



Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 58/2021

Kaiken takana on laadukas raaka-aine – Silakan laadun mittausmenetelmät

Anna-Liisa Välimaa, Heikki Aisala, Ella Aitta, Hanna-Leena Alakomi,
Jaakko Hiidenhovi, Kaisu Honkapää, Anu Hopia, Jaana Huotari,
Tanja Kakko, Nora Logrén, Pirjo Mattila, Sari Mäkinen, Jari Setälä,
Baoru Yang ja Guy Svanbäck

Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 58/2021

Kaiken takana on laadukas raaka-aine – Silakan laadun mittausmenetelmät

Anna-Liisa Välimaa, Heikki Aisala, Ella Aitta, Hanna-Leena Alakomi, Jaakko Hiidenhovi,
Kaisu Honkapää, Anu Hopia, Jaana Huotari, Tanja Kakko, Nora Logrén, Pirjo Mattila,
Sari Mäkinen, Jari Setälä, Baoru Yang ja Guy Svanbäck



Viittausohje:

Välimaa, A-L., Aisala, H., Aitta, E., Alakomi, H-L., Hiidenhovi, J., Honkapää, K., Hopia, A., Huotari, J., Kakko, T., Logrén, N., Mattila, P., Mäkinen, S., Setälä, J., Yang, B. & Svanbäck, G. 2021. Kaiken takana on laadukas raaka-aine – Silakan laadun mittausmenetelmät. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 58/2021. Luonnonvarakeskus. Helsinki. 91 s.

Anna-Liisa Välimaa, ORCID ID, <https://orcid.org/0000-0002-4953-6100>



ISBN 978-952-380-258-2 (Painettu)
ISBN 978-952-380-259-9 (Verkkójulkaisu)
ISSN 2342-7647 (Painettu)
ISSN 2342-7639 (Verkkójulkaisu)
URN <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-380-259-9>

Copyright: Luonnonvarakeskus (Luke)

Kirjoittajat: Anna-Liisa Välimaa, Heikki Aisala, Ella Aitta, Hanna-Leena Alakomi, Jaakko Hiidenhovi, Kaisu Honkapää, Anu Hopia, Jaana Huotari, Tanja Kakko, Nora Logrén, Pirjo Mattila, Sari Mäkinen, Jari Setälä, Baoru Yang ja Guy Svanbäck

Julkaisija ja kustantaja: Luonnonvarakeskus (Luke), Helsinki 2021

Julkaisu vuosi: 2021

Kannen kuva: Jari Setälä, Luonnonvarakeskus (Luke)

Painopaikka ja julkaisumyynti: PunaMusta Oy, <http://luke.juvenesprint.fi>

Tiivistelmä

Anna-Liisa Välimaa¹, Heikki Aisala², Ella Aitta³, Hanna-Leena Alakomi², Jaakko Hiidenhovi⁴, Kaisu Honkapää², Anu Hopia⁵, Jaana Huotari², Tanja Kakko³, Nora Logrén⁵, Pirjo Mattila⁶, Sari Mäkinen⁴, Jari Setälä⁶, Baoru Yang³ ja Guy Svanbäck⁷

¹ Luonnonvarakeskus (Luke), Paavo Havaksen tie 3, 90570 Oulu

² Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy, Tietotie 2, Otaniemi, 02150 Espoo

³ Elintarvikekemian ja elintarvikekehitys, Bioteknologian laitos, Turun yliopisto, PharmaCity, Itäinen Pitkätie 4C, 7. krs, 20520 Turku

⁴ Luonnonvarakeskus (Luke), Myllytie 1, 31600 Jokioinen

⁵ Turun yliopiston funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiskeskus, PharmaCity, Itäinen Pitkätie 4 A, 5. krs, 20520 Turku

⁶ Luonnonvarakeskus (Luke), Itäinen Pitkätie 4 A, 20520 Turku

⁷ Österbottens Fiskarförbund, Kalastuksen talo/Kalaranta, 65100 Vaasa

Kalatalouden innovaatio-ohjelma Blue Products keskittyy kotimaisen kalan arvon lisäämiseen kehittämällä alihyödynnettyjen kalojen, kuten silakan ja särkikaloiden käyttöä elintarvikkeissa ja uusissa, innovatiivisissa korkean lisäarvon erikoistuotteissa. Kuluttajien kiinnostus silakkaa ja särkikaloihin kohtaan ympäristöystävällisenä ja terveellisenä ruokana on viime aikoina kasvanut, mutta toisaalta samaan aikaan yrityskentältä ja kuluttajilta on tullut viestiä silakan laadun vaihtelusta ja liian heikosta säilyvyydestä. Sekä perinteistä ruokakäyttöä että innovatiivisempia tuotteita varten kalan laadun onkin oltava erinomainen. Jotta silakan laatua pystytään parantamaan, pitää laatu pystyä mittaamaan numeerisesti kalastusalueelta kauppaan. Tässä raportissa arvioidaan erilaisten mittausmenetelmien soveltuvuutta silakan laadun määrittämiseksi kalaketjun eri vaiheissa ja tarvetta uusille pikamenetelmille laadun mittaamiseksi.

Kuluttajalle laatu näyttäytyy aistittavana laatuna. Kalojen aistinvaraisen laadun tutkimuksessa voidaan käyttää monenlaisia menetelmiä, mutta kalaketjun käyttöön tarvitaan helposti omaksettava ja mielellään älylaitteessa toimiva yksinkertainen numeerinen mittari. Tällaiseksi voisi soveltua silakalle kehitetty laatuindeksiin perustuva älypuhelinsovellus, joka mukailee "How fresh is your fish"-sovellusta. Tämän tuomiseksi käytäntöön tarvitaan yhteistyökumppaniksi ohjelmistoyritys. Aistittavan laadun taustatekijät ovat joukko kemiallisia, biokemiallisia, fysikaalisia ja mikrobiologisia ilmiöitä, joiden mittaamiseen löytyy lukuisia menetelmiä. Lupaavilta kalan laadunvalvontaan ja tuoreuden arviointiin prosessoinnissa ja kaupassa vaikuttavat kaupalliset pikamenetelmät kuten "Freshness checker" ja "PRECICE® Freshness Assay Kit", sekä pakattujen tuotteiden kohdalla erilaiset värimuutokseen perustuvat kemiosensitiiviset sensorit, jotka viestivät kalan laadusta sekä kuljetuksen että säilytyksen aikana. Kalan sähköisten ominaisuuksien muutoksiin perustuvat Torrymeter sekä Fischtester VI ovat edelleen käyttökelpoisia, kaupallisesti saatavia, koko ketjun seurantaan soveltuvia kalan tuoreusmittareita, mutta ne ovat epäherkkiä ja alttiita erilaisille virhemittauksille. Sähkökemiallinen impedanssispektrosopia (EIS) antaa kalan koostumuksesta tarkempaa informaatiota. Tämän menetelmän mahdollisuuksia silakan laadun mittaamiseen tullaan testaamaan Blue Products -ohjelman jatkotutkimuksissa. Erilaiset kuvantamistekniikat, kuten hyperspektrikuvantaminen, tarjoavat mielenkiintoisia uusia mahdollisuuksia kalan laadun määrittämiseksi ja esimerkiksi kalansaaliin laadun perusteella. Kuvantamistekniikka on vielä nykyisellään melko kallista, mutta toisaalta kuvantamismenetelmät ovat jo vakiinnuttaneet asemansa laajasti teollisuuden eri aloilla ja elintarviketeollisuudessa laaduntarkkailussa.

Asiasanat: silakka, kalan laatu, alihyödynnetty kala

Abstract

Blue Products is an innovation program, which aims to increase the use of underutilized fish species, such as Baltic herring and roach, by developing added-value products. The consumers' interest in these fish species has increased due to health and environmental reasons, but at the same time the concern of the rapid decrease in freshness and sensory quality of Baltic herring is noticeable in low demand. Thus, excellent quality of the fish is a key element when developing new products. Numeric, easy-to-use methods are needed to measure the quality of Baltic herring all the way from fishing vessels to shops. In this report, different methods to determine the quality of fish are reviewed, focusing on the suitability and availability of quick methods for Baltic herring in different parts of the food chain.

Sensory quality is the most important quality parameter for the consumers. There are already many different methods to determine the sensory quality of fish, but there is a need for a numeric and easy-to-use mobile application for Baltic herring. An example of this could be an application which mimics the "How fresh is your fish" –mobile application but would be based on the quality index developed especially for Baltic herring. Collaboration with a software company is needed to enable the development of this kind of an application.

The sensory quality is dependent on a combination of biochemical, chemical, physical and microbial changes, many of which can be analysed and determined with specific methods. For example, there are commercial applications to measure biochemical changes in fish, namely "Freshness checker" and "PRECICE® Freshness Assay Kit". Further, chemosensitive compounds, which change colour upon biochemical changes, could be applied to primary packaging. This would enable easy, visible method to ensure freshness during shipping and resale. The changes in electrochemical properties of the fish flesh can be measured with Torrymeter and Fischtester VI, which are common and suitable tools for every part of the fish processing chain. Although being easy to use, these meters have challenges in precision and reliability. Electrical Impedance Spectroscopy (EIS), however, is a more precise method which will be studied further by the Blue Products partners, focusing on its suitability to determine the quality of Baltic herring.

Lastly, different imaging techniques have also been studied. For example, hyperspectral imaging can be used for sorting fish and some fish industries have already adopted this method in their facilities. Although being expensive, automated imaging techniques are already vastly used in food and other industries.

Key words: Baltic herring, fish quality, underutilized fish

Abstrakt

Fiskerinäringens innovationsprogram Blue Products är inriktat på att öka värdet av den inhemska fisken genom att utveckla användningen av underutnyttjad fisk, såsom strömming och mörtfiskar, i livsmedel och nya, innovativa specialprodukter med högt mervärde. Konsumenternas intresse för strömming och mörtfiskar som miljövänlig och hälsosam mat har ökat den senaste tiden, men å andra sidan har det samtidigt från företagssektorn och konsumenterna kommit antydningar om variationer i strömmingens kvalitet och för dålig hållbarhet. För såväl traditionella livsmedelsprodukter som mera innovativa produkter bör fiskens kvalitet vara utmärkt. För att kunna förbättra strömmingens kvalitet, måste det vara möjligt att numeriskt mäta kvaliteten från fiskefartyget till handeln. I denna rapport bedöms olika mätmetoders lämplighet för att bestämma strömmingens kvalitet i fiskkedjans olika skeden och behovet av nya snabbmetoder att mäta kvaliteten.

För konsumenten framstår kvaliteten som sensorisk kvalitet. Vid undersökningen av fiskars sensoriska kvalitet kan man använda ett brett spektrum av metoder, men för användning i fiskkedjan behöver man en enkel numerisk mätare som är lätt att ta i bruk och som helst fungerar på en smartenhet. Som en dylik kunde den för strömming utvecklade smartphone -appen, som baserar sig på kvalitetsindex, lämpa sig, och som är anpassad efter "How fresh is your fish" -appen. För att få denna i praktiskt bruk behövs något mjukvaruföretag som samarbetspart.

Bakgrundsfaktorerna för sensorisk kvalitet är en uppsättning kemiska, biokemiska, fysikaliska och mikrobiologiska fenomen, vilka det finns en mängd olika metoder för att mäta. Kommerciella snabbmetoder som "Freshness checker" och "PRECICE® Freshness Assay Kit" verkar lovande för kvalitetsövervakning av fisk och för bedömning av färskhet, och för förpackade produkter olika kemiska sensoriska metoder som baserar sig på färgförändringar, och som anger fiskens kvalitet såväl under transport som under lagring. Torrymeter och Fischtester VI, som baserar sig på förändringar i fiskens elektriska egenskaper, är fortfarande användbara, kommersiellt tillgängliga, lämpliga färskhetsmätare för uppföljning av fisk i hela fiskkedjan, men de är okänsliga och mottagliga för olika felmätningar. Elektrokemisk impedansspektroskopi (EIS) ger mer exakt information om fiskens sammansättning. Möjligheterna med denna metod för att mäta strömmingens kvalitet kommer att testas i de fortsatta undersökningarna i Blue Products-programmet.

Olika bildtekniker, som exempelvis hyperspektral fotografering, erbjuder intressanta nya möjligheter att bestämma fiskens kvalitet och att exempelvis sortera fisken enligt kvalitet. Bildteknik är ännu idag ganska dyr, men å andra sidan har bildframställningsmetoderna redan etablerat sig inom olika industrisektorer och inom livsmedelsindustrins kvalitetskontroll.

Ämnesord: strömming, fisk kvalitet, underutnyttjad fisk

Sisällys

1. Tausta ja tavoitteet.....	8
2. Aistinvaraiset menetelmät.....	9
2.1. Johdanto.....	9
2.2. Laatuasteikolliset menetelmät	9
2.2.1. Torry Sensory Scheme	9
2.2.2. Quality Index Method (QIM).....	10
2.2.3. Muut laatuoluokitusmenetelmät: European Union (EU) Grading Scheme, Evira 8001	11
2.3. Kuvailevat menetelmät	11
2.3.1. Pääasialliset kuvailevat menetelmät.....	12
2.3.2. Kuvailevat pikamenetelmät	12
2.4. Instrumentaali- ja aistimenetelmien rajapinta	12
2.4.1. Artificial Quality Index (AQI).....	12
2.5. Yhteenveto ja arvio aistinvaraisten menetelmien soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille.....	13
3. Kemialliset ja biokemialliset menetelmät.....	15
3.1. Johdanto.....	15
3.2. Maitohapon ja pH:n mittaus.....	16
3.3. Entsyymiaktiivisuuksien mittaus.....	17
3.4. Rasvojen ja proteiinien hapettuminen.....	17
3.5. K-arvoon perustuvat menetelmät	18
3.5.1. Kaupalliset laitteet.....	19
3.6. Trikloorietikkahappoon liukenevat peptidit	19
3.7. Kemosensitiiviset yhdisteet.....	20
3.8. Haihtuvien amiinien mittaus P3HT-sensorilla	21
3.9. Arvio soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille	21
4. Fysikaalis-kemialliset menetelmät.....	24
4.1. Sähköisten ominaisuuksien muutokseen perustuvat menetelmät.....	24
4.1.1. Fischtester.....	24
4.1.2. Torrymeter.....	25
4.1.3. Fischtesterin ja Torrymeterin vertailua.....	25
4.2. Väriin mittaus.....	26
4.3. Sähkökemiallinen impedanssispektroskopia (EIS).....	27
4.4. Konenäkö	28

4.5. Raman-spektroskopia	30
4.6. VIS/NIR-spektroskopia.....	32
4.7. Hyperspektrikuvantaminen	34
4.8. Elektroninen nenä.....	37
4.9. Elektroninen kieli.....	39
4.10. Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia - NMR.....	40
4.11. Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetri – DSC.....	41
4.12. Kaksiulotteinen elektroforeesi (2DE)	42
4.13. Terahertsispektroskopia ja -kuvannus	43
4.14. Rakenteen mittaus.....	45
4.15. Arvio soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille	49
5. Mikrobiologiset menetelmät.....	53
5.1. Johdanto.....	53
5.2. Viljelymenetelmät	54
5.2.1. Elintarvikepatogeenien määrittäminen.....	54
5.2.2. Mikrobiologisen laadun määrittäminen	55
5.2.3. Valikoivat kasvatusalustat (kromogeeniset kasvualustat)	56
5.3. Immunomääritysmenetelmät.....	57
5.3.1. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	57
5.3.2. ELFA (enzyme linked fluorescent assays).....	57
5.3.3. Lateraalivirtaustestit.....	58
5.4. Nukleiinihappoihin perustuvat menetelmät.....	59
5.4.1. Polymeerasiketjureaktio.....	59
5.4.2. Reaaliaikainen PCR.....	60
5.4.3. Isoterminen monistus	61
5.4.4. Seuraavan sukupolven sekvensointi	61
5.5. Proteiinirakenteiden tunnistukseen perustuvat menetelmät.....	62
5.5.1. MALDI-TOF MS.....	62
5.6. Kaupalliset pikatestit ympäristönäytteiden ottoon.....	64
5.7. Ennustava mikrobiologia.....	65
5.8. Arvio mikrobiologisten menetelmien soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille	65
6. Yhteenveto.....	68
Lähteet.....	74

1. Tausta ja tavoitteet

Kalatalouden innovaatio-ohjelma Blue Productsin tavoitteena on auttaa Suomen kalasektoria nostamaan vajaahyödynnetyistä kalalajeista, joihin myös silakan ajatellaan kuuluvan, ja kalateollisuuden sivuvirroista saatavaa arvoa mm. kehittämällä uusia, innovatiivisia tuotekonsepteja. Suomen suurin ja taloudellisesti merkittävin kalansaalis muodostuu silakasta ja kilohailista, mutta valtaosa saaliista käytetään turkiseläinten rehuksi tai kalajauhoksi, ja vain pieni osa käytetään suoraan (kotimaisena) elintarvikkeena. Koska silakkasaaliista iso osa päätyy rehukäyttöön, kyseisen osan laatua ei ole tarvinnut pitää elintarvikesilakan tasolla, vaan rehulaatu on riittänyt. Kun turkistarhaus on Suomessa vähenemässä, vapautuisi sen käytöstä iso resurssi elintarvikekäyttöön, mutta tällöin raaka-ainekalan laatu pitää nostaa erinomaiselle tasolle. Tähän tarvitaan luultavasti kalastuskäytäntöjen muutoksia ja laatutyötä koko tuotantoketjussa.

Ilmeisin tapa nostaa kotimaisen silakkakiintiön arvoa olisi käyttää siitä aiempaa suurempi osa perinteisiin elintarvikkeisiin, kuten kuluttajille myytäviin silakkafileisiin tai silakkapihvien raaka-aineena. Myös vaihtoehtoisia uusia tapoja hyödyntää esimerkiksi pienikokoista silakkaa elintarvikkeena on kehitetty (nyhtösilakkakonsepti). Sekä perinteisiä että innovatiivisempia käyttöjä varten silakan laadun pitää olla erinomainen.

Kala-alan yritykset ovat tuoneet markkinoille uusia kiinnostavia tuotteita, joissa raaka-aineena on käytetty vajaahyödynnetyjä kalalajeja. Mediassa on viime aikoina ollut paljon kirjoituksia ja ohjelmia, joissa on korostettu kotimaisen luonnonkalan roolia tärkeänä ympäristöystävällisenä ja herkullisena proteiinin lähteenä. Myös kuluttajien kiinnostus silakkaa, särkeä, lahnaa, yms. kohtaan vaikuttaa lisääntyvän. Aika vaikuttaakin kypsältä todelliseen kulutusmurrokseen; vajaahyödynnetyjen kalojen nousuun varteenotettavaksi raaka-aineeksi elintarvikesektorille. Samaa aikaan kuitenkin sekä yrityskentästä että kuluttajilta on tullut viestiä muun muassa silakoiden ja silakkatuotteiden liian heikosta laadusta ja säilyvyydestä. Jotta hyvää hetkeä silakoiden ja särkikaloiden menekin lisäämiseen ei menetetä, pitää varmistaa, että teollisuudelle on tarjolla hyvälaatuisia raaka-ainetta ja kuluttajien ostamat tuotteet ovat viimeisenä käyttöpäivinäkin vielä riittävän laadukkaita. Blue Products haluaa osaltaan olla edistämässä silakan käytön edistämistä olemalla tukemassa yrityskenttää koko ketjun kattavassa laadun kehitystyössä.

Jotta laatua voi parantaa, se pitää ensin muuttaa numeroiksi. Tässä raportissa benchmarkataan olemassa olevia kalan laadun määrittymenetelmiä kirjallisuudesta ja markkinoilta sekä arvioidaan niiden soveltuvuutta kotimaisen kalasektorin käyttöön. Erityisesti tavoitteena on arvioida analyysimenetelmien soveltuvuutta silakan laadun mittaamiseen joko kalaketjun toimijoiden käytössä tai tutkimuksen apuvälineinä. Tietoa hyödynnetään suunniteltaessa silakoiden laadun parantamiseen tähtäviä koesarjoja. Raportissa myös arvioidaan, onko tarpeellista kehittää uusia (pika)menetelmiä tai muokata muihin sovelluksiin jo käytössä olevia menetelmiä soveltuvaan erityisesti silakan laadun tarkkailuun arvoketjun eri vaiheissa.

Tämän raportin sisältöä esiteltiin Kalatalouden innovaatiopäivillä marraskuussa 2020. Ennen sitä muutama kalasektorin asiantuntija oli tutustunut aineistoon ja antanut asiantuntevaa palautetta raportin sisällöstä. Raportin kirjoittajat kiittävät arvokkaasta palautteesta. Raportti on tuotettu osana Euroopan meri- ja kalatalousrahaston osarahoittamaa Blue Welfare Network – Blue Products -ohjelmaa, hankenumero 33338.

2. Aistinvaraiset menetelmät

2.1. Johdanto

Aistinvarainen arviointi on tärkeä työkalu kalan tuoreuden määrittämisessä, sillä kaikista laaduntarkkailumenetelmistä se vastaa eniten tavallisen kuluttajan kokemusta tuotteen laadusta. Aistinvarainen arviointi voi myös olla nopeampaa ja joustavampaa kuin tuoreuden määrittäminen laitteilla, eikä se välttämättä vaadi kalan "rikkomista". Arvioijien "kalibrointi" on kuitenkin useimmissa menetelmissä välttämätöntä tarkkojen tuloksien saavuttamiseksi. Aistinvaraisen arvioinnin menetelmiä ovat erotustestit, laatuasteikolliset menetelmät, kuvailevat menetelmät ja miellyttävyyteen perustuvat testit. Tässä luvussa käsiteltävien menetelmien pohjarajauksena on käytetty Alasalvarin ja muiden (2011) kirjan "Handbook of seafood quality, safety and health applications" aistinvaraisten menetelmien listaa kirjan luvusta 2.2. Täydentävänä lähde on käytetty Rehbeinin ja Ohenlenschlägerin kirjan "Fishery Products - Quality, safety and authenticity" (2009) lukuja 19 ja 20.

Erotustesteissä vertaillaan poikkeavaa (esimerkiksi toisella tavalla säilytettyä) ja vertailunäytettä (esimerkiksi vakio-olosuhteissa säilytettyä) näytettä. Erotustesteillä saadaan varsin vähän tietoa näytteistä työmäärään nähden, joten erotustestejä ei käsitellä tässä luvussa. Miellyttävyydesteissä kuluttajat arvioivat näytteiden miellyttävyyttä yleensä 9-portaisella miellyttävyyssasteikolla. Menetelmä vaatii kuitenkin suuren arvioijamäärän, minkä vuoksi se ei sovellu nopeaan testaamiseen. Tämän takia miellyttävyydestejäkään ei käsitellä tässä luvussa. Laatuasteikollisiin ja kuvaileviin menetelmiin syvennytään alla.

2.2. Laatuasteikolliset menetelmät

Laatuasteikollisiksi menetelmiksi kutsutaan kaikkia menetelmiä, joissa erilaisia aistinvaraisia ominaisuuksia kuvaillaan kategorisin laatuasteikoin, esimerkiksi erinomaisesta huonoon tai tuoreesta pilaantuneeseen. Laatuasteikollisilla menetelmillä voidaan tehokkaasti erotella laadultaan poikkeavat näytteet. Asteikko ei ole tasavälinen: esimerkiksi Torry-arviointimenetelmässä arvojen 9 ja 10 väli on erisuuri kuin arvojen 6 ja 7. Laatuasteikollisissa menetelmissä myös usein lasketaan summia eri aistiominaisuuksien, kuten ulkonäön ja hajun saamien laatuasteikoiden välillä. Nämä ominaisuudet johtavat siihen, ettei laatuasteikollisilla menetelmillä voi tehdä tehokasta tilastollista tulkintaa, eikä menetelmiä voi yhdistää instrumentaalisiin mittauksiin. (Martinsdóttir ym. 2009)

Laatuasteikollisia menetelmiä, kuten laajasti käytössä olevaa laatuasteikointimenetelmää QIM:ä (engl. Quality Index Method), on kehittänyt erityisesti Tasmanian elintarviketutkimusyksikkö TFRU (engl. Tasmanian Food Research Unit) Australiassa (Sant'Ana ym. 2011).

2.2.1. Torry Sensory Scheme

Torry-arviointimenetelmä (Torry Sensory Scheme) on Iso-Britanniassa Torry-tutkimusasemalla kehitetty systemaattinen pisteytysmenetelmä kalan tuoreuden arviointiin. Menetelmässä arvioidaan kalan hajua, makua, rakennetta, suutuntumaa ja ulkonäköä, joiden perusteella kalan tuoreudelle annetaan arvo asteikolla 3–10. Asteikolla 10 vastaa juuri pyydetyn kalan tuoreutta, ja 3 on ihmisravinnoksi kelpaamaton. Arvoa 5,5 voidaan pitää rajana syömäkelpoisuudelle (Nollet & Toldra 2009). Pistemäärän perusteella on myös mahdollista arvioida, kuinka monta päivää

kalaa on säilytetty (jäissä). Torry-menetelmän tulosten havaittiin korreloivan kalan ihon sähköjohtavuuden kanssa, jonka perusteella kehitettiin sähköjohtavuuteen perustuva Torrymeter-laite (Nollet & Toldra 2009).

Koska eri kalalajit pilaantuvat eri tavalla, ja pilaantumisesta kertova piirre yhdessä kalalajissa ei välttämättä kerro siitä toisessa, Torry-menetelmän pisteytyksessä käytettävät parametrit ovat lajikohtaisia. Lajikohtaisia "karttoja" löytyy muun muassa turskalle, koljalle, kampelalle, makrillille, taimenelle, lohelle, katkaravulle, ja sillille (saatavilla osoitteesta https://www.seafish.org/media/Publications/sensory_assessment_scoresheets_14_5_10.pdf). Menetelmä olisi sovellettavissa silakalle, mutta silakalle ei ole raportoitu omaa Torry-menetelmää. Menetelmän pohjalta kehitetty Torrymeter-laite voisi kuitenkin olla suoraviivaisempi tapa tuoreuden mittaamiseen.

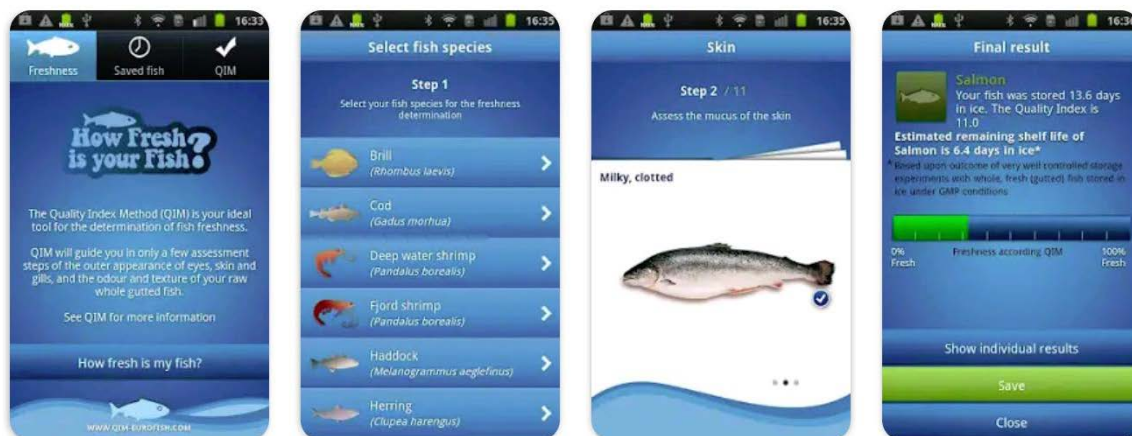
2.2.2. Quality Index Method (QIM)

Laatuindeksimenetelmä QIM on alun perin TRFU:n kehittämä laatuasteikollinen menetelmä. QIM:ssä oletetaan, että jokainen laatu parametri on riippumaton muista parametreista. Menetelmässä kalan ominaisuuksille (iho, lima, silmät, vatsa, haju, kidukset) annetaan pisteitä välillä 0–3, ja lopuksi kaikkien parametrien pisteet lasketaan yhteen laatuindeksiksi (Quality Index, QI) (Nollet & Toldra 2009). Laatuindeksi "0" tarkoittaa että kala on hyvin tuore ja korkeampi pistemäärä kertoo etenevästä laadun heikkenemisestä (Martinsdóttir ym. 2001). QI nousee lineaarisesti kalan vanhetessa (QIM Eurofish). QIM, kuten Torry-menetelmäkin, on lajikohtainen. Lajikohtaiset pisteytysparametrit on julkaistu useimmille kaupallisesti merkittävälle kalalajeille, kuten sillille, turskalle, makrillille, piikkimakrillille, sardiinille, punasimpulle, silokampelalle, hieta-kampelalle, piikkikampelalle, punakampelalle, koljalle, seitille, merianturalle, kultaotsa-ahvenelle, lohelle ja katkaravulle (Martinsdóttir ym. 2001).

QIM on yksi yleisimmin käytetyistä menetelmistä kalan tuoreuden aistinvaraisessa arvioinnissa. Myös QIM:n avulla voidaan arvioida kuinka pitkään kalaa on säilytetty jäissä, ja kuinka pitkään sitä voidaan vielä säilyttää (Nielsen & Hyldig 2004). Sitä voidaan käyttää esimerkiksi, kun halutaan selvittää, miten eri käsittelytavat, prosessointi tai varastointi vaikuttavat kalan laatuun tai säilyvyyteen. QIM:n etuina ovat myös sen nopeus (kokeneet arvioijat voivat arvioida 40 kalaa 20 minuutissa) ja tarkkuus säilytyksen alkuvaiheessa, jolloin useimmat instrumentaaliset menetelmät eivät pysty arvioimaan laatua tarkasti (Nollet & Toldra 2009 2010). QIM-menetelmän toimivuus on kuitenkin riippuvainen mm. siihen valituista aistinvaraisista parametreista, näytekoosta (arvioitavien kalojen lukumäärä) ja arvioijien kokeneisuudesta, joten eri tahojen samalle kalalajille kehittämissä QIM-menetelmissä saattaa esiintyä variaatiota (Bernardo ym. 2020).

Suomessa on kehitetty QIM kasvatetun siian arviointiin (Järvelä 2011). Silakalle ei löydy ainaakaan julkisesti raportoitua QIM-menetelmää, joten sen käyttöönotto silakan tuoreuden arvioimiseksi vaatisi menetelmän kehittämisen. QIM:n kehittäminen uudelle kalalajille, koostuu alku-testauksesta, luonnoksen testauksesta ja menetelmän validoinnista. Menetelmää kehitettäessä kaloja on arvioitava useana ajankohtana pyynnistä pilaantumiseen asti, ja tuoreuden arvioimisen apuna tulee käyttää esimerkiksi mikrobiologisia mittauksia. Menetelmää voidaan myös soveltaa vain niissä säilytysolosuhteissa joille menetelmä on kehitetty (Järvelä 2011; Nollet & Toldra 2010).

QIM:n käytön edistämiseksi lanseerattu QIM Eurofish (www.qim-eurofish.com) on julkaissut menetelmään perustuvan älypuhelinsovelluksen "How fresh is your fish?" (Nofima Marin AS, Kuva 1). Sovellus on saatavilla 11 kielellä (ei suomeksi) ja 13 eri kalalajille.



Kuva 1. QIM-menetelmään perustuva "How fresh is your fish?" (Nofima Marin AS) älypuhelinsovellus. Kuva julkaistu kehittäjän luvalla.

2.2.3. Muut laatuluokitusmenetelmät: European Union (EU) Grading Scheme, Evira 8001

Euroopan unionin neuvosto on antanut vuonna 1996 oman asetuksensa kalojen laatukriteereistä (Council Regulation (EC) No 2406/96: Laying down Common Marketing Standards for Certain Fishery Products, 1996). Asetus keskittyy ensimmäistä kertaa myytävänä oleviin kalatuotteisiin. Asetuksen menetelmä on laatuasteikko, jossa on luokat erinomainen, A, B, ja kelpaamaton. Asetuksessa on määritetty eri laatuluokitusten kuvailut kalaryhmittäin, eli esimerkiksi sini- ja valkokaloille erikseen. Menetelmää on kritisoitu esimerkiksi siitä, ettei se ota kantaa kalalajien välisiin eroihin, eikä arviointiin ole tarjolla koulutusta tai käytännön opastusta (Martinsdóttir ym. 2009). Esimerkiksi sardiinien suhteen on raportoitu, että neuvoston asetuksen menetelmällä saatiin eroteltua huomommin näytteiden säilytyslaatua kuin QIM-menetelmällä (Triqui & Bouchriti 2003).

Elintarviketurvallisuusvirasto Eviralla, nykyisin Ruokavirastolla, oli oma laatuluokitukseen perustuva menetelmänsä (Evira 8001: Kalan aistinvarainen arviointi). Menetelmässä käytetään laatuasteikkoa 5–0, jossa ääripäät ovat 5 = erittäin hyvä ja 0 = ei kelpaa ihmisravinnoksi (Järvelä 2011). Menetelmää on käytetty muun muassa siian laadunseurantaan (Järvelä 2011). Menetelmä on kuitenkin ollut vain Ruokaviraston sisäiseen käyttöön, ja aistinvaraisia menetelmiä ollaan ajamassa alas Ruokavirastossa näytteiden puutteen vuoksi (Tiina Ritvanen, henkilökohtainen viesti 27.4.2020).

Muilla laatuasteikollisilla menetelmillä ei voi nähdä käyttöpotentiaalia Suomessa, vaan laatuindeksimenetelmä on näitä kehittyneempi ja elinvoimaisempi.

2.3. Kuvailevat menetelmät

Kuvailevissa menetelmissä näytteille, esimerkiksi eri tavalla kasvatettujen kirjolohien näytteille luodaan yhteinen, niiden hajua, ulkonäköä, makua ja rakennetta kuvaava sanasto. Sanastossa on yleensä 10–15 termiä, joilla näytteet voidaan erotella termien voimakkuuserojen perusteella. Arvioijina on tyypillisesti 6–15 hengen aisteiltaan testattu ja pitkälle koulutettu raati (Martinsdóttir ym. 2009). Sanasto tarkennetaan yleensä kullekin näytetyypille erikseen ja valikoidaan

niin, että se selittää parhaiten näytteiden välisiä eroja. Kerralla voidaan arvioida 3–6 erilaista näytettä.

Tällaisia menetelmiä pidetään yleisesti tarkimpina ja objektiivisinta aineistoa tuottavina aistinvaraisina menetelminä. Niillä tuotettua aineistoa voidaan myös tarkastella tehokkain tilastollisin menetelmin kuten varianssianalyysilla. Havaitut aistinvaraisten ominaisuuksien voimakkuudet voidaan samoin liittää erilaisiin instrumentaalsiin ja kemiallisiin mittaustuloksiin. Kääntöpuolella näiden menetelmien vaatima arvioijien valikointi, koulutusjaksot ja toistoarvioinnit johtavat siihen, etteivät menetelmät toimi niin hyvin rutiininomaisissa tai kalastusvaiheen laadunseurannoissa. Menetelmä soveltuu kuitenkin Suomessa erityisesti tarkempaan tutkimukseen, sillä Suomessa on paljon kokemusta kuvailevien menetelmien käytöstä ja useita tarjolla olevia raateja.

2.3.1. Pääasialliset kuvailevat menetelmät

Vuosien saatossa on kehitetty lukuisia kuvailevia menetelmiä, joita kaikkia on käytetty myös kalanäytteiden arviointiin. Nykyisin käytössä on erityisesti yleinen kuvaileva menetelmä (engl. generic descriptive analysis, GDA) sekä käyttöoikeuksiltaan rajoitetumpi kvantitatiivinen kuvaileva menetelmä (engl. quantitative descriptive analysis, QDA), joka on rekisteröity tavaramerkki. Käytännön ominaisuuksiltaan nämä menetelmät ovat kuitenkin hyvin lähellä toisiaan. Näillä menetelmillä on kuvailtu ja eroteltu esimerkiksi siikanäytteitä (Suomela ym. 2016), turskanäytteitä (Sveinsdóttir ym. 2009), hammasahvennäytteitä (Rincón ym. 2016) ja kerralla useita Suomelle merkittäviä kalalajeja, kuten silakka, ahven, kuha ja lahna (Luoma & Latva-Kala 1998).

2.3.2. Kuvailevat pikamenetelmät

Kuvailevien menetelmien vaatiman pitkän koulutuksen ja sanaston kehittämisen vuoksi on kehitetty myös pikamenetelmiä, jotka perustuvat esimerkiksi näytteiden ryhmittelyyn tai vertailevaan luokitteluun. Menetelmissä ei tarvita erillistä sanastonkehitystä, ja lyhytkin raadin koulutus riittää. Suosituimpia pikamenetelmiä ovat tällä hetkellä CATA-menetelmä (engl. Choose All That Apply), sekä Projective Mapping -menetelmä. CATA-menetelmässä annetaan lista mahdollisista näytettä kuvailevista ominaisuuksista, joista kuluttaja valitsee mielestään näytettä kuvaavat. Kun vastaukset yhdistetään tilastollisesti, nähdään kyseisen kuluttajaotoksen mielestä tärkeimmät ominaisuudet kullekin näytteelle. Menetelmien lisäetuna on, että kerralla voidaan arvioida suurempi määrä näytteitä, yleensä 8–15 erilaista näytettä. Esimerkiksi CATA:lla on tehty yleiskatsaus 23 espanjalaisesta kalalajista neljässä arviointisessiossa (Lazo ym. 2016). Toisaalta arvioijien välisen suuremman hajonnan vuoksi raadin koon on oltava suurempi, eivätkä tulokset ole samalla tavalla kvantitatiivisia kuin perinteisissä menetelmissä. Pikamenetelmät sopivat kuitenkin hyvin yleiskatsauksen saamiseen näytteistä sekä näytteiden seulontavaiheessa.

2.4. Instrumentaali- ja aistimenetelmien rajapinta

2.4.1. Artificial Quality Index (AQI)

Artificial Quality Index method perustuu QIM-menetelmään, mutta aistinvarainen arviointi on korvattu instrumentaalisilla menetelmillä. Usein käytettyjä instrumentaalimenetelmiä AQI:n määrittämiseen ovat tekstuurianalysointilaitteet, elektroninen nenä ja kolorimetri (Macagnano ym. 2005).

AQI on alun perin kehitetty turskakaloille ja sen jälkeen myös sardiineille. Menetelmää ei ole raportoitu monille muille kalalajeille, ja menetelmä ei vaikuta olevan kovin yleisesti käytössä. AQI:n käyttökelpoisuus Suomessa, verrattuna QIM:in lienee kyseenalainen, sillä se vaatii kolmen eri instrumentin saatavuutta. AQI:n on kuitenkin havaittu korreloivan hyvin QIM:n kanssa, joten se soveltuu tilanteisiin, joissa koulutettuja arvioijia aistinvaraiseen arviointiin ei ole saatavilla.

2.5. Yhteenveto ja arvio aistinvaraisten menetelmien soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille

Kalojen aistinvaraisen laadun tutkimuksessa on käytössä monenlaisia menetelmiä (Taulukko 1). Suomessakin kalojen kuvailevia profiloineja on tehty viime vuosituhalta saakka. Tois-
taiseksi silakalle on saatavilla hyvin rajallisesti aistinvaraista tutkimusaineistoa. Tähän suositukseseen olemme valinneet menetelmät, joissa on riittävä teoreettinen pohja ja riittävä tieteellinen dokumentaatio niiden toimivuudesta sekä hyvä sovellettavuus tämän innovaatio-ohjelman tarpeisiin.

Aistinvaraisten arviointimenetelmien suhteen on tunnistettu kaksi erilaista käyttötarkoitusta: 1) silakan laadun seuranta kalaketjun eri vaiheissa troolista kuluttajalle, ja 2) yksityiskohtaisempi menetelmä tutkimuksen sekä kalan menekien edistämisen käyttöön. Kalaketjun käyttöön tarvitaan helposti omaksuttava ja mielellään älylaitteessa toimiva yksinkertainen numeerinen mittari. Tällaiseksi voisi soveltua silakalle kehitetty QIM-menetelmään perustuva älypuhelinsovellus, joka mukailee "How fresh is your fish"-sovellusta. Tähän tarvitaan yhteistyökumppaniksi ohjelmistoyritys.

Tutkimuskäyttöön soveltuu yleinen kuvaileva menetelmä GDA, jolla olisi tarpeen tehdä profilointi yleisimmille suomalaisille kalalajeille. Työn pohjana voidaan käyttää aiempaa tutkimusmateriaalia suomalaisista kalalajeista.

Näiden kahden menetelmän lisäksi tarvitaan menetelmiä, joissa voidaan lisätä yleisön kiinnostusta kotimaisiin kalalajeihin. CATA-menetelmällä tuotettu aineisto sopii nähdäksemme tähän tarkoitukseen.

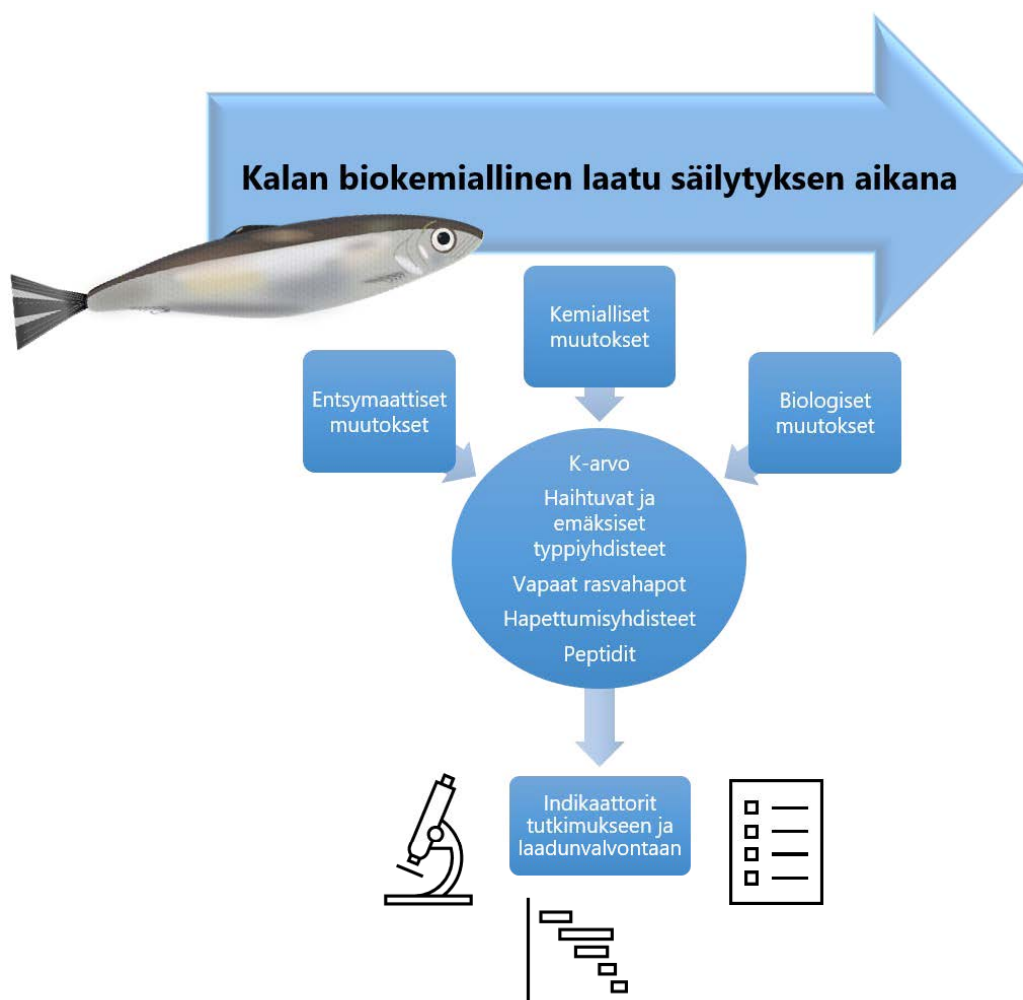
Taulukko 1. Aistinvaraiset määrittämenetelmät.

Menetelmä	Soveltuvuus	Hyödyt	Haasteet	Muuta
Laatuindeksi (Quality Index Method, QIM) – Systemaattinen pisteytysmenetelmä kalan tuoreuden arvioimiseksi	Laadunvalvontamenetelmä tuoreelle kalalle kalaketjun eri vaiheissa trolaista kuluttajalle	<ul style="list-style-type: none"> •Selkeä, pisteytys kalan ominaisuuksille (iho, lima, silmät, vatsa, haju, kidukset) •Indeksistä voidaan arvioida jäljellä olevaa säilytysaikaa •Nopea ja tarkka •Instrumentaalisia menetelmiä herkempi säilytyksen alkuvaiheessa 	<ul style="list-style-type: none"> •Lajikohtainen •Vaatii kehitystä joka kalalajille •Vaatii arvioijan koulutuksen •Ei vielä tehty silakalle 	<p>Mitä vanhempi kala, sitä suurempi indeksiluku</p> <p>Menetelmään perustuen on kehitetty How Fresh is Your Fish -älypuhelinsovellus, joka on saatavilla 11 kielellä (ei suomeksi) ja 13 eri kalalajille https://www.qim-eurofish.com/</p>
Yleinen kuvaileva menetelmä kalan aistinvaraisen laadun arvioimiseksi (Generic descriptive analysis, GDA)	Tutkimus, eri kalalajien aistinvaraisen profiilin objektiivinen kuvaus (ei mieltymyskuvaus)	<ul style="list-style-type: none"> •Erittelee näytteen aistittavat ominaisuudet •Mahdollistaa erilaisten näytteiden (esim. kalalajien) tarkan kuvailun ja erottamisen toisistaan •Tulokset yhdistettävissä esim. kemiallisiin mittauksiin 	<ul style="list-style-type: none"> •Työläs •Vaatii koulutetun raadin, koulutuksen ja sanaston kehittämisen •Näytemäärä rajallinen 	Menetelmällä kuvailtu ja eroteltu esimerkiksi siikanäytteitä, turskanäytteitä, hammasahvennäytteitä ja useita Suomelle merkittäviä kalalajeja, kuten silakka, ahven, kuha ja lahna
Pikamenetelmä kalan kokonaisvaltaisen kuluttajalaadun arvioimiseksi (Choose All That Apply –CATA)	Tutkimus, kuluttajalaadun arviointi	<ul style="list-style-type: none"> •Tunnistaa, mitkä ominaisuudet kuluttaja kokee tärkeiksi •Mahdollistaa suurehkon näytemäärän •Ei vaadi raatilaisten kouluttamista 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii suurehkon raadin •Laadullinen analyysi, ei mitta-asteikkoa ominaisuuksien voimakkuuden mittaamiselle 	Sopii yleiskatsauksen saamiseen näytteistä sekä näytteiden seurantavaiheessa
Torry - systemaattinen pisteytysmenetelmä kalan tuoreuden arvioimiseksi	Laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Selkeä pisteytys 3–10, jossa pisteet kalan hajulle, rakenteelle, maulle, suutuntumalle ja ulkonäölle 	<ul style="list-style-type: none"> •Lajikohtainen, vaatii kehitystä joka kalalajille •Ei tehty silakalle 	Torrymeter-laite kehitetty tämän pohjalta, minkä seurauksena aistinvarainen menetelmä jäänyt käytöstä
European Union (EU) Grading Scheme	Laadunvalvonta/viranomaisvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Selkeä laatuasteikko kalaryhmittäin, jossa on luokat erinomainen, A, B ja ihmisravinnoksi kelpaamaton. Perustuu EU:n asetukseen 	<ul style="list-style-type: none"> •Ei ota kantaa kalalajien välisiin eroihin •Arviointiin ei ole tarjolla koulutusta tai käytännön opastusta •Huono erottelukyky verrattuna esim. laatuindeksiin menetelmään 	
Kalan laatu luokitusmenetelmä / Ruokavirasto	Viranomaisvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Laatuasteikko 5–0, jossa ääripäät ovat 5 = erittäin hyvä, ja 0 = ei kelpaa ihmisravinnoksi 	<ul style="list-style-type: none"> •Vain Ruokaviraston sisäisessä käytössä 	Ruokavirasto ajaa menetelmää alas (näytteiden puutteessa)
Näytteiden ryhmittely ja keskinäinen vertailu (Projective mapping)	Tutkimus, kuluttajalaadun arviointi	<ul style="list-style-type: none"> •Tunnistaa, mitkä ominaisuudet kuluttaja kokee tärkeiksi •Mahdollistaa suurehkon näytemäärän •Ei vaadi raatilaisten pitkäaikaista kouluttamista •Pystyy havainnollistamaan näytteiden samankaltaisuuksia tai eroja 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii suurehkon raadin •Laadullinen analyysi, ei mitta-asteikkoa ominaisuuksien voimakkuuden mittaamiselle •Työläämpi kuin CATA sekä arvioijalle että tutkijalle •Vaatii enemmän koulutusta kuin CATA 	Sopii yleiskatsauksen saamiseen näytteistä sekä näytteiden seurantavaiheessa

3. Kemialliset ja biokemialliset menetelmät

3.1. Johdanto

Muutokset eläinten biokemiallisessa koostumuksessa kuoleman jälkeen aiheuttavat muutoksia rakenteessa ja aistittavissa ominaisuuksissa, ja näitä muutoksia mittaamalla voidaan arvioida kalan tuoreutta (Kuva 2). Suurimmat muutokset liittyvät adenosiinirifosfaatin (ATP) ja sen hajoamistuotteiden, biogeenisten amiinien, myoglobiinin ja sen hapettumistuotteiden määriin, sekä rasvahappojen hapettumiseen. Kalan rakenteeseen vaikuttavat merkittävästi myös proteiinien hajoaminen entsyymaattisen toiminnan seurauksena ja sitä seuraavat muutokset kudosten vedensitomiskyvyssä.



Kuva 2. Biokemialliset muutokset kalan laadussa säilytyksen aikana. Muutokset voidaan jakaa biologisiin, entsyymaattisiin ja kemiallisiin muutoksiin. Näihin luetaan muutokset adenosiinirifosfaatin (ATP) ja sen hajoamistuotteiden (näistä lasketaan K-arvo), haihtuvan kokonaistypen (TVB-N), trimetyyliaminin (TMA), vapaiden rasvahappojen (FFA), emäksisten typpiyhdisteiden (TBA), amiinien ja mikrobien määrissä.

Yksi ensimmäisistä muutoksista eläimen kuoleman jälkeen on muutokset ATP:n määrissä. ATP on runsasenerginen yhdiste, joka osallistuu lihassolujen supistumisliikkeeseen. Kuoleman jälkeen lihasten hermosolut eivät enää lähetä supistumiskäskyjä, mutta ATP:ta käytetään soluissa vielä moniin energiaa vaativiin tehtäviin. ATP:n määrää pidetään aluksi yllä glykolyysin avulla eli hajottamalla glukoosia. Glykolyysin ylläpitoon riittävä aika riippuu lihaskudoksen varastohiilihydraatin glykogeenin määrästä: jos eläin on stressaantunut kuolemaa edeltävänä aikana sen lihasten glykogeenivarastot ovat ehtyneet ja glykolyysi pysähtyy aiemmin. Jos taas lihasten glykogeenivarastot ovat normaalit, ATP:n muodostuminen glykolyysin kautta kestää pidempään. Kun glykolyysissa muodostuva maitohappo laskee lihaksen pH:n 5–5,5:een, glykolyyttisten entsyymien aktiivisuus lakkaa ja ATP:ta ei enää muodostu. Tällöin muodostuu lihassoluissa niin kutsuttu rigor-kompleksi. ATP:n puuttuessa proteiinit eivät palaudu supistuksesta vaan jäävät kangistuneeseen tilaan, jota kutsutaan kuolonkankeudeksi (*rigor mortis*). (Coulter 2015)

Kuolemanjälkeiset värinmuutokset lihassa ja kalassa selittyvät osittain myoglobiinin hapettumisella metmyoglobiiniksi ja oksimyoglobiiniksi. Myoglobiini antaa lihalle ja kalalle kirkkaanpunaisen värin, mutta sen pitoisuudet vaihtelevat kalalajin mukaan. Esimerkiksi silakassa on turskaa enemmän niin kutsuttua tummaa lihaskudosta, joka sisältää suuremman myoglobiinititoisuuden lisäksi myös enemmän rasvaa vaaleaan lihaskudokseen verrattuna. Tumma lihaskudos on tärkeä fysiologinen piirre avomerien kaloissa, koska sen sisältämät rasvasolut ja myoglobiini mahdollistavat pitkäaikaisen liikkeellä pysymisen. Kun kudoksen happipitoisuus laskee kuoleman jälkeen, myoglobiini hapettuu metmyoglobiiniksi. Metmyoglobiinin väri on ruskeanpunainen, ja sen muodostuminen kielii pilaantumista. Rautaionin hapettumisen muodostuu myös vapaa radikaali, joka voi aloittaa lipideissä hapettumisketjureaktioita, jotka puolestaan huonontavat kalan laatua nopeasti. (Coulter 2015)

Rasvojen hapettuminen on yksi merkittävimmistä pilaantumisreaktioista kalassa ja suuri tyydyttymättömien rasvahappojen määrä edesauttaa hapettumisreaktioiden syntyä. Silakka on rasvainen kala, jossa on etenkin runsaasti tyydyttymättömiä omega-3-rasvahappoja. Rasvojen hapettumisessa muodostuvia ensisijaisia tuotteita ovat hydroperoksidit, joiden määrää voidaan mitata peroksidilukumäärityksellä. Hydroperoksidit eivät vaikuta aistittaviin ominaisuuksiin, mutta ne hajoavat toissijaisiksi hapettumistuotteiksi, jotka puolestaan aiheuttavat erilaisia epämiellyttäviä hajuja sekä kellertävää väriä kalan kudoksessa. Useat muodostuvat aldehydit ovat niin kutsuttuja tiobarbituurihappo-reaktiivisia aineita (thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS), joita voidaan mitata tiobarbituurihapon avulla hapettumisasteen määrittämiseksi (Huss 1995). Sillin rasvojen hapettumistuotteissa nähdään merkittäviä nousuja jo 2–3 päivän jäässä säilytyksen jälkeen ja pilaantuminen voidaan havaita haistamalla jo 2,5 päivän jälkeen. Pilaantuneen hajun kanssa korreloivat tutkimuksen mukaan parhaiten ($r = 0,97$) peroksidiluvun mittaustulokset, jota käytetään standardimenetelmänä rasvojen hapettumisen analysoinnissa (Undeland ym. 1999).

3.2. Maitohapon ja pH:n mittaus

Kuten edellisessä kappaleessa kerrottiin, glykolyysissä muodostuu maitohappoa, joka laskee lihaksen pH-arvoa. Esimerkiksi elävän turskan normaali pH on 6,8, mutta se putoaa kuoleman jälkeen 6,1–6,5:een. pH ja maitohappokonsentraatiot voivat kalalajin lisäksi vaihdella myös kuolemaa edeltävien olosuhteiden vuoksi. Stressaantuneella tai sairaalla eläimellä on alkujaan vähemmän glykogeeniä eli varastohiilihydraattia kudoksissaan, mikä johtaa kuoleman jälkeen suurempaan pH:n alenemaan verrattuna ei-stressaantuneeseen yksilöön. pH:n lasku muuttaa eläimen fysiologista rakennetta: proteiinien ionivaraukset muuttuvat johtaen osittaiseen dena-

turoimiseen, jolloin niiden vedensidontakyky laskee (Huss 1995). Usean päivän säilytyksen jälkeen kudoksen pH alkaa taas nousta, kun hajottajamikrobien toiminnasta muodostuu emäksisiä aineenvaihduntatuotteita. Kudoksen pH on helppo määrittää pH-elektrodilla veden kanssa (5:1) homogenoidusta kudoksenäytteestä (Kyrana & Lougovois 2002).

Kudoksen laktaatti eli maitohappopitoisuus voidaan määrittää esimerkiksi Boehringer-Mannheimin Lactate UV-testillä. Kudoksenäyte säilötään nestemäiseen tyypeen, ja ennen testiä homogenisoidaan huumareen avulla nestemäisessä työssä. Lihasnäytettä punnitaan pieni määrä (40–80 mg), ja sekoitetaan 1 mL:aan 0,6 N perkloorihappoa ja sentrifugoidaan. Määritys suoritetaan supernatantista Boehringer-Mannheimin testipakkauksen mukaan UV-spektrofotometrillä. (Ruoppa 1982)

3.3. Entsyymiaktiivisuuksien mittaaminen

Kudosten entsyymiaktiivisuudet kokevat suuria muutoksia kuolemanjälkeisenä aikana ja näitä muutoksia seuraamalla voidaan myös arvioida kalan tuoreutta. Entsyymit voivat olla joko kudoksessa itsessään löytyviä tai mikrobien tuottamia. Esimerkiksi 5'-nukleotidaasi on bakteerien tuottama entsyymi, jonka lisääntyminen kertoo bakteerien määrän kasvusta (Yoshioka ym. 2019). Tuoreuden mittaamiseen voidaan käyttää ainakin seuraavien kudoksessa itsessään esiintyvien entsyymien aktiivisuuksia: laktaattidehydrogenaasi (LDH), koliiniesteraasi, aspartaattiaminotransferaasi (ASAT), alaniiniaminotransferaasi (ALAT/GPT), delta-aminolevuliinihappodehydrataasi (ALA-D), beta-glukuronidaasi (BG) ja UDP-glukuronosyylitransferaasi (UDPGA) (Ruoppa, 1982). Laktaattidehydrogenaasin aktiivisuuden on osoitettu vähenevän kylmäsäilytyksen aikana useissa kalalajeissa (Nambudiri & Gopakumar 1992) ja sen mittaamiseen löytyy nykyään kaupallisia kittejä (esim. Fish Lactate Dehydrogenase (LDH) ELISA Kit, MyBioSource, Inc., CA, USA). Kudoksenäyte homogenoidaan fosfaattipitoisen puskuriliuoksen kanssa ja sentrifugoidaan. Supernatanttia pipetoidaan pieni määrä näytekäivoon. Toiseen kaivoon pipetoidaan kitin mukana tulevaa standardiseosta ja kolmanteen näytteen homogenointiin käytettyä puskuria nollanäytteeksi. Kaivoihin lisätään HRP-konjugaattia ja inkuboidaan tunti 37 °C:ssa. Kaivot pestään kitin mukana tulevalla pesuliuksella, jonka jälkeen kaivoihin lisätään kahta kromogeenistä liuosta ja inkuboidaan 15 minuuttia 37 °C:ssa. Reaktiot pysäytetään pysäytysliuksella ja näytteiden väriä pitäisi vaihtua sinisestä keltaiseksi. Kaivot kuvataan kuoppalevykijalle 450 nm aallonpituudella 15 minuuttia pysäytysliuoksen lisäämisen jälkeen.

3.4. Rasvojen ja proteiinien hapettuminen

Yleisimpiä rasvojen hapettumisen mittaamiseen käytettäviä menetelmiä ovat hydroperoksidiluvun (PV), tiobarbituuriaktiivisten yhdisteiden (TBARS) ja *para*-anisidiiniluvun (AV) määrittämiset. Peroksidilukumääritys mittaa primääristen hapettumistuotteiden määrän ja korkea mitaustulos kertoo korkeasta hapettumisasteesta. Hydroperoksidit hajoavat kuitenkin ajan mittaan sekundäärisiksi hajoamistuotteiksi, joten säilytyksen edetessä PV-arvo alkaakin laskea. PV-arvon mittaamiseen on kaksi yleistä menetelmää: jodipitoisella reagenssilla titraaminen (AOCS Official Method Cd 8b-90) sekä spektrofotometrinen menetelmä, jossa käytetään rauta(III)tiosyanaattia (Wagner ym. 1947). Monet sekundääriset hapettumistuotteet reagoivat tiobarbituurihapon kanssa muodostaen punertavan värin, joka mitataan spektrofotometrillä. Näiden menetelmien rinnalla voidaan käyttää vielä anisidiinilukumääritystä (AOCS Official Method Cd 18-90), joka perustuu peroksidien hajoamistuotteiden määrittämiseen. Määrityksessä aldehydit ja

ketonit reagoivat anisidiinireagenssin kanssa ja värimuutos mitataan spektrofotometrillä. Teollisuudessa hapettumista kuvataan yleisesti TOTOX-arvolla, joka lasketaan peroksidi- ja anisidiinilukujen avulla. Näin otetaan huomioon sekä primäärinen että sekundäärinen hapettuminen.

Proteiinien hapettuminen on monimutkainen ilmiö, jota on tutkittu vähemmän kuin rasvojen hapettumista. Ajatellaan, että proteiinien hapettuminen tapahtuu rinnakkain rasvojen hapettumisen kanssa. Voi myös olla, että primääriset lipidien hapettumistuotteet lisäävät proteiinien hapettumista, etenkin kylmäsäilytyksen aikana. Proteiinien hapettuminen huonontaa kalan laatua muuttamalla lihasten rakennetta ja vähentämällä niiden vedensidontakykyä ja siten mehukkuutta. Proteiinien hapettumista voidaan mitata esimerkiksi karbonyyliryhmien avulla, joita muodostuu happiradikaalien toiminnan seurauksena. Eräässä menetelmässä proteiiniliuokseen lisätään 2,4-dinitrofenyylihydratsiinia (DNPH) ja lyhyen inkuboinnin jälkeen natriumhydroksidia. Absorbanssi luetaan spektrofotometrillä ja tulokset voidaan laskea, kun tiedetään DNPH:n absorptiivisuus karbonyyliryhmille (Mesquita ym. 2014).

3.5. K-arvoon perustuvat menetelmät

Kuolonkankeus laukeaa, kun elimistön soluihin varastoituneet entsyymit alkavat hajottaa proteiineja. Kaloilla *rigor mortis* on ohi muutamassa tunnissa kalalajista riippuen. Kuolonkankeus heikentää kalan leikattavuutta huomattavasti ja kala pyritään käsittelemään joko ennen kuolonkankeuden alkamista, tai sen loputtua. Entsyymit alkavat pilkkoa myös ATP:ia sen hajoamistuotteiksi (adenosiinidifosfaatti (ADP), adenosiinimonofosfaatti (AMP), inosiinimonofosfaatti (IMP), inosiini (Ino) ja hypoksantiini (Hx)), joilla on puolestaan merkittävä rooli kalan laadun huonontumisessa. Esimerkiksi hypoksantiinilla on todettu suora yhteys pilaantuneen kalan karvaan maun kanssa (Hughes & Jones 1966). ATP:n hajoaminen tapahtuu saman kaavan mukaisesti kaikissa kalalajeissa, joskin hajoamisen nopeus vaihtelee lajeittain. Tästä syystä kalan tuoreuden mittarina voidaan käyttää niin kutsuttua K-arvoa, joka lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti:

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

K-arvo on todettu myös tutkimuksessa hyväksi tavaksi arvioida silakan laatua, sillä tuoreen kalan K-arvo eroaa 95 % varmuudella kolme päivää tai sitä pidempään säilytetystä kalasta. Arvot ovat myös hyvin verrattavissa aistinvaraisen arvioinnin tuloksiin (Ritvanen 2001).

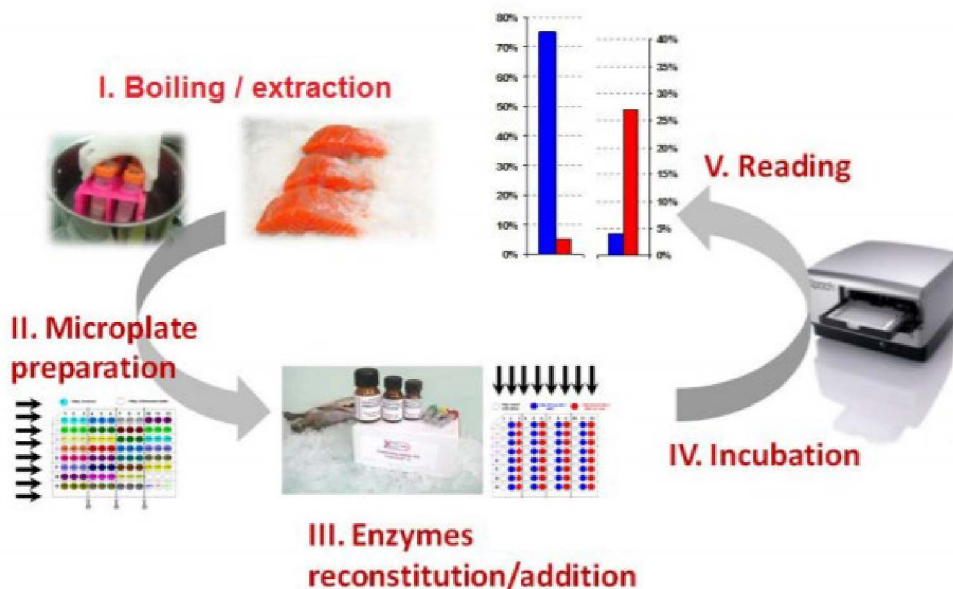
Kalastustavan vaikutusta silakan laadulle on tutkittu mittaamalla ATP:n hajoamistuotteita. Hatula ym. (1995) selvittivät troolauksella, avoverkolla ja avorysällä pyydystettyjen silakoiden laatueroja. Avoverkolla pyydystettyjen silakoiden *rigor mortis* alkoi aiemmin ja IMP-arvot olivat alhaisemmat kuin troolauksella tai rysällä kalastettujen silakoiden, mikä viittaa huonompaan laatuun.

Yksi tunnetuimmista K-arvon määrittämiseen käytetyistä menetelmistä on korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan (HPLC) perustuva erotusmenetelmä, jossa ATP ja sen johdannaiset uutetaan perkloori- tai trikloorietikkahapolla ja neutralisoidaan ennen ajoa (Ryder 1985). Menetelmä on kuitenkin verrattain hidas ja vaatii kromatografialaitteiston, ja sen tuntevan henkilön.

3.5.1. Kaupalliset laitteet

Tao ja Sato (2013) ovat kehittäneet K-arvon mittaamiseen nopeamman elektroforeesipaperiin ja UV:n mittaamiseen perustuvan menetelmän, joka on myös kaupallisesti saatavilla tuotenimellä "Freshness Checker", QS-Solution, Japani. ATP ja sen hajoamistuotteet uutetaan suolahapolla ja homogenisoidaan, jonka jälkeen näyte sentrifugoidaan. Supernatanttia pipetoidaan pieni määrä elektroforeesipaperille, jonka jälkeen yhdisteet erotellaan sähkövirran avulla. Erotuksen jälkeen paperi kuivatetaan ja valaistaan ultraviolettisäteiden avulla, jolloin yhdisteiden muodostamat täplät näkyvät sinisinä. Paperi kuvataan digitaalisella kameralla ja kuvan tulokset ja analysoidaan tietokonesovelluksen avulla. K-arvo määritetään täplien tuottamien intensiteettien avulla.

K-arvon mittaamiseen on kehitetty myös toinen kaupallinen kitti (PRECICE® Freshness Assay Kit, NovoCIP, Lyon, Ranska), jossa muodostetaan entsyymireaktiolla IMP:sta, inosiinista ja hypoksantiinista nikotiinidiamiinidinukleotidia (NADH₂), jonka muodostumista seurataan absorbanssimittauksen avulla (Kuva 3). Näyte käsitellään keittämällä, jonka jälkeen lisätään pieni määrä suodatettua uutetta kuoppalevyille. Kuoppiin lisätään kaupallista entsyymiseosta, jonka jälkeen absorbanssit luetaan spektrofotometrillä (340 nm). Näytteenkäsittelyn hinnaksi ilmoitetaan sivustolla <12 €/näyte. Lisäksi kuoppalevyllä voidaan analysoida 31 näytettä samanaikaisesti. Menetelmä on yksinkertainen, mutta laitteen saatavuudesta ei ole tietoja, sillä valmistajan nettisivuja ei ole päivitetty vuoden 2014 jälkeen. Laitetta on kuitenkin käytetty vuonna 2019 julkaistussa tieteellisessä artikkelissa, jossa K-arvoa ei kuitenkaan pidetty yhtä luotettavaa laadun mittarina kuin esimerkiksi laatuasteikollista menetelmää (QIM) tai kvantitatiivista kuvailevaa menetelmää (QDA). (Fogarty ym. 2019a)



Kuva 3. Kaavio kaupallisen K-arvon mittaukseen perustuvan testauskitin (PRECICE® Freshness Assay Kit, NovoCIP, Ranska) näytteenkäsittelystä. Kuva julkaistu NovoCIP:n luvalla.

3.6. Trikloorietikkahappoon liukenevat peptidit

Proteiinien pilkkoutuminen *post mortem* -tilassa on myös yksi kalan rakennetta heikentävä tekijä. Proteiinit pilkkoutuvat peptideiksi sekä kudoksessa itsessään esiintyvien että mikrobien

tuottamien proteaasien eli proteiineja pilkkovien entsyymien toiminnan seurauksena. Pilkkoutumista voidaan seurata esimerkiksi tarkkailemalla trikloorietikkahappoon liukenevien peptidien muodostumista varastoinnin aikana (Rawdkuen ym. 2010). Peptidien määrittäminen on nopeaa eikä vaadi kalliita investointeja. Pieni määrä kalaa homogenoidaan trikloorietikkahapon kanssa ja viilennetään, jonka jälkeen se sentrifugoidaan ja peptidien määrä mitataan spektrofotometrillä käyttäen Lowryn menetelmää (Lowry ym. 1951). Tulokset ilmoitetaan muodossa $\mu\text{mol tyrosiinia /g lihaskudosta}$ (Zhuang ym. 2020). Menetelmä ei vaadi kalliita investointeja ja se soveltuu etenkin laboratoriotutkimuksiin. Silakan tutkimukseen peptidien mittausta ei ole vielä hyödynnetty, ja menetelmä pitäisikin ensiksi kalibroida juuri silakalle sopivaksi mittaamalla pilaantumista myös muiden parametrien osalta.

3.7. Kemosensitiiviset yhdisteet

Biogeeniset amiinit ovat emäksisiä tyypillisiä aineenvaihduntatuotteita, joita muodostuu esimerkiksi aminohappojen hajotessa. Kalassa amiinit muodostuvat sekä endogeenisten entsyymien hajottaessa aminohappoja että mikrobien toiminnan seurauksena, joista jälkimmäisellä on huomattavasti suurempi rooli niiden muodostumisessa. Elintarvikkeissa esiintyviä amiineja ovat muun muassa histamiini, putreskiini, kadaveriini, tyramiini, tryptamiini, β -fenylylietyyliamiini, spermiini sekä spermidiini. Näistä histamiini, kadaveriini ja putreskiini ovat etenkin merenelävissä yleisiä diamiineja, jotka muodostuvat tiettyjen aminohappojen dekarboksylaatiosta post mortem -tilassa. Ammoniakki, trimetyyliamiini (TMA) ja dimetyyliamiini (DMA) ovat yleisiä pilaantumisen kertovia yhdisteitä, joista käytetään yhdessä termiä haihtuva kokonaistyyppi (total volatile base nitrogen, TVB-N). TVB-N on yleinen kalan pilaantumisen seurannassa mitattu yhdiste. (Rehbein & Oehlenschläger 2009)

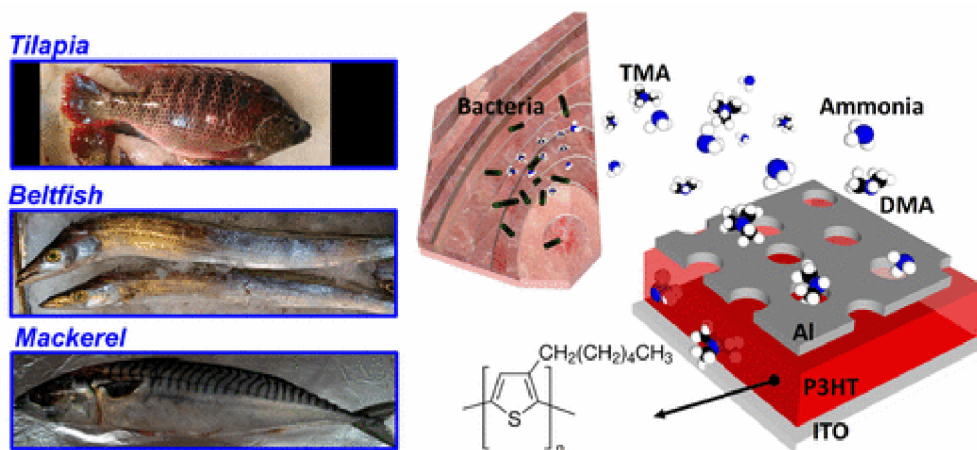
Kemosensitiiviset eli kemiallisen ympäristön vaihteluille herkäät yhdisteet mahdollistavat nopean ja noninvasiivisen pilaantumisen tarkkailun. Nämä yhdisteet reagoivat tyypillisiin pilaantumisen muodostuviin yhdisteisiin, kuten TMA:han, DMA:han, kadaveriiniin ja putreskiiniin. Zaragoza ym. (2012) tutkivat hammasahvenen säilyvyyttä 4 °C:ssa 11 päivän ajan. Eri yhdisteiden värimuutoksista, ja fysiokemiallisista kokeista (kosteusprosentti, TVB-N, valumahävikki, *Enterobacteriaceae*-bakteerien määrä, ATP:n kaltaisten yhdisteiden määrät sekä K-arvo) tehtiin peruskomponenttianalyysi, joka mahdollisti näytteiden jakamisen neljään ryhmään: ensimmäiseen ryhmään kuuluivat mittaustulokset 0, 2 ja 4 päivien kohdalla ja toiseen, kolmanteen ja neljänteen ryhmään mittauspäivät 7, 9 ja 11. Mallin avulla voidaan siis ennustaa, mihin ryhmään kalanäyte kuuluu kemosenitiivisten yhdisteiden värimuutosten perusteella. Kovin tarkkaa säilytysaikaa mallilla ei kuitenkaan voitu määrittää, vain noin kahden päivän tarkkuudella. Silakalle tällaista analyysia ei ole tehty, joten menetelmän käyttöönotto vaatisi ensin peruskomponenttianalyysin kaltaisen mallin luomisen, jotta värireaktioita perusteella voidaan määrittää kalan tuoreus. Lisäksi värianturimenetelmä olisi sopiva vain kylmäsäilytyksen seuraamiseen, kun kala on suljetussa pakkauksessa, eli lähinnä elintarvikeketjussa vasta pakkauksen jälkeen. Toisaalta älypakkaukset herättävät kuluttajissa kiinnostusta ja ne saattavat yleistyä tulevaisuudessa.

Toisen tutkimuksen mukaan kemosenitiivisten yhdisteiden väriintensiteetin kasvu korreloi suoraan perinteisten pilaantumisen mittareiden eli pH:n ja tiobarbituurihappo-reaktiivisten aineiden määrien muutosten kanssa. Useita kemosenitiivisiä yhdisteitä injektoidiin silikonigeelille, jotka asetettiin suljetun astian kanteen sisäpuolelle säilytyskokeen ajaksi. Eri yhdisteiden intensiteetit vaihtelivat säilytysolosuhteiden, kuten lämpötilan mukaan, joten tarkimmat tulokset saadaan yhdistelemällä mittauksessa useita yhdisteitä matriisiksi verrattuna yhden väriyhdisteen käyttöön. Kun tutkimuksessa käytetty säilytyslämpötila oli 4 °C, suurimmat signaalinmuutokset antavat yhdisteet olivat rosolihappo, kresolipunainen, alitsariini, metyyliipunainen,

kristalliviolettilaktoni, ksylenoli (sininen), bromifenolisininen sekä bromikresolivihreä. (Morsy ym. 2016). Värimuutoksiin perustuva mittaustapa mahdollistaa säilyvyysmäärityksen lisäämisen suoraan elintarvikepakkaukseen, mutta se ei ole toimiva menetelmä laadunvalvontaan tai tuoreuden määrittämiseen kalastusaluksilla tai lajittelussa.

3.8. Haihtuvien amiinien mittaus P3HT-sensorilla

Orgaanisia puolijohteita voidaan käyttää hyväksi haihtuvien typpiyhdisteiden analyysissä. Chang ym. (2017) kehittivät menetelmän (Kuva 4), jossa anturi koostuu 40 nm paksuisesta puolijohtavasta P3HT-polymeeristä (poly-(3-heksyyli tiofeeni)). Alapuolen elektrodi on puolestaan indiumtinaoksidia (ITO) ja yläpuolen elektrodi on huokoista alumiinia. Biogeenisten amiinien ja P3HT:n välinen pelkistysreaktio johtaa sähkönjohtavuuden heikkenemiseen, joka voidaan havaita. P3HT-sensori voi mitata kuivasta ilmasta alimmillaan 100 ppb ammoniakkipitoisuuden. Laitteen antama signaali muodostuu kuitenkin ammoniakkin, DMA:n ja TMA:n yhteispitoisuuksista. Sensorin lisäksi mittalaitteisto koostuu kaasuputkesta, kuivatussylinteristä ja pumpusta, joka kontrolloi kaasujen virtausnopeuksia. Yhtä määritystä varten tarvitaan noin gramma lihasnäytettä, mutta näyte pitäisi ottaa aina samasta kohdasta, jotta mittaustulokset ovat luotettavia. Menetelmän nopeus ja helppokäyttöisyys mahdollistaisivat sen käytön rutiinianalyysissä, mutta se ei ole vielä kaupallisesti saatavilla.



Kuva 4. Herkkä P3HT-sensori tunnistaa haihtuvat amiinimolekyylit, kuten ammoniakkin (engl. ammonia), dimetyyliamiinin (DMA) ja trimetyyliamiinin (TMA) raa'asta kalasta minuutissa. Yhdisteet aiheuttavat muutoksen sähkönjohtavuudessa, joka voidaan mitata. Kuva: Chang ym. (2017). Kuvan julkaisu ABC Publicationin luvalla.

3.9. Arvio soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille

Taulukossa 2 on esitetty koonti biokemiallisista menetelmistä, jotka on esitelty tässä raportissa. Biokemiallisista menetelmistä K-arvon mittaukseen perustuvat kaupalliset pikamenetelmät Biokemiallisista menetelmistä pH:n mittaus, peroksidiluku, *para*-anisidiiniluku ja näistä laskettu TOTOX (engl. Total Oxidation Products) ovat tunnettuja ja laajasti käytettyjä menetelmiä. pH:n mittaus on nopeaa, joskin se pitäisi kalibroida silakalle. Peroksidi ja *para*-anisidiinilukujen mittauksiin löytyy virallisia menetelmiä, mutta ne vaativat näytteenkäsittelyä ja soveltuvat paremmin tutkimukseen kuin nopeaan laadunvalvontaan. K-arvon mittaukseen perustuvat kaupalliset pikamenetelmät kuten "Freshness checker" ja "PRECICE® Freshness Assay Kit" soveltuvat ka-

laketjun alkupäähän laadunvalvontaan ja tuoreuden arviointiin. Kyseiset menetelmät ovat helpokäyttöisiä ja nopeita, joskin laitteiden ja kittien saatavuudesta ei ole kirjoitushetkellä varmuutta.

Pakattujen kalatuotteiden laadun seurantaan sopivat puolestaan erilaiset värimuutokseen perustuvat sensorit, jotka viestivät kalan laadusta sekä kuljetuksen että säilytyksen aikana. Kemosensitiivisiä sensoreita ei ole saatavilla valmiina, vaan ne vaatisivat kehitystyötä kullekin kalalajille ja tuotteelle, jotta värimuutoksen signaalin voimakkuus saadaan kalibroitua vastaamaan juuri kyseisen tuotteen laatua.

Tutkimuksessa ja uusien menetelmien validoinnissa voidaan käyttää tunnettuja ja luotettavia laadunmittausmenetelmiä, kuten nestekromatografiaan pohjautuvaa K-arvon määrittystä, edellämainittuja peroksidi- ja *para*-anisidiinilukumäärittäjä, tiobarbituurihapporeaktiivisten aineiden määrittystä sekä trikloorietikkahappoon liukenevien peptidien mittausta. Näitä laboratoriomenetelmiä voitaisiin siis käyttää uusien menetelmien kalibroinnissa, ja näihin menetelmiin käytettävät reagenssit ja laitteistot ovat yleisesti saatavilla elintarvikealan laboratorioissa.

Taulukko 2. Kemialliset ja biokemialliset menetelmät

Menetelmä	Soveltuvuus	Hyödyt	Haasteet	Muuta
pH:n mittaus pH laskee kalan kuoleman jälkeen, kun ensin muodostuu maitohappoa ja alkaa nousta, kun mikrobit muodostavat emäksisiä aineenvaihdunta- tuotteita	Laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> Nopea Edullinen Näytteenkäsittelyksi riittää kalanäyteen homogenointi veden kanssa 	<ul style="list-style-type: none"> pH:n yhteys laatuun täytyy mallintaa silakalle erikseen pH laskee kalan kuoleman jälkeen ja nousee taas uudestaan hajoamisen edetessä: kertooko mittaustulos, että kala on todella tuore, vai jo monta päivää vanha? 	<ul style="list-style-type: none"> pH:n yhteys laatuun täytyy mallintaa silakalle erikseen pH laskee kalan kuoleman jälkeen ja nousee taas uudestaan hajoamisen edetessä: kertooko mittaustulos, että kala on todella tuore, vai jo monta päivää vanha?
Laktaattidehydrogenaasin (LDH) mittauskitti Mittaa LDH:n (entsyymi) määrää	Tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> Valmiita testikittejä saatavilla 	<ul style="list-style-type: none"> Tarkkuutta vaativa näytteenkäsittely Kitit ovat kalliita Vaatii ELISA-kuoppalevylukijan Vaatii myös kalibroinnin silakalle 	
Peroksidiluvun määrittäminen Mittaa primäärisiä hapettumisyhdisteitä, pääasiassa peroksideja	Tutkimus ja laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> Yleinen rasvojen hapettumisesta kertova menetelmä Spektrofotometriä hyödyntävä menetelmä on nopea 		
Anisidiiniluvun määrittäminen Mittaa sekundäärisiä hapettumisyhdisteitä, kuten aldehydejä ja ketoneja	Tutkimus ja laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> Spektrofotometriä hyödyntävä menetelmä on nopea 	<ul style="list-style-type: none"> Myrkyllinen reagenssi 	<ul style="list-style-type: none"> Sopii käytettäväksi peroksidilukumäärittäjä rinnalla
TOTOX Lasketaan peroksidiluvun ja anisidiiniluvun avulla	Tutkimus ja laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> Kertoo kokonaishapettumisasteen Yleisesti käytössä teollisuudessa, etenkin öljyjen hapettumisen mittaamiseen 	<ul style="list-style-type: none"> Työläs, sillä vaatii sekä peroksidiluvun että anisidiiniluvun mittaamisen 	<ul style="list-style-type: none"> Laskukaava: TOTOX = AV + 2 x PV
Freshness Checker, QS-Solution, Japani	Laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> Nopea Helppo näytteenkäsittely 	<ul style="list-style-type: none"> Saatavuus 	<ul style="list-style-type: none"> Ei ole ajantasaista tietoa laitteen saatavuudesta

Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 58/2021

Mittaa k-arvoa, joka liittyy ATP:n hajoamistuotteisiin				(https://www.qs-solution.jp/english/index.html)
PRECICE® Freshness Assay Kit, NovoCIP, Lyon, Ranska Mittaa k-arvoa, joka liittyy ATP:n hajoamistuotteisiin	Laadunvalvonta, tutkimus	•Nopea	•Saatavuus •Tutkimuksen mukaan ei yhtä luotettava kuin laatuasteikolliset menetelmät	•22:n näytteen kitti maksaa 480 € (http://www.novocib.com/Freshness_Principle.html)
Trikloorihappoon liukenevien peptidien mittaus Mittaa tiettyjä peptiditejä, eli proteiinien hajoamista	Tutkimus	•Nopea	•Vaatii "kalibroinnin" silakalle	•Vaatii spektrofotometrin
Kemosensitiiviset yhdisteet Mittaa pilaantumisessa muodostuvia haihtuvia yhdisteitä, kuten trimetyyliamiinia, dimetyyliamiinia, kadaveriinia ja putreskiinia	Laadunvalvonta, älypakkaukset	•Nopea •Tulokset helposti nähtävillä	•Vaatii kehitystyötä •Ei kaupallisesti saatavilla •Kalliimpi kuluttajakautaus	
Haihtuvien amiinien mittaus P3HT-sensorilla Mittaa ammoniakin, dimetyyliamiinin ja trimetyyliamiinin määriä	Laadunvalvonta	•Nopea •Helppokäyttöinen	•Ei kaupallisesti saatavilla •Vaatii vielä kehitystyötä	

4. Fysikaalis-kemialliset menetelmät

4.1. Sähköisten ominaisuuksien muutoksiin perustuvat menetelmät

4.1.1. Fischtester

Kalan resistanssi riippuu sen tuoreudesta, mutta matalilla taajuuksilla kalan ja mittauselektrodien rajapinta (tästä aiheutuva ns. elektrodien polarisaatio) sekä kalan sisäiset kalvorakenteet aiheuttavat reaktiivisia impedansseja (kapasitansseja), jotka vääristävät mittaustulosta. Reaktiiviset impedanssit ovat kuitenkin taajuusriippuvia ja niiden vaikutus on eliminoitavissa tekemällä mittausta kahdella tai useammalla taajuudella. Intellectron Fischtester VI:ssä menetellään näin mittaamalla impedanssi Wheatstone-sillalla samanaikaisesti kahdella eri taajuudella.

Elektrodit kytketään kalan kylkiin lähelle peräaukkoa. Tulos saadaan analogiselta tai digitaaliselta näytöltä, jonka lukemat ovat välillä 0–100. Taulukossa 3 on esitetty Fischtesterin näyttämät lukemat eri kalalajien tapauksessa, kun kalat on mitattu tuoreina (alle 1 tunti *post mortem*). Näitä lukemia voidaan käyttää mittauksen kalibrointiin. Jäädetyt ja sulatettu kala voi näyttää tuoreelta, mutta sen solukalvot ovat rikkoutuneet, minkä Fischtester paljastaa heti näyttämällä lukemaa nolla.

Taulukko 3. Eri kalalajien tuoreiden kalojen Fischtester-lukemat. Taulukon lähde Rehbein & Oehlenschläger (2009).

Table 13.4 Basic Fischtester data of different fish species from North Atlantic, all data measured on freshly caught fish (less than 1 hour *post mortem*).

Species	Year	Catching area	N	Arithmetic mean	Median	Min.	Max.	SD
<i>Sebastes marinus</i>	1984	WBW	98	67.72	67	59	87	5.61
<i>Sebastes marinus</i>	1984	WBW	99	65.68	66	57	74	3.56
<i>Sebastes marinus</i>	1984	WBW	100	69.96	70	60	80	3.58
<i>Sebastes marinus</i>	1984	WBW	100	68.06	68	57	78	3.53
<i>Sebastes marinus</i>	1982	East Greenland	108	66.92	66	59	79	4.31
<i>Sebastes mentella</i>	1984	WBW	100	76.16	77	56	94	7.98
<i>Sebastes mentella</i>	1982	East Greenland	101	71.50	72	58	80	4.92
<i>Sebastes mentella</i>	1981	WBW	81	43.91	44	32	54	5.56
<i>Sebastes mentella</i>	1982	Barents Sea	99	74.35	74	66	86	3.67
<i>Sebastes marinus</i>	2002	East Greenland	155	66.27	66	57	78	4.10
<i>Gadus morhua</i>	1984	WBW	100	78.86	79	70	90	3.21
<i>Gadus morhua</i>	1984	WBW	74	74.61	75	62	87	5.27
<i>Gadus morhua</i>	1982	Barents Sea	108	76.88	77	64	85	3.72
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	1984	Rockall Bank	100	85.71	86	68	100	4.68
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	1982	Rockall Bank	100	87.54	88	74	98	4.77
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	1982	Rockall Bank	57	80.98	82	59	93	7.79
<i>Pollachius pollachius</i>	1984	Rockall Bank	101	68.71	68	44	76	4.68
<i>Micromesistius poutassou</i>	1983	WBW	99	84.90	86	68	99	5.32
<i>Coryphaenoides rupestris</i>	1981	WBW	100	52.42	53	34	63	5.39
<i>Coryphaenoides rupestris</i>	1983	WBW	100	57.84	58	34	72	6.83
<i>Macrurus berglax</i>	1983	WBW	99	42.48	42	30	64	5.54
<i>Aphanopus carbo</i>	1981	WBW	56	88.34	88	74	98	5.19
<i>Clupea harengus</i>	1983	St Kilda	100	72.08	72	54	80	4.51

WBW, West British waters

- dried out skin (shrinking when bent)
- surface of electrodes covered by slime or scales.

4.1.2. Torryster

Torrysterissä (Kuva 5) elektrodien polarisaation ongelmaa vähennetään käyttämällä neljää elektrodia. Virtaa syötetään kalaan toisen elektrodiparin kautta (tähän muodostuu elektrodien polarisaatiota) ja näiden välillä olevalla toisella elektrodiparilla mitataan jännite (näiden kautta kulkee vain pieni virta ja elektrodien polarisaatiota ei synny). Mitatusta resistanssista ja kapasitanssista laskettu ns. Q-kerroin korreloi hyvin sen kanssa, miten monta päivää kalaa on säilytetty jäissä. Torryster mittaa 2 kHz:n taajuudella elektrodiparien välisen vaihe-eron, joka on hyvällä tarkkuudella Q-kerroin.

4.1.3. Fischtesterin ja Torrysterin vertailua

Torryster on helppokäyttöinen, koska elektrodit painetaan tiiviisti kalan toiselle sivulle, kun taas Fischtesterillä mittausta tehdään kalan läpi. Kalan koolla on vain vähäinen vaikutus mittauksen tarkkuuteen molempien mittalaitteiden tapauksessa. Kun mitataan laatikossa olevaa kalaa, molemmat mittarit näyttävät pinnalta otetun kalan olevan tuoreempaa kuin pohjalta otetun, koska ilmeisesti kalojen paino aiheuttaa pieniä vaurioita. Tiettyyn tarkkuuteen (esim. ± 1 päivää jäissä) pääsemiseksi Torrysterillä tarvitaan jonkin verran enemmän mittauksia kuin Fischtesterillä (Taulukko 4). Joidenkin kalalajien tapauksessa Torryster näyttää toimivan huonosti. Tällaisia lajeja ovat esimerkiksi purple *Lethrinus lentjan*, *Scorpaenomoropus commerson*, *Lutjanus lentjan* ja *Solea senegalensis*. Monet tekijät voivat aiheuttaa virheellisiä mittaustuloksia: ihovauriot mittauskohdissa tai ihon kuivuminen, kala on suomustettu, kala on ollut kontaktissa elektrolyyttien kanssa, kala on jäänyt kokonaan tai osittain, kalan lämpötila on yli 10 °C, lima tai suomet peittävät mittauselektrodeja.

Taulukko 4. Tarvittava mittausten määrä eri menetelmillä, jotta päästäisiin tarkkuuteen ± 1 päivää (95 %:n luottamusväli). Taulukko muokattu lähteestä Rehbein & Oehlschlager (2009).

Menetelmä	Arvio	Ennuste
Torryster	27	31
Fischtester	17	20
Trimetyyliamiini	7	10
Yleinen ulkonäkö	3	4
Raa'an haju	2	3
Kypsennetyn haju	2	4
Kypsennetyn maku	2	4

Torrysteriä ja Fischsteriä on käytetty pitkään kalan tuoreuden mittaamisessa (Cheyne, 1975). Esimerkiksi Lougovois ym. (2003) vertasivat useita eri menetelmiä (esim. Torryster, aistinvarainen, K-arvo, mikrobiologinen) jäitetyn kultaotsa-ahvenen laadun seuraamisessa. Torryster-lukemat laskivat lineaarisesti varastoinnin ajan ja olivat linjassa aistinvaraisen arvioinnin kanssa. Johtopäätös oli, että Torryster mittausta on luotettava keino seurata kalan laatua ja tarkkuudeksi määritettiin $\pm 2,2$ päivää. Oehlschlager (2005) mukaan myös Fischtester on edelleen käyttökelpoinen laite kalan tuoreuden mittaamisessa. Toisaalta Hattula ym. (1995) totesivat, että Torryster ei ollut tarpeeksi herkkä, kun vertailtiin eri kalastusmenetelmien vaikutusta silakan laatuun.

Torrymeter (ja Fischtester) ovat edelleen käyttökelpoisia laitteita esimerkiksi silakan laadun mittaamiseen, mutta ne ovat epäherkkiä ja monet tekijät saattavat aiheuttaa virheellisiä mittaus tuloksia.

Kaupallisia laitteita: Distell Industries Ltd, Fauldhouse, West Lothian, UK (Torrymeter); Intellectron International Electronics, Hamburg, Germany (Fishtester VI (IT); RT Rafagnataekni Reykjavik, Iceland (RT-Freshness Grader).



Kuva 5. Distell Industries -yrityksen Torrymeter-mittalaite. Kuva julkaistu valmistajan luvalla.

4.2. Väriin mittaus

Väriä mitataan värimittarilla, joka antaa numeeriset arvot väreille. Yleisimmin käytettyjä väriarvoja ovat CIELAB tai $L^*a^*b^*$. Kun värille mitataan arvot, eliminoidaan epämääräisyys värien kuvaamisesta. Näin voidaan laskea ja tallentaa eri mittausten välinen ero, väriero. Numeroarvoista nähdään värierojen suunnat, onko kyse vaaleuden muutoksesta väriin pysyessä samana, vai onko värisävyssä eroa. Värieron laskeminen on jatkuvassa kehityksessä, jotta se saadaan paremmin vastaamaan ihmisen näköä.

Väriin mittaamista käytetään yleisimmin vesiviljelyssä esimerkiksi kirjolohien ruokinnan optimoinnissa, kalamassojen ja surimien laadunvalvonnassa sekä kalan prosessoinnin vaikutusten seuraamisessa (jäähdytys, pakastaminen, kuumennuskäsittelyt, savustus ja korkeapaineprosessointi). Kalan tuoreutta voidaan seurata mittaamalla väriin muutosta kalan kiduksissa ja silmissä konenäön avulla (esimerkiksi Lalabadi ym. 2020, ks. kohta 4.4). Väriinmittausta käytetään myös erilaisten jäähdytysprosessien vaikutusten seuraamiseen. Väriin mittaamisen potentiaali on Suomessa lähinnä tuotteistuspölellä, ei niinkään kalan tuoreuden seurannassa. Väriin mittaamiseen on olemassa erilaisia värianalysointilaitteita, värisensoreita ja spektrofotometrejä, kuten esimerkiksi Spectropen®.

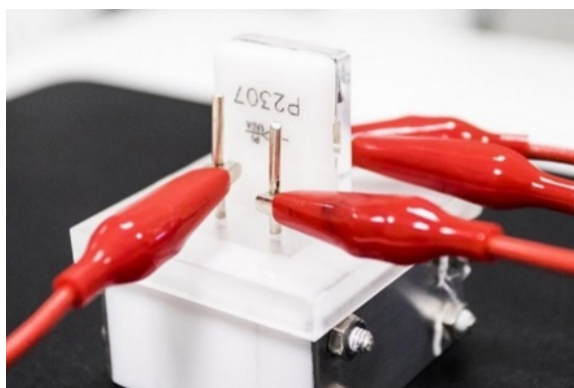
4.3. Sähkökemiallinen impedanssispektroskopia (EIS)

Sähkökemiallinen impedanssispektroskopia (electrochemical impedance spectroscopy, EIS) on menetelmä, jossa mitataan ensin näytteen impedanssi $Z(f)$ taajuuden funktiona (Kuva 6). Mittattu impedanssi sovitetaan tietokoneella sopivaa algoritmia käyttäen sähköiseen sijaiskytkentään, joka sisältää resistansseja (R) ja kapasitansseja (C) ja periaatteessa myös induktansseja (L). Lopputuloksena saadaan impedanssia $Z(f)$ parhaiten kuvaavat resistanssien ja kapasitanssien lukuarvot, jotka puolestaan korreloivat näytteen ominaisuuksien kanssa. Sijaiskytkentä voidaan valita monella tavalla ja se voi olla fysikaalinen tai empiirinen.

Zhao ym. (2017) esittelee EIS-menetelmän käyttömahdollisuuksia elintarvikkeiden laadun tutkimisessa. Menetelmää voidaan käyttää muun muassa kalojen tuoreuden selvittämiseen, koska kalan kudosten sähköiset ominaisuudet riippuvat sen tuoreudesta. EIS on automatisoitavissa ja toteutettavissa melko edullisin laittein, näytettä tuhoamaton ja tulokset saadaan nopeasti.

Esimerkiksi Niu & Lee (2000) tutkivat karppia, silliä ja meribassia. Kalaan asetettiin yksinkertaiset elektrodit ja impedanssi mitattiin taajuusalueella 0,1 Hz–100 kHz. Sekä impedanssin vaihekulman että suuruuden muutoksien havaittiin korreloivan kalan pyydystämisen ajan kanssa. Kalat voitiin näin jakaa helposti neljään tuoreusluokkaan (tuore, melko tuore, melko pilaantunut, pilaantunut). Viime aikoina EIS:ää on käytetty useiden eri kalojen tuoreuden mittaamiseen (Pérez-Esteve ym. 2014; Yuan ym. 2018; Zavadlav ym. 2016; Sun ym. 2017, 2018). EIS:ää on käytetty myös muun muassa suolapitoisuuksien monitorointiin suolaus-savustus -prosesseissa (Rizo ym. 2013) sekä kalan rasvapitoisuuden mittaamisessa (Rasmussen ym. 2012; Willis & Hobday 2008).

EIS vaikuttaa lupaavalta kalojen tuoreuden mittaamenetelmältä. Elektrodien ja näytteen rajapinnalle syntyvä elektrodien polarisaatio on merkittävin mittaustarkkuuden haaste. Potentiaalia näyttäisi olevan, mutta mahdollisuuksia silakan laadun monitorointiin tulisi tutkia lisää. Tampereen yliopistossa on kaksi laitetta impedanssimittauksiin ja asiantuntemus impedanssitietojen käsittelyyn ja analysointiin (Computational Biophysics and Imaging -ryhmä CBIG). Professori Jari Hyttinen (jari.hyttinen@tuni.fi; p. +358 40 849 0020). Lisätietoja on saatavilla osoitteesta: <https://www.tuni.fi/fi/tutkimus/electrical-impedance-spectroscopy-eis#switcher-trigger--services>



Kuva 6. Sähkökemiallisen impedanssin mittaus. Kuva: Virpi Alarautalahden luvalla lähteestä Tampereen yliopisto <https://www.tuni.fi/fi/tutkimus/electrical-impedance-spectroscopy-eis>.

Fishermen Seafood Analytics esitteli uuden elektronisen kalanseurantalaitteen vuonna 2015 (Kuva 7). Laite on täysin integroitu elektroninen kalan ominaisuuksien seurantaan tarkoitettu laite. Se antaa tutkijoille, vesiviljelylaitoksille, jalostajille, merellä toimiville tarkkailijoille, kalastajille ja muille kalatalousalan toimijoille mahdollisuuden mitata ja tallentaa tärkeitä elektronisia tietoja kaloista nopeasti ja helposti. Fishboard-sovelluksen avulla käyttäjät voivat nopeasti ja helposti arvioida yksittäisten kalojen pituuden, painon, terveyden, tilan ja pilaantumisen tilan sekä kehon koostumuksen. Laitetta voidaan käyttää mittausten reaaliaikaisen tarkkailuun ja tallentamiseen.



Kuva 7. Certified Quality Reader, CQ Foods Inc., USA. Kuva: Sara Hiidenhovi, Luke

4.4. Konenäkö

Konenäkö on teknologiaa, jossa yhdistyvät mekaniikka, optinen instrumentointi, sähkömagneettisen säteilyn havaitseminen sekä digitaalisen videon ja kuvan prosessointiteknologia. Konenäköteknologia tarjoaa korkeaa joustavuutta ja toistettavuutta suhteellisen alhaisilla kustannuksilla sekä sallii melko nopean tuotannon läpivirtauksen tarkkuutta vaarantamatta. Konenäköä käytetään laajalti erilaisissa tutkimus- ja monitorointisovelluksissa eri aloilla, kuten lääketieteellisessä diagnostiikassa, automaattisessa valmistuksessa ja valvonnassa, kaukokartoituksessa, robottien ohjauksessa sekä maataloudessa ja elintarviketeollisuudessa (Patel ym. 2012). Tyypillisesti konenäkösystemi koostuu valaisinyksiköstä (valonlähde), kuvankaappausysteemistä, liitäntäkortista kameralle (frame grabber) ja tietokoneesta (He ym. 2015).

Yksinkertaisimmissa konenäkösovelluksissa, joissa analysoitava näkymä on kaksiulotteinen yksittäinen kuva, kuva-analyysiprosessi koostuu eri vaiheista: esikäsitely, segmentointi, sisällön kuvauksen muodostus, sovitus, mallit ja tunnistus. Ensimmäisenä vaiheena on kuvan muodostaminen kuvälähteellä, esimerkiksi digikameralla. Seuraavaksi kuva esikäsitellään: tällöin kuva muokataan digitaalisen kuvankäsittelyn menetelmillä analyysin kannalta edullisempaan muotoon, esimerkiksi normalisoimalla siten, että valaistuksessa tapahtuneet vaihtelut eivät vaikuta liikaa lopputulokseen. Kuvasta usein suodatetaan pois kohinaa tai muita analyysiä häiritseviä sävyvaihteluja sekä korostetaan mielenkiinnon kohteina olevia piirteitä. Geometrista korjausta voidaan tehdä esimerkiksi kameran linssin aiheuttamien vääristymien vuoksi. Segmentoinnin

tavoitteena on erottaa kohteet ja kohteiden osat toisistaan ja taustastaan. Segmentointiin voidaan käyttää aluepohjaista menetelmää, jossa kuva jaetaan harmaasävyllään, värillään tms. ominaisuudeltaan homogeenisiin alueisiin tai reunanilmaisua, jossa kuvasta ilmaistaan jyrkkiä sävynmuutoskohtia eli alueiden reunoja. Segmentointi on kuva-analyysin kriittisimpiä kohtia. Segmentoinnin jälkeen lasketaan segmentoitujen alueiden, reunojen tms. ominaisuuksia kuvaavia piirteitä (mm. muoto, väri ja alueiden pintarakennetta kuvaava tekstuuri), joiden perusteella erilaisia kohteita voidaan erottaa toisistaan. Muodostettuja kuvauksia verrataan systeemille etukäteen opetettujen prototyyppikohteiden malleihin ja näin voidaan tunnistaa kuvassa esiintyviä kohteita tai ilmaista poikkeamia malleista. (Pietikäinen & Silvén 2019)

Konenäköä alettiin käyttää elintarviketeollisuudessa 1990-luvun alusta. Nykyisin sitä käytetään laajalti erilaisten elintarvikkeiden laaduntarkkailussa- ja valvonnassa, sillä kyseinen teknologia tarjoaa objektiivisen ja tarkan tiedon tutkittavasta kohteesta. Kalan ja kalatuotteiden laaduntarkkailussa konenäköä on käytetty analysoimaan muun muassa väriä, muotoa, pituutta, kokoa, painoa ja pinnan vioituksia sekä kemiallisia ominaisuuksia, kuten rasvaa. Konenäköä on myös käytetty kuolonkankeuden määrittämisessä, luokittelussa sekä lajittelussa (Taulukko 5).

Tehokas kalankasvatus edellyttää tarkkaa ajantasaista tietoa kalojen lukumäärästä, aktiivisuudesta, terveydentilasta sekä biomassasta, jotta voidaan optimaalisesti hallita esimerkiksi ruokintaa ja kasvatustiheyksiä. Janhunen ym. (2019) selvittivät 3D-kameratekniikan ja koneoppimisen hyödyntämistä suomalaisessa kalankasvatuksessa. Kuvauskokeiluissa ruokailevasta kirjolohesta ja siiasta saadusta liikedatasta pystyttiin toteamaan niiden aktiviteetin muutoksia. Kuhakasvatusten kuvauksissa kuhan liikeaktiivisuutta ei havaittu samean veden ja kuhan passiivisen ruokailukäyttäytymisen vuoksi. Sen sijaan kalojen pituudesta saatiin luotettavia metrisiä mittaustuloksia 3D-kameradatan avulla, mutta näytemäärä ei ollut riittävä suoraan biomassan arviointiin. Tulosten perusteella 3D-kuvasta saatuja pituusmittoja voitaisiin käyttää kalojen kasvun tarkempaan arviointiin. Menetelmää voidaan käyttää myös kalan kidusten ja silmien värin seurantaan (ks. kohta 4.2).

Saatavilla on erilaisia kaupallisia laitteita. Esimerkiksi AIA:n Vision Online – Vision Systems:n sivuilta <https://www.visiononline.org/vision-resources.cfm> löytyy tietoa konenäkösystemeistä, teknologiasta, tapahtumista, koulutuksista, yrityksistä sekä tuotteista ja palveluista.

Taulukko 5. Valittuja esimerkkejä konenäön käytöstä kala ja kalatuotteiden laadunarvioinnissa.

Ominaisuus	Kalalaji	Viite
Väri	Taimen (<i>Salmo trutta</i>)	Marty-Mahé ym (2004); Quevedo ym. (2010)
	Kirjolohi (<i>Oncorhynchus mykiss</i> W.)	Stien ym. (2006a, 2006b)
	Tonnikala (<i>Thunnus thynnus</i> L.1758)	Mateo ym. (2006)
	Atlantin lohi (<i>Salmo salar</i>)	Erikson ym. (2011)
Paino	Kirjolohi (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Gümüş & Balaban (2010)
	Alaskan seiti (<i>T. chalcogramma</i>)	Balaban ym. (2010a)
	Silli (<i>Clupea harengus</i>)	Mathiassen ym. (2011)
	Kolja (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>), silli (<i>C. harengus</i>), seiti (<i>Pollachius virens</i>)	Svelling ym. (2006)
Koko ja muoto	Turska (<i>G. morhua</i>), lohi (<i>S. salar</i>)	Misimi ym. (2008)
Tilavuus	Alaskan seiti (<i>T. chalcogramma</i>)	Balaban ym. (2011a, 2011b)
Vioitukset	Lohi (<i>Salmo salar</i> L.)	Ashton ym. (2010)
Kuolonkankeus (<i>rigor mortis</i>)	Kirjolohi (<i>O. mykiss</i>)	Stein ym. (2006b)
Rasva	Atlantin lohi (<i>S. salar</i>)	Borderías ym. (1999)
	Taimen (<i>Salmo trutta</i> L.)	Marty-Mahé ym. (2004); Stien ym. (2007)
Luokittelu/ lajittelu	Meriantura eli kielikampela (<i>Solea solea</i>), punakampela, valkoturska (<i>Merlangius merlangus</i>), hieta-kampela (<i>Limanda limanda</i>), turska (<i>G. morhua</i>), pikkupääkampela (<i>Microstomus kitt</i>)	Storbeck & Daan (2001)
	Liejukampela (<i>H. platessoides</i>), meriantura (<i>S. vulgaris</i>), pikkupääkampela (<i>Microstomus kitt</i>)	White ym. (2006)
	Karppi (<i>C. carpio</i>), Niilin tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.)	Zion ym. (2007)
	Atlantin lohi (<i>S. salar</i>)	Misimi ym. (2008)

4.5. Raman-spektroskopia

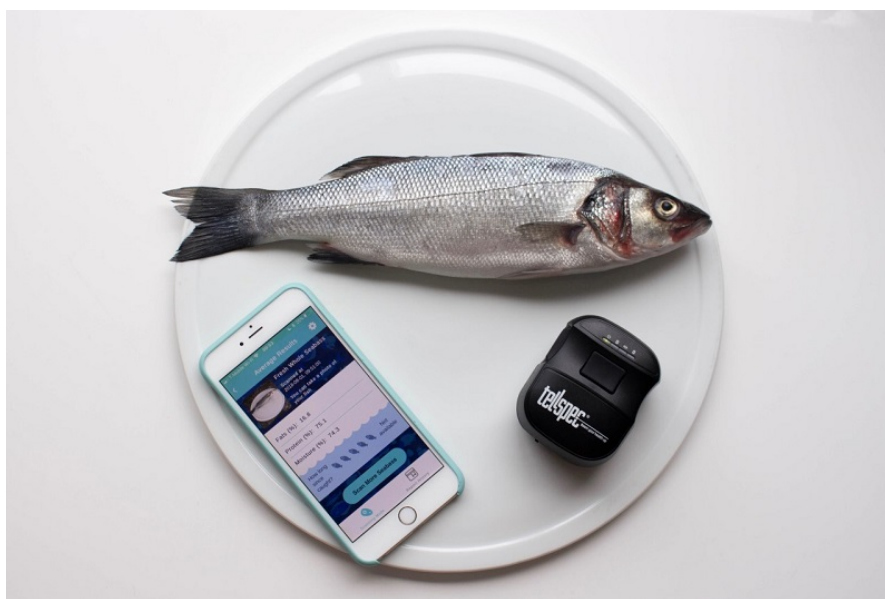
Raman-spektroskopiassa mitataan molekyylin värähtelytaajuuden siirtymää verrattuna vaikuttavan säteen taajuuteen. Siinä näyte säteilytetään monokromaattisella UV-, VIS- tai NIR -alueen lasersäteellä, jolloin molekyylin värähtelyenergiataso siirtyy perustasolta korkeamman energian tasolle. Kun molekyyli siirtyy takaisin matalamman energian tasolle, Raman-sironna tapahtuu alemmalla taajuudella kuin lasersäteen taajuus. Sen vuoksi samanaikaisesti voidaan saada tietoa näytteen laadullisista ja määrällisistä rakenne- ja kemiallisista ominaisuuksista. Raman-spektroskopialla voidaan mitata kaasumaisia, nestemäisiä sekä kiinteitä näytteitä. (Hassoun & Karoui 2017)

Tyypillisesti Raman-spektroskopia-laitteisto koostuu seuraavista pääkomponenteista: lasersäteen lähde, kuituoptinen Raman koetin, kuvantava spektrograafi ja valoherkkä kenno. Kuvauksessa näyte, kuten lohifile, valaistetaan lasersäteellä. Sen jälkeen sironnut valo kerätään kuituoptiselle Raman-koettimelle, josta se syötetään kuvantavalle spektrograafille. Sironnut joustava säteily suodatetaan pois ja jäljelle jäänyt valo dispergoidaan valokennolle, joka tallentaa koko spektrin samanaikaisesti (Xu ym. 2015).

Elintarvikesektorilla Raman-spektroskopiaa on hyödynnetty elintarvikkeiden väärennösten, niiden maantieteellisen alkuperän ja fysikokemiallisten ominaisuuksien määrittämisessä sekä prosessin kontrolloinnissa. Raman-spektroskopian on osoitettu olevan käyttökelpoinen menetelmä kalan laadun mittaukseen prosessilinjalla, mutta kyseisen teknologian käyttö on vielä vähäistä (Hassoun & Karoui 2017). Velioglu ym. (2015) testasivat, voidaanko Raman-spektroskopiolla erottaa pakastettu ja sulatettu kala toisistaan. Testauksessa tutkittiin 6 eri kalalajin näytettä: piikkimakrilli (*Trachurus trachurus*), sardelli (*Engraulis encrasicolus*), keltajuovamullo (*Mullus surmuletus*), sinikala (*Pomatomus saltatrix*), Atlantin lohi (*S. salar*) ja isokurnusimppu (*Trigla lucerna*). Kun kuvadata prosessointiin PCA-mallilla, kalalajit pystyttiin erottamaan toisistaan sekä lajin että tuoreuden perusteella.

Raman-spektroskopiaa on käytetty myös kalojen rasvan hapettumisen seurantaan ja rasvapitoisuuden sekä proteiinirakenteiden määrittämiseen. Herrero ym. (2004) tutkivat kummeliturskan lihaksen rakennemuutoksia $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$:n pakastuksen aikana. Muutoksia havaittiin proteiinin sekundaarirakenteessa spektrialueella $1\ 600\text{--}1\ 680\text{ cm}^{-1}$. Lisäksi proteiinin tertiäarirakenteessa havaittiin muutoksia spektrialueella $2\ 935\text{ cm}^{-1}$, mikä osoittaa lihaproteiinin denaturoitumisen. Sanchez-Alonso ym. (2012) puolestaan tutkivat kummeliturskan (*Merluccius merluccius* L) fileestä eristetyn rasvan muutoksia $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa varastoinnin jälkeen. Näytteitä varastoitettiin 3, 14 ja 23 viikkoa. Muutokset rasvan hapettumisessa havaittiin spektrialueella noin 1658 cm^{-1} .

Kanadalaisen TellSpecsin kehittämä laite on tarkoitettu siian laadun tarkkailuun reaaliaikaisesti (Kuva 8). Määrytykset voidaan tehdä kokonaisesta kalasta tai fileestä. Sovellusta voidaan käyttää koostumuksen mittaamiseen sekä väärennösten toteamiseen. TellSpecin laitteiston toimintatapa on lyhyesti seuraava: laite lähettää lasersäteen mitattavaan elintarvikkeeseen, mittaa heijastuneen valon, ja lähettää sen bluetoothin välityksellä pilvipalveluun serverille. Siellä informaatiota verrataan referenssidataan lukuisten algoritmien avulla. Lopuksi tulokset (kosteus-, rasva- ja proteiinipitoisuus, lisätty veden määrä) lähetetään käyttäjälle, joka voi nähdä ne heti kännykässään grafiikkana ja taulukoina (FOODnavigator 2018; SalmonBusiness 2018). TellSpecin pikalaite näyttää lupaavalta. Sitä ei voi kuitenkaan suoraan käyttää silakalle, vaan sille pitää luoda oma sormenjälkikirjasto ja datan perusteella tarvittavat algoritmit.



Kuva 8. TellSpecin laite siian laaduntarkkailuun reaaliaikaisesti. Kuva valmistajan luvalla.

4.6. VIS/NIR-spektroskopia

Infrapunasäteily (IR) on osa sähkömagneettista säteilyä. Se toimii sähkömagneettisen spektrin aallonpituusalueella 780 nm–1 mm, ja voidaan jakaa lähi-infrapuna- (NIR: 0,78–2,5 μm), keski-infrapuna- (MIR: 2,5–25 μm) ja kaukoinfrapuna-alueisiin (FIR: 25–1000 μm). NIR-alue voidaan jakaa lyhytaaltoinfrapuna- (SW-NIR: 780–1300 nm) ja pikäaaltoinfrapuna-alueisiin (LW-NIR: 1300–2500 nm) (Cen & He 2007). Infrapunaspektroskopia perustuu säteilyn absorptioon orgaanisen aineen tiettyjen molekyylien (O-H-, N-H-, ja C-H-ryhmät sekä C-C-, C-O-, C-N- ja N-O-ryhmät) värähtelytaajuuksilla (Soriano-Disla ym. 2014). Elektronien siirtymät absorboivat näkyvän valon ja ultraviolettivalon aallonpituusalueilla (Rossel ym. 2006).

NIR-spektroskopiassa näytteen pinnalle lähetetään valoa ja sen jälkeen mitataan näytteestä tuleva valo eri aallonpituuksilla. Tutkittavan kohteen spektri voidaan tuottaa neljällä tavalla. Transmittanssitavassa mitataan näytteen läpi kulkemaa valoa. Siinä valonlähde ja detektori ovat näytteen vastakkaisilla puolilla, ja näytteen läpi kulkema valo mitataan vastakkaisella puolella täsmällisesti samassa kohtaa kuin se on lähtenytkin. Reflektanssitavassa mitataan näytteestä heijastunutta valoa. Siinä valonlähde ja detektori sijaitsevat samalla puolella näytettä. Pintaheijastuksen välttämiseksi detektorit sijoitetaan tavallisesti 45 asteen kulmaan näytteeseen nähden. Transflektanssi on transmittanssi- ja reflektanssitapojen yhdistelmä, ja siinä mitataan näytteen läpi kulkemaa ja heijastunutta valoa. Näyte on sijoitettu ikään kuin heijastuksen mittausta varten, mutta heijastinyksikkö sijaitsee valonlähdettä vastapäätä näytteen takana. Heijastinyksikön heijastama valo siirtyy näytteen läpi detektorille. Vuorovaikutustapa on transmittanssi- ja reflektanssi-tapojen yhdistelmä. Myös siinä mitataan näytteen läpi kulkemaa ja heijastunutta valoa. Tässä mittaustavassa näyte valaistetaan valokuitukaapeleilla, jotka ovat suorassa kosketuksessa näytepinnan tai näytepidikkeen kanssa. Valo etenee näytteen sisällä ja on vuorovaikutuksessa kulkeutumalla läpi, heijastuen ja/tai absorboituen. Lähteiden kanssa samalle puolelle sijoitetut kuitukimput palauttavat näytteen sisällä etenevän valon detektoriin. (Alander ym. 2013)

NIR-mittauksessa kertyvä valtava datamäärä pitää esikäsitellä ja arvioida kemometrisesti. Prosessi sisältää kolme vaihetta: spektritiedon esikäsitely, kalibrointimallin rakentaminen ja mallin siirto. Spektridatan esikäsitely tavoitteena on saada data käyttökelpoisempaan muotoon monimuuttuja-analyysia varten (Alander ym. 2013; Cortés ym. 2019).

Sähkömagneettisen säteilyn spektrin ultravioletti-, näkyvän valon ja infrapuna-alueiden aallonpituusalueilla toimivaa spektroskopiaa käytetään yhä enemmän elintarvikkeiden laadun mittaamiseen, sillä laitteistot ovat entistä laadukkaampia, niiden hinnat ovat laskeneet ja datan käsittelyyn tarvittavat kemometriset työkalut ovat kehittyneet (Hassoun & Karoui 2017).

Kalassa ja kalatuotteissa VIS/NIR-spektroskopiaa on käytetty kemiallisen koostumuksen, kuten vesi-, rasva-, proteiini- ja suolapitoisuuden analysoinnissa. Lisäksi laaduntarkkailussa sitä on käytetty vioittumien ja kalan tuoreuden arvioinnissa sekä kalojen luokittelussa ja alkuperän määrittämisessä (He ym. 2015). Menetelmä on tutkittavaa kohdetta tuhoamaton. Taulukossa 6 on esitetty sovellusesimerkkejä VIS/NIR -spektroskopian käytöstä kalan ja kalatuotteiden laadun arvioinnissa.

VIS/NIR-spektroskopian soveltuvuutta kalan kemiallisen koostumuksen määrittämiseen on ovattu tutkineen muun muassa Nortvedt ym. (1998) ja Folkestad ym. (2008). Nortvedt ym. (1998) määrittä proteiinipitoisuuden ruijanpallaksesta ja tulos vastasi tarkkuudeltaan kemiallisella menetelmällä saatua tulosta. Folkestad ym. (2008) tutki NIR-spektroskopian soveltuvuutta rasvapitoisuuden määrittämiseen. Tutkijat käyttivät aallonpituusaluetta 760–1040 nm ja näytteinä oli eläviä ja teurastettuja Atlantin lohia. Tulos oli suhteellisen hyvä. NIR-spektroskopiaa on käytetty

myös määrittämään kalan mustelmia, joita voi tulla kalastuksen, varastoinnin ja kuljetuksen aikana. Perustuen deoksihemoglobiinille luonteenomaiseen absorbanssikaistaan 760 nm kohdalla, Hammers ym. (2007) käytti aallonpituusalueetta 600–1100 nm määrittämään mustelmia kokonaisesta hopealohesta (*Oncorhynchus kisutch*).

VIS/NIR -spektroskopian on osoitettu soveltuvan kalan tuoreuden arviointiin. Turskafileiden tuoreuden arviointiin Nilsen ym. (2002) käytti näkyvän valona aallonpituusalueetta 400–700 nm, ja lohien tuoreuden arviointiin tutkijat käyttivät VIS/NIR-aallonpituusalueetta 700–1100 nm. Uddin & Okazaki (2004) pystyivät tutkimuksessaan erottamaan NIR -spektroskopiolla tuoreen ja pakastetun ja sitten sulatetun Japanin hevosmakrillin (*T. japonicus*) tosistaan perustuen siihen, että kalan liha absorboi ja heijastaa valoa eri tavalla varastoinnin ja sulatuksen aikana. Testauksessa he käyttivät aallonpituusalueetta 1100–2500 nm ja heijastunut spektri analysoitiin kromometrisesti. Costa ym. (2011) puolestaan käytti VIS/NIR-spektroskopiaa aallonpituusalueella 400–970 nm määrittämään merellä häkeissä kasvatetun ja sementtitankeissa maalla kasvatetun meribassin (*Dicentrarchus labrax*) lihan eroavaisuudet. Erot voitiin havaita 48 h teurastuksen jälkeen, mutta 96 tunnin jälkeen erot eivät olleet niin selvät. Ottavian ym. (2012) käytti NIR-spektroskopiaa kalan alkuperän toteamiseen. Tutkijat onnistuivat erottamaan luonnonvaraisen meribassin (*D. labrax*) kasvatetusta meribassista käyttämällä aallonpituusalueetta 1100–2500 nm. Taulukkoon 6 on koottu esimerkkejä VIS/NIR-spektroskopian käytöstä kalan ja kalatuotteiden laadun arvioinnissa.

Taulukko 6. Esimerkkejä VIS/NIR-spektroskopian käytöstä kalan ja kalatuotteiden laadun arvioinnissa.

Ominaisuus	Kalalaji	Aallonpituus (nm)	Viite
Rasva, proteiini, kuiva-aine	Ruijanpallas (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	850–1048	Nortvedt ym. (1998)
Tuoreus	Turska (<i>G. morhua</i>), lohi (<i>S. salar</i>)	turska: 400–700; lohi: 700–1100	Nilsen ym. (2002)
Erottelu	Japanin hevosmakrilli (<i>T. japonicus</i>)	1100–2500	Uddin & Okazaki (2004)
Mustelmat	Hopealohi (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	600–1100	Hammers ym. (2007)
Rasva, pigmentti	Viljelty Atlantin lohi (<i>Salmo salar</i> L.)	760–1040	Folkestad ym. (2008)
Erottelu	Euroopan meribassi (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	1100–2500	Ottavian ym. (2012)

Suomessakin on alan laitevalmistajia (muun muassa GrainSense), jotka voisivat rakentaa linjoja tai yksittäisiä mittalaitteita kala-alankin käyttöön. Tarvitaan kuitenkin referenssiaineiston keräämistä, testausta ja tutkimusta.

Laboratoriolaitteet. NIR spektroskopiaan perustuvia kaupallisia laboratoriolaitteita eri aineiden koostumuksen määrittämiseen on markkinoilla paljon, kuten Metrohm (<https://www.metrohm.com/fi-fi/products-overview/spectroscopy/nirs-lab-analyzers/>) ja Fossin (<https://www.fossanalytics.com/en/productfinder>) laitteet.

On-line/In-line laitteet (anturit) teollisuuteen. Myös eri valmistajien erilaisia antureita on kaupallisesti saatavilla teollisuuden käyttöön, esimerkiksi BÜCHI Labortechnik AG Switzerland <https://www.buchi.com/en/products/nir-online/nir-online-process-analyzer>. Heidän BUCHI NIR-Online® -sarjassaan on monenlaisia antureita erilaisten prosessien ohjaukseen (Kuva 9).

Yhtenä käyttökohteena on mainittu kalarehun valmistus <https://static1.buchi.com/sites/default/files/NIR-Online Solution Brochure en.pdf>.



Kuva 9. BUCHI NIR-Online® -sarjan NIR -spektroskopiaan perustuvia antureita erilaisten prosessien ohjaukseen. Kuva BÜCHI Labortechnik AG:n luvalla <https://static1.buchi.com/sites/default/files/NIR-Online Solution Brochure en.pdf>.

Kannettavat mittalaitteet. Hiljattain markkinoille on tullut kädessä pidettäviä laitteita, kuten suomalainen GrainSensen valmistama viljalaboratorio, joka analysoi siementen (vehnä, ruis, ohra, kaura, rypsi, rapsi) valkuaisen, kosteuden, öljy- ja hiilihydraattipitoisuuden noin viidessä sekunnissa. Mittaukset voidaan tehdä jo pellolla ennen sadonkorjuuta (Maatilan Pellervo 2018).

GrainSense- mittarin toimintaperiaate on seuraava: se yhdistetään älypuhelinsovellukseen bluetooth-yhteydellä, jolloin laatu tiedot voidaan nähdä laitteen näytöltä ja kännykkäsovelluksesta. Sovellus tallentaa mittaustulokset ja GPS-paikkatiedon automaattisesti. Sieltä ne välitetään pilvipalveluun, jossa ne ovat käytettävissä tietokoneellakin. Lisäksi laatu tiedot voi jakaa suoraan sovelluksesta teksti-, whatsapp- tai sähköpostiviestinä.

Mittalaitteet kuluttajien käyttöön. Markkinoilla on tai tulossa NIR-tekniikkaan perustuvia laitteita kuluttajienkin käyttöön, kuten suomalaisen Spectral Enginesin ja israelilaisen SCiOscanin kehittämiä laitteita. Spectral Enginesin laite mittaa ruoan ainesosat, ravintoaineet ja allergeenit (Food Navigator 2017).

4.7. Hyperspektrikuvantaminen

Spektraalisessa kuvantamisessa yhdistyvät spektroskopia ja kuvantamistekniikka, minkä ansiosta saadaan samanaikaisesti tietoa kohteen fysikaalisista ja geometrisistä piirteistä (muoto, koko, ulkonäkö ja väri) sekä kemiallisesta koostumuksesta spektrianalyysin perusteella (Elmasry

ym. 2012). Menetelmä on tutkittavaa kohdetta tuhoamaton. (Hyper)spektraalinen kuvantaminen perustuu siihen, että erilaisen kemiallisen koostumuksensa ja fysikaalisen rakenteensa vuoksi kaikki materiaalit lähettävät eli emittoivat, heijastavat sekä absorboivat säteilyä eri tavoin ja eri aallonpituuskaistoilla (Ks. 4.6). Sensorilla havaitusta säteilyn intensiteetistä ja aallonpituudesta saadaan tietoa kohteen ominaisuuksista, ja kohteet voidaan tunnistaa sen heijastusominaisuuksien perusteella (Keto 2020).

Multi- ja hyperspektrikuvauksessa säteilyä mitataan usealla eri sähkömagneettisen spektrin aallonpituusalueella eli kaistalla. Multispektrikuvauksessa havainnoitavien kaistat ovat suhteellisen leveitä, mutta niiden määrä on pieni (tavallisesti alle 10), jolloin kuvapikselistä ei saada koko spektriä. Hyperspektrikuvauksessa sensorit mittaavat satoja tarkkaan rajattuja, säännöllisellä etäisyydellä toisistaan olevia kapeita kaistoja, ja jokaiselle kuvapikselille saadaan täysi spektri mitatulla aallonpituusalueella. Molemmissa tapauksissa kuvat voidaan kasata päällekkäin tasoina, jolloin saadaan niin kutsuttu datakuutio. Siinä x-y-tasoilla saadaan paikkatieto ja kuution kolmannella ulottuvuudella kuvataan eri aallonpituuskaistoista otetuista kuvista koostuvia tasoja. (Elmasry ym. 2012)

Hyperspektraalinen kuvatieto voidaan tuottaa monin tavoin, kuten pistepyyhkäisyllä, viivapyyhkäisyllä tai säädettävällä aallonpituussuotimella. Pistepyyhkäisyssä kuva tuotetaan piste pisteeltä, viivapyyhkäisyssä kuva skannataan viiva viivalta yhdensuuntaisesti ja aluekuvauksessa (aallonpituusskannaus) kuva koko kohteesta tai alueesta tuotetaan yhdellä aallonpituudella kerrallaan (Elmasry ym. 2012). Hyperspektrimittauksessa kertyy valtavasti spektridataa. Kuvadatan tulkintaan tarvitaankin pitkälle kehittyneitä kemometrisiä menetelmiä (Thomas ym. 2018).

Detektorityypistä riippuen hyperspektikuvia voidaan muodostaa valon eri aallonpituusalueilla: ultraviolettialueella (UV) 200–400 nm, näkyvän ja lähi-infrapuna-alueella (VIS/NIR) 400–1000 nm ja lyhytaaltoinfrapuna-alueilla (SWIR) 900–1700 nm tai 1000–2500 nm (Elmasry ym. 2012).

Hyperspektrikuvantamista käytetään laajalti eri teollisuudenaloilla. Hyperspektrikuvantamista on käytetty kalan laadun ja turvallisuuden arviointiin. Sitä on käytetty erilaisten kalan tuoreutta ilmaisevien indikaattoreiden, kuten haihtuvien typpiyhdisteiden (TVB-N) (Cheng ym. 2017), tiobarbituraattihapon reaktiivisten yhdisteiden (TBARS) (Dai ym. 2015) ja bakteerien kokonaismäärän (Khoshnoudi-Nia ym. 2018) sekä aistittavan laadun (Cheng ym. 2015) arviointiin. Lisäksi sitä on käytetty kemiallisten koostumuksen, kuten rasvan, kosteuden ja suolapitoisuuden määrittämiseen.

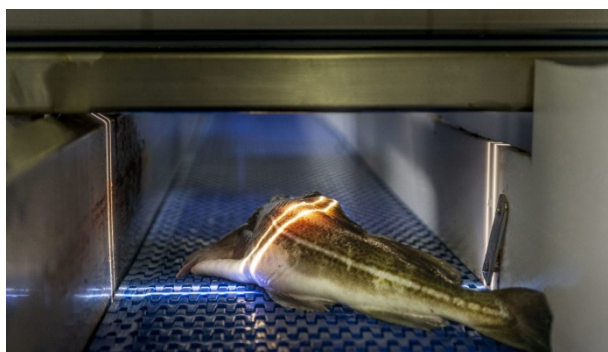
Khoshnoudi-Nia & Moosavi-Nasab (2019) kehittivät multispektraalisen kuvantamismenetelmän kirjolohifileiden kemiallisen, mikrobiologisen ja aistinvaraisen laadun yhtäaikaiseen määrittämiseen. Työssään he kuvasivat lohifileitä (*O. mykiss*) 12:n vuorokauden ajan aallonpituusalueella 430–1010 nm. Hyperspektridata käsiteltiin kemometrisesti. Samoista näytteistä määritettiin haihtuvat typpiyhdisteet (TVB-N), psyktrotrofisten bakteerien kokonaismäärä (PPC) sekä arvioitiin aistinvaraisesti. Tuloksen mukaan multispektrikuvantamisella voidaan ennustaa kirjolohen kemiallista, mikrobiologista ja aistinvaraista laatua yhtäaikaisesti, joskin vielä tarvitaan kemometristen menetelmien kehittämistä. Taulukkoon 7 on koottu esimerkkejä hyperspektrikuvantamisen käytöstä kalan ja kalatuotteiden laadun arvioinnissa.

Taulukko 7. Esimerkkejä hyperspektrikuvantamisen käytöstä kalan ja kalatuotteiden laadun arvioinnissa.

Ominaisuus	Kalalaji	Aallonpituus (nm)	Viite
Kosteus, rasva	Ruijanpallas (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>), kissakala (<i>Ictalurus punctatus</i>), turska (<i>G. morhua</i>), Japanin makrilli (<i>Scomber japonicus</i>), silli (<i>C. harengus</i>), seiä (<i>Pollachius virens</i>)	760–1040	Elmasry & Wold (2008)
Suola, rasva	Lohi (<i>S. salar</i>)	760–1040	Segtnan ym. (2009a, 2009b)
Pigmentti (astaxanthin)	Kirjolohi (<i>O. mykiss</i>)	385–970	Dissing ym. (2011)
Sukkulamadot	Turska (<i>G. morhua</i>)	400–1000	Sivertsen ym. (2011)
Luokittelu	Lohi (<i>S. salar</i> L.)	400–1100	Sone ym. (2012)
TVB-N	Ruohokarppi (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	400–1100	Chen ym. (2017)
TVB-N, PPC, aistinvarainen laatu	Kirjolohi (<i>O. mykiss</i>)	430–1010	Khoshnoudi-Nia & Moosavi-Nasab (2019)

Hyperspektrikuvantamisella on paljon sovelluskohteita Suomessa myös kala-alalla. Nofiman kehittämä teknologia (ks. kohta kaupalliset laitteet) voisi soveltua vaalealihaisen kalan, silakan, luokitteluun, mutta se pitäisi testata. Nofima on kehittänyt hyperspektriteknologiaan perustuvan teknologian (Kuva 10), jolla turskat voidaan lajitella automaattisesti jo ennen kuin ne toimitetaan jalostamoille. Hyvälaatuisen (suolistetun) kalan liha on valkoinen ja hieno. Suolistamattoman tai kalastuksen yhteydessä vaurioituneeseen kalan lihaan muodostuu veritahroja ja -hyytymiä. Kalat valaistaan tuotantolinjalla ja lihaksen veripitoisuus arvioidaan anturiin heijastuvien valosignaalien perusteella. Näin kalat voidaan lajitella eri laatuluokkiin niiden veripitoisuuden perusteella. Kone pystyy mittaamaan ja analysoimaan kalat kuljetinhihnalla nopeudella kaksi metriä sekunnissa. (Sciencenorway, 2019)

Suomestakin löytyy hyperspektrikuvantamiseen erikoistuneita yrityksiä, joilta löytyy eri aallonpituusalueilla toimivia eri käyttötarkoituksiin soveltuvia hyperspektrikameroita. Uusi sovellusalue vaatii kuitenkin kehitystyötä.



Kuva 10. Nofiman kehittämä hyperspektriteknologiaan perustuva teknologia, jolla turska voidaan automaattisesti lajitella jo ennen kuin se toimitetaan jalostamoille. Kuva julkaisijan © Norsk Elektro Optikk luvalla <https://partner.sciencenorway.no/fish-fisheries-nofima/using-light-to-ascertain-the-quality-of-fish-has-the-potential-to-revolutionize-the-fishing-industry/1594685>

4.8. Elektroninen nenä

Elektroninen nenä (EN, tekonenä) koostuu näytteensyöttöjärjestelmästä, sensorikammiosta sekä tietokoneesta. EN sisältää useita erilaisia sensoreita, joilla on osittainen spesifisyys suurelle joukolle haihtuvia yhdisteitä. Nämä sensorit on kytketty näytteen tunnistamiseen kykenevään hahmontunnistusjärjestelmään. Kun haihtuva yhdiste adsorboituu sensorin pinnalle, muuttuvat sensorin johtokyky, resonanssitaajuus tai optiset ominaisuudet (fluoresenssi, adsorptio) sensorin tyyppin mukaisesti. Muutokset rekisteröidään tietokoneella spektreinä ja näytteet tunnistetaan muodostamalla niistä "sormenjälkiprofiilileja" erilaisten tilastollisten menetelmien, kuten pääkomponenttianalyysin (PCA, Principal component analysis), multilineaarisen regression (MLR) ja keinotekoisien neuroverkkojen (ANN, Artificial Neural Network), avulla. Tekonenän tärkeimpiä ominaisuuksia ovat herkkyys, nopeat reaktio- ja palautumisajat ja osittainen selektiivisyys aineryhmille. Lisäksi sensoreiden pitäisi olla mahdollisimman epäherkkiä ulkoisten olosuhteiden muutoksia kohtaan. Elektronisen nenän sovellutuksia kehitettäessä on syytä käyttää vertailumenetelmiä, joiden avulla voidaan arvioida tekonenän erottelukykyä tutkittaville näytteille ja löytää perusteet näytteiden erottumiselle. Tällaisia vertailumenetelmiä ovat esimerkiksi aistinvarainen arviointi, haihtuvien yhdisteiden määrittäminen kaasukromatografisesti ja mikrobiologiset määrittäykset. (Albers ym. 2003)

Tekonenää hyödynnetään monilla aloilla (Karakaya ym. 2020):

- elintarvike- ja juomateollisuus (laadun arviointi, säilyvyyden ja pilaantumisen valvonta, vaarallisten kemikaalien tai bakteerien havaitseminen ja luokittelu).
- maa- ja metsätalous (hedelmät, vihannekset, kukat, kasvit, tupakka ja vastaavat tuotteet vapauttavat erityisiä haihtuvia orgaanisia yhdisteitä yhdisteet, jotka voidaan havaita E-nenällä; hedelmien ja kasvien laadun ja kypsyyden seuranta, torjunta-ainejäämien havaitseminen)
- lääketiede ja terveydenhuolto (sairauksien havaitseminen, esimerkiksi astma, syöpä ja tuberkuloosi)
- sisä- ja ulkoilmanlaadunseuranta
- turvallisuus (räjähteiden toteaminen).

Elektronista nenää voidaan hyödyntää kalalajien lajittelussa. Güney & Atasoy (2015) pystyivät erottamaan kolme erilaista kalalajia, piikkimakrillin, sardellin ja valkoturskan, toisistaan käyttämällä elektronista nenää. Keinonenää voidaan käyttää myös kalan tuoreuden tai pilaantumisen arviointiin. Sen avulla voidaan esimerkiksi havainnoida mikrobien tuottamia haihtuvia yhdisteitä niin kylmäsavustetuista kuin tuoreista lohifileistä (Olafsdottir ym. 2005). Teknologiaa voidaan hyödyntää myös laaduntarkkailussa. Li ym. (2020) raportoivat, että keinonenän avulla voitiin tunnistaa ja erottaa varastoidun kalajauhon erilaiset tuoreusasteet. Menetelmän avulla voitiin arvioida kalajauhon happoluku ja TVB-N-arvo ja siten määrittää kalajauhon tuoreus kvantitatiivisesti.

Ranskalaisen Alpha MOSin Heracles Neo (Kuva 11) on laboratoriotason laite, jolla lukuisia sovelluksia muun muassa tuotteiden laadun ja yhdenmukaisuuden seurantaan, tuotekehityksen tueksi sekä ruokaväarennösten havaitsemiseen.



Kuva 11. Heracles Neo -laitteisto, Alpha MOS, Ranska (<https://www.alpha-mos.com>) on etenkin laboratoriokäyttöön suunnattu elektroninen nenä. Kuva Alpha MOSin luvalla <https://www.alpha-mos.com/sites/default/files/alphamos/images/photo-heracles-neo-autosampler-computer-operator2.jpg>

Sensigentin valmistama Cyranose® 320 (Kuva 12) on kannettava mittauslaite. Valmistajan sivulta löytyy lista julkaisuista, joissa laitetta on hyödynnetty erilaisissa sovelluksissa (<https://www.sensigent.com>).



Kuva 12. Mittauslaite Cyranose® 320, Sensigent, USA (<https://www.sensigent.com>). Kuva Sensigent'in luvalla <http://www.sensigent.com/products/cyranose.html>.

Ohessa linkkejä muiden laitevalmistajien sivuille:

<https://aryballe.com/>

<https://airsense.com/en>

<http://www.roboscientific.com/products/model-307b/>

<http://e-nose.asia/index.php?lang=en>

4.9. Elektroninen kieli

Elektronisen kielen toimintaperiaate on sama kuin keinonenässä sillä erotuksella, että siinä näyte on kosketuksissa anturiin. Keinokielet soveltuvat käytettäväksi nestemäisten elintarvikkeiden makuominaisuuksien määrittämiseen. Mittauslaite koostuu kolmesta osasta: anturi-, signaalinkeruu- ja hahmontunnistusjärjestelmät. Yleisimmin käytetyt anturit ovat joko potentiometriä tai amperometriä. Alun perin keinonenää sovellettiin viiden perusmaun erottamiseen ja analysointiin mutta vähitellen siitä on tullut käyttökelpoinen työkalu elintarvikeväärenösten, aitouden ja lääkejäämien havaitsemiseksi. Perinteiset menetelmät, kuten massaspektrometria, sähkökemiallinen analyysi ja aistinvaraisen arvioinnin raati voivat olla aikaa vieviä, kalliita, ja niitä ei voida käyttää online-mittauksiin, koska vaihtelua esiintyy usein ihmisen väsymyksen tai stressin takia. Keinokielen etuja perinteisiin menetelmiin nähden ovat näyttöiden tuhoutumattomuus testauksessa, mahdollisuus myrkyllisten aineiden analyysiin sekä objektiivinen arviointi yleensä ilman näyttöjen esikäsittelyä. Elektronisen kielen käyttö onkin laajentunut muun muassa lääketeollisuuteen, ympäristön ja käymisprosessien seurantaan. Keinokielimenetelmien heikkous ihmiseen verrattuna on kuitenkin se, että ne ovat usein herkkiä ympäristökijöiden, kuten esimerkiksi lämpötilan vaikutukselle. (Jiang ym. 2018)

Keinokieltä on mahdollista käyttää myös kalan tuoreuden arviointiin. Rodriguez-Mendez ym. (2009) määrittivät suutarin (*Tinca tinca*) pilaantumisasasteen analysoimalla biogeenisten amiinien muodostumista keinokielen avulla. Han ym. (2015) osoitti, että keinokieltä voidaan käyttää kalan mikrobiologisen laadun määrittämiseen. Han ym. (2019) ovat kehittäneet keinokielen, jonka avulla hän pystyttiin samanaikaisesti ja kvantitatiivisesti arvioimaan kolmen raskasmetallin kadmiumin, elohopean ja lyijyn, jäämät ruutanasta. Menetelmä on kirjoittajien mukaan sovellettavissa myös muihin kalatuotteisiin. Ruiz-Rico ym. (2013) luokittelivat keinokielen avulla kylmäsäilytetyt (4 °C) turskat tuoreisiin (varastoitu ≤ 1 vrk) ja pilaantuneisiin (varastoitu ≥ 4 vrk). Keinokielellä saadut tulokset olivat verrannollisia fysikaalis-kemiallisten ja mikrobisten määrittämenetelmien (kosteuspitoisuus, TVBN ja ATP:iin liittyvät yhdisteet) avulla saatujen tulosten kanssa. Tämän tutkimuksen perusteella elektronista kieltä voidaan soveltaa rutiininomaiseen laadunvalvontaan toimitusketjun missä tahansa vaiheessa. Sähköistä kieltä käyttämällä havaittiin myös makueroja eri kalalajien (*Thamnaconus modestus*, *Sebastiscus marmoratus*, *Inimicus japonicus* ja *Pagrus major*) lihan happamuuden, karvauuden, umamin ja suolaisuuden suhteen (Mabuchi ym. 2018).

Markkinoilla on myös kaupallisia elektronisia kieliä (Kuva 13). Niitä käytetään elintarvikkeiden, juomien ja lääkkeiden makujen arviointiin. Laitteita voidaan soveltaa tutkimukseen ja tuotekehitykseen, laadunvalvontaan ja laadunvarmistukseen.



Kuva 13. Astree-mittauslaite, Alpha MOS, Ranska (<https://www.alpha-mos.com>). Kuva Alpha MOSin luvalla <https://www.alpha-mos.com/sites/default/files/alphamos/images/photo-astree-autosampler-computer-operator2.jpg>

4.10. Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia - NMR

Ydinmagneettinen resonanssispektrometria (NMR, nuclear magnetic resonance spectrometry) perustuu sähkömagneettisten aaltojen määrittämiseen radiotaajuusalueella. NMR-tekniikalla saadaan tarkkaa ja yksityiskohtaista tietoa näytteen kemiallisesta koostumuksesta ja molekyyli-rakenteista. Molekyylin NMR-spektri on ikään kuin molekyylin sormenjälki, jonka perusteella se voidaan tunnistaa ja tehdä sen rakenteesta päätelmiä. Menetelmällä voidaan analysoida seoksia molekyyli-tasolla nopeasti ilman, että tarvitaan erottamis- ja/tai puhdistusvaiheita (Hatzakis 2018).

NMR-tekniikkaa voidaan soveltaa monipuolisesti kalan koostumuksen ja laatua määrittävien yhdisteiden mittaamiseen. NMR-menetelmällä saadaan tarkkoja ja spesifisiä tuloksia nopeasti. NMR-tekniikkaa on käytetty esimerkiksi kalan rasvahappopitoisuuksien määrittämiseen, kalan laatuun liittyvien nukleotidien ja nukleosidien määrittämiseen, kalan alkuperän tunnistamiseen, sekä tuoreen ja jäädytetyn-sulatetun kalan erottamiseen kemiallisten markkeriyhdisteiden perusteella. (Erikson ym. 2012)

Monista eduistaan huolimalla NMR-menetelmien käyttöönottoa rajoittaa NMR-laitteiden kallis tekniikka sekä määrittämiin tarvittavat spesifiset kalibroinnit. Toisaalta, kun kalibroinnit ovat kunnossa, menetelmä on helppokäyttöinen. Perinteiset laitteistot vaativat erillisen näytteenoton, jolloin tulee kiinnittää huomiota edustavien ja homogeenisten näytteenottamiseen. Viime aikoina on kehitetty ja kaupallistettu matalan resoluution laitteita, jotka ovat halvempia ja pienempiä sekä paremmin sovellettavissa teollisuuteen (Hatzakis 2018), esimerkkipuote laitteistosta on esitetty Kuvassa 14. Uutta tekniikkaa edustaa esimerkiksi kuljetettava laite (ns. NMR mouse), joka mahdollistaa jopa alle 20 s analyysiajan ja on-line - ja in vivo -analyysit (<https://www.sensor-test.de/ausstellerbereich/upload/mnpdf/en/profilemouse.pdf>). NMR-menetelmällä on monipuolista potentiaalia silakan laadun määrittämiseen ja laatuun vaikuttavien tekijöiden tunnistamiseen. Viime aikoina kehitettyjen laitteiden ja tekniikan soveltuvuutta laadun määrittämiseen ketjun eri vaiheissa tulisi selvittää lisää.



Kuva 14. Helppokäyttöinen ja nopeatoiminen NMR-laite tutkimuskäyttöön. Laitetta myy Buck Scientific. Kuva: Nanalysis Corp. luvalla <https://www.bucksci.com/products/nmr-benchtop-spectrometer>.

4.11. Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetri – DSC

Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetri (engl. differential scanning calorimetry, DSC) mittaa faasimuutoksiin ja kemiallisiin reaktioihin liittyvää entalpiaa ja määrittää lämpötilan, jossa nämä prosessit tapahtuvat. Tekniikkaa käytetään mm. materiaalien tunnistamiseen ja karakterisointiin. Mittaukset voivat antaa sekä määrällistä että laadullista tietoa fysikaalisista ja kemiallisista muutoksista, joihin liittyy endoterminen (energiaa kuluttava) ja eksoterminen (energiaa tuottava) prosessi, tai muutoksia lämpökapasiteetissa (Gill ym. 2010).

DSC sopii hyvin elintarvikkeiden analysointiin, koska valmistusprosesseihin liittyy usein kuumennus ja/tai jäädyttäminen. DSC-menetelmää voidaan käyttää sekä laadunvalvontaan että T&K tarkoituksiin. DSC on helppo käyttää eikä useimmissa tapauksissa vaadi erityistä näytteen valmistelua. Menetelmä soveltuu sekä kiinteiden että nestemäisten elintarvikkeiden analysointiin (Gill ym. 2010; Biliaderis 1983). Tyypillisiä määrytyksiä, joita elintarvikkeilla tehdään DSC-menetelmällä ovat öljyjen, rasvojen ja levitteiden sulamis- ja hyytymislämpötilat, polysakkariidien gelatoituminen ja kristallisaatio, sekä proteiinien denaturoituminen ja aggregaatio (Farkas & Mohácsi-Farkas 1996). Kala ja kalatuotteet ovat tyypillisesti herkkiä lämpötilan muutoksille. DSC on edullinen ja helppokäyttöinen menetelmä, jota voidaan hyödyntää tunnistamaan lämpötilaan liittyviä muutoksia kalan laadussa, erityisesti kalan rakenteeseen liittyviä muutoksia. Menetelmällä voidaan tuottaa soveltuvaa tietoa myös uusien kalatuotteiden kehittämisessä.

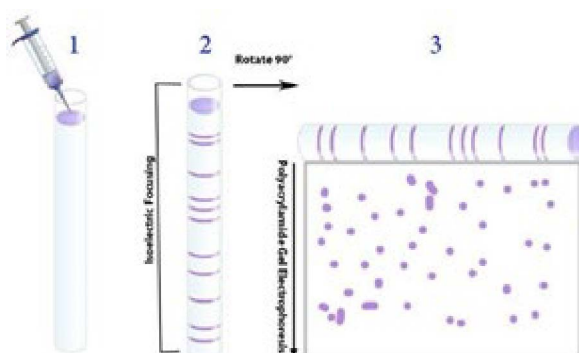
DSC-laitteistoja on saatavilla analyttisestä laboratoriomittakaavasta teolliseen mittakaavaan. Kuvassa 15 on esitetty esimerkkinä kaupallisesti saatavilla oleva laitteisto, joka soveltuu sekä teollisuuden että tutkimuksen käyttöön tuotekehityksessä ja laadunvalvonnassa.



Kuva 15. DCS 8000 -differentiaalinen pyyhkäisykalorimetri. Kuva PerkinElmerin luvalla <https://www.perkinelmer.com/fi/product/dsc-8000-lab-system-n5340511>.

4.12. Kaksiulotteinen elektroforeesi (2DE)

Kaksiulotteisella polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (engl. two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE) tarkoitetaan proteiinianalyysiä, jossa näytteen proteiinit erotellaan ensin isoelektrisen pisteensä perusteella (isoelektrinen fokusointi) ja sen jälkeen edelleen molekyylipainon perusteella (SDS-PAGE) toisiaan vastaan kohtisuorissa suunnissa. Isoelektrinen fokusointi erottaa proteiinit niiden isoelektristen pisteiden perusteella. Ajo suoritetaan ohuessa kapillaariputkessa, johon valettuun geeliin muodostetaan pH-gradientti liuosten avulla sähkökentässä. Kun proteiinit joutuvat gradienttiin sähkökentässä, ne liikkuvat varauksensa mukaisesti joko anodia tai katodia kohti. Ne lähestyvät omaa isoelektristä pistettään, jossa niiden nettovaraus on nolla, ja pysähtyvät siihen. Tämän jälkeen samasta näytteestä ajetaan SDS-PAGE kohtisuorassa suunnassa, jolloin isoelektrisen pisteensä mukaisesti erottuneet proteiinit erottuvat toisistaan vielä molekyylipainonsa mukaan. Proteiinit paikannetaan geelistä sopivalla menetelmällä (proteiinivärjäys- tai vasta-aineperusteinen Western blot) analysointia varten. Kuva 16 havainnollistaa menetelmän kulkua ja tulokseksi saatavaa proteiinikarttaa. Menetelmän erotuskyky on yksiulotteista geelielektroforeesia parempi, ja sillä pystytään erottamaan samanaikaisesti huomattavan suuria määriä erilaisia proteiineja toisistaan.



Kuva 16. Kaksisuuntaisen geelielektroforeesin toimintaperiaate. Kuva Creative Proteomicsin luvalla <https://www.creative-proteomics.com/services/2d-electrophoresis-2.htm>. Ensimmäisessä vaiheessa proteiinit erotellaan isoelektrisen pisteensä perusteella ja toisessa vaiheessa edelleen molekyylipainon perusteella. Tuloksena saadaan ns. proteiinikartta.

Elintarviketieteiden alueella 2DE on ollut käytössä melko pitkään, ainakin kaksi vuosikymmentä. Tässä ajassa elektroforeesitekniikka ja proteiinipisteiden tunnistamiseen käytettävät ohjelmistot ovat kehittyneet siten, että menetelmä on nykyään edullisempi sekä toistettavuudeltaan ja

erotuskyvyltään parempi aiempaan verrattuna. Kalan laatuun liittyen tyypillisiä sovelluskohteita ovat kala- ja äyriäistuotteiden proteomitutkimukset (Kjærsgård ym. 2006; Piñeiro ym. 1998) ja alkuperän todentamiseen (Martinez & Jakobsen Friis 2004; Martinez ym. 2007) sekä vesiviljelyyn ja kalojen fysiologiaan liittyvät tutkimukset (Kjærsgård & Jessen 2003).

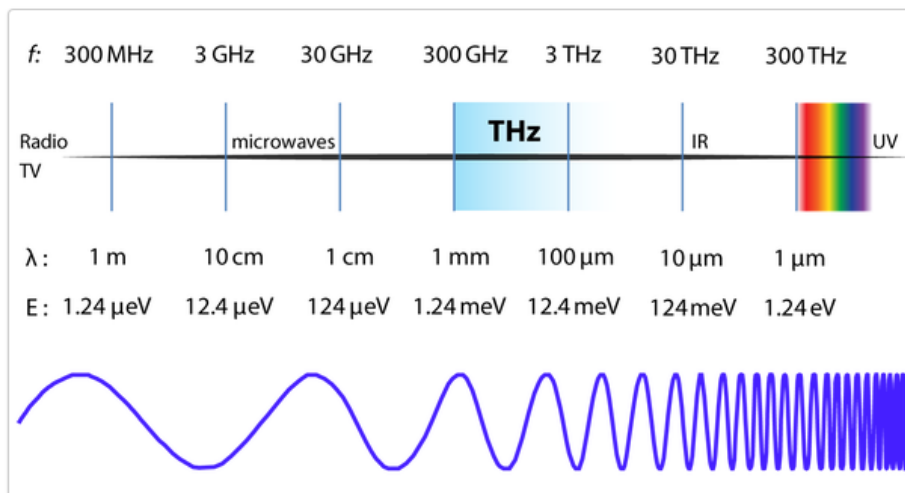
2DE on ensisijaisesti tutkimuskäyttöön sopiva menetelmä. Se tarjoaa paljon yksityiskohtaista ja syvällistä tietoa kalan proteiineista liittyen esimerkiksi kalan laadun muodostumiseen kalan elinkaaren aikana. Menetelmä vaatii monivaiheisen ja varsin tarkan näytteiden esikäsittelyn ja tulosten tulkinta syvällistä tieteellistä asiantuntemusta proteomiikasta. Tämän vuoksi menetelmä ei sellaisenaan toimi nopeana analyysityökaluna kalan laadun määrittämiseen kalastusaluksilla ja/tai prosessoinnissa. Toisaalta menetelmä tarjoaa monipuolisia mahdollisuuksia silakan laadun muodostuksen syvällisempään ymmärrykseen sekä laatuun liittyvien markkeriyhdisteiden ja biokemiallisten reaktioiden tunnistamiseen. Tämä tieto voi auttaa kehittämään uusia tehokkaita menetelmiä laadunvarmistukseen ja parantamiseen. Laboratoriokäyttöön tarkoitettuja 2DE -laitteistoja on saatavilla kaupallisesti useilta laitevalmistajilta, esimerkiksi 2-D Electrophoresis, Bio-Rad Laboratories Inc., USA (Kuva 17).



Kuva 17. 2DE-analysilaitteisto ja reagenssit. Kuva: Bio-Rad Laboratories Inc., USA luvalla <https://www.bio-rad.com/en-fi/category/2-d-electrophoresis?ID=6916a228-0f95-4b26-a37a-5e4afe76add7>

4.13. Terahertsispektroskopia ja -kuvannus

Terahertsialue (THz) tarkoittaa sähkömagneettisen spektrin hyvin kapeaa aluetta mikroaalto- ja infrapuna-alueiden välillä, taajuusalueella 0,1–10 THz. THz-alue sähkömagneettisessa spektrissä on havainnollistettu kuvassa 18. THz-aalloilla on ainutlaatuisia ominaisuuksia, jotka vastaavat osin mikro- ja infrapuna-aaltojen ominaisuuksia. Terahertsiaallot voivat tunkeutua ja olla vuorovaikutuksessa monien yleisesti käytettyjen materiaalien kanssa, mikä tekee niistä sopivia sekä perustutkimukseen että teollisuuteen. THz-säteily on erinomainen ei-ionisoiva vaihtoehto röntgensäteille, koska sillä pystytään tuottamaan korkean resoluution kuvia kiinteän kappaleen sisältä. Monilla yhdisteillä on ainutlaatuiset absorptio- ja hajontaominaisuudet THz-alueella. THz-spektroskopiolla ja -kuvannuksella voidaan tehdä määrittämiä kahdella eri tavalla: a) taajuusalueääritykset käyttäen THz-lähdettä ja detektoria jatkuvatoimisesti sekä b) aika-alueääritykset (engl. THz time domain spectroscopy). (Gowen ym. 2012)



Kuva 18. THz-alue sähkömagneettisessa spektrissä. Kuva Boston Electronicsin luvalla <https://blog.3g4g.co.uk/2018/07/terahertz-and-beyond-100-ghz-progress.html>.

Tekniikka kehitettiin 1990-luvun alkupuolella, mutta tekniikan kalleus ja säteilylähteiden sekä detektorien tehottomuus rajoittivat tuolloin tekniikan laajempaa käyttöönottoa. Viime aikoina on tapahtunut merkittävää kehitystä säteilylähteiden ja detektorien tekniikassa, mikä on parantanut menetelmän suorituskykyä huomattavasti. Huomattavaa vaikutusta on ollut esimerkiksi lasertekniikan kehittymisellä. Kehityksen myötä THz-spektroskopia ja -kuvantaminen on siirtynyt laboratoriomittakaavan tekniikasta monipuolisiksi kuvantamisvälineeksi, jolla on monia käytännön sovelluksia, joista yksi esimerkki on elintarvikkeiden laadunvalvonta. (koostartikkeli Afsah-Hejri ym. 2019)

Viime vuosina THz-spektroskopian ja -kuvantamisen on todettu olevan lupaava menetelmä elintarvikkeiden tarkastamiseen ja laadunvalvontaan. THz-spektroskopiolla saadaan sekä laadullista että määrällistä tietoa elintarvikkeenäytteistä. THz-tekniikan tärkeimpiä sovelluksia elintarviketeollisuudessa ovat kosteuden ja vierasesineiden havaitseminen ja laadunvalvonta. Muita THz-spektroskopian sovelluksia elintarviketeollisuudessa ovat haitallisten yhdisteiden, antibioottien ja mikro-organismien havaitseminen (Gowen ym. 2012). THz-spektroskopia on hyvä työkalu myös elintarvikkeiden koostumuksen, esimerkiksi hiilihydraattien, aminohappojen, rasvahappojen ja vitamiinien määrittämiseen (koostartikkeli Afsah-Hejri ym. 2019).

THz-tekniikan käyttöä rajoittavat sirontavaikutus, rajallinen herkkyys ja se, että elintarvikkeiden yhdisteille ei ole vielä saatavilla kattavaa tietokantaa. THz-spektroskopia on edelleen myös melko kallis tekniikka. Myös skannausnopeutta tulee kehittää seuraavissa THz-järjestelmissä. Haasteista huolimatta THz-tekniikka on jo vakiintunut elintarviketeollisuudessa tehokkaana työkaluna havainnointiin ja kvantitointiin (koostartikkeli Afsah-Hejri ym. 2019). THz-spektroskopia ja -kuvantaminen vaikuttavat monipuolisuutensa vuoksi lupaavalta menetelmältä silakan laadun analysointiin. Menetelmän mahdollisuudet ulottuvat kemiallisten yhdisteiden ja mikro-organismien analysoinnista vierasesineiden havaitsemiseen. Menetelmän sovellusmahdollisuutta, sopivien yhdisteiden löytymistä tietokannoista ja kustannustehokkuutta tulisi tutkia lisää.

Kaupallisia laitteita löytyy moniin eri käyttötarkoituksiin (Kuva 19). Teollisuuden käyttöön on saatavilla terahertsikuvantamiseen tarkoitettuja kameroita ja skannereita, jotka soveltuvat käytettäväksi monien teollisten prosessien tarkkailuun. Kameran tai skannerin lisäksi kuvantamista varten tarvitaan säteilylähde.



Kuva 19. Terahertsikamera vasemmalla, -skanneri keskellä ja säteilylähde oikealla (Mesurex, Spain). Kuvat Terasensen www.terasense.com luvalla <https://www.mesurex.com/en/products/terahertz-cameras-and-sensors>

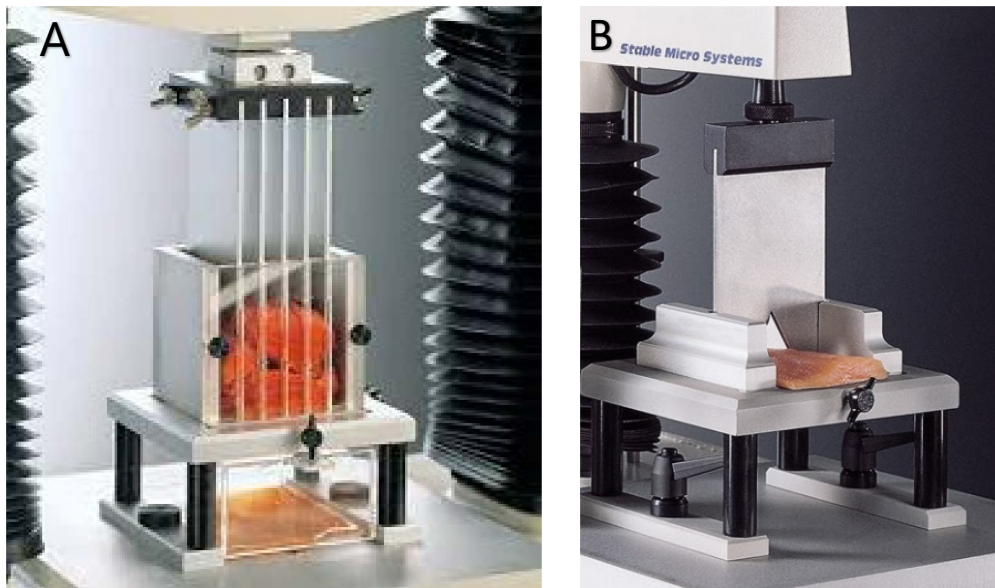
4.14. Rakenteen mittaus

Rigor mortis -tilassa kalan liha pehmenee helposti, mikä luonnollisesti vaikuttaa sen rakenteeseen. Siksi kalojen tuoreutta arvioidaan pääasiassa niiden rakenteen perusteella. Rakenneparametrien avulla myös tutkitaan ja arvioidaan kalan laatua arvoketjussa seuraamalla erilaisten kalan käsittely- ja prosessointimenetelmien vaikutusta kalan säilyvyyteen ja kuluttajahyväksyntään. Erityisesti kalan käsittely- ja prosessointilämpötilojen on havaittu vaikuttavan suuresti kalan rakenteeseen. Yleisimmät rakennevirheet ovat kalan lihasten pehmeneminen ja lihasjaokkeiden irtaantuminen (gaping). Nämä ongelmat liittyvät enimmäkseen kemiallisen koostumuksen muutoksiin ja lihasproteiinien hajoamisiin. Kalan rakenteeseen ja rakenteen mittaukseen vaikuttavat erilaiset **fyysiset** (kalalajit, ikä ja koko, rehun aineosat, näytteen heterogeenisuus ja lihasjaokkeiden irtaantuminen), **kemialliset** (vesipitoisuus ja sen jakauma, rasvapitoisuus ja sen jakauma sekä kollageenipitoisuus) ja **prosessitekniset tekijät** (varastointiaika ja lämpötila, jäädyttäminen, jäähdytys, sekä suolaaminen ja savustus). (Cheng ym. 2014)

Kalan rakenteeseen liittyvää laatua mitataan joko aistinvaraisin menetelmin tai rakennemittareilla. Perinteinen aistinvarainen menetelmä on ns. sormitesti. Siinä arviointi suoritetaan painamalla kalaa tai kalafilettä sormella. Tulos perustuu suurelta osin asiantuntijapaneelin subjektiiviseen arviointiin. Rakennemittareilla saatujen tulosten on osoitettu olevan täsmällisempiä kuin aistinvaraisilla menetelmillä, koska niissä inhimillisistä tekijöistä johtuva vaihtelu on vähäisempää. (Cheng ym. 2014)

Kalan rakenteen mittaukseen ja arviointiin käytettävät instrumentaalitekniikat ja -menetelmät perustuvat leikkaus-, lävistys-, jännitys- tai puristusvoiman mittaamiseen. **Leikkausvoiman** määrittämiseen käytetään joko Kramer tai Warner-Bratzler -leikkauskennoa. Kramer-leikkauskenno sisältää yläosan terineen, joka painetaan näytteen sisältävään laatikkoon, jossa on raot terille (Kuva 20 A). Laite ilmoittaa tuloksen leikkausvoima-aika -kuvaajana. Menetelmä sopii ns. bulk-näytteiden mittaamiseen. Näyte valmistetaan mittaukseen joko siten, että keiton jälkeen kalafileet pilkotaan, sekoitetaan huolellisesti ja pakataan yhtenäiseksi kerrokseksi laatikkoon tai laatikkoon levitetään tasaisesti vakiomäärä kuutioitua ja kypsennettyä kalalihaa. Sitä on käytetty myös vertailumenetelmänä ei-hajottavien mittausten, kuten UV/VIS-spektroskopian, kanssa (Isaksson ym. 2002). Menetelmä vaatii suhteellisen paljon näytettä ja on aikaa vievä.

Warner-Bratzler -leikkauskenno puolestaan koostuu terästä, jossa on kaksi leikkuureunaa 60 asteen kulmassa ja joka tunkeutuu tasoon, jossa on rako (Kuva 20 B). Terä leikkaa näytteen kuten giljotiini ja näytteeseen kohdistuu siten monimutkainen jännitys-, puristus- ja leikkausvoimien yhdistelmä.



Kuva 20. A) Kramer-leikkauskennno. Kuva Stable Micro Systems:in luvalla <https://3.bp.blogspot.com/-6zQ0RbXC4to/U57gXyjdRGI/AAAAAAAAA A/EBTLHJyBwhw/s1600/kramer-cell.jpg>
B) Warner-Bratzler -leikkauskennno. Kuva Stable Micro Systems:in luvalla <https://3.bp.blogspot.com/-mbVIOY3Ajs4/UvltXhtzJ1I/AAAAAAAAAmQ/M611R4MqBts/s1600/blade-fish.jpg>

Lävistystestissä mitataan voimaa, jolla kartiomainen, lieriömäinen tai kiilamainen mittauspää uppoaa elintarvikkeeseen tai murtaa mitattavan elintarvikkeen rakenteen (Kuva 21). Laite ilmoittaa tuloksen voima-aika -kuvaajana, josta käy ilmi mittaukseen kulunut aika sekä murtaamiseen tarvittava voima. Käyrä nousee ylöspäin, kunnes elintarvikkeen rakenne antaa periksi, jolloin käyrä alkaa äkillisesti laskea. Mittauspää tunkeutuu joko vakiosyvyyteen tai murtumispisteeseen. Käytetty voima voi kasvaa lineaarisesti tai vakiona. Testiä tehdessä pitää miettiä, millaista tukea käyttää tutkittavan elintarvikkeen alla, koska vääränlainen tuki saattaa aiheuttaa virheitä tuloksiin. Mitattavan tuotteen tulisi olla kolme kertaa suurempi kuin mittauspää tai murenevilla tuotteilla jopa enemmän. (Vallin, 2016)



Kuva 21. Kalafileen kiinteyden mittaus palloanturilla. Kuva Stable Micro Systems:in luvalla <https://www.stablemicrosystems.com/images/secondary-image/food/spherical-probe-fish.jpg>

Vetotestauksessa näyte kiinnitetään kahden puristimen väliin vakioetäisyydellä toisistaan (Kuva 22). Kuormausvarsi (kiinnitetty yläpuristimeen) liikkuu ylös vakionopeudella venyttäen näytettä. Näyte muuttaa muotoaan ensin elastisesti ja sitten plastisesti. Jos näytteen rikkomiseen vaadittava voima on kuormituskennon rajoissa, tapahtuu murtuma.

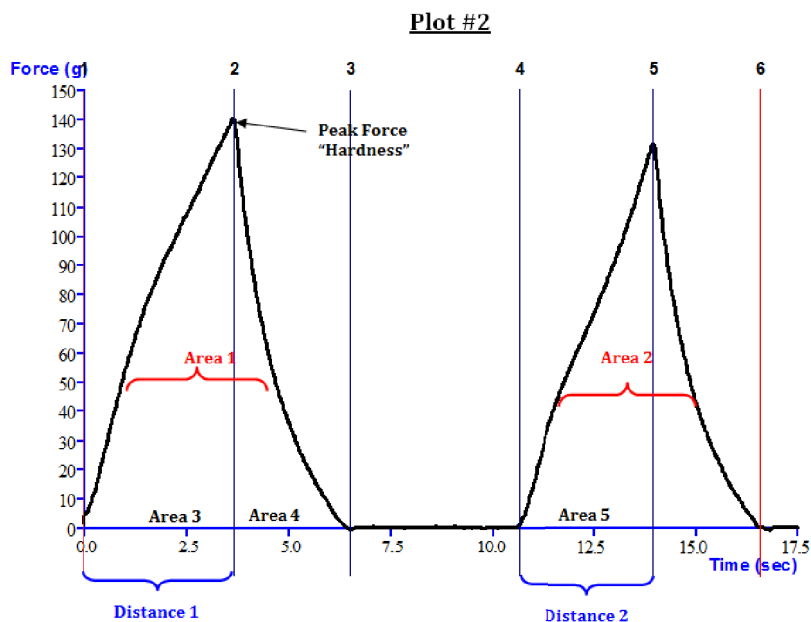


Kuva 22. Vetotestauslaitteisto. Kuva Stable Micro Systems:in luvalla <https://3.bp.blogspot.com/-ZOVH2wu8DXs/W2L8uJjo3LI/AAAAAAAAAGQI/z7RLXIEq6NcoPs5vPHPVSdId-VuJyZNNwACLcBGAs/s320/hdplus-tensile.jpg>

Mitattava näyte leikataan käsipainon muotoiseksi tai liuskoiksi. Jos näytettä ei valmisteta huolellisesti, se voi johtaa puristimien luistamiseen tai näytteen ennen aikaiseen murtumiseen. Mittaamalla vedon aikaista voimaa ja kappaleen venymää saadaan voima-venymäkäyrä, jonka avulla voidaan laskea muun muassa venytettävän näytteen vetolujuus ja murtovenymä. Vetolujuus (Tensile strength, TS, MPa) lasketaan jakamalla maksimivoima (N, joka tarvitaan näytekalvon katkeamiseen) näytekalvon poikkileikkauksen pinta-alalla (m^2). Näytekalvon keskimääräistä paksuutta käytetään näytteen poikkipinta-alan laskemisessa. Murtovenymä (Elongation at break, EAB, %) lasketaan jakamalla kalvon venymä (mm) murtumishetkellä näytteiden alkuperäisellä tartuntapituudella (esimerkiksi 50 mm) kerrottuna 100 %.

Puristustestissä mitattavaa näytettä puristetaan kahdella yhdensuuntaisella tasaisella pinnalla, joista toinen on kiinteä ja toinen liikkuva. Testi suoritetaan joko puristamalla näytettä vakio määrä (prosentuaalinen muodonmuutos) tai ennalta asetettuun voima-arvoon. Puristuksen aikana näytteen muoto muuttuu mutta tilavuus ei muutu. Mittausanturin tulisi olla suurempi kuin näyte. Testi voi myös olla ns. ei-hajottava, jos käytetty voima ei ole riittävä aiheuttamaan näytteelle peruuttamattomia vaurioita. Jauhetulle ja keitetylle kalatuotteelle käytetään puristusvoimaa, joka aiheuttaa 50 % muodonmuutoksen. Jauhetulle tuoreelle kalalle käytetään puristusvoimaa, joka aiheuttaa 30 %, ja tai fileille käytetään puristusvoimaa, joka aiheuttaa 10 % muodonmuutoksen.

Toinen puristustestin muoto on ns. **rakenneprofiilianalyysi** (engl. texture profile analysis, TPA). TPA-menetelmä perustuu näytteen puristamiseen kahdesti edestakaisella liikkeellä. Testillä jäljitellään puremisliikettä. Voima-aikakäyrän (Kuva 23) avulla voidaan määrittää erilaisia rakenneparametreja, kuten kovuus (hardness, ensimmäisen puristuksen maksimivoima) tai joustavuus (cohesiveness, area 1/area 2). Lisää parametreja ja niiden laskemishojeita löytyy linkistä: <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis>. Taulukkoon 8 on koottu esimerkkejä instrumentaalimenetelmien käytöstä kalan rakenteen mittauksessa ja Kuvasa 24 on esitetty Stable microsystems:in valmistamia erilaisia rakennemittareita.



Kuva 23. TPA-testin voima-aika-kuvaaja. Kuva Texture Technologies Corporation:in luvalla <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis>.

Taulukko 8. Esimerkkejä instrumentaalimenetelmien käytöstä kalan ja kalatuotteiden rakenteen mittaauksessa.

Kalalaji	Testi/ominaisuus	Rakenteeseen vaikuttava tekijä	Viite
Turska (<i>G. morhua</i>)	Kramer	Pyydystystapa ja vuodenaika	Botta ym. 1987
Piikkikampela (<i>Scophthalmus maximus</i>), file	Kramer	Erilaiset keittomenetelmät	Madeira & Penfield 1985
Kirjolohi (<i>O. mykiss</i>)	Puristustesti	Kalarehu, lihaksen rasvapitoisuus ja varastointiaika jäissä	Andersen ym. 1999
Lohi (<i>S. salar</i>), file	WB, lävistystesti (litteäpäinen sauva ja pallomainen anturi)	Fileen kosteus	Jonsson ym. 2001
Jättilabeo (<i>Labeo rohita</i>)	Lävistystesti (litteäpäinen sauva)	Varastointi jäissä	Jain ym. 2007
Lohi (<i>S. salar</i>)	WB, TPA, uusi vetotesti	Savustus	Ashton ym. 2010
Katla (<i>Catla catla</i>), jättilabeo (<i>L. rohita</i>), Intian-mutakarppi (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	TPA/gelatiinin geelinmuodostus	Kalalaji	Chandra & Shamasundra 2015
Monni (<i>Silurus glanis</i>)	TPA, aistinvarainen arviointi	Keittäminen ja pakastus	Bland ym. 2018

WB = Warner-Bratzler, TPA = rakenneprofiiliianalyysi



Kuva 24. Stable Micro Systemsin rakennemittareita. Kuva Stable Micro Systems'in luvalla <https://www.stablemicrosystems.com/images/main-image/ta-range-C.jpg>

4.15. Arvio soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille

Fysikaalis-kemiallisia menetelmiä on olemassa useita ja ne mittaavat eri asioita (Taulukko 9), joten tarkoituksenmukaisen menetelmän valitseminen ketjun eri vaiheisiin ja laitteiden kalibrointi mitattaville suureille vaatii perehtyneisyyttä. Menetelmien etuja ovat, että ne ovat näytettä tuhoamattomia, nopeita ja soveltuvat usein on-line -menetelmiksi sekä niitä voidaan käyttää ketjun useassa eri vaiheissa.

Kalan sähköisten ominaisuuksien muutoksiin perustuvat **Torryster** sekä **Fischtester VI** ovat edelleen käyttökelpoisia, kaupallisesti saatavia, koko ketjun seurantaan soveltuvia kalan tuoreusmittareita, mutta ne ovat epäherkkiä ja alttiita erilaisille virhemittauksille. Sähkökemiallinen **impedanssispektrosopia (EIS)** antaa kalan koostumuksesta tarkempaa informaatiota. EIS-laite on myös kaupallisesti saatavissa (esimerkiksi <https://certifiedqualityseafoods.com/>).

Konenäköä voidaan käyttää laaduntarkkailussa ja kemiallisten ominaisuuksien analysoinnissa koko arvoketjussa, myös kalankasvatuksessa. Konenäköteknologia tarjoaa joustavuutta ja hyvää toistettavuutta suhteellisen alhaisilla kustannuksilla sekä sallii melko nopean tuotannon läpivirtauksen tarkkuutta vaarantamatta.

Raman-spektroskopia on lupaava menetelmä, jolla voidaan määrittää kokonaisen, prosessoidun tai pakastetun kalan fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia sekä todeta kalan aitous ja alkuperä. Kaupalliset pikalaitteet eivät sellaisenaan sovellu suomalaisten kalalajien monitorointiin, joten uusi sovellusalue vaatii tutkimus- ja kehitystyötä.

VIS/NIR -spektroskopiaa voidaan hyödyntää monipuolisesti kalan laaduntarkkailussa ja kemiallisten ominaisuuksien analysoinnissa koko arvoketjussa. Menetelmään perustuvia kaupallisia laitteita on saatavilla sekä laboratoriokäyttöön että prosessiohjaukseen.

Hyperspektrikuvantamisen sovellusmahdollisuudet kalan laadun analysoinnissa ovat monipuoliset. Sitä voidaan käyttää esimerkiksi kalan tuoreuden, mikrobiologisen ja aistittavan laadun sekä kemiallisten koostumuksen määrittämisessä koko arvoketjussa. Uusi sovellusalue vaa- tii tutkimus- ja kehitystyötä.

Elektronista nenää voidaan hyödyntää kalan tuoreuden tai pilaantumisen arvioinnissa ketjun eri vaiheissa. Sen avulla voidaan esimerkiksi havainnoida mikrobien tuottamia haittuvia yhdisteitä. Menetelmä soveltuu tuoreen kalan ja kalatuotteiden lisäksi myös kalajauholle. Sen avulla voidaan tunnistaa ja erottaa varastoidun kalajauhon erilaiset tuoreusasteet. Lisäksi sitä voidaan hyödyntää myös lajittelussa, esimerkiksi erottelemaan eri kalalajit toisistaan.

Elektronista kieltä voidaan soveltaa kalan ja kalatuotteiden rutiininomaiseen tuoreuden ja tuoteturvallisuuden valvontaan toimitusketjun missä tahansa vaiheessa. Keinokielen avulla voidaan esimerkiksi analysoida biogeenisten amiinien muodostumista ja kalan mikrobiologisen laadun muutoksia. Lisäksi sitä on käytetty arvioimaan raskasmetallien (Cd, Pb ja Hg) jäämiä kalasta.

Differentiaalista pyyhkäisykalorimetriä (DSC) voidaan hyödyntää esimerkiksi tunnistamaan lämpötilaan liittyviä muutoksia kalan laadussa, erityisesti kalan rakenteeseen liittyviä muutoksia. Menetelmä on edullinen ja yksinkertainen, mutta menetelmän herkkyys on rajallinen. Menetelmän käyttö on mahdollista ketjun eri vaiheissa.

Terahertsispektroskopia ja -kuvantaminen vaikuttaa monipuolisuutensa vuoksi lupaavalta menetelmältä silakan laadun analysointiin. Menetelmän mahdollisuudet ulottuvat kemiallisten yhdisteiden ja mikro-organismien analysoinnista vierasesineiden havaitsemiseen. Menetelmän sovellusmahdollisuutta, sopivien yhdisteiden löytymistä tietokannoista ja kustannustehokkuutta tulisi tutkia lisää.

Kalan tuoreutta voidaan arvioida myös sen rakenteen (kovuuden/pehmeuden) avulla **rakenne-** **mittareilla**. Lisäksi proteiinikoostumusta voidaan tutkia **kaksisuuntaisella elektroforeesilla**. Nämä menetelmät ovat pikemminkin tutkimukseen soveltuvia menetelmiä eivätkä sovi kalan tuoreuden seuraamiseen arvoketjussa yhtä hyvin kuin muut yllä mainitut menetelmät.

Taulukko 9. Fysikaalis-kemiallisia analysointimenetelmiä.

Menetelmä	Soveltuvuus	Hyödyt	Haasteet	Muuta
Fischtester kalan tuoreuden mittaussuomen- telmä koko arvo- ketjussa	Laadunval- vonta ja tutki- mus	<ul style="list-style-type: none"> •Kaupallisesti saatavilla •Mittaus tehdään kalan läpi, ei siten näytteenkäsittelyä 	<ul style="list-style-type: none"> •Epäherkkä •Altis erilaisille virhemittauksille 	Kaupallisia laitteita: Intellectron International Electronics, Hamburg, Germany (Fishtester VI (IT))
Torrmeter kalan tuoreuden mittaussuomen- telmä koko arvo- ketjussa	Laadunval- vonta ja tutki- mus	<ul style="list-style-type: none"> •Kaupallisesti saatavilla •Helppokäyttöinen: elektrodit painetaan tiiviisti kalan toiselle sivulle, ei siten näytteenkäsittelyä 	<ul style="list-style-type: none"> •Epäherkkä •Altis erilaisille virhemittauksille 	Kaupallisia laitteita: Distell Industries Ltd, Fauldhouse, West Lothian, UK (Torrmeter)
Värin mittaus Väriä mitataan värimittarilla, joka antaa numeeriset arvot väreille.	Laadunval- vonta ja tutki- mus	<ul style="list-style-type: none"> •Kun värille mitataan arvot, eliminoidaan epämääräisyys värien kuvaamisesta. •Voidaan laskea ja tallentaa eri mittausten välinen väriero. 	<ul style="list-style-type: none"> •Potentiaali Suomessa lähinnä tuoteistuspuolella, ei niinkään kalan tuoreuden seurannassa 	<ul style="list-style-type: none"> •Värin mittaamiseen on olemassa erilaisia värianalysointilaitteita, värisensoreita ja spektrofotometreja, kuten Spectropen®. Myös kokenäköä voidaan käyttää.

<p>Sähkökemiallinen impedanssispektroskopia (EIS) Mittaa kalan kudosien sähköisiä ominaisuuksia.</p>	<p>Laadunvalvontaa ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Antaa kalan koostumuksesta ja tuoreudesta tarkempaa tietoa •Näytettä tuhoamaton •Kaupalliset laitteet yksinkertaisia ja nopeita käyttää •Mahdollistaa reaaliaikaisen laadun seurannan 	<ul style="list-style-type: none"> •Kalibroitava silakalle 	<ul style="list-style-type: none"> •Kaupallisia laitteita: Certified Quality Reader, CQ Foods Inc., USA https://certifiedqualityseafoods.com/
<p>Konenäkömekaniikka, optinen instrumentointi, sähkömagneettisen säteilyn havaitseminen sekä digitaalisen kuvainformaation automaattinen havainnointi ja tulkinta</p>	<p>Laadunvalvontaa ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi näytteenkäsittelyä •Näytettä tuhoamaton •Tarjoaa joustavuutta ja hyvää toistettavuutta suhteellisen alhaisilla kustannuksilla •Sallii melko nopean tuotannon läpivirtauksen tarkkuutta vaarantamatta. 	<ul style="list-style-type: none"> •Teknologian soveltaminen suomalaisten kalalajien monitorointiin vaatii tutkimus- ja kehitystyötä. 	<p>nettilinkejä https://www.visiononline.org/vision-resources.cfm</p>
<p>Raman-spektroskopialla tunnistetaan molekyyliä ja selvitetään niiden kemiallisia ominaisuuksia ja rakenteita.</p>	<p>Laadunvalvontaa ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi näytteenkäsittelyä •Näytettä tuhoamaton 	<ul style="list-style-type: none"> •Kaupalliset pikalaitteet eivät sellaisenaan sovellu suomalaisten kalalajien monitorointiin, joten uusi sovel-lusalue vaatii tutkimus- ja kehitystyötä. 	<p>Esimerkki TellSpecsin laite siian laadunvalvontaan reaaliaikaisesti https://tellspec.com/eit-food/fishproject/</p>
<p>VIS/NIR-spektroskopia analysoidaan kemiallisia ominaisuuksia sähkömagneettisen säteilyn avulla.</p>	<p>Laadunvalvontaa ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Kaupallisia laitteita saatavilla sekä laboratoriokäyttöön että prosessinohjaukseen •Prosessilaitteet näytettä tuhoamattomia •Prosessilaitteet eivät vaadi näytteenkäsittelyä 	<ul style="list-style-type: none"> •Tarkoitukseen sopivien laitteiden valinta 	<p>On-line/In-line laitteet (anturit) teollisuuteen https://www.buchi.com/en/products/nir-online/nir-online-process-analyzer, myös kalarehun valmistukseen https://static1.buchi.com/sites/default/files/NIR-Online_Solution_Brochure_en.pdf. https://www.grainsense.com/</p>
<p>Hyperspektrikuvaus spektroskopian ja kuvantamisteknologian yhdistelmä</p>	<p>Laadunvalvontaa ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi näytteenkäsittelyä •Näytettä tuhoamaton •Monipuoliset sovellusmahdollisuudet koko arvoketjussa •Saadaan samanaikaisesti tietoa kohteen fysikaalisista ja geometrisistä piirteistä (muoto, koko, ulkonäkö ja väri) sekä kemiallisesta koostumuksesta spektrianalyysin perusteella. 	<ul style="list-style-type: none"> •Teknologian soveltaminen silakan tai muun suomalaisen kalan laadunvalvontaan vaatii tutkimus- ja kehitystyötä. 	<p>Nofima the Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research kehittänyt sovelluksen turskan automaattiseen lajitteluun jo ennen kuin ne toimitetaan jalostamoille</p>
<p>Elektroninen nenä Mittaa haihtuvia yhdisteitä.</p>	<p>Laadunvalvontaa, tuotekehitys ja tutkimus, monipuoliset sovellusmahdollisuudet koko arvoketjussa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi näytteenkäsittelyä •Näytettä tuhoamaton 	<ul style="list-style-type: none"> •Soveltaminen silakan tai muun suomalaisen kalan kanssa vaatii tutkimus- ja kehitystyötä •Sovelluksia kehitettäessä on syytä käyttää vertailumenetelmiä, joiden avulla voidaan arvioida tekosenän erottelukykyä tutkittaville näytteille ja löytää perusteet näytteiden erottumiselle. Tällaisia vertailumenetelmiä ovat esimerkiksi aistinvarai- 	<p>Saatavilla sekä kannettavia että laboratoriotason laitteita</p>

			nen arviointi, haihtuvien yhdisteiden määritykset kaasukromatografisesti ja mikrobiologiset määritykset.	
Elektroninen kieli Mittaa elintarvikkeiden makuominaisuuksia.	Laadunvalvonta, laadunvarmistus, tuotekehitys ja tutkimus, monipuoliset sovellusmahdollisuudet koko arvoketjussa.	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi yleensä näytteen esikäsittelyä •Näytettä tuhoamaton •Voidaan analysoida myrkyllisiä näytteitä •Objektiivinen arviointi 	<ul style="list-style-type: none"> •Soveltaminen silakan tai muun suomalaisen kalan laadunvalvontaan vaatii tutkimus- ja kehitystyötä •Herkkä ympäristötekijöiden, kuten lämpötilan, vaikutuksille 	Saatavilla laboratoriotason laitteita
Ydinmagneettinen resonanssispektrometria (NMR)	Tutkimus ja tuotekehitys Monipuoliset mahdollisuudet kalan koostumuksen ja laadun määrittävien yhdisteiden mittaamiseen	<ul style="list-style-type: none"> •Tarkkoja ja spesifisiä tuloksia nopeasti •Voidaan analysoida seoksia molekyyliatasolla nopeasti ilman, että tarvitaan erottamis- ja/tai puhdistusvaiheita •Soveltuu mm. kalan rasvahappopitoisuuksien määrittämiseen, kalan alkuperän tunnistamiseen, sekä tuoreen ja jäädytetyn-sulatetun kalan erottamiseen 	<ul style="list-style-type: none"> •Kallis tekniikka •Määrityksiin tarvittavat spesifiset kalibroinnit (kuitenkin helpokäyttöinen, kun kalibroinnit on tehty) •Perinteiset laitteistot vaativat erillisen näytteenoton, jolloin tulee kiinnittää huomiota edustavien ja homogeenisten näytteiden otamiseen. 	Viime aikoina on kehitetty ja kaupallistettu matalan resoluution laitteita, jotka ovat halvempia ja pienempiä ja paremmin sovellettavissa teollisuuteen. Uutta tekniikkaa edustaa esimerkiksi kuljetettava laite (ns. NMR mouse), joka mahdollistaa jopa alle 20 s analyysiajan ja on-line - ja in vivo -analyysit.
Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetri (DSC)	Tutkimus, tuotekehitys, teollisuus. Tyyppillisiä määrityksiä ovat sulamis- ja hyytymislämpötilojen, geelinmuodostuksen ja kiteytymisen, sekä proteiinien denaturoitumisen määrittäminen.	<ul style="list-style-type: none"> •DSC on helppo käyttää eikä useimmissa tapauksissa vaadi erityistä näytteen valmistelua •DSC on edullinen ja helpokäyttöinen menetelmä •Menetelmää voidaan hyödyntää tunnistamaan lämpötilaan liittyviä muutoksia kalan rakenteessa. 	<ul style="list-style-type: none"> •Menetelmä sellaisenaan ei suoraan sovellu kalan laadun määrittämiseen. 	DSC-laitteistoja on saatavilla analyttisestä laboratoriomittakaavasta teolliseen mittakaavaan sekä teollisuuden, että tutkimuksen käyttöön. Molemmat laitteet soveltuvat sekä teollisuuden, että tutkimuksen käyttöön tuotekehityksessä.
Kaksiulotteinen polyakryyli-amidigeelielektroforeesi (2D-PAGE)	Tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Saadaan yksityiskohtaista ja täsmällistä tietoa näytteen proteiinikoostumuksesta 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii erityisosaamista, laitteistoa ja kemikaaleja •Mittaukset ja tulosten tulkinta vievät melko paljon aikaa 	
Terahertsispektroskopia ja -kuvannus	Elintarvikkeiden tarkastaminen ja laadunvalvonta. Mahdollisuuksia kemiallisten yhdisteiden ja mikro-organismien analysoinnista viarasineiden havaitsemiseen.	<ul style="list-style-type: none"> •Saadaan sekä laadullista että määrällistä tietoa elintarvikkeenäytteistä •Monipuolinen, nopea ja tehokas menetelmä 	<ul style="list-style-type: none"> •Toistaiseksi kallis tekniikka •Käyttöä rajoittavat rajallinen herkkyys, sirontavaikutus, ja se, että elintarvikkeiden yhdisteille ei ole vielä saatavilla kattavaa tietokantaa 	Kaupallisia laitteita löytyy moniin eri käyttötarkoituksiin. Haasteista huolimatta tekniikka on jo vakiintunut elintarviketeollisuudessa tehokkaana työkaluna havainnointiin ja kvantitointiin.
Rakenteen mitaus Mittaa kalan lihaksen rakennetta.	Tuotekehitys ja tutkimus	Rakennemittareilla saatujen tulosten on osoitettu olevan täsmällisempiä kuin aistinvaraisilla menetelmillä saadut tulokset.	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii erityisosaamista •Pääsääntöisesti näytteet tuhoutuvat mittauksissa •Laitteet melko kalliita •Mittaukset usein aikaa vieviä, vaativat useita toistoja 	Useita laitevalmistajia

5. Mikrobiologiset menetelmät

5.1. Johdanto

Kaloissa voi esiintyä monenlaisia ihmisten terveyteen haitallisesti vaikuttavia biologisia vaaratekijöitä, kuten patogeenisia organismeja ja toksiineja. Ne voivat aiheuttaa sairauksia kalansyönnin seurauksena tai muuta reittiä (EFSA, 2010). Kalan nahassa, kiduksissa ja suolistossa esiintyy luontaisesti erilaisia mikrobeja. Ulosteperäisiä mikrobeja voi esiintyä erityisesti rannikkoalueilla, ja kala voi kontaminoitua pyydystämisen jälkeen tai prosessoinnissa (Novoslavskij ym. 2016).

Kaloissa luontaisesti esiintyviä patogeenisia organismeja ovat loiset (muun muassa *Anisakis* spp.), virukset (muun muassa hepatiitti A ja kalikivirus), bakteerit *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* sekä *Listeria monocytogenes*. Lisäksi kaloissa voi esiintyä *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerilajeja, kuten *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ja *Escherichia coli*. Kaloissa mahdollisesti esiintyvät toksiinit voivat olla lämmönkestäviä, vesiliukoisia biotoksiineja, kasviplanktonin tuottamia toksiineja sekä biogeenisiä amiineja (EFSA, 2010).

Helposti pilaantuvien kalastustuotteiden mikrobiologista laatua valvotaan tarkasti Euroopan Unionin (EU) jäsenmaiden alueella (Eviran ohje 16023/5). Mikrobiologista elintarviketurvallisuutta säätelee mikrobikriteeriasetus (EY) No 2073/2005, jonka mukaan elintarvikealan toimijoiden on varmistettava, että elintarvikkeiden turvallisuudelle ja prosessin hygienialle asetetut vaatimukset täyttyvät. Toimija valvoo tuottamiensa elintarvikkeiden turvallisuutta omavalvonnan avulla. Turvallisuusvaatimuksissa tietyille elintarvikepatogeeneille, niiden tuottamille toksiineille tai aineenvaihduntatuotteille on asetettu pitoisuuksien sallitut raja-arvot. Suomalaisissa kala-alan laitoksissa tämä turvallisuusvaatimus koskee erityisesti *L. monocytogenes* -bakteeria (Ruokaviraston ohje 4095/04.02.00.01/2020/3).

Mikrobiologisessa analysoinnissa toimijat voivat käyttää omavalvonnassaan mikrobikriteeriasetuksessa mikrobiologiselle vaatimukselle asetettua vertailumenetelmää (yleensä CEN- tai ISO-menetelmä) tai Ruokaviraston listaamia vaihtoehtoisia menetelmiä. Myös muita analyysimenetelmiä voidaan käyttää edellyttäen, että menetelmä on validoitu mikrobikriteeriasetuksen vertailumenetelmää vastaan EN/ISO 16140 -standardin tai muun samanlaisen, kansainvälisesti hyväksytyyn protokollan mukaisesti. (Ruokaviraston ohje 4095/04.02.00.01/2020/3). Tuotantoympäristön ja -laitteiden pintapuhtausnäytteiden analyysimenetelmistä ei säädetä mikrobikriteeriasetuksessa.

L. monocytogenes -bakteerin lisäksi toinen vakavia ruokamyrkytyksiä aiheuttava bakteeri on *C. botulinum*, joka kasvaa vain hapettomissa olosuhteissa. Sen itiöitä esiintyy yleisesti maaperässä, vesistöjen pohjalietteenä sekä kalojen ja muiden eläinten suolistossa. *C. botulinum* -bakteerin tuottama hermomyrkykky, botuliini, aiheuttaa halvaustilan, eli botulismia, joka saattaa johtaa kuolemaan. Botuliinia syntyy elintarvikkeessa bakteerin kasvuvaiheen aikana, kun elintarviketta säilytetään yli 3 °C:n lämpötilassa hapettomissa olosuhteissa. Suolatut ja kuivatut lihatuotteet, säilykkeet sekä lämminsavustetut, vakuumpakatut kalat ovat ruokamyrkytysbotulismia yleisimmät tartuntalähteet (Ruokavirasto 2019a). Botulismi on harvinainen Suomessa, eikä bakteeri-itiöiden, bakteerin, tai niiden tuottamien toksiinien esiintyvyyttä valmiissa elintarvikkeissa seurata järjestelmällisesti (Ruokavirasto 2019b).

Elävän kalan mikrobiomi on lajikirjoltaan hyvin laaja, ja osa lajeista aiheuttaa raaka-aineen pilaantumisen (Gram & Huss 1996). Säilytysolosuhteet luovat sopivat kasvuolosuhteet osalle kalassa olevista mikrobeista, jolloin ne pystyvät lisääntymään toisia lajeja paremmin. Jotkut näistä lajeista ovat aktiivisia pilaajia, sillä ne muodostavat lisääntyessään aineenvaihduntatuotteita, minkä seurauksena elintarvikkeeseen syntyy sivumakuja ja -hajuja (Gram ym. 1987). Kalassa on paljon aminohappoja ja usein myös trimetyyliamiinioksidia (TMAO), joita monet bakteerit hyödyntävät energiantuotannossaan (Gram & Dalgaard 2002). Kalatuotteiden pilaajamikrobit tuottavat aminohapoista muun muassa ammoniakkia, biogeenisiä amiineja, orgaanisia happoja ja rikkiyhdisteitä. Monet mikrobit pelkistävät TMAO:a trimetyyliamiiniksi (TMA), mistä tulee pilaantuvalla kalalla ominainen ammoniakkinen sivumaku (Gram & Dalgaard 2002).

Tyypilliset pilaajalajit ovat erilaisia riippuen muun muassa säilytyslämpötilasta ja siitä, onko kala säilötty vai tuore (Gram & Huss 1996). Kylmässä säilytetyn tuoreen kalan pilaajia ovat osa *Pseudomonas*-suvun lajeista (Parlapani ym. 2013; Boziaris & Parlapani 2016) sekä rikkivetyä tuottavat bakteerit, joita ovat erityisesti *Shewanella*-sukuun kuuluvat *S. putrefaciens* ja *S. baltica* (Fonnesbech Vogel ym. 2005). Lämpimässä säilytetty kala puolestaan pilaantuu usein enterobakteerien sekä *Vibrio*- ja *Aeromonas*-sukuihin kuuluvien bakteerien vaikutuksesta (Gram ym. 1987; Gram ym. 1990; Parlapani ym. 2013). Pakkausmenetelmä vaikuttaa myös suuresti kalan säilyvyyteen ja siihen, mitkä mikrobilajeista pystyvät kasvamaan tuotteessa (Rudi ym. 2004). Suojakaasuun tai vakuumiin pakattu kala pilaantuu yleisimmin *Photobacterium phosphoreum* -bakteerin ja eri maitohappobakteerien, kuten *Carnobacterium* spp. ja *Brochotrix thermosphacta*, vaikutuksesta (Dalgaard 1995; Rudi ym. 2004; Boziaris & Parlapani 2016).

Pilaaja- tai muiden haitallisten bakteerien pitoisuuksille ei ole lainsäädännöllisiä raja-arvoja, mutta Elintarviketeollisuusliitto (ETL) on koostanut suositukset mikrobiologisista ohjausarvoista viimeisenä käyttöpäivänä (ETL 2017). Kaloille ja kalajalosteille on suositukset muun muassa rikkivetyä tuottavien pilaajabakteerien ja aerobisten mikrobien enimmäismääristä.

Elintarvikediagnostiikassa käytettävien analyysimenetelmien kirjo on nykyisin laaja (Välimaa ym. 2015). Tässä kappaleessa esitellään mikrobiologiseen laadunvarmistukseen käytettäviä validoituja, kaupallisesti saatavilla olevia viljely-, immunologisia ja molekulaarisia (nukleiinihappoperusteiset) menetelmiä sekä proteiinirakenteiden tunnistukseen perustuvia menetelmiä.

5.2. Viljelymenetelmät

Viljelymenetelmät perustuvat kohdeorganismien moninkertaistamiseen kasvatusliemessä tai -agarissa siten, että lukumäärän kasvu voidaan nähdä sameutena, värinmuutoksena tai laskea pesäkkeinä mikrobikohtaisten inkubointiolosuhteiden jälkeen (Jasson ym. 2010).

5.2.1. Elintarvikepatogeenien määrittäminen

Viljelymenetelmiä käytetään edelleen virallisina, hyväksytyinä määrittämenetelminä sekä elintarvikepatogeenien määrittämisessä. Esimerkiksi *L. monocytogenes* -bakteerin osalta ISO 11290-1:1996 -menetelmällä kohdeorganismien esiintyminen tai poissaolo määritetään yleensä 25 grammassa ruoka-ainetta. Menetelmässä elintarvikenäyte ensin esirikastetaan esirikastusliemessä, jotta lähes kuolleet, stressaantuneet, bakteerit saadaan toipumaan ja lisääntymään. Sen jälkeen vaihdetaan selektiivinen rikastusliemi. Sen tarkoituksena on lisätä kohdeorganismien määrää estämällä kilpailevien mikrobien kasvua. Rikastusvaihetta seuraa bakteerien kasvatus selektiivisillä kasvualustoilla. Tulos varmistetaan mikroskooppisin, biokemiallisin, serologisin tai geneettisin testein (Jasson ym. 2010).

Tuloksen saaminen kuitenkin kestää jopa useita päiviä: negatiivisen tuloksen saaminen vie 4–5 vuorokautta (esirikastus, rikastus, eristys selektiiviselle agarille). Positiivisen tuloksen varmistamiseen (maljaus ja inkubointi agarilla ja biokemialliset varmistukset) vie lisäksi aikaa (Jasson ym. 2010). Taulukossa 10 on esitetty mikrobikriteeriasetuksen mukainen vertailumenetelmä ja sille vaihtoehtoinen menetelmä *L. monocytogenes* -bakteerille (Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen - Eviran ohje 10501/2, Evisa 2009 ja Mikrobiologisten menetelmien ja niille vaihtoehtoisten menetelmien luettelo, 5.3.2019).

Taulukko 10. Mikrobikriteeriasetuksen mukainen vertailumenetelmä ja sille vaihtoehtoinen menetelmä *L. monocytogenes* -bakteerille.

Mikrobi	Asetuksen mukainen vertailumenetelmä	Vaihtoehtoinen menetelmä
<i>L. monocytogenes</i>	SFS-EN ISO 11290-1:2017 (raja-arvo ei todettu/ 25 g näytettä)	NMKL 136: 2010
	SFS-EN ISO 11290-2:2017 (raja-arvo 100 pmy/g)	

5.2.2. Mikrobiologisen laadun määrittäminen

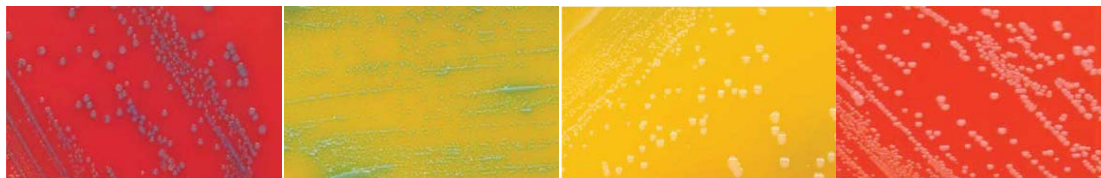
Kalan ja muiden elintarvikkeiden mikrobiologisen laadun mittarina käytetään yleisimmin bakteerien kokonaismäärää. Myös rikkivetyä tuottavien bakteerien määrittäminen on tärkeää kylmässä säilytetyn tuoreen kalan osalta, sillä niiden määrän on havaittu vastaavan melko tarkasti kalan aistinvaraista laatua (Gram & Dalgaard 2002; Fogarty ym. 2019b). Sekä kokonaisbakterimäärästä että rikkivetyä tuottavien bakteerien määrästä viimeisenä käyttöpäivänä on olemassa Elintarvikeliiton koostamat ohjeavrot (ETL 2017). Viljelymenetelmillä voidaan tutkia myös muita kalatuotteen mikrobiologisen laadun kannalta tärkeitä mikrobiryhmiä, kuten sulfiittia pelkistäviä klostrideja (ETL 2017).

Kokonaismikrobimäärä määritetään usein standardoiduilla menetelmillä, jotta menetelmä olisi yhdenmukainen ja tulokset vertailukelpoisia. ISO 4833-2:2013 -menetelmän mukaan kalatuotetta hienonnetaan viljelyä varten ja siitä valmistettu laimennussarja levitetään viljelyalustan pinnalle. Viljelyalustana käytetään yleisalustaa, Plate count agaria, jossa mahdollisimman moni viljeltävissä oleva bakteerilaji pystyy muodostamaan pesäkkeitä. Viljeltyjä maljoja pidetään lämpökaapissa 30 °C:n lämpötilassa kolmen vuorokauden ajan, jonka jälkeen maljoille muodostuneet pesäkkeet lasketaan. Kalojen viileän elinympäristön ja vaihtolämpöisyyden vuoksi kalatuotteissa on kuitenkin myös sellaisia mikrobeja, jotka eivät kasva riittävän nopeasti tai ollenkaan 30 °C:n lämpötilassa (Gram & Huss 1996). Tällaiset kylmiin oloihin sopeutuneet bakteerit, eli psykrotrofit, voivat lisääntyä jääkaappilämpötilassa ja ovat siksi yleensä vastuussa kylmäsäilytetyn kalan pilaantumisesta. Siksi 30 °C:n lisäksi kokonaismikrobimäärän määrittämiseen käytetään usein myös kylmempiä lämpötiloja, kuten 6,5 °C:ta (ISO 17340:2019). Suomessa Elintarviketeollisuusliitto on koostanut suosituksen elintarvikkeiden mikrobiologisista arvoista viimeisenä käyttöpäivänä (ETL 2017). Suosituksen mukaan tuoreen tai pakastetun kalan tai äyriäisten kokonaismikrobimäärän ei tule toistuvasti ylittää tasoa 10⁶ pesäkettä muodostavaa yksikköä grammassa elintarviketta (pmy/g) viimeisenä käyttöpäivänä. Jos 10⁷ pmy/g taso ylittyy, toimijan on tehtävä riskiarviointi ja ryhdyttävä tarvittaessa toimenpiteisiin elintarvikkeen mikrobiologisen laadun parantamiseksi.

5.2.3. Valikoivat kasvatusalustat (kromogeeniset kasvualustat)

Kromogeenisiä kasvatusalustoja käytetään vähentämään kasvatusjaksojen ja biokemiallisten testien määrää, ja siten nopeuttamaan ja helpottamaan mikrobien tunnistusta. Kyseisissä kasvatusalustoissa tiettyjä värejä (kromogeeninen aine) ja entsyymiin yhdistettyä kromogeenistä substraattia käytetään erottamaan kohdeorganismi helposti muista mikrobeista. Mikrobin kasvaessa entsyymiin sidotun substraatin vapautuminen kasvualustaan nähdään värin muutoksena sekä joissain tapauksissa saostuskehänä (Dwivedi & Jaykus 2011; Jasson ym. 2010).

Kromogeenisiä kasvatusalustoja on olemassa sekä elintarvikepatogeenien että pilaajamikrobien määrittämiseen. Kuvassa 25 on esimerkki *Listeria*-lajien tunnistukseen soveltuvasta RAPID'L.Mono -kromogeenisestä kasvatusalustasta, joka perustuu fosfatidylinositolifosfolipaasi (PIPLC) -entsyymiin aktiivisuuteen sekä ksyloosi-sokerin käyttökykyyn. *L. monocytogenes*- ja *Listeria ivanovii* -bakteereilla on PIPLC-aktiivisuus, jolloin pesäkkeet nähdään värillisinä, kun taas muilta lajeilta se puuttuu, ja pesäkkeet nähdään valkoisina. Ksyloosin käyttökyvyn perusteella erottelu perustuu siihen, että *L. monocytogenes* -bakteeri ei pysty käyttämään ksyloosia, jolloin pesäkkeet nähdään sinisinä ja kehättöminä. Sen sijaan *L. ivanovii*- bakteeri pystyy käyttämään ksyloosia, jolloin sen tuottamat pesäkkeet ovat sinivihreitä keltaisen kehän ympäröimiä. (bio-rad)



Kuva 25. *Listeria* -lajit RAPID'L.Mono kromogeenisellä kasvualustalla (Bio-Rad). Vasemmalta lukien *L. monocytogenes* (PIPLC+, xylose–), *L. ivanovii* (PIPLC+, xylose+), *Listeria welshimeri* (PIPLC–, xylose+) ja *Listeria innocua* (PIPLC–, xylose–). Kuva Bio-Radin luvalla, muotoiltu lähteestä https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_3046B.pdf

Kromogeenisiä agareita löytyy useilta eri valmistajilta. Päivitetyt tiedot AFNORin validoimista kasvatusalustoista löytyvät osoitteesta <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/04/List-of-methods-certified-NF-VALIDATION-Food.pdf>. Taulukossa 11 on listattu viljelymenetelmiä yleisimmille pilaajamikrobeille. Esimerkiksi rikkivetyä tuottavien bakteerien tunnistamiseen käytetään rauta-agaria, jossa rikkivetyä tuottavat bakteerit voidaan erottaa mustina pesäkkeinä.

Taulukko 11. Viljelymenetelmiä yleisimpien pilaajamikrobien määrittämiseen elintarvikkeista.

Mikrobiryhmä	Viljelyalusta	ISO-standardi /Viite
Enterobakteerit	Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)	ISO 21528-2:2017
<i>Pseudomonas</i> spp. ja <i>Aeromonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> - <i>Aeromonas</i> -selektiiviagar	Kielwein ym. 1969, Kielwein 1971
<i>Pseudomonas</i> spp.	CFC-agar	ISO 13720:2010
<i>Vibrio</i> spp.		ISO 21872-1:2017
Maitohappobakteerit	De Man Rogosa Sharpe agar (MRSA)	ISO 15214:1998
Rikkivetyä tuottavat bakteerit	Lyngby-rauta-agar	Gram ym. 1987

5.3. Immunomääritysmenetelmät

Immunomääritysmenetelmät perustuvat erityisen spesifiseen vasta-aineen ja antigeenin väliin sitoutumiseen. Vasta-aineen tarttumisosaa tunnistaa tarkasti antigeenimolekyylin rakenneosan epitooppin ja sitoutuu siihen. Vasta-aineen sitoutumisvoimakkuus määrittää menetelmän herkkyyden ja spesifisyyden. Vasta-aine voi olla monoklonaalinen tai polyklonaalinen. Monoklonaalisella vasta-aineella saadaan tunnistettua täsmällisesti yksi epitooppi, jolloin esimerkiksi yksittäisen bakteerilajin serotyypin saadaan tunnistettua. Polyklonaalisella vasta-aineella voidaan tunnistaa useita saman tai monien antigeenien epitooppeja. Sillä voidaan tunnistaa tietyt bakteerilajit, esimerkiksi *Listeria*-lajit. Immunomääritysmenetelmissä tarvitaan näytteen rikastusvaiheita ennen varsinaista mittausta, ja positiivinen tulos vaatii varmistuksen standardimenetelmällä. (Jasson ym. 2010). Elintarvikediagnostiikassa on kaupallisesti saatavilla monenlaisia immunomääritysmenetelmiä, joista tässä yhteydessä käsitellään lateraalivirtaustestejä (lateral flow devices, LFD) sekä ELISA- (enzyme linked immunosorbent assay) ja ELFA (enzyme linked fluorescent assays) -menetelmiä.

5.3.1. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

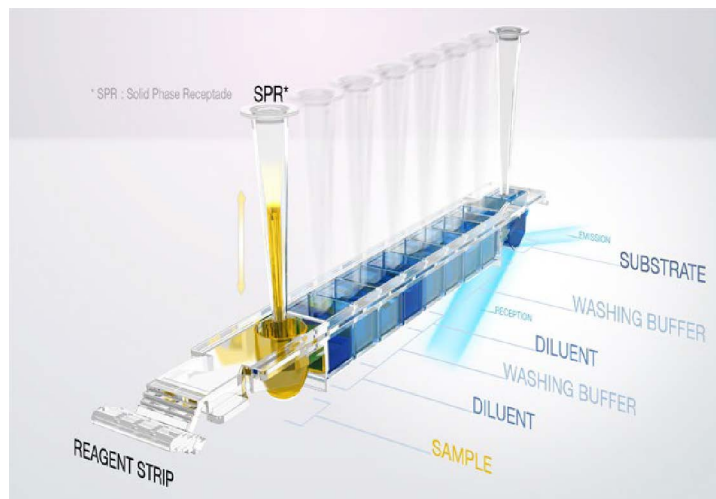
ELISA-menetelmä on immunologisen ja entsyymattisen määritysmenetelmän yhdistelmä. ELISA-menetelmiä on erilaisia, ja elintarvikediagnostiikassa käytetyt menetelmät ovat yleisimmint ns. sandwich-menetelmiä. Siinä kohdespesifiset sieppaajavasta-aineet sidotaan esimerkiksi 96-kuoppalevyn pohjalle, näyte lisätään, ja siinä mahdollisesti olevat kohdeantigeenit sitoutuvat vasta-aineisiin. Sitoutumaton näyte pestään pois. Seuraavaksi lisätään detektoiva vasta-aine, joka sitoutuu antigeeniin. Tämän jälkeen lisätään entsyymiin liitetty vasta-aine, jonka avulla saadaan sitoutua detektoivaan vasta-aineeseen. Sitoutumattomat vasta-aine-entsyymikompleksit pestään pois. Viimeiseksi lisätään substraatti, jonka entsyymi muuntaa mitattavaksi värilliseksi yhdisteeksi (Jasson ym. 2010). Substraatti voi olla esimerkiksi piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase, HRP), alkaalinen fosfataasi (alkaline phosphatase) ja β -galaktosidaasi (Yeni ym. 2014).

ELISA-testejä on kaupallisesti saatavissa erilaisten elintarvikepatogeenien ja niiden toksiinien sekä ympäristönäytteiden määrittämiseen. Esimerkiksi BIOCONTROL:n valmistama TRANSIA® PLATE *Listeria monocytogenes* -testi (<http://www.biocontrolsys.com/assets/uploads/14051955097-transia-plate-listeria-monocytogenes-dfu-englishrev-02.pdf>) on tarkoitettu määrittämään *L. monocytogenes* elintarvike- ja ympäristönäytteistä. Testi on spesifinen, sillä siinä ei tule ristireaktioita saman suvun eri lajien, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* ja *L. murrayi*, kanssa. *L. monocytogenes* -bakteerin suhteen esirikastetusta näytteestä negatiivinen tulos saadaan 46 tunnin inkuboinnin jälkeen. Positiivinen tulos on varmistettava biokemiallisin testein (Valderrama ym. 2016).

5.3.2. ELFA (enzyme linked fluorescent assays)

ELFA-menetelmä on pääperiaatteeltaan ELISA-menetelmän kaltainen, mutta analysoinnin pääteipisteessä mitataan fluoresenssi. Kaupallinen VIDAS®-menetelmä koostuu muovisesta pipetistä (SPR*, the Solid Phase Receptacle), jonka sisäpintaan vasta-aineet on sidottu ja testiliuskasta, jossa on tarvittavat analysointireagenssit käyttövalmiina. Nestemäinen, rikastettu näyte pipetoidaan reagenssiliuskaan, joka asetetaan mini VIDAS®-laitteeseen (Vaz-Velho ym. 2000). (Nykyisin on saatavilla myös monipaikkaisempia VIDAS®- ja VIDAS® 3 -laitteita. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vidas-solution>). Laite suorittaa ELFA:n siirtämällä näytettä automaattisesti SPR:n kaivoissa, jotka sisältävät tarvittavat laimennus- ja pesuliuokset sekä entsyymikonjugoidun vasta-aineen ja substraatin, 4-metyyliumbelliferyylifosfaatin. Vasta-

aineeseen konjugoitu entsyymi, alkaalinen fosfataasi, katalysoi substraatin hydrolyysiä fluoresoivaksi tuotteeksi, 4-metyyliumbelliferoniksi. Syntyvä fluoresenssi mitataan aallonpituudella 450 nm (Kuva 26). Instrumentti analysoi tuloksen automaattisesti ja tulkitsee sen joko positiiviseksi tai negatiiviseksi. Testaukseen kuluu noin 45 min–2 h testisarjasta riippuen. Positiivinen tulos on varmistettava standardimenetelmällä (Vaz-Velho ym. 2000).



Kuva 26. Kaupallinen VIDAS®-menetelmä. Kuva julkaistu bioMérieux:n luvalla <https://www.biomerieux-nordic.com/product/vidasr-solution>.

Uusimmassa VIDAS UP®-menetelmässä käytetään kohteen vasta-aineiden sijasta kohdespesifisiä rekombinantteja faagiproteiineja, jotka on leimattu alkaalisella fosfataasilla (Chajęcka-Wierzchowska ym. 2012). Bakteriofaagit (faagit) ovat bakteereita tappavia viruksia, ja ovat erittäin isäntäspesifisiä pystyen infektoimaan vain saman lajin tai jopa vain tietyn kannan bakteereita. Ne tunnistavat isäntäbakteerinsa tietyn pintarakenteen ja kiinnittyvät solun pintaan hänen avulla (Hagens & Loessner 2007). Menetelmään on saatavissa useita kittejä eri mikrobien, esimerkiksi AFNORin validoimia kittejä *L. monocytogenes*-bakteerin määrittämiseen <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/listeria-monocytogenes/>. Menetelmää hyödynnetään omavalvonnassa ja viranomaisnäytteiden seulonnassa.

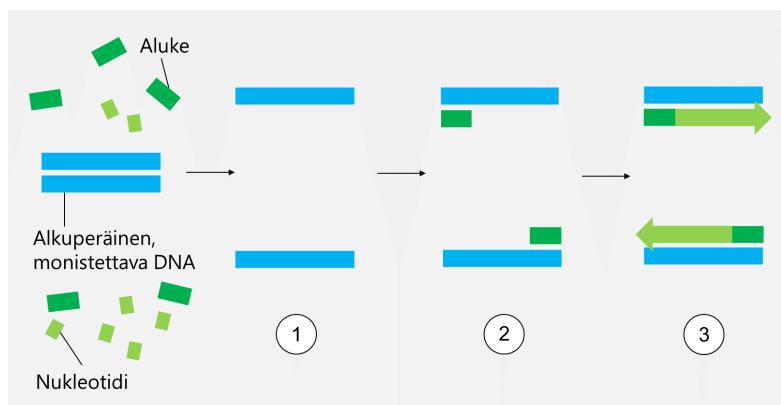
5.3.3. Lateraalivirtaustestit

Lateraalivirtaustesti (lateral flow assay, LFA) on ELISA-testin muunnos, joka perustuu vasta-aineen ja sen kohdemikrobin, esimerkiksi patogeenin, väliseen, paljain silmin nähtävään reaktioon. Huokoisesta kalvosta, kuten nitroselluloosasta, valmistetussa kiinteässä testialustassa on omat kohtansa lisättävälle näytteelle, sieppaajavasta-aineelle ja detektoivalle vasta-aineelle, johon on yhdistetty esimerkiksi kolloidinen kulta- tai lateksipartikkeli. Näyte kulkeutuu alustaa pitkin kapillaarisesti, ja siinä oleva kohdemolekyylit sitoutuu detektoivaan vasta-aineeseen. Syntynyt kompleksi siirtyy jälleen kapillaarisesti kohti sieppaajavasta-ainetta, ja tulos nähdään paljain silmin värillisenä viivana. Kontrollia, sitoutumatonta vasta-ainetta, varten on oma sieppausvyöhykkeensä. Kohdespesifinen reaktio nähdään kontrollista eroavana viivana. Lateraalivirtaustestit ovat edullisia ja helppoja käyttää. Itse kvalitatiivinen mittaustulos saadaan nopeasti, mutta näyte täytyy rikastaa ja saatu tulos on varmistettava biokemiallisin ja serologisin testein (Valderrama ym. 2016; Dwivedi & Jaykus 2011). Esimerkiksi Neogenin valmistamassa Reveal for *L. monocytogenes*-testissä mittausaika on 2 tuntia, mutta rikastusaika on 30–48 tuntia, jolloin mittaukseen kuluu aikaa yhteensä 32–50 tuntia (Valderrama ym. 2016).

5.4. Nukleiinihappoihin perustuvat menetelmät

5.4.1. Polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction, PCR) on geenitekniikan menetelmä, jossa tunnettua DNA-jaksoa monistetaan siihen sopivien alukkeiden avulla. Alukkeet ovat lyhyitä DNA-jaksoja, jotka sitoutuvat tutkittavaan DNA:han, jos sitä on näytteessä. Reaktiossa voi käyttää myös useita alukepareja, jolloin esimerkiksi usean eri patogeenin toteaminen näytteestä on mahdollista yhtäaikaisesti (monianalyysi-PCR) (Españeira ym. 2010). PCR tehdään lämpösyklilaitteessa, joka vuoroin lämmittää ja viilentää näytettä (Candrian 1995). Lämpötilavaihtelun avulla DNA:n kaksoisjuosteet saadaan irtomaan toisistaan, ja yksijuosteisia molekyyliä mallina käyttäen rinnalle valmistetaan uudet juosteet tiettyjä entsyymejä käyttäen (Kuva 27). Monistussykliä aikana tutkittavan DNA:n määrä näytteessä kasvaa eksponentiaalisesti. PCR-monistustuotteita voidaan kuvantaa elektroforeesilla agarosi-geelissä, jolla monistunut DNA saadaan näkyviin tiettyinä vyöhykkeinä. Tuloksen lopulliseksi varmistamiseksi vyöhykkeiden sisältämä DNA voidaan tunnistaa tarvittaessa sekvensoimalla DNA:n nukleiinihappojärjestys.



Kuva 27. Polymeraasiketjureaktion vaiheet. DNA-kaksoisjuosteet irtoavat toisistaan (1), jolloin alukkeet pääsevät kiinnittymään yksijuosteisiin molekyyliihin (2). Uudet DNA-juosteet rakentuvat vapaina olevista nukleotideista yksijuosteisia molekyyliä mallina käyttäen (3). Kuva: Jaana Huotari/VTT.

Viljelypohjaisiin menetelmiin verrattuna PCR on nopeampi ja tarkempi, sillä sen avulla voidaan havaita näytteestä myös pieniä populaatioita ja mikrobeja, joita ei pystytä viljelemään (Candrian 1995). Elintarvikemikrobiologiassa on käytössä useita PCR-pohjaisia sovelluksia, joita on sovellettu muun muassa lajintunnistukseen, virulenssigeenien tunnistukseen, ruokamyrkytysten ja ruuan aitouden tutkimukseen (Le Nguyen ym. 2008; Mafra ym. 2008; Españeira ym. 2010; Qin ym. 2011). PCR-menetelmiin patogeenien havaitsemiseksi elintarvikkeista on olemassa ISO-standardveja (mm. ISO 22174:2005) (Postollec ym. 2011).

BAX® System (Hygiena, <https://www.hygiena.com/endpt-pcr-works.html#>) on kaupallinen esimerkki PCR-pohjaisesta menetelmästä. Siinä BAX® System PCR tabletit sisältävät interkalatoivan ja fluoresoivan värin, joka sitoutuu reaktiossa syntyvään kaksijuosteiseen DNA:han. Monistussyklin jälkeen näytteen lämpötila lasketaan tasolle, jossa DNA:n kaksoisjuosteet irtoavat toisistaan. Tällöin interkalatoiva väri vapautuu, mikä vähentää fluoresenssia. Laite laskee fluoresenssin muutoksen ja ilmoittaa joko negatiivisen tai positiivisen tuloksen. Positiivinen tulos on varmistettava biokemiallisin testein. Taulukossa 12 on esitetty BAX System -pikamenetelmään käytettävä aika *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämisessä.

Taulukko 12. BAX System -pikamenetelmään käytettävä aika *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämisessä. Muotoiltu lähteestä Valderrama ym. (2016).

Kitti	Rikastusaika (h)	Mittausaika (h)	Kokonaisaika (h)
BAX® System <i>L. monocytogenes</i> 24E	24–28	3,5	27,5–31,5
BAX® System <i>L. monocytogenes</i>	48	3,5	51,5

5.4.2. Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikainen PCR (quantitative PCR tai real-time PCR) on menetelmä, jossa paitsi tietyn DNA-jakson läsnäoloa myös sen määrää näytteessä voidaan mitata (Postollec ym. 2011). Reaktiossa rakentuva DNA-juoste voidaan havaita qPCR-laitteella sen rakentuessa, reaaliaikaisesti. QPCR-tuotteiden havaitseminen perustuu joko kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvien fluoresoivien värien tai koettimien käyttöön. Molemmista tekniikoista fluoresenssin voimakkuus kasvaa jokaisessa syklistä, jos PCR-tuotteen määrä reaktiossa lisääntyy. Havaittavissa olevan fluoresenssin tuottamiseksi tarvittavien PCR-sykliden määrä on riippuvainen siitä, kuinka monta kopiota DNA:sta oli alun perin näytteessä, joten menetelmän avulla voidaan laskea näytteen alkuperäinen DNA-pitoisuus (Postollec ym. 2011). Elintarvikemikrobiologiassa qPCR-menetelmää käytetään ruokaperäisten patogeeneiden sekä esimerkiksi hyötymikrobien havaitsemiseen ja niiden määrän laskemiseen näytteissä, sillä ne ovat usein viljelymenetelmiä nopeampia toteuttaa (Postollec ym. 2011).

Erlaisia qPCR (RT-PCR) -kittejä *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämiseen on kaupallisesti saatavilla (Taulukko 13). Huomioitavaa on, että kaikkia kittejä ei voida ajaa kaikilla qPCR (RT-PCR) -laitteilla, vaan tarvitaan oma erityinen laite, kuten GeneDisc -teknologiassa (Pall Corporation 2014).

Taulukko 13. Esimerkkejä AFNORin validoimista qPCR (RT-PCR) -kisteistä *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämiseen (AFNOR, 2020c. <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/listeria-monocytogenes/>).

Valmistaja	Menetelmä
Qualicon Diagnostics, LLC	BAX System RT PCR Assay Genus <i>Listeria monocytogenes</i>
Eurofins GeneScan Technologies GmbH	BACGene <i>Listeria monocytogenes</i>
Eurofins GeneScan Technologies GmbH	BACGene <i>Listeria</i> Multiplex
OXOID Ltd, Part of Thermo Fisher Scientific	ThermoScientific SureTect <i>Listeria monocytogenes</i> PCR Assay
Qiagen GmbH	QIAGEN <i>mericon</i> Manual <i>Listeria monocytogenes</i> /
Life Technologies Corporation, Part of Thermo Fisher Scientific	MicroSEQ <i>Listeria monocytogenes</i>
BIO-RAD	iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II
Pall GeneDisc Technologies	GeneDisc <i>Listeria monocytogenes</i>
bioMérieux	GENE-UP <i>Listeria monocytogenes</i>

5.4.3. Isoterminen monistus

Perinteisten ja reaaliaikaisten PCR-menetelmien lisäksi on kuvattu monia muitakin nukleiinihappojen monistusmenetelmiä. Silmukavälitteisessä isotermisessä DNA -monistustekniikassa (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) reaktio tapahtuu vakiolämpötilassa (60–65 °C) nopeasti, tehokkaasti ja spesifisesti (Notomi ym. 2000). Spesifisyyttä ja nopeutta parantaa se, että LAMP sisältää useita alukepareja, jotka kohdistuvat kohdegeenin kuuteen eri alueeseen. Reaktion nopeuttamiseksi voidaan lisäksi käyttää silmukka-alukkeita (Notomi ym. 2000; Nagamine ym. 2002). Lähtömateriaalina voidaan käyttää myös RNA:ta. LAMP ei vaadi erityistä laitteistoa, vaan reaktiot voidaan monistaa tavanomaisessa laboratoriossa käytettävässä lämpöhauteessa (Notomi ym. 2000). Monistustuotteiden muodostuminen voidaan havaita silminnähtävästi sameuden, värireaktion tai fluoresenssin avulla. LAMP-reaktiossa DNA-synteesin sivutuotteena muodostuvan magnesiumpyrofosfaatin vuoksi monistustuotteiden muodostuminen voidaan havaita sameutena (Notomi ym. 2015). Värireaktioon perustuvassa havainnoinnissa käytetään interkalatoivia värejä, kuten kalseiinia. Fluoresenssin perustuvassa detektoinnissa käytetään fluoresoivia värejä (esim. SYBR Green). Detektointi geelielektroforeesin avulla on myös mahdollista (Notomi ym. 2015; Wong ym. 2017). Monelaisia LAMP -menetelmään perustuvia määrittämenetelmiä ja sen erilaisia muunnoksia on kehitetty myös elintarvikepatogeenien määrittämiseen elintarvikkeista ja ympäristönäytteistä (Wong ym. 2017). Esimerkkejä LAMP-teknologiaan perustuvista menetelmistä ovat *L. monocytogenes* -bakteerin määrittämiseen tarkoitetut AFNORin validoimat kitit: 3M Molecular Detection Assay 2- *Listeria* (AFNOR 2020a) ja ANSR for *Listeria* spp (AFNOR 2020b).

5.4.4. Seuraavan sukupolven sekvensointi

Viljelypohjaisia menetelmiä käytetään yhä yleisesti elintarvikkeiden mikrobiologisen laadun selvittämisessä. Kuitenkin vain murto-osa ympäristössä olevista mikrobeista pystytään havaitsemaan käytössä olevilla viljelymenetelmillä (Whitman ym. 1998), joten niiden rinnalla käytetään myös uudempia, mikrobien geeniperimän sekvensointiin pohjautuvia teknologioita. Sekvensointi tarkoittaa perintöaineksen (DNA:n tai RNA:n) sekvenssin eli emäsjärjestyksen selvittämistä, ja koska eri eliölajeilla sekvenssi on hieman erilainen, ne voidaan erottaa toisistaan sen perusteella. Seuraavan sukupolven sekvensointi (Next-generation sequencing, NGS) kattaa joukon erilaisia teknologioita, joiden avulla voidaan analysoida suuria määriä lyhyitä sekvenssejä yhtäaikaaisesti. Tämä nopeuttaa lajintunnistusta esimerkiksi PCR-tekniikkoihin verrattuna, sillä sekvensoimalla voidaan tutkia yhtäaikaisesti useita geenejä monesta eri näytteestä.

Sekvensointia varten tutkittava DNA eristetään joko mikrobiviljelmästä tai suoraan näytteestä, esimerkiksi elintarvikkeesta. DNA:ta täytyy joissain tapauksissa pilkkoa tai monistaa ja siihen on lisättävä sekvensointiadapterit, eli pienet DNA-juosteet, joiden avulla sekvensoitava DNA saadaan kiinnittymään sekvensointialustaan. Tätä vaihetta kutsutaan DNA-kirjaston valmistamiseksi. Analyysivaiheessa sekvenssejä verrataan sekvenssitietokantoihin, jolloin saadaan sekvensseille taksonominen luokitus. Sekvenssidatan analysointiin on käytettävissä erilaisia ohjelmistoja ja työkaluja, joista osa on pitkälle automatisoituja ja usein ilmaisia (Jagadeesan ym. 2019; High-Throughput Sequencing and Food Microbiology 2020). Ohjelmistojen käyttö ja tulosten tulkinta vaatii kuitenkin asiantuntijuutta, sillä tällä hetkellä saatavilla ei ole teollisuudelle soveltuvia pikamenetelmiä (Jagadeesan ym. 2019).

Elintarvikemikrobiologiassa seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmiä käytetään pääasiassa joko yksittäisen viljelymenetelmillä eristetyn mikrobin koko genomien sekvensointiin tai tietyn geenialueen (markkerigeenialueen) kohdennettuun sekvensointiin, jossa tavoitteena on analysoida kaikki näytteen sisältämät mikrobit (Jagadeesan ym. 2019). Elintarviketeollisuudessa

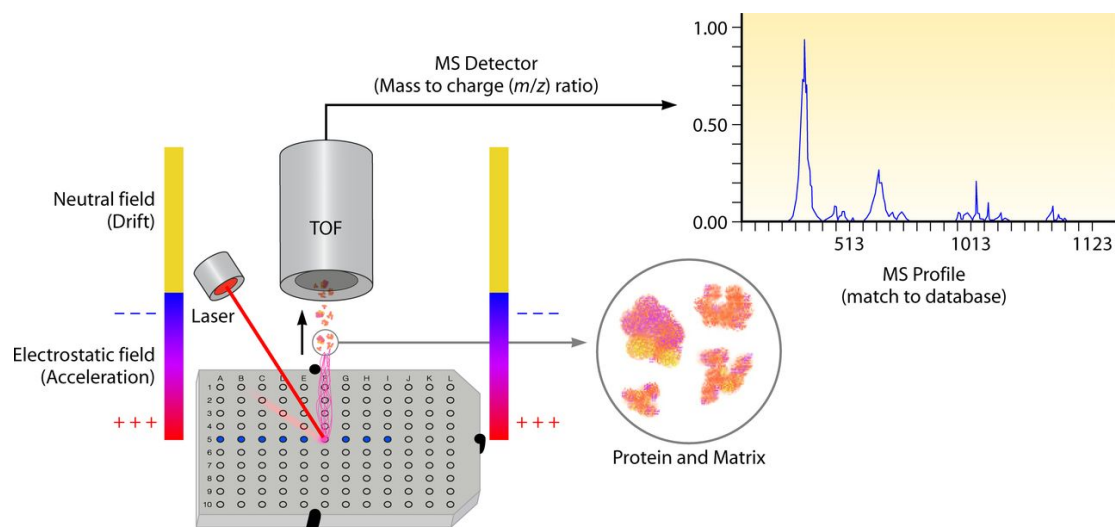
kokogenomisekvensointia voidaan hyödyntää mikrobikontaminaation lähteen jäljittämiseen, sillä sen avulla voidaan tutkia esimerkiksi, onko jokin mikrobikanta tuotantotiloissa uusi vai toistuva (Jagadeesan ym. 2019). Kokogenomisekvensointi sopii myös antibioottiresistenssigeenien ja patogeenisten kantojen määrittämiseen (Rantsiou ym. 2018).

Markkerigeenialueiden sekvensoinnilla saadaan taksonominen luokitus teoreettisesti kaikille näytteessä oleville mikrobeille, jolloin voidaan tutkia monimuotoisia mikrobiyhteisöjä - myös niitä mikrobeja, joiden olemassaoloa ei osata epäillä, tai jotka eivät ole viljeltävissä (Jagadeesan ym. 2019). Mikrobipopulaatioiden muutoksia voidaan seurata ajan kuluessa, mitä on hyödynnetty esimerkiksi fermentoitujen elintarvikkeiden (Roh ym. 2010) sekä pilaantumisen tutkimisessä (Chaillou ym. 2015).

5.5. Proteiinirakenteiden tunnistukseen perustuvat menetelmät

5.5.1. MALDI-TOF MS

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight Mass Spectrometry eli MALDI-TOF MS on teknologia, jonka avulla on mahdollista tunnistaa mikrobisoluja niiden proteiinirakenteiden avulla suku- ja lajitasolle asti. Myös lajien alatyypitys on mahdollista, sillä esimerkiksi mikrobilääkeresistenssiin liittyviä proteiineja voidaan tunnistaa MALDI-TOF-menetelmällä (Bruker Daltonics Inc. 2019). Menetelmä perustuu massaspektrometriaan, jossa näyte ionisoidaan varautuneiksi molekyyleiksi niin, että niiden massan ja varauksen suhdetta voidaan mitata (Clark ym. 2013). Kuvassa 28 on kuvattu MALDI-TOF massaspektrometrian toimintaperiaate: mikrobimassaa hierotaan pieni määrä näytelevylle, jonka jälkeen se peitetään matriisiliuoksella ja annetaan kuivua, jolloin näytteen ja matriisin seos kiteytyy. Tämän jälkeen levy ladataan MALDI-TOF -laitteeseen. Laser ionisoi näytteen ja matriisin muodostamat makromolekyylit, ja ne kaasuuntuvat ja erottuvat massan ja varauksen mukaan laitteen TOF-massananalysointiosassa. Suurimassaiset ionit liikkuvat analysointiosan läpi pienimassaisia hitaammin, jolloin ne osuvat laitteen MS-detektoriin eriaikaisesti. Näin muodostuu näytteelle ominainen massaspektrometriaprofiili, jota laitteen ohjelmisto vertailee referenssitietokantaan, eli kirjastoon, lajitunnistuksen saamiseksi.



Kuva 28. MALDI-TOF MS -menetelmän periaate. Mikrobimassaa hierotaan näytelevylle ja peitetään matriisiliuoksella. Levy ladataan MALDI-TOF -laitteeseen, joka erottelee näytteen sisältämät molekyylit niiden massan ja varauksen mukaan ja luo näytteelle MS-profiilin, jota verrataan laitteen referenssitietokantaan lajitunnistuksen saamiseksi. Clark ym. (2013), lisenssi kuvan käyttöön saatu kustantajalta.

Mikrobien lajitunnistus on nopeaa MALDI-TOF MS -menetelmällä, ja sen käyttökustannukset ovat kohtuulliset verrattuna sekvensointiin ja biokemiallisiin tunnistusmenetelmiin. MALDI-TOF MS on tullut yleisesti käyttöön klinisen mikrobiologian alalla, ja sitä on viime vuosina käytetty enenevässä määrin myös elintarvikeperäisten mikrobien tunnistuksessa (Peruzy ym. 2019). Tällä hetkellä MALDI-TOF-laitteita valmistavat Biomerieux (<https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-ms-0>) ja Bruker Daltronics (<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification.html>), jonka MALDI Biotyper® -laite on esitetty Kuvassa 29. Molempien valmistajien ylläpitämiin referenssikirjastoihin kuuluu monia elintarvikkeisiin liittyviä lajeja, ja lisäksi käyttäjät voivat lisätä niihin itse mikrobikantoja. Bruker MALDI-TOF Biotyper on AOAC OMA -sertifioitu ISO 16140-6:2019 -standardin mukainen vaihtoehtoinen menetelmä *Salmonella*-, *Cronobacter*- ja *Campylobacter*-sukuihin kuuluvien bakteerien (AOAC Official method 2017.09, 2017) sekä *L. monocytogenes* ja *Listeria*-sukuun kuuluvien bakteerien (AOAC Official method 2017.10, 2017) toteamiseen useilta eri kasvualustoilta.

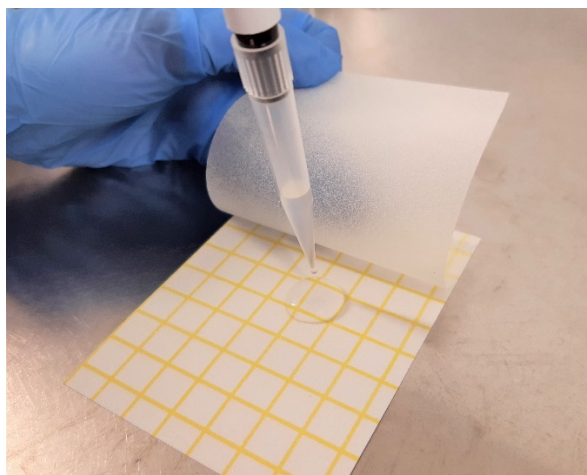


Kuva 29. MALDI Biotyper® (Bruker). Kuva: Jaana Huotari, VTT.

5.6. Kaupalliset pikatestit ympäristönäytteiden ottoon

Mikrobiologisen puhtauden tarkkailua suositellaan osaksi elintarvikehuoneistojen omavalvontajärjestelmää (Ruokavirasto 2018). Siivoustoimien riittävyttä voidaan tarkastella ottamalla pistokoeluontoisesti pinta- ja puhtausnäytteitä puhdistetuilta pinoilta, kuten työtasoilta, leikkuulaudoilta, eri työvälineistä ja astioista. Näytteenottoon on olemassa monenlaisia kaupallisia pikamenetelmiä, kuten Hygicult-kontaktilevyt (Orion Diagnostics) ja Petrifilm (3M) (Kuva 30), joilla näyte voidaan ottaa esimerkiksi kosketus- tai sivelymenetelmällä tutkittavasta pinnasta.

Petrifilm on validoitu (Microval) ISO 4832:2006 standardia vasten vaihtoehtoiseksi menetelmäksi β -glukoronidaasi-positiivisen *E. coli* -bakteerin ja koliformien määrän laskemiseen elintarvikkeista ja rehuista.



Kuva 30. Petrifilm-pikamenetelmä. Kuva: Jaana Huotari, VTT

5.7. Ennustava mikrobiologia

Elintarvikealan toimijoiden on varmistettava, että tuottamansa elintarvikkeet täyttävät niille asetetut tai ilmoitetut mikrobiologiset, kemialliset ja aistinvaraiset vaatimukset myyntiajan loppuun saakka. Tarvittaessa toimijoiden on määriteltävä turvallinen säilyvyysaika tuottamilleen tuotteille, joille asetetaan viimeinen käyttöajankohta tai parasta ennen -päiväys. Säilyvyystutkimuksia ei tarvitse tehdä kaikille elintarvikkeille, kuten valmistuspäivänä nautittavat elintarvikkeet. Tällöin voidaan käyttää yleisesti käytössä olevia säilyvyysaikoja. Mikrobiologiaan liittyviä säilyvyystutkimuksia tulisi tehdä, kun lainsäädäntö edellyttää sellaisia (esimerkiksi *L. monocytogenes* sellaisenaan syötävissä elintarvikkeissa), kyseisen tuotteen säilyvyydestä ei ole riittävää näyttöä (esimerkiksi uudet tuotteet) tai tuote, sen valmistus- tai pakkaustapa oleellisesti muuttuu siten, että tuotteen säilyvyys heikentyy. Säilyvyystutkimuksissa voidaan käyttää matemaattisia ennustemalleja. Esimerkiksi FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor) ohjelmaa voidaan käyttää ennustamaan pilaajamikrobien ja taudinaiheuttajien kasvua elintarvikkeissa ja esimerkiksi vaihtuvan lämpötilan vaikutuksesta varastoinnissa tuotteen säilyvyyteen. Ohjelma on ilmaiseksi ladattavissa osoitteesta <http://fssp.food.dtu.dk/> Ruokaviraston ohje 4095/04.02.00.01/2020/3.

5.8. Arvio mikrobiologisten menetelmien soveltuvuudesta kotimaiselle silakkasektorille

Suomalainen elintarviketeollisuus on valveutunut ja seuraa lainsäädännön vaatimuksia ja viranomaisten suosituksia. Koonti mikrobiologisista analysointimenetelmistä on esitetty taulukossa 14.

- Perinteiset viljelymenetelmät mahdollistavat elävien mikrobi-isolaattien eristyksen, ja niiden avulla saadaan kvantitatiivista tietoa mikrobimääristä.
- Pikamenetelmät voivat olla hyödyllisiä yritysten omavalvonnassa esimerkiksi ympäristönäytteenotossa. Uudet tekniikat, kuten isoterminen monistus, mahdollistavat myös haittamikrobien, kuten *L. monocytogenes* -bakteerin, nopean havainnoinnin.
- Tutkimuksessa tehokkaita työkaluja mikrobiomin määrittämiseen ovat sekvensointimenetelmät, kuten seuraavan sukupolven sekvensointi (NGS). Näillä menetelmillä saadaan geenitason tietoa pilaajamikrobeista ja niiden ominaisuuksista.
- Myös kuvantamisteknologiat, kuten hyperspektrikuvantaminen, ovat lupaavia menetelmiä silakan mikrobiologisen laadun arviointiin.

Taulukko 14. Mikrobiologisia analysointimenetelmiä

Menetelmä	Soveltuvuus	Hyödyt	Haasteet	Muuta
Viljelymenetelmät				
Viralliset, hyväksytyt määrittäminen menetelmät Mikrobiologisen laadun, elintarvikapatogeenien määrittäminen	Viranomaisvalvontaa, laadunvalvontaa ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Standardin mukainen tulos •Virallinen tulos •Tietty tutkimukset voi tehdä itsekin 	<ul style="list-style-type: none"> •Aikaa vievä ja monivaiheinen •Vaatii perehtyneisyyttä •Reagenssit ja kasvatusalustat kalliita 	<p>Palvelu kannattaa ostaa Ruokaviraston hyväksymistä laboratorioista https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/ruokaviraston-hyvaksymat-laboratoriot/elintarvikelaboratoriot/</p> <p>Virallisia, standardoituja menetelmiä (SFS-EN ISO, ISO, NMKL)</p>
Valikoivat kasvatusalustat Elintarvikapatogeenien ja pilajamikrobien määrittäminen	Laadunvalvontaa ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Vähentää kasvatusjaksojen ja biokemiallisten testien määrää ja siten nopeuttaa tunnistusta •Kasvatusalustan värinmuutokset tai saostukset helpottavat mikrobien tunnistusta. 	<ul style="list-style-type: none"> •Kasvatusalustat kalliita 	<p>Validoimattomia ja validoituja kasvatusalustoja löytyy useilta eri valmistajilta. AFNORin validoimat: https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/04/List-of-methods-certified-NF-VALIDATION-Food.pdf</p>
Immunomäärittäminen menetelmät				
ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) Tunnistetaan mikrobin proteiinirakenteeseen sitoutunut spesifinen vasta-aine entsyymien avulla. Tulos mitataan värireaktiolla.	Laadunvalvontaa	<ul style="list-style-type: none"> •Kvalitatiivinen tulos (positiivinen/negatiivinen) saadaan nopeasti verrattuna viljelymenetelmään 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii kuitenkin näytteen rikastamisen •Positiivinen tulos on varmistettava standardimenetelmällä •Vaatii erityislaitteen 	<p>Kaupallisesti saatavilla monenlaisia testejä erilaisten elintarvikapatogeenien ja niiden toksinien sekä ympäristönäytteiden määrittämiseen. Esimerkiksi TRAN-SIA® PLATE <i>Listeria monocytogenes</i>-testi (http://www.biocontrol.com/assets/uploads/14051955097-transia-plate-listeria-monocytogenes-dfu-englishrev-02.pdf)</p>
ELFA (enzyme linked fluorescent assay) Tunnistetaan mikrobin proteiinirakenteeseen sitoutunut spesifinen vasta-aine entsyymien avulla. Tulos mitataan fluoresenssin avulla.	Laadunvalvontaa ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Kvalitatiivinen tulos (positiivinen/negatiivinen) saadaan nopeasti verrattuna viljelymenetelmään 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii kuitenkin näytteen rikastamisen •Positiivinen tulos on varmistettava standardimenetelmällä •Vaatii erityislaitteen 	<p>Kaupallisesti saatavilla monen kokoisia VIDAS®-laitteita ja niihin soveltuvia kittejä. Menetelmä on käytössä Ruokaviraston hyväksymisissä laboratorioissa, esimerkiksi <i>L. monocytogenes</i>-bakteerin määrittämiseen Scanlabissa: https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/ruokaviraston-hyvaksymat-laboratoriot/rekisterioitteet/scanlab-oy_oulu.pdf</p>
Lateraalivirtaus-testi (lateral flow assay, LFA) Tunnistetaan mikrobin proteiinirakenteeseen sitoutunut spesifinen vasta-aine entsyymien avulla. Tulos näkyy värireaktiolla.	Laadunvalvontaa	<ul style="list-style-type: none"> •Kvalitatiivinen tulos (positiivinen/negatiivinen) saadaan nopeasti verrattuna viljelymenetelmään •Tulos silmin havaittavissa •Helppolukuinen 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii kuitenkin näytteen rikastamisen •Positiivinen tulos on varmistettava standardimenetelmällä 	<p>Kaupallisesti saatavilla monenlaisia testejä eri patogeeneille</p>
Nukleiinihappoihin perustuvat menetelmät				
Polymeraasiketjureaktio (PCR)	Laadunvalvontaa ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Viljelymenetelmiä nopeampi ja tarkempi 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii erityislaitteen 	<p>PCR-menetelmiin patogeenien havaitsemiseksi elintarvikkeista on olemassa ISO-standardit</p>

Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 58/2021

Mikrobien havaitseminen elintarvikkeesta DNA-jakson perusteella				
Reaaliaikainen PCR (qPCR tai RT-PCR) Mikrobien havaitseminen ja niiden määrän laskeminen elintarvikkeesta DNA-jakson perusteella	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Viljelymenetelmiä nopeampi ja tarkempi 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii erityislaitteen 	Erlaisia qPCR (RT-PCR) -kittejä on kaupallisesti saatavilla esim. <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin määrittämiseen
Silmukaväliittien isoterminen DNA -monistus (LAMP) Mikrobien havaitseminen elintarvikkeesta DNA-jakson perusteella	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi erityistä laitteistoa 		<i>Listeria monocytogenes</i> -bakteerin määrittämiseen on olemassa AFNORin valimoimia kittejä: 3M Molecular Detection Assay 2-Listeria ja ANSR for Listeria spp.
Seuraavan sukupolven sekvensointi (NGS) Mikrobipopulaatioiden tutkimus DNA-jaksojen perusteella	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Monimuotoisien mikrobiyhteisöjen tutkiminen esim. fermentioprosessissa •Mikrobikontaminaation lähteen jäljittäminen 		<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii erityislaitteen •Ohjelmistojen käyttö ja tulosten tulkinta vaatii asiantuntijuutta
Muut menetelmät				
MALDI-TOF MS Mikrobisolujen lajitunnistus niiden proteiinirakenteiden avulla	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Tehokas •Helppokäyttöinen 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii erityislaitteen 	Kallis laiteinvestointi
Kaupalliset pikatestit ympäristönäytteiden ottoon Viljelypohjaisia menetelmiä mikrobien määrittämiseen pinnoilta ja elintarvikkeista	Laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Helppokäyttöinen 		Kaupallisesti saatavilla monenlaisia testejä eri patogeeneille, kuten Hygicult-kontaktilevyt (Orion Diagnostics) ja Petrifilm (3M)
Ennustava mikrobiologia Mikrobien kasvun ennustaminen matemaattisilla malleilla osana säilyvyystutkimusta	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Elintarvikealan toimija tietää, mikä on turvallinen säilyvyysaika tuottamilleen tuotteille, joille asetetaan viimeinen käytöajankohta tai parasta ennen -päiväys 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii perehtyneisyyttä asiaan 	Saatavissa matemaattisia ennustemalleja, esimerkiksi ilmainen FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor) http://fssp.food.dtu.dk/

6. Yhteenveto

Edellisissä luvuissa olemme käsitelleet yksityiskohtaisesti tarjolla olevia, moderneja mittaamenetelmiä ja tekniikoita kalan laadun monipuoliseen mittaamiseen. Tähän yhteenvetoon olemme tiivistäneet suosituksemme aihepiireittäin suomalaisen kalateollisuuden ja -tutkimuksen käyttöön. Tärkeimmät johtopäätöksemme on koottu taulukkoon 15, jossa listataan kunkin menetelmän soveltuvuus, hyödyt ja haasteet.

Aistinvaraiset menetelmät

Kalojen aistinvaraisen laadun tutkimuksessa on käytössä monenlaisia menetelmiä. Suomessa kalojen kuvailevia profiloiteja on tehty viime vuosituhalta saakka. Toistaiseksi silakalle on saatavilla hyvin rajallisesti aistinvaraista tutkimusaineistoa. Tähän suositukseen olemme valinneet menetelmät, joissa on riittävä teoreettinen pohja ja riittävä tieteellinen dokumentaatio niiden toimivuudesta sekä hyvä sovellettavuus tämän innovaatio-ohjelman tarpeisiin.

Aistinvaraisten arviointimenetelmien suhteen on tunnistettu kaksi erilaista käyttötarkoitusta: 1) silakan laadun seuranta kalaketjun eri vaiheissa troolista kuluttajalle, ja 2) yksityiskohtaisempi menetelmä tutkimuksen sekä kalan menekin edistämisen käyttöön. Kalaketjun käyttöön tarvitaan helposti omaksuttava ja mielellään älylaitteessa toimiva yksinkertainen numeerinen mittari. Tällaiseksi voisi soveltua silakalle kehitetty QIM-menetelmään perustuva älypuhelinsovellus, joka mukailee "How fresh is your fish"-sovellusta. Tähän tarvitaan yhteistyökumppaniksi ohjelmistoyritys.

Tutkimuskäyttöön soveltuu yleinen kuvaileva menetelmä GDA, jolla olisi tarpeen tehdä profilointi yleisimmille suomalaisille kalalajeille. Työn pohjana voidaan käyttää aiempaa tutkimusmateriaalia suomalaisista kalalajeista.

Näiden kahden menetelmän lisäksi tarvitaan menetelmiä, joissa voidaan lisätä yleisön kiinnostusta kotimaisiin kalalajeihin. CATA-menetelmällä tuotettu aineisto sopii nähdäksemme tähän tarkoitukseen.

Kemialliset ja biokemialliset menetelmät

Biokemiallisista menetelmistä **pH:n mitta**us, **peroksidiluku**, **para-anisidiiniluku** ja **näistä laskettu TOTOX** (eng. Total Oxidation Products) ovat tunnettuja ja laajasti käytettyjä menetelmiä. pH:n mitta on nopeaa, joskin se pitäisi kalibroida silakalle. Peroksidi ja *para*-anisidiinilukujen mittauksiin löytyy virallisia menetelmiä, mutta ne vaativat näytteenkäsittelyä ja soveltuvat paremmin tutkimukseen, kuin nopeaan laadunvalvontaan. K-arvon mittaukseen perustuvat kaupalliset pikamenetelmät kuten "Freshness checker" ja "PRECICE® Freshness Assay Kit" soveltuvat kalaketjun alkupäähän laadunvalvontaan ja tuoreuden arviointiin. Kyseiset menetelmät ovat helppokäyttöisiä ja nopeita, joskin laitteiden ja kittien saatavuudesta ei ole kirjoitushetkellä varmuutta.

Pakattujen kalatuotteiden laadun seurantaan sopivat puolestaan erilaiset **värimuutokseen perustuvat sensorit**, jotka viestivät kalan laadusta sekä kuljetuksen että säilytyksen aikana. Kemiosensitiivisiä sensoreita ei ole saatavilla valmiina, vaan ne vaatisivat kehitystyötä kullekin kalalajille ja tuotteelle, jotta värimuutoksen signaalin voimakkuus saadaan kalibroitua vastaamaan juuri kyseisen tuotteen laatua.

Tutkimuksessa ja uusien menetelmien validoinnissa voidaan käyttää tunnettuja ja luotettavia laadunmittausmenetelmiä, kuten nestekromatografiaan pohjautuvaa K-arvon määrittystä, edellämainittuja peroksidi- ja *para*-anisidiinilukumäärittäyksiä, tiobarbituurihapporeaktiivisten aineiden määrittystä sekä trikloorietikkahappoon liukenevien peptidien mittausta. Näitä laboratoriomenetelmiä voitaisiin siis käyttää uusien menetelmien kalibroinnissa, ja näihin menetelmiin käytettävät reagenssit ja laitteistot ovat yleisesti saatavilla elintarvikealan laboratorioissa.

Fysikaalis-kemialliset menetelmät

Fysikaalis-kemiallisten menetelmien etuja ovat, että ne eivät tuhoa näytettä, ne ovat nopeita, ne soveltuvat usein on-line -menetelmiksi ja niitä voidaan käyttää ketjun useassa eri vaiheissa. Menetelmiä on olemassa useita ja ne mittaavat eri asioita (ks. alla), joten tarkoituksenmukaisen menetelmän valitseminen ketjun eri vaiheisiin ja laitteiden kalibrointi mitattaville suureille vaatii perehtyneisyyttä.

Kalan sähköisten ominaisuuksien muutoksiin perustuvat **Torryster** sekä **Fischtester VI** ovat edelleen käyttökelpoisia, kaupallisesti saatavia, koko ketjun seurantaan soveltuvia kalan tuoreusmittareita, mutta ne ovat epäherkkiä ja alttiita erilaisille virhemittauksille. Sähkökemiallinen **impedanssispektrosopia (EIS)** antaa kalan koostumuksesta tarkempaa informaatiota. EIS-laite on myös kaupallisesti saatavissa (esimerkiksi <https://certifiedqualityseafoods.com/>).

Konenäköä voidaan käyttää laaduntarkkailussa ja kemiallisten ominaisuuksien analysoinnissa koko arvoketjussa, myös kalankasvatuksessa. Konenäköteknologia tarjoaa joustavuutta ja hyvää toistettavuutta suhteellisen alhaisilla kustannuksilla sekä sallii melko nopean tuotannon läpivirtauksen tarkkuutta vaarantamatta.

Raman-spektroskopia on lupaava menetelmä, jolla voidaan määrittää kokonaisen, prosessoidun tai pakastetun kalan fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia sekä todeta kalan aitous ja alkuperä. Kaupalliset pikalaitteet eivät sellaisenaan sovellu suomalaisten kalalajien monitorointiin, joten uusi sovellusalue vaatii tutkimus- ja kehitystyötä.

VIS/NIR-spektroskopiaa voidaan hyödyntää monipuolisesti kalan laaduntarkkailussa ja kemiallisten ominaisuuksien analysoinnissa koko arvoketjussa. Menetelmään perustuvia kaupallisia laitteita on saatavilla sekä laboratoriokäyttöön että prosessinohjaukseen.

Hyperspektrikuvantamisen sovellusmahdollisuudet kalan laadun analysoinnissa ovat monipuoliset. Sitä voidaan käyttää esimerkiksi kalan tuoreuden, mikrobiologisen ja aistittavan laadun sekä kemiallisten koostumuksen määrittämisessä koko arvoketjussa. Uusi sovellusalue vaatii tutkimus- ja kehitystyötä.

Elektronista nenää voidaan hyödyntää kalan tuoreuden tai pilaantumisen arvioinnissa ketjun eri vaiheissa. Sen avulla voidaan esimerkiksi havainnoida mikrobien tuottamia haihtuvia yhdisteitä. Menetelmä soveltuu tuoreen kalan ja kalatuotteiden lisäksi myös kalajauholle. Sen avulla voidaan tunnistaa ja erottaa varastoidun kalajauhon erilaiset tuoreusasteet. Lisäksi sitä voidaan hyödyntää myös lajittelussa, esimerkiksi erottelemaan eri kalalajit toisistaan.

Elektronista kieltä voidaan soveltaa kalan ja kalatuotteiden rutiininomaiseen tuoreuden ja tuoteturvallisuuden valvontaan toimitusketjun missä tahansa vaiheessa. Keinokielen avulla voidaan esimerkiksi analysoida biogeenisten amiinien muodostumista ja kalan mikrobiologisen laadun muutoksia. Lisäksi sitä on käytetty arvioimaan raskasmetallien (Cd, Pb ja Hg) jäämiä kalasta.

Terahertsispektroskopia ja -kuvantaminen vaikuttaa monipuolisuutensa vuoksi lupaavalta menetelmältä silakan laadun analysointiin. Menetelmän mahdollisuudet ulottuvat kemiallisten yhdisteiden ja mikro-organismien analysoinnista vierasesineiden havaitsemiseen. Menetelmän sovellusmahdollisuutta, sopivien yhdisteiden löytymistä tietokannoista ja kustannustehokkuutta tulisi tutkia lisää.

Kalan tuoreutta voidaan arvioida myös sen rakenteen (kovuuden/pehmeuden) avulla **rakenne-****mittareilla**. Lisäksi proteiinikoostumusta voidaan tutkia **kaksisuuntaisella elektroforeesilla**. Nämä menetelmät ovat pikemminkin tutkimukseen soveltuvia menetelmiä eivätkä sovi kalan tuoreuden seuraamiseen arvoketjussa yhtä hyvin kuin muut yllä mainitut menetelmät.

Mikrobiologiset menetelmät

Suomalainen elintarviketeollisuus on valveutunutta ja seuraa lainsäädännön vaatimuksia ja vi-
ranomaisten suosituksia.

- Perinteiset viljelymenetelmät mahdollistavat elävien mikrobi-isolaattien eristyksen, ja niiden avulla saadaan kvantitatiivista tietoa mikrobimääristä.
- Pikamenetelmät voivat olla hyödyllisiä yritysten omaavalvonnassa esimerkiksi ympäristönäytteenotossa. Uudet tekniikat, kuten isoterminen monistus, mahdollistavat myös haittamikrobien, kuten *L. monocytogenes* -bakteerin, nopean havainnoinnin.
- Tutkimuksessa tehokkaita työkaluja mikrobiomin määrittämiseen ovat sekvensointimenetelmät, kuten seuraavan sukupolven sekvensointi (NGS). Näillä menetelmillä saadaan geenitason tietoa pilaajamikrobeista ja niiden ominaisuuksista.
- Myös kuvantamisteknologiat, kuten hyperspektrikuvantaminen, ovat lupaavia menetelmiä silakan mikrobiologisen laadun arviointiin.

Taulukko 15. Yhteenveto silakan kalan laadun analysointimenetelmistä.

Menetelmä	Soveltuvuus	Hyödyt	Haasteet	Muuta
Aistinvaraiset menetelmät				
Laatuindeksi (Quality Index Method, QIM) – Systemaattinen pisteytysmenetelmä kalan tuoreuden arvioimiseksi	Laadunvalvontamenetelmä tuoreelle kalalle kalaketjun eri vaiheissa troolista kuluttajalle	<ul style="list-style-type: none"> •Selkeä, pisteytys kalan ominaisuuksille (iho, lima, silmät, vatsa, haju, kidukset) •Indeksistä voidaan arvioida jäljellä olevaa säilytysaikaa •Nopea ja tarkka Instrumentaalisia menetelmiä herkempi säilytyksen alkuvaiheessa	<ul style="list-style-type: none"> •Lajikohtainen •Vaatii kehitystä joka kalalajille •Vaatii arvioijan koulutuksen •Ei vielä tehty silakalle 	Mitä vanhempi kala, sitä suurempi indeksiluku Menetelmään perustuen on kehitetty How Fresh is Your Fish - älypuhelinsovellus , joka on saatavilla 11 kielellä (ei suomeksi) ja 13 eri kalalajille https://www.qim-eurofish.com/
Yleinen kuvaileva menetelmä kalan aistinvaraisen laadun arvioimiseksi (Generic descriptive analysis, GDA)	Tutkimus, eri kalalajien aistinvaraisen profiilin objektiivinen kuvaus (ei mieltymyskuvaus)	<ul style="list-style-type: none"> •Erittelee näytteen aistittavat ominaisuudet •Mahdollistaa erilaisten näytteiden (esim. kalalajien) tarkan kuvailun ja erottamisen toisistaan Tulokset yhdistettävissä esim. kemiallisiin mittauksiin	<ul style="list-style-type: none"> •Työläs •Vaatii koulutetun aistinvaraisen raadin, koulutuksen ja sanaston kehittämisen Näytemäärä rajallinen	Menetelmällä kuvailtu ja eroteltu esimerkiksi siikanäytteitä, turskanäytteitä, hammasahvennäytteitä ja useita Suomelle merkittäviä kalalajeja, kuten silakka, ahven, kuha ja lahna
Pikamenetelmä kalan kokonaisvaltaisen kuluttajalaadun arvioimiseksi (Choose All That Apply –CATA)	Tutkimus, kuluttajalaadun arviointi	<ul style="list-style-type: none"> •Tunnistaa, mitkä ominaisuudet kuluttaja kokee tärkeiksi •Mahdollistaa suurehkon näytemäärän •Ei vaadi raatilaisten kouluttamista 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii suurehkon raadin Laadullinen analyysi, ei mitta-asteikkoa ominaisuuksien voimakkuuden mittaamiselle	Sopii yleiskatsauksen saamiseen näytteistä sekä näytteiden seulontavaiheessa
Kemialliset ja biokemialliset menetelmät				
pH:n mittaus pH laskee kalan kuoleman jälkeen, kun ensin muodostuu maitohappoa ja alkaa nousta, kun mikrobit muodostavat emäksisiä aineenvaihduntatuotteita	Laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Edullinen •Näytteenkäsittelyksi riittää kalanäytteen homogeenointi veden kanssa 	<ul style="list-style-type: none"> •pH:n yhteys laatuun täytyy mallintaa silakalle erikseen •pH laskee kalan kuoleman jälkeen ja nousee taas uudestaan hajoamisen edessä: kertooko mitaustulos, että kala on todella tuore, vai jo monta päivää vanha? 	pH:n yhteys laatuun täytyy mallintaa silakalle erikseen pH laskee kalan kuoleman jälkeen ja nousee taas uudestaan hajoamisen edessä: kertooko mitaustulos, että kala on todella tuore, vai jo monta päivää vanha?
Peroksidiluvun määrittäminen Mittaa primäärisiä hapettumisyhdisteitä, pääasiassa peroksideja	Tutkimus ja laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Yleinen rasvojen hapettumisesta kertova menetelmä •Spektrofotometriä hyödynnettävä menetelmä on nopea 		
Anisiidiiniluvun määrittäminen Mittaa sekundäärisiä hapettumisyhdisteitä, kuten aldehydejä ja ketoneja	Tutkimus ja laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Spektrofotometriä hyödynnettävä menetelmä on nopea 	<ul style="list-style-type: none"> •Myrkyllinen reagenssi 	Sopii käytettäväksi peroksidiluvun määrittämisen rinnalla
TOTOX Lasketaan peroksidiluvun ja anisiidiiniluvun avulla	Tutkimus ja laadunvalvonta	<ul style="list-style-type: none"> •Kertoo kokonaishapettumisasteen •Yleisesti käytössä teollisuudessa, etenkin öljyjen 	<ul style="list-style-type: none"> •Työläs, sillä vaatii sekä peroksidiluvun että anisiidiiniluvun mittaamisen 	Laskukaava: TOTOX = AV + 2 x PV

		hapettumisen mittaamiseen		
Fysikaalis-kemialliset menetelmät				
Konenäkö Sähkömagneettisen säteilyn havaitseminen sekä digitaalisen kuvainformaation automaattinen havainnointi ja tulkinointi	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi näytteenkäsittelyä •Näytettä tuhoamaton •Tarjoaa joustavuutta ja hyvää toistettavuutta suhteellisen alhaisilla kustannuksilla •Sallii melko nopean tuotannon läpivirtauksen tarkkuutta vaarantamatta. 	<ul style="list-style-type: none"> •Teknologian soveltaminen suomalaisten kalalajien monitorointiin vaatii tutkimus- ja kehitystyötä. 	Nettilinkejä https://www.visiononline.org/vision-resources.cfm
VIS/NIR-spektroskopiolla analysoidaan kemiallisia ominaisuuksia sähkömagneettisen säteilyn avulla.	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Kaupallisia laitteita saatavilla sekä laboratoriokäyttöön että prosessinohjaukseen •Prosessilaitteet näytettä tuhoamattomia •Prosessilaitteet eivät vaadi näytteenkäsittelyä 	<ul style="list-style-type: none"> •Tarkoitukseen sopivien laitteiden valinta 	On-line/In-line laitteet (anturit) teollisuuteen https://www.buchi.com/en/products/nir-online/nir-online-process-analyzer , myös kalarehun valmistukseen https://static1.buchi.com/sites/default/files/NIR-Online_Solution_Brochure_en.pdf . https://www.grainsense.com/
Hyperspektrikuvaus Spektroskopian ja kuvantamisteknologian yhdistelmä	Laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi näytteenkäsittelyä •Näytettä tuhoamaton •Monipuoliset sovellusmahdollisuudet koko arvoketjussa •Saadaan samanaikaisesti tietoa kohteen fysikaalisista ja geometrisistä piirteistä (muoto, koko, ulkonäkö ja väri) sekä kemiallisesta koostumuksesta spektrianalyysin perusteella. 	<ul style="list-style-type: none"> •Teknologian soveltaminen silakan tai muun suomalaisen kalan laadunvalvontaan vaatii tutkimus- ja kehitystyötä. 	Nofima the Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research kehittänyt sovelluksen turskan automaattiseen lajitteluun ennen jätöistamoille toimittamista
Elektroninen kieli Mittaa elintarvikkeiden makuominaisuuksia.	Laadunvalvonta, laadunvarmistus, tuotekehitys ja tutkimus, monipuoliset sovellusmahdollisuudet koko arvoketjussa.	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Ei vaadi yleensä näytteen esikäsittelyä •Näytettä tuhoamaton •Voidaan analysoida myrkyllisiä näytteitä •Objektiivinen arviointi 	<ul style="list-style-type: none"> •Soveltaminen silakan tai muun suomalaisen kalan laadunvalvontaan vaatii tutkimus- ja kehitystyötä •Herkkä ympäristökijöiden, kuten lämpötilan, vaikutuksille 	Saatavilla laboratoriotason laitteita
Mikrobiologiset menetelmät				
Viralliset, hyväksytyt määrittäminen menetelmät Mikrobiologisen laadun, elintarvikkepatogeenien määrittäminen	Viranomaisvalvonta, laadunvalvonta ja tutkimus	<ul style="list-style-type: none"> •Standardin mukainen tulos •Virallinen tulos •Tietyt tutkimukset voi tehdä itsekin 	<ul style="list-style-type: none"> •Aikaa vievä ja monivaiheinen •Vaatii perehtyneisyyttä •Reagenssit ja kasvatusalustat kalliita 	Kannattaa ostaa palvelu Ruokaviraston elintarvikelain nojalla hyväksymistä laboratorista https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/ruokaviraston-hyvaksymat-laboratorio/elintarvikelaboratorio/ Virallisia, standardoituja menetelmiä (SFS-EN ISO. ISO, NMKL)

<p>ELFA (enzyme linked fluorescent assay) Tunnistetaan mikrobien proteiinirakenteeseen sitoutunut spesifinen vasta-aine entsyymien avulla. Tulos mitataan fluoresenssin avulla.</p>	<p>Laadunvalvonta ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Kvalitatiivinen tulos (positiivinen/negatiivinen) saadaan nopeasti verrattuna viljelymenetelmään 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii kuitenkin näytteen rikastamisen •Positiivinen tulos on varmistettava standardimenetelmällä •Vaatii erityislaitteen 	<p>Kaupallisesti saatavilla monen kokoisia VIDAS®-laitteita ja niihin soveltuvia kittejä. Menetelmä on käytössä Ruokaviraston hyväksymissä laboratorioissa, esimerkiksi <i>L. monocytogenes</i> -bakteerin määrittämiseen Scanlabissa: https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/ruokaviraston-hyvaksymat-laboratoriot/rekisterioitteet/scanlab-oy_oulu.pdf</p>
<p>Polymeraasiketjureaktioon perustuvat menetelmät (PCR qPCR LAMP) Mikrobien havaitseminen elintarvikkeesta DNA-jakson perusteella</p>	<p>Laadunvalvonta ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Viljelymenetelmiä nopeampi ja tarkempi 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii erityislaitteen 	<p>PCR-menetelmiin patogeenien havaitsemiseksi elintarvikkeista on olemassa ISO-standardit</p> <p>Erilaisia qPCR (RT-PCR) -kittejä on kaupallisesti saatavilla esim. <i>Listeria monocytogenes</i> -bakteerin määrittämiseen</p> <p>LAMP-menetelmä: <i>Listeria monocytogenes</i> -bakteerin määrittämiseen on olemassa AF-NORin valimoimia kittejä: 3M Molecular Detection Assay 2-Listeria ja ANSR for Listeria spp</p>
<p>Seuraavan sukupolven sekvensointi (NGS) Mikrobipopulaatioiden tutkimus DNA-jaksojen perusteella</p>	<p>Laadunvalvonta ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Monimuotoisien mikrobisyhteisöjen tutkiminen esim. fermentioprosessissa •Mikrobikontaminaation lähteen jäljittäminen 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii tutkimusta ja lisäkehitystä, jotta saadaan nopeampia, teollisuuden käyttöön sopivia ratkaisuja 	<p>Vaatii erityislaitteen</p> <p>Ohjelmistojen käyttö ja tulosten tulkinta vaatii asiantuntijuutta</p>
<p>Kaupalliset pikatestit ympäristönäytteiden ottoon Viljelypohjaisia menetelmiä mikrobien määrittämiseen pinnoilta ja elintarvikkeista</p>	<p>Laadunvalvonta</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Nopea •Helppokäyttöinen 		<p>Kaupallisesti saatavilla monenlaisia testejä eri patogeeneille, kuten Hygicult-kontaktilevyt (Orion Diagnostics) ja Petrifilm (3M)</p>
<p>Ennustava mikrobiologia Mikrobien kasvun ennustaminen matemaattisilla malleilla osana säilyvyystutkimusta</p>	<p>Laadunvalvonta ja tutkimus</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Elintarvikealan toimija tietää, mikä on turvallinen säilyvyysaika tuottamilleen tuotteille, joille asetetaan viimeinen käyttöajankohta tai parasta ennen -päiväys 	<ul style="list-style-type: none"> •Vaatii tutkimusta ja lisäkehitystä, jotta saadaan rakennettua tarkempia mallinnusohjelmia 	<p>Saatavissa matemaattisia ennustemalleja, esimerkiksi ilmainen FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor) http://fssp.food.dtu.dk/</p>

Lähteet

- AFNOR 2020a. NF validation mark - 3M™ Molecular Detection Assay 2 - Listeria. La Plaine Saint-Denis, France [verkkoaineisto]. [viitattu 8.6.2020]. Saatavissa: https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/05/3M-01-14-05-16_en.pdf.
- AFNOR 2020b. NF validation mark - ANSR for Listeria spp [verkkoaineisto]. [viitattu 8.6.2020]. Saatavissa: https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/02/NEO-35-03-01-16_en.pdf.
- AFNOR 2020c. *Listeria monocytogenes* [verkkoaineisto]. [viitattu 8.6.2020]. Saatavissa: <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/listeria-monocytogenes/>.
- Afsah-Hejri, L., Hajeb, P., Ara, P. & Ehsani, R. J. 2019. A Comprehensive review on food applications of terahertz spectroscopy and imaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18: 1563–1621. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12490>.
- Alander, J. T., Bochko, V., Martinkauppi, B., Saranwong, S. & Mantere, T. 2013. A review of optical nondestructive visual and near-infrared methods for food quality and safety. *International Journal of Spectroscopy* 3. Saatavissa: <https://doi.org/10.1155/2013/341402>.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K. & Wanasundara, U. (Eds.) 2011. *Handbook of seafood quality, safety and health applications*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Albers, M., Helle, H., Varpula, T., Itävaara, M., Kapanen, A. & Vikman, M. 2003. Kompostointiprosessin monitorointi ja ohjaus. Kirjallisuusselvitys. Espoo, VTT Tiedotteita 2207, 81 s. Saatavissa: <http://www.vtt.fi/inf/pdf/tiedotteet/2003/T2207.pdf>.
- Andersen, U. B., Thomassen, M. S. & Rørå A. M. B. 1999. Texture properties of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of diet, muscle fat content and time of storage on ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74: 347–353. Saatavissa: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199707\)74:3<347::AID-JSFA802>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3<347::AID-JSFA802>3.0.CO;2-F).
- Ashton, T. A., Michie, I. & Johnston, I. A. 2010. A novel tensile test method to assess texture and gaping in salmon fillets. *Journal of Food Science* 75: 182–190. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01586.x>.
- Balaban, M. O., Chombeau, M., Cirban, D. & Gümüş, B. 2010. Prediction of the weight of Alaskan pollock using image analysis. *Journal of Food Science* 75 (8): E552–E556. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01813.x>.
- Balaban, M. O. S., Şengör, G. F. Ü., Soriano, M. G. & Ruiz, E. G. 2011a. Quantification of gaping, bruising, and blood spots in salmon fillets using image analysis. *Journal of Food Science* 76: E328–E331. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02060.x>.
- Balaban, M. O., Chombeau, M., Gümüş, B. & Cirban, D. 2011b. Determination of volume of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) by image analysis. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 20: 45–52. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10498850.2010.531996>.
- Bernardo, Y. A. A., Rosario, D. K. A., Delgado, I. F. & Conte-Junior, C. A. 2020. Fish quality index method: principles, weaknesses, validation, and alternatives—A review. *Comprehensive*

- Reviews in Food Science and Food Safety 19(5): 2657–2676. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12600>
- Biliaderis, C. G. 1983. Differential scanning calorimetry in food research—A review. Food Chemistry 10(4): 239–265. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90081-X).
- Biomat 2020. ELISA Assay Technology [verkkoaineisto]. [viitattu 24.9.2020]. Saatavissa: <https://www.biomat.it/applications-techniques/elisa-assay/>.
- Bland, J. M., Bett-Garber, K. L., Li, C. H., Brashear, S. S., Lea, J. M. & Bechtel, P. J. 2018. Comparison of sensory and instrumental methods for the analysis of texture of cooked individually quick frozen and fresh-frozen catfish fillets. Food Science & Nutrition 6(6): 1692–1705. Saatavissa: <https://doi.org/10.1002/fsn3.737>.
- Borderías, A. J., Gómez-Guillón, M. C., Hurtado, O. & Montero, P. 1999. Use of image analysis to determine fat and connective tissue in salmon muscle. European Food Research and Technology 209: 104–107. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s002170050466>.
- Botta, J. R., Bonnell, G. & Squires, B. E. 1987. Effect of method of catching and time of season on sensory quality of fresh raw Atlantic cod (*Gadus morhua*). Journal of Food Science 52(4): 928–931. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb14245.x>.
- Boziaris, I. S. & Parlapani, F. F. 2016. Specific spoilage organisms (SSOs) in fish. The Microbiological Quality of Food 61–98. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6>.
- Bruker Daltonics Inc. 2019. Innovation with integrity MALDI biotyper CA system [verkkoaineisto]. [viitattu: 2.6.2020]. Saatavissa: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1862840_MBT_Food_brochure_01-2019_ebook.pdf.
- BÜCHI Labortechnik AG. 2020. NIR-Online process analyser [verkkoaineisto]. [viitattu 17.6.2020] Saatavissa: <https://www.buchi.com/en/products/nir-online/nir-online-process-analyzer> ja https://static1.buchi.com/sites/default/files/NIR-Online_Solution_Brochure_en.pdf.
- Candrian, U. 1995. Polymerase chain reaction in food microbiology. Journal of Microbiological Methods 23(1): 89–103. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00019-H](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00019-H).
- Cen, H. & He, Y. 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. Trends in Food Science & Technology 18: 72–83. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.003>.
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Desmonts, M. H., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.-J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Macé, S., Pilet, M.-F., Prévost, H., Rivollier, M. & Champomier-Vergès, M.-C. 2015. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. The ISME Journal 9(5): 1105–1118. Saatavissa: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202>.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Kłębukowska, L. & Łaniewska-Trokenheim, Ł. 2012. Salmonella detection in poultry meat—Validation of VIDAS Xpress automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay-based method. Journal of Food Safety 32(4): 407–414. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00394.x>.

- Chandra, M. V. & Shamasundra, B. A. 2015. Texture profile analysis and functional properties of gelatin from the skin of three species of fresh water fish. *International Journal of Food Properties* 18: 572–584. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.845787>.
- Chang, L.-Y., Chuang, M.-Y., Zan, H.-W., Meng, H.-F., Lu, C.-J., Yeh, P.-H. & Chen, J.-N. 2017. One-minute fish freshness evaluation by testing the volatile amine gas with an ultrasensitive porous-electrode-capped organic gas sensor system. *ACS Sensors* 2(4): 531–539. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00829>
- Cheng, J.-H., Sun, D.-W., Han, Z. & Zeng, X.-A. 2014. Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(1): 52–61. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12043>.
- Cheng, J.-H. & Sun, D.-W. 2015. Data fusion and hyperspectral imaging in tandem with least squares-support vector machine for prediction of sensory quality index scores of fish fillet. *LWT - Food Science and Technology* 63: 892–898. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.039>.
- Cheng, J.-H., Sun, D.-W. & Wei, Q. 2017. Enhancing visible and near-infrared hyperspectral imaging prediction of TVB-N level for fish fillet freshness evaluation by filtering optimal variables. *Food Analytical Methods* 10: 1888–1898. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0742-9>.
- Cheyne, A. 1975. How the GR Torrymeter aids quality control in the fishing industry. *Fisheries News International* 12: 71–76.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 26(3): 547–603. Saatavissa: <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>.
- Cortés, V., Blasco, J., Aleixos, N., Cubero, S. & Talens, P. 2019. Monitoring strategies for quality control of agricultural products using visible and near-infrared spectroscopy: A Review. *Trends in Food Science & Technology* 85: 138–148. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.015>.
- Costa, C., D’Andrea, S., Russo, R., Antonucci, F., Pallottino, F. & Menesatti, P. 2010. Application of non-invasive techniques to differentiate sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) quality cultured under different conditions. *Aquaculture International* 19: 765–778. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9393-9>.
- Coulter, T. 2016. *Food: the chemistry of its components*: 6th Edition. Royal Society of Chemistry.
- Council Regulation (EC) No 2406/96: Laying down common marketing standards for certain fishery products, Pub. L. No. 31996R2406, 334 OJ L (1996). Saatavissa: <http://data.europa.eu/eli/reg/1996/2406/oj/eng>.
- Dai, Q., Cheng, J.-H., Sun, D.-W. & Zeng, X.-A. 2015. Advances in feature selection methods for hyperspectral image processing in food industry applications: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55: 1368–1382. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.871692>.

- Dalgaard, P. 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26(3): 319–333. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00137-U](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00137-U).
- Dissing, B. S., Nielsen, M. E., Ersbøll, B. K. & Frosch, S. 2011. Multispectral imaging for determination of astaxanthin concentration in salmonids. *PLoS ONE* 6(5): 1–8. Saatavissa: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019032>.
- Dwivedi, H. P. & Jaykus, L. 2011. Detection of pathogens in foods: The current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology* 37(1): 40–63. Saatavissa: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.506430>.
- Elintarviketeollisuusliitto ETL 2017. Elintarvikkeiden mikrobiologisia ohjausarvoja viimeisenä käyttöpäivänä [verkkoaineisto]. [viitattu: 20.5.2020]. Saatavissa: <https://www.etl.fi/media/aineistot/suosituks-et-ja-ohjeet/elintarvikkeiden-mikrobiologisia-ohjausarvoja-viimeisena-kayttopaivana-2017-suositus.pdf>.
- Elmasry, G., Kamruzzaman, M., Sun, D.-W. & Allen, P. 2012. Principles and applications of hyperspectral imaging in quality evaluation of agro-food products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 999–1023. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.543495>.
- Elmasry, G. & Wold, P. 2008. High-speed assessment of fat and water content distribution in fish fillets using online imaging spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7672–7677. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf801074s>.
- Erikson, U., Misimi, E. & Gallart-Jornet, L. 2011. Super chilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chemistry* 127: 1427–1437. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.036>.
- Erikson, U., Standal, I.B., Aursand, I.G., Veliyulin E. & Aursand M. 2012. Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50: 471–480. Saatavissa: <https://doi.org/10.1002/mrc.3825>
- Espiñeira, M., Atanassova, M., Vieites, J. M. & Santaclara, F. J. 2010. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology* 27(1): 122–131. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.004>.
- European Food Safety Authority (EFSA) 2010. Scientific opinion on fish oil for human consumption. Food hygiene, including rancidity. EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal* 8(10): 1874. Saatavissa: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2010.1874>.
- Eviran ohje 16023/5 2017. Kalastustuotteiden valvonta [verkkoaineisto]. Saatavissa: https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/yritykset/elintarvikeala/valmistus/elintarvikeryhmat/kalat-ja-kalastustuotteet/eviran_ohje_16023_5_fi.pdf.
- Farkas, J. & Mohácsi-Farkas, C. 1996. Application of differential scanning calorimetry in food research and food quality assurance. *Journal of Thermal Analysis* 47: 1787–1803. <https://doi.org/10.1007/BF01980925>.
- Fogarty, C., Smyth, C., Whyte, P., Brunton, N. & Bolton, D. 2019a. Sensory and ATP derivative-based indicators for assessing the freshness of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod

- (Gadus morhua). Irish Journal of Agricultural and Food Research 5: 71–80. Saatavissa: <https://doi.org/10.2478/ijafr-2019-0008>.
- Fogarty, C., Whyte, P., Brunton, N., Lyng, J., Smyth, C., Fagan, J. & Bolton, D. 2019b. Spoilage indicator bacteria in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored on ice for 10 days. Food Microbiology 77: 38–42. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.001>.
- Folkestad, A., Wold, J. P., Rørvik, K.-A., Tschudi, J., Haugholt, K. H., Kolstad, K. & Mørkøre, T. 2008. Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 280: 129–135. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.037>.
- FOODnavigator 2018. [verkkoaineisto]. [viitattu 17.6.2020]. Saatavissa: https://www.foodnavigator.com/Article/2018/10/08/TellSpec-s-Al-sensor-detects-fish-fraud-in-real-time-This-technology-is-disruptive-says-CEO?utm_source=copyright&utm_medium=On-Site&utm_campaign=copyright.
- Gill, P., Moghadam, T. T. & Ranjbar, B. 2010. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. Journal of Biomolecular Techniques 21: 167–193.
- Gowen, A. A., O’Sullivan, C. & O’Donnell, C. P. 2012. Review: terahertz time domain spectroscopy and imaging: emerging techniques for food process monitoring and quality control. Trends in Food Science & Technology 25(1): 40–46. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.12.006>.
- GrainSense 2020. [verkkoaineisto]. [viitattu 17.6.2020]. Saatavissa: <https://www.grain-sense.com/>.
- Gram, L. & Dalgaard, P. 2002. Fish spoilage bacteria - Problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology 13: 262–266. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9).
- Gram, L. & Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology 33(1): 121–37. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8).
- Gram, L., Trolle, G. & Huss, H. H. 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. International journal of food microbiology, 4(1): 65–72. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90060-2).
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C. & Huss, H. H. 1990. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). International Journal of Food Microbiology 10(3–4): 303–316. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90077-1).
- Gümüş, B. & Balaban, M. Ö. 2010. Prediction of the weight of aqua cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by image analysis. Journal of Aquatic Food Production Technology 19: 227–237. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10498850.2010.508869>.
- Güney, S. & Atasoy, A. 2015. Study of fish species discrimination via electronic nose. Computers and Electronics in Agriculture 119: 83–91. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2015.10.005>.

- Hagens, S. & Loessner, M. J. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 513–519. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1031-8>.
- Hammers, M. M., Cavinato, A. G., Mayes, D., Lin, M. & Rasco, B. A. 2007. Non-destructive detection of deep muscle bruising in salmon by near infrared spectroscopy. *Eastern Oregon Science Journal* 3: 25–29. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.746638>.
- Han, F., Huang, X., Teye, E. & Gu, H. 2015. Quantitative analysis of fish microbiological quality using electronic tongue coupled with nonlinear pattern recognition algorithms. *Journal of Food Safety* 35(3): 336–344. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/jfs.12180>.
- Han, F., Huang, X. & Teye, E. 2019. Novel prediction of heavy metal residues in fish using a lowcost optical electronic tongue system based on colorimetric sensors array. *Journal of Food Process Engineering* 42(2): 12983. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/jfpe.12983>.
- Hassoun, A. & Karoui, R. 2017. Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and nondestructive instrumental methods: Advantages and limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(9): 1976–1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1047926>.
- Hattula, T., Luoma, T., Kostianen, R., Poutanen, J., Kallio, M. & Suuronen, P. 1995. Effects of catching method on different quality parameters of Baltic herring (*Clupea harengus* L.). *Fisheries Research* 23: 209–221. Saatavilla: [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(94\)00358-4](https://doi.org/10.1016/0165-7836(94)00358-4).
- Hatzakis, E. 2019. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18: 189–220. Saatavilla: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>.
- He, H.-J., Wu, D. & Sun, D.-W. 2015. Nondestructive spectroscopic and imaging techniques for quality evaluation and assessment of fish and fish products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(6): 864–886. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.746638>.
- Herrero, A. M., Carmona, P. & Careche, M. 2004. Raman spectroscopic study of structural changes in hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle proteins during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(8): 2147–2153. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf034301e>.
- Hughes, R. B. & Jones, N. R. 1966. Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a comment on flavour relations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17(9): 434–436. Saatavissa: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170911>.
- Huss, H. H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish - 5. Postmortem changes in fish (No. 348), FAO fisheries and aquaculture technical paper. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome.

- Isaksson, T., Swensen, L. P., Taylor, R. G., Fjaera, S. O. & Skjervold, P. O. 2002. Non-destructive texture analysis of farmed Atlantic salmon using visual/near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(1): 53–60. Saatavissa: <https://doi.org/10.1002/jsfa.997>.
- ISO 2013. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique (ISO 4833-2:2013). International Organization for Standardization.
- ISO 2019. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms (ISO 17340:2019). International Organization for Standardization.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S., Van Der Vossen, J., Tang, S., Katase, M., McClure, P., Kimura, B., Ching Chai, L., Chapman, J. & Grant, K. 2019. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiology* 79: 96–115. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>.
- Jain, D., Pathare, P. B. & Manikantan, M. R. 2007. Evaluation of texture parameters of Rohu fish (*Labeo rohita*) during iced storage. *Journal of Food Engineering* 81: 336–340. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.11.006>.
- Janhunen, M., Niukko J., Vehviläinen, H., Kankainen, M., Hakulinen, J. & Pesonen, O. 2019. Esi-selvitys 3D- kameratekniikan ja koneoppimisen hyödyntämisestä suomalaisessa kalan-kasvatuksessa. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus, 19. Luonnonvarakeskus, Helsinki, 24 s. Saatavissa: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-326-733-6>.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. & Uyttendaele, M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27(6): 710–730. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>.
- Jiang, H., Zhang, M., Bhandari, B. & Adhikari, B. 2018. Application of electronic tongue for fresh foods quality evaluation: A review. *Food Reviews International*, 34(8): 746–769. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1424184>.
- Jonsson, A., Sigurgisladottir, S., Hafteinsson, H. & Kritbergsson, K. 2001. Textural properties of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets measured by different methods in comparison to expressible moisture. *Aquaculture Nutrition* 7(2): 81–89. Saatavissa: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2001.00152.x>.
- Järvelä, A. 2011. Kotimaisen tuorekalan tuoreuden arviointi laatuindeksimenetelmällä QIM® (Pro gradu -tutkielma, Helsingin yliopisto). Saatavissa: <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/28485?show=full>.
- Karakaya, D., Ulucan, O. & Turkan, M. 2020. Electronic nose and its applications: a survey. *International Journal of Automation and Computing*, 17(2): 179–209. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s11633-019-1212-9>.
- Keto, K. 2020. RPAS-laitteiden käyttömahdollisuudet vesistöarakenteiden tarkkailussa ja muissa vesivaratehtävissä (Diplomityö, Oulun yliopisto). Saatavissa: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:oulu-202003191297>.

- Kielwein, G. 1971. Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln. Arch f Lebensmittelhyg 22: 29–37.
- Kielwein, G., Gerlach, R.U. & Johne, H. 1969. Untersuchungen über das Vorkommen von Aeromonas hydrophila in Rohmilch. Arch f Lebensmittelhyg 20: 34–38.
- Kjærsgård, I. V. H. & Jessen, F. 2003. Proteome analysis elucidating post-mortem changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(14): 3985–3991. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf0340097>.
- Kjærsgård, I. V. H., Nørrelykke, M. R., Baron, C. P. & Jessen, F. (2006). Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(25): 9437–9446. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf061885m>.
- Khoshnoudi-Nia, S., Moosavi-Nasab, M., Nassiri, S. M. & Azimifar, Z. 2018. Determination of total viable count in rainbow-trout fish fillets based on hyperspectral imaging system and different variable selection and extraction of reference data methods. Food Analytical Methods 11(5): 3481–3494. Saatavissa: <http://doi.org/10.1007/s12161-018-1320-0>.
- Khoshnoudi-Nia, S. & Moosavi-Nasab, M. 2019. Prediction of various freshness indicators in fish fillets by one multispectral imaging system. Scientific Reports 9: 14704. Saatavissa: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51264-z>.
- Kyranas, V. R. & Lougovois, V. P. 2002. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. International Journal of Food Science & Technology 37(3): 319–328. Saatavissa: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00572.x>
- Lalabadi, H. M., Sadeghi, M. & Mireei, S. A. 2020. Fish freshness categorization from eyes and gills color features using multi-class artificial neural network and support vector machines. Aquacultural Engineering 90: 102076. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2020.102076>.
- Lazo, O., Claret, A. & Guerrero, L. 2016. A comparison of two methods for generating descriptive attributes with trained assessors: check-all-that-apply (CATA) vs. free choice Profiling (FCP): CATA vs. FCP. Journal of Sensory Studies 31(2): 163–176. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/joss.12202>.
- Le Nguyen, D. D., Ngoc, H. H., Dijoux, D., Loiseau, G. & Montet, D. 2008. Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on *Pangasius* fish from Viet Nam. Food Control 19(5): 454–460. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.006>.
- Li, P., Geng, J., Li, H. & Niu, Z. 2020. Fish meal freshness detection by GBDT based on a portable electronic nose system and HS-SPME–GC–MS. European Food Research and Technology 246: 1129–1140. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03462-7>.
- Lougovois, V. P., Kyranas, E. R. & Kyranas, V. R. 2003. Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Food Research International 36(6): 551–560. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00220-X).

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265–275.
- Luoma, T. & Latva-Kala, K. 1998. Suomelle merkittävien kalalajien aistinvaraisen profiilin määrittäminen (Loppuraportti No. 258/98). VTT.
- Maatilan Pellervo 2018. GrainSense on kädessä pidettävä viljalaboratorio. Saatavissa: <https://maatilanpellervo.fi/2018/10/03/grainsense-on-kadessa-pidettava-viljalaboratorio/>.
- Mabuchi, R., Ishimaru, A., Tanaka, M., Kawaguchi, O. & Tanimoto, S. 2019. Metabolic profiling of fish meat by GC-MS analysis, and correlations with taste attributes obtained using an electronic tongue. *Metabolites* 9(1): 1. Saatavissa: <https://doi.org/10.3390/metabo9010001>.
- Macagnano, A., Careche, M., Herrero, A., Paolesse, R., Martinelli, E., Pennazza, G., Carmona, P., D'Amico, A. & Natale, C. D. 2005. A model to predict fish quality from instrumental features. *Sensors and Actuators B: Chemical* 111–112: 293–298. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.06.028>.
- Madeira, K. & Penfield, M. P. 1985. Turbot fillet sections cooked by microwave and conventional heating methods: objective and sensory evaluation. *Journal of Food Science* 50: 172–177. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1985.TB13303.X>.
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Oliveira, M. B. P. P. 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology* 227: 649–665. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x>.
- Martinez, I., Bathen, T., Standal, I. B., Halvorsen, J., Aursand, M., Gribbestad, I. S. & Axelson, D. E. 2005. Bioactive compounds in cod (*Gadus morhua*) products and suitability of ¹H NMR metabolite profiling for classification of the products using multivariate data analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(17): 6889–6895. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf0507902>.
- Martinez, I. & Jakobsen Friis, T. 2004. Application of proteome analysis to seafood authentication. *Proteomics* 4(2): 347–354. Saatavissa: <https://doi.org/10.1002/pmic.200300569>.
- Martinez, I., Šližytė, R. & Daukšas, E. 2007. High resolution two-dimensional electrophoresis as a tool to differentiate wild from farmed cod (*Gadus morhua*) and to assess the protein composition of klipfish. *Food Chemistry* 102(2): 504–510. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.037>.
- Martinsdóttir, E., Sveinsdóttir, K., Lutén, J., Schelvis-Smit, R. & Hyldig, G. 2001. Reference manual for the fish sector : Sensory evaluation of fish freshness. QIM Eurofish. National Institute of Aquatic Resources. Saatavilla: <https://orbit.dtu.dk/en/publications/reference-manual-for-the-fish-sector-sensory-evaluation-of-fish-f>.
- Martinsdóttir, E., Schelvis, R., Hyldig, G. & Sveinsdóttir, K. 2009. Sensory evaluation of seafood: methods. In H. Rehbein & J. Oehlenschläger, *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity* 425–443. Saatavissa: <https://doi.org/10.1002/9781444322668.ch20>.

- Marty-Mahé, P., Loisel, P., Fauconneau, B., Haffray, P., Brossard, D. & Davenel, A. 2004. Quality traits of brown trouts (*Salmo trutta*) cutlets described by automated color image analysis. *Aquaculture* 232(1–4): 225–240. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00458-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00458-7).
- Mateo, A., Soto, F., Villarejo, J. A., Roca-Dorda, J., Gandara, F. D. & García, A. 2006. Quality analysis of tuna meat using an automated color inspection system. *Aquacultural Engineering* 35(1): 1–13. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.06.007>.
- Mathiassen, J. R., Misimi, E., Toldnes, B., Bondø, M. & Østvik, S. O. 2011. High-speed weight estimation of whole herring (*Clupea harengus*) using 3D machine vision. *Journal of Food Science* 76(6): E458–E464. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02226.x>.
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V. & Marcos, J. C. 2014. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry* 458: 69–71. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>.
- Misimi, E., Erikon, U., Diger, H., Skavhaug, A. & Mathiassen, J. R. 2008. Computer vision-based evaluation of preand postrigor changes in size and shape of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets during rigor mortis and ice storage: Effects of perimortem handling stress. *Journal of Food Science* 73(2): E57–E68. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00626.x>.
- Morsy, M. K., Zór, K., Kostesha, N., Alstrøm, T. S., Heiskanen, A., El-Tanahi, H., Sharoba, A., Papkovsky, D., Larsen, J., Khalaf, H., Jakobsen, M. H. & Emnéus, J. 2016. Development and validation of a colorimetric sensor array for fish spoilage monitoring. *Food Control* 60: 346–352. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.038>.
- Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16(3): 223–229. Saatavissa: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
- Nambudiri, D. D. & Gopakumar, K. 1992. ATPase and lactate dehydrogenase activities in frozen stored fish muscle as Indices of cold storage deterioration. *Journal of Food Science* 57: 72–76. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05428.x>.
- Nielsen, D. & Hyldig, G. 2004. Influence of handling procedures and biological factors on the QIM evaluation of whole herring (*Clupea harengus* L.). *Food Research International* 37(10): 975–983. Saatavissa: <https://orbit.dtu.dk/en/publications/influence-of-handling-procedures-and-biological-factors-on-the-qi>.
- Nilsen, H., Esaiassen, M., Heia K. & Sigernes, F. 2002. Visible/near-infrared spectroscopy: A new tool for the evaluation of fish freshness? *Food Science* 67(5): 1821–1826. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08729.x>.
- Niu, J. & Lee, J. Y. 2010. New approach for the determination of fish freshness by electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of Food Science* 65: 780–785. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13586.x>.
- Nollet, L. M. L. & Toldra, F. 2009. *Handbook of seafood and seafood products analysis*. CRC Press.

- Nollet, L. M. L. & Toldra, F. 2010. Sensory analysis of foods of animal origin. CRC Press.
- Nortvedt, R., Torrissen, O. J. & Tuene, S. 1998. Application of near-infrared transmittance spectroscopy in the determination of fat, protein and dry matter in Atlantic halibut fillet. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42(1-2): 199–207. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00012-4).
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. & Kanda, H. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* 53(1): 1–5. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12): E63. Saatavissa: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- NovoCIP 2014. Fish Freshness K value Assay [verkkoaineisto]. [viitattu 20.5.2020]. Saatavissa: http://www.novocib.com/Fish_Freshness_K_Value_Assay.html.
- Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Bartkevičs, V. & Bērziņš, A. 2016. Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, 66: 1–15. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1102-5>.
- AOAC Official Method 2017.09 2017. Analysis confirmation and identification of Salmonella species, Cronobacter species, Campylobacter species, and other gram-negative organisms [verkkoaineisto]. [viitattu 16.6.2020]. Saatavissa: <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=51624>.
- AOAC Official Method 2017.10 2017. Confirmation and identification of Listeria monocytogenes, Listeria species, and other gram-positive organisms [verkkoaineisto]. [viitattu 16.6.2020]. Saatavissa: <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=51641>.
- Oehlschlager, J. 2005. The intellectron fishtester VI-an almost forgotten powerful tool for freshness and spoilage determination of fish at the inspection level. Fifth World Fish Inspection and Quality Control Congress 116–122. Ryder, J. & Ababouch. L. (Eds.), FAO, Rome.
- Olafsdottir, G., Chanie, E., Westad, F., Rosa Jonsdottir, R., Thalmann, C. R., Bazzo, S., Labreche, S., Marcq, P., Lundby, F. & Haugen, J. E. 2005. Prediction of microbial and sensory quality of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by electronic nose. *Journal of Food Science* 70(9): 563–574. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb08330.x>.
- Ottavian, M., Facco, P., Fasolato, L., Novelli, E., Mirisola, M., Perini, M. & Barolo, M. 2012. Use of near-infrared spectroscopy for fast fraud detection in seafood: Application to the authentication of wild European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(2): 639–648. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf203385e>.
- Pall Corporation 2014. GeneDisc® Technologies - For an easy, rapid and reliable identification of Listeria species [verkkoaineisto]. [viitattu 17.6.2020]. Saatavissa: <https://www.pall.co.uk/content/dam/pall/food-beverage/literature-library/non-gated/FBDSGDLSPEN.pdf>.
- Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, K. Ar. & Boziaris, I. S. 2013. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene

- analysis. *Food Microbiology* 33(1): 85–89. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.001>.
- Patel, K. K., Kar, A., Jha, S. N. & Khan, M. A. 2012. Machine vision system: A tool for quality inspection of food and agricultural products. *Journal of Food Science and Technology* 49(2): 123–141. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0321-4>.
- Pérez-Esteve, E., Fuentes, A., Grau, R., Fernández-Segovia, I., Masot, R., Alcañiz, M. & Barat, J. M. 2014. Use of impedance spectroscopy for predicting freshness of sea bream (*Sparus aurata*). *Food Control* 35(1) 360–365. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.025>.
- Peruzy, M. F., Murru, N., Yu, Z., Kerkhof, P.-J., Neola, B., Joossens, M., Proroga, Y. T. R. & Houf, K. 2019. Assessment of microbial communities on freshly killed wild boar meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA amplicon sequencing. *International Journal of Food Microbiology* 301: 51–60. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.005>.
- Pietikäinen, M. & Silvén, O. 2019. Tekoälyn haasteet – koneoppimisesta ja konenäöstä tunnetekäilyyn. *Konenäön ja signaalianalyysin keskus, Oulu*. Saatavissa: <http://jultika oulu.fi/Record/isbn978-952-62-2482-4>.
- Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. & Gallardo, J. M. 1998. Two-dimensional electrophoretic study of the water-soluble protein fraction in white muscle of gadoid fish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10): 3991–3997. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf9800965>.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J. & Sohler, D. 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* 28(5): 848–861. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>.
- Prabhakar, P. K., Vatsa, S., Srivastav, P. P. & Pathak, S. S. 2020. A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations. *Food Research International* 133: 109157. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109157>.
- QIM Eurofish 2020. [verkkoaineisto]. [viitattu 22.6.2020]. Saatavissa: <https://www.qim-eurofish.com/default.asp?ZNT=S0T1O265>.
- Qin, J., Cui, Y., Zhao, X., Rohde, H., Liang, T., Wolters, M., Li, D., Belmar Campos, C., Christner, M., Song, Y. & Yang, R. 2011. Identification of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain responsible for a food poisoning outbreak in Germany by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 49(9): 3439–3440. Saatavissa: <https://doi.org/10.1128/JCM.01312-11>.
- QS-SOLUTION 2020. Freshness Checker [verkkoaineisto]. [viitattu: 20.5.2020]. Saatavissa: https://www.qs-solution.jp/english/freshness_checker.html.
- Quevedo, R. A., Aguilera, J. M. & Pedreschi, F. 2010. Color of salmon fillets by computer vision and sensory panel. *Food and Bioprocess Technology* 3(5): 637–643. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0106-6>.
- Quijada, N. M., Hernández, M. & Rodríguez-Lázaro, D. 2020. High-throughput sequencing and food microbiology. *Advances in Food and Nutrition Research* 91: 275–300. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.10.003>.

- Rantsiou, K., Kathariou, S., Winkler, A., Skandamis, P., Saint-Cyr, M. J., Rouzeau-Szynalski, K. & Amézquita, A. 2018. Next generation microbiological risk assessment: opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 287: 3–9. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.007>.
- Rasmussen, J. B., Krimmer, A. N., Paul, A. J. & Hontela, A. 2012. Empirical relationships between body tissue composition and bioelectrical impedance of brook trout *Salvelinus fontinalis* from a Rocky Mountain stream. *Journal of Fish Biology* 80(6): 2317–2327. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03295.x>.
- Rawdkuen, S., Jongjareonrak, A., Phatcharat, S. & Benjakul, S. 2010. Assessment of protein changes in farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscles during refrigerated storage. *International Journal of Food Science & Technology* 45: 985–994. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02217.x>.
- Rehbein H. & Oehlenschläger, J. (Eds.) 2009. *Fishery products: quality, safety and authenticity*. Wiley-Blackwell Pub. Saatavissa: <https://doi.org/10.1002/9781444322668>.
- Rincón, L., Castro, P. L., Álvarez, B., Hernández, M. D., Álvarez, A., Claret, A., Guerrero, L. & Ginés, R. 2016. Differences in proximal and fatty acid profiles, sensory characteristics, texture, colour and muscle cellularity between wild and farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture* 451: 195–204. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.016>.
- Ritvanen, T.-K. 2001. *Kotimaisten kalalajien tuoreuden määrittäminen eri menetelmillä*. Pro gradu - tutkielma, Turun yliopisto.
- Rizo, A., Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Masot, R., Alcañiz, M. & Barat, J. M. 2013. Development of a new salmon salting–smoking method and process monitoring by impedance spectroscopy. *LWT – Food Science & Technology* 51(1): 218–224. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.025>.
- Rodríguez-Méndez, M. L., Gay, M., Apetrei, C. & Saja, J. A. 2009. Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensor system based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta* 54(27): 7033–7041. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.07.024>.
- Roh, S. W., Kim, K.-H., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Park, E.-J. & Bae, J.-W. 2010. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *The ISME Journal* 4(1): 1–16. Saatavissa: <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.83>.
- Rossel, R. V., Walvoort, D. J. J., McBratney, A. B., Janik, L. J. & Skjemstad, J. O. 2006. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. *Geoderma* 131(1–2): 59–75. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.03.007>.
- Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S. E. & Nissen, H. 2004. Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 5010–5018. Saatavissa: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.5010-5018.2004>.

- Ruiz-Rico, M., Fuentes, A., Masot, R., Alcañiz, M., Fernández-Segovia, I. & Barat Baviera, J. M. 2013. Use of the voltammetric tongue in fresh cod (*Gadus morhua*) quality assessment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 18: 256–263. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.12.010>.
- Ruokavirasto 2018. Puhdistuksen riittävyyden arviointi [verkkoaineisto]. [viitattu 9.6.2020]. Saatavissa: <https://www.ruokavirasto.fi/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-yhteiset-vaatimukset/elintarvikehygienia/puhtaanapito/puhdistuksen-riittavyyden-arviointi/>.
- Ruokavirasto 2019a. Clostridium botulinum ja botulismien ehkäisy [verkkoaineisto]. Saatavissa: <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/clostridium-botulinum/>.
- Ruokavirasto 2019b. Botulismi [verkkoaineisto]. Saatavissa: <https://www.ruokavirasto.fi/teemat/zoonosikeskus/zoonoosit/bakteerien-aiheuttamat-taudit/botulismi/>.
- Ruokaviraston ohje 10501/2. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen sekä yleisiä ohjeita mikrobiologisista tutkimuksista. Ohje elintarvikealan toimijoille. Saatavissa: https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikealan-oppaat/eviran_ohje_10501_2_mikrobiologiset_vaatimukset_toimijoille.pdf
- Ruokaviraston ohje 4095/04.02.00.01/2020/3. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen sekä yleisiä ohjeita elintarvikkeiden mikrobiologisista tutkimuksista. Ohje elintarvikealan toimijoille. Saatavissa: https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-oppaat/elintarvikkeiden-mikrobiologiset-vaatimukset_ohjeita-toimijoille.pdf.
- Ruoppa, M. 1982. Vesihallinnossa käytettävät kalojen kliiniskemialliset ja histologiset määrittämenetelmät. Vesihallituksen monistesarja, 98 s.
- Ryder, J.M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 678–680. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf00064a027>.
- SalmonBusiness 2018. [verkkoaineisto]. [viitattu 17.6.2020]. Saatavissa: <https://salmonbusiness.com/this-small-futuristic-fish-scanning-device-is-going-to-fight-the-billion-dollar-seafood-fraud-industry/>.
- Sanchez-Alonso, I., Carmona, P. & Careche, M. 2012. Vibrational spectroscopic analysis of hake (*Merluccius merluccius* L.) lipids during frozen storage. *Food Chemistry* 132(1): 160–167. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.047>.
- Sant'Ana, L. S., Soares, S. & Vaz-Pires, P. 2011. Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *LWT - Food Science and Technology* 44(10): 2253–2259. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.004>.

- Sciencenorway 2019. Using light to ascertain the quality of fish has the potential to revolutionize the fishing industry [verkkoaineisto]. [viitattu 17.6.2020]. Saatavissa: <https://partner.sciencenorway.no/fish-fisheries-nofima/using-light-to-ascertain-the-quality-of-fish-has-the-potential-to-revolutionize-the-fishing-industry/1594685>.
- Segtnan, V. H., Høy, M., Lundby, F., Narum, B. & Wold, J. P. 2009a. Fat distribution analysis in salmon using non-contact near infrared interactance imaging: A sampling and calibration strategy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 17(1): 247–253. Saatavissa: <https://doi.org/10.1255/jnirs.851>.
- Segtnan, V. H., Høy, M., Sorheim, O., Kohler, A., Lundby, F., Wold, J. P. & Ofstad, R. 2009b. Noncontact salt and fat distributional analysis in salted and smoked salmon fillets using x-ray computed tomography and NIR interactance imaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5): 1705–1710. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf802080s>.
- Sivertsen, A. H., Heia, K., Stormo, S. K., Elvevoll, E. & Nilsen, H. 2011. Automatic nematode detection in cod fillets (*Gadus morhua*) by transillumination hyperspectral imaging. *Journal of Food Science* 76(1): 77–83. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01928.x>.
- Sone, I., Olsen, R. L., Sivertsen, A. H., Eilertsen, G. & Heia, K. 2012. Classification of fresh Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets stored under different atmospheres by hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering* 109(3): 482–489. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.11.001>.
- Soriano-Disla, J. M., Janik, L. J., Viscarra Rossel, R. A., Macdonald, L. M. & McLaughlin, M. J. 2014. The performance of visible, near-, and mid-infrared reflectance spectroscopy for prediction of soil physical, chemical, and biological properties. *Applied Spectroscopy Reviews* 49(2): 139–186. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/05704928.2013.811081>.
- Stien, L. H., Kiessling, A. & Manne, F. 2007. Rapid estimation of fat content in salmon fillets by colour image analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(2): 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.07.007>.
- Stien, L. H., Manne, F., Ruohonene, K., Kause, A., Rungruangsak-Torrissen, K. & Kiessling, A. 2006a. Automated image analysis as a tool to quantify the colour and composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) cutlets. *Aquaculture* 261: 695–705. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.009>.
- Stien, L. H., Suontama, J. & Kiessling, A. 2006b. Image analysis as a tool to quantify rigor contraction in pre-rigor-filletted fillets. *Computers and Electronics in Aquaculture* 50(2): 109–120. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2005.08.012>.
- Storbeck, F. & Daan, B. 2001. Fish species recognition using computer vision and a neural network. *Fisheries Research* 51(1): 11–15. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(00\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00254-X).
- Sun, J., Zhang, R., Zhang, Y., Liang, Q., Li, G., Yang, N., Xu, P. & Guo, J. 2018. Classifying fish freshness according to the relationship between EIS parameters and spoilage stages. *Journal of Food Engineering* 219: 101–110. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.011>.

- Sun, J., Zhang, R., Zhang, Y., Li, G. & Liang, Q. 2017. Estimating freshness of carp based on EIS morphological characteristic. *Journal of Food Engineering* 193: 58–67. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.08.007>.
- Suomela, J.-P., Lundén, S., Kaimainen, M., Mattila, S., Kallio, H. & Airaksinen, S. 2016. Effects of origin and season on the lipids and sensory quality of European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Food Chemistry* 197: 1031–1037. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.114>.
- Sveinsdóttir, K., Martinsdóttir, E., Green-Petersen, D., Hyldig, G., Schelvis, R. & Delahunty, C. 2009. Sensory characteristics of different cod products related to consumer preferences and attitudes. *Food Quality and Preference* 20(2): 120–132. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.09.002>.
- Svellingen, C., Totland, B., White, D. & Øvredal, J. T. 2006. Automatic species recognition, length measurement and weight determination, using the CatchMeter computer vision system. *International council for exploration of the sea*, 3. Saatavissa: <https://imr.brage.unit.no/imr-xmlui/bitstream/handle/11250/100899/N0306.pdf?sequence=1>.
- Tao, Z.-H. & Sato, M. 2013. Determination of K value for fish freshness by filter paper electrophoresis. *Modern Food Science and Technology* 29(10): 2509–2511+2553.
- TellSpec 2020. Test in real-time for the nutritional value, moisture and freshness of white fish without destroying the fish [verkkoaineisto]. [viitattu 17.6.2020]. Saatavissa: <https://tellspec.com/eit-food/fishproject/>.
- Thomas, S., Kuska, M. T., Bohnenkamp, D., Brugger, A., Elias Alisaac, E., Wahabzada, M., Behmann, J. & Mahlein, A.-K. 2018. Benefits of hyperspectral imaging for plant disease detection and plant protection: a technical perspective. *Journal of Plant Diseases and Protection* 125(5): 5–20. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0124-6>.
- Triqui, R. & Bouchriti, N. 2003. Freshness assessments of Moroccan sardine (*Sardina pilchardus*): Comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(26): 7540–7546. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf0348>.
- Uddin, M. & Okazaki, E. 2004. Classification of fresh and frozen-thawed fish by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Science* 69(8): C665–C668. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2004.tb18015.x>.
- Undeland, I., Hall, G. & Lingnert, H. 1999. Lipid oxidation in fillets of herring (*Clupea harengus*) during ice storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 524–532. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/jf9807871>.
- Valderrama, W. B., Dudley, E. G., Doores, S. & Cutter, C.N. 2016. Commercially available rapid methods for detection of selected food-borne pathogens. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 56(9): 1519-1531. Saatavissa: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.775567>.
- Vallin, I. 2016. Gluteenittomien tattarinappien rakenteen analysointi. Rakenne-, kuiva-aine- ja aw-mittaus. Opinnäytetyö, Seinäjoen ammattikorkeakoulu. 55 s. Saatavissa: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-201605137619>.

- Vaz-Velho, M., Duarte, G. & Gibbs, P. 2000. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines off fresh to cold-smoked fish. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2): 147–151. Saatavissa: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00118-4).
- Velioglu, H. M., Temiz, H. T. & Boyaci, I. H. 2015. Differentiation of fresh and frozen-thawed fish samples using Raman spectroscopy coupled with chemometric analysis. *Food Chemistry* 172: 283–290. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.073>.
- Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Satomi, M. & Gram, L. 2005. Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6689–6697. Saatavissa: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6689-6697.2005>.
- Välimaa, A.-L., Tilsala-Timisjärvi, A. & Virtanen, E. 2015. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review. *Food Control* 55: 103–114. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>.
- Wagner, C. D., Clever, H. L. & Peters, E. D. 1947. Evaluation of ferrous thiocyanate colorimetric method. *Analytical Chemistry* 19: 980–982. Saatavissa: <https://doi.org/10.1021/ac60012a011>.
- White, D. J., Svellingen, C. & Strachan, N. J. C. 2006. Automated measurement of species and length of fish by computer vision. *Fisheries Research* 80(2–3): 203–210. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.04.009>.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(12): 6578–6583. Saatavissa: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>.
- Willis, J. & Hobday, A. 2008. Application of bioelectrical impedance analysis as a method for estimating composition and metabolic condition of southern blue tuna (*Thunnus maccoyii*) during conventional tagging. *Fisheries Research* 93(1–2): 64–71. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2008.02.010>.
- Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S. & Chee, H.-Y. 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 124(3): 626–643. Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/jam.13647>.
- Xu, J.-L., Riccioli, C. & Sun, D.-W. 2015. An overview on nondestructive spectroscopic techniques for lipid and lipid oxidation analysis in fish and fish products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14(4). Saatavissa: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12138>.
- Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö.G., Soyer, Y. & Alpas, H. 2014. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control* 40: 359–367. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.020>.
- Yoshioka, T., Konno, Y. & Konno, K. 2019. Below-zero storage of fish to suppress loss of freshness. *Fisheries Science* 85: 601–609. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01294-3>.
- Yuan, P., Wang, Y., Miyazaki, R., Liang, J., Hirasaka, K., Tachibana, K. & Taniyama, S. 2018. A convenient and nondestructive method using bioimpedance analysis to determine fish

- freshness during ice storage. *Fisheries Science* 84: 1099–1108. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1256-8>.
- Zaragoza, P., Ribes, S., Fuentes, A., Vivancos, J.-L., Fernandez-Segovia, I., Ros-Lis, J., Barat, J. & Martínez-Máñez, R. 2012. Fish freshness decay measurement with a colorimetric array. *Procedia Engineering* 47: 1362–1365. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.pro-eng.2012.09.409>
- Zavadlav, S., Janči, T., Lacković, I., Karlović, S., Rogulj, I. & Vidaček, S. 2016. Assessment of storage shelf life of European squid (cephalopod: Loliginidae, *Loligo vulgaris*) by bioelectrical impedance measurements. *Journal of Food Engineering* 184: 44–52. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.022>.
- Zhao, X., Zhuang, H., Yoon, S.-C., Dong, Y., Wang, W. & Zhao, W. 2017. Electrical impedance spectroscopy for quality assessment of meat and fish: A review on basic principles, measurement methods, and recent advances. *Journal of Food Quality* 2: 1–16. Saatavissa: https://doi.org/10.1155/2017/6370739Zhao_ym.2017.
- Zhuang, S., Li, Y., Hong, H., Liu, Y., Shu, R. & Luo, Y. 2020. Effects of ethyl lauroyl arginate hydrochloride on microbiota, quality and biochemical changes of container-cultured largemouth bass (*Micropterus salmonides*) fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 324: 126886. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126>.
- Zion, B., Alchanatis, V., Ostrovsky, V., Barki, A. & Karplus, I. 2007. Real-time underwater edible fish species sorting. *Computers and Electronics in Agriculture*, 56(1): 34–45. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2006.12.00>



luke.fi

Luonnonvarakeskus
Latokartanonkaari 9
00790 Helsinki
puh. 029 532 6000