



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioala

OPINNÄYTETYÖ

**NIR-KALIBROINTIOHJELMAN KÄYTTÖÖNOTTO JA SEN VERTAILU YKSITTÄISIIN
MÄÄRITYSTEKNIIKKoihin ERI SUKLAAMASSOILLE**

**Työn tekijä: Karina Moslova
Työn ohjaajat: Pekka Koivisto
Pirkko Pyysalo**

Työ hyväksytty: ____ . ____ . 2010

**Pirkko Pyysalo
lehtori**



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Fazer Makeiset Oy:n Vaaralan tehtaassa laboratoriolle. Haluan kiittää erityisesti elintarviketieteen maisteri Pekka Koivistoa hyvistä neuvoista ja kärsivällisestä ohjauksesta koko opinnäytetyöprojektin ajan. Lisäksi kiitän muuta laboratorion henkilökuntaa suuresta avusta ja opastuksesta päivittäisessä työskentelyssä. Kiitos kuuluu myös tehtaassa muulle henkilökunnalle hyvästä yhteistyöstä projektin aikana.

Kiitän perhettäni: miestäni ja lapsiani suuresta tuesta, jota sain opinnäytetyötä kirjoittaessani. Suuri kiitos lasteni isovanhemmille ja tädeille avusta lasten- ja kodinhoidossa. Kiitän myös kavereitani, jotka pitivät huolta jaksamisestani ja auttoivat vaikeiden hetkien yli.

Kiitos valvonta- ja ohjauksesta kuuluu myös opinnäytetyöni ohjaavalle opettajalle lehtori Pirkko Pyysälle.

Helsingissä 22.01.2010

Karina Moslova

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Karina Moslova	
Työn nimi: NIR-kalibrointiohjelman käyttöönotto ja sen vertailu yksittäisiin määritystekniikoihin eri suklaamassoille	
Päivämäärä: 22.01.2010	Sivumäärä: 41 s.
Koulutusohjelma: Laboratorioala	
Työn ohjaaja: lehtori Pirkko Pyysalo	
Työn ohjaaja: ETM Pekka Koivisto	
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Fazer Makeiset Oy:n toimeksiannosta Vaaralan tehtaalla. Työn tavoitteena oli InfraXact™ Lab -laitteen uuden kalibrointiohjelman käyttöönotto ja sen validointi.</p> <p>InfraXact™ Lab -analysaattorilla analysoidaan NIR-tekniikan avulla yhtäaikaista mm. suklaamassan vesi-, rasva-, laktoosi- ja sakkaroosipitoisuuksia. Saatua tuloksia verrattiin tässä työssä yksittäisiin käytössä oleviin määritystekniikoihin eri suklaamassoille.</p> <p>Lähi-IR-alue on 750 – 3000 nm. Näytteiden ainesosien määrittämiseksi NIR-spektroskopiaa vaatii vertailumenetelmien pohjalta kalibroinnin. Spektrin hajaantuneen transmittanssin, heijastuskyvyn ja hankaluuden takia kalibrointi suoritetaan käyttäen monimuuttujamatematiikkaa eli kemometriaa.</p> <p>Työssä tutkittiin eroavatko eri mittaustavat, kyveteillä ja petrimaljalla, ja viikon verran vanhojen ja tuoreiden näytteiden analyysitulokset merkittävästi toisistaan. Selvitettiin myös, miten näytteen esikäsittely eri lämpötiloissa vaikuttaa analyysitulokseen ja olisiko ohjelma sopivampi vain tietyille suklaamassoille, jolloin muita massoja varten tulisi tehdä toinen kalibrointiohjelma. Työssä tutkittiin myös systemaattisen virheen laatua ja tarkkuutta sekä laskettiin mittausepävarmuudet. Kaikkien suklaalaatujen kaikille ainesosille laskettiin luottamusvälit.</p> <p>InfraXact™ Lab -laitteen vanhan kalibrointiohjelman validointi onnistui hyvin. Tutkittuja mittausten menetelmiä tulisi edelleen kehittää, koska ne sisältävät sekä suhteellisia systemaattisia että vakiosystemaattisia virheitä. Kyvetti- ja petrimaljamenetelmät eroavat toisistaan huomattavasti. Lämpötila-analyysi osoitti, että lämpötilan alenemisella ei ole vaikutusta suklaamassan analyysitulokseen kummassakaan menetelmässä. Myöskään massan ikä ei vaikuta analyysitulokseen. Tehty työ osoitti, että tämän hetkinen ohjelma ennustaa huonommin, jos tutkittava ainesosa on sitoutunut johonkin toiseen raaka-aineeseen eikä ole vapaasti lisättynä suklaamassaan. Tätä välttämää voisi tarkistaa mittaamalla enemmän kyseisiä suklaalaatuja.</p>	
Avainsanat: suklaa, NIR-tekniikka, InfraXact™ Lab -analysaattori, osittaisvalidointi	



ABSTRACT

Name: Karina Moslova

Title: Implementation of NIR Calibration Program and Its Comparison to Individual Analytical Methods with Different Chocolate Masses

Date: 22 January 2010

Number of pages: 41

Department: Laboratory Sciences

Instructor: Pirkko Pyysalo, Senior Lecturer

Supervisor: Pekka Koivisto, M.Sc. (foodstuffs)

This study was carried out for Fazer Makeiset OY in their Vaarala factory. The purpose of this study was to introduce and validate a new calibration program included in the InfraXact Lab™ device.

Water, fat, lactose and sucrose concentration in chocolate mass was simultaneously analyzed by NIR technology using the InfraXact™ Lab analyzer. The results were compared to individual analytical methods currently used for analyzing different chocolate masses.

Near-IR range is 750 – 3000 nm. To determine the ingredients in the samples NIR spectroscopy requires a calibration based on different methods of comparison. The calibration is carried out using multivariate mathematics, or chemometrics, due to scattered transmittance, reflectance and difficulty of the spectrum.

The main objective of this study was to find out whether the analytical results differ greatly when using different methods such as Slurry cup and Petri dish, and when using week-old and fresh samples, as well. Another objective was to determine how pre-treating the samples at different temperatures affect the analytical results, and whether the program would be appropriate only for certain types of samples, thus requiring another calibration program for other types of sample. This study also deals with the quality in the systematic error, accuracy and uncertainty. Confidence intervals were also calculated for all chocolate ingredients.

The validation of the old calibration program included in the InfraXact™ Lab device succeeded very well. The methods of measurement cannot be implemented since they include both relative systematic errors as well as constant systematic errors. The Slurry cup and the Petri dish methods are considerably different. The temperature analysis showed that a decrease in the temperature does not affect the analytical result in the chocolate mass with either method. Also, the age of the mass does not affect the analysis result. The work showed that the current program is not very accurate, if the ingredient under examination is combined to another raw material and is not added to the chocolate mass as free raw material. This claim could be checked by measuring more of these kinds of chocolate.

Keywords: chocolate, NIR technology, InfraXact™ Lab analyzer, partial validation

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1	JOHDANTO	1
2	SUKLAA	2
2.1	Kaakaopuu	2
2.2	Hedelmästä kaakaopavuksi	2
2.3	Kaakaopapujen käsittely	3
2.4	Suklaan ainekset	5
2.5	Suklaan valmistus	9
3	LAADUNVALVONTA	10
3.1	Suklaan laatu	10
3.2	Sokerit	11
3.2.1	<i>Entsymaattinen määrittely</i>	12
3.2.2	<i>Analysoiminen</i>	14
3.3	Rasva	15
3.3.1	<i>Soxhlet-uutto</i>	15
3.3.2	<i>Analysoiminen</i>	15
3.4	Kosteus	16
3.4.1	<i>Karl Fischer -reaktio</i>	17
3.4.2	<i>Analysoiminen</i>	18
4	NIR-SPEKTROSKOPIA	19
4.1	InfraXact™ Lab -laite	22
4.2	ISIScan-kalibrointiohjelma	23
4.3	Analysointi	24
5	TULOKSET	27
5.1	Menetelmien vertailu	32
5.2	Lämpötila-analyysin tulokset	34
5.3	Toistokokeen tulokset	36
5.4	Konssien väliset vertailutulokset	37
6	PÄÄTELMÄT	38
	VIITELUETTELO	40

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tavoitteena oli InfraXact™ Lab -laitteen uuden kalibroitiohjelman käyttöönotto ja sen validointi. Käytössä olevan ajan puitteissa uusi ohjelma ei kuitenkaan ehtinyt saapua, joten työ tehtiin vanhalla kalibroitiohjelmalla. Työn tavoitteena oli osittaisvalidoida se eli määrittää ainakin tarkkuus, täsmällisyys ja mittausepävarmuus. Tarkoituksena oli tutkia, eroavatko eri mittaustavat, kyveteillä ja petrimaljalla, ja viikon verran vanhojen ja tuoreiden näytteiden analyysitulokset merkittävästi toisistaan. Pyrittiin myös selvittämään, miten näytteen esikäsittely eri lämpötiloissa vaikuttaa analyysitulokseen ja olisiko ohjelma sopivampi vain tietyille suklaamassoille, jolloin muita massoja varten tulisi tehdä toinen kalibroitiohjelma.

InfraXact™ Lab -laitteella analysoidaan yhtäaikaaisesti mm. suklaamassan vesi-, rasva-, laktoosi- ja sakkaroosipitoisuudet. Saatuja tuloksia verrattiin tässä työssä yksittäisiin käytössä oleviin määritystekniikoihin eri suklaamassoille. Vesipitoisuutta verrattiin Mettlerin Toledo DL 38 Karl Fischer Titrator -automaattititraattorilla (KF1) saatuihin arvoihin. Rasvapitoisuuksia verrattiin Foss Tecator Soxtec 2050 system -laitteella uutetuihin rasvapitoisuusarvoihin. Laktoosi- ja sakkaroosipitoisuuksia verrattiin entsyymaattisilla kittimenetelmillä saatuihin arvoihin.

Työ tehtiin Fazer Makeiset Oy:n toimeksiannosta Vaaralan tehtaalla. InfraXact Lab -laite oli hankittu keväällä 2007. Tämän hetkinen kalibroitiohjelma otettiin käyttöön huhtikuussa 2008. [1.] Työn on tarkoitus olla apuna jatkossa ohjelmaa edelleen kehitettäessä.

2 SUKLAA

2.1 Kaakaopuu

Kaakaopuu kasvaa parhaiten trooppisilla alueilla, joten sen tärkeimmät viljelyalueet sijaitsevat päiväntasaajan alueella kuten Länsi-Afrikassa. Sen optimaalinen kasvulämpötila on 18 ja 32 °C:n välillä. Sademäärän on oltava suuri, jotta suhteellinen ilman kosteus olisi 70 - 80 %. [3.]

Kaakaopuuta on kasvitieteellisesti kolme lajia: Griollo, Forasteroa ja Trinitario. Griollo on alkuperäinen viljelylajike. Se on vaaleanruskea väriltään, pähkinän tai hedelmäisen makuinen. Nykyään sitä on hyvin vaikea saada. Forasteroa on vallitsevin laji noin 95 %:a koko sadosta. Sillä on tyypillinen suklaamainen aromi. [3.] Sitä löytyy Länsi-Afrikan lisäksi Brasiliasta, Ecuadorista ja Meksikosta. Trinitario on Criollon ja Forasteron risteytys. Viljely alkoi Trinidadissa ja on nykyään levinnyt Venezuelaan, Ecuadoriin, Kameruniin, Samoaan, Sri Lankaan, Javalle ja Papua-Uusi-Guineaan. [4.]

2.2 Hedelmästä kaakaopavuksi

Kypsiä hedelmiä säilytetään muutama päivä, minkä jälkeen hedelmät halkaistaan ja sekä papujen ympärillä oleva sokeripitoinen hedelmäliha että pavut fermentoidaan. Fermentointi on biokemiallinen prosessi, jonka saavat aikaan hedelmälihassa olevat mikrobit ja entsyymit. Fermentointi kestää viidestä seitsemään päivään kaakaopuun lajista riippuen. Sen kaikki vaiheet vaikuttavat papujen laatuun ja aromin muodostumiseen, joten ne on tehtävä hyvin huolellisesti. [3.]

Fermentoinnin jälkeen kaakaopavut yleensä kuivataan matalassa astiassa tai tasoilla ulkona auringon alla. Kuivauksella estetään homeen muodostumista varastoinnin aikana. [3.] On olemassa myös erilaisia kuivaimia. Esimerkiksi *Samoan Dryer* on pienten plantaasien suosittu halpa peruskuivain. Se on tehty luonnon materiaaleista ja sen kuivausolosuhteet ovat 60-70 °C. *Platform Dryer* on vähemmän käytetty kuivain, jota voi käyttää myös muiden tuotteiden kuivaukseen. Muita mekaanisia kuivaimia ovat mm. Rotary Dryer, Büttner Dryer ja Lister Dryer. [5, s. 13 – 14.]

Kuivauksen aikana kaakaopavun kosteus putoaa 65 %:sta seitsemään %:iin. Kaakaopapu koostuu kuoresta, joka on noin 10 - 17 %, sirkkalehdistä ja

idusta. Sirkkalehdet, toisella nimellä nibsit, sisältävät 50 - 56 % rasvaa. [3.] Hiilihydraatteja niissä on 15 %: mm. tärkkelys, sokeri, pektiini, selluloosa, kasviliima ja pihka. Fermentoinnin aikana proteiinit hajoavat osittain hydrolysoituessaan peptideiksi ja aminohapoiksi ja muuntautuvat polyfenolien vaikutuksesta liukenemattomaan muotoon. Polyfenoliset komponentit koostuvat antosyaaneista ja leucoantosyaaneista (3 %), katekolista (3 %), ja moniosaisista muista polyfenoleista. Fermentoinnin ja kuivauksen aikana polyfenolit hapettuvat edistäen papujen oksidatiivista ruskistumista antaen suklaalle ominaista ruskeaa väriä. Kaakaossa pääalkaloidi on teobromiini (1,5 %), kofeiinia on hyvin vähän, vain 0,15 %. [5, s. 17.]

Papujen laatu tarkistetaan erittäin tarkasti tiettyjen laatuparametrien mukaan. Jos fermentointi ja kuivaus on tehty huonosti, on olemassa homeen tai muun vaurioitumisen riski. Papuihin voivat myös iskeä hyönteiset tai toukat, aiheuttaen paljon tuhoa. Laatutarkastuksen jälkeen pavut ovat valmiita vientiä varten maailman raaka-ainepörssien kautta tehtaille, joilla itse suklaan valmistus tapahtuu. Fermentoidut pavut säilytetään varastoissa, joiden lämpötilaa valvotaan ja ilmankosteus pidetään noin 15 %:issa, kunnes pavut puhdistetaan ja paahdetaan. [4.]

2.3 Kaakaopapujen käsittely

Pääraaka-aine suklaan valmistuksessa on kaakaopapu. Pavut esipuhdistetaan mahdollisten epäpuhtauksien poistamiseksi, minkä jälkeen niitä voidaan jatkojalostaa kolmella hieman erilaisella prosessilla: perinteisellä papujen paahdolla, nibsien paahdolla tai massan paahdolla. Kaikkien menetelmien tarkoituksena on tuottaa toivottuja aromeja, poistaa ei-toivottu aines, parantaa kaakaon laatua, saavuttaa mikrobiologinen turvallisuus, irrottaa kuoret ja parantaa hienontamista. Pää tarkoitus on tuottaa runsas ja hyvämakuisen kaakaon aromi. [3.]

Paahtoprosessi sisältää myös pastörintivaiheen mikrobimäärän alentamiseksi. Pastörinti tehdään joko itse paahtimessa tai erillisessä prosessissa, missä kaakaota käsitellään kuumassa (~100 °C:ssa) ja kosteassa ilmassa tarpeellisen ajan. [3.]

Papujen paahto on perinteinen ja helpoin tapa, jossa murskauslaitteella murskataan pavut niin, että kuori irtoaa nibsistä. Nykyisin murskausvaiheessa lämpötila on noin 80 °C ja laitteen pyörimisnopeus on säädettävissä. Täs-

sä lämpötilassa pavut käyttäytyvät elastisen murskauksen mukaisesti. Tu-loksena on suurempia jakeita, jotka on helpompi erottaa toisistaan. [3.] Pa-puja seulotaan erikokoisten verkkojen läpi, harjataan ja nostetaan ilmaan, jolloin ilmavirta imee pois irronneet kuoret. Magneettiset erottajat poistavat kuidut, kivet ja hiekan, vieraat metallit, papuklusterit ja epäkypsät pavut. [5, s. 28.] Puhdistuksen jälkeen pavut pastöroidaan, paahdetaan, rouhitaan ja seulotaan [3].

Näin erotellut kaakaonibsit jauhetaan, jolloin kaakaonibsin solurakenne tu-houtuu ja kaakaovoi vapautuu ja sulaa. Tällöin syntyy kaakaomassaa, joka on dispersio eli kiintoainetta sulassa rasvassa, jolla on viskoottinen vir-tausominaisuus. Solut ovat helppo murskata, mutta jauhaminen on vaikeaa kahdesta syystä:

- nibsien korkea vesipitoisuus (>2,5 %) aiheuttaa lämpimän, hyvin viskooot-tisen massan
- pieni osa kuorista ja iduista on puumaisia ja kovia, ja niiden pienentämi-nen vaatii suurimman osan jauhatusenergiasta. [3.]

Nibsien paahto -prosessi eroaa papujen paahto -prosessista siten, että pe-ruspuhdistuksen jälkeen käytetään lämpöshokkia, jotta kuori irtoaisi hel-pommin ytimestä. Siinä pavut lämmitetään lyhytaikaisesti joko infra-punasäteilijöillä tai kuumalla ilmalla. Lämmityksen aikana pavun sisällä oleva kosteus höyrystyy kuoren ja ytimen väliin, jolloin kuori pullistuu ja ydin irtoaa kuoresta. Shokkilämmitystä käytetään silloin, kun papu on muodoltaan litteä tai paksukuorinen tai sen kosteuspitoisuus on korkea. Lämmityksen jälkeen pavut murskataan ja nibsit erotellaan kuoresta seulomalla. Niitä pastöroi-daan ja paahdetaan kuten papuja. Pastöroinnin voi suorittaa myös ennen paahtoa. Paahdon yhteydessä on mahdollista myös parantaa nibsien laatua. Paahdon jälkeen nibsit jauhetaan ja saadaan kaakaomassaa. [3.]

Massan paahto -menetelmässä puhdistuksen jälkeen pavut pastöroidaan, shokkilämmitetään, rouhitaan ja seulotaan, jolloin saadaan kaakaonibsit. Massan pastörointi on vaikeaa verrattuna muihin paahtomenetelmiin, koska rasvafaasi suojelee mikrobeita. Mylly tarvitsee erityiset alipainelaitteet, joilla kosteus poistetaan jauhatuksen aikana. Raa'an massan paahto tehdään ohuena filminä tai kaapimilla varustetuissa lämmönvaihtimissa. Menetelmä tarjoaa käyttöön suuren pinta-alan, josta ei-toivotut aineet (esim. hapot) hel-

posti haihtuvat. Tämä lyhentää jatkokäsittelyssä tarvittavaa konssausaikaa. [3.]

Kaakaomassa voidaan varastoida sekoittimilla varustetuissa säiliöissä, joissa kiintoaineiden laskeutuminen tankin pohjalle estetään massaa sekoittamalla. Tankkien lämpötila pidetään yleensä 50 °C:ssa. Massa voidaan varastoida myös kiinteänä, 25 kg:n harkkoina. Sula massa esikiteytetään ja vetaaan muovilla vuorattuihin laatikoihin ja jäähdytetään kunnes massa on kiinteä. [3.]

2.4 Suklaan ainekset

Suklaan tavallisimmat raaka-aineet ovat kaakaomassa, kaakaovoi, sokeri, maito, vanilja, suola sekä lesitiini. Suklaalaatuja on hyvin paljon erilaisia, ja niissä raaka-aineiden suhteellinen osuus vaihtelee melko paljon. Suklaamassa voi sisältää erilaisia kaakaomassoja. Edellä mainittujen aineksien lisäksi suklaaseen voidaan lisätä vanilliinia, voiöljyä tai kasviperäistä rasvaa lainsäädännön puitteissa [1].

Suklaan valmistus vaatii huolellista ainesten sekoittamista. Sokeri poistaa kaakaomassan kitkeryyden. Kaakaovoi antaa täyteläisen pehmeän koostumuksen. Suklaaseen voidaan haluttaessa lisätä erilaisia rouheita, esim. pähkinöitä tai rusinoita. Jäähtyneet suklaatuotteet pakataan ja lähetetään sitten maailmalle nautittaviksi. Laadukkaassa tummassa suklaassa on vähintään 50 % kaakaota. Kaakaoprosentti saadaan kaakaomassan ja kaakaovoin osuudesta suklaassa. [4.]

Suomalaisten suosimaa maitosuklaata saadaan käyttämällä tuoretta maitoa tai maitojauhetta muiden raaka-aineiden lisäksi [7]. Valkoinen suklaa ei sisällä kaakaomassaa. Se valmistetaan kaakaovoista, sokerista ja maitojauheesta ja sitä maustetaan yleensä vaniljalla. [6.]

Kaakaovoi

Kaakaomassa sisältää noin 50 - 56 % kaakaovoita, josta osa poistetaan puristimella. Puristettu kakku sisältää tavallisesti 10 - 12 % kaakaovoita valmistettaessa jauhetta. Suklaan valmistuksessa käytetään kaakaota noin 22 - 24 %. Kaakaovoin määrä riippuu käyttötarkoituksesta. [3.]

Kaakaovoi suodatetaan puristimen jälkeen mahdollisten kiintoaineiden poistamiseksi. Tämän jälkeen kaakaovoi voidaan myydä puhtaana puristekaakaovoina. Kaakaovoi voidaan myös deodorisoida, jotta saataisiin neutraali maku. Kaakaovoin sulaminen ja kiteytyminen ovat tärkeitä ominaisuuksia suklaan valmistuksessa. Alkuperällä on huomattava vaikutus kaakaovoin ominaisuuksiin. Kaakaovoi koostuu triglyserideistä, mm. steariini-, palmitiini-, oleiini- ja linolirasvahapoista, ja se voi kiteytyä useassa muodossa eli se on polymorfinen. Se on keltainen väriltään, liuos on kiinteä 20 °C:ssa ja yli 35 °C:ssa sula. Kaakaovoi ja kaakaomassa toimitetaan käyttäjille useimmiten säiliökuljetuksena. [3.]

Suklaan valmistuksessa käytetään lainsäädännön puitteissa muitakin kaakaovoin kaltaisia kasvirasvoja kuten Illipe-voita, joka on eristetty Shorea-kasvilajin siemenistä. Shea-voi saadaan afrikkalaisesta puusta nimeltä *Butyrospermum parkii*, joka kasvaa Nigerian ja Senegalin alueilla. [7, s. 84, 86.] Nämä kasvirasvat ovat kaakaovoiekvivalentin eli CBE-rasvan raaka-aineita. CBE-rasva (Cocoa Butter Equivalent) koostuu pääasiassa samoista rasvahapoista kuin kaakaovoi, etupäässä steariini- palmitiini- ja oleiinihapoista. CBE-rasvaa voi käyttää korkeintaan 5 % suklaan kokonaismäärästä yhdessä kaakaovoin kanssa. [1.]

Sokeri

Kaakaomassa on melko kitkerää ja voimakkaan makuista, joten siihen lisätään sokeria, jolloin suklaasta tulee miellyttävämmän makuista [4]. Suklaamassan makeuttajana voi olla myös kondensoitu maito, makeasta maidosta pastöroitu jauhe tai muu vastaava makea jauhe.

Maitojauhe

Maitojauhetta käytetään vaaleissa suklaamassoissa. Se antaa vaalean värin ja miedomman maun. Maidon lisääminen suklaaseen keksittiin Sveitsissä. Monen vuoden kokeilun jälkeen Daniel Peter onnistui 1875 valmistamaan maitosuklaata käyttämällä kondensoitua maitoa. [4.] Nykyään suklaan valmistukseen on mahdollista käyttää erilaatuisia maitojauheita, maitoa, kondensoitua maitoa tai herajauhetta.

Vanilliini tai vanilja

Suklaan maustamiseen käytetään yleensä joko vanilliinisokeria tai vanilja-jauhetta. Niitä käytetään erittäin pieniä määriä. [4.]

Lesitiini

Lesitiini on emulgointiaine, jota lisätään suklaaseen alustusvaiheessa erittäin pieniä määriä kerrallaan. Emulgointiaineet tekevät rasvan ja veden sekoittamisesta helpompaa. Ilman lesitiiniä pienet vesimäärät, joita on kaikissa aineissa, tekisivät suklaamassasta sitkeää alustuksen aikana. [6.] Suklaan valmistuksessa käytetään kasviperäistä lesitiiniä, jota saadaan soijasta, maapähkinästä, puuvillansiemenistä, maissista tai rypsiästä. Soijalesitiini on suosituin suklaateollisuudessa, sillä sen viskositeettia vähentävä vaikutus on huomattavasti suurempi kuin muiden kasvilesitiinien. Sen muoto ei myöskään ole yhtä muuttuva kuin muiden, ja sen saatavuus on parempi. [5, s. 89.]

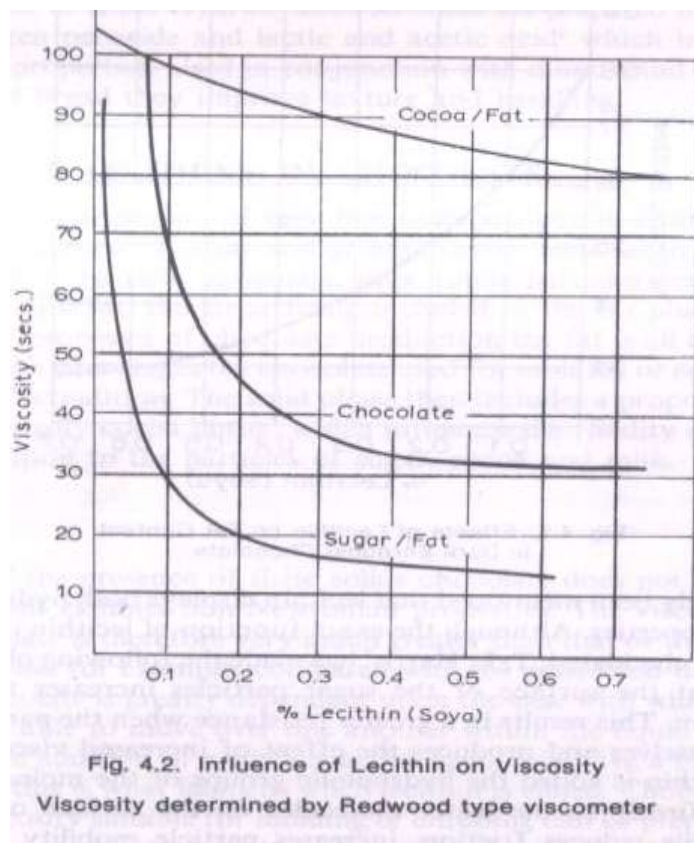
Lesitiinin lisäyksen fysikaaliset vaikutukset suklaamassaan

Suklaa koostuu hajonneista hienojakoisista kiinteistä partikkeleista rasvafaasissa. Tummassa suklaassa partikkelit ovat peräisin sokerista ja kaakaojauheesta. Maitosuklaassa on vielä maitorasvan lisäyksen takia kiinteät maitopartikkelit, jotka siirtyvät myöhemmin rasvafaasiin. Suklaan valmistuksen ensimmäisessä vaiheessa kaikki rasva on liuosmuodossa, mutta myöhemmissä valamisvaiheissa suklaata käytetään temperoituna. Silloin kiinteä faasi sisältää tasaisesti rasvahiukkasia, normaalia kaakaovoita, joka vaikuttaa suklaan valuvuuteen, sokerin, kaakaon ja maidon. [5, s. 94.]

Lesitiinin lisääminen suklaaseen vaikuttaa merkitsevästi suklaan viskositeettiin. Nestemäisen suklaan viskositeetti on huomattavasti suurempi kuin pelkästään suklaan sisältämien rasvojen viskositeetti itsestään. Suklaan valamisominaisuuteen vaikuttaa erittäin paljon, miten kiinteät partikkelit liukuvat toistensa lomitse nestefaasissa. Lesitiinin läsnäolo vähentää kaakaovoin käyttöä, joten se on myös kustannuskysymys, sillä kaakaovo on hyvin kallis raaka-aine suklaan valmistuksessa. [5, s. 94.]

Normaalisti suklaan vesipitoisuus on 0,5 - 1,5 %. Jos seokseen lisätään edes vähän ylimääräistä vettä, vesipitoisuus kuten myös viskositeetti kasvaa

huomattavasti. Lesitiini on sekä hydrofiilinen että lipofiilinen aine. Sen vaikutusta viskositeettiin ja kosteuteen on testattu lisäämällä sitä suklaaseen, sokeri-rasva- ja kaakao-rasva-seoksiin. [5, s. 94 – 96.] Sen vaikutus näkyy kuvassa 1.



Kuva 1. Lesitiinin vaikutus viskositeettiin eri seoksissa [5, s. 96]

Sokeripartikkeleiden pinnalla oleva kosteus nostaa niiden välistä kitkaa. Tämä aiheuttaa suuren vastuksen partikkeleiden liikkeessa toistensa ohitse ja antaa kohonneen vaikutuksen viskositeetista. Kun lesitiini on lisätty, molekyylien hydrofiiliset osat kiinnittyvät tiukasti yhteen sokeripartikkeleiden pinnalla oleviin vesimolekyyleihin. Tällä tavalla muodostuneet fraktiot helpottavat partikkeleiden liikkumista ja viskositeetti laskee. Tämän väittämän tueksi on tehty kokeita, joiden perusteella voidaan sanoa, että ainoastaan lesitiinin oikea lisäysmäärä vaikuttaa tehokkaasti viskositeetin pienentämiseen. [5, s. 96.]

Lesitiinin lisääminen aiheuttaa myös sen, että suklaan käsittelyssä on mahdollista käyttää korkeampia lämpötiloja viskositeetin pysyessä muuttumattomana. Temperoinnissa lesitiinin käytön on huomattu vaikuttavan alijäähtymiseen, joka tapahtuu matalimmassa lämpötiloissa. [5, s. 97.]

2.5 Suklaan valmistus

Suklaan valmistus tapahtuu siten, että sekoituskone täytetään suklaan raaka-aineilla: kaakaomassalla, sokerilla, maitojauheella (ainoastaan maitosuklaan valmistuksessa) ja kaakaovoilla. Raaka-aineet vaivataan yhteen sileäksi, joustavaksi massaksi. [4.] Kaikkia raaka-aineita lisätään pienissä osissa ja tietynlaisessa järjestyksessä, joka vaikuttaa valmistetun suklaan laatuun [1].

Suklaamassan tulee tuntua suussa sileältä eikä rakeiselta. Sen takia suklaamassa hienonnetaan sileiden terästelojen välissä, jotka pyörivät toisiaan vasten eri nopeuksilla. Tällä tavoin yksittäisten hiukkasten koko pienennetään noin yhdestä millimetristä noin 0,02 millimetriin. Valssauksesta suklaa kuljetetaan suurille konssauskoneille. Niissä massaa vaivataan kuudesta tunnista muutamaan päivään riippuen suklaalaadusta samalla kun siihen lisätään lämpöä (50 - 80 °C) ja ilmaa. Hienot aromit ja eri suklaatyypin väliiset makuerot saadaan aikaan valvomalla konssauksen lämpötilaa ja kestoja. Konssauksen jälkeen, ennen temperoinnin alkua, on suklaamassan oltava tasalaatuista ja sileää. Valmiiksi konssattua suklaamassaa säilytetään vielä monta päivää suurissa säiliöissä, joiden lämpötila on 40 - 50 °C. Jotta saadaan suklaalle luonteenomainen kiilto ja kiinteä koostumus, on se jäähdytettävä tiettyyn lämpötilaan ennen kuin se lopulta valetaan muotteihin. [4.]

Viimeinen tuotantovaihe on valaminen, joka voidaan tehdä kahdella tavalla: valamalla suklaa suoraan muotteihin tai peittämällä sisempi ydin tai valmis täyte suklaakerroksella. Esimerkiksi kuorutettavan tuotteen ydin asetetaan säleikölle ja kuljetetaan nestemäisen suklaamassan läpi, siten päälystyen se suklaalla. Ulkopuoli koristellaan myös usein tässä vaiheessa ennen konvehdin kuljetusta jäähdytystunneliin, jossa suklaan kiteytyminen alkaa. [4.]

Täytekonvehdit tehdään niin, että nestemäistä suklaata kaadetaan muotteihin. Ennen kuin suklaa kovettuu, muotit käännetään ylösalaisin, jotta keskiosan suklaamassa valuu reunoja pitkin ja muodostaa suklaakuoren. Muotit käännetään jälleen ympäri, täytetään täytteellä ja jäähdytetään. Tämän jälkeen muoteissa olevien konvehtien päälle kaadetaan lisää suklaata, josta muodostuu konvehdin pohja. [4.]

Kokonaisina valetut kompaktilevyt valetaan muovimuotteihin. Mahdollisesti tarvittavat pähkinät, rusinat tai muut mausteet lisätään suklaamassaan valu-

vaiheessa. Jäähdytyksen jälkeen suklaalevyt kuljetetaan suoraan pakkaus-koneille. [4.]

3 SUKLAAN LAADUNVALVONTA

Elintarvike- ja terveyssuojelulain ja -asetusten mukaan jokaisella elintarvikkeita valmistavalla yrityksellä tulee olla omavalvontasuunnitelma. Lisäksi useat valmistajat ovat sertifioineet laatu- ja ympäristöjärjestelmänsä standardien ISO 9001 ja ISO 14001 mukaan. [2.]

Teollisuudessa raaka-aineiden ja pakkausmateriaalien laatutoimintaan kuuluu niiden toimittajien valinta ja jatkuva arviointi. Näiden vastaanoton yhteydessä niitä tarkistetaan, hyväksytään tai mahdollisesti hylätään. Pakkaamattomia tuotteita ja niiden valmistusprosessia valvotaan tuotannossa. Suoriteetaan vaadittavia valvonta- ja varmistusmittauksia sekä dokumentoidaan tuloksia toiminnanohjaus-järjestelmään. [2.]

Raaka-aineille, pakkausmateriaaleille, puolivalmisteille sekä valmistetuille ja pakatuille tuotteille on tehty oma näytteenottosuunnitelma ja -ohje. Jokaisesta pakatusta tuotteesta säilytetään näyte vähintään sen parasta ennen -ajan vastanäytevarastossa. [2.]

Elintarviketeollisuudessa raaka-aineille, puolivalmisteille ja lopputuotteille tehdään aistinvaraisia, kemiallisia, fysikaalisia ja mikrobiologisia testejä tuoteturvallisuuden varmistamiseksi [8].

3.1 Suklaan laatu

Suklaan laatua on mahdollista tarkistaa myös analyttisin menetelmiin. Energiaa saadaan ruoan sisältämistä energiapitoisista ravintoaineista, joita ovat hiilihydraatit, proteiini, rasva ja alkoholi [9]. Suklaan sisältämät rasvat ovat pääasiassa kasvirasvoja, lukuun ottamatta maitorasvaa. Rasvat tuottavat kaloreita kaksin verroin enemmän kuin hiilihydraatit ja proteiini. Alkoholin energiapitoisuus sijoittuu sen sijaan näiden väliin. [9.] Taulukossa 1 on esitetty erilaisten suklaiden ravintosisältö.

Taulukko 1. Erilaisten suklaiden ja makeisten ravintosisällöt [5, s. 634]

Product	g per 100 g			per 100 g
	Protein	Fat	Available carbohydrate	Calories
1. Dark chocolate	5.6	35.2	52.5	544
2. Milk chocolate	8.7	37.6	54.5	588
3. Chocolate assortment	4.1	18.8	73.3	467
4. Milk chocolate covered bar	5.3	18.9	66.5	447
5. Clear boiled sweets	–	–	87.3	327
6. Cocoa powder	20.4	25.6	35.0	452
7. Toffee	0.2	6.2	90.8	399
8. Malt food drink	11.4	7.5	67.6	370
9. Chocolate creme bar	2.5	15.5	75.1	438
10. Aerated candy, milk chocolate covered	5.3	22.9	71.6	501
11. Milk chocolate bar with biscuits and raisins	7.1	28.1	58.3	508
12. Cocoa	20.4	21.8	34.9	417

Suklaan sisältämä kosteus vaikuttaa massan viskositeettiin sekä jäähdytysominaisuuteen. Liiallinen kosteus haittaa myös tuotantoprosessia. Eri tuotteiden valmistuksessa käytetään eri ohjelmia ja niille ominaisia prosessinopeuksia, jotta tuotteet ehtisivät jäähtyä tasaisesti ennen pakkaamista. Liian kostea suklaa saattaa pilata koko tuotteen ja samalla liata tuotantolinjaa aiheuttaen ylimääräisiä kustannuksia. [1.]

Jokaiselle suklaaladulle on omat sertifikaatio-, ohje- ja ajoarvonsa, joiden toteutumista seurataan jatkuvasti [1].

3.2 Sokerit

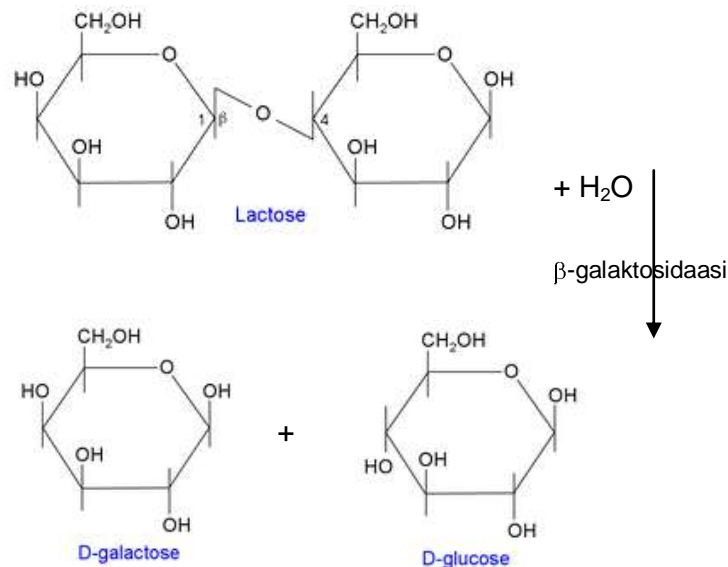
Sokeri eli sakkaroosi on disakkaridi, joka koostuu fruktoosista ja glukoosista. Nämä muodostuvat kahdesta monosakkaridimolekyylistä näiden liittyessä toisiinsa kondensaatioreaktiossa 1,4- α -glykosididisidoksella. Glykosididisidos muistuttaa alkoholiryhmien välille muodostuvaa eetterisidosta. [10.]

Laktoosi eli maitosokeri on myös tärkeä disakkaridi, joka on maidossa ja maitotuotteissa esiintyvä sokeri. Se muodostuu glukoosista ja galaktoosista. Disakkaridit voivat hydrolysoitua monosakkarideiksi laimean hapon vaikutuksesta tai entsyymien toiminnan seurauksena. [10.]

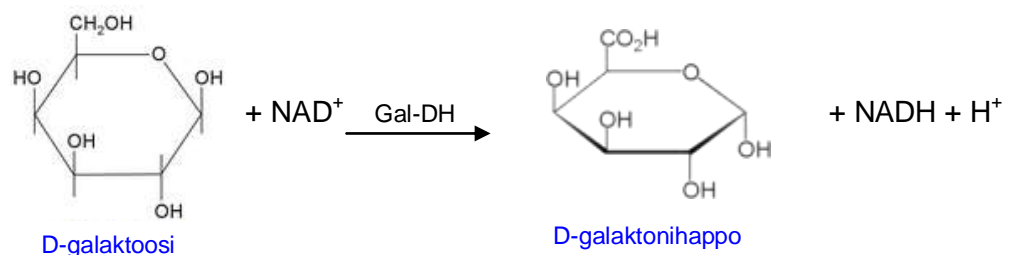
3.2.1 Entsymaattinen määrittäminen

Tässä työssä sakkaroosi ja laktoosi analysoitiin entsyymattisin menetelmiin. Menetelmät perustuvat sokerien spesifisiin entsyymireaktioihin ja indikaattorin absorptio- spektrofotometriseen mittaamiseen. Analyysiin käytettiin Boehringer Mannheim/R-Biopharm:n ”Sucrose/D-Glucose” [11] ja ”Lactose/D-Galactose” [12] -kittiohjeita. Mittaukset suoritettiin aallonpituudella 340 nm PerkinElmerin Lambda 25 UV/VIS-spektrofotometrillä, jonka toimintakunto tarkistettiin sertifioitujen referenssimateriaalien avulla.

Määrittäessä suklaamassan laktoosipitoisuutta laktoosi hajotetaan D-galaktoosiksi ja D-glukoosiksi β -galaktosidaasi-entsyymillä pH:n ollessa 6,6 sekä veden läsnä ollessa. Reaktioyhtälö on esitetty seuraavassa reaktioyhtälössä. [12.]

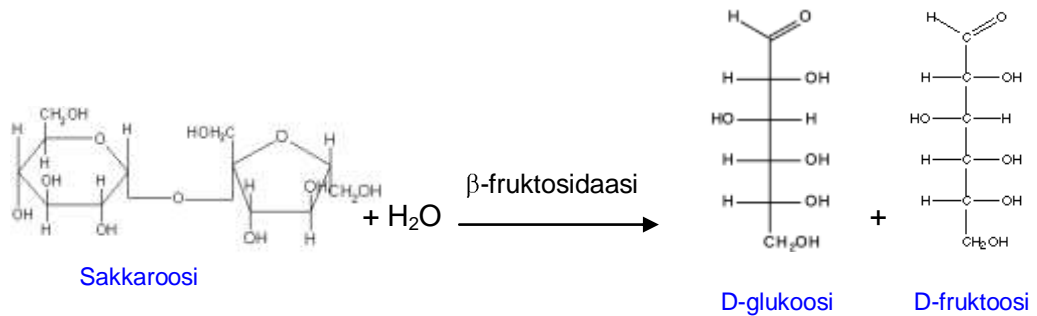


D-galaktoosi hapettuu pH:ssa 8,6 nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin (NAD^+) vaikutuksesta D-galaktonihapoksi β -galaktoosi-dihydrogenaasin (Gal-DH) läsnä ollessa. [12.]

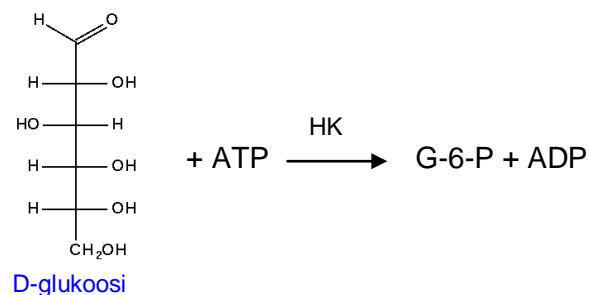


Tässä reaktiossa muodostuneen nikotiiniamidiadeniinidinukleotidimolekyylin (NADH) määrä on stoikiometrinen muodostuneelle laktoosin ja D-galaktoosin määrälle. NADH-molekyylin määrän kasvu mahdollistaa niiden spektrofotometrisiä mittauksia aallonpituuksilla 334, 340 tai 365 nm. [12.]

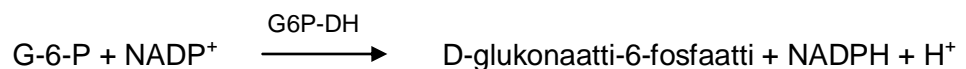
Määritettäessä suklaamassan sakkaroosipitoisuutta sakkaroosi hydrolysoidaan β -fruktosidaasientsyymillä pH 4,6:ssa D-glukoosiksi ja D-fruktoosiksi [11]. Reaktioyhtälö on esitetty seuraavassa reaktioyhtälössä.



Heksoginaasientsyymi (HK) katalysoi pH 7,6:ssa D-glukoosin fosforylaation adensiino-5'-trifosfaatin (ATP) avulla muodostaen samanaikaisesti adensiino-5'-difosfaatin (ADP) [11].



Glukoosi-6-fosfaatti-dehydrogenaasientsyymillä (G6P-DH) läsnä ollessa muodostunut D-glukoosi-6-fosfaatti (G-6-P) hapetetaan nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatilla (NADP) D-glukonaatti-6-fosfaatiksi ja pelkistetyksi nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatiksi (NADPH) [11].



Tässä reaktiossa muodostuneen NADPH:n määrä on stoikiometrinen muodostuneelle D-glukoosin määrälle, ja se on mitattavissa spektrofotometrisesti aallonpituuksilla 334, 340 tai 365 nm [11].

3.2.2 Analysoiminen

Käytetyssä kittiohjeessa on hyvin tarkat ohjeet tutkittavan näytteen käsittelystä ja reagenssien pipetointimääristä. Laboratoriossa kyseisiä mittauksia on tehty jo hyvin pitkään, joten siellä on käytössä oma jonkin verran muunneltu työhje. Työtä tehtäessä otettiin huomioon molemmat, sekä kitti- että laboratorion omat ohjeet. Jotta reagenssien kulutus olisi minimaalinen, samasta esikäsitelystä näytteestä määritettiin yhtä aika sekä sakkaroosi- että laktoosipitoisuudet ja mittaukset suoritettiin lomittain. Näytteitä mitattiin 4 - 6 kpl päivässä ja jokaisesta tehtiin kolmet rinnakkaiset, kyvetteihin ei mittapulloihin. Työn aikana käsiteltiin yhteensä 93 näytettä.

Kitissä olevat reagenssit käsiteltiin kittiohjeiden mukaan. Tarvittaviin pulloihin lisättiin oikea määrä ionivaihdetta vettä käyttäen apuna täyspipettejä. Mittauksiin käytettiin kertakäyttöisiä muovikyvettejä. Niihin pipetoitiin ohjeiden mukaiset reagenssi- ja näytemäärät.

Kittiohjeessa laktoosi- ja sakkaroosipitoisuuksien laskemiseksi on kehitetty yhtälöt. Laktoosipitoisuutta laskettiin kaavojen 1 ja 2 mukaan.

$$c = \frac{V * MW}{\epsilon * d * v * 1000} * \Delta A \text{ g/l}; \text{ jossa} \quad (1)$$

V = lopullinen tilavuus (ml)

v = näytteen tilavuus (ml)

MW = analysoitavan aineen molekyylipaino (g/mol)

d = valon matka (cm)

ϵ = absorptiokerroin NADH:lle 340 nm:ssä, joka on $6,3 \text{ (l} * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1})$

$$\Delta A_{\text{laktoosi}} = (A_2 - A_1)_{\text{näyte}} - (A_2 - A_1)_{\text{blankki}}$$

$$c = \frac{3,300 * 342,3}{6,3 * 1,00 * 0,100 * 1000} * \Delta A = \frac{11,30}{6,3} * \Delta A \text{ g laktoosia / l näyteliuos ta}$$

$$\text{Total laktoosipitoisuus} = \frac{C_{\text{laktoosi}} \text{ g / l näyteliuos ta}}{\text{punnittu näyte g / l näyteliuos ta}} * 100 \text{ g / 100 g} \quad (2)$$

Sakkaroosipitoisuus laskettiin samoilla kaavoilla. Erona on vain lopullinen tilavuus (V), joka on sakkaroosin tapauksessa pienempi eli 3,020 ml. Laskuis- sa otettiin huomioon tehty laimennus, joka oli 2,5-kertainen.

3.3 Rasva

Kuten jo aikaisemmin mainittiin suklaata valmistettaessa, siihen voidaan lisätä kaakaovoita, maitorasvaa tai muuta kasviperäistä rasvaa. Lisätty rasva parantaa suklaan fysikaalisia ominaisuuksia sekä makua.

3.3.1 Soxhlet-uutto

Rasvan määrittämisessä elintarvikkeista yleisin menetelmä on Soxhlet-uutto. Liotinuutossa seokset erotetaan niiden liukoisuuserojen avulla. Aina ei rasvaa saada uutettua näytteestä suoraan, vaan tarvitaan erilaisia esikäsittelyjä tai muita menetelmiä. Perusajatus on, että kuivattu, homogenoitu näyte uutetaan jatkuvatoimisessa Soxhlet-uuttolaitteessa. Lipidit uuttuvat ja kulkeutuvat liuottimen mukana kolviin. Liuotin haihdutetaan pois ja kolvin pohjalle jäänyt raakarasva kuivataan ja punnitaan. Näin saadun raakarasvan määrittäminen perustuu liuottimeen uuttuneen aineksen punnitsemiseen. [13.]

3.3.2 Analysoiminen

Tässä työssä kokonaisrasvapitoisuutta suklaamassasta analysoitiin Foss Tecator Soxtec 2050 system -laitteen avulla (kuva 2). Näytteestä erotettiin rasva keittämällä sitä 10 %:ssa suolahapossa ja uuttamalla sen jälkeen petrolieetterillä. Samalle näytteelle tehtiin kolme rinnakkaista punnitusta, jotta yhdessä päivässä käsiteltiin vain neljä näytettä.



Kuva 2. Foss Tecator Soxtec 2050 system –uuttolaite [14]

Sulaa suklaamassaa punnittiin SoxCap-lasikapseliin 1 - 3 g, jossa on kertakäyttöinen SoxCap-polyesterisuodatin. Kapseli erottaa hydrolyysin yhteydessä näytteessä olevan rasvan ja vapauttaa sen 10 %:seen HCl-liuottimeen uuttamisen yhteydessä. Tyhjiöpumppu poistaa samassa yhteydessä muodostuvat happohöyryt automaattisesti [15]. Kuvassa 3 on esitetty SoxCap system -keittoastia.



Kuva 3. 2047 SoxCap system -keittoastia [16]

Pesu suoritettiin kylmällä vesijohtovedellä kuusi kertaa. Pesun jälkeen kapselit nostettiin käsipyyhkeen päälle, jotta ylimääräinen vesi poistuisi. Pieni pumpuli työnnettiin kapseliin suodattimen molemmin puolin. Tämän jälkeen ne nostettiin kiertoilmauniin 50 °C:seen kuivumaan yön yli.

Uutto suoritettiin Soxtec™ 2050 automaattisella uuttojärjestelmällä [17]. Yön yli kuivuneisiin näytekapseliin asetettiin selluloosauuttosukka (28 x 22 mm) ja metalliadapteri, minkä jälkeen ne kiinnitettiin uuttoyksikköön magneettikiinnityksen avulla. Näytteistä uutettiin rasvaa petrolieetterillä seuraavanlaisella ohjelmalla: 3 h uutto, 1 h huuhtelu, 8 min takaisinkeräysaika ja 1 min kuivaus. Uuttokuppeihin erottuneen rasvan määrä punnittiin ja rasvapitoisuus laskettiin kaavan 3 mukaan.

$$\text{rasva-\%} = \frac{w_2 - w_1}{w_0} \cdot 100 \%, \text{ missä} \quad (3)$$

w_2 = uuttokuppi + uutettu rasva (g)

w_1 = uuttokuppi (g)

w_0 = näytemäärä (g)

3.4 Kosteus

Suklaassa oleva vesipitoisuus on yleensä 0,5 - 1,5 %. Ylimääräinen vesi nostaa huomattavasti suklaan viskositeettia. [5, s. 94.] Viskositeetin kuuluu olla oikea, jotta prosessituotanto olisi mahdollista. Raaka-aineiden ja valmiin suklaamassan vesipitoisuudet tulee valvoa säännöllisesti hyvän tuotteen aikaansaamiseksi.

Elintarvikkeesta kosteutta voidaan määrittää gravimetrisesti tai pakkaskuivauksella, jossa näyte ensin pakastetaan ja sitten vesi haihdutetaan pois alipaineessa. Veden esiintymismuoto ja määrä elintarvikkeessa määräävät käytettävän menetelmän. Se voi esiintyä vapaana vetenä, johon muita aine-

ta on liuenneena tai dispergoituneena, hydraatteina, geeleihin sitoutuneena ja adsorboituneena. [18.] Tässä työssä suklaamassan vesipitoisuutta määritettiin Karl Fischerin menetelmällä.

3.4.1 Karl Fischer -reaktio

Karl Fischer -titraus on laajalti käytetty analyysimenetelmä, jolla voidaan kvantitatiivisesti määrittää vesipitoisuutta eri tuotteista. Tämän titrauksen perusajatus perustuu jodin ja rikkidioksidin väliseen reaktioon nestemäisessä väliaineessa. Karl Fischer havaitsi, että tämän reaktion voisi muuttaa ja käyttää ei-vesipitoisen järjestelmän veden määrittämiseksi, joka sisältää rikkidioksidia ylimäärin. Hän käytti ensisijaisesti liuottimena metanolia ja puskurina pyridiiniemästä. [19.]

Metanoli ei ainoastaan käyttäydy kuten liuotin vaan myös osallistuu suoraan itse reaktioon. Se reagoi rikkidioksidin (SO_2) ja emäksen kanssa muodostaakseen välituotteen, alkyylisulfiittisuolan, joka tämän jälkeen hapetetaan jodilla alkyylisulfaattisuolaksi. Tämä hapetusreaktio kuluttaa vettä. Reagoiva alkoholi on tyypillisesti metanoli tai 2-2-etoksietoksietanoli, joka tunnetaan myös nimellä dietyleeniglykoolimonoetyylieetteri (DEGEE) tai jokin muu sopiva alkoholi. Nykypäivänä käytössä olevat Karl Fischer -reagenssit eivät sisällä pyridiiniä, vaan ne sisältävät sen sijaan imidatsolia tai primääriamiinia. [19.]

Alkoholiliuoksessa reaktio jodin ja veden välillä tapahtuu stoikiometrisessä suhteessa 1:1. Kun kaikki läsnä oleva vesi kuluu, jodin ylimäärä havaitaan voltametrisesti titraattorin indikaattorielektrodilla. Nämä pisteet ovat titrauksen päätepisteet. Vesipitoisuuden määrä näytteessä lasketaan Karl Fischer -titrausreagenssissa olevan jodin konsentraation ja kulutuksen mukaan. [19.]

Optimaalinen pH-alue Karl Fischerin -reaktiolle on 5 - 8 ja voimakkaasti happamia tai emäksisiä näytteitä pitää puskuroida, jotta saadaan pH tälle alueelle. Jos pH on alle 5, titrausnopeus on hyvin hidasta. Toisaalta, kun pH on yli 8, titrausnopeus on kova, mutta ainoastaan kun sivureaktion tuotteena muodostuu vettä esteröinnin seurauksena, tuloksena on päätepisteen katoaminen. [19.]

3.4.2 Analysoiminen

Tässä työssä suklaamassojen vesipitoisuudet määritettiin Mettlerin Toledo DL 38 Karl Fischer Titrator -automaattititraattorilla (kuva 4). Laitteen toimintakunto tarkistettiin sertifioidujen referenssimateriaalien avulla.



Kuva 4. Mettler Toledo DL 38 Karl Fischer Titrator [21]

Tällä laitteella tapahtuu kahden komponentin tilavuustitraus. Titrantti sisältää vain jodia ja metanolia, kun taas Solventti sisältää muita Karl Fischer -reagointikomponentteja (rikkidioksidi, imidatsoli ja metanoli), joita käytetään väliaineena titrausastiassa. Kaksikomponenttisillä reagensseilla on paremmat pitkäaikaiset vakaus- ja nopeammat titrausajat kuin yksikomponenttisillä reagensseilla, mutta ne ovat yleensä kalliimpia ja niillä on matalampi liuotinkapasiteetti. [20, s. 6.]

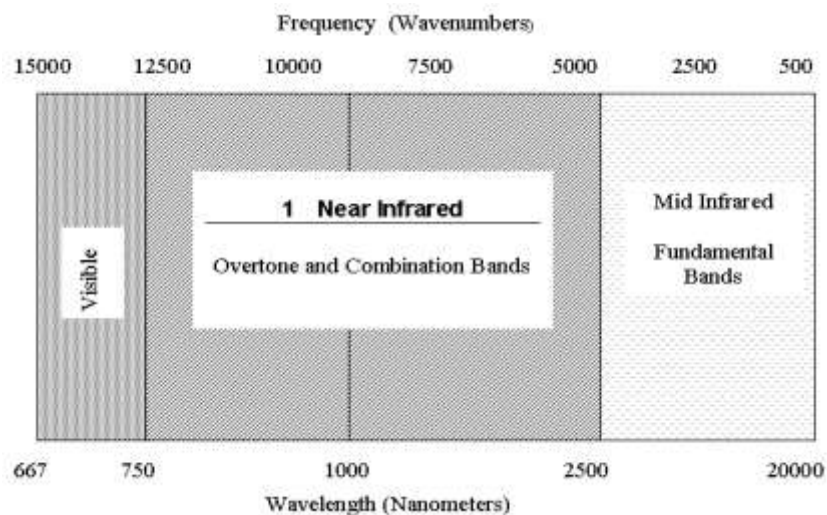
Tässä työssä liuoksina olivat Riedel-de Haënin Hydranal – Solvent ja Hydranal – Titrant 5. Koska titrausastiaan laitettavan suklaan massa täytyy olla tiedossa, apuna käytettiin Mettlerin AT100 FZ 5096 -analyysivaakaa, jonka tarkkuus on $\pm 0,0001$ g.

Sula suklaa punnittiin ruiskussa 0,8 – 1,8 g. Liuotinta vaihdettiin kolmen mittauksen jälkeen. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista mittausta.

4 NIR-SPEKTROSKOPIA

Infrapunaspektrometriaa eli IR-spektrometriaa käytetään aineiden tunnistamiseen ja molekyylien rakenteiden selvittämiseen. IR-säteily on lämpösäteilyä, joka absorboituessaan aineeseen saa sen molekyylit värähdys- ja pyörähdysliikkeeseen. [24, s. 90.] IR-alue jaetaan kolmeen taajuusalueeseen (kuva 5) [22, s. 288, 289, 292]:

- Near-IR: 12500–4000 cm^{-1} (750–3000 nm) (lähi-infrapuna)
- Mid-IR: 4000–1300 cm^{-1} (3000–20000 nm) (keski-infrapuna)
- Far-IR: 667–10 cm^{-1} (667–750 nm) (kaukoinfrapuna)

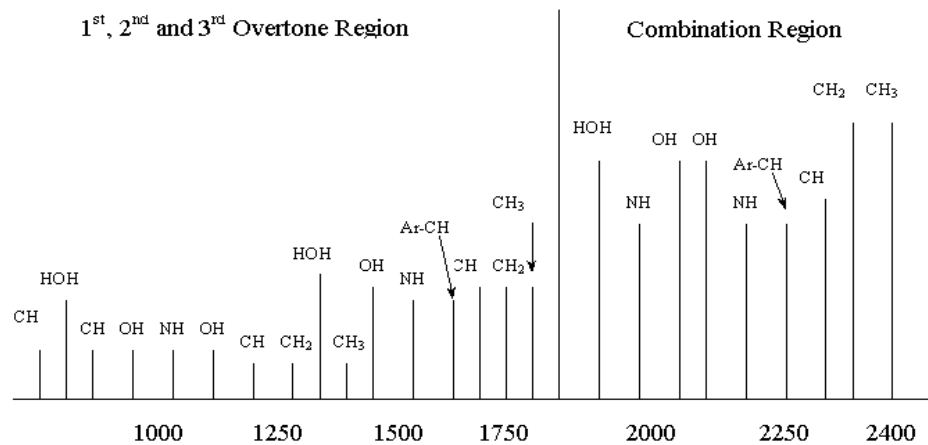


Kuva 5. IR-säteilyn absorptioalueen jako [25]

NIR-spektroskopiaa käytetään rutiinomaisesti koostumuksellisissa, toiminnallisissa ja aistinvaraisissa analyyseissä elintarvikeainenosien määrittelyksi prosessin väli- ja lopputuotteista [23].

Elintarvikkeiden NIR-spektrit ovat laajat leveät vyöhykkeet, jotka syntyvät päällekkäisistä kemiallisten sidosten absorptioista, kuten CH, OH ja NH. Nämä koostuvat pääasiassa perusvärähdyksistä, joissa jokaisesta on olemassa vastaava sarja yli- ja kombinaatiovärähdyksiä. Kuvassa 6 on esitetty kemiallisten sidosten perusvärähdysalueet, jotka on jaettu yli- ja kombinaatiovärähdyksiin. Näissä jokainen peräkkäinen ylivärähdysalue on noin kerta- luokkaa vähemmän intensiivistä kuin edellinen. Tämä tarjoaa sisäänraken-

netut laimennussarjat, jotka mahdollistavat useita vaihtoehtoja erilaisia absorptiointensiteettejä, jotka sisältävät samat kemialliset tiedot. [23.]

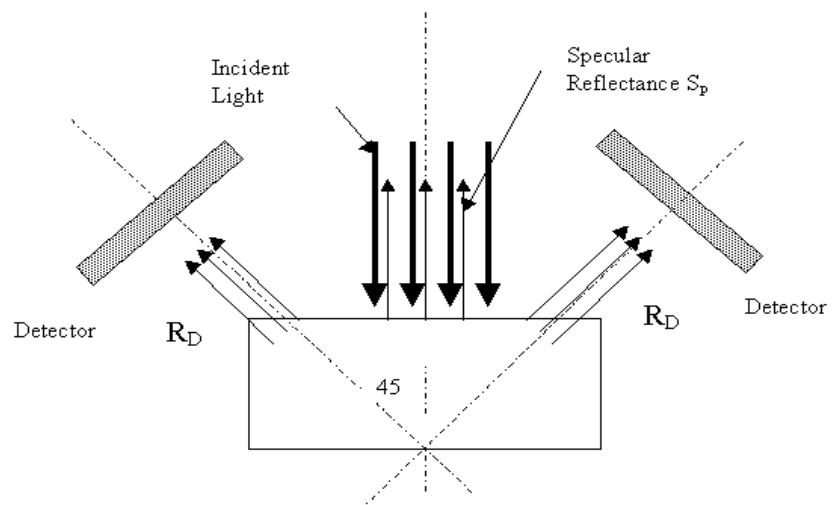


Kuva 6. Kemiallisten sidosten absorptioaallonpituudet lähi-IR -alueella [25]

Vesi-, proteiini-, rasva- ja hiilihydraattipitoisuudet voidaan periaatteessa määrittää klassisen absorptiospektroskopian avulla. Kuitenkin useimpien elintarvikenäytteiden kemiallinen informaatio hämärtyy spektreissä tapahtuvien muutoksien takia ja silmämääräinen tunnistaminen on mahdotonta. Muutoksia aiheuttavat näytteiden fysikaaliset ominaisuudet, kuten esimerkiksi jauheiden hiukkaskoko. [23.] Fysiokemiallisissa tutkimuksissa hyödynnetään aineen isomeriaa, olomuotoa, lämpötilaa ja muita ulkoisia tekijöitä, jotka vaikuttavat IR-spektrissä esiintyvien absorptioiden taajuuksiin ja intensiteetteihin [24, s. 90]. Näytteiden ainesosien määrittämiseksi NIR-spektroskopia vaatii vertailumenetelmien pohjalta kalibroinnin. Spektrin hajaantuneen transmittanssin, heijastuskyvyn ja hankaluuden takia kalibrointi suoritetaan käyttäen monimuuttujamatematiikkaa eli kemometriaa. Merkittävä rajoitus NIR-spektroskopian elintarvikeanalyseissa on sen riippuvuus vähemmän tarkoista vertailumenetelmistä. [23.] Näiden avulla tunnistettujen näytteiden suuri määrä spektrejä voidaan ajaa tietokoneen muistiin. Näin ollen statistisen korrelaatioanalyysin avulla voidaan saada vastaavat ominaisuudet selville tuntemattomasta näytteestä. [24, s. 112.]

NIR:n suuri etu on se, että yleensä mikään näytteen esikäsittely ei ole tarpeen. Analyysit ovat hyvin yksinkertaisia ja erittäin nopeita (15 - 90 s) ja ne voidaan suorittaa saman tien. Yksi NIR-tekniikan vahvuuksista on se, että se mahdollistaa useiden ainesosien samanaikaisen mittaamisen. [23.]

NIR-analyysiin vaadittavat laitteet ovat suhteellisen yksinkertaisia ja kohtuuhintaisia. Säteilylähteenä toimii tavallinen halogeenilamppu. Optiikasta vastaa yksi tai kaksi kvartsiprismaa tai prismahila kaksoismonokromaattori. [22, s. 293] Detektorin materiaali riippuu mitattavasta aallonpituudesta. Esimerkkeinä materiaaleista ovat Si 400 - 1100 nm, InGaAs 800 - 1700 nm ja PbS 1100 - 2500 nm. Mittauksissa voidaan käyttää myös näiden yhdistelmiä, jolloin mitta-alue laajenee. Piin ja lyijysulfidin yhdistelmädetektorilla voi mitata vain jauhemaisia tai rakeisia näytteitä diffuusioheijastustekniikalla kuituoptiikkailmaisimella. [23.] Siinä hyödynnetään ellipsoidin muotoisten peilien optisia ominaisuuksia jauhemaisen näytteen lähettämää, joka suuntaan sironavan IR-säteilyn mittaamiseksi. Ellipsoidin toiseen polttopisteeseen laitetaan näyte ja toiseen detektori. Näin näytteestä lähtevä säteily saadaan fokuoitiua detektorille. [24, s. 103.] Kuvassa 7 on esitetty diffuusioheijastuslaitteen toimintaperiaate. Optimaalinen valo havaitaan 45 asteen heijastuksesta. Heijastunut valo on yhdistelmä peili- ja diffuusioheijastuksesta. Jotta tällaista tekniikkaa voitaisiin käyttää, heijastuksen on oltava enemmän diffuusioheijastusta kuin peilimäistä. [25.]



Kuva 7. Diffuusioheijastuslaitteen toimintaperiaate [27]

Toinen mittaustekniikka on *Interactance*. Sen pääasiallinen tehtävä on saada valo tunkeutumaan mahdollisemman syvälle näytteeseen ja mitata sieltä heijastunutta valoa. Tätä tekniikkaa käytetään vaikeasti mitattaville ja ei-homogenisoiduille lietteille. [25.]

4.1 InfraXact™ Lab -laite

InfraXact™ Lab -laitteen avulla mitataan tarkasti NIR-teknologiaa käyttäen tuotteen koostumusta, kuten rasvaa, proteiineja, kosteutta ja tärkkelystä kiinteistä, rakeisista ja nestemäisistä tuotteista. Useimmissa tapauksissa näytteet eivät vaadi mitään esikäsitteilyä. [27.]

Tällä hetkellä laboratoriossa käytetään FOSSin InfraXact™ Lab -laitetta (kuva 8). Se päätettiin ottaa käyttöön vuonna 2007 parin koekuukauden jälkeen, jolloin oli ollut yhtä aikaa koekäytössä myös PerkinElmerin valmistama NIR-spektrometri. [1.] Laitteen NIR-alue on 570 - 1948 nm. Yhdistelmädetektori koostuu Si-detektorista, joka toimii 570 - 1098 nm:n alueella ja InGaAs-detektorista 1100 - 1948 nm:n alueella. Valolähteenä on halogeenilamppu 24 V DC , 3A. Skannaukseen kuuluu kolme sekuntia ja dataväli on kaksi nm. Aallonpituustarkkuus on alle puoli nm ja -toistettavuus alle 0,02 nm. [26.]



Kuva 8. InfraXact™Lab -laite [28]

InfraXact-laitteen käyttö vaatii tietokoneeseen asennettavan ISIScan-ohjelman. InfraXact ja PC yhdistetään USB-kaapelin avulla. ISIScan-ohjelmassa käytetään profiileja ohjelman konfiguroimiseksi näytteiden rutiinianalysointia varten. Profiileissa laite- ja ohjelma-asetukset tallennetaan loogisiin ryhmiin, mikä tekee niiden esitystavan ja käytön helpoksi ja intuitiiviseksi. Dialogiruutujen esitystapa riippuu siitä, kuinka ohjelmisto on konfiguroitu eri profiileissa. [27.]

Ennen varsinaisen näytteen mittausta laitteen toimintakunto tarkistetaan skannaamalla sisäistä keraamista referenssiläätettä. Näyte voi pysyä paikallaan koko mittauksen ajan tai sitä voidaan pyörittää ja ottaa osamittauksia eri

kohdista, tällöin näytekuppi pysähtyy aina skannauksen ajaksi ja kuppi palautuu aloitusasentoonsa mittauksen jälkeen. [27.]

Näytekuppia täytettäessä on tärkeää, että kuppi tulee täytetyksi näytteellä niin, ettei valo vuoda läpi. Suora valo vaikuttaa analyysitulokseen. Laitteella on mahdollista käyttää sekä kyvettiä (kuva 9) että petrimaljaa. [27.]



Kuva 9. InfraXact-laitteen kyvetti

4.2 ISIScan-kalibrointiohjelma

Kalibrointiohjelmaa laadittaessa kalibrointinäytteet on valittu ja nimetty edustaviksi odotetuista tuntemattomista näytteistä. Nämä näytteet on analysoitu käyttäen referenssimenetelmiä, jotta on voitu asentaa tietyt parametrit ja luoda matemaattinen data. Kalibrointi ISIScan:ssa on matemaattinen määritelmä, joka ennustaa parametrien arvot NIR-spektrin perusteella. Kalibrointi voidaan luoda käyttäen apuna MLR:ää (multiple linear regression [monikermainen lineaarinen regressio]), mPLS/PLS:ää (modified partial least squares regression [osittainen pienemmän neliösumman regressio]), LOCAL regressiota tai ANN:ää (artificial neural networks [keinotekoinen neuroverkko]). [27.]

LOCAL regressio on ainutlaatuinen ennustustekniikka, jossa tuntemattoman näytteen spektriä verrataan kalibrointitietokantaan ja valitaan vain samantyyppisiä näytteitä. Kalibrointi on tehty valituista näytteistä vain tietylle ainesosalle, esimerkiksi rasvalle, jolloin aina seuraava tutkittava ainesosa käsitellään samalla tavalla. [27.]

Tällä hetkellä laboratorioissa on käytössä kolmas versio kalibrointiohjelmasta kyvetille ChoF706 ja petrimaljalle ChoF706P. Siinä käytetään LOCAL regressiota. Ohjelma saapui huhtikuussa 2008, minkä jälkeen sitä ei ole sen kummemmin tutkittu vaan ruvettiin heti käyttämään valmistajan validointiraportin perusteella. [1.] Valmistaja paransi ohjelmaa 237 suklaanäytteellä ky-

vettimittausmenetelmää varten ja 231 näytteellä petrimaljamittausmenetelmää varten ja teki kalibroinnin näytteiden spektrien ja referenssimittausten rasva-arvojen mukaan. Valmistaja suoritti validoinnin ainoastaan rasvalle, jolloin saatiin suhteellisesti pienemmät arvot edellisiin kalibrointiohjelmiin verrattuna, jotka on esitetty taulukossa 2. [29.]

Taulukko 2. Valmistajan tekemät kalibrointiohjelmien validoinnin tulokset [31]

Dataset	Malli	SEP	SEP(C)	Bias	Slope	R ²
Kyvetti030308	ChoF705	1,25	0,69	1,05	1,02	0,97
Kyvetti030308	ChoF706	0,59	0,55	0,20	1,03	0,98
Kyvetti030308*	ChoF706	0,52	0,45	0,20	1,02	0,99
Petrimalja030308	ChoF705P	2,11	2,05	0,51	2,05	0,96
Petrimalja030308	ChoF706P	0,69	0,69	0,03	1,07	0,97
Petrimalja030308*	ChoF706P	0,49	0,47	0,14	1,05	0,99

SEP: Ennusteen standardin mukainen virhe (Standard error of prediction)

SEP(C): Ennusteen standardin mukainen virhe poikkeaman korjauksen jälkeen (Standard error of prediction after bias adjustment)

* Datasta on poistettu poikkeava näyte

Validointiraportin mukaan kalibrointiohjelma on parempi kuin edellinen, etenkin kyvettimittausmenetelmällä ongelmia on yhden näytetyypin kanssa sekä kyvetti- että petrimaljamittauksella. Valmistajan mukaan kalibrointiohjelma ennustaa hyvällä tarkkuudella eri suklaalaatujen rasvapitoisuudet. [29.]

4.3 Analysointi

Tässä työssä on tutkittu 16 eri suklaalaatua ja yhteensä 93 suklaanäytettä. Näytteet otettiin eri päivinä eri kellonaikoina ja eri säiliöistä. Jotta tuotesalaisuudet eivät paljastuisi, jokaiselle suklaalaadulle on keksitty lyhenne. Tärkeimpiä eli eniten käytössä olevia laatuja pyrittiin tutkimaan tarkemmin ja muita mahdollisuuksien mukaan. Taulukossa 3 on esitetty, mitä laatuja on tutkittu.

Taulukko 3. Suklaalaadut

Nimi	K3	VE	V1	M1	M2	7	T1	K1	K2	M3	T2	T3	T4	T5	R	E1
Näytteet(kpl)	12	20	17	15	10	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1

Aluksi kaikki näytteet analysoitiin edellä kuvatuilla referenssimenetelmillä. Tulokset on esitetty taulukossa 4. n tarkoittaa kunkin suklaalaadun mittauskertoja yhteensä.

Taulukko 4. Suklaalaatujen sakkaroosi-, laktoosi-, rasva- ja vesipitoisuuksien tulokset referenssimenetelmiä käyttäen

		sakkaroosi	laktoosi	rasva	vesi
VE	ka=	39,02	8,87	32,88	0,78
n=60	s=	1,22	0,28	0,46	0,09
	RSD=	3 %	3 %	1 %	12 %
V1	ka=	33,50	11,69	32,53	1,89
n=51	s=	0,77	0,99	0,48	0,15
	RSD=	2 %	8 %	1 %	8 %
K1	ka=	48,16	0,20	33,52	0,53
n=6	s=	0,24	0,05	0,17	0,03
	RSD=	1 %	27 %	1 %	5 %
K2	ka=	47,94	0,08	34,02	0,56
n=6	s=	0,71	0,06	0,11	0,04
	RSD=	1 %	73 %	0 %	7 %
K3	ka=	48,14	0,12	33,27	0,60
n=36	s=	1,24	0,07	0,58	0,04
	RSD=	3 %	56 %	2 %	7 %
M1	ka=	36,28	12,54	33,10	0,81
n=45	s=	0,82	0,36	0,45	0,07
	RSD=	2 %	3 %	1 %	8 %
M2	ka=	54,47	0,24	28,33	0,41
n=30	s=	1,35	0,10	0,28	0,04
	RSD=	2 %	41 %	1 %	10 %
M3	ka=	41,67	8,56	36,46	0,66
n=3	s=	0,18	0,06	0,06	0,02
	RSD=	0,4 %	1 %	0,2 %	2 %
7	ka=	28,03	0,46	40,95	0,99
n=6	s=	0,38	0,18	0,20	0,03
	RSD=	1 %	40 %	0,5 %	3 %
T1	ka=	52,08	0,16	30,59	0,54
n=3	s=	0,27	0,01	0,04	0,04
	RSD=	1 %	5 %	0 %	6 %
T2	ka=	38,26	11,71	33,26	0,97
n=6	s=	0,20	0,23	0,05	0,03
	RSD=	1 %	2 %	0,2 %	3 %
T3	ka=	42,52	9,35	34,96	0,67
n=6	s=	0,16	0,11	0,21	0,02
	RSD=	0,4 %	1 %	1 %	2 %
T4	ka=	52,04	0,06	33,71	0,51
n=6	s=	0,26	0,35	1,05	0,03
	RSD=	0,5 %	612 %	3 %	6 %
T5	ka=	32,98	12,01	36,14	0,75
n=6	s=	0,17	0,75	1,15	0,02
	RSD=	1 %	6 %	3 %	3 %
E1	ka=	41,88	5,31	34,20	0,69
n=3	s=	0,43	0,08	0,18	0,02
	RSD=	1 %	1 %	1 %	3 %
R	ka=	40,06	11,90	35,60	0,76
n=6	s=	0,38	0,27	0,69	0,04
	RSD=	1 %	2 %	2 %	6 %

Joitain yksittäisiä rasvapitoisuuden analyysituloksia ei huomioitu keskiarvoa laskiessa niiden poikkeavuuden takia. Joidenkin tulosten pienuus saattoi johtua happokeiton jälkeisestä pesusta, jolloin pieni osa näytettä saattoi poistua lasikapselista. Tämä tarkoittaa sitä, että uutetun rasvan määrä ei enää vastaa punnittua näytteen määrää.

Sitten näytteet sulatettiin uudelleen ja suoritettiin mittauksia InfraXact™ Lab-laitteella. Laite antaa heti sekä rasva-, sakkaroosi-, laktoosi- että vesipitoisuudet. Sulaa massaa valettiin kyvetteihin ja petrimaljoihin, laitettiin 50

°C:seen lämpökaappiin temperoitumaan noin neljänneksiksi ja mitattiin koneelle asennetulla sekä kyvetti- että petrimaljakalibroitiohjelmilla. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista kyvetti- ja petrimaljamittausta. Tämän lisäksi jokaisesta mittauksesta otettiin peräkkäin kolme signaalia, joten kaiken kaikkiaan yhdestä näytteestä saatiin yhdeksän mittaustulosta sekä kyvetti- että petrimaljamenetelmällä mitattaessa. Temperointi suoritettiin 50 °C:ssa, koska siinä lämpötilassa kaikki rasva on sulanut. Massa on mahdollisimman tasainen ja siksi tuloksien oletetaan olevan luotettavia.

Työn tarkoituksena oli NIR-laitteen validoinnin ja mittausmenetelmien vertaamisen lisäksi tutkia,, eroavatko viikon verran seisseiden näytteiden analyysitulokset merkittävästi toisistaan. Lisäksi tutkittiin myös eri esikäsitteilylämpötilojen ja konssien vaikutusta analyysitulokseen. Lämpötila-analyysi tehtiin 40 ja 50 °C:ssa kolmelle suklaalaadulle: VE:llä kaksi näytettä, K3:lla ja M2:lla kolme näytettä kummallakin. Myös toistokoe tehtiin samoille laaduille 50 °C:ssa. VE:llä ja K3:lla viisi näytettä kummallakin ja kolme näytettä M2:lla. Tosin säilyvyydestä ei tehty heti vastatulleille näytteille vaan vasta viikkojen päästä, uutta kalibroitiohjelmia odottaessa. Samat näytteet kuitenkin analysoitiin viikon erolla ensimmäisestä mittauksesta.

5 TULOKSET

NIR-analysaattorilla tehtyjen analyysien tuloksia 50 °C:ssa (taulukko 5) verrattiin suklaalaatu ja menetelmä kerrallaan referenssimenetelmillä saatuihin keskiarvoihin taulukoissa 4 ja 5 esitettyjen tuloksien perusteella.

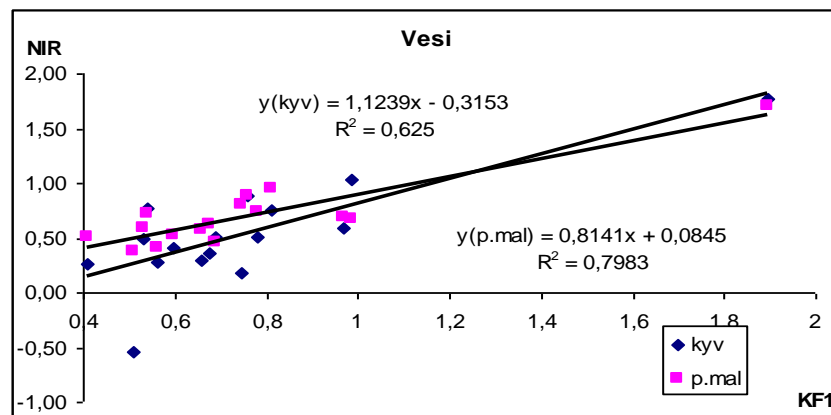
Taulukko 5. InfraXact™Lab -laitteella suoritettujen mittauksien tuloksia, niiden keskiarvot, -hajonnat ja suhteelliset hajonnat

		sakkaroosi		laktoosi		rasva		vesi		
		kyv 50°C	p.mal 50°C	kyv 50°C	p.mal 50°C	kyv 50°C	p.mal 50°C	kyv 50°C	p.mal 50°C	
VE	ka=	39,87	38,07	10,35	10,78	33,16	34,22	0,52	0,73	
	n=180	s=	0,41	0,28	0,57	0,38	0,34	0,26	0,15	0,09
		RSD=	1 %	1 %	5 %	3 %	1 %	1 %	30 %	12 %
V1	ka=	35,47	33,98	14,00	14,15	32,73	33,19	1,77	1,71	
	n=153	s=	0,42	0,26	0,23	0,38	0,38	0,32	0,20	0,14
		RSD=	1 %	1 %	2 %	3 %	1 %	1 %	11 %	8 %
K1	ka=	48,17	44,95	1,39	1,73	33,14	32,65	0,50	0,59	
	n=18	s=	0,16	0,13	0,19	0,27	0,08	0,07	0,09	0,03
		RSD=	0,3 %	0,3%	14 %	15 %	0 %	0,2 %	18 %	5 %
K2	ka=	47,37	43,97	3,48	4,56	34,11	34,11	0,27	0,41	
	n=18	s=	0,25	0,26	0,32	0,37	0,26	0,16	0,08	0,04
		RSD=	1 %	1 %	9 %	8 %	1 %	0 %	29 %	9 %
K3	ka=	47,72	44,25	3,02	3,63	33,23	33,34	0,41	0,53	
	n=108	s=	0,23	0,31	0,45	0,80	0,40	0,34	0,12	0,08
		RSD=	0,5 %	0,7 %	15 %	22 %	1 %	1 %	29 %	16 %
M1	ka=	36,72	35,38	13,60	13,74	32,89	33,55	0,75	0,94	
	n=135	s=	1,00	0,67	0,49	0,55	0,38	0,25	0,12	0,05
		RSD=	3 %	2 %	4 %	4 %	1 %	1 %	16 %	5 %
M2	ka=	54,05	48,28	0,97	1,79	28,30	29,96	0,26	0,51	
	n=90	s=	0,30	0,47	0,73	1,17	0,30	0,35	0,12	0,11
		RSD=	1 %	1 %	75 %	65 %	1 %	1 %	47 %	21 %
M3	ka=	42,73	40,02	9,17	10,09	36,06	35,47	0,29	0,57	
	n=9	s=	0,09	0,22	0,21	0,37	0,05	0,12	0,11	0,02
		RSD=	0,2 %	0,5 %	2 %	4 %	0 %	0,3 %	38%	4 %
7	ka=	25,38	34,30	7,45	2,73	39,70	35,33	1,04	0,67	
	n=18	s=	0,15	0,19	0,17	0,24	0,22	0,09	0,15	0,05
		RSD=	1 %	1 %	2 %	9 %	1 %	0 %	15%	8 %
T1	ka=	52,89	46,63	3,02	3,62	30,32	31,61	0,77	0,72	
	n=9	s=	0,15	0,17	0,21	0,14	0,06	0,05	0,07	0,05
		RSD=	0,3 %	0,4 %	7 %	4 %	0 %	0,2 %	9 %	6 %
T2	ka=	39,31	37,82	13,19	13,37	33,05	33,85	0,58	0,69	
	n=18	s=	0,18	0,23	0,37	0,46	0,16	0,21	0,14	0,04
		RSD=	0,5 %	0,6 %	3 %	3 %	0 %	0,6 %	24 %	6 %
T3	ka=	43,65	40,53	10,35	11,59	34,53	35,05	0,36	0,63	
	n=18	s=	0,26	0,18	0,23	0,23	0,23	0,07	0,14	0,04
		RSD=	1 %	0 %	2 %	2 %	1 %	0 %	39%	6 %
T4	ka=	54,24	46,04	6,04	7,00	33,49	33,57	-0,54	0,38	
	n=18	s=	0,29	0,36	0,26	0,45	0,28	0,25	0,07	0,04
		RSD=	1 %	1 %	4 %	6 %	1 %	1 %	-13 %	12 %
T5	ka=	33,56	33,23	14,78	14,64	35,91	35,06	0,18	0,80	
	n=18	s=	0,65	0,56	0,23	0,77	0,25	0,28	0,08	0,11
		RSD=	2 %	2 %	2 %	5 %	1 %	1 %	45 %	14 %
E1	ka=	42,14	40,58	7,23	7,01	34,03	33,49	0,51	0,46	
	n=9	s=	0,12	0,16	0,22	0,23	0,16	0,08	0,06	0,04
		RSD=	0,3 %	0,4 %	3,1 %	3 %	0,5 %	0,2 %	11 %	8 %
R	ka=	42,09	38,76	10,74	12,18	34,92	34,86	0,89	0,88	
	n=18	s=	0,19	0,20	0,74	0,82	0,60	0,18	0,09	0,04
		RSD=	0,4 %	0,5 %	7 %	7 %	2 %	1 %	10 %	4 %

Menetelmiä verrattiin toisiinsa regressiosuoran avulla. Piirrettiin kuvaaja, jossa vaak-akselilla on referenssimenetelmän mittaustulokset ja pystyakselilla NIR-analysaattorin mittaustulokset. Näihin sovitettiin regressiosuora,

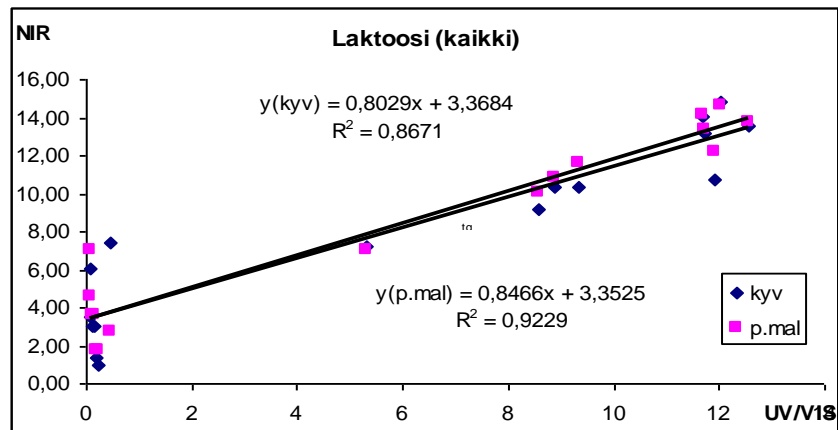
jonka avulla tutkittiin, antavatko menetelmät samat tulokset. Sovitetun suor-
ran kulmakerroin tulee olla yksi ja sen tulee leikata pysty akseli origossa, jos
menetelmät antavat samat tulokset.

Visuaalisesti mittaustuloksia tarkasteltaessa todettiin, että niissä on suuret
hajonnat ja että ne eivät näytä oikeaa arvoa. Kuvaajasta 1 nähdään, että
regressiosuorien kulmakertoimet eivät ole yksi ja että ne eivät leikkaa pysty-
akselia origossa. NIR-analysointorilla ei siis voi mitata luotettavasti näyttei-
den vesipitoisuuksia.

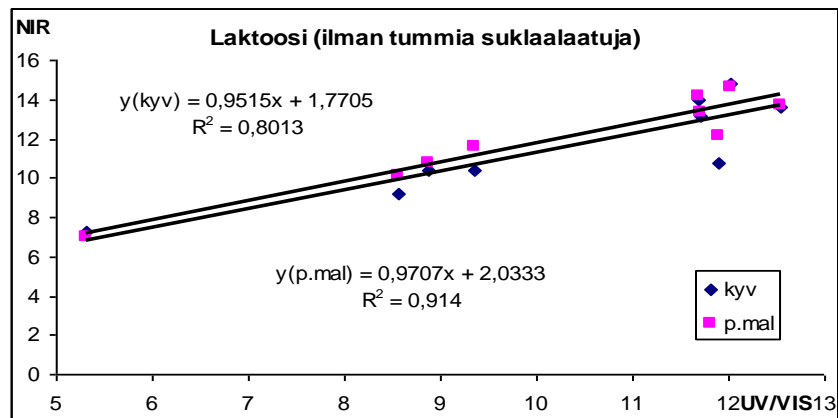


Kuvaaja 1. Vesipitoisuuden regressiosuorat sekä kyveti- että petrimaljamenetelmille

Vähälaktoosisia (K1, K2, K3, M2, 7, T1 ja T4) suklaalaatuja täytyy tuntea, sil-
lä nolla-arvoa ei ole mahdollista mitata sekä entsyymaattisesti UV/VIS-
spektrofotometriä että NIR-analysointorilla käytettäessä. Tämä on nähtävissä
molempien menetelmien mittaustuloksissa. Kuvaajassa 2 on kaikkien suk-
laalaatujen laktoosiarvojen regressiosuorat sekä kyveti- että petrimaljame-
netelmille. Kun piirretään suora ilman vähälaktoosittomia suklaalaatuja (ku-
vaaja 3), regressiosuorien kulmakertoimet paranevat, mutta ne eivät ole kui-
tenkaan yksi. Suorat eivät myöskään leikkaa pysty akselia origossa, joten
voidaan todeta, että menetelmien tulokset eroavat. Laktoosia sisältävien
näytteiden mittaustulokset olivat noin kaksi prosenttiyksikköä suuremmat
kuin entsyymaattisen menetelmän tulokset. Suurimmalle osalle näytteistä
(5:4) kyvettimenetelmän tulokset ovat kuitenkin lähempänä oikeita, samoin
niiden hajonta on pienempi kuin petrimaljamenetelmällä mitattaessa.

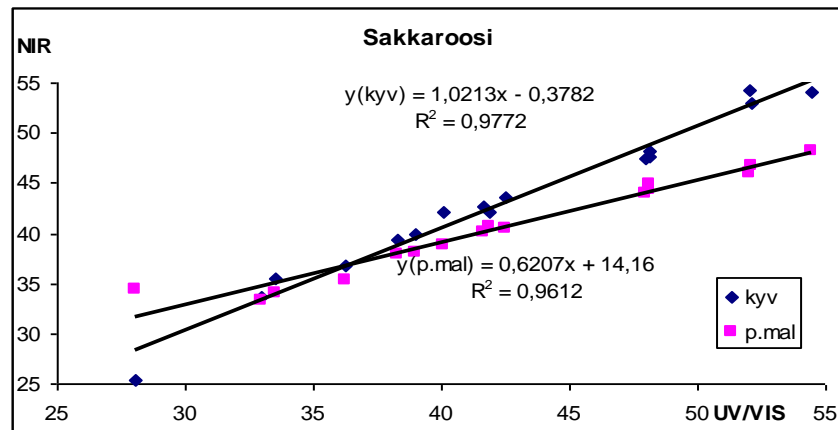


Kuvaaja 2. Laktosipitoisuuden regressiosuorat sekä kyvetti- että petrimaljamenetelmille kaikille suklaalaaduille



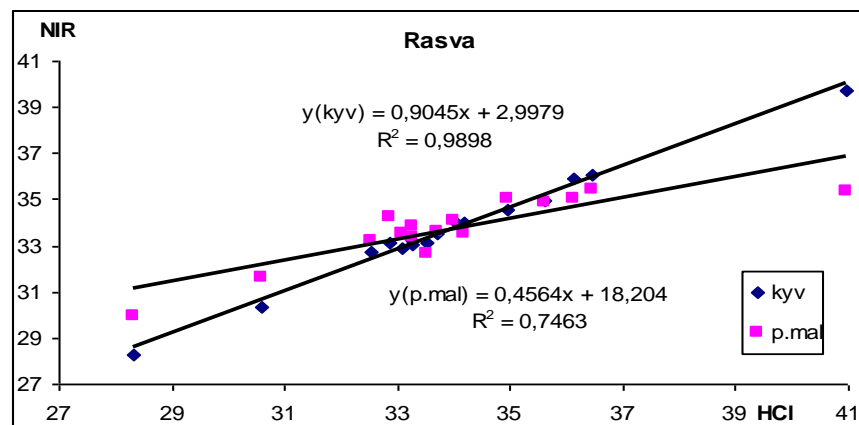
Kuvaaja 3. Laktosipitoisuuden regressiosuorat sekä kyvetti- että petrimaljamenetelmille kaikille suklaalaaduille, lukuun ottamatta K1-, K2-, K3-, M2-, T1-, T4- ja 7-laatuja.

Mitattaessa suklaalaatujen sakkaroosipitoisuutta NIR-analysointorilla, suurin osa (12:4) kyvettimenetelmän tuloksista on lähes samoja kuin entsyymaattisella menetelmällä UV/VIS-spektrofotometrillä mitattaessa, myös niiden hajonta on pienempi. 7-, V1-, T4- ja R-laadut erosivat enemmän, yli kaksi prosenttiyksikköä. Petrimaljamenetelmä ei anna samoja sakkaroosituloksia kuin referenssimenetelmä. Sen regressiosuoran (kuvaaja 4) kulmakerroin ei ole yksi ja suora ei leikkaa pystyakselia origossa, kun taas kyvettimenetelmän suoran kulmakerroin on yksi ja se leikkaa pystyakselin hyvin lähellä origoa. Näyttää siltä, että ohjelma ennustaa huonommin niitä suklaalaatuja, joissa sokeri esiintyy suhteellisen paljon sitoutuneena toiseen raaka-aineeseen.



Kuvaaja 4. Sakkarooisipitoisuuden regressiosuorat sekä kyvetti- että petrimaljamenetelmille

Mitattaessa näytteiden rasvapitoisuutta kyvettimenetelmän tulokset olivat hyvin lähellä referenssimenetelmän tuloksia. M2-laadun kyvettimenetelmän tulos oli lähes sama. Kuvaajasta 5 nähdään, että kyvettimenetelmän mittaus-tulokset sijoittuvat tosi hyvin suoralle, kun taas petrimaljamenetelmän tulok-sissa on suuri hajonta. Eniten rasvapitoisuustulokset erosivat 7-laadulla sit-ten R:lla. Huonoon ennustukseen todennäköisesti vaikuttaa se, että 7-laadussa rasva esiintyy voiöljynä sekä sitoutuneena suhteellisesti suureen osaan kaakaomassaa. R-laadussa rasva esiintyy kaakaovoina, jota on siinä suhteellisesti eniten verrattuna muihin laatuihin, ja rasvaisessa maitojau-heessa. Parhaiten rasvapitoisuuksia kalibrointiohjelma ennusti, jos suklaa-massan valmistuksessa on käytetty kaakaovoin lisäksi muita rasvoja, esim. voiöljyä, tai jos pelkkää kaakaovoina on suhteellisesti vähiten. Jos rasva esiintyy sitoutuneena muihin raaka-aineisiin, niin ennustaminen vaikeutuu. Tätä väittämää voi tarkistaa mittaamalla enemmän kyseisiä suklaalaatuja.



Kuvaaja 5. Rasvapitoisuuden regressiosuorat sekä kyvetti- että petrimaljamenetelmille

Taulukossa 6 on esitetty InfraXact-laitteella molemmilla menetelmillä mitattujen suklaalaatujen sakkaroosi-, laktoosi-, rasva- ja vesipitoisuudet ja niiden luottamusrajat, jotka laskettiin kaavan 4 mukaan. Lasketut luottamusrajat ovat pienet, mikä osoittaa sitä, että menetelmät ovat täsmällisiä, VE-, V1-, K1-, K3- ja 7-laatuojen kohdalla parempia kuin toisten. Edellä on kuitenkin todettu, että ainoastaan kyvettimenetelmällä sakkaroosi- ja rasvapitoisuuksia voi mitata luotettavasti.

$$\mu = a \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right) \quad (4)$$

$t_{0,05,(n-2)}$ = kaksipuoleinen Studentin t-testi (95%)

s = NIR-mittausten keskihajonta

n = näytteiden lukumäärä

Taulukko 6. Suklaalaatujen aineosien pitoisuusarvot luottamusväleineen

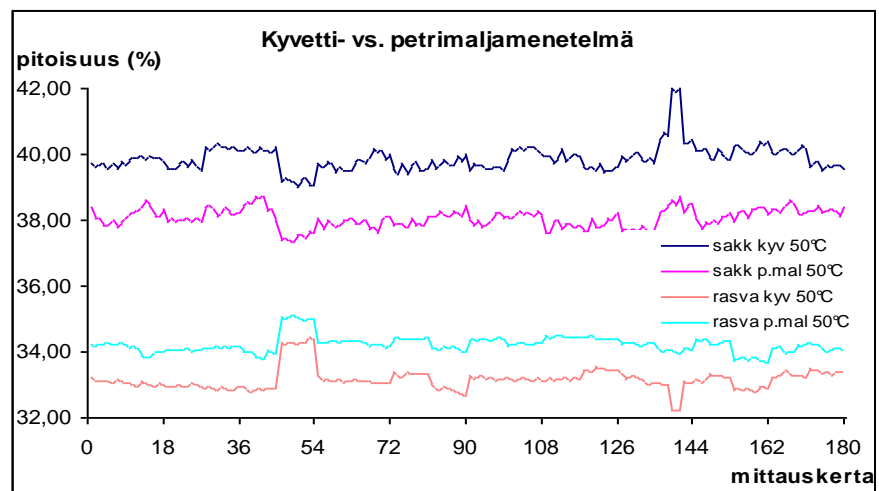
	sakk		lak		rasva		vesi	
	kyv 50°C	p.mal 50°C	kyv 50°C	p.mal 50°C	kyv 50°C	p.mal 50°C	kyv 50°C	p.mal 50°C
VE	39,9 ± 0,2	38,2 ± 0,1	10,4 ± 0,2	10,8 ± 0,2	33,2 ± 0,2	34,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,04
V1	35,5 ± 0,2	34,0 ± 0,1	14,0 ± 0,1	14,2 ± 0,2	32,7 ± 0,2	33,2 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
K1	48,2 ± 0,2	45,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,3	33,1 ± 0,1	32,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,01
K2	47,4 ± 0,3	44,0 ± 0,3	3,5 ± 0,3	4,6 ± 0,4	34,1 ± 0,3	34,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,03
K3	47,7 ± 0,1	44,3 ± 0,2	3,0 ± 0,3	3,6 ± 0,5	33,2 ± 0,2	33,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,05
M1	36,7 ± 0,6	35,4 ± 0,4	13,6 ± 0,3	13,7 ± 0,3	32,9 ± 0,2	33,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,02
M2	54,1 ± 0,2	48,3 ± 0,3	1,0 ± 0,5	1,8 ± 0,8	28,3 ± 0,2	30,0 ± 0,2	0,3 ± 0,05	0,5 ± 0,1
M3	42,7 ± 0,5	40,0 ± 1,6	9,2 ± 1,4	10,1 ± 2,4	36,1 ± 0,3	35,5 ± 0,9	0,3 ± 0,6	0,6 ± 0,1
7	25,4 ± 0,1	34,3 ± 0,2	7,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2	39,7 ± 0,2	35,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,05
T1	52,9 ± 0,2	46,6 ± 1,0	3,0 ± 1,1	3,6 ± 0,7	30,3 ± 0,4	31,6 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,3
T2	39,3 ± 0,2	37,8 ± 0,2	13,2 ± 0,4	13,4 ± 0,5	33,1 ± 0,2	33,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,03
T3	43,7 ± 0,3	40,5 ± 0,1	10,4 ± 0,2	11,6 ± 0,2	34,5 ± 0,3	35,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,04
T4	54,2 ± 0,3	46,0 ± 0,4	6,0 ± 0,2	7,0 ± 0,5	33,5 ± 0,3	33,6 ± 0,3	-0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,03
T5	33,6 ± 0,7	33,2 ± 0,6	14,8 ± 0,2	14,6 ± 0,9	35,9 ± 0,3	35,1 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1
E1	42,1 ± 0,5	40,6 ± 0,9	7,2 ± 1,0	7,0 ± 1,5	34,0 ± 1,1	33,5 ± 0,5	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
R	42,1 ± 0,2	38,8 ± 0,2	10,7 ± 0,8	12,2 ± 0,9	34,9 ± 0,7	34,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,02

egressiosuorien avulla tutkittiin systemaattisen virheen olemassaoloa. Jos suora ei kulje origon kautta, mutta herkkyys ei poikkea ykkösestä, niin menetelmä sisältää vakiosystemaattisen virheen eli virhe on näytteen pitoisuudesta riippumaton. Jos herkkyys poikkea merkittävästi ykkösestä, niin menetelmä sisältää suhteellisen systemaattisen virheen eli virhe on näytteestä riippuva. Virheiden merkitsevyyttä tutkittiin t-testin avulla. Laskujen mukaan sekä kyvetti- että petrimaljamenetelmät sisältävät molempia virheitä ja suurin osa niistä on suhteellisia systemaattisia virheitä. Kyseinen virhe on jokaisen suklaalaadun molemmissa menetelmissä. Vakiosystemaattinen virhe on K2-, K3- ja T5-suklaalaatujen laktoosin molemmissa menetelmissä. Koska menetelmät sisältävät jokaisen suklaalaadun kohdalla ainakin yhden virheen, niitä ei voi käyttää luotettavasti merkitsevyytensä tasolla 0,05.

5.1 Menetelmien vertailu

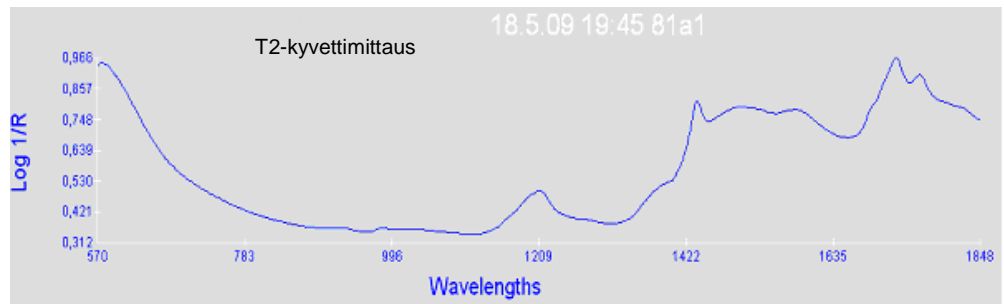
Kyvetti- ja petrimaljamenetelmien tuloksia 50 °C:ssa verrattiin keskenään sekä piirtämällä kuvaajat että analysoimalla näytteiden spektrit.

Piirretyistä kuvaajista näkee heti, että menetelmät eroavat toisistaan kaikkien suklaalaatujen kohdalla. Esimerkkinä on VE-laadun sakkaroosi- ja rasvapitoisuudet mittauskerran funktiona sekä kyveti- että petrimaljamenetelmää käyttäen (kuvaaja 6).

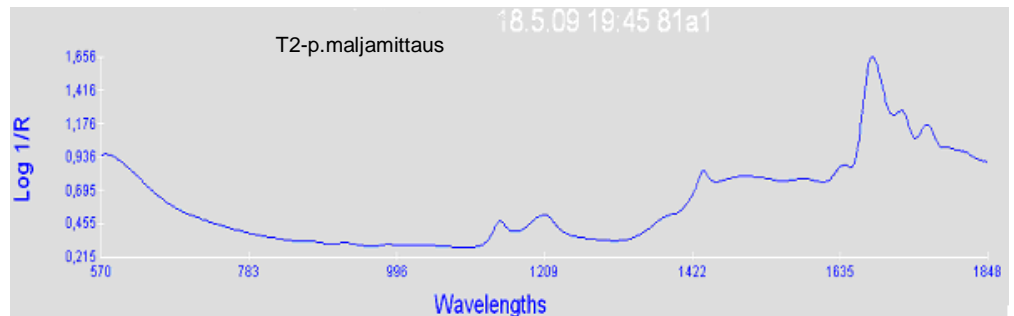


Kuvaaja 6. VE-laadun sakkaroosi- ja rasvapitoisuudet mittauskerran funktiona sekä kyveti- että petrimaljamenetelmää käyttäen

Verrattaessa saman näytteen kyveti- ja petrimaljamenetelmien spektrejä (kuvat 11, 12) nähdään, että petrimaljan spektrissä on kaksi ylimääräistä piikkiä aallonpituudella 1150 nm ja 1635 nm sekä yksi piikki on kasvanut huomattavasti. Todennäköistä on, että tämän aiheuttaa itse petrimalja, joka absorboi valoa. Muuten spektrien piikit ovat samanmuotoisia ja sijaitsevat samoilla aallonpituuksilla. Näytteen rinnakkaisten spektrien välillä ei ole näkyvää eroa. Spektrien logaritminen asteikko vaihtelee suklaalaadun mukaan. Vähälaktoosittomien suklaalaatujen logaritminen asteikko nousee yli 1300 1/R, kun taas laktoosia sisältävien laatujen asteikko on 850-1200 1/R välillä. T3-, R-, M1- ja T5-laatujen asteikko alkaa 850 - 900 1/R. VE-, VM-, M3- ja T2-laatujen asteikko alkaa 950 - 1000 1/R välillä. E1-suklaalaadun asteikko alkaa 1200 1/R.



Kuva 10. T2-näytteen kyvettimittauksen spektri



Kuva 11. T2-näytteen petrimaljamittauksen spektri

$$\text{Tarkkuus } (\%) = \frac{x_i - \bar{\mu}}{\bar{\mu}} \cdot 100 \%$$

, missä
 x = kyvetti- tai petrimaljamenetelmällä saatu arvo
 μ = referenssimenetelmällä saatu arvo

(5)

Kyvetti- ja petrimaljamenetelmille tehtiin osittaisvalidointi, jossa tarkasteltiin sekä menetelmien tarkkuutta ja satunnaisvaihteluja että laskettiin mittaus-epävarmuudet. Tarkkuutta (%) arvioitiin kaavan 5 mukaan referenssimenetelmien tuloksien avulla [30]. Laajennettu mittausepävarmuus, U , laskettiin kaavan 6 mukaan. Satunnaisvirheen standardiepävarmuus laskettiin taulukossa 5 olevien suhteellisten keskihajontojen avulla. Systemaattinen virhe arvioitiin laskemalla aluksi jokaiselle suklaaladulle virheprosentti (tarkkuus) jokaisen ainesosan kohdalla. Laskemalla niistä keskihajonnat saatiin systemaattisen virheen osuudet kokonaismittausepävarmuudesta. Kyseiset parametrit laskettiin jokaiselle ainesosalle erikseen, kuitenkin kaikki suklaaladut mukaan lukien. Tarkoituksena oli selvittää, onko jokin tietty ainesosa, jonka kohdalla kalibrointimenetelmää täytyy kehittää lisää. Validoinnin tulokset on esitetty taulukossa 7. Laktoosin kohdalla lasketut arvot eivät sisällä laktoosittomien (K1, K2, K3, M2, 7, T1 ja T4) suklaaladujen tuloksia.

$$U = k \cdot u_c, \text{ missä} \quad (6)$$

$$u_c = \sqrt{u(\text{suht})^2 + u(\text{system})^2}, \text{ kokonaisepävarmuus}$$

$u(\text{suht})$ = satunnaisvirheen standardiepävarmuus (%) = kaikkien suklaalaatujen suhteellisten keskihajontojen keskiarvo

$u(\text{system})$ = systemaattisen virheen standardiepävarmuus (%) = kaikkien suklaalaatujen virheprosenttien keskihajonta

k = kattavuuskerroin luottamustasolla 95 % eli 2

Taulukko 7. Osittaisvalidoinnin tutkittujen parametrien tulokset

	sakkaroosi		laktoosi		rasva		vesi	
	kyv	p.mal	kyv	p.mal	kyv	p.mal	kyv	p.mal
Tarkkuus (%)	1,1	-3,3	14	18	-0,7	-0,5	-35	-5,4
Mittausepävarmuus (%)	7	16	140	60	3	9	120	50

Osittaisvalidoinnin tuloksien mukaan molempia kalibrointimenetelmiä täytyy kehittää lisää, etenkin laktoosin ja veden kohdalla, luotettavien tuloksien aikaan saamiseksi.

5.2 Lämpötila-analyysin tulokset

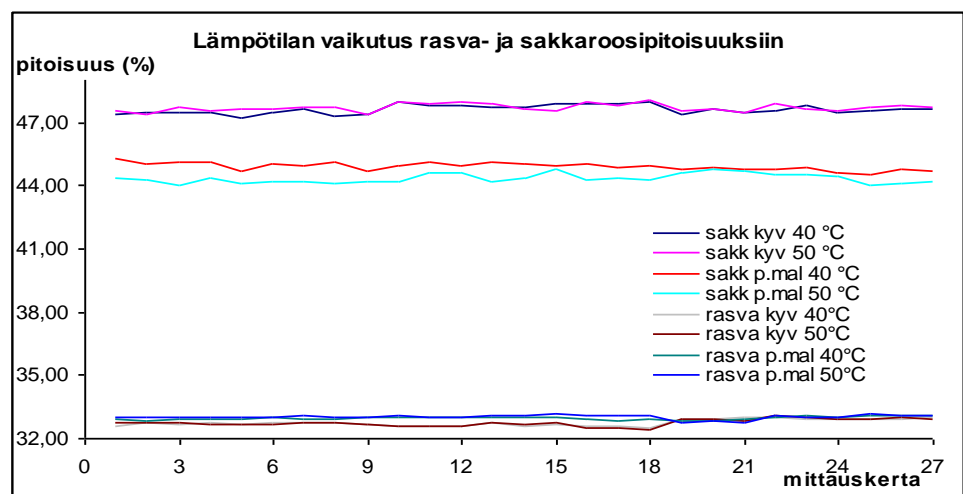
Tässä työssä tutkittiin myös, vaikuttaako näytteiden temperointi eri lämpötiloissa analyysitulokseen. Tuloksia (taulukko 8) verrattiin keskenään piirtämällä kuvaajat ja analysoimalla spektrit. Samalla lämpötilan vaikutusta analyysituloksiin tarkistettiin laskemalla niille tilastollinen t-arvo pareittaisen t-testin avulla.

Taulukko 8. Lämpötila-analyysin tulokset

		sakkaroosi				laktoosi			
		kyv 50°C	kyv 40°C	p.mal 50°C	p.mal 40°C	kyv 50°C	kyv 40°C	p.mal 50°C	p.mal 40°C
VE	ka	39,93	39,86	38,14	38,67	10,46	10,48	10,68	10,76
n=18	kh	0,07	0,10	0,15	0,09	0,15	0,11	0,14	0,16
K3	ka	47,72	47,64	44,36	44,93	2,92	2,97	3,40	3,44
n=27	kh	0,14	0,11	0,19	0,14	0,15	0,13	0,22	0,20
M2	ka	54,04	53,89	48,27	48,51	0,85	1,12	1,78	1,90
n=27	kh	0,13	0,13	0,30	0,21	0,18	0,17	0,18	0,15
		rasva				vesi			
		kyv 50°C	kyv 40°C	p.mal 50°C	p.mal 40°C	kyv 50°C	kyv 40°C	p.mal 50°C	p.mal 40°C
VE	ka	33,00	32,83	34,18	34,06	0,55	0,60	0,76	0,80
n=18	kh	0,05	0,04	0,03	0,03	0,08	0,07	0,03	0,03
K3	ka	32,76	32,76	33,02	32,97	0,39	0,54	0,52	0,58
n=27	kh	0,08	0,06	0,08	0,07	0,08	0,08	0,04	0,03
M2	ka	28,35	28,27	29,99	29,95	0,24	0,38	0,50	0,54
n=27	kh	0,10	0,09	0,08	0,05	0,13	0,11	0,05	0,04

Mitattaessa kyvettimenetelmällä näytteitä, jotka ovat olleet 40 °C:ssa, kaikkien ainesosien kohdalla VE-laadun pitoisuusarvot eroavat oikeista arvoista vähemmän kuin 50 °C:ssa temperoitujen näytteiden. K3- ja M2-suklaalaaduilla mitään säännöllistä poikkeavuutta ei ole huomattavissa. Käytettäessä petrimaljamenetelmää määrittäessä suklaalaatunäytteiden sakkaroosi- ja rasvapitoisuudet, näytteet kannattaa temperoida 40 °C:ssa, sillä

niiden tulokset ovat lähempänä oikeita tuloksia. Kuitenkin petrimaljamenetelmä on vähemmän luotettava kuin kyvettimenetelmä. K3- ja M2-laatuojen laktoosipitoisuuksien tuloksia ei huomioitu, sillä laite ei anna niille nollopitoisuusarvoa. Vesipitoisuuden osalta näytteiden temperointilämpötilalla ei ole väliä. Tulokset eivät eroa toisistaan kovinkaan paljon. 40 °C:ssa temperoitujen näytteiden kaikkien ainesosien pitoisuustuloksien hajonta on pienempi. T-testien mukaan suurimmalla osalla kaikkien ainesosien pitoisuusarvojen tuloksista lämpötilalla ei ole vaikutusta analyysitulokseen molemmissa menetelmissä. Menetelmät myös eroavat toisistaan yhtä paljon 40 °C:ssa kuin 50 °C:ssa, mikä näkyy kuvaajassa 7.



Kuvaaja 7. K3-näytteen lämpötila-analyysin kuvaaja

Näytteiden eri temperointilämpötilojen spektreissä on havaittavissa pientä eroa. Lämpimämpien näytteiden (50 °C) piikkien intensiteetti on jonkin verran pienempi kuin 40 °C:isten, mikä näkyy molempien menetelmien spektreissä. Pääasiassa myös 50 °C:ssa temperoitujen näytteiden tulokset ovat siis hieman matalammat.

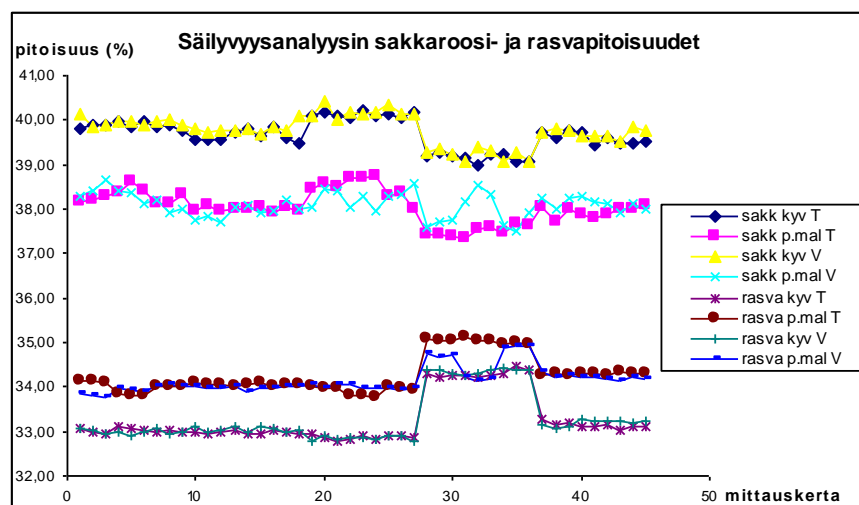
5.3 Toistokokeen tulokset

Samalla tavalla tutkittiin myös, eroavatko viikon verran seisseiden näytteiden analyysitulokset (taulukko 9) merkittävästi toisistaan eli tehtiin toistokoe. Säilyvyydestin taulukoissa ensimmäinen mittaus on merkitty T:llä ja viikon päästä suoritettu mittaus V:llä.

Taulukko 9. Säilyvyysanalyysin tulokset

		sakkaroosi				laktoosi			
		kyv T	kyv V	p.mal T	p.mal V	kyv T	kyv V	p.mal T	p.mal V
VE	ka	39,68	39,78	38,04	38,10	10,36	10,52	10,60	10,85
n=45	kh	0,09	0,11	0,11	0,25	0,14	0,17	0,21	0,39
K3	ka	47,54	47,66	44,03	44,05	3,47	3,43	4,46	4,52
n=45	kh	0,11	0,13	0,16	0,10	0,17	0,13	0,22	0,17
M2	ka	54,10	54,14	48,21	47,75	1,20	1,31	2,20	2,45
n=27	kh	0,12	0,12	0,16	0,16	0,17	0,18	0,17	0,14
		rasva				vesi			
		kyv T	kyv V	p.mal T	p.mal V	kyv T	kyv V	p.mal T	p.mal V
VE	ka	33,26	33,28	34,26	34,14	0,57	0,63	0,79	0,76
	kh	0,05	0,07	0,05	0,11	0,09	0,08	0,08	0,08
K3	ka	33,50	33,50	33,68	33,78	0,38	0,38	0,46	0,48
	kh	0,09	0,06	0,05	0,04	0,08	0,07	0,04	0,03
M2	0,11	28,39	28,49	30,07	30,33	0,27	0,29	0,45	0,51
	54,1	0,08	0,06	0,04	0,06	0,09	0,09	0,03	0,04

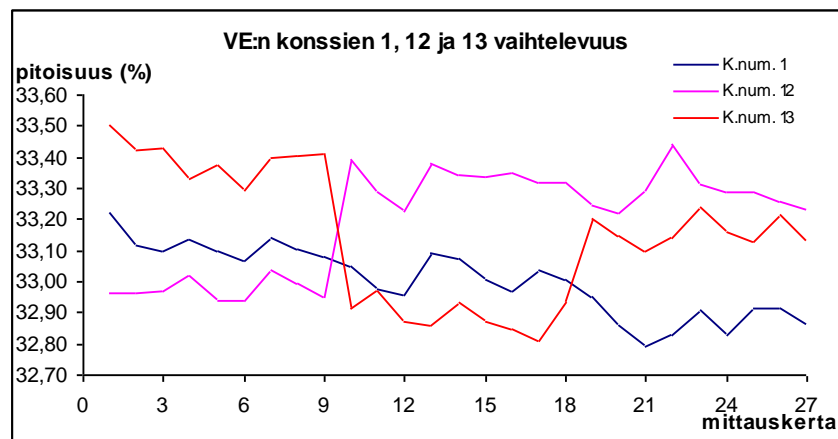
Taulukosta 9 nähdään, että eri-ikäisten näytteiden analyysitulokset eivät eroa toisistaan melkein yhtään. Myös tehtyjen parittaisten t-testien mukaan suurimmassa osassa mittauksista massan ikä ei aiheuta merkittävää eroa kummallakaan menetelmällä mitattaessa. Tämä on myös huomattavissa piirretyssä kuvaajassa 8, jossa on esitetty analyytin pitoisuus mittauksen funktiona. Kummaankaan menetelmän eri-ikäisten näytteiden spektreissä merkittävää eroa ei myöskään ole havaittavissa. Yleisesti voidaan sanoa, että kaikkien analyyttien kannalta massan ikä ei vaikuta analyysitulokseen, sillä kalibrointiohjelmaa täytyy kehittää lisää.



Kuvaaja 8. VE-laadun säilyvyysanalyysin kuvaaja

5.4 Konssien väliset vertailutulokset

Työssä myös tutkittiin, onko merkittävää eroa saman suklaalaadun eri konsseista otettujen näytteiden tuloksien välillä. Sitä tutkittiin piirtämällä kuvaajat. Esimerkkinä on kuvaaja 9, missä on esitetty VE-suklaalaadun rasvapitoisuuden vaihtelu konsittain mittauksen funktiona. Yleisesti dataa kerättiin VE-, V1- sekä M1-suklaalaatujen mittaustuloksista, koska näitä laatuja on otettu monesta eri konssista. Muiden suklaalaatujen näytteet olivat peräisin samoista konsseista, joten niitä ei ollut mahdollista tutkia tältä kannalta.



Kuvaaja 9. VE:n rasvapitoisuudet kyvetimittauksen funktiona. Näytteet on otettu konsseista numero 1, 12 ja 13.

Kuvaajasta 9 nähdään, että saman suklaalaadun yhteensä yhdeksän näytettä eroavat toisistaan rinnakkaisten tuloksien välillä. Myös eri konsseista otettujen näytteiden rasvapitoisuus vaihtelee, mutta mitään säännönmukaisuutta niissä ei ole havaittavissa. Vaikka suklaalaatu ja sen valmistusohje olisi sama, näytteet on otettu eri päivinä, joten niitä on todennäköisesti valmistettu eri tarkkuudella, myös raaka-aineiden koostumus vaihtelee. Näytteiden rasvapitoisuus siis vaihtelee konsittain, mutta mitään säännönmukaisuutta ei ole havaittavissa. Suklaalaatujen vaihteleva rasvapitoisuus todennäköisesti johtuu niiden annostelutarkkuudesta.

6 PÄÄTELMÄT

InfraXact™ Lab -laitteen vanhan kalibrointiohjelman validointi onnistui hyvin. Validoinnin perusteella todettiin, että ChoF706- ja ChoF706P-mittausmenetelmiä ei voida ottaa käyttöön. Niitä täytyy kehittää lisää luotettavien tuloksien aikaansaamiseksi. Menetelmät ovat T2-, T3- ja R-suklaalaaduille paremmat kuin toisille, mutta niillä ei voida mitata yhtä aikaa luotettavasti sakkaroosi-, laktoosi-, rasva- ja vesipitoisuuksia.

Valmistajan raportti lupasi luotettavia rasvapitoisuusmittauksia kaikille suklaalaaduille molemmilla menetelmillä. Tehty työ osoitti kuitenkin muuta. Rasvapitoisuudet ovat muihin ainesosapitoisuuksiin verrattuna lähempänä oikeita arvoja ja tulokset on ennustettu paremmalla tarkkuudella, mutta siinäkin on kehitettävää.

Kyvetti- ja petrimaljamenetelmät eroavat toisistaan huomattavasti. Validointitulosten mukaan menetelmät antoivat hyvin epätarkkoja laktoosi- ja vesipitoisuusarvoja. Näille pitoisuuksille on myös suurimmat luottamusvälit. Sitä on mahdollista korjata kehittämällä parempi kalibrointiohjelma, huomioon ottaen kaikki ainesosat eikä ainoastaan rasva. Olisi parempi, jos vesi- ja laktoosipitoisuusmittauksia varten olisi tehty erillinen kalibrointiohjelma. Käytössä oleva mittausalue on aivan liian suuri. Keskittymällä pienempään pitoisuusalueeseen on mahdollista parantaa mittaustuloksia.

Lämpötila-analyysi osoitti, että lämpötilan alenemisella ei ole vaikutusta analyysitulokseen kummassakaan menetelmässä. 40 °C:n tulokset poikkeavat referenssimenetelmien tuloksista yhtä paljon kuin 50 °C:ssa temperoitujen näytteiden tulokset. Menetelmät myös eroavat toisistaan yhtä paljon 40 °C:ssa kuin 50 °C:ssa. Kaikkien näytteiden kaikkien ainesosien pitoisuustuloksien hajonta on kuitenkin pienempi.

Säilyvyysanalyysi osoitti, että eri-ikäisten näytteiden analyysitulokset eivät eroa toisistaan merkittävästi.

Suklaalaatujen ainesosapitoisuuksiin ei vaikuta, mistä konssista näytteet on otettu. Suklaamassan pienet näytekohtaiset pitoisuusvaihtelut ovat tavallisia.

Luotettava referenssimenetelmä on hyvä apukeino määritettäessä systemaattista virhettä. Systemaattisen virheen vaikutus on mahdollista poistaa

tai pienentää sitä paikallistamalla virhelähde. Tässä työssä käytetyt referenssimenetelmät vesi- ja rasvapitoisuuden mittaamiseksi ovat luotettavia. Käytettyjen Karl Fischer -titraattorin ja spektrofotometrin toimintakunto on tarkistettu sertifioitujen referenssimateriaalien avulla. Niillä saadut pitoisuudet vastaavat hyvin suklaalaatujen reseptiarvoja. Entsymaattisilla kittimenetelmillä mitatut sakkaroosi- ja laktoosipitoisuudet taas eroavat enemmän reseptiarvoista. Kannattaisi kokeilla muita menetelmiä sokeripitoisuuksien selvittämiseksi. Esimerkiksi samalta valmistajalta löytyy laktoosin määrittämiseksi "Lactose/D-Glucose" -kitti ja sakkaroosin määrittämiseksi "Maltose/Sucrose/D-Glucose" -kitti, jotka voivat olla sopivampia määritysmenetelmiä suklaa-analyysiin.

Tallentamalla InfraXact™ Lab -laitteen kalibrointiohjelman muistiin enemmän spektrejä erilaisista suklaalaaduista. Koska spektrissä esiintyvien absorptioiden taajuuksiin ja intensiteetteihin vaikuttavat mm. aineen olomuoto ja lämpötila, voisi kokeilla näytteiden temperointia korkeammassa lämpötilassa, esimerkiksi 70 °C:ssa. Tämän hetkinen ohjelma ennustaa huonommin, jos tutkittava ainesosa on sitoutunut johonkin toiseen raaka-aineeseen eikä ole vapaasti lisättynä suklaamassaan. Lämpötilan nostamisen myötä suklaan olomuoto muuttuu sulavammaksi helpottaen molekyylien liikkumista ja niiden NIR-absorption mittaamista, joten saadaan tarkempi spektri. Näytteen annostelu voi myös vaikuttaa mittaustuloksen systemaattiseen virheeseen. Valamisen sijasta näyteastian voi ruiskun avulla annostella ohuen tasaisen paksun suklaakerroksen.

Edellä mainitut asiat voidaan ottaa huomioon validoitaessa uutta kalibrointiohjelmää, joka on saapunut laboratorioon elokuussa.

VIITELUETTELO

- [1] Koivisto, Pekka, Elintarviketieteen maisteri. Haastattelu. Fazer Makeiset, Vantaa. 11.06.09.
- [2] Virtanen, Pia – Lihavainen, Arja, *01.14.01 Omavalvonta suunnitelma Vantaan ja Lappeenrannan tuotantolaitoksille*. 3. versio. Fazer. 2008. [moniste].
- [3] Cloetta Fazer, *Kaakaopuu*. [verkkodokumentti, viitattu 10.06.09]. Saatavissa: <http://confectionerynet.clofaz.net/upload/PRoduction/Suklaan%20valmistus.ppt>
- [4] Kraft Foods, Taustatietoa suklaasta, *Raaka-aineet*. 2009. [verkkodokumentti, viitattu 28.07.09]. Saatavissa: <http://www.kraftfoods nordic.com/kraft/page?siteid=kraftprd&locale=fifi1&PageRef=2444&Mid=2444>
- [5] Minifie, Bernard W., *Chocolate, cocoa & confectionery*. USA, Westport Connecticut: The AVI Publishing Company, INC. 2nd edition. 1980.
- [6] *Suklaan valmistus ja historia*. [verkkodokumentti, viitattu 10.09.09]. Saatavissa: <http://users.tkk.fi/~ejkauppi/studio2/suklaanvalmistus.html>
- [7] Suklaa, *Tietoa suklaasta*. [verkkodokumentti, viitattu 29.07.09]. Saatavissa: <http://oppi.edu.ouka.fi/~oleeul00/tietoa.htm>
- [8] Laakso, Sinikka, Laborantti. Haastattelu. Fazer Makeiset, Vantaa. 28.04.09.
- [9] Dan Sukker, Ravinto ja terveys, *Energia*. [verkkodokumentti, viitattu 10.08.09]. Saatavissa: <http://www.dansukker.com/Default.aspx?ID=282>
- [10] Peda.net, Disakkaridit. 26.08.09. [verkkodokumentti, viitattu 10.09.09]. Saatavissa: <http://www.peda.net/veraja/projekti/centraali/verkkokurssit/kemia/hiihihydraatit/rakenne/disakkaridit>
- [11] *Sucrose/D-Glucose*, UV-method for the determination of sucrose and D-glucose in foodstuffs and other materials. R-BIOPHARM AG, kittiohje. 2009.
- [12] *Lactose/D-Galactose*, UV-method for the determination of lactose and D-galactose in foodstuffs and other materials. R-BIOPHARM AG, kittiohje. 2009.
- [13] Laboratorioanalyysit, Rasvan määrittäminen elintarvikkeesta. Opetushallitus. [verkkodokumentti, viitattu 10.09.09]. Saatavissa: http://www.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit_rasvat.html
- [14] Soxtec 2055 - Fat Extraction System. PHILAB Industries, Inc. [verkkodokumentti, viitattu 10.9.09]. Saatavissa: http://www.philab.com/foss_page3.html
- [15] FOSS, SoxCap™ 2047/2047^{mini}. User Manual 1001 2445/Rev.3.
- [16] *Foss SoxCap™ 2047 Hydrolysis Unit*. Thermo Fisher Scientific Inc. 2009 [verkkodokumentti, viitattu 10.09.09]. Saatavissa: <https://new.fishersci.com/wps/portal/PRODUCTDETAIL?LBCID=84833590&productid=>

- [17] FOSS, *Soxtec™ 2050 Automatic System*. User Manual 1000 7414/Rev.4.
- [18] Laboratorioanalyysit, *Kosteuden määrittäminen elintarvikkeista*. Opetushallitus. [verkkodokumentti, viitattu 13.08.09]. Saatavissa: http://www.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit_kosteus.html
- [19] *Aquastar®*, *Karl Fischer Titration Basics*. EMD. [verkkodokumentti, viitattu 15.04.09]. Saatavissa: www.emdchemicals.com/analytics/literature/KF_Titration_Basics.pdf
- [20] *Mettler Toledo DL31/DL38 Titrators*. Application brochure 26. Sveitsi: Mettler-Toledo GmbH. 10/98, 03/99.
- [21] Measurement Directory.com, The volumetric Karl Fischer DL38 and DL31 titrators. [verkkodokumentti, viitattu 10.09.09]. Saatavissa: http://www.measurementdirectory.com/karl_fischer_titrator.html
- [22] Willard, Hobart H. ym, *Instrumental Methods of Analysis*. USA: Wadsworth Publishing Company. 7th edition. 1988
- [23] Osborne, Brian G., *Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Australia, North Ryde: BRI Australia Ltd. [verkkodokumentti, viitattu 10.09.09] Saatavissa: <http://bsei.ist.utl.pt/2007/News/NIR%20Food%20Review.pdf>
- [24] Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka, *Laboratorion analyysitekniikka*. Helsinki: Edita. 5., uudistettu painos.
- [25] NIR Technology Systems. [verkkodokumentti, viitattu 10.09.09]. Saatavissa: <http://www.nirtech.net/technology.htm>
- [26] *InfraXact™ Lab*. Käyttäjän opas 10010011/Rev 2.0
- [27] *ISIScan, Quick Start Guide for System II Analyzers*. Infracore International, USA. FOSS, Höganäs, Sweden. Versio 2.08. 2006
- [28] Scanco. Infracore-foss. [verkkodokumentti, viitattu 29.09.09]. Saatavissa: <http://www.scancotec.com/fossinfracore.html>
- [29] *InfraXact Chocolate calibration update at Cloetta Fazer Finland*. Application Report. FOSS, Tanska. Huhtikuu 2008.
- [30] Mittatekniikan keskus, *Laskuesimerkkejä mittausepävarmuuden määrittämisestä kemian laboratoriossa*. Helsinki: FINAS S33/1996. 1996.

