

**KÜLMUTAMIS- JA VANANEMISMARKERITE
MÄÄRAMINE AHVENA JA KOHA FILEES**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Birgit Maidla

Juhendaja: Kärt Reitel, KBFI

Kaasjuhendaja: Indrek Reile, KBFI

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Birgit Maidla

.....

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle/magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Kärt Reitel

.....

[allkiri ja kuupäev]

Juhendaja: Indrek Reile

.....

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Autorideklaratsioon	1
Annotatsioon	4
Abstract.....	5
Lühendite loetelu.....	6
Sissejuhatus.....	7
1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1. Kala kvaliteeti mõjutavad faktorid.....	8
1.1.1. Nukleotiidide laguproduktid vananemismarkeritena.....	8
1.1.2. Teisi vananemismarkereid	10
1.2. Külmutamismarkerid.....	13
1.3. Vananeva liha mõju tervisele.....	13
1.4. Meetodid kala kvaliteedi kontrolliks.....	14
1.4.1. Sensoorsed meetodid	14
1.4.2. Biokeemilised ja keemilised meetodid	15
1.4.3. Füüsikalised meetodid	16
1.4.4. Mikrobioloogilised meetodid.....	18
1.4.5. Bioonilised meetodid	18
1.4.6. Spektroskoopia meetodid.....	19
1.5. Tuumamagnetresonantsspektroskoopia meetod	19
2. Eksperimentaalne osa.....	20
2.1. Töö eesmärk ja ülesanded	20
2.2. Tuumamagnetresonantsspektroskoopia	20
2.2.1. Spinnkvantarv	20
2.2.2. Raadiosageduslik pulss.....	22
2.2.3. FID-signaali.....	22
2.2.4. Andmete töötlus	23
2.2.5. Keemiline nihe	24
2.3. Kala tuumamagnetresonants spektroskoopias.....	25
2.4. Materjalid ja meetodid	27
2.5. Proovide ettevalmistus	28
3. Tulemused ja analüüs	29
3.1. Integreerimine ja kohalik normaliseerimine.....	29
3.2. Kvalitatiivne analüüs	29

3.3.	Kvaliteedimarkerite analüüs ja kvaliteediindeksi määramine	29
3.3.1.	Lõhe kvaliteedimarkerid	29
3.3.2.	Koha kvaliteedimarkerid	34
3.3.3.	Ahvena kvaliteedimarkerid	35
3.4.	Külmutamismarkerid.....	38
3.4.1.	Lõhe külmutamismarkerid	38
3.4.2.	Koha külmutamismarkerid.....	39
3.4.3.	Ahvena külmutamismarkerid.....	40
	Kokkuvõte	43
	Allikad.....	45
	Lisad	49
	Lisa 1. Universal Laboratory AID homogenisaator, mille proovi sisaldav osa on jäävannis.	49
	Lisa 2. Vaakumfiltersüsteem, 1 – paberfilter, 2 – vaakumsüsteem, 3 – homogeniseeritud proov jäävannil.....	50
	Lisa 3. Kuuljahvati	51
	Lisa 4. Kuuljahvati plokk koos proovidega jääl.....	52
	Lisa 5. Kohafilee paralleelid steriilsetes topsides.....	53
	Lisa 6. Ependorfid lõhe ja ahvena uhmerdatud proovidega TKA lahuses ning teraskuulidega	54
	Lisa 7. Ependorfid ahvena ja lõhe proovidega peale homogeniseerimist ja tsentrifuugimist.....	55
	Lisa 8. Spektrid erineva homogeniseerimise meetodil valmistatud lõhe proovidest.....	56

Annotatsioon

Kalade kvaliteeti mõõdetakse erinevate meetoditega, nukleotiidide laguproduktide hulga mõõtmine ja selle järgi K-indeksi arvutamine üks detailsemaid. K-indeksi arvutamiseks on vähe kasutatud TMR tehnoloogiat ning paljude Eestis leiduvate kalaliikide K-indeksi analüüsi ei ole läbi viidud.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on anda ülevaade kvaliteedimarkeritest ja külmutamismarkeritest ning nende analüüsimise meetoditest, põhjalikumalt kirjeldatakse TMR tööpõhimõtet. Eksperimentaalse töö eesmärk on kontrollida varasemates lõhe analüüsivates töodes kasutatud meetodite korratavust lõhel ning kohandatavust ahvena ja koha analüüsimise jaoks.

Lõhe ja ahvena fileedega viidi läbi vananemise katse, milles 14 päeva jooksul peale ostmist või fileerimist valmistatud proove tuumamagnetresonantsspektromeetris (TMR). Saadud spektreid analüüsiti kirjanduses leiduvate referentstabelite abil ning neis tuvastati kvaliteedimarkerid ja arvutati K-indeks. Koha fileest valmistatud prooviga vananemiskatset läbi ei viidud, sest proov oli liiga riknenud.

Külmutamismarkerite mõõtmiseks asetati lõhe, koha ja ahvena fileed ööpäevaks erinevatele temperatuuridele: -20 °C, -40 °C ja -80 °C. Proove mõõdeti enne ja peale külmutamist TMR spektromeetris, saadud spektreid analüüsiti kirjanduse abil. Külmutamismarkerid tuvastati lõhe ja ahvena 0 ja 3. päeva proovides, 7. päevaks olid mõlemad degradeerunud.

Kokkuvõtteks leiti, et lõhe varem uurinud tööde meetodite abil õnnestus ahvena ja koha filee analüüsimine. Lõhe ja ahvena kvaliteedi-indeksid muutusid sarnaselt, kuid ahvena kvaliteet langes kiiremini. Ahvena värskuse hindamiseks kvaliteedi-indeksi põhjal tuleb luua kriteeriumid kvaliteedi-indeksile, mis korreleeruksid sensoorsete näitajatega. Külmutamismarkerite analüüsil järeldati, et lõhe ja ahvena filees saab neid markereid mõõta 3 päeva jooksul peale sulatamist olenemata külmutamistemperatuurist.

Abstract

The quality of fish is typically measured using different methods, one of them being the K-index, which describes the change of nucleotide metabolites. Out of all the different techniques used to measure the quality of fish, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy hasn't been used to determine the K-index or to analyse fish species native to Estonia.

The primary aim of this dissertation is to verify the reproducibility of the NMR method that has been used to measure the K-index of fresh salmon and whether this method can be applied to measure the K-index of fresh perch and zander. The secondary aim of this dissertation is to verify the reproducibility of the NMR method that has been used to determine the differences between fresh and thawed salmon and whether this method can be applied to determine the differences between fresh and thawed perch and zander. The objective of this dissertation is to give an overview of different fish metabolites and the methods used to evaluate freshness and quality of fish and fish muscle with a focus on NMR.

Two experiments were conducted for salmon, perch and salmon to measure the K-index and to determine the differences between fresh and thawed fish. For the freshness experiment, salmon muscle was kept at 4 °C and perch muscle at 0 °C for 14 days. NMR spectra were acquired and analysed and K-index was found. Zander fillet appeared to be too degraded on the day of purchase, therefore K-index was not found for zander. The differences between fresh and thawed salmon and perch fillet were determined at three different freezing temperatures: -20, -40 and -80. The differences were not found in zander fillet.

In conclusion, the NMR methods for measuring the K-index and determining the difference between fresh and thawed fish were successfully used to analyse salmon and perch. Perch was found to degrade quicker than salmon which was confirmed with the changes of the K-index value.

Lühendite loetelu

ADP	adenosiindifosfaat
AMP	adenosiinmonofosfaat
Asp	aspartaat
ATP	adenosiintrifosfaat
BA	biogeensed amiinid
DMA	dimetüülamiin
FID	<i>free induction decay</i>
HPLC	kõrg-surve vedelikkromatograafia
HSI	hyperspectral imaging
IMP	inosiinmonofosfaat
Ino	inosiin
KIM	kvaliteediindeksi meetod
Phe	fenüülalaniin
RF	<i>radio frequency</i> ehk raadiosagedus
SSO	<i>special spoilage organisms</i> ehk erilised riknemise organismid
TKA	trikloroäädikhape
TMA	trimetüülamiin
TMAO	trimetüülamiinoksiid
TMR	tuumamagnetresonants
TSP	deutereeritud 3-(trimetüüllsilüül)propioonhape naatriumisool
TVB-N	<i>total volatile basic nitrogen</i> ehk kogu aluseline lenduv lämmastik
Tyr	türosiin
Vis/NIR	<i>visible or near-infrared spectrometry</i> ehk nähtav või infrapuna-lähedane spektromeetria

Sissejuhatus

Kala on inimeste toidulaua populaarne toiduaine, mida soovitatakse tarbida kolm korda nädalas. Kalades on olulisi toitaineid nagu asendamatud rasvhapped, valgud ning D- ja B-vitamiinid. Enne toidulauale jõudmist on vajalik, et järgitaks toiduohutuse reegleid ning kasutataks korrektsed käitlemis- ja säilitamisvõtteid. Kala kvaliteet langeb suhteliselt kiiresti, seega on tarbija õiglase kohtlemise ning ohutu tarbimise seisukohalt oluline kvaliteeti kontrollida. Kvaliteeti kontrollitakse erinevaid biokeemilisi markereid ja füüsikalisi tunnuseid analüüsides.

Biokeemiliste markerite ehk kvaliteedimarkerite kontsentratsioonid muutuvad kala roiskumise käigus. Nende kontsentratsioonide muutuse jälgimisel saab kindlaks teha kala säilivusaja ning püügist möödunud aja. Külmutamismarkerid on keemilised ühendid, mis tekivad kalas paari päeva jooksul peale külmutamist ja üles sulamist. Külmutamismarkerite olemasolu hindamine on oluline kaubanduses oleval kalal märgitud teabe kontrollimiseks ning pettuste leidmiseks ja ennetamiseks.

Käesolevas töös antakse ülevaade erinevatest kvaliteedi- ja külmutamismarkeritest ning nende rollist kala füsioloogias. Lisaks kirjeldatakse erinevaid kasutuses olevaid meetodeid markerite analüüsimiseks ning nende kasutamise eeliseid ja puuduseid. Üheks tehnoloogiaks kala kvaliteedi- ja külmutamismarkerite analüüsimisel on tuumamagnetresonantspektroskoopia, kuid seda ei ole paljude Eestis leiduvate kalaliikide analüüsimiseks kasutatud. TMR tööpõhimõtet kirjeldatakse käesoleva töö eksperimentaalses osas.

Lisaks kirjeldatakse töö eksperimentaalses osas kala TMR spektreid ning lõhe, koha ja ahvenaga läbi viidud katseid. Lõhe ja ahvena fileedega viidi läbi vananemise katse, mille käigus jälgiti kvaliteedimarkerite hulga muutust proovis ja leiti värskust iseloomustav K-indeks. Koha fileest valmistatud proovi mõõdeti TMR spektromeetris vaid ostmise päeval, sellega vananemiskatset läbi ei viidud.

Külmutamismarkerite mõõtmiseks viidi lõhe, koha ja ahvena fileed ööpäevaks erinevatele temperatuuridele: -20 °C, -40 °C ja -80 °C. Sulatamisest kahe ja kuue päeva möödumisel mõõdeti proove TMR spektromeetrial ning saadud spektreid analüüsiti kirjanduse abil.

Käesoleva töö eesmärgiks on kontrollida varem TMR abil lõhes leiduvaid kvaliteedi- ja külmutamismarkereid analüüsitud tööde korratavust ning kohandatavust Eestis leiduvatele kalaliikidele nagu koha ja ahven.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Kala kvaliteeti mõjutavad faktorid

Kala ja kalatooted riknevad suhteliselt kiiresti, mistõttu on nende ohutu käitlemise ja tarbimise jaoks vaja tunda riknemise protsesse ja tunnuseid. Nende protsesside tundmaõppimiseks ja kalatoodete kvaliteedi ehk värskuse kontrollimiseks on tarvis kasutada ja välja töötada objektiivseid, efektiivseid ning ökonoomseid meetodeid. Kasutuses olevad kvaliteedi kontrolli meetodid põhinevad kalas aset leidvatel bioloogilistel ja keemilistel muutustel.

Inimsilmale nähtavad on füsioloogilised muutused, mis toimuvad kalas peale surma nagu värvuse ja tekstuuri muutused. Tekstuuri muutuseid põhjustavad surmajärgsed protsessid on lõdvestumine, *rigor mortis* ehk kangestumine ja taaslõdvestumine. Need muutustest on seotud muuhulgas kala surma-eelse käitlemisega. (J.-H. Cheng et al., 2014)

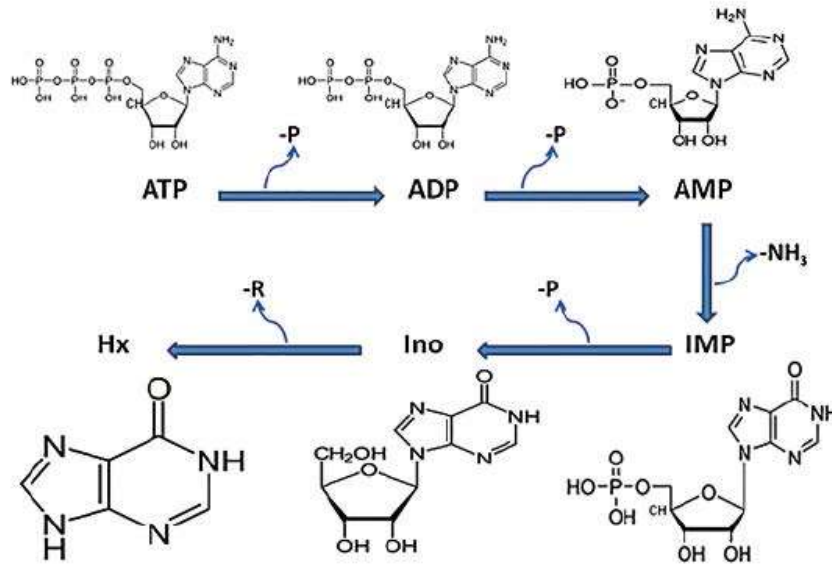
Kala lihase lagunemist ehk biokeemiliste lagunemisreaktsioonide produktide tekkimist saab mõõta päevade lõikes, mis võimaldab säilivusaja määramist ning värskuse hindamist. Produktide analüüsimisel tuleb arvestada, et erinevad ühendid mängivad riknemise protsessis erinevat rolli. Need ühendid saab jagada gruppidesse nende keemilise struktuuri järgi: valgud, lipiidid, mineraalid, süsivesikud. Suuremad makromolekulide grupid kalas ja nende keskmine sisaldus on toodud tabelis 1.1. Kalas leidub vähe süsivesikuid ning palju lipiide ja valke. Analüüsivad ühendid lagunevad autolüütiliselt ehk kudedes leiduvate ensüümide abil ja mikroobse lagundamise teel. Käesolev peatükk kirjeldab olulisemate metaboliitide lagunemist ning rolli kala värskuse ja kvaliteedi hindamisel.

Tabel 1.1. Keskmised toitainesisaldused kalas. (Alam, 2007)

Aine	Väärtus, %
Vesi	65-90
Valgud	10-22
Lipiidid	0.5-20
Tuhk (mineraalid)	0.5-5

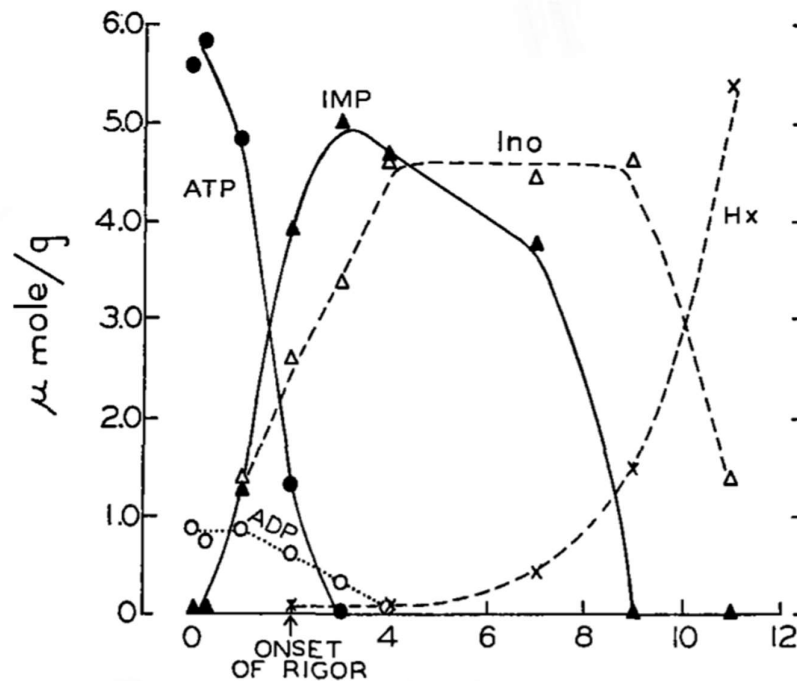
1.1.1. Nukleotiidide laguproduktid vananemismarkeritena

Kala säilitamise käigus toimuvad keemilised reaktsioonid, mille lähteainete ja saaduste kontsentratsiooni muutuste jälgimisega, on võimalik kindlaks teha selle värskus. Üheks selliseks aineks, mis järk-järgult laguneb, on adenosin trifosfaat ehk ATP. Nukleotiidide nagu adenosini trifosfaat vormid on rakus toimuvate keemiliste protsesside energiaallikaks ning üheks DNA ja RNA sünteesi lähteaineks. ATP järk-järgulised laguproduktid on adenosin difosfaat (ADP), adenosin monofosfaat (AMP), inosin monofosfaat (IMP), inosin (Ino) ja hüpoksantiin (Hx) (joonis 1.1). Inosin monofosfaadi kontsentratsiooni langust ja hüpoksantiini kontsentratsiooni tõusu säilitamise perioodi vältel on jälgitud mitmes uurimistöös. (Ciampa et al., 2012; Shumilina et al., 2015)



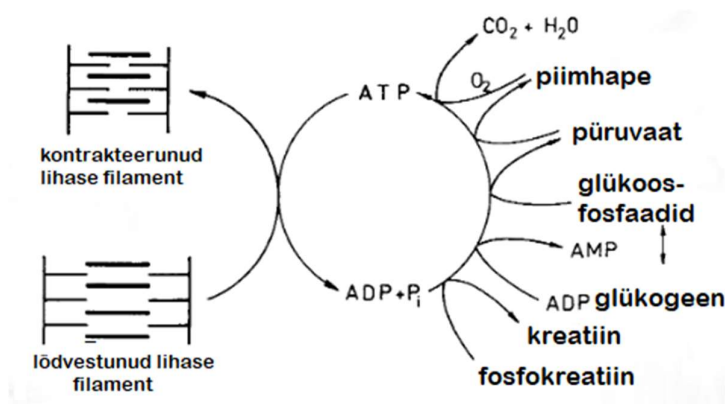
Joonis 1.1. ATP lagunemine kõrgema energiaga ühenditest madalama energiaga ühenditeks. (allikas)

ATP metaboliitide kontsentratsioonid muutuvad kala säilitamise käigus, seoses kõrgema energiaga ühendite biokeemilisel lagunemisel nagu on näidatud joonisel 1.2. Fraser *et al.* 1967 uurisid tursa lihas peale surma toimuvaid muutuseid, vältides surmaeelset rapsimist ja ATP varude ära kulutamist. Palju rapsinud kala lihases on vähem ATP-d ja suhkruid, rohkem piimhapet kui rahulikus kalas. Need muutused mõjutavad kala maitset ja tekstuuri, samuti säilivusaega. Seetõttu mõjutab kvaliteeti peale säilitamistingimuste ka püügiaegne kohtlemine. (Fraser et al., 1967)



Joonis 1.2. ATP ja selle laguproduktide kontsentratsiooni muutus ajas 0 °C juures. (Fraser et al., 1967)

Püüdmisel tuleb arvestada, et elus kala lihases toimub lihase lõdvestumise ja kokkutõmbumise jaoks ATP-ga seotud reaktsioone, mis on seotud metabolismi energia tootmise ja tarbimisega (joonis 1.3). Rapsides kulutab kala lihaste energiavarud, kuid ei jõua neid enne surma taastada. Seetõttu kiirenevad surmajärgsed lagunemisreaktsioonid.



Joonis 1.3. Lihase lõdvestumise ja kokkutõmbumise seotud metabolism (Sikorski, 1990)

Lisaks püügiviisile mõjutab liha lagunemist ka säilitamistemperatuur. Temperatuur mõjutab säilivusaega, sest keemiliste reaktsioonide kiirused on erinevatel temperatuuridel erinevad. Selle põhimõtte järgi töötasid Shumilina *et al.* (2015) välja mudeli, mis jagab erinevatel päevadel tehtud lõhe proovid säilitamistemperatuuri ja surmast möödunud aja järgi gruppidesse. ATP laguproduktide kontsentratsioon tõuseb 4 °C juures kiiremini kui 0 °C juures. Seega on võimalik ATP laguproduktide kontsentratsiooni mõõtmisega kindlaks teha säilitamistemperatuur. Nad leidsid, et üle kahe nädala jää sees seisnud lõhefilee markerite kontsentratsioonid on sarnased kuni kaks nädalat 4 °C juures seisnud fileega. Seega Shumilina grupi mudel töötab vaid sellise lõhe analüüsimiseks, mille püüdmisest on möödas vähem kui 14 päeva, sest sellest ajast kauem säilitatud lõhesid ei olnud võimalik eristada säilitamistemperatuuride järgi. (Shumilina *et al.*, 2015)

Lähtudes ATP järk-järgulisest lagunemisest hinnatakse kala kvaliteeti ja värskust produktide kontsentratsioonide kaudu. Nende kvaliteedimarkerite analüüsimisel on võimalik hinnata kala säilivusaega ning seniseid säilitamistingimusi.

1.1.2. Teisi vananemismarkereid

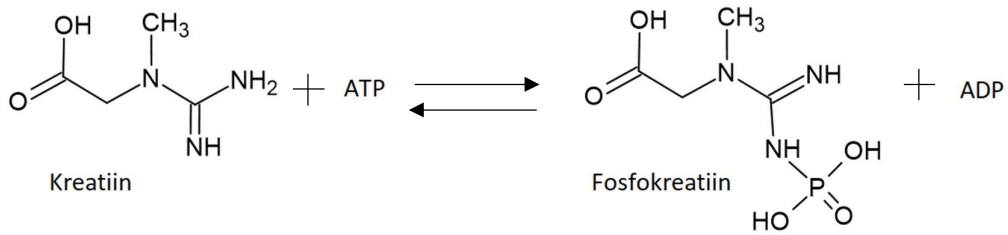
Peale nukleotiidide laguproduktide analüüsitakse värskuse hindamiseks ka teisi rakkude eluks vajalike ühendite lagunemisprodukte. Need ühendid makromolekulide gruppidesse, mida kalas kõige suuremas hulgas leidub. Valgud lagunevad esialgu aminohapeteks. Vabu aminohappeid leidub kalas erinevas kontsentratsioonis (näidatud tabelis 1.2), kusjuures nende kontsentratsioon langeb hoidmise käigus. Vabad aminohapped degradeeruvad lenduvateks lämmastikühenditeks ja biogeenseteks amiinideks. Valgud ja aminohapped lagunevad nii mikroobse tegevuse kui autolüütiliste protsesside käigus.

Tabel 1.2. Aminohapete keskmine sisaldus kalades nagu tursk, kilttursk, söekala, säga, merilesta, hiidlest, makrell jms. (Sikorski, 1990)

Aminohape	Keskmine % N6.25	Vahemik % N6.25
Alaniin	7.91	7.7-8.8
Arginiin	5.95	5.7-6.3
Asparagiinhape	10.34	9.9-10.9
Tsüstiin	1.04	0.9-1.1
Glutamaat	14.91	14.3-15.4
Glütsiin	4.60	4.2-5.4
Histidiin	2.01	1.8-2.2
Isoleutsiin	6.03	5.5-6.3
Leutsiin	8.41	7.8-9.1
Lüsiin	8.81	7.9-9.5
Metioniin	2.97	2.8-3.2
Fenüülalaniin	3.92	3.7-4.1
Proliin	3.52	3.3-3.7
Seriin	5.14	4.6-6.0
Treoniin	4.62	4.4-5.0
Trüptofaan	0.96	0.9-1.0
Türosiin	3.27	3.1-3.4
Valiin	5.95	5.6-6.2

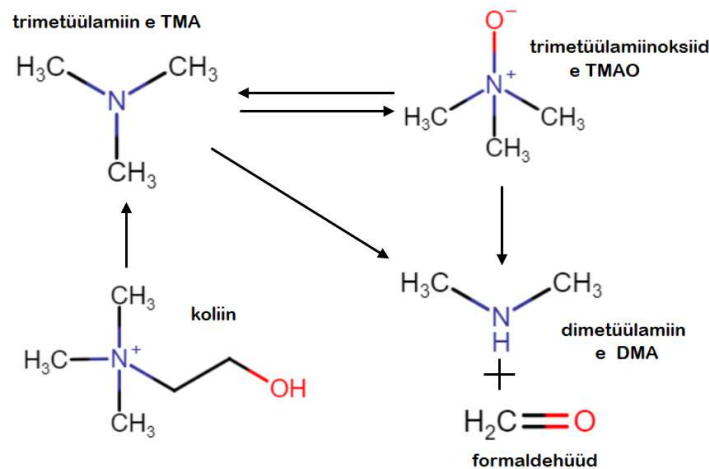
Samuti langeb säilitamise ajal erinevate suhkrute nagu maltoosi, glükoosi, galaktoosi ja mannoosi kontsentratsioon. Nende lagunemisel tõuseb piimhappe, äädikhappe, suktsiinhappe, etanooli ja 2,3-butaandiooli kogus kas ensümaatilise lagunemise või mikroobse fermenteerimise käigus. (Sikorski, 1990)

Lisaks suhkrutele on lihases oluline energiamolekul kreatiin. Kreatiin vahendab ADP fosforüleerimist ehk ATP tootmist ADP-st. Fosfokreatiin talletab fosfaatrühmas keemilist energiat, mille kannab ADP-le fosforüleerimise käigus (joonis 1.4). Kreatiini/fosfo-kreatiini on seetõttu lihases märgatavas koguses. Surmajärgselt hakkab kreatiini hulk lihases langema autolüütiliste protsesside ja mikroobse lagunemise käigus. Seega kreatiini kontsentratsiooni muutus lihases korreleerub kala riknemisega. (Sikorski, 1990)



Joonis 1.4. Kreatiin ja fosfokreatiin.

Peale makromolekulide lagunemise, analüüsitakse ka lämmastikuühendeid. Kalade lihastes leidub trimetüülamiinoksiidi (TMAO), mis kaitseb lihasvalke kõrge rõhu mõjude eest (Leisner, Gram, 2014). Kala lagunemisel toimub trimetüülamiinoksiidi lagunemine trimetüülamiiniks (TMA), mis on kalale iseloomuliku tugeva lõhna allikas, ja formaldehüüdiks. TMAO kontsentratsioon elus kalas tõuseb tema vanuse ja suuruse kasvuga ning langeb keskkonna soolsuse langusega (van Waarde, 1988). TMA võib tekkida ka koliinist bakteriaalse lagunemise käigus nagu näidatud joonisel 1.5. TMAO ja TMA kontsentratsiooni analüüsimisel kala lihases saab hinnata kala kvaliteeti.



Joonis 1.5. Koliini lagunemise käigus tekivad TMA, TMAO, DMA ja formaldehüüd.

Tavaliselt toimub TMAO redutseerimine bakterite anaeroobse hingamise tõttu, produktiks TMA. TMAO toimib bakterite raku hingamisel elektronide akseptorina (Rodger & Hastings, 1984). Erandiks on tursklaste sugukonna kalad (nt tursk, kilttursk, söekala), kes toodavad ensüümi TMAO-aas ehk TMAO demetülaas. TMAO-aas lagundab TMAO dimetüülamiiniks (DMA) ja formaldehüüdiks. Formaldehüüd tekitab lihasvalkude vahel ristsidemeid, muutes lihase sitkemaks ning soodustades veekadu. Sitke ja kuiv filee ei ole tarbimiseks atraktiivne, seega tasub kasutada meetodeid formaldehüüdi moodustumise aeglustamiseks nagu säilitamine temperatuuril alla -30°C . (Gill et al., 1979; Huss, 1995)

Kalaliha vananemist saab jälgida mitmete keemiliste ühendite kaudu, mis mängivad rolli liha kvaliteedi langemises. Käesolevas peatükis nimetatud ühendite lagunemiseid ei ole selgelt järk-järgulised nagu ATP lagunemisreaktsioonid.

1.2. Külmutamismarkerid

Madalaid temperatuure kasutatakse kala säilitamiseks kahel põhjusel: bakterite kasvu inhibeerimiseks ning ensüümide deaktiveerimiseks, mõlemad mängivad rolli orgaanilise massi lagunemises. Madalal temperatuuril – alla 0 °C – tekivad veekristallid, mis lõhuvad rakuseinu ja organelle vabastades ensüüme ja muid keemilisi ühendeid. Seetõttu on peale üles sulatamist kala lihas toimuvad reaktsioonid veidi erinevad sellise kala liha metabolismist, mida ei ole sügavkülmutatud. Läbinisti külmutatud ja sulatatud lihas leidub aspartaati (Asp), fumaraati ja kõrgemas kontsentratsioonis fenüülalaniini (Phe) erinevalt 0 °C juures hoitud lihast (Shumilina et al., 2020). Nii fumaraadi kui aspartaadi kogus tõuseb alates esimesest päevast peale sulatamist kuni kolmanda päevani ning seejärel langeb nullini. Külmutamata lihas on mõlema kontsentratsioon väga madal ning langeb hoidmise vältel. Phe leidub nii sulatatud kui külmutamata lihas, kuid külmutatud-sulatatud lihas on selle kontsentratsioon märgatavalt kõrgem. (Shumilina et al., 2020)

Kala külmutamine pikendab säilivusaega ja seega vähendab toidu raiskamist. Külmutatud ja värskel lihal on tarbija jaoks erinev väärtus, lisaks on oluline toodetele tõese teabe märkimine. Seega tarbija petmise vähendamiseks ja ennetamiseks on vajalik külmutamismarkerite sisalduse kontrollimine.

1.3. Vananeva liha mõju tervisele

Enamasti mõjutavad hoidmise käigus tekkivad ühendid kala lõhna, maitset, välimust ja tekstuuri, kuid ei ole ohtlikud. Vananevas kalas leidub teatud säilitamise aja järel biogeenseid amiine, mis tekkivad aminohapete dekarboksüleerumisel. Biogeensed amiinid on tavaliselt tugeva lõhnaga bioaktiivse toimega ained, mis mängivad organismis olulist rolli närvisüsteemis, veresoontes ja aju töös. Nende üleliigne hulk on organismile kahjuliku mõjuga. Biogeensed amiinid tekkivad kala lihas hoidmise käigus, mistõttu seisnud kala tarbimine võib põhjustada organismis tugevaid reaktsioone. (Rodriguez et al., 2014)

Biogeensetest amiinidest leidub kalas kõige rohkem histamiini, putrestsiini, kadaveriini, türamiini, trüptamiini, 2-fenüületüülamiini, spermiini, spermidiini ja agmatiini (Özogul, Özogul, 2006). Erinevalt teistest biogeensetest amiinidest on histamiin lõhnatu. Histamiin võib põhjustada allergilisi reaktsioone. Lisaks, histamiin, dopamiin, serotoniin ja türamiin on psühhotropse mõjuga. Putresiin ja kadaveriin mängivad rolli toidumürgistuses (Önal, 2007). Kala ohutu tarbimise jaoks on oluline korrektne säilivusaja kommuniqueerimine ning õigete säilitamistingimuste tagamine.

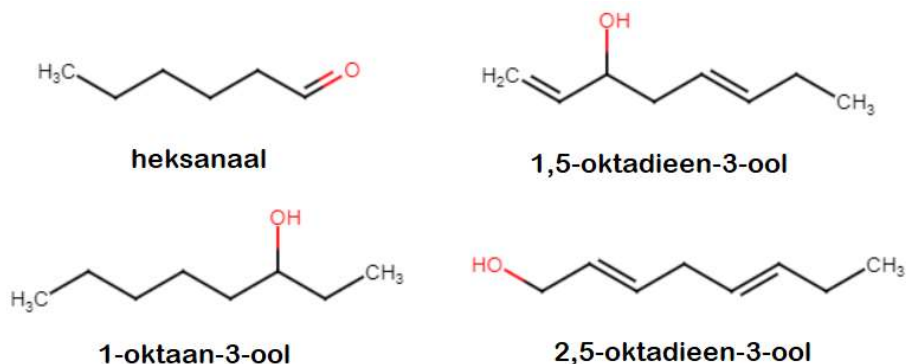
1.4. Meetodid kala kvaliteedi kontrolliks

Kala toodete kvaliteedi määravad traditsiooniliselt nende välimus, värskuse aste ja toiduohutus bakterite, parasiitide ja kahjulike kemikaalide puuduse näol. Nende omaduste hindamiseks on vaja objektiivseid meetodeid. Meetodite valimisel tuleb arvesse võtta nende aja- ja ressursikulukust, kättesaadavust ning sobilikkust konkreetsele kala tootele. Kvaliteedi hindamise meetodid võib üldiselt jagada sensorseteks ja instrumentaalseteks. Kuna lõplik hinnang toote kohta jääb tarbija teha, oleks hea, kui kontrolli tulemused korreleeruksid sensorsete kvaliteedinäitajatega.

1.4.1 Sensorised meetodid

Sensorised meetodid hõlmavad vaatlust, kompimist ning lõhna hindamist. Nende omaduste objektiivsemaks hindamiseks on välja töötatud erinevad kvaliteedi hindamise meetodid. Neist populaarseimad on kvaliteediindeksi meetod (KIM) (ingl k *quality index method* ehk QIM) ja Torry skeem. Mõlemad meetodid on liigispetsiifilised ning hinde arvutamisel lähtutakse referentstabelitest. Kala värskuse hindamisel võetakse arvesse lõpuste, silmade, soomuste, sisikonna, naha, lihase värvi, tekstuuri ja lõhna. Üldiselt korreleerub madal kvaliteedi skoor mikroobse rikkumisega. (Archer, 2010; Wu et al., 2019)

Värvuse muutus toimub kalas müoglobiini ja hemoglobiini oksüdeerumisel ning lämmastikühenditega reageerimisel, mille tulemuseks on pruunid ühendid. Kalale iseloomuliku värse kala lõhna tekitavad karbonüülühendid ja kuue, kaheksa ja üheksa süsinikuga alkoholid - heksanaal, 1-oktaan-3-ool, 1,5-oktadieen-3-ool ja 2,5-oktadieen-1-ool, mille struktuurid on näidatud joonisel 1.6. Alkoholide hulga suurenemisel ja lühikese ahelaga estrite tekkimisel muutub kala lõhn nõrgemaks. Happeline, piimjas, kopitanud lõhn tekib biogeensete amiinide ja lenduvate lämmastikuühendite tõttu. Lagunemisega seotud lõhn tekib aminohapete tsüsteiini ja metioniini lagunemisel tekkivatest vävliühenditest. Roiskunud kalale iseloomuliku lõhna allikaks on aminohapete lagunemise produktid indool, putrestsiin ja kadaveriin. (Sikorski, 1990)



1.6. Heksanaali, 1,5-oktadieen-3-ooli, 1-oktaan-3-ooli ja 2,5-oktadieen-3-ooli struktuurid.

Sensoorse kvaliteedi hindamise meetodid KIM ja Torry skeem annavad hinnangu terve kala omadustele, seega ei sobi filee ja töödeldud toodete hindamiseks. Mõlema meetodi hinnete järgi saab arvutada, mitu päeva on kala jääl hoitud ning KIMI skoori kasutatakse säilivusaja hindamiseks. (Archer, 2010)

Sensoorse hindamise eeliseks on kiirus ja proovi puutumatus – proov säilib esialgsel kujul. Sensoorne kvaliteedi hinne on otseselt seotud toote atraktiivsusega tarbija jaoks. Meetodi puuduseks on treenitud eksperdi vajadus ja inimestele omane subjektiivsus. (Aursand et al., 2009)

1.4.2 Biokeemilised ja keemilised meetodid

Biokeemilised ja keemilised meetodid põhinevad molekulide keemilistel omadustel nagu molekulidevaheliste sidemete loomise võime, faasiüleminekud, molekulmass, ionide moodustamise võime. Seni on kalatoodete värskuse hindamiseks mõõdetud lenduvaid lämmastikühendeid (*total volatile basic nitrogen* ehk TVB-N) nagu TMA, DMA, ammoniaak jm lämmastikühendid; biogeenseid amiine (BA); nukleotiidide metaboliite; etanooli ja lipiidsete hüperoksiidide peroksiidarv (*peroxide value*). (Wu et al 2019)

TVB-N ühendid tekivad riknemise hilisemas staadiumis valkude, aminohapete jm kõrgemat järku lämmastikühendite lagunemisel. TMAO ei leidu mageveekalades, seega nende kvaliteedi hindamiseks mõõdetakse BA ja TVB-N. DMA abil saab värskust määrata vaid tursklaste sugukonda kuuluvates liikides.

Lenduvate lämmastikühendite ja biogeensete amiinide mõõtmiseks kasutatakse muuhulgas aurudestillatsiooni; mikrodifusiooni; gaas-, vedelik-, õhukese kihi, kation-vahetuse kromatograafiat ja mass-spektromeetria. Need meetodid on aeganõudvad ja ressursikulukad, kromatograafid vajavad põhjalikku kalibreerimist, mass-spektromeetris interakteerub proov instrumendiga, muutes korduvad mõõtmised ebatäpseks. Nii kromatograafia kui MS meetodid hävitavad proovi. (Mattsson et al., 2018)

ATP metaboliitide kaudu kvaliteedi hindamiseks on loodud K-indeks, valem 1.1, mis hõlmab kõikide ATP laguproduktide kontsentratsioone proovis (Ciampa et al., 2012; Saito et al., 1959). Luong et al., 1992 leidsid, et osade liikide kvaliteedi hindamiseks sobib H-indeks (valem 1.2), milles ei arvestata ATP, ADP ja AMP kontsentratsioone.

$$K = \frac{[Ino]+[Hx]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]+[IMP]+[Ino]+[Hx]} \times 100\% \quad (1.1)$$

$$H = \frac{[Hx]}{[IMP]+[Ino]+[Hx]} \times 100\% \quad (1.2)$$

K-indeks on pöördvõrdeliselt seotud kala kvaliteediga, kuid kvaliteeti määravad vahemikud on liigispetsiifilised. K-indeksi ülemine väärtus lõhele on 70-80%, suurepärase kvaliteediga lõhele alla 40-50% (Erikson et al., 1997). Toore tuunikala K-indeksile kehtivad sellised kriteeriumid: hea kvaliteet kuni 18,7%, rahuldav, restoranikvaliteet kuni 52%. K-indeksi väärtus tõuseb külmaveekalades ja tumeda lihaga kalades kiiremini. (Sikorski, 1990)

ATP metaboliidid lagunevad suhteliselt kiiresti. K-indeks sobib kvaliteedi määramiseks riknemise varases staadiumis. Metaboliitide kontsentratsiooni proovis mõõdetakse traditsiooniliselt kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) meetodil, ensüümidega kaetud testribade või ensüümidega kaetud elektroodidega. HPLC on aeganõudev ja ressursikulukas, testribad ja elektroodid on vaid kvalitatiivse väärtusega vahendid. (Wang et al., 2015)

Peale lämmastikuühenditele ja ATP metaboliitidele on kalades ka suur hulk küllastumata rasvhappeid, mis lagunevad kergesti alifaatseteks hapeteks, aldehyüdideks ja ketoonideks. Lipiidide oksüdeerumine on märk kala lagunemisest. Selle hindamiseks mõõdetakse tiobarbituurhapet ja peroksiidaru spektrofotomeetria meetodil. Spektrofotomeetria sobib üksikute ühendite sisalduse analüüsimiseks proovis, kuid mitte keeruliste segude. Erinevat tüüpi ühendite analüüsimiseks on tarvis erineva tundlikkuse ja lainepikkuse vahemikuga spektrofotomeetrit, mistõttu võib erinevat tüüpi segude analüüsimine kallis olla. (Mendes et al., 2009)

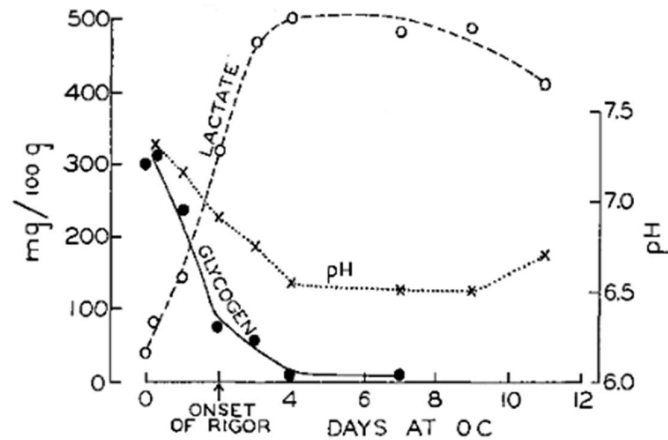
Lisaks riknemisega kaasnevate ühendite mõõtmisele hinnatakse üldiseid keemilisi omadusi nagu niiskus-, lipiidide, valgu- ja tuhasisaldus. Need omadused ei näita selgelt kala värskust ja säilivusaega.

Biokeemiliste ja keemiliste meetodite eeliseks sensorsete meetodite ees on võimalus seada kvalitatiivseid standardeid. Samas varieeruvad kalade keemilised omadused liikide, püügiaja ja -koha ning toitumistingimuste tõttu. Lisaks sobivad erinevate kala- ja mereloomade liikide jaoks erinevad meetodid, mis teeb keeruliseks õige meetodi valimise. Liikideülese standardi loomine on seega keeruline.

1.4.3 Füüsikalised meetodid

Füüsikaliste meetodite hulka kuuluvad elektrijuhtivuse, pH, tekstuuri ja värvuse mõõtmine. Zhu et al 2013 leidsid seose jämepea (*Aristichthys nobilis*) liha takistuse, pH ja tekstuuri vahel hoidmise käigus (Zhu et al., 2013). Filee elektrijuhtivusel on selge seos surmajärgsete muutustega, kuid sõltub, mis liiki kala on ning sellest, kas kala on veristatud või veristamata, vigastatud, fileeritud või külmutatud. (Sikorski, 1990)

Lihase pH muutub suhkrute lagundamise ja sellejärgse hapete hulga tõusu tõttu. Joonisel 1.7 on näidatud glükogeeni, piimhappe ja pH muutused tursa lihases. Glükogeen on glükoosi jääkidest koosnev polüsahhariid, mis hüdrolüüsumisel laguneb glükoosiks. Piimhappe hulga tõus peatub glükogeeni kontsentratsiooni 0-ni langemisel. Samal ajal pH langus ja stabiliseerumine korreleerub piimhappe hulga tõusu ja stabiliseerumisega.



Joonis 1.7. Glükogeeni, piimhappe ja pH muutused tursa lihases 0°C juures. (Fraser et al., 1967)

Tekstuuri mõõtmisel lähtutakse surmajärgsetest etappidest, millest halvima mõjuga kala kvaliteedile on surmajärgne kangestumine. *Rigor mortis* on lihaste kokkutõmme, kuid toimub ATP lagunemise tõttu. Lihaskiudude lõdvestunud olekus hoiab ATP müosiini ja aktiini filamendid lahus. ATP ja filamentide vahelise sideme katkemisel libisevad filamendid üksteise vahele – toimub lihaskontraktsioon. Kohe peale surma on lihas lõtv ja elastne. Peale kangestumist, mis võib kesta mitu tundi kuni ööpäeva, järgneb lõdvestumine filamentide proteolüüsi tõttu – lihas on kaotanud elastsuse. (J.-H. Cheng et al., 2014)

Tekstuuri instrumentaalsel mõõtmisel hinnatakse läbitavust, kokkusurutavust, pinget ja lõigatavust. Enim kasutatakse Warner-Bratzler Shear Force Test (WBSFT) ja Kramer Shear Cell aparatuuri (Alizadeh et al., 2007). Tekstuuri mõõtmine on täpne ja sirgjooneline meetod kala liha kvaliteedi hindamiseks, samas mõjutavad liha tekstuuri nii surmaeelne ja -järgne käitlemine, säilitamistingimused, liik, vanus kui kasvukeskkond. Lisaks ei saa tekstuuri põhjal hinnata kala liha vanust ega säilivusaega.

Värvuse hindamiseks kasutatakse kolorimeetrit ning hinnatakse heledust, punasust, kollasust ja üldist värvimuutust. Kala värvuse muutused korreleeruvad KIM skooriga. Värvuse muutuse mõõtmine ei ole liikideülene meetod, lisaks mängivad rolli organismi kasvukeskkond, dieet, temperatuur ja hoiutingimused. (Olafsdottir et al., 2004)

Füüsikaliste meetodite eelis on proovide säilimine analüüsi käigus. Samas mõõdavad need üldisi omadusi, mis varieeruvad kalaliikide, kasvukeskkonna, vanuse ja säilitamistingimuste tõttu. Need meetodid sobivad kiireks ja pealiskaudseks analüüsiks, kuid mitte säilivusaja hindamiseks ja põhjalikumaks kvaliteedianalüüsiks.

1.4.4 Mikrobioloogilised meetodid

Mikrobioloogilised meetodid on teistega võrreldes kõige aeganõudvamad. Mikroobide arvu kasv korreleerub kala kvaliteedi langusega mitte-lineaarselt. Mikroobide arvu hinnatakse elusrakkude arvu loendamise (toores kalas max 10^6 CFU/g (Olafsdottir et al., 1997)) ja *special spoilage organisms* ehk SSO-de arvu loendamise (Mikš-Krajnik et al., 2016). SSO alla kuuluvad mõned gram-negatiivsed fermenteerivad liigid (*Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* ja *Vibrio*), kes eelistavad töötlemata külmaveekala, ja mõned gram-positiivsed psührofiilsed ja tiogeensed liigid (*Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* ja *Flavobacterium*), kes eelistavad jahutatud soojaveekala. (Sikorski, 1990)

Rakkude loendamiseks on erinevaid meetodeid, millest kõige aeglasem on elusrakkude loendamine. Selleks on vaja teha proovist külvi, sellest väljakülve ning oodata iga külvi kasvamist. Kiiremad meetodid on immunoensüümmeetod (ELISA), polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ja 16S rRNA järgmise generatsiooni ssekveneerimine. (Böhme et al., 2013) Need meetodid on ressursikulukad ning aeglasemad kui tööstuses kala kvaliteedi hindamiseks tarvis on.

1.4.5 Bioonilised meetodid

Biooniline tehnoloogia on suures plaanis üsna uus ning vajab veel täiustamist, kuid sel on suur potentsiaal asendada traditsioonilised kvaliteedi määramise meetodid. Ensümaatiline biosensor on väga selektiivne ning sobib keeruliste proovide analüüsiks. (Thakur & Ragavan, 2013)

Kvantitatiivseks analüüsiks nõuab ensümaatiline biosensor proovi ettevalmistust. Lisaks on enüümide tootmine kallis ning sensoriväline keskkond võib põhjustada nende deaktiveerumist. (Rotariu et al., 2016)

Elektrokeemiline biosensor on vähem tundlik ning vajab kõrget proovi puhtust. Elektrokeemiline biosensor töötab adsorptsiooni või elektro-katalüütilisel põhimõttel. Selle meetodi eelis on madal hind ja väiksem proovi ettevalmistuse aeg. (Peris & Escuder-Gilabert, 2009)

Elektroonilise nina tehnoloogia jäljendab inimese lõhnatundmise mehhanismi. See on kiire mõõteaja, laia tuvastusvahemikuga ja hea korratavusega meetod, mille jaoks ei ole tarvis proovi ette valmistada. Meetodi puuduseks on kõrge töötemperatuur – 250-500 °C – ja spetsiifiline gaasikeskkond. (Hui et al., 2012)

Kolorimeetritel sensoritel on täpsuse ja tundlikkuse eelis elektroonilise nina sensorite ees ning neid saab toota mobiilsete seadmete jaoks. Kolorimeetriteliste sensorite pinnal seonduvad lenduvad molekulid tugevate keemiliste sidemetega, seetõttu ei saa sensoreid taaskasutada. Kolorimeetrial põhinevad ka targa pakendi tehnoloogiad. (Domínguez-Aragón et al., 2018; Pacquit et al., 2006)

Elektrooniline keel on sarnane elektroonilisele ninale, kuid sobib vedelate proovide analüüsiks. Apetrei et al. 2013 näitasid, et e-keel sobib kala värskuse mõõtmiseks. (Apetrei et al., 2013).

Masin-nägemise meetod eristab muutusi vaid kala pinnal, mistõttu ei tuvasta riknemist lagunemise algfaasis. Bioonilised meetodid on kiired, mõned neist ei hävita proovi ning on objektiivsemad kui inimeste läbi viidavad sensoorsed meetodid (J. H. Cheng et al., 2013). Samas on neil arenguruumi ja need ei asenda veel traditsioonilisi meetodeid.

1.4.6. Spektroskoopia meetodid

Uuemad spektroskoopia meetodid on nähtava/infrapuna-lähedane (*visible/near-infrared* ehk Vis/NIR) spektroskoopia, *hyperspectral imaging* ehk HSI ja fluorestsents-spektroskoopia. Vis/NIR tuvastab varajasi bakteritest tingitud muutusi, kuid vajab mudelit erinevate säilitamistingimuste jaoks. (Sone et al., 2011)

HSI meetod liidab spektroskoopia ja piltdiagnostika parimad omadused. See tehnoloogia ei kahjusta proovi, HSI spekter visualiseerib proovi struktuuri ja keemilise koostise. (J. H. Cheng et al., 2013)

HSI ja fluorestsents-spektroskoopia tööstuses kasutuselevõtmiseks on vaja ulatuslikumat uurimistööd parimate lainepikkuste leidmiseks proovide jaoks. Seni on nende meetoditega analüüsitud väheseid liike. (Wu et al., 2019)

1.5. Tuumamagnetresonantsspektroskoopia meetod

Lisaks muudele spektroskoopia meetoditele on kalade metaboliitide analüüsimiseks kasutatud ka tuumamagnetresonants spektroskoopiat. Uuritud on erinevaid kalaliike nagu lõhe, tursk, tuunikala, boga, heik jm. Shumilina *et al.* ja Ciampa *et al.* on loonud tugeva aluse TMR spektroskoopia kasutamiseks kala kvaliteedi hindamiseks.(Ciampa et al., 2012; Shumilina et al., 2015)

Tuumamagnetresonantsspektroskoopial on eeliseid teiste spektroskoopiameetodite ees. TMR analüüs ei hävita proovi, seda saab säilitada ja korduvalt mõõta. Sisestandardite keemistemperatuur on suhteliselt madal, seega proovi on võimalik puhastada. TMR spektromeeter ei nõua kalibreerimist. Proovi ettevalmistamine on vähe aega nõudev. TMR pakub nii struktuurset kui kvantitatiivset infot proovi kohta, seega on võimalik tundmatuid ühendeid tuvastada. TMR puuduseks mass-spektromeetria ees on madalam tundlikkus, kuid MS ja TMR on komplementaarsed meetodid. (Brennan, 2014)

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärk ja ülesanded

Käesoleva töö eesmärk on kontrollida lõheliste perekonna kaladega läbi viidud TMR analüüsimeetodite kohandatavust teistele kalaliikidele – kohale ja ahvenale. TMR spektroskoopiaga analüüsiti kvaliteedi- ja külmutamismarkereid.

2.2. Tuumamagnetresonantsspektroskoopia

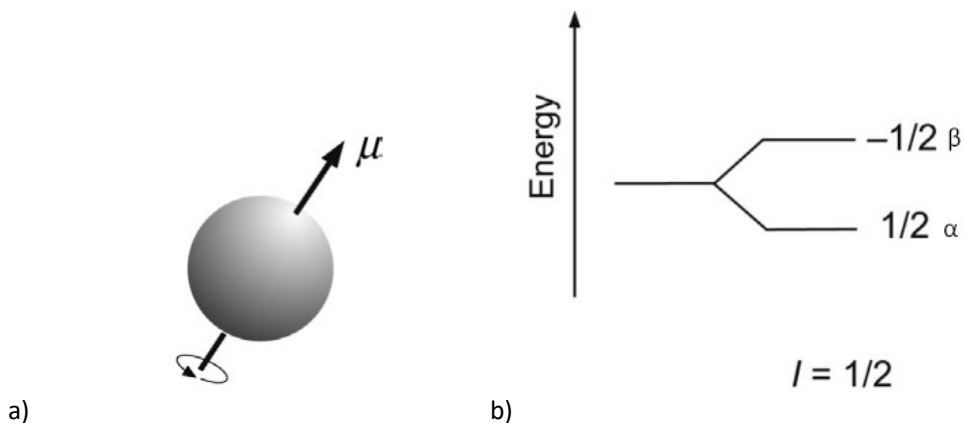
TMR on spektroskoopia tehnika, milles proov interakteerub tugeva magnetväljaga. Meetodi põhimõte tuleneb aatomituumade magnetilistest omadustest. Paaritu massiarvu või paaritu aatomiarvuga tuumad ehk tuumad, milles on paaritu arv prootoneid või neutroneid, omavad nullist erinevat spinni, mis annab neile magnetmomendi, mis omakorda annab vastasmõju väliste magnetväljadega. See-eest paarisarvu neutronite ja prootonitega tuumade spinn on 0, seega neid ei saa TMR abil mõõta. (Keeler, 2010)

2.2.1. Spinnkvantarv

Aatomituumasid iseloomustatakse spinnkvantarvuga $I=n/2$, kus n on positiivne täisarv. Spinn kirjeldab tuuma nurkmomenti, mis on jääv suurus (Joonis 2.1a). Spinni orientatsioon ruumis võib olla erinev, kuid väärtus sõltub ainult tuumast. Lahuste spektroskoopia käsitleb tavaliselt tuumasid, mille spinn on $1/2$, näiteks ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F . Edaspidi kirjeldatakse käesolevas töös ^1H TMR spektroskoopiat. ^1H spinnil on $2I+1$ võimalikku olekut: $-1/2$ ja $+1/2$. Kokkulepitult $-1/2$ on β -olek ja $+1/2$ on α -olek. α -olek on madalama energiaga, kui β -olek (joonis 2.1b), nende vahet iseloomustab ΔE , mis on võrdelises seoses magnetvälja B_0 tugevusega. (Claridge, 2016)

Energia muutu kirjeldab valem 2.1, kus h – Plancki konstant, v – nurkkiirus, γ – güromagneetiline suhe.

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.1)$$

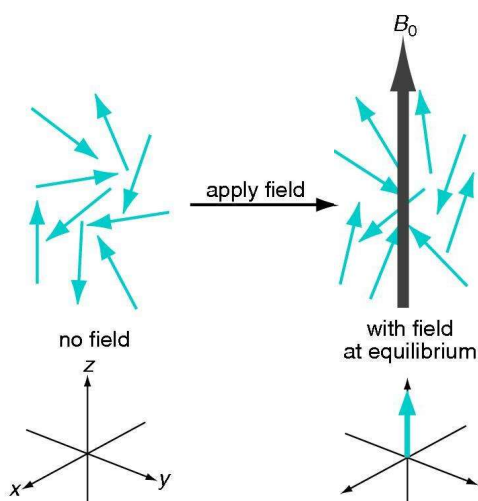


Joonis 2.1. a) Aatomituuma magnetmoment μ , b) prootoni spinni võimalikud olekud energiateljel.(Claridge, 2016)

Kuna prootonil (^1H) on laeng, tekib selle pöörlemisel magnetväli, mille magnetmoment on spinni suund. Ilma välise magnetväljata esinevad proovis olevate tuumade spinnid suvalistes suundades, niiet kõikide spinnide magnetmomentide vektorsumma on null. Asetades proovi magnetvälja B_0 pöörduvad (pöörlevad) tuumad osaliselt välise magnetvälja suunas. Tekib olukord, kus spinnide magnetmomentide vektorsumma ei ole enam null, vaid annab summaarse makroskoopilise magnetisatsiooni välise magnetvälja suunas (joonis 2.2). TMR mõõdab seda summaarset magnetisatsiooni. Magnetisatsioon on proportsionaalne α - ja β -olekus spinnide suhtega (valem 2.2). (Keeler, 2010):

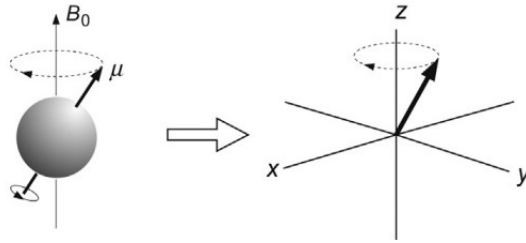
$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\Delta E/k_B T}, \quad (2.2)$$

kus N_α ja N_β – vastavates olekutes olevate spinnide arvu, k_B – Boltzmanni konstant, T – temperatuur, K.



Joonis 2.2. Vasakul pinnide vektorid ilma välise magnetväljata, paremal spinnid välises tugevas magnetväljas B_0 , kus summaarne magnetisatsioon on magnetvälja suunas. (Claridge, 2016)

Individuaalsed spinnid ei pöörle magnetväljaga B_0 ideaalselt paralleelselt, vaid pretsesseeruvad – keerlevad ümber z-telje nagu vurrid – teatud sagedusel, mida nim. Larmouri sageduseks (joonis 2.3). Larmouri sagedus sõltub magnetvälja B_0 tugevusest. (Claridge, 2016)



Joonis 2.3. Spinni pretsesseerumine (Claridge, 2016)

2.2.2. Raadiosageduslik pulss

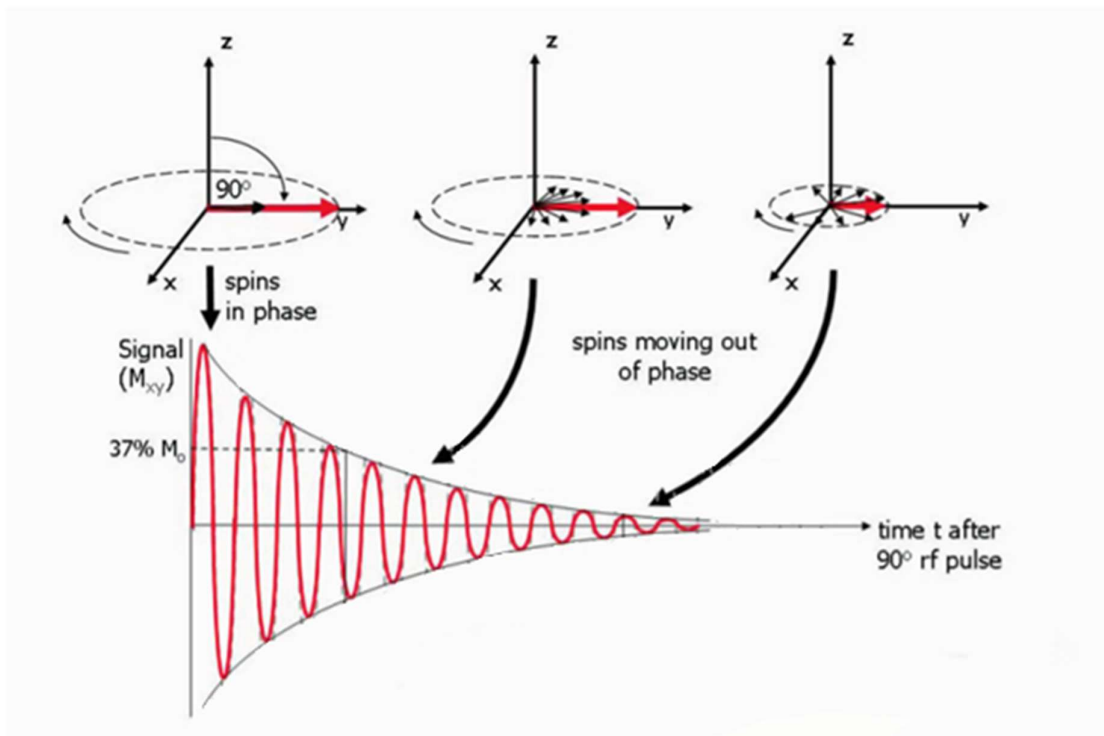
Väline konstantne tugev magnetväli B_0 on TMR esimene komponent. Kui väline magnetväli teistpidi pöörata, pöörduksid ka spinnid vastupidises suunas – toimub üleminek α -olekult β -olekule ja vastupidi. (Keeler, 2010)

TMR teine komponent on tugev ostsilleeruv raadiosageduslik pulss (RF). RF pulss on väga lühike ja katab laia sageduste vahemiku. Kui RF pulss tabab proovis olevaid aatomituumasid Larmouri sagedusel ehk nende resonantssagedusel, toimuvad üleminekud α - ja β -olekute vahel. (Keeler, 2010)

TMR eksperimendis kasutatakse 90° RF pulssi, mis pöörab tuumade summaarse magnetisatsiooni vektori magnetvälja suunalt – z-teljelt – eemale xy-tasandile, misjärel see hakkab z-telje ümber Larmouri sagedusel pöörlema ning oma algset asendit taastama ehk relakseeruma. (Keeler, 2010)

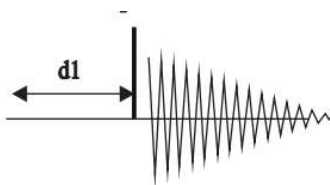
2.2.3. FID-signaali

Relakseeruvad tuumad annavad signaali, mida nimetatakse *Free Induction Decay* ehk FID-iks. FID koosneb sumbuvatel koosinuslainetest, mille amplituud sõltub relakseeruvate spinnide xy-komponendist. Joonisel 2.3 on näidatud, kuidas 90° pulsi saanud tuum relakseerub ja summaarne spinni xy-komponent väheneb, kuna spinn pöörub z-telje suunas. Resonantssignaali FID väheneb magnetisatsiooni asendi taastudes. Relakseerumise kiirus sõltub tuuma keemilisest keskkonnast. (Keeler, 2010)



Joonis 2.4. Tuuma relakseerumine peale 90° pulssi ning vastav FID. (Ridgway, 2010)

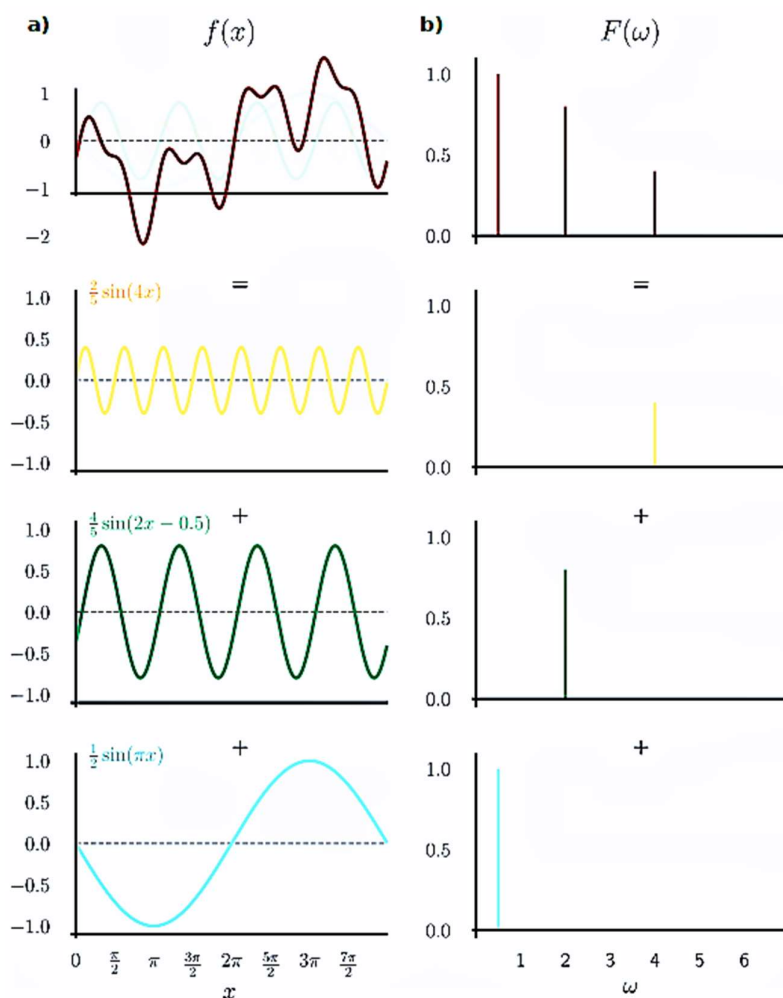
Kogu eksperiment tuumade ergastamisest kuni spinnide asendi taastumiseni võtab aega mõne sekundi (joonis 2.5). Sama eksperimenti korrates saab tulemused kokku liita, mis parandab signaali ja müra suhet. (Keeler, 2010)



Joonis 2.5. TMR pulsiprogrammi skeem ajateljel, d_1 on ooteaeg, jäme vertikaaljoon on 90° RF pulss, millele järgneb signaali kogumine kuni sumbumiseni. (Parella, 2006)

2.2.4. Andmete töötlus

Kogutud FID töödeldakse Fourier teisenduse abil ajateljel koossinussignaalidest sagedusteljel spektriiks, spekter esindab funktsiooni proovi moodustavate erinevas keemilises keskkonnas olevate protonite resonants-sagedustest (joonis 2.6). Skaala esitatakse abstsiss-teljel kahanevalt. Fourier teisenduse käigus korrutatakse eksperimentaalne FID läbi erinevatel sagedustel sünteetiliste koosinus lainetega. Spektrijoon sagedusteljel tekib sagedustel, mis leiduvad ka FID-s. (Keeler, 2010)



Joonis 2.6. Lihtsate perioodiliste funktsioonide (a) Fourier transformatsioon (b). (Ellaway, 2021)

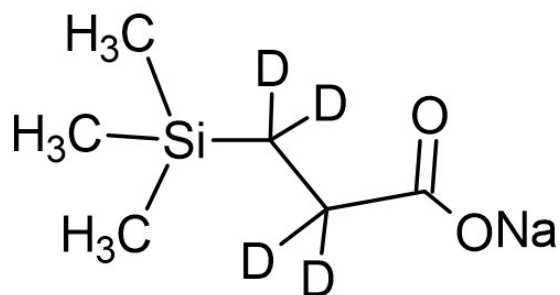
2.2.5. Keemiline nihe

TMR saadav keemiline informatsioon tuleneb elektrontiheduste erinevusest erinevas keemilises keskkonnas asuvate tuumade ümber. Elektronid varjestavad tuuma välise magnetvälja eest, mistõttu mõjub elektrontihedas keskkonnas asuvatele tuumadele väiksem magnetväli. Sellise tuuma kohta öeldakse, et see on varjestatud ja selle spektrijoon asub TMR spektri paremal pool. Mitte-varjestatud tuum asub elektronhõredas keskkonnas ning see resoneerub kõrgemal sagedusel, st spektril vasakul. Tänu sellele on võimalik eristada samas molekulis asuvate prootonite signaale. (Keeler, 2010)

Proovile lisatakse sisestandard – ühend, mille resonantssagedus on teada – ning kõikide teiste signaalide piike võrreldakse sellega. Signaali sagedus sõltub TMR spektromeetri magnetväljast B_0 , mistõttu ei saa signaali teistsuguse magnetväljaga TMR spektromeetril mõõdetud signaaliga võrrelda. Selle probleemi vältimiseks viiakse läbi teisendus sageduse skaalast, mille ühik on Hz, keemilise nihke skaalale, mille ühik on ppm (*parts per million*). Keemiline nihe väljendab vaadeldava tuuma signaali erinevust sisestandardi signalist suhtes välise magnetvälja sagedusega (valem 2.3). (Keeler, 2010)

$$\text{Keemiline nihe [ppm]} = \frac{\text{Signaali kaugus sisestandardi signaalist [Hz]}}{\text{Sisestandardi resonantss [MHz]}} \quad (2.3)$$

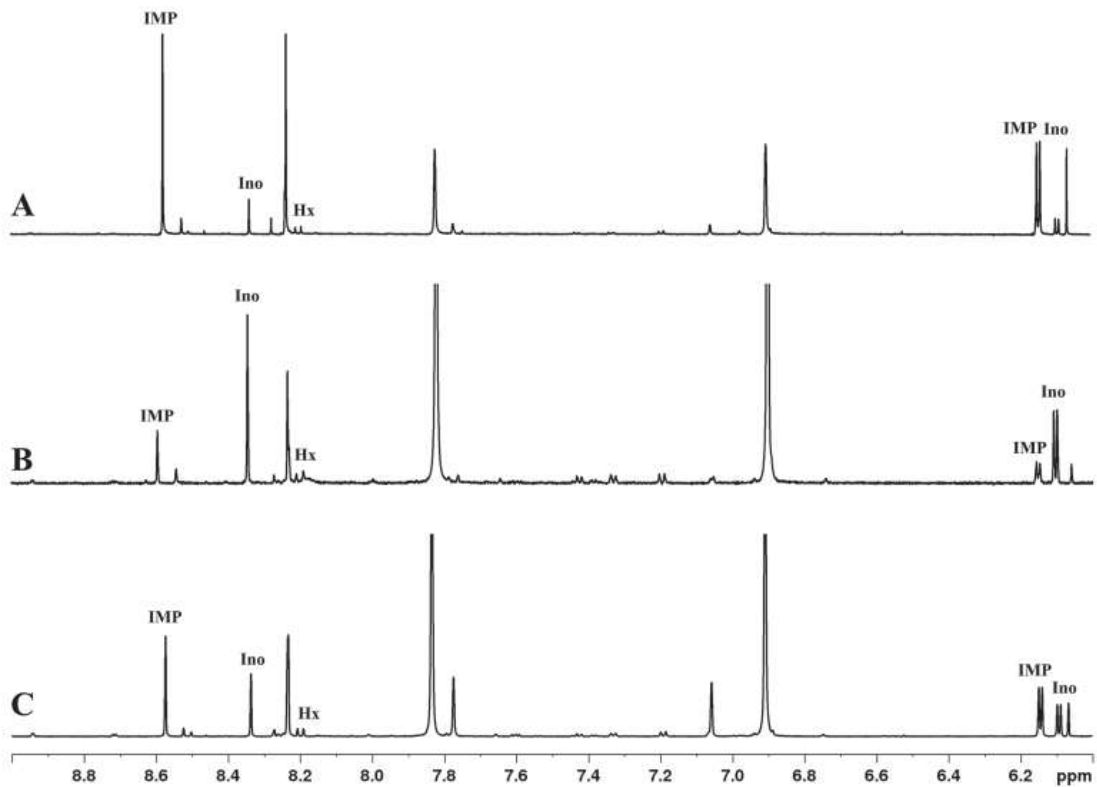
Sisestandardina kasutatakse orgaanilisi aineid, mille TMR signaal on madalamal sagedusel kui enamike uuritavate orgaaniliste ainete signaalide sagedused. Tüüpilised sisestandardid on tetrametüülsilaan (CH₃)₄Si ehk TMS apolaarsetes orgaanilistes lahustites, 3-(trimetüülsilüül)propioonhape naatriumisool ehk TSP ja 2,2-dimetüül-2-silapentaan-5-sulfonaat ehk DSS polaarsetes lahustites nt vesilahustes. Keemilise nihke skaalal on nende sisestandardite signaal 0 ppm. Käesolevas töös kasutatud sisestandard TSP-d₄ on osaliselt deutereeritud, st osad vesinikuaatomid on asendatud deuteriumi aatomitega, nii et ¹H signaali annavad ainult metüülrühma vesinikud. (Keeler, 2010)



Joonis 2.7. TSP-d₄ keemiline struktuur.

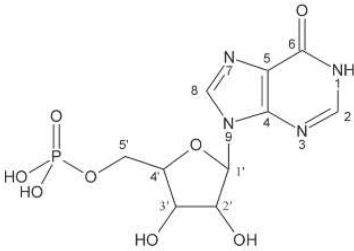
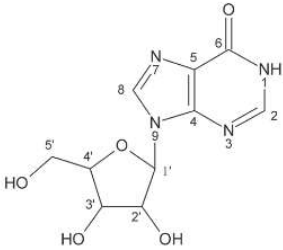
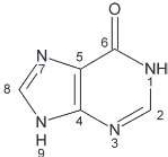
2.3. Kala tuumamagnetresonants spektroskoopias

Tuumamagnetresonants spektroskoopia on laiahaardeline tehnoloogia orgaaniliste ainete ja nende segude analüüsimiseks. Seda on kasutatud erinevate kalaliikide analüüsimiseks (Erikson et al., 2012). Joonisel 2.8 on näidatud Abramova *et al.* 2019 läbi viidud katse kolme kala spektrid. Spektritel on tähistatud kvaliteedimarkerite signaalid ehk piigid. Kvaliteedimarkerid lagunevad järjekorras ATP – ADP – AMP – IMP – Ino – Hx.



Joonis 2.8. Kolme lõheliste sugukonda kuuluva kala lihase proovide spektrid 9.0-6.0 ppm: A) gorbuša (*Oncorhynchus gorbuscha*), B) keta (*Oncorhynchus keta*), C) nerka (*Oncorhynchus nerka*) (Abramova et al., 2019)

Piigid tähistatakse kirjanduse andmeil. Joonisel 2.9 on lõige Abramova et al., 2019 töös esitatud keemiliste nihete tabelist. Joonisel on välja toodud ühendite keemiline struktuur, mille vesinikud on nummerdatud, ning iga signaali andva vesiniku keemiline nihe. Joonisel 2.8 näidatud vahemikus 9.0-6.0 ppm on IMP-l kolm signaali: 8.58 ppm, 8.23 ppm ja 6.14 ppm. Inosiinil on samas vahemikus samuti kolm signaali: 8.34, 8.23 ja 6.09 ppm. Ino ja IMP piigid seega kattuvad 8.23 ppm. Hx kahe piigi keemilised nihked on 8.21 ja 8.19 ppm, need on joonisel 2.8 üsna madalad. Sellise põhimõtte järgi tähistati käesolevas töös spektrite analüüsitavad piigid.

Metabolite	Chemical Structures	Carbon atom	Chemical shifts	
			proton δ_r , ppm	Multiplicity*
Inosin-5'-phosphate (IMP)		2	8.54	
		4		
		5		
		6		
		8	8.58	s
		1'	6.14	s
		2'	4.70	m
		3'	4.49	dd
		4'	4.56	m
		5'	4.06, 4.01	m
Inosine (Ino)		2	8.54	s
		4		
		5		
		6		
		8	8.24	s
		1'	6.09	d
		2'	4.77	s
		3'	4.45	dd
		4'	4.29	dd
		5'	3.95, 3.86	dd
Hypoxantin (Hx)		2	8.21	s
		4		
		5		
		6		
		8	8.19	s

* s – singlet; d – doublet; dd – doublet of doublet; m – multiplet.

Joonis 2.9. ATP metaboliitide IMP, Ino ja Hx keemiline struktuur, iga prootoni keemiline nihe ja multiplitsus. (kohandatud Abramova et al., 2019)

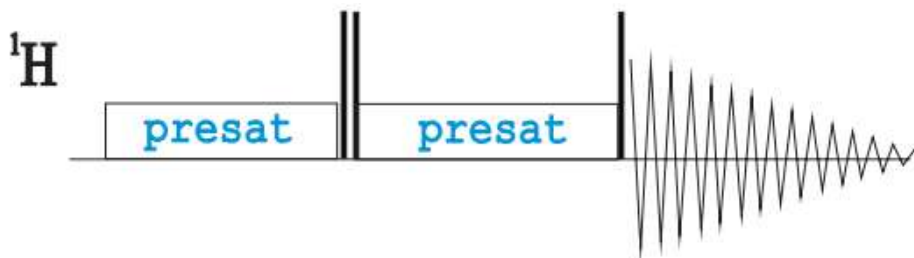
2.4. Materjalid ja meetodid

Käesolevas töös analüüsitud koha ja lõhe fileed pärinevad kaubandusest, ahven püüti Hiiumaa rannikult 29.11.21. Ekstraheerimiseks kasutati 100% (w/v) trikloroäädikhapet (TKA) puhtusega 100±2% (Spectrum, Fischer Scientific). Sisestandardiks kasutati osaliselt deutereeritud 3-(trimethüülsilüül)propioonhappe naatriumisool (TSP-d₄) 99.8% lahus (Euro Isotop).

Proovi töötlemise jaoks valmistati 7.5% trikloroäädikhappe lahus jäävannis. Sisestandardi TSP 1M lahus valmistati D₂O-s. pH reguleerimiseks valmistati erineva molaarsusega NaOH ja HCl lahused.

Proovide homogeniseerimiseks kasutati Universal Laboratory AID type MPW-309 (Poola) homogenisaatorit (lisa 1). Vaakumfiltreerimiseks (lisa 2) kasutati 30-35 mm pooridega filterpaberit (Whatman Grade 802). Kuuljahvatuseks kasutati Retscher MM 400 jahvatit (lisa 3) 3 mm terasest jahvatuskuulidega tingimustel 25 pööret minutis 4 min pausidega 3 tsükli. Pausidel hoiti plokke jääl (lisa 4). Tsentrifugiti Sigma 2-16PK tsentrifuugis 4 °C ja 21460 g juures.

Tuumamagnetresonantspektromeetria mõõtmised viidi läbi Agilent DD2 500 MHz spsektromeetril, mis baseerub 11,74 T ülijuhtmagnetil. Kõik mõõtmised toimusid proovi temperatuuril 25 °C. Mõõdeti ^1H tuumasid ühedimensionaalsete TMR eksperimentidena. Kuna 90% solvendist oli vesi, siis protonspektreid mõõdeti vee signaali mahasurumisega presaturatsiooni teel (joonis 2.8).



Joonis 2.8. 1D ^1H eksperimentideks kasutatud pulsiprogramm, jämedad vertikaaljooned tähistavad 90° RF pulssi. Presat-plokid tähistavad pikka madala võimsusega RF pulssi vee resonantssagedusel, mis hävitab vee magnetisatsiooni seeläbi elimineerides spektrist vee signaali.

2.5. Proovide ettevalmistus

Koha ja lõhe fileed lõigati väiksemateks tükkideks, mis jaotati steriilsetesse pakenditesse 4 ja 9 paralleeliks (lisa 5). Ahven puhastati ja fileeriti, seejärel lõigati väiksemateks tükkideks ning jaotati steriilsete pakendite vahel edasisteks proovideks.

TMR proovi ettevalmistamisel lähtuti Ciampa et al. 2012 poolt välja töötatud metodikast, proovi jaoks kaaluti 5 g kalafileed, sellele lisati 20 ml 7,5% TKA lahust ning homogeniseeriti jäävannil. Saadud segu filtreeriti läbi filterpaberi. Filtraadi pH viidi NaOH ja HCl vesilahustega 8 juurde. Proov tsentrifuugiti 5 min võimaliku naatrium trikloroatsetaadi sademe eraldamiseks lahusest. Seejärel lisati 100 μl TSP endorfi ning saadud segust pipeteeriti 600 μl NMR 5 mm tuubi.

Kuuljahvatis homogeniseerimiseks kaaluti 2 ml endorfi u 0,25 g vedelas lämmastikus uhmerdatud fileed ning lisati 1 ml 7,5% TKA ja 4 teraskuuli (lisa 6). Proove hoiti ettevalmistamise ajal jääl. Peale kuuljahvatust eemaldati endorfidest teraskuulid ning tsentrifuugiti 12 min tahke faasi eraldamiseks. Lõhe proovidel sadenes osa tahket faasi endorfi põhja ning hüdrofiobne osa vedeliku pinnale (lisa 7). Endorfidest eemaldati supernatant ning selle pH viidi NaOH ja HCl vesilahustega vajaliku väärtuseni. Leiti, et proovide pH võib kõikuda paari kümnendiku ulatuses paari tunni vältel, seega edaspidistes töodes soovitatakse kasutada puhvrit. Peale pH paika viimist tsentrifuugiti proov 5 min ning NMR tuubi pipeteeriti 540 μl proovi ja 60 μl 1 M TSP-d₄.

Homogenisaatori kasutamine osutus aeganõudvaks meetodiks, sest proove pidi homogeniseerima ükshaaval. Kuuljahvatis oli võimalik homogeniseerida palju paralleele korraga, mistõttu eelistati seda meetodit. Lisaks võrreldi nendel meetoditel ettevalmistatud proovide spektreid ning järelitati, et kuuljahvatusel homogeniseeritud proovi spektri lahutusvõime oli parem – signaalid olid teravamad (lisa 8)

3. Tulemused ja analüüs

Käesoleva töö jaoks püstitati hüpotees, et lõheliste jaoks loodud meetodid (Shumilina et al., 2015, 2020) kvaliteedi- ja külmutamismarkerite TMR analüüsiks sobib ka teiste kalaliikide jaoks. Hüpoteesi kontrollimiseks viidi esialgu katsed läbi lõhega, seejärel analüüsiti koha ja ahvenat. Shumilina *et al.* 2015 välja pakutud proovi ettevalmistusprotokolli järgiti lõhe, koha ja ahvena fileede uurimisel. Spektrite analüüsil võeti aluseks Shumilina et al 2015 ning Abramova 2019 töodes toodud tabelid ühendite keemiliste nihetega.

3.1. Integreerimine ja kohalik normaliseerimine

Kvantitatiivseks analüüsiks on traditsiooniliselt tarvilik täpselt kaalutud kogus referentsühendit, milleks on sisestandard. Globaalne integreerimine võimaldas piikide kohalikku normaliseerimist. Selleks integreeriti kogu spekter, va mahasurutud vee piigi piirkond 5.1-4.55 ppm ja sisestandardi piirkond <0.2 ppm. Iga analüüsitava spektri integraal jagati globaalse ehk kogu spektri integraaliga, saadi normeeritud integraalsuhe. Erinevate proovide integraalsuhteid sai võrrelda omavahel ning arvutada K-indeks. Kogu spektri integraali järgi normeerimise eelis on proovi ettevalmistusaja lühendamine, kuna puudub vajadus sisestandardi täpselt kaalumiseks.

3.2. Kvalitatiivne analüüs

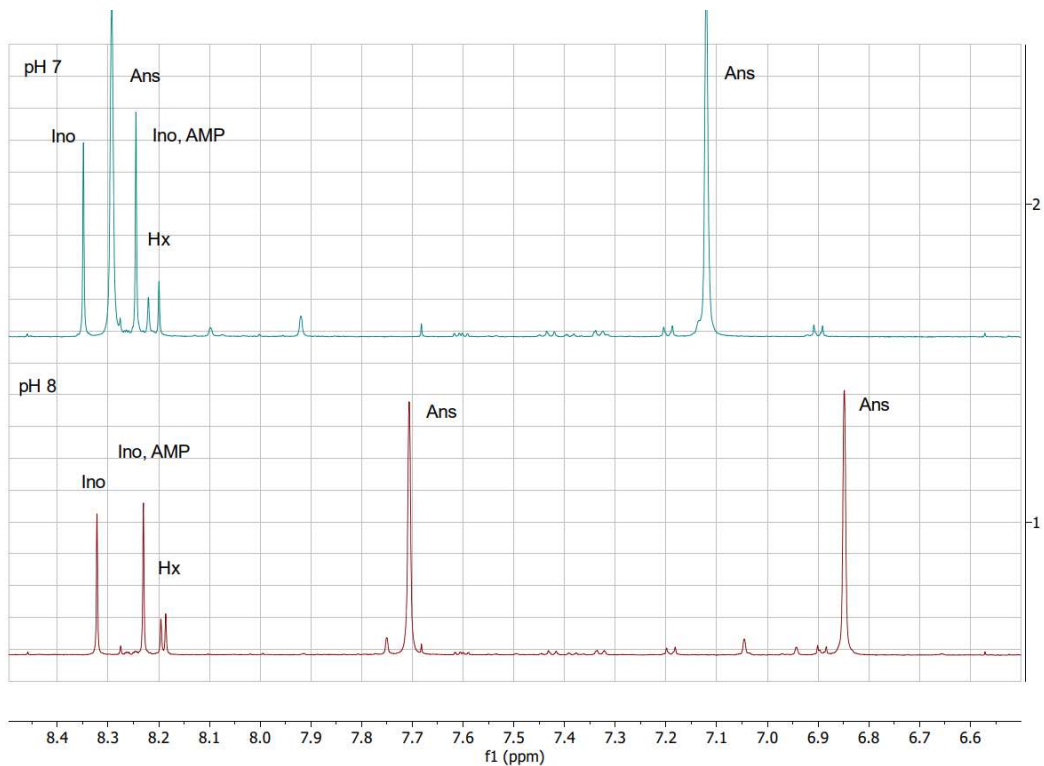
Proovide kvalitatiivne analüüs põhines signaalide identifitseerimisel kirjanduse alusel ja erinevatel tingimustel mõõdetud spektrite omavahelisel võrdlusel. Koha proovides identifitseeriti signaale spaikimise abil. Spaikimine on proovi sisse kindla kontsentratsiooniga uuritava ühendi lahuse lisamine, see aitab tuvastada signaali keemilisi nihkeid ning spektrijoonte kuju proovi tingimustes.

3.3. Kvaliteedimarkerite analüüs ja kvaliteediindeksi määramine

Kvaliteedimarkereid analüüsiti kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt. Spektrite analüüsil alustati oluliste piikide nimetamisest ning omavahelisest võrdlusest. Proove võrreldi omavahel kvantitatiivselt integraalsuhete kaudu. Spektrite omavaheliseks võrdluseks normaliseeriti need sisestandardi piigi kõrguse järgi, kuna spektrijoone kuju ei varieerunud proovide vahel märkimisväärselt.

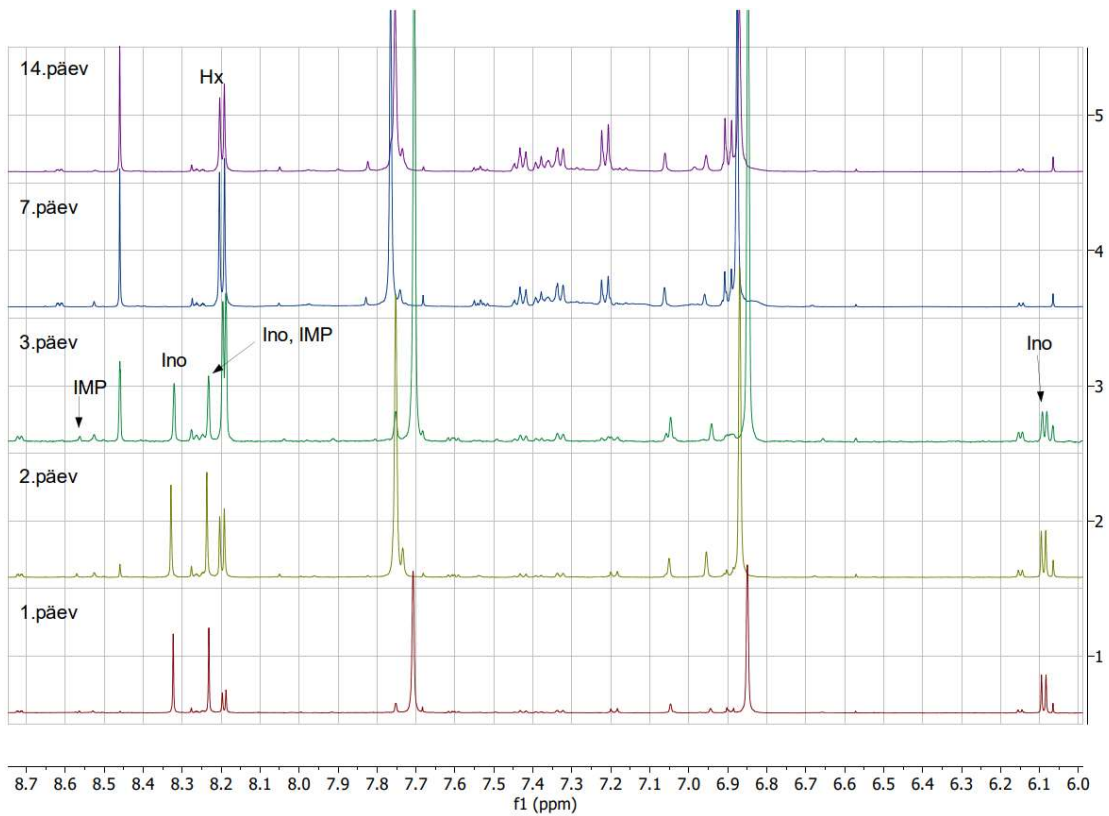
3.3.1. Lõhe kvaliteedimarkerid

Lõhe ostmise päeval valmistati 0 proov, misjärel filee säilitati temperatuuril 4 °C 14 päeva, kusjuures seni oli lõhefileed säilitatud jää peal. Kirjanduses kirjeldatud proovi ettevalmistusmeetodi kohaselt pidi lõhe proovi pH viima 7.8ni. Esimese päeva proov jagati kaheks paralleeliks, millest ühe pH viidi 7 ja teise 8-ni ning saadud spektreid võrreldi, näitatud joonisel 3.1. Leiti, et pH 7 juures on anseriini signaalid lähedal huvipakkuvate kvaliteedimarkerite signaalidele, samas kui pH 8 proovi spektril on anseriini signaalid kaugemal ja ei sega kvaliteedimarkerite integreerimist. Anseriin on lihastes leiduv antioksidant, selle sisaldust edaspidistes proovides ei tähistatud, sest see ei ole käesolevas töös oluline. Erineva pH-ga proovide võrdlemisel järeldati, et pH 8 on analüüsiks sobilikum.



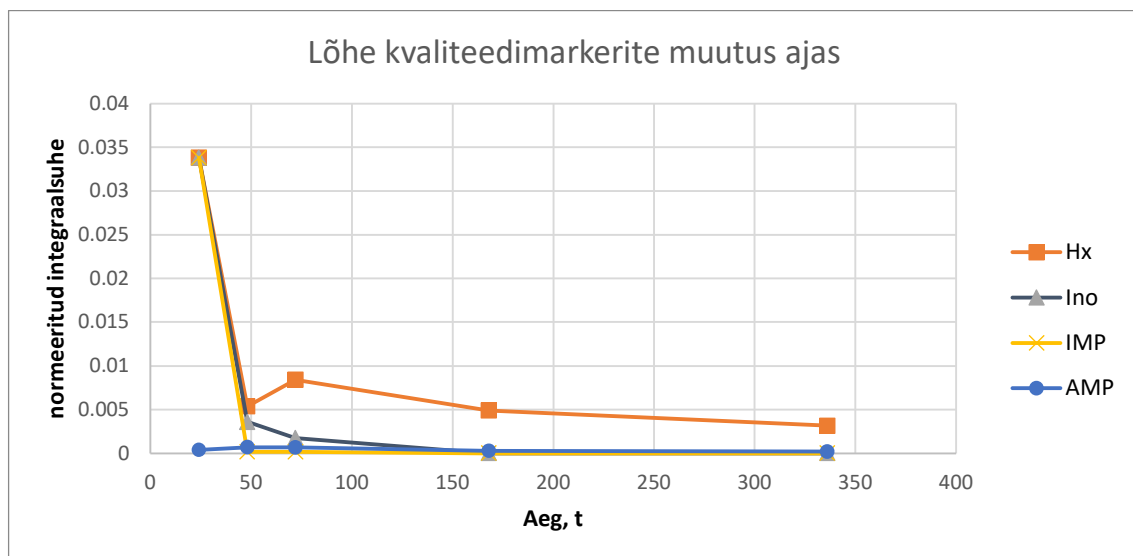
Joonis 3.1. 1) lõhe pH 8 proovi spekter, 2) lõhe pH 7 proovi spekter. Spektritel tähistatud suuremad signaalid.

Vananemiskatse 1., 2., 3., 7. ja 14. päeval valmistati proov TMR mõõtmiseks. Joonisel 3.2 on näha lõhe vananemiskatse spektrit päevade kaupa. Esimesel kolmel päeval on tuvastatud inosiini ja IMP sisaldus, viimane küll väga madal võrreldes ülejäänud ühenditega. 7. päevast alates enam inosiini ja IMP ei tuvastatud. Hüpoksaantiini leidis igas proovis. Tulemus on kirjandusega võrreldes ootuspärane – IMP laguneb inosiiniks ja see hüpoksaantiiniks, niiet peale inosiini lihast kadumist püsib hüpoksaantiini kontsentratsioon veel mõnda aega kõrge.



Joonis 3.2. Lõhe vananemiskatse TMR spektrid 6.0-8.7 ppm päevade kaupa

Globaalse integreerimise abil saadud normeeritud integraalsuhte muutused ajas on näha joonisel 3.3. Kõik markerid langesid järsult esimese ja teise päeva vahel. Alates teisest päevast langes Hx kontsentratsioon väga aeglaselt, samal ajal AMP, IMP ja Ino kontsentratsioonid langesid seitsmendal päeval nulli.



Joonis 3.3. Lõhe kvaliteedimarkerite normeeritud integraalsuhte muutused ajas.

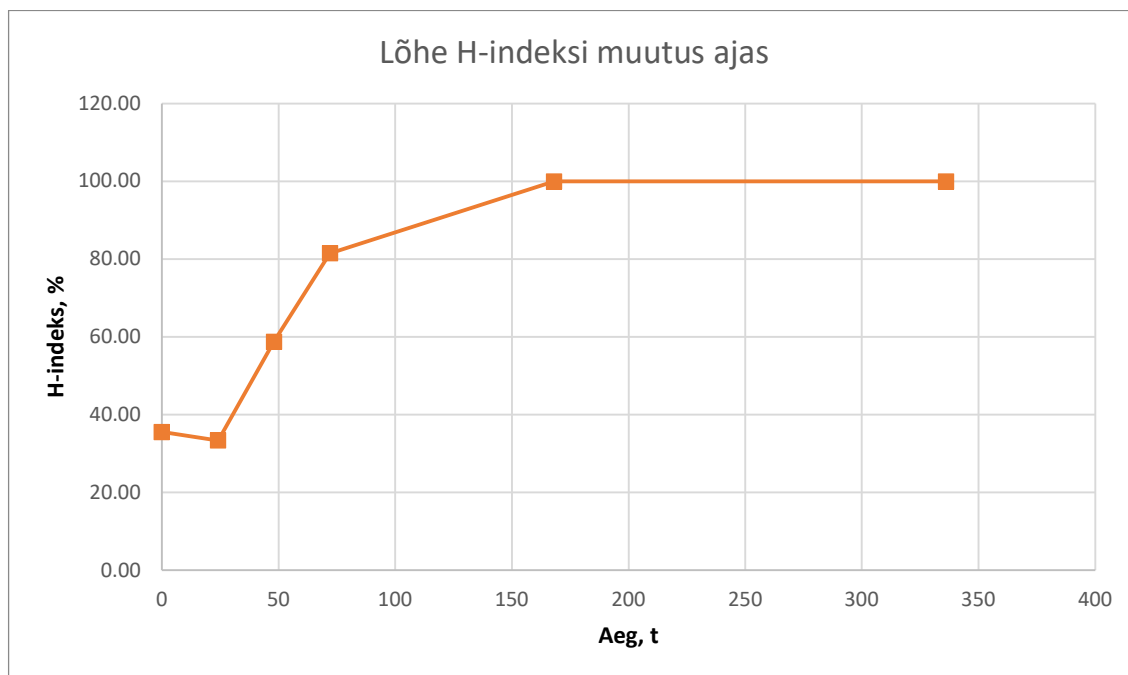
Kõik kvaliteedimarkerid analüüsitud proovides näitavad languse trendi, mis tähendab, et filee värskus oli langemas. Harilikult arvutatakse kvaliteediindeks valemi 1.1 järgi (vt. ptk 1.4.2.), kuid Luong et al., 1992 leidsid, et osade liikide jaoks, kelle lihas kaovad ATP ja ADP kiiresti, sobib kohandatud H-indeks paremini. H-indeksit arvutatakse valemi 1.2 järgi (vt. ptk 1.4.2.). Kuna analüüsitud proovides ei sisaldunud alates 7. päevast enam IMP ja Ino, kasutati lõhe värskuse hindamiseks H-indeksi väärtuseid. Leitud integraalsuhete põhjal arvutati H-indeks, esitatud tabelis 3.1.

Tabel 3.1. Lõhe H-indeksi väärtused.

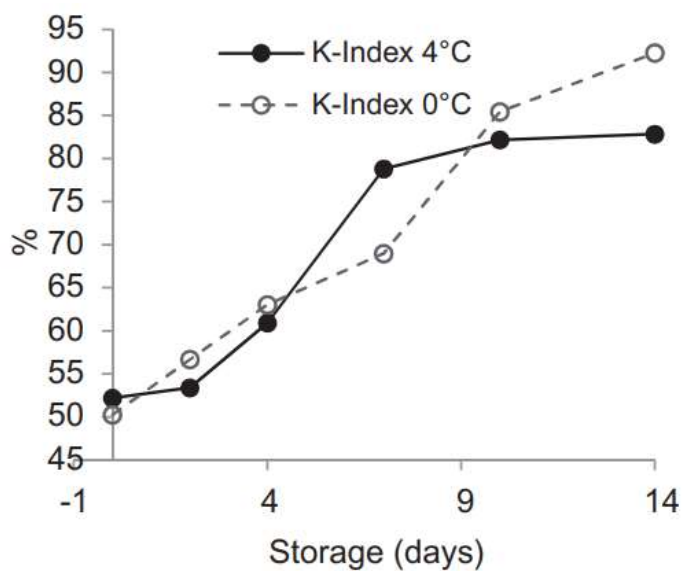
aeg, t	K indeks
0	35.53
24	33.33
48	58.71
72	81.45
168	100.00

Alates 7. päevast (168 t) ei tuvastatud proovis inosiini ega IMP sisaldust, seetõttu on nende proovide H-indeks 100%. Lõhele kehtiva värskuse kriteeriumite kohaselt on analüüsitud lõhefilee esimesel päeval peale ostmist valmistatud proov suurepärase kvaliteediga (alla 40-50%), alates 3. päevast kehva kvaliteediga (üle 70-80%), tarbimiskõlbmatu. Abramova et al., 2019 leidsid, et lõhe K-indeks on säilitamise 9. päeval ligikaudu 60% ja 18. päeval ligikaudu 90%. Seega võib järeldada, et teisel päeval mõõdetud lõhefilee püüdmisest oli möödas ligikaudu 9 päeva, st ostmise päeval oli lõhefilee püügist möödas 7 päeva.

Lõhe H-indeksi muutus ajas on näidatud joonisel 3.4. H-indeksi muutust võrreldi Shumilina *et al.* 2015 töös välja toodud K-indeksi muutusega, näidatud joonisel 3.5. Analüüsitud lõhe H-indeks muutus sarnaselt joonisel 3.5 esitatud 4 °C juures hoitud lõhe K-indeks. Analüüsitud graafiku joone kuju on sarnane kirjanduse joone kujuga peale 4. päeva. Analüüsitud lõhe 0 päeva proovi H-indeks on liiga kõrge, et sobida H-indeksi tõusutrendiga. Põhjus võib olla proovi ettevalmistusmeetodi erinevuses, sest esimesed lõheproovid homogeniseeriti Laboratory AID homogenisaatoriga, järgnevad kuuljahvatis.



Joonis 3.4. Lõhe H-indeksi muutus ajas.



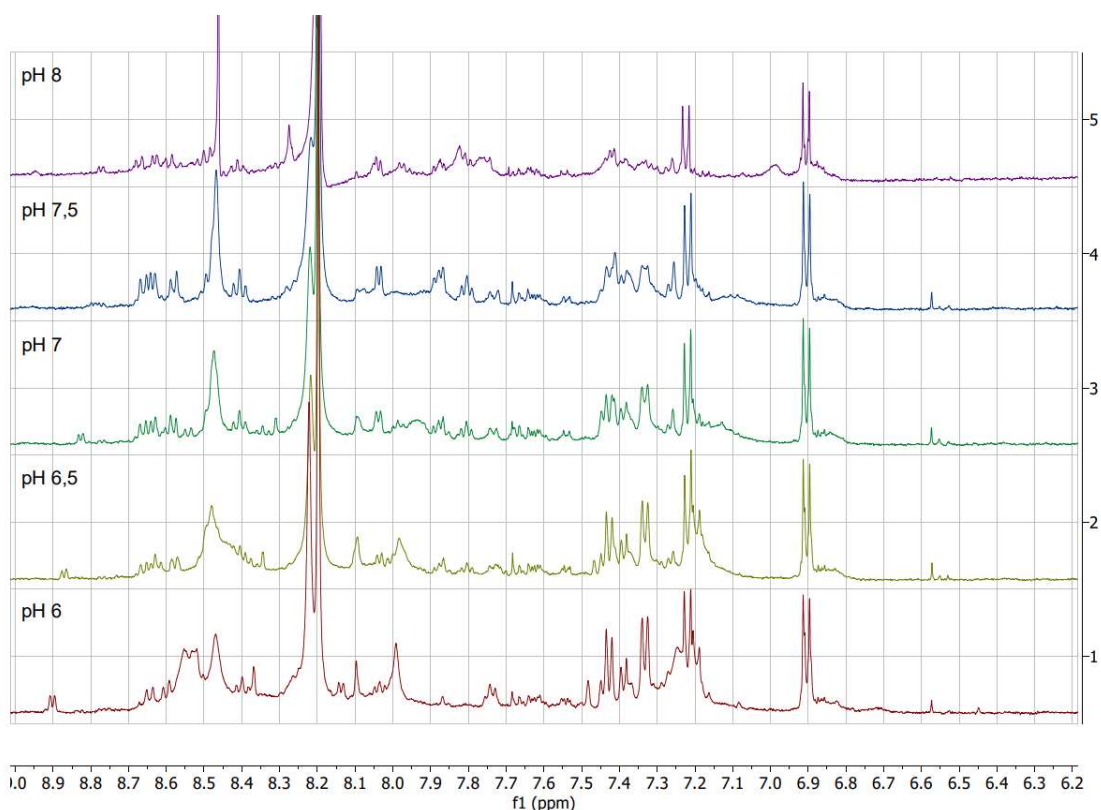
Joonis 3.5. Lõhe K-indeksi muutused päevade lõikes sõltuvalt temperatuurist. (Shumilina et al., 2015)

Lõhes mõõdetud kvaliteedimarkerid näitasid ootuspäraseid muutuseid. Nukleotiidide laguproduktide kadumise järel lihast ei peegelda K-indeks enam kala värskust. Kirjanduse abil oli võimalik arvutada analüüsitud lõhe püügist möödunud päevade arv.

3.3.2. Koha kvaliteedimarkerid

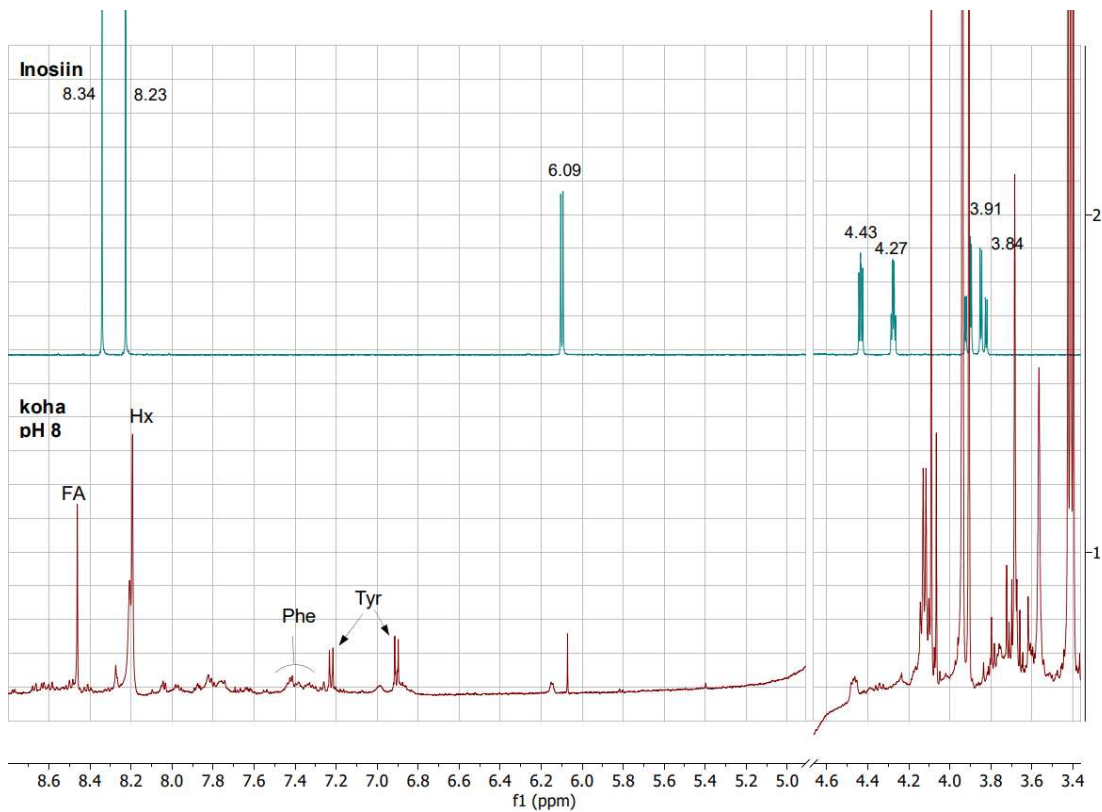
Kaubandusest soetatud kohafilee osutus pealiskaudsel sensoorsel analüüsil katse jaoks vajalikust värskuse tasemest roiskunumaks. Kohafilee vananemise katset läbi ei viidud, kuid kontrolliti kvaliteedimarkerite sisaldust sellegipoolest.

Koha jaoks meetodi kohandamiseks võrreldi erineva pH mõju spektri lahutuvusele. Joonisel 3.6 on näha, et pH tõustes paraneb piikide lahutus, seetõttu viidi edasistes katsetes kõigi proovide pH 8-ni.



Joonis 3.6. Koha TMR spektrid pH 6-8 vahemikus 6.2-9.0 ppm.

Analüüsitud koha filee spetkritel ei suudetud tuvastada nukleotiidide metaboliitide piike. Lihtsustamaks inosiini sisalduse kontrollimist valmistati inosiini lahuse deuteeritud vees ja mõõdeti selle spekter. Inosiini spekter asetati kohakuti koha spektriga, mille lahuse pH oli 8. Joonisel 3.7 on näha, et koha spektril ei kattu ükski piik inosiiniga, millest järeldati, et inosiini selles ei sisaldunud.

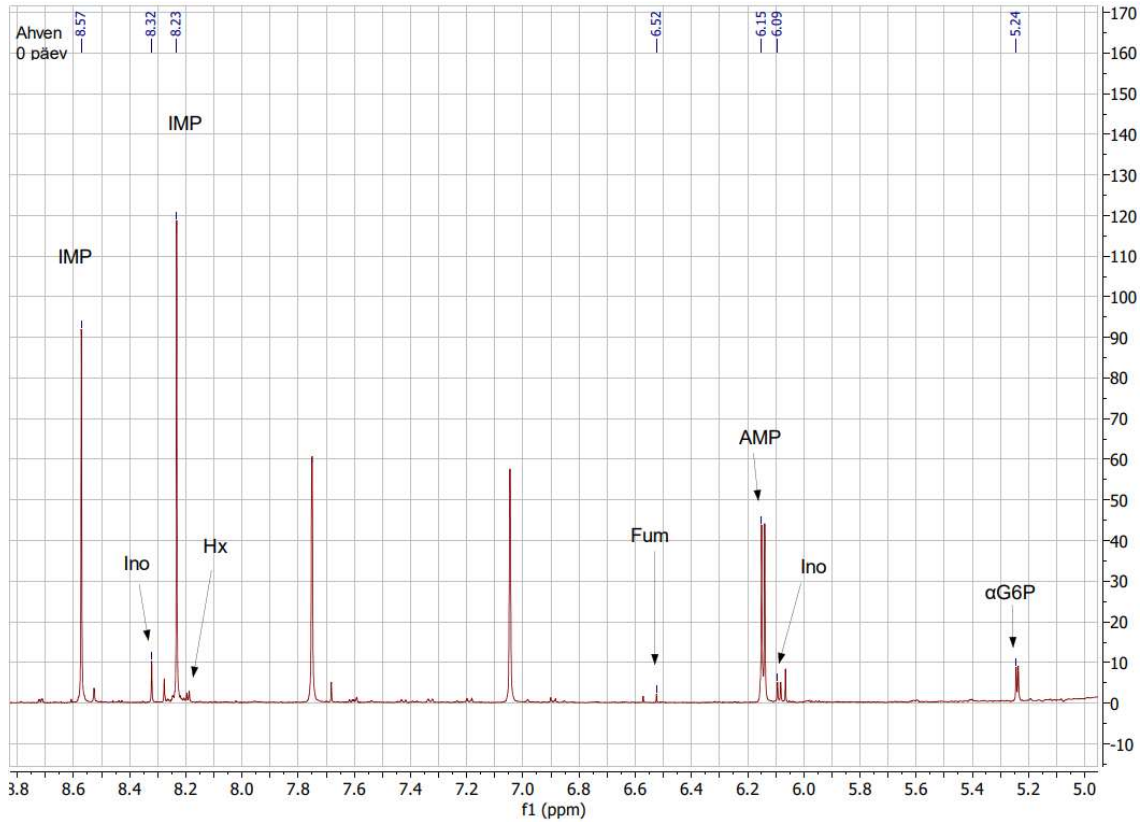


Joonis 3.7. 1) koha pH 8 spekter; 2) inosiini spekter; 8.7-3.4 ppm. Vee piik 4.6-5.0 ppm välja lõigatud

Kvaliteedimarkerite piirkonnas tuvastati hüpoksaantiini piik, kuid selle prekursoreid mitte. Analüüsitud kohafilee leiduvatest ühenditest ei piisanud K-indeksi arvutamiseks, mis korreleerus analüüsitava filee sensorsete omadustega.

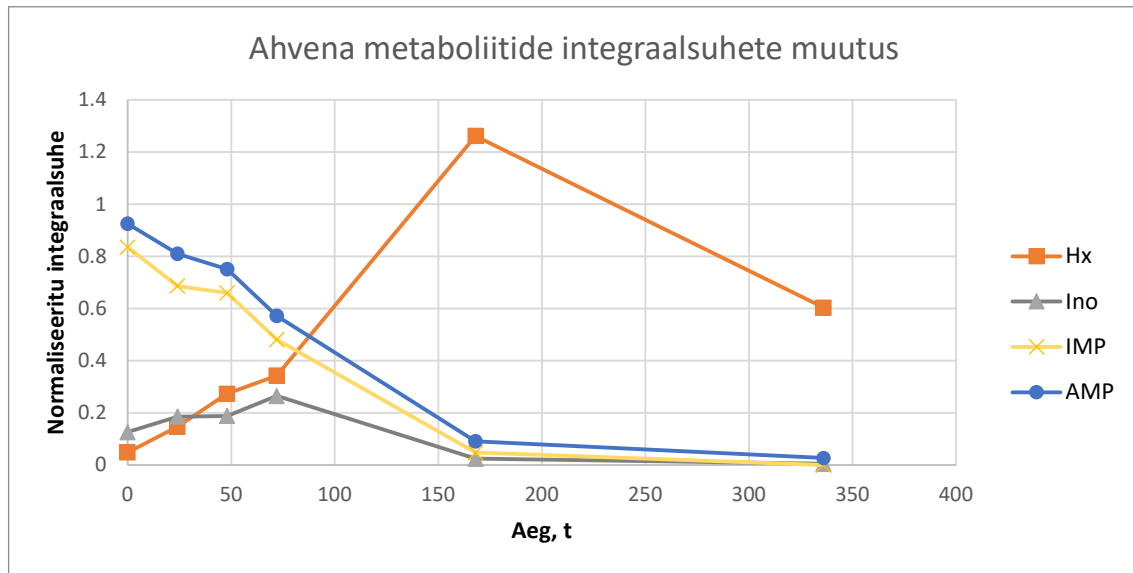
3.3.3. Ahvena kvaliteedimarkerid

Lõhega läbi viidud vananemise/kvaliteedimarkerite mõõtmise katse viidi läbi 5 ahvena fileel. Ahvenad fileeriti ööpäev peale püüki. Fileerimise päeval ahvena fileest saadud spektris tuvastati olulisemad piigid, mis on näidatud joonisel 3.8. Ahvena filees leidsid värsketele kalale iseloomulikud ühendid nagu IMP, Ino, AMP ja Hx. IMP ja AMP piigid olid Ino ja Hx piikidest kõrgemad, mis on ootuspärane nii värskes kalas. Spektril on ka tähistatud α -D-glükoos-6-fosfaadi piik. Suhkrud ja nende fosfaadid on iseloomulikud vaid värsketele kalale. Liha vananemise käigus laguneb glükoos piimhappeks. Glükoosi ja piimhappe muutusi edaspidistes proovides ei jälgitud.



Joonis 3.8. Ahvena spekter 8.8-5.0 ppm nimetatud IMP, Ino, Hx, fumaraadi (Fum), AMP ja α -D-glükoos-6-fosfaadi (α G6P) piigid.

Shumilina *et al.* 2015 eeskujul mõõdeti ahvenafileede spektrid 1., 2., 3., 7. ja 14. päeval peale fileerimist. 14 päeva jooksul mõõdetud metaboliitide normeeritud integraalsuhte muutus on esitatud joonisel 3.9.



Joonis 3.9. Ahvena metaboliitide Hx, Ino, IMP ja AMP integraalsuhte muutus ajas.

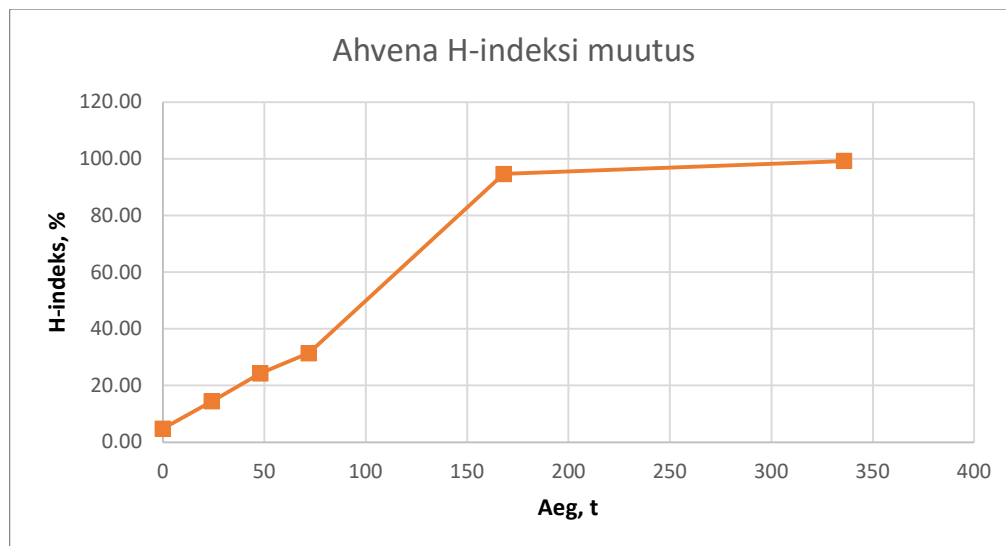
Ahvena proovide kvaliteedinäitajate sisalduste muutused näitavad ootuspärast trendi. Kõrgema energiaga ühendite AMP ja IMP hulk langeb lineaarselt peaaegu nullini, seejärel aeglasemalt. Inosiini hulk esialgu tõuseb ning 7. päevaks langeb peaaegu nullini. Hüpoksaantiini hulk tõuseb 7. päevani, seejärel langeb.

Iga päeva jaoks arvutati 5 paralleeli keskmine K-indeks ja H-indeks, et võrrelda nende väärtuseid. Kuna K-indeks ei järgi tõusutrendi, on järelikult ahvena värskuse hindamiseks sobilik kasutada H-indeksit.

Tabel 3.2. Ahvena 5 paralleeli keskmistatud K-indeks ja H-indeks.

aeg, t	K-indeks	H-indeks
0	6.52	4.77
24	10.29	14.42
48	10.33	24.34
72	16.28	31.45
168	2.97	94.64
336	1.38	99.19

K-indeks on peale 7. päeva kõrgem kui lõhe ootuspärane H-indeks, hoolimata sellest, et lõhe säilitati temperatuuril 4 °C ja ahven temperatuuril 0 °C, jää peal. Ahvena kvaliteet langeb seega kiiremini, kui lõhe kvaliteet. Joonisel 3.10 on näidatud ahvena H-indeksi sõltuvus ajast. Kuni 3. päevani tõuseb H-indeksi väärtus lineaarselt, kuid 7. ja 14. päeva H-indeksi väärtused enam lineaarse tõusu joonele ei sobitu.



Joonis 3.10. Ahvena K-indeksi muutumine ajas.

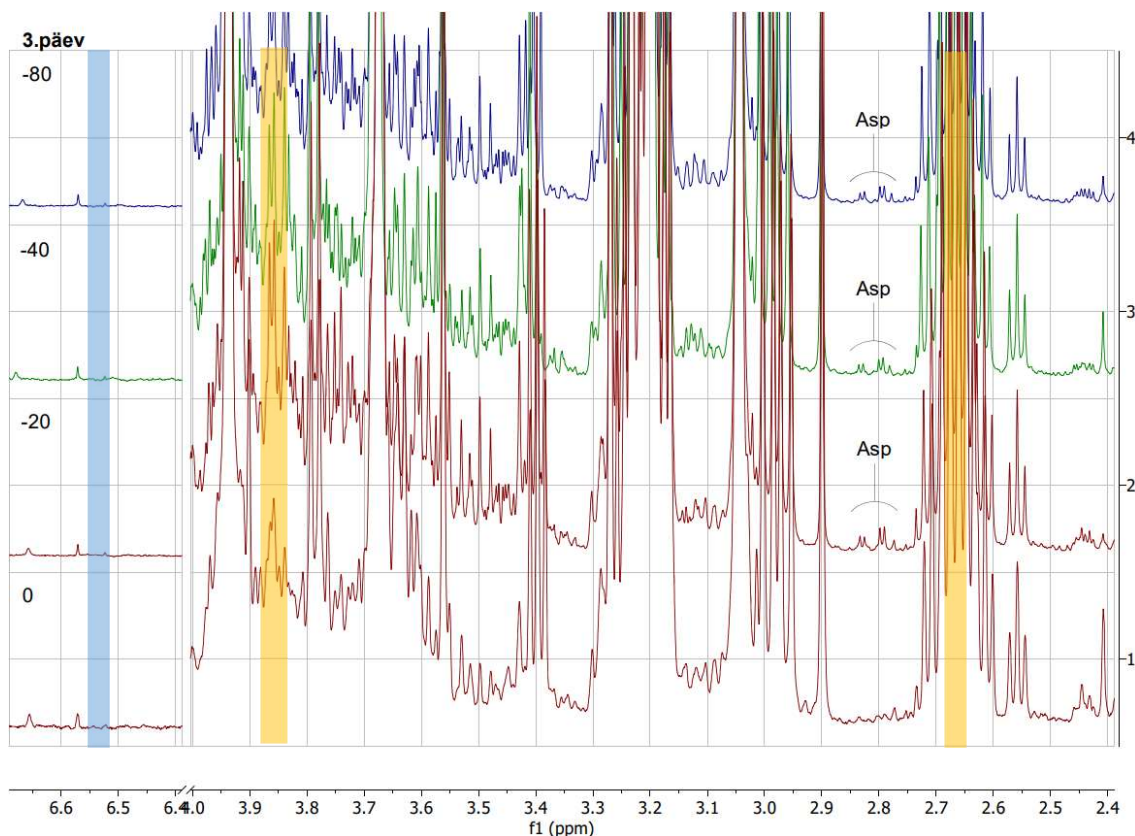
Ahvena filees kvaliteedimarkerid muutuvad sarnaselt lõhega, kuid kiiremini. K-indeksi järgi värskusele hinnangu andmiseks on tarvis põhjalikum uurimist ja ahvena liigipõhiste referentsväärtuste leidmist, st millise K-indeksi väärtuse juures sobib ahven veel tarbimiseks. Lõhe jaoks loodud meetodit õnnestus korrata ahvenal rahuldavate tulemustega.

3.4. Külmutamismarkerid

Külmutamismarkereid aspartaati, fumaraati ja fenüülalaniini analüüsi kvalitatiivselt. Uurimaks külmutamistemperatuuri mõju külmutamismarkerite tekkimisele lõhes ja ahvenas, hoiti proove vähemalt ööpäeva kolmel erineval temperatuuril: -20 °C, -40 °C ja -80 °C, järgnevatel päevadel temperatuuril hoiti lõhe fileed temperatuuril 4 °C ja ahvena fileed 0 °C. Koha fileed hoiti ööpäev temperatuuril -20 °C, seejärel 4 °C. TMR spektrid mõõdeti enne külmutamist (0 päev), kaks päeva peale sulatamist (eksperimenti 3. päev) ja 6 päeva peale sulatamist (eksperimenti 7. päev). Eksperimendid viidi läbi paralleelselt kvaliteedimarkerite katsetega.

3.4.1. Lõhe külmutamismarkerid

Lõhe katse 3. päeva proovide spektritelt olid aspartaadile omase keemilise nihkega piirkondades väga madalad piigid. Seega ei saa neis proovides kindlalt määrata aspartaadi sisaldust integraalsuhte järgi. Joonisel 3.11 on märgitud aspartaadi piigid, mida oli võimalik eristada, ning kollaselt tähistatud piirkonnad, kus peaksid asuma teised Asp iseloomulikud piigid. Neis vahemikes on muude ühendite kõrgemad piigid, mis varjavad võimalike Asp piikide olemasolu.



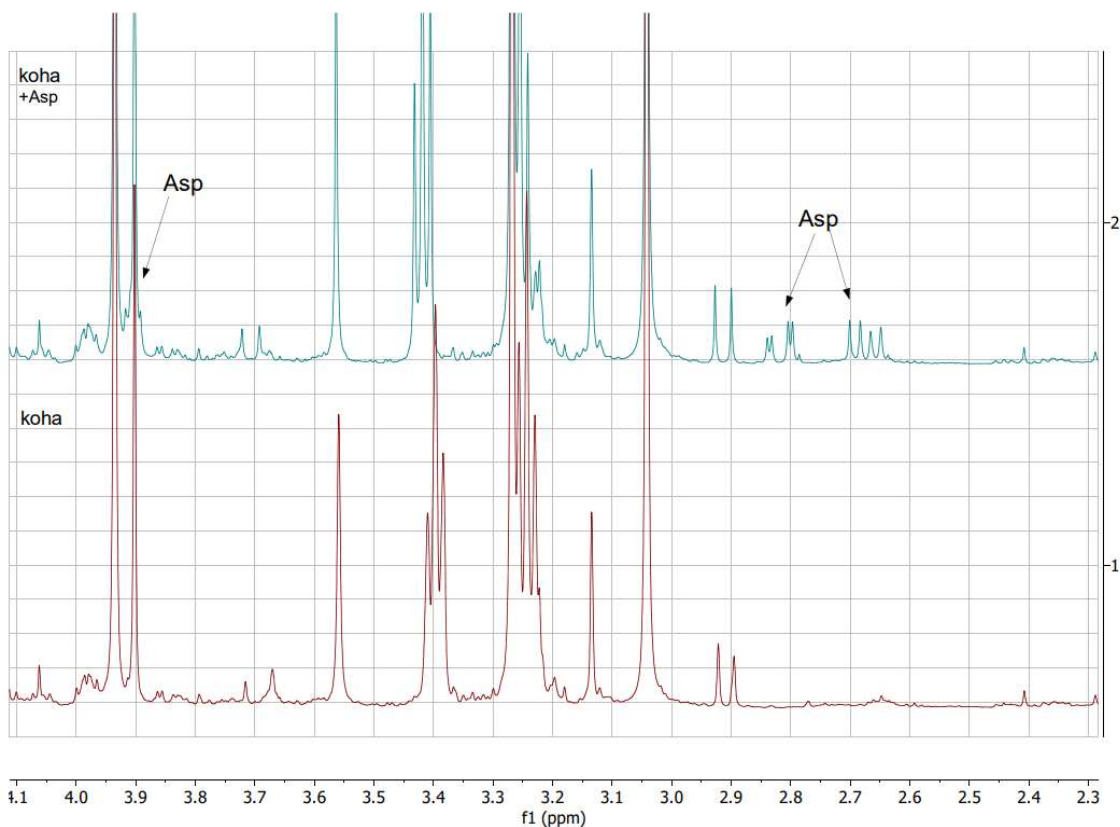
Joonis 3.11. Lõhe külmutamiskatse proovide ja külmutamata proovi 3. päeva spektrid ja vahemikes 6.7-6.4 ppm ja 4.0-2.4 ppm: 1) 0 °C hoitud, 2) -20 °C, 3) -40 °C ja 4) -80 °C juures ööpäeva hoitud.

Fumaraadi hulk lõhes peaks tõusma ja langema aspartaadiga sama kiirusega peale sulamist (Shumilina et al., 2020). Fumaraadile iseloomulikke keemilise nihke 6.51 ppm ümbruses ei leidunud mürast eristatavat piiki, see vahemik on joonisel märgitud siniselt. Kuna aspartaadi piigid on väga madalad, st selle sisaldus proovis on madal, võib ka fumaraadi sisaldus väga madal olla, mistõttu seda ei pruugi mürast eristada.

7. päeval mõõdetud proovides ei tuvastatud aspartaati ega fumaraati. Shumilina *et al.* 2020 mudeli põhjal langevad Asp ja fumaraadi kontsentratsioonid nädala jooksul peale sulatamist nullini. Seetõttu on 7. päeval mõõdetud proovides Asp ja fumaraadi puudumine ootuspärane.

3.4.2. Koha külmutamismarkerid

Koha filee külmutati 7 päeva peale ostmist 24 tunniks temperatuuril -20 °C. Neli päeva peale sulatamist mõõdeti TMR spekter, seejärel lisati spaikimiseks proovi lahusesse asparagiinhappe standardi deutereeriumoksiidi lahus. Saadud spektreid võrreldi, et lihtsustada Asp piigi leidmist. Jooniselt 3.12 võib järeldada, et koha proov ei sisaldanud aspartaati.

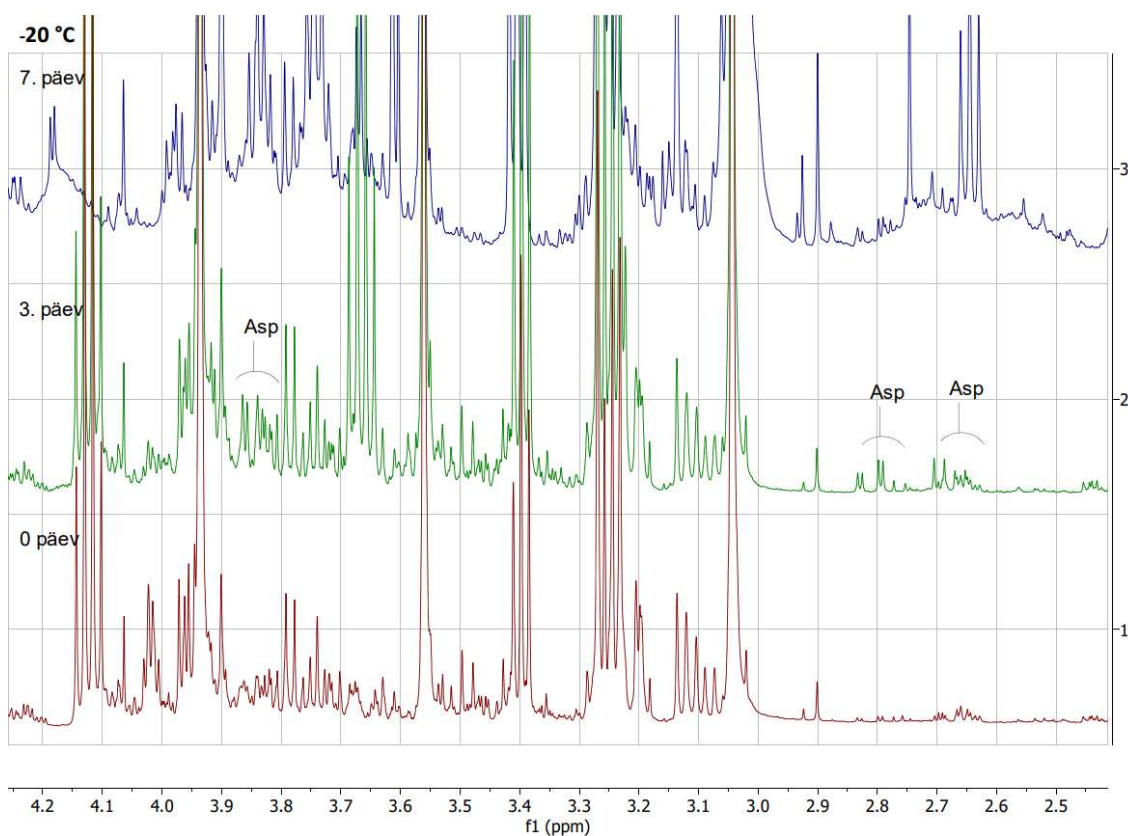


Joonis 3.12. Koha proovide spektrid 4.1-2.3 ppm: 1) koha, 2) koha proov, millesse aspariighappe standardit lisatud.

Aspartaadi puudumine sulatatud filees võib viidata aminohapete degradeerumisele enne külmutamist. Samuti võis analüüsitud filee olla külmutatud ning sulatatud enne ostmist, mille tulemusel aspartaat ja fumaraat lagunesid enne proovide mõõtmist. Koha külmutamismarkerite analüüsi puudutava kirjanduse puudusel ei saa ka kindel olla, et aspartaati külmutamise järel tekib nii nagu lõhe filees. Edaspidi tasub analüüsida kalafileed, mille püügiaeg on teada, et teha informeeritud järeldusi.

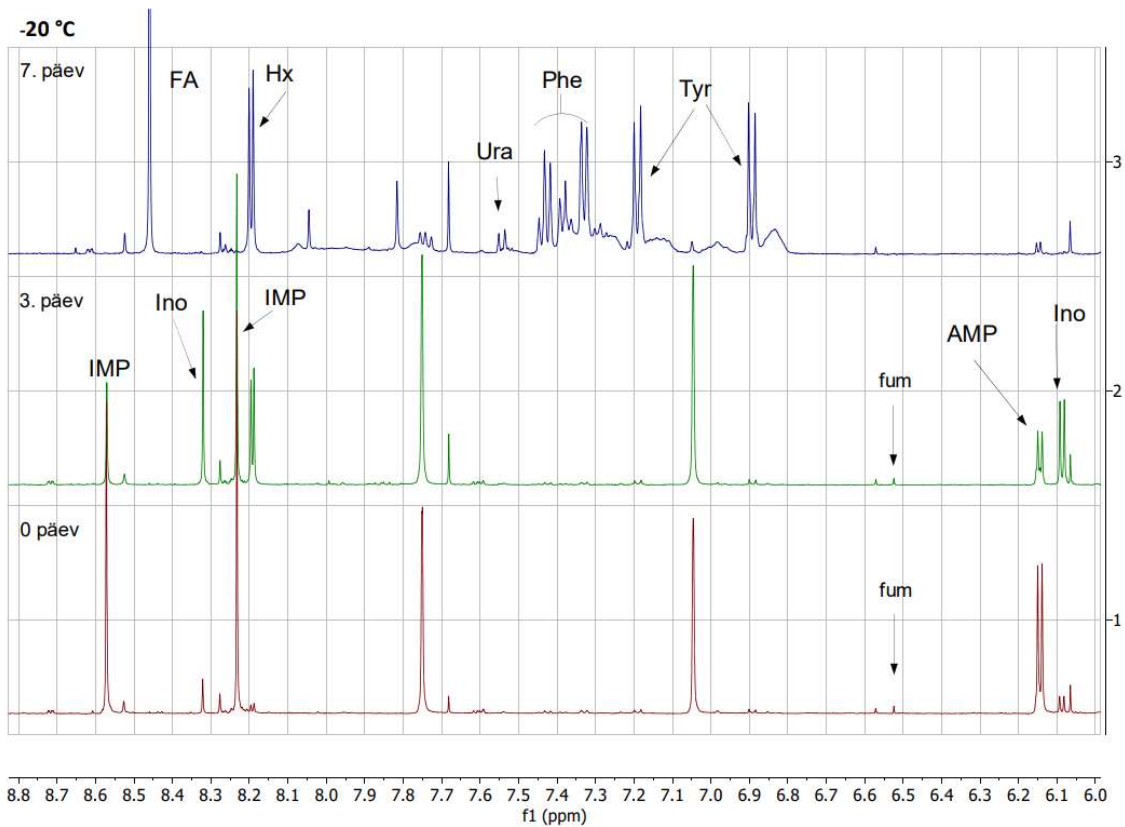
3.4.3. Ahvena külmutamismarkerid

Ahvena fileetükke külmutati lõhe katse eeskujul kolmel erineval temperatuuril ja spektrid mõõdeti 3. ja 7. päeval. Joonisel 3.10 on näidatud $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures külmutatud filee ja enne külmutamist (0 päev) mõõdetud spektrite 4.15-2.55 ppm vahemik. Erinevatel temperatuuridel külmutatud proovide spektrid olid üldjoontes sarnased, neid võrreldi omavahel, näidatud joonisel 3.13. 3. päeva spektril on märgitud võimalikud Asp piigid, kuid need on väga madalad võrreldes ümbritsevate piikidega.



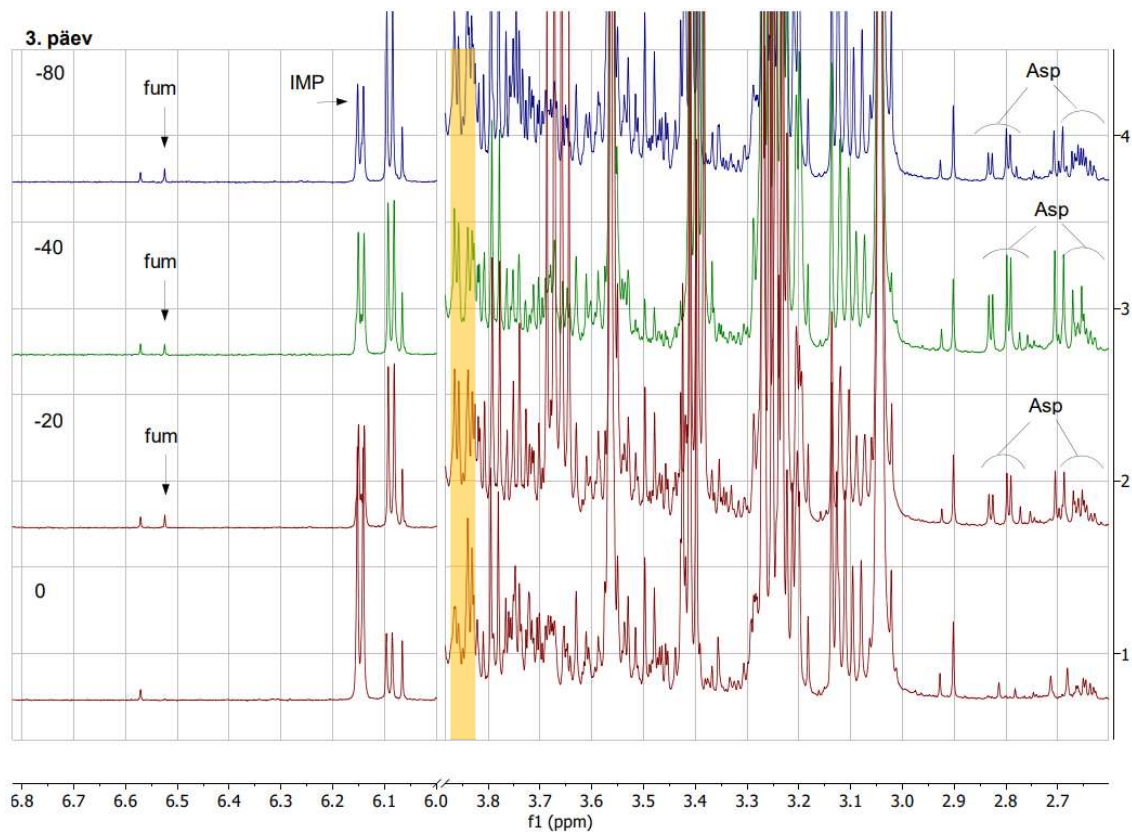
Joonis 3.13. Ahvena -20 juures hoitud proovide spektrid 4.15-2.55 : 1) 0 päeva, 2) 3. päeva, 3) 7. päeva spekter. Tähistatud on aspartaadi piigid

Eelnevalt kirjeldatud spektri vasak pool (8.8-6.0 ppm) on näidatud joonisel 3.14. Joonisel on märgitud nii kvaliteedimarkerid kui külmutamismarkerid, lisaks sipelghape, uratsiil, fenüülalaniin ja türosiin. Fumaraadi piik on nii 0 kui 3. päeval väga madal ning kaob proovist 7. päevaks.



Joonis 3.14. Ahvena -20 °C juures hoitud proovide spektrid 8.8-6.0 ppm: 1) 0 päeva, 2) 3. päeva, 3) 7. päeva spekter. Tähistatud on IMP, Ino, Hx, sipelghappe (FA), uratsiili (Ura), fenüülalaniini (Phe), türosiini (Tyr), fumaraadi (fum) ja AMP piigid.

Ahvena proovidest õnnestus tuvastada nii aspartaadi kui fumaraadi sisaldus kuni katse 3. päevani. Võrreldi ka erinevatel temperatuuridel külmutatud proove. 3. päeval mõõdetud spektrid ning paralleelselt 0 °C juures toimunud vananemiskatse spekter on esitatud joonisel 3.15. Igas külmutamiskatse proovis leidis aspartaati ja fumaraati, külmutamata proovis aspartaadi piiki ei tuvastatud.



Joonis 3.15. Ahvena 3. päeval mõõdetud proovide spektrid 6.8-2.6 ppm, välja lõigatud 6.0-3.9 ppm vahemik: 1) 0 °C hoitud, 2) -20 °C, 3) -40 °C ja 4) -80 °C juures külmutatud. Tähistatud on Asp ja fum piigid ja kollaselt vahemik, kus peaks olema Asp signaal.

7. päeval mõõdetud spektritel ei tuvastatud aspartaadi ja fumaraadi piike. Seega külmutamismarkerite hulk filees tõusis 3. päevani ja langes nullini 7. päevaks. Selline tulemus on kirjandusega kooskõlas.

Katse eesmärgiks oli kontrollida lõhel läbiviidud katse korratavust ahvenal ja analüüsida tulemusi kvalitatiivselt. Ahvenafileega läbi viidud katse põhjal järeldati, et külmutamismarkereid on võimalik tuvastada ahvenafileest. Saadud andmete põhjal on võimalik kinnitada, et fileesid külmutati, kuna proovides tuvastati aspartaati 3. päeval, aga mitte 7. päeval.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärk oli anda ülevaade erinevatest kvaliteedi- ja külmutamismarkeritest, markerite analüüsimise meetoditest ning TMR tööpõhimõttest. Eksperimentaalse töö eesmärk oli kontrollida lõhe kohta rahvusvahelises kirjanduses välja toodud kvaliteedi- ja külmutamismarkereid analüüsivate katsete korratavust kaubanduses kättesaadava lõhe peal ning kontrollida nimetatud katsete kohandatavust Eestis püütavate liikide koha ja ahvena analüüsimiseks.

Lõhe ja ahvena fileedega viidi läbi vananemise katsed, mille käigus mõõdeti ostmise päeval ning 1., 2., 3., 7. ja 14. päeval peale ostmist või fileerimist valmistatud proove TMR spektromeetris. Saadud spektreid analüüsiti kirjanduses leiduvate referentstabelite abil ning neis tuvastati kvaliteedimarkerid. Koha fileest valmistatud proovi mõõdeti TMR spektromeetris ostmise päeval, sellega vananemiskatset läbi ei viidud. Lõhe ja ahvena spektritel leitud integraalsuhete abil arutati iga proovi K-indeks ning esitati K-indeksi muutus ajas. Leiti, et sellise lõhe, milles ATP, ADP ja AMP enam ei sisaldu, ning ahvena analüüsimiseks ja värskuse hindamiseks sobivad paremini H-indeksi väärtused.

Ostmise päeval oli lõhe H-indeks 35%, mis on kirjanduses esitatud kriteeriumite kohaselt suurepärane kvaliteet. H-indeks tõusis üle 80% 3. päeval peale ostmist, mis tähendab, et sellest päevast alates oli lõhe kvaliteet kehv, ei olnud enam värsket. Kirjanduses esitatud K-indeksiga võrreldes järelitati, et analüüsitud lõhefilee püügist oli ostmise päevaks möödunud 7 päeva. Ahvena fileerimise päeval, so püüdmise järgsel päeval oli ahvena H-indeks 4.8% ning tõusis 3. päevaks 31%-ni. 7. päeval peale fileerimist oli H-indeks 94%, seega ahvena värskus langes kiiremini kui lõhel. Koha spektril tuvastati kvaliteedimarkerites vaid hüpoksaantiin ja inosiin, seega K-indeksit arutada ei olnud võimalik. Järelitati, et analüüsitud kohafilee püüdmisest oli kauem aega möödunud, kui K-indeksi leidmiseks vajalik on.

Külmutamismarkerite mõõtmiseks asetati lõhe, koha ja ahvena fileed ööpäevaks erinevatele temperatuuridele: -20 °C, -40 °C ja -80 °C. Proove mõõdeti enne külmutamist ning sulatamisest kahe ja kuue päeva möödumisel TMR spektromeetris ning saadud spektreid analüüsiti kirjanduse abil. Lõhe spektritel tuvastati aspartaadi signaalid, ahvena spektritel tuvastati aspartaadi ja fumaraadi signaalid 0 päeval ja 3. päeval, kuid mitte 7. päeval. Selline muutus vastab kirjanduses esitatule. Külmutamistemperatuur markerite tekkimist ja lagunemist ei mõjutanud.

Koha filees tehtud proovide spektritel ei tuvastatud külmutamismarkerite signaale. Põhjuseks võib olla analüüsitud filee varasem külmutamine ja sulatamine, mistõttu olid külmutamismarkerid tekkinud ja lagunened enne laborisse toomist.

Edasistes töödes tuleb arvesse võtta pH kõikumist proovide mõõtmise eel ning lisada proovidesse puhvrit. Samuti tasub proovide homogeniseerimiseks kasutada kuuljahvatusmeetodit. Külmutamistemperatuuri mõju külmutamismarkerite hulga hindamiseks tuleks läbi viia külmutamismarkerite kvantitatiivne analüüs ning koha külmutamismarkerite analüüsimiseks tuleks analüüsida fileed, mille säilitamistingimused on teada.

Tänuavaldused

Allikad

- Abramova, L. S., Kozin, A. v., & Shashkov, A. S. (2019). NMR — SPECTROSCOPY TECHNIQUE FOR SALMON FISH SPECIES QUALITY ASSESSMENT. *Food Systems*, 2(4), 4–9. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2019-2-4-4-9>
- Alam, N. (2007). Structure of Fish Muscles and Composition of Fish 5 Structure of Fish Muscles and Composition of Fish. In *Participatory Training of Trainers: A New Approach Applied in Fish Processing*. Bangladesh Fisheries Research Forum. <https://www.researchgate.net/publication/342231886>
- Alizadeh, E., Chapleau, N., de Lamballerie, M., & LeBail, A. (2007). Effects of freezing and thawing processes on the quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*, 72(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00355.x>
- Apetrei, I. M., Rodriguez-Mendez, M. L., Apetrei, C., & de Saja, J. A. (2013). Fish freshness monitoring using an E-tongue based on polypyrrole modified screen-printed electrodes. *IEEE Sensors Journal*, 13(7), 2548–2554. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2013.2253317>
- Archer, M. (2010). *Sensory assessment scoresheets for fish and shellfish-Torry & QIM*.
- Aursand, M., Standal, I. B., Praél, A., Mcevoy, L., Irvine, J., & Axelson, D. E. (2009). 13C NMR pattern recognition techniques for the classification of atlantic salmon (*salmo salar* L.) according to their wild, farmed, and geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3444–3451. <https://doi.org/10.1021/jf8039268>
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Pazos, M., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2013). Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, 34(6), 877–887. <https://doi.org/10.1002/elps.201200532>
- Brennan, L. (2014). NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 83, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2014.09.001>
- Cheng, J. H., Dai, Q., Sun, D. W., Zeng, X. A., Liu, D., & Pu, H. bin. (2013). Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection. *Trends in Food Science and Technology*, 34(1), 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.005>
- Cheng, J.-H., Sun, D.-W., Han, Z., & Zeng, X.-A. (2014). Texture and Structure Measurements and Analyses for Evaluation of Fish and Fillet Freshness Quality: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 52–61.
- Ciampa, A., Picone, G., Laghi, L., Nikzad, H., & Capozzi, F. (2012). Changes in the Amino Acid Composition of Bogue (Boops boops) Fish during Storage at Different Temperatures by 1H-NMR Spectroscopy. *Nutrients*, 4(6), 542–553. <https://doi.org/10.3390/nu4060542>
- Claridge, T. D. W. (2016). Introducing High-Resolution NMR. In *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* (pp. 11–59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-099986-9.00002-6>
- Domínguez-Aragón, A., Olmedo-Martínez, J. A., & Zaragoza-Contreras, E. A. (2018). Colorimetric sensor based on a poly(ortho-phenylenediamine-co-aniline) copolymer for the monitoring of tilapia (*Oreochromis niloticus*) freshness. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 259, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.020>
- Ellaway, J. I. J. (2021). *The Fourier Transform and Its Application to Structural Biology [Part One]*. Stemsid.Co.Uk.

- Erikson, U., Beyer, A. R., & Sigholt, T. (1997). Muscle High-Energy Phosphates and Stress Affect K-Values during Ice Storage of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 62(1), 43.
- Erikson, U., Standal, I. B., Aursand, I. G., Veliyulin, E., & Aursand, M. (2012). Use of NMR in fish processing optimization: A review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50(7), 471–480. <https://doi.org/10.1002/mrc.3825>
- Fraser, D. I., Dingle, J. R., Hines, J. A., Nowlan, S. C., & Dyer, W. J. (1967). Nucleotide Degradation, Monitored by Thin-Layer Chromatography, and Associated Postmortem Changes in Relaxed Cod Muscle. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 24(8), 1837–1841. www.nrcresearchpress.com
- Gill, T. A., Keith, R. A., & Smith Lall, B. (1979). TEXTURAL DETERIORATION OF RED HAKE AND HADDOCK MUSCLE IN FROZEN STORAGE AS RELATED TO CHEMICAL PARAMETERS AND CHANGES IN THE MYOFIBRILLAR PROTEINS. *Journal of Food Science*, 44, 661–667.
- Hui, G., Wang, L., Mo, Y., & Zhang, L. (2012). Study of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) quality predictive model based on electronic nose. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 166–167, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.066>
- Huss, H. H. (1995). *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Keeler, J. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy* (2nd ed.). Wiley.
- Leisner, J. J., & Gram, L. (2014). FISH: Spoilage of Fish. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Vol. 1, pp. 932–937). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00125-7>
- Luong, J. H. T., Male, K. B., Masson, C., & Nguyen, A. L. (1992). Hypoxanthine Ratio Determination in Fish Extract Using Capillary Electrophoresis and Immobilized Enzymes. *Journal of Food Science*, 57(1), 77–81.
- Mattsson, L., Xu, J., Preininger, C., Tse Sum Bui, B., & Haupt, K. (2018). Competitive fluorescent pseudo-immunoassay exploiting molecularly imprinted polymers for the detection of biogenic amines in fish matrix. *Talanta*, 181, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.010>
- Mendes, R., Cardoso, C., & Pestana, C. (2009). Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry*, 112(4), 1038–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.052>
- Mikš-Krajnik, M., Yoon, Y. J., Ukuku, D. O., & Yuk, H. G. (2016). Volatile chemical spoilage indexes of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored under aerobic condition in relation to microbiological and sensory shelf lives. *Food Microbiology*, 53, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.001>
- Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I. M., Henahan, G., Nielsen, J., & Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish Review freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8(August), 258–265.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S. v., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., & Jørgensen, B. M. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.08.006>
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4), 1475–1486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>

- Özogul, F., & Özogul, Y. (2006). Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chemistry*, *99*(3), 574–578. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.029>
- Pacquit, A., Lau, K. T., McLaughlin, H., Frisby, J., Quilty, B., & Diamond, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. *Talanta*, *69*, 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.10.046>
- Parella, T. (2006). *Pulse program catalogue: I. 1D & 2D NMR experiments*. Bruker Biospin.
- Peris, M., & Escuder-Gilabert, L. (2009). A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Analytica Chimica Acta*, *638*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.02.009>
- Rodger, G., & Hastings, R. (1984). Role of Trimethylamine Oxide in the Freeze Denaturation of Fish-Muscle-Is It Simply a Precursor of Formaldehyde? *Journal of Food Science*, *49*, 1640–1641.
- Rodriguez, M. B. R., Carneiro, C. da S., Feijó, M. B. da S., Júnior, C. A. C., & Mano, S. B. (2014). Bioactive Amines: Aspects of Quality and Safety in Food. *Food and Nutrition Sciences*, *05*(02), 138–146. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.52018>
- Rotariu, L., Lagarde, F., Jaffrezic-Renault, N., & Bala, C. (2016). Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants - trends and perspective. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *79*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.017>
- Saito, T., Arai, K.-I., & Matsuyoshi, M. (1959). A New Method for Estimating the Freshness of Fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, *24*(9), 749.
- Shumilina, E., Ciampa, A., Capozzi, F., Rustad, T., & Dikiy, A. (2015). NMR approach for monitoring post-mortem changes in Atlantic salmon fillets stored at 0 and 4 °C. *Food Chemistry*, *184*, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.037>
- Shumilina, E., Møller, I. A., & Dikiy, A. (2020). Differentiation of fresh and thawed Atlantic salmon using NMR metabolomics. *Food Chemistry*, *314*(January), 126227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126227>
- Sikorski, Z. E. (1990). *Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*. CRC Press, Inc. <https://doi.org/10.4324/9781003068419>
- Sone, I., Olsen, R. L., Dahl, R., & Heia, K. (2011). Visible/near-infrared spectroscopy detects autolytic changes during storage of atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Food Science*, *76*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02062.x>
- Thakur, M. S., & Ragavan, K. v. (2013). Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, *50*(4), 625–641. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0783-z>
- van Waarde, A. (1988). OPERATION OF THE PURINE NUCLEOTIDE CYCLE IN ANIMAL TISSUES. In *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 63, pp. 259–298). <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1469-185x.1988.tb00632.x>
- Wang, L., Li, J., & Zhang, L. (2015). Determination of polyphosphates in fish and shrimp muscles by capillary electrophoresis with indirect UV detection after phosphatase inhibition using high pressure pretreatment. *Food Chemistry*, *185*, 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.008>
- Wu, L., Pu, H., & Sun, D. W. (2019). Novel techniques for evaluating freshness quality attributes of fish: A review of recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, *83*, 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.002>
- Zhu, S., Luo, Y., Hong, H., Feng, L., & Shen, H. (2013). Correlation Between Electrical Conductivity of the Gutted Fish Body and the Quality of Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) Heads Stored at 0 and

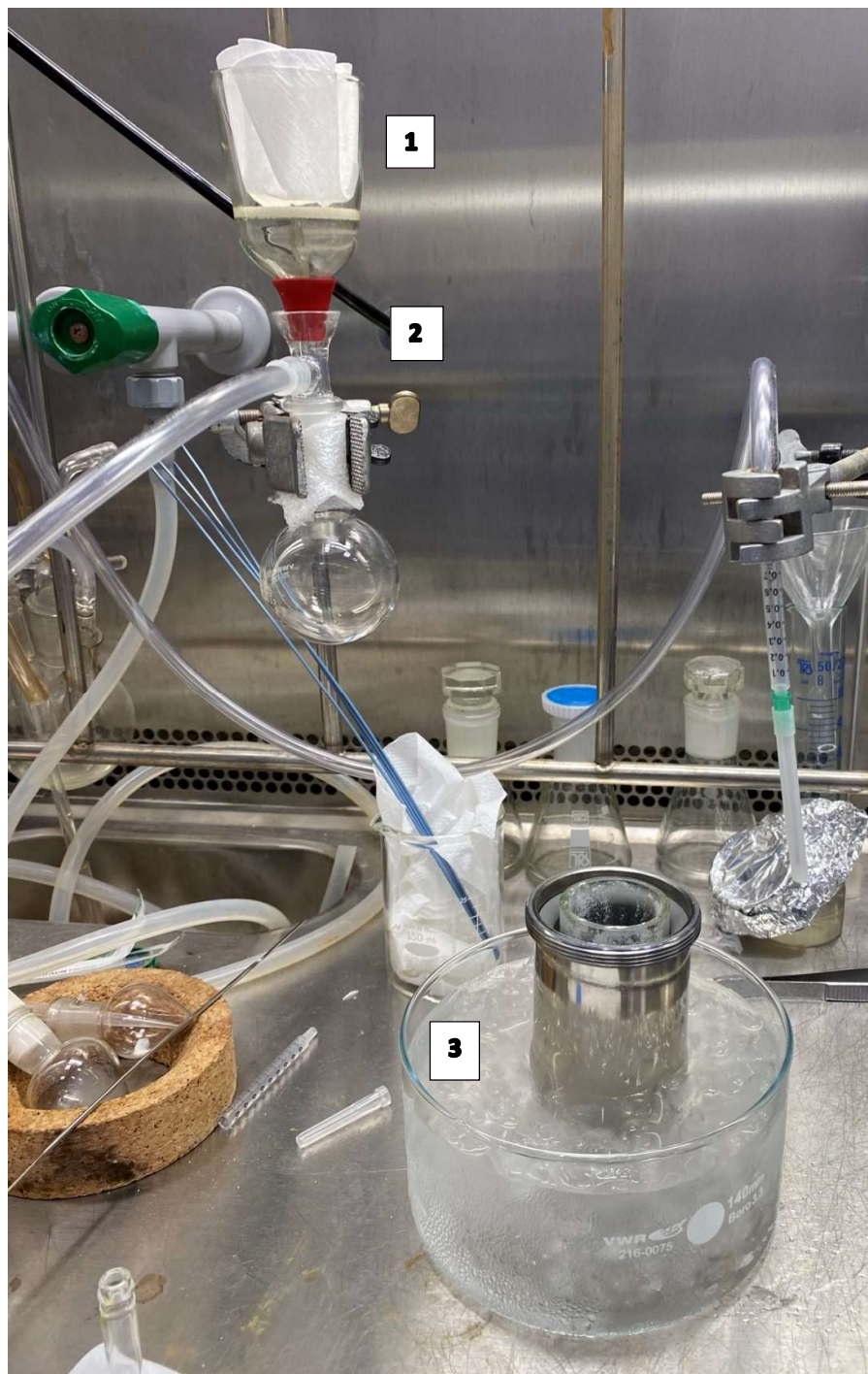
3 °C. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3068–3075. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0991-6>

Lisad

Lisa 1. Universal Laboratory AID homogenisaator, mille proovi sisaldav osa on jäävannis.



Lisa 2. Vaakumfiltersüsteem, 1 – paberfilter, 2 – vaakumsüsteem, 3 – homogeniseeritud proov jäävannil



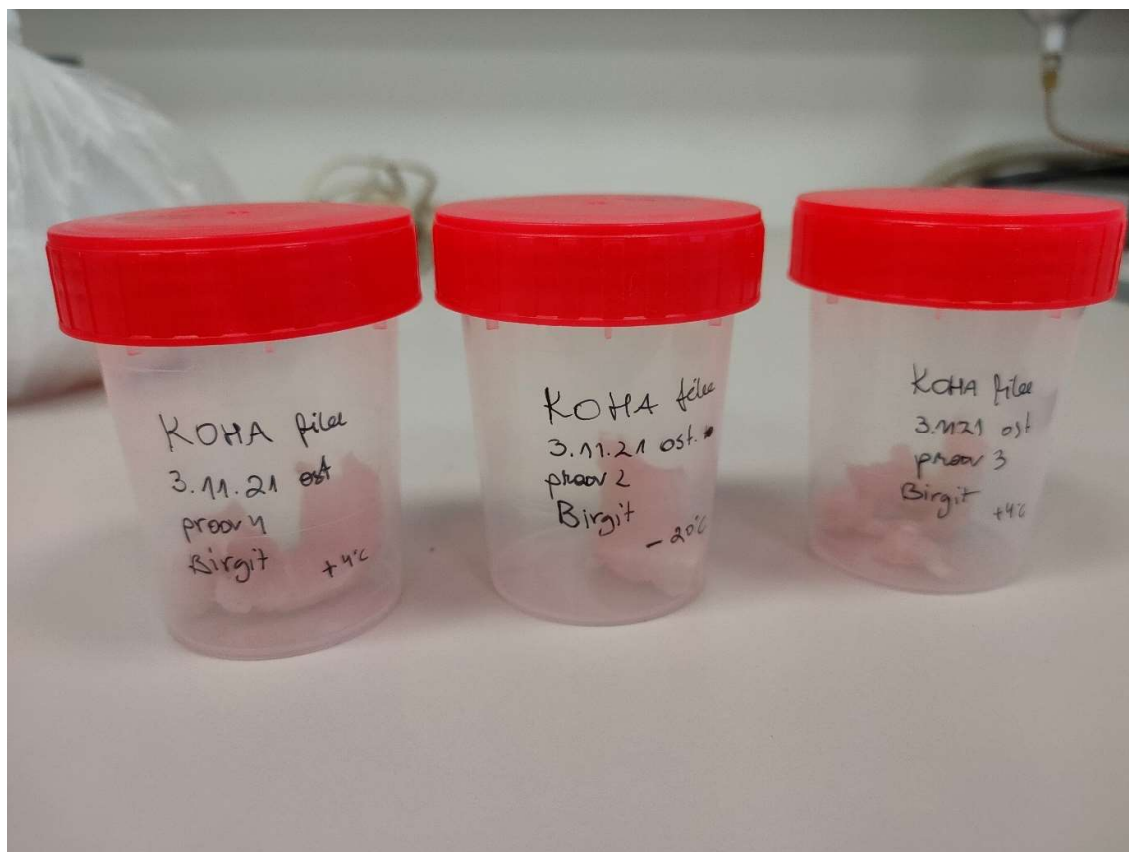
Lisa 3. Kuuljahvati



Lisa 4. Kuuljahvati plokk koos proovidega jää



Lisa 5. Kohafilee paralleelid steriilsetes topsides.



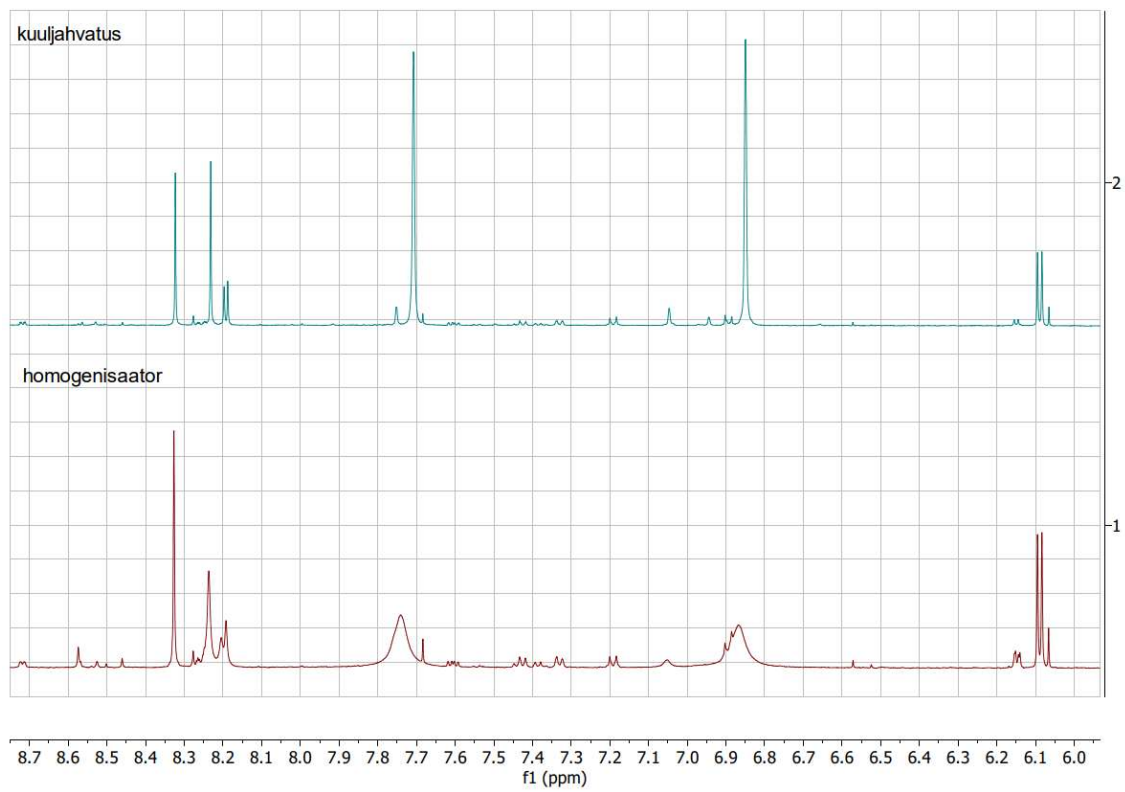
Lisa 6. Ependorfid lõhe ja ahvena uhmerdatud proovidega TKA lahuses ning teraskuulidega



Lisa 7. Ependorfid ahvena ja lõhe proovidega peale homogeniseerimist ja tseentrifuugimist



Lisa 8. Spektrid erineva homogeniseerimise meetodil valmistatud lõhe proovidest.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina _____ (autori nimi)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on _____,
(juhendaja nimi)

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

(kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtjaja jooksul ei kehti.

