



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Lumi Pajunen

Pektinaasiaktiivisuusmenetelmän validointi ja käyttöönotto

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

12.4.2019

Tekijä Otsikko	Lumi Pajunen Pektinaasiaktiivisuusmenetelmän validointi ja käyttöönotto
Sivumäärä Aika	32 sivua + 3 liitettä 12.4.2019
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Laboratorioinsinööri Pauliina Saarinen Lehtori Eija Koriseva
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida ja lopulta ottaa käyttöön uusi kolorimetrinen pektinaasientsyymiaktiivisuusmenetelmä vanhan viskosimetrinen menetelmän tilalle Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa. Vanhasta menetelmästä haluttiin luopua siinä havaittujen käyttövaikeuksien vuoksi verrattuna muihin analyttisiin menetelmiin. Lisäksi vanha käytössä ollut substraatti tuli korvata uudella valmisteella.</p> <p>AB Enzymes suoritti uuden menetelmän optimoinnin Darmstadtin toimipisteessä Saksassa, ja sen todettiin soveltuvan vanhan menetelmän korvaajaksi. Myös uusi substraatti testattiin optimoinnin yhteydessä, ja vanha käytössä ollut Copenhagen X-2955-substraatti päätettiin vaihtaa uuteen Pectin-C-valmisteeseen.</p> <p>Validointi toteutettiin optimoinnin tietojen pohjalta ja se suoritettiin neljällä erilaisella neste-mäisellä entsyymivalmisteella, joiden aktiivisuustasot olivat toisistaan poikkeavia. Validoitaviksi parametreiksi valittiin menetelmän toistettavuus ja uusittavuus, joista laskettiin myös mittausepävarmuudet. Lisäksi menetelmän lineaarisuus tarkistettiin ja menetelmälle määritettiin toteamis- ja määritysraja.</p> <p>Tulosten tarkastelussa keskityttiin pitkälti suhteellisten keskihajontojen tuloksiin, joiden tuli pysyä noin 10 prosentissa tai alle, jotta tuloksia voitiin pitää validoinnin osalta onnistuneina. Tämän osalta kaikki entsyymivalmisteet osoittivat menetelmän olevan luotettava. Lisäksi lineaarisuuden todettiin olevan hyvä.</p> <p>Validoinnin aikana huomattiin suurehkoa absorbanssien hajontaa, joka osaltaan vaikutti mittausepävarmuuksiin. Mittausepävarmuudet eivät kuitenkaan olleet ratkaiseva tekijä validoinnin hyväksymisen kannalta. Saatujen tulosten perusteella validointi oli kokonaisuutena onnistunut ja tehdyn työn perusteella uusi menetelmä voidaan ottaa tulevaisuudessa käyttöön. Lopullinen käyttöönotto tapahtuu vuoden 2019 lopulla.</p>	
Avainsanat	entsyymit, pektinaasit, validointi, laadunvalvonta

Author Title	Lumi Pajunen Validation and Implementation of Pectinase Activity Method
Number of Pages Date	32 pages + 3 appendices 12 April 2019
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Pauliina Saarinen, Laboratory Engineer Eija Koriseva, Lecturer
<p>The aim of the thesis was to validate and eventually implement a new colorimetric pectinase enzyme activity method to replace the old viscosimetric method in the Quality Control laboratory of the Roal Oy. The purpose was to replace the old method because of the difficulties in usage compared to the other analytical methods. In addition, the old substrate had to be replaced with a new preparation.</p> <p>The optimization of the new method was carried out by AB Enzymes at the German office in Darmstadt and was accepted as a replacement for the old method. The new substrate preparation was tested with optimization, and a decision was made to replace the old Copenhagen X-2955-substrate with the new Pectin-C-substrate.</p> <p>Validation was based on the optimization data and carried out with four different liquid enzyme preparations that had different levels of activity. The repeatability and reproducibility were selected as validated parameters and measurement uncertainties were calculated. Detection and determination limits were also determined, and the linearity of the method was verified.</p> <p>Reviewing of the results was largely focused on to the relative standard deviations. Deviations had to be a maximum of 10 % or below for the results to be successful for the validation. The method was proved to be reliable based on the validation and the linearity was found out to be precise.</p> <p>A major dispersion of the absorbances were observed during the validation, and the measurement uncertainties of the repeatability and reproducibility results were relatively high. However, the uncertainties were not a decisive factor for the validation. The validation was successful based on the results. The new method can be implemented in the future, which will take place at the end of the 2019.</p>	
Keywords	enzymes, pectinases, validation, quality control

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Yritys	2
3	Pektinaasit	3
3.1	Pektinaasin määritelmä	3
3.2	Pektinaasit teollisuudessa	4
4	Polygalakturonaasin mittausmenetelmät	6
4.1	Viskosimetrinen menetelmä	6
4.2	Kolorimetrinen menetelmä	6
5	Työn taustaa	7
6	Optimointi	7
6.1	Värireagenssi	8
6.2	Substraatti	10
6.3	Lineaarisuus	11
7	Validointi	12
7.1	Näytteet	13
7.2	Menetelmä	13
7.2.1	Reagenssit	13
7.2.2	Määrityksen kulku	14
7.2.3	Kalibrointisuora	15
8	Tulokset	18
8.1	Toistettavuus	18
8.2	Uusittavuus	19
8.3	Mittausepävarmuus	20
8.4	Toteamis- ja määritysraja	22

8.5	Lineaarisuus	22
9	Huomioita	26
9.1	Kertoimet	26
9.2	Vertailunäyte	26
9.3	Absorbanssit	27
9.4	Substraatti	27
10	Yhteenveto	29
	Lähteet	31
	Liitteet	
	Liite 1. Viskosimetrinen menetelmän kuvaus	
	Liite 2. Toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus	
	Liite 3. Toteamis- ja määrittäysraja	

Lyhenteet

AVE *Average*, keskiarvo.

DNS 3,5-dinitrosalisyylihappo.

LOD *Limit of Detection*, toteamisraja.

LOQ *Limit of Quantification*, määrittäysraja.

nm Nanometri.

PAHBAH 4-hydroksibentshydraatsidi.

RSD *Relative Standard Deviation*, suhteellinen keskihajonta.

STD *Standard Deviation*, keskihajonta.

ΔE Absorbanssierotus, kun nollanäytteen absorbanssi on vähennetty näytteen absorbanssista.

1 Johdanto

Kun halutaan valmistaa ravintoarvoltaan laadukkaita elintarvikkeita kustannustehokkaasti ja luonnollisesti, avainasemassa ovat entsyymit. Entsyymit avaavat uusia mahdollisuuksia valmistusprosessien kehittämiseksi, ja uusia sovelluksia kehitetään bioteknologian keinoin muokkaamalla tuotantokantoja, homeita ja bakteereita. Entsyymitekniologia tähtää muutoksiin, jotka vaikuttavat tuotteen ravintoarvoon, hypoallergiaominaisuuksiin, makuun, rakenteeseen ja ulkonäköön, eli lähes kaikkeen, mikä määrää elintarvikkeen objektiivista laatua. [Eerola & Puranen 2009.]

Entsyymien avulla saadaan aikaan myös ympäristöön vaikuttavia säästöjä, sillä niiden käytöllä voidaan tehokkaasti parantaa muun muassa raaka-aineiden saantoa ja säästää energiaa tuotannon eri sektoreilla. Entsyymien ensisijainen käyttötarkoitus on kuitenkin parantaa tuotteen laadullisia ominaisuuksia. [Eerola & Puranen 2009.]

Tämä insinööri työ tehtiin toimeksiantona bioteknologiayritys Roal Oy:lle, joka valmistaa nestemäisiä ja jauhemaisia entsyymituotteita eri teollisuusalojen sovelluksiin maailmanlaajuisesti. Työn tarkoituksena oli korvata tällä hetkellä käytössä oleva viskosimetrinen entsyymiaktiivisuuden määrittäminen uudella kolorimetrisellä menetelmällä. Molemmilla menetelmillä mitataan pektinaaseihin kuuluvan polygalakturonaasin aktiivisuutta.

Uusi menetelmä tuli validoida ja ottaa lopulta käyttöön Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa. Mittaukset suoritettiin neljällä erilaisella nestemäisellä entsyymivalmisteella. Mittattaviksi parametreiksi valittiin menetelmän toistettavuus, uusittavuus sekä toteamis- ja määrittämissä. Lisäksi toistettavuus- ja uusittavuustuloksista laskettiin mittausepävarmuudet. Myös menetelmän lineaarisuus tarkistettiin.

Uuden menetelmän myötä polygalakturonaasiaktiivisuuden määrittäminen helpottuu ja nopeutuu merkittävästi. Myös reagenssimäärissä tullaan tekemään merkittäviä säästöjä. Menetelmä on tarkoitettu ottaa käyttöön vuoden 2019 lopulla.

2 Yritys

Roal Oy on kansainvälinen teollisia entsyymejä valmistava bioteknologia-alan yritys, jonka ydinosuamista ovat teollisen mittakaavan *Trichoderma*-, *Aspergillus*- ja *Bacillus*-fermentoinnit. Fermentoinneista jalostetaan tuotteita eri teollisuusalojen sovelluksiin, joista 90 % menee vientiin maailmanlaajuisesti. Yritys perustettiin vuonna 1991, kun silloinen Alko ja saksalainen Röhm GmbH päättivät yhdistää bioteknisen liiketoimintansa ja lisätä valmistuskapasiteettiaan uuden yhteisyrityksen kautta. [Yritys 2018; Yritysesitely 2018.]

Vuodesta 1999 Roal Oy:n on omistanut brittiläinen Associated British Food ja kotimainen Altia. Tuotteiden markkinoinnissa ja myynnissä yritys tekee yhteistyötä AB Enzymesin kanssa, jonka nimen alla myös myytävät entsyymivalmisteet kulkevat. AB Enzymes hoitaa myös entsyymivalmisteiden jakelun. [Yritys 2018; Toimintajärjestelmäkuvaus 2019: 7.]

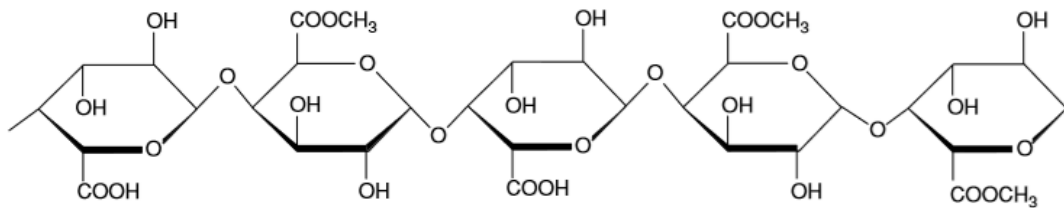
Vaikka yritys on perustettu vuonna 1991, pitkäjänteinen ja korkeatasoinen tutkimustyö ja vahva teknologinen osaaminen ovat peräisin jo aikaisemmilta ajoilta. Ensimmäiset *Aspergillus*-homeilla tehdyt kokeilut tapahtuivat 1950-luvulla ja Röhmmissä on työskennelty entsyymien parissa jo peräti 1910-luvulta lähtien. [Yritys 2018.]

Organisaatio koostuu keskenään yhteistyössä toimivista tutkimus- ja kehitysosastosta sekä tuotannosta. Tuotannon osina toimivat laadunvalvontalaboratorio, osto- ja logistiikkaosasto sekä kunnossapito. Tukifunktiona edellä mainituille toimii hallinto, joka tarjoaa ympäristö-, työsuojelu-, talous-, HR- sekä laatu- ja johtamispalveluita. [Yritys 2018.]

3 Pektinaasit

3.1 Pektinaasin määritelmä

Pektiinit ovat monimutkaisia suurimolekyyllipainoisia polysakkarideja, joita esiintyy lähes kaikissa kasveissa. Ne lisäävät kasvien lujuutta ja edistävät niiden solurakennetta. Pektiinit (kuva 1) koostuvat galakturonihappotähteiden ketjuista, jotka ovat kytköksissä toisiinsa α -(1,4)-glykosididoksilla. [Flutto 2003: 4440.]



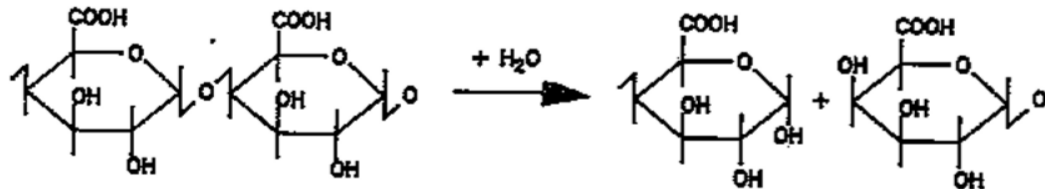
Kuva 1. Pektiinien rakenne [Flutto 2003: 4441].

Pektiineillä on pitkä käyttöhistoria hyytelöimisaineina, mutta pektiinien entsyymattinen hajottaminen pektinaasientsyymien avulla on muotoutunut tärkeäksi rooliksi elintarvikke- ja juomateollisuudessa [Pectins and Pectinases].

Pektinaasit ovat heterogeeninen entsyymiryhmä, joka jaotellaan polygalakturonaasiin, pektiinieraasiin ja pektiinilyaasiin. Jaottelu perustuu niiden erilaisiin entsyymattisiin reaktiomuotoihin pektiinisubstraattissa. Mainitut entsyymit hajottavat pektiinipolymeerejä pienempiin fragmentteihin hydrolyysillä, trans-eliminaatiolla ja esteröintireaktiolla. [Jadaun, Narnoliya & Verma 2018: 2; Gummadi & Kumar 2007: 99.]

Monien mikro-organismien, kuten kasvien, bakteerien, hiivojen ja homesienien, on todettu tuottavan pektinaasientsyymiä. Pektinaasientsyymiä saadaan muun muassa *Saccharomyces*-, *Aspergillus*-, *Penicillium*-, *Rhizopus*- ja *Fusarium*-sienistä. Entsyymiä tuottavat myös esimerkiksi *Bacillus*- ja *Erwinia*-bakteerit. Entsyymintuotantoon kaikista sopivimpia ovat kuitenkin homesienet. Tämä johtuu homeiden hyvästä saatavuudesta ja niiden kyvystä kestää pieniä muutoksia ympäristössään, kuten vaihtelua lämpötilassa, pH:ssa ja paineessa. [Jadaun ym. 2018: 2; Gummadi ym. 2007: 99.]

Tässä työssä validoitavan menetelmän entsyyminä toimii polygalakturonaasi, joka tunnetaan myös nimellä pektiini-depolymeraasi. Se on entsyymi, joka hydrolysoi pektiinin galakturonihappotähteiden väliset α -(1,4)-glykosididokset vapauttamalla vesimolekyylin. [Jadaun ym. 2018: 2.] Hydrolyysireaktio on havainnollistettu kuvassa 2.



Kuva 2. Pekiinin hydrolyysi polygalakturonaasin vaikutuksesta [Lea 1991: 208].

Polygalakturonaasilla on myös tärkeä tehtävä kasvien kehityksessä esimerkiksi hedelmien kypsymisen aikana, ja sitä pidetään keskeisenä entsyyminä kasvisolujen seinämien hajoamisessa fytopatogeenisen hyökkäyksen jälkeen. [Christiaens, Stefanie; Ngouémazong, Eugénie; Hendrickx, Marc; Houben, Ken; Kermani, Zahra; Moelants, Katlijn; Van Buggenhout, Sandy & Van Loey, Ann 2016: 1028.]

3.2 Pektinaasit teollisuudessa

Pektinaaseja käytettiin hedelmämeheollisuudessa ensimmäisen kerran omenamehun kirkastukseen 1930-luvulla. Pektinaasien käytöllä mehuun saatiin kirkkauden lisäksi alhaisempi viskositeetti, jonka seurauksena prosessiin kuluva aika lyheni ja teollisen omenamehun laatua saatiin parannettua huomattavasti. [Grassin 2007: 111.]

Tänä päivänä pektinaasientsyymien käyttö on olennainen osa nykyaikaista hedelmä- ja vihannesmehun valmistusta. Mehu- ja juomateollisuudelle tärkeä sovellusala on hedelmä- ja vihannesmehujen uutaminen ja yksi tärkeimpiä sovelluksia on tehostaa uutto pektinaasientsyymeillä. Pektinaaseja käytetään erityisesti omena- ja päärynämehuihin sekä marjoista ja trooppisista hedelmistä valmistettuihin mehuihin. [Fruits, Vegetables, Juices and Wines.]

Kun hedelmämehuja uutetaan, se johtaa hyytelömäisiin tuotteisiin. Hedelmien monimutkaisten pektiinirakenteiden takia mehua on erittäin vaikea erottaa tästä viskoosisesta hyytelömassasta. Pektinientsyymit vaikuttavat pektiiniin ja rikkovat pektiinin galakturonihappomonomeerien välillä olevat glykosididokset. Reaktion ansiosta saadaan runsaasti mehua. Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että mehun saanto kasvaa jopa kaksinkertaiseksi pektinaasientsyymien ansiosta. [Jadaun ym. 2018: 2.]

Eri hedelmämehut tarvitsevat erilaisia entsyymikäsittelyjä riippuen käsiteltävästä hedelmästä. Esimerkiksi omenat, marjat ja viinirypäleet tarvitsevat intensiivistä pektinaasikäsittelyä, jotta toivottu kirkkaus, viskositeetti ja korkea saanto saavutetaan. Puolestaan toiset hedelmämehut, kuten appelsiini- ja ananasmehut, tarvitsevat vain lievää pektinaasikäsittelyä, sillä ne eivät tarvitse niin intensiivistä kirkastusta. [Jadaun ym. 2018: 2.]

Entsyymikäsittely parantaa mehun väriä poistamalla pektiinikuitujen aiheuttamat ei-toivotut sameudet sekä parantaa kirkkautta estämällä mehun tummumisen ja tarjoamalla mehulle sen ominaisvärin. Kaikki nämä ominaisuudet ovat erittäin tärkeitä kaupallisella tasolla. Halutun tuotteen saamiseksi tarvitaan tarkkoja prosessiparametreja, jotka on optimoitava entsyymikonsentraation, entsyymikäsittelyn keston, inkubointilämpötilan ja liuoksen pH:n osalta. Pektinaasien käytöllä vähennetään myös tehokkaasti hedelmäjätteen määrää. [Jadaun ym. 2018: 2–3; Tuoteportfolio 2018.]

Pektinaasientsyymejä käytetään myös viinin valmistuksessa, jossa ne varmistavat onnistuneen suodatuksen ja tukevat punaviinin värin kehittymistä ja vapautumista viinirypäleistä. Ne vaikuttavat myös viinin makuun halutulla tavalla. Roal Oy:n entsyymivalmisteita käytetään myös menestyksekkäästi ultrasuodatuskalvojen puhdistamiseen. [Tuoteportfolio 2018.]

4 Polygalakturonaasin mittaamenetelmät

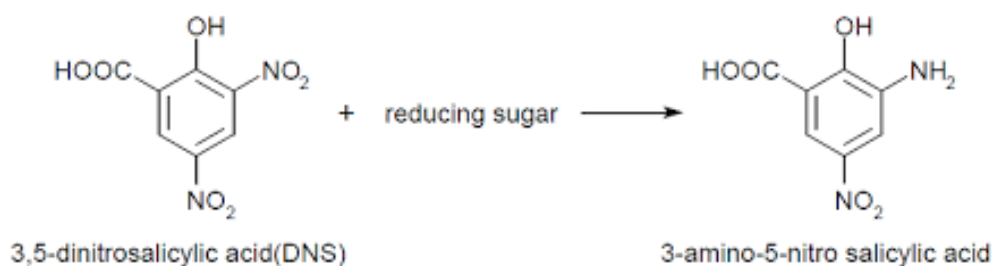
4.1 Viskosimetrinen menetelmä

Viskosimetrisessä menetelmässä entsyymiaktiivisuuden määrittäminen perustuu pektiinisubstraatin viskositeetin alenemisen mittaamiseen. Viskositeetti laskee, kun näytteessä oleva polygalakturonaasi vaikuttaa pektiinin rakenteeseen. Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa menetelmä suoritetaan puoliautomaattisella laitteistolla, jossa substraatin muodostama seos virtaa jatkuvasti viskosimetrin läpi.

Aktiivisuuden laskeminen perustuu tunnetun standardinäytteen sisältämään aktiivisuuteen ja ilmoitetaan yksikössä PGU/mg. Yksi aktiivisuusyksikkö on se määrä entsyymiä, joka laskee reaktioliuoksen viskositeettia menetelmän olosuhteissa 11 minuutin aikana 0,02 η-1. Tarkempi kuvaus menetelmän kulusta on luettavissa liitteestä 1.

4.2 Kolorimetrinen menetelmä

Kolorimetrisessä menetelmässä näytteessä oleva polygalakturonaasi hydrolysoi substraatin pektiiniä. Aktiivisuuden mittaaminen perustuu reaktiossa muodostuneiden pelkistävien sokereiden määrittämiseen spektrofotometrisesti käyttäen DNS-värireagenssia eli 3,5-dinitrosalisyylihappoa. DNS reagoi pelkistävien sokereiden kanssa muodostaen 3-amino-5-nitrosalisyylihappoa, kun sokereiden aldehydyryhmät hapettuvat karboksyyliyhmiiksi [Saarinen 2014: 4]. Reaktio on havainnollistettu kuvassa 3.



Kuva 3. 3,5-dinitrosalisyylihapon (DNS) pelkistysreaktio [Estimation of reducing sugars by dinitrosalicylic acid method: 5].

Reaktiossa muodostuva oranssi väri absorboi valoa voimakkaasti aallonpituudella 540 nm. DNS toimii analyysissä myös entsyymi-inhibiittorina, jolla reaktio pysäytetään inkubointiajan päätyttyä. [Saarinen 2014: 4–5.] Kolorimetrinen menetelmän aktiivisuus ilmoitetaan yksikössä PGX/g, joka on se määrä entsyymiaktiivisuutta, joka määritysolosuhteissa vapauttaa 1 µmol:n glukoosia vastaavan määrän pelkistäviä sokereita minuutissa.

5 Työn taustaa

Roal Oy:n laboratoriossa on tällä hetkellä käytössä viskosimetrinen menetelmä polygalakturonaasiaktiivisuuden määrittämiseen. Tästä menetelmästä halutaan kuitenkin luopua siinä havaittujen käyttövaikeuksien vuoksi verrattuna muihin analyttisiin menetelmiin [Schmidt 2018: 1]. Viskosimetrinen menetelmän avulla ei välttämättä saada todellista kuvaa aktiivisuuden määrästä, sillä viskositeetin lasku on suhteellisen alhaista [N. Gummadi ym. 2007: 101]. Menetelmän suorittaminen vie myös paljon aikaa, sen aikana kuluu runsas määrä substraattia ja laitteisto on vanha.

Viskosimetrisessä menetelmässä on ollut käytössä vuosien ajan Copenhagen X-2955-pektiinisubstraatti. Sitä on kuitenkin varastoitu jo yli 25 vuoden ajan, ja se on ajan saatossa menettänyt kemiallisia ominaisuuksiaan. Näin ollen kyseinen substraatti on muuttumassa käyttöön sopimattomaksi. Kyseistä pektiinivalmistetta ei myöskään ole enää mahdollista hankkia uudelleen samalta toimittajalta. Uuden menetelmän validoinnin myötä vanha substraatti päätettiin vaihtaa uuteen substraattivalmisteseen. [Schmidt 2018: 1.] Edellä mainittujen ongelmien myötä viskosimetrinen menetelmä päätettiin korvata uudella kolorimetrillä menetelmällä ja aikaisemmin käytössä ollut substraatti vaihtaa uuteen pektiinivalmisteseen.

6 Optimointi

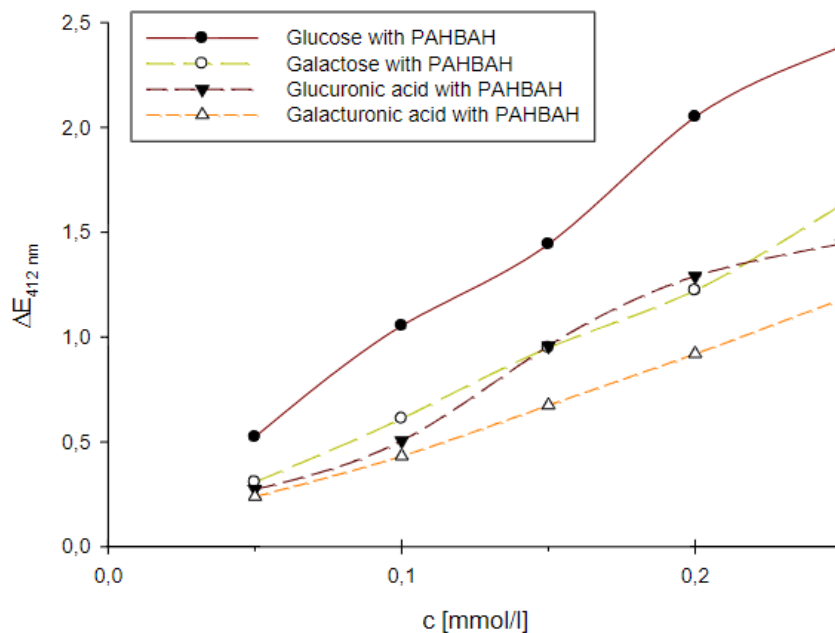
Roal Oy:n kanssa yhteistyötä tekevän AB Enzymesin Saksassa sijaitsevan Darmstadtin yksikön entsyymibiokemian tutkimus- & kehitysosaston tutkija Oliver Schmidt on optimoinut uuden kolorimetrinen analyysimenetelmän. Optimoinnin tuloksena Schmidt vahvisti uuden kolorimetrinen menetelmän soveltuvan vanhan viskosimetrinen menetelmän korvaajaksi.

6.1 Värireagenssi

Roal Oy:lla ja AB Enzymesillä käytetään pelkistävien sokereiden määrittämiseen yleisesti kahta eri värireagenssia: 4-hydroksibentsyhydridia (PAHBAH) tai 3-5-dinitrosalisyylihappoa (DNS).

Alun alkaen uuteen menetelmään haluttiin ottaa käyttöön PAHBAH-värireagenssi, sillä kyseisellä reagenssilla on useita etuja verraten DNS:ään. Se on muun muassa herkempiä ja vähemmän myrkyllistä. Sitä on myös helpompi soveltaa robotiikan sovelluksiin, sillä PAHBAH kykenee saavuttamaan värireaktion alemmassa lämpötilassa kuin DNS. Testien yhteydessä konsentraatiokäyrät eri sokereilla kuitenkin osoittivat, että PAHBAH:n signaali riippuu sokereista, joihin se reagoi. [Schmidt 2018: 3; Kaltenbach 2019.]

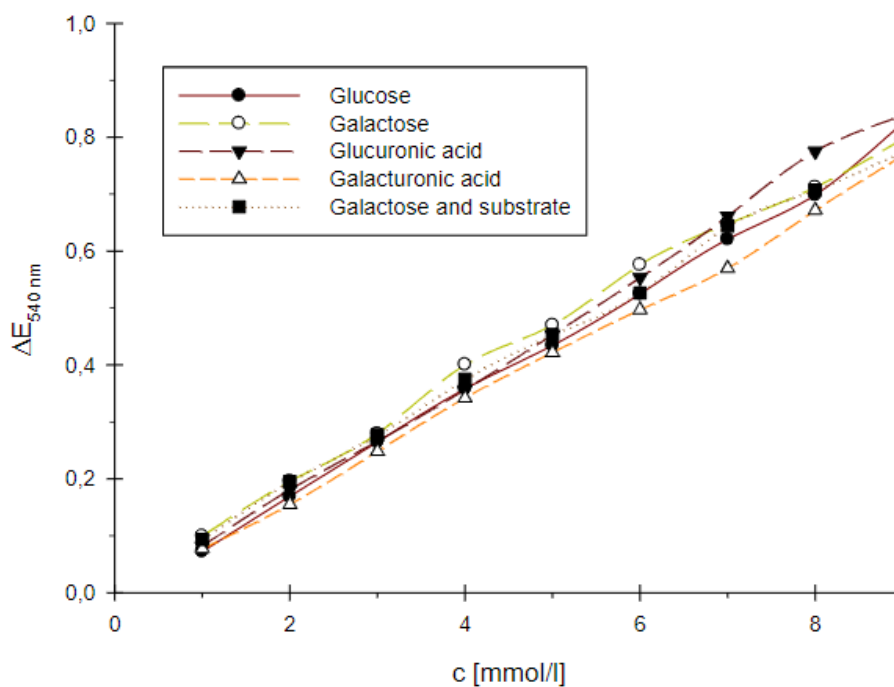
Kuvassa 4 on havainnollistettu PAHBAH-värireagenssilla saatuja konsentraatiokäyriä aallonpituudella 412 nm, kun nollanäytteen absorbanssi on vähennetty näytteen absorbanssista.



Kuva 4. Eri sokereiden konsentraatiokäyrät käyttäen PAHBAH-värireagenssia [Schmidt 2018: 4].

Pektiini on heterogeenin yhdistelmä useita eri sokereita, eikä näiden sokereiden prosentuaalisista mittasuhteista ole tarkkaa tietoa. Mikäli menetelmässä käytettäisiin PAHBAH-värireagenssia, se aiheuttaisi virhetuloksia työskenneltäessä pektiinin kaltaisen yhdisteen kanssa. [Schmidt 2018: 4; Kaltenbach 2019.]

Testi suoritettiin myös DNS-värireagenssilla, jolla saavutettiin huomattavasti parempia tuloksia. Testien jälkeen todettiin, että DNS ei näytä lähes minkäänlaista riippuvuutta testattujen sokereiden välillä (kuva 5), eivätkä eri sokereiden konsentraatiokäyrät juurikaan eronneet toisistaan.

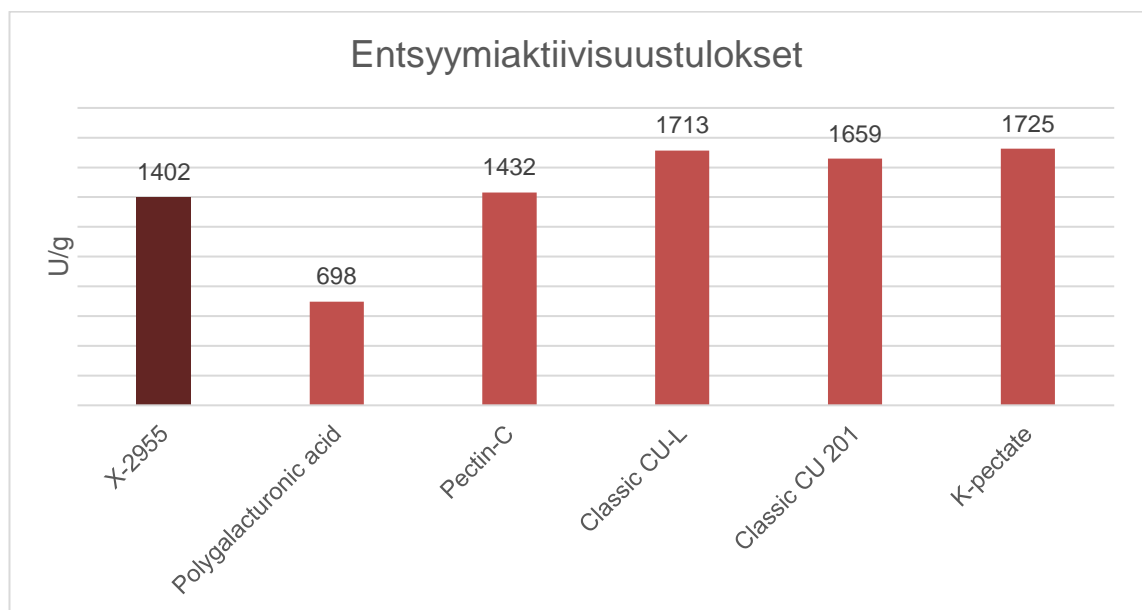


Kuva 5. Eri sokereiden konsentraatiokäyrät käyttäen DNS-värireagenssia [Schmidt 2018: 5].

Koska PAHBAH:n havaittiin reagoivan eri sokereihin eri tavoin ja antaen virheellisiä tuloksia, testien perusteella menetelmän värireagenssiksi valikoitui DNS PAHBAH:n sijasta.

6.2 Substraatti

Jotta korvaavan substraatin valinnasta voitiin tehdä päätös, yhden entsyymivalmisteen aktiivisuus määritettiin viidellä uudella vaihtoehdoisella pektiinisubstraatilla. Saatuja tuloksia verrattiin vanhalla Copenhagen X-2955 -substraatilla saatuun aktiivisuustulokseen. Koska aluksi menetelmän värireagenssiksi kaavailtiin PAHBAH-yhdistettä, substraattitestit suoritettiin käyttäen kyseistä värireagenssia. [Schmidt 2018: 2-3; Kaltenbach 2019.] Kuvassa 6 on havainnollistettu substraattitestin entsyymiaktiivisuustuloksia.



Kuva 6. Valitun entsyymivalmisteen aktiivisuustulokset eri substraateilla mitattuina [Schmidt 2018: 3].

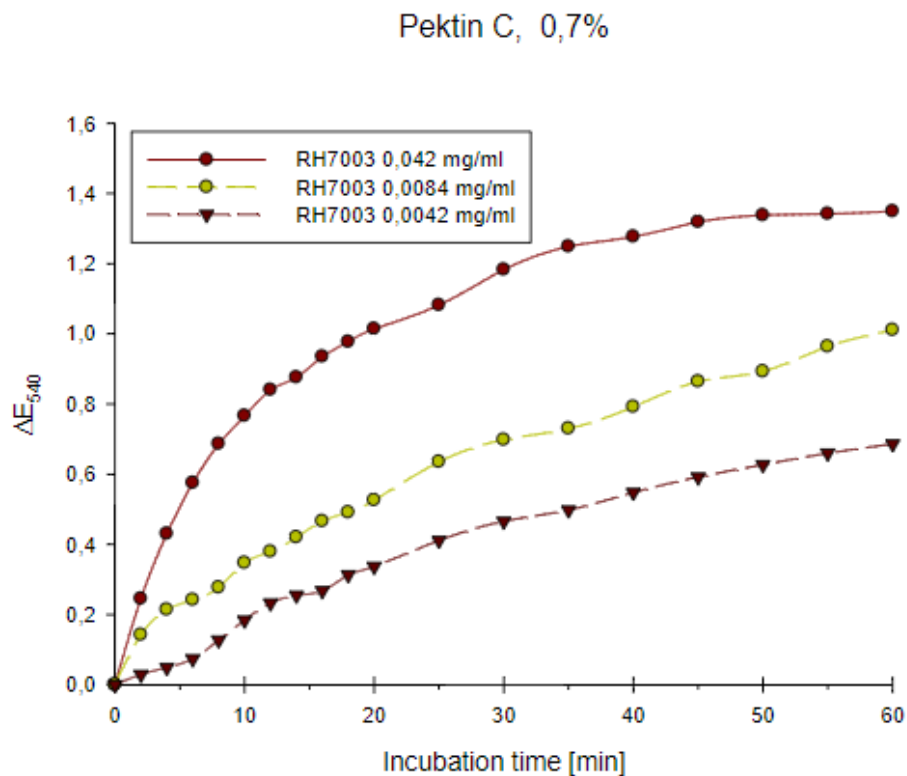
Kuvassa tummennettu palkki vastaa tällä hetkellä käytössä olevalla Copenhagen X-2955 -substraatilla saatua entsyymiaktiivisuusmäärää. Muilla substraattivalmisteilla saatuja aktiivisuustuloksia verrattiin tähän tulokseen. Kuten kuvasta voidaan todeta, Pectin-C-substraatti antaa vanhaan substraattiin nähden parhaiten verrattavissa olevan tuloksen. Testin perusteella uudeksi substraatiksi valikoitui Pectin-C-valmiste.

Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa on käytössä pektiinaasien määrittämiseen kaksi muutakin entsyymiaktiivisuusmenetelmää: pektiiniesteraasi- ja pektiini-transelimi-naasimenetelmä. Myös näissä on käytetty vanhaa Copenhagen X-2955 -pektiini-substraattia ja vanha substraatti tullaan vaihtamaan uuteen näissäkin menetelmissä.

Substraatin toimivuus tarkistettiin myös edellä mainittujen menetelmien osalta, ja nämäkin testit tukivat Pectin-C-substraattivalmisteen valintaa.

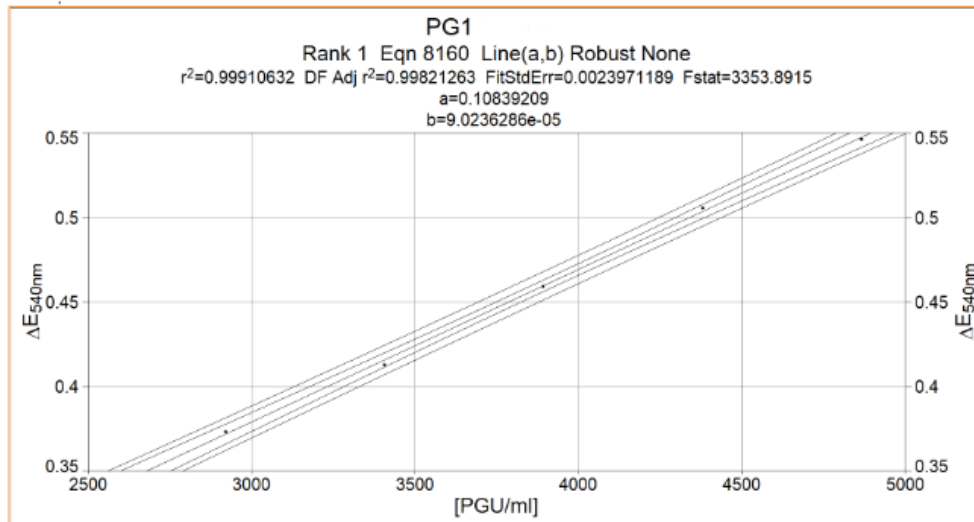
6.3 Lineaarisuus

Seuraavaksi määritettiin alue, jossa absorbanssi reagoi lineaarisesti entsyymikonsentraation muutokseen 0,7-prosenttisessa Pectin-C-substraattikonsentraatiossa. Tämän avulla saatiin selville tarkka absorbanssialue, jossa entsyymiaktiivisuusarvot voitiin mitata luotettavasti. [Schmidt 2018: 5.] Kuva 7 havainnollistaa, että kyseisen näytteen aktiivisuuskäyrä on lineaarinen absorbanssiarvoon ~0,6 asti, kun näytteen pitoisuus on 0,042 mg/ml. Inkubointiaika kohdentui tässä noin 10 minuutin kohdalle.



Kuva 7. Absorbanssialueen määrittäminen, kun absorbanssin muutos on verrannollinen inkubointiaikaan 0,7-prosenttisessä substraattikonsentraatiossa [Schmidt 2018: 6].

Samanlainen koe suoritettiin myös toiselle entsyymivalmisteelle, jonka aktiivisuus näytti samanlaisen lineaarisen absorptiovälin. [Schmidt 2018: 6.] Absorption lineaarisuus tarkistettiin vielä kiinteällä inkubointiajalla, joka tässä tapauksessa valikoitui 10 minuutiksi. Testi suoritettiin samalla valmisteella kuin ensimmäinen koe. Lineaarisuus on havainnollistettu kuvassa 8.



Kuva 8. Lineaarisuusalueen määrittäminen 10 minuutin inkubointiajalla [Schmidt 2018: 6].

Kiinteällä 10 minuutin inkubointiajalla tehdyt mittaukset osoittivat, että lineaarisuus on oikeellinen aallonpituudella 540 nm $\sim 0,6$:een asti [Schmidt 2018: 7]. Tämän perusteella menetelmän absorbanssirajoiksi asetettiin 0,3–0,6.

7 Validointi

Validoinnin aikana mitataan ja arvioidaan useita käsitteitä. Validoinnin tarkoituksena on varmistaa, että analyysimenetelmä toimii tarkoitetulla tavalla. Validoinnin avulla todetaan menetelmän luotettavuus ja oikeellisuus, sekä sen toimivuus pyritään testaamaan mahdollisimman huolellisesti ennen kuin se otetaan vakituisen käyttöön. [Laurén 1999: 1.]

Tässä työssä testattiin menetelmän toistettavuutta sekä uusittavuutta, ja näille laskettiin mittausepävarmuudet. Menetelmälle määritettiin myös toteamis- ja määrittäysraja, sekä

menetelmän lineaarisuus tarkistettiin. Kaikki validointiin liittyvät käytännön osuuden mitaukset suoritettiin Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa. Tuloksia verrattiin analyysille asetettuihin vaatimuksiin Schmidtin suorittaman optimoinnin myötä.

7.1 Näytteet

Validointimittauksia varten valittiin neljä erilaista entsyymivalmistetta tuoreimmista eristä. Kaikki näytteet olivat nestemäisiä ja niiden entsyymiaktiivisuustasot olivat toisistaan poikkeavia. Kaikki näytteet oli tuotettu homeilla, kuten *Trichoderma-* ja *Aspergillus*-kannoilla. Valitut entsyymivalmisteet ja niiden aktiivisuusmäärät viskosimetrisellä menetelmällä määritettynä on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Validointiin valitut näytteet ja niiden entsyymiaktiivisuustasot vanhalla menetelmällä mitattuina.

NÄYTE	AKTIIVISUUS (PGU/mg)
Entsyymi 1	843 000
Entsyymi 2	67 400
Entsyymi 3	151 000
Entsyymi 4	38 200

Roal Oy:n edustaja valitsi kaikki validointiin mukaan otettavat näytteet yrityksen tarpeiden mukaisesti.

7.2 Menetelmä

7.2.1 Reagenssit

Kaikkien menetelmässä käytettyjen reagenssien valmistukseen käytettiin ionivaihdettua vettä. Analyysiin vaadittavat reagenssit olivat

- 0,1 M natriumasetaattipuskuri, jonka pH on 3,90
- 0,7 % Pectin-C-substraattiliuos
- DNS-värireagenssi
- galaktoosi.

Galaktoosia käytettiin menetelmän kalibroitisuuden valmistamiseen. Kalibroitisuuden kulmakerrointa ja leikkauspistettä tarvittiin lopullisen aktiivisuustuloksen laskennassa. Kalibroitisuorasta ja sen valmistamisesta kerrotaan tarkemmin luvussa 7.3.3.

7.2.2 Määrityksen kulku

Näytteet ja nollat

Kahteen koeputkeen pipetoitiin 1,8 ml Pectin-C-substraattiliuosta. Toista putkea (näyte) temperoitiin 40 °C:ssa 5 minuutin ajan. Temperoituun putkeen lisättiin 200 µl entsyymilaimennosta ja se sekoitettiin huolellisesti koeputkiravistelijassa. Näyteputkea inkuboitiin tasan 10 minuutin ajan, minkä jälkeen putkeen lisättiin 2 ml DNS-väriagenssia reaktion pysäyttämiseksi, ja se sekoitettiin huolellisesti.

Tämän jälkeen ei-temperoituun putkeen (näytenolla) lisättiin sama määrä DNS-väriagenssia ja pipetoitiin entsyymilaimennos. Lopuksi molemmat putket suljettiin korkeilla ja ne asetettiin kiehuvaan vesihauteeseen tasan 5 minuutin ajaksi. Keiton jälkeen näytteet jäädytettiin huoneenlämpötilaan kylmässä vesihauteessa.

Jälkikäsittely

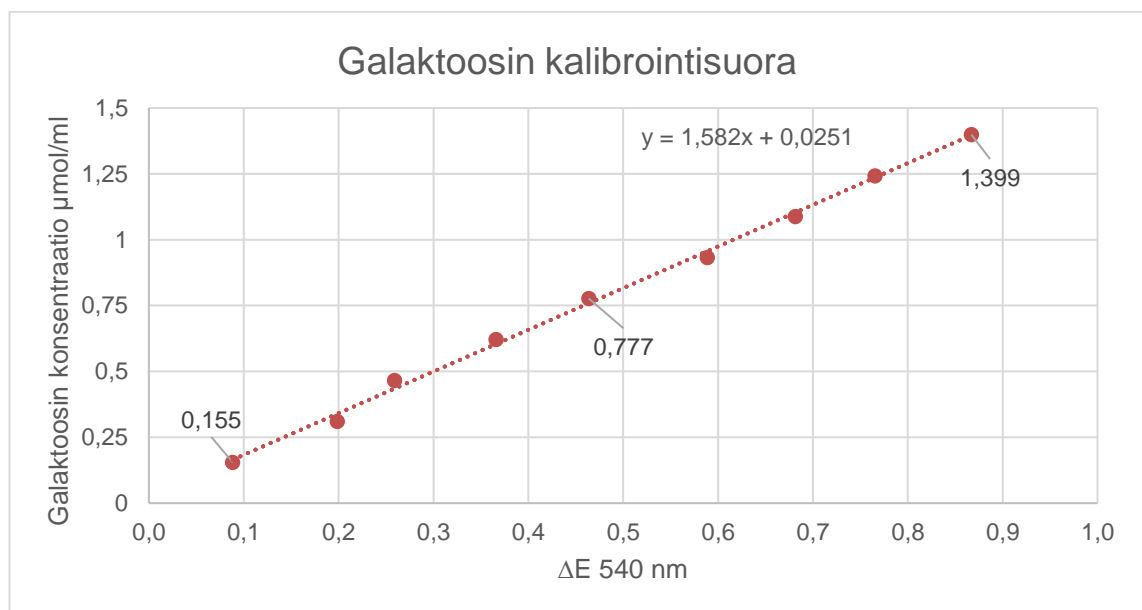
Koska reaktion aikana liuokseen muodostuu sakkaa, jokaisesta putkesta siirrettiin noin 1,3 ml näytettä 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin ja niitä sentrifugoitiin 2 minuutin ajan kierrosnopeudella 13 000 rpm. Sentrifugoidut näytteet kaadettiin varoen mikrokyvetteihin ja ne mitattiin reagenssinollaa vastaan aallonpituudella 540 nm.

Normaalisti yksi näyte analysoidaan aina kolmena rinnakkaisena. Lopullinen tulos on näiden tulosten keskiarvo. Hajontaa rinnakkaistulosten välille sallitaan korkeintaan 10 % riippuen suoritettavasta menetelmästä.

7.2.3 Kalibrintisuora

Menetelmän sokerina käytettiin galaktoosia, sillä optimoinnin yhteydessä sen todettiin olevan paras valinta sen hyvän toistettavuuden ansiosta [Schmidt 2018: 8]. Kalibrintisuoraa varten galaktoosista valmistettiin kantaliuos, josta edelleen yhdeksän eripitoista jatkolaimennosta. Kaikki liuokset valmistettiin 0,1 M natriumasettaattipuskuriin ja käsiteltiin määrityksen kulun mukaisesti samalla tavalla kuin näytenollat. Reagenssinolla valmistettiin pipetoimalla 200 µl puskuriliuosta entsyymilaimennoksen sijasta.

Valmistettua yhdeksän pisteen kalibrintisuoraa (kuva 9), käytettiin toistettavuus- ja uusittavuusmittauksista saatujen tulosten laskennassa. Normaalisti jokaista analysointikerää varten valmistetaan ainoastaan kolmen pisteen kalibrintisuora, eikä yhdeksän pisteen suoraa käytetä laskennassa. Kolmen pisteen suorassa käytetään pisteitä 1, 5 ja 9, joiden pitoisuudet on ilmoitettu galaktoosin kalibrintisuoran kuvaajassa (kuva 9).

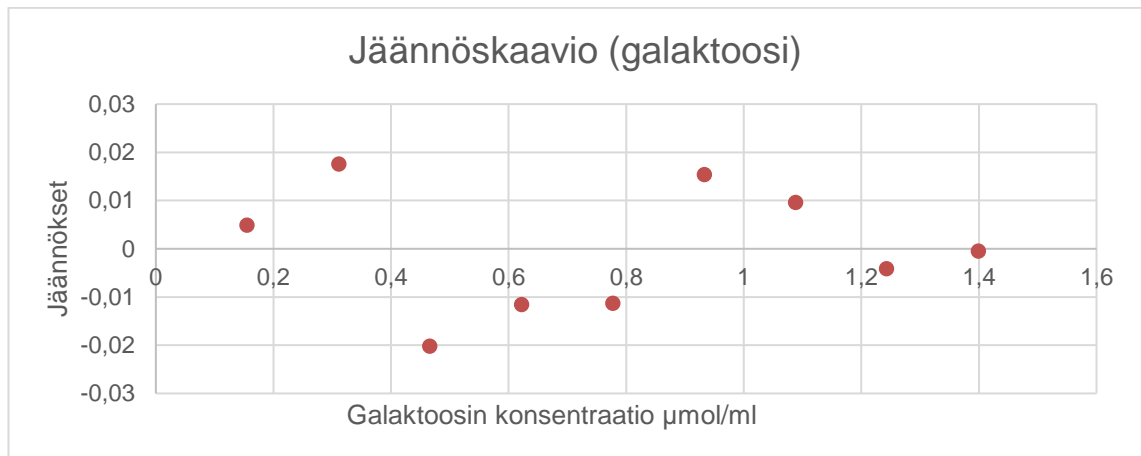


Kuva 9. Galaktoosin yhdeksän pisteen kalibrintisuora.

Kalibrintisuora tehtiin käänteisesti, jotta saatu suoran yhtälö voitiin sijoittaa entsyymiaktiivisuuden laskemiseen käytettävään kaavaan (kaava 1) sellaisenaan. Galaktoosin konsentraatio sijoitettiin y-akselille ja muuttuvat arvot, tässä tapauksessa absorbanssit, sijoitettiin x-akselille.

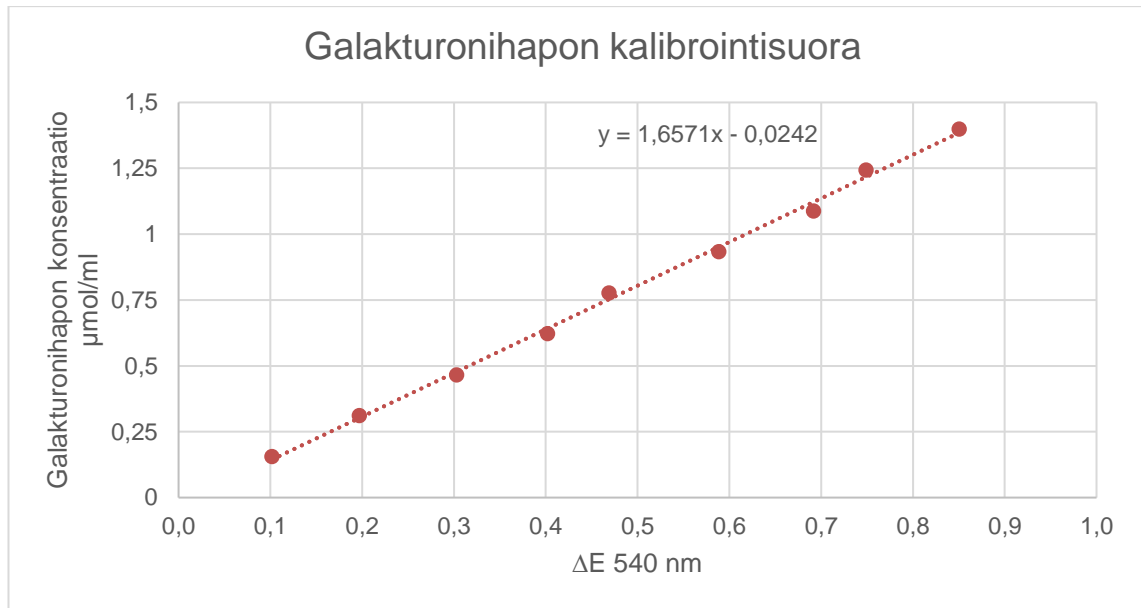
Galaktoosin kalibrintisuoran havaintoarvoista tehtiin myös regressioanalyysi, jonka avulla tarkasteltiin residuaaleja ja varmistettiin suoran oikeellisuus. Regressio tehtiin Excel-ohjelman avulla. Mikäli regressiomalli sopii hyvin havaintoarvoihin, residuaalien tulisi sijoittua satunnaisesti nollan ympärille [Ellison, Barwick & Duguid-Farrant 2009: 97].

Regression tuloksena galaktoosin kalibrintisuoran selitysteekiksi saatiin 0,9977 ja F:n tarkkuudeksi $1,776 \cdot 10^{-10}$, minkä perusteella regressiomalli oli merkitsevä. Tehdyn regressioanalyysin jäännöskaavio on esitetty kuvassa 10.



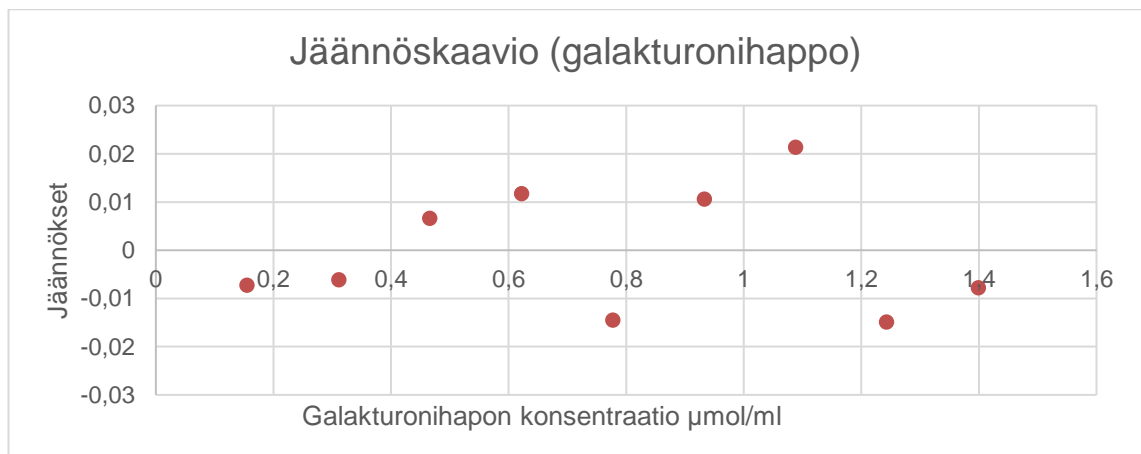
Kuva 10. Galaktoosin kalibrintisuoran jäännöskaavio.

Validoinnin aikana kalibroitikäyrän toimivuutta testattiin asiakkaan pyynnöstä lisäksi galakturonihapolla. Galakturonihapon pitoisuus laskettiin vastaamaan galaktoosin pitoisuutta, jotta tuloksia voitiin verrata luotettavasti toisiinsa. Myös galakturonihapon kalibrintisuora (kuva 11) tehtiin käänteisenä.



Kuva 11. Galakturonihapon yhdeksän pisteen kalibrintisuora.

Regressioanalyysi tehtiin myös galakturonihapon kalibrintisuoran arvoista, minkä tuloksena sen selitysasteeksi laskettiin 0,9975 ja F:n tarkkuudeksi $2,390 \cdot 10^{-10}$. Myös tämän mallin todettiin olevan merkitsevä. Galakturonihapon regressioanalyysin jäännöskaavio on esitetty kuvassa 12.



Kuva 12. Galakturonihapon kalibrintisuoran regressioanalyysin jäännöskaavio.

Koska molemmat kalibrintisuorat antoivat toisiinsa verraten samoja tuloksia, päätettiin siinä, että menetelmän sokerina tullaan jatkossakin käyttämään galaktoosia galakturonihapon sijasta.

8 Tulokset

Entsyymiaktiivisuustulos laskettiin vähentämällä nollanäytteen absorbanssi näytteen absorbanssista. Erotuksen tuli osua välille 0,3–0,6, sillä Schmidtin suorittaman optimoinnin aikana menetelmän todettiin olevan lineaarinen tällä alueella. Galaktoosin pitoisuus luettiin kalibrointikäyrästä ja jaettiin näytteen massakonsentraatiolla sekä inkubointiajalla. Lopullinen tulos esitetään yksikössä PGX/g. Lopullisen aktiivisuustuloksen laskukaava on esitetty alla,

$$\frac{PGX}{g} = \frac{(a + b * \Delta E_{540nm}) * 1000}{\beta * 10 \text{ min}} \quad (1)$$

jossa

a	on galaktoosin kalibrointikäyrän leikkauspiste
b	on galaktoosin kalibrointikäyrän kulmakerroin
1000	on muuntokerroin mg → g
β	on näytteen massakonsentraatio (mg/ml)
10 min	on inkubointiaika.

Tulosten laskennassa ei käytetty lainkaan muuntokerrointa, sillä kaikki näytteet käsiteltiin alun alkaen grammoina milligrammojen sijasta.

8.1 Toistettavuus

Toistettavuustestien avulla saatiin arvio menetelmän toistotarkkuudesta. Jokainen entsyymi käsiteltiin yksi kerrallaan omana sarjanaan yhden laborantin suorittamana. Testit suoritettiin määrityksen kulun mukaisesti. Näytettä punnittiin noin 0,25 g 12 erilliseen 25 ml:n mittapulloon ja ne täytettiin merkkiin 0,1 M natriumasetaattipuskurilla. Jokaista sarjaa kohden tehtiin kolmen pisteen kalibrointisuora tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi. Tulosten laskennassa käytettiin galaktoosin yhdeksän pisteen kalibrointisuoran arvoja (kuva 9).

Taulukkoon 2 on koottu toistettavuusmittauksista saadut entsyymiaktiivisuustulokset, jotka on laskettu kaavalla 1. Taulukkoon on myös kirjattu keskihajonnat (kaava 2) ja suhteelliset keskihajonnat.

Taulukko 2. Toistettavuusmittausten tulokset.

NÄYTE	PGX/g	STD	RSD%
Entsyymi 1	11528	896,6	7,8
Entsyymi 2	938	47,6	5,1
Entsyymi 3	2002	107,4	5,4
Entsyymi 4	797	40,2	5,0

Taulukossa 2 ilmoitetut tulokset ovat jokainen 12 erillisen tuloksen keskiarvo. Kaikki yksittäiset mittaustulokset ovat lueteltuna liitteessä 2.

8.2 Uusittavuus

Uusittavuus kuvaa testitulosten yhteensopivuutta, kun yksi tai useampi testausolosuhteista muuttuu [Laurén 1999: 5]. Tässä tapauksessa kaksi muuta laboranttia suorittivat uusittavuusmittaukset, jolloin saatiin kuva mittaustulosten yhteensopivuudesta, kun mitaukset suoritettiin eri henkilöiden tekeminä. Laboratoriossa eri henkilöillä on käytössään omat välineet, kuten laimentimet, pipetit ja annostelijat, joten myös välineisiin saatiin vaihtuvuutta. Uusittavuusmittaukset suoritettiin samoin kuin toistettavuusmittaukset. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Uusittavuusmittausten tulokset.

NÄYTE	LABORANTTI	PGX/g	STD	RSD%
Entsyymi 1	OH	11459	679,5	5,9
	MSI	11667	1173,8	10,1
Entsyymi 2	OH	1041	34,5	3,3
	MSI	1030	62,9	6,1
Entsyymi 3	OH	2439	130,9	5,4
	MSI	2401	114,8	4,8
Entsyymi 4	OH	821	47,0	5,7
	MSI	918	25,7	2,8

Myös taulukossa 3 ilmoitetut tulokset ovat jokainen 12:n erillisen tuloksen keskiarvo. Yksittäiset mittaustulokset löytyvät samaten liitteestä 2. Toistettavuus- ja uusittavuusmittausten tulokset koottiin lopuksi yhteen (taulukko 4) ja saaduista tuloksista laskettiin yhteiset keskiarvot, keskihajonnat (kaava 2) ja suhteelliset keskihajonnat.

Taulukko 4. Kootut toistettavuus- ja uusittavuusmittausten tulokset.

NÄYTE	PGX/g	STD	RSD%
Entsyymi 1	11552	916,3	7,9
Entsyymi 2	1003	67,5	6,7
Entsyymi 3	2277	232,7	10,2
Entsyymi 4	845	65,0	7,7

Yrityksen puolesta toistettavuus- ja uusittavuustulosten tarkastelussa seurattiin pitkälti suhteellisen keskihajonnan prosentuaalisia lukuja. Kun RSD% oli noin 10 tai alle, voitiin tulosta pitää validoinnin osalta onnistuneena. Suhteellinen keskihajonta pysyi molempien mittausten ja kaikkien näytteiden kohdalla määrättyissä rajoissa, joten tulokset todettiin hyväksyttäväksi.

8.3 Mittausepävarmuus

Toistettavuus- ja uusittavuusmittauksista laskettiin lisäksi mittausepävarmuudet. Laskelmien tulokset löytyvät taulukosta 5, jossa

s_r	on toistettavuuden keskihajonta
S_{Rw}	on toistettavuuden ja uusittavuuden yhdistetty keskihajonta
$u(c)$	on yhdistetty mittausepävarmuus (s_r ja S_{Rw})
U	on laajennettu mittausepävarmuus
C	on uusittavuuden keskiarvo [Validointipohja 2018].

Taulukko 5. Toistettavuus- ja uusittavuusmittausten mittausepävarmuudet.

Näyte	s_r	S_{Rw}	$u(c)$	U	C	%U	TULOS
Entsyymi 1	896,6	916,3	1282	2564	11552	22	11552 ± 22 %
Entsyymi 2	47,6	67,5	83	165	1003	16	1003 ± 16 %
Entsyymi 3	107,4	232,7	256	513	2277	23	2277 ± 23 %
Entsyymi 4	40,2	65,0	76	153	845	18	845 ± 18 %

Taulukosta 5 voidaan havaita, että menetelmän mittausepävarmuus näyttää epäluotettavalta. Menetelmää validoitaessa havaittiin absorbanssien suurehkoa heittelyä, joka aiheutti tuloksiin hajontaa. Tämä osaltaan vaikutti negatiivisesti mittausepävarmuuksiin. Mittausepävarmuuksien laskemisella saatiin hyvä käsitys siitä, kuinka paljon absorbanssijajonnat vaikuttivat lopullisiin tuloksiin. Epäluotettavat mittausepävarmuudet eivät kuitenkaan olleet ratkaiseva tekijä validoinnin hyväksymisen kannalta.

Kaikki keskihajonnat laskettiin kaavalla

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

jossa

x_i	on havaintoarvot
\bar{x}	on keskiarvo
n	on havaintojen lukumäärä [Karjalainen 2010: 97].

Suhteelliset keskihajonnat laskettiin jakamalla näytteen keskihajonta näytteen keskiarvolla. Kaikki suhteelliset keskihajonnat on ilmoitettu prosenttiyksiköissä, joten tulokset on kerrottu vielä sadalla.

Yhdistetty mittausepävarmuus laskettiin kaavalla 3.

$$u(c) = \sqrt{s_r^2 + s_{RW}^2} \quad (3)$$

Laajennettu mittausepävarmuus U saatiin kertomalla yhdistetty mittausepävarmuus $u(c)$ kattavuuskertoimella k . Kaava ilmoitettu alla.

$$U = u(c) * k \quad (4)$$

Kattavuuskertoimena käytettiin arvoa 2, joka vastaa noin 95 %:n luottamusväliä [Karjalainen 2010: 103].

8.4 Toteamis- ja määrittäysraja

Tässä tapauksessa toteamisrajalla (LOD) tarkoitetaan pienintä absorbanssiarvoa, jonka perusteella voidaan luotettavasti todeta, sisältääkö näyte tutkittavaa yhdistettä vai ei [Laurén 1999: 7.] Tässä työssä toteamisrajan määrittämiseen käytettiin nollanäytteen hajontaa ja se määritettiin kaavalla (5).

$$LOD = \text{absorbanssien keskiarvo} + (3 * STD) \quad (5)$$

Määrittäysraja (LOQ) on alin absorbanssitaso, jonka avulla voidaan ilmaista tutkittavan yhdisteen alin pitoisuus kvantitatiivisesti [Laurén 1999:7]. Määrittäysraja laskettiin kaavalla (6).

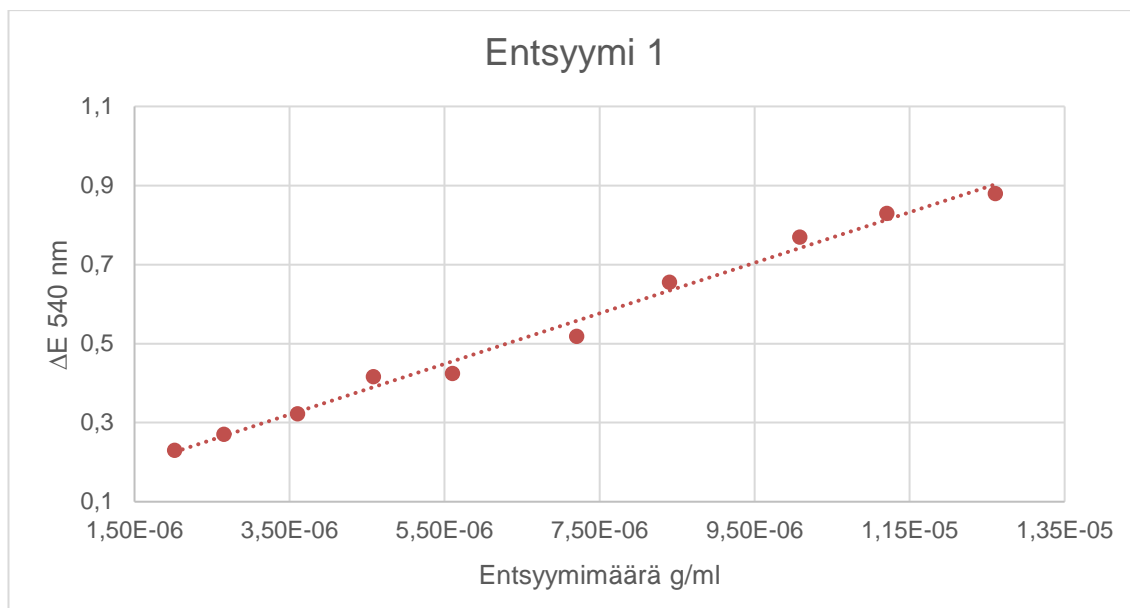
$$LOQ = \text{absorbanssien keskiarvo} + (6 * STD) \quad (6)$$

Mittaus suoritettiin menetelmäohjeen mukaisesti mutta näytteen tilalle pipetoitiin 0,1 M natriumasetaattipuskuria. Mittaus toistettiin kolme kertaa eri päivinä ja jokainen mittaus sisälsi 12 rinnakkaista. Kaikki yksittäiset mittaustulokset löytyvät liitteestä 3. Lopulliset tulokset laskettiin kaikkien kolmen mittauksen keskiarvoista. Menetelmän toteamisrajaksi laskettiin 0,220 ΔE aallonpituudella 540 nm. Määrittäysrajaksi laskettiin 0,316.

8.5 Lineaarisuus

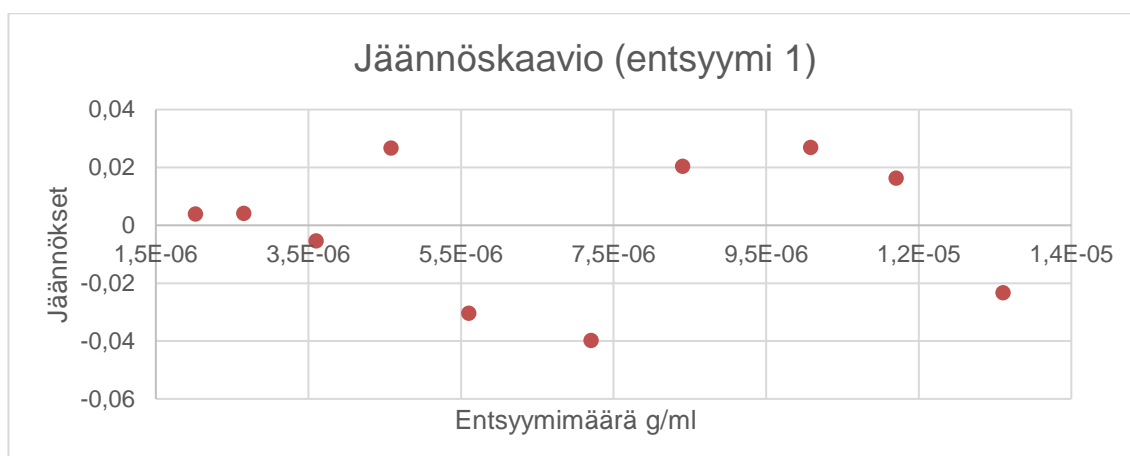
Menetelmän lineaarisuus tarkistettiin tekemällä entsyymivalmisteista standardisuorat laajemmalle pitoisuusalueelle kuin mitä menetelmässä normaalisti käytetään. Schmidin [2018: 6] suorittamien testien mukaan menetelmän todettiin olevan lineaarinen aallonpituudella 540 nm välillä 0,3–0,6, joten standardisuorat tehtiin alueella ~0,1–1,0. Lisäksi standardisuorista tehtiin regressioanalyysit.

Entsyymi 1 (kuva 13) osoitti hyvää lineaarisuutta, vaikka neljännen, viidennen ja kuudennen pisteen kohdalla huomattiin pientä epävakautta. Lineaarisuuden katsottiin kuitenkin olevan oikeellinen.



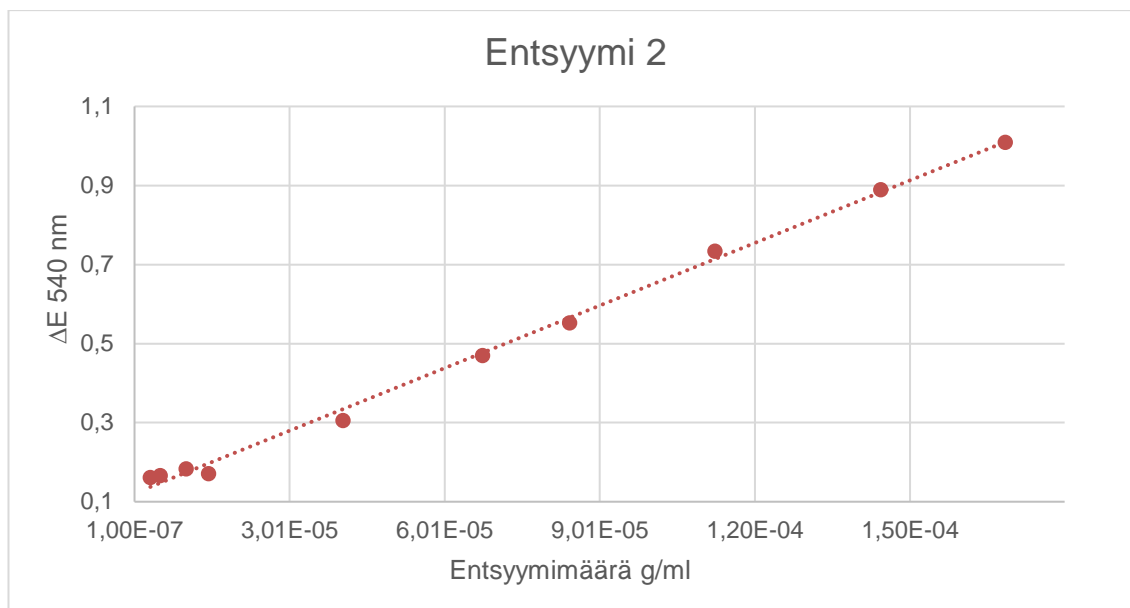
Kuva 13. Enzymin 1 standardisuora.

Regressioanalyysin tuloksena enzymin 1 selitysasteeksi saatiin 0,9897, joka vahvisti lineaarisuuden olevan hyvä. F:n tarkkuus oli $3,062 \cdot 10^{-9}$, jonka perusteella mallin voitiin sanoa olevan tilastollisesti merkitsevä. Regression jäännöskaavio on esitetty kuvassa 14.



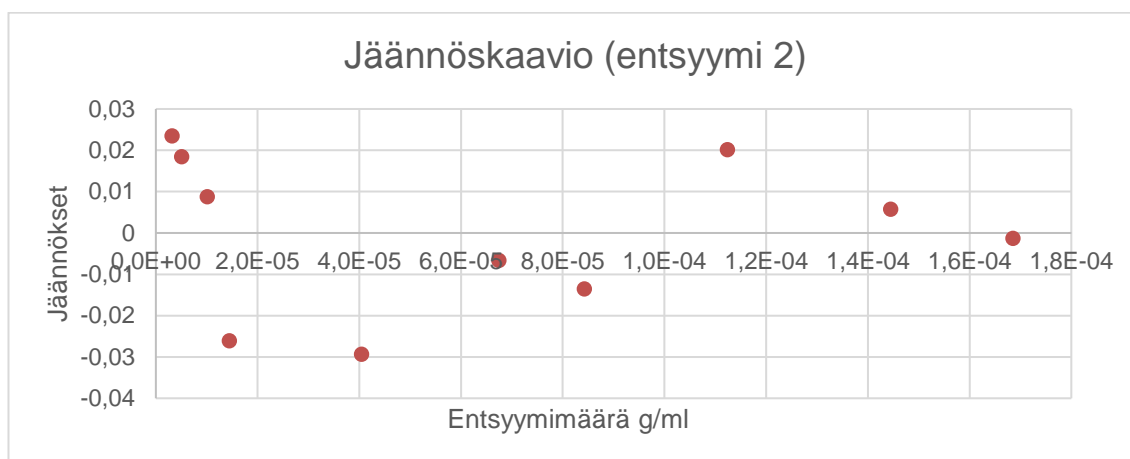
Kuva 14. Enzymin 1 jäännöskaavio.

Toisen enzymivalmisteen kohdalla (kuva 15) huomattiin selkeä hajonta ensimmäisen ja neljännen pisteen välillä ennen kuin absorbanssiarvo $\sim 0,3$ saavutetaan. Suora lähti kuitenkin tämän jälkeen hyvään lineaariseen linjaan, kuten optimoinnin aikana todettiin.



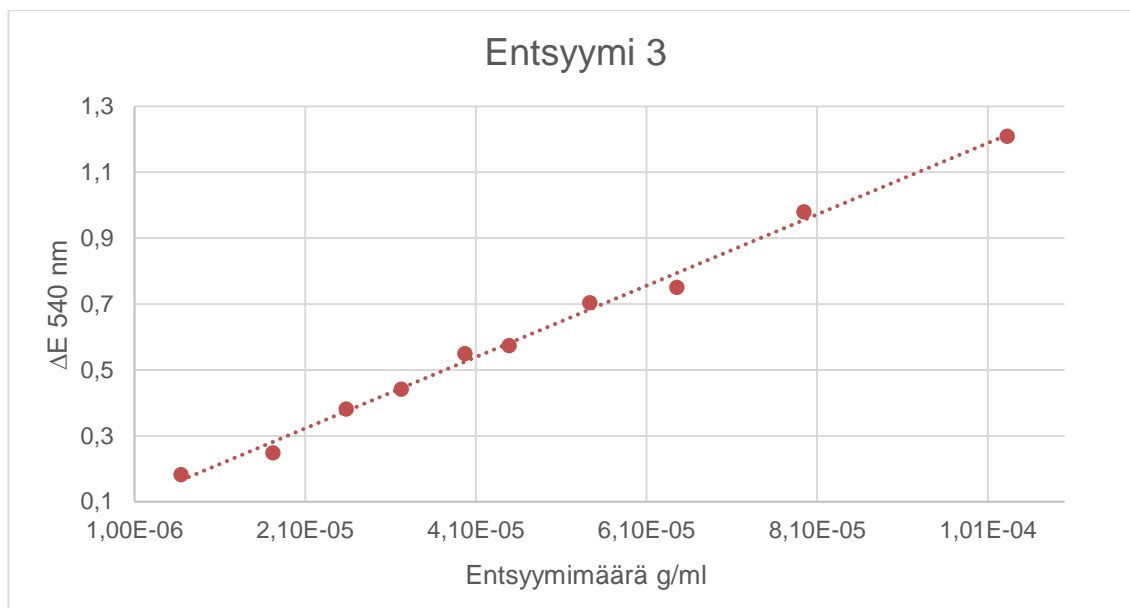
Kuva 15. Enzymin 2 standardisuora.

Enzymille 2 tehdyn regressioanalyysin tuloksena selitysasteeksi saatiin 0,9966, joka oli hyvä. F:n tarkkuus $3,758 \cdot 10^{-11}$ vahvisti mallin olevan merkitsevä. Jäännöskävio on esitetty kuvassa 16.



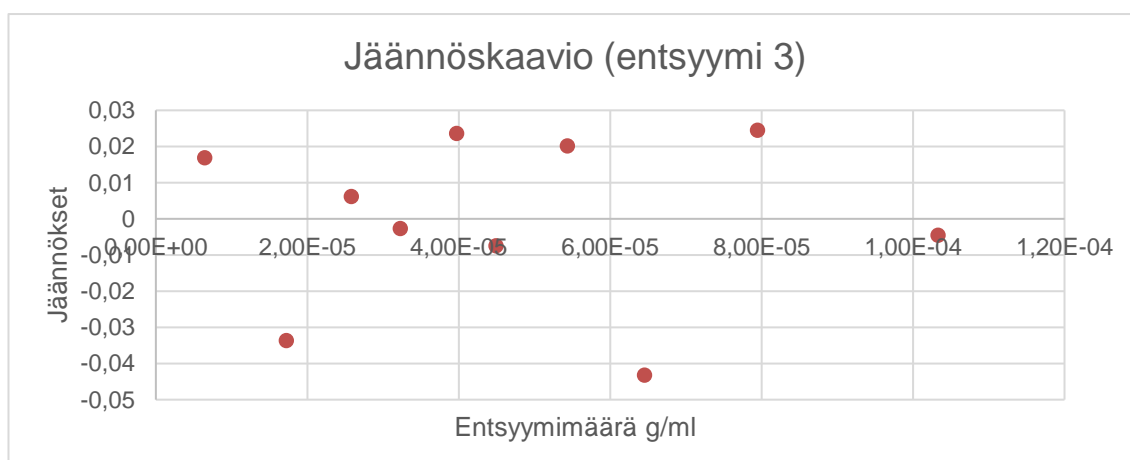
Kuva 16. Enzymin 2 regressioanalyysin jäännöskävio.

Myös kolmannen enzymivalmisteen standardisuora (kuva 17) näytti hyvää lineaarista linjaa. Jäännöskävio (kuva 18) tukee menetelmän lineaarisuutta myös tämän näytteen osalta.



Kuva 17. Ensyymien 3 standardisuora.

Kolmannen entsyymivalmisteen selitysaste oli 0,9946 ja F:n tarkkuus $2,295 \cdot 10^{-10}$. F:n tarkkuus osoitti myös tämän mallin olevan tilastollisesti merkitsevä.



Kuva 18. Ensyymien 3 regressioanalyysin jäännöskaavio.

Kaikkien entsyymien lineaarisuudet todettiin yhdenmukaisiksi Schmidtin suorittamien testien valossa ja hyväksyttiin sellaisenaan. Yrityksen puolesta lineaarisuuden tarkistamista ei koettu tarpeelliseksi entsyymille numero 4, joten se jätettiin lineaarisuustarkistusten ulkopuolelle.

9 Huomioita

9.1 Kertoimet

Vanhalla menetelmällä saatu aktiivisuus ilmoitetaan yksikössä PGU/mg ja uuden menetelmän tulos yksikössä PGX/g. Koska vanhan ja uuden menetelmän aktiivisuustuloksia ei voida suoraan verrata toisiinsa, kaikille tuotteille tulee määrittää erilliset kertoimet. Kertoimia tullaan määrittämään vielä työn loppumisen jälkeen ja dataa kerätään sitä mukaa kun näytteitä tulee analysoitavaksi. Näyte analysoidaan ensin vanhalla viskosimetrisellä menetelmällä, jonka jälkeen siitä määritetään aktiivisuus uudelleen kolorimetrisellä menetelmällä. Esimerkki kertoimen laskemisesta on havainnollistettu kaavassa 8.

$$Kerroin = \frac{PGU/mg}{PGX/g} = \frac{34\,000\,PGU/mg}{888\,PGX/g} = 38,3 \quad (8)$$

Roal Oy:n laadunvalvontalaboratorio tulee käyttämään tuloksia yksikössä PGX/g mutta kertoimet on menetelmän käyttöönoton alussa kyettävä ilmoittamaan asiakkaille, jotta he pystyvät laskemaan mikä määrä uudella menetelmällä saatua aktiivisuutta vastaa vanhalla menetelmällä saatua. Jatkossa aktiivisuus tullaan ilmoittamaan myös asiakkaille yksikössä PGX/g.

9.2 Vertailunäyte

Ennen kuin uusi kolorimetrinen analyysi voidaan ottaa vakituiseen käyttöön, menetelmälle on valittava vertailunäyte. Vertailunäyte otetaan mukaan jokaiseen sarjaan analysoitavien näytteiden kanssa, kun menetelmää suoritetaan. Vertailunäytteen aktiivisuustuloksen avulla todennetaan, että analyysi on onnistunut ja näytteiden saadut aktiivisuustulokset ovat oikealla tasolla. Vertailunäytteeksi valitaan jokin entsyymivalmiste tuoreesta tuotantoerästä, mitä muutoinkin analysoidaan kyseisellä menetelmällä. Ennen kuin valittu vertailunäyte voidaan ottaa vakituiseen käyttöön, se tarvitsee luotettavat aktiivisuuksien viitearvot. [Vertailunäyte 2018.]

Vertailunäytteen aktiivisuustuloksista kerätään dataa sitä mukaa, kun analyysiä tällä hetkellä tehdään. Kun mittaustuloksia on kerätty hyväksytysti vähintään 20 kappaletta, voidaan näytteelle laskea alustavat aktiivisuusrajat. Tämän jälkeen vertailunäyte asetetaan seurantaan ja seuranta jatketaan edelleen. Kun dataa on kerätty tarpeeksi, voidaan laskea lopulliset viitearvot. [Vertailunäyte 2018.] Vertailunäyte valitaan yhdessä AB Enzymesin kanssa, jotta tulevaisuudessa Roal Oy:n ja AB Enzymesin biokemian laboratorion välisiä tuloksia voidaan luotettavasti verrata toisiinsa ja mahdollisia poikkeamia on helppo seurata.

9.3 Absorbanssit

Validoinnin aikana havaittiin absorbanssien suurehkoa hajontaa. Ongelmaan ei validoinnin aikana löytynyt selkeää syytä, joten sen selvittämistä jatketaan vielä työn päättymisen jälkeen yhdessä AB Enzymesin entsyymibiokemian tutkimus- & kehitysosaston kanssa.

Menetelmää harkitaan myöhemmin siirrettäväksi pipetointirobotille, joka suorittaisi menetelmän haudevaiheen sekä näytteiden siirtämisen Eppendorf-putkiin ja mikrokuvetteihin. Tämän avulla voitaisiin tehokkaasti poistaa mahdollisia virhelähteitä ja absorbanssien hajontaa saataisiin mahdollisesti minimoitua. Alkuun menetelmä otetaan kuitenkin käyttöön käsin tehtäväksi, ja pipetointirobotille siirtämisestä keskustellaan myöhemmin. On myös keskusteltu siitä, että sentrifugointiaikaa nostettaisiin muutamalla minuutilla.

9.4 Substraatti

Validoinnin aikana testattiin Pectin-C-substraattiliuoksen säilyvyyttä. Koska kyseistä substraattia ei ole käytetty laboratoriossa aikaisemmin, sen säilyvyysominaisuuksia ei tiedetty. Kylmäsäilytyksessä (~ 8 °C) Pectin-C- substraatti säilyy stabiilina ja käyttökelpoisena neljän päivän ajan. Validoinnin aikana haluttiin kuitenkin testata pakastamisen mahdollisuutta, jotta jatkossa uutta erää substraattiliuosta ei tarvitsisi valmistaa jokaista analyysikertaa kohti erikseen. Tämä nopeuttaisi analyysin aloittamista ja säästäisi aikaa.

Säilyvyydestiä varten substraattia säilytettiin pakkasessa noin kuukauden ajan. Testi suoritettiin entsyymivalmisteella 2. Näytettä punnittiin noin 0,25 g yhteen 25 ml:n mittapulloon ja täytettiin merkkiin 0,1 M natriumasetaattipuskurilla. Tästä tehtiin kuusi rinnakkaista kumpaakin substraattia kohden.

Määritys suoritettiin samassa sarjassa käyttäen sekä tuoretta että pakastettua substraattia. Kummallakin substraatilla tehtiin omat kolmen pisteen standardisuorat, joita käytettiin myös tulosten laskennassa. Taulukkoon 6 on eritelty pakastetulla substraatilla saatujen rinnakkaisten aktiivisuustulokset, niiden keskiarvo, keskihajonta (2) sekä suhteellinen keskihajonta.

Taulukko 6. Pakastetulla substraatilla saadut aktiivisuustulokset.

LAIMENNOS	ABS	NOLLA	EROTUS	PGX/g		
150	0,325	0,017	0,308	729		
150	0,248	-0,003	0,251	595		
150	0,350	-0,003	0,353	835		
150	0,402	-0,002	0,404	955	AVE	800
150	0,365	0,012	0,353	835	STD	123
150	0,385	0,025	0,360	851	RSD%	15,4

Taulukkoon 7 on koottu tuoreella substraatilla saadut tulokset.

Taulukko 7. Tuoreella substraatilla saadut aktiivisuustulokset.

LAIMENNOS	ABS	NOLLA	EROTUS	PGX/g		
150	0,413	0,004	0,409	906		
150	0,456	0,006	0,450	999		
150	0,458	0,003	0,455	1010		
150	0,437	-0,010	0,447	992	AVE	986
150	0,439	-0,005	0,444	985	STD	41
150	0,457	-0,004	0,461	1023	RSD%	4,2

Alustavasti voidaan todeta, että Pectin-C-substraattiliuos ei säily pakastuksessa näin pitkää aikoa. Vertailemalla taulukoita 6 ja 7, voidaan havaita, että pakastettu substraatti antaa matalampaa tulosta ja suhteellinen keskihajonta on huomattavasti suurempi.

Saaduista tuloksista tehtiin myös kaksisuuntainen t-testi, jossa varianssit oletettiin erisuuriksi. Saatu p-arvo (0,0129) oli pienempi kuin merkitsevyystaso 0,05, joten pakastetulla ja tuoreella substraatilla saadut aktiivisuustulokset erosivat toisistaan tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 95 %. Substraatin säilyvyydestä tarvitaan kuitenkin vielä lisää testejä, eikä tämän yhden mittauksen perusteella voida antaa lopullisia tuloksia.

10 Yhteenveto

Tämän työn tarkoituksena oli validoida ja lopulta ottaa käyttöön uusi kolorimetrisen pektinaasiaktiivisuusmenetelmä vanhan viskosimetrin menetelmän tilalle. Validoinnin aikana testattiin uuden menetelmän toistettavuutta, uusittavuutta ja näille laskettiin mittausepävarmuudet. Lisäksi menetelmälle laskettiin toteamis- ja määritysraja ja sen lineaarisuus tarkistettiin. Validoinnin myötä vanha käytössä ollut Copenhagen X-2955-substraatti korvattiin uudella Pectin-C-valmisteella.

Mittausten aikana seurattiin tiiviisti tulosten suhteellisia keskihajontoja. Kaikkien tulosten RSD% pysyi noin 10:ssä tai alle, joten validointia voitiin pitää onnistuneena ja tuloksia hyväksyttävänä. Menetelmä osoitti myös hyvää lineaarisuutta. Validoinnin aikana ilmeni kuitenkin suurehkoa hajontaa absorbansseissa, mikä aiheutti tulosten välille rinnakkaiseroja. Tämä osaltaan vaikutti tuloksiin negatiivisesti ja lisäsi menetelmän mittausepävarmuutta.

Absorbanssien hajontaan pyrittiin aktiivisesti löytämään ratkaisu jo validoinnin aikana mutta selkeitä ongelman aiheuttajia ei havaittu. Tästä syystä ongelman selvittämistä jatketaan vielä työn päättymisen jälkeen yhdessä AB Enzymesin kanssa. Menetelmää harkitaan myös tulevaisuudessa siirrettäväksi pipetointirobotille, joka suorittaisi menetelmän haudevaiheen, sekä näytteiden siirtämisen Eppendorf-putkiin ja mikrokyvetteihin. Pipetointirobotin käytöllä voisi olla myönteinen vaikutus absorbanssien hajontaan.

Insinööriytyö oli kokonaisuudessaan onnistunut ja tarjosi laajan perehtymisen entsyymiaktiivisuusmenetelmän validointiin ja käytännönläheiseen työskentelyyn. Tehdyn työn perusteella vanhasta menetelmästä voidaan luopua ja uusi menetelmä voidaan ottaa käyttöön Roal Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa.

Ennen menetelmän käyttöönottoa analysoitaville entsyymivalmisteille tulee vielä määrittää aktiivisuuskertoimet, jotta voidaan laskea, mikä määrä vanhalla menetelmällä saatua entsyymiaktiivisuutta vastaa uudella menetelmällä saatua. Lisäksi vertailunäyte valitaan ja virallinen menetelmäohje viimeistellään. Laboratoriohenkilökunnan perehdyttäminen uuden analyysin suorittamiseen aloitetaan mahdollisimman pian. Menetelmän virallinen käyttöönotto tapahtuu vuoden 2019 lopulla.

Lähteet

Christiaens, Stefanie; D. Ngouémazong, Eugénie; E.G. Hendrickx, Marc; Houben, Ken; Kermani, Zahra Jamsazzadeh; R.N. Moelants, Katlijn; Van Buggenhout, Sandy & Van Loey, Ann. 2016. Process-Structure-Function Relations of Pectin in Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. s. 1028.

Dr. Grassin, Catherine. 2007. Enzymes in Fruit Juice Production and Fruit Processing. Teoksessa Aehle, Wolfgang (ed.). *Enzymes in Industry*, s. 111. Weinheim: WILEY-VCH.

Eerola, Susanna & Puranen, Terhi. 2009. Elintarvikeala hyödyntää entsyymejä monella tavalla. Verkkoaineisto. Kehittyvä Elintarvike. <<http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajuttu/40-elintarvikeala-hyodyntaa-entsyymeja-monella-tavalla>>. Luettu 14.1.2019.

Ellison, Stephen; Barwick, Vicki & Duguid-Farrant, Trevor. 2009. *Practical Statistics for the Analytical Scientist*. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Estimation of reducing sugars by dinitrosalicylic acid method. Verkkoaineisto. <http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/445_lab_2.pdf>. Luettu 18.1.2019.

Fruits, Vegetables, Juices and Wines. Verkkoaineisto. AB Enzymes. <<https://www.abenzymes.com/en/your-industry/fruits-vegetables-juices-and-wines/>>. Luettu 24.1.2019.

Jadaun, Jyoti Singh; Narnoliya, Lokesh K & Verma, Heena. 2018. Pectinase: A Useful Tool in Fruit Processing Industries. Verkkoaineisto. Juniper Publishers. <<https://juniper-publishers.com/nfsij/pdf/NFSIJ.MS.ID.555673.pdf>>. 7.3.2018. Luettu 18.1.2019.

Kaltenbach, Miriam. 2019. Entsyymibiokemiaosaston johtaja, AB Enzymes, Darmstadt. Sähköpostikeskustelu 1.2.2019.

Karjalainen, Leena. 2010. *Tilastotieteen perusteet*. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

L. Flutto, Danisco. 2003. Pectin: Properties and Determination. Teoksessa Caballero Benjamin; Finglas, Paul M. & Trugo, Luiz (ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Food Nutrition*, s. 4440-4449. Amsterdam: Academic Press.

Laurén, Marjo. 1999. Validoinnin käsitteet ja määritelmät. Kurssimateriaali. AEL.

Lea, A.G.H. 1991. Enzymes in the production of beverages and fruit juices. Teoksessa Tucker, G.A. & Woods, L.F.J. (ed.). *Enzymes in Food Processing*, s. 208. Glasgow & Lontoo: Blackie.

N. Gummadi, Sathyanarayana & Kumar, D. Sunil. 2007. Structural and biochemical properties of pectinases. Teoksessa Polaina, Julio & P. MacCabe, Andrew (ed.). Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, s. 99–101. Dordrecht: Springer.

Oliver Schmidt. Substitution of viscosimeter determination of PG (PGU) by a new colorimetric assay. 2018. Yrityksen sisäinen dokumentti. AB Enzymes.

Pectins and Pectinases. Verkkoaineisto. Scribd.

<<https://www.scribd.com/book/282469937/Pectins-and-Pectinases>>. Luettu 30.1.2019.

Saarinen, Pauliina. 2014. Entsyymianalytiikan automatisointi. Insinööriyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.

Toimintajärjestelmäkuvaus. 2019. Yrityksen sisäinen dokumentti. Roal Oy.

Tuoteporfolio. 2018. Verkkoaineisto. Roal. <<https://www.roal.fi/tuoteporfolio/>>. Luettu 24.1.2019.

Validointipohja analyyseille. 2018. Yrityksen sisäinen dokumentti. Roal Oy.

Vertailunäytteet. 2018. Yrityksen sisäinen dokumentti. Roal Oy.

Yritys. 2018. Verkkoaineisto. Roal. <<https://www.roal.fi/yritys/>>. Luettu 24.1.2019.

Yritysesittely. 2018. Verkkoaineisto. Roal. <<https://www.roal.fi/yritysesittely/>>. Luettu 24.1.2019.

Viskosimetrinen menetelmän kuvaus



Sivu 1 (8)

Tunnus B045

Versio

Päivämäärä 10/25/2018

4:03 PM

Analytical method - B

POLYGALAKTURONAASIMÄÄRITYS (PGU)

Muutoshistoria

Päivämäärä	Lyhyesti mitä muutettiin	Kuka teki muutokset
25.10.2018	uusi templaatti määritelmä päivitetty	Pauliina Saarinen

Periaate

Polygalakturonaasiaktiivisuuden määrittäminen perustuu pektiinisubstraatin viskositeetin alenemisen mittaamiseen näytteessä olevan entsyymin vaikutuksesta. Aktiivisuuden laskeminen perustuu tunnetun standardinäytteen sisältämään aktiivisuuteen.

Aktiivisuusyksikkö

Polygalakturonaasiaktiivisuus ilmoitetaan PGU1/mg tai PGU2/mg. Yksi aktiivisuusyksikkö (PGU) on se määrä entsyymiä, joka laskee reaktioliuoksen viskositeettia menetelmän olosuhteissa 11 minuutin aikana 0,02 η-1.

Soveltamisalue

Menetelmä soveltuu polygalakturonaasiaktiivisuuden (1 ja 2) määrittämiseen pektinaaseista.

Työturvallisuus- ja ympäristönäkökohdat

Ei erityistä huomioitavaa. Huomioi kuitenkin laitteiston liitosten mahdollinen peittäminen, erityisesti 80 °C:n haude sekä substraatin valmistamisessa turvalliset toimintatavat.

Laitteet

Magneettisekoittaja
Velp DLS - sekoitin
Automaattinen näytteenäyttävä (säädöt: imu aika 165 s, odotusaika 560 s)
Monikanavapumppu, Ismatec IPC, nopeusasetus 0.73
Vesihaude 80 °C
Vesihaude 30 °C
Viskosimetri Haake Viscotester 550 (VT 550, roottori NV), 30 °C
Pumppu ilmakehien poistoon ennen mittausta, esim. Heidolph Pumpdrive 5001

Major Version 3 effective on 10/25/2018



Sivu 2 (8)

Tunnus B045

Versio

Päivämäärä 10/25/2018
4:03 PM

Analytical method - B

Pumppu, jolla imetään reaktioseosta viskosimetristä, esim. Ismatec SA (180)
Jäähdytin vesikierrolla esim. Lauda RCS
Softa: Haake Rheowin

Reagenssit ja tarvikkeet

Kaikkien reagenssien valmistukseen käytetään ionivaihdettua vettä, Milli-Q tai vastaavaa, mikäli toisin ei mainita. Reagenssin vaihtuessa ohjeen esimerkkituotteesta toiseen, tulee sen toimivuus testata analyysissä vanhan reagenssin rinnalla. Substraattissa myös erän vaihtuessa on tarkistettava sen toimivuus.

1. 1,0 M Kalsiumkloridiliuos

Punnitaan 147,0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 2382), liuotetaan veteen ja täytetään tilavuus 1000 ml:ksi.

2. 10 mM Kalsiumkloridiliuos

Liuotetaan 10 ml 1,0 M kalsiumkloridiliuosta veteen ja täytetään tilavuus 1000 ml:ksi.

3. Sitraattipuskuri (pH n. 3,5)

Punnitaan 42,2 g sitruunahappoa (Merck 244), lisätään 280 ml 1,0 M NaOH ja 200 ml 1,0 M CaCl_2 täytetään tilavuus vedellä 2000 ml:ksi.

4. Substraattiliuos

Punnitaan n. 80 g pektiiniä (Copenhagen Pectin x-2955 91-003-01 punnittava määrä voi vaihdella substraattierästä ja sen iästä riippuen) ja liuotetaan se noin 250 ml:aan 96 % etanolia. Kostutetaan pektiini ensin sekoittamalla varovasti, jatketaan sekoittamista Velp-sekoittimella kierrosnopeutta lisäten niin, että loppukierrosnopeus on n. 1000 rpm. Sammutetaan sekoittaja ja lisätään 5 l kuumaa (n. 80 °C - 95 °C) vettä, käynnistetään sekoitin mahdollisimman nopeasti ja sekoitetaan voimakkaasti (2000 rpm) vähintään 15 min. Odotetaan, kunnes lämpötila laskee noin 60 °C:een. Lisätään 2 l sitraattipuskuria ja sekoitetaan n. 15 min 1000 rpm. Täytetään tilavuus vedellä 11 l:ksi. Suodatetaan G2-lasisinterin läpi ja säilytetään yön yli n. + 4 °C:ssa. Poistetaan substraattiliuksesta ilma vakuumilla. Viskositeetin tulee olla noin 8 - 10 mPas mitattuna 30 °C:ssa. Substraattia voidaan tarvittaessa laimentaa tasapainotusvaiheessa vedellä. Substraattiliuosta voi säilyttää ainakin 7 vuorokautta kylmähuoneessa.

Näytteen esikäsittely

Nestemäiset entsyymit: Punnitaan tarkasti 0,25 - 0,5 g näytettä 25 ml:n

Major Version 3 effective on 10/25/2018



Sivu 3 (8)

Tunnus B045

Versio

Päivämäärä 10/25/2018

4:03 PM

Analytical method - B

mittapulloon, täytetään merkkiin 10 mM CaCl₂-liuoksella ja sekoitetaan huolellisesti.

Kuivat entsyymit: Punnitaan tarkasti 0,5 – 1,0 g näytettä 50 ml:n mittapulloon, liuotetaan näyte 10 mM CaCl₂-liuokseen sekoittaen huolellisesti magneettisekoittajalla 20-30 min. huoneenlämpötilassa. Täytetään merkkiin liuotuksen jälkeen.

Näyte laimennetaan 10 mM CaCl₂-liuoksella siten, että se sisältää 3500-4500 PGU/ml. PG2-näytelaimennosten (myös kantalaimennosten) tulee olla mahdollisimman tuoreita. Jokaisen määrityksen yhteydessä ajetaan vertailunäyte.

Standardisuora

Kalibrointinäytteenä käytetään näytettä Pect 3802 Ch.91023 (Eich für PG1).

Punnitus g	Pullo 1 ml	Ota ml	Pullo 2 ml	Aktiivisuus PGU/ml
0,55	250	0,8	50	2571
0,55	250	1,1	50	3535
0,55	250	1,4	50	4499
0,55	250	1,7	50	5464

Kalibrointikuvaajan konstruointi on selostettu Liitteessä 1: Mittaus ja datan käsittely.

Sekä kalibrointinäyte että kontrollinäyte laimennetaan 10 mM CaCl₂:lla.

Näytteiden järjestys:

Aloitus: yksi kontrollinäyte, ei lasketa standardisuoraan

Kalibrointi: neljä kalibrointinäytettä

Mittaus: kontrollinäyte

10 näytettä

kontrollinäyte jne.

Määritys

Analyysi suoritetaan puoliautomaattisella laitteistolla, jossa substraatin ja entsyymin muodostama seos virtaa jatkuvasti Haake VT 550-viskosimetrin läpi n. 25 ml/min. Näytteenäytössä käytetään huuhteluliuksena 10 mM CaCl₂. Viskosimetriä käytetään Rheowin softan kautta ja aktiivisuus lasketaan

Major Version 3 effective on 10/25/2018



Analytical method - B

Sivu 4 (8)

Tunnus B045

Versio

Päivämäärä 10/25/2018
4:03 PM

viskositeetin muutosten perusteella.

Substraattiliuosta pidetään jatkuvasti magneettisekoituksessa. Kaasun poistamiseksi liuoksesta substraattiliuosta pumpataan (viisi pumpun kanavaa, letkut 3,4 ml/min) ensin kiertämään 80 °C:n vesihauteessa olevassa lasikierukassa. Sen jälkeen substraattiliuos termostoidaan 30 °C:een vesihauteessa.

Tämän jälkeen substraattiliuokseen pumpataan suuria ilmakuplia estämään diffuusiota ja näytteiden sekoittumista toisiinsa. Substraattiliuokseen, jonka lämpötilan pitäisi tässä vaiheessa olla 30 °C, johdetaan nyt näyte (yhden pumpun kanavan kautta, 2,9 ml/min, imu aika 165 s, odotusaika 560 s.).

Varsinainen entsyymireaktio tapahtuu 30 °C:n vesihauteessa lasikierukassa, jonka läpi entsyymisubstraattiseos ohjataan kulkemaan, viipymän tulisi olla noin 11 min. Reaktioseos johdetaan seuraavaksi viskosimetriin, joka on vesikierron avulla termostoitettu 30 °C:een. Ennen mittausreaktioseoksesta poistetaan ilmakuplat pumpun avulla. Viskosimetristä imetään reaktioseosta pumpun avulla pois.

Laskeminen

Liitteessä 1, Mittaus ja datan käsittely, on ohjeet tulosten laskemiseksi PGU-laskentataulukon avulla.

Polygalakturonaasimääritys on suhteellinen menetelmä, jossa aktiivisuusyksikköjen määrittely perustuu kalibroitinäytteelle sovittuun aktiivisuusarvoon. PG1- ja PG2- aktiivisuudet käyttäytyvät määrittelyssä eri tavoin ja periaatteessa kummallekin pitäisi tehdä omat kalibroitikuvaajansa. Seuraavassa kuitenkin esitetään tapa PG1:n ja PG2:n määrittämiseksi samalla kertaa. Ensin määritetään PG1 ja näiden arvojen perusteella voidaan PG2 laskea.

PG1:n laskeminen

Fysikaalinen signaali on substraattiliuoksen dynaaminen viskositeetti ilman entsyymivaikutusta tai entsyymivaikutuksen kanssa. Viskositeetin muutos ilmaistaan termillä $\Delta 1/\eta$. Tämä termi lasketaan käänteisistä viskositeeteista:

$$(1) \quad \Delta 1/\eta = 1/\eta - 1/\eta_0, \text{ jossa}$$

η = entsyymikäsitellyn substraattiliuoksen (pienin) viskositeetti (mPas)

η_0 = on käsittelemättömän substraattiliuoksen viskositeetti (mPas).

Kalibroitikuvaajan laatimista varten standardit mitataan ja tulokset viedään excel-pohjaiseen laskentakaavaan. Alla on esitetty esimerkki (PGU ajo 17.11.2013)

Major Version 3 effective on 10/25/2018



Sivu 5 (8)

Tunnus B045

Versio

Päivämäärä 10/25/2018

4:03 PM

Analytical method - B

kalibrointipisteiden mittaamisesta ja sen perusteella lasketuista tuloksista.

1	2	3	4	5
	η , mPas	$1/\eta$, mPas ⁻¹	$\Delta 1/\eta$, mPas ⁻¹	PGU/ml
0	8,993	0,1112	0	0
E 1	5,020	0,1992	0,088	2575
E 2	4,395	0,2275	0,1163	3540
E 3	3,986	0,2509	0,1397	4506
E 4	3,714	0,2693	0,1581	5471

Laaditaan kuvaaja PGU/ml $\Delta 1/\eta$ -arvojen funktiona (E1-E4). Sovitetaan standardisuora $y=ax^2+bx+c$ yhtälöksi taulukkolaskentaohjelman avulla. Ohje liitteessä 1: Mittaus ja datan käsittely.

Näytteiden aktiivisuudet luetaan tältä kuvaajalta. Konsentraatiot lasketaan sitten seuraavan kaavan (2) mukaan:

$$(2) \text{ PGU/mg} = \frac{\text{PGU/ml (kalibr.kuvaajalta)}}{\text{Ents. konsentr.(mg/ml)}}$$

Näin saadaan määritettyä PG1-aktiivisuuksia.

Esimerkki 1.:

Näytteen konsentraatio: 0,0689 mg/ml

Viskositeetti: 4,177 mPas, substraatin viskositeetti 8,993 mPas

Vaihe 1:

$$1/\eta = 0,2394 \text{ mPas}^{-1}$$

$$\Delta 1/\eta = 0,12821 \text{ mPas}^{-1}$$

Kalibrointikuvaajan mukaan tämä vastaa aktiivisuutta 4008 PGU/ml.

Vaihe 2:

$$4008 \text{ PGU/ml} / 0,0689 \text{ mg/ml} = 58171 \text{ PGU/mg}$$

PG2:n laskeminen:

Periaatteessa PG2:n laskemisen pitäisi perustua erilliseen kalibrointikuvaajaan. PG1:n ja PG2:n välillä vallitsee kuitenkin seuraava korrelaatio (PGU method ABEG rev 2 (ID 22154)):

$$(3) \quad \ln(\text{PG2}) = a + b \cdot \ln(\text{PG1}),$$

Major Version 3 effective on 10/25/2018



Sivu 6 (8)

Tunnus B045

Versio

Päivämäärä 10/25/2018

4:03 PM

Analytical method - B

jossa $a = -3,307$ ja $b = 1,407$

Laskeminen tapahtuu kolmessa vaiheessa:

1. Määritetään PG1-aktiivisuus yksikköinä PGU/ml (esim.1. vaihe 1)
2. Muunnetaan PG1-aktiivisuus (PGU/ml) PG2-aktiivisuudeksi (PGU/ml)
3. Lasketaan PG2-konsentraatio (PGU/mg)

Esimerkki 2.:

Näytteen konsentraatio 0,0689 mg/ml

Viskositeetti: 4,117 mPas, substraatin viskositeetti 8,993 mPas

Vaihe 1:

$$1/\eta = 0,2394 \text{ mPas}^{-1} \quad \Delta 1/\eta = 0,12821 \text{ mPas}^{-1}$$

Kalibrintokuvaajan mukaan tämä vastaa aktiivisuutta 4008PGU/ml.

Vaihe 2:

$$\ln(\text{PG2}) = -3,307 + 1,407 * \ln(\text{PG1}),$$

$$\text{PG2} = 4487 \text{ PGU2/ml}$$

Vaihe 3:

$$4487 \text{ PGU2/ml} / 0,0689 \text{ mg/ml} = 65123 \text{ PGU2/mg}$$

Laitteiston puhdistus

Määritysten päätyttyä laitteiston läpi pumpataan runsaasti vettä ja 20 % Deconex –liuosta. Tarvittaessa laitteisto puhdistetaan 0,1 M kaliumpermanganaatilla, jonka jälkeen likaantuneet letkut/liitokset vaihdetaan.

Viitteet

Determination of polygalacturonase (PGU), QA 1/011/003 eng., rev 2

HUOM. Suomenkielinen ohje ei vastaa täysin alkuperäistä. Sitä on modifioitu mm. Oliver Schmidtin ohjeiden mukaan (24.1.2011).

[Enzyme assay substrate register](#)

Major Version 3 effective on 10/25/2018

Toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus

VALIDATION: PGX-method (pectinase)

Repeatability (U1)

12 weighings/12 results in a day (same technician)

Red marked are not included in the calculations!

Product	Date	Technician	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Average	STD	RSD%
Enzyme 1	23.10.2018	LPA	11894	11208	9888	8123	10356	12237	11725	10764	11550	11917	12587	12687	11528	896,6	7,8
Enzyme 2	23.10.2018	LPA	952	1044	882	927	901	899	899	898	998	951	956	943	938	47,6	5,1
Enzyme 3	19.10.2018	LPA	2132	2092	1908	2070	1839	2066	2054	1936	2017	1926	1842	2140	2002	107,4	5,4
Enzyme 4	19.10.2018	LPA	740	821	834	859	820	807	711	771	807	792	798	798	797	40,2	5,0

Reproducibility (U2)

12 weighings/12 results in a day (3 different technicians)

Product	Date	Technician	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Average	SD	RSD%
Enzyme 1	23.10.2018	LPA	11894	11208	9888	8123	10356	12237	11725	10764	11550	11917	12587	12687	11528	896,6	7,8
Enzyme 1	24.10.2018	OH	11824	12419	10449	11857	10266	11486	11268	11387	11680	11458	10927	12485	11459	679,5	5,9
Enzyme 1	1.11.2018	MSI	10202	10550	10227	11073	12647	12079	12123	12430	13237	12036	10150	13252	11667	1173,8	10,1
Enzyme 2	23.10.2018	LPA	952	1044	882	927	901	899	899	898	998	951	956	943	938	47,6	5,1
Enzyme 2	24.10.2018	OH	1052	1012	1052	1023	1011	1032	1083	1065	1035	1057	1095	1065	1041	34,5	3,3
Enzyme 2	1.11.2018	MSI	1028	1084	1010	987	1015	985	925	959	1145	1057	1083	1088	1030	62,9	6,1
Enzyme 3	19.10.2018	LPA	2132	2092	1908	2070	1839	2066	2054	1936	2017	1926	1842	2140	2002	107,4	5,4
Enzyme 3	25.10.2018	OH	2470	2486	2137	2532	2613	2499	2294	2319	2421	2520	2537	2445	2439	130,9	5,4
Enzyme 3	2.11.2018	MSI	2272	2154	2320	2019	2509	2351	2450	2425	2478	2435	2493	2522	2401	114,8	4,8
Enzyme 4	19.10.2018	LPA	740	821	834	859	820	807	711	771	807	792	798	798	797	40,2	5,0
Enzyme 4	25.10.2018	OH	854	849	914	866	824	815	751	816	776	836	794	758	821	47,0	5,7
Enzyme 4	2.11.2018	MSI	922	968	941	885	908	903	902	931	877	944	918	915	918	25,7	2,8

Method uncertainty calculated to the products:

Product	U1		U2		U	C	%U	Result
	s_r	S_{RW}	$u(c)$	S_{RW}				
Enzyme 1	896,6	916,3	1282	2564	11552	11552	22	11552 ± 22 %
Enzyme 2	47,6	67,5	83	165	1003	1003	16	1003 ± 16 %
Enzyme 3	107,4	232,7	256	513	2277	2277	23	2277 ± 23 %
Enzyme 4	40,2	65,0	76	153	845	845	18	845 ± 18 %

s_r Repeatability standard deviation
 S_{RW} Reproducibility standard deviation
 u_c Combined standard uncertainty
 U Expanded uncertainty
 C Reproducibility average

Toteamis- ja määrittäysraja

Detection & Quantification

7.11.2018	ABS. BUFFER	ABS. BLANK	ABS. DIFFERENCE
1	0.720	0.585	0.135
2	0.721	0.583	0.138
3	0.733	0.584	0.149
4	0.696	0.574	0.122
5	0.726	0.593	0.133
6	0.697	0.590	0.107
7	0.696	0.586	0.110
8	0.726	0.581	0.145
9	0.711	0.571	0.140
10	0.716	0.578	0.138
11	0.704	0.583	0.121
12	0.736	0.540	0.196
Average	0.715	0.579	0.136
STD			0.023
LOD			0.205
LOQ			0.274

20.11.2018	ABS. BUFFER	ABS. BLANK	ABS. DIFFERENCE
1	0.720	0.572	0.148
2	0.707	0.557	0.150
3	0.695	0.574	0.121
4	0.708	0.551	0.157
5	0.717	0.564	0.153
6	0.676	0.578	0.098
7	0.707	0.524	0.183
8	0.658	0.569	0.089
9	0.702	0.551	0.151
10	0.674	0.562	0.112
11	0.703	0.561	0.142
12	0.722	0.551	0.171
Average	0.699	0.560	0.140
STD			0.029
LOD			0.226
LOQ			0.312

14.12.2018	ABS. BUFFER	ABS. BLANK	ABS. DIFFERENCE
1	0.696	0.616	0.080
2	0.661	0.599	0.062
3	0.699	0.604	0.095
4	0.639	0.602	0.037
5	0.621	0.586	0.035
6	0.684	0.610	0.074
7	0.705	0.599	0.106
8	0.709	0.581	0.128
9	0.690	0.589	0.101
10	0.700	0.590	0.110
11	0.718	0.588	0.130
12	0.716	0.519	0.197
Average	0.687	0.590	0.096
STD			0.045
LOD			0.230
LOQ			0.363