

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

Keemia- ja materjalitehnoloogia teaduskond

Toiduainete Instituut

FORELLIMARJA SÄILIVUSE MÄÄRAMINE

Magistritöö

TIINA DE OLIVEIRA GUARILHA

Toidutehnika ja tootearenduse õppekava

TALLINN 2014

TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Faculty of Chemical and Material Technology

Department of Food Processing

**DETERMINATION OF SHELF LIFE OF TROUT
CAVIAR**

Master thesis

TIINA DE OLIVEIRA GUARILHA

Food engineering and product development

TALLINN 2014

Deklareerin, et käesolev magistritöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud või (avaldamata tööde korral) toodud autorlus välja põhitekstis.

Tiina De Oliveira Guarilha

.....

Üliõpilase kood: 121822 KATM

Töö vastab kehtivatele nõuetele:

Juhendaja:

Toomas Paalme, Toidutehnoloogia õppetool, õppetooli juhataja,
professor

Kaitsmisele lubatud “....”2014

Kaitsmiskomisjoni esimees Prof. Toomas Paalme

ANNOTATSIOON

Forellimarja ja teiste toiduainete puhul on levinud suund väheneva soolasisalduse poole, mistõttu säilivusaeg lüheneb ning selle pikendamiseks peab kasutama lisaaineid. Tarbijate soovil on mitmetes toiduainetes loobutud kunstlikest säilitusainetest ning leitud asemele looduslikke variante. Magistritöö ülesanne on määrata forellimarja säilivus kasutades nelja erinevat retseptuuri, millest esimene ei sisalda ühtegi lisaainet ja teised kolm sisaldavad erinevaid lisaaineid ja/või nende kombinatsiooni. Forellimarja säilivuse määramiseks kasutatakse mikrobioloogilist ja sensoorset analüüsi, millele lisaks mõõdetakse igast proovist pH. Magistritöö tulemustest selgub, et forellimarja sensoorsed omadused säilitamise jooksul halvenevad ja mikroorganismide hulk kasvab. Kirjanduse andmetel on toiduaine riknemise sensoorse tuvastamise alguspiiriks mikroorganismide hulk 10^7 . Sellele vastavalt säilib lisaaineteta forellimari 16 päeva, naatriumbensoaadiga 28 päeva, kaaliumsorbaadiga 28 päeva ja naatriumbensoaadi ning sidrunhappega 37 päeva.

Magistritöö koosneb kirjanduse ülevaatest, teema peatükkidest, eksperimentaalsest osast, arutelust ja kokkuvõttest. Kirjanduse ülevaates tutvustatakse vikerforelli, kirjeldatakse marja teket emakalas ning söömiseks valmistatud forellimarja sensoorseid omadusi. Teema peatükkides räägitakse kalamarja toitainelisest koostisest, käitlemise tehnoloogiast, kalamarja riknemisest ja kalatoodetele lubatud lisaainetest. Eksperimentaalses osas tutvustatakse materjale ja meetodeid, retseptuuride valikut, katsete käiku, tulemusi ja nende analüüsi. Arutelu analüüsitakse tulemusi ja nende põhjuseid. Kokkuvõttes antakse ülevaade magistritöö eesmärgist, töö käigust, tulemustest ja järeldustest.

Magistritöö koosneb 60 leheküljest, neljast joonisest, viiest graafikust ja 15 tabelist.

ABSTRACT

For caviar and other processed foods, the salt content has been reduced constantly and to extend the shortened shelf life, food additives are necessary. At the request of consumers many food producers have disclaimed the use of artificial preservatives and found natural additives instead. The scope of this master's thesis is to determine the shelf life of trout caviar using four different recipes of which one does not contain any additive and the other three contain different additives and/or a combination of them. Microbiological and sensorial analyses are used to determine the shelf life of trout caviar, the pH of each sample is measured in addition. The results of this thesis show that the sensorial quality of trout caviar deteriorates during storage time and the amount of microbes increases. Based on literature the amount of microbes indicating obvious spoilage is 10^7 . According to that amount the shelf life of trout caviar without additives is 16 days, with sodium benzoate is 28 days, with potassium sorbate is 28 days and with sodium benzoate combined with citric acid is 37 days.

The master thesis consists of literature overview, main chapters, experimental part, discussion and summary. In the literature overview the rainbow trout, the process of eggs formation in female trouts and sensory characteristics of caviar are described. In the main chapters the nutritional composition of caviar, production technologies, spoilage and additives for fish products are discussed. The experimental part is about the materials and methods, the selection of recipes, the experiment itself, results and their analyses. In discussion the results and their causes are analyzed. In the summary the overview of purpose of this thesis, the experiment, the results and conclusions are given.

The master thesis consists of 60 pages, four figures, five graphs and 15 tables.

SISUKORD

| | |
|---|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 8 |
| SISSEJUHATUS | 9 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 10 |
| 2. KALAMARJA TOITAINELINE KOOSTIS | 12 |
| 2.1 Forelli- ja lõhemari | 13 |
| 2.2 Tuuramari | 14 |
| 3. FORELLIMARJA KÄITLEMISE TEHNOLOOGIAD | 15 |
| 3.1 Marjaterade eraldamine | 15 |
| 3.2 Soolamine | 16 |
| 3.2.1 Tuuramarja soolamine | 16 |
| 3.3 Pastöriseerimine | 17 |
| 4. KALATOODETE RIKNEMINE | 19 |
| 5. KALATOODETELE LUBATUD LISAAINED | 22 |
| 5.1 Naatriumkloriid | 22 |
| 5.1.1 Antimikroobne toime..... | 23 |
| 5.2 Bensoehape ja bensoaadid | 23 |
| 5.2.1 Keemilised ja füüsikalised omadused | 24 |
| 5.2.2 Toimemehhanismid | 24 |
| 5.2.3 Toksikoloogia | 26 |
| 5.3 Sorbiinhape ja sorbaadid | 27 |
| 5.3.1 Tootmine..... | 27 |
| 5.3.2 Toimemehhanismid | 27 |
| 5.3.3 Metaboolne lagunemine | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.3.4 Toksikoloogia | 29 |
| 5.4 Sidrunhape | 30 |
| 5.5 Biosäilitamine piimhappebakteritega | 31 |
| 5.6 Biosäilitamine eeterlike õlidega | 31 |
| 6. PRAKTILINE OSA..... | 33 |
| 6.1 Säilivuskatsete planeerimine | 33 |
| 6.1.1 Retseptuuri valik ja katsete kord | 33 |
| 6.2 Forellimarja retseptuuride valmistamine | 34 |
| 6.3 Materjalid ja meetodid..... | 35 |
| 6.3.1 Mikrobioloogilised ja pH analüüsid | 36 |
| 6.3.2 Veeaktiivsuse määramine | 36 |
| 6.3.3 Sensoorne analüüs | 37 |
| 7. TULEMUSED..... | 39 |
| 7.1 Mikrobioloogilised ja keemilised analüüsid..... | 39 |
| 7.2 Sensoorsed analüüsid..... | 43 |
| 8. TULEMUSTE ANALÜÜS | 44 |
| 9. ARUTELU | 52 |
| KOKKUVÕTE..... | 55 |
| SUMMARY | 57 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 58 |
| TÄNUAVALDUSED..... | 60 |

KASUTATUD LÜHENDID

Cfu- colony forming unit

E260- äädikhappe E-tähis

E300- askorbiinhappe E-tähis

E330- sidrunhappe E-tähis

IU- rahvusvaheline ühik

N- Newton, [J]

NaCl- naatriumkloriid

RT- Riigi Teataja

USDA- United States Department of Agriculture

SISSEJUHATUS

Kalamari on maailmas levinud delikatess, mille tuntuim esindaja on must tuuramari ehk kaaviar. Kaaviari kõrval toodetakse ka teiste kalade marja, eelkõige lõheliste, heeringa, merivarblase, tursa ja siia marja. Töötlemistehnoloogiatest kasutatakse peamiselt soolamist, pastöriseerimist ja suitsutamist. Kalamari on tervislik toiduaine, sest ta on hea valgu, küllastumata rasvhapete ning vitamiinide E ja D allikas.

Marja säilivus sõltub tooraine kvaliteedist, soola kontsentratsioonist, kasutatud lisanditest ja töötlemismeetodist. Käesolevas töös uuritav mari on soolatud 2,5 %-se soolasisaldusega, millele on lisatud säilitusainet naatriumbensoaati. Bensoaatidele ja sorbaatidele on hoolimata looduslikust päritolust omistatud negatiivseid mõjusid tervisele nagu laste hüperaktiivsus, astma ja nõgestõbi. Mitmetes toiduainetes on säilitamiseks edukalt rakendatud aineid, mis on looduslikumad, näiteks ensüümid, eeterlikud õlid, piimhappebakterid ja nende toodetud antimikroobsed ühendid. Töös kasutatavate retseptuuride valimisel uuritakse ka niinimetatud biosäilitamise võimalusi.

Uuritava forellimarja tootja on väikeettevõtja, kes on toote säilivuse määranud oma oskuste baasil, kuid puudub katseline dokumenteeritud uurimus. Osa forellimarjast valmistatakse ainult soolaga, kuna tarbijate hulgas on nõudlus ka e-ainete vabale marjale. Töö eesmärgiks on määrata forellimarja säilivus kasutades mikrobioloogilist ja sensoorset analüüsi. Sensoorse analüüsi abil hinnatakse toote omaduste muutuseid ja määratakse forellimarja kõlblikkus ning võrreldakse samal ajahetkel sisalduva mikroorganismide arvuga. Poodides müügil olevates kalatoodetes, sealhulgas kalamarjas, kasutatakse säilitusainetena naatriumbensoaati ja kaaliumsorbaati, millele on mõnes tootes lisatud juurde sidrunhapet ja askorbiinhapet. Soolatud forellimarjale on võrdluseks võetud kolm lisaretseptuuri, et hinnata forellimarja säilivust erinevate lisanditega.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Vikerforell (*Onchorhynchus mykiss*) on forellide hulgast kõige enam kasvatatav liik, sest võrreldes teistega talub ta kõrgemaid temperatuure ja kasvab kiiremini. Forell elab vees, mille temperatuur kõigub 10-18°C vahel (surmav temperatuur on vahemikus 25-27°C), aga teda leidub ka mitmetes troopilistes ja subtroopilistes piirkondades nagu Aasia, Aafrika ja Lõuna-Ameerika. Kasvatatud forelli elukeskkonnaks on tiigid, sumbad (värkse ja soolane vesikeskkond), reservuaarid ja vooluveega süsteemid [1].

Kala mari on marjakotis olevad kala ootsüüdid, millest peale viljastamist arenevad kalamaimud. Paljunemise aktiivsus sõltub enamikel kaladel aastaajast, kõige rohkem neil, kes paljunevad suurel hulgal. Valgusperiood ja temperatuur on kõige põhilisemad keskkondlikud tegurid, mis paljunemistsükli mõjutavad. Valgusperioodi muutused initsieerivad enamike liikide paljunemistsükli, samas kui temperatuuri muutused kontrollivad tsükli lõpuleviimist, et tagada vastsete tootmise kokkulangevus sobivate keskkonna tingimustega nende ellujäämiseks [2]. Ootsüütide areng sõltub üldiselt maksa funktsionaalsetest metaboolsetest protsessidest. Muna on hoiuorganiks rebule, mis sisaldab toitaineid embrüo ja tema järelarenguks. Emakala varustab rebu prekursori valgu (vitellogeniin) abil oma energiaga. Vitellogeniin (kõrgmolekulaarne lipoglükofosfoproteiin) sisaldab põhilisi toitaineid varajase kasvu jaoks ja tulevase kala ellujäämiseks. Vitellogeniin seob katioone, eriti kaltsiumi, mistõttu suudab ta varustada arenevaid ootsüüte valkude, aminohapete, lipiidide, süsivesikute ja mineraalidega ning fosfaatidega, mis on olulised hilisemal luustiku arenemisel [3].

Kalamarjatooted kuuluvad mitmetes kultuurides traditsiooniliste toitade hulka. Kaaviariks nimetatakse kalade ja meres elavate selgrootute soolatud marja. Toormarja säilitatakse külmkapi temperatuuril või sügavkülmutatuna, pikema säilivuse annab kuumtöötlemine, soolamine, kuivatamine, suitsutamine ja marineerimine. Kaaviari valmistatakse puhastatud marjateradest soolamise teel, millele lisatakse mõnikord maitseaineid ja/või värvi. Kõige tuntum ja kallim kaaviar on tuuramari, mis pärineb Kaspia mere regioonist (hind aastal 2003 oli 700\$/ 100 g). USA-s on lubatud kaaviari nime all müüa ainult tuuramarja [4].

Kalamarja toodete valmistamiseks peab toormari olema kahjustamata, terve, vastava värvitooniga, läikega, tekstuuri ja maitsega. Õige marja suutunne kala liikide vahel erineb.

Lõhemarja tähtsaks omaduseks on marjatera katki hammustamisel teatud plõksu olemasolu, mille järel täitub suu pehme meetaolise tundega. Tuuramarja puhul on oluline võine tekstuur, mis tekitab suus sulava tunde. Iga toote valmistamiseks peab toormari olema õige küpsusega. Väheküpsunud mari on mõrkja maitsega (heeringas, lõhe) ja ei sooldu hästi. Ebahühtlaselt sooldunud mari võib kiiresti rikneda psührotroofsete roisubakterite toimel. Üleküpsunud tuura mari on väheelastne ja pehme ning ei ole sooldumise järgselt ümara kujuga, lõhe mari muutub ümbert kummiseks. Marja saagis sõltub kala liigist, tootmise protsessist, küpsusastmest, toitumisest, stressitasemest ja keskkondlikest tingimustest. Lõhe (*Onchorynchus keta*) marja saagis on umbkaudu 15% ja tuura puhul isegi kuni 25%. Saagikust arvutatakse marjaga kalade protsendina kogu hukatud ema- ja isakalade hulgast [4].

2. KALAMARJA TOITAINELINE KOOSTIS

Marja keemiline koostis (tabel 1) sõltub marja küpsusastmest, erinevusi esineb ka kasvatuspiirkondade ja aastate lõikes. Kõikide kalade marjas on üldiselt kõrge valgu ja rasva kontsentratsioon. Keemiline koostis muutub vähesel määral marja asukoha järgi kala kõhus, sest küpsemad marjaterad paiknevad kala sabapoolses osas, kust nad esimestena vette lastakse [5].

Tabel 1. Kalamarja koostis USDA National Nutrient Database andmetel [6].

| Nutrient | Unit | Value per 100 g |
|-----------------------------|------|-----------------|
| Proximates | | |
| Water | g | 47,50 |
| Energy | kcal | 264,00 |
| Energy | kJ | 1105,00 |
| Protein | g | 24,60 |
| Total lipid (fat) | g | 17,90 |
| Carbohydrate, by difference | g | 4,00 |
| Fiber, total dietary | g | 0,00 |
| Sugars, total | g | 0,00 |
| Minerals | | |
| Calcium, Ca | mg | 275,00 |
| Iron, Fe | mg | 11,88 |
| Magnesium, Mg | mg | 300,00 |
| Phosphorus, P | mg | 356,00 |
| Potassium, K | mg | 181,00 |
| Sodium, Na | mg | 1500,00 |
| Zinc, Zn | mg | 0,95 |
| Copper, Cu | mg | 0,11 |
| Manganese, Mn | mg | 0,05 |
| Selenium, Se | µg | 65,50 |
| Vitamins | | |
| Vitamin C | mg | 0,00 |
| Thiamin | mg | 0,19 |
| Riboflavin | mg | 0,62 |
| Niacin | mg | 0,12 |
| Pantothenic acid | mg | 3,50 |
| Vitamin B-6 | mg | 0,32 |
| Folate, total | µg | 50,00 |
| Folic acid | µg | 0,00 |

| Nutrient | Unit | Value per 100 g |
|------------------------------------|------|-----------------|
| Vitamins | | |
| Folate, DFE | µg | 50,00 |
| Choline, total | mg | 490,90 |
| Vitamin B-12 | µg | 20,00 |
| Vitamin A, RAE | µg | 271,00 |
| Retinol | µg | 271,00 |
| Carotene, beta | µg | 0,00 |
| Carotene, alpha | µg | 0,00 |
| Cryptoxanthin, beta | µg | 0,00 |
| Vitamin A, IU | IU | 905,00 |
| Lycopene | µg | 0,00 |
| Lutein + zeaxanthin | µg | 648,00 |
| Vitamin E (alpha-tocopherol) | mg | 1,89 |
| Vitamin D (D2 + D3) | µg | 2,09 |
| Vitamin D | IU | 117,00 |
| Vitamin K (phylloquinone) | µg | 0,60 |
| Lipids | | |
| Fatty acids, total saturated | g | 4,06 |
| Fatty acids, total monounsaturated | g | 4,63 |
| Fatty acids, total polyunsaturated | g | 7,41 |
| Other | | |
| Alcohol, ethyl | g | 0,00 |
| Caffeine | mg | 0,00 |
| Theobromine | mg | 0,00 |

2.1 Forelli- ja lõhemari

Forelli marjas (*Onchorynchus mykiss*) esineb lipiide 6,5-8,8 %. Marjatera küpsemisel lipiidide osa suureneb. Forellimarja põhilised lipiidid on triglütseriidid ja fosfolipiidid, vastavalt 42-49 % ja 49-54 %. Kolesterooli sisaldus on 1,9-2,4 %, vabu rasvhappeid on 0-1,6 %, oomega-3-rasvhappeid 37 % ja oomega-6-rasvhappeid 6,3 %. Lõhe mari on peaaegu samasuguse koostisega nagu forelli mari. Lõhe marjas on rohkem lipiide, mille täpne kontsentratsioon erineb mõnevõrra lõhe liigist. *Onchorynchus keta* marjas on 12-20 % lipiide, mille fraktsioon koosneb peamiselt triatsüülgütseroolist (63 %), fosfolipiididest (30 %) ja steroolidest (4,2 %). Triatsüülgütseroolid ja fosfolipiidid on põhilised rühmad soolatud forellimarjas [5].

Kalamarjas on ka palju vitamiine ja mineraalaineid. Näiteks lõhe mari sisaldab 50-3000 IU/ g vitamiini A, 5-25 IU/ g vitamiini D, 10-80 IU/ 100 g vitamiine B1, B2 ja B12 ning 10-30 IU/ 100 g vitamiini C. Mineraalainetest sisaldab lõhe mari kaltsiumi, rauda, magneesiumi, mangaani, fosforit, kaaliumit, vaske ja tsinki. Forelli marjas ja teistes kalamarjades on kõrge valgu väärtus, sest neis esineb väga lai hulk aminohappeid [5].

2.2 Tuuramari

Tuura liike on üle kahekümne, marja tootmiseks kasvatatakse või püütakse peamiselt siberi tuura (*Acipenser baerii*), beluga tuura (*Huso Huso*) ja vene tuura (*Acipenser gueldenstaedtii*). Beluga tuura marjas on valku 14,73 %, rasva 3,92 %, vett 74,97 % ja tuhka 0,81 %. Rasvasisalduse <4 % alusel on tuur väherasvane kala. Enamjaolt on uuritud marja rasvhappelist koostist. Rasvast moodustavad monoküllastumata rasvhapped 43,11 %, polüküllastumata rasvhapped 28,02 % ja küllastunud rasvhapped 20,72 %. Põhilised rasvhapete esindajad nendes gruppides on vastavalt olehape (C18:1), dokosaheksahape (C22:6) ja palmithape (C16:0) [7].

3. FORELLIMARJA KÄITLEMISE TEHNOLOOGIAD

Igasugune kalamari peab kaaviari valmistamiseks olema õige küpsusega. Vähesel küpsusega mari võib olla mõrkja maitsega (heeringas, lõhe) või ei sooldu piisavalt. Üleküpsunud tuura mari võib muutuda pehmeks, kaotab oma elastsuse ega jää peale sooldumist terveks. Lõheliste ja mõnede teiste liikide mari moodustab üleküpsemisel kõva, kummise väliskesta. Maitse ning valkude ja lipiidide konsistentsist tingitud suutunne muutub üleküpsemisega ebameeldivaks [5].

3.1 Marjaterade eraldamine

Üldine forelli- ja lõhemarja soolamise tehnoloogiline skeem on toodud joonisel 1. Kalamari eemaldatakse kalade kõhust sidekoelises marjakotis. Marjakott on nahkne materjal, mis on terade ümber ja kaitseb neid. Terade vabastamiseks ja üksteisest eemaldamiseks kasutatakse sõelumist. Esmalt kastetakse marjakott 3 %-sse soolalahusesse. Seejärel lahutatakse iga marjatera nahksest ümbrisest manuaalselt, surudes nad õrnalt läbi nailonist või roostevabast terasest sõrestiku (*screen*). Marjaterade eraldamiseks sidekoest kasutatakse ka ensümaatilisi protsesse, mis vähendavad inime aega ja suurendavad saagikust. Kasutatavate ensüümide hulka kuulub peamiselt kollageenaas, mis ekstraheeritakse krabi pankreasest. Ensümaatiline töötlus imiteerib emases kalas toimuvat looduslikku protsessi marjaterade küpsemise järel, kus terade kõhust väljalaskmiseks lõhutakse sidekude vastavate ensüümide abil [4].

Lõhele *Onchorynchus gorboscha* on aretatud oma ensümaatiline meetod marjaterade eraldamiseks sidekoest. 25 %-sse soolalahusesse lisatakse ensüümipreparaati Digestase (Alaska Russia Salmon Caviar Co., Anchorage, AK) 0,5 g/ kg marja kohta. Marja ja soolalahuse suhe on 0,5 kg toormarja/ l. Soolalahuse segu ja toormarja soojendatakse inkubaatoris 37°C juures 4-10 minutit ja tekkinud jäägid dekanteeritakse marja pealt. Eraldunud marjaterasid loputatakse neli korda külmas (4°C) 25 %-s soolalahuses. Tootja lubab taolise tootmisprotsessi saagikuseks 90 %, kuid tegelikult on see 80 % ning ülejäänud hulk on katkised marjaterad. Kalamarja lõpptootes on kõrge niiskussisaldus ja marja valmistamise nõrutamisprotsessis eemaldub palju vedelikku.

Põhjuseks on marjakesta osaline hüdroliüs kollageenaasi toimel inkubaatoris. Ensümaatilise eraldamise eeliseks manuaalsele on väiksem kasutatud tööjõud. [5].

3.2 Soolamine

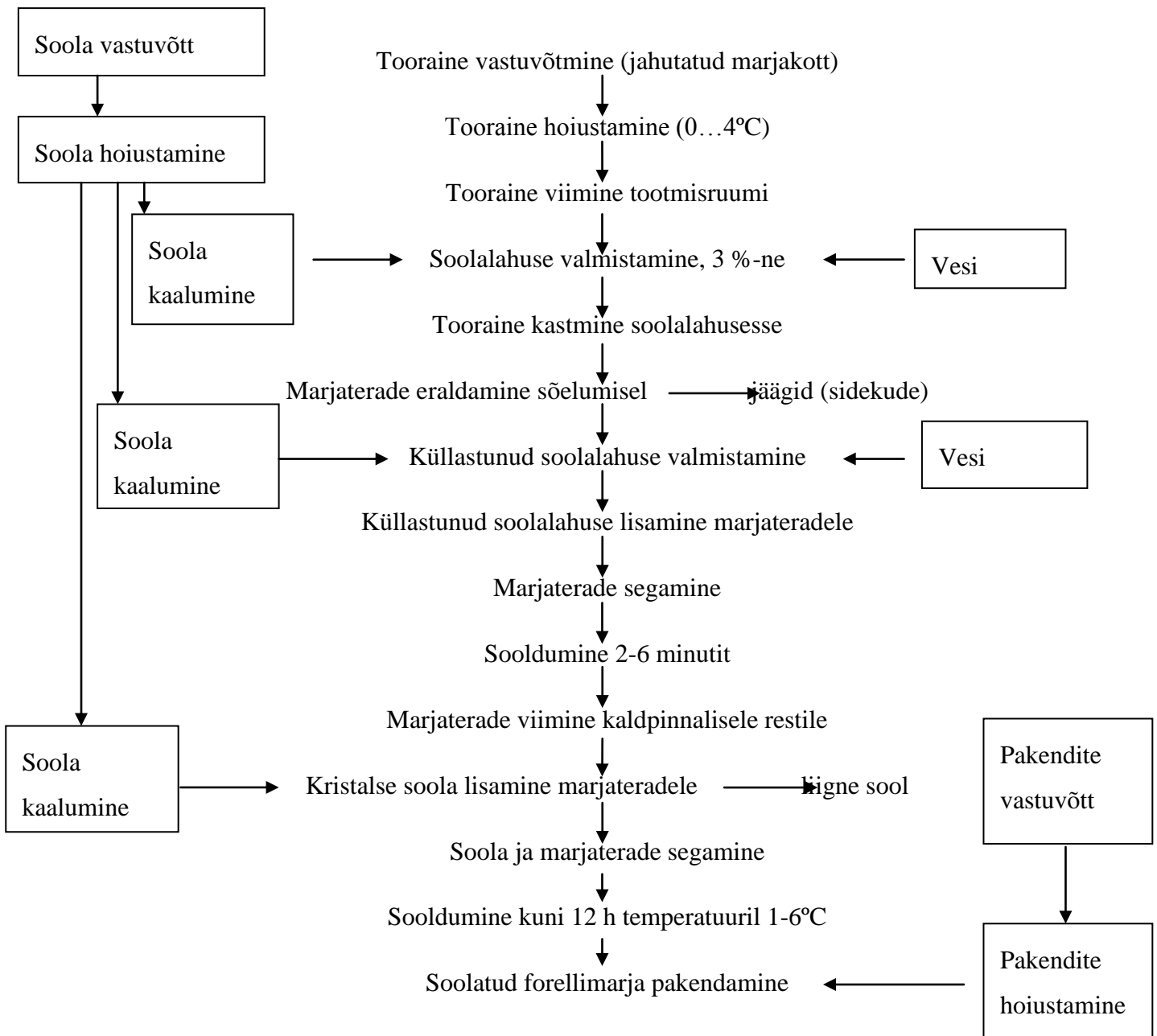
Forelli- ja lõhemarja soolatakse tavaliselt 3-4 %-sena, soolasemate toodete puhul lisatakse 4-6 % soola. Tarbijate eelistuste muutumisel on populaarsust kogunud 2,8-3,5 % soolasusega mari. Tüüpilise lõhemarja ehk *ikra* (mari, vene k.) valmistamiseks lisatakse eraldatud marjateradele küllastunud soola vesilahust (marja/soolalahuse mahusuhe 1/3), segatakse ning lastakse mõjuda 2-6 minutit kuni saavutatakse vajalik soola kontsentratsioon. Protsess toimub temperatuurivahemikus $8...12^{\circ}\text{C}$. Soolamine muudab marja kesta tugevamaks. Peale marja soolamist niiskuse osa väheneb ja valgu osa suureneb, sest sooldumise käigus eemaldub vesi. Tuha kogus suureneb lisatud naatriumi tõttu ja lipiidide osa suureneb proportsionaalselt eemalduva vee hulgaga sooldumise käigus. Soola imendumine sõltub kala liigist, marja seisukorrast ja küpsusastmest. Ensümaatiliselt töödeldud marjas toimub sooldumine kiiremini võrreldes sama kvaliteediga värskel marjaga, mis pole vastavat töötlust saanud. Marja nõrutamiseks ja sooldumiseks asetatakse mari kaldpinnalisele roostevabast terasest restile või perforeeritud plastmassist ämbrisse. Kaldpind võimaldab liigselt marja pindmistel ja rakusisestel vedelikel eralduda ja ära voolata. Marja nõrutamine ja sooldumine toimub külmkapi temperatuuril ($1-6^{\circ}\text{C}$) vähemalt 30 minutit ja kestab kuni 12 tundi. Mitmetunnine sooldumine ühtlustab marja sees soola kontsentratsiooni ja aitab marjateradel tugevneda [4].

3.2.1 Tuuramarja soolamine

Tuuramarja soolamiseks kasutatakse tavaliselt kuivsoolamist, sool segatakse marjateradega kontsentratsioonis 4-5 %/ kg marja kohta. Lõpptootes saavutatakse soolasus 3-3,5 %, tekkiv vedelik koos osalise soolaga eraldub nõrutamisel. Tuuramarja nõrutatakse 5-15 minutit peenel sõelal. Lõplik soolasus sõltub marja küpsusest, värskusest, marja/soola segu temperatuurist ja sooldumisajast. Sooldumine mõjutab marja füüsikalisi omadusi ja suurendab marjakesta tugevust. Katsete käigus on näidatud, et marjakesta purustamiseks vajalik jõud kasvab suuruselt 0,456 N suuruseni 0,833 N. Tuuramarja valmistatakse ka pressitud marjana ehk *pausnaya*´na. Väikesed või katkised marjaterad soolatakse kergelt ja muudetakse marmelaaditaoliseks tooteks [4].

3.3 Pastöriseerimine

Pastöriseerimine aitab pikendada säilivust ja vähendada ohtlike mikroorganismidega seotud riske. Kalamarja saab töödelda ainult kuni 70°C-ni, sest ta on väga kuumatundlik. Vahemikus 50-70°C ei koaguleeru kalamarja valgud märgatavalt ning tootel säilib visuaalselt värske marjaga võrreldav välimus. Lõhemari muutub siiski veidi kahvatumaks ja ebaküpsed marjaterad kaotavad oma ümmarguse kuju. Vahemikus 56-60°C muutub mari väga vähe. Temperatuuril 71°C marja terad tuhuvad ja 72°C juures koaguleerub marja sisu täielikult ning mari muutub kummiseks keedetud munamassiks. Kõrge temperatuuri ja lühikese ajaga pastöriseerimiseks saab kasutada dielektrilisi kuumutamismeetodeid. Pastöriseerimine ei taga kvaliteeti toatemperatuuril, külmkapi temperatuuril säilib toode 2-3 nädalat [4].



Joonis 1. Forellimarja soolamise tehnoloogiline skeem

4. KALATOODETE RIKNEMINE

Toit laiemalt vaadatuna on dünaamiline süsteem, milles aja jooksul muutuvad pH, toitaineline koostis ja mikrofloora. Säilitamise ajal muutub mikrofloora vastavalt nende toitevajadustele ja tolerantsusele säilitamistingimuste suhtes. Gramnegatiivsed fermentatiivsed bakterid (näiteks *Vibrionaceae*) põhjustavad toore kala riknemist. Psührofiilsed gramnegatiivsed bakterid (näiteks *Pseudomonas* spp. ja *Shewanella* spp.) kasvavad jahutatud kalal. CO₂ -ga pakendamine inhibeerib aeroobseid mikroorganisme ja võimaldab kasvada *Photobacterium phosphoreum*¹ ja piimhappebakteritel. Aeroobseid gramnegatiivseid baktereid inhibeeritakse tavaliselt NaCl lisamisega, hapestamisega ja säilitamisega jahedas vaakumpakendis. Nendel tingimustel muutub keskkond sobivamaks piimhappebakteritele, *P. phosphoreum*¹le ja psührofiilsetele *Enterobacteriaceae*¹le. Säilitamise mõju tõstmiseks lisatavad happed ja säilitusained nagu sorbaadid ja bensoaadid, võimaldavad poolfabritseeritud (*semi-preserved*) toodetes nagu marineeritud heeringas piimhappebakterite ja pärmide kasvu. Pärmid suudavad kasvada ka väga soolases vesikeskkonnas (näiteks tunniheeringas). Mitmeid kalatooteid kuumutatakse kergelt ja see võib mõjutada spore moodustavate bakterite kasvu, eriti, kui tootele pole lisatud soola (näiteks *sous vide* tooted) [7].

Kalatoode rikkumise hindamiseks on välja töötatud SSO (*specific spoilage organism*) põhimõte. SSO-sid on kalas vähesel hulgal ja nad moodustavad kogu töödeldud kalatoode mikrofloorast väikese fraktsiooni. SSO identifitseerimine põhineb riknenud toodete sensoorsete ja keemiliste näitajate võrdlemisel isoleeritud roisumikroflooraga. Vastava mikrofloora roiskumise potentsiaali hinnatakse võimaluse järgi toota kõrvalõhnu ja roiskumise aktiivsust hinnatakse roiskumise metaboliitide järgi. Kasulik SSO-de identifitseerimise meetod on olnud isoleeritud bakterite võrdlus trimetüülamiini, biogeensete amiinide või lenduvate amiinide võrdlemisel tootes [7].

Kala sisaldab vähe süsivesikuid, kuid väga palju vabu aminohappeid. Paljud kalaliigid sisaldavad trimetüülamiinoksiidi. Kalatoode SSO-d toodavad aminohapetest ammoniaaki, biogeenseid amiine, orgaanilisi happeid ja väävlühendeid; ATP laguproduktidest hüpoksaantiini ja laktaadist atsetaati. Trimetüülamiini toodavad mõned bakterid, kes on võimelised kasutama trimetüülamiinoksiidi anaeroobsel hingamisel. Mitmed mikroobsed metaboliidid on kalatoodetel

ja lihatoodetel samad; kalatoodete riknemisel tekivad tüüpilised ammoniaagi ja kalased kõrvalõhnad trimetüülamiinist. Viimase reduseerimist trimetüülamiinoksiidist põhjustavad *Aeromonas* spp., psührofiilsed *Enterobacteriaceae*, *P. phosphoreum*, *Vibrio* spp. ja *Shewanella putrefaciens* [7].

Mõnede kalatoodete riknemine on põhjalikult teada ja see on võimaldanud luua konkreetse SSO järgi toote säilitamistingimused. Selle näiteks on värske jääga kaetud kala CO₂ keskkonda pakendamine, mis inhibeerib aeroobsete roisubakterite kasvu (*Shewanella* ja *Pseudomonas*). Kuna CO₂-resistentne trimetüülamiinoksiidi redutseeriv *P. phosphoreum* on sellegipoolest võimeline kasvama, siis pole CO₂ keskkonnast säilivuse pikendamisele mõju. Sihilik *P. phosphoreum* inhibeerimine (näiteks külmutamine) vähendab tema kasvu ja pikendab ka toote säilivusaega. Soolveses krevettide säilivuse pikendamiseks on kasutatud roiskumist mittepõhjustavaid piimhappebaktereid või puhtaid bakteriotsiine. Vastavate meetodite kasutamata jätmisel rikneb toode roiskumist põhjustavate piimhappebakterite tõttu. SSO-de puhul on uuritud riknemisprotsesse, kus osaleb ainult üks mikroorganism. Vähesoolatud tooted, kuhu pole juurde lisatud säilitusaineid või on neid vähe, riknevad mikrofloora võimalike omavaheliste interaktsioonide tõttu. Üldiselt lähtutakse toidu mikrobioloogias “üldarvust” või konkreetsest patogeenist. Rohkem peaks uurima mikrobioloogilise kasvu kombinatsioone metabolismi kineetikaga, molekulaartehnikaga, analüütilise keemiaga, sensoorse hindamisega ja matemaatilise modelleerimisega [7].

Krevettide säilivuse uuringus 2013. aastal on võrreldud veeaktiivsust alandavate ühenditega töödeldud krevette töötlemata krevettidega. Uuringus on määratud aeroobsete mikroobide üldarv, veeaktiivsus, niiskussisaldus, tekstuuri muutused, astaksantiini ja vabade aminohapete kontsentratsioon ning hinnatud krevette sensoorselt. Erinevate meetodite kombineerimisel saab paremini määrata säilivuse jooksul esinevaid muutusi ning hinnata toiduaine kõlblikkust. Krevettide säilivuse uurimisel on oluline vähendada veeaktiivsust, kuid mitte niiskussisaldust, et tootel oleksid paremad sensoorsed omadused. Astaksantiin on krevettides sisalduv karotenoid, mis hapniku või valguse käes oksüdeerub, halvendades toote värvi. Valkude lagunemisel tekivad vabad aminohapped. Sensoorse analüüsi käigus hinnatakse välimuse, lõhna, maitse ja tekstuuri erinevaid omadusi hindamisskaalal 1-10, miinimumhindeks on määratud 6. Uuringu tulemustest on selgunud, et töödeldud krevettide säilivusaeg on 30 päeva.

Paralleelselt määratud teised näitajad on kinnitanud, et veeaktiivsust madaldavate ühendite kasutamine aeglustab mikroorganismide kasvu, astaksantiini oksüdatsiooni ja valkude lagunemist [8].

5. KALATOODETELE LUBATUD LISAAINED

Lisaainete kasutamist kõikide toiduainete puhul reguleerib Eesti Vabariigi Valitsuse määrus RT I 2000, 23, 131 “Toidus lubatud lisaainete loetelu ja piirnormid toidugruppide kaupa, lisaainete kasutamise tingimused ja viisid ning lisaainete märgistamise ja muul viisil teabe edastamise erinõuded ja kord”. Forellimarjas lubatud lisaainete loetelu ja kogused on toodud punktis 9.4.3 “Lõheasendajad, kaaviar ja muud kalamarjatooted”. Loetelus on toodud ka erinevad värvained ja magusained, mis kõnealuse toote puhul tähtsust ei oma. Loetelu lõpus on toodud mäрге, et lisas 3 nimetatud aineid on lubatud kasutada vajalikus koguses, sinna hulka kuulub ka sidrunhape. Tabelis 2 on esitatud kalamarjatoodele lubatud antioksüdantide ja säilitusainete loetelu [9].

Tabel 2. Väljavõte kalamarjatoodele lubatud lisaainetest [9].

| 9.4.3 Lõheasendajad, kaaviar ja muud kalamarjatooted | | |
|---|------------------|---|
| Antioksüdandid, säilitusained | | |
| Sorbiinhape ja sorbiaadid | E 200, E 202-203 | Kokku 2g/ kg |
| Bensoehape ja bensoaadid | E 210-213 | |
| Boorhape | E 284 | Ainult tuurlaste mari, kokku 4g/ kg |
| Naatriumtetraboraat | E 285 | |
| Isoaskorbiinhape ja naatriumisoaskorbaat | E 315, E 316 | Kokku 1,5 g/ kg, arvatuna isoaskorbiinhappele |

5.1 Naatriumkloriid

Naatriumkloriid, mida tavaliselt kutsutakse soolaks, on inimese organismis elulise tähtsusega. Ta seob toidus olevaid maitseid ja omab toidu töötlemisel funktsionaalset rolli. Näiteks kontrollib ta mikrobioloogilist kasvu ja nihutab fermentatsiooni vajalikus suunas; tugevdab gluteeni ja võimendab pagaritoodete kooriku värvi. Ajaloost on teada, et sool on olnud väärtuslik ja teda on vahetatud teiste kaupade vastu. Toiduainete töötlemisel ja säilitamisel kasutatakse ka teisi naatriumi sisaldavaid ühendeid nagu naatriumaskorbaat, naatriumbensoaat, naatriumbikarbonaat, naatriumnitraat, naatriumtsitraat, naatriumnitrit, naatriumfosfaat ja

naatriumpropionaat. Naatriumkloriidi asendamiseks on kasutatud ka kaaliumkloriidi, kaltsiumkloriidi, ammooniumkloriidi, magneesiumkloriidi ja liitiumkloriidi. Kaaliumkloriidi kasutatakse naatriumkloriidi kõrval kõige laialdasemalt, hinnatud on tema funktsionaalsed omadused, kuid kasutamist piirab kibe kõrvalmaitse. Magneesium- ja kaltsiumkloriidid on samuti kibedad. Ammooniumkloriid võib olla ebastabiilne ning liitiumkloriid on inimestele mürgine. Sool koosneb kahest elemendist, katioonsest naatriumioonist ja anioonsest kloorioonist. Naatriumiooni tähtsus inimese organismis on säilitada vere mahtu ja raku osmootset rõhku ning abistada närviimpulsside ülekandeid. Naatriumkloriid esineb valge kristallilise pulbrina, mis on vees ja glütseroolis hästi lahustuv ning moodustab värvitu ja lõhnatu lahuse [10].

5.1.1 Antimikroobne toime

Naatriumkloriidi vastav toime sõltub tema kogusest toiduaines ja on otsene või kaudne. Kuivatatud ja suitsutatud lihale lisatakse suur kogus soola, mis muudab nad hästi säilivateks. Nendes olev sool avaldab säilivusele otsest mõju. Praegusel ajal lisatakse soola vähe ja kombineeritakse säilitusainetega, et tagada tootele piisav säilivusaeg. Mikrobioloogilist kasvu inhibeeriva toime saavutamiseks peab soola lisama 16,54 %, sel juhul langeb veeaktiivsus 0,9-ni. Soola kasutamisel on tänapäeval enamasti maitsestamise eesmärk. Fermenteeritud toiduainetes aitab sool parajas koguses väljutada toitaineid ja omakorda sellest tingituna kasvavad piimhappebakterid, kes inhibeerivad roisubakterite ja mõningate patogeensete bakterite kasvu nagu *Staphylococcus* liigid [10].

5.2 Bensoehape ja bensoaadid

Bensoehape on üks vanemaid maailmas kasutatavatest säilitusainetest kosmeetika-, ravimi- ja toiduainetööstuses. Naatriumbensoaat on olnud esimene keemiline säilitusaine, mille USA Toidu- ja Ravimite Nõukogu (FDA) on heaks kiitnud. 1875. aastast pärinevad esimesed kirjeldused naatriumbensoadi kohta, kui on avastatud bensoehappe ja fenooli omavaheline koosmõju. 1900-nda aasta paiku on hakatud bensoehapet laialdasemalt kasutama, sest enne seda osati teda sünteetiliselt toota ainult väikestes kogustes. Odavad tootmiskulud, värvitu olek ja väike toksilisus on muutnud bensoehappe laialt kasutatavaks kogu maailmas [11].

5.2.1 Keemilised ja füüsilised omadused

Bensoehape (C_6H_5COOH) esineb puhtas vormis värvitu või valgete niidikestena. Ta lahustub vees piiratud määral (0,18; 0,27 ja 2,2 g 100 ml vee kohta) vastavalt vee temperatuurile 4°C, 18°C ja 75°C. Naatriumbensoaat on valge graanuliline või kristalliline pulber. Ta lahustub vees palju paremini (62,8; 66,0 ja 74,2 g 100 ml vee kohta) vastavalt vee temperatuurile 0°C, 20°C ja 100°C. Seetõttu on ta enamjaolt eelistatud. Säilitusainetena kasutamiseks on heaks kiidetud ka kaaliumbensoaat ja kaltsiumbensoaat, kuid nende lahustuvus on halvem kui naatriumbensoaadil [11].

Bensoehape esineb loomulikul kujul mitmetes toiduainetes. Teda on leitud pohlades, jõhvikates, mustsõstardes, seentes ja tomatites. Ka jogurtites on leitud bensoehapet. Ta tekib sinna mikroorganismide tegevuse kõrvalproduktina, näiteks fenüülalaniini lagundamisel. Teise võimalusena võib ta tekkida bensaldehüüdi oksüdatsioonil. Bensoehapet on leitud ka *Lactobacillus plantarum* suspensiooni uurimisel. Ka seal on ta tekkinud bakteri tegevuse kõrvalproduktina, lisaks on leitud veel teisigi madalmolekulaarseid ühendeid, mis lisaks bensoehappele omavad samuti antimikroobset toimet [11].

5.2.2 Toimemehhanismid

Antimikroobse omaduse eest vastutab dissotsieerumata bensoehappe molekul. Tema toime kohta tehtud uuringutes on leitud, et happelisemas keskkonnas on antimikroobsed omadused suuremad kui neutraalses keskkonnas. Lisaks on saadud teada, et naatriumbensoadi toksilisus lahuses on tingitud dissotsieerumata bensoehappe molekulist. pH, NaCl, sahharoosi, sorbiin- ja bensoehapete mõjud erinevatele roiskumist põhjustavatele pärmidele on toodud tabelis 3. pH 5 juures olid säilitusainetele kõige vastupidavamad *Zygosaccharomycesbailii* ja *Yarrowialipolytica*. Sorbiinhape toimis testitud kultuuridele paremini kui bensoehape. pH tõstmine halvendab säilitusaine mõju [11].

Tabel 3. Bensoehappe mõju roiskumist põhjustavatele pärmidele sõltuvalt pH väärtusest [11].

| Pärm | Tüvede arv | Maksimaalne kasvamistõimaldavkontsentratsioon (mg/L) | | | |
|---------------------------------|------------|--|------|------|------|
| | | pH 2 | pH 3 | pH 5 | pH 7 |
| Debaromyces hansenii | 3 | EK | - | 500 | 1200 |
| Yarrowia lipolytica | 5 | - | 250 | 1200 | 1200 |
| Pichia anomala | 1 | - | - | 500 | 1200 |
| P. membranae-faciens | 2 | - | - | 750 | 1200 |
| S. cerevisiae | 2 | EK | - | 750 | 1200 |
| Kluyveromyces marxianus | 4 | EK | - | 500 | 1200 |
| Kloeckera apiculata | 4 | - | - | 750 | 1200 |
| Zygosaccharomyces bailii | 6 | EK | 250 | 1200 | EK |
| Z. rouxii | 2 | EK | - | 750 | 1200 |

Märkus: EK- ei kasva ilma bensoehapet lisamata; - ei kasva 250 mg/l bensoehappe kontsentratsiooni juures

1999. aastal on teadlased Hsiao ja Siebert läbi viinud uurimuse, kus nad on kasutanud erinevaid orgaanilisi happeid bakterisöötmetes. Bakterid on valitud vastavalt happetundlikud (*Bacillus* ja *Alicyclobacillus*) ja happeresistentsed (*Lactobacillus* ja *Escherichia coli*). Igale happele on määratud ka minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon. Antimikroobset toimet on näidanud ainult lipolüütilised happed nagu bensoehape. Üks hüpotees on see, et nad inhibeerivad või tapavad mikroorganisme sekkudes mikroobi rakumembraani tavapärasesse ainevahetusse, segades näiteks substraadi transpordi ja oksüdatiivset fosforülatsiooni elektroni transpordisüsteemis. *Bacillus subtilise* aminohapete membraantranspordi häirumise tõttu ei saa rakud enam vajalikke toitaineid. Bensoehape toob rakku sisse pideva prootonite hulga, mille jõuga inhibeeritakse transpordi süsteem. Bensoehappe inhibeeriva toime potentsiaali saab määrata rasva/vee suhte koefitsiendi, pK väärtuse ja bensoehappe molekulide võime järgi delokaliseerida rakkude sees olevate ionide negatiivset laengut ja seeläbi tõsta nende liikuvust läbi membraani [11].

Orgaanilistel hapetel põhinevate säilitusainete mõju *E.coli* kasvule ja rakusisesele pH-le on uuritud 1984. aastal. Autorite arvates on nõrkade hapete potentsiaal toidu säilitamisel seotud nende võimega spetsiaalselt vähendada rakusisest pH-d. Kuigi nii dissotsieerumata kui ka dissotsieerunud hapete vormid vähendasid rakusisest pH-d, on kasvu peatumine põhiliselt dissotsieerumata happe tulemus. *E.coli* kasvatamisel vedelsöötmes koos ja ilma 20 mM bensoaadita on täheldatud esimesel juhul valkude tootmise kasvu, mis on tingitud pH muutusest. Bensoaadi lisamisel pH 6,5 juures toodetakse rakus juurde 33 valku, millest 12 valku toodetakse ka pH 8 juures [11].

5.2.3 Toksikoloogia

Bensoehappe ja naatriumbensoaadi võimalike toksiliste mõjude kohta on tehtud mitmeid uuringuid. Juba 20. sajandi alguses läbiviidud katsed inimestega on näidanud, et naatriumbensoaadil ei ole inimese tervisele kahjulikku mõju. Bensoaadid ei akumuleeru organismis. Selle põhjuseks on bensoaadi detoksifikatsioon absorbeerumisel soolestikus ja reageerimine atsetüülkoensüüm-A-ga, mille tulemuseks on bensoüülkoensüüm-A. Viimase reageerimisel glütsiiniga moodustub maksas hipuurhape, mis eraldub uriini. Hipuurhappe moodustumine suureneb bensoehappe juuresolekul. Bensoehappe metabolismi rajad avastati juba 1909. aastal ning 1929. aastal avastati, et mehhanism toimib 66-95 % katsetes antud kogustest, mis on olnud suuremad kui tänapäeval toiduainetes lubatud kogused. Katse läbiviijad on oletanud, et bensoehape, mis ei eraldu uriini hipuurhappena, detoksifikeerub ühinemisel glükuroonhappega ja eraldub seejärel uriini [11].

1994. aastal on kasutati deutereeritud bensoehapet ja tuumade magnetresonants spektroskoopiat, et uurida aine metaboliseerumist hea tervisega meesterahvas. Katsealusele anti oraalset ühekordse doosina 250 mg bensoehapet, sellest moodustub nelja tunni jooksul hipuurhape, mis eraldub uriini. Inimeste poolt tarvitavat naatriumbensoaadi kogust saab hinnata uriini kogunenud hipuurhappe koguse järgi. 1991. aastal anti kuuele meesterahvale oraalset nädalase vahega naatriumbensoaati kolmes koguses (40, 80 ja 160 mg/ kg), et uurida vereplasmas bensoe- ja hipuurhappe kogust ning uriinis hipuurhappe kogust. Uuringu läbiviijad järeldasid, et nii hipuurhappe moodustumine bensoehappest kui ka selle eraldumine uriini toimus metaboolse raja järgi [11].

5.3 Sorbiinhape ja sorbaadid

Sorbiinhape on orgaaniline, sirgeahelaline *trans-trans* küllastumata monokarboksüülrasvhape (2,4-heksadieenhape, $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$). Organism metaboliseerib teda samamoodi kui maisiõli linoleenhapet ja margariini olehapet. Sorbiinhappe karboksüülrühm on väga reaktiivne ja moodustab mitmeid sooli ja estreid. Konjugeeritud kaksiksidemed on samuti reageerimisvõimelised ja võivad mõjutada sorbiinhappe antimikroobset toimet ning toiduainete kvaliteeti ja ohutust. Sorbiinhape esineb looduslikult pihlakates, millest ta ka esimest korda on eraldatud. Aine nimi tuleb pihlaka ladinakeelsest nimetusest *Sorbus aucupartia L.* Esimest korda on sorbiinhapet sünteesinud 1900. aastal O. Doebner. 1945. aastal võeti USA-s C.M. Goodingu poolt patent avastusele, et α -positsioonis oleva kaksiksidemega küllastumata rasvhapped toimivad toiduainetes hallituste vastaselt. 1953. aastal kiideti heaks sorbaatide kasutamine säilitusainetena [12].

5.3.1 Tootmine

Sorbiinhappe tootmiseks kasutatakse keteeni ja krotoonaldehüüdi vahelist reaktsiooni. Keteen toodetakse äädikhappe või atsetooni termilisel lagunemisel tööstuslikus ahjus. Krotoonaldehüüd moodustub atseetaldehüüdi kondensatsiooni kõrvalproduktina. Tööstusliku tootmise meetodina kasutatakse katalüüsitud reaktsiooni, milles toodetakse polüester molekulkaaluga 1000-5000. Reaktsioonis kasutatakse keteeni ja krotoonaldehüüdi vahelist reaktsiooni vastavas lahuse keskkonnas, milleks on kas alifaatsed, alitsüklilised, aromaatsed süsivesinikud või nende derivaadid. Polüester lagundatakse happelises keskkonnas või termilisel töötlusel. Stabiilsemaid *trans-trans* struktuure võrreldes *cis* isomeeridega saab lahustamisega või katalüsaatorite abil. Toiduainetes kasutamiseks jätkatakse aine puhastamist rekristalliseerimisel ja süsinikuga töötlemisel. Sorbiinhapet müüakse kuiva pulbrina. Vesilahustuvaid kaalium-, naatrium- ja kaltsiumsooli toodetakse vastava hüdroksiidiga neutraliseerimisel ja kuivatamisel [12].

5.3.2 Toimemehhanismid

Sorbaadid inhibeerivad pärmide, hallituste ja bakterite kasvu. Toimet saab vaadelda ka mikroorganismide erinevate jaotuste järgi: grampositiivsete ja gramnegatiivsete,

katalaasnegatiivsete, aeroobsete ja anaeroobsete, mesofiilsete ja psührotroofsete, patogeensete ja roisubakterite vastane. Vähesed mikroorganismid suudavad sorbaate metaboliseerida. Vähem kui 0,3 %-ne sorbaatide kontsentratsioon inhibeerib kasvu, suurem määr on surmava toimega [12].

Sorbaadid inhibeerivad raku kasvu ja jagunemist, samuti sporoleerumist. Mitmetes uuringutes on tõdetud, et sorbaadid suudavad takistada spooride idanemist. Katsetes on uuritud baktereid nii agasöötmel kui ka toiduainetes ning tulemus on erinenud sõltuvalt liigist, tüvest, pH-st ja sorbaadi kontsentratsioonist. Spooride idanemist takistatakse sporeolüütiliste ensüümide inhibeerimisel, mis osalevad idamisel või sorbaatide interaktsioonil spoori membraaniga, suurendades nende läbivoolavust. Kindlatel tingimustel suudavad sorbaadid muuta raku morfoloogilisi omadusi. Pärmirakkudel on leitud tihedalt paiknevaid fosfoproteiinide graanuleid, ebaregulaarseid rakutuumi, suurenenud hulgal ning erinevates suurustes mitokondreid ja vakuole. *Clostridium botulinum* rakud on osutunud piklikuks, sibulja vormiga ja puuduliku jaotusega. Taoliste muudatuste põhjuseks peetakse sorbaatide liitumist teatud rakustruktuuridega ja raku biosünteesiliste protsesside muundamist [12].

Kõrgetel kontsentratsioonidel muutuvad säilitusained, sealhulgas sorbaadid, mikroorganismidele surmavaks. Sorbaadid vähendavad süsiniku omastamist erinevatest substraatidest nagu glükoos, atsetaat, suktsinaat, püruvaat, laktaat, etanool ja atseetaldehüüd. Uuringute alusel inhibeerivad sorbaadid raku metabolismi ensüümide, toitainete omastamise või mitmete transpordi funktsioonide kaudu. Nad vähendavad ensüümisüsteemide aktiivsust, mis võib viia eluliste protsesside häirumiseni, sealhulgas transpordifunktsioon, raku metabolism, kasv ja replikatsioon. Vastavate ensüümide hulka kuuluvad alkoholi dehüdrogenaas, fumaraas, enolaas, aspartaas, katalaas, malaadi dehüdrogenaas, fitsiin ja suktsiini dehüdrogenaas. *Saccharomyces cerevisiae* puhul on uuringus leitud, et sorbaadid ei vähenda tema ensüümide aldolaasi, enolaasi ja püruvaadi dekarboksülaasi aktiivsust. Selle põhjal järeldati, et sorbaadid kahjustavad pärmirakku peamiselt tema rakumembraani läbilaskvust mõjutades, olles adsorbeerunud pinnarakkudel dissotsieerumata kujul [12].

Rasvhappelised säilitusained nagu sorbaadid seonduvad substraadi ja elektrontranspordi süsteemiga ning eemaldavad substraadi transpordisüsteemist. Substraadi vähene liikumine raku põhjustab raku nälgimise. Toitainete, näiteks glükoosi ja aminohapete imendumise takistamist võib põhjustada vajaliku prootoni liikumisjõu neutraliseerimine, elektroni transpordisüsteemi ja

ATP sünteesi inhibeerimine/ vähendamine ning aminohapete transpordisüsteemi poolt metabolismienergia utiliseerimise inhibeerimine. ATP sünteesi vähenemise mehhanism seisneb raku ioonse tasakaalu säilitamises, milleks ATP hüdrolyüsitakse. Erinevatel tingimustel võivad mikroorganismides esineda samaaegselt mitmed inhibeerivad mehhanismid [12].

5.3.3 Metaboolne lagunemine

Normaalse toitumise korral oksüdeeritakse sorbaadid organismis täielikult süsinikdioksiidiks ja veeks nagu teisedki rasvhapped. See tähendab, et sorbaadid annavad 6,6 kcal/ g, millest poolt on bioloogiliselt võimalik uuesti kasutada. Loomad (inimene) ja mõned mikroorganismid metaboliseerivad sorbaate β -oksüdatsiooni kaudu. Kõrgemate kontsentratsioonide puhul toimib ka ω -oksüdatsioon. Mõned hallitused suudavad sorbaate metaboliseerida, vastavaid metaboliite on leitud juustudest ja puuviljatoodetest. Tavaliselt on 0,1 %-ne sorbaatide kogus inhibeeriva toimega. Mõned *Penicilliumi* liigid suudavad kasvada ja metaboliseerida sorbaate koguste juures 0,18-1,2 %. Üheks sorbaatide metaboliidiks, mida hallitused toodavad, on 1,3-pentadieen, mis on lenduv ühend ja tema lõhn meenutab petrooleumi või süsivesinikke ning ta moodustub dekarboksüleerumise reaktsiooni tulemusena. Teised hallitused, kes samuti suudavad sorbaate metaboliseerida, on *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* ja *Geotrichum*. Üldiselt, enamik hallitusi on sorbaatidele tundlikud, kuid teatud tüved on resistentsed ja kasutavad sorbaate süsiniku allikana. Hallituste võime neid metaboliseerida sõltub liigist, tüvest, eelnevast kokkupuutest, sorbaadi kogusest ja substraadi tüübist. Ka mõned bakteri liigid võivad kindlatel tingimustel sorbaate metaboliseerida. Seda omadust seostatakse piimhappebakteritega, keda on suurel hulgal sorbaadi surmava koguse juures. Nende bakterite võime sorbaate lagundada on ilmnunud pelargoonisarnase kõrvallõhnaga veinis ja fermenteeritud köögiviljades, mida põhjustavad etüülsorbaat, 4-hekseenhape, 1-etoksüheksa-2,4-dieen ja 2-etoksüheksa-3,5-dieen [12].

5.3.4 Toksikoloogia

USA-s on sorbaadid GRAS (*generally recognized as safe*) tüüpi ühendid. Kuna nad on metaboliseeritavad rasvhapped, on WHO (Maailma Tervishoiu Organisatsioon) seadnud päevaseks annuseks 25 mg/ kg kehakaalu kohta päevas. Sorbaatide kahjulik mõju tervisele on suhteline. Akuutse toksilisuse uuringus määrati rottidele LD₅₀ annus 4,2 -10,5 g/ kg kehakaalu

kohta. Võrdluseks, näiteks NaCl kogus on 5 g/ kg kehakaalu kohta. Seetõttu on sorbaadid ühed ohutuimad säilitusained [12].

Rottide pikemaajalistel toitumisuuringutel on leitud, et kui sorbiinhape moodustab 10% toidust, suudab organism vastu pidada 40 päeva. Kui söötmissperiودي pikendatakse 120 päevani, suureneb loomade maksa kaal. Lisauuringus, kuhu on kaasatud lisaks rottidele ka koerad, leiti, et 5% sorbiinhappe kogus toidus ei tekita halba mõju kuni 90 päeva. 8 %-ne lisand tekitab loomadel maksa suurenemise. Uuringu läbiviijad seostavad taolist suurenemist sorbiinhappesest saadud kalorsuse ärakasutamise tulemusena. Sorbiinhappe kroonilist mõju on samuti rottide peal uuritud. Uuringus on kasutatud sorbiinhapet 10 %-se kogusena toidust või 90 mg/ kg kehakaalu kohta ühe või kahe generatsiooni vältel. Katse tulemusena ei täheldata kõrvalekaldeid, mõne looma kasv suureneb märgatavalt, ilmselt sorbiinhappesest saadud lisakalorite tõttu. Loomadele ei ole leitud kantserogeenseid ega mutageenseid mõjusid [16].

Sorbaatide ja nitritite kasutamisel koos võib esineda halb mõju inimese tervisele. Nitritid võivad reageerida rasvhapetega ja kuna sorbiinhape on küllastumata rasvhape, võib näiteks soolatud lihas esineda nendevahelist reageerimist, mille produktid võivad olla mutageensed ühendid. Mitmete uuringutega on kindlaks tehtud taolise reaktsiooni täpsemad tingimused: nitritid reageerivad sorbiinhappesega pH 3,5 juures, samas kui lihatoodete tavaline pH on 6,0; nitrosoamiinide saamiseks peab nitriti hulk olema liias; kahjuliku reaktsiooni pärssimiseks saab lisada tootele askorbiinhapet, tsüsteiini ja kuumutada [16].

Sorbiinhappe ja teiste lisandite vahel ei ole leitud tõendeid toksilite ühendite tekkest, sealhulgas reageerimisel parabeenide, bensoaatide ja propionaatidega. Samas ei kaitse sorbaadid teiste ühendite kahjuliku mõju eest. Üldiselt on nii sorbiinhape kui ka tema derivaadid ühed ohutuimad säilitusained [16].

5.4 Sidrunhape

Sidrunhape on üks peamisi toiduainetööstuses kasutatavaid happeid. Teda kasutatakse hapendajana, antioksidandina ja metallioonide sidujana. Ta on ka maitsete võimendaja. Sidrunhapet toodetakse sidruni- või ananassimahlast ning fermentatsioonil, kasutades *Candida* spp. või mittetoksilisi *Aspergillus niger* tüvesid. Sidrunhappele pole rakendatud päevast

tarbimiskoguse piirnormi, samuti tema naatrium-, kaalium-, kaltsium- ega ammooniumsooladele. Termofiilsete bakterite inhibeerimisel on sidrunhappel eelis äädik- ja piimhappe ees [13].

Sidrunhape pole tüüpiline nõrk orgaaniline hape, vaid lipofiilne dissotsieerunud hape, mis inhibeerib mikroorganismide kasvu sidudes toitainetest kahevalentseid metalliioone. Tal on kolm karboksüülrühma ja kaks korda rohkem hüdrofiilseid rühmi võrreldes hüdrofoobsete rühmadega.

Sidrunhappe puuduseks toiduainetes kasutamisel on tema terav ja hapu maitse, mis on tugevalt esindatud ning võib toote enda maitset segada ja varju jätta. Sidrunhape on ka väga hügrokoopne ning kuivainete koostisosana võib ta tekitada tükikesi, kui toode on niiskust saanud [13].

5.5 Biosäilitamine piimhappebakteritega

Enamlevinud säilitusainete kõrvale on otsitud võimalusi kasutada aineid, mis on 100 % looduslikud ja suudavad mõjuda samaväärselt. Piimhappebakterid suudavad inhibeerida roisubakterite ja patogeensete bakterite kasvu, sest nad toodavad antimikroobseid ühendeid nagu orgaanilised happed, vesinikperoksiid, diatsetüül ja bakteritsiidsed ühendid [14].

Piimhappebakteritega säilitamist kasutatakse eelkõige fermenteeritud toiduainete puhul. Kalatoodetele rakendamise teeb raskeks asjaolu, et kala on madala suhkrusisaldusega maatriks. Lisaks säilitatakse kala madalal temperatuuril ja sobimatud tüved võivad ise kala roiskumist põhjustada. Kalatoodete uurimisel on saavutatud edu *Listeria spp.* inhibeerimisel piimhappebakteritega, peamiselt *Carnobacterium genus'ga*, mis tuleneb bakteriotsiinide tootmisest või võistlemismehhanismist. Enne tööstuslikku rakendamist on vajalik uurida piimhappebakterite mõju toidu sensorsetele omadustele ja erinevate bakteriotsiinide ohutust inimesele [14].

5.6 Biosäilitamine eeterlike õlidega

Eeterlikes õlides on palju antimikroobse toimega ühendeid. Nende rakendamine toiduainete säilitamisel annaks võimaluse vähendada kunstlike säilitusainete kasutamist. Eeterlike õlide kasutamisala jaotub kolme põhirühma: toidu maitseained, parfümeeria ja ravimitööstus (funktsionaalsete omaduste tõttu). Uuringutes on välja toodud, et mistahes *in vitro* katsetel

saadud tulemuste rakendamiseks toidumaatriksis on eeterlike õlide kogust vaja alati mitmekordistada [15].

Eeterlikest õlidest sobiks kalatoodetel kasutamiseks oreganoõli. See õli sisaldab kahte olulist antimikroobset komponenti karvakrooli ja tümooli. *In vitro* katsete põhjal inhibeerivad need ühendid mitmete patogeensete bakterite kasvu nagu *E.coli*, *L.monocytogenes*, *S.typhimurium*, *B.cereus* ja *S.aureus*. Eeterlike õlide toimemehhanismi aluseks on nende hüdrofoobsus. Seetõttu seonduvad õlide komponendid bakteri rakumembraaniga ja mitokondriga, tekitades häire raku ainevahetuses. Selle tagajärjel võivad raku sees olevad ioonid liikuda rakust välja. Kui liigne kogus ioone ja teisi rakusiseseid ühendeid liiguvad rakust välja, võib sellega kaasneda raku surm [15].

Eeterlike õlide antimikroobse mõju tulemus sõltub hapniku hulgast. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et vähese hapniku juuresolekul tekib vähem oksüdatiivseid muutusi õlis endas ja/või rakud, mille energia toodetakse anaeroobse metabolismiga, on eeterlike õlide toksilisusele tundlikumad. Oreganoõli mõju uurimisel toorel hakklihhal ilmnes parem tulemus, kui toodet säilitati modifitseeritud õhuga pakendis. Kui toodet säilitati hapnikuga pakendis, polnud õlil bakteritele üldse inhibeerivat toimet [15].

6. PRAKTILINE OSA

6.1 Säilivuskatsete planeerimine

6.1.1 Retseptuuri valik ja katsete kord

Forellimarja säilivuskatsete eesmärk on võrrelda olemasolevat retseptuuri teistega. Kokku võrreldi nelja retsepti, mille soolasisaldus oli kõigil võrdne (tabel 4). Tootja valmistab forellimarja isiklikult väljatöötatud retsepti ja tehnoloogia alusel. Marjale lisatakse 2,5 % soola ja vastavalt seadusele lubatud maksimummääras säilitusainet naatriumbensoaati (2g/kg). Naatriumbensoaat on poollooduslik säilitusaine, mis esineb bensoehappena näiteks pohlades ja jõhvikates. Teda kasutatakse nii kalatoodetes kui ka mujal ja tema toime on suurem madalamatel pH-del.

Enimlevinud säilitusained kalamarja ja ka teiste kalatoodete puhul on naatriumbensoaat E211 ja kaaliumsorbaat E202. Muud lisaained on happesuse regulaatorid E330, E300 ja E260. Esimene valitud põhiretsept on 2,5 %-se soolasisaldusega forellimari K1, millele ei ole lisatud lisaaineid. Vastava retseptuuri järgi on võimalik hinnata mikroorganismide kasvu ilma lisaainete mõjuta. Teise retsepti K2 aluseks võeti põhiretsept, millele lisati säilitusainet naatriumbensoaati. Kolmandaks retseptiks K3 võeti eelnev retsept, millele lisati sidrunhapet. Sidrunhappe lisamise eesmärk oli alandada pH-d ja seeläbi inhibeerida mikroorganismide kasvu ning suurendada naatriumbensoaadi toimivust. Neljandas retseptis K4 kasutati säilitusainena kaaliumsorbaati.

Tabel 4. Säilivuskatsetes kasutatud kalamarja retseptuurid

| | K1 | K2 | K3 | K4 |
|-----------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|
| Sool | 2,5% | 2,5% | 2,5% | 2,5% |
| Säilitusaine | - | Naatriumbensoaat | Naatriumbensoaat | Kaaliumsorbaat |
| Muud lisaained | - | - | Sidrunhape | - |

Retseptuuri valikust jäi välja variant, mis sisaldaks täislooduslikku säilitusainet. Planeerimise ajal tehti katse oreganoõliga, et uurida, millises koguses oleks seda võimalik kasutada forellimarja sensoorseid omadusi muutmata. Kuigi eeterlikel õlidel on säilitamise

seisukohast palju potentsiaali, ei ole võimalik neid kasutada kalamarja puhul, kuna toode kaotab omase lõhna ja maitse.

Säilivuse määramiseks ja muutuste hindamiseks selle aja jooksul tehti vastavaid analüüse kindlate ajavahemike järel. Toote piisavaks jälgimisperioodiks valiti kaks kuud ja selle aja jooksul hinnati muutusi viiel korral (keskmiselt 10-14 päeva järgi). Andmete täpsemaks kogumiseks valmistati kokku kolm paralleeli eelmainitud nelja retsepti alusel. Analüüsimeetoditeks valiti mikrobioloogiline ja sensoorne analüüs, millele lisaks mõõdeti proovidest pH väärtus. Mikroorganismide hulka tootes antud ajahetkel analüüsiti aeroobsete bakterite üldarvu alusel (NMKL metoodika nr 86 “Aerobic Microorganisms.Determination in foods at 30°C, 20°C or 6,5°C.”) ja hügieenilise puhtuse hindamiseks analüüsiti tootes *E.coli* esinemist (NMKL metoodika nr 125 “Thermotolerant coliform bacteria and *Escherichia coli*. Enumeration in food and feed.”).

6.2 Forellimarja retseptuuride valmistamine

Käesolevas töös uuritud forellimarja valmistas väketootja Eksfisk OÜ oma tehnoloogia järgi. Eksfisk OÜ on perefirma, kes on tegelenud värske roogitud lõhe (*Salmo salar*) ja forelli (*Onchorynchus mykiss*) importimisega ning nendest toodete valmistamisega üle 10 aasta. Kõik oma kalatoodete valmistamiseks kasutatavad tehnoloogiad on ettevõtte enda arendatud. Forellimarja soolamise tehnoloogia on ettevõtte ärisaladus, mistõttu ei saa siinkohal täpset kirjeldust anda. Toormari puhastatakse käsitsi ja soolamiseks kasutatakse kuivsoolamist peene jodeerimata soolaga (25g/ kg marja kohta), säilitusainena lisatakse naatriumbensoaati. Mari ja lisandid segatakse õrnalt ja ühtlaselt läbi, etmari ei läheks katki, kuid sool ja muud lisandid saaksid jaotuda ühtlaselt. Sooldumise järel pakendatakse mari 300- ja 500- grammistesse pastmassist karpidesse ning 3- kilostesse plastmassist ämbritesse. Marja hoiustatakse tootmisruumi külmruumis temperatuuril 0°C...+3°C. Magistritöö katsete jaoks pakendati proovid 30- grammistesse plastmassist topsidesse ning neid säilitati Net-Foodlab Eesti OÜ labori külmruumis temperatuuril 3-6°C.

Lisaks neljale partiile, mille uuritavad retseptid osaliselt kattusid, oli katsete uurimisobjektiks ka retsept K, kus forellimarjale lisati 2,5% soola ja kaaliumsorbaati 200 mg/kg.

6.3 Materjalid ja meetodid

Kalamarja toorainena kasutatakse Soomes kasvatatud vikerforellide toormarja, mille tootja isiklikult Eestisse transpordib. Mari võetakse otse tootmisliinilt ja transporditakse Eestisse plastmassist ämbrites jahutussüsteemiga varustatud autos. Kalamarja töötlemisega alustatakse koheselt tootmispaika jõudes, et mikroorganismide juurde ei kasvaks.

Soolamiseks kasutatakse jodeerimata peensoola, mis ostetakse hulgilaost. Säilitusaine naatriumbensoaat ostetakse edasimüüjalt 25- kilogrammises pakendis. Tootja on Danisco, USA. Sidrunhape ostetakse jaemüügist nimetuse “Latplanta” all 30- grammises pakendis. Tootja on SIA Spilva, Läti ja säilivusaeg on 06.08.2016. Kuna sidrunhapet müüakse kristalsel kujul, peenestati ta marjaga kiiremaks segunemiseks pulbriks. Peenestamiseks valati sidrunhape steriilsesse Stomacheri kotti ja vajutati lusikaga peeneks. Peenestatud sidrunhape valati tagasi originaalpakendisse. Säilitusaine kaaliumsorbaat ostetakse edasimüüjalt 250- grammises pakendis. Tootja on Sigma-Aldrich, Saksamaa. Mikrobioloogiliste analüüside sötmed ja nende koostised on tabelis 5.

Tabel 5. Mikrobioloogiliste analüüside sötmed

| Söode | Füsioloogiline lahus LAB 103 | PCA (Plate Count Agar) LAB 149 | VRBA (Violet Red Bile Agar) 101406 | TSA (Tryptic Soy Agar) 105458 |
|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Koostis, g/L | Peptoon 1,0 | Trüptoon 5,0 | Lihapeptoon 7,0 | Kaseiini peptoon 15,0 |
| | Naatriumkloriid 8,5 | Pärmiekstrakt 2,5 | Pärmiekstrakt 3,0 | Soja peptoon 5,0 |
| | | Glükoos 1,0 | Naatriumkloriid 5,0 | Naatriumkloriid 5,0 |
| | | Agar Nr 2 12,0 | Laktoos 10,0 | Agar-agar 15,0 |
| | | | Neutraalpunane 0,03 | |
| | | | Sapisoolasegu 1,5 | |
| | | | Kristallviolet 0,002 | |
| | | | Agar-agar 13,0 | |
| Tootja | Lab M | Lab M | Merck | Merck |

6.3.1 Mikrobioloogilised ja pH analüüsid

Forellimarja katsete esimene partii valmistati 15.11.2013. Tootja valmistas nelja retseptuuri alusel säilivuskatseteks piisavad marjakogused. Valmistamise järel jaotati mari 25-grammisteks ja 30-grammisteks portsjoniteks väikestesse plastmassist topsidesse. Topse hoiti labori külmruumis, mille temperatuur oli perioodi vältel $+1,7^{\circ}\text{C} \dots 7,0^{\circ}\text{C}$. Igal analüüsi hetkel võeti 25-grammine tops sensoorseks analüüsiks ja 30-grammine tops mikrobioloogilisteks analüüsideks ning pH mõõtmiseks.

Aeroobsete bakterite ja *E.coli* analüüside jaoks kaaluti 10 g forellimarja Stomacheri kotti ja lisati 90 ml füsioloogilist lahust. Seejärel homogeniseeriti proov Stomacheri seadmes 10 sekundit ja tehti vajalikul hulgal kümnendlahjendused katseklaasidesse. Lahjenduste tegemise hulgas lähtuti eelnevate proovide tulemustest või arvamusest, mis sellel hetkel võib vajalik olla. Aeroobsete bakterite ja *E.coli* proove külvati kumbagi kaks järjestikust lahjendust paralleelproovidena. *E.coli* määramiseks külvati alati 10^{-1} ja 10^{-2} lahjendused, aeroobsete bakterite lahjendused erinesid iga kord. Proovide külvamiseks pipeteeriti vastavat lahjendust 1 ml Petri tassile ja segati vastava söötmega. Aeroobsete bakterite proovi jaoks kasutati PCA söödet. *E.coli* proovidel jäeti tassid peale TSA söötmega segamist 1 tunniks toatemperatuurile seisma, misjärel valati peale VRBA söötme kiht. Kui tassidel oli agar tahkunud, märgistati tassid ja viidi inkubeerima. Aeroobsete bakterite tasside inkubeerimine toimus 30°C juures 72 h ja *E.coli* 44°C juures 24 h. pH määrati kalamarjast otse ja Stomacheri kotist koos füsioloogilise lahusega, millest olid eelnevalt külvatud vajalikud proovid. Enne pH määramist kalibreeriti pH-meeter vastavalt labori juhendile.

6.3.2 Veeaktiivsuse määramine

Katsete toimumise keskel mõõdeti kahest proovist ka veeaktiivsus, kuna laborisse osteti veeaktiivsuse mõõtja. Proovitopsi võeti forellimarja nii, et topsi põhi oleks kaetud. Tops pandi seadmesse, suleti kaas ja vajutati "Start". Kui mõõtmine lõppes, andis seade sellest signaaliga märku. Seejärel vajutati uuesti "Start". Teistkordselt mõõdetud proov võeti seadmest välja ja pandi järgmine sisse ning korrati protseduuri. Proovi veeaktiivsus väärtus väljendati kahe tulemuse keskmisena.

6.3.3 Sensoorne analüüs

Sensoorse analüüsi eesmärgiks oli toote omaduste hindamine arvulisel skaalal võrreldes referentsprooviga. Hindamise läbiviimiseks koostati ankeet, millel toodi välja värsele forellimarjale iseloomulikud omadused välimuse, maitse, lõhna ja tekstuuri kategooriates. Omaduste leidmiseks degusteeris 5-liikmeline grupp tootja retsepti järgi valmistatud forellimarja. Omavahelise arutelu käigus hinnati marja omadusi vastavate terminitega (tabel 6), mis said ka hindamisankeedile kantud.

Tabel 6. Grupiga degusteeritud forellimarja omadused

| Kategooria | Omadus | Omadused ankeedil |
|-------------------|--|--|
| Välimus ja värvus | Läikiv; Läbipaistev, marjateras oranž täpik | Läikivus, Läbipaistvus, Värv intensiivsus |
| Lõhn | Õrn lõhn; Valgulõhn; Värske kala lõhn | Lõhna tugevus, Lõhna samasus |
| Tekstuur | Voolav; Kleepuv; Krõmpsuv, Ümar tera; | Voolavus, Kleepuvus, Krõmpsuvus, Pehmus, Tera ümarus |
| Maitse | Soolane, Kalamaitse, Mahlane, Kõrvalmaitseta | Soolasus, Maitse samasus, Mahlasus |

Marja degusteerimine viidi läbi Toiduainete Instituudi sensoorikalaboris ja mõnikord ka raamatukogu grupitöö ruumis. Laboris olid olemas kõik vajalikud nõud, raamatukogus kasutati ühekordseid plastmassist nõusid. Proovid ja referentsproov toodi degusteerimispaika vastavalt külmuurumist ja tootja käest. Referentsproov oli sellel hetkel värskusega 7 ± 3 päeva ja valmistatud vastavalt tootja retseptile (2,5% soola ja 2g/kg naatriumbensoati). Degusteerijatele anti taldrikul nummerdatud proovid ja kõrvaltaldrikul referentsproov. Kui degusteerida oli vaja erinevaid partiid, siis olid ühe partii proovid ühel taldrikul ja esmajärjekorras anti värskem partii. Võrdlemise alusel andis degusteerija oma hinnangu vastava omaduse kohta ja kandis tulemuse hindamislehele. Hindamise ajal ei olnud degusteerijad teadlikud proovi retseptuurist ega partiist. Igast degustatsioonist võttis osa 2-3 inimest, mis oli madalam algselt planeeritud osalejate arvust.

Degustatsiooni läbiviimisel püüti arvestada kõiki ettenähtud korralduslikke norme nagu kellaeg, valgustus, istujate paigutus laua taga, müra ja muud sellised näitajad. Enamjaolt kulgesid degustatsioonid mõnede erinevustega. Kokkusaamiste kellaajad olid erinevad olenevalt osavõtjate muudest kohustustest. Sellest tulenevalt toimusid degustatsioonid õhtusel ajal alati raamatukogu grupitöö ruumis, mis oli eelnevalt broneeritud ja võimaldas segamatult degustatsioon läbi viia. Kõrvaline müra oli minimaalne, sest raamatukogu on iseenesest vaikne keskkond. Proovide kõrval oli alati tops joogiveega ja taldrikul pirnilõigud. Raamatukogus kitleid ei kasutatud, kuid sensorikalabis olid kitlid olemas. Hoolimata degustatsiooni kohast ja ajast oli igal degusteerijal võimalik süveneda oma töösse.

Ühe erandina toimus 29.12.2013 degustatsioon mikrobioloogia laboris, kus kõiki proove hoiti ja mikrobioloogilisi-keemilisi analüüse läbi viidi. Põhjuseks oli asjaolu, et pühade ajal ei olnud võimalik mujale minna ning seal oli vaikne, sest tööd ei toimunud. Kaasas olid ühekordsed nõud, joogivesi ja pirnilõigud, kitlid olid kohapeal olemas.

7. TULEMUSED

Forellimarja säilivuskatsete tulemused näitasid, et iga tootepartii on teineteisest mõnevõrra erinev. Sama tulemust kinnitasid nii mikrobioloogilised kui sensoorsed analüüsid. Sensoorne analüüs tehti vaid esmasel vaatlusel toidukõlblikest proovidest. Mikrobioloogilisi külve ja pH määramist tehti kõikidele proovidele viiel korral kahe kuu jooksul.

7.1 Mikrobioloogilised ja keemilised analüüsid

Hügieenilise puhtuse indikaatorina analüüsitud *E.coli* ei leitud üheski partiis. pH muutus säilivusaja jooksul, kuid pH erinevusi esines ka olenevalt retsepti koostisest. Füsioloogilise lahusega mõõdetud pH väärtus oli puhta marja väärtusest alati kõrgem. Tabelites 7-10 on toodud iga partii pH väärtuste tulemused ja selle kõrval aeroobsete bakterite need tulemused, mille alusel on arvatud vastaval hetkel bakterite arv forellimarjas. Aeroobsete bakterite arvu lihtsamaks väljendamiseks on tabelites x⁻lahtrites tulemuste suurused 10⁶ korda väiksemad kui tegelikkuses saadud analüüsitulemused.

Aeroobsete bakterite tulemuste lugemisel lähtuti tasside lugemise juhendist, mis vastavas laboris kasutusel on. ISO metoodikale vastavalt on aeroobsete bakterite usaldusväärne vahemik 25-250 kolooniat. Külvide hulgas esines ka tasse, kus oli kolooniaid < 25. Osadel tassidel oli bakterite kasv niivõrd suur, et tulemuste lugemiseks kasutati neljandik sektori lugemist või isegi 1 cm² piirkonna lugemist tassil. Vastavalt labori juhendile on kõik tulemused, mis ei lange piirkonda 25-250 kolooniat, hinnangulised. *E.coli* tulemuste lugemisel on usaldusväärseks vahemikuks 10-100 kolooniat tassil. Vastavalt ISO standardile tuleb vähemalt viis kolooniat kinnitada, enne kui lõplik tulemus anda. Tassidel olevatest kolooniatest ei osutunud ükski *E.coli*ks või puudus kasv üldse. Vastavalt on iga proovi tulemus < 10 cfu /g.

Tabel 7. Partii I- aeroobsete bakterite arv (miljonit cfu/g kalamarja kohta) ja pH

| | Külviaeg, mitmes päev | Lahjendus | Cfu tassidel | X ⁻ tulemus cfu/ g | pH, mari | pH,mari+lahus |
|---|--------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|----------|---------------|
| Kalamari 1 Sool 2,5% | 3 | 10 ⁻² | 43/ 44 | 0,00435 | 6,07 | 6,3 |
| | 18 | 10 ⁻⁷ | 47/55 | 510 | 5,99 | 6,12 |
| | 29 | 10 ⁻⁸ | 0/2 | 100 | 5,86 | 6,37 |
| | 46 | 10 ⁻⁹ | 6/11 | 8500 | 6,19 | 6,58 |
| | 58 | 10 ⁻⁷ | 206/171 | 1900 | 6,4 | 6,68 |
| Kalamari 2 Sool 2,5% + E211 0,2% | 3 | 10 ⁻¹ | 46/42 | 0,00044 | 6,03 | 6,25 |
| | 18 | 10 ⁻³ | 23/39 | 0,031 | 5,92 | 6,13 |
| | 29 | 10 ⁻⁵ | 144/143 | 14 | 5,83 | 6,1 |
| | 45 | 10 ⁻⁶ | 200/191 | 200 | 5,65 | 6,03 |
| | 58 | 10 ⁻⁷ | 25/20 | 220 | 5,99 | 6,31 |
| Kalamari 3 Sool 2,5% + E211 0,2% + E330 0,1% | 3 | 10 ⁻¹ | 29/26 | 0,000275 | 5,83 | 6,02 |
| | 18 | 10 ⁻² | 90/84 | 0,0087 | 5,79 | 5,82 |
| | 29 | 10 ⁻⁴ | 25/30 | 0,275 | 5,61 | 5,99 |
| | 45 | 10 ⁻⁶ | 38/31 | 35 | 5,49 | 5,83 |
| | 58 | 10 ⁻⁷ | 6/5 | 55 | 5,72 | 6,07 |

Tabel 8. Partii II- aeroobsete bakterite arv (miljonit cfu/g kalamarja kohta) ja pH

| | Külviaeg, mitmes päev | Lahjendus | Cfu tassidel | X ⁻ tulemus cfu/ g | pH, mari | pH, mari+ lahus |
|---|--------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|----------|--------------------|
| Kalamari 1 Sool 2,5% | 2 | 10 ⁻¹ | 71/84 | 0,000775 | 6,1 | 6,5 |
| | 11 | 10 ⁻⁶ | 125/119 | 120 | 5,9 | 6,22 |
| | 18 | 10 ⁻⁷ | 97/110 | 1000 | 6,07 | 6,46 |
| | 26 | 10 ⁻⁶ | 1824/1311 | 1600 | 5,88 | 6,12 |
| | 43 | 10 ⁻⁷ | 126/159 | 1400 | 5,73 | 6,08 |
| Kalamari 2 Sool 2,5% + E211 0,2% | 3 | 10 ⁻¹ | 78/67 | 0,000725 | 6,14 | 6,43 |
| | 18 | 10 ⁻³ | 4788/4332 | 0,46 | 5,96 | 6,22 |
| | 26 | 10 ⁻⁵ | 492/588 | 54 | 5,7 | 6,09 |
| | 46 | 10 ⁻⁷ | 77/71 | 740 | 6,02 | 6,3 |
| | 57 | 10 ⁻⁷ | 40/38 | 1400 | 5,39 | 5,78 |
| Kalamari 3 Sool 2,5% + E211 0,2% + E330 0,1% | 3 | 10 ⁻¹ | 66/50 | 0,00058 | 5,83 | 6,18 |
| | 18 | 10 ⁻³ | 1360/1192 | 1,3 | 5,62 | 5,93 |
| | 26 | 10 ⁻⁵ | 283/252 | 27 | 5,56 | 6,15 |
| | 43 | 10 ⁻⁷ | 22/18 | 200 | 5,82 | 6,1 |
| | 57 | 10 ⁻⁷ | 70/62 | 660 | 5,55 | 5,98 |
| Kalamari 4 Sool 2,5% + E202 0,2 % | 2 | 10 ⁻¹ | 80/80 | 0,0008 | 6,02 | 6,35 |
| | 18 | 10 ⁻³ | 2934/1824 | 2,1 | 5,94 | 6,42 |
| | 27 | 10 ⁻⁵ | 3306/2508 | 290 | 5,75 | 6,21 |
| | 45 | 10 ⁻⁷ | 63/54 | 590 | 6,1 | 6,31 |
| | 57 | 10 ⁻⁷ | 111/96 | 1040 | 6,6 | 6,8 |

Tabel 9. Partii III- aeroobsete bakterite arv (miljonit cfu/g kalamarja kohta) ja pH

| | Külviaeg, mitmes päev | Lahjendus | Cfu tassidel | X ⁻ tulemus cfu/ g | pH, mari | pH, mari+ lahus |
|---|--------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|----------|--------------------|
| Kalamari 1 Sool 2,5% | 3 | 10 ⁻¹ | 798/684 | 0,00741 | 5,85 | 6,24 |
| | 10 | 10 ⁻⁶ | 117/135 | 130 | 5,93 | 6,22 |
| | 17 | 10 ⁻⁷ | 67/79 | 730 | 5,82 | 6,24 |
| | 25 | 10 ⁻⁷ | 139/140 | 1400 | 6,25 | 6,73 |
| | 41 | 10 ⁻⁷ | 141/156 | 1500 | 6,37 | 6,64 |
| Kalamari 2 Sool 2,5% + E211 0,2% | 3 | 10 ⁻² | 29/37 | 0,0033 | 5,87 | 6,27 |
| | 17 | 10 ⁻⁵ | 120/106 | 11 | 5,85 | 6,33 |
| | 25 | 10 ⁻⁷ | 48/37 | 430 | 6,12 | 6,53 |
| | 41 | 10 ⁻⁶ | 194/210 | 2000 | 6,05 | 6,39 |
| | 55 | 10 ⁻⁷ | 153/134 | 1400 | 6,39 | 6,78 |
| Kalamari 3 Sool 2,5% + E211 0,2% + E330 0,1% | 3 | 10 ⁻² | 52/69 | 0,00605 | 5,66 | 6,07 |
| | 17 | 10 ⁻⁵ | 78/66 | 7,2 | 5,57 | 6,1 |
| | 25 | 10 ⁻⁷ | 27/38 | 330 | 5,72 | 6,32 |
| | 41 | 10 ⁻⁷ | 28/37 | 330 | 5,95 | 6,29 |
| | 55 | 10 ⁻⁸ | 13/12 | 1010 | 6,51 | 6,62 |
| Kalamari 4 Sool 2,5% + E202 0,2 % | 3 | 10 ⁻¹ | 114/112 | 0,00113 | 5,99 | 6,41 |
| | 17 | 10 ⁻⁴ | 4560/6213 | 54 | 5,75 | 6,17 |
| | 32 | 10 ⁻⁶ | 68/47 | 58 | 6,27 | 6,69 |
| | 41 | 10 ⁻⁷ | 30/27 | 290 | 6,33 | 6,74 |
| | 57 | 10 ⁻⁶ | 72/71 | 72 | 5,9 | 6,3 |

Tabel 10. Partii IV- aeroobsete bakterite arv (miljonit cfu/g kalamarja kohta) ja pH

| | Külviaeg, mitmes päev | Lahjendus | Cfu tassidel | X ⁻ tulemus cfu/ g | pH, mari | pH, mari+ lahus |
|---|--------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|----------|--------------------|
| Kalamari 4 Sool 2,5% + E202 0,2 % | 2 | 10 ⁻² | 189/185 | 0,0187 | 5,95 | 6,46 |
| | 17 | 10 ⁻⁷ | 45/33 | 390 | 6,16 | 6,57 |
| | 29 | 10 ⁻⁶ | 65/57 | 61 | 5,86 | 6,21 |
| | 41 | 10 ⁻⁶ | 19/25 | 22 | 5,9 | 6,3 |
| | 56 | 10 ⁻⁶ | 77/84 | 81 | 5,8 | 6,22 |

Proovi K analüüsi neljal erineval ajahetkel. Aeroobsete bakterite kasvu järgi on näha, et kaaliumsorbaadi lisamine 200 mg/ kg on liiga väike, sest bakterite kasv proovis oli sama kiire kui iga partii retseptil K1, kus polnud ühtegi lisaainet. Forellimarja veeaktiivsus mõõdeti esimese partii proovil K2 ja neljanda partii proovil K4. Mõlema proovi paralleelkatsete tulemused olid 0,97 ja seega veeaktiivsuse määramise tulemus on 0,97.

7.2 Sensoorsed analüüsid

Forellimarja degusteerimisel analüüsi toote omadusi vastavalt hindamislehel olevatele tunnustele hindamisskaalal -2...+2. Degusteerijaid oli igal korral minimaalselt kaks ja maksimaalselt kolm. Kui mari oli vananenud silmnähtavalt (hallitus), jäeti proov maitsmata ja seetõttu ei saanud hinnata ka teisi maitsmisest tulenevaid näitajaid (krõmpsuvus, mahlasus jt). Proov võis olla ka näiliselt kõlbulik, kuid kui nuusutamisel ja maitsmisel ilmses, et marja vastavad omadused on võrreldes referentsiga (märgatavalt) halvenenud, siis järgneval korral enam vastavat proovi degustatsioonile ei võetud. Sõltuvalt marja seisukorrast on igal proovil erinev degustatsioonide arv.

8. TULEMUSTE ANALÜÜS

Tulemuste põhjal analüüsiti kirjeldava statistilise meetodiga aeroobsete bakterite ja degusteerimise tulemusi. Sensoorsel hindamisel oli neli põhiomaduste gruppi: värv, lõhn, tekstuur ja maitse. Kokku oli 13 omadust, millele degusteerija andis hindamisskaalal -2...+2 vastava hinde. Igal degustatsioonil osales erinev hulk degusteerijaid ning nende hinded samasuguse omaduse puhul olid tihtipeale erinevad. Seeõttu arvutati iga proovi omaduse kohta keskmine hinne, mille alusel arvutati koguhinne. Esialgne hindamisskaala teisendati ümber, et iga omadus, mis halvenes, saaks negatiivse hinde. Näiteks 03.12.2013 valmistatud proovil K1 oli teisel degusteerimisel lõhna tugevuse keskmine hinne +1. See näitab, et lõhna tugevus oli võrreldes referentsprooviga suurenenud. Teisendamise järel sai sellest hindest -1. Sarnaselt teisendati tulemus ka juhul, kui lõhna tugevus oli väiksem kui referentsproovil. Näiteks 11.12.2013 valmistatud proovil K1 oli esimesel degusteerimisel lõhna tugevuse keskmine hinne -0,5. See näitab, et lõhna tugevus oli väiksem kui referentsproovil ja peale teisendamist sai sellest hindest +0,5. Lisaks lõhna tugevusele, teisendati samamoodi ka voolavuse, krõmpsuvuse, pehmuse ja soolasuse keskmised tulemused.

Tabel 11. Proovi K1 degusteerimise teisendatud hinded

| | | K1 sool 2,5% aeg päevades | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------|------------------------------|------------|--|--|------------------------|------------|-----------|--|------------------------|-----------|------------|------------|--|--|
| | | Valmistatud (15.11.13) | | | | Valmistatud (03.12.13) | | | | Valmistatud (11.12.13) | | | | | |
| | | 5 | 19 | | | 1 | 16 | 26 | | | 7 | 18 | 28 | | |
| Värv | Läikivus | 0 | 0,3 | | | -0,7 | 0,5 | 1 | | | 0 | 0,5 | 0 | | |
| | Läbipaistvus | 0 | 0 | | | -0,3 | -0,5 | 0 | | | 0 | -0,5 | 0 | | |
| | Värvi intensiivsus | 0 | 0 | | | 0,7 | 0,5 | 0 | | | 0 | 0 | -0,5 | | |
| Lõhn | Lõhna tugevus | 0 | -0,3 | | | 1,3 | -1 | -1,5 | | | 0,5 | -1 | -1 | | |
| | Lõhna iseloom | 0 | -0,7 | | | 0,3 | 0 | -2 | | | 0 | -0,5 | -1,5 | | |
| Tekstuur | Voolavus | 0,5 | -1 | | | 1,3 | 1 | -1 | | | 0 | -0,5 | -0,5 | | |
| | Kleepuvus | 0 | 0 | | | 0,7 | 0,5 | 0,5 | | | 0,5 | 0 | 1 | | |
| | Krõmpsuvus | -0,5 | -1,3 | | | 0 | 0,5 | 0,5 | | | 0,5 | 0,5 | 0 | | |
| Maitse | Pehmus | 0,5 | 1 | | | 0,3 | -1 | -0,5 | | | -0,5 | -0,5 | 0 | | |
| | Tera ümarus | 0 | -1,3 | | | 0,7 | 0 | -1,5 | | | 0 | -0,5 | -1 | | |
| | Soolasus | -0,5 | 0 | | | 0 | -0,5 | 0 | | | 0,5 | -0,5 | 0 | | |
| | Maitse iseloom | 0,5 | -2 | | | -0,3 | 0 | -2 | | | -1 | -1,5 | -2 | | |
| | Mahlasus | -0,5 | -1 | | | -0,7 | -0,5 | -0,5 | | | -1 | -0,5 | -1 | | |
| Kokku | | 0 | -6 | | | 3,3 | -1 | -7 | | | -1 | -5 | -7 | | |
| log (cfu) | | -2 | 2,7 | | | -3 | 2,1 | 3 | | | -2 | 2,1 | 2,9 | | |

Tabel 12. Proovi K2 degusteerimise teisendatud hinded

| | | K2 sool 2,5% +E211 aeg päevades | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--------------------|---------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------------------|-------------|------------|--|--|------------------------|-----------|------------|------------|--|
| | | Valmistatud (15.11.13) | | | | | Valmistatud (03.12.13) | | | | | Valmistatud (11.12.13) | | | | |
| | | 5 | 19 | 33 | 44 | 54 | 1 | 16 | 26 | | | 7 | 18 | 28 | 41 | |
| Värv | Läikivus | 0 | 0 | 0 | -0,5 | 0,5 | -0,7 | 1 | 0 | | | -0,5 | 0,5 | 0 | 0 | |
| | Läbipaistvus | 0 | 0 | 0 | -0,5 | -0,5 | -0,3 | 0 | -0,5 | | | 0,5 | -0,5 | 0 | 0 | |
| | Värvi intensiivsus | 0 | 0 | 0 | 0,5 | -0,5 | 0,3 | 0 | 0,5 | | | 0 | 0,5 | 0 | 0 | |
| Lõhn | Lõhna tugevus | -0,5 | 0 | -1 | -0,5 | 0 | 1,3 | 0 | -1 | | | -1 | -1 | 0 | -1 | |
| | Lõhna iseloom | 0 | -0,7 | 0 | 0 | -0,5 | 0 | 0,5 | -0,5 | | | 0 | 0 | 0 | -1 | |
| Tekstuur | Voolavus | 0 | -1 | -1 | -1 | -0,5 | 0,7 | 0,5 | -0,5 | | | 0,5 | -1,5 | -0,5 | -0,5 | |
| | Kleepuvus | -0,5 | -0,3 | -0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0 | 0,5 | | | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | |
| | Krõmpsuvus | 0 | -0,7 | 1 | 1 | | -0,3 | -0,5 | 0 | | | -0,5 | 0 | -0,5 | | |
| | Pehmus | -0,5 | 0,7 | -1,5 | -1 | | 0,3 | 0 | -0,5 | | | -0,5 | 0 | 1 | | |
| Maitse | Tera ümarus | 0 | -0,3 | -0,5 | -1 | -1 | 0,7 | 0 | -1 | | | 0 | -1,5 | -1 | -1 | |
| | Soolasus | 0 | -0,3 | 1 | -1,5 | | -0,7 | 0,5 | 0 | | | 0,5 | 0 | -0,5 | | |
| | Maitse iseloom | 0 | -0,3 | -1 | -1 | | 0 | 1 | -1,5 | | | 0 | 0 | 0,5 | | |
| | Mahlasus | 0,5 | -0,3 | 0 | -0,5 | | 0 | 0 | 0 | | | -0,5 | -1 | -1 | | |
| | Kokku | -1 | -3 | -4 | -6 | -2 | 1,7 | 3 | -5 | | | -2 | -4 | -2 | -3 | |
| | log(cfu) | -3 | -2 | 1,1 | 2,3 | 2,3 | -3 | -0,3 | 1,7 | | | -2 | 1 | 2,6 | 3,3 | |

Tabelis 11-14 on toodud proovide K1, K2, K3 ja K4 teisendatud keskmised tulemused ja degusteerimisega paralleelselt saadud aeroobsete bakterite üldarvu tulemused väljendatuna logaritmiliselt. Tabel 14 näitab, et proovi K1 kõigil kolmel paralleelil kasvab ajas bakterite hulk ja omaduste kvaliteet langeb. Keskmise paralleelproovi bakterite hulk nullhetkel oli suurem kui teistel paralleelidel. Tabel 15 näitab proovi K2 tulemusi. Esimesel ja kolmandal paralleelproovil on viimased degustatsioonid viidud läbi ilma maitsmiseta, kuna proovil kasvas hallitus. Üldiselt on igal paralleelil näha omaduste kvaliteedi langust, teisel ja kolmandal paralleelil omaduste kvaliteet veidi kõigub. Mikroorganismide arv tõuseb aja jooksul kõikide paralleelide puhul. Nullhetkel oli baktereid kõige rohkem kolmandal paralleelil.

Tabelis 13 on proovi K3 tulemused. Kõiki paralleele iseloomustab omaduste halvenemine ja mikroorganismide arvu suurenemine ajas. Iga paralleeli nullhetkel oli erinev bakterite hulk, kõige vähem oli neid esimesel paralleelil ja kõige rohkem kolmandal paralleelil.

Tabel 13. Proovi K3 degusteerimise teisedandud hinded

| | | K3 sool 2,5%+E211 +E330 | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------------------|----------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------------------|------------|------------|--|--|------------------------|-----------|------------|--|--|--|
| | | Valmistatud (15.11.13) | | | | | Valmistatud (03.12.13) | | | | | Valmistatud (11.12.13) | | | | | |
| aeg päevades | | 5 | 19 | 33 | 44 | 54 | 1 | 16 | 26 | | | | 7 | 18 | | | |
| Värv | Läikivus | 0 | 0 | -0,5 | 0,5 | -0,5 | -1 | 0,5 | -0,5 | | | | -0,5 | 0 | | | |
| | Läbipaistvus | 0 | 0 | 0 | 0 | -0,5 | -0,3 | 0 | 0 | | | | 0 | -0,5 | | | |
| Lõhn | Värvi intensiivsus | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0,7 | 0 | 0 | | | | 0 | 0,5 | | | |
| | Lõhna tugevus | 0 | 0 | -1 | 0 | -1 | 1 | 0 | -1 | | | | -0,5 | -1 | | | |
| Tekstuur | Lõhna iseloom | 0 | 0,3 | 0 | -0,5 | 0 | 0,3 | 0 | -1,5 | | | | 0 | 0 | | | |
| | Voolavus | 0 | 0 | -1 | 0,5 | -1 | 1 | 0 | -0,5 | | | | 0,5 | -0,5 | | | |
| Maitse | Kleepuvus | 0 | 0 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0,3 | 0 | 0,5 | | | | 0 | 0 | | | |
| | Krõmpsuvus | 0 | -1 | -0,5 | 0 | 0 | 0 | -0,5 | | | | | -0,5 | -1 | | | |
| | Pehmus | 0 | 1 | 0,5 | 0 | 0,5 | 0,3 | 0 | | | | | 0,5 | 1 | | | |
| | Tera ümarus | 0 | -0,7 | -1 | -1,5 | -1 | 0,7 | -0,5 | -1,5 | | | | -0,5 | -1 | | | |
| | Soolasus | 0 | 0 | 1 | -1 | -0,5 | -0,7 | 0,5 | | | | | 0 | 0 | | | |
| | Maitse iseloom | 0,5 | -0,7 | -0,5 | -0,5 | -0,5 | -0,3 | 0,5 | | | | | 0 | 0 | | | |
| | Mahlasus | 0 | -0,3 | 0 | -0,5 | -0,5 | -0,7 | 0 | | | | | -0,5 | -1 | | | |
| | Kokku | 0,5 | -1 | -3 | -2 | -4 | 1,3 | 0,5 | -5 | | | | -2 | -4 | | | |
| | log(cfu) | -4 | -2 | -1 | 1,5 | 1,7 | -3 | 0,1 | 1,4 | | | | -2 | 0,9 | | | |

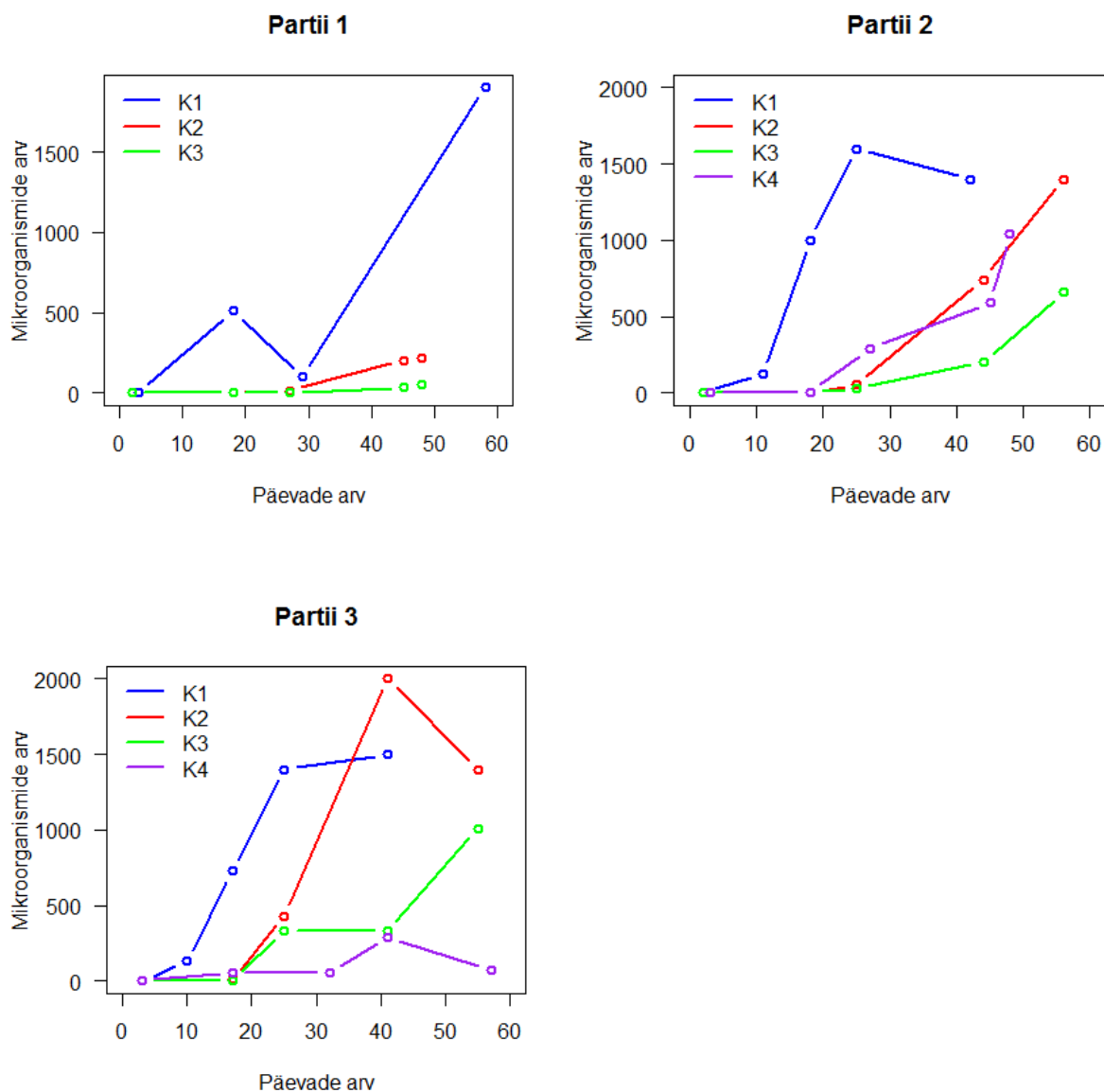
~ Tabelis 14 on proovi K4 tulemused. Mikroorganismide hulk proovis nullhetkel oli suurem kolmandal paralleelil, teisel kahel paralleelil ühesugune. Aja jooksul kasvas mikroorganisme juurde, teisel ja kolmandal paralleelil näitas hulk viimase külvi hetkel vähest langust. Degustatsioonide hinded aja jooksul langesid, kuid esimese ja kolmanda paralleeli viimase degustatsiooni hinne oli eelnevaga võrreldes parem. Kõigi kolme paralleelproovide degustatsiooni hinded nullhetkel olid kahanevas järjekorras, mis võib tuleneda sellest, et vastav degustatsioon viidi läbi erinevatel päevadel peale valmistamist.

Kõikide proovide puhul on ühiselt näha, et aja jooksul kalamarja sensoorsed omadused halvnevad ja mikroorganismide hulk kasvab, nende hulk proovis nullhetkel on erinev.

Tabel 14. Proovi K4 degusteerimise teisendatud hinded

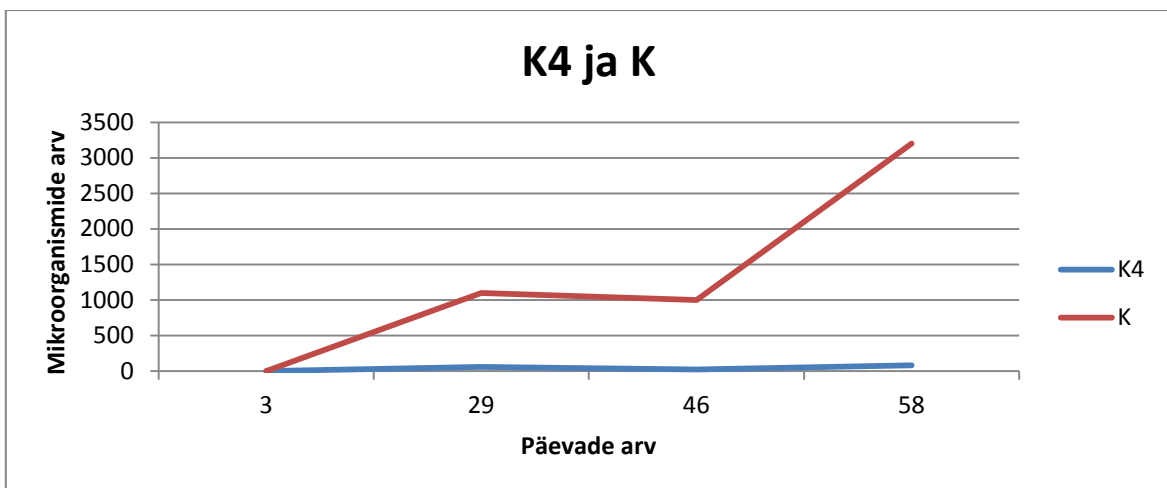
| | | K4 sool 2,5%+ E202 | | | | | Valmistatud (03.12.13) | | | | | Valmistatud (11.12.13) | | | | | Valmistatud (18.12.13) | | | |
|----------|--------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------------------|------------|------------|------------|----|------------------------|----|----|----|
| | | aeg päevades | | | | | 1 | 16 | 26 | 42 | 56 | 7 | 18 | 28 | 41 | 56 | 11 | 21 | 27 | 41 |
| Värv | Läikivus | 0 | 0,5 | 0,5 | 0 | -0,7 | 0 | 0 | -0,5 | -0,5 | 0 | 0,5 | 0,5 | -0,3 | -0,3 | | | | | |
| | Läbipaistvus | -0,3 | 0 | -0,5 | -1 | -0,3 | 0,5 | 0 | 0 | -1 | -1 | 0 | 0 | -0,7 | 0 | | | | | |
| | Värvi intensiivsus | 0,3 | 0 | 0 | 0,3 | 0 | -0,5 | 0 | 0 | 0 | -0,5 | 0 | 0,5 | 0 | -0,3 | | | | | |
| Lõhn | Lõhna tugevus | 1 | -1 | -0,5 | -0,7 | 0,3 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | -0,5 | -0,5 | 0 | 0 | | | | | |
| | Lõhna iseloom | 0,3 | 0 | 0 | -0,7 | -0,7 | 0 | 0 | 0 | -0,5 | -0,5 | 0,5 | -1 | -0,7 | -1,7 | | | | | |
| Tekstuur | Voolavus | 0,7 | 0,5 | -1 | -1 | 1,7 | -1 | -0,5 | -0,5 | -0,5 | 0 | -1 | -1 | -1 | 0,7 | | | | | |
| | Kleepuvus | 0,3 | 0,5 | 1 | -0,3 | 1,3 | 1 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | -0,3 | 0,7 | | | | | |
| | Krõmpsuvus | -0,3 | 0,5 | 0 | 0,3 | 1,3 | 0 | 0,5 | -0,5 | -0,5 | -1 | 1 | -0,5 | -0,3 | 0,7 | | | | | |
| | Pehmus | 0,3 | -1 | -1 | -0,3 | -1 | 0 | -0,5 | 0 | 0,5 | 1 | -0,5 | -0,5 | 0,3 | -0,3 | | | | | |
| Maitse | Tera ümarus | 0,7 | 0 | -1 | -1,3 | -0,7 | 0 | -0,5 | -1 | -1 | -1 | 0 | -1 | -1 | -0,7 | | | | | |
| | Soolasus | 0 | 1 | -0,5 | 0,7 | 0,7 | 0 | 0 | -0,5 | -0,5 | 0 | -0,5 | -0,5 | 0 | 0,3 | | | | | |
| | Maitse iseloom | 0 | 0 | -1 | -0,7 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -0,5 | -1,5 | -1 | -1 | -2 | | | | | |
| | Mahlasus | -0,3 | -0,5 | 0 | -1 | -0,7 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | -1 | 0 | -0,5 | -1 | -0,7 | | | | | |
| | Kokku | 2,7 | 0,5 | -4 | -6 | 0,3 | 0 | -1 | -3 | -4 | -4 | -2 | -6 | -6 | -4 | | | | | |
| | log(cfu) | -3 | 0,3 | 2,5 | 2,8 | 3 | -3 | 1,7 | 1,8 | 2,5 | 1,9 | -2 | 2,6 | 1,8 | 1,3 | | | | | |

Proovide peale oli kokku neli erinevat kalamarja partiid. Esimeses partiis valmistati kalamarja variandid K1-K4, kuid viimasele neist lisati säilitusainet kaaliumsorbaati kümme korda vähem seaduses lubatud maksimaalsest kogusest. Proovi K4 bakterite kasv oli samas suurusjärgus prooviga K1 ning järgnevates partiides lisati kaaliumsorbaati seaduses lubatud maksimummääras. Neljandas partiis on ainult proov K4, et võrdse säilitusaine kogusega proove oleks kokku kolm. Esimese partii proovi K4 (edaspidi K) vaadeldakse eraldi koos neljanda partii prooviga K4, et võrrelda sama säilitusaine mõju erinevatel kontsentratsioonidel. Teises ja kolmandas partiis valmistati variandid K1-K4. Partii 1-3 võrdlused on joonisel 2. Mikroorganismide arv cfu/g on lihtsustamiseks 10^6 korda väiksem analüüsis saadud tegelikust hulgast. Joonisel on hästi näha, kuidas mõjutavad kasutatavad lisaained mikroorganismide kasvu. Kõigi partii puhul on näha, et kõige kiiremini toimub mikroorganismide kasv proovis K1, millele järgnevad K2 ja K3. Partii kaks jääb proovi K4 mikroorganismide kasv sarnaseks prooviga K2. Partii kolm on proovi K4 kasv kõige aeglasem ja kõigi nelja proovi erinevused on kõige paremini välja toodud.



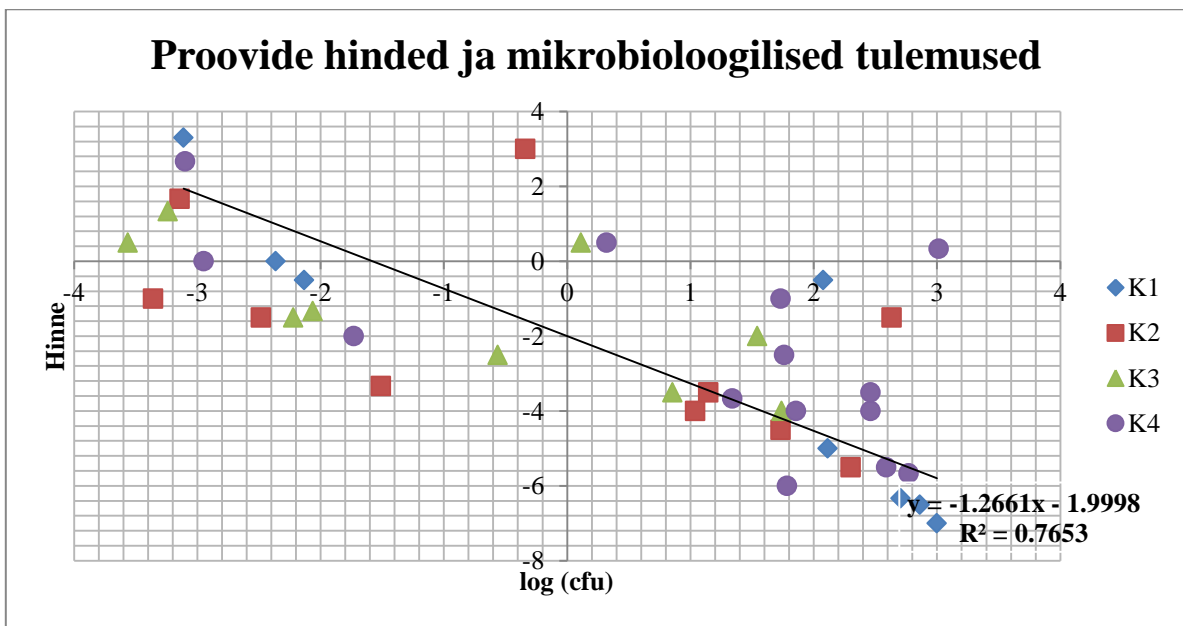
Joonis 2. Proovide K1-K4 võrdlus partiide alusel

Neljanda partii proovi K4 on võrreldud esimese partii prooviga K, kuhu lisati sama säilitusainet kümme korda vähem. Seetõttu on nende võrdlus toodud eraldi joonisel 3, kust selgub, et mikroorganismide hulk tõusis 29 päevaga proovis K väärtuseni 1000, püsis stabiilsena ja jätkas kasvu. Proovi K4 mikroorganismide kasv jäi prooviga K võrreldes väga tagasihoidlikuks.



Joonis 3. Proovide K ja K4 mikroorganismide hulga võrdlus

Kalamarja säilivuse uurimiseks kasutatud sensoorse ja mikrobioloogilise meetodi kokkulangevuse uurimiseks on joonisel 4 toodud korrelatsioonisirge graafik. Graafikul on kõikide proovide mikroorganismide arvu logaritmilised väärtused ning degustatsioonide hinded. Graafikult on näha, et sirge lõikab x-telge punktis, kus log väärtus on -1,6. Vastavalt sellele väärtusele on mikroorganismide arv $2,5 \cdot 10^4$ cfu/g ja proovi hinne on 0.



Joonis 4. Degustatsiooni hinde ja mikroorganismide arvu korrelatsioon

Degustatsiooni väärtuse -2 korral on mikroorganismide logaritmiline suurus 0 ehk 10^6 . Hinde -3 juures on logaritmiline suurus 0,8 ja sellele vastav mikroorganismide hulk $6,3 \cdot 10^6$.

Hinde -4 juures on mikroorganismide hulk jõudnud suuruseni $\log 1,6$ ehk $4 \cdot 10^7$. Hindele -5 vastab \log väärtus 2,3 ehk mikroorganismide hulk $2 \cdot 10^8$. Kirjanduse andmetel on toiduainete riknemist sensoorselt võimalik tuvastada bakterite hulgal 10^7 - 10^8 cfu/g [4].

Vaadates kõikide proovide mikrobioloogiliste analüüside tulemusi, saab leida umbkaudse päevade arvu, millal bakterite hulk jõudis suuruseni 10^7 . Täpsemaks ülevaateks on tabelis 15 arvatud kõikide proovide kolme paralleeli tulemused. Juurde on lisatud andmed ka mikroorganismide hulga 10^6 kohta, mis oleks toote säilivuse mõttes ohutum piir. Kasvukiirus arvutati iga proovi külvietappide vahel ja võeti nende keskmine. Kasvu kiirus arvutati valemi 1 põhjal [17] ning samast valemist avaldati aeg t , võttes mikroorganismide lõpphulgaks 10^6 ja 10^7 .

Valem 1:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

kus: N - bakterite arv; t - aeg [h]; μ - kasvukiirus [h^{-1}]

Logaritmilisel kujul avaldub kasvukiirus μ :

$$\mu = \frac{\log N(t) - \log N}{t}$$

ja aeg t avaldub:

$$t = \frac{\log Nt - \log N}{\mu}$$

kus: μ - kasvukiirus [h^{-1}]; Nt - bakterite arv ajal t ; N - bakterite arv; t - aeg [h]

Tabelist 15 selgub, et mikroorganismide hulga 10^7 juures kasvab säilivus järjekorras K1, K2, K4 ja K3, kusjuures proovide K2 ja K4 säilivusaeg on võrdne. Kui mikroorganisme on proovis 10^6 , siis kasvab säilivus järjekorras K1, K4, K2 ja K3. Proovide K2 ja K4 säilivus erineb ainult kahe päeva võrra. Proovide säilivus kasvab erineva hulga päevade võrra. Proovide K1 ja K2 säilivus kasvab viie päeva võrra, proovi K4 säilivus seitsme päeva ning proovi K3 säilivusüheksa päeva võrra.

Tabel 15. Proovide säilivus vastavalt mikroorganismide hulgale 10^7 ja 10^6

| | Mikroorganismide hulk 10^7 | | | | Mikroorganismide hulk 10^6 | | | |
|-----------|------------------------------|-------------|-------------|-----------|------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| | Päevade arv | Päevade arv | Päevade arv | Keskmine | Päevade arv | Päevade arv | Päevade arv | Keskmine |
| K1 | 15 | 17 | 17 | 16 | 10 | 13 | 11 | 11 |
| K2 | 40 | 30 | 15 | 28 | 31 | 23 | 15 | 23 |
| K3 | 48 | 35 | 28 | 37 | 37 | 27 | 19 | 28 |
| K4 | 30 | 38 | 17 | 28 | 22 | 28 | 11 | 21 |

9. ARUTELU

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli määrata forellimarja säilivus kasutades nelja erinevat retseptuuri. Valitud lisaained esindasid tööstuslikes kalatoodetes kasutatavaid säilitusaineid ja happesuse regulaatorit. Enne säilivuskatsete alustamist oli hüpoteetiliselt teada lisaainete oodatav mõju tootele, kuid mitte täpne säilivusaeg. Looduslike säilitusainete uurimisel katsetati eeterlikku oreganoõli forellimarjas, kuid kahjuks näitas see, et forellimarjale eeterlikud õlid ei sobi, sest nad jätavad tootele omase lõhna ja maitse varju.

Forellimarja sensoorsed katsed näitasid toimuvaid muutusi uuritud omadustes. Värske forellimarja lõhn ja maitse on väga nõrgad ja valgulised. Aja jooksul muutuvad nad tugevamaks ja kalataoliseks. Välimuses toimuvad muutused on kõige tagasihoidlikumad. Forellimari on läikiv ja läbipaistev, kauni oranži tooniga. Need omadused säilivad lõhna, maitse ja tekstuuriga võrreldes kõige paremini. Tekstuur muutub aja jooksul pehmemaks, marjatera kaotab ümaruse ning tema pinnale tekivad lohud. Marja vedelus suureneb tera pehmenemise tõttu, sest pehmenenud kest ei kaitse marja sisu väljavoolamise eest. Degustatsioonil hinnati 13 omadust, millest igaüks andis maksimaalselt -2 punkti, kokku võis proov saada -26 punkti. Sensorse analüüsi etteantud punktide piiri, mille järgi hinnata marja säilivust, ei ole. Kui võrrelda ajahetki, mil proovide mikroorganismide hulk kasvas suuruseni 10^7 ja sellele lähedasel ajal saadud sensorse analüüsi hinnet, on näha, et säilivuse piiriks võib anda keskmiselt -4 punkti, see moodustab 15% minimaalsest punktisummast.

Mikrobioloogilised külvid näitasid, et uuritud kalamarjas ei olnud *Escherichia coli* mitte üheski partiis, andes kinnitust puhtale tootmisprotsessile. Aeroobsete bakterite üldarvu analüüs näitas, et bakterite arv proovides nullhetkel oli 10^2 - 10^3 . Neljanda partii proovil K4 oli ainukesena nullhetkel bakterite hulk 10^4 . Kõiki proove ja partiisid analüüsiti viiel korral kahe kuu jooksul, vastava perioodi lõpul oli bakterite hulk kasvanud suuruseni 10^7 - 10^9 . Sensorsete ja mikrobioloogiliste analüüsides keskmiste tulemuste korrelatsioonisirge näitas, et kahe meetodi tulemused korreleeruvad väga hästi ning säilivuse lõpus on mikroorganismide hulk forellimarjas $4 \cdot 10^7$. Üldsuurusjärgu 10^7 järgi säilivad kolme partii proovid keskmiselt K1 16 päeva, K2 ja K4 28 päeva ning K3 37päeva. Proovide K1- K3 paremusjärjestus on ootuspärane, kuid proovi K4 puhul oodati kõige pikemat säilivusaega või võrdset tulemust prooviga K3.

Proovipartiide graafikutelt saab analüüsida iga proovi mikroorganismide kasvu erinevusi. Proov K1 kasvab kõikides partiides kõige kiiremini. Proovi K2 kasvujoon on laugem ning proovi K3 kasv on veelgi tagasihoidlikum. Lisaainete mõju on kasvujoontes selgelt näha. Ühtlasi võib öelda, et iga järgneva partii kasvujooned tõusevad kiiremini. Proovi K4 kasvujoon teises partiis oli sarnane eelnevalt leitud paremusjärjestusega, millest selgus, et proovid K2 ja K4 säilisid võrdse ajaga. Kolmanda partii K4 kasvujoon näitas aga tulemust, mida tegelikult oodati ehk kõige aeglasemat mikroorganismide kasvu. Kuigineljanda partii proov K4 on eraldi graafikul koos prooviga K, võib teise ja kolmanda partii mikroorganismide hulgaga võrreldes öelda, et proovi K4 kasvujoon muutus kolmandas ja neljandas partiis aeglasemaks.

Aeroobsete bakterite üldarvu tulemused erinevate partiide lõikes näitasid, et kalamarjas sisalduvate mikroorganismide hulk ja liigid võivad olla erinevad. Teise partii proovidel K2 ja K3 (valmistatud 03.12.2013) kasvas 26. päeval hallitus, aga sama partii proovidel K1 ja K4 ei olnud hallitust. Proov K4 sisaldas säilitusainet kaaliumsorbaati, mis võis mõjuda hallituse vastu tõhusamalt võrreldes naatriumbensoadiga, kuid raske on leida põhjust proovi K1 kohta, kus ei olnud ühtegi säilitusainet. Tõenäoliselt, kuna proovis olev bakterite hulk kasvas kahe nädala jooksul suuruseni 10^8 , ei olnud hallitusel võimalik toitainete pärast konkureerida. Kolmanda partii proovil K3 (valmistatud 11.12.2013) oli samuti 25. päeval hallitus. Mõlema partii proovide K3 hallituse põhjuseks võib olla tänu sidrunhappele madaldatud pH, mis pidurdab bakterite kasvu ja soodustab seeläbi hallituse kasvu. Täpne hallituse päritolu on teadmata, tootmisruumidest ei olnud võimalik õhuanalüüsi teha ning tootja kinnitas, et nende samal kuupäevadel toodetud forellimarjal hallituse kasvu ei olnud. Siinjuures on oluline märkida, et tootja müüb iga partii ära kahe nädala jooksul, mis moodustab poole toote säilivusajast ning kolmandal ja neljandal nädalal tootjal enam vastavat partiid laos ei ole. Mikroorganismide kasvu üldiselt võisid mõjutada ka katseteks pakendatud proovide säilitamistingimused, mis erinesid mõnevõrra tootja enda tingimustest, sest mikrobioloogia labori külmruumi temperatuur kõikus laiemas vahemikus kui tootja külmruumis, $1,7^{\circ}\text{C}$ - 7°C ja 1°C - 5°C vastavalt.

Lisaainete valimisel oli hüpoteetiline proovide paremusjärjestus K1, K2, K3 ja K4. Säilivuskatsed näitasid, et ainult soolaga forellimari säilib kõige vähem. Naatriumbensoat pikendas säilivust 12 päeva võrra. Sidrunhappe lisamine naatriumbensoadile pikendas säilivust veel üheksa päeva, sest madaldatud pH takistas bakterite kasvu ning suurendas säilitusaine mõju.

Kaaliumsorbaadi mõju osutus samasuguseks kui naatriumbensoaadil, kuigi nendes partiides, kus esines hallitus, oli kaaliumsorbaat kõige efektiivsem. Säilivuskatsete tulemused olid ootuspärased, välja arvatud kaaliumsorbaadiga proovide puhul. Lisaainete mõju proovide sensorsetele omadustele otseselt ei jälgitud, kuid kaks degusteerijat tundsid pärast neljandat nädalat proovis K3 sidrunhappe maitset. Neljanda partii proovis K4 oli neljandal nädalal ja hiljem tunda keedumuna maitset, kuid raske on järeldada, kas see oli tingitud kaaliumsorbaadist endast või oli munamaitseline ühend tekkinud mõne bakteri elutegevusel.

KOKKUVÕTE

Kalamarja valmistatakse erineva soolasisaldusega, tavaliselt 4-6 %. Säilivuse pikendamiseks võib soolatud marja pastöriseerida. Tarbijate eelistuste tõttu valmistatakse rohkem vähesoolast kalamarja, mille soolasisaldus on keskmiselt 2,5-3,5 %. Maailmas on forelli- ja lõhemarja tootlus suur, sest vastavaid kasvatusi on nii Norras, Põhja-Ameerikas, Tšiilis kui ka Jaapanis. Tuuramari ehk kaaviar on liiga kallis, mistõttu punase kala marjast on saanud laialt levinud delikatess.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli võrrelda, kui kaua vähesoolatud forellimari erinevate lisaainetega säilib. Marja tootja on väikeettevõtte, kes kasutab soola 2,5 % ja säilitusainena naatriumbensoaati. Töös uuriti forellimarja säilivust neljas variandis: ilma lisaaineteta; naatriumbensoadiga; sidrunhappe ja naatriumbensoadiga ning kaaliumsorbaadiga. Säilivuse määramiseks kasutati sensoorset ja mikrobioloogilist analüüsi iga kahe nädala tagant. Katse tulemustest selgus, et säilitamisaja jooksul forellimarja sensoorsed omadused halvenevad; kõige vähem muutus marja värv, läikivus ja läbipaistvus. Mikrobioloogilised külvid näitasid, et forellimarja tootmisprotsess oli puhas, *Escherichia coli* ei olnud üheski proovis. Aeroobsete bakterite üldarv kasvas säilivuse jooksul suurusjärgus 10^3 - 10^9 . Kahe analüüsimeetodi korrelatsioonigraafiku sirge näitas, et kõikide proovide keskmine säilivus piirdus mikroorganismide hulgaga $4 \cdot 10^7$. Sellest tulenevalt on proovide K1-K4 säilivus vastavalt 16, 28, 37 ja 28 päeva.

Forellimarja säilivuskatsete tulemused olid proovide K1-K3 puhul ootuspärased, sest säilitusaine lisamine pikendab marja säilivust ning sidrunhappe kombineerimine säilitusainega alandab pH-d, mis inhibeerib omakorda bakterite kasvu. Proov K4 sisaldas säilitusainet kaaliumsorbaati, mille kasutamisel oodati eelnevatest proovidest pikemat säilivusaega. Tegelik säilivusaeg jäi võrdseks prooviga K2, kõige kauem säilis forellimari proovis K3, mis oli valmistatud naatriumbensoadi ja sidrunhappega. Aeroobsete bakterite üldarvu alusel on võimatu öelda, millist liiki mikroorganisme forellimari sisaldas ja kui palju partiides erinevad liigid muutusid. Teises ja kolmandas partiis esinenud hallitus ei mõjutanud proove K4, kuid teadmata põhjusel ei suutnud kaaliumsorbaat inhibeerida bakterite kasvu ootuspäraselt.

Säilivusuuringu tulemustest selgub, et tootja määratud forellimarja säilivus ühtib magistritöö tulemustega. Tootja kasutab säilitusainet naatriumbensoati ning forellimarja säilivusajaks on 28 päeva. Tootja saab soovi korral otsustada, kas ta soovib lisada naatriumbensoadile sidrunhapet. Kuna kaks degusteerijat tundsid pärast neljandat nädalat forellimarjas sidrunhappe maitset, peaks säilivuskatset kordama ja jälgima täpsemalt sidrunhappe mõju sensorsetele omadustele.

SUMMARY

DETERMINATION OF SHELF LIFE OF TROUT CAVIAR

Trout caviar is a delicacy with an expensive price but it is cheaper than the sturgeon caviar. The consumers prefer lightly salted caviar of 2,5-3,5 % which has a shorter shelf life than caviars with average salt concentrations ranging from 4-6 %. The scope of this thesis was to determine the shelf life of trout caviar at salt concentration of 2,5 % with different additives.

For the purpose of shelf life determination four different samples of trout caviar were prepared. Sample K1 was prepared with salt only, for sample K2 sodium benzoate was added, for sample K3 sodium benzoate and citric acid was added and for sample K4 potassium sorbate was added. The samples were analyzed microbiologically and sensorially after every two weeks during two months. The microbiological analyses were determination of *Escherichia coli* and Total Viable Count. The sensorial analyse was conducted using a hedonic scale of points -2 to +2.

The results of sensorial analyses showed that trout caviar's taste, odor and texture change the most during storage. The changes in the caviar's appearance were modest. The results of microbiological analyses showed that the amount of microbes increases during storage but at different speed depending on the additive. The fastest growth of microbes was in the sample K1, followed by samples K2, K4 and K3. The comparison of microbiological and sensorial analyses showed that at the point of sample becoming unconsumable the amount of microbes is $4 \cdot 10^7$. Thereby the shelf life was determined 16 days for sample K1, 28 days for samples K2 and K4; 37 days for sample K3.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. G. J. Flick, L. Ankenman Granata. Seafood Industry: Species, Products, Processing and Safety (2). USA: Wiley-Blackwell, 2012. 488
2. R. T. Di Giulio, D. E. Hinton. The Toxicology of Fishes. USA: CRC Press, 2008. 1096
3. M. J. Rocha, A. Kapoor. Fish Reproduction. USA: Science Publishers, 2008. 644
4. Y.H. Hui. Handbook of Food Science, Technology and Engineering (4). Florida: CRC Press, 2005. 3632
5. G.E. Bledshoe, C.D. Bledshoe, B. Rasco. Caviars and Fish Roe Products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 4. London: Taylor& Francis, 2003, 317-356
6. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, <http://ndb.nal.usda.gov>, 29.05.2014
7. Mohammad Reza Ghomi, Mehdi Nikoo, Mehdi Sohrabnezhad. Effect of alive weight on body composition and fatty acid content of farmed beluga sturgeon (*Huso Huso*). International Aquatic Research, 2013, 5, 1-8
8. L.Gram, P. Dalgaard. Fish spoilage bacteria- problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology 2002, 13, 262-266
9. Hongbo Cui, Changhu Xue. Development of shelf-stable, ready-to-eat (RTE) shrimps (*Litopenaeus vannamei*) using water activity lowering agent by response surface methodology. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50, 1137-1143
10. Toidus lubatud lisaainete loetelu ja piinormid toidugruppide kaupa, lisaainete kasutamise tingimused ja viisid ning lisaainete määrgistamise ja muul viisil teabe edastamise erinõuded ja kord. Vabariigi Valitsuse määrus RT I 2000, 23, 131
11. P. Michael Davidson. Antimicrobials in Food (3). Florida: CRC Press, 2005. 720
12. Fatih Yildiz. Advances in Food Biochemistry. Florida: CRC Press, 2009. 516
13. Maria M. Theron, J. F. Rykers Lues. Organic Acids and Food Preservation. Florida: CRC Press, 2010, 340
14. A.S.Naidu. Natural Food Antimicrobial Systems. Florida: CRC Press, 2000. 818

15. S. Matamoros, M.F. Pilet. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 2009, 26, 638-644
16. S. Burt. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94, 223-253
17. R. E. McKinney. *Environmental Pollution Control Microbiology: A Fifty- Year Perspective*. USA: CRC Press, 2004.448

TÄNUAVALDUSED

Käesoleva magistritöö valmimisel osales mitu osapoolt. Soovin tänada oma tööandjat Tuomas Virtalaist, kes võimaldas analüüside tegemist Net-Foodlab Eesti laboris. Olen tänulik ka ettevõtjatele Maria ja Peeter Vaigule, kes valmistasid ja andsid vajalikud kalamarja proovid. Suur osa tänust kuulub samuti mu juhendajale Toomas Paalmele kasuliku nõu eest ja kaastudengitele, kes osalesid degustatsioonidel.