



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KSYLANAASIAKTIIVISUUSMENETELMÄN AUTOMATISOINTIMAHDOLLISUUDEN SELVITTÄMINEN

Sanna Lindström

Opinnäytetyö
Kesäkuu 2017
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus

LINDSTRÖM, SANNA:

Ksylanaasiaktiivisuusmenetelmän automatisointimahdollisuuden selvittäminen

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 5 sivua
Kesäkuu 2017

Opinnäytetyö tehtiin DuPontin tytäryhtiö Genencor International Oy:n entsyymituotantolaitoksella Jämsänkoskella. Tuotantolaitoksella valmistetaan useita erilaisia entsyymituotteita, joista tärkeimpiin kuuluvat ksylanaasientsyymiä sisältävät rehuvalmisteet. Entsyymivalmisteiden aktiivisuudet määritetään tehtaan laboratoriossa. Tällä hetkellä aktiivisuusmääritykset suoritetaan kahdella erilaisella manuaalimenetelmällä, mutta ne halutaan korvata yhdellä autoanalysaattorimenetelmällä. Määrityksen automatisoinnilla tavoitellaan työn helpottamisen lisäksi säästöjä sekä määritysten kestossa että kustannuksissa.

Työn tavoitteena oli selvittää, voidaanko automatisoitua menetelmää siirtyä käyttämään entsyymituotteiden aktiivisuuden määrittämisessä ja onko menetelmän vaihto kannattavaa. Työn tarkoituksena oli analysoida erilaisia ksylanaasientsyymiä sisältäviä näytetyyppejä eri menetelmillä ja verrata menetelmien tuloksia keskenään. Lisäksi verrattiin eri menetelmien tarkkuutta, kestoja, kustannuksia sekä työturvallisuuteen ja ergonomiaan liittyviä seikkoja.

Opinnäytetyön tuloksista voidaan nähdä, että autoanalysaattorilla saadaan aina korkeampi aktiivisuustulos kuin vastaavalla manuaalimenetelmällä. Tulosten välinen ero on kuitenkin säännönmukainen, joten analysaattorimenetelmään siirtyminen olisi mahdollista tekemällä muutoksia nykyisiin tuotteiden valmistus- ja analysointikäytäntöihin joko ottamalla käyttöön menetelmien välinen korjauskerroin tai vaihtamalla analysaattorimenetelmän standardia.

Analysaattorimenetelmään siirtymistä puoltavat sen parempi tarkkuus, edullisemmat kustannukset ja lyhyempi analysointiaika. Lisäksi aktiivisuusmenetelmien automatisointi parantaa niin työturvallisuutta kuin työskentelyergonomiaakin.

Luottamuksellisen tiedon säilyttämiseksi esimerkiksi tuotteiden tarkat tiedot, kunkin tuotetyypin sisältämät formulointikemikaalit, käytettyjen reagenssien tiedot ja hinnat sekä analyysimenetelmien tarkka kuvaus on poistettu raportin julkisesta versiosta.

Asiasanat: entsyymit, ksylanaasit, entsyymiaktiivisuus, automatisaatio

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Energy and Environmental Engineering
Degree Programme in Laboratory Engineering

LINDSTRÖM, SANNA:
Study of Xylanase Activity Method Automatisation

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 5 pages
June 2017

This thesis was made for the enzyme production plant of Genencor International Oy in Jämsänkoski. Enzyme activities are analysed in the on-site laboratory. The laboratory pursues to replace two present manual xylanase activity methods with one autoanalyser method. The aim is to ease the analysing process and reduce the costs and shorten the analysis time.

The objective of this thesis was to examine if the new analyser method could replace the present methods and if the method change would be beneficial. The purpose was to analyse eighteen different xylanase product types with all three methods and compare the results. In addition, analysis times, costs and work safety were compared between the methods.

The results suggest that the activities measured with the analyser are higher than the ones measured with the manual methods. The difference in results is systematic, which makes it possible to introduce the new method by changing the production and analysing practices. In any case, this study confirms that analysis times and costs could be reduced by using the analyser method. Additionally, the new method is more precise, makes analysing safer and provides ergonomic improvements.

For reasons of confidentiality, some details were excluded from the public report. This confidential information includes specific product details, the reagents used, reagent prices, and exact method descriptions.

Key words: enzymes, xylanases, enzyme activity, automatisation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	ENTSYYMIT	7
2.1	Teollisten entsyymien valmistus.....	7
2.1.1	Esikäsittely ja fermentointi	8
2.1.2	Jälkikäsittely ja formulointi	10
2.2	Ksylanaasit.....	11
2.3	Teollisten entsyymien käyttö	12
2.3.1	Ksylanaasien käyttö	12
2.3.2	Ksylanaasit rehuteollisuudessa	14
2.4	Entsyymiaktiivisuus.....	14
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	16
3.1	Manuaalimenetelmät.....	16
3.2	Automaattimenetelmä	19
3.3	Näytteet	21
3.4	Analyysien laadunvalvonta.....	22
4	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	24
4.1	Aktiivisuuksien keskiarvo.....	24
4.2	Menetelmien välinen prosentuaalinen ero	28
4.3	Suhteellinen keskihajonta	30
4.4	Fermentoinnin lineaarisuus.....	34
5	POHDINTA.....	37
	LÄHTEET.....	43
	LIITTEET	46
	Liite 1. Y5-KL-menetelmän aktiivisuustulokset	46
	Liite 2. XYL-menetelmän aktiivisuustulokset	48
	Liite 3. ABX-menetelmän aktiivisuustulokset	50

LYHENTEET JA TERMIT

CMO	klassisesti muunneltu organismi
DNS	3,5-dinitrosalisyylihappo
endohydrolyysi	yhdisteen hajottaminen keskisidoksista vettä lisäämällä
globulaarinen	pallomainen
GMO	geneettisesti muunneltu organismi
hemiselluloosa	polysakkarideista rakentuva kasvien soluseinän komponentti
permeaatti	suodattimen läpäissyt liuos
probiootti	mikrobi, joka tasapainottaa ruoansulatuskanavan mikrobistoa
retentaatti	suodattimelle jäänyt aines
TRIS	tris(hydroksyyli)aminometaani
ympäys	bakteerikasvuston siirrostaminen

1 JOHDANTO

Suomalaisilla on vahvat perinteet teollisten entsyymien tutkimuksessa ja tuotannossa, ja tänäkin päivänä suomalaiset teollisten entsyymien tuotantolaitokset ja suomalainen tutkimusosaaminen edustavat maailman kärkeä. Ensimmäisiä teollisia entsyymejä kehitettiin ja valmistettiin Suomessa 1960-luvulla. Suuren mittakaavan entsyymiteollisuuden kehittyminen sai kuitenkin alkunsa 1980-luvulla, kun Oy Alko Ab ja Suomen Sokeri Oy päättivät alkaa investoida entsyymibiotekniikkaan. (Korhola & Uusikylä 2012, 7.)

Tämä opinnäytetyö tehtiin Genencor International Oy:n Jämsänkosken entsyymituotantolaitokselle. Suomen Sokeri aloitti entsyymien tuotannon tehtaalla vuonna 1984, ja nykyään tehdas kuuluu DuPontin tytäryhtiönä toimivalle Genencor International Oy:lle. Tuotantolaitoksella valmistetaan useita erilaisia entsyymejä eri teollisuudenalojen käyttöön.

Ksylanaasientsyymiä valmistetaan Jämsänkosken tuotantolaitoksella useiksi erilaisiksi entsyymivalmisteiksi lähinnä rehuteollisuuden käyttöön. Y5-ksylanaasien entsyymiaktiivisuutta määritetään tehtaan laboratoriossa kahdella erilaisella manuaalimääritysmenetelmällä, mutta laboratoriossa pyritään korvaamaan molemmat manuaalimenetelmät yhdellä automatisoidulla menetelmällä. Automatisoinnilla tavoitellaan muun muassa analysointikustannusten vähentämistä ja analysointiaikojen lyhentämistä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, voidaanko laboratoriossa siirtyä käyttämään automaattista aktiivisuusmenetelmää ksylanaasientsyymituotteiden aktiivisuuden määrittämisessä, ja onko menetelmään siirtyminen kannattavaa. Automaattinen menetelmä on käytössä joillakin muilla yrityksen tuotantolaitoksilla, ja Jämsänkosken laboratoriossakin uuden menetelmän käyttöönottoa on yritetty aiemmin, mutta projekti keskeytettiin.

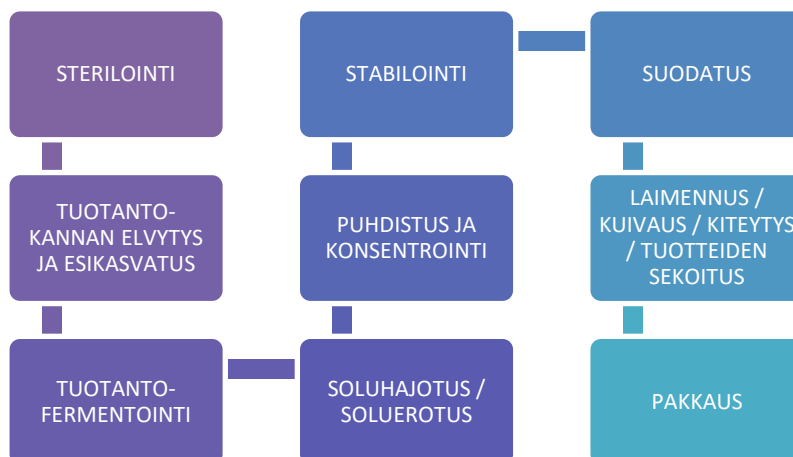
Opinnäytetyön tarkoituksena oli analysoida kahdeksatoista erilaista näytetyyppiä sekä manuaalimenetelmillä että autoanalysaattorilla, ja verrata saatuja tuloksia keskenään. Tarkoituksena oli myös tutkia analysaattorimenetelmän toimivuutta sekä fermentointinäytteillä että lopputuotenäytteillä muun muassa menetelmien toistotarkkuuden kannalta. Lisäksi työssä tutkittiin analysaattorimenetelmään siirtymisen kannattavuutta kustannusten ja analysointiaikojen sekä työturvallisuuden kannalta.

2 ENTSYIMIT

Entsyymit ovat solujen tuottamia globulaarisia proteiineja, jotka toimivat biologisina katalyytteinä nopeuttaen solujen kemiallisia aineenvaihduntareaktioita. Katalyytit eivät itse kulu reaktiossa eivätkä ne muuta reaktion tasapainoa. (Suominen 2002, 51; Campbell & Farrell 2011, 139, 142–143.) Ilman entsyymejä solun aineenvaihduntareaktiot olisivat niin hitaita, ettei solun toiminta olisi mahdollista. Entsyymit ovat tehokkaimpia tunnettuja katalyyttejä, sillä ne voivat nopeuttaa reaktioita jopa 10^{20} -kertaisesti. Muut kuin entsyymaattiset katalyytit kykenevät nopeuttamaan reaktioita vain 10^2 – 10^4 -kertaisesti. Entsyymit toimivat laskemalla reaktion aktivoitumisenergiaa eli energiamäärää, joka tarvitaan reaktion käynnistämiseen. (Campbell & Farrell 2011, 139.)

2.1 Teollisten entsyymien valmistus

Entsyymejä tuotetaan pääosin hallituissa tehdasympäristöissä mikrobien avulla, mutta niitä voidaan myös eristää eläin- tai kasvimateriaaleista. Teollisten entsyymien tuotantoprosessi mikrobien avulla koostuu esikäsitteystä, fermentoinnista, jälkikäsitteystä ja formuloinnista. Kuhunkin päävaiheeseen sisältyy erilaisia välivaiheita tuotteesta ja sen käyttötarkoituksesta riippuen. Tuotantoprosessin yleisimmät vaiheet on esitetty kuviossa 1. Tarkemmin tuotantoprosessin vaiheet on kuvattu luvuissa 2.1.1 ja 2.1.2.



KUVIO 1. Teollisten entsyymien valmistusprosessi

Tärkeimpiä tuotantomikrobeja ovat *Aspergillus*- ja *Trichoderma*-sukujen homeet sekä *Bacillus*-suvun bakteerit. Mikrobit soveltuvat hyvin entsyymien tuotantoon, sillä niiden kasvu on nopeaa ja tarvittavat raaka-aineet edullisia. (Ojamo 2002, 112–113.) Tuotantomikrobeja muokataan usein geenitekniikan avulla, jotta tuottotaso voidaan nostaa mahdollisimman korkeaksi. Parhaimmillaan mikrobi voidaan saada tuottamaan useita kymmeniä grammoja entsyymiproteiinia litraa kohti. Tuotanto-organismien geneettinen muuntelu voi olla joko sattumanvaraista tai suunniteltua. (Aittomäki ym. 2002, 13–14.)

Sattumanvaraisesti eli klassisesti muunnellun organismin (CMO, Classically Modified Organisms) geeneihin aiheutetaan sattumanvaraisia mutaatioita, ja syntyneistä entsyymien muunnelmista valitaan käyttötarkoitukseen parhaimmat. Klassisesti muokatut tuotantokannat tuottavat usein entsyymiseoksia, joilla on useita eri aktiivisuuksia. Niin kutsutut sivuaktiivisuudet voivat olla häiritseviä joissakin tuotteen käyttötarkoituksissa. Lisäksi klassisesti muokattujen kantojen heikkoutena on niiden rajoittunut kyky tuottaa vain niille luonnollisia entsyymejä. Tuotantokannat voivat myös muodostaa lopputuotteelle häiritseviä tai haitallisia sivutuotteita, kuten happoja tai toksiineja. Klassisesti muokatuilla tuotantokannoilla myös tuottokyky on usein rajallinen verrattuna suunnitellusti muokattuihin tuotantokantoihin. (Paloheimo, Piironen & Vehmaanperä 2010, 34.)

Klassisesti muunneltujen organismien rajoittavien tekijöiden muokkaaminen on mahdollista suunnitellun geenimuuntelun avulla (GMO, Genetically Modified Organisms). Tuotanto-organismia voidaan muunnella geneettisesti esimerkiksi liittämällä siihen haluttua entsyymiä koodaavaa geeniä tai asettamalla haluttu geeni vahvaan promoottorialueeseen. Geenit, jotka koodaavat ylimääräisten entsyymien tai haitallisten yhdisteiden syntyä, voidaan passivoida tai poistaa kokonaan tuotantokannan genomista. Geneettisen muuntelun avulla voidaan saavuttaa huomattavasti klassista muuntelua korkeammat entsyymien tuottotasot. (Paloheimo, Piironen & Vehmaanperä 2010, 34.)

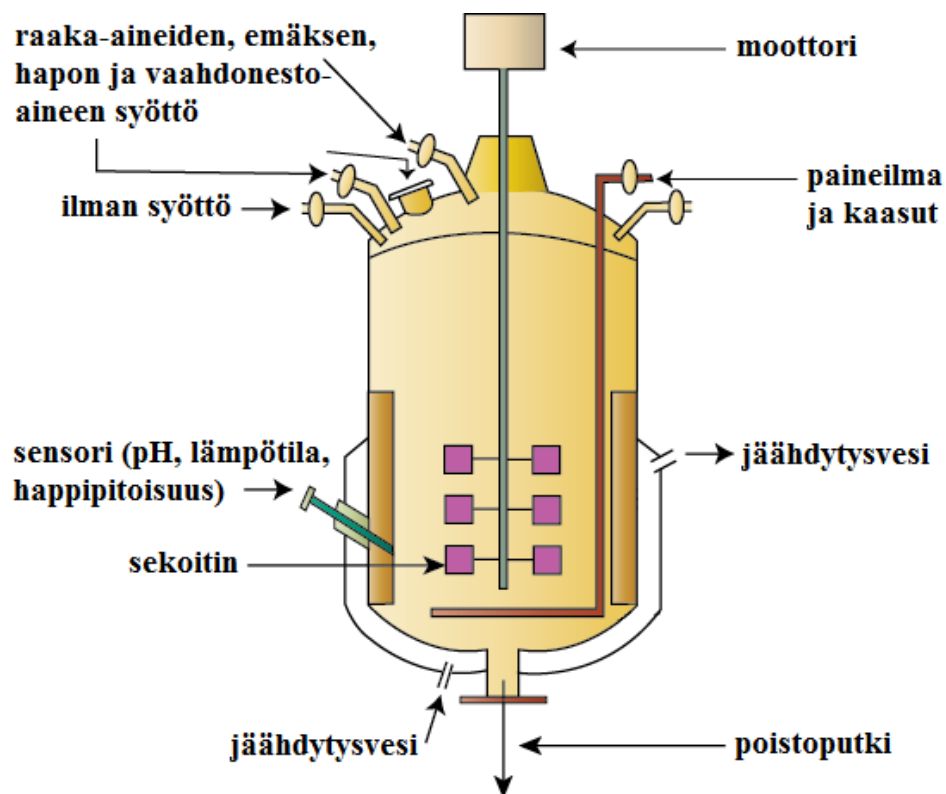
2.1.1 Esikäsitteily ja fermentointi

Entsyymejä valmistettaessa halutaan kasvattaa vain yhtä mikro-organismia eli tuotantokantaa, joten valmistusprosessin on oltava aseptinen. Ennen varsinaisen fermentoinnin

aloittamista prosessissa käytettävä kasvatusliuos ja siihen kosketuksissa olevat muut liuokset, kaasut ja laitteet tulee steriloida esimerkiksi lämpösteriloinnilla, autoklavoimalla, UV-valolla tai suodattamalla. (Von Weymarn 2002, 137, 142–144.)

Entsyymien valmistuksessa käytettävät tuotantokannat säilytetään yleensä syväjäähdytyskammiossa vähintään $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Esikäsittelyvaiheessa tuotantokanta elvytetään sulattamalla se ja kasvattamalla sitä runsasravinteisessa kasvatusliuoksessa optimoidussa lämpötilassa ja pH:ssa. Kun solujen lukumäärä on riittävän suuri, elvytyskasvusto siirretään esikasvatukseen. Esikasvatusten lukumäärä vaihtelee prosessista riippuen ja ne tapahtuvat joko ravistelupulloissa tai pienen kokoluokan ympäfermentoreissa. (Von Weymarn 2002, 145–147.)

Esikasvatusvaiheen jälkeen siirrytään suurempiin tuotantofermentoreihin, jossa pH:ta, lämpötilaa, happipitoisuutta ja ravinteiden määrää seurataan ja pidetään yllä koko fermentoinnin ajan. Fermentori on suljettava ja steriloitava bioreaktori, jossa on moottorilla toimiva sekoitin, sensorit vallitsevien olosuhteiden mittaamiseen, sekä venttiilit ilman, kaasujen ja raaka-aineiden syöttöön ja poistoon. Fermentoria jäähdytetään vesivaipalla. (Von Weymarn 2002, 118, 129–130.) Tyypillinen fermentori on esitetty kuviossa 2.



KUVIO 2. Tyypillisen fermentorin rakenne (NPTEL 2012, muokattu)

Entsyymien fermentointi suoritetaan usein panossyöttöprosessina, joka koostuu kahdesta vaiheesta. Ensimmäisenä tapahtuvassa panosvaiheessa soluja kasvatetaan edelleen ja fermentointia jatketaan, kunnes solujen eksponentiaalisen kasvun vaihe on loppumassa tai hiililähde ehtyy. Panosvaihetta seuraavassa syöttövaiheessa alkaa entsyymien tuotto, jota pidetään yllä lisäämällä raaka-aineita joko pulsseittain tai jatkuvana syöttönä. Tuottoa jatketaan, kunnes haluttu entsyymiaktiivisuus on saavutettu, raaka-aineet ovat loppuneet tai biomassan entsyymintuotto loppuu. (Von Weymarn 2002, 129–130.)

2.1.2 Jälkikäsitely ja formulointi

Mikrobit voivat tuottaa joko intrasellulaarisia entsyymejä solun sisälle tai ekstrasellulaarisia entsyymejä solun ulkopuolelle. Jos lopputuote on solunsisäinen, solut täytyy hajottaa joko mekaanisesti tai ei-mekaanisesti. Usein entsyymituotteet ovat kuitenkin solunulkoisia, joten riittää, että solumassa erotetaan entsyymit sisältävästä liuoksesta. Erotus tapahtuu useimmiten suodattamalla. (Von Weymarn 2002, 182–184, 203.)

Entsyymiliuokset puhdistetaan ja konsentroidaan usein ultrasuodatuksen avulla, jossa kalvon huokoskoko on 0,001–0,02 nanometriä. Suodatuksessa välisäiliössä olevaa entsyymiliuosta pumpataan ultrasuodattimelle, josta retentaatti, eli suodattimelle jäänyt aines, kierrätetään takaisin välisäiliöön ja suodattimen läpäissyt permeaatti hylätään. Jos välisäiliöön ei lisätä nestettä hylätyn permeaatin tilalle, tuote konsentroituu. (Von Weymarn 2002, 187–189.)

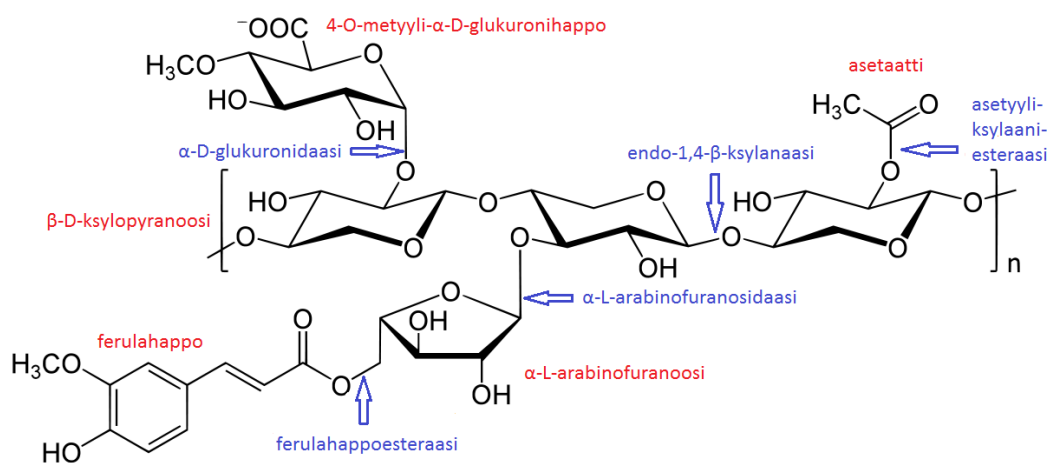
Konsentraattien pH:ta muokataan ja stabiilisuutta parannetaan formuloinnilla, jossa konsentraattiin lisätään esimerkiksi sokerialkoholeja ja suoloja. Käyttötarkoituksesta riippuen entsyymituote voidaan pakata suoraan konsentraattina, mutta usein tuote laimennetaan sopivaan aktiivisuuteen tai spray-kuivataan jauheeksi, ja mahdollisesti myös kiteytetään ennen pakkausta. Jotkin formuloidut tuotteet voidaan vielä suodattaa ennen pakkaamista esimerkiksi ulkonäön parantamiseksi. Jos tuotteesta tehdään entsyymiseos, on haluttujen tuotteiden sekoitus myös osa formulointia. (Von Weymarn 2002, 201–203.)

2.2 Ksylanaasit

Ksylanaasit eli endo-1,4- β -ksylanaasit ovat ryhmä entsyymejä, jotka katalysoivat ksylaanin 1,4- β -D-glykosididistosten endohydrolyysiä. Hydrolyysin tuloksena polysakkaridi ksylaani hajoaa pienemmiksi oligosakkarideiksi. (Prade 1995, Collinsin, Gerdayn & Fellerin 2005, 4 mukaan.) Whistler ja Masek (1955, 1241–1243) kuvasivat ksylanaasit pentosanaaseiksi ja niille annettiin vuonna 1961 entsyymiluokitus EC 3.2.1.8 (Collins, Gerday & Feller 2005, 4).

Ksylanaasin substraattina toimiva ksylaani on kasvisolujen tärkein rakenteellinen polysakkaridi ja kattaa arviolta yhden kolmasosan maapallon uudistuvasta orgaanisesta hiilestä (Prade 1995, Collinsin, Gerdayn & Fellerin 2005, 4 mukaan). Ksylaani on kasvien hemiselluloosan pääkomponentti, ja yhdessä ligniinin ja selluloosan kanssa ne muodostavat kasvien soluseinän päärakenteen (Shallom & Shoham 2003, 219–220).

Aspinallin (1959) mukaan ksylaanin homopolymeerinen runko koostuu 1,4-sitoutuneista β -D-ksylopyranosyyliyksiköistä ja siihen sitoutuneista sivuryhmistä, kuten asetyylistä, arabinofuranosyylistä ja glukuronihaposta. Ksylaaneja luokitellaan ja nimetään sivuryhmiensä mukaan, joten esimerkiksi ksylaani, jossa on sivuryhmänä arabinofuranosyyliä, on nimetty arabinoksylaaniksi. Ksylaanin monimutkaisen rakenteen ja erilaisten sidosryhmien vuoksi ksylaanin täydelliseen hajottamiseen tarvitaan ksylanaasin lisäksi muitakin entsyymejä (kuvio 3). (Kulkarni, Shendye & Rao 1999, 413.)



KUVIO 3. Ksylaanin rakenne ja sidoksia katkaisevat entsyymit (Rogowski ym. 2014, muokattu)

Y5-ksylanaasi

Y5-ksylanaasi on ksylanaasientsyymien muunnos, joka on tuotettu geneettisesti muokattulla *Trichoderma reesei* -tuotantokannalla. Normaalisti *T. reesei* tuottaa lämmölle herkkää ksylanaasientsyymiä. Entsyymiä koodaavaa geeniä on kuitenkin muokattu niin, että entsyymiproteiinissa kolme aminohappoa vaihtuu toisiin aminohappoihin, ja sekvenssiin liittyy yksi ylimääräinen aminohappo. Muokattu tuotantokanta tuottaa lämpökestävää Y5-ksylanaasia. (EFSA 2007, 8.)

2.3 Teollisten entsyymien käyttö

Teollisilla entsyymeillä on eri teollisuudenaloilla laajalti käyttökohteita ja uusia kehitetään jatkuvasti. Teollisia entsyymejä käytetään varsinkin elintarvike-, rehu- ja pesuaineteollisuudessa, paperi-, lääke- ja tekstiiliteollisuudessa, biopolttoaineiden valmistuksessa sekä hiilihydraattien prosessoinnissa. Uusiin käyttötarpeisiin vastataan jatkuvasti tuotekehityksellä ja uusilla sovelluksilla, joten entsyymiteollisuus on jatkuvasti kasvava ja muuttuva teollisuudenala. (Korhola & Uusikylä 2012; DuPont 2016.)

Varsinkin elintarviketeollisuudessa teollisten entsyymien avulla on voitu korvata useita synteettisiä kemikaaleja, joita aiemmin on käytetty. Tämä on mahdollistanut ympäristöystävällisemmät tuotantoprosessit esimerkiksi alentamalla energiankulutusta ja parantamalla tuotteiden ja jätteiden biohajoavuutta. Entsyymien etuna on myös niiden korkea spesifisyys, joten synteettisiin kemikaaleihin verrattuna entsyymejä käyttävät prosessit tuottavat vähemmän sivutuotteita, minkä tuloksena tuotteet ovat puhtaampia ja parempi-laatuisia. (European Commission n.d.)

2.3.1 Ksylanaasien käyttö

Ksylanaaseja käytetään lähes kaikissa teollisuusentsyymien käyttökohteissa (kuvio 4). Ksylanaaseja voidaan käyttää yksin, mutta usein niitä käytetään entsyymiseoksissa esimerkiksi amylaasien, sellulaasien ja fytaasien kanssa, jolloin useiden entsyymien ominaisuudet saadaan hyödynnettyä (Collins, Gerday & Feller 2005). Tärkeimpiä ksylanaasien

käyttökohteita ovat rehuteollisuus (luku 2.3.2) ja elintarviketeollisuus. Muita käyttökoh- teita ovat esimerkiksi paperi- ja selluteollisuudessa sellumassan valkaisu, biopolttoainei- den valmistus sekä tekstiiliteollisuus (Korhola & Uusikylä 2012).

Rehuteollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • sulavuuden parantaminen • fosfaatin vapauttaminen
Leivontateollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • rakenteen muokkaus • gluteenin hapetus
Sokeriteollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • tärkkelyksen hydrolyysi • fruktoosin tuotto
Meijeriteollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • proteiinin saostus • laktoosin hydrolyysi
Juomateollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • mehusaannon lisääminen • hapen poisto
Pesuaineteollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • lian irrottaminen • lian hajottaminen
Puunjalostus	<ul style="list-style-type: none"> • sellun valkaisu • vedenpoisto paperikoneella
Lääketeollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • ruansulatuslääkkeet • laktoosin hydrolyysi
Tekstiiliteollisuus	<ul style="list-style-type: none"> • tärkin poisto • kuitujen muokkaus

KUVIO 4. Ksylanaasien käyttökohteita (Ojamo 2002, 113, muokattu)

Rouaun (1993) mukaan ksylanaasien käyttö leivontateollisuudessa perustuu niiden ky- kyyn muuttaa taikinän liukenemattomat hemiselluloosat liukoisiksi (Butt, Tahir-Nadeem, Ahmad & Sultan 2008, 25). Ksylanaaseja käytetään lisäämään taikinän vahvuutta ja elas- tisuutta ja siten parantamaan taikinän työstettävyyttä. Ksylanaaseilla voidaan myös vai- kuttaa tuotteen, esimerkiksi leivän, tilavuuteen, rakenteeseen, maun voimakkuuteen ja säilyvyyteen. (Dutron ym. 2007.) Leivontateollisuudessa ksylanaaseilla voidaan korvata erilaisia emulgointiaineita (Olse 1995; Sprössler 1997, Buttin ym. 2008, 26 mukaan) ja muita kemiallisia lisäaineita, kuten bromaatti (Maat ym. 1992; Kulkarni, Shendye & Rao 1999, Buttin ym. 2008, 26 mukaan).

Mehuteollisuudessa ksylanaaseja käytetään hajottamaan tärkkelyksen kaltaisia ainesosia hedelmien soluseinistä, jolloin saanto paranee ja mehusta saadaan kirkkaampaa ja juoksevampaa (Nagar, Mittal & Gupta 2012). Alkoholiteollisuudessa ksylanaasien kykyä hajottaa kasvien soluseinien komponentteja hyödynnetään esimerkiksi oluiden ja viinien valmistuksessa, jolloin soluseinän sokerit saadaan hyödynnettyä käymisprosessissa ja uutto- ja suodatusprosesseja voidaan parantaa (Aastrup & Olsen 2008).

2.3.2 Ksylanaasit rehuteollisuudessa

Viljojen ja muiden rehuissa käytettävien raakamateriaalien, kuten soijapavun ja rapsin, sisältämät kuidut vähentävät rehumateriaalin ravintoarvoa ja heikentävät ravinnon sulavuutta. Ravintokuitu koostuu pääosin liukenevasta ja liukenemattomasta arabinoksyalaanista, joka on osa kasvin soluseinää. Arabinoksyalaani sulkee soluseinän sisään tärkeitä ravinteita, kuten tärkkelystä ja proteiineja, eivätkä eläinten omat entsyymit kykene hajottamaan soluseinän kuituja. Arabinoksyalaani myös lisää ravinnon viskositeettiä, mikä hidastaa ravinnon kulkeutumista suolistossa vähentäen eläimen saaman ravinnon määrää ja siten hidastaa kasvua. Arabinoksyalaani aiheuttaa lisäksi haitallisia muutoksia eläimen suoliston mikrofloorassa, mikä johtaa heikkoon ruoansulatukseen sekä lisääntyneisiin ja vetisiin jätteisiin. (Barletta 2010, 1–3; Danisco Animal Nutrition 2012.)

Ksylanaasit hajottavat arabinoksyalaania, joten ksylanaasien käytöllä eläinrehuissa voidaan parantaa eläinten ruoansulatusta ja ravinteiden saantia sekä ravinnon tasalaatuisuutta. Ksylanaasien käytöllä voidaan siten vähentää tuotantokustannuksia, lisätä eläinten kasvua sekä vähentää jätteiden määrää ja parantaa jätteen koostumusta. (Danisco Animal Nutrition 2012.) Ksylanaasit kykenevät myös muodostamaan ksylo-oligosakkarideja, jotka voivat toimia eläimessä probiootteina parantaen suoliston hyödyllisten mikrobien kasvua ja muodostaen lyhytketjuisia rasvahappoja (Kay 2014, 26).

2.4 Entsyymiaktiivisuus

Reaktiossa mukana olevan entsyymin määrää voidaan ilmaista entsyymiaktiivisuuden avulla. Entsyymien aktiivisuutta määritetään käytännössä joko tutkimalla kuluneen substraatin tai muodostuneen lopputuotteen määrää aikayksikköä kohti. Aktiivisuuden

yksikkö SI-järjestelmässä on katal, kat. Katal ilmaisee entsyymin määrää, joka katalysoi yhden substraattimoolin muuttumisen lopputuotteeksi sekunnissa. Usein entsyymiaktiivisuuden yksikkönä käytetään kuitenkin suuruusluokaltaan sopivampaa yksikköä U, joka ilmaisee entsyymimäärän, joka tarvitaan katalysoimaan yhden mikromoolin substraattia muuttumisen lopputuotteeksi minuutissa. (NC-IUB 1979, 319–320.)

Entsyymien substraattispesifisyyden johdosta entsyymiseoksista on mahdollista mitata tietyn yksittäisen entsyymin aktiivisuus. Aktiivisuuden määrittämiseen on olemassa lukuisia erilaisia menetelmiä, joista yleisimpiä ovat spektrofotometriset analyysit. Useimmiten entsyymi ja substraatti muodostavat reaktiossa värillisen lopputuotteen, ja värin intensiteetti määritetään spektrofotometrin avulla. Entsyymien aktiivisuutta voidaan määrittää myös esimerkiksi kromatografisin menetelmin HPLC-laitteella (Rossomando 1998) ja ohutkerroskromatografialla (Kriska & Girotti 2005) tai fluoresenssimenetelmillä, jotka perustuvat esimerkiksi substraatin hajoamisen seurauksena syntyvään fluoresenssireaktioon (Maryati ym. 2013).

Entsyymien aktiivisuusanalyysit ovat hyvin herkkiä määriä. Kaikilla entsyymeillä on tietty lämpötila- ja pH-alue, joilla ne toimivat parhaiten. Täten muutokset pH:ssa ja lämpötilassa voivat aiheuttaa merkittäviä vaihteluita tuloksissa. Esimerkiksi lämpötilan noustessa reaktiot tavallisesti nopeutuvat, mutta liian korkeassa lämpötilassa entsyymin toiminta loppuu. Entsyymit ovat myös hyvin laimennosherkkiä. Analyysien toistotarkkuus on siis analyysistä riippuen usein heikko, joten aktiivisuusanalyysien automatisoinnilla pyritään tasaamaan reaktio-olosuhteita ja poistamaan analysoijasta johtuvaa vaihtelua. Aktiivisuusanalyysien automatisoinnilla voidaan myös vähentää analyysiin kuluvaa aikaa sekä kokonaisuudessaan että aktiivisen työn osalta. Automatisointi mahdollistaa myös useampien näytteiden analysoinnin kerralla, ja usein analyysiin kuluvien reagensien määrää voidaan vähentää. Myös työntekijöiden hyvinvoinnin kannalta automatisointi on kannattavaa, sillä manuaaliset menetelmät vaativat paljon pipetointia ja toistuvia liikkeitä, jotka rasittavat käden ja selän lihaksistoa.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Ksylanaasientsyymin aktiivisuuden määrittämiseksi käytettiin kolmea valmista menetelmää, ja menetelmäohjeita noudatettiin tarkasti. Menetelmistä XYL ja ABX ovat manuaalimenetelmiä ja Y5-KL automaattimenetelmä. Kaikki menetelmät ovat spektrofotometriisiä ja niissä mitataan lopputuotteen muodostumisnopeutta. Reaktio-olosuhteet ja käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Reagenssit ja reaktio-olosuhteet

menetelmä	substraatti	pH	reaktio-lämpötila	pysäytys-liuos	aallon-pituus
Y5-KL	o-nitrofenyyli- β -ksylotrioksi	5,0	30 °C	2 % TRIS, pH 12	405 nm
XYL	vehnän arabinksyalaani	4,0	40 °C	2 % TRIS, pH 12	590 nm
ABX	4-O-metyyli-glukuroniksyalaani	5,3	50 °C	DNS	540 nm

Taulukossa käytetty TRIS on lyhenne tris(hydroksimetyyli)aminometaanille ja DNS puolestaan 3,5-dinitrosalisyylihapolle. Työssä käytetyt menetelmät on kuvattu tarkemmin luvuissa 3.1 ja 3.2.

3.1 Manuaalimenetelmät

Tässä työssä manuaalimenetelmällä tarkoitetaan aktiivisuusmäärittystä, jossa kaikki analyysin työvaiheet suoritetaan käsin. Manuaalimenetelmissä substraatti ja laimennetut näytteet pipetoidaan reaktioputkiin, joita pidetään tietyn lämpöisessä vesihauteessa tarkasti tietyn aikaa. Reaktioajan kuluttua reaktio pysäytetään pipetoimalla putkiin hapanta tai emäksistä pysäytysliuosta, jolloin pH:n muutos estää entsyymin toiminnan. Analyysistä riippuen reaktioputket voidaan vielä keittää ja temperoida lähelle huoneen lämpötilaa. Lopuksi muodostuneen värin intensiteetti määritetään spektrofotometrillä.

Spektrofotometri

Spektrofotometri on laite, joka kykenee erottamaan sähkömagneettisen säteilyn eri aallonpituudet toisistaan ja mittaamaan intensiteetit kullekin aallonpituudelle. Spektrofotometreissä aallonpituuksien erottelu tapahtuu monokromaattorin, useimmiten hilan, avulla. Säteily heijastuu hilan uurteista aallonpituutensa määrittämään suuntaan niin, että säteilyn aallonpituuden kerrannaiset heijastuvat samaan suuntaan. Hilojen yhteydessä käytetään usein suodattimia, joilla voidaan poistaa ylimääräiset kertaluvut. (Thermo RGL 2002.)

Säteilyn intensiteetti pienenee sen kulkiessa näytteen läpi. Intensiteetin pienenemiseen vaikuttavat näytteen ominaisuudet, näytteen pitoisuus ja paksuus sekä säteilyn aallonpituus. Spektrofotometrit mittaavat näytteeseen tulleen ja näytteen läpäisseen säteilyn intensiteettien suhdetta säteilyn aallonpituuden funktiona. Absorbanssi (A) kuvaa näytteeseen absorboituneen säteilyn määrää, ja se on suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon. (Anderson, Bendell & Groundwater 2004, 8–9.)

Tässä työssä käytettiin Shimadzun UV-1800 -spektrofotometriä (kuva 1), jonka mittausalue on 190–1100 nm. Lisäosana spektrofotometrissä käytettiin pumppua, joka imee näytteen läpivirtauskyvetiin. (Shimadzu n.d.) Läpivirtauskyvettä käyttämällä voidaan välttää kyvettien välisten erojen ja kyvettien käsittelyn vaikutus mittaustuloksiin, sillä kyvettä ei vaihdeta erikseen joka näytteelle. Lisäksi läpivirtauskyvetti ja pumppu nopeuttavat absorbanssien mittaamista.



KUVA 1. Shimadzu UV-1800 -spektrofotometri ja läpivirtauspumppu (sipper unit)
(Kuva: Sanna Lindström 2017)

Manuaalimenetelmä, XYL

Menetelmässä käytetään substraattina kuivattua atsurini-ristisidottua vehnän arabino-ksylaania. Tableteiksi puristettu substraatti hajoaa veteen, mutta ei liukene. Reaktioajan jälkeen reaktio pysäytetään emäksisellä 2 % TRIS-liuoksella. Menetelmä perustuu ksylanaasientsyymien kykyyn hydrolysoida substraattia vapauttaen liukoisia värifragmentteja. Syntyneen värillisen liuoksen absorbanssi mitataan aallonpituudella 590 nm. Absorbanssi on suoraan verrannollinen ksylanaasin aktiivisuuteen, joten näytteiden aktiivisuudet las- ketaan standardisuoralta.

Menetelmä poikkeaa muista menetelmistä siinä, että rinnakkaisia laimennoksia ei käytetä. Menetelmässä kutakin näytettä pipetoidaan kolme eri tilavuutta rinnakkaisiin putkiin. Yhteensä yhtä näytettä on siis kuudessa eri putkessa. Tulosten perusteella kullekin näytteelle muodostetaan kaksi kolmen pisteen suoraa, joissa aktiivisuus on näytilavuuden funktiona. Suorien korrelaatiokertoimen tulee olla yli 0,99. Tämä XYL-menetelmän poikkeavuus on oleellinen, kun vertaillaan menetelmien tarkkuutta luvussa 4.3.

Manuaalimenetelmä, ABX

ABX-menetelmän substraattina käytetään koivupuun 4-O-metyyliglukuroniksyyliaania, joka hajoaa pelkistäviksi sokereiksi ksylanaasin vaikutuksesta. Lisäksi reagenssina käytetään DNS-liuosta, jonka aiheuttama pH:n muutos estää entsyymien toiminnan pysäyttäen siten reaktion. Pysäytyksen jälkeen putkia keitetään, jolloin DNS-liuos reagoi pelkistävien sokereiden kanssa muodostaen punaoranssia 3-amino-5-nitrosalisyylihappoa. Reaktiossa muodostuneen oranssin värin absorbanssi mitataan aallonpituudella 540 nm ja näytteiden aktiivisuudet lasketaan ksyloosistandardisuoralta.

3.2 Automaattimenetelmä

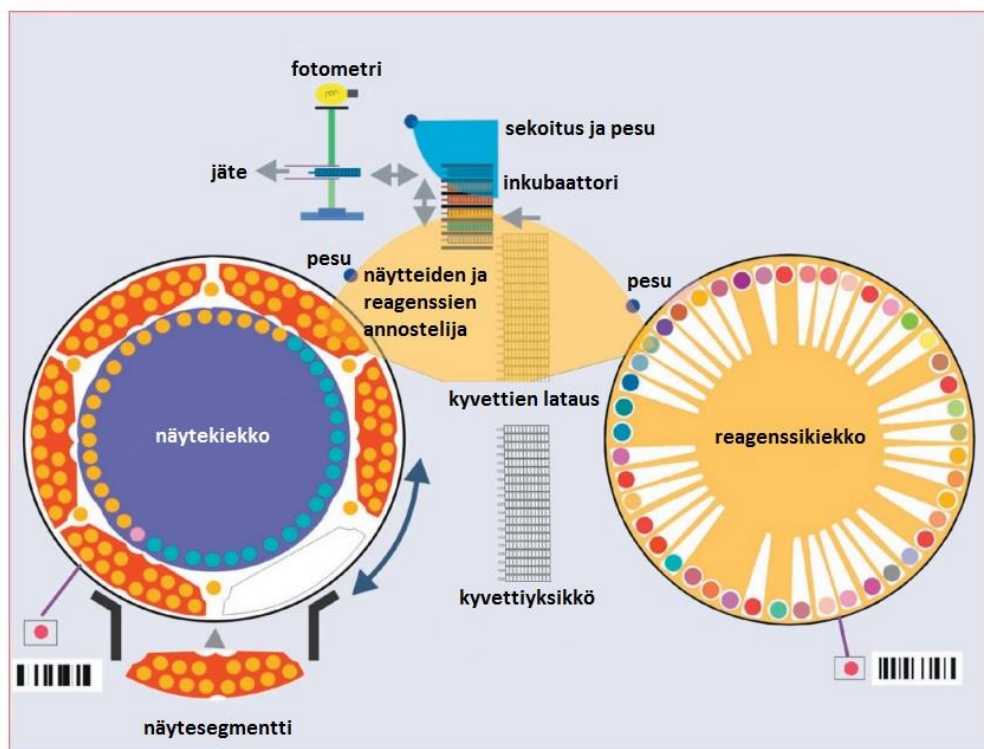
Automatisoidussa aktiivisuusmenetelmässä käytetään kahta erilaista Thermo Scientificin fotometristä autoanalysaattoria, joista toinen on kuvassa 2. Thermo Scientificilla on sarja erilaisia autoanalysaattoreita, joille on kehitetty suuri määrä erilaisia määrittämenetelmiä ja valmiita reagensseja eri alojen, kuten prosessiteollisuuden, biotekniikan, elintarvikekemian ja kliinisen kemian, käyttötarpeisiin. Valmiiden määrittämenetelmien lisäksi analysaattoreille on mahdollista luoda omia menetelmiä käyttäjän tarpeiden mukaisesti. (Thermo Scientific 2007, 2013.)



KUVA 2. Arena 30 -analysaattori (Kuva: Sanna Lindström 2017)

Rakenteeltaan Arena 30 ja Konelab Arena 30 poikkeavat toisistaan hieman, mutta toimintoiltaan ne ovat käytännössä toisiaan vastaavat analysaattorit. Molemmissa analysaattoreissa näytteen absorbanssien mittauksen suorittaa yksikanavainen suodatinfotometri. Mittausaallonpituus voidaan valita väliltä 340–880 nm ja mittauslämpötilä väliltä 30–50 °C. Valonlähteenä molemmissa analysaattoreissa toimii halogeenilamppu, jonka lineaarinen absorbanssialue on 0–2,4 A. (Thermo Scientific 2007, 2008.)

Molemmat laitteet kykenevät kuormituksesta ja määritysten ominaisuuksista riippuen analysoimaan jopa 300 näytettä tunnissa (Thermo Scientific 2007, 2008, 2013). Entsyymimäärityksissä määrä on usein huomattavasti pienempi pidemmistä reaktioajoista johtuen. Thermo Scientificin (2007, 2008, 2013) mukaan analysaattoreihin mahtuu kerrallaan 84 näyttekuppia, 45 reagenssiastiaa ja 600 kyvettä, joten analysaattorit kykenevät toimimaan itsenäisesti ilman analysoijan huomiota parhaimmillaan muutaman tunnin ajan. Konelab Arena 30 -analysaattorin rakenne on esitetty kuviossa 5.



KUVIO 5. Konelab Arena 30 -analysaattorin rakenne (Thermo Scientific 2007, muokattu)

Analysaattorin käyttö on nopeaa ja yksinkertaista menetelmien tallennusmahdollisuuden johdosta. Analysaattorille on mahdollista tallentaa noin 200 erilaista menetelmää, joten

uuden analyysin aloittaminen ja analyysin vaihto tapahtuvat nopeasti analyysien parametrien ollessa laitteella valmiina.

Kun käytetään tallennettua menetelmää, analysaattorille ohjelmoidaan näytteiden lukumäärä, valitaan haluttu analyysi sekä syötetään substraatti, pysäytysliuos ja näytteet. Ohjelmoinnin jälkeen analysaattori suorittaa menetelmän mukaisesti reagenssien ja näytteiden pipetoinnin, pysäyttää analyysin tarkasti oikeaan aikaan ja määrittää muodostuneen värin intensiteetin. Analysaattorille on mahdollista lisätä esimerkiksi reagensseja ja näytteitä pysäyttämättä analyysiä, mikä parantaa analysoinnin joustavuutta ja muunneltavuutta.

Automaattimenetelmä, Y5-KL

Autoanalyyttimenetelmässä käytetään substraattina o-nitrofenyyli- β -ksylotriosoia, jonka hajotessa ksylanaasin vaikutuksesta vapautuu o-nitrofenyyliä. Autoanalyyttoriin annostellaan myös 2 % TRIS-liuosta, jolla laite pysäyttää reaktion reaktioajan päätyttyä. Fenoliryhmä on kromofori, joten analysaattori määrittää liuoksen absorbanssin aallonpituudella 405 nm. Absorbanssi on suoraan verrannollinen ksylanaasiaktiivisuuteen, joten näytteiden aktiivisuus lasketaan standardisuoralta.

3.3 Näytteet

Työssä käytettiin yhteensä kahdeksatoista erilaista näytetyyppiä. Kontrollinäytteiden ja lopputuotinäytteiden lisäksi mukana oli näytteitä fermentoinnin ja jälkikäsittelyn eri vaiheista. Kaikki työssä käytetyt näytteet olivat nestemäisiä. Jokaisesta näytetyypistä valittiin analysoitavaksi kahdesta viiteen mahdollisimman tuoretta näyte-erää. Joistakin näytetyypeistä oli kuitenkin mahdollista saada analysoitavaksi vain yksi erä. Käytetyt näytteet on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Työssä käytetyt näytteet

KOODI	NÄYTTEEN TYYPPI	LKM	NÄYTE-ERÄT	ABX
KTR	kontrolli (XYL ja Y5-KL)	1	KTR	
99h	ajonseurantanäyte, 99 h	1	99h	X
171h	ajonseurantanäyte, 171 h	1	171h	X
243h	ajonseurantanäyte, 243 h	1	243h	X
LN	fermentoinnin loppunäyte	4	LN1, LN2, LN3, LN4	X
LNS	loppunäytteen suodos	1	LNS	X
K	konsentraatti	5	K1, K2, K3, K4, K5	X
N1	puolivalmiste tai lopputuote	4	N1.1, N1.2, N1.3, N1.4	X
N2	puolivalmiste tai lopputuote	2	N2.1, N2.2	X
N3	puolivalmiste tai lopputuote	3	N3.1, N3.2, N3.3	
N4	puolivalmiste tai lopputuote	2	N4.1, N4.2	X
N5	puolivalmiste tai lopputuote	3	N5.1, N5.2, N5.3	
N6	puolivalmiste tai lopputuote	2	N6.1, N6.2	
N7	puolivalmiste tai lopputuote	2	N7.1, N7.2	
N8	puolivalmiste tai lopputuote	2	N8.1, N8.2	
N9	puolivalmiste tai lopputuote	3	N9.1, N9.2, N9.3	
N10	puolivalmiste tai lopputuote	2	N10.1, N10.2	
N11	puolivalmiste tai lopputuote	1	N11	

Osa mukana olevista näytteistä hyväksytään tehtaalta vapautettaviksi ABX-aktiivisuuden perusteella (merkitty taulukon ABX-sarakkeeseen). Nämä näytteet analysoitiin sekä ABX-, XYL- että Y5-KL -menetelmillä. Näytteet, joiden vapautusaktiivisuutena on käytössä XYL, analysoitiin vain XYL- ja Y5-KL -menetelmillä. Näytteet analysoitiin vähintään kahdesti kullakin vaaditulla menetelmällä.

3.4 Analyysien laadunvalvonta

Jokaisessa analyysissä valmistettiin standardisuora, jolle oli asetettu menetelmäkohtainen korrelaatiokertoimen vähimmäisraja. Lisäksi XYL- ja Y5-KL -menetelmissä keskimmäiselle standardipisteelle oli asetettu rajat, joiden sisällä standardipisteen absorbanssin ja konsentraation suhteen tuli olla. Kunkin analyysin standardisuora hyväksyttiin vain, jos nämä kriteerit täyttyivät.

Jokaisessa analyysissä oli mukana kontrollinäyte kahtena rinnakkaisena laimennoksena. XYL- ja Y5-KL -menetelmissä käytettiin samaa kontrollinäytettä, kun taas ABX-mene-

telmässä käytettiin eri kontrollia. Kaikkien menetelmien kohdalla hyväksyttiin vain niiden analyysien tulokset, joissa kontrollinäytteen aktiivisuus oli määrätyissä rajoissa. Standardi- ja kontrollituloksia koskevat laadunvalvontaan liittyvät rajat on esitetty taulukossa 3. Y5-KL -menetelmälle asetetut rajat eivät vielä ole viralliset, vaan suuntaa antavat.

TAULUKKO 3. Analyysien laadunvalvonnan rajat

menetelmä	STANDARDI		KONTROLLI aktiivisuus (U/g)
	korrelaatio	A / c	
Y5-KL	0,997	0,025–0,031	–
XYL	0,990	0,680–0,850	23656–26945
ABX	0,998	–	22256–25913

Analyyseissä hyväksyttiin vain ne tulokset, jotka osuivat standardisuoralle ja useimmissa tapauksissa standardisuoran keskivaiheille. XYL-menetelmässä jokaiselle näytteelle tehtiin kaksi rinnakkaista kolmen pisteen suoraa ja kaikkien pisteiden tuli olla menetelmän lineaarisella alueella.

Edellä mainittujen kriteerien lisäksi analyyseissä valvottiin tulosten suhteellisia keskihajontoja. Suhteellinen keskihajonta eli RSD lasketaan jakamalla otoksen keskihajonta otoksen keskiarvolla. ABX- ja Y5-KL -menetelmissä saman näytteen rinnakkaisten laimennosten välinen suhteellinen keskihajonta sai olla enintään 5 %. Lisäksi kaikissa menetelmissä samasta näytelaimennoksesta määritettyjen rinnakkaisten absorbanssien suhteellisen keskihajonnan yläraja oli 5 %. Jos suhteelliset keskihajonnat olivat suurempia, uusittiin kyseisten näytteiden aktiivisuusmääritykset.

4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Työhön hyväksyttiin aktiivisuustulokset kaikista analyyseistä, joissa analyysin laadunvalvonnan kriteerit täyttyivät. Kahden analyysin tulokset hylättiin, sillä toisessa kontrolliliuoksen aktiivisuus oli huomattavasti alle hyväksyntärajan ja toisessa standardisuoran korrelaatiokerroin oli alhainen. Hylätyt analyysit uusittiin hyväksytysti. Kaikki hyväksytyt aktiivisuustulokset on esitetty liitteissä 1, 2 ja 3.

4.1 Aktiivisuuksien keskiarvo

Näytteiden rinnakkaisista aktiivisuustuloksista laskettiin kaikille kolmelle menetelmälle keskiarvot. Kontrolleille ja fermentoinnin eri vaiheista otetuille näytteille lasketut keskiarvot on esitetty taulukossa 4. XYL- ja Y5-KL -menetelmissä on käytössä sama kontrollinäyte ja ABX menetelmässä eri näyte. Täten ABX-kontrolli analysoitiin vain ABX-menetelmällä, eikä tulosta käytetty työssä muuhun kuin analyysien laadunvalvontaan. Taulukossa on esitetty myös suhteelliset keskihajonnat (RSD) prosentteina kunkin näytteen rinnakkaisille tuloksille.

TAULUKKO 4. Kontrolli- ja fermentointinäytteiden aktiivisuustulosten keskiarvot ja suhteelliset keskihajonnat analyysien välillä

NÄYTE	Y5-KL		XYL		ABX	
	aktiivisuus U/g	RSD %	aktiivisuus U/g	RSD %	aktiivisuus U/g	RSD %
KONTROLLI KTR (KL, XYL) KTR (ABX)	26070	3,39	25451	3,97	23529	4,71
LOPPUNÄYTE						
LN1	67842	2,40	62214	3,14	34391	5,38
LN2	66022	2,11	57230	0,02	32240	5,53
LN3	59299	3,91	53334	5,60	29629	0,83
LN4	64581	0,57	59680	1,42	28034	1,36
KONSENTRAATTI						
K1	290896	1,92	260703	1,84	138598	4,36
K2	288953	1,19	253483	1,34	131150	0,93
K3	283264	3,38	248471	1,04	127708	2,55
K4	275460	2,18	246047	2,53	129006	4,38
K5	257138	1,68	245367	3,29	124451	3,56
AJONSEURANTA						
99h	13115	4,86	13050	0,86	6240	1,84
171h	32562	1,94	32274	2,41	14327	4,66
243h	51025	1,41	46365	0,45	21347	2,50
LN SUODOS						
LNS	75007	1,15	64967	3,11	31521	3,08

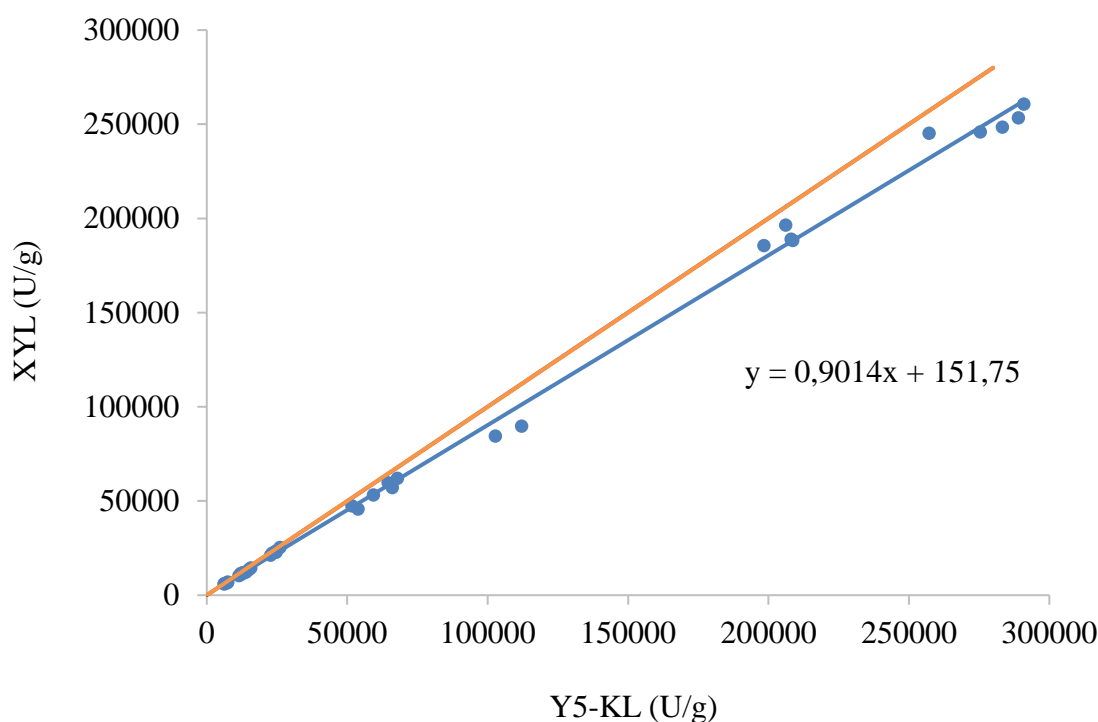
Taulukossa 5 on puolestaan esitetty puolivalmisteiden ja lopputuotteiden aktiivisuustulosten keskiarvot ja rinnakkaisten tulosten suhteelliset keskihajonnat. ABX-menetelmällä analysoitiin vain ne näytteet, joiden vapautuksessa on tällä hetkellä käytössä ABX-aktiivisuus.

TAULUKKO 5. Puolivalmisteiden ja lopputuotteiden aktiivisuustulosten keskiarvot ja suhteelliset keskihajonnat analyysien välillä

NÄYTE	Y5-KL		XYL		ABX	
	aktiivisuus U/g	RSD %	aktiivisuus U/g	RSD %	aktiivisuus U/g	RSD %
N1.1	208682	4,79	188375	4,92	97032	2,64
N1.2	208062	3,07	189079	2,43	96596	1,61
N1.3	206106	3,07	196583	5,77	99696	5,50
N1.4	198427	0,95	185699	5,88	97797	3,87
N2.1	112102	2,13	89894	2,01	50010	2,50
N2.2	102711	6,04	84536	0,73	46757	1,93
N3.1	12871	0,40	11992	3,05		
N3.2	12200	0,63	11151	3,47		
N3.3	11507	2,73	10479	2,49		
N4.1	53844	0,83	45839	2,91	24905	4,54
N4.2	51728	2,95	47456	0,20	25725	2,09
N5.1	23339	1,12	22308	1,65		
N5.2	24146	1,16	22870	4,20		
N5.3	22754	0,92	21337	3,28		
N6.1	15635	1,10	14593	3,36		
N6.2	15033	2,24	13778	2,11		
N7.1	6234	2,66	6225	2,48		
N7.2	6263	0,49	5983	3,34		
N8.1	7369	3,56	6806	2,08		
N8.2	7497	1,99	7102	2,22		
N9.1	12367	0,88	11630	0,89		
N9.2	12877	0,99	11874	3,63		
N9.3	12063	2,76	11545	1,20		
N10.1	24680	2,01	22861	0,49		
N10.2	24524	6,04	23423	0,75		
N11.1	13966	0,51	12278	4,35		

Joidenkin näytteiden kohdalla rinnakkaisten tulosten suhteellinen keskihajonta ylitti lievästi laboratoriossa yleisesti käytössä olevan 5 % rajan. Työn tarkoituksena oli kuitenkin menetelmien vertailukelpoisuuden lisäksi tutkia myös menetelmien toistokykyä, joten kaikki mittaustulokset jätettiin työhön mukaan.

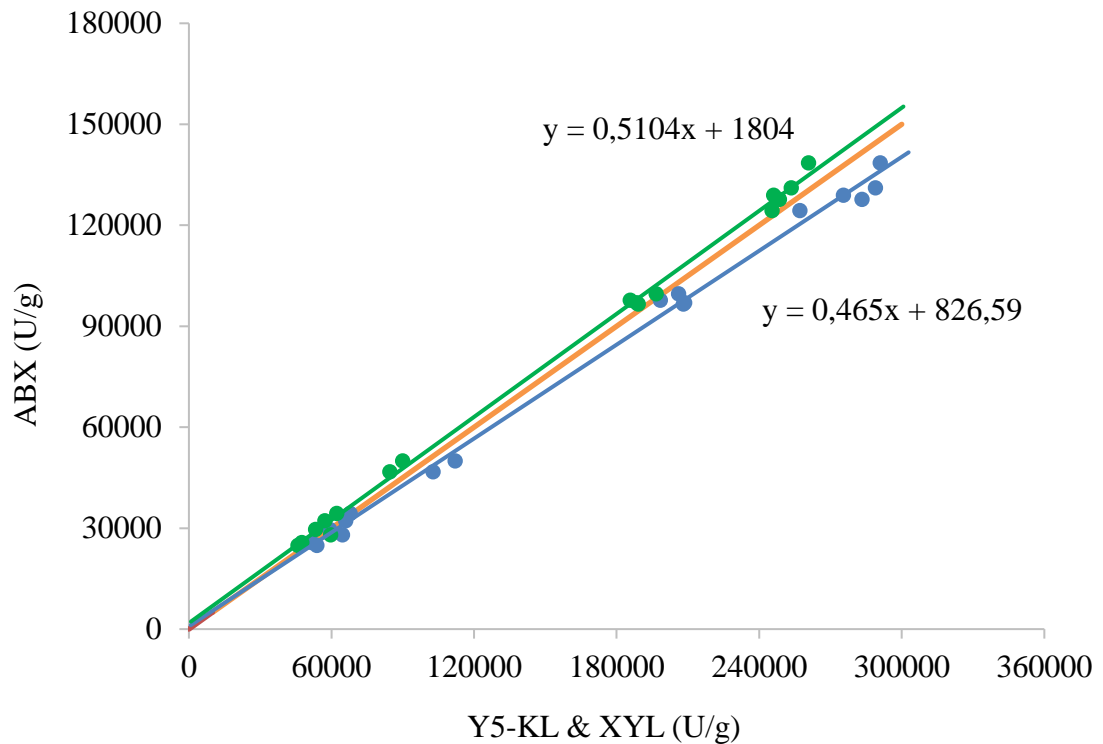
XYL- ja Y5-KL -menetelmien tulosten olisi toivottavaa olla yhtä suuret. Tulosten vertailemiseksi piirrettiin kuvaaja (kuvio 6), jossa XYL-menetelmän tulokset ovat Y5-KL -menetelmän tulosten funktiona. Pisteiden kautta sovitettiin kulkemaan suora. Lisäksi kuvaajaan piirrettiin oranssi suora, jossa $x=y$.



KUVIO 6. XYL-menetelmän tulokset Y5-KL -menetelmän funktiona

Kuvaajassa oranssi suora esittää siis ideaalitulannetta, jossa menetelmien tulokset ovat yhtä suuret. Kuvaajasta voidaan kuitenkin nähdä, että jokaisen näytteen kohdalla Y5-KL -menetelmän tulos oli XYL-menetelmän tulosta suurempi. Pienillä aktiivisuuksilla menetelmien tulokset olivat kuitenkin lähempänä toisiaan.

ABX-menetelmän tulosten tulisi olla noin puolet XYL- ja Y5-KL -menetelmän tuloksista. Kuviossa 7 on esitetty kuvaaja, jossa ABX-menetelmän aktiivisuudet ovat y-akselilla ja XYL- sekä Y5-KL -aktiivisuudet ovat x-akselilla. Kuvaajassa vihreällä on esitetty ABX-aktiivisuudet XYL-aktiivisuuksien funktiona ja sinisellä ABX-aktiivisuudet Y5-KL -aktiivisuuksien funktiona. Oranssi suora esittää tilannetta, jossa ABX-aktiivisuudet ovat tasan puolet XYL- ja Y5-KL -aktiivisuuksista.



KUVIO 7. ABX-aktiivisuudet XYL- ja Y5-KL -aktiivisuuksien funktiona

Kuvioon on laskettu sekä ABX/XYL -suoran että ABX/Y5-KL -suoran yhtälöt. Suorien kulmakertoimista ja kuvaajista voidaan nähdä ABX-aktiivisuuksien olleen enemmän kuin puolet XYL-aktiivisuuksista ja vähemmän kuin puolet Y5-KL -aktiivisuuksista. Koko aineistosta laskettuna ABX- ja XYL-aktiivisuuksien suhde oli noin 0,53 ja ABX- ja Y5-KL -aktiivisuuksien suhde noin 0,47. Toisin sanoen ABX-aktiivisuus oli keskimäärin 53 % XYL-aktiivisuudesta ja 47 % Y5-KL -aktiivisuudesta.

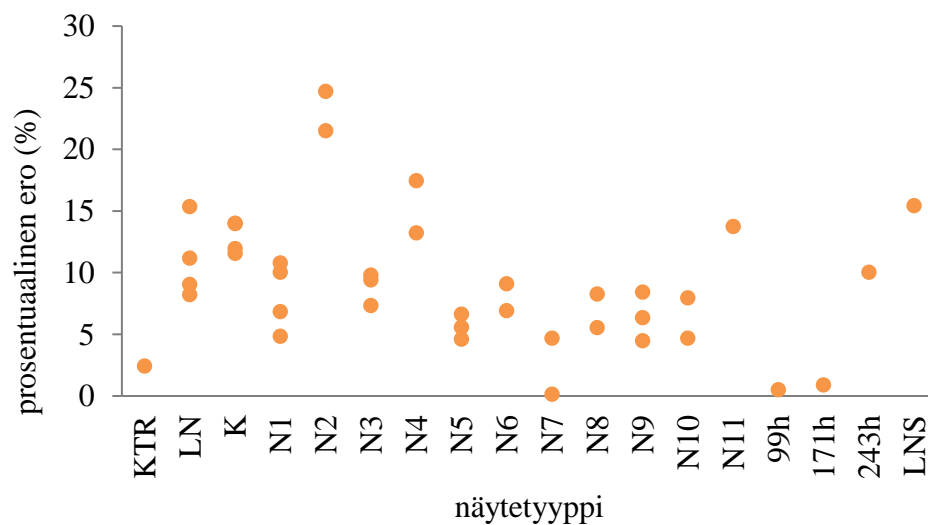
4.2 Menetelmien välinen prosentuaalinen ero

XYL- ja Y5-KL -menetelmien tuloksia verrattiin tarkemmin laskemalla prosentuaalinen ero menetelmien tulosten välille. Prosentuaaliset erot laskettiin vertaamalla, kuinka monta prosenttia Y5-KL -menetelmän tulokset olivat suurempia kuin XYL-menetelmän tulokset. Prosentuaaliset erot on esitetty taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Prosentuaalinen ero XYL- ja Y5-KL -menetelmien tulosten välillä

näyte- tyyppi	prosentuaalinen ero				
	näyte 1	näyte 2	näyte 3	näyte 4	näyte 5
KTR	2,43				
LN	9,05	15,36	11,18	8,21	
K	11,58	13,99	14,00	11,95	4,80
N1	10,78	10,04	4,84	6,85	
N2	24,71	21,50			
N3	7,33	9,41	9,81		
N4	17,46	13,23			
N5	4,62	5,58	6,64		
N6	6,91	9,11			
N7	0,14	4,68			
N8	8,28	5,56			
N9	6,34	8,44	4,49		
N10	7,95	4,70			
N11	13,75				
99h	0,50				
171h	0,89				
243h	10,05				
LNS	15,45				

Näytekohtaisista prosentuaalisista eroista piirrettiin kuvaaja (kuvio 8). Kuvaajassa saman näytetyypin eri näyte-erien tulosten prosentuaaliset erot on esitetty päällekkäin.



KUVIO 8. Prosentuaalinen ero XYL- ja Y5-KL -menetelmien tulosten välillä

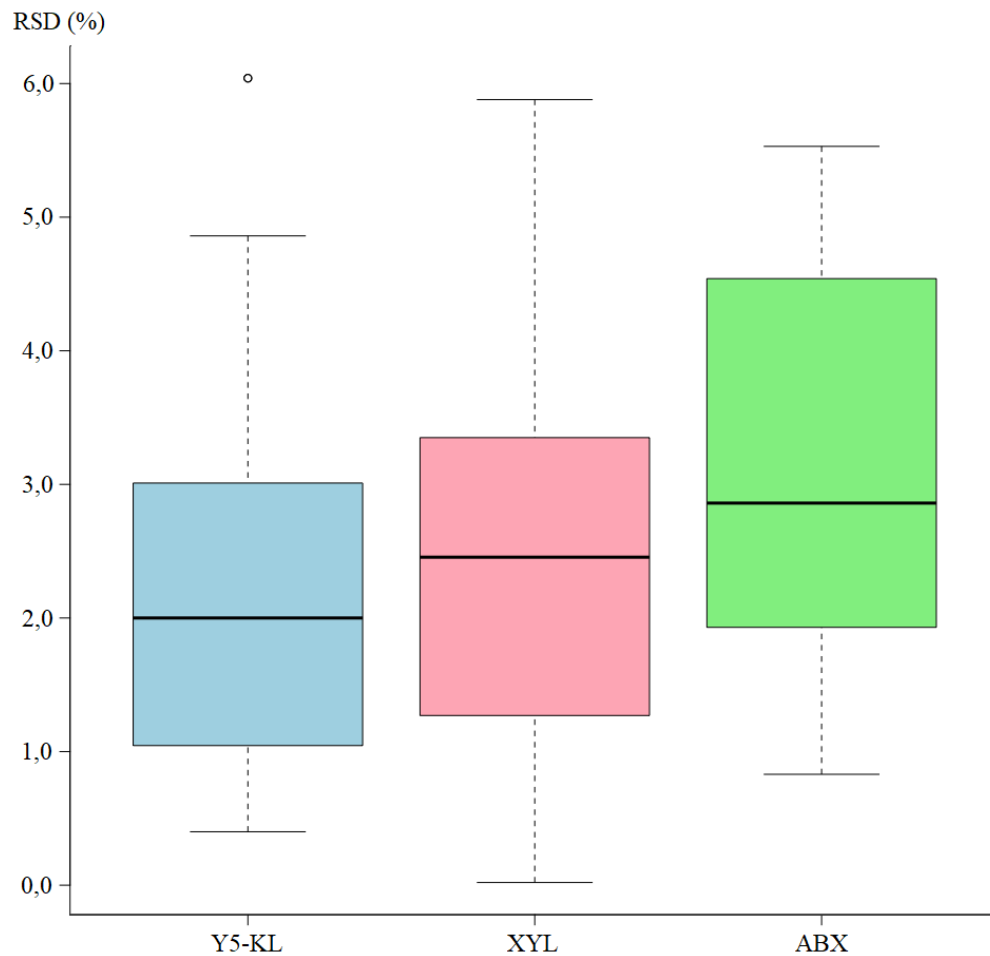
Kuvaajasta voidaan nähdä näytetyypin vaikuttavan prosentuaaliseen eroon, sillä saman näytetyypin näytteillä prosentuaaliset erot olivat samaa luokkaa. Tästä voidaan päätellä, millä näytetyypeillä analysaattorimenetelmään siirtyminen on ongelmallista tai jopa mahdotonta ilman muutoksia tuotteiden valmistus- ja analysointiprosesseihin.

Kaikista suurin prosentuaalinen ero tulosten välillä oli N2-näytetyypillä. Työssä käytettiin kyseisestä näytetyypistä uusimpia näyte-eriä, jotka olivat vuodelta 2012. Kyseisten näytteiden aktiivisuus on noussut vuonna 2012 analysoiduista tuloksista, eikä näytteiden tulosten voida varmuudella katsoa olevan enää vertailukelpoisia. Lisäksi kyseisen tuotetyypin valmistus on lopetettu, joten tuotteen tulosten voidaan ajatella olevan merkityksetömiä analysaattorimenetelmään siirtymistä suunniteltaessa.

4.3 Suhteellinen keskihajonta

Rinnakkaisten aktiivisuustulosten poikkeamista toisistaan tarkasteltiin laskemalla tuloksille suhteelliset keskihajonnat. ABX- ja Y5-KL -menetelmissä samasta näytelaimennoksesta saatiin kaksi absorbanssitulosta, ja rinnakkaisia laimennoksia tehtiin kaksi. XYL-menetelmässä rinnakkaisia laimennoksia ei tehty, mutta samasta näytelaimennoksesta saatiin useita absorbanssituloksia. Näin ollen suhteellinen keskihajonta voitiin laskea eri analyysien välille, saman analyysin rinnakkaisten laimennosten välille ja saman laimennoksen rinnakkaisten tulosten välille.

Analyysien välisistä suhteellisista keskihajonnoista muodostettiin R-ohjelmalla boxplot-kaaviot kullekin menetelmälle (kuvio 9). Boxplot eli laatikko- ja viiksikaavio kuvaa aineiston jakauman neljänneksinä. Laatikkoon sijoittuu 50 % havaintoarvoista ja viiksiin aineiston alin ja ylin 25 %. Mahdolliset yksittäiset poikkeavat havaintoarvot esitetään ympyröinä viiksien ulkopuolella. Aineiston mediaani, eli keskimäinen arvo, kuvataan laatikossa olevalla mustalla viivalla.



KUVIO 9. Boxplot-kaaviot analyysien välisistä suhteellisista keskihajonnoista eri menetelmillä

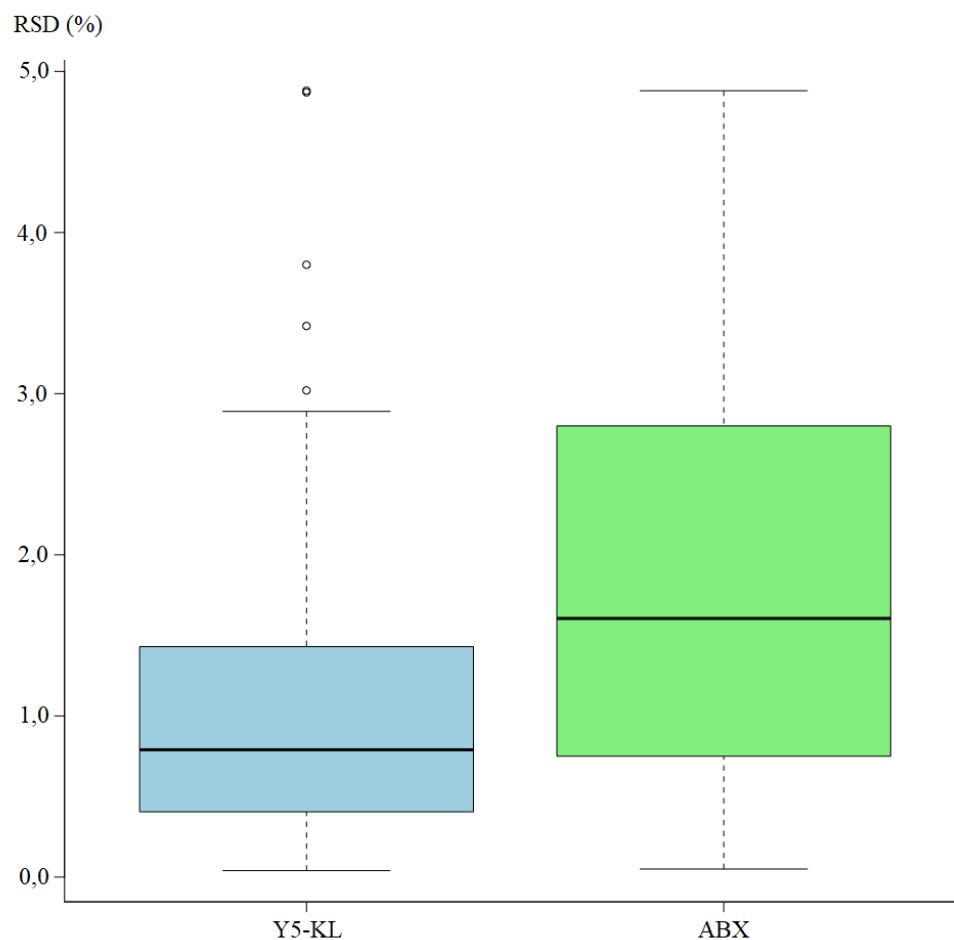
Boxplot-kuvaajasta voidaan nähdä, että suhteellisten keskihajontojen mediaani oli pienin Y5-KL -menetelmässä ja suurin ABX-menetelmässä. Tulosten keskimäinen 50 % oli XYL- ja Y5-KL -menetelmissä vaihteluväliltään lähes sama, ja ABX-menetelmässä suurempi. Kokonaisuudessaan suurin vaihteluväli oli XYL-menetelmässä, jos Y5-KL -menetelmän yhtä poikkeavan suurta arvoa ei oteta huomioon. Analyysien välisistä suhteellisista keskihajonnoista laskettiin myös mediaanit ja keskiarvot (taulukko 7).

TAULUKKO 7. Suhteellisten keskihajontojen mediaanit ja keskiarvot

menetelmä	mediaani	keskiarvo
Y5-KL	2,00	2,20
XYL	2,46	2,52
ABX	2,86	3,20

Laskennallisista mediaaneista ja keskiarvoista voidaan nähdä, että kullakin menetelmällä suhteellisten keskihajontojen mediaanit olivat hieman keskiarvoja pienemmät. Sekä mediaaneista että keskiarvoista on nähtävissä, että Y5-KL -menetelmällä on todennäköisempää saada pienempiä tulosten suhteellisia keskihajontoja analyysien välillä kuin manuaalimenetelmillä.

Boxplot-kaavioita käytettiin myös analyysien sisäisen suhteellisen keskihajonnan vertailuun. Kuviossa 10 on esitetty boxplot-kaaviot rinnakkaisten laimennosten suhteellisista keskihajonnoista Y5-KL - ja ABX-menetelmillä.

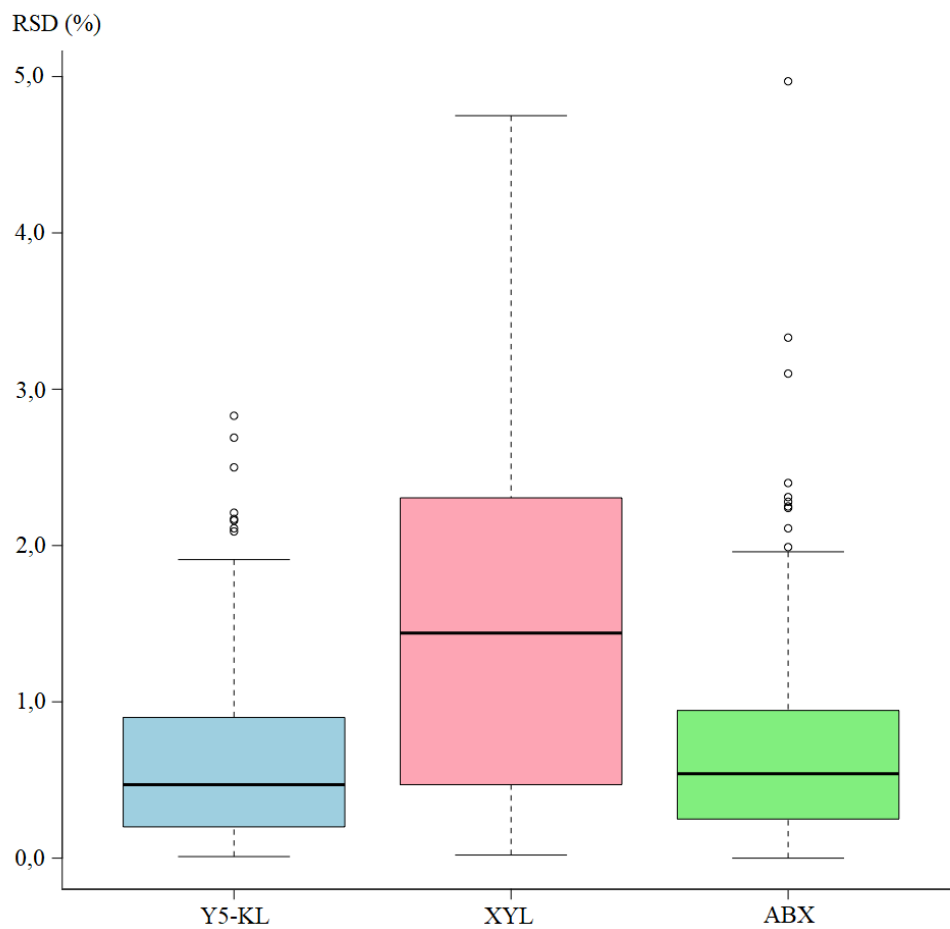


KUVIO 10. Rinnakkaisten laimennosten suhteelliset keskihajonnot

Rinnakkaisten laimennosten suhteelliset keskihajonnot olivat selvästi pienemmät Y5-KL -menetelmässä, etenkin, jos yksittäiset poikkeavat arvot jätetään huomiotta. Alempien

viiksien päistä nähdään, että molemmilla menetelmillä voidaan saavuttaa suhteellisia keskihajontoja, jotka ovat hyvin lähellä nollaa. Y5-KL -menetelmällä pieniä suhteellisen keskihajonnan arvoja saavutetaan kuitenkin selvästi ABX-menetelmää useammin.

ABX- ja Y5-KL -menetelmissä määritettiin lisäksi kaksi rinnakkaista absorbanssia samalle näytelaimennokselle. XYL-menetelmässä rinnakkaisia absorbanssituloksia määritettiin kuusi, mutta molempien suorien tuloksista laskettiin käytännössä keskiarvo. Tämän johdosta kaikista menetelmistä oli mahdollista laskea suhteelliset keskihajonnot myös yksittäisestä laimennoksesta saaduille rinnakkaisille absorbanssituloksille. Myös näistä suhteellisista keskihajonnoista muodostettiin boxplot-kaavio (kuvio 11).



KUVIO 11. Saman näytelaimennoksen rinnakkaisten mittausten absorbanssien suhteelliset keskihajonnot

Kuvaajasta voidaan nähdä ABX- ja Y5-KL -menetelmien olevan lähes yhtä tarkkoja saman laimennoksen rinnakkaisten tulosten osalta. ABX-menetelmällä on siis mahdollista saavuttaa autoanalyysointitarkkuus, mikäli analyysoija pipetoi huolellisesti.

XYL-menetelmällä vastaavanlaista tarkkuutta ei saavuteta, mutta menetelmää ei voida erilaisuutensa vuoksi pitää tässä suhteessa täysin vertailukelpoisena kahden muun menetelmän kanssa. Tällainen suhteellisten keskihajontojen vertailu antaa kuitenkin arvokasta tietoa menetelmien tarkkuutta ja luotettavuutta tutkittaessa.

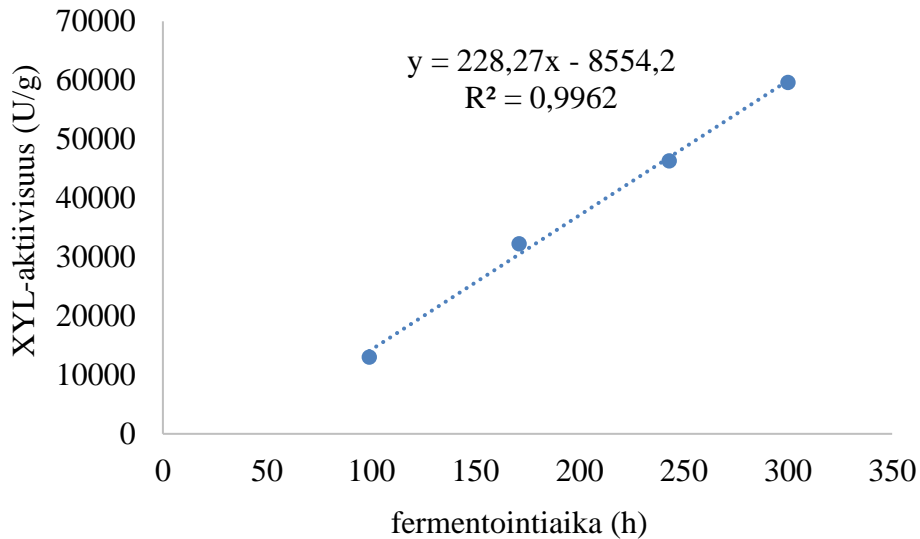
4.4 Fermentoinnin lineaarisuus

Lopputuotenäytteiden lisäksi laboratoriossa analysoidaan näytteitä fermentoinnin eri vaiheista. Tällä hetkellä Y5-fermentointien aktiivisuutta ei seurata ajon aikana. Jos kuitenkin ajonseuranta jälleen aloitettaisiin, olisi tärkeää tietää, että analysaattorimenetelmän ajonseurantatulokset ovat yhtä lineaariset kuin manuaalimenetelmillä. Fermentoinnin lineaarisuutta eri menetelmillä tutkittiin analysoimalla jokaisella menetelmällä ajonseuranta-näytteitä fermentoinnin 99, 171 ja 243 tunnin kohdalla sekä fermentoinnin lopussa 300 tunnin kohdalla. Viimeinen näyte oli sama kuin näyte LN4. Taulukkoon 8 on koottu fermentoinnin ajonseurantanäytteiden aktiivisuudet ja niiden perusteella lasketut korrelaatiokertoimet kullekin menetelmälle. Korrelaatiokerroin on tilastollinen tunnusluku, joka kuvaa suoraviivaisen riippuvuuden voimakkuutta. Jos korrelaatiokertoimen arvo on tasan yksi, vallitsee muuttujien välillä täydellinen positiivinen korrelaatio, eli muuttujien arvot ovat lineaarisesti täysin riippuvaisia toisistaan.

TAULUKKO 8. Fermentoinnin ajonseurantanäytteiden aktiivisuus ja korrelaatio

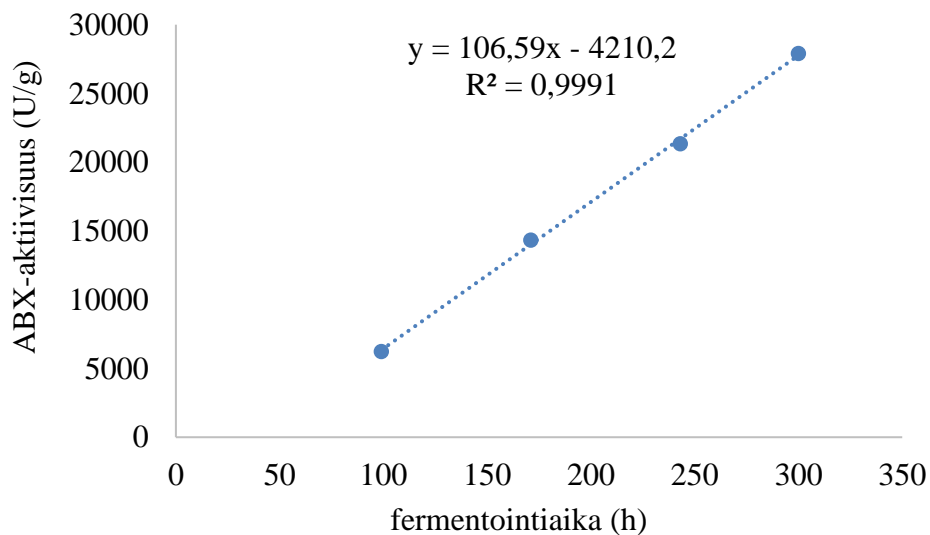
fermentointiaika h	Y5-KL aktiivisuus U/g	XYL aktiivisuus U/g	ABX aktiivisuus U/g
99	13115	13050	6240
171	32562	32274	14327
243	51025	46365	21347
300	64581	59680	27901
korrelaatio	0,9997	0,9981	0,9995

Korrelaatiokertoimien perusteella voidaan todeta fermentointinäytteen aktiivisuuden ja fermentointiajan olleen lähes täysin riippuvaisia toisistaan jokaisella menetelmällä, sillä lineaarinen korrelaatio on kunkin menetelmän kohdalla hyvin lähellä arvoa yksi. Fermentointinäytteiden aktiivisuustuloksista laadittiin jokaiselle menetelmälle kuvaaja, jossa x-akselilla on ajon kesto ja y-akselilla näytteen aktiivisuus. Mittauspisteisiin sovitettiin suora. XYL-menetelmän kuvaaja on esitetty kuviossa 12.



KUVIO 12. Fermentoinnin lineaarisuus XYL-menetelmällä

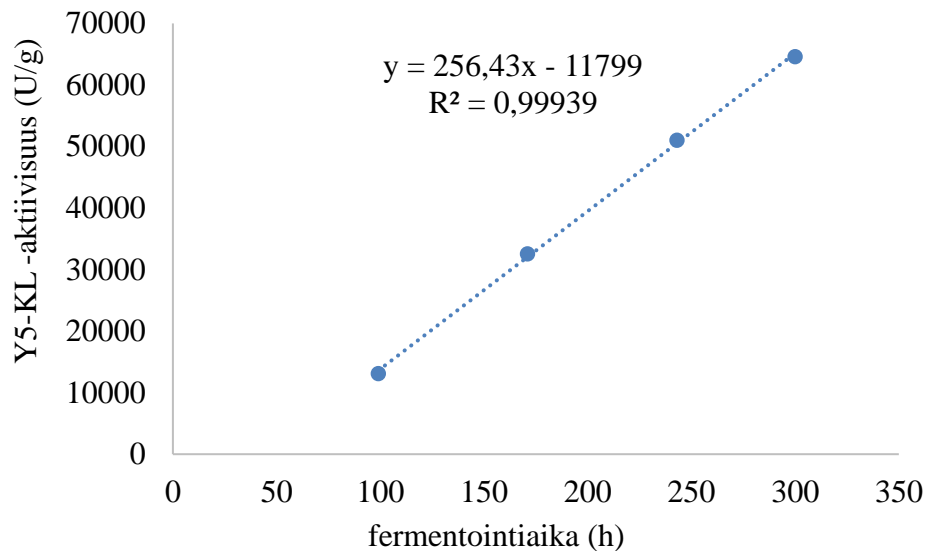
Lineaarisuuden tutkimiseen oli saatavilla näytteitä vain yhdestä fermentoinnista, joten näiden tulosten perusteella ei voida tehdä varmoja johtopäätöksiä menetelmien lineaarisuudesta ajonseurantänäytteiden määrittämisessä. Tuloksista voidaan kuitenkin saada viitteitä lineaarisuudesta. Myös ABX-menetelmän tuloksista piirrettiin kuvaaja, joka on esitetty kuviossa 13.



KUVIO 13. Fermentoinnin lineaarisuus ABX-menetelmällä

Kuvaajiin on laskettu determinaatiokerroin, R^2 , joka on korrelaatiokertoimen neliö. Determinaatiokerroin ilmaisee, kuinka suuri osa toisen muuttujan vaihtelusta on tilastollisesti selitettävissä toisen muuttujan vaihtelulla. Lisäksi kuvaajissa on esitetty molempien

suorien yhtälöt. Yhtälöissä näkyvistä kulmakertoimista ja y-akselin leikkauspisteistä voidaan havaita ABX-menetelmän tulosten olevan myös ajonseurantanäytteillä noin puolet XYL-menetelmän tuloksista. Myös Y5-KL-menetelmälle piirrettiin fermentoinnin ajonseurantanäytteiden aktiivisuuksien perusteella kuvaaja. Kuvaaja on esitetty kuviossa 14.



KUVIO 14. Fermentoinnin lineaarisuus Y5-KL -menetelmällä

Myös Y5-KL -menetelmän kuvaajaan on laskettu determinaatiokerroin ja suoran yhtälö. Determinaatiokertoimen perusteella voidaan sanoa analysaattorimenetelmän olevan lineaarisempi kuin manuaalimenetelmien, joskin kaikki kolme menetelmää ovat tulosten perusteella hyvin lineaarisia. Kuvaajien kulmakertoimia ja y-akselin leikkauspisteitä vertaamalla voidaan todeta Y5-KL -menetelmän aktiivisuustulosten olevan XYL-menetelmän tuloksia korkeampia, kuten jo muiden näytetyyppien kohdalla aiemmin todettiin.

Fermentoinnin loppunäytteestä analysoidaan laboratoriossa myös suodos, jonka aktiivisuus on hieman suodattamatonta näytettä korkeampi. Työssä tutkittiin myös loppunäytteen LN4 ja sen suodoksen aktiivisuuksien suhdetta analysaattorimenetelmällä suhteessa XYL- ja ABX-menetelmään. Y5-KL -menetelmällä aktiivisuuksien suhde oli suurin, sillä loppunäytteen suodoksen aktiivisuus oli noin 16 % loppunäytteen aktiivisuutta korkeampi. ABX-menetelmällä ero oli 12 % ja XYL-menetelmällä 9 %.

5 POHDINTA

Vaikka XYL- ja Y5-KL -menetelmien tulosten olisi toivottavaa vastata toisiaan, voitiin analysointimenetelmän tulosten odottaa olevan XYL-menetelmän tuloksia korkeampia aiempien tutkimustulosten perusteella. Työssä saadut tulokset tukevat laboratorion aiempien selvitystöiden päätelmiä siitä, että Y5-KL -menetelmän tulokset ovat säännönmukaisesti korkeampia kuin XYL-menetelmän tulokset. Menetelmien välinen prosentuaalinen ero vaihteli 0,14 % ja 17,46 % välillä, jos poikkeavaa ja jo lopetettua tuotetyyppeä N2 ei otettu huomioon. Prosentuaalisten erojen keskiarvo ilman tuotetyyppeä N2 oli 8,33 %.

Todennäköisimmin menetelmien välinen ero tuloksissa johtuu menetelmien erilaisuudesta, kuten eri pH:sta tai eri substraateista ja reagensseista. Menetelmissä käytetään myös eri standardinäytteitä, mikä voi vaikuttaa tulosten väliseen eroon. Tuloksista voidaan huomata menetelmien välisen prosentuaalisen eron riippuvan jossakin määrin näytetyypin aktiivisuudesta, sillä suurimmat erot tuloksissa olivat näytteillä, joiden aktiivisuus on suuri. Sama havainto voidaan tehdä myös fermentoinnin ajon seuranta näytteiden tulosten perusteella, sillä prosentuaalinen ero menetelmien välillä kasvoi fermentointinäytteen aktiivisuuden kasvaessa. Voimakasta korrelaatiota näytteiden aktiivisuuden ja tulosten prosentuaalisen eron välillä ei kuitenkaan ole havaittavissa.

Formulointikemikaaleilla ei nähty olevan selkeää vaikutusta eri menetelmien tulosten välisiin prosentuaalisiin eroihin, mutta ainakin näytetyypin N2 kohdalla tämä voi olla mahdollista, sillä erästä kyseisten näytteiden sisältämää formulointikemikaalia ei ole muissa työssä käytetyissä näytteissä. Ennen formulointikemikaalien vaikutuksesta tehtyjä johtopäätöksiä tulisi tutkimuksia jatkaa esimerkiksi erilaisia koeformulaatioita analysoimalla.

Joidenkin analyysien kohdalla on huomattavissa analyysin yleisen tason olleen normaalia hieman korkeampi tai matalampi, vaikka analyysi täytti kaikki laadunvalvontakriteerit. Tietyn analyysin tulokset voivat siis korottaa suhteellista keskihajontaa ja vaikuttaa nostavasti tai laskevasti myös tulosten keskiarvoon. Tällaisissa tilanteissa analyysi kuitenkin uusittiin kyseisten näytteiden osalta, jotta poikkeavat tulokset eivät vaikuttaisi merkittä-

västi mittaustulosten keskiarvoon. Työn tuloksia voidaan pitää luotettavina, sillä analyysien laadunvalvontakriteerejä seurattiin tarkasti, eikä analyyseissä havaittu mitään normaalista poikkeavia seikkoja, jotka voisivat vaikuttaa vääristävästi työn tuloksiin.

Uuden menetelmän käyttöönoton kannalta säännönmukaisesti korkeammat tulokset ovat hyvä asia, sillä menetelmien välille on mahdollista ottaa käyttöön korjauskerroin, joilla menetelmien ero pystytään tasaamaan. Jos analysaattorin tulokset olisivat osalla näytteistä selvästi suuremmat ja osalla selvästi pienemmät kuin XYL-menetelmän tulokset, olisi Y5-KL -menetelmän tuloksia vaikeampi saada vastaamaan XYL-tuloksia. Korjauskerroin voidaan laskea XYL- ja Y5-KL -menetelmien tulosten suhteen perusteella. Eri näytetyypeillä prosentuaalinen ero on kuitenkin eri suuruinen, joten saman korjauskertoimen käyttö kaikilla näytetyypeillä saattaa johtaa tulosten vääristymiseen näytteillä, joiden aktiivisuus on keskiarvoa suurempi tai pienempi. Näytetyypistä riippuvan korjauskertoimen käyttöönotto on myös mahdollista, mutta useat erilaiset korjauskertoimet hankaloittavat käytännön työskentelyä. Todennäköisesti kuitenkin yksi kaikille näytetyypeille yhteinen korjauskerroin riittää.

Mikäli fermentointinäytteiden analysointi siirretään analysaattorille, eikä korjauskorointia ole käytössä, on riskinä liian laimean lopputuotteen tekeminen. Esimerkkinä voidaan käyttää työssä analysoitua konsentraattinäytettä K1, jonka aktiivisuus analysaattorimenetelmällä oli 290896 U/g ja XYL-menetelmällä 260703 U/g. Jos tästä konsentraatista laimennetaan analysaattorimenetelmän aktiivisuustuloksen perusteella tuotetta N3, jonka tavoiteaktiivisuus on noin 11400 U/g, on valmiin tuotteen aktiivisuus XYL-menetelmällä vain noin 10200 U/g. Useimmissa tilanteissa tuotteen aktiivisuus on edelleen sallituissa rajoissa, mutta joissakin tilanteissa lopputuotteen aktiivisuus saattaa olla liian matala.

Vaikka analysaattorimenetelmällä saadaankin korkeampia tuloksia, puoltavat useat seikat siihen siirtymistä. Suhteellisista keskihajonnoista sekä yksittäisen analyysin sisällä että analyysien välillä voidaan todeta analysaattorimenetelmän olevan menetelmistä tarkin. Kuten luvun 4.3 boxplot-kaavioista nähdään, rinnakkaisten tulosten ja rinnakkaisten analyysien suhteelliset keskihajonnat olivat pienimmät analysaattorilla määritettynä. Analysaattorimenetelmässä tekijästä johtuvaa vaihtelua on vähemmän, sillä analysaattori hoitaa suurimman osan pipetoinneista ja analysaattorin pipetointitarkkuus on parempi kuin ihmisellä. Työssä käytettiin vaihtelevasti molempia analysaattoreita, eikä analysaattorilla valinnalla huomattu olevan vaikutusta tuloksiin.

Työturvallisuuden näkökulmasta Y5-KL -menetelmää voidaan pitää manuaalimenetelmiä parempana. Manuaalimenetelmissä liuoksia käsitellään lasisissa koeputkissa, joiden kunto tarkastetaan silmämääräisesti ennen analyysiä. Pieniä vaurioita on kuitenkin vaikea havaita, joten putket voivat hajota käsiteltäessä. Etenkin sekoituksessa putkia joudutaan painamaan koeputkisekoittajaa vasten, jolloin putken hajoamisen riski kasvaa. Myös ABX-menetelmän keittovaiheessa lievästikin vaurioituneet putket hajoavat helposti. ABX-menetelmän keittovaihetta voidaan pitää muutenkin turvallisuusriskinä, sillä siinä käsitellään kiehuvaa vettä ja kuumia koeputkia.

Käytettävien reagenssien turvallisuudessa ei juurikaan ole eroa. ABX-menetelmässä käytettävä DNS-liuos on luokiteltu ihoa ja silmiä ärsyttäväksi ja terveydelle haitalliseksi hengitettynä, nieltynä ja iholle joutuessaan. DNS-liuosta kuitenkin käytetään laboratoriossa muissakin aktiivisuusmenetelmissä, joten DNS-liuoksen käyttöä ei voitaisi lopettaa, vaikka ABX-menetelmän käytöstä luovuttaisiinkin. Vaikka Y5-KL -menetelmässä ei käytetä haitallista DNS-liuosta, on pysäytysliuoksena käytössä XYL-menetelmän tapaan TRIS, joka on luokiteltu ihoa ja silmiä ärsyttäväksi. Lisäksi jokaisessa menetelmässä käsitellään liuosten pH:n säädön yhteydessä väkeviä happoja ja emäksiä, jotka luokitellaan syövyttäväksi ja ärsyttäväksi. Vaikka jokaisessa menetelmässä onkin käytössä haitallisia reagensseja, analysaattorimenetelmässä niitä käsitellään vähemmän kuin manuaalimenetelmissä. Analysaattori hoitaa reagenssien pipetoinnin, joten analysoijan täytyy vain syöttää reagenssit laitteelle. Täten työturvallisuuden voidaan katsoa paranevan myös reagenssien käsittelyn osalta.

Analysaattorimenetelmään siirtyminen olisi merkittävä parannus laboratoriotyöskentelyn ergonomian kannalta, sillä erityisesti pipetointi on merkittävä vaivojen ja rasitusvammojen aiheuttaja laboratorioissa. Pipetointi on pitkäkestoista ja staattista ja vaatii usein paljon toistoja. Työterveyslaitoksen tutkimusinsinööri Risto Toivonen kertoo pipetoinnin kuormittavan koko käden lihaksistoa sekä niska- ja hartia-seutua (Saarikko 2016). Pipetointi vaatii myös voimankäyttöä esimerkiksi kärkeä kiinnitettäessä ja poistettaessa, jolloin varsinkin peukalo kipeytyy helposti. Ergonomia ja käytettävyys -tiimin päällikkö Nina Nevala Työterveyslaitokselta kertoo käsivammojen riskin viisinkertaistuvan, jos pipetointia tehdään yli 300 tuntia vuodessa (Alajoki 2012, 16). Automaattimenetelmässä pipetointia tarvitsee tehdä huomattavasti vähemmän kuin manuaalimenetelmissä, sillä analysaattori suorittaa näytteiden ja reagenssien pipetoinnin.

Yhtenä työn osana oli vertailla eri menetelmien kustannuksia ja arvioida mahdollista säästöä, joka automaattimenetelmään siirtymällä voitaisiin saavuttaa. Menetelmien kustannukset on arvioitu taulukossa 9 tämänhetkisten reagenssien hintojen perusteella. Arviot on laskettu analyysille, jossa on mukana standardin ja kontrollin lisäksi neljä näytettä sekä niiden rinnakkaiset laimennokset. Taulukkoon on laskettu myös substraatin hinta yhtä näytettä ja sen rinnakkaista laimennosta kohti. ABX-menetelmän kohdalla on huomioitavaa, että tällä hetkellä käytössä olevaa substraattia ei enää valmisteta. Kustannukset ABX-substraatin osalta on siten laskettu sekä nykyiselle substraatille että eräälle vaihtoehtoiselle uudelle substraatille.

TAULUKKO 9. Menetelmien kustannukset

menetelmä	hinta per analyysi (4 näytettä) €	substraatin hinta yhtä näytettä kohti €
Y5-KL	40	5,3
ABX	42 / 77	0,4 / 5,0
XYL	50	8,0

Taulukosta voidaan huomata, ettei yksittäisten analyysien hinnoissa ole merkittävää eroa eri menetelmien välillä, jos käytetään ABX-menetelmän nykyistä substraattia. Uuteen substraattiin siirryttäessä ABX-menetelmän kustannukset nousevat kuitenkin merkittävästi muita menetelmiä korkeammiksi. Jos arvioidaan neljän näytteen XYL- ja ABX-analyysejä tehtävän vuosittain kumpaakin 65 kappaletta, voidaan XYL- ja ABX-analyysien yhteenlaskettujen vuosittaisten kustannusten laskea vanhalla ABX-substraatilla olevan noin 6000 euroa ja uudella substraatilla noin 8300 euroa. Jos nämä analyysimäärät lasketaan yhteen ja analysoidaan autoanalysaattorimenetelmällä, tulee vuosikustannuksiksi noin 5200 euroa. Y5-KL -menetelmään siirtymällä voidaan Y5-näytteiden vuosittaisissa analysointikustannuksissa säästää siis vähintään 800 euroa, eli noin 13 %, ja mikäli joudutaan siirtymään uuden substraatin käyttöön ABX-menetelmässä, olisi vuosittainen säästö analysaattorimenetelmällä noin 3100 euroa, eli noin 37 %. Todellisuudessa Y5-KL -menetelmään siirryttäessä vuosittaisten kustannusten voidaan kuitenkin katsoa vähenevän tästä edelleen, sillä analysaattorimenetelmässä voidaan analysoida kerralla useampia näytteitä kuin manuaalimenetelmillä. Lisäksi varsinkin ABX-menetelmään verrattuna Y5-KL -menetelmä on vakaampi, joten uusinta-analyysien määrän voidaan

katsoa vähenevän nykyisestä, mikä osaltaan vähentää vuosittaista analyysimäärää. Vuosittaiset analyysimäärät ja näytteiden määrä analyysiä kohti on laskettu edellisten vuosien analyysimäärien ja keskimääräisen näytemäärän perusteella.

Yhtenä syynä uuteen menetelmään siirtymiselle pidetään analyysien keston lyhentämistä ja sitä kautta tuotteiden aktiivisuustulosten nopeampaa valmistumista. Taulukossa 10 on arvioitu analyysin kokonaiskesto, kun analyysissä on mukana neljä tai kahdeksan näytettä. Analysointiajat on laskettu analyysin aloitushetkestä tulosten valmistumiseen. Ajoissa ei kuitenkaan ole huomioitu reagenssien valmistamista tai näytteiden laimentamista, sillä niihin kuluvan ajan voidaan katsoa olevan kaikissa menetelmissä lähes sama.

TAULUKKO 10. Analyysien kesto eri menetelmillä

menetelmä	kesto (4 näytettä)	kesto (8 näytettä)	näytteitä enintään analyysissä
Y5-KL	45 min	45 min	kymmeniä
ABX	1,5–2 h	3–4 h	4
XYL	1,5–2 h	3–4 h	7

Analyysien keston lisäksi taulukkoon on arvioitu näytteiden maksimimäärä yhtä analyysiä kohti, kun jokaisesta näytteestä valmistetaan kaksi rinnakkaislaimennosta. XYL-menetelmässä rinnakkaislaimennoksia ei käytetä. Manuaalimenetelmissä on rajallinen näytteiden maksimimäärä yhtä analyysiä kohti, joten kahdeksalla näytteellä analyysi joudutaan tekemään kahdesti. ABX-menetelmässä standardisuora on voimassa 12 tuntia analysoinnista, joten suoraa ei tarvitse tehdä saman päivän aikana uudelleen, mutta XYL-menetelmässä standardiliuos analysoidaan aina kontrollin ja näytteiden mukana. Y5-KL-analyysissä voidaan analysoida käytännössä kymmeniä näytteitä, jos alku-, väli- ja lopukontrollien tulokset eivät poikkea toisistaan merkitsevästi, eli kontrollien suhteellinen keskihajonta ei ylitä viittä prosenttiyksikköä. Autoanalysaattori määrittää 45 minuutissa sekä standardisuoran että noin kymmenen näytettä ja niiden rinnakkaiset laimennokset. Jos näytteitä on enemmän, lisääntyy analysointiaika noin 25 minuutilla kymmentä näytettä kohti.

Taulukossa ilmoitetut analyysien kestot ovat kokonaiskestoja. Manuaalimenetelmissä analysoija joutuu olemaan aktiivisesti analyysissä läsnä lähes koko analyysin keston ajan, mutta Y5-KL -menetelmässä analysaattori suorittaa ohjelmoinnin ja reagenssien syötön

jälkeen analyysin itsenäisesti. Täten analysaattorimenetelmässä analysoijaa sitova aika on huomattavasti analyysin kokonaiskestoa lyhyempi, eli noin 10 minuuttia.

Yhteenvetona voidaan todeta Y5-KL -menetelmän olevan toimiva menetelmä, jolla saadaan keskimäärin 8 % nykyistä XYL-manuaalimenetelmää korkeampia tuloksia. Työn perusteella analysaattorimenetelmään siirtymistä puoltavat edullisemmat kustannukset, nopeampi analysointiaika, analysaattorimenetelmän tarkkuus sekä työturvallisuuden ja työskentelyergonomian paraneminen. Lisäksi XYL-menetelmän tilalle on tulossa uusi manuaalimenetelmä, jota laboratorioissa ei haluta siirtyä käyttämään. Myös ABX-menetelmän substraatin valmistuksen loppuminen lisää analysaattorimenetelmän kannattavuutta, sillä uusi substraatti on nykyistä kalliimpi.

Työssä saatujen tulosten perusteella päätettiin siirtyä käyttämään uutta analysaattorimenetelmää lähitulevaisuudessa. Ennen menetelmän käyttöönottoa odotetaan lausuntoa yrityksen laadunvalvontalaboratorioiden toimintaa ohjaavalta toimipaikalta. Saadun lausunnon perusteella päätetään, miten menetelmän vaihdon kanssa edetään. Analysaattorimenetelmä kuitenkin todettiin toimivaksi kaikilla näytetyypeillä ja menetelmän vaihto kannattavaksi, joten seuraavaksi päätetään, miten menetelmien välinen ero tasataan ja eron vaikutukset minimoidaan.

LÄHTEET

- Aastrup, S. & Olsen, H.S. 2008. Enzymes in brewing. *BioZoom* 10 (2). Biokemisk Forening - Danish Society for Biochemistry and Molecular Biology. [verkkojulkaisu]. Luettu 19.4.2017. <http://www.biokemi.org/biozoom/issues/522/articles/2368>
- Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. 2002. *Bioprosessitekniikka*. 1. painos. Helsinki: WSOY.
- Alajoki, Sanna. 2012. Ergonominen laboratorio on toimiva ja viihtyisä. *Kemia* 39 (4), 16.
- Anderson, R.J., Bendell, D.J. & Groundwater, P.W. 2004. *Organic Spectroscopic Analysis*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Aspinall, G.O. 1959. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry* 14, 429–468.
- Barletta, A. 2010. Introduction: Current Market and Expected Developments. Teoksessa Bedford, M. & Partridge, G. (ed.) *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2nd edition. Wallingford: CAB International. 1–11.
- Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z. & Sultan, M.T. 2008. Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology* 46 (1), 22–31.
- Campbell, M.K., Farrell, S.O. 2011. *Biochemistry*. 7th edition. Pacific Grove: Brooks/Cole.
- Collins, T., Gerday, C. & Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (1), 3–23.
- Danisco Animal Nutrition. 2012. Danisco Xylanase. More profit through improved nutrition. DuPont. [PDF]. Tulostettu 27.2.2017. http://animalnutrition.dupont.com/fileadmin/user_upload/live/animal_nutrition/documents/open/Feed-carbohydrase-enzyme-Danisco-Xylanase-Danisco-Animal_-Nutrition.pdf
- DuPont. 2016. 2015 DuPont Data Book. [PDF]. Tulostettu 4.3.2017. https://s2.q4cdn.com/752917794/files/doc_downloads/2015/DuPont_2015_DataBook-FINAL.pdf
- Dutron, A., Georis, J., Genot, B., Dauvrin, T., Collins, T., Hoyoux, A. & Feller, G. 2007. Use of family 8 enzymes with xylanolytic activity in baking. Patentihakemus US 20070054011 A1. [www-sivu]. Päivitetty 8.3.2007. Luettu 4.3.2017. <https://www.google.ch/patents/US20070054011>
- EFSA. 2007. Safety and efficacy of Danisco Xylanase G/L (endo-1,4-beta-xylanase) as a feed additive for chickens for fattening, laying hens and ducks for fattening. *The EFSA Journal* 5 (10).
- European Commission. n.d. Enzymes. [www-sivu]. Luettu 20.2.2017. http://ec.europa.eu/food/safety/food_improvement_agents/enzymes_en

- Kay, Z. 2014. Additive technology improves alternative feed ingredient performance. *Feed International* 35 (6), 24–29.
- Korhola, M. & Uusikylä, M. 2012. Teollisuusentsyymeistä kansainvälisesti verkostoitunutta liiketoimintaa. *Tekesin katsaus* 287/2012. [PDF]. Tulostettu 16.2.2017. <https://www.tekes.fi/globalassets/julkaisut/teollisuusentsyymit.pdf>
- Kriskka, T. & Girotti, A.W. 2005. A thin layer chromatographic method for determining the enzymatic activity of peroxidases catalyzing the two-electron reduction of lipid hydroperoxides. *Journal of Chromatography B* 827 (1), 58–64.
- Kulkarni, N., Shendye, A. & Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23 (4), 411–456.
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos Da Silva, M.J., Bosse, M., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., Gorcom, R.F.M., Helsing, J.G.M., Van den Hondel, C.A.M.J.J. & Van Rotterdam, C. 1992. Xylanases and their applications in bakery. Teoksessa Visser, J., Kusters van Someren, M.A., Beldman, G. & Voragen, A.G.J. (ed.) *Xylan and Xylanases, Progress in Biotechnology No. 7*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 349–360.
- Maryati, M., Kaur, I., Jadhav, G.P., Olotu-Umoren, L., Oveh, B., Hashmi, L., Fischer, P.M. & Winkler, G.S. 2013. A fluorescence-based assay suitable for quantitative analysis of deadenylase enzyme activity. *Nucleic Acids Research* 42 (5).
- Nagar, S., Mittal, A. & Gupta, V.K. 2012. Enzymatic clarification of fruit juices (Apple, pineapple and tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17 (6), 1165–1175.
- NC-IUB. 1979. Units of Enzyme Activity. Recommendations 1978. *European Journal of Biochemistry* 97 (2), 319–320.
- NPTEL. 2012. Bioreactors for plant engineering. [www-sivu]. Päivitetty 3.10.2012. Luettu 17.4.2017. <http://nptel.ac.in/courses/102103016/36>
- Ojamo, H. 2002. Käytännön sovellukset. Teoksessa Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. (toim.) *Bioprosessitekniikka*. 1. painos. Helsinki: WSOY. 78–115.
- Olse, H.S. 1995. Use of enzymes in food processing. Teoksessa Reed, G. & Nagodawithana (ed.) *Enzymes, Biomass, Food and Feed Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH. 663–736.
- Paloheimo, M., Piironen, J. & Vehmaanperä, J. 2010. Xylanases and cellulases as feed additives. Teoksessa Bedford, M. & Partridge, G. (ed.) *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2nd edition. Wallingford: CAB International. 12–53.
- Rogowski, A., Baslé, A., Farinas, C.S., Solovyova, A., Mortimer, J.C., Dupree, P., Gilbert, H.J. & Bolam, D.N. 2014. Evidence that GH115 α -glucuronidase activity, which is required to degrade plant biomass, is dependent on conformational flexibility. *Journal of Biological Chemistry* 289 (1), 53–64.

Rossomando, E.F. 1998. HPLC in Enzymatic Analysis. 2nd edition. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication.

Rouau, X. 1993. Investigations into the effects of an enzyme preparation for baking on wheat flour dough pentosans. *Journal of Cereal Science*. 18 (2), 145–157.

Saarikko, M. 2016. Pipetointikin voi invalidisoida. *Luonnontieteilijä* 1/2016. [verkkolehti]. Luettu 2.5.2017. https://www.loimu.fi/lehti/artikkelit/2016/1/Pipetointikin_voi_invalidisoida

Shallom, D. & Shoham Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6 (3), 219–228.

Shimadzu. n.d. UV-1800. Shimadzu UV-VIS Spectrophotometer. [PDF] Tulostettu 4.5.2017. http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/Spectroscopy/UV-1800_Broc_B.pdf

Sprössler, B.G. 1997. Xylanases in baking. Teoksessa Angelino, S.A.G.F., Hamer, R.J., van Hartingsveldt, W., Heidekamp, F. & van der Lugt, J.P. (ed.) *Proceedings of the 1st European Symposium on Enzymes and Grain Processing*. Zeist: TNO Nutrition and Food Research Institute. 177–187.

Suominen, I. 2002. Solujen rakenne ja toiminta. Teoksessa Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. (toim.) *Bioprosessitekniikka*. 1. painos. Helsinki: WSOY. 20–77.

Thermo RGL. 2002. The Physics of Diffraction Gratings. [PDF]. Tulostettu 27.5.2017. <http://www.ino.it/home/lucamerca/Reticolo%20Diffrazione.pdf>

Thermo Scientific. 2007. Konelab Arena 30 Technical Specifications.

Thermo Scientific. 2008. Arena 30 Technical Specifications.

Thermo Scientific. 2013. Automation and efficiency for food and beverage testing. *Thermo Scientific Arena 20, 20XT, 30*, 60.

Von Weymarn, N. 2002. Valmistusprosessit. Teoksessa Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N. (toim.) *Bioprosessitekniikka*. 1. painos. Helsinki: WSOY. 116–211.

LIITTEET

Liite 1. Y5-KL -menetelmän aktiivisuustulokset

(1/2)

TAULUKKO 11. Näytteiden aktiivisuustulokset ja keskiarvot Y5-KL -menetelmällä

näyte	rinnakkais- tulokset	rinnakkais- tulokset	keskiarvo	näyte	rinnakkais- tulokset	rinnakkais- tulokset	keskiarvo																																																																																																																																																															
	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g		aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g																																																																																																																																																															
LN1	68019	70021	67842	LN2	65846	67973	66022																																																																																																																																																															
	67119	66208			64674	65593		LN3	61528	61056	59299	LN4	64054	64754	64581	57573	57037	64623	64894	K1	294357	294955	290896	K2	285772	292706	288953	291448	282823	286308	291026	K3	272956	277269	283264	K4	281857	278262	275460	291656	291173	273790	267931	K5	258259	259146	257138					250778	260367						N1.1	204623	196414	208682	N1.2	211582	214970	208062	216780	216912	204798	200897	N1.3	206580	214778	206106	N1.4	198493	200565	198427	202675	200389	198692	195958	N2.1	112970	113609	112102	N2.2	113189	105651	102711	113281	108548	103589	99606	N3.1	12937	12829	12871	N3.2	12280	12169	12200	12887	12832	12108	12241	N3.3	11697	11835	11507					11595	11686					N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728	54036	53266	52930	50431	N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033
LN3	61528	61056	59299	LN4	64054	64754	64581																																																																																																																																																															
	57573	57037			64623	64894		K1	294357	294955	290896	K2	285772	292706	288953	291448	282823	286308	291026	K3	272956	277269	283264	K4	281857	278262	275460	291656	291173	273790	267931	K5	258259	259146	257138					250778	260367						N1.1	204623	196414	208682	N1.2	211582	214970	208062	216780	216912	204798	200897	N1.3	206580	214778	206106	N1.4	198493	200565	198427	202675	200389	198692	195958	N2.1	112970	113609	112102	N2.2	113189	105651	102711	113281	108548	103589	99606	N3.1	12937	12829	12871	N3.2	12280	12169	12200	12887	12832	12108	12241	N3.3	11697	11835	11507					11595	11686					N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728	54036	53266	52930	50431	N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713								
K1	294357	294955	290896	K2	285772	292706	288953																																																																																																																																																															
	291448	282823			286308	291026		K3	272956	277269	283264	K4	281857	278262	275460	291656	291173	273790	267931	K5	258259	259146	257138					250778	260367						N1.1	204623	196414	208682	N1.2	211582	214970	208062	216780	216912	204798	200897	N1.3	206580	214778	206106	N1.4	198493	200565	198427	202675	200389	198692	195958	N2.1	112970	113609	112102	N2.2	113189	105651	102711	113281	108548	103589	99606	N3.1	12937	12829	12871	N3.2	12280	12169	12200	12887	12832	12108	12241	N3.3	11697	11835	11507					11595	11686					N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728	54036	53266	52930	50431	N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713																				
K3	272956	277269	283264	K4	281857	278262	275460																																																																																																																																																															
	291656	291173			273790	267931		K5	258259	259146	257138					250778	260367						N1.1	204623	196414	208682	N1.2	211582	214970	208062	216780	216912	204798	200897	N1.3	206580	214778	206106	N1.4	198493	200565	198427	202675	200389	198692	195958	N2.1	112970	113609	112102	N2.2	113189	105651	102711	113281	108548	103589	99606	N3.1	12937	12829	12871	N3.2	12280	12169	12200	12887	12832	12108	12241	N3.3	11697	11835	11507					11595	11686					N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728	54036	53266	52930	50431	N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713																																
K5	258259	259146	257138																																																																																																																																																																			
	250778	260367																																																																																																																																																																				
N1.1	204623	196414	208682	N1.2	211582	214970	208062																																																																																																																																																															
	216780	216912			204798	200897		N1.3	206580	214778	206106	N1.4	198493	200565	198427	202675	200389	198692	195958	N2.1	112970	113609	112102	N2.2	113189	105651	102711	113281	108548	103589	99606	N3.1	12937	12829	12871	N3.2	12280	12169	12200	12887	12832	12108	12241	N3.3	11697	11835	11507					11595	11686					N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728	54036	53266	52930	50431	N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713																																																											
N1.3	206580	214778	206106	N1.4	198493	200565	198427																																																																																																																																																															
	202675	200389			198692	195958		N2.1	112970	113609	112102	N2.2	113189	105651	102711	113281	108548	103589	99606	N3.1	12937	12829	12871	N3.2	12280	12169	12200	12887	12832	12108	12241	N3.3	11697	11835	11507					11595	11686					N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728	54036	53266	52930	50431	N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713																																																																							
N2.1	112970	113609	112102	N2.2	113189	105651	102711																																																																																																																																																															
	113281	108548			103589	99606																																																																																																																																																																
N3.1	12937	12829	12871	N3.2	12280	12169	12200																																																																																																																																																															
	12887	12832			12108	12241		N3.3	11697	11835	11507					11595	11686					N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728	54036	53266	52930	50431	N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713																																																																																															
N3.3	11697	11835	11507																																																																																																																																																																			
	11595	11686																																																																																																																																																																				
N4.1	54316	53758	53844	N4.2	53166	50383	51728																																																																																																																																																															
	54036	53266			52930	50431		N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146	23680	23048	24226	24255	N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713																																																																																																																									
N5.1	23277	23349	23339	N5.2	24368	23734	24146																																																																																																																																																															
	23680	23048			24226	24255		N5.3	22455	22904	22754					22760	22896					N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033	15482	15854	14771	14713																																																																																																																																					
N5.3	22455	22904	22754																																																																																																																																																																			
	22760	22896																																																																																																																																																																				
N6.1	15689	15514	15635	N6.2	15331	15318	15033																																																																																																																																																															
	15482	15854			14771	14713																																																																																																																																																																

näyte	rinnakkais- tulokset	rinnakkais- tulokset	keskiarvo	näyte	rinnakkais- tulokset	rinnakkais- tulokset	keskiarvo
	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g		aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g
N7.1	6367 6019	6363 6187	6234	N7.2	6287 6291	6238 6235	6263
N8.1	7589 7261	7578 7049	7369	N8.2	7565 7428	7666 7327	7497
N9.1	12410 12256	12304 12498	12367	N9.2	12945 12851	13001 12709	12877
N9.3	12358 11666	12319 11910	12063				
N10.1	25404 24592	24399 24323	24680	N10.2	22698 26549 24063 25012	22328 25621 24231 25693	24524
N11.1	13868 14039	13984 13973	13966				
99h	14000 12491	13066 12904	13115	171h	32340 32964	31776 33167	32562
243h	50907 51690	51436 50065	51025				
LNS	74823 74370	76267 74567	75007				

TAULUKKO 12. Näytteiden aktiivisuustulokset ja keskiarvot XYL-menetelmällä

näyte	rinnakkais- tulokset	keskiarvo	näyte	rinnakkais- tulokset	keskiarvo
	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g		aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g
LN1	60834	62214	LN2	57220	57230
	63594			57239	
LN3	50837	53334	LN4	60280	59680
	56640			59079	
	52524				
K1	264098	260703	K2	251083	253483
	257307			255883	
K3	250292	248471	K4	241650	246047
	246650			250443	
K5	239656	245367			
	251078				
N1.1	194928	188375	N1.2	192328	189079
	181821			185829	
N1.3	210334	196583	N1.4	191597	185699
	183162			171799	
	199329			196684	
	193505			182714	
N2.1	91172	89894	N2.2	84098	84536
	88615			84974	
N3.1	11733	11992	N3.2	10877	11151
	12251			11424	
N3.3	10466	10479			
	10225				
	10746				
N4.1	45033	45839	N4.2	47388	47456
	47380			47524	
	45105				
N5.1	22568	22308	N5.2	22190	22870
	22048			20975	
				23549	
N5.3	20841	21337			
	21832				
N6.1	14098	14593	N6.2	13572	13778
	15079			13984	
	14603				

(2/2)

näyte	rinnakkais- tulokset	keskiarvo	näyte	rinnakkais- tulokset	keskiarvo
	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g		aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g
N7.1	6334 6116	6225	N7.2	5841 6124	5983
N8.1	6906 6706	6806	N8.2	7219 6922 7164	7102
N9.1	11556 11703	11630	N9.2	11569 12179	11874
N9.3	11447 11643	11545			
N10.1	22940 22782	22861	N10.2	23298 23547	23423
N11.1	11900 12655	12278			
99h	13129 12970	13050	171h	32824 31724	32274
243h	46217 46513	46365			
LNS	66394 63540	64967			

Liite 3. ABX-menetelmän aktiivisuustulokset

TAULUKKO 13. Näytteiden aktiivisuustulokset ja keskiarvot ABX-menetelmällä

näyte	rinnakkais- tulokset	rinnakkais- tulokset	keskiarvo	näyte	rinnakkais- tulokset	rinnakkais- tulokset	keskiarvo
	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g		aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g	aktiivisuus U/g
LN1	31947	32296	34391	LN2	30254	31247	32240
	35354	36151			34010	33449	
	36035	34564					
LN3	29752	29466	29629	LN4	28226	28190	28034
	29914	29384			27464	28257	
K1	134942	132944	138598	K2	130008	132742	131150
	140013	146493			131419	130429	
K3	123263	127515	127708	K4	135978	131000	129006
	130781	129274			125710	123334	
K5	123857	130650	124451				
	123130	120168					
N1.1	96683	93587	97032	N1.2	95403	98833	96596
	98430	99429			95686	96462	
N1.3	103092	99088	99696	N1.4	97711	97778	97797
	93525	92833			93298	95481	
	104265	105372			104577	97936	
N2.1	51688	50175	50010	N2.2	47454	46374	46757
	48822	49353			47535	45664	
N4.1	23584	23479	24905	N4.2	26323	26031	25725
	25973	25949			25206	25338	
	25528	24917					
99h	6386	6216	6240	171h	15197	13592	14327
	6107	6251			14387	14130	
243h	21591	21088	21347				
	20752	21956					
LNS	32421	30575	31521				
	32292	30795					