuun ei tarvitse erikseen lisätä fosforia. Kaikki lisätty fosfori ei imeydy karjaeläinten suolistossa vaan päätyy ulosteeseen ja sitä kautta mahdollisesti vesistöihin. Vesistöihin päätynyt fosfori rehevöittää ympäristöä ja lisää ympäristökuormitusta. (Polaina & MacCabe. 2014: 505; Karhapää. 2014; Aittomäki ym. 2002: 115)

Useat kasvit varastoivat fosforia fytiinihappona ja vapauttavat fosforia fytiinihaposta pilkkomalla sitä tarpeen mukaan. Fytaaasi pilkkoo fytiinihappoa hydrolyyttisesti (kuva1). Monet karjaeläimet, kuten siat ja kalkkunat, eivät pysty hyödyntämään fytiinihappoon sidottua fosforia. Fytiinihapposta pilkottuja fosforiryhmiä karjaeläimet kuitenkin pystyvät hyödyntämään, ja näin voidaan välttää ylimääräisen fosforin lisäys rehuun. Kun fosforia ei tarvitse lisätä rehuun, fosforin pitoisuus karjan tuottamassa ulosteessa vähenee, jolloin myös ympäristökuormitus pienentyy. (Polaina & MacCabe. 2014: 505; Aittomäki ym. 2002: 115; Opetushallitus. Solun toiminnalle tärkeät yhdisteet.)

Fytaaasia on eristetty sienistä, hiivoista, bakteereista ja alkueliöistä. Ensimmäisenä fytaaasia eristettiin kaupallisesti *Aspergillus niger* -homeesta. (Polaina & MacCabe. 2014: 506)

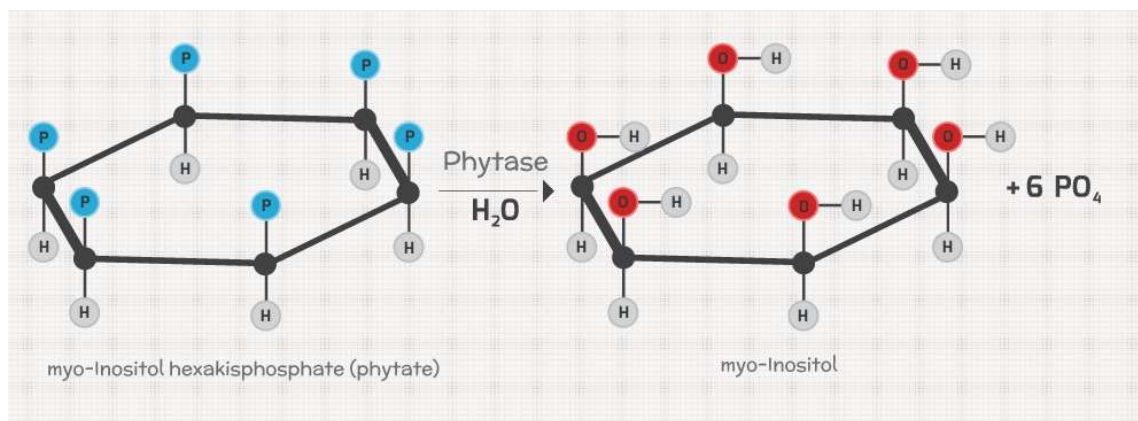
Joiltain eläimiltä eristetyissä kudoksenäytteissä on pystytty todentamaan fytaasiaktiivisuutta, mutta miltään eläimeltä ei ole pystytty täysin karakterisoimaan fytaaasia. Karakterisoinnin puuttumisen on osaksi arveltu johtuvan siitä, että eläimen oma fytaaasi jää osin tai täysin eläimen suolistossa elävien bakteereiden fytaasin varjoon. Suurin osa juuri eläinten paksusuolesta ja pötsistä eristetystä fytaasista on todettu olevan bakteeriperäistä. (Polaina & MacCabe. 2014: 508)



## 2.2 Fytaaasin käyttö ja sovellukset

Fytaaasia käytetään laajalti eläinten rehussa pilkkomaan fytiinihapon fosforiryhmiä. Fosforiryhmät ovat pilkottuina eläimille paljon helpommin hyödynnettävissä. Fytaaasin lisäämisen avulla voidaan välttää fosforin lisääminen rehuun. Siat pystyvät käyttämään maissipohjaisesta rehusta fosforia noin 18 % ilman lisättyä fytaaasia. Kun rehuun lisättiin fytaaasia, fosforin imeytymisen todettiin lisääntyneen 18 %:sta 56 %:iin. Vehnäpohjaisella rehulla fosforin hyödyntäminen nousi 62 %:sta 74 %:iin ja ruisvehnällä fosforin imeytyminen nousi 52 %:sta 67 %:iin. (Polaina & MacCabe. 2014: 516; Koivunen. 2013)

Fytiinihapolla on myös todettu olevan ominaisuuksia, jotka haittaavat ravinnon imeytymistä. Tätä ominaisuutta kutsutaan yleisesti antiravitsemukselliseksi ominaisuudeksi. Esimerkiksi fytiinihappo saattaa joissain tilanteissa muodostaa kompleksin ravitsemuksen kannalta tärkeiden metalli-ionien kanssa. Tämä kompleksit ei pääse imeytymään suolistossa vaan päätyy ulosteeseen ja näin pienentää osaltaan rehun ravintoarvoja. Yleisimmät ionit, joiden kanssa fytiinihappo muodostaa kompleksin, ovat rauta ja sinkki. Pilkottu fytiinihappo ei kykene muodostamaan kompleksia, jolloin myös muun muassa raudan ja sinkin imeytyminen rehusta paranee. (Polaina & MacCabe. 2014: 517; MTT Kotieläintuotannon tutkimus. 2014)



Kuva 1. Fytaaasin hydrolyyttinen pilkkoutuminen (Früge. 2015).

### 3 Fytaasin määrittäminen

#### 3.1 FTU-analyysi

FTU-analyysi on kehitetty *E. Colin* tuottaman fytaasin määrittämiseen. Analyysi perustuu natriumfytaatin pilkkoutuessa vapautuvan epäorgaanisen fosforin tunnistukseen värireaktiossa. Väri muodostuu, kun epäorgaaninen fosfori muodostaa kompleksin vanadaatti- ja molybdaatti-ionien kanssa. Muodostunut väri voidaan mitata spektrofotometrillä aallonpituudella 415 nm. Analyysin työohje löytyy viitteistä (viite 1).

#### 3.2 Työturvallisuus

Analyysissä käytettävä ammoniumvanadaatti on myrkyllistä nieltynä ja ärsyttää silmiä, ihoa ja hengityselimiä.

Typpihappo on syövyttävää. Se syövyttää ihoa ja vaurioittaa silmiä.

#### 3.3 Näytteiden esikäsittely

Nestemäisiä entsyymejä punnitaan tarkasti 0,25–0,5 grammaa 25 ml:n mittapulloon, minkä jälkeen mittapullo täytetään merkkiin asti asetaattipuskurilla.

Kuivat entsyymit punnitaan tarkasti 0,5–1,0 grammaa 50 ml:n mittapulloon ja liuotetaan näyte asetaattipuskuriin sekoittaen huoneenlämmössä magneettisekoittajalla 20–30 minuuttia. Tämän jälkeen täytetään mittapullot merkkiin asti asetaattipuskurilla.

Vitamiini/mineraalipremiksejä punnitaan tarkasti 5 grammaa 250 ml:n dekanterilasiin ja lisätään 200 millilitraa vitamiini/mineraalipremiksin uuttopuskuria. Sekoitetaan huoneenlämmössä 30 minuuttia magneettisekoittajalla ja lopuksi sentrifugoidaan 10 minuuttia noin 2 800 x g.

Kaikki näytteet laimennettiin milli-Q-vedellä, joka on erittäin puhdasta ultrasuodatettua vettä. (Milli-Q)

### 3.4 Fytaasin määrittäminen

Laitteet:

- pH-mittari
- analyysivaaka
- magneettisekoittaja
- näytelaimennin
- koeputkisekoittaja
- sentrifugi
- spektrofotometri
- termostoitu lämpöhaude

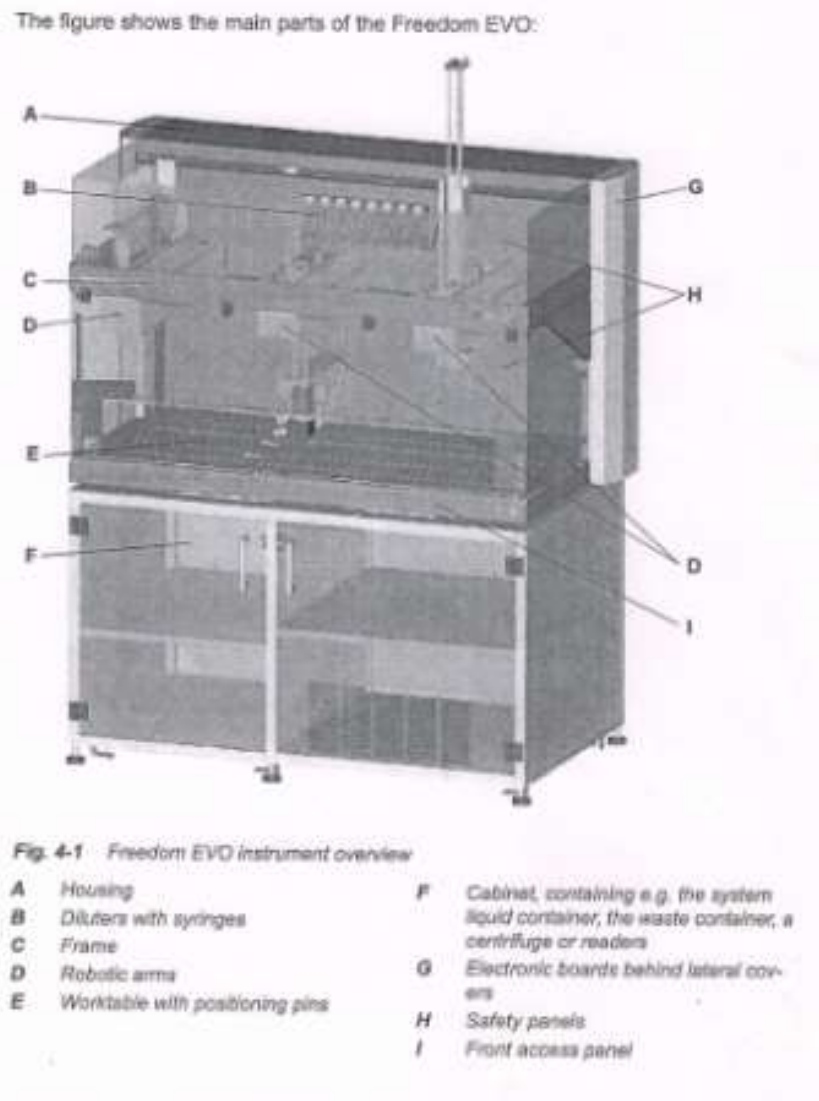
Määrittäminen suoritettiin kolmena päivänä viitenätoista rinnakkaisena näytteenä. Näytteiden esikäsittelyn jälkeen pipetoitiin 2,0 millilitraa natriumfytaattisubstraattia kahteen muoviseen sentrifugiputkeen. Tämän jälkeen putkia ja näytelaimennoksia temperoitiin 37 °C:ssa 5–10 minuuttia. Tämän jälkeen näytelaimennosta lisättiin toiseen substraattia sisältävistä putkista 1,0 millilitraa ja putkia inkuboitiin tasan 60 minuuttia 37 °C:ssa. Kun tasan 60 minuuttia oli kulunut, reaktio pysäytettiin lisäämällä 1,0 millilitraa pysäytysreagenssia. Tämän jälkeen näyte sekoitettiin ja siirrettiin huoneenlämpöön.

Entsyiminollat valmistettiin samalla tavalla kuin näyte. Entsyiminolliin lisättiin ensin substraatti ja sen jälkeen pysäytysreagenssi. Kun substraatti ja pysäytysreagenssi oli sekoitettu riittävän hyvin, lisättiin lopuksi entsyymilaimennos.

Kun näytteet ja entsyiminollat oli valmistettu, niiden annettiin seistä huoneenlämmössä 20 minuuttia. Tämän jälkeen putket sentrifugoitiin 10 minuuttia 2 000 x g. Sentrifugoinnin jälkeen liuos kaadettiin kyvetteihin ja mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä aallonpituudella 415 nm.

## 4 Tecan Freedom EVO

### 4.1 EVO:n rakenne



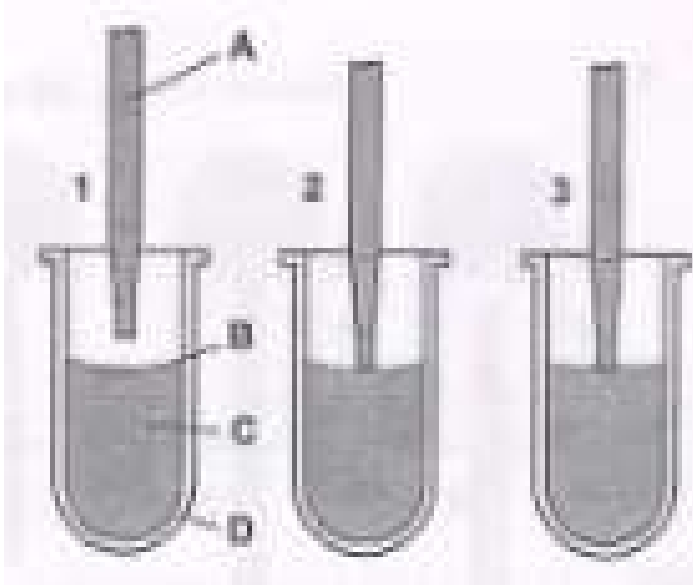
Kuva 2. EVO-pipetointirobotin rakenne (Freedom EVO Operating manual)

EVO-pipetointirobotin komponentit näkyvät kuvassa 2. Tämän työn kannalta tärkeimmät komponentit ovat kuitenkin:

- nesteenkäsittely-yksikkö (LIHA)
- pipetit
- haude
- kuoppalevydike

## 4.2 Pipetointi

Pipetoinnissa Tecan Freedom EVO -pipetointirobotti siirtää tietyn tilavuuden nestettä paikasta toiseen. Pipetointirobotilla on yhteensä kahdeksan kärkeä. Jokaisessa kärjessä on erillinen nestepinnan tunnistus.

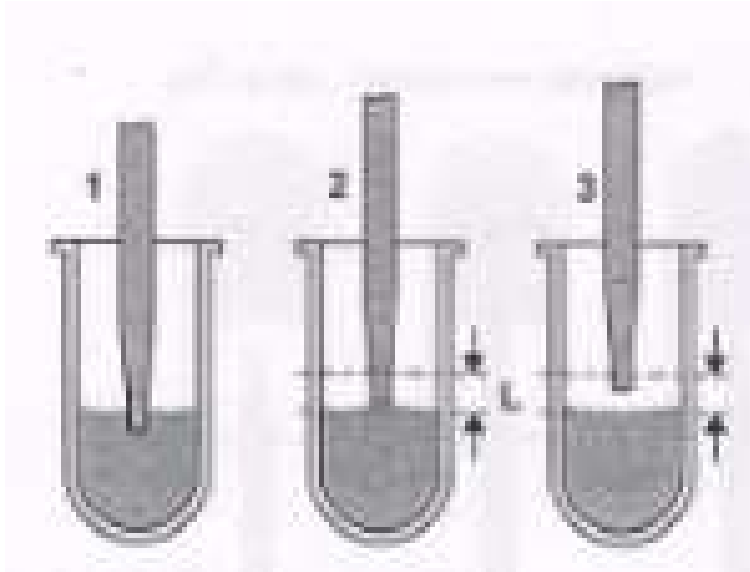


Kuva 3. Pipetointi (Freedom EVO Operating manual)

Kuvassa 3 on esitetty (A) pipetin kärki, (B) nestepinta, (C) neste ja (D) koeputki.

### 4.2.1 Nestepinnan tunnistus

Nestepinnan tunnistus perustuu kapasitanssiin. Kun kärki koskettaa nestepintaa, muutokset kapasitanssissa aiheuttavat signaalin, jonka perusteella laite määrittää nestepinnan. Tämän takia nesteen konduktanssi vaikuttaa suuresti siihen, kuinka hyvin laite pystyy tunnistamaan nestepinnan. Näiden avulla laite arvioi, milloin se koskettaa nestepintaa ja milloin pipetin kärki nousee nestepinnan yläpuolelle. Jokainen kärki tunnistaa nestepinnan itsenäisesti. (Freedom EVO Operating Manual; Tecan Freedom EVO)



Kuva 4. Nestepinnan tunnistus (Freedom EVO Operating manual)

Kuvan parametria  $L$  voidaan säätää helposti ohjelmoinnin aikana. Laitteella on tosin valmiina useita eri vaihtoehtoja nesteelle, jolloin parametreja ei tarvitse itse säätää vaan ohjelma kysyy, minkälainen neste on kyseessä ja säätää parametrit valmiiksi sen mukaan.

Nestepinnan tunnistuksessa voidaan säätää tunnistuksen herkkyyttä. Jos taas halutaan lisätä tarkkuutta, voidaan käyttää nestepinnan tunnistuksessa kaksinkertaista tunnistusta. Kaksinkertaisessa tunnistuksessa nestepinta tunnistetaan kahteen kertaan. Tämä lisää tarkkuutta etenkin tilanteissa, joissa neste vaahtoa helposti ja muodostaa pinnalle kuplia. Jos pipetin kärki osuu kuplaan ensimmäisen tunnistuksen aikana, kupla todennäköisesti puhkeaa. Seuraavalla tunnistuskerralla laite tunnistaa, että kyseessä oli kupla, koska nestepinta on paljon alempana kuin aikaisemmin. (Freedom EVO Operating Manual)

#### 4.2.2 Tukoksen tunnistaminen

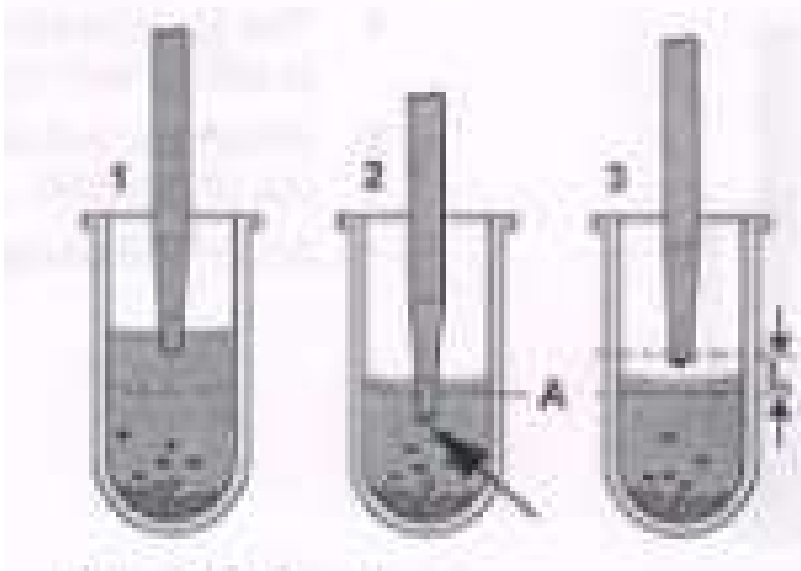
Koska FTU-analyysissä käytettävä vertailunäyte on granuloinut, se muodostaa aina jonkin verran sakkaa etenkin laimennusputken pohjalle. Tämän takia on tärkeää, että EVO-pipetointirobotti pystyy tunnistamaan, mikäli sen pipettiin joutuu sakkaa tai siihen muodostuu tukos. Sakka voi vaikuttaa analyysiin ja sen onnistumiseen häiritsemällä reaktiota tai vaikuttamalla nestetilavuuteen, jota laite pipetoi.

Tukoksen tunnistaminen perustuu nestepinnan tunnistukseen. Laite tarkkailee, missä kohtaa pipetin kärki irtoaa nestepinnasta ja vertaa tätä aikaisempaan tietoon siitä, missä kohtaa pipetin kärki meni nestepinnan alapuolelle. Laite myös seuraa jatkuvasti sitä, missä kohtaa nestepinta on, jotta se osaa pitää pipettien kärjet juuri halutun verran nestepinnan alapuolella.

Jos laite havaitsee tukoksen pipetissä (kuten kuvassa 5), se antaa häiriöilmoituksen. Häiriöilmoitus tulee siinä vaiheessa, kun laite saavuttaa oletetun nestepinnan ja jolloin kärkien kuuluisi olla nestepinnan yläpuolella.

Laitteen olettamaa nestepinnan tasoa voi myös säätää tarvittaessa, jos neste on hyvin viskoosia tai tahmeaa. Häiriösignaali saattaa tulla myös siinä tilanteessa, jos pipetti ei syystä tai toisesta pysty imemään nestettä. Mahdollinen syy voi olla tukos putkistossa, vuoto tai muu toimintahäiriö.

Erityistilanteissa voi olla niin, että näytettä ei ole sentrifugoitu tarpeeksi, jolloin näytteessä on pieniä kelluvia partikkeleita. Tällöin laite saa osan näytteestä imettyä pipettiin, minkä jälkeen pipetti tukkeutuu. Tämänlaisissa tilanteissa laite ei välttämättä tunnista tukosta tai sitä, että pipetissä ei ole oikeaa tilavuutta nestettä. (Freedom EVO Operating Manual)



Kuva 5. Sakan tunnistus (Freedom EVO Operating manual)

## 5 Käytännön osuus

### 5.1 Testiasetus

Koska analyysi on herkkä, eri henkilöt voivat saada systemaattisesti hieman poikkeavia tuloksia toisistaan. Eri henkilöiden tekemät systemaattiset eroavaisuudet testissä poistettiin sillä, että sama henkilö suoritti kaikki testit sekä käsin että pipetointirobotilla. Analyysit suoritettiin eri päivinä. Päivät valittiin sattumanvaraisesti. Näytteenä käytettiin Roal Oy:n laadunvalvontalaboratorion käyttämää standardinäytettä, jonka fytaasipitoisuus tunnetaan ja jota käytetään vertailunäytteenä tulosten luotettavuutta tarkkailtaessa.

### 5.2 FTU-ohjelma EVOlle

Ohjelman tekeminen aloitettiin suunnittelemalla, kuinka telineet asetetaan ja miten pipetointi suoritetaan. Ohjelma päätettiin rakentaa kaksivaiheiseksi. Ensin ohjelma suorittaisi reaktion ja pysäyttäisi sen. Seuraavassa osiossa ohjelma pipetoisi näytteen kuoppalevyille. Syy ohjelman rakentamiselle näin oli se, että reaktion jälkeen näyte tulee sentrifugoida, jotta reaktion aikana muodostunut sakka ei häiritsisi tulosten mittausta spektrofotometrillä tai tukkisi pipetointirobotin kärkiä.

### 5.3 FTU-ohjelman rakenne

Telineet asetettiin niin, että nollaputket ja näyteputket tulivat hauteeseen ja standardisuoran putkia ei laitettu hauteeseen. Kuoppalevy asetettiin sille tarkoitettuun kohtaan.





Kuva 6. Suunnitelmakaavio ohjelman kulusta

Kun pohjasuunnitelma oli saatu valmiiksi (kuva 6), nesteenkäsittelyrobotti oli kohtuullisen helppo ohjelmoida Tecanin EVOWare-ohjelmointityökalulla.

#### 5.4 Ohjelman testauksessa ilmenneet ongelmat

Ohjelmoinnissa ilmeni muutamia ongelmia, joita ratkottiin sitä mukaa, kun ohjelmaa testattiin. Esimerkiksi ohjelmointivaiheessa ohjelmasta puuttui yksi rivi ohjelmasta. Ensimmäinen testiajo suoritettiin käyttämällä reagenssien sijaan milli-Q-vettä. Ohjelman virheen vuoksi EVO pipetoi vettä hauteeseen. Tämä ongelma havaittiin nopeasti ja korjattiin välittömästi ohjelmaan, minkä jälkeen suoritettiin välittömästi uusi testiajo pipetointirobotilla.

Yksi opinnäytetyön tavoitteista oli vähentää reagenssien kulutusta automatisoinnin myötä. Ensiksi reagenssien kulutusta yritettiin vähentää jakamalla kaikkien reagenssien kulutus kahdeksasosaan. Reagensseja pipetoitiin siis ensiksi seuraavat määrät:

- 250 µl substraattia
- 125 µl näytelaimennosta
- 250 µl pysäytysreagenssia

Määrät osoittautuivat kuitenkin liian pieniksi. Tämän pystyi toteamaan siinä vaiheessa, kun robotti ei pystynyt pipetoimaan näytettä kuoppalevyille. Aluksi vaikutti siltä, että ongelma olisi ollut robotin nestepinnan tunnistuksessa tai nesteen tunnistuksessa, mutta melko nopeasti huomattiin, että ongelma on näytteen vähäisyydessä.

Reagenssimääriä suurennettiin siten, että reagensseja käytettiin neljäsosa alkuperäisestä reagenssimäärästä. EVO-pipetointirobotti ohjelmoitiin pipetoimaan seuraavat määrät reagensseja:

- 500 µl substraattia
- 250 µl näytettä
- 500 µl pysäytysreagenssia

Reagenssimäärien lisääminen poisti havaitun ongelman, joka johtui reagenssimäärien vähäisyydestä.

Seuraava ongelma, joka ilmeni, oli näytteiden hyvin vaalea väri mitattaessa. Aluksi näytteiden vaaleuden syyksi epäiltiin, että pysäytysreagenssi ei olisi reagoanut kunnolla pysäytysreagenssin lisäyksen jälkeen. Ongelmaa yritettiin ratkaista ensin sekoittamalla näytteitä ennen sentrifugointia. Tämä ei kuitenkaan tuottanut haluttua tulosta.

Seuraava epäily näytteiden haaleuden syystä kohdistui hauteeseen, jonka tulee olla tasan +37 °C. Hauteiden lämpötilat varmistettiin lämpömittarilla. Hauteen lämpötilaa mitattiin koko ajon aikana, jotta voitiin varmistua siitä, että reagenssien lisäys koeputkiin ei laske hauteiden lämpötilaa merkittävästi. Hauteiden lämpötilan todettiin olevan tavoiteltu +37 °C koko analyysin ajan.

Uudessa testiajossa huomattiin, että näytteet olivat edelleen tavallista vaaleampia. Lopulta näytti ilmeiseltä, että ohjelmassa on oltava vielä virhe siinä kohtaa, kuinka kauan reaktio saa aikaa hauteessa. Ongelmaa yritettiin ratkaista mittaamalla haudeaika sekuntikellon avulla. Mitattaessa huomattiin, että haudeaika oli jäänyt liian lyhyeksi ja se oli vain 50 minuuttia. Ongelma ratkaistiin korjaamalla ohjelmasta haudeaikaa laskevan kellon ajanotto.

## 6 Tulokset ja matemaattinen tarkastelu

### 6.1 Hypoteesit

Matemaattisessa päättelyssä tulee ensin muodostaa hypoteesit, joita voidaan testata matemaattisin menetelmin. Lähtöoletus oli, että keskiarvot eivät eroaisi matemaattisesti merkitsevästi toisistaan, tehtiin analyysi sitten käsin tai pipetointirobotilla.

Matemaattiset hypoteesit:

$H_0$  = Keskiarvojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, riippuen siitä, tehtiinkö analyysi pipetointirobotilla tai manuaalisesti.

$H_1$  = Keskiarvojen välillä on tilastollisesti merkitsevä ero, riippuen siitä, tehtiinkö analyysi pipetointirobotilla tai manuaalisesti.

Jos tilastollinen testi ei osoita muuta, nollahypoteesi jää voimaan.

### 6.2 P-arvo

Matemaattisissa analyyseissä on muutamia yleisesti käytettyjä ja hyödyllisiä tunnuslukuja. Yksi hyvin yleinen tunnusluku on p-arvo, joka kertoo, kuinka suuri on todennäköisyys tehdä virhepäätelmä, jos nollahypoteesi hylätään.

Kun aineistoa tutkitaan matemaattisesti ja päädytään johonkin johtopäätökseen, on neljä vaihtoehtoa, mihin tulokset johdattavat päättelyä ja mikä on todellinen tilanne ai-

neiston kannalta. Seuraavassa on esitetty, mihin tuloksiin johtopäätöksen tekeminen voi johtaa.

1. Nollahypoteesi hylätään ja nollahypoteesi on epätosi, jolloin on tehty oikea johtopäätös.
2. Nollahypoteesi hylätään, vaikka nollahypoteesi on tosi. Tällaisessa tilanteessa on kyse ensimmäisen lajin virheestä, eli toisin sanoen hylkäämisvirheestä.
3. Nollahypoteesi jää voimaan, vaikka nollahypoteesi on oikeasti epätosi. Tässä tilanteessa on kyse toisen lajin virheestä, eli toisin sanoen hyväksymisvirheestä.
4. Nollahypoteesi hylätään ja nollahypoteesi on epätosi, jolloin on saatu tehtyä oikea johtopäätös.

Sama asia voidaan esittää selkeämmässä muodossa taulukoituna.

Taulukko 1) Johtopäätökset esitetty taulukkomuodossa.

	Nollahypoteesi todellisuu- dessa epätosi	Nollahypoteesi todellisuu- dessa tosi
Päätetään hylätä nollahy- poteesi	Oikea päätelmä	Ensimmäisen lajin virhe
Päätetään pitää nollahy- poteesi voimassa	Toisen lajin virhe	Oikea päätelmä

Hylkäämisvirhe halutaan mahdollisimman pieneksi, jolloin p-arvon tulisi olla mahdollisimman pieni T-testissä. Testille voidaan asettaa tietty merkitsevyytystaso. Tämä tarkoittaa sitä, että otetaan tietyn suuruinen riski siitä, että tehdään ensimmäisen lajin virhe (hylkäämisvirhe). Kaikissa analyyseissä virhe on otettava huomioon, mutta hyväksyttä-

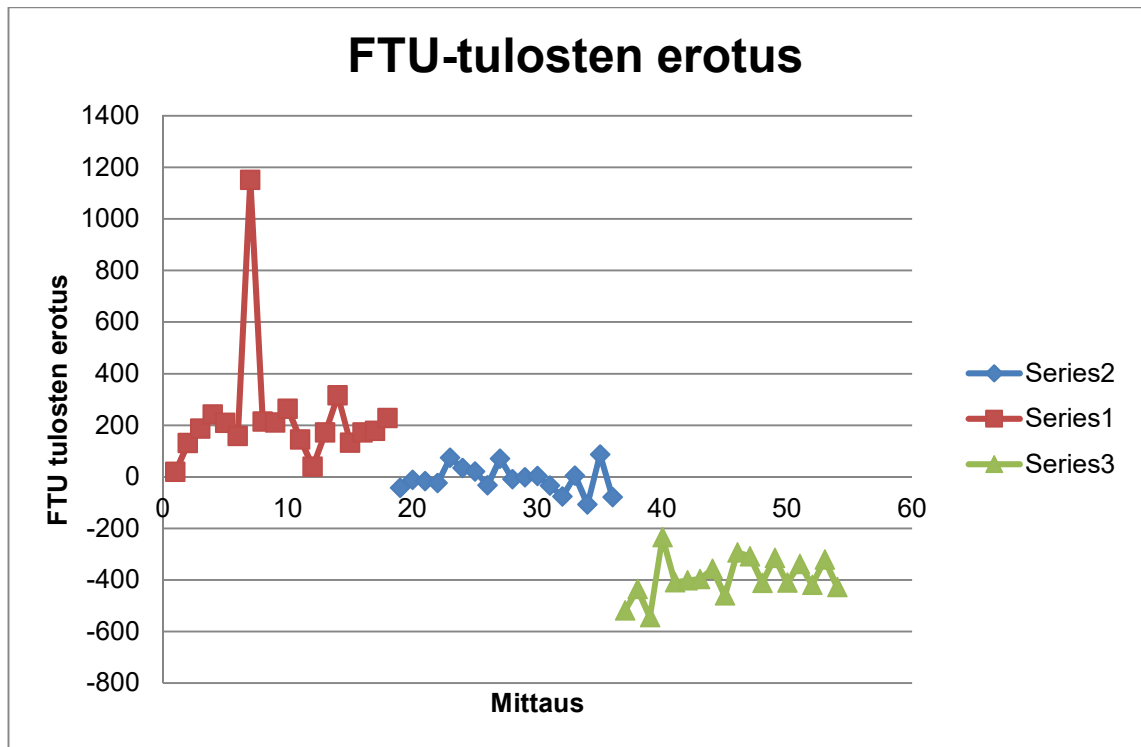
vän virheen arvon voi itse valita. Tietysti tutkittavan asian vakavuudesta riippuen merkitsevyystaso voi olla pienempi tai suurempi. Yleensä luonnollisesti halutaan mahdollisimman pieni merkitsevyystaso, jotta riski ensimmäisen lajin virheelle olisi mahdollisimman pieni. (Holopainen M, ym, 2014; Tilastokeskus)

Yleisesti käytössä olevat merkitsevyystasot:

1.  $\alpha \leq 0,001$  jolloin voidaan sanoa tuloksen tai eron olevan tilastollisesti erittäin merkitsevä
2.  $0,001 \leq \alpha \leq 0,01$  jolloin voidaan sanoa tuloksen tai eron olevan tilastollisesti merkitsevä
3.  $0,01 \leq \alpha \leq 0,05$  jolloin voidaan sanoa tuloksen tai eron olevan tilastollisesti melkein merkitsevä

Tässä työssä merkitsevyystasoksi valittiin  $\alpha = 0,05$ , jonka todettiin olevan riittävän pieni.

## 6.3 Tulokset



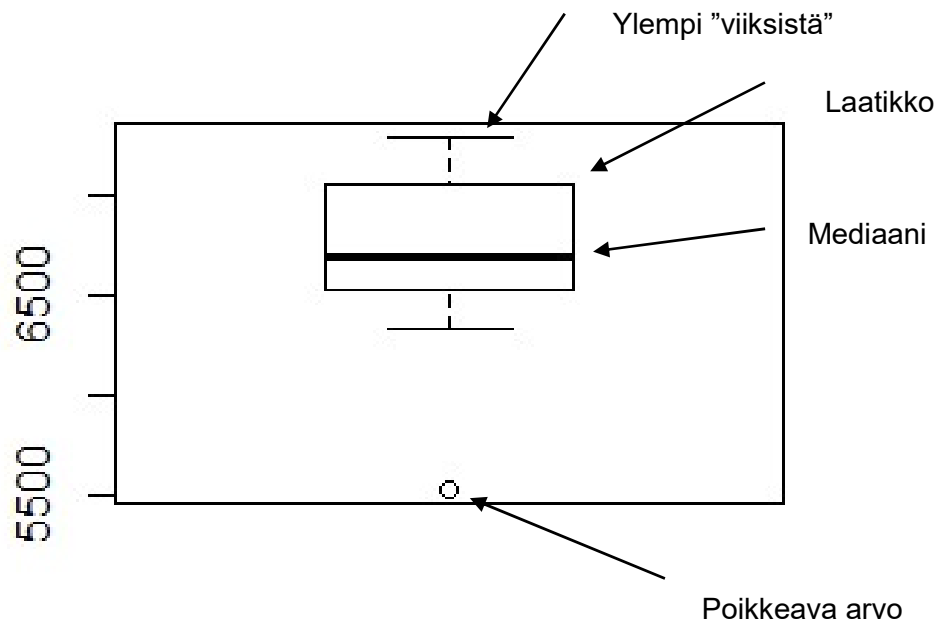
Kuva 7. Tulosten erotuksen kuvaaja. Kuvaajan pisteet laskettuna käsin tehdyistä tuloksista, joista on vähennetty laitteen antamat tulokset.

Kuvassa 7 on kuvattuna suoralle pipetointirobotin ja manuaalisesti tehdyn tulosten erotus. Kuviosta voidaan tarkastella, löytyykö datasta jonkinlaista systemaattista kuviota. Esimerkiksi, jos kuviossa olisi selkeää nousua tai laskua, tästä voisi päätellä, että analyysissä on jokin systemaattinen virhe.

Ensinnäkin kuviosta voidaan havaita selvästi, että yksi arvo poikkeaa selvästi muista arvoista. Tämä arvo voidaan olettaa virheeksi, koska se eroaa huomattavasti muista. Tämän takia arvo jätetään pois, kun dataa tarkastellaan jatkossa. Tämänkaltaiset poikkeavat tulokset voivat vaikuttaa dataa analysoitaessa tehtävien testien tuloksiin, tämä taas voi lisätä riskiä tehdä jokin päätelmävirhe, kuten aikaisemmin jo todettiin.

Muut pisteet osuvat melko hyvin samassa analyysissä osuvien pisteiden kanssa yhteen. Ensimmäisessä ja kolmannessa ajossa huomataan pientä eroavaisuutta, mutta tämä voi selittyä pelkästään analyysin hajonnalla.

Toiseksi kuvioista voidaan havaita, että eri päivinä saadut tulokset muuttuvat systemaattisesti. Ensimmäisenä päivänä pipetointirobotti on antanut keskimäärin pienempää tulosta, kuin käsin tehdyssä analyysissä on saatu. Seuraavana päivänä käsin saadut tulokset ovat melko samaa tasoa kuin pipetointirobotin antamat tulokset, ja kolmantena päivänä käsin saadut tulokset ovat keskimäärin pienempiä kuin pipetointirobotin antamat tulokset.



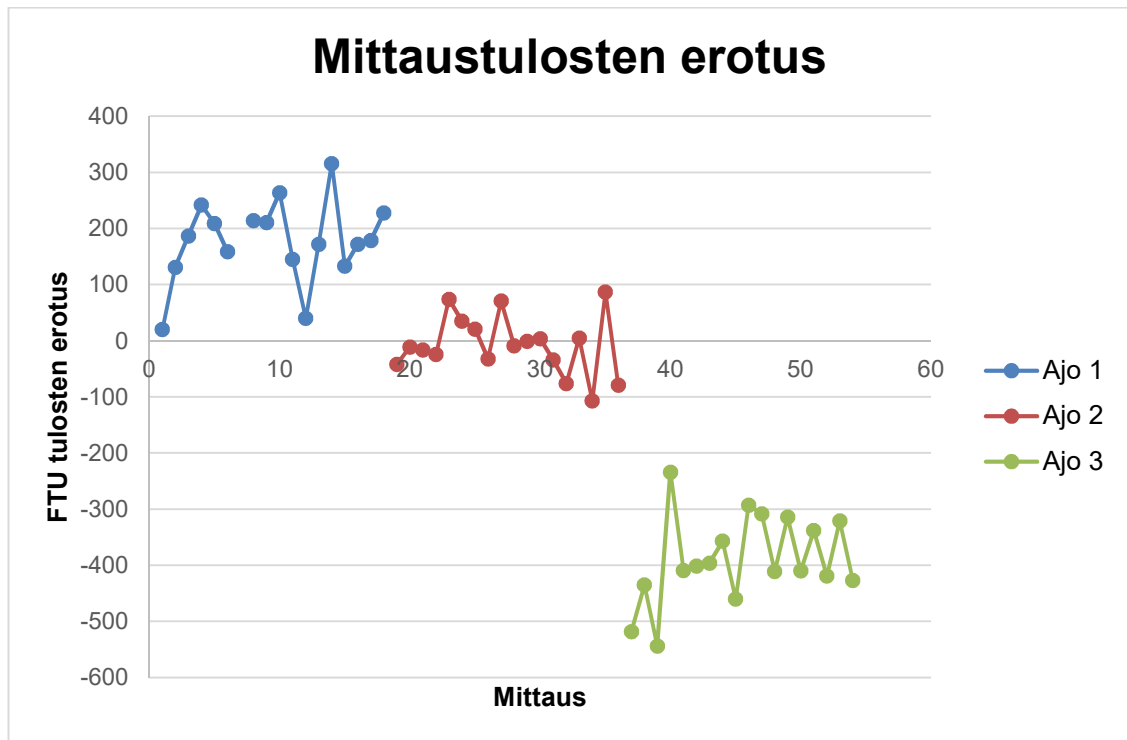
Kuva 8. Pipetointirobotin antamat tulokset, joista poikkeava arvo voidaan havaita selkeästi.

Kuviossa on esitetty tulokset siten, että tummemmalla mustalla viivalla laatikon sisällä on mediaani. Laatikon sisällä on 50 % mitatuista arvoista ja "viiksien" sisään menee 95 % arvoista. Jos yksittäinen poikkeava arvo olisi sisällytetty kuvaajaan, se näkyisi erillisenä pisteenä "viiksien" ulkopuolella, tarkoittaen selkeästi aineistosta poikkeavaa arvoa (outlier). Arvo voidaan viimeistään tässä vaiheessa havaita selvästi poikkeavaksi, ja siksi se on poistettu analyysistä.

Poikkeava arvo voi hyvinkin olla oikea tulos mutta vain hyvin epätodennäköinen sellainen. Todennäköisempää kuitenkin on, että poikkeava arvo on vain mittausvirhe, kon-

taminaatio näytteessä tai muu vastaava virhe, jota ei voi ottaa mukaan tulosten tulkitaan. Poikkeavat arvot voivat vaikuttaa suuresti matemaattiseen analyysiin ja sotkea tuloksia. (Holopainen M, ym, 287)

Tässä kuvaajassa voidaan huomata poikkeava arvo ja poistaa se analyysistä, jotta se ei vääristäisi tuloksia.



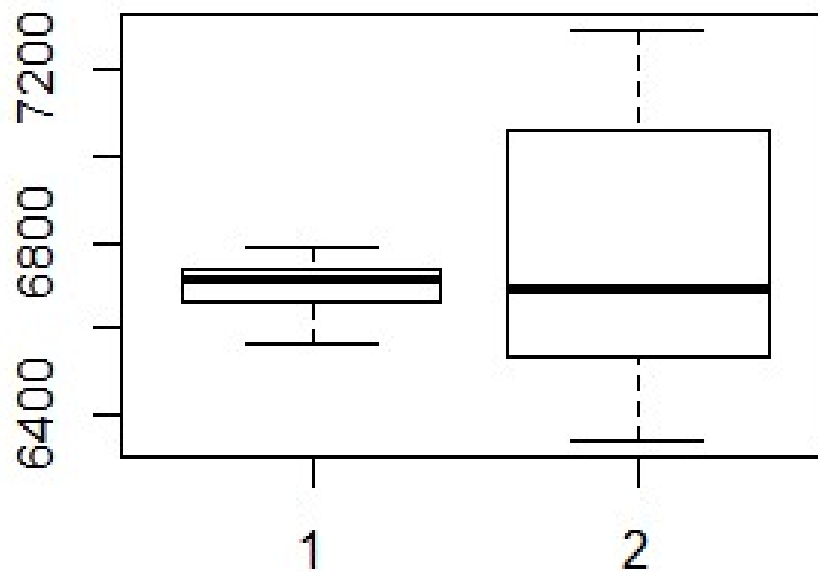
Kuva 9. Erotusten kuvaaja, josta on poistettu poikkeava arvo.

Kuvaajasta voidaan havaita nyt selkeämmin, että erotus jää ensimmäisessä ajossa nollatason yläpuolelle. Toisessa ajossa (punainen viiva) keskiarvojen erotus osuu kohdullisesti nollatason molemmille puolille, kun taas kolmannessa ajossa tulosten erotus osuu selkeästi nollatason alapuolelle.

Vaikka kuvaajasta voidaan huomata, että keskiarvojen erotus poikkeaa ensisilmäyksellä melko paljonkin, on otettava huomioon, että tulosten keskiarvon tulisi kuitenkin olla kutakuinkin 6 899 FTU. Näin ollen ensisilmäyksellä suurelta vaikuttanut pipetointirobotin ja käsin tehdyn analyysien erotusten arvo ei ole kovin suuri verrattuna analyysistä saatavaan oletusarvoon.



Jos tarkastellaan yksittäisiä sarjoja, ei sarjojen sisällä näyttäisi olevan kovin selvää systemaattisuutta, eli arvot ovat melko hyvin sattumanvaraisia. Kuvion sahalaitaisuus on yleensä melko hyvä merkki siitä, että näytteet yksittäisen ajon sisällä eivät vaikuta toisiinsa laskevasti tai nousevasti.



Kuva 10. Box and whiskers -kuvaaja. 1:llä kuvattuna käsin saadut arvot ja 2:lla kuvattuna EVOI-la saadut arvot.

Kuvaajasta voidaan huomata, että mediaanit osuvat melko hyvin kohdakkain, kun analyysin tekee pipetointirobotilla tai käsin. Käsin tehdyssä on kuitenkin selvästi pienempi hajonta kuin koneella saaduissa tuloksissa.

Kuvaaja ei kuitenkaan ota huomioon eri henkilöiden tekemiä analyyseja ja sitä, kuinka paljon hajontaa olisi, jos useampi laborantti olisi tehnyt testit eri kerroilla.

## 6.4 T-testi ja T-arvo

Koneen antamien tulosten oletetaan olevan kutakuinkin normaalijakautuneita, mutta tuloksia ei kuitenkaan ole kovin paljon, tällöin keskiarvoja voidaan arvioida t-testin avulla.

T-testillä voidaan tutkia, eroavatko kahden eri otoksen keskiarvot toisistaan. Tämän avulla voidaan päätellä, onko ero todellinen vai pelkästään satunnaisvaihtelun aiheuttamaa.

Testisuure  $t$  saadaan kaavalla:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s * \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad (1)$$

jossa

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) * s_1 + (n_2 - 1) * s_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} \quad (2)$$

on t-jakautunut vapausastein

$$f = n_1 + n_2 - 2 \quad (3)$$

jos nollahypoteesi on tosi. (Holopainen M, ym, 2014)

Kaavassa (1)  $x_1$  on ensimmäisen muuttujan keskiarvo ja  $x_2$  toisen muuttujan keskiarvo.  $s$  on keskivirhe, joka voidaan laskea kaavalla 2.  $n_1$  ja  $n_2$  ovat mitattujen arvojen lukumäärä.

Kaavassa (2)  $s_1$  ja  $s_2$  ovat aineistojen keskihajonnat.

Kaavassa (3)  $f$  on vapausasteet, joihin vaikuttaa mitattujen arvojen lukumäärä

T-testi suoritettiin R -ohjelmalla. R-ohjelma laskee testeissä kaiken valmiiksi ja tulostaa taulukon, josta voidaan tarkastella tarpeellisia tunnuslukuja.

#### Paired t-test

```
data: Manual and Evo
t = -2.2823, df = 52, p-value = 0.02659
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-145.621981 -9.359152
sample estimates:
mean of the differences
-77.49057
```

Kuva 11. T-testin tulostus R-ohjelmassa

Koska p-arvo on alle 0,05, ensimmäisen asteen virhe on niin pieni, että nollahypoteesi voidaan hylätä. Tämä tarkoittaa sitä, että tämän testin mukaan analyysi antaa eri arvoja riippuen siitä, tehdäänkö analyysi käsin tai koneella. Tässä kuitenkin otetaan huomioon analyysi vain yhden henkilön tekemänä.

Käytännön kannalta tällä tuloksella ei ole välttämättä kovin suurta merkitystä. Suurempi merkitys on luottamusväleillä, jotka voidaan katsoa tulosteen kohdasta "95 percent confidence interval". Automatisoinnin kannalta ei olekaan niin tärkeää, miten laite saa saman henkilön kanssa samoja tuloksia vaan pikemminkin se, kuinka analyysi osuu luottamusvälien sisälle.

Kuvassa 11 voidaan huomata kohta "95 percent confidence interval", jossa ovat arvot -145,621981 ja -9,359152. Numerot kertovat analyysin antaman luottamusvälin, joka voidaan laskea tulosten avulla. Kun esimerkiksi tunnetaan vertailunäytteen pitoisuus, joka tässä analyysissä on 6899 FTU, voidaan laskea luottamusvälien alaraja summaamalla tunnettu arvo t-testin luottamusvälin ensimmäiseen arvoon. Luottamusvälin yläraja saadaan taas summaamalla tunnettu pitoisuus t-testin luottamusvälin antavien arvojen toiseen arvoon. Näin saadaan luottamusväleiksi 95 %:n tarkkuudella  $6899 + (-145,6) = 6753$  alarajaksi ja ylärajaksi  $6899 + (-9,4) = 6890$ .

Edellisessä kohdassa tuloksia analysoitiin parittaisen t-testin avulla, koska näytteet olivat samoja joka kohdassa. Jos tuloksia tarkastellaan erillisinä analyysinä, saadaan seuraavanlainen tulostus:

```
welch Two Sample t-test

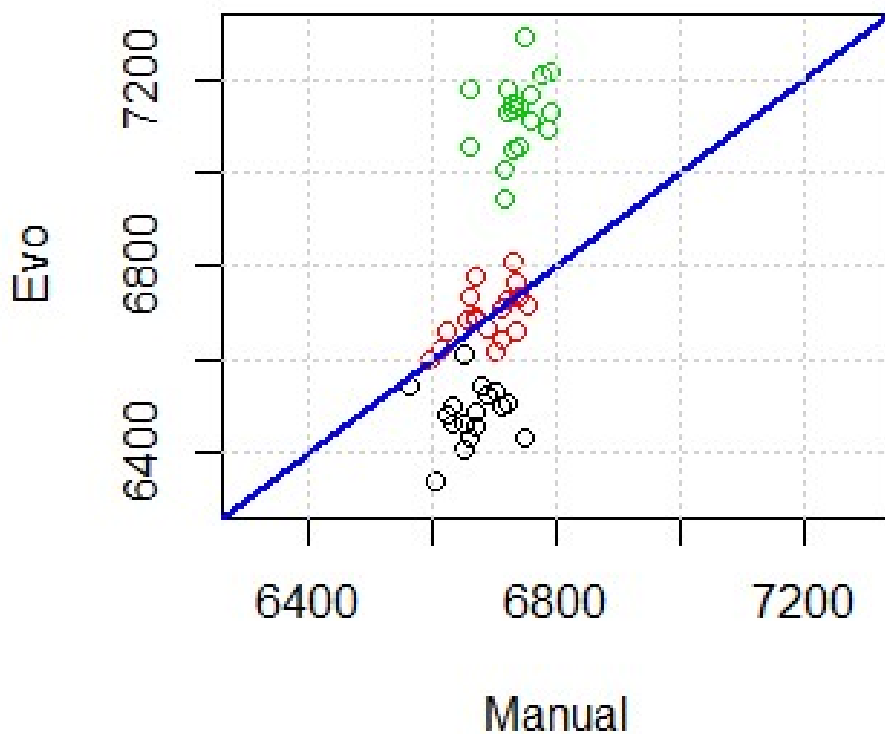
data: Manual and Evo
t = -1.9941, df = 55.801, p-value = 0.05103
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -155.3406782    0.3595461
sample estimates:
mean of x mean of y
 6695.679  6773.170
```

Kuva 12. T-testi tulostus erillisinä analyysinä.

Tästä kuvasta (kuva 12) voidaan huomata, että p-arvo on hieman suurempi. P-arvo ylittää asetetun rajan 0,05, mikä tarkoittaisi sitä, että nollahypoteesia ei voitaisi tämän testin perusteella vielä hylätä.

P-arvo on kuitenkin vieläkin hyvin pieni. Jos luotettaisiin pelkästään p-arvoon tämän testin perusteella, jatkotutkimukset olisivat vähintäänkin suositeltavia. Olettaessamme analyysit erillisiksi huomaamme, että luottamusväli kasvaa hieman. Tämä kasvu ei kuitenkaan ole merkittävä.

Tällä toisella testillä luottamusväleiksi saadaan alarajaksi 6744 ja ylärajaksi 6899.



Kuva 13. Rinnakkaisten vertailu.

Kuvassa 13 on mustilla palloilla kuvattu ensimmäisen päivän testi, punaisilla palloilla toisen päivän ja vihreillä kolmannen. Sinisellä viivalla kuvataan selvyuden vuoksi  $x=y$ -akseli. Pipetointirobotin tulokset voidaan lukea pystysuunnassa ja käsin tehdyn analyysin tulokset vaakasuunnassa.

Taulukko on tehty R-ohjelmalla. Kuviosta voidaan hyvin huomata systemaattinen virhe, jonka tulokset antavat. Tulosten tulisi kutakuinkin osua samalle kohdalle suoran kanssa.

## 6.5 Systemaattinen virhe

Kun tarkastellaan ensin käsin tehdystä analyysistä saatuja tuloksia, voidaan huomata niiden olevan melko hyvin samalla tasolla. Pipetointirobotilla saadut tulokset nousevat kuitenkin paljon selkeämmin päiväkohtaisesti. Ensimmäisenä päivänä tulokset ovat selkeästi  $x=y$ -akselin alapuolella. Seuraavana päivänä tulokset ovat melko hyvin asetuneet  $x=y$ -akselin päälle ja kolmantena päivänä tulokset ovat selkeästi  $x=y$ -akselin yläpuolella.

Tulosten systemaattiseen nousuun ei välttämättä ole yhtä selittävää ratkaisua. Kokeita ei suoritettu peräkkäisinä päivinä, saati peräkkäisinä ajoina, jolloin kone pestiin useaan kertaan testien välissä. Näin ollen koneessa ei voinut olla jäämiä entsyymistä peräkkäisissä ajoissa.

Ajojen välissä ei myöskään ollut huomattavan pitkää aikaa, jolloin näytteen vanheneminen ei voi olla syynä tulosten systemaattiseen nousuun. Näytteenä käytettiin kuivattua ja granuloitua fytaasientsyymiä, joka oli jokaisessa ajossa samasta erästä, jolloin mahdollinen erien tuoma vaihtelu ei voi vaikuttaa tuloksiin.

Analyysit suoritettiin joka kerta samalla kaavalla ja samassa aikaikkunassa, jolloin tuloksiin ei vaikuttaisi myöskään se, kuinka kauan näytteet mahdollisesti seisovat puskurissa.

Pysäytysreagenssi valmistettiin joka kerta, ennen kuin näytteitä liuotettiin puskuriin. Pysäytysreagenssi säilytettiin samalla tavalla joka ajon yhteydessä, suojattuna valolta. Pullo, johon reagenssi valmistettiin, käärittiin foliolla ja säilytettiin kaiken varalta pimeässä kaapissa, jotta se olisi mahdollisimman suojassa valolta. Pysäytysreagenssikaan ei siis selitä systemaattista nousua eri ajojen välillä.

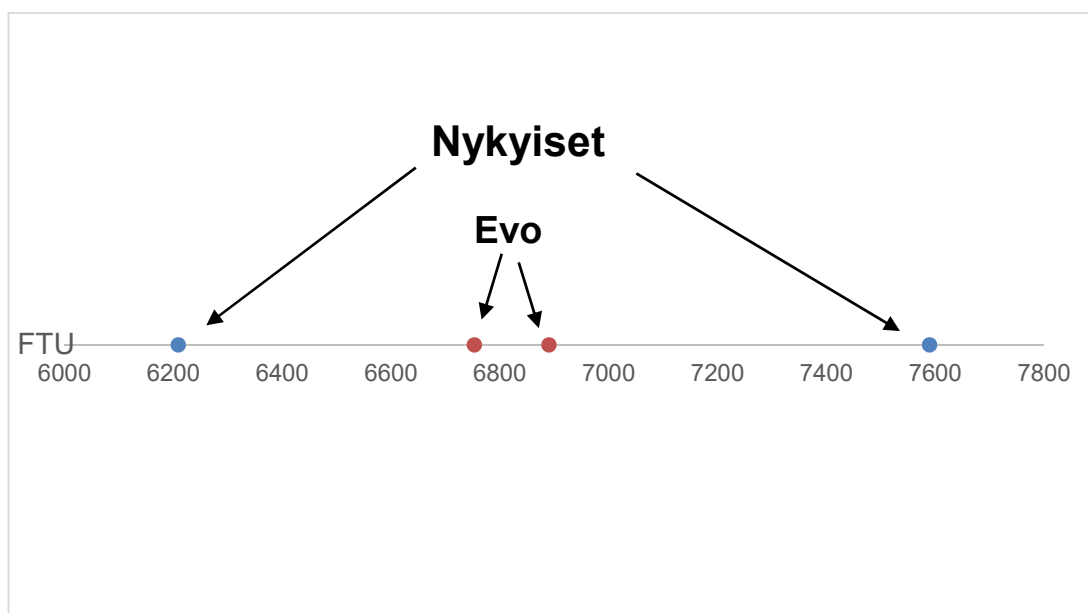
Tulosten kannalta tulee kuitenkin ottaa huomioon, että systemaattinen nousu voi johtua toki vain sattumasta.

Huomionarvoista on myös se, että käsin tehtävällä analyysimenetelmällä testit suoritti yksi ja sama henkilö. Tällöin ei voida sanoa mitään siitä, miten eri henkilöiden tekemät analyysit eroavat toisistaan. Pipetointirobotti suorittaa testin aina kutakuinkin samalla tavalla, jolloin eri henkilöiden tekemät pienet erot analyysissa saadaan eliminoidua.

## 6.6 Luottamusvälit

Luottamusväli kertoo, minkälainen osa tutkimuksessa saatavista arvoista asettuu tietyllle välille, jos tutkimuksen tuloksia olisi loputtomasti. Luottamusvälit voidaan määrittellä myös toisella tapaa. Toisella tapaa määriteltynä luottamusväli on se väli, josta voidaan sanoa tietyllä varmuudella, mihin saatu tulos asettuu. Tässä analyysissä käytettiin 95 %:n luottamusväliä, mikä siis tarkoittaa, että 95 % tuloksista osuu kyseisen luottamusvälien sisälle. (Holopainen & Pulkkinen. 2014: 166) (Tilastokeskus)

Luottamusvälit laskettiin R-ohjelmalla. Luottamusvälit saatiin tulostuksena samaan taulukkoon, josta aikaisemmin tarkasteltiin p-arvoa. Laskettuja luottamusvälejä voidaan verrata nykyisiin luottamusväleihin ja tarkastella, kuinka hyvin pipetointirobotin antamat tulokset sopivat nykyisiin standardeihin.



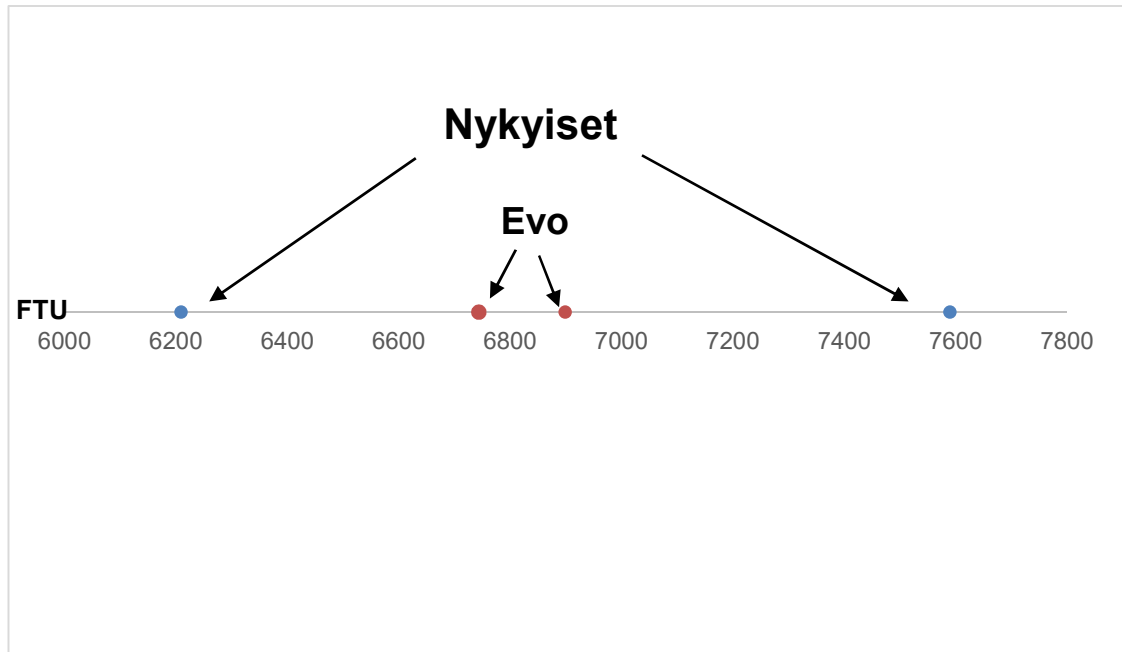
Kuva 14. Luottamusvälit kuvattu viivalle. Manuaali sinisellä ja EVO punaisella.

Kuvaajassa on sinisillä pisteillä merkitty nykyinen, käsin tehtävän analyysin luottamusväli ja punaisilla pisteillä merkitty pipetointirobotin analyysin luottamusväli.

Kuten kuvaajasta voi hyvin havaita, pipetointirobotin luottamusväli osuu selvästi nykyisten käsin tehdyn analyysin luottamusvälien sisälle. Tämänhetkinen luottamusväli Roalin testille on alaraja 6 209 ja yläraja 7 589 FTU-yksikköä.

Taulukon avulla saadaan pipetointirobotin luottamusväliksi 95 %:n varmuudella alarajaksi 6753 ja ylärajaksi 6890 FTU-yksikköä.

Jos vapausasteita tarkasteltaisiin toisen testin mukaan, jossa analyysit oletetaan erillisiksi ja luottamusvälit piirretään kuvaajaan, saadaan seuraavanlainen kuvaaja.



Kuva 15. Vapausasteet, joissa testit toisistaan riippumattomat.

Kuviosta voidaan huomata, että vapausasteet eivät muutu juurikaan, vaikka t-testi tehtäisiin siten, että oletetaan analyysit erillisiksi.

Vapausasteet toisessa kuvoissa ovat alaraja 6 744 ja yläraja 6 899 FTU-yksikköä.



## 7 Johtopäätökset ja pohdintaa

Työn tarkoituksena oli selvittää, voiko fytaasientsyymianalyysin siirtää EVO-pipetointirobotille.

Nollahypoteesina oli, että käsin tehty analyysi antaa saman tuloksen kuin pipetointirobotilla tehty analyysi. T-testi antaa pienen p-arvon, jolloin nollahypoteesi hylätään. Seuraavaksi voidaan analyysin siirtämistä tarkastella luottamusvälien avulla. Tämä tilastollisesti merkitsevä ero on käytännön kannalta lähes merkityksetön. On mielekkäämpää tutkia asiaa luottamusvälien kautta, kuin tarkastella pelkästään p-arvoa. Luottamusväli analyysille on 6 209–7 589, kun pipetointiroboti antaa tuloksia luottamusvälillä 6 753–6 890.

Luottamusvälit näyttäisivät osuvan hyvin nykyisen analyysin luottamusvälien sisälle, jolloin testi on mahdollista siirtää koneellisesti suoritettavaksi. Jos p-arvo olisi ollut suuri mutta luottamusväli ei olisi osunut nykyisten luottamusvälien sisälle, olisi ollut tarvetta jatkotutkimuksille.

Analyysin siirtäminen pipetointirobotille vähentää selvästi reagenssien kulutusta ja lisää työergonomiaa, kun työntekijän suorittama pipetointi vähenee. Reagenssien kulutuksen vähentäminen on taloudellisesti edullisempaa ja ympäristöystävällisempää. Myös vaihto muoviputkista lasiputkiin synnyttää vähemmän jätettä. Analyysin siirtäminen koneelliseksi vähentää myös mahdollista altistumista reagensseille, joista osa on haitallisia ihmiselle.

Vaikka analyseissa ei ole ajallista eroa, on koneella mahdollista suorittaa suurempia sarjoja, mikä nopeuttaa työtä ja vähentää analyysiaikaa yhden näytteen kohdalla. Pipetointirobotin suorittaessa analyysia vapautuu myös henkilötyötunteja muihin analyysihin.

Analyysissä tehdään joka kerta standardisuora, jonka avulla tulokset tulkitaan. Standardisuoralla on näin suuri merkitys analyysin tulosten kannalta. Standardisuoralla ei kuitenkaan ole varsinaisia vakioarvoja, jotka antaisivat suuntaa siihen millainen standardisuoran tulisi olla. Tämän takia on vaikea arvioida, onko pipetointirobotin tekemä suora samanlainen kuin käsin tehty suora. Systemaattisen virheen voisi siis osin selittää standardisuoralla.

Aiheesta voisi jatkossa tutkia mahdollisesti sitä, kuinka paljon eri laboranttien tekemät analyysit eroavat toisistaan, eli kuinka paljon hajontaa ilmenee eri laboranttien analyysillä. Vaikka pipetointirobotti näyttäisi antavan tuloksia melko suurella hajonnalla, se voi kuitenkin olla loppujen lopuksi pienempi hajonta kuin mitä eri laboranttien tuottamien tulosten välillä on.

Testien aikana tuli ilmi vain yksi selvä kontaminaatio tai mittausvirhe, joka poistettiin tuloksista ennen kuin tuloksia alettiin analysoida R-ohjelmalla.

Kaiken kaikkiaan voidaan todeta, että tutkimuksen tavoitteet saavutettiin. Tämän tutkimuksen mukaan analyysi olisi mahdollista siirtää pipetointirobotille suoritettavaksi.

## Lähteet

Aittomäki E., Eerikäinen T., Leisola M., Ojamo H., Suominen I. & von Weymarn N. 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo: Sanoma Pro Oy.

Freedon EVO Operating Manual, 392886, en, V1.4.

Früge Emily. 2015. Phytase Superdosing: Beyond Ca and P release.

<<http://www.hubbardfeeds.com/blog/phytase-superdosing-beyond-ca-and-p-release>>

Luettu 15.7.2016

Heino, J., Vuento, M. 2004. Solubiologia. Porvoo: WSOY.

Holopainen, Martti, Pulkkinen, Pekka. 2014. Tilastolliset menetelmät. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Karhapää M. 2014. Fytaaasi ja uusi rehuarvojärjestelmä.

<[https://www.proagria.fi/sites/default/files/attachment/sikatalouden\\_tulosseminaari\\_mk\\_04\\_11\\_2014.pdf](https://www.proagria.fi/sites/default/files/attachment/sikatalouden_tulosseminaari_mk_04_11_2014.pdf)> Luettu 4.7.2016

Koivunen E. 2013. Fytaaasi parantaa fosforin hyväksikäyttöä.

<[https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/Tietosiilo/Tietokortit/tk\\_fytaaasi%20siipikarjalle%20valmis.pdf](https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/Tietosiilo/Tietokortit/tk_fytaaasi%20siipikarjalle%20valmis.pdf)> Luettu 4.7.2016.

Milli-Q

<<http://www.merckmillipore.com/FI/en/products/water-purification/type-1/5cSb.qB.89EAAFAJqpxkiQpx,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2F&bd=1>> Luettu 26.11.2016

MTT Kotieläintuotannon tutkimus. 2014. Fytaasin vaikutus fosforin sulavuuteen uudessa sikojen rehuarvojärjestelmässä.

<<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/Rehutaulukot/laskentaperusteet/Fytaa-sin%20vaikutus%20fosforin%20sulavuuteen%20uudessa%20rehuarvoj%C3%A4rjestelm%C3%A4ss%C3%A4.pdf>> Luettu 4.7.2016

Opetushallitus. Solun toiminnalle tärkeät yhdisteet.

<<http://www02.oph.fi/etalukio/biologia/kurssi2/orgaaniset.html>> Luettu 17.8.2016

Pandey, A., Webb, C., Soccol C.R. & Larroche, C. 2008. Enzyme technology. Springer.

Polaina J. & MacCabe A.P. 2007, Industrial enzymes, Springer, Dordrecht

Qvirist, L., Carllson N. & Andild T. 2015. Assesing phytase activity

<<http://www.jbmethods.org/jbm/article/view/58>> Luettu 17.8.2016

Roal Oy

<<http://www.roal.fi/>> Luettu 26.11.2016.F

Tecan Freedom EVO

<[http://lifesciences.tecan.com/products/liquid\\_handling\\_and\\_robotics/freedom\\_evo](http://lifesciences.tecan.com/products/liquid_handling_and_robotics/freedom_evo)>

Luettu 22.10.2016.

Tilastokeskus. Käsitteet.

<<http://www.stat.fi/meta/kas/index.html>> Luettu 12.11.2016.

Wiseman, A. 1995. Handbook of enzyme biotechnology. Cornwall: T.J. Press.

## Fytaasin aktiivisuuden määrittäminen

### FYTAASIN AKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS (pH 5,5, epäorgaanisen fosfaatin vapautuminen)

#### Periaate

Menetelmä perustuu epäorgaanisten fosfaattiryhmien vapautumiseen Na-fytaatista fytaasientsyymin vaikutuksesta. Na-fytaattia ja fytaasi-entsyymiä inkuboidaan, minkä jälkeen muodostunut väri mitataan spektrofotometrillä. Värillinen liuos syntyy molybdaatti- ja vanadaatti-ionien muodostaessa kompleksin epäorgaanisen fosforin kanssa.

#### Aktiivisuusyksikkö

Yksi yksikkö fytaasia (FTU) on entsyymimäärä, joka määritysolosuhteissa vapauttaa 1 µmol epäorgaanista fosforia minuutissa 37 °C:ssa, pH:ssa 5,5 standardiolosuhteissa.

#### Sovellusalue

Menetelmä on kehitetty *E. Coli* -fytaasin määrittämiseen.

#### Työturvallisuus- ja ympäristönäkökohdat

Ammoniumvanadaatti on myrkyllistä nieltynä, aiheuttaa silmä-ärsytystä, ärsyttää ihoa ja hengityselimiä. Ammoniumvanadaattia sisältävät liuokset on käsiteltävä vetokaapissa ja hävitettävä ongelmajätteiden käsittelyn mukaisesti.

Typpihappo on syövyttävää. Käytettävä suojavaatteita, suojalaseja ja suojahanskoja (esim. vahvoille hapoille soveltuvat neopreenihanskat). Vahvat hapot on käsiteltävä vetokaapissa. Toiminnassa syntyvä jäte hävitetään Roal:n jätehuoltosuunnitelman mukaisesti.

**Määrittäolosuhteet**

Substraatti	Na-fytaatti
pH	5,50
Inkubointilämpötila	37 °C ± 0,5 °C
Inkubointiaika	60 min

**Laitteet**

Sentrifugi	
Spektrofotometri	415 nm
Koeputkisekoittaja (vortex)	
Vesihaude	37 °C

**Reagenssit**

Kaikkien reagenssien valmistukseen käytetään ionivaihdettua vettä, Milli-Q tai vastaava.

**1. Ammoniumheptamolybdaatti-kantaliuos**

Liutetaan 20 g ammoniumheptamolybdaattia ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, Merck 1182) 180 ml:n vettä. Lisätään 2 ml ammoniumhydroksidia (NH<sub>4</sub>OH, Sigma-Aldrich 221228 28–30 %), täytetään vedellä 200 ml:ksi mittapullossa ja peitetään pullo alumiinifoliolla. Säilytetään huoneenlämmössä valolta suojattuna enintään 30 vuorokautta.

**2. Typpihappoliuos (22,75 %)**

Laimennetaan 175 ml väkevää typpihappoa (HNO<sub>3</sub>, Merck 1.00456.1000) n. 250 ml:aan vettä. Sekoitetaan, jäädytetään huoneenlämpöiseksi ja täytetään vedellä 500 ml:ksi mittapullossa.

**3. Ammoniumvanadaatti-kantaliuos**

Liutetaan 0,47 g ammoniumvanadaattia (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, Riedel de Haen 31153) n. 160 ml:aan vettä. Liukenemisen nopeuttamiseksi liuos lämmitetään n. 50-asteiseksi vesihauteessa samalla magneettisekoittajalla sekoittaen. Liuos alkaa muuttua kellertäväksi, kun yhdiste liukenee. Kun NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> on liuennut kokonaan, lisätään hitaasti 4 ml 22,75 % typpihappoliuosta samalla sekoittaen. Jäädytetään huoneenlämpöiseksi ja täytetään vedellä 200 ml:ksi mittapullossa. Kääritään pullo alumiinifolioon. Säilytetään huoneenlämmössä valolta suojattuna enintään 30 vuorokautta.

**4. Pysäytysreagenssi**

Reagenssin määrä on riippuvainen analysoitavien näytteiden määrästä. 100 ml pysäytysreagenssia varten sekoitetaan 25 ml ammoniumheptamolybdaatin kantaliuosta ja 25 ml ammoniumvanadaattiliuosta. Lisätään 16,5 ml 22,75 % typpihappoliuosta ja täytetään 100 ml:n mittapullo vedellä merkkiin. Liuos valmistetaan päivittäin.

**5. Tween 20 -liuos (10 % w/v)**

Liuetetaan 5 g Tween 20:tä (Merck 8.22184.0500) n. 40 ml:aan vettä. Täytetään vedellä 50 ml:ksi mittapullossa. Säilytetään 4 °C:ssa enintään 3 kuukauden ajan.

**6. Na-asetaatipuskuri, 250 mM, pH 5,50**

	1 L	2 L	5 L
Na-asetaattrihiydraatti, CH <sub>3</sub> COONa · 3 H <sub>2</sub> O, Merck 1.06267.1	30,02 g	60,04 g	150,1 g
Vesi	900 ml	1800 ml	4500 ml
Jäätikkää (CH <sub>3</sub> COOH, Merck 1.00063.2511)	1,68 ml	3,36 ml	8,4 ml
Kalsiumkloridi dihydraatti, CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O, Merck 1.02382.1	0,147 g	0,294 g	0,735 g
10 %:nen Tween 20-liuos	1,0 ml	2,0 ml	5,0 ml

Puskuri valmistetaan yllä olevan taulukon mukaisesti riippuen valmistettavasta litramäärästä. Liuetetaan Na-asetaattrihiydraattiin veteen. Lisätään jäätikkää ja kalsiumkloridi. Puskurin pH säädetään 5,50:ksi käyttämällä joko 1 M etikkahappoa tai 1 M NaOH:a. Täytetään valitun tilavuuden mukaisesti mittapullossa vedellä merkkiin, lisätään tween juuri ennen. Säilytetään +4 °C:ssa enintään 30 vuorokautta.

**7. Kaliumfosfaattistandardi, 7,2 mM, pH 5,50**

Ennen liuotusta kaliumdivetyfosfaatti (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, M=136,09 g/mol, Merck 1.04873.1) tulee kuivattaa uunissa 105 °C:ssa 2 h. Punnitetaan jäähtynyttä kaliumdivetyfosfaattia 0,0980 g ja liuotetaan se Na-asetaattipuskuriin 100 ml:ksi. Tarkistetaan pH (5,50). Säilytetään 4 °C:ssa enintään 30 vrk.

**8. Fytaattisubstraatti**

Liuetetaan 0,98 g fytaattia (LabChem EE05501) n. 80 ml:aan Na-asetaattipuskuria. Säädetään pH jäätikkällä 5,50:ksi. Täytetään asetaattipuskurilla 100 ml:ksi mittapullossa. Liuos valmistetaan päivittäin.

**9. Uuttopuskuri vitamiini/mineraali premiksien käsittelyyn**

5 litraa uuttopuskuria sisältää:

- 500 ml (525 g) 2,5 M asetaattipuskuria, pH 5,50
- 4000 ml milliQ vettä
- 5 ml CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 14,7 % -liuosta
- 5 ml Tween liuosta (katso kohta 5)
- 95 g EDTA dinatriumsuola, dihydraatti (esim. Merck 1.08418)
- 2,5 g albumiinia (BSA) (Sigma A-2153)
- 50,7 g dinatriumfosfaattia (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) (esim. Merck 1.06580)

Säädetään puskurin pH 5,50:ksi käyttämällä joko 2,5 M etikkahappoa tai 5 M NaOH:a Täytetään vedellä 5 litraksi mittapullossa. Säilytetään 4 °C:ssa enintään 7 vrk.

### Näytteen esikäsittely

Nestemäiset entsyymit: Punnitaan tarkasti 0,25 g - 0,5 g näytettä 25 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asetaattipuskurilla ja sekoitetaan huolellisesti.

Kuivat entsyymit: Punnitaan tarkasti 0,5 g – 1 g näytettä 50 ml:n mittapulloon, liuotetaan näyte asetaattipuskuriin magneettisekoittimella 20-30 min huoneen lämpötilassa ja täytetään merkkiin liukenemisen jälkeen. Näytemäärä suositellaan nostettavaksi 5 grammaan (250 ml:aan) jos näyte on epähomogeeninen tai näytteen tiheys on korkea (>1 kg/l). Sentrifugoidaan tarvittaessa 10 min. n. 2800 x g.

Vitamiini/mineraali premiksit: Punnitaan tarkasti 5 g entsyymiä sisältävää premiksiä 250 ml:n dekkään ja lisätään 200 ml vitamiini/mineraalipremiksien uuttopuskuria. Sekoitetaan magneettisekoittimella 30 min. huoneenlämpötilassa ja sentrifugoidaan 10 min. n. 2800 x g.

Näytteet laimennetaan asetaattipuskuriin siten, että absorbanssierotukseksi saadaan 0,4 – 1,1.

### Standardi

Käytetään 7,2 mM kaliumfosfaattiliuosta, josta tehdään seuraavat standardilaimennokset puskuriin:

Standardi	Laimennos	Fosfaatti µmol/ml	FTU/ml*
1	1:10	0,72	0,012
2	1:6,67	1,08	0,018
3	1:5	1,44	0,024
4	1:4	1,8	0,03
5	1:3,33	2,16	0,036
6	1:2,5	2,88	0,048

Standardi voidaan tehdä käyttämällä kaikkia pisteitä 1-6 tai vain pisteitä 1,4 ja 6. Pipetoidaan 1,0 ml kutakin standardilaimennosta kahteen muoviseen sentrifugiputkeen. Reagenssinollaan pipetoidaan standardilaimennoksen sijaan vastaava määrä asetaattipuskuria. Lisätään 2,0 ml fytaattisubstraattia jokaiseen putkeen ja sekoitetaan. Lisätään 2,0 ml pysäytysreagenssia ja sekoitetaan. Standardeja ei tarvitse inkuboida 37 °C:ssa. Annetaan värin muodostua 20 minuuttia huoneenlämmössä. Sentrifugoidaan 10 min 2000×g. Mitataan absorbanssi reagenssinollaa vastaan 415 nm:ssä. Standardisuora tehdään jokaisen näytesarjan yhteydessä.



\*Vastaava fytaasiaktiivisuus (FTU/ml) on saatu jakamalla fosfaattikonsentraatio reaktioajalla (60 min) ja punnitulla laimennoksen määrällä (1 ml = 1 g). Saadut yksiköt ovat muotoa  $\mu\text{mols}/\text{min}/\text{ml}$  tai fytaasiyksiköinä (FTU/ml).

### Määrittäminen

Fytaasin määrittäminen tehdään kolmena rinnakkaisena. Pipetoidaan 2,0 ml Na-fytaattisubstraattia kahteen muoviseen sentrifugiputkeen. Esi-inkuboidaan sekä substraattiputkia että entsyymilaimennoksia 5-10 minuuttia 37 °C:ssa. Reaktio aloitetaan sekuntikelloa käyttäen lisäämällä 1,0 ml laimennettua näytettä toiseen substraattiputkeen ja sekoitetaan. Inkuboidaan 37 °C tasana 60 min, lisätään 2,0 ml pysäytysreagenssia ja sekoitetaan.

Entsyymillä valmistetaan kuten näyte, paitsi entsyymilaimennos lisätään vasta pysäytysreagenssin lisäyksen jälkeen.

Annetaan värin muodostua putkissa 20 minuuttia huoneenlämmössä. Sentrifugoidaan 10 min 2000×g. Mitataan näytteen absorbanssi entsyymillä vastaan aallonpituudella 415 nm. Absorbanssieroituksen tulee olla 0,4 -1,1.

### Laskeminen

Näytteen absorbanssista vähennetään entsyymillä saatu absorbanssi ja vastaava aktiivisuus (FTU/ml) luetaan standardisuoralta. Tulos kerrotaan laimennuskertoimella. Lopputuloksi on laskettu grammaa kohden alkuperäistä näytettä (FTU/g). Laskuesimerkki (FTU) on esitetty alla:

$$\text{FTU/g} = \frac{\text{FTU/ml} \times \text{uuttopuskurin tilavuus (ml)} \times \text{laimennoskerroin}}{\text{Uutetun näytteen paino (g)}}$$

missä:

<i>FTU/ml</i>	= näytteen aktiivisuus (standardisuoralta)
<i>uuttopuskurin tilavuus</i>	= 25 ml/50 ml entsyymeillä ja 200 ml premikseillä
<i>Laimennoskerroin</i>	= kokonaislaimennoskerroin
<i>Uutetun näytteen paino</i>	= 0,25 g – 1,0 g entsyymeillä ja 5 g premikseillä

### Viite

ISO 30024:2009(E) Animal feeding stuffs – Determination of phytase activity

#### Huom.

Menetelmä on sovellettu viitteenä olevasta ohjeesta.

Roal omistaa lisenssin yhteen kirjalliseen ja yhteen sähköiseen versioon.