

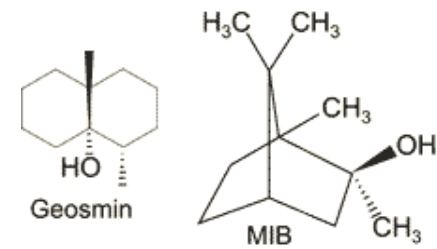
Uusimpia tuloksia makuvirhetutkimuksessa

Vesiviljelyn kesäpäivät

Petra Lindholm-Lehto
24.8.2022



Makuvirheet









Esim.
4-bromofenoli - ulostemainen
nonaanihappo - ummehtunut
4-etyylioktaanihappo - vuohimainen
3-metyyli-indoli - ulostemainen
kumariini - ruohomainen
1-dodekanoli - pistävä
dodekaanihappo - multamainen
8-heptadekeeni - multamainen
voihappo - juustomainen, hiki

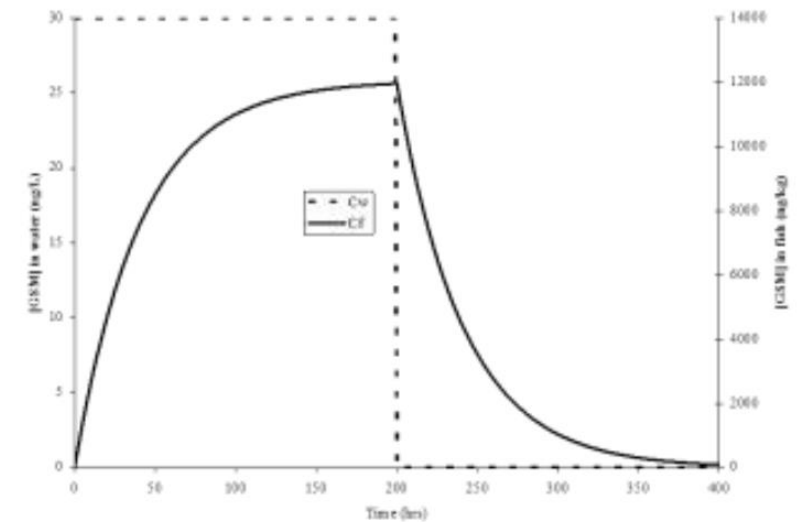
- Geosmiini (GSM), 2-metyyli-isoborneoli (MIB)
 - Liukoisuus veteen 194,5 mg/L MIB; 150,2 mg/L GSM
 - K_{ow} 3,13 MIB; 3,7 GSM
 - Lisäksi runsaasti muita: Mm. puisevaa, pihkaista (β -karyofylleeni, α -humuleeni, β -ionooni), mätää (aldehydit, 2-nonenal), metallista tai polttoainemaista (aromaattiset hiilivedyt), 4-etyylioktaanihappo (vuohimainen), p-kresoli (hevostallimainen), skatoli (ulostemainen) muistuttavaa hajua/makua
 - Mikrobien metaboliatuotteet, mutta myös rehuperäiset yhdisteet saattavat aiheuttaa makuvirhettä
 - Raskasmetallit (Cu, Zn, Cd, Pb) saattavat välillisesti vaikuttaa makuvirheisiin: varastoinnissa kiihdyttävät rasvahappojen hapettumista
 - Esim. 52 haihtuvaa yhdistettä kuhasta (*Sander lucioperca*): aldehydejä (12), alkoholeja (9), ketoneja (7), terpeenejä (4), rikkiyhdisteitä (2) ja bentseenejä 17.
- 28 pitoisuus laski 1-2 viikon raikastuksessa

- M Mahmoud, A Buettner 2021. Sci rep 11:421.
- M Kalay, M Canli 2000. J Turk. J. Zool. 24:429–436.
- R Podduturi, MA Petersen, M Vestergaard, G Hyldeg, NOG Jorgensen 2021. Aquaculture 530:735754.

Makuvirheet

Compound	Chemical Structure	Chemical Formula	Molecular Weight	CAS Number	Water Half-Life	Log Kow	Water Solubility (mg·cm ⁻³)
MIB		C ₁₁ H ₂₀ O	168.3	2371-42-8	19.5 days	3.13	0.45
GEO		C ₁₂ H ₂₂ O	182.3	16423-19-1	24.5 days	3.7	0.0512
IPMP		C ₈ H ₁₂ N ₂ O	152.2	25773-40-4	n.a.	2.41	61.4
IBMP		C ₉ H ₁₄ N ₂ O	166.2	24683-00-9	n.a.	2.72	20.9
β-Ionone		C ₁₃ H ₂₀ O	192.2	14901-07-6	n.a.	2.9	0.104
β-Cyclocitral		C ₁₀ H ₁₆ O	152.2	432-25-7	n.a.	2.4	Insoluble

- Muodostuvat vesistöissä kesällä (lämpötila, hidas virtaus, auringon valo)
- Alhaisempi muodostuminen kun: alle 20 °C lämpötila, voimakas auringon säteilyteho (>100 μmol/m²/s)
- Levät, syanobakteerit ja erilaiset mikrobit (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, Myxobakteerit, Actinomycetale: *Streptomyces*, *Sorangium*)
- Tuottavat mm. terpenoidi-, rasvahappo-, karotenoidi- ja rikkiyhdisteitä
- Vain 0.001%–1% kokonaismikrobimäärästä tuottaa GSM kiertovesiympäristössä
- Kulkeutuminen kalaan kidusten, ihon ja ruoansulatuskanavan kautta
- Syytä geosmiinin muodostumiselle mikrobien metaboliassa ei täysin ymmärretä
- Energeettisesti edullista tuottaa GSM



Lukassen et al. 2017 Aquaculture, 479, 304–310

Moretto et al. 2022 Fishes 7, 34

Petersen et al. 2011 J. Agric. Food Chem. 59, 12561–12568

Havaitseminen

- Havainnointiraja vaihtelee lajeittain
- Kirjolohi: GSM 0.9 µg/kg; MIB 0.7 µg/kg
- Kertyy helpommin rasvaiseen lajiin, mutta
- Korkeampi rasvapitoisuus nostaa havainnointirajaa
- Äskettäin tehty tutkimus, jossa havaittiin makuvirheiden voivan aiheuttaa ihmisillä päänsärkyä, stressiä ja vatsavaivoja

TABLE 1 Reported sensory threshold levels of GSM and MIB in water and different species of fish

Species	Sensory threshold (GSM)	Sensory threshold (MIB)	References
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	GSM 0.9 µg/kg	MIB 0.7 µg/kg	Johnsen and Lloyd (1992) Martin and Suffet (1992) Robertson et al. (2005)
Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	GSM 0.25–0.5 µg/kg	MIB 0.1–0.2 µg/kg	Grimm, Lloyd, and Zimba (2004)
Fresh water trout <i>Salvelinus namaycush</i>	GSM 6–10 µg/kg	–	Yurkowski and Tabachek (1974)
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	GSM 0.044–0.5 µg/kg	MIB >0.9 µg/kg	Burr et al. (2012), Davidson et al. (2014)
Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	GSM 0.74 µg/kg	–	Jones et al. (2013)
Rainbow trout <i>O. mykiss</i>	GSM 0.9 µg/kg	–	
Channel catfish <i>I. punctatus</i>		MIB 0.7 µg/kg	
Murray cod (<i>Maccullochella peelii peelii</i>)	GSM 0.059–0.9 µg/kg	–	Robertson et al. (2006), Palmeri, Turchini, Caprino, et al. (2008)
Rainbow trout <i>O. mykiss</i>	GSM 0.9 µg/kg	MIB 0.6 µg/kg	Robertson et al. (2005), Persson (1980a)
Water	GSM 0.015–0.2 µg/L	MIB 0.018–0.045 µg/L	Persson (1980a), Maga (1987)
	GSM 0.0038 µg/L odour	MIB 0.02–0.1 µg/L	Zoeteman and Piet (1973), Persson and York (1978), Persson (1980b)
	GSM 0.016 µg/L taste (40°C)	MIB 0.015 µg/L (40°C)	Young, Horth, Crane, Ogden, and Arnott (1990)

Note. GSM: geosmin, MIB: 2-methylisoborneol.

Aistinvaraisesti

Raja-arvoja (haistamalla), mg/L

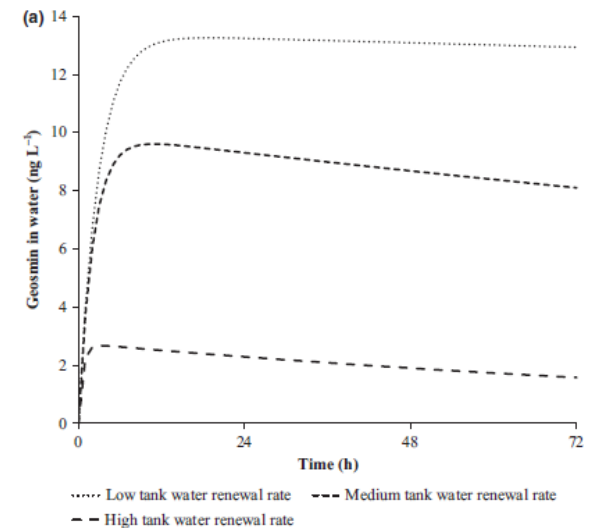
Chemical Class	Chemical Name	Odour Description	Concentration (mg/L)	Category	Chemical Name	Odour Description	Concentration (mg/L)	
Alcohol	ethanol				ethanol	Alcohol odour	0.52	
	1-octen-3-ol				1-octen-3-ol	Fishy odour	0.0015	
	1-butanol				1-butanol	Alcohol-like odour	0.038	
	2-methylisopropan-1-ol				2-methylisopropan-1-ol	Musty odour	40	
	1-pentanol				1-pentanol	Mild odour	0.12	
	1-hexanol				1-hexanol	Fishy odour	0.5	
	1-octanol				1-octanol	Alcohol odour	0.0027	
	1-pentene-3-ol				1-pentene-3-ol	Grassy odour	0.4	
	1-octen-3-ol				1-octen-3-ol	Grassy odour	0.1	
	(E)-2-octen-1-ol				(E)-2-octen-1-ol	Grassy odour	0.04	
	cyclopentanol				cyclopentanol	Mint odour	0.125	
	2-methylisoborneol (MIB)				2-methylisoborneol (MIB)	Earthy odour	0.000029	
	geosmin (GSM)				geosmin (GSM)	Earthy odour	0.00001	
	heptanaldehyde				heptanaldehyde	Fishy odour	0.00018	
	butyraldehyde				butyraldehyde	Pungent odour	0.00067	
Aldehyde	hexanal				hexanal	Fishy odour	0.097	
	nonanal				nonanal	Grassy odour	0.00034	
	benzaldehyde				benzaldehyde	Bitter almond odour	0.35	
	octanal				octanal	Grassy odour	0.025	
	2-hexenal				2-hexenal	Grassy odour	0.017	
	4-heptenal				4-heptenal	Fishy odour	0.0004	
	(E)-2-octenal				(E)-2-octenal	Fatty odour	0.003	
	trans-2-pentenal				trans-2-pentenal	Grassy odour	0.0015	
	(E)-2-nonenal				(E)-2-nonenal	Fatty odour	0.0004	
	(Z)-2-decenal				(Z)-2-decenal	Metallic odour	0.001	
	trans,trans-2,4-nonadienal				trans,trans-2,4-nonadienal	Beany odour	0.00005	
	trans,trans-2,4-heptadienal				trans,trans-2,4-heptadienal	Fishy odour	0.001	
	3-methylthiopropionaldehyde				3-methylthiopropionaldehyde	Musty odour	0.00045	
	(E,Z)-2,6-nonadienal				(E,Z)-2,6-nonadienal	Fatty odour	0.9	
	(E,E)-2,4-nonadienal				(E,E)-2,4-nonadienal	Fatty odour	0.2	
(E,Z)-2,4-dodecenal				(E,Z)-2,4-dodecenal	Fatty odour	0.5		
(E,Z,Z)-2,4,7-decatrienal				(E,Z,Z)-2,4,7-decatrienal	Fatty odour	0.02		
Ketone	acetone	Mint odour	130					
	2,3-butanedione	Chlorine-like odour	0.0054					
	2,3-pentanedione	Butter odour	1.0					
	3-pentanone	Mint odour	not detected					
	1-pentene-3-one	Paint odour	0.0009					
	6-Methyl-5-hepten-2-one	Metallic odour	0.068					
	1,5-oct-diene-3-ol	Earthy odour	0.1					
	1,5-octadien-3-one	Earthy odour	0.05					
	Acid	acetic acid	Strong odour of vinegar	0.006				
		valeric acid	Butter-like odour	0.39				
		caproic acid	Goat-like odour	0.42				
		caprylic acid	Unpleasant and irritating odour	0.5				
		nonanoic acid	Fatty odour	0.1				
		Trimethylamine (TMA)	Fishy odour	0.0024				
	Amine	dimethylamine	Fishy odour	0.003				
ethyl 3-methylthiopropionate		Metallic odour	0.007					
Sulfur compounds	dimethyl sulfide	Unpleasant odour of wild radish	0.003					
	2-pentyl-furan	Metallic odour	0.006					
Furans	2-ethylfuran	Smoky burnt odour	0.0023					
	3-isobutyl-2-methoxypyrazine	Musty odour	0.000002					
Pyrazines	benzothiazole	Plastic odour	not detected					
	1H-indole	Musty odour	0.0000316					
Thiazoles	cedrol	Woody odour	2.00					
	(E)-4,5-epoxy-(E)-2-decenal	Metallic odour	0.0002					

Wang et al. 2022 Int J Food Sci Technol doi:10.1111/ijfs.15962

Raikastus

- Usein riittävä 6-15 vrk puhtaassa vedessä, pitempikin aika voi olla tarpeen
- Kalan koko, rasvapitoisuus, virtausnopeus/ uintinopeus, veden vaihto, pitoisuudet vedessä ja kalassa
- Happipitoisuus ei vaikuta
- Raikastuksessa veden lämpötilalla tärkeä rooli → kalan aineenvaihdunnan nopeus
- Lipofiiliset makuvirheet poistuvat raikastuksessa passiivisesti diffuusiolla kidusten ja osittain ihonkin kautta
- Poolisemmat metaboliitit poistuvat maksan ja munuaisten kautta ulosteina
- Pitoisuudet pidettävä alle 10 ng/L raikastusvedessä
- Paasto laskee rasvapitoisuutta, laihtuminen, rehunkäytön teho (kustannukset)
- Raikastuksessa veden määrä erittäin suuri suhteessa raikastuvasta poistuvaan → Ei vaikuta raikastuksen onnistumiseen; Paitsi erittäin suurissa kalatiheyksissä?

Schram et al. 2017 Aquacult. Res. 48, 4646-4655

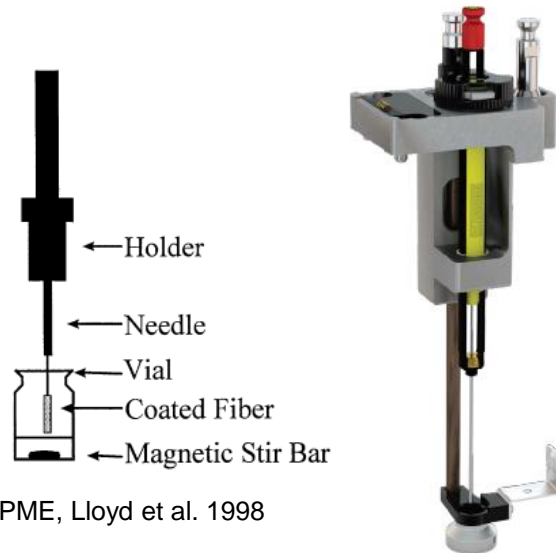


Analytiikka Lukessa

Soveltuu vesi- ja kalanäytteille

Levels of detection (LOD)s, levels of quantification (LOQ)s, and linearities (R^2) in aqueous solutions (1-100 ng L⁻¹) of selected off-flavors analyzed with automated SPME-GC-QQQ.

Compound	LOD	LOQ	Linearity, R^2
Acetoin, ng L ⁻¹	0.45	0.80	0.9949
GSM, ng L ⁻¹	0.11	0.15	0.9261
Hexanal, ng L ⁻¹	0.73	1.23	0.9233
Hexanoic acid, ng L ⁻¹	1.61	5.50	0.9934
IBMP, ng L ⁻¹	1.26	1.26	0.9997
IPMP, ng L ⁻¹	0.12	0.53	0.9783
MIB, ng L ⁻¹	0.39	0.41	0.9318
Methional, ng L ⁻¹	1.04	1.40	0.9931
Octanal, ng L ⁻¹	0.29	0.96	0.9941
Octanoic acid, ng L ⁻¹	1.61	2.44	0.9949
Phenylacetaldehyde, ng L ⁻¹	0.32	0.78	0.9988
TCA, ng L ⁻¹	0.55	1.31	0.9959
Terpineol, ng L ⁻¹	0.85	1.05	0.9938
Vanillin, ng L ⁻¹	0.24	0.65	0.9700



SPME, Lloyd et al. 1998

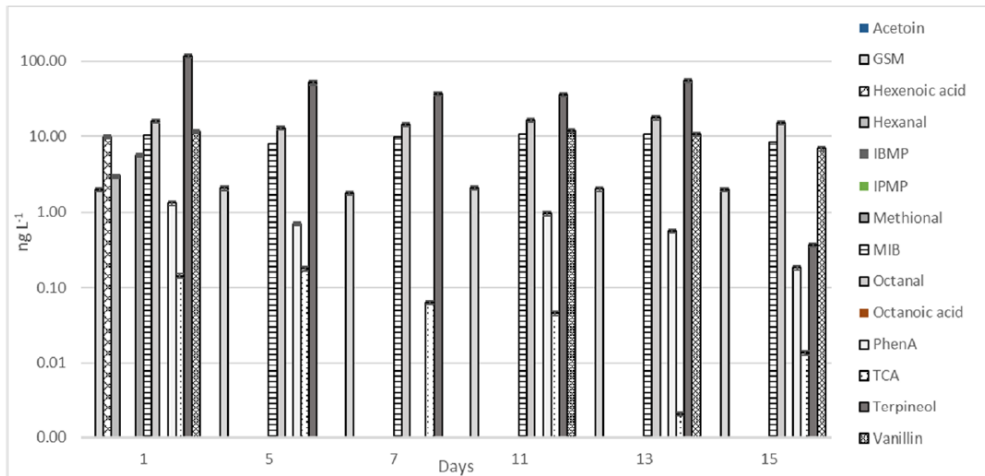


Lindholm-Lehto 2022 Environ Sci Pollut Res 29, 55866–55876

Raikastus

Raikastuskoe

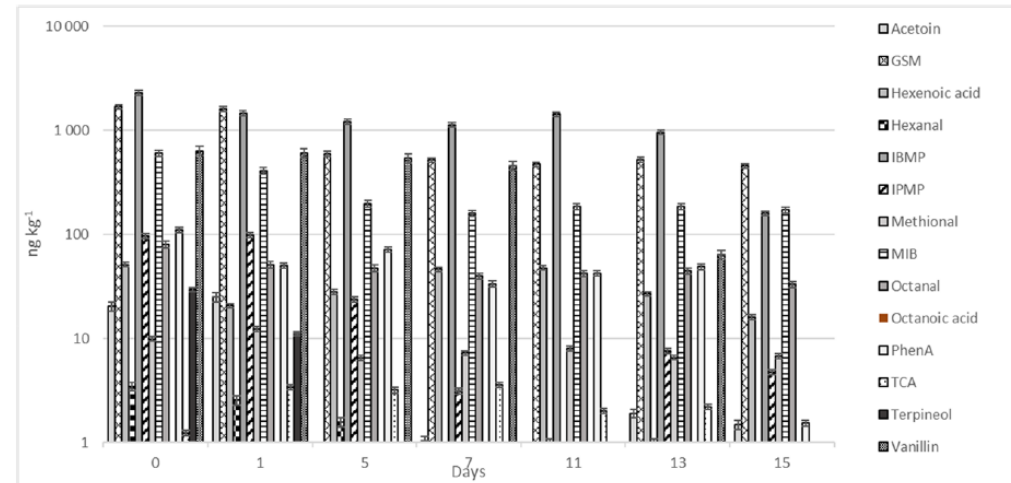
- Seurattiin 14 makuvirhettä aiheuttavan yhdisteen pitoisuuksia kiertovedessä, tulovedessä ja raikastuksen aikana sekä kalassa, kirjolohi (*O. mykiss*), 0, 1, 5, 7, 11, 13, 15 vrk



Lindholm-Lehto 2022 Environ Sci Pollut Res 29, 55866–55876

Table 1 Selected off-flavor compounds, their purities, formulas, CAS numbers, densities, and aroma descriptions

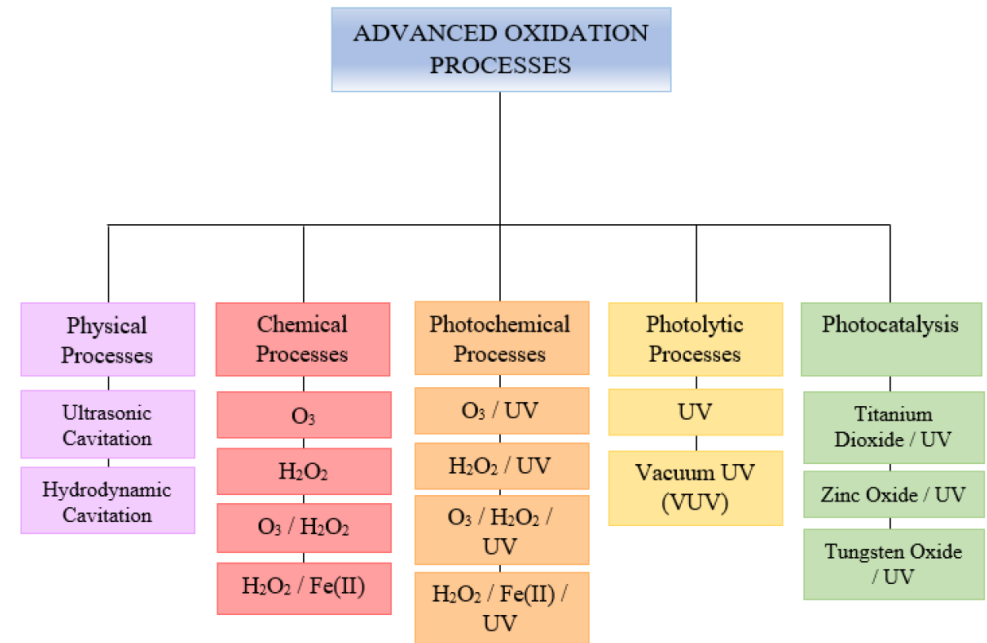
Compound	Purity	Chemical formula	CAS number	Density, g mL ⁻¹	Aroma
Acetoin /3-hydroxy-butan-2-one/	≥ 99%	CH ₃ CH(OH)C(O)CH ₃	513-86-0	1.013	Buttery
Caproic acid/hexanoic acid	≥ 99%	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	142-62-1	0.927	Goat-like
Caproic aldehyde/hexanal	≥ 95%	CH ₃ (CH ₂) ₄ CHO	66-25-1	0.815	Grass
Caprylic acid/octanoic acid	≥ 99.5%	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	124-07-2	0.910	Fruity-acid, irritating
Caprylic aldehyde/octanal	99%	CH ₃ (CH ₂) ₆ CHO	124-13-0	0.821	Fruit-like
Geosmin/dimethyl-8-hydronaphtalen	99%	C ₁₂ H ₂₂ O	16,423-19-1	10 ⁻⁴	Musty
3-Isobutyl-2-methoxy- pyrazine	99%	C ₉ H ₁₄ N ₂ O	24,683-00-9	0.990	Undesirable, musty
2-Isopropyl-3-methoxy pyrazine	≥ 98%	C ₈ H ₁₂ N ₂ O	25,773-40-4	0.996	Undesirable, musty
2-Methylisoborneol	99%	C ₁₁ H ₂₀ O	2371-42-8	0.968	Earthy
3-(Methylthio)propionaldehyde	98%	CH ₃ S(CH ₂) ₂ CHO	3268-49-3	1.052	Onion-like, meat-like
Phenylacetaldehyde	95%	C ₈ H ₈ O	122-78-1	1.075	Sweet, rose, flowery
α-Terpeneol	96%	C ₁₀ H ₁₈ O	98-55-5	0.930	Terpeneic
2,4,6-Trichloroanisole	99%	C ₇ H ₅ Cl ₃ O	87-40-1	Solid	Medicinal, phenolic, iodine-like
Vanillin/4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	99%	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄	1696-60-2	1.056	Vanilla, sweet



Hapettamiseen perustuvat menetelmät

AOP (Advanced oxidation processes)

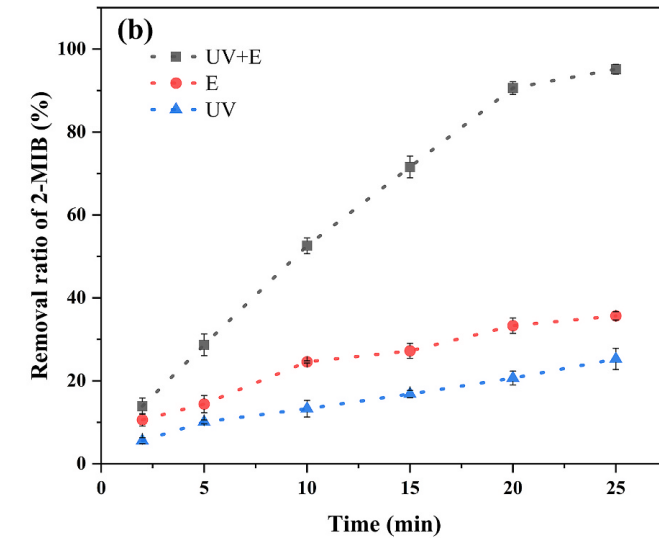
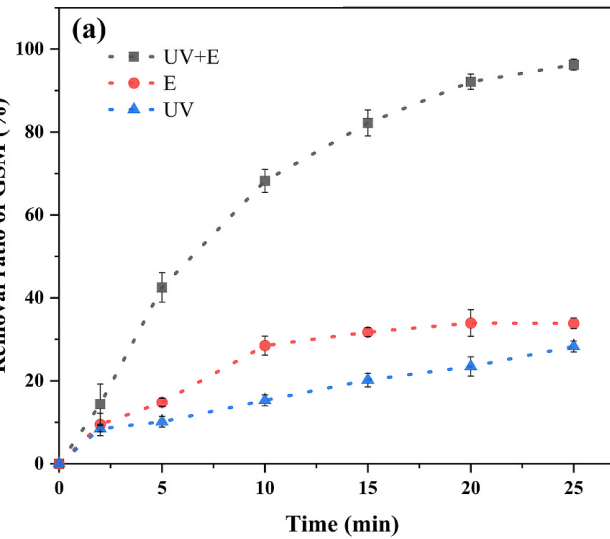
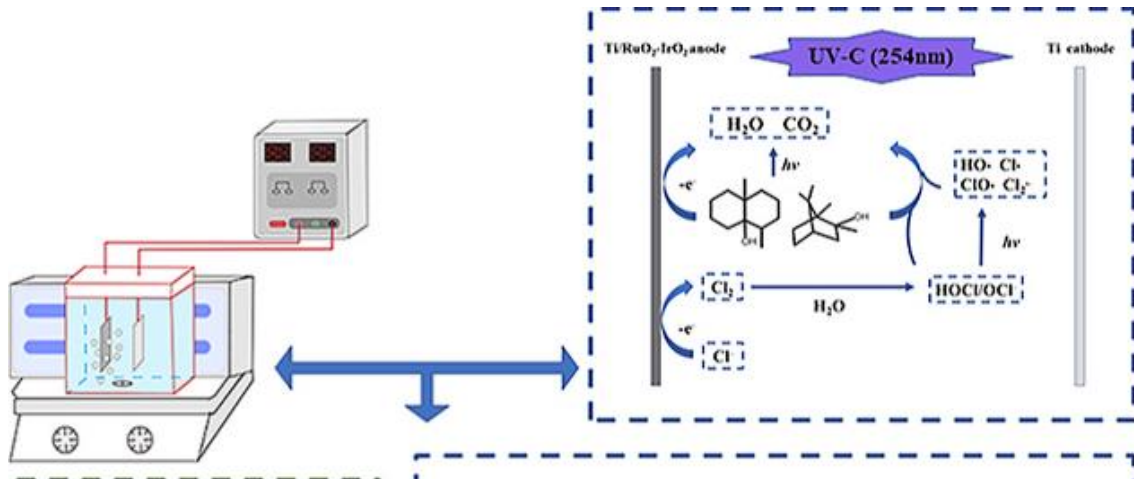
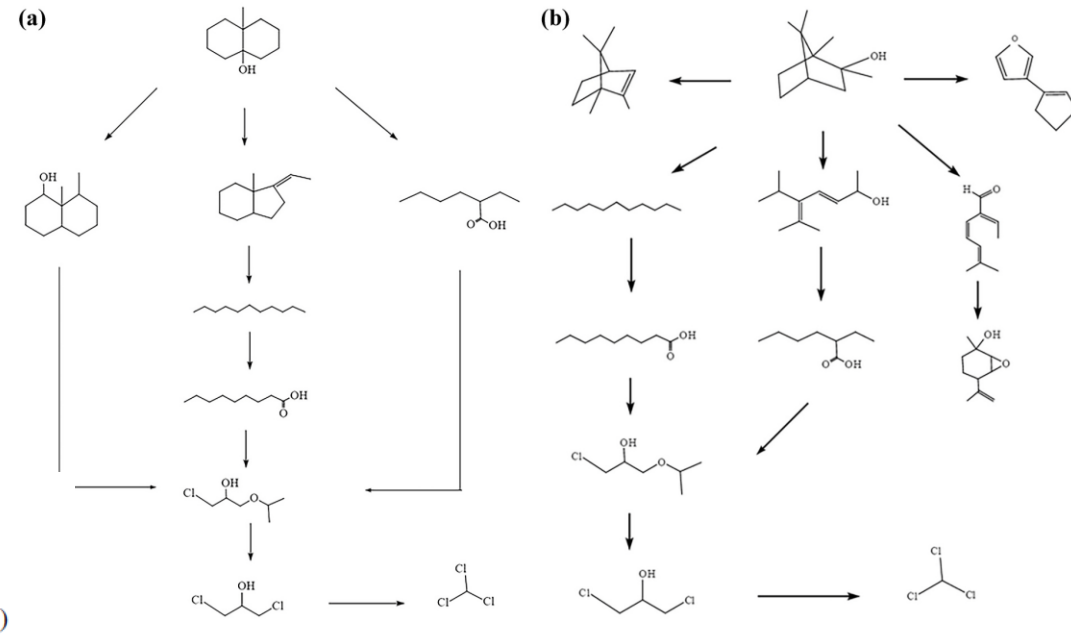
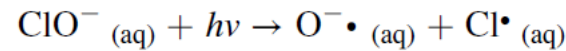
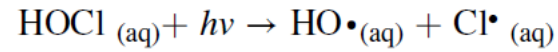
- Perustuvat hydroksyyli- radikaalin hapetustehoon
- Fysikaaliset menetelmät kavitaatioon
- Valokemialliset UV-säteilyyn
- Absorboituu orgaaniseen materiaaliin, hajoaminen
- AOP mahdollinen myös UV+ Cl₂ tai HClO tai ClO⁻
- Ei klooriyhdisteitä RAS:iin
- Monet menetelmät alun perin juomaveden valmistuksesta
- RAS:n kiintoaine tuo haasteita



Valoelektrokemiallinen hajoitus

- AOP: UV-välitteinen elektrokemiallinen hapetus (UV-C+ E)

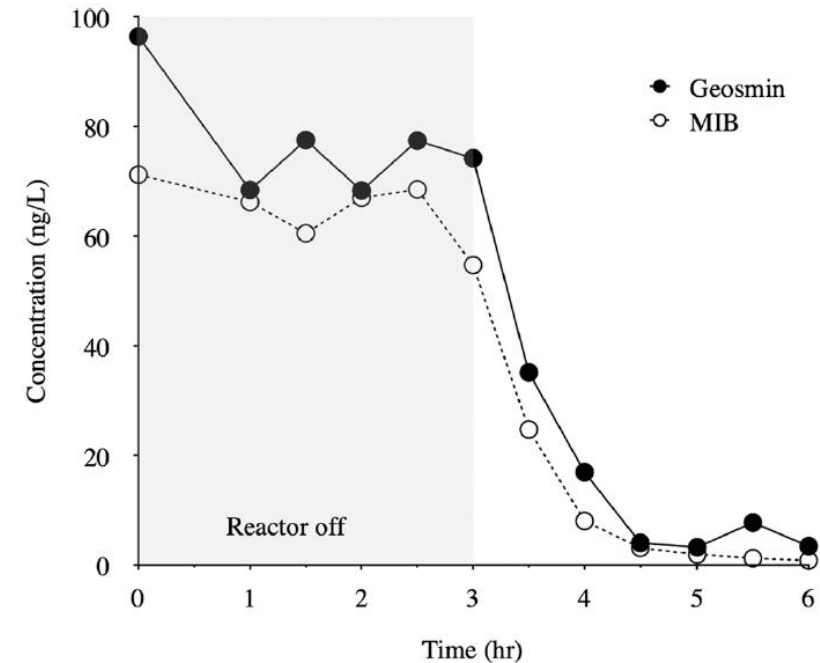
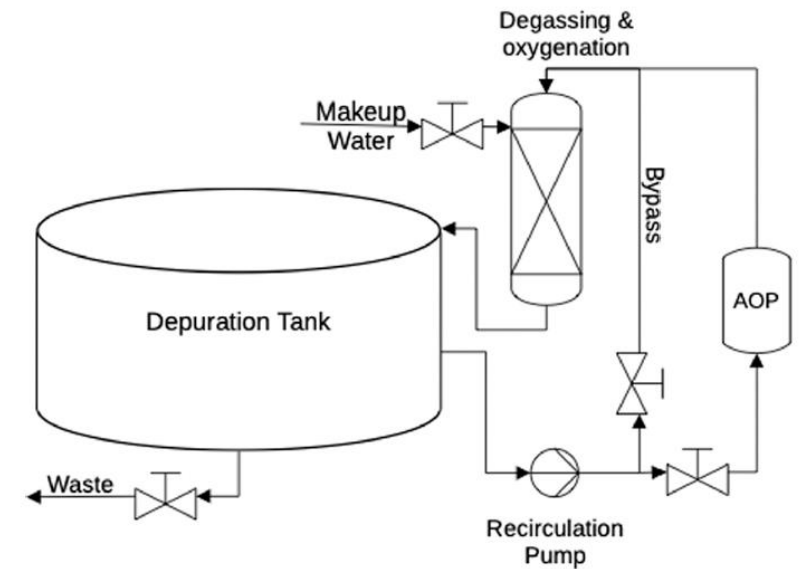
→ Hajotus H₂O ja CO₂ asti



Huang et al. 2022 Chemosphere 290, 133325

eAOP

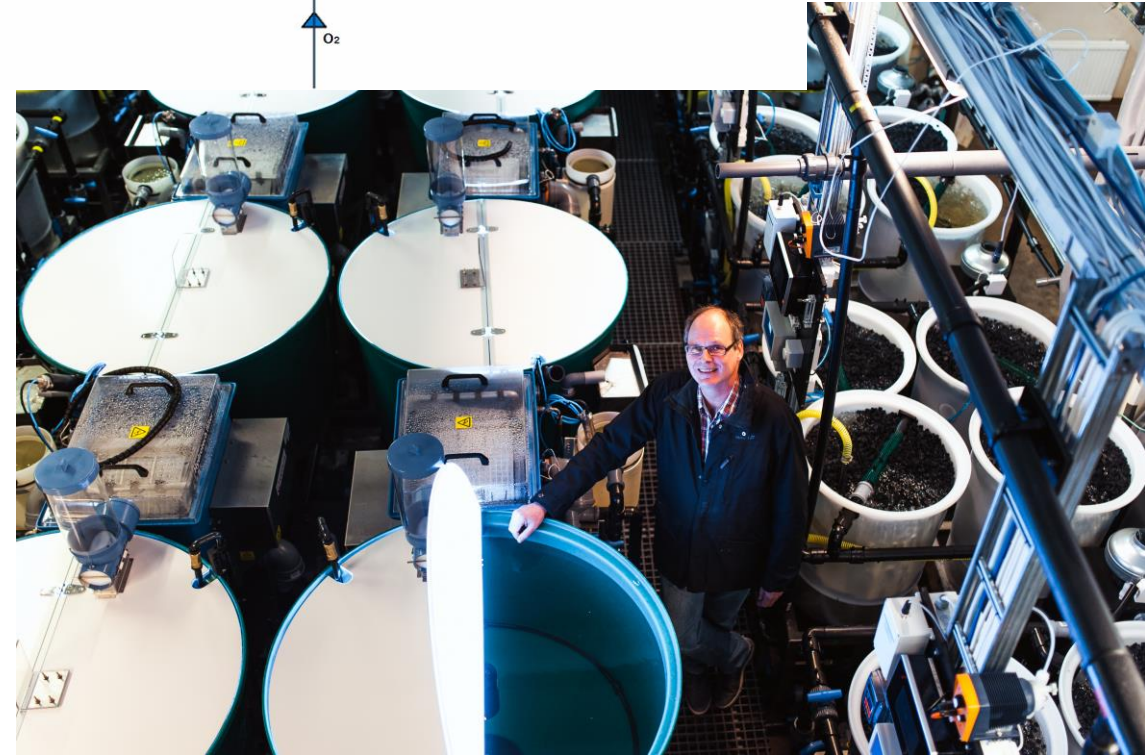
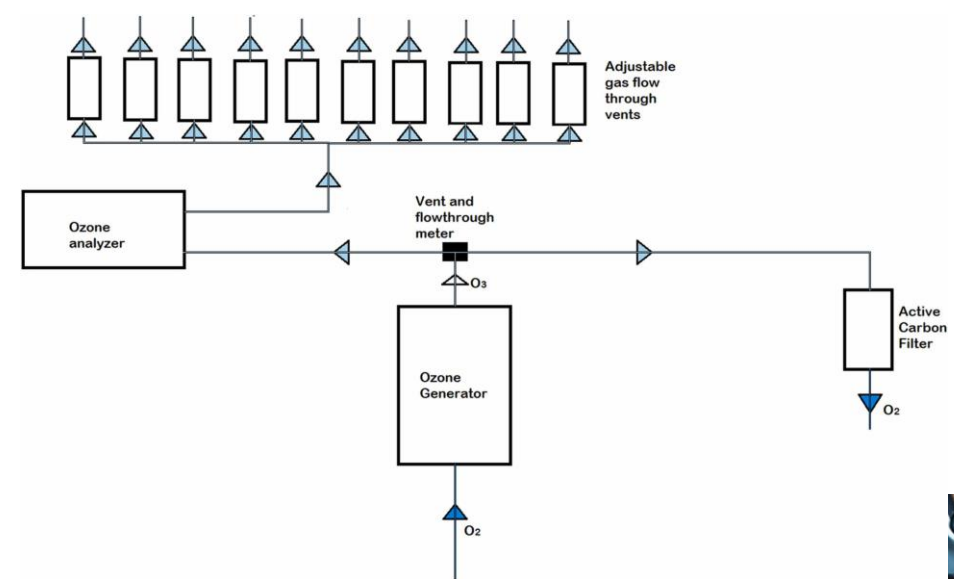
- AOP GSM ja MIB poistoon, annostelu raikastukseen
 - Koelajina lohi (*Salmo salar*)
 - Spiikattu GSM, MIB 100 ng/L
 - UV/H₂O₂ (eAOP[®], Exciton Advanced Oxidation Process) reaktori
- Fotokatalyyysi, UV-fotolyysi, elektrolyysi, UV/ H₂O₂
- Exciton Clean: Reaktorissa valoaktiiviset metallielektrodit pinnoitettu nanopinnoitteella, katodi + UV (254 nm)
- Katalyytin korkeaaenergiset elektronit hapettaa orgaanista materiaalia, muodostuu OH• radikaaleja
- Raikastus 10 vrk → 5 vrk
 - Säästää vettä ja lyhentää raikastuksen kestoja
 - Säästää arviolta \$0.12-\$0.22 per kalakilo



Kropp et al. 2022 Aquacult Eng 97, 102240

Hapetus, Koe 1

- Koe Laukaan laitoksella keväällä 2021
- 10 RAS-yksikköä
- Rakennettu O_3 :n ja H_2O_2 :n annostelu
- O_3 0.4 mg/L
- O_3 0.8 mg/L
- H_2O_2 0.15 μ l/L
- AOP: O_3 0.4 mg/L + H_2O_2 0.10 μ l/L
- Kontrolli -



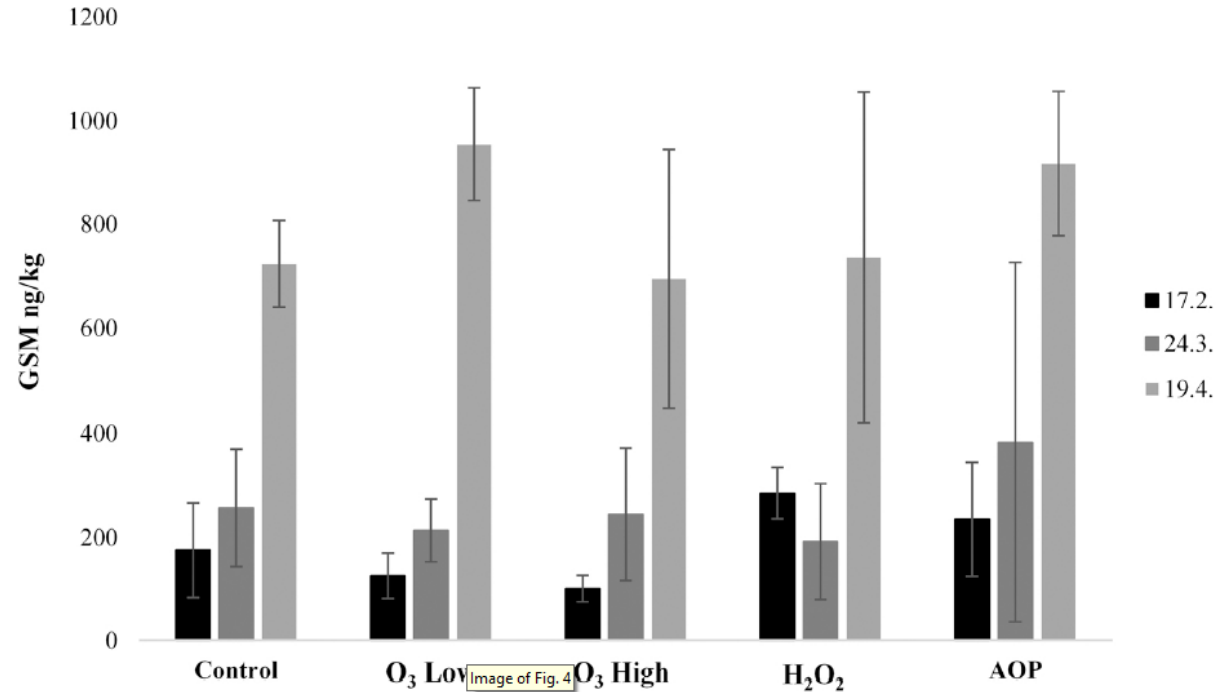
Pettersson et al. 2022 Aquacult Eng 98,102277

Koe 1: tuloksia

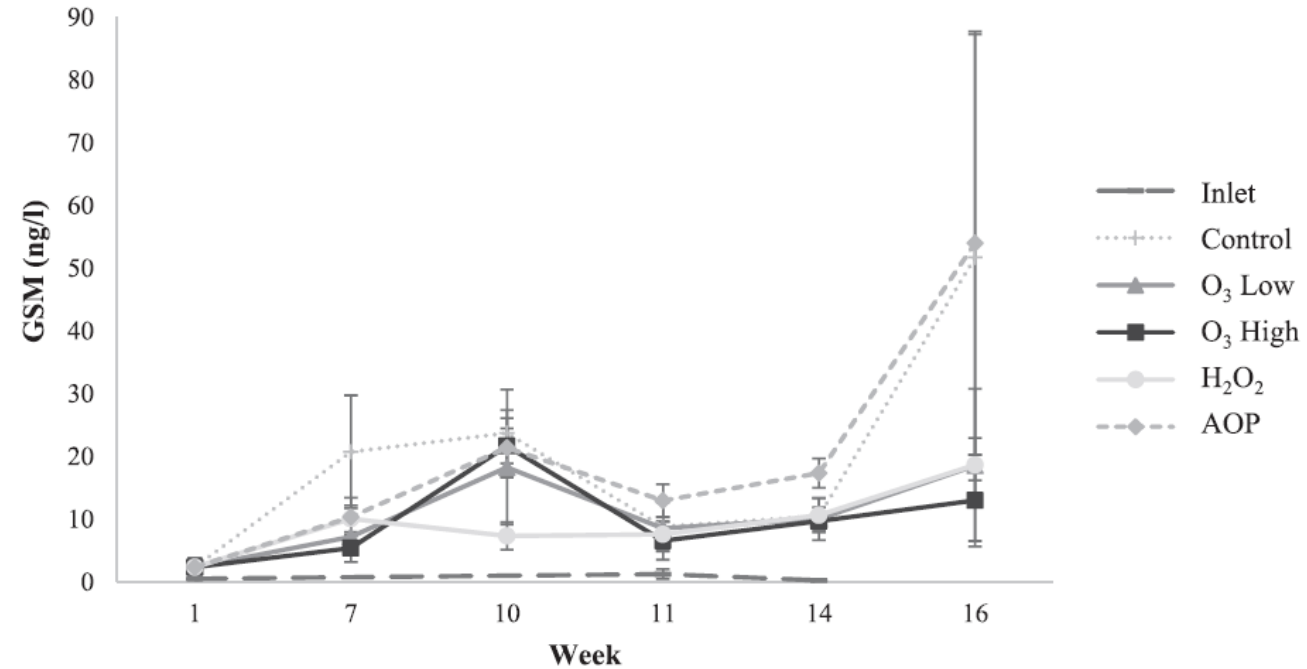
H₂O₂ 0.15 µg/L H₂O₂
 O₃ 0.4 mg/L
 O₃ 0.8 mg/L
 AOP 0.1 µg/L H₂O₂+0.4 mg/L O₃
 Kontrolli -

GSM, kala

Pettersson et al. 2022 Aquacult Eng 98, 102277

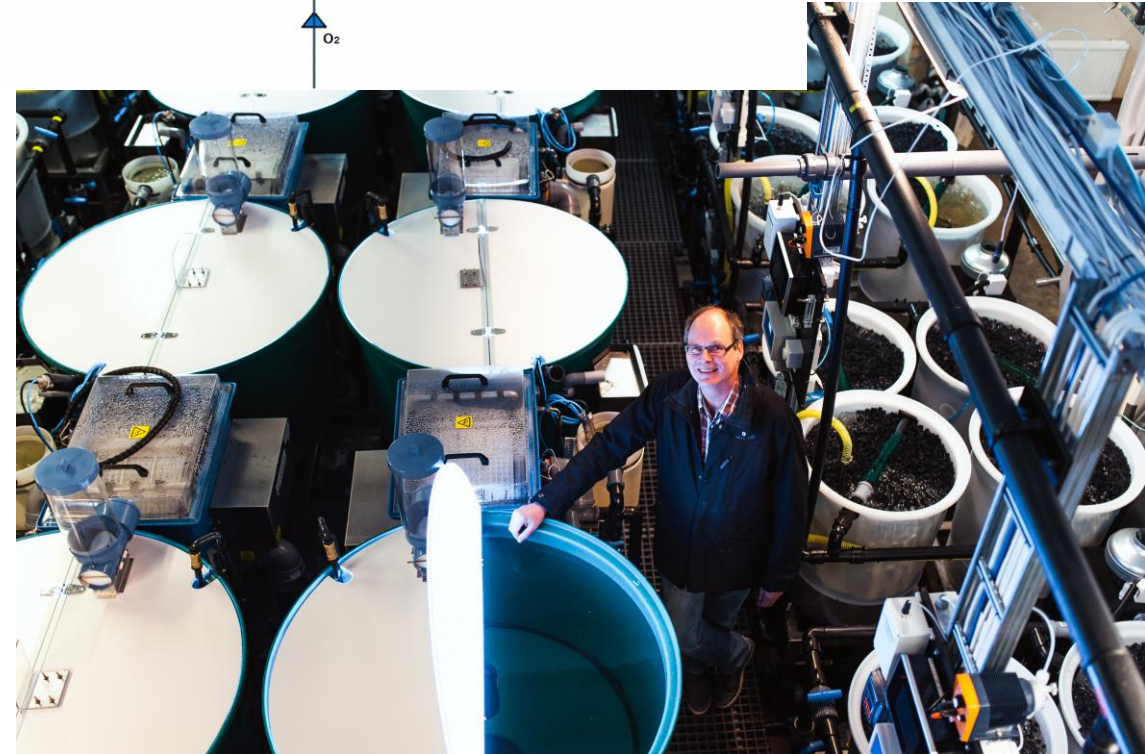
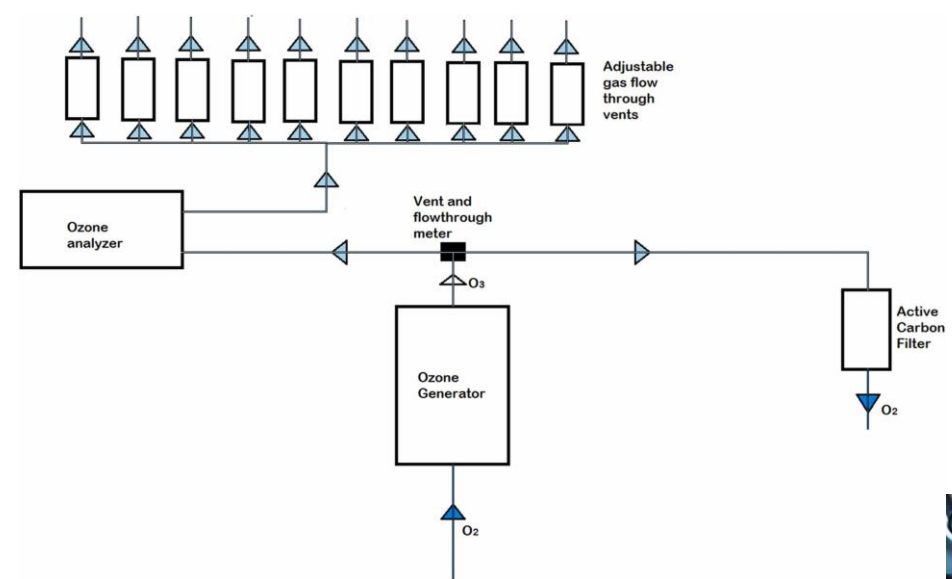


GSM, RAS-vesi



Hapetus, Koe 2

- Koe Laukaan laitoksella keväällä 2022
- 9 RAS-yksikköä
- Yksiköihin O_3 ja H_2O_2 annostelu
- H_2O_2 1.2 $\mu\text{g/L}$ H_2O_2
- AOP 0.6 $\mu\text{g/L}$ H_2O_2 +1.2 mg/L O_3
- Kontrolli –
- Annostelu 8h/pv, ei vkl

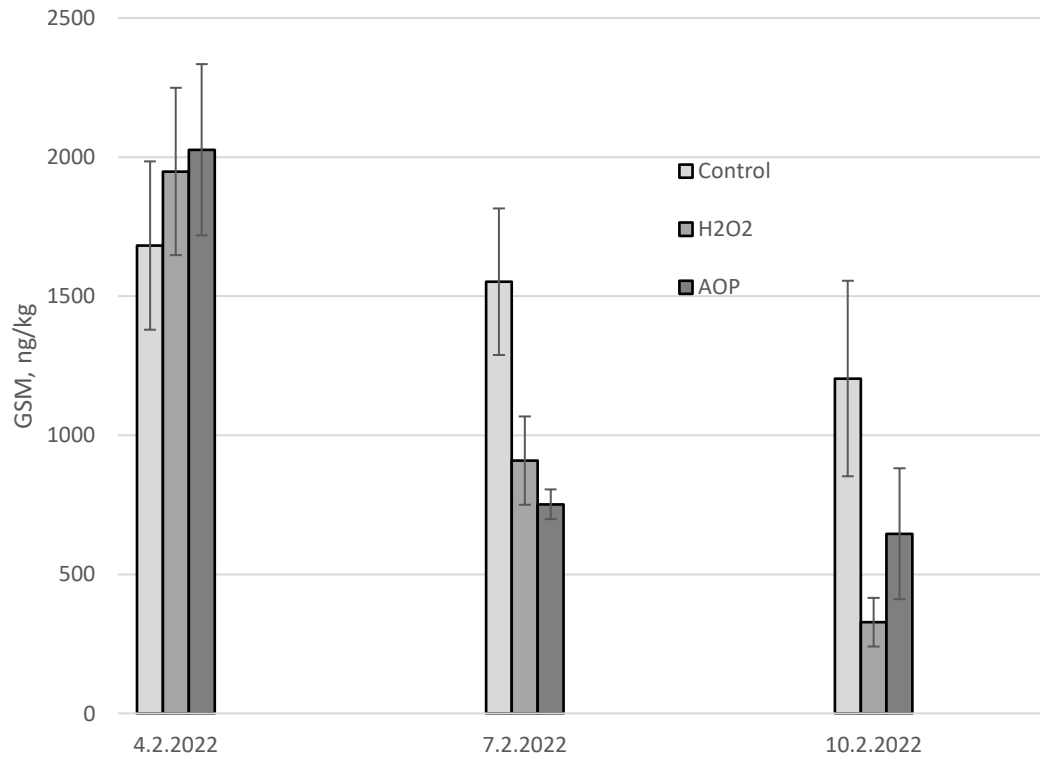


Koe 2: tuloksia

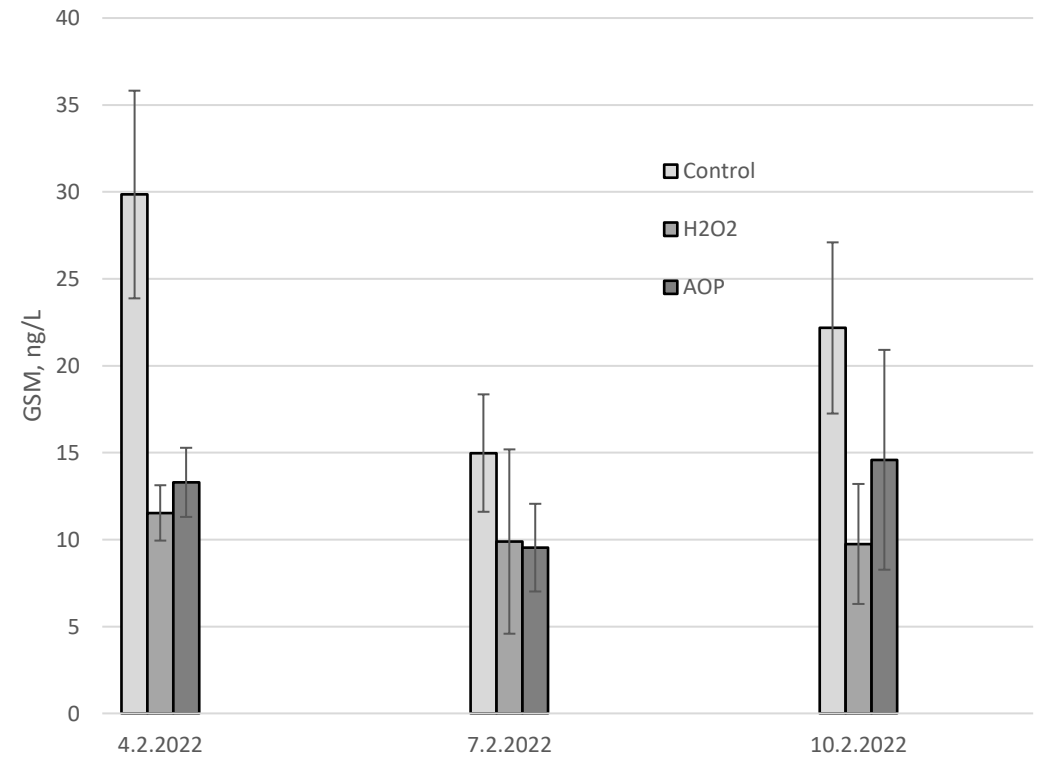
H₂O₂ 1.2 µg/L H₂O₂
AOP 0.6 µg/L H₂O₂+1.2 mg/L O₃
Kontrolli -

GSM, kala

Pettersson et al. (under preparation)



GSM, RAS-vesi

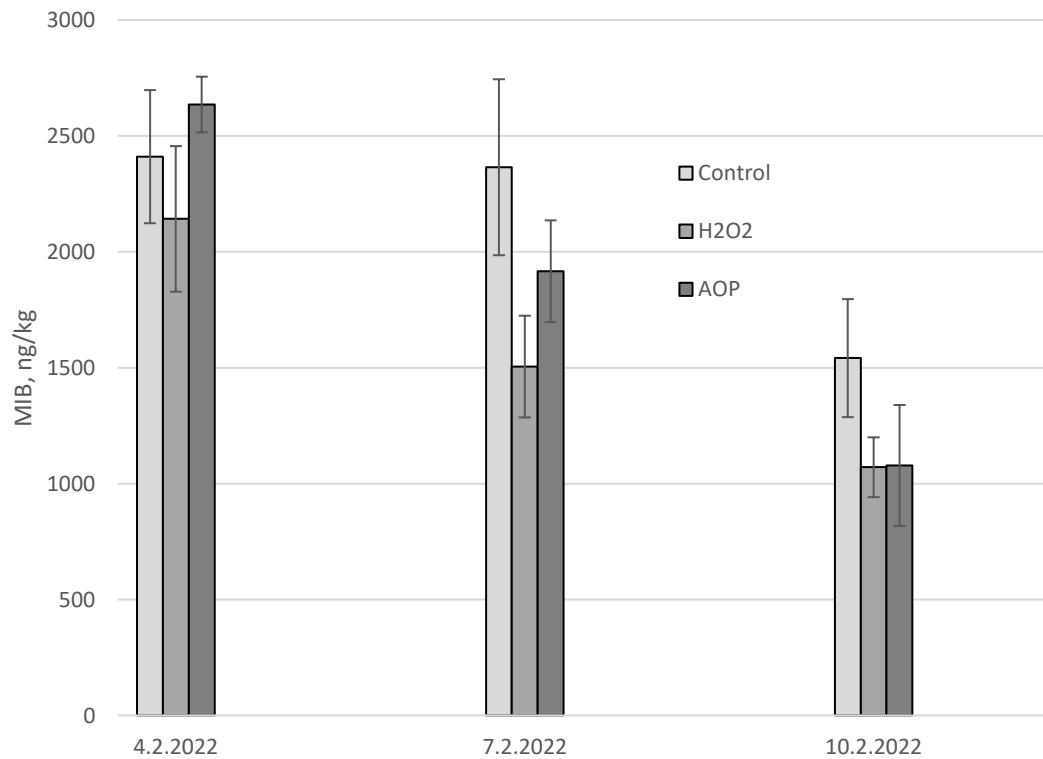


Koe 2: tuloksia

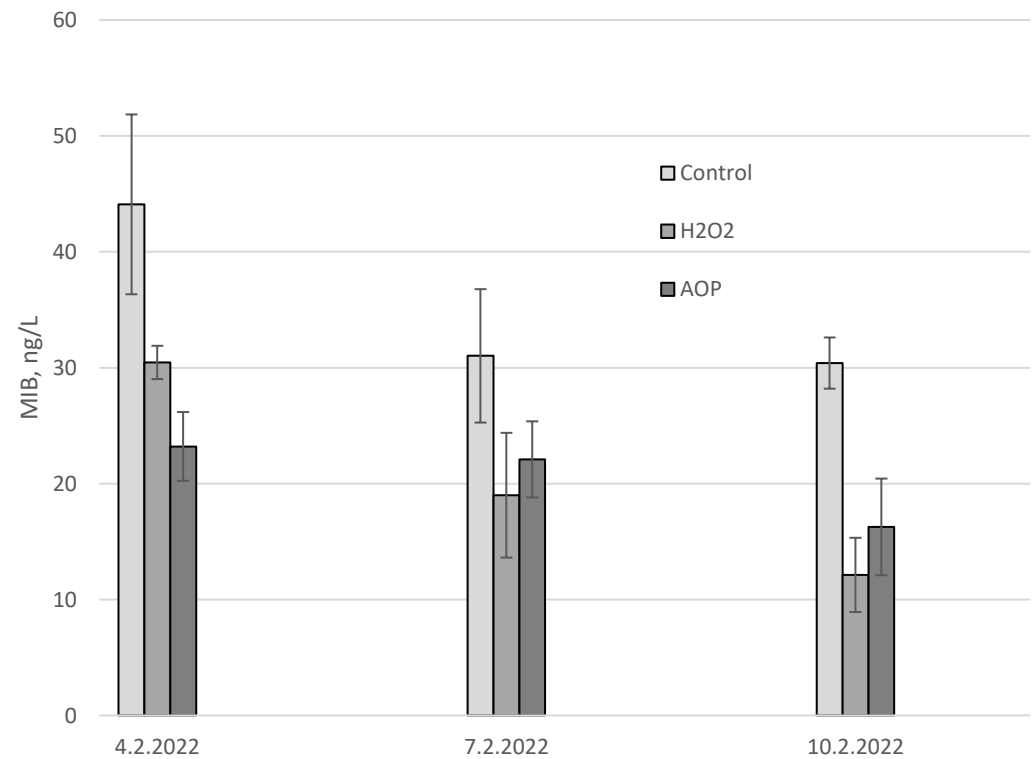
H₂O₂ 1.2 µg/L H₂O₂
AOP 0.6 µg/L H₂O₂+1.2 mg/L O₃
Kontrolli -

MIB, kala

Pettersson et al. (under preparation)



MIB, RAS-vesi



Aquaponics

- Kasvien kasvatuksen ja vesiviljelyn yhdistelmä: Eläinperäiset ravinteet hyötykäyttöön kasvien kasvuun
 - Mm. tilapia (*O. niloticus*), kirjolohi (*O. mykiss*) ja salaatti, tomaatti, kurkku, yrtit
- Fischer et al. selvitti RAS:n ja aquaponics-systeemin mikrobistoa
- Kevätsipuli, sitruunaruoho ja isobassi (*M. salmoides*)
 - Ei havaittu *Streptomyces*-lajia (GSM, MIB tuottaja)
 - Vaikutusta makuvirheiden muodostumiseen?
- Atique et al. systeemissä RAS kirjolohi (*O. mykiss*) vs. aquaponics kirjolohi & pinaatti (*Spinacia oleracea*)
 - Ei eroa kalaan kertyvissä pitoisuuksissa

Fischer et al. 2021 Aquaculture 538, 736554

Atique et al. 2022 Water 14, 1447

Table 6. Concentrations of off-flavor geosmin (GSM ng/L) and 2-methylisoborneol (MIB ng/L) in water from deep water culture (DWC) hydroponics (no fish tanks) and aquaponics (with baby spinach and rainbow trout), and water from fish tanks (aquaponics and RAS), and in rainbow trout muscle (ng/kg) (aquaponics and RAS) in the beginning (5 May) and at the end (14 June) of the 6-week experiment.

Off-Flavors	Aquaponics				Hydroponics (DWC) or RAS			
	Start		End		Start		End	
GSM DWC	5.60	±1.60	3.62	±1.37 ^A	6.88	±1.49	3.72	±2.52 ^A
MIB DWC	13.08	±2.70	21.05	±14.83	23.81	±3.83	17.07	±9.64
GSM Tank	6.29	±3.13	7.97	±1.29	6.62	±2.50	4.97	±2.82
MIB Tank	24.32	±2.35	36.21	±13.35	20.77	±8.56	28.28	±4.83
GSM Muscle	493.6	±99.10	376.0	±24.99 ^{Aa}	493.6	±99.10	466.3	±39.40 ^a
MIB Muscle	1758.1	±298.5	1611.5	±298.6	1758.1	±298.5	1473.8	±240.3

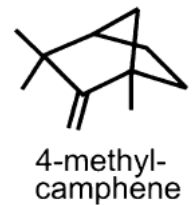
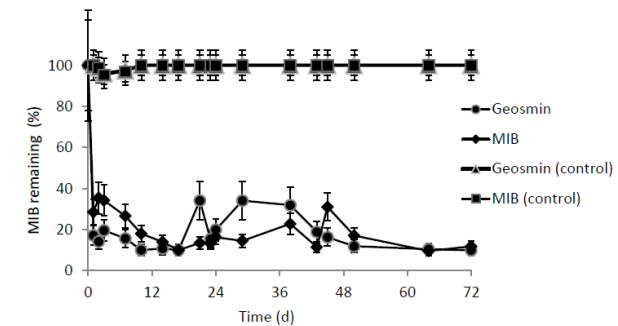
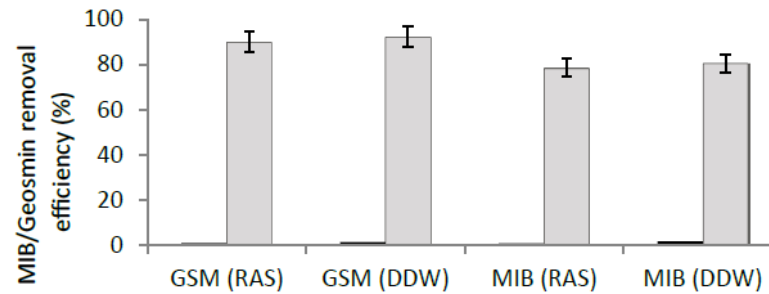
Values are means ± SD, $n = 3$ for end samples and 2 for start samples. The superscript letter "A" indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between the sampling points and "a" between the treatments (aquaponics vs. RAS).

Adsorptio/biohajoaminen

- Alginaattipohjainen kantajamateriaali (60-70 kDa, mannuroni- & glukuronihappo), hydrofobinen kompleksi
 - muodostuu pyöreää Ø 4mm kantajamateriaalia
 - Adsorptio ja biohajoaminen, 72 d
 - Ei juuri haittaa orgaanisesta kiintoaineesta
- MIB:n biohajottaminen terpeenejä hajottavilla bakteeri-isolaateilla (*Pseudomonas* sp. SBR3-tpnb, *Rhodococcus wratislaviensis*)
- → Muodostui hajuttomat 2-metyleenibornaani ja 4-metyylikamfeeni.



Azaria et al. 2021 J Water Process Eng 42, 102125
Eaton et al. 2012 Biodegradation 23, 253–261



Yhteenveto



- Edelleen raikastus tärkeä ja menetelmät sen tehostamiseksi
 - Lyhyempi raikastusaika, kustannusten minimointi
- Kiinnostavia ja lupaavia tuloksia mm. AOP-menetelmillä
- Tuloveden hyvä laatu ja laadun seuranta (myös kesäkaudella)
- Jäännösrehun minimointi, rehun koostumus GSM tuottavien mikrobien vähentämiseksi systeemissä
- Huomioitava myös muut yhdisteet kuin GSM
 - Lukuisia vaihtoehtoja, mitä yhdisteitä valitaan seurantaan?



