



Johannes Pollari

Maitotuotteiden NMR-analyysin menetelmäkehitys

Opinnäytetyö

Kevät 2021

SeAMK Ruoka

Bio- ja Elintarviketekniikka

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Ruokayksikkö

Tutkinto-ohjelma: Bio- ja Elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Johannes Pollari

Työn nimi: Maitotuotteiden NMR-analyysin menetelmäkehitys

Ohjaaja: Sarita Ventelä

Vuosi: 2021

Sivumäärä: 24

Liitteiden lukumäärä: -

Työn tarkoituksena oli kehittää Valion Seinäjoen laboratorioon hankitulle SMART Oracle 6-laitteelle menetelmät, joilla voidaan mitata neljän eri näytetyypin rasvapiitoisuutta ja kuiva-ainepitoisuutta. Laitteelle kehitettyjä menetelmiä verrataan tilastollisesti laboratoriossa aikaisemmin käytettyyn Röse-Göttlieb-menetelmään, jonka SMART Oracle 6 tulee korvaamaan.

On olemassa neljä erilaista näytetyyppiä, jolle menetelmät kehitellään: jugurtti, vanukas, rahka ja mousse. Näytteet tulevat Valion Seinäjoen tehtaalta suoraan tuotantolinjalta laboratorioon analysoitavaksi. Kun näytteet on analysoitu aluksi Röse-Göttlieb-menetelmällä, niin tullaan näytteet analysoimaan halutulla Smart ORACLE 6-menetelmän avulla saman päivän aikana. Tulosten tarkastelu toteutettiin studentin t-testin avulla, jolla otettiin selvää, antoiko uusi menetelmä samankaltaisia tuloksia vanhaan verrattuna.

Tuloksista raportoitiin työtä valvovalle Valion edustajalle työn aikana ja sen jälkeen. Lopullinen työ on Valion hyväksymä ja viittaa tietoihin, joita ei voi julkaista opinnäytetyössä.

Avainsanat: Ydinmagneettinen resonanssi, menetelmäkehitys, kuiva-aine, rasva

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: Food and Agriculture

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food Sciences

Author/s: Johannes Pollari

Title of thesis: Method Development of NMR-analysis

Supervisor(s): Sarita Ventelä

Year: 2021 Number of pages: 24 Number of appendices: -

The purpose of this thesis was to develop methods for a Smart ORACLE 6-instrument, which had been acquired for Valio Oy's milk laboratory. The methods would be developed to measure the fat and dry sample percentage for 4 different sample types. The methods developed for the instrument would be compared statistically to a previously used Röse-Göttlieb-method, which Smart ORACLE 6 would replace.

There exists 4 different sampletypes for which the methods were developed for: yoghurt, pudding, curd and mousse. The analyzed samples would come directly from the production of Valio's Seinäjoki factory. After the samples have been analyzed by the Röse-Göttlieb-method, they would be analysed the same day by a different method which uses Smart ORACLE 6. The examination of the results were done by student's t-test, which were used to determine whether the new method gave similar results compared to the old one.

The results were reported to a supervising representative of Valio, during the completion of the thesis and afterwards. The final work is approved by Valio and references information with cannot be published in this work.

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance, method development, dry matter, fat

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluettelo.....	5
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	6
1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET.....	7
2 ANALYYSIMENETELMÄT.....	9
2.1 NMR-tekniikka.....	9
2.2 Kuiva-aineen mittaus.....	10
2.3 Röse-Gottlieb-menetelmä.....	10
2.4 Smart Oracle 6.....	11
3 TYÖN TOTEUTUS.....	14
3.1 Menetelmävertailu.....	14
3.2 Näytteiden analysointi.....	14
3.2.1 Vanukas.....	16
3.2.2 Mousse.....	16
3.2.3 Rahka.....	17
3.2.4 Jugurtti.....	17
3.2.5 Loput näytteet.....	18
4 TULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY.....	19
4.1 Keskiarvo.....	19
4.2 Keskihajonta.....	20
4.3 Studentin t-testi (kaksisuuntainen).....	21
4.4 Tuloksien tarkastelua.....	22
5 JOHTOPÄÄTÖKSET.....	23
6 Lähteet.....	24
LIITTEET.....	1

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuvio 1. Kaava 1: Spinien energia-ero	9
Kuvio 2. Kuva 1: Laitteisto	10
Taulukko 1. Näytteiden kuiva-aineiden keskiarvo.	20
Taulukko 2. Näytteiden rasvojen keskiarvo.....	20
Taulukko 3. Näytteiden kuiva-aineiden keskihajonta.	21
Taulukko 4. Näytteiden rasvojen keskihajonta.....	21
Taulukko 5. Studentin t-testi rasvalle.	22
Taulukko 6. Studentin t-testi kuiva-aineelle.....	22

Käytetyt termit ja lyhenteet

ISO	International Standardization Organisation, kansainvälinen standardisoimisjärjestö
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, atomin yliviritykseen perustuva ilmiö johon työssä käytetyn laitteen toiminta perustuu

1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET

Valio Oy on suomalainen meijerialan yritys, joka on toiminut vuodesta 1905 17 eri meijerin osuuskuntana. Tänä päivänä yhtiöllä on 2 miljardin liikevaihto, noin 4600 työntekijää ja sillä on toimintaa usealla suomalaisella ja ulkomaisella paikkakunnalla. Valiolla on Seinäjoella tehdas, missä valmistetaan muun muassa rahkoja, jogurtteja sekä vanukkaita. Näiden tuotteiden kuiva-aine ja rasvapitoisuutta tarkkailaan tehtaan maitolaboratoriossa, missä käytössä on variaatio Röse-Göttlieb-menetelmästä. Menetelmä kestää useita tunteja ja vaatii ihmisille vahingollisia kemikaaleja toimiakseen. Tämän takia maitolaboratorio on hankkinut NMR-tekniikkaan perustuvan Smart Oracle 6-laitteen, mikä ei tarvitse kemikaaleja toimiakseen ja vie 3–5 minuuttia analyysia kohden. Laite on kuitenkin ensiksi asennettava, testattava ja kehitettävä sille menetelmät, joilla näytteet voidaan ajaa. Smart-analysaattori ja Oracle 6 ovat kaksi eri laitetta, joista toisen tarkoitus on analysoida näytteen kuiva-ainepitoisuus haihduttamalla siitä vesi ja punnitsemalla analyysivaa'alla sen lopullinen kuiva-aine.

Oracle 6 on NMR-tekniikalla toimiva laite, joka mittaa näytteen rasvan protonien määrän ylivirittämällä ne toiselle spin-tasolle. Kun yliviritys päättyy, palaa atomin elektroni takaisin alkuperäiselle spin-tasolle, vapauttaen pienen energiamäärän. Vapautuneesta energiamäärästä voidaan laskea näytteen rasvapitoisuus. (Günther, 2013, 25.)

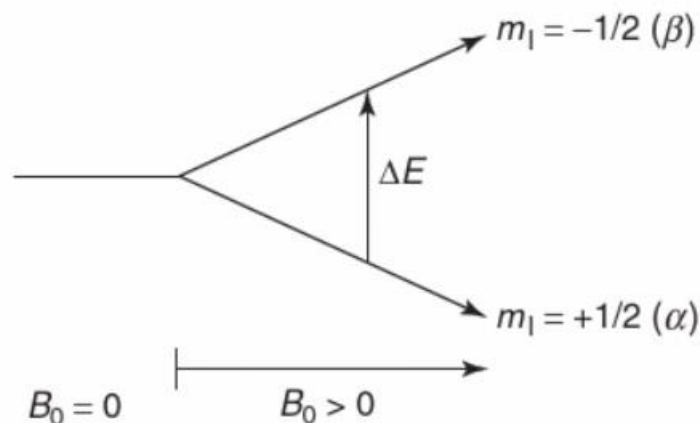
Työn tavoitteet. Työn tärkeimpänä tavoitteena oli kehittää näytetyyppikohtaiset menetelmät uudelle laitteelle ja osoittaa niiden toistettavuus. Tavoitteen saavuttamiseksi selvitettiin jokaisen näytetyypin (rahka, vanukas, jogurtti sekä mousse) toistettavuus eli keskiarvo ja keskihajonta. Sen jälkeen ajettaisiin tarpeeksi näytteitä, joita pystyisi vertailemaan alkuperäiseen menetelmään. Tämän lisäksi tehtäisiin myös käyttäjäopas. Valiolla aikaisemmin on ollut käytössä Smart Turbo 5-analysaattori (Vastamäki, 2018), mutta nyt käyttöön otetaan päivitetty versio Smart 6 Oracle. Menetelmät kehitettiin rahkoille, jogurteille, vanukkaille ja raejuustoille. Näytetyypeissä on myös vaihtelua siinä, että esim. eri jogurtit saattavat sisältää muun

muassa hilloa ja jotkut rahkat saattavat sisältää suklaata. Menetelmien toistettavuutta tullaan käsittelemään tilastollisin menetelmin, vertaamalla jo valmiiksi käytettyyn Rose-Göttlieb-menetelmään, joka on käytössä Seinäjoen maitolaboratoriossa.

2 ANALYYSIMENETELMÄT

2.1 NMR-tekniikka

NMR perustuu atomin elektronin ylivirittämiseen. Nostamalla elektronin kiertorataa atomin ympärillä korkeammaksi kuin mitä se on luonnollisessa tilassa ja sitten mittaamalla sen lähettämä kvanttienergia, kun elektroni palaa takaisin alkuperäiselle kiertoradalleen. Elektronin yliviritys tapahtuu, kun atomi saa oikean taajuuden omaavaa säteilyenergiaa, mikä nostaa elektronin spin-lukua (kuva 1). Ilman jatkuvaa säteilyenergiaa ylläpitämässä elektronin spin-lukua, elektroni putoaa omalle kiertoradalleen: (Günther 2013, 25.)



Kuva 1: Spinien energia-ero. Günther 2013.

NMR-tekniikkaa on käytetty aikaisemmin muun muassa jugurtin eri happojen erittelyyn, missä kvanttienergia kohdistettiin happojen eri hiiliatomeihin (Lu ym. 2018). Samalla periaatteella eri maitotuotteiden rasvapitoisuus voidaan määrittää. Smart Oracle 6 laskee kuitenkin kaikki rasvaliukoiset aineet yhteensä. Laite laskee kaikki ylivirittyneiden hiiliatomien protoneiden lähettämän kvanttienergian, joista saadaan tulos prosentteina näytteen kokonaispainosta. NMR-tekniikkaa on käytetty meijerteollisuudessa 1990-luvun lopusta saakka rasvan ja vesimäärän selvittämiseen maitotuotteissa. Vuonna 2013 on kehitelty menetelmä, jolla rasvan ja kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen kestää noin 2 minuuttia. Virhe-marginaali määrittämiselle oli alle 1

%. (Maher & Rochfort, 2014, 4). NMR-tekniikalla on useampi hyöty orgaanisten rasvojen analysoimisessa (Rahman & Choudhury, 2015, 59). Näitä ovat nopeuden lisäksi myös toistettavuus ja reagenssien tarpeettomuus.

2.2 Kuiva-aineen mitta

Kuiva-aineen mitta tapahtuu analyysivaa'alla. Aineen kosteuspitoisuus vähennetään kuumentamalla tietyssä lämpötilassa (102–112 astetta), jolloin jäljelle jäänyt kuiva-aine voidaan mitata massan erotuksena. Lämpökaapin mittavirhe on noin ± 2 °C. Kuivaus toimii joko manuaalisesti lämpökaapin ja ajastimen kanssa, tai sitten Smartin sisäänrakennetulla uunilla, joka lämmittää näytteen noin 3–4 minuutissa asetuksista riippuen. Kuivauksessa astiana toimiva lasikuitupaperi on taarattu ennen painon laskemista, joten sitä ei lasketa mukaan. Menetelmä, johon SMART ORACLEa verrataan, soveltaa useampaa eri ISO-standardia, riippuen mikä aine on, josta määritetään kuiva-ainetta tai rasvaa. (Valion Menetelmä 250).

2.3 Röse-Gottlieb-menetelmä

Valiolla on oma Röse-Göttlieb-menetelmänsä, jolla pystytään määrittämään materiaalin kokonaislipidimäärä. Tähän kuuluu kaikki rasvaliukoiset aineet, kuten tri-, di- ja monoglyseridit (-asyyliglyserolit), vapaat rasvahapot, sterolit (pääasiassa kolesteroli) sterolierit, fosfolipidit, karotenidit ja rasvaliukoiset vitamiinit. Rasvapitoisuus saadaan selville käsitelystä näytteestä. Näyte käsitellään aluksi punnitsemalla sen kokonaispaino ja sen jälkeen kuivaamalla sitä eksikaattorissa, kunnes sen paino ei enää muutu. Rasvapitoisuus ilmoitetaan painoprosentteina tuorepainosta (Valion Menetelmä 250).

Menetelmä perustuu seuraaviin ISO-standardeihin: ISO 5534; IDF 21B:1987; IDF15B1991; IDF 26A:1993; ISO 3728; ISO 3727-1; ISO 13580; ISO 8851-. Menetelmässä käytetään mojonnier-putkia, jossa liuottimina on sekä petrolieetteriä, että dietyylieetteriä. Mojonnier-putken avulla tehtäviä maidon rasvan määrytyksiä on erityyppisiä, missä muun muassa rasvan liuotukseen käytetään rikkihappoa ammoniakin sijasta. Eetterien tarkoitus on erottaa rasva muista aineista omaan faasiinsa, jonka voi dekantoida ja siten asettaa haihdutettavaksi vetokaappiin. Lopullinen paino mitataan ja verrataan alkuperäiseen näytteeseen. Työn valmistelu vie useamman tunnin. (Chandan, 2016, 602.)

Menetelmän korvaamisen syitä ovat myös siihen käytetyt aineet. Menetelmässä käytettäviä aineita ovat emäksinen ammoniakkiliuos, joka ärsyttää ihoa, joka tulee käsitellä vetokaapissa ja jonka kanssa tulee käyttää suojakäsineitä ja laseja. Ammoniakkiliuosta lisätään estämään kaseiinin saostumisen etanolilisäyksen jälkeen. Etanolia sen sijaan käytetään hajottamaan rasvapallojen membraani eli lipidikalvo. Liuottimet tulee haihduttaa, mikä on turvallisuushaitta. Käytössä on myös dietyylieetteri ja petrolieetteri, jotka ovat kumpikin I luokan palavia nesteitä. (KTT VWR, Dietyylieetteri 2019) (KTT VWR, Petrolieetteri 2019). Nämä liuokset ärsyttävät silmiä sekä limakalvoja ja kuivattavat ihoa. Näitä aineita käytetään rasvan uuttoon. Rasvan mittaamisen tulisi tulevaisuudessa hoitamaan ORACLE-laite, minkä toistettavuutta tulee verrata vanhaan menetelmään.

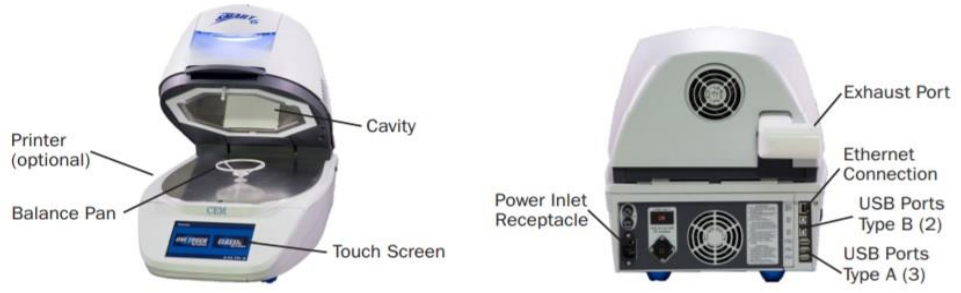
2.4 Smart Oracle 6

Uudessa menetelmässä kaksi laitetta keskustelelee keskenään. Toinen niistä on Smart kuiva-aine-analysointilaitteisto ja toinen on Oracle rasva-analysointilaitteisto. Smart-analysointilaitteisto on analyysivaaka, jonka sisällä voidaan säätää haluttava lämpötila sekä säteilyn määrä, jolla aine saadaan kuivattua. Laite voidaan myös ajoittaa eri vaiheisiin, jolloin lämpötila saadaan muutettua haluttaessa (Oracle Operation Manual, 2018, kuva 2). Aikaisempaa mallia laitteesta on verrattu vanhempiin rasvan ja kuiva-aineen määrittämiseen, joilla saatiin tuloksia, jotka olivat verrannollisia keskenään. SMART-laitetta verrattiin Babcock-menetelmään, mikä on saman tyyppinen Röse-Gottliebin kanssa (Cartwright, ym. 2005).

ORACLE NMR Magnet and Processor box



SMART 6 (Only for SMART 6 users)



Kuva 1: Laitteisto (ORACLE Operation Manual 2018)

Kun näyte on kuivattu, niin se taitellaan lasikuitupaperin ja muovin sisään, jonka jälkeen näyte voidaan asettaa NMR-spektrometriin. Lasikuitupaperi asetellaan SMARTin sisällä olevan tasapainovaa'an sisään ja mahdollisesti asetetaan myös toinen paperi sen päälle. Tällä estettiin rasvan palamista, sillä palanut rasvanäyte ei enää anna luotettavia tuloksia. Jos kahta paperia käytetään, saatetaan näyte präsätää mahdollisimman leveälle pinta-alalle. Näyte lämmitetään SMARTin sisälle, jonka jälkeen paperi asetetaan pienen muovinpalasen päälle ja pyöritetään rullaksi. Tämä rulla asetetaan muoviputkeen, joka puolestaan asetetaan ORACLEn päällä olevaan reikään NMR-viritystä varten. Laite antaa tämän jälkeen tuloksen rasvaprosentteina ja paperi tulee poistaa putkesta.

3 TYÖN TOTEUTUS

3.1 Menetelmävertailu

Jokaisen eri näytetyypin toistettavuus määritellään hankkimalla tilastollisesti hyväksyttävä määrä näytemittauksia. Jokaisesta näytteestä otetaan kaksi rinnakkaista tulosta, joiden keskiarvoista määritellään keskihajonta ja R-kerroin. Jos keskihajonta on alkuperäisen menetelmän keskiarvoon verrattuna molemminpuolinen, niin menetelmää ei tarvitse muuttaa. Menetelmiä vertaillaan keskenään kahdensuuntaisen studentin t-testin avulla. T-testissä verrataan kahden toisistaan riippumattoman otoksen keskiarvoja. Testillä selvitetään ovatko otokset toisistaan riippuvaisia, vai ei. Jos otokset ovat riippuvaisia toisistaan, antaa uusi menetelmä tilastollisesti virheellisiä tuloksia vanhaan verrattuna. (Heikkilä, 1998, 230.) T-testi suoritettiin kaksisuuntaisena, mikä tarkoittaa, että keskiarvot ovat joko samansuuruiset, tai eivät. Yksisuuntaisessa testissä sen sijaan kysyttäisiin, onko toinen keskiarvo suurempi kuin toinen (Holopainen 2008, 183.)

3.2 Näytteiden analysointi

Työssä suoritettiin näytteiden kuiva-aineen ja rasvojen pitoisuuden määrittäminen eri näytetyypeille, pääasiassa rahkoille, jugurteille, mousseille ja vanukoille. Muista näytetyypeistä ei saatu tarpeeksi materiaalia tilastolliseen vertailuun, mutta niitä ajettiin toimeksiantajan pyynnöstä ja suuntaa antavan vertailun vuoksi. Ennen näytteiden ajoa asennettiin laite laboratorion tiloihin ja kalibroitiin käyttöä varten. NMR-laitteelle suoritettiin shimmaus. NMR-laitteen sisällä oleva magneetti ei tuota itsestään tarpeeksi homogeenista magneettikenttää, jotta näytteiden analysointi olisi mahdollista. Magneettikentän korjaamisesta yhdensuuntaiseksi käytetään nimitystä shimming tai shimmaaminen. Tämä suoritetaan joko manuaalisesti asettamalla erityisiä kuparisia shimmaukseen tarkoitettuja käämejä, mutta Oraclen tapauksessa laitteen sisällä on valmiiksi asennettu automattinen shimmaus, jonka tulisi saada magneettikenttä homogenisoitua. (Lian ym., 2011, 12.) Koska magneettinen kenttä ylettyy

kaikkialle laitteen lähettyville, on turvallisuussyistä näytteenkäsittelyn aikana pidettävä matkapuhelimet ja muut sähkömagneettiset laitteet pois NMR-laitteen magneettitimen lähettyviltä (Oracle Operation Manual 2018).

Näytteiden ajossa käytettiin kahta lasikuitupaperia, joiden väliin asetettiin näyte joko kertakäyttöisellä lusikalla tai pipetillä, riippuen minkälainen aineen viskositeetti oli. Liukoisempaan näytteeseen käytettiin pipettiä, kun taas kiinteämpään aineeseen muovilusikkaa. Näytteet ajettiin sen mukaan, kun näytetyyppejä saatiin tuotannon puolelta haltuun. Näytteet ajettiin sen jälkeen, kun ne analysoitiin ensimmäiseksi Röse-Gottlieb-menetelmällä. Näytteet olivat tämän jälkeen säilötetty jääkaapissa seuraavaan päivään tai jätetty huoneenlämpöiseksi 2–3 tunnin ajaksi seisomaan, kunnes ne pystyttiin ajamaan Oracle SMARTilla. Ennen näytteenajoa taarattiin kuitenkin SMARTin vaaka, aluksi sen sisällä olevan kipon päälle asetettiin lasikuitupaperi, taarattiin ja sen jälkeen aseteltiin paperin päälle 100 g paino tarkistamaan heitteleekö vaaka. Noin 20 päivittäisen taarauksen jälkeen paino heitti tasaisesti noin 0,001 g alakanttiin oletetusta painosta. Tämän jälkeen valittiin haluttu ohjelma millä ajaa näyte. Ennen näytteen ajoa, aseteltiin kaksi lasikuitupaperia laitteen vaa'an päälle, taarausta varten. Tämän jälkeen otettiin toinen lasikuitupapereista pois, takaisin lasikuitupaperipinon päälle. On mahdollista käyttää vain yhtä lasikuitupaperia, mutta menetelmässä käytettiin kahta suojatakseen näytettä palamiselta, mikä vääristää rasvapitoisuuden tulosta. Vaa'alle jäävän lasikuitupaperin sen sijan aseteltiin näyte, joka pyrittiin pitämään $\pm 0,2$ g, 2,0 g alueella. Kun noin 2,0 g näytettä saatiin aseteltua paperin päälle, niin että vaa'an luku näytti olevan tasainen, otettiin näyte pois ja laitettiin se pienen metallisen prässin päälle. Toinen lasikuitupaperi laitettiin näytteen päälle. Papereilla on kaikilla sama paino. Paperi aseteltiin toisen päälle niin, että ne peittivät mahdollisimman paljon toisiaan. Näyte pyrittiin myös saamaan mahdollisimman paljon keskelle, ettei prässissä näyte pursuisi papereiden ulkopuolelle. Jos näin ei käy, nostetaan näytepaperi reunasta kiinni pitäen takaisin vaa'an päälle, suljetaan sen kansi ja käynnistetään ohjelma. Näytteen ajossa SMARTin uunissa menisi noin 2–3 minuuttia, riippuen kuinka voimakasta säteilyä käytettäisiin lämmittämään näyte ja minkä tyyppistä säteilyä. SMART antaa hälytysäänen, jolloin käyttäjä tietää avata luukun ja ottaa näytteen pois. Näyte aseteltiin muovipalan päälle ja sen kulmat taiteltiin sisäänpäin niin että kulmien päät koskettaisivat toisiaan

ja lopuksi näyte rullattiin kasaan ja painettiin muoviputkilon sisään muovisella painimella. Tässä vaiheessa saisi kulua vain 20 sekuntia, sillä näytteen ei haluttaisi jäähtyvän ennen NMR-vaihetta. ORACLE ja SMART kommunikoivat kumpikin keskenään ja ORACLE ilmoittaa milloin 20 sekuntia on kulunut ja näytteen voi asettaa sisään laitteeseen. Muoviputkilo asetetaan ORACLEn päällä olevaan reikään. Putkilossa on noin 5 cm pohjasta oleva merkki, mikä kertoo miltä alueelta laite virittää rasvan vetyprotoneja. Jos näyte ei ole taiteltu tarpeeksi tiiviisti alueen sisään, antaa laite alhaisempia tuloksia kuin on tarkoitus. Toisaalta, jos näyte on rullattu liian tiiviiksi, sekin saattoi vaikuttaa tuloksiin kuten ajaessa tuli nähtyä. Kun laitteelle on ilmoitettu, että näyte on aseteltu sisään, avautuu laitteen sisällä oleva suoja ja pudottaa putkilon alas viritettäväksi. Tässä kestää noin 20 sekuntia, jonka jälkeen laite antaa hälytysäänen ja tulostaa mahdollisesti tulokset. Tiedot jäävät myös laitteen sisäiseen tietokantaan. Laitteet ovat yhdistetty yhteiseen kiintolevyyn, jossa kaikki tiedot ja käyttöjärjestelmä on.

3.2.1 Vanukas

Vanukkaan pitoisuuden määrittäminen aloitettiin lämmittämällä näytettä 107 °C:ssa (380 K), noin 5 minuutin verran, kunnes näyte käärittiin mikropaperiin ja aseteltiin Oracleen rasvapitoisuuden määritettäväksi. Noin 7 näytteen jälkeen vanukkaan kuiva-ainepitoisuutta nostettiin 0,3 prosenttiyksiköllä. Seuraavista 20 näytteestä saatiin materiaali tilastollista vertailua varten. Vanukkaan käsittelyssä käytettiin kertakäyttöisiä lusikoita näytteen levitykseen. Vanukkaissa ei ollut makuja lukuun ottamatta eroja rasva-, tai kuiva-aineprosenteissa. Todellinen rasvaprosentti vanukkaille oli 1,5 % ja kuiva-aine 22,00 %.

3.2.2 Mousse

Moussea ajettiin noin 4–5 näytettä kunnes asetettiin kuiva-aineelle korjauskerroin 0,6 prosenttiyksikköä. Sen jälkeen ajettiin 17 näytettä. Näiden näytteiden jälkeen kokeiltiin nostaa lämpötilaa 112 °C (385 K) ja laskea MR-tasoa 80 % alkuperäisestä, tarkoituksena oli nähdä laskisiko se merkittävästi rasvan keskihajontaa. Mousse-

näytteitä ajettaessa käytettiin näytteiden asetteluun kertakäyttöisiä muovilusikoita. Eräässä näytetyypissä oli mukana suklaahippuja, joka vaikutti suuresti näytteen rinnakkaisten tulosten vaihteluun. Toistettavuuden parantamiseksi näytteitä soseutettiin hippujen mekaanisesti parantamiseksi.

3.2.3 Rahka

Rahkoja ajettiin 12 näytettä, kunnes päätettiin nostaa kuivakerrointa 0,7 prosenttiyksikköä. Tämän jälkeen ajettiin 16 näytettä, jonka jälkeen päätettiin kokeilla näytteiden ajamista jääkaappilämpöisinä (noin 0 °C). 7 näytteen ajon jälkeen ei löytynyt merkittävää muutosta rasva- ja kuiva-ainepitoisuudessa ja päätettiin ajaa loput näytteet huoneenlämpöisinä (21 °C). Tämän jälkeen ajettiin 23 näytettä, joista saatiin lopullinen materiaali. Rahkojen näytteiden asettelussa käytettiin kertakäyttöisiä pipettejä, joiden kärki leikattiin irti, tällöin rahkan pystyi levittämään tasaisemmin lasikuitupaperin päälle. Pääasiallisesti näytteet olivat maustettuja rahkoja, joissa on pastöroitua kermaa ja maitoa, sokeria, vettä, sekä aromeja. Mukana saattoi myös olla pieniä palasia mm. appelsiinia tai vaniljatankoa. Poikkeuksena oli kuitenkin kermarahkat, joita ajettiin samalla ohjelmalla, näiden rahkojen rasvaprosentti oli noin 2 prosenttiyksikköä isompi kuin maustettujen rahkojen tuloksia. Rahkojen seassa oli myös herkkurahkoja, missä maitorahkan seassa oli myös hilloa. Tämä vaikutti kyseisten näytteiden tuloksiin ja näytteet otettiin pois tilastoista.

3.2.4 Jugurtti

Jugurtteja ajettiin 19 kappaletta 102 asteen lämpötilassa. Tämän jälkeen annettiin jugurttiohjelmalle korjauskerroin kuiva-aineseen 0,6 % ja nostettiin lämpötilaa 107 asteeseen celsiusta. Jugurtit ajettiin myöhemmin kuin muut tuotteet tuotannollisista syistä. Jugurteissa oli mukana yleensä hilloa mikä vaikutti näytteiden lopputulokseen. Jugurtit analysoitiin pääasiallisesti sekoittamalla aluksi käytettävällä muovilusikalla, jonka jälkeen se levitettiin lasikuitupaperille. Joissain jugurttinäytteissä oli mukana mansikan siemeniä, jotka saattoivat vaikuttaa tuloksiin. Näytteiden rasvaprosentti oli 4,7 %.

3.2.5 Loput näytteet

Muuten laitteella ajettiin kokeellisesti juotavia jugurteja, maustettuja raejuustoja, sekä raejuustokastikkeita, joista ei kuitenkaan saatu tarpeeksi materiaalia analyysia varten. Raejuustokastikkeissa, sekä jugurteissa oli myös ongelmana näytteiden matala rasvaprosentti ja nestemäisyys, joka teki näytteiden ottamisesta hankalaa. Näytteet otettiin pääasiallisesti pipetillä suoraan näytepurkista, sekoittamisen jälkeen.

4 TULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY

Menetelmäkehityksen tavoitteena oli selvittää kaksi asiaa. Ensiksi tuli selvittää, antoiko laite samanlaisia tuloksia vai poikkesivatko rinnakkaiset näytteet merkitsevästi toisistaan. Sen jälkeen tuli selvittää, erosiko uusi menetelmä Smart Oracle-laitteella vanhasta Röse-Göttlieb-menetelmästä merkitsevästi. Tätä varten säädettiin laitteen ohjelmat maahantuojan ja valmistajan ohjeiden mukaan ja ajettiin näytteet. Näytteitä pyrittiin ajamaan noin 15 näytettä per näytetyyppi. Menetelmäkehityksen aikana kuitenkin ohjelmiin tehtiin muutoksia, kuten lämpötila ja magneettisäteilyn määrä. Tämän takia tuloksia on kertynyt enemmän, mutta vain osa niistä on käytettävissä tarkastelua varten. Tuloksista kirjattiin keskiarvo, keskihajonta ja lopuksi studentin t-testi. Smart ORACLE-laitteella ajettuja tuloksia verrattiin vanhaan menetelmään, jotka olivat Röse-Göttlieb-menetelmä sekä hiekkapunnitus menetelmä.

4.1 Keskiarvo

Smartilla ajettujen näytteiden kahdesta rinnakkaisesta tuloksesta saatiin kuiva-ainesten keskiarvo, jota verrattiin sitten vanhan manuaalisesti tehdyn kuiva-ainesten tulosten keskiarvoon. Keskiarvoista voidaan päätellä antavatko Smartin sisäinen vaaka samankaltaisia tuloksia vai poikkeavatko tulokset alkuperäisestä menetelmästä. Vanukkaan ja rahkan kuiva-ainesten tuloksia ei kirjattu, koska hiekasta ei saatu tarpeeksi tuloksia. Toimeksiantajalle oli tärkeämpää saada rasvatuloksia, joten kuiva-ainetuloksia ei otettu tarpeeksi tilastolliseen tarkasteluun. Taulukossa 1 ja 2 esitetään tarkasteluun otettujen näytteiden keskiarvo.

Taulukko 1. Näytteiden kuiva-aineiden keskiarvo.

<i>Kuiva-aine</i>	<i>Keskiarvo Smart</i>	<i>Keskiarvo hiekkä</i>	<i>Keskiarvojen ero- tus</i>
<i>Vanukas</i>	-	-	-
<i>Mousse</i>	30,65 g	30,75 g	-0,10 g
<i>Rahka</i>	-	-	-
<i>Jugurtti</i>	24,56 g	24,55 g	0,01 g

Taulukko 2. Näytteiden rasvojen keskiarvo.

<i>Rasva</i>	<i>Keskiarvo Smart</i>	<i>Keskiarvo hiekkä</i>	<i>Keskiarvojen ero- tus</i>
<i>Vanukas</i>	1,52 g	1,47 g	0,05 g
<i>Mousse</i>	5,76 g	5,61 g	0,15 g
<i>Rahka</i>	7,04 g	7,07 g	-0,03 g
<i>Jugurtti</i>	5,02 g	4,94 g	0,08 g

4.2 Keskihajonta

Keskihajonnan tarkoitus oli nähdä antaako Smart ORACLE toistettavia tuloksia, eli siis poikkeako näytetulokset niin paljon toisistaan, että menetelmä ei ole luotettava. Rahkan ja vanukkaan tuloksien puute johtuu tulosten puutteesta. Toimeksiantaja ei kokenut kuiva-aineen vertailua yhtä tärkeänä, joten hiekkamenetelmällä ei saatu tarpeeksi tuloksia vertailua varten.

Näytetyyppien keskihajonta oli riittävän tarkka Valion tarpeisiin nähden. Keskihajonta oli kuitenkin hieman yli keskiarvon kaikissa näytetyypeissä, paitsi jugurtin kuiva-aineen kanssa. Taulukossa 3 ja 4 esitetään tarkasteluun otettujen näytteiden keskihajonta.

Taulukko 3. Näytteiden kuiva-aineiden keskihajonta.

Kuiva-aine	Smart	Hiekka	Erotus
Vanukas	-	-	-
Mousse	0,90 g	0,80 g	0,1 g
Rahka	-	-	-
Jugurtti	0,59 g	0,63 g	-0,04 g

Taulukko 4. Näytteiden rasvojen keskihajonta.

Rasva	Smart	RG	Erotus
Vanukas	0,13 g	0,8 g	0,5 g
Mousse	0,72 g	0,67 g	0,05 g
Rahka	0,27 g	0,28 g	0,01 g
Jugurtti	0,10 g	0,09 g	0,01 g

4.3 Studentin t-testi (kaksisuuntainen)

T-testin tarkoituksena on verrata saatujen otosten keskiarvoja valmiisiin vertailuarvoihin. Nämä vertailuarvot ovat tietyllä tarkkuudella, joka määrittyy sen mukaan, miten monta näytetulosta (f) on populaatiossa. Vertailuarvo voidaan katsoa myös eri tarkkuuksilla. Näytteitä tutkittiin tarkkuudella 0,05, mikä merkitsee, että tilasto on 95 % todennäköisyydellä oikeassa. T-testissä annetaan hypoteesi, jonka tulokset joko todistavat toteen tai eivät. Tässä tapauksessa hypoteesi oli että, antaako uusi menetelmä samanlaisia tuloksia, niin kuin vanha menetelmä. Hypoteesin todistamiseksi täytyi yhtälön $t > T_{0,05}$ tapahtua toteen. Yhtälö toteutui vain jugurtissa. Täten tilastollisesti menetelmissä on vielä kehitettävää tarkempien tuloksien kannalta. Taulukossa 5 ja 6 esitetään tarkasteltavien näytteiden t-testi.

Taulukko 5. Studentin t-testi rasvalle.

	<i>t</i>	<i>f</i>	<i>T</i> _{0,05}
Vanukas	1,241	18	2,101
Mousse	0,497	16	2,120
Rahka	0,264	12	2,179

Taulukko 6. Studentin t-testi kuiva-aineelle.

	<i>t</i>	<i>f</i>	<i>T</i> _{0,05}
Vanukas	-	-	-
Mousse	0,335	15	2,131
Rahka	-	-	-
Jugurtti	0,037	15	2,131

4.4 Tuloksien tarkastelua

Se miksi tulokset poikkesivat kolmessa eri näytetyypissä *T*-arvosta, johtuu eri syistä. Vanukas oli näytetyypeistä kaikista juoksevin ja siten sillä oli isoin pinta-ala näytepaperilla. Koska näyteputken kosketuspinta oli rajallinen, niin laajan pinta-alan näyte saattoi päästä analysoitavan alueen ulkopuolelle. Jotkut moussenäytteistä sisälsi suklaata, mikä saattoi vaikuttaa tulosten väliseen vaihteluun. Jossain rahkanäytteissä oli sisällä myös hilloa, mikä saattoi vaikuttaa tuloksiin. Rahkojen näytemäärä oli myös kaikista vähäisin muihin verrattuna. T-testi on sitä tarkempi mitä enemmän näytteitä on. Rahkoista osa oli myös kermarahkoja, joiden rasvaprosentti oli korkeampi muihin rahkoihin verrattuna. Korkeampi rasvaprosentti antaa korkeampia tuloksia, koska SMART Oracle analysoi rasvanäytteen hiiliprotonit.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn tavoitteena oli kehittää menetelmät näytetyypeille, joita tulnaisiin käyttämään tai jotka antaisivat pohjan Smart ORACLE 6 käytölle Valion maitolaboratoriossa. Laitetta käyttäessä yhden analyysin kesto oli noin 5–10 minuuttia, mikä oli huomattavasti vähemmän kuin alkuperäisen menetelmän tuntien ero. Laitteen käyttö oli myös käyttäjäturvallista, ainoa mahdollinen turvallisuusriski on Smartissa olevan uunin väärinkäyttö. Laitteen sisään ei tule laittaa muuta kuin näyte ja lämpökestävät kuitupaperit, käyttäjän tulee tarkistaa, että mittauksen aikana käytetyt muovilusikat tai pipetit eivät jää vahingossa laitteen sisään ennen sen käynnistämistä.

Menetelmien toistettavuus testattiin laskemalla keskiarvo, keskihajonta ja studentin t-testi näytteille. T-testit kuitenkin näyttivät menetelmissä olevan vielä kehitettävää, sillä niissä esitetty hypoteesi ei toteutunut vanukkaan, moussen ja rahkan kohdalla, rasvanäytteissä. Joko menetelmiä tulee tarkastella uudestaan tai sitten näytetyyppejä tulee jakaa tarkempia menetelmiä varten. Laite antoi kuitenkin sisäisesti toistettavia tuloksia, josta voidaan päätellä, että laite itsessään antaa luotettavia tuloksia. Kuiva-aineiden t-testissä ei myöskään hypoteesi toteutunut. Menetelmien tarkkuutta voidaan kuitenkin edistää erilaisin keinoin.

Näytteet voidaan lämmittää ennen analyysia tarkkaan lämpötilaan Oraclen mukana tulleella laitteella. Näin ei kuitenkaan tehty, koska menetelmästä pyrittiin tekemään ajallisesti tehokas. Lasikuitupaperin asettelussa on myös erilaisia tekniikoita, jotka voivat vaikuttaa menetelmän tulokseen. Menetelmien käyttöä voi kehittää asettelemalla lasikuitupaperit toistensa päälle vinoittain, pikemminkin kuin suoraan kuten menetelmissä käytettiin. Tuloksien saannissa on otettava huomioon myös inhimillinen tekijä. SMART Oracle 6:n menetelmäkehityksen tulokset teki yksi henkilö, mutta vertailtavan menetelmän tulokset tulivat usealta eri henkilöltä, joiden tulokset vaihtelivat.

6 Lähteet

- Cartwright, G, McManus, B, Leffler, T & Moser, C., 2005, Journal of AOAC International Vol. 88, No. 1. Rapid Determination of Moisture/Solids and Fat in Dairy Products by Microwave and Nuclear Magnetic Resonance Analysis
- Chandan, C, R., Arun, K. & Nagendra P, S. 2016, Dairy Processing and Quality Assurance. 2. uud. p. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Günther, H. 2013. NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry [Verkkokirja]. 3. uud. p. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Heikkilä T. 1998. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita.
- Holopainen M., Pulkkinen P. 2008 Tilastolliset menetelmät. Helsinki: WSOY
- Käyttöturvallisuustiedote 2019 Dietyylieetteri 2019, VWR: Helsinki.
https://fi.vwr.com/assetsvc/asset/fi_FI/id/7668909/contents
- Käyttöturvallisuustiedote 2019 Petrolieetteri, VWR: Helsinki. https://fi.vwr.com/assetsvc/asset/fi_FI/id/7896446/contents
- Lian, L., Roberts, G. Lian. 2011. Protein NMR Spectroscopy : Practical Techniques and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2011 s.12-13
- Lu, Y; Hu, F; Miyakawa, T & Tanokura, M. 2016. Complex Mixture of Organic Compounds in Yogurt by NMR Spectroscopy. Metabolites, Vol 6 (2). [Verkkolehtiartikkeli]. Saatavana Ebsco Academic Search Elite -tietokannasta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Maher, A., Rochfort, S., Applications of NMR in Dairy Research Metabolites Mar; 4 (1). 2014. s 131–141. [Verkkolehtiartikkeli]. Saatavana Ebsco Academic Search Elite -tietokannasta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Oracle Operation Manual, 2018
- Rahman, A., & Choudhary M. I., 2015 Applications of NMR Spectroscopy: Volume 1. [Verkkokirja] Sharjah: Bentham eBooks. [Viitattu 06.05.2021] Saatavana ProQuest Ebook Central -palvelusta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Valion Menetelmä 250
- Vastamäki J. 2018. Smart-analysaattorin validointi maito- ja kaurapohjaisille tuotteille. Helsinki Metropolia AMK. Laboratorioanalytiikka. opinnäytetyö, Helsinki Metropolia AM

LIITTEET

Liite 1. Näytteiden rasvapitoisuus

Liite 2. Näytteiden kuiva-aine

Liite 1. Näytteiden rasvapitoisuus

Näyte	Vanukas		Mousse		Rahka		Jugurtti	
	SMART	Röse-Göttlieb	SMART	Röse-Göttlieb	SMART	Röse-Göttlieb	SMART	Röse-Göttlieb
1	1,48 g	1,42 g	7,84 g	7,68 g	6,87 g	6,92	4,86	4,74
2	1,56 g	1,51 g	5,84 g	5,86 g	6,63 g	6,69	5,01	4,9
3	1,69 g	1,54 g	5,76 g	5,46 g	7,05 g	7,05	4,98	4,95
4	1,07 g	1,29 g	4,73 g	4,61 g	7,30 g	7,32	4,88	4,8
5	1,56 g	1,52 g	5,60 g	5,42 g	7,41 g	7,46	4,81	4,76
6	1,52 g	1,46 g	7,14 g	6,89 g	6,89 g	6,87	5,11	5,01
7	1,68 g	1,64 g	5,70 g	5,41 g	7,11 g	7,15	5,10	5,01
8	1,38 g	1,29 g	4,98 g	4,92 g	6,95 g	6,96	5,03	4,98
9	1,52 g	1,49 g	5,68 g	5,52 g	7,67 g	7,73	5,04	4,93
10	1,56 g	1,53 g	5,85 g	5,8 g	7,04 g	7,08	5,03	4,97
11	1,58 g	1,45 g	5,48 g	5,33 g	6,95 g	6,97	5,05	4,93
12	1,58 g	1,45 g	5,56 g	5,42 g	7,01 g	6,92	5,07	4,97
13	1,41 g	1,42 g	5,50 g	5,27 g	6,78 g	6,83	4,91	4,97
14	1,56 g	1,47 g	7,56 g	7,26 g			5,11	5,03
15	1,50 g	1,52 g	5,51 g	5,44 g			5,06	4,96
16	1,59 g	1,52 g	5,51 g	5,49 g			5,12	5,01
17	1,54 g	1,49 g					5,20	5,05
18	1,57 g	1,51 g			5,07	4,96		
19	1,54 g	1,48 g						

Näytteiden rasvapitoisuus g per 100 g

Liite 2. Näytteiden kuiva-ainepitoisuus

Näyte	Vanukas		Mousse		Jugurtti	
	Hiekka	SMART	Hiekka	SMART	Hiekka	SMART
1	21,81	21,7	32,20	31,91	24,845	24,84
2	22,405	22,28	30,21	30,36	24,55	24,34
3	21,72	21,73	30,12	30,39	25	24,97
4	20,285	20,47	29,66	29,92	24,29	24,36
5	22,21	22,31	31,38	31,39	25,355	25,48
6	22,325	22,46	30,78	31,00	24,725	24,56
7	22,525	22,6	29,80	29,78	23,815	24,04
8	20,52	20,47	31,34	31,39	23,805	23,94
9	21,94	22,23	31,32	31,74	25,65	26,01
10	21,9	22,14	29,79	30,02	24,215	24,28
11	21,975	22,21	31,07	31,26	23,4	23,34
12	22,13	22,24	29,47	29,70	24,655	24,65
13	21,71	22,08	32,06	31,85	24,46	24,49
14	22,44	22,45	29,65	29,84	24,85	24,35
15	21,66	22,45	30,89	30,74	24,73	24,57
16	22,235	22,24				
17	21,82	22,07				
18	22,27	22,23				

Näytteiden kuiva-ainepitoisuus g per 100 g