ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ

Διεύθυνση: Τ.Θ. 141, 57400 Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310-791353, Fax: 2310-791375, e-mail: zotos@food.teithe.gr
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Αναστάσιος Ζώτος

ΤΙΤΛΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

Παρασκευή Πρωτεϊνικών Προϊόντων Αλιευμάτων (surimi) από Πελαγικά Αλιεύματα που Υποαξιοποιούνται από τη Βιομηχανία.

Αναστάσιος Ζώτος, Δημήτριος Πετρίδης, Παναγιώτης Καραγιαννακίδης

Θεσσαλονίκη, 2007

Τίτλος Ερευνητικού προγράμματος: Παρασκευή Πρωτεϊνικών Προϊόντων Αλιευμάτων (surimi) από Πελαγικά Αλιεύματα που Υποαξιοποιούνται από τη Βιομηχανία.

Επιστημονικά Υπεύθυνος: Αναστάσιος Ζώτος

Επιστημονικοί συνεργάτες:

Όνομα: Δημήτριος Πετρίδης, Θέση: Καθηγητής,

Ειδικότητα: Εφαρμοσμένη Στατιστική

Εξωτερικοί επιστημονικοί συνεργάτες:

Όνομα: Παναγιώτης Καραγιαννακίδης, Θέση: Ερευνητής,

Ειδικότητα: Τεχνολόγος Τροφίμων

Απασχολημένες φοιτητές: Σπυρίδων Καράκος, Μαρία Βουζανίδου και Βασιλική Γκαρανέ

Διάρκεια Ερευνητικού Προγράμματος: 2 έτη

Ποσό χρηματοδότησης Επιτροπής Ερευνών: 3.000,00

Δημοσιεύσεις/παρουσιάσεις εργασιών:

1. Karayannakidis PD, **Zotos A***, Petridis D and Taylor KDA, 2007. The effect of initial wash at acidic and alkaline pHs on the properties of protein concentrate (kamaboko) products from sardine (*Sardina pilchardus*) samples. *Journal of Food Engineering*, 78, 775-783.

Παρασκευή Πρωτεϊνικών Προϊόντων Αλιευμάτων (surimi) από Πελαγικά Αλιεύματα που Υποαξιοποιούνται από τη Βιομηχανία.

Αναστάσιος Ζώτος, Δημήτριος Πετρίδης, Παναγιώτης Καραγιαννακίδης

Περίληψη

Οι ιδιότητες των θερμικά επεξεργασμένων πηκτών (kamaboko), που παρήχθησαν από σουρίμι σαρδέλας (SS) μελετήθηκαν με βάση τις συνθήκες πλυσίματος του κιμά σαρδέλας. Η υψηλότερη ανάκτηση στερεών και πρωτεϊνών παρατηρήθηκε στα δείγματα που το αρχικό τους πλύσιμο έγινε σε όξινες περιοχές pH (4,0, 5,5 και 2,5), υψηλότερες τιμές επίσης παρατηρήθηκαν στην ελαστικότητα, συνεκτικότητα και σκληρότητα. Ενώ η υψηλότερη απομάκρυνση λίπους στα δείγματα που πλύθηκαν σε pH 8,5, 10,0 και 11,5.

Διαπιστώθηκε ότι η τιμή pH 5,5 ακολουθούμενη από την τιμή 8,5 είναι οι καταλληλότερες για το πρώτο πλύσιμο δειγμάτων σαρδέλας για την παρασκευή πρωτεϊνικών προϊόντων (kamaboko).

Οι πηκτές (kamaboko) από SS μελετήθηκαν επιπλέον με βάση τρεις πειραματικές παραμέτρους: (α) τις συνθήκες πλυσίματος (pH 5,5, 8,5 και 4,0) (β) την προσθήκη ή μη μικροβιακής τρανσγλουταμινάσης (MTGασης) και (γ) την προσθήκη διαφόρων αλάτων. Οι πηκτές που προήλθαν από κιμά σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 5,5 έδωσαν τις υψηλότερες τιμές *L** και *WI*, οι οποίες ακολουθήθηκαν από τις πηκτές που προήλθαν από κιμά σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 8,5 και 4.0. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε για τη σκληρότητα των πηκτών. Η προσθήκη της MTGασης είχε ευεργετικό αποτέλεσμα τόσο στις τιμές *L** και *WI* όσο και στη σκληρότητα και συνεκτικότητα των θερμικά επεξεργασμένων πηκτών ($p<0.05$). Οι πηκτές που περιείχαν $CaCl_2$ ή $MgCl_2$ ήταν λαμπρότερες και σκληρότερες σε σχέση με αυτές που περιείχαν NH_4Cl ($p<0.05$).

Οι θερμικές μεταπτώσεις των μιγμάτων σουρίμι – αμύλου μελετήθηκαν με τη βοήθεια του θερμιδομέτρου διαφορικής σάρωσης (DSC). Τρεις μεταπτώσεις παρατηρήθηκαν κατά τη θέρμανση του σουρίμι το οποίο περιείχε 5% μη τροποποιημένου αμύλου σίτου (UWS), που έλαβαν χώρα στους 45,2^{o}C, 63,3^{o}C και 71,4^{o}C και ήταν ουσιαστικά ίδιες όταν έγινε προσθήκη UWS σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο σουρίμι ($p\geq0.05$). Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου οδήγησε σε επικάλυψη της κορυφής ζελατινοποίησης του αμύλου και μετουσίωσης της ακτίνης.

Περιεχόμενα **Σελίδα**

1. Εισαγωγή 1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση 3
2.1 Εκχύλισμα πρωτεϊνών αλιευμάτων (σουρίμι) 3
2.1.1 Στάδια παρασκευής σουρίμι 3
2.1.2 Εναλλακτικές πρώτες ύλες για την Παρασκευή σουρίμι 4
2.1.3 Παραγωγή σουρίμι από μικρά πελαγικά αλιεύματα 5
2.1.4 Χαρακτηριστικά σαρδέλας 7
2.2 Σύσταση αλιευμάτων 8
2.2.1 Πρωτεΐνες αλιευμάτων 8
2.2.1.1 Σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες - Ένζυμα 8
2.2.1.2 Μυϊκές ή δομικές πρωτεΐνες 10
2.2.1.3 Σκληροπρωτεΐνες ή Στρώμα 11
2.2.2 Λίπος Αλιευμάτων 11
2.3 Πρωτεολυτικά ένζυμα και pH 12
2.3.1 Πρωτεολυτική δραστικότητα 12
2.3.2 pH 14
2.4 Έλεγχος παραγωγής σουρίμι και ποιοτικών μεταβολών 15
2.4.1 Έλεγχος παραγωγής 15
2.4.1.1 Κατάσταση πρώτης ύλης 15
2.4.1.2. Ραφινάρισμα 16
2.4.1.2.1 Ποιότητα νερού 17
2.4.1.2.2 Χρόνος πλυσίματος και θερμοκρασία 17
2.4.1.3 Σχηματισμός λύματος 18
2.4.1.3.1 Προσθήκη αλάτων 18
2.4.1.3.2 Υγρασία 18
2.4.1.3.3 pH 19
2.4.1.3.4 Διάρκεια σχηματισμού λύματος και θερμοκρασία 19
2.4.1.4 Σχηματισμός πηκτής 20
2.4.1.4.1 Σχηματισμός πηκτής στους 0-4°C ή σε θερμοκρασία 22°C 20
2.4.1.4.2 Σχηματισμός πηκτής με θέρμανση σε χαμηλές θερμοκρασίες 20
2.4.1.4.3 Σχηματισμός πηκτής με θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες 21
2.4.1.4.4 Σχηματισμός πηκτής με συνεισφορά συστατικών με ικανότητα ζελατινοποίησης 21

2.4.1.4.5 Σημασία προσθήκης αμύλου στο σχηματισμό πηκτής 23
2.4.1.4.6 Συνεισφορά κρυοπροστατευτικών 24
2.5 Μεταβολές χρώματος 25
2.6 Μικροβιολογικός έλεγχος 27
2.7 Έλεγχος ποιοτικών μεταβολών 29
3. Σκοπός της εργασίας 31
4. Υλικά & Μέθοδοι 32
4.1 Υλικά – Όργανα 32
4.1.1 Πρώτη ύλη 32
4.1.2 Αντιδραστήρια 32
4.1.3 Όργανα 32
4.2 Επεξεργασία 33
4.2.1 Παραγωγή kamaboko (pH 4,0, 5,5, και 8,5) 34
4.2.2 Προετοιμασία της πηκτής 35
4.2.3 Αποτελεσματικότητα πλυσίματος 35
4.3 Μέθοδοι Ανάλυσης 36
4.3.1 Μέτρηση pH 36
4.3.2 Προσδιορισμός Υγρασίας 36
4.3.3 Προσδιορισμός Λίπους 36
4.3.4 Προσδιορισμός Ολικής Πρωτεΐνης 37
4.3.5 Υπολογισμός Τέφρας 39
4.3.6 Ανίχνευση πρωτεολυτικών ενζύμων 39
4.3.7 Μέτρηση χρώματος 40
4.3.8 Μέτρηση υφής 40
4.3.9 Στατιστική ανάλυση 40
4.3.10 Διαφορική θερμιδομετρική ανάλυση (DSC) 41
4.3.11 Μικροβιολογικός έλεγχος 41
4.3.11.1 Αρίθμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας 42
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση 43
5.1 Έλεγχος πρώτης ύλης 43
5.1.1 Χαρακτηριστικά δειγμάτων σαρδέλας 43
5.1.2 Σύσταση πρώτης ύλης 44
5.1.3 Απόδοση επεξεργασίας 45
5.1.3.1 Ανάκτηση ολικών στερεών και πρωτεϊνών (pH 4,0, 5,5 & 8,5) 51
5.1.3.2 Απομάκρυνση λίπους και τέφρας 53
5.1.4 Πρωτεολυτική δραστικότητα στο υγρό απόρριψης 56
5.2 Χαρακτηριστικά χρώματος 59
5.2.1 Χαρακτηριστικά χρώματος της μη πλυμένης σαρδέλας 59

5.2.2 Επίδραση του πλυσίματος στα χαρακτηριστικά του χρώματος του κιμά σαρδέλας 60
5.2.3 Χαρακτηριστικά χρώματος των πηκτών σουρίμι που δέχτηκαν θερμική επεξεργασία 61
5.2.3.1 Κύριες επιδράσεις 61
5.2.3.1.1 Επίδραση των συνθηκών πλυσίματος 61
5.2.3.1.2 Η επίδραση προσθήκης της MTGασης 62
5.2.3.1.3 Η επίδραση προσθήκης των διαφορετικών αλάτων 63
5.2.3.2 Παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις 64
5.3 Μετρήσεις υφής 67
5.3.1 Κύριες επιδράσεις 67
5.3.1.1 Η επίδραση των συνθηκών πλυσίματος 67
5.3.1.2 Η επίδραση της MTGασης 68
5.3.1.3 Η επίδραση των διαφορετικών αλάτων 69
5.3.2 Παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις 70
5.4 Έλεγχος πρωτεϊνικών μορίων και αμύλου μέσω θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης (DSC) 73
5.5. Μεταβολές Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) κατά την επεξεργασία 80
6. Συμπεράσματα 82
7. Βιβλιογραφία 84
8. Appendix (Δημοσίευση) 97

Παρασκευή Πρωτεϊνικών Προϊόντων Αλιευμάτων (surimi) από Πελαγικά Αλιεύματα που Υποαξιοποιούνται από τη Βιομηχανία.

Αναστάσιος Ζώτος, Δημήτριος Πετρίδης, Παναγιώτης Καραγιαννακίδης

1. Εισαγωγή

Ένα ποσοστό πλέον του 50% της παράκτιας αλιείας παγκοσμίως δεν διατίθεται απ' ευθείας προς ανθρώπινη κατανάλωση. Ανάλογη είναι η κατάσταση και στην Ελλάδα όπου πολλά (κυρίως μικρά και σκοτεινόσαρκα) αλιεύματα επεξεργάζονται με αλάτισμα, ξήρανση, κάπνισμα κλπ. με αποτέλεσμα τη συσσώρευση αποβλήτων που αποτελούνται από τα άκρα (κεφάλια, ουρές) αυτών ή ακόμη και από τα ίδια τα αλιεύματα (όταν αυτά είναι πολύ μικρά για οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία). Κύρια συνέπεια της συσσώρευσης αυτής είναι η σημαντική επιμόλυνση του περιβάλλοντος. Εντούτοις
τα απόβλητα αυτά όντας βιολογικό υλικό, περιέχουν πολλές εν δυνάμει θρεπτικές και αξιοποιήσιμες ουσίες (π.χ. πρωτεΐνες, λιπίδια, ένζυμα, βιταμίνες, ορμόνες κλπ).

Η πλέον ενδεδειγμένη προσέγγιση για την αξιοποίηση όλων των προαναφερθέντων φαίνεται να είναι η ανάκτηση της σάρκας των αλιευμάτων αυτών (μικρά ή σκοτεινόσαρκα πελαγικά είδη) με μηχανική αποστέωση και στη συνέχεια η παρασκευή προϊόντων σημαντικής βιολογικής αξίας τόσο από τη σάρκα (απομίμηση κάβουρα, αστακού, γαρίδας γνωστά ως σουρίμι) (Venugopal & Shahidi, 1995), όσο και από τα υπόλοιπα απορριπτόμενα μέρη των αλιευμάτων.

Κατά συνέπεια, αντικειμενικός σκοπός τόσο της βιομηχανίας όσο και της οικονομίας θα πρέπει να είναι η αξιοποίηση και η αύξηση της

αξίας των συγκεκριμένων αλιευμάτων (σκουμπρί, σαρδέλα κλπ.). Ο σκοπός δε αυτός αποτελεί στην ουσία ανάγκη η οποία επιτάσσεται όχι μόνο από οικονομικής άποψης αλλά και από τη συνεχώς αυξανόμενη έλλειψη πρωτεϊνούχων τροφών στον πλανήτη.

Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο είδος για την παρασκευή πρωτεϊνικών προϊόντων αλιευμάτων είναι ο μπακαλιάρος της Αλάσκας (*Alaska pollock*), ωστόσο ερευνητικές δραστηριότητες έδειξαν ότι, εκτός των συνήθως χρησιμοποιούμενων ειδών, και άλλα είδη μπορούν να δώσουν υψηλής ποιότητας προϊόντα με εφαρμογή συγκεκριμένων μεταχειρίσεων (Bentis *et al*., 2005)

Δοκιμές παραγωγής έχουν δείξει ότι από πολλά είδη αλιευμάτων μπορεί να παραχθεί υψηλής ποιότητας σουρίμι ή παρεμφερή προϊόντα (Trondsen, 1998). Εντούτοις και παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, δεν ήταν ακόμη δυνατή η παραγωγή kamaboko, ικανοποιητικής ποιότητας, από αλιεύματα όπως η σαρδέλα και το σκουμπρί (Chen *et al*., 1997).

Η διεργασία του πλυσίματος της σάρκας θεωρείται ως ένα από τα δύο μεγάλα προβλήματα στην όλη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος. Το υψηλό ποσοστό λίπους, οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, το μη πρωτεϊνικό άζωτο (NPN), καθώς και το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) που περιέχονται στον κιμά αλιευμάτων με σκούρα σάρκα, καθιστούν δύσκολη την παρασκευή υψηλής ποιότητας πρωτεϊνικών προϊόντων (kamaboko) (Shimizu *et al*., 1992; Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). Η παρασκευή kamaboko από τέτοια είδη αλιευμάτων απαιτεί θέρμανση στους 75°C για μια ώρα και προθέρμανση (δέσιμο-setting) στους 45°C. Ένας άλλος ανασταλτικός παράγοντας είναι η ταχεία πτώση του pH της σάρκας

αμέσως μετά την νεκρική ακαμψία (Lanier, 1992; Pacheco-Aguilar *et al*., 2000).

Όπως είναι γνωστό, χωρίς την κατάλληλη επεξεργασία μετά την αλιεία τους, τα αλιεύματα υπόκεινται σε αλλοίωση που σχετίζεται με την αποικοδόμηση και μετουσίωση των μυϊκών πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρασκευή κατώτερης ποιότητας kamaboko (Benjakul *et al.,* 2002). Η συντήρηση των αλιευμάτων σε κατάψυξη μπορεί να αποτρέψει την αλλοίωση των αλιευμάτων που προκαλείται από μικροοργανισμούς και που αποτελεί την κύρια αιτία αποικοδόμησης των πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των συνθηκών πλυσίματος, της προσθήκης Μικροβιακής Τρανσγλουταμινάσης (MTGασης) και των διαφορετικών αλάτων σε πηκτές σουρίμι από σαρδέλα (*Sardinops pilchardus*), μέσω μεταβολών του χρώματος και της υφής. Επιπλέον, η μελέτη της ζελατινοποίησης του αμύλου σε μίγματα σουρίμι – αμύλου με εφαρμογή της θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης (DSC). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας στο βακτηριακό φορτίο των δειγμάτων.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Εκχύλισμα πρωτεϊνών αλιευμάτων (σουρίμι)

Το “surimi” είναι Ιαπωνικός όρος και αναφέρεται στην πάστα της σάρκας αλιευμάτων, που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του παραδοσιακού γιαπωνέζικου προϊόντος που ονομάζεται “kamaboko”. Ως εκ τούτου, πρόκειται για τις μυϊκές

πρωτεΐνες αλιευμάτων οι οποίες παραλαμβάνονται μετά την αποστέωση και επιμελές πλύσιμο της παραγόμενης σάρκας.

Είναι καλό να γίνει διαχωρισμός μεταξύ των όρων «σουρίμι», «κιμάς αλιευμάτων» και «προϊόντα με βάση το σουρίμι». Όταν η σάρκα των αλιευμάτων διαχωρίζεται από τα οστά και το δέρμα και λεπτοτεμαχίζεται παράγεται ο «κιμάς αλιευμάτων» που αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή «σουρίμι». Με το πλύσιμο του «κιμά αλιευμάτων» για την απομάκρυνση του λίπους, των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών και άλλων υδατοδιαλυτών συστατικών προκύπτει το ακατέργαστο σουρίμι. Το ακατέργαστο σουρίμι είναι επομένως το συμπύκνωμα των μυϊκών πρωτεϊνών (μη υδατοδιαλυτών) των αλιευμάτων που διαθέτουν σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες, όπως ενισχυμένη ικανότητα σχηματισμού πηκτής και αυξημένη ικανότητα συγκράτησης νερού (Lanier & Lee, 1992).

2.1.1 Στάδια παρασκευής σουρίμι

Τα στάδια παρασκευής σουρίμι είναι τα εξής :

1. Αλίευση, προσωρινή συντήρηση
2. Κατανομή σύμφωνα με το μέγεθος
3. Προετοιμασία του μη επεξεργασμένου προϊόντος (αποκεφαλισμός, απαλλαγή των εντοσθίων ή φιλετοποίηση)
4. Μηχανική αποστέωση ή κιμαδοποίηση
5. Πλύσιμο του κιμά, στράγγισμα πριν από κάθε στάδιο (ενδιάμεσο στράγγισμα)
6. Ραφινάρισμα
7. Τελικό στράγγισμα
8. Προσθήκη ή ενσωμάτωση κρυοπροστατευτικών
9. Συσκευασία

10. Ψύξη/ κατάψυξη (συντήρηση)
(Shahidi, 1994; Hall & Ahmad, 1997; Toyoda *et al*., 1992)

2.1.2 Εναλλακτικές πρώτες ύλες για την παρασκευή σουρίμι

Τα αλιεύματα με σκουρόχρωμη σάρκα αποτελούν το 40-50% της συνολικής αλιείας σε παγκόσμια κλίμακα (Hultin & Kelleher, 2000). Τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των μεγάλων ποσοτήτων των προαναφερθέντων πελαγικών αλιευμάτων για ανθρώπινη κατανάλωση και πιο συγκεκριμένα για την παρασκευή σουρίμι.

Τα λιπαρά αλιεύματα με σκουρόχρωμους μύες διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα άπαχα, λευκού χρώματος μυών, τα οποία παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για την παρασκευή σουρίμι:

1. Ο λόγος ερυθρών/ λευκών μυών είναι μεγαλύτερος και επιπλέον οι λευκοί μύες είναι σκουρότεροι από τους αντίστοιχους των άπαχων αλιευμάτων.
2. Η σάρκα αναδύει εντονότερη οσμή και γεύση, χαρακτηριστική του αλιεύματος, ιδιαίτερα οι σκουρόχρωμοι μύες.
3. Η σάρκα διαθέτει υψηλότερη λιποπεριεκτικότητα, η οποία υπόκειται σε εποχική διακύμανση.
4. Το pH της σάρκας μειώνεται ταχύτερα σε χαμηλότερες τιμές μετά θάνατο.
5. Το μέγεθος των σκουρόχρωμων αλιευμάτων είναι γενικά μικρό και η σύσταση της σάρκας τους υπόκειται σε σχετικά μεγαλύτερη εποχική διακύμανση.
6. Η σάρκα παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα κατά τη διάρκεια συντήρησης σε κατάψυξη.

7. Οι μύες διαθέτουν γενικά, υψηλότερα επίπεδα ενδογενών, σταθερών στη θέρμανση πρωτεολυτικών ενζύμων.
8. Η σάρκα εμφανίζει ισχυρή ρυθμιστική ικανότητα (Lanier & Lee, 1992).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα προβλήματα που κύρια απορρέουν από την αξιοποίηση μικρών πελαγικών αλιευμάτων, όπως η σαρδέλα και το σκουμπρί, για την παρασκευή πρωτεϊνικών προϊόντων (σουρίμι) είναι η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης σκουρόχρωμων μυών, ταυτόχρονα με την υψηλή περιεκτικότητα λίπους και μυοσφαιρίνης. Τα παραπάνω οδηγούν σε αντιμετώπιση δυσκολιών για την παρασκευή υψηλής ποιότητας σουρίμι από αυτά τα είδη (Chen, 2002; Ochiai *et al*., 2001). Η περιορισμένη ποσότητα αλιευμάτων για παρασκευή σουρίμι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει οδηγήσει το ενδιαφέρον στην αξιοποίηση αλιευμάτων με σκουρόχρωμους μύες ως εν δυνάμει εναλλακτική πρώτη ύλη (Chen *et al*., 1997; Kelleher *et al*., 1994; Wu *et al*., 2000).

2.1.3 Παραγωγή σουρίμι από μικρά πελαγικά αλιεύματα

Έχει ήδη ξεκινήσει μία σημαντική προσπάθεια εκμετάλλευσης ειδών αλιευμάτων τα οποία είναι είτε σε αφθονία είτε δεν αξιοποιούνται σε μεγάλη έκταση. Όμως, παρά τις σοβαρές προσπάθειες για την αξιοποίηση ειδών όπως το σκουμπρί και η σαρδέλα για την παρασκευή πρωτεϊνικών προϊόντων (σουρίμι), ο έλεγχος των παραγόντων που επηρεάζουν την καθιέρωση ευρείας κλίμακας παραγωγής τέτοιων προϊόντων παραμένει δύσκολος (Chen *et al*., 1997).

Οι παράγοντες, όπως προαναφέρθηκε, είναι η υψηλή λιποπεριεκτικότητα, οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες καθώς και οι χρωστικές και το τριμεθυλοαμινοξείδιο (TMAO) στον κιμά των αλιευμάτων με σκουρόχρωμους μύες.

Για την παρασκευή σουρίμι, η μυοσφαιρίνη και η αιμοσφαιρίνη διαδραματίζουν βασικό ρόλο όσο αφορά το λευκό χρώμα, που είναι ένας από τους παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα της παραγόμενης πηκτής (Chen, 2002). Η αιμοσφαιρίνη απομακρύνεται σχετικά εύκολα κατά την επεξεργασία, σε αντίθεση με την μυοσφαιρίνη που συγκρατείται λόγω της ενδοκυτταρικής δομής των μυών (Livingston & Brown, 1981).

Επομένως, οι περισσότερες αλλαγές στο χρώμα του κρέατος είναι αποτέλεσμα αντίδρασης της μυοσφαιρίνης με άλλα συστατικά των μυών και ειδικά με τις μυϊκές πρωτεΐνες (Hanan & Shaklai, 1995). Επίσης, οι σκουρόχρωμοι μύες παρουσιάζουν μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστικότητα σε σχέση με τους λευκούς μύες (Shimizu *et al.,* 1992). Αυτό μπορεί να επιφέρει την εξασθένιση της πηκτής ή αλλιώς φαινόμενο modori, που λαμβάνει χώρα εάν η πηκτή κρατηθεί για παρατεταμένο χρόνο σε θερμοκρασία περίπου 50-60°C. Οι Ochiai *et al*. (2001) ανακοίνωσαν ότι σουρίμι υψηλής ποιότητας, με μεγαλύτερη δύναμη της πηκτής και βελτιωμένη λευκότητα μπορεί να παρασκευαστεί όταν οι σκουρόχρωμοι μύες απομακρύνονται στο μέγιστο δυνατό.

Όμως στην περίπτωση των αλιευμάτων με σκουρόχρωμους μύες, όπως η σαρδέλα και το σκουμπρί, η απομάκρυνση αυτών των μυών είναι ιδιαίτερα δύσκολη (Ochiai *et al*., 2001). Άρα γίνεται αντιληπτό ότι το επαρκές πλύσιμο είναι απαραίτητο για την παρασκευή υψηλής ποιότητας σουρίμι (Shimizu *et al*., 1992).

Το χρώμα του σουρίμι μπορεί να βελτιωθεί αυξάνοντας τους κύκλους πλυσίματος (Kim *et al*., 1996), τον χρόνο πλυσίματος και την ποσότητα του νερού (Chen *et al*., 1997). Όμως το πλύσιμο μακράς διάρκειας οδηγεί σε εκτεταμένη ενυδάτωση του κιμά και σε αποικοδόμηση των μυϊκών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η επακόλουθη διαδικασία απομάκρυνσης του νερού και να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός πηκτής.

Το χρώμα του σουρίμι που προέρχεται από αλιεύματα με σκουρόχρωμους μύες μπορεί να βελτιωθεί με το πλύσιμο του κιμά σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ή ανθρακικό νάτριο ή με την προσθήκη συστατικών όπως λίπους/ καζεΐνης που θα βοηθήσουν στη βελτίωση του χρώματος (Chen *et al*., 1997).

Οι Bentis *et al*., (2005) μελετώντας δείγματα σαρδέλας διαπίστωσαν ότι η λιποπεριεκτικότητα και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ήταν χαμηλές, ενώ η υγρασία αντιστρόφως ανάλογα με την υψηλή λιποπεριεκτικότητα. Ανακοίνωσαν επίσης ότι μύες σαρδέλας προερχόμενοι από δείγματα μετά την περίοδο της ωοτοκίας παρουσίασαν χαμηλότερη ικανότητα σχηματισμού πηκτής συγκρινόμενα με δείγματα που προήλθαν πριν την περίοδο της ωοτοκίας.

2.1.4 Χαρακτηριστικά σαρδέλας

Οι Chaijan *et al*. (2004) ανακοίνωσαν, μελετώντας δείγματα σαρδέλας και σκουμπριού ότι η περιεκτικότητα των μυών σε πρωτεΐνες κυμάνθηκε μεταξύ 13,74-17,54%. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι γενικά της τάξης του 11-24% εξαρτώμενη από το είδος, την εκτροφή, καθώς και από το στάδιο του αναπαραγωγικού κύκλου (Sikorski, 1994; Spinelli & Dassow, 1982).

Τα λίπος της σαρδέλας είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ως εκ τούτου ιδιαίτερα ευαίσθητο στην οξείδωση (Ohshima *et al.*, 1988). Η λιποπεριεκτικότητα είναι γενικά υψηλότερη στους σκουρόχρωμους μύες. Οι σκουρόχρωμοι μύες είναι πλουσιότεροι σε χρωμοπρωτεΐνες και περιέχουν 2-5 φορές περισσότερο λίπος συγκρινόμενοι με τους κανονικούς μύες (Sikorski *et al.*, 1990). Οι Chaijan *et al*., (2004) ανακοίνωσαν επίσης ότι οι σκουρόχρωμοι μύες έχουν τη χαμηλότερη υγρασία.

Οι σκουρόχρωμοι μύες περιέχουν περισσότερη αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη, και κυτόχρωμα C (Sikorski *et al*., 1990). Η μυοσφαιρίνη όπως είναι γνωστό συνεισφέρει στο ερυθρό χρώμα των μυών το οποίο και σχετίζεται με χαμηλότερες τιμές λευκότητας της πηκτής από σουρίμι (Chen, 2002; Hultin & Kelleher 2000).

Οι σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες επίσης βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα πελαγικά αλιεύματα όπως η σαρδέλα και το σκουμπρί (Haard *et al*., 1994; Hashimoto *et al*., 1979).

2.2 Σύσταση αλιευμάτων

2.2.1 Πρωτεΐνες αλιευμάτων

Οι πρωτεΐνες των αλιευμάτων ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες, τις σαρκοπλασματικές, τις μυϊκές ή δομικές και τις σκληροπρωτεΐνες ή στρώμα.

2.2.1.1 Σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες - Ένζυμα

Είναι υδατοδιαλυτές και περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών όπως η μυοσφαιρίνη, τα ένζυμα και άλλες αλβουμίνες. Οι σκουρόχρωμοι μύες σε ορισμένα είδη περιέχουν λιγότερες σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες συγκρινόμενοι με τους λευκούς μύες.

Τα σαρκοπλασματικά ένζυμα είναι υπεύθυνα για την υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευμάτων μετά θάνατο. Περιλαμβάνουν γλυκολυτικά και υδρολυτικά ένζυμα. Μεγάλος αριθμός πρωτεασών ή πρωτεϊνασών που ανευρίσκονται στο σαρκοπλασματικό υγρό είναι ικανές να καταλύσουν την αντίδραση αποικοδόμησης αζωτούχων συστατικών στο μυϊκό ιστό. Η δραστικότητα αυτών των ενζύμων εξαρτάται από το είδος των αλιευμάτων, τον τύπο του μυϊκού ιστού καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Με το κατάλληλο πλύσιμο οι σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες μπορούν να απομακρυνθούν με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πρωτεϊνικού συμπυκνώματος αποτελούμενο κυρίως από μυϊκές, οι οποίες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στο σχηματισμό πηκτής. Μικρές ποσότητες σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στη δύναμη και ελαστικότητα της σχηματιζόμενης πηκτής από μυϊκές πρωτεΐνες (Haard *et al*., 1994; Hultin & Kelleher, 2000).

Πιο συγκεκριμένα, οι σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες μπορεί να παρεμβληθούν στους δεσμούς μυοσίνης κατά τη διάρκεια σχηματισμού πηκτής, λόγω της μειωμένης ικανότητάς τους να σχηματίζουν πηκτή και του γεγονότος ότι παρουσιάζουν μικρότερη ικανότητα συγκράτησης νερού (Sikorski & Kolakowska, 1994). Έτσι, η παρουσία των σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών μπορεί να μεταβάλλει τις ρεολογικές ιδιότητες της πηκτής των μυϊκών πρωτεϊνών.

Η δύναμη της πηκτής από σουρίμι μπορεί να ενισχυθεί υποβάλλοντας τα δείγματα σε πήξη σε χαμηλές θερμοκρασίες (setting) που κυμαίνονται από 0 ως 40°C πριν τη θέρμανση (Alvarez & Tejada, 1997). Κατά τη διάρκεια της πήξης σε χαμηλές θερμοκρασίες, η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης πολυμερίζεται μέσω

του σχηματισμού μη-δισουλφιδικών ομοιοπολικών δεσμών σταυροειδούς μορφής, αντίδραση που καταλύεται από τη δράση ενός ενδογενούς ενζύμου, της τρανσγλουταμινάσης (TGασης) (Kumazawa *et al*., 1995).

Η TGαση είναι γνωστό ότι καταλύει τη μεταφορά ακυλίων όπου η ομάδα του γ-καρβοξυαμιδίου της γλουταμίνης της πεπτιδικής αλυσίδας λειτουργεί ως δότης ακυλίων, ενώ η ε-αμινομάδα της πεπτιδικής λυσίνης δρα ως δέκτης (Folk & Chung, 1973). Ο ε-(γ-γλουταμύλ)λυσίνη δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών αναφέρεται ότι συμβάλλει στην ενίσχυση της δύναμης της πηκτής (Kumazawa *et al*., 1995).

Η δράση της TGασης έχει διαπιστωθεί στη σάρκα πολλών αλιευμάτων. Η παρουσία NH_4Cl και EDTA αναστέλλει τη δράση του ενζύμου αυτού, ενώ το πρωτεϊνικό υπόστρωμα επηρεάζει σημαντικά τη δράση του. Η δράση της ενδογενούς TGασης εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων Ca^{++} και μπορεί να ενισχυθεί κατά την διάρκεια της πήξης σε χαμηλή θερμοκρασία (setting) 25-40°C.

Οι TGασες των αλιευμάτων έχουν διαφορετική ευαισθησία στα ιόντα Ca^{++} (Ashie & Lanier, 2000). Επομένως, η αποτελεσματικότητα του $CaCl_2$ στην ενίσχυση της πήξης σε χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να εξαρτάται από το είδος των αλιευμάτων. Έχει βρεθεί ότι η συνεκτικότητα της πηκτής των μυϊκών πρωτεϊνών από αλιεύματα κρύων νερών αυξήθηκε με την προσθήκη 0,2% $CaCl_2$ (Morales *et al*., 2001).

Οι Benjakul *et al*. (2004) ανακοίνωσαν ότι η σκληρότητα των πηκτών σουρίμι αυξήθηκε με την αύξηση της προσθήκης $CaCl_2$, ειδικά σε συγκεντρώσεις μέχρι 20mmol kg^{-1}. Σε υψηλές συγκεντρώσεις $CaCl_2$, τα ιόντα χλωρίου ή ασβεστίου μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές

στην διαμόρφωση των πρωτεϊνικών μορίων. Τα ιόντα αντιδρούν με τις αντίθετα φορτισμένες ομάδες των πρωτεϊνικών μορίων και σχηματίζουν μία διπλή εξουδετερωμένη στοιβάδα (με τη δράση των ιόντων Ca^{++} και Cl^{-}), η οποία μειώνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων (Vojdani, 1996).

Με δεδομένο το γεγονός ότι το NaCl προστίθεται για να διαλυτοποιήσει τις μυϊκές πρωτεΐνες, η προσθήκη υπερβολικής ποσότητας $CaCl_2$ μπορεί να προκαλέσει εξαλάτωση οδηγώντας έτσι σε απώλεια της διαλυτότητας των πρωτεϊνών. Γίνεται φανερό ότι με σκοπό την επίτευξη βέλτιστης πήξης σε χαμηλή θερμοκρασία απαιτείται η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας $CaCl_2$.

2.2.1.2 Μυϊκές ή δομικές πρωτεΐνες

Είναι διαλυτές σε διαλύματα με αυξημένη ιονική ισχύ. Το μεγαλύτερο μέρος των μυϊκών πρωτεϊνών που συναντώνται στους μύες των αλιευμάτων αποτελείται από τη μυοσίνη, ακτίνη, τροπομυοσίνη και τις τροπονίνες C, I και T (Suzuki, 1981). Οι μυϊκές πρωτεΐνες μεταβάλλονται κατά την επεξεργασία της κατάψυξης καθώς και τη μακρά συντήρηση σε κατάψυξη. Η υφή των προϊόντων καθώς και η ικανότητα σχηματισμού πηκτής μπορούν να επηρεαστούν από αυτές τις μεταβολές.

Η μυοσίνη απαντά σε υψηλότερη συγκέντρωση στους μύες των αλιευμάτων, 50-60%. Το μόριο της μυοσίνης αποτελείται από 2 βαριές αλυσίδες (200 και 240kDa) συνδεδεμένες μη ομοιοπολικά με 2 ζεύγη ελαφρών αλυσίδων (16 με 28kDa).

Η μυοσίνη είναι η πιο σημαντική μυϊκή πρωτεΐνη για το σχηματισμό πηκτής κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας σε χαμηλές

θερμοκρασίες, ικανότητα ιδιαίτερα σημαντική για την παρασκευή προϊόντων με βάση το σουρίμι.

Η μυοσίνη είναι γνωστό ότι αποτελεί την υπεύθυνη πρωτεΐνη για την προκαλούμενη λόγω θέρμανσης συσσωμάτωση, αφού οι υπόλοιπες μυϊκές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου και της ακτίνης, δεν σχηματίζουν πηκτές, αν και επηρεάζουν τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες των πηκτών μυοσίνης (Boyer *et al*., 1996).

Η ακτίνη είναι η δεύτερη σε συγκέντρωση πρωτεΐνη στους μύες των αλιευμάτων, 20%. Σε ουδέτερο αλατοδιάλυμα η ακτίνη συνεκχυλίζεται με την μυοσίνη ως ακτομυοσίνη.

2.2.1.3 Σκληροπρωτεΐνες ή Στρώμα

Αποτελούνται από κολλαγόνο και ελαστίνη του συνδετικού ιστού. Παραμένουν μετά την εκχύλιση των σαρκοπλασματικών και μυϊκών πρωτεϊνών. Είναι διαλυτές σε αραιά διαλύματα HCl και NaOH και αποτελούν το 2% του συνολικού ποσοστού των πρωτεϊνών.

2.2.2 Λίπος Αλιευμάτων

Δύο μεγάλες κατηγορίες λιπαρών υλών συναντώνται στα αλιεύματα. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις τριακυλογλυκερόλες ή τριγλυκερίδια ενώ η δεύτερη κατηγορία αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη.

Οι λιπαρές ύλες των εδώδιμων μερών των αλιευμάτων έχουν ιδιαίτερη σημασία για 3 διαφορετικούς λόγους.

Πρώτον, επηρεάζουν την αίσθηση της ευχυμότητας του προϊόντος υποκαθιστώντας κατά κάποιον τρόπο το ρόλο του νερού.

Δεύτερον, όπως είναι πλέον ευρέως αποδεκτό, είναι ιδιαίτερα ευεργετικές για την υγεία του καταναλωτή. Οι ευεργετικές ουσίες των

λιπαρών υλών των αλιευμάτων είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδιαίτερα το εικοσαπενταενοϊκό οξύ, το οποίο έχει 20 άτομα άνθρακα και 5 διπλούς δεσμούς (C20:5ω-3), καθώς και το εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ (C22:6ω-3).

Τρίτον, οι λιπαρές ύλες της σάρκας των αλιευμάτων συνεισφέρουν στο άρωμα (γεύση, οσμή) του προϊόντος.

Η αλλοίωση του λίπους λαμβάνει εύκολα χώρα και περιορίζει τη διάρκεια ζωής των λιπαρών αλιευμάτων κατά την περίοδο συντήρησής τους (McDonald & Hultin, 1987). Η υδρολυτική μαζί με την οξειδωτική τάγγιση σχετίζονται άμεσα με την υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευμάτων (Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). Η υδρολυτική τάγγιση, προκαλούμενη από λιπάσες, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία υπόκεινται στη συνέχεια σε περαιτέρω οξείδωση με αποτέλεσμα τον σχηματισμό χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων που είναι υπεύθυνες για την οσμή και γεύση ταγγισμένου στα αλιεύματα και στα προϊόντα από αλιεύματα.

2.3 Πρωτεολυτικά ένζυμα και pH

2.3.1 Πρωτεολυτική δραστικότητα

Η παρουσία διαφόρων τύπων πρωτεολυτικών ενζύμων στους μύες των αλιευμάτων έχει ευρέως ανακοινωθεί (Perez-Borla *et al*., 1998). Μετά την αλίευση και θάνατο των αλιευμάτων, η σάρκα τους γίνεται ευάλωτη στην αυτόλυση λόγω της δράσης ενδογενών πρωτεασών. Επίσης, η τεχνολογία παρασκευής διαφόρων προϊόντων από σάρκα

αλιευμάτων όπως π.χ. το σουρίμι, περιλαμβάνει στάδια κατά τα οποία επικρατούν συνθήκες που ευνοούν την ενδογενή πρωτεόλυση. Η αύξηση του pH της σάρκας κατά τη διάρκεια της νεκρικής ακαμψίας αποδίδεται στην παραγωγή αζωτούχων ενώσεων λόγω πρωτεολυτικής δραστικότητας. Πιθανές πηγές πρωτεολυτικής δραστικότητας στη σάρκα των αλιευμάτων είναι τα ενδογενή ένζυμα (καθεψίνες, ουδέτερες και αλκαλικές πρωτεϊνάσες), ένζυμα πέψης και/ή ένζυμα που παράγονται από βακτήρια και παράσιτα που έχουν εισβάλλει στους μύες (Pacheco-Aguilar & Crawford, 1994). Επομένως, μη επιμελείς χειρισμοί μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντική επιμόλυνση της σάρκας με πρωτεολυτικά ένζυμα.

Οι Pacheco-Aguilar *et al*. (2000) μελετώντας δείγματα σαρδέλας, αλιευόμενα την περίοδο της άνοιξης, ανακοίνωσαν ότι η πρωτεολυτική δραστικότητα αυξήθηκε με αργό ρυθμό μετά από 15 ημέρες συντήρησης σε πάγο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η χαμηλή θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα την περιορισμένη δραστικότητα των ενδογενών ενζύμων αυτόλυσης στη σάρκα. Σε αντίθεση, αντίστοιχα αλιεύματα τα οποία αλιεύθηκαν κατά την χειμερινή περίοδο παρουσίασαν εντονότερη πρωτεολυτική δραστικότητα κατά τη διάρκεια των 15 ημερών.

Η καθεψίνη D, πρωτεάση που καταλύει τη διάσπαση της αιμοσφαιρίνης, είναι το ένζυμο που μελετήθηκε περισσότερο από όλες τις πρωτεάσες της σάρκας των αλιευμάτων. Οι καθεψίνες A, B και C καθώς και διάφορες διπεπτιδάσες έχουν επίσης ανιχνευτεί στη σάρκα των αλιευμάτων.

Η πρωτεολυτική δραστικότητα στη σάρκα αλιευμάτων σχετίζεται με αλλαγές στις μυϊκές πρωτεΐνες γεγονός που επηρεάζει την ποιότητα της σάρκας τους (Osatomi *et al*., 1997). Η πρωτεολυτική

αποικοδόμηση των μυϊκών πρωτεϊνών, ειδικότερα της μυοσίνης, έχει αρνητικό αποτέλεσμα στην ποιότητα του σουρίμι και μειώνει σημαντικά το σχηματισμό και τη δύναμη της πηκτής.

Πολλές πρωτεάσες της σάρκας των αλιευμάτων συμμετέχουν στην αποικοδόμησή της κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεασών είναι οι καθεψίνες B ή L, η καθεψίνη D, αλκαλικές πρωτεάσες, και Ca^{++} - πρωτεάσες (Benjakul *et al.,* 1997). Η συμμετοχή του κάθε πρωτεολυτικού ενζύμου ξεχωριστά στην αλλοίωση της σάρκας των αλιευμάτων είναι δύσκολο να εκτιμηθεί κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε πάγο.

Οι Perez-Borla *et al*., (2002) σε μελέτη τους σε σάρκα μπακαλιάρου που συντηρήθηκε σε κατάψυξη (-20^{0}C) ανέφεραν ότι η πρωτεολυτική δραστικότητα μετά από 50 ημέρες παρουσίασε υψηλότερες τιμές συγκρινόμενη με αυτή των νωπών δειγμάτων. Τα ίδια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και μετά από την πάροδο 110 ημερών. Οι παραπάνω μεταβολές, οι οποίες παρατηρήθηκαν και από άλλους ερευνητές, αποδόθηκαν σε μεταβολές κατά τη συντήρηση στην κατάψυξη και την απόψυξη των δειγμάτων. Ως παράδειγμα μπορούν να αναφερθούν η πιθανή διάρρηξη των κυτταρικών δομών, η απελευθέρωση ενεργοποιητών πρωτεολυτικών ενζύμων, καθώς επίσης και μεταβολές σε αναστολείς πρωτεολυτικών ενζύμων (Shimizu & Wendakoon, 1990).

2.3.2 pH

Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την υφή των αλιευμάτων είναι το pH της σάρκας τους. Κατά τη διάρκεια συντήρησης σε κατάψυξη η σάρκα των αλιευμάτων σταδιακά γίνεται

σκληρότερη. Η μεταβολή αυτή στην υφή ποικίλει και είναι ανάλογη με το είδος του αλιεύματος.

Οι Chaijan *et al*. (2004), μελετώντας δείγματα από σαρδέλα και σκουμπρί, ανακοίνωσαν ότι κατά την διάρκεια συντήρησης σε πάγο παρατηρήθηκε μία σταδιακή αύξηση της τιμής του pH στο σκουμπρί κατά τις πρώτες 15 ημέρες. Στη σαρδέλα, το pH παρέμεινε σταθερό τις πρώτες 12 ημέρες και αυξήθηκε απότομα την 15^{η} ημέρα. Οι διαφορές αυτές στη μεταβολή του pH μεταξύ των δύο ειδών θα μπορούσε να οφείλεται στην διαφορετική ρυθμιστική ικανότητα της σάρκας, που πιθανά είναι μεγαλύτερη στη σαρδέλα.

Η αύξηση της τιμής του pH υποθετικά οφείλεται στην αύξηση των πτητικών βάσεων που παράγονται είτε από ενδογενή είτε από μικροβιακά ένζυμα. Οι Benjakul *et al*., (2002) ανακοίνωσαν ότι η αποικοδόμηση των αζωτούχων ενώσεων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του pH στη σάρκα των αλιευμάτων.

Το γαλακτικό οξύ το οποίο παράγεται, απουσία οξυγόνου, από το γλυκογόνο αποτελεί τον κύριο λόγο της πτώσης του pH της σάρκας των αλιευμάτων μετά θάνατο (Sikorski *et al*., 1990). Ο Lawrie (1992) ανέφερε ότι οι σκουρόχρωμοι μύες των αλιευμάτων παρουσιάζουν μία σχετική έλλειψη ενζύμων που καταλύουν τη μετατροπή του γλυκογόνου σε γαλακτικό οξύ.

Οι Pacheco-Aguilar *et al*. (2000) ανακοίνωσαν ότι το pH της σάρκας σαρδέλας μειώθηκε γρήγορα μετά θάνατο. Η ζωντανή σαρδέλα έχει ένα pH της τάξης του 7,2. Μετά θάνατο το pH της σάρκας μειώθηκε σε 6,8 μετά από 2h, στο 6,2 μετά από 8h και στο 5,8 μετά από 24h (Watabe *et al*., 1991).

Οι μεταβολές της τιμής του pH εξαρτώνται από πληθώρα παραγόντων όπως το διαφορετικό είδος, την περιοχή αλιείας, τη

θερμοκρασία αποθήκευσης καθώς και τη ρυθμιστική ικανότητα της σάρκας (Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). Οι Sikorski *et al*., (1990) ανακοίνωσαν ότι η μεταβολή του pH εξαρτάται επίσης και από την απελευθέρωση ανόργανου φωσφόρου και αμμωνίας λόγω της ενζυματικής αποδόμησης του ATP.

2.4 Έλεγχος παραγωγής σουρίμι και ποιοτικών μεταβολών

2.4.1 Έλεγχος παραγωγής

Υπάρχουν 4 κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσικές ιδιότητες των πηκτών από πρωτεΐνες αλιευμάτων. Οι παράγοντες αυτοί είναι : (1) η κατάσταση της πρώτης ύλης, (2) η διαδικασία του ραφιναρίσματος, (3) ο σχηματισμός λύματος (sol) με ανάμιξη με NaCl και (4) ο σχηματισμός πηκτής με θέρμανση (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.1 Κατάσταση πρώτης ύλης

Στα αλιεύματα παρατηρούνται διάφορα στάδια, μετά θάνατο, βιοχημικών μεταβολών από τη στιγμή της αλιείας τους μέχρι και την επεξεργασία τους. Ένας από τους παράγοντες που καθορίζει την ποιότητα των πρωτεϊνών των αλιευμάτων, καθοριστικός για την ικανότητα σχηματισμού πηκτής, είναι η αποικοδόμηση του μυϊκού ιστού λόγω πρωτεολυτικής δράσης.

Η πρωτεολυτική δραστικότητα ποικίλει ανάλογα με το είδος του αλιεύματος και το μέρος του σώματος (Siebert & Schimitt, 1965), ενώ εξαρτάται από την θερμοκρασία και το pH (Geist & Crawford, 1974). Το αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης των μυϊκών πρωτεϊνών είναι η σταδιακή μείωση της ικανότητας σχηματισμού πηκτής.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την λειτουργικότητα (ικανότητα σχηματισμού πηκτής) των μυϊκών πρωτεϊνών για ένα συγκεκριμένο είδος αλιεύματος είναι ο βαθμός φρεσκάδας (freshness) και η εποχική διακύμανση. Η φρεσκάδα με τους κατάλληλους χειρισμούς αποτελεί έναν ελεγχόμενο παράγοντα. Αντίθετα, η διαφορετική περίοδος αλιείας αποτελεί σημαντικό πρόβλημα. Κατά τη διάρκεια και μετά την αναπαραγωγική περίοδο, για παράδειγμα, η σάρκα των αλιευμάτων εμφανίζει μειωμένη ικανότητα σχηματισμού πηκτής και αυτό κύρια προέρχεται από την παρατηρούμενη αυξημένη ενζυμική δράση κυρίως όξινων πρωτεασών, όπως η καθεψίνη D (Konakaya, 1983).

2.4.1.2. Ραφινάρισμα

Ο όρος ραφινάρισμα αναφέρεται στο πλύσιμο και το στράγγισμα του κιμά αλιευμάτων. Το μεγαλύτερο μέρος των σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων πεπτικών ενζύμων όπως πρωτεασών, λιπασών και φωσφολιπασών, ανόργανων αλάτων, ποικίλων υδατοδιαλυτών ενώσεων και αίματος απομακρύνονται κατά το στάδιο του πλυσίματος. Το μεγαλύτερο μέρος των σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών απομακρύνονται κατά τον πρώτο κύκλο πλυσίματος όταν χρησιμοποιείται μία αναλογία 1:3, κιμάς αλιευμάτων: διάλυμα πλυσίματος αντίστοιχα (Flick & Martin, 1992).

Η αύξηση της συγκέντρωσης των μυϊκών πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ικανότητα σχηματισμού πηκτής του πλυμένου κιμά αλιευμάτων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, μετά τον δεύτερο κύκλο πλυσίματος δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της δύναμης της πηκτής παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα των μυϊκών πρωτεϊνών

αυξάνουν με τους επιπρόσθετους κύκλους πλυσίματος (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.2.1 Ποιότητα νερού

Δύο σημαντικοί παράγοντες σε σχέση με την ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή σουρίμι είναι (1) η συγκέντρωση των ανόργανων αλάτων (σκληρότητα) και (2) το pH.

Υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{++} και Mg^{++} στο νερό πλυσίματος έχουν ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση μετουσίωσης των μυϊκών πρωτεϊνών (ακτίνης, μυοσίνης) στο σουρίμι κατά τη συντήρηση του σε συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης (Tamoto, 1971). Έτσι το αποδεκτό εύρος ιονικής ισχύος προερχόμενης από την προσθήκη των παραπάνω ιόντων στο νερό πλυσίματος είναι 0,005-0,1 (Ohshima *et al.,* 1993).

Το pH του νερού πλυσίματος σχετίζεται με την ικανότητα συγκράτησης νερού των μυϊκών πρωτεϊνών και ως εκ τούτου με την ικανότητα σχηματισμού πηκτής του τελικού προϊόντος (Lee, 1986a). Για το λόγο αυτό, το pH του νερού πλυσίματος πρέπει να προσαρμόζεται στα επίπεδα του pH της σάρκας των αλιευμάτων (6,5-7,0) ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών των αλιευμάτων.

2.4.1.2.2 Χρόνος πλυσίματος και θερμοκρασία

Η εκχύλιση των υδατοδιαλυτών συστατικών του κιμά αλιευμάτων σε ένα δεδομένο αριθμό κύκλων πλυσίματος, είναι συνδυασμός του χρόνου ανάδευσης και της θερμοκρασίας του διαλύματος πλυσίματος. Ο Lee (1986b) ανέφερε ότι η ποσότητα των πρωτεϊνών που εκχυλίστηκαν αυξήθηκε σημαντικά καθώς ο χρόνος πλυσίματος έφτασε τα 9-12min. Από αυτό το χρονικό σημείο και μετά δεν

παρατηρήθηκε αύξηση της ποσότητας των πρωτεϊνών που εκχυλίστηκαν. Τα 5min ανάδευσης σε κάθε κύκλο πλυσίματος θεωρήθηκαν επαρκή (Flick & Martin, 1992).

Οι Douglas-Schwarz & Lee (1988) ανέφεραν ότι σε ένα εύρος θερμοκρασιών 3-27^{0}C, η εκχύλιση των σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών αυξήθηκε γραμμικά σε σχέση με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού πλυσίματος. Όμως, η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας πρέπει να βασίζεται στη σταθερότητα στη θέρμανση που παρουσιάζουν οι μυϊκές πρωτεΐνες (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.3 Σχηματισμός λύματος

Κατά τη διαδικασία του σχηματισμού λύματος, οι παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητες τόσο του λύματος όσο και της πηκτής είναι (1) τα επίπεδα των αλάτων και της υγρασίας, (2) το pH, και (3) η διάρκεια της κιμαδοποίησης και η θερμοκρασία (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.3.1 Προσθήκη αλάτων

Τα άλατα, κυρίως το NaCl, χρησιμοποιούνται για τη διαλυτοποίηση των μυϊκών πρωτεϊνών κατά τον σχηματισμό του λύματος, ένα βασικό στάδιο για την παραγωγή ελαστικής και συνεκτικής πηκτής με θέρμανση. Τα επίπεδα των αλάτων που απαιτούνται για τη μεγιστοποίηση της συνεκτικότητας της πηκτής έχει βρεθεί ότι εξαρτώνται από το είδος των αλιευμάτων (Flick & Martin, 1992). Αύξηση της συγκέντρωσης των αλάτων σε συγκεκριμένα όρια, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συνεκτικότητας της πηκτής λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης.

2.4.1.3.2 Υγρασία

Η πηκτή πρωτεϊνών αποτελείται από ένα δίκτυο πρωτεϊνών και νερού. Το νερό είναι ακινητοποιημένο μέσα στο τρισδιάστατο πρωτεϊνικό πλέγμα. Σε συγκεκριμένα επίπεδα υγρασίας η δύναμη της πηκτής καθορίζεται από το βαθμό ικανότητας των πρωτεϊνικών μορίων να συγκρατήσουν νερό μέσα στο πλέγμα.

Οι Lee & Toledo, (1976) ανέφεραν ότι, όταν η υγρασία μειώθηκε πέρα από το κρίσιμο όριο του 74% όπως καθορίστηκε για το μη πλυμένο σκουμπρί Ισπανίας (*Scomberomorous maculates*), η συνεκτικότητα της πηκτής μειώθηκε ενώ η σκληρότητα αυξήθηκε. Γίνεται έτσι αντιληπτό ότι, απαιτείται συγκεκριμένο επίπεδο υγρασίας για την επαρκή διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών και τον σχηματισμό του δικτύου που είναι υπεύθυνο για την ελαστική, συνεκτική πηκτή.

Όταν τα επίπεδα της υγρασίας ξεπεράσουν την ικανότητα συγκράτησης νερού των πρωτεϊνικών μορίων, το παραγόμενο προϊόν παρουσιάζει μία αδύναμη υφή και δεν είναι πλέον αποδεκτό (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.3.3 pH

Η δύναμη της πηκτής εξαρτάται επίσης από το pH του λύματος. Το βέλτιστο pH ποικίλει ανάλογα με το είδος των αλιευμάτων και την εφαρμοζόμενη μεταχείριση.

Όταν για την παραγωγή σουρίμι χρησιμοποιήθηκε μεταχείριση χωρίς προσθήκες συστατικών (άμυλο, κυτταρίνη), το βέλτιστο pH βρέθηκε να είναι μεταξύ 6-7 με την ελάχιστη δύναμη πηκτής να

παρατηρείται σε pH 5 (Okada, 1963). Η αύξηση του pH πάνω από 7, οδήγησε σε σταδιακή μείωση της δύναμης της πηκτής.

Το γεγονός ότι ο σχηματισμός της πηκτής εξαρτάται από το pH σχετίζεται με το ότι η ικανότητα συγκράτησης νερού των μυϊκών πρωτεϊνών εξαρτάται και αυτή από το pH (Hamm, 1986).

2.4.1.3.4 Διάρκεια σχηματισμού λύματος και θερμοκρασία

Ο σκοπός του σχηματισμού λύματος είναι η ρήξη του μυϊκού ιστού, η έκθεση μεγαλύτερης επιφάνειας στο NaCl, άρα η ομοιόμορφη διασπορά αυτού και αποτελεσματικότερη διαλυτοποίηση των μυϊκών πρωτεϊνών.

Οι Lippincott & Lee (1983), ανέφεραν ότι τα επίπεδα της εκχυλίσιμης μυοσίνης αυξήθηκαν με την αύξηση του χρόνου σχηματισμού του λύματος μέχρι ένα συγκεκριμένο όριο (12min). Πέρα από το όριο αυτό παρατηρήθηκε μείωση της εκχυλίσιμης μυοσίνης που αποδόθηκε σε πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων, γεγονός που οδήγησε στον πολυμερισμό των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία κατά το σχηματισμό του λύματος, πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά με σκοπό την αποφυγή της απώλειας των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Οι Douglas-Schwarz & Lee (1988), ανέφεραν μείωση της ικανότητας σχηματισμού πηκτής σε δείγματα μπακαλιάρου Αλάσκας (*Alaska Pollock*) σε σχέση με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά το σχηματισμό του λύματος. Αυτή η μείωση της ικανότητας σχηματισμού πηκτής αποδόθηκε σε μεταβολές της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών ως αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων (Deng *et al.,* 1976).

2.4.1.4 Σχηματισμός πηκτής

2.4.1.4.1 Σχηματισμός πηκτής στους 0-4°C ή σε θερμοκρασία 22°C

Λόγω απουσίας θέρμανσης, απαιτείται περισσότερος χρόνος για το σχηματισμό πηκτής, ενώ δεν παρατηρείται μετουσίωση των πρωτεϊνών. Για το σχηματισμό πηκτής στους 0-4°C απαιτείται περισσότερος χρόνος σε σχέση με τους 22°C, αλλά η σχηματιζόμενη πηκτή παρουσιάζει μεγαλύτερη συνεκτικότητα. Η έλλειψη μετουσίωσης των πρωτεϊνικών μορίων οδηγεί σε προϊόν με υψηλότερη φωτεινότητα (λευκότητα) σε σύγκριση με το προϊόν που προέρχεται από θερμικά μετουσιωμένες πρωτεΐνες (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.4.2 Σχηματισμός πηκτής με θέρμανση σε χαμηλές θερμοκρασίες

Επιτυγχάνεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 40-50°C. Συνοδεύεται από ήπια μετουσίωση των πρωτεϊνών, ενώ οι δεσμοί που συμμετέχουν στο σχηματισμό του πρωτεϊνικού δικτύου είναι κυρίως υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και σε μικρότερη έκταση δισουλφιδικοί και δεσμοί υδρογόνου (Okada ,1963).

Η πήξη σε χαμηλές θερμοκρασίες εξαρτάται από τη σχέση θερμοκρασίας-χρόνου για την παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας. Σε βιομηχανική κλίμακα, η πήξη σε χαμηλές θερμοκρασίες λαμβάνει χώρα πριν την τελική θέρμανση. Η ποιότητα της υφής του τελικού προϊόντος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον επιτυχή έλεγχο της πήξης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.4.3 Σχηματισμός πηκτής με θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες

Συνοδεύεται ή όχι από την προαναφερόμενη μέθοδο. Επιτυγχάνεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 80-95°C και για χρονική διάρκεια 20-40min, εξαρτώμενη από τον τύπο και το μέγεθος των προϊόντων. Συνοδεύεται από πλήρη μετουσίωση των πρωτεϊνών, ενώ οι δεσμοί που συμμετέχουν στο σχηματισμό του πρωτεϊνικού δικτύου είναι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δισουλφιδικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου (Flick & Martin, 1992).

Λόγω της συναίρεσης των πρωτεϊνών που λαμβάνει χώρα σε υψηλές θερμοκρασίες, το πρωτεϊνικό δίκτυο των πηκτών που θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες χωρίς προηγούμενη πήξη σε χαμηλές θερμοκρασίες, παρουσιάζει μία λιγότερο ομοιόμορφη και συμπαγή δομή συγκρινόμενο με αυτό που έχει παραχθεί με θέρμανση σε χαμηλές θερμοκρασίες (Douglas-Schwarz & Lee, 1988).

Με την πήξη σε χαμηλές θερμοκρασίες, η σχηματιζόμενη πηκτή είναι περισσότερο συνεκτική και ελαστική. Άρα γίνεται αντιληπτό ότι, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να προηγείται της τελικής θέρμανσης της πηκτής (Flick & Martin, 1992).

2.4.1.4.4 Σχηματισμός πηκτής με συνεισφορά συστατικών με ικανότητα ζελατινοποίησης

Σημαντική ικανότητα ζελατινοποίησης έχει διαπιστωθεί από διάφορα συστατικά όπως, οι πρωτεΐνες πλάσματος και οι αλγινάσες. Οι πρωτεΐνες πλάσματος (υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες) είναι πολλά υποσχόμενες πηγές οι οποίες έχουν αναγνωρισθεί ως ένα χρήσιμο συστατικό σε μαγειρεμένα προϊόντα κρέατος, λόγω των άριστων ιδιοτήτων ζελατινοποίησης. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι

επιδεικνύουν παρεμποδιστική δραστικότητα σε πρωτεολυτικά ένζυμα και ικανότητα ενδυνάμωσης της πηκτής κατά την θερμικά προκαλούμενη ζελατινοποίηση του σουρίμι. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη πλάσματος κοτόπουλου (Chicken Plasma Protein, CPP) διαπιστώθηκε ότι μπορεί να ενισχύσει τη δύναμη της πηκτής σουρίμι, δρώντας ως ενισχυτής στο πλέγμα της πηκτής καθώς επίσης και ως παρεμποδιστής της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων (Rawdkuen *et al*., 2005).

Επίσης, οι αλγινάσες χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως πηκτικοί παράγοντες, παράγοντες ζελατινοποίησης και σταθεροποιητές στα τρόφιμα και σε βιομηχανικά προϊόντα όπως χρώματα, χαρτιά και υφάσματα. Οι αλγινάσες είναι υδροκολλοειδή, με υψηλό μοριακό βάρος, που προέρχονται από τα καφέ φύκια (*phaecophyceae*). Παρατηρήθηκε ότι το δίκτυο των υδροκολοειδών των αλγινασών εμπλέκεται με το πλέγμα που σχηματίζεται από τις μυϊκές πρωτεΐνες (Kim, 2003).

Η χρήση της μικροβιακής τρανσγλουταμινάσης (MTGασης), έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνει τις ιδιότητες της πηκτής**.** Συγκεκριμένα η προσθήκη της έχει μελετηθεί ως τρόπος βελτίωσης των χαρακτηριστικών της υφής και των μηχανικών ιδιοτήτων του σουρίμι. Στις πηκτές σουρίμι από μπαρμπούνι, παρατηρήθηκε ότι η MTGαση επηρέασε τόσο τη σκληρότητα όσο και τη συνεκτικότητα. Μάλιστα, η σκληρότητα επηρεάστηκε ιδιαίτερα σημαντικά. Με απουσία MTGασης η θερμοκρασία που απαιτήθηκε για να επιτευχθεί η μέγιστη σκληρότητα ήταν 34°C ενώ η προσθήκη της οδήγησε σε αύξηση της παραπάνω θερμοκρασίας κατά 5°C. Το παραπάνω αποτέλεσμα αποδόθηκε στη διαφορετική θερμοκρασία δράσης της MTGασης και της ενδογενούς TGασης. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η

κατάλληλη θερμοκρασία δράσης της MTGασης είναι 35-40°C, ενώ εκείνη της ενδογενούς TGασης 32-36°C. Η προσθήκη της MTGασης στην πήξη σουρίμι οδήγησε σε βελτίωση των μηχανικών του ιδιοτήτων (Ramirez *et al*., 2000). Ωστόσο, η προσθήκη της MTGασης σε συνδυασμό με κάποια υδροκολλοειδή (πηκτίνες) (τα οποία διαπιστώθηκε ότι βελτιώνουν σημαντικά τις μηχανικές ιδιότητες των πηκτών σουρίμι) οδήγησε σε διάσπαση των πηκτών σουρίμι.

2.4.1.4.5 Σημασία προσθήκης αμύλου στο σχηματισμό πηκτής.

Η προσθήκη συστατικών στην πηκτή σουρίμι είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει στο σχηματισμό πλέγματος. Ο τύπος των συστατικών που χρησιμοποιούνται μπορεί να αλλάξει το περιβάλλον ζελατινοποίησης και τη διαθεσιμότητα του νερού και σχετίζεται με τη δημιουργία πρωτεϊνικών δεσμών. Το άμυλο είναι το πιο κοινό “ενισχυτικό” που χρησιμοποιείται σε προϊόντα που βασίζονται στο σουρίμι. Η επιλογή του τύπου και του ποσοστού του αμύλου που προστίθεται καθορίζεται από παράγοντες όπως η επίδραση που ασκεί στη δύναμη της πηκτής, η σταθερότητα κατά την ψύξη-απόψυξη και φυσικά το κόστος. Οι ιδιότητες ενίσχυσης της πηκτής και σταθεροποίησης κατά την ψύξη-απόψυξη, διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του αμύλου. Στα είδη αμύλου με ισχυρή επίδραση στην ενίσχυση της πηκτής περιλαμβάνονται το άμυλο πατάτας, καλαμποκιού (50-75% αμυλοπηκτίνη) και σιταριού, τα οποία διογκώνονται, εμφανίζουν υψηλό ιξώδες κατά τη ζελατινοποίηση, παρέχουν σταθερές πηκτές όταν μαγειρευτούν και ψύχονται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Η ιδιότητα ενίσχυσης της πηκτής μπορεί να εξηγηθεί από τη διόγκωσή του και την πρόσληψη νερού κατά τη ζελατινοποίηση κατά τη θέρμανση. Κατά τη μεταβολή αυτή τα

μόρια του αμύλου διαστέλλονται σε σημαντικό βαθμό, ενώ περιορίζονται από το πλέγμα. Η διόγκωση των μορίων αμύλου δημιουργεί πίεση στο πρωτεϊνικό πλέγμα. Η πίεση αυτή, συνδυαστικά με την απομάκρυνση της υγρασίας από το πρωτεϊνικό πλέγμα, οδηγεί σε σταθερότερο και ελαφρώς πιο συνεκτικό πλέγμα πηκτής (Shahidi, 1994; Lee *et al*., 1992).

Το ποσοστό του αμύλου που χρησιμοποιείται στη χώρα μας, σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων είναι 5%, ενώ οι παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα ενίσχυσης της πηκτής είναι η υγρασία, η θερμοκρασία μαγειρέματος και η παρουσία άλλων συστατικών που δρουν ανταγωνιστικά προς την υγρασία.

2.4.1.4.6 Συνεισφορά κρυοπροστατευτικών

Η προσθήκη κρυοπροστατευτικών αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο παρεμπόδισης της μετουσίωσης των πρωτεϊνών κατά τη συντήρηση σε κατάψυξη. Η χρησιμοποίηση αυτών των ουσιών επέτρεψε την παραγωγή σουρίμι να ξεφύγει από το επίπεδο της οικοτεχνίας και να αναπτυχθεί σε βιομηχανική κλίμακα. Αρχικά, δοκιμάστηκε ένας μεγάλος αριθμός ουσιών αλλά μόνο μια μικρή ομάδα αυτών διαπιστώθηκε αποτελεσματική. Η δράση των κρυοπροστατευτικών εντοπίζεται στην κατακράτηση του νερού και στην αύξηση της επιφανειακής τάσης (Hall & Ahmad, 1997).

Οι Matsumoto & Noguchi, (1992) διαχώρισαν σε φυσικοχημικούς και χημικούς, τους παράγοντες που επηρεάζουν την κρυοσταθεροποίηση των μυϊκών πρωτεϊνών. Στους φυσικοχημικούς περιλαμβάνονται: η επίδραση του πλυσίματος, η θερμική αντοχή των μυϊκών πρωτεϊνών, η επίδραση του pH και οι διαδικασίες ψύξης/

κατάψυξης/ απόψυξης που εφαρμόζονται. Οι χημικοί περιλαμβάνουν τη δράση των κρυοπροστατευτικών ουσιών που προστίθενται.

Πολλές ουσίες, συμπεριλαμβανόμενων σακχάρων (μικρού μοριακού βάρους), αλκοολών, αμινοξέων, καρβοξυλικών οξέων και πολυφωσφατιδίων, βρέθηκαν ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κρυοπροστατευτικά μέσα. Οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες ουσίες είναι η ζάχαρη (ποσοστό 4%) συνδυαστικά με σορβιτόλη (ποσοστό 4-5%) και με πολυφωσφορικά άλατα (ποσοστό 0,25-0,3%). Επίσης η πολυδεξτρόζη και η μαλτοδεξτρίνη οι οποίες ανήκουν στη κατηγορία των πολυμερών, έχουν εμφανίσει κρυοπροστατευτική δράση. Μάλιστα η πολυδεξτρόζη, που θεωρείται και διογκωτικός παράγοντας, φαίνεται ότι οδηγεί και σε μείωση το pH του κιμά/ σουρίμι (Zhou *et al*., 2005). Το γαλακτικό νάτριο επίσης (ουσία που έχει χρησιμοποιηθεί ως γαλακτοματοποιητής, ενισχυτής γεύσης και παράγοντας ρύθμισης του pH) καθώς και η τρεχαλόλη (D-glycopyranosyl- a(1-P1)-D-glycopyranoside), ένας δισακχαρίτης με μικρή θερμιδική αξία, όταν προστέθηκαν σε ποσοστό 8% (w/w) σε σουρίμι από πέρκα (*Tilapia nilotica* & *Tilapia aurea*), βρέθηκε ότι παρεμπόδισαν αποτελεσματικά τη μετουσίωση των πρωτεϊνών κατά την κατάψυξη στους –18°C για 24 εβδομάδες. Η τρεχαλόζη σε συγκέντρωση 8% (w/w) έδειξε καλύτερη κρυοπροστατευτική δράση από το εμπορικό μίγμα σουκρόζης:σορβιτόλης (1:1), ενώ το γαλακτικό νάτριο έδειξε ισοδύναμο αποτέλεσμα με το συμβατικό μίγμα. Έτσι η τρεχαλόζη και το γαλακτικό νάτριο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά κρυοπροστατευτικά μέσα στο σουρίμι εξαιτίας της μικρής γλυκύτητας και θερμιδικής αξίας που εμφανίζουν (Zhou *et al*., 2005).

Η ακριβής ποσότητα του κάθε κρυοπροστατευτικού που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τη διάρκεια συντήρησης του κατεψυγμένου προϊόντος (Matsumoto & Noguchi, 1992) ενώ η ομοιόμορφη προσθήκη και ανάμιξη καθώς και ο έλεγχος αύξησης της θερμοκρασίας είναι παράγοντες στους οποίους πρέπει να δοθεί μεγάλη προσοχή (Hall & Ahmad, 1997).

2.5 Μεταβολές χρώματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μυοσφαιρίνη και η αιμοσφαιρίνη διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη του λευκού χρώματος των πρωτεϊνικών προϊόντων. Το χρώμα είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα της πηκτής σουρίμι (Chen, 2002). Οι Faustman *et al*. (1992) ανακοίνωσαν ότι ο κορεσμός του κόκκινου χρώματος στο κρέας σχετίζεται άμεσα με την συγκέντρωση της μυοσφαιρίνης. Η σταθερότητα της μυοσφαιρίνης επηρεάζει σημαντικά το χρώμα του κρέατος (Chen, 2002).

Κατά τη διάρκεια των χειρισμών και της αποθήκευσης των αλιευμάτων, λαμβάνουν χώρα μία σειρά από βιοχημικές, χημικές και μικροβιολογικές μεταβολές που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή του χρώματος (Pacheco-Aguilar *et al*., 2000).

Η μεταβολή του χρώματος του τόνου, για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια συντήρησης σε κατάψυξη οφείλεται στο σχηματισμό της μεταμυοσφαιρίνης (Haard, 1992). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως το pH, τη θερμοκρασία, την ιονική ισχύ και την κατανάλωση οξυγόνου (Renerre & Labas, 1987).

Γενικά οι πρωτεΐνες της αίμης στα νωπά αλιεύματα μπορούν να απομακρυνθούν με το πλύσιμο της σάρκας, δίνοντας αυξημένη λευκότητα. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες της αίμης καθίστανται λιγότερο διαλυτές με την εμφάνιση αλλοίωσης των αλιευμάτων (Chaijan *et al.,* 2004).

Ο Chen (2002) διαπίστωσε οξείδωση της μυοσφαιρίνης σε μεταμυοσφαιρίνη σε σαυρίδι (*Trachurus murphyi*) μέσω της ικανότητας εκχύλισης της μυοσφαιρίνης. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα αλιευμάτων (σουρίμι) που παρασκευάζονται από αλλοιωμένη πρώτη ύλη είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν ανεπιθύμητες μεταβολές του χρώματος. Το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα έντονο σε αλιεύματα με σκουρόχρωμη σάρκα, όπως είναι η σαρδέλα.

Οι Chaijan *et al*. (2004) μελετώντας δείγματα σαρδέλας ανακοίνωσαν ότι κατά την 15^{η} μέρα συντήρησης σε πάγο η περιεκτικότητα των μυών σε χρωστικές μειώθηκε σημαντικά, σε σχέση με αυτή των φρέσκων μυών. Αυτό δείχνει ότι οι χρωστικές οξειδώθηκαν ή μετουσιώθηκαν κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Μείωση της διαλυτότητας και δέσμευση της οξειδωμένης μυοσφαιρίνης στους μύες οδηγεί σε μικρότερη απομάκρυνση της μυοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια του πλυσίματος. Στην ίδια μελέτη, αναφέρθηκε ότι το σύνολο των χρωστικών στους σκουρόχρωμους μύες παρουσίασε μικρότερη ικανότητα εκχύλισης σε σχέση με τους υπόλοιπους. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην εντονότερη οξείδωση των λιπαρών υλών στους σκουρόχρωμους μύες, οι οποίοι έχουν και υψηλότερη λιποπεριεκτικότητα, και σε πιθανές αντιδράσεις των οξειδωμένων λιπαρών υλών με τη μυοσφαιρίνη ή με παράγωγά της. Οι Hultin & Kelleher (2000) ανέφεραν ότι οι σκουρόχρωμοι μύες, οι οποίοι έχουν

μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος και προ-οξειδωτικές ουσίες, είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην οξείδωση από τους υπόλοιπους.

Στην παραπάνω μελέτη, ο δείκτης ερυθρότητας (a*/b* λόγος) σε σαρδέλα και μπακαλιάρο, μειώθηκε κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε συνθήκες κατάψυξης. Ο παραπάνω λόγος χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μεταβολής του χρώματος του τόνου κατά τη διάρκεια συντήρησής του. Διαπιστώθηκε επίσης μείωση του δείκτη ερυθρότητας και αποδόθηκε στην οξείδωση της μυοσφαιρίνης σε μεταμυοσφαιρίνη.

Οι Benjakul *et al*. (2005) μελετώντας ποικίλα είδη αλιευμάτων διαπίστωσαν ότι η λευκότητα των πηκτών σουρίμι μειώθηκε κατά τη διάρκεια συντήρησης τους στους –18^0 C. Οι διαφορές του χρώματος μεταξύ των διαφορετικών ειδών αποδόθηκε σε πιθανή διαφορετική περιεκτικότητα των μυών σε χρωστικές.

Η μείωση της λευκότητας αποδίδεται επίσης στη συνένωση χρωμοπρωτεϊνών και ιδιαίτερα οξειδωμένων χρωστικών με τις μυϊκές πρωτεΐνες. Επιπλέον, η οξείδωση των λιπαρών υλών στους μύες κατά την διάρκεια της συντήρησης σε κατάψυξη μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό δεσμών χρωμοπρωτεϊνών και μυϊκών πρωτεϊνών μέσω της διαδικασίας των ελεύθερων ριζών (Saeed *et al*., 1999). Αυτές οι χρωστικές δεν μπορούν να απομακρυνθούν αποτελεσματικά κατά το πλύσιμο και παραμένουν στο σουρίμι. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της λευκότητας των πηκτών.

2.6 Μικροβιολογικός έλεγχος

Οι πηγές βακτηριακής επιμόλυνσης των νωπών αλιευμάτων που προορίζονται για την παραγωγή σουρίμι βρίσκονται συνήθως στο δέρμα, τα βράγχια και τα εντόσθια (Hall & Ahmad, 1997; Lee,1992).

Το μικροβιακό φορτίο στο δέρμα κυμαίνεται από 10^3 ως 10^5 ανά cm^2, στα βράγχια από 10^3 ως 10^4 ανά g και στα έντερα από 10^2 ως10^9 ανά g δείγματος. Η μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται στα έντερα οφείλεται στην κατάσταση εκτροφής των αλιευμάτων πριν την αλίευση. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί των νωπών αλιευμάτων περιέχουν είδη που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas, Alteromonas, Moraxella, Acinetobacter, Flavobacterium, Cytophaga, Vibrio, Aeromonas, Arthrobacter, Cytobacterium* (Lee, 1992).

Εάν το αλίευμα είναι σε καλή κατάσταση και κατάλληλα κατεψυγμένο θα πρέπει να έχει ένα μικρό μικροβιακό φορτίο της τάξης του 10^3 έως 10^4/g. Μια πηγή μικροβιακής επιμόλυνσης είναι τα δοχεία συντήρησης, των οποίων η εσωτερική επιφάνεια είναι δύσκολο να καθαριστεί και να αποστειρωθεί, έτσι ένα μοναδικό μικροβιακό περιβάλλον μπορεί να δημιουργηθεί.

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο δέρμα, στα βράγχια και στα εντόσθια μπορούν να εξαπλωθούν κατά το στάδιο προετοιμασίας όπως, αφαίρεση κεφαλιού, βραγχίων, εντοσθίων, δέρματος και φιλετοποίηση, για το λόγο αυτό στα στάδια αυτά θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή. Σε αντίθετη περίπτωση οι μικροοργανισμοί που παγιδεύονται στον κιμά είναι δύσκολο να απομακρυνθούν, ακόμη και με επιμελές επαναλαμβανόμενο πλύσιμο. Οι αποστεωτές/ κιμαδοποιητές μπορεί να είναι πιθανές πηγές επιμόλυνσης, καθώς ίχνη αίματος και δέρματος μπαίνουν στα τύμπανα μαζί με την σάρκα. Η χαμηλή θερμοκρασία του νερού πλυσίματος μπορεί να συγκρατήσει τα ψυχρότροφα βακτήρια, περιλαμβάνοντας οργανισμούς αλλοίωσης. Τα στάδια του ραφιναρίσματος και της αφυδάτωσης συγκεντρώνουν τα στερεά, συμπεριλαμβανομένης και της μικροβιακής βιομάζας. Η προσθήκη και ανάμιξη με

κρυοπροστατευτικές ουσίες αποτελεί επίσης μια πιθανή μικροβιακή επιμόλυνση (Lee, 1992). Ωστόσο οι Hall & Ahmad, (1997) υποστηρίζουν ότι η πρόσθεση κρυοπροστατευτικών και χλωριούχου νατρίου συμβάλουν στην καταστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων.

Η κατάψυξη του σουρίμι εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και η επαρκής θερμική επεξεργασία θανατώνει τους εναπομείναντες οργανισμούς.

Η βακτηριακή επιμόλυνση θα μπορούσε να οδηγήσει σε προβλήματα τροφικής αλλοίωσης ή δηλητηρίασης. Η τροφική δηλητηρίαση που αποδίδεται στο σουρίμι και όχι σε μη προσεκτική επεξεργασία και χειρισμούς, δεν φαίνεται να αποτελεί πρόβλημα. Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν τροφική αλλοίωση χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες ως πηγή ενέργειας, μπορούν να οδηγήσουν σε οργανοληπτικές μεταβολές στη γεύση, στο άρωμα και στην υφή των προϊόντων.

Η αρχή του HACCP μπορεί να βρει εφαρμογή σε διάφορα σημεία της επεξεργασίας σουρίμι. Όμως η μεταβλητότητα των γραμμών παραγωγής σουρίμι, μπορεί να επιφέρει διαφορετικά κρίσιμα σημεία για το κάθε στάδιο (Hall & Ahmad, 1997).

2.7 Έλεγχος ποιοτικών μεταβολών

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με σκοπό τον έλεγχο των ποιοτικών μεταβολών σε πηκτές σουρίμι διαφόρων αλιευμάτων.

Οι φυσικές ιδιότητες σχετίζονται άμεσα με τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών και είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι αυτές οι ιδιότητες επηρεάζουν άμεσα την αποδοχή ή όχι των προϊόντων από τους καταναλωτές λόγω της επίδρασής τους στην υφή του προϊόντος (Shenouda, 1980). Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες της υφής των πηκτών σουρίμι που εξετάζονται συχνότερα περιλαμβάνουν την

σκληρότητα, συνεκτικότητα και ελαστικότητα. Οι Rawdkuen *et al*., (2005) και Morales *et al*., (2001) μελέτησαν τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε πηκτές σουρίμι από διάφορα αλιεύματα.

Η μέτρηση του χρώματος των αλιευμάτων, με την χρήση ειδικών χρωματομέτρων, μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες όσο αφορά τον έλεγχο των ποιοτικών μεταβολών των αλιευμάτων (Chaijan *et al*., 2004). Οι τιμές χρώματος L* a*, b* καθώς και ο δείκτης λευκότητας είναι παράμετροι που φανερώνουν την έκταση των ποιοτικών μεταβολών των πηκτών αλιευμάτων (Benjakul *et al*., 2005; Uresti *et al*., 2003; Perez-Mateos & Lanier, 2006).

Έχει αναφερθεί ότι η δύναμη της πηκτής αυξάνει με την εφαρμογή δύο τουλάχιστον κύκλων πλυσίματος και με χρησιμοποιούμενη αναλογία μέσου πλυσίματος: κιμά, 3:1 (Toyoda *et al*., 1992). Οι Hall & Ahmad, (1997) υποστήριξαν ότι οι τρεις κύκλοι πλυσίματος, διάρκειας 10 min, αναλογίας μέσου πλυσίματος: κιμά, 3:1, επαρκούν για τις περισσότερες εφαρμογές. Οι Chaijan *et al*., (2004) χρησιμοποίησαν την παραπάνω αναλογία σε κιμά σαρδέλας ενώ εφαρμόστηκε και σε άλλα είδη αλιευμάτων από τους Morales *et al*., (2001) και από τους Phatcharat *et al*., (2005).

Η πρωτεολυτική δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων, οδηγεί σε σοβαρή αποικοδόμηση των δομικών πρωτεϊνών, ιδιαίτερα της μυοσίνης. Η αποικοδόμηση αυτή οδηγεί σε υποβάθμιση της ποιότητας του σουρίμι και μειώνει σημαντικά την ισχύ της πηκτής (An *et al.,* 1996). Η ανίχνευση των πρωτεολυτικών ενζύμων έχει ερευνηθεί εξαιτίας της επίδρασης που έχουν στην ποιότητα του τελικού προϊόντος (Benjakul *et al*., 2003; Phatcharat *et al*., 2005).

Έχει αναφερθεί ότι ο θερμικά προκαλούμενος σχηματισμός πηκτής σουρίμι, επηρεάζεται έντονα από την ανασταλτική αλλά και την

ενισχυτική δράση κάποιων ουσιών. Οι ουσίες αυτές ουσιαστικά ενισχύουν ή αναστέλλουν τη δράση της ενδογενούς TGασης, η οποία συμβάλλει σημαντικά στη δομή της πηκτής. Οι ουσίες που εξετάζονται συχνότερα, είναι το χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$), που ενεργεί ως ενισχυτής της δράσης της TGασης αλλά και το χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl), που δρα ως αναστολέας της TGασης (Rawdkuen *et al*., 2005; Benjakul *et al*., 2004; Morales *et al*.,2001; Benjakul & Visessanguan, 2003).

Η μέθοδος της Διαφορική Θερμιδομετρική Ανάλυση (Differential Scanning Calorimetry), χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον έλεγχο της θερμικής σταθερότητας και της ικανότητας σχηματισμού πηκτής αντίστοιχα (Montejano *et al.,* 1985). Οι AbuDagga & Kolbe, (1997), μέτρησαν την θερμική αγωγιμότητα και την ειδική θερμότητα σε πηκτή σουρίμι χρησιμοποιώντας την παραπάνω μέθοδο.

3. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν:

1. Η μελέτη της επίδρασης του πλυσίματος σε 6 διαφορετικές τιμές pH (2,5, 4,0, 5,5, 8,5, 10,0 & 11,5) στο σχηματισμό πηκτής και στον αποχρωματισμό των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων (ανάδειξη καλύτερων τρόπων πλυσίματος).
2. Η παρασκευή πρωτεϊνικών προϊόντων σαρδέλας από αλιεύματα τα οποία υπο-αξιοποιούνται από τη βιομηχανία στη χώρα μας, με προσθήκη 5% αμύλου (ποσοστό που προδιαγράφεται στις διατάξεις του Κώδικα Τροφίμων).
3. Η μελέτη της επίδρασης του πλυσίματος στις 3 καταλληλότερες τιμές pH (4,0, 5,5 & 8,5) στο σχηματισμό πηκτής και στον αποχρωματισμό των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων (ανάδειξη καλύτερων τρόπων πλυσίματος).
4. Ο έλεγχος απομάκρυνσης πρωτεολυτικών ενζύμων κατά την εφαρμογή των ανωτέρω διαφορετικών τρόπων πλυσίματος (σημαντική συμβολή στην ανάδειξη του τρόπου πλυσίματος).
5. Ο έλεγχος της δράσης διαφορετικών αλάτων ($CaCl_2$, $MgCl_2$, NH_4Cl) στο σχηματισμό της πηκτής (ανάδειξη καταλληλότερου στην παρασκευή του προϊόντος).
6. Ο έλεγχος της συμβολής του ενζύμου της μικροβιακής τρανσγλουταμινάσης (ΜΤασης) στο σχηματισμό της πηκτής.
7. Ο έλεγχος της σκληρότητας, συνεκτικότητας και ελαστικότητας των παραγόμενων θερμικά επεξεργασμένων προϊόντων (INSTRON)
8. Μέτρηση θερμοκρασίας και ενθαλπίας μετουσίωσης πρωτεϊνών και ζελατινοποίησης του αμύλου μέσω θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης (DSC).
9. Ο έλεγχος της βακτηριακής επιβάρυνσης κατά τα στάδια της επεξεργασίας

4. Υλικά και μέθοδοι.

4.1 Υλικά – Όργανα

4.1.1 Πρώτη ύλη

Η προμήθεια των δειγμάτων (σαρδέλες, *Sardinops. Pilchardus*) έγινε από το μόνιμο προμηθευτή αλιευμάτων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης, την περίοδο του Νοεμβρίου 2005 (3 παρτίδες περίπου 2kg, στην 3, 8 και 10 Νοεμβρίου) Τα δείγματα (μεγέθους 11,3 -16cm και βάρους 12,4-36,7g) καλύφθηκαν με στρώμα τριμμένου πάγου ώστε να αποφευχθεί η άνοδος της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της μεταφοράς και μεταφέρθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα, μικρότερο των 30min, στο εργαστήριο για περαιτέρω επεξεργασία.

4.1.2 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη ερευνητική δραστηριότητα ήταν αναλυτικής καθαρότητας (AR).

4.1.3 Όργανα

- Μηχανή παρασκευής κιμά για τον λεπτοτεμαχισμό και την κιμαδοποίηση της παραλαμβανόμενης σάρκας των δειγμάτων.
- Συσκευή Kjeldahl τύπου Buchi για τον προσδιορισμό της ολικής και εκχυλίσιμης πρωτεΐνης.
- Φυγόκεντρος τύπου SORVAL RC-28S SUPRAspeed για τον προσδιορισμό του λίπους.
- Περιστροφικός συμπυκνωτής τύπου Buchi Re 111 για την απομάκρυνση του διαλύτη (χλωροφόρμιο) κατά τον προσδιορισμό του λίπους.

- Συσκευή Instron UTM Analyser, μοντέλο 1140 (Instron Ltd., U.K.) για την ανάλυση της υφής και των ρεολογικών ιδιοτήτων των προϊόντων.
- Φούρνο αέρα τύπου Memmert για τον προσδιορισμό της υγρασίας.
- pH-μετρο μοντέλου 8424 Hanna Instruments.
- Όργανο μέτρησης διαφορικής θερμικής ανάλυσης (DSC) Perkin Elmer DSC 6 thermal analysis system
- Χρωματόμετρο “Micro Color LMC”, DR LANGE.
- Φασματοφωτόμετρο Bausch & Lomb, μοντέλο Spectronic 601.

4.2 Επεξεργασία

Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε χειρονακτικά. Απομακρύνθηκαν το κεφάλι, τα εντόσθια και η ουρά, με τομή παράλληλη και κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης αφαιρέθηκε το δέρμα και στη συνέχεια τα φιλέτα κιμαδοποιήθηκαν με μηχανή του κιμά, μέσω ενός κόσκινου με διάμετρο οπών 3 mm, σε χρονικό διάστημα 2h.

Ακολούθησαν τρία στάδια πλυσίματος σε θερμοκρασίες 8,8-12,3°C και σε αναλογία διαλύματος προς κιμά 3:1 αντίστοιχα. Τα πλυσίματα είχαν διάρκεια 10min υπό συνεχή ανάδευση. Μετά το πέρας των 10min ακολούθησε στράγγισμα σε μεταλλικό κόσκινο με πόρους 200μm για την ανάκτηση των στερεών συστατικών. Στο στάδιο αυτό έγινε η πρώτη μέτρηση χρώματος.

Στο πρώτο στάδιο πλυσίματος έγινε σε διαφορετικά pH ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή συμβολή του στην ποιότητα των τελικών προϊόντων. Έτσι το pH ρυθμίστηκε σε 2,5, 4,0, 5,5, 8,5, 10,5 και 11,5. Για τα όξινα pH (2,5, 4,0 και 5,5) χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M NaH_2PO_4 σε συνδυασμό με 85% H_3PO_4. Για τα αλκαλικά pH (8,5, 10,0 και 11,5) χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό

διάλυμα 0.1M $Na_2HPO_4.2H_2O$ σε συνδυασμό με 30% NaOH. Στο δεύτερο στάδιο πλυσίματος το pH ρυθμίστηκε στο 7.0-7.5 με διάλυμα 0.1M $Na_2HPO_4.2H_2O$ και σταδιακή προσθήκη 85% H_3PO_4. Τέλος στο τρίτο στάδιο το πλύσιμο έγινε σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,3% για την διευκόλυνση απομάκρυνσης του νερού.

Με το πέρας κάθε σταδίου ποσότητα περίπου 80g κιμά και 50mL απορριπτόμενου υγρού συλλέγονταν και αποθηκεύονταν για τις απαιτούμενες αναλύσεις.

Στο τέλος του τρίτου πλυσίματος η υγρασία του κιμά ρυθμίστηκε στο 80% (77,55-83,36%) με τη βοήθεια τυρόπανου (τσαντίλα) και ακολούθησε προσθήκη 2,5% NaCl με συνεχή ανάδευση για 1min. Στη συνέχεια ο κιμάς τοποθετήθηκε σε μεταλλικά δακτυλίδια (9.7mm ύψος και 25mm διάμετρος) για μορφοποίηση και μετά σε περιέκτες πολυαιθυλενίου οι οποίοι κλείνονταν σε συσκευή κενού. Ο κάθε περιέκτης τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 40°C για 40 min και ακολούθησε θερμική επεξεργασία στους 90-95°C για 30min. Μετά τη θερμική επεξεργασία τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες ψύξης 4-6°C για 24h και ακολουθούσε η τελική χρωματομέτρηση και ο ρεολογικός έλεγχος.

4.2.1 Παραγωγή kamaboko (pH 4,0, 5,5, και 8,5)

Ο κιμάς σαρδέλας (~600g) πλύθηκε όπως παραπάνω, σε δεξαμενή πολυαιθυλενίου σε αναλογία μέσου πλυσίματος: σαρδέλας, 3:1 αντίστοιχα για 10 min υπό συνεχή ανάδευση. Το περιεχόμενο της υγρασίας μετά το πλύσιμο ρυθμίστηκε σε ποσοστό περίπου 80%, χρησιμοποιώντας τυρόπανο. Ο κιμάς της σαρδέλας πλύθηκε σε pH 4,0, 5,5, και 8,5.

Οι τρεις κύκλοι πλυσίματος εφαρμόστηκαν ως ακολούθως:

Πρώτος κύκλος πλυσίματος

Για να διαπιστωθεί η επίδραση του pH στην ποιότητα του kamaboko εξετάσθηκαν τρία διαφορετικά pH (4,0, 5,5, 8,5). Τα όξινα pH 4,0 και 5,5 αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας διάλυμα $NaH_2PO_4*H_2O$ 0,1M το οποίο στη συνέχεια για την απόκτηση του επιθυμητού pH ενισχύθηκε με 85% H_3PO_4 ή με 30% NaOH αντίστοιχα. Το αλκαλικό pH δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας διάλυμα $Na_2HPO_4*2H_2O$ 0,1M το οποίο ενισχύθηκε με 85% H_3PO_4. Όλα τα δείγματα πλύθηκαν στα παραπάνω pH για 10min.

Δεύτερος κύκλος πλυσίματος

Όλα τα παραπάνω pH ρυθμίστηκαν σε εύρος 7,0 –7,5 με διάλυμα φωσφορικού νατρίου ($Na_2HPO_4*2H_2O$ 0,1M, το οποίο ρυθμίστηκε στο επιθυμητό εύρος 7,0-7,5 με την προσθήκη H_3PO_4 85%). Όλα τα δείγματα πλύθηκαν στα παραπάνω pH για 10min.

Τρίτος κύκλος πλυσίματος

Το τελευταίο πλύσιμο του κιμά σαρδέλας έγινε με 0,3% διάλυμα χλωριούχου νατρίου με σκοπό να διευκολυνθεί η αποβολή νερού. Όλα τα δείγματα πλύθηκαν στο παραπάνω διάλυμα για 10min. Το περιεχόμενο της υγρασίας των δειγμάτων του πλυμένου κιμά σαρδέλας ρυθμίστηκε σε ποσοστό περίπου 80% χρησιμοποιώντας τυρόπανο.

4.2.2 Προετοιμασία της πηκτής

Ο πλυμένος και στραγγισμένος κιμάς σαρδέλας (~80% υγρασία) αναμίχθηκε για 2min με NaCl και με μη-τροποποιημένο άμυλο σιταριού, σε συγκέντρωση 2,5% (w/w) και 5% (w/w) του βάρους του κιμά αντίστοιχα. Ο κιμάς διαχωρίστηκε σε 6 μέρη (A, B, C, D, E και F). Τα μέρη A, B και C, αναμίχθηκαν για 1 λεπτό με 0,2% (w/w)

χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$), χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) αντίστοιχα. Ενώ τα μέρη D, E και F αναμίχθηκαν για 1 min με 0,2% (w/w) μικροβιακή TGαση (MTGαση) και 0,2% (w/w) από το κάθε προαναφερθέν άλας, αντίστοιχα. Το παραγόμενο λύμα μορφοποιήθηκε σε μεταλλικά δαχτυλίδια, όμοιων διαστάσεων (ύψους 9,7mm και διαμέτρου 25mm), κλείστηκε υπό κενό σε αδιαπέραστες από υγρασία/ ατμό σακούλες λεπτής μεμβράνης, προθερμάνθηκε στους 40°C για 40min, θερμάνθηκε στους 90°C για 30min και διατηρήθηκε στη συντήρηση (4$\pm$1°C) για 18h, πριν την εκτίμηση της υφής.

4.2.3 Αποτελεσματικότητα πλυσίματος

Η αποτελεσματικότητα πλυσίματος υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Pacheco-Aguilar *et al*., (2000, ως ποσοστό ανάκτησης των ολικών στερεών και πρωτεϊνών και ως ποσοστό απομάκρυνσης των λιπιδίων και της τέφρας:

% ανακτημένα ολικά στερεά ή πρωτεΐνες = [(ποσοστό των ολικών στερεών ή των πρωτεϊνών που ανακτήθηκαν μετά το πλύσιμο)/(ποσοστό των ολικών στερεών ή πρωτεϊνών του μη πλυμένου κιμά)]×100

% απομάκρυνση λιπαρών υλών ή τέφρας = 100 – [(ποσοστό λιπαρών υλών ή τέφρας που ανακτήθηκαν μετά το πλύσιμο)/(ποσοστό λιπαρών υλών ή της τέφρας του μη πλυμένου κιμά)]×100

4.3 Μέθοδοι Ανάλυσης

4.3.1 Μέτρηση pH

Το pH της σάρκας σαρδέλας μετρήθηκε με τη χρήση pH-μετρου, (μοντέλο 8424 της Hanna Instruments). Τα δείγματα ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Cortez–Ruiz *et al.*, (2001), αναμιγνύοντας 2 g κιμά σαρδέλας με 18 mL αποσταγμένου νερού.

4.3.2 Προσδιορισμός Υγρασίας

Το περιεχόμενο της υγρασίας καθορίστηκε με την συνιστώμενη μέθοδο της CEC (Commission of European Communities) ISOR 1442 (CEC 1979).

Περίπου 1g δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε τριβλίο Petri στο οποίο προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί και με ακρίβεια ζυγιστεί 3-4g άμμου και ένα μικρό γυάλινο ραβδάκι. Το δείγμα στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε φούρνο με αέρα στους 100±2°C μέχρι σταθερού βάρους για τουλάχιστον 24h. Ακολούθησε ψύξη σε ξηραντήρα και η ακριβής ζύγισή του. Η περιεκτικότητα σε υγρασία υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\%\ \text{Υγρασία} = \frac{\text{Αρχικό Βάρος - Τελικό Βάρος}}{\text{Βάρος Δείγματος}} \cdot 100\%$$

4.3.3 Προσδιορισμός Λίπους

Το περιεχόμενο των λιπαρών υλών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των Bligh & Dyer (1959), όπως τροποποιήθηκε απ' τους Hanson & Olley (1963).

Ζυγίστηκαν 10g δείγματος, σε φιάλη ομογενοποίησης 250mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10mL νερού, 20mL χλωροφορμίου με 0,01%

BHT και 40mL μεθανόλης, το μίγμα ομογενοποιήθηκε για 2min. Στη συνέχεια προστέθηκαν στη φιάλη ομογενοποίησης άλλα 20mL χλωροφορμίου με 0,01% BHT και ακολούθησε νέα ομογενοποίηση για 30s. Μια ακόμη ομογενοποίηση για 30s πήρε μέρος μετά την προσθήκη 10mL νερού. Η ομογενοποίηση γινόταν κάθε φορά σε θερμοκρασία 0-5°C.

Το ομογενοποίημα μεταφέρθηκε σε φιάλες φυγοκέντρησης και αφού ζυγίστηκαν ανά δύο ώστε να μην έχουν διαφορά βάρους μεταξύ τους μεγαλύτερη από 0,1g, φυγοκεντρήθηκαν στα 2000rpm (κεφαλή F-16/250) για 20min στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση και με τη βοήθεια ενός σιφωνίου πληρώσεως, ελήφθησαν συνολικά 10-20mL από το υποκείμενο υγρό των φιαλών φυγοκέντρησης και μεταφέρθηκαν σε αποξηραμένη και προζυγισμένη με ακρίβεια φιάλη του περιστροφικού συμπυκνωτή και ακολούθησε απομάκρυνση του χλωροφορμίου.

Μετά την συμπύκνωση η φιάλη με το λίπος τοποθετήθηκε σε φούρνο θερμοκρασίας 102 ± 2°C για 30min. Μετά τον φούρνο τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για να κρυώσει (περίπου 15min) οπότε και ξαναζυγίστηκε.

Η διαφορά βάρους της πρώτης από τη δεύτερη ζύγιση της φιάλης οφείλεται στο περιεχόμενο σε αυτήν λίπος. Ο προσδιορισμός του ολικού λίπους έγινε ως εξής:

$$\%\ \text{Ολικό λίπος} = \frac{\text{βάρος εκχυλιζομένου λίπους}}{\text{βάρος δείγματος}} \cdot \alpha \cdot 100$$

Όπου α είναι ο λόγος της ολικής χρησιμοποιηθείσας ποσότητας χλωροφορμίου προς την ποσότητα του χλωροφορμίου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ολικού λίπους.

4.3.4 Προσδιορισμός Ολικής Πρωτεΐνης

Το ολικό περιεχόμενο πρωτεΐνης (ακατέργαστη πρωτεΐνη N×6,25) των δειγμάτων καθορίσθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kjeldahl, σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο AOAC (1990).

Περίπου 1g σάρκας δείγματος ζυγίστηκε με ακρίβεια σε αναλυτικό ζυγό μέσα σε άτεφρο ηθμό, το δείγμα τυλίχθηκε προσεκτικά με τον ηθμό και τοποθετήθηκε σε φιάλη Kjeldahl. Στη φιάλη προστέθηκαν δύο ταμπλέτες Kjeltabs (3,5g K_2S0_4 & 0,4g $CuSO_4$ $5H_2O$) και 25 mL πυκνό θειικό οξύ - H_2SO_4 96% w/w.

Η φιάλη στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 400-800°C σε ειδικό μπλοκ θέρμανσης μέχρι που το περιεχόμενο της έγινε πράσινο και διαυγές λόγω $CuSO_4$ για περίπου 2h. Μετά την καύση στης οργανικής ύλης που έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του περιεχόμενου αζώτου σε αμμωνιακό άλας (NH_4HSO_4) ακολούθησε απόσταξη σε έντονο αλκαλικό περιβάλλον (προσθήκη NaOH 50%) ενώ η απελευθερωμένη αμμωνία δεσμεύτηκε από 40mL διαλύματος βορικού οξέος 4%. Το βορικό οξύ που είχε προστεθεί σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε στο άκρο της συσκευής απόσταξης, το οποίο παρέμεινε εμβαπτισμένο μέσα στο οξύ, ώστε να μην επιτραπεί διαφυγή της $NH_3\uparrow$ στο περιβάλλον αλλά να δεσμευτεί αμέσως από το βορικό οξύ.

Η δέσμευση της NH_4OH διαπιστώθηκε με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη που είχε προηγούμενα προστεθεί στην κωνική φιάλη μαζί με το βορικό οξύ.

Η απόσταξη ολοκληρώθηκε με τη συγκέντρωση 150mL αποστάγματος και ακολούθησε ογκομέτρηση του αποστάγματος με 0,100N υδροχλωρικού οξέος - HCl.

Η συγκέντρωση του ολικού αζώτου υπολογίσθηκε από τη σχέση:

$$\% \text{ Ολικό Άζωτο} = \frac{0,14(S-B)}{W} \cdot 100\%$$

S = mL HCl 0,100N που καταναλώθηκαν για την ογκομέτρηση του δείγματος
B = mL HCl 0,100N που καταναλώθηκαν για το λευκό προσδιορισμό
W = Βάρος δείγματος σε g.

Το άζωτο από τον παραπάνω τύπο πολλαπλασιαζόμενο με τον εμπειρικό συντελεστή Kjeldahl 6,25 δίνει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

4.3.5 Υπολογισμός Τέφρας

Ο υπολογισμός της τέφρας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο AOAC (1990).
Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκε το βάρος της κάψας και στη συνέχεια προστέθηκαν 5g δείγματος. Τα δείγματα θερμάνθηκαν σε ηλεκτρικό μάτι για περίπου 2h και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο αποτέφρωσης μέχρι σταθερού βάρους για 24h στους 550°C. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα για ψύξη και ακολούθησε η ακριβής ζύγιση του. Το αποτελέσματα υπολογίσθηκαν από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ περιεχόμενη τέφρα} = \frac{B1 - B2}{SampleWeight} x100$$

B_1: βάρος κάψας μετά την αποτέφρωση

B_2: βάρος κάψας

4.3.6 Ανίχνευση πρωτεολυτικών ενζύμων

Η πρωτεολυτική δράση μετρήθηκε στο απορριπτόμενο υγρό το οποίο συλλέχθηκε μετά τον 1ο, 2ο και 3ο κύκλο πλυσίματος. Το μίγμα αντίδρασης περιείχε 2,5mL 0,5% καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Na_2HPO_4 0,1M με pH 7,00 και 0,3mL της ακατέργαστης πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάσθηκε σε υδατόλουτρο στους 40°C για 30 min. 2,8 mL 5% (w/v) τριχλωροξικού οξέος (TCA) προστέθηκαν για να σταματήσει η αντίδραση και να κατακρημνισθούν οι πρωτεΐνες. Το μίγμα έμεινε για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα απομακρύνθηκε με διήθηση μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman No 1. Η απορρόφηση του διηθήματος μετρήθηκε στα 280nm σε κυψελίδα πυριτίου 1cm. Ο λευκός προσδιορισμός ετοιμάστηκε προσθέτοντας το διάλυμα ενζύμων, μετά την πρόσθεση του TCA (Zotos & Taylor, 1996). Ως μονάδα ενζυμικής δραστικότητας ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την απελευθέρωση ενός μmol L-τυροσίνης ανά mL και ανά min, στις παραπάνω συνθήκες (Alam *et al.,* 2005).

$$IU = \frac{Absorbance x 181000}{0,3x30}$$

4.3.7 Μέτρηση χρώματος

Ο μη-πλυμένος και ο πλυμένος κιμάς σαρδέλας τοποθετήθηκαν σε διαφανή τριβλία πετρί ενώ μια διάφανη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση των πηκτών σουρίμι που παρήχθησαν μέσω θέρμανσης. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε πέντε φορές για κάθε δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου. L*(άσπρο /μαύρο) (λαμπρότητα),

α*(κόκκινο /πράσινο) και b* (κίτρινο/μπλε) τιμές μετρήθηκαν και ο δείκτης λευκότητας υπολογίσθηκε χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$WI = 100-[(100-L^*)^2+\alpha^{*2}+b^{*2}]^{1/2}$ (Lanier, 1992)

4.3.8 Μέτρηση υφής

Η ανάλυση της υφής έγινε με το Instron Universal Testing Machine, μοντέλο 1140 (Instron LTD UK) με επίπεδο άκρο διαμέτρου 6 cm προσκολλημένο σε κεφαλή 50kg. Ο ρυθμός παραμόρφωσης ρυθμίστηκε στα 80 mm min^{-1} και τα ποσοστά συμπίεσης σε 75% (double byte analysis). Από την καμπύλη συμπίεσης (compression curve) καθορίσθηκαν τρεις παράμετροι της υφής: η σκληρότητα, η συνεκτικότητα και η ελαστικότητα.

4.3.9 Στατιστική ανάλυση

Εφαρμόσθηκε ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one way ANOVA) στις μεταβλητές για να διαπιστωθούν ενδεχόμενες σημαντικές επιδράσεις ανάμεσα στις μεταχειρίσεις. Οι μεταβολές στο χρώμα και στις ιδιότητες της υφής των πηκτών kamaboko, μελετήθηκαν μέσω 3 πειραματικών παραγόντων (3-way ANOVA, μοντέλο I): α) συνθήκες πλυσίματος (3 επίπεδα) β) προσθήκη ή μη MTG-άσης (2 επίπεδα) γ) πρόσθεση διαφόρων αλάτων (3 επίπεδα). Η διαπίστωση σημαντικών επιδράσεων ($p<0,05$) μεταξύ των επιπέδων των εξεταζόμενων παραγόντων οδήγησε σε εφαρμογή ελέγχου πολλαπλού εύρους σύγκρισης των μέσων όρων Student-Newman-Keuls (SNK) με τη χρήση του λογισμικού MultiComp. Ο έλεγχος της κανονικής κατανομής έγινε μέσω του Saphiro-Wilk ελέγχου και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων με τον έλεγχο Levene.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το Statistica Software Package Version 6.0.

4.3.10 Διαφορική θερμιδομετρική ανάλυση (DSC)

Οι επιπτώσεις της υγρασίας, του χλωριούχου νατρίου, των πρωτεϊνών των δειγμάτων καθώς και η παρουσία $CaCl_2$, $MgCl_2$, NH_4Cl και MTGασης μελετήθηκαν μέσω της διαφορικής θερμιδομετρικής ανάλυσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Η ρύθμιση της θερμοκρασίας έγινε χρησιμοποιώντας ως πρότυπο ίνδιο (T_o=156,6^{o}C και ΔH=28,45J/g). Τα δείγματα κλείστηκαν ερμητικά σε δοχεία αλουμινίου και θερμάνθηκαν σε θερμοκρασιακό εύρος 20-110°C με ρυθμό αύξησης 10°Cmin^{-1}. Ένας κενός περιέκτης αλουμινίου χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς.

4.3.11 Μικροβιολογικός έλεγχος

Για την μέθοδο εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου κατά την παρασκευή προϊόντος kamaboko από σαρδέλα (*Sardina Pilchardus*) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ενσωμάτωσης ή πρότυπη μέθοδος αρίθμησης της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε τρυβλία (Pour Plate, Standard Plate Count). Το αποτέλεσμα της εκτίμησης του μικροβιακού πληθυσμού εκφράσθηκε σε μονάδες σχηματιζόμενων αποικιών (Colony Form Unit, CFU/g).

Το μικροβιακό φορτίο μετρήθηκε κατά τα στάδια παρασκευής του προϊόντος ως εξής: σάρκα των μη επεξεργασμένων δειγμάτων, κιμαδοποιημένα δείγματα, κιμάς μετά το πλύσιμο σε pH 5,50, κιμάς μετά το πλύσιμο σε pH 7,00, κιμάς μετά το πλύσιμο με 0,3% NaCl και τελικό προϊόν μετά την θέρμανση στους 90°C για 30 min.

Η διαδικασία παρασκευής πραγματοποιήθηκε σε κανονικές συνθήκες (τρόπος εφαρμοζόμενος και σε βιομηχανική κλίμακα, χειρονακτικά) και μετά την απολύμανση με αιθυλική αλκοόλη των σκευών (περιέκτες, κιμαδομηχανή) και εργαλείων (μαχαίρια, επιφάνεια κοπής) και επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν γάντια μιας χρήσης.

4.3.11.1 Αρίθμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας

Για την παρασκευή της μητρικής αραίωσης (αρχικής) 1/10 έγινε ομογενοποίηση του δείγματος σε φυσιολογικό πεπτονούχο νερό ως αραιωτικό, σε χρονικό διάστημα 3min, στην συνέχεια παρασκευάσθηκαν οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις με την μεταφορά 1mL σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9mL πεπτονούχου νερού.

Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας μετά τη μεταφορά δείγματος από την προηγούμενη αραίωση, ανακινήθηκε σε αναδευτήρα δοκιμαστικών σωλήνων για 15s. Για κάθε αραίωση χρησιμοποιήθηκε νέο ρύγχος στην αυτόματη πιπέτα του 1mL και όλες οι αραιώσεις έγιναν σε διάστημα 15min από την στιγμή ομογενοποίησης του δείγματος. Ο ενοφθαλμισμός των τρυβλίων έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης ή πρότυπη μέθοδο αρίθμησης τρυβλίων. Από κάθε δεκαδική αραίωση του δείγματος μεταφέρθηκε 1mL και τοποθετήθηκε στο κέντρο του πυθμένα του αποστειρωμένου τρυβλίου πετρί (διαμέτρου 88mm και βάθους 12mm). Από κάθε αραίωση ενοφθαλμίστηκαν δύο τρυβλία. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν περίπου 15mL υποστρώματος (Plate Count Agar) θερμοκρασίας 45-46°C. Η ανάμειξη του ενοφθαλμίσματος έγινε με ήπιες κυκλικές κινήσεις. Η όλη εργασία από την στιγμή παρασκευής των αραιώσεων μέχρι το τέλος του ενοφθαλμισμού ολοκληρώθηκε σε 20 min. Μετά την πήξη

του υποστρώματος τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ανεστραμμένα και επωάσθηκαν στους 35°C για 48±2h. Όλη η διαδικασία έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες.

5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

5.1 Έλεγχος πρώτης ύλης

5.1.1 Χαρακτηριστικά δειγμάτων σαρδέλας

Η επίδραση της περιόδου αλίευσης στο μέγεθος και το βάρος των δειγμάτων σαρδέλας όπως επίσης στο pH του παρασκευαζόμενου κιμά και στην απόδοση λόγω φιλετοποίησης δίνονται στον πίνακα 1. Όπως προέκυψε από την ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) ($p<0,05$) το μέγεθος και το βάρος των δειγμάτων επηρεάστηκαν σημαντικά από την περίοδο αλίευσης (Πίνακας 1). Από τη σύγκριση των μέσων όρων μέσω του ελέγχου SNK διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα σαρδέλας που αποκτήθηκαν την 8^{η} Νοεμβρίου ήταν μεγαλύτερα τόσο σε μέγεθος όσο και σε βάρος από τα αντίστοιχα δείγματα σαρδέλας που αποκτήθηκαν την 3^{η} και 10^{η} Νοεμβρίου. Η παραπάνω διακύμανση στο μέγεθος και βάρος των δειγμάτων επηρέασε την απόδοση τους κατά τη φιλετοποίηση, η οποία ήταν υψηλότερη στα μεγαλύτερα και βαρύτερα δείγματα. Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν από τους Ramírez-Suárez *et al*., (2000) σε δείγματα σαρδέλας (*Sardinops sagax caerulea*). Οι παραπάνω ερευνητές διαπίστωσαν ότι η απόδοση των δειγμάτων τους ήταν ανάλογη του μεγέθους και βάρους της πρώτης ύλης.

Η διακύμανση του pH σε σχέση με την περίοδο απόκτησης των δειγμάτων φαίνεται επίσης στον πίνακα 1. Οι μεταβολές της τιμής του pH εξαρτώνται από πληθώρα παραγόντων όπως το διαφορετικό είδος, την περιοχή αλιείας, τη θερμοκρασία αποθήκευσης καθώς και

τη ρυθμιστική ικανότητα της σάρκας (Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). Οι Sikorski *et al*., (1990) ανακοίνωσαν ότι η μεταβολή του pH εξαρτάται επίσης και από την απελευθέρωση ανόργανου φωσφόρου και αμμωνίας λόγω της ενζυματικής αποικοδόμησης του ATP.

Η μέση τιμή του pH των δειγμάτων σαρδέλας που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία ήταν 6,55 ± 0,18, ενώ η μέση απόδοση λόγω φιλετοποίησης 40,63 ± 1,32% η οποία ήταν παρόμοια με την απόδοση 40,0 ± 1,1% που ανακοινώθηκε από τους Ramírez-Suárez *et al*., (2000) σε δείγματα σαρδέλας (*Sardinops sagax caerulea*).

Πίνακας 1: Επίδραση της περιόδου αλίευσης στο μέγεθος, βάρος, pH και στην απόδοση φιλετοποίησης των δειγμάτων σαρδέλας.

Περίοδος αλίευσης	Μέγεθος[1]	Βάρος[1]	pH	Απόδοση (%)
3η Νοεμβρίου	12,69 ± 1,35[b]	18,30 ± 5,48[a]	6,75	39,26
8η Νοεμβρίου	14,36 ± 1,03[a]	28,61 ± 6,03[b]	6,51	41,90
10η Νοεμβρίου	13,55 ± 0,80[a,b]	21,47 ± 3,33[a]	6,39	40,74

[1] Οι τιμές είναι μέσοι όροι 10 επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι τιμές της ίδιας στήλης με ίδιο εκθέτη δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \geq 0,05$)

5.1.2 Σύσταση πρώτης ύλης

Η χημική σύσταση των μη πλυμένων κιμαδοποιημένων δειγμάτων σαρδέλας σε σχέση με την περίοδο αλίευσης δίνεται στον πίνακα 2. Έχει ανακοινωθεί ότι τα μικρά πελαγικά είδη, όπως οι σαρδέλες, υπόκεινται σε σημαντικές εποχιακές διακυμάνσεις στη χημική τους σύσταση, με το λίπος να είναι το συστατικό που υφίσταται τις

σημαντικότερες μεταβολές εμφανίζοντας τη χαμηλότερη τιμή (10g kg^{-1}) κατά τη διάρκεια του Φεβρουαρίου ενώ την υψηλότερη (220g kg^{-1}) κατά τη διάρκεια του Σεπτεμβρίου (Hultin & Kelleher 2000; Ramírez-Suárez *et al*., 2000; Esquível *et al*., 1997). Στη συγκεκριμένη εργασία η συγκέντρωση της υγρασίας, του λίπους και της τέφρας επηρεάστηκαν σημαντικά από την περίοδο αλίευσης σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA), ($p<0,05$). Επειδή όλα τα δείγματα σαρδέλας στην εργασία αποκτήθηκαν το Νοέμβριο η διακύμανση που παρατηρήθηκε μπορεί να αποδοθεί σε παράγοντες όπως η διατροφή, η περιοχή αλίευσης, το μέγεθος των δειγμάτων, το φύλο των δειγμάτων καθώς επίσης και σε περιβαλλοντολογικούς παράγοντες (Pacheco-Aguilar *et al*., 2000). Ωστόσο, η παρατηρούμενη διακύμανση στη μυϊκή σύσταση των δειγμάτων σαρδέλας είναι πιθανό να προκαλέσει δυσκολίες στην τυποποίηση της διαδικασίας πλυσίματος για την παρασκευή σουρίμι.

Πίνακας 2: Επίδραση της περιόδου αλίευσης στη χημική σύσταση του μη πλυμένου κιμά σαρδέλας

Περίοδος αλίευσης	% Υγρασία	Επί ξηρού		
		% Πρωτεΐνη	% Λίπος	% Τέφρα
$3^{η}$ Νοεμβρίου	$74,48 \pm 0,73^{a}$	$78,59 \pm 2,60^{a}$	$19,52 \pm 0,83^{a}$	$6,39 \pm 0,07^{a}$
$8^{η}$ Νοεμβρίου	$72,95 \pm 0,47^{b}$	$79,93 \pm 0,01^{a}$	$19,34 \pm 0,78^{a}$	$5,74 \pm 0,09^{b}$
$10^{η}$ Νοεμβρίου	$73,39 \pm 0,13^{b}$	$76,45 \pm 3,42^{a}$	$23,00 \pm 0,48^{b}$	$5,84 \pm 0,06^{b}$

Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι τιμές στην ίδια στήλη με ίδιο εκθέτη δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p\geq0,05$)

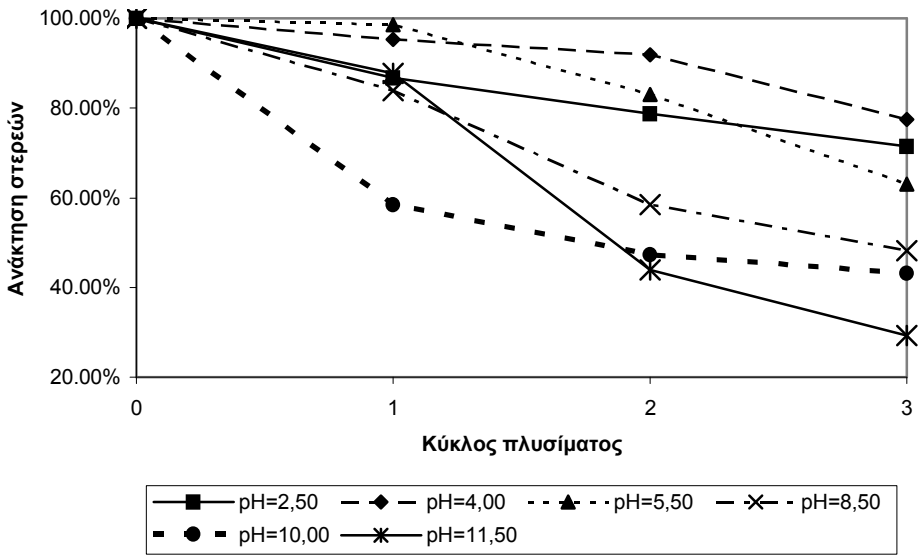
5.1.3 Απόδοση επεξεργασίας

Η επίδραση των μεταχειρίσεων πλυσίματος στην % ανάκτηση των ολικών στερεών και πρωτεϊνών δίνονται στα σχήματα 1 & 2. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι επεξεργασίας στις όξινες περιοχές (pH 2,5, 4,0 & 5,5) των δειγμάτων κιμά σαρδέλας οδήγησαν σε προϊόντα με υψηλότερη ανάκτηση τόσο ολικών στερεών όσο και πρωτεϊνών, ενώ αντίθετα οι επεξεργασίες στις αλκαλικές περιοχές (pH 8,5, 10,0 & 11,5) οδήγησαν σε υψηλότερες απώλειες ($p<0.05$). Αυτό πιθανά οφείλεται στην αυξημένη ικανότητα διάλυσης των πρωτεϊνικών μορίων σε αλκαλικά διαλύματα λόγω διαχωρισμού τους και μη ικανότητας συσσωμάτωσης τους οδηγώντας σε απομάκρυνσή τους (Zayas, 1997). Επιπλέον, οι σκούροι μύες των αλιευμάτων διαθέτουν υψηλότερη ποσότητα πρωτεϊνικών μορίων διαλυτών σε αλκαλικά διαλύματα από τους αντίστοιχους λευκούς μύες (Chaijan *et al*., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα ανακοινώθηκαν από τους Chen *et al.*, (1997) κατά την επεξεργασία πλυσίματος κιμά προερχόμενο από σκουμπρί (*Trachurus japonicus*). Στην εργασία τους διαπίστωσαν ότι η ολική ανάκτηση πρωτεϊνών του κιμά που πλύθηκε σε αλκαλικά διαλύματα ήταν χαμηλότερη από τον αντίστοιχο που πλύθηκε σε κρύο νερό ή σε νερό στο οποίο προστέθηκε όζον, για το ίδιο χρόνο πλυσίματος. Ο έλεγχος διακύμανσης SNK των μέσων όρων για την ανάκτηση των πρωτεϊνικών μορίων στη συγκεκριμένη εργασία οδήγησε στην ακόλουθη φθίνουσα σειρά: $pH_{4,0}=pH_{2,5}>pH_{5,5}>pH_{8,5}>pH_{10,0}>pH_{11,5}$. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για την ανάκτηση των ολικών στερεών $pH_{4,0}>pH_{2,5}>pH_{5,5}>pH_{8,5}>pH_{10,0}>pH_{11,5}$.

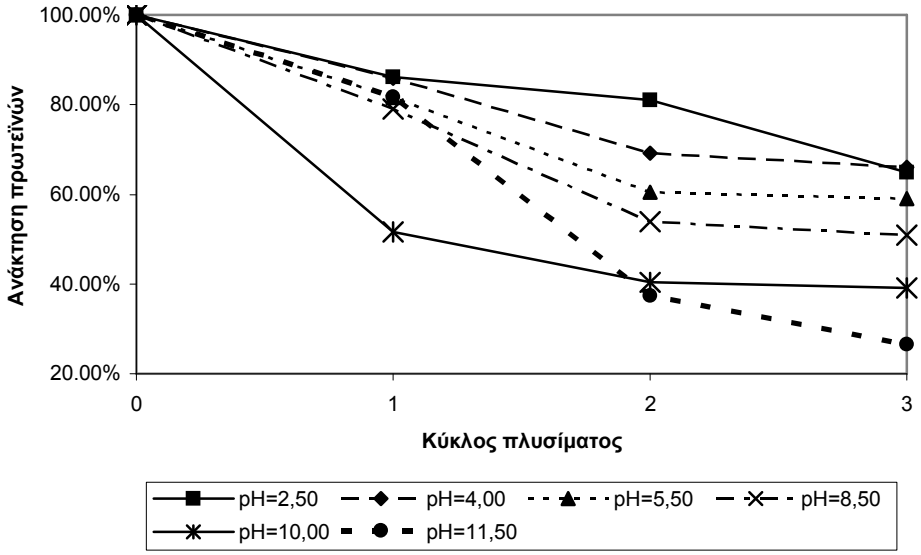
Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι το πλύσιμο του κιμά σαρδέλας σε αλκαλικές συνθήκες ήταν περισσότερο αποτελεσματικό για την

απομάκρυνση των λιπαρών υλών από τα μη πλυμένα δείγματα ($p<0.05$) (Σχήμα 3). Οι Chen *et al.*, (1997) ανακοίνωσαν ανάλογα αποτελέσματα για την απομάκρυνση λίπους σε αλκαλικά διαλύματα σε σχέση με κρύο νερό και νερό όπου προστέθηκε όζον. Στην συγκεκριμένη εργασία η απομάκρυνση του λίπους προσέγγισε στο 73.29% στα δείγματα κιμά σαρδέλας που πλύθηκαν σε pH 11,5, ενώ η χαμηλότερη απομάκρυνση παρατηρήθηκε στα δείγματα κιμά σαρδέλας που πλύθηκαν σε pHs 2,5 και 4,0 με μέσες τιμές απομάκρυνσης 33.84% και 37.28%, αντίστοιχα. Όμως, το πλύσιμο του κιμά σαρδέλας κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των δομικών πρωτεϊνών (pH 5,5) οδήγησε σε περισσότερο αποτελεσματική απομάκρυνση λίπους (58.9%) από το πλύσιμο στις άλλες όξινες επεξεργασίες ($p<0.05$). Η ρύθμιση του pH κοντά στο pI οδήγησε σε κατακρήμνιση των πρωτεϊκών μορίων με αποτέλεσμα οι λιπαρές ύλες να απελευθερωθούν στην επιφάνεια ως αποτέλεσμα διαφοράς στην πυκνότητα (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2001). Ο έλεγχος διακύμανσης SNK των μέσων όρων για την απομάκρυνση των λιπαρών υλών έδωσε την ακόλουθη φθίνουσα σειρά: $pH_{11,5}>pH_{8,5}=pH_{5,5}=pH_{10,0}>pH_{4,0}=pH_{2,5}$.

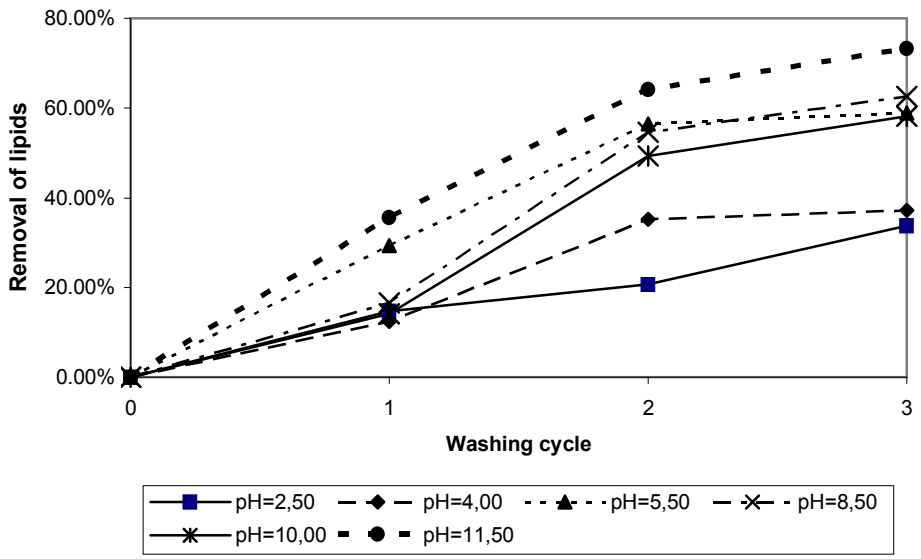
Οι μεταχειρίσεις πλυσίματος οδήγησαν επίσης σε διαφορές στην απομάκρυνση της τέφρας ($p<0.05$) όπως φαίνεται στο σχήμα 4. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι είναι πιθανό η προσθήκη των φωσφορικών, για τη ρύθμιση των χαμηλών pH, να οδήγησε σε αύξηση της περιεχόμενης τέφρας στα εξεταζόμενα δείγματα.



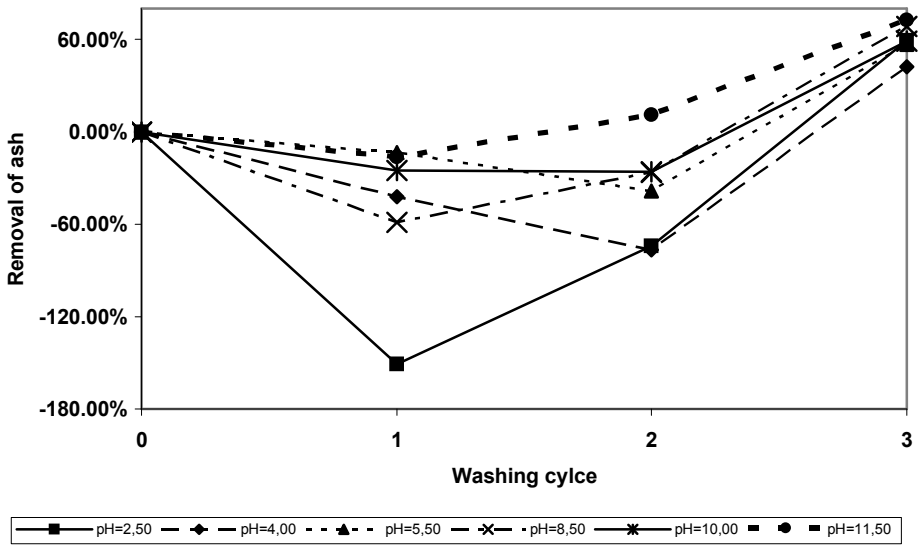
Σχήμα 1: Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών πλυσίματος στην ανάκτηση των ολικών στερεών του κιμά σαρδέλας.



Σχήμα 2: Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών πλυσίματος στην ανάκτηση πρωτεϊνών από κιμά σαρδέλας.



Σχήμα 3: Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών πλυσίματος στην απομάκρυνση λιπαρών υλών από κιμά σαρδέλας.



Σχήμα 4: Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών πλυσίματος στην απομάκρυνση τέφρας από κιμά σαρδέλας.

Τα προϊόντα των παραπάνω επεξεργασιών μελετήθηκαν επιπλέον ως προς τα ρεολογικά τους χαρακτηριστικά, το χρώμα και την

απομάκρυνση των ενζύμων και με την εφαρμογή της ανάλυσης ολικής βαθμολογίας έγινε η επιλογή των καταλληλότερων επεξεργασιών, οι οποίες μελετήθηκαν περαιτέρω.

Ανάλυση Ολικής Βαθμολογίας (Sum Score Analysis)

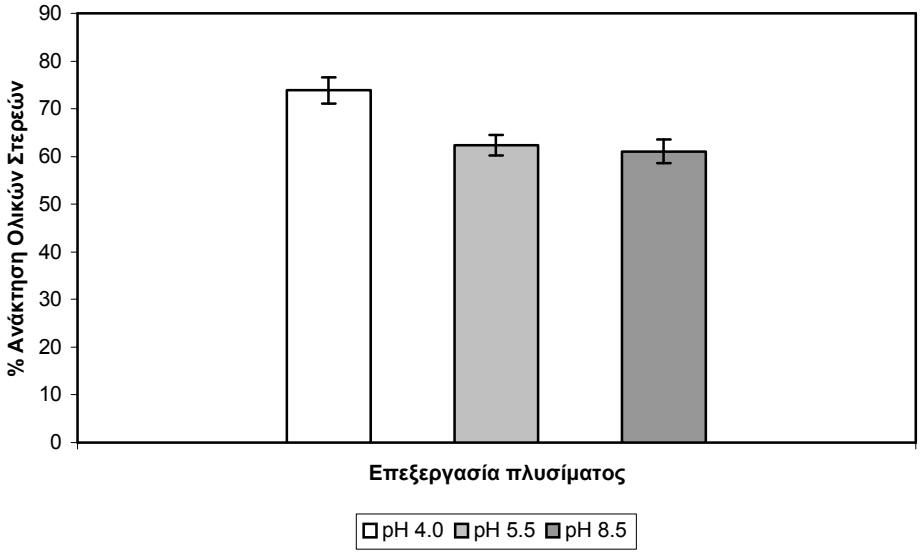
Η ανάλυση ολικής βαθμολογίας δίνεται στον πίνακα 1. Όλοι οι παράμετροι θεωρήθηκαν ως ισότιμοι ως προς τη συμβολή τους στις ιδιότητες υψηλής ποιότητας πρωτεϊνικών πηκτών από κιμά σαρδέλας. Όπως προκύπτει από τον πίνακα 1 οι καταλληλότερες μεταχειρίσεις για παραγωγή πηκτών kamaboko από κιμά σαρδέλας είναι αυτές με τις υψηλότερες τιμές. Επομένως, τα δείγματα κιμά σαρδέλας που πλύθηκαν αρχικά σε pH 5,5 ακολουθούμενα από αυτά που πλύθηκαν σε pH 8,5 και 4,0 φαίνεται να οδηγούν σε πηκτές kamaboko με τις καλύτερες ιδιότητες. Ως εκ τούτου οι τρεις αυτές μεταχειρίσεις επιλέχθηκαν για επιπλέον μελέτη.

Πίνακας 3: Ολική βαθμολογία (Sum Scores)

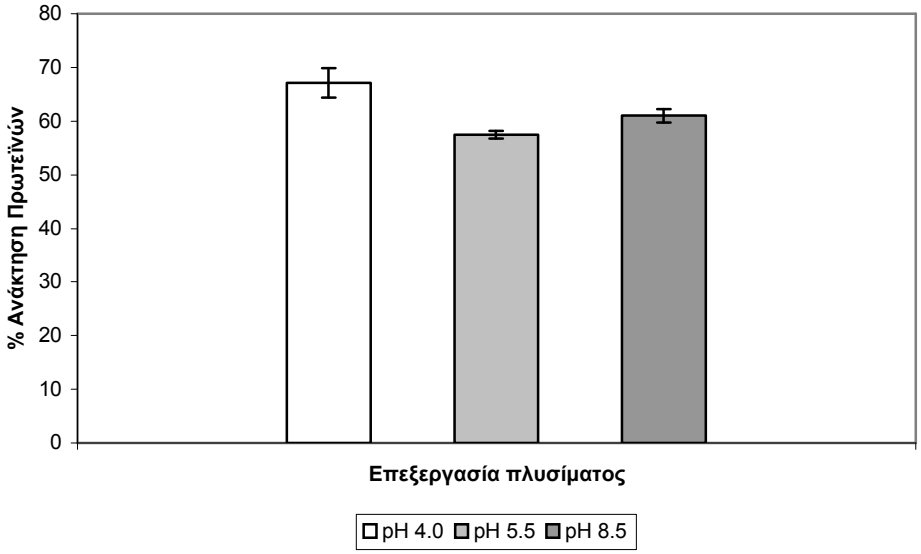
	Επεξεργασίες					
Παράμετροι	$A_{2,5}$	$B_{4,0}$	$C_{5,5}$	$D_{8,5}$	$E_{10,0}$	$F_{11,5}$
Σκληρότητα	0.015	-0.524	-0.632	-0.702	-0.900	-0.925
Συνεκτικότητα	-0.023	-0.442	-0.086	-0.417	-0.320	-0.477
Ελαστικότητα	0.614	0.972	0.632	0.457	0.122	-0.759
Λευκότητα	-0.749	0.275	0.721	0.348	0.106	0.182
Ανάκτηση στερεών	0.665	0.896	0.340	-0.235	-0.428	-0.969
Ανάκτηση πρωτεϊνών	0.853	0.903	0.579	0.201	-0.355	-0.942
Απομάκρυνση λίπους	-0.920	-0.758	0.258	0.437	0.228	0.938
Απομάκρυνση τέφρας	0.123	-0.912	-0.044	0.670	0.092	0.955
Απομάκρυνση ενζύμων	-0.654	0.372	0.154	0.633	-0.514	-0.777
Ολική βαθμολογία	**-0.076**	**0.782**	**1.922**	**1.392**	**-1.969**	**-2.774**

5.1.3.1 Ανάκτηση ολικών στερεών και πρωτεϊνών (pH 4,0, 5,5 & 8,5)

Η επίδραση του πλυσίματος των δειγμάτων σε όξινες και αλκαλικές συνθήκες στην ανάκτηση των ολικών στερεών φαίνονται στο σχήμα 5. Παρατηρήθηκε ότι τα ολικά στερεά μειώθηκαν κατά τη διάρκεια του πλυσίματος, δείχνοντας μείωση στην ανάκτηση των πρωτεϊνών και αύξηση στην απομάκρυνση των λιπαρών υλών και της τέφρας. Το πλύσιμο σε pH 4,0, 5,5, και 8,5, οδήγησε στις ακόλουθες μέσες τιμές ανάκτησης σάρκας σαρδέλας: 73,87%, 62,39%, και 61,05%, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και στις μεταχειρίσεις που προηγήθηκαν (πλύσιμο σε pH 2,5, 4,0, 5,5, 8,5, 10,0 & 11,5) που αφορούσαν τα ίδια είδη και τις ίδιες συνθήκες πλυσίματος με εξαίρεση τη μεταχείριση στην αλκαλική περιοχή (pH 8,5) όπου στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκε υψηλότερη ανάκτηση στερεών. Η σύγκριση των μέσων όρων ανάκτησης ολικών στερεών μέσω του ελέγχου SNK οδήγησε στις ακόλουθες μέσες τιμές με φθίνουσα σειρά: 73,87%>62,39%=61,05% για pH 4,0, 5,5 και 8,5 αντίστοιχα. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα ανάκτησης πρωτεϊνών: 67,09%>57,49%=61,00% για pH 4,0, 5,5 και 8,5 αντίστοιχα (Σχήμα 6). Οι Kristinsson *et al*., (2005) ανακοίνωσαν ανάκτηση πρωτεϊνών της τάξης του 71,5% και 70,3% σε δείγματα που πλύθηκαν σε όξινη και αλκαλική περιοχή αντίστοιχα. Ωστόσο, στην εργασία τους συμπεριέλαβαν τη δύναμη της φυγοκέντρησης κατά το πλύσιμο και όχι ανάδευση που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη εργασία. Η παρατηρούμενη μειωμένη ανάκτηση πρωτεϊνών κατά το πλύσιμο της σάρκας αλιευμάτων αποδόθηκε στην απομάκρυνση των σαρκοπλασματικών καθώς επίσης στην απομάκρυνση μέρους των δομικών πρωτεϊνών (Kristinsson *et al*., 2005).



Σχήμα 5: Επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στην ανάκτηση των ολικών στερεών (οι κάθετες γραμμές δείχνουν την τυπική απόκλιση).

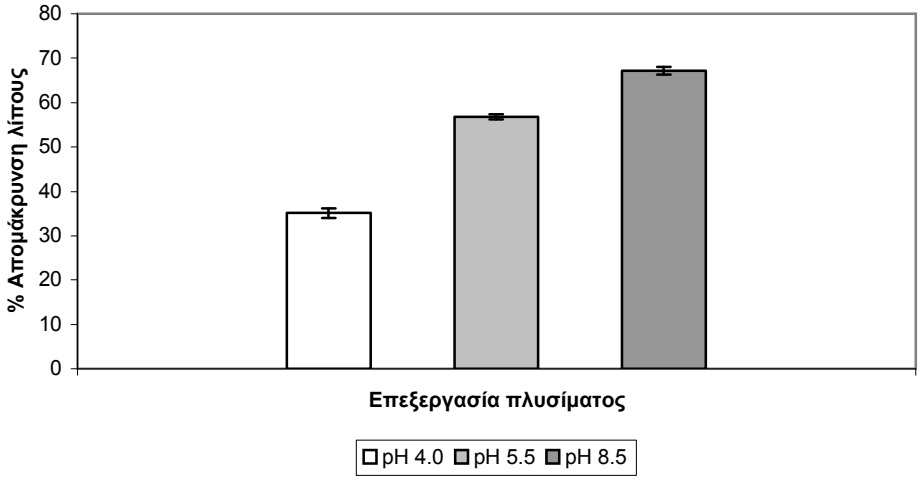


Σχήμα 6: Επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στην ανάκτηση πρωτεϊνών (οι κάθετες γραμμές δείχνουν την τυπική απόκλιση).

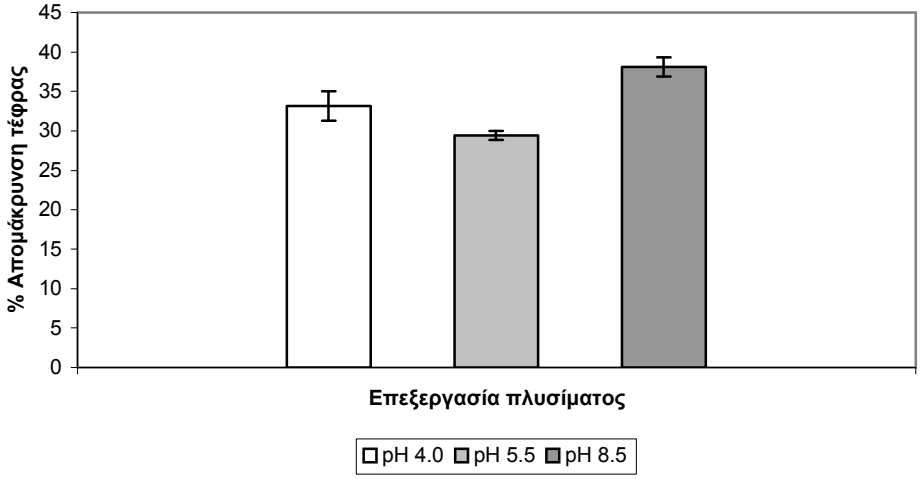
5.1.3.2 Απομάκρυνση λίπους και τέφρας

Η επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στην απομάκρυνση του λίπους φαίνεται στο σχήμα 7. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αμφότερες οι μεταχειρίσεις (πλύσιμο σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον) ήταν αποτελεσματικές στην επιθυμητή απομάκρυνση του λίπους από τον κιμά των δειγμάτων σαρδέλας. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η απομάκρυνση του λίπους είναι άμεσα εξαρτώμενη από την εφαρμοζόμενη διαδικασία πλυσίματος ($p<0,05$). Έτσι, η υψηλότερη απομάκρυνση λιπαρών υλών παρατηρήθηκε στον πλυμένο σε αλκαλικές συνθήκες κιμά σαρδέλας, ακολουθούμενη από τον κιμά που πλύθηκε σε pH 5,5 και στη συνέχεια σε αυτόν που πλύθηκε σε pH 4,0. Οι μέσες τιμές απομάκρυνσης λίπους στις διαφορετικές συνθήκες πλυσίματος ήταν 67,12%, 56,76%, και 35,14% σε pH 8,5, 5,5 και 4,0 αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και στις μεταχειρίσεις που προηγήθηκαν με μέσες τιμές απομάκρυνσης λίπους 62,65%, 58,84% και 37,28% σε pH 8,5, 5,5 και 4,0 αντίστοιχα. Αφού οι λιπαρές ύλες διαχωρίζονται από τις μυϊκές πρωτεΐνες ευκολότερα όταν το pH της σάρκας ρυθμίζεται σε τιμή απόμακρη του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών (*pI* περίπου 5,5), μπορεί να υποτεθεί ότι η απομάκρυνση του λίπους μπορεί να σχετίζεται με την διαλυτότητα των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία του πλυσίματος. Όμως, στη συγκεκριμένη εργασία το πλύσιμο σε pH 5,5 οδήγησε σε περισσότερη και αποτελεσματικότερη απομάκρυνση λίπους από το πλύσιμο σε pH 4,0. Στη περίπτωση αυτή μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι οι μυϊκές πρωτεΐνες καθιζάνουν κατά το πλύσιμο σε pH 5,5 και ως εκ τούτου οι

λιπαρές ύλες ελευθερώνονται στην επιφάνεια των δειγμάτων λόγω διαφοράς στην πυκνότητα (Karayannakidis *et al*., 2007).



Σχήμα 7: Επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στην απομάκρυνση λίπους (οι κάθετες γραμμές δείχνουν την τυπική απόκλιση).



Σχήμα 8: Επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στην απομάκρυνση τέφρας (οι κάθετες γραμμές δείχνουν την τυπική απόκλιση).

Η απομάκρυνση της τέφρας επηρεάστηκε από τη διαδικασία πλυσίματος όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) ($p<0,05$). Οι μέσες τιμές απομάκρυνσης της τέφρας ήταν 33,16%, 29,45%, και 38,10% σε pH 4,0, 5,5 και 8,5, αντίστοιχα (Σχήμα 8).

5.1.4 Πρωτεολυτική δραστικότητα στο υγρό απόρριψης

Η πρωτεολυτική δραστικότητα διαφοροποιήθηκε σε όλα τα στάδια των εφαρμοζόμενων συνθηκών πλυσίματος όπως διαπιστώθηκε με την ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) ($p<0,05$). Η σύγκριση των μέσων όρων έδειξε μια πτωτική τάση στην πρωτεολυτική δραστικότητα με την εξέλιξη των κύκλων πλυσίματος (Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά που ανακοινώθηκαν από τους Karayannakidis *et al*., (2007) και επιβεβαιώνουν ότι το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεολυτικών ενζύμων απομακρύνεται από τον κιμά σαρδέλας μετά τον πρώτο κύκλο πλυσίματος. Οι Lin *et al*., (1995) ανέκτησαν και προχώρησαν σε ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων που απομακρύνονται με το νερό πλυσίματος κιμά μπακαλιάρου του Ειρηνικού (*Merluccius productus*) με εφαρμογή είτε υπερδιήθησης ή μικροδιήθησης. Στην εργασία τους η ποσοτική ανάλυση, με εφαρμογή ηλεκτροφόρησης πολυακριλαμιδίου (SDS-PAGE), έδειξε ότι μια μεγάλη ποσότητα μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνικών μορίων (29 – 45 kDa) απομακρύνθηκαν στο πρώτο νερό πλυσίματος, ενώ η ποσότητα της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης ήταν αμελητέα. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες είναι τα κύρια συστατικά στο νερό απόρριψης του πρώτου πλυσίματος του κιμά. Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

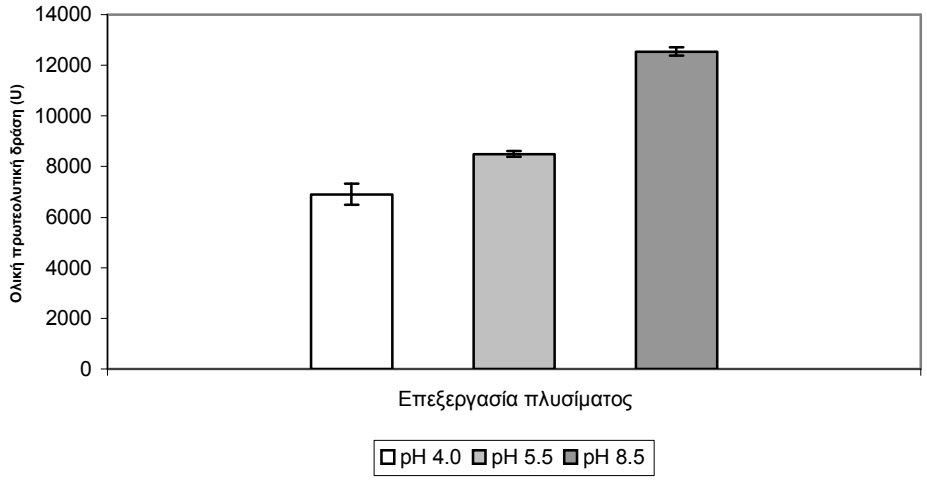
Πίνακας 4: Δραστικότητα πρωτεολυτικών ενζύμων στα διάφορα στάδια πλυσίματος και στα διαφορετικά pH.

Επεξεργασίες	Κύκλοι πλυσίματος	Δραστικότητα πρωτεασών (IU)
$pH_{4.0}$	1	4069,2 ± 133,9[a]
	2	2037,9 ± 281,8[b]
	3	749,1 ± 154,4[c]
$pH_{5.5}$	1	5289,2 ± 331,3[a]
	2	2634,6 ± 165,0[b]
	3	657,0 ± 76,1[c]
$pH_{8.5}$	1	7345,6 ± 162,9[a]
	2	3519,4 ± 292,1[b]
	3	1699,4 ± 174,2[c]

Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι τιμές της ίδιας στήλης/ επεξεργασίας με διαφορετικό εκθέτη δείχνουν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών ($p<0,05$).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) παρατηρήθηκαν επίσης στην ολική πρωτεολυτική δραστικότητα, η οποία έδειξε μέγιστη τιμή (12542,6±156,2 IU) στο απορριπτόμενο νερό πλυσίματος που προήλθε από τον κιμά που πλύθηκε σε pH 8,5, ενώ η χαμηλότερη πρωτεολυτική δραστικότητα (6911,5±404,4 IU) παρατηρήθηκε στο απορριπτόμενο νερό πλυσίματος που προήλθε από τον κιμά που πλύθηκε σε pH 4,0 (Σχήμα 9). Έχει ανακοινωθεί ότι η πρωτεολυτική δραστικότητα στη σάρκα των αλιευμάτων σχετίζεται με ενδογενή ένζυμα, ένζυμα του πεπτικού συστήματος καθώς επίσης και ένζυμα που προέρχονται από βακτήρια ή παράσιτα τα οποία εισβάλουν στη σάρκα (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000). Καθώς η φιλετοποίηση στη

συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε χειρονακτικά, μπορεί να υποτεθεί ότι ο κιμάς των δειγμάτων επιμολύνθηκε από εντερικά ένζυμα σε διαφορετική έκταση, οδηγώντας έτσι σε διαφορετική ολική πρωτεολυτική δραστικότητα.



Σχήμα 9: Ολική πρωτεολυτική δραστικότητα στο απορριπτόμενο νερό πλυσίματος (οι κάθετες γραμμές δείχνουν την τυπική απόκλιση)

Οι DeWitt & Morrissey (2002) ανακοίνωσαν ότι τα απορριπτόμενα υγρά κατά την παραγωγή σουρίμι έχουν βιολογική αξία. Το πλύσιμο αποσκοπεί σε απομάκρυνση λιπαρών υλών, σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών, χρωστικών, αμινών, βιταμινών καθώς επίσης και ενζύμων με σκοπό τη συμπύκνωση των μυϊκών πρωτεϊνών. Μέρος επίσης των μυϊκών πρωτεϊνών είναι πιθανό να εμπεριέχονται στα στερεά συστατικά που αποβάλλονται κατά το πλύσιμο του κιμά (Lin *et al*., 1995). Επιπλέον, η σαρδέλα (*Sardina pilchardus*), ένα είδος με υψηλή συγκέντρωση σε σκουρόχρωμους μύες, έχει υψηλή συγκέντρωση σε λίπος, διαθέτει υψηλά επίπεδα ενδογενών

θερμοανθεκτικών πρωτεολυτικών ενζύμων και περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση σε χρωστικές της αίμης από τα αντίστοιχα λευκόσαρκα αλιεύματα (Shimizu *et al*., 1992). Κατά συνέπεια, τα απορριπτόμενα υγρά κατά την παραγωγή σουρίμι του σκουρόσαρκων αλιευμάτων είναι πιθανό να περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε συστατικά υψηλής βιολογικής αξίας από αυτά που προέρχονται από λευκόσαρκα. Επομένως, αφενός θα ήταν σημαντικά ευεργετική η ανάκτηση και αξιοποίηση των βιολογικών αυτών ουσιών και αφετέρου μια τέτοια αξιοποίηση θα οδηγήσει σε μείωση του κόστους του παραγόμενου σουρίμι.

5.2 Χαρακτηριστικά χρώματος

5.2.1 Χαρακτηριστικά χρώματος της μη πλυμένης σαρδέλας

Ο μη πλυμένος κιμάς σαρδέλας, που απετέλεσε το δείγμα μάρτυρα, είχε μια σκούρα πράσινη/ κίτρινη χροιά σύμφωνα με τις *L**, *a**, και *b** οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 5. Το αρχικό σκούρο χρώμα του κιμά έχει αποδοθεί στην επιμόλυνση της σάρκας των αλιευμάτων με μαύρες χρωστικές μελανίνης, που προέρχονται από το δέρμα και που απελευθερώνονται λόγω του τραυματισμού στα δομικά συστατικά των αλιευμάτων που συμβαίνει κατά τη διαδικασία της φιλετοποίησης (Hutchings, 1999). Οι χρωστικές της αίμης, μυοσφαιρίνη και αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνες για την κόκκινη χροιά της σάρκας των αλιευμάτων. Όμως, η αιμοσφαιρίνη απομακρύνεται σχετικά εύκολα κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης και αποθήκευσης, ενώ η μυοσφαιρίνη κατακρατείται από την ενδοκυτταρική δομή των μυών (Chaijan *et al*., 2004). Επομένως, η μυοσφαιρίνη (Mb) και τα παράγωγά της, μεταμυοσφαιρίνη (metMb) θεωρούνται οι κύριοι παράγοντες που συνεισφέρουν σε πιθανές μεταβολές των τιμών *a**

και *b** του κιμά. Κατά συνέπεια, απώλεια του κόκκινου χρώματος (+*a**) και εμφάνιση πρασινωπής χροιάς (-*a**) καθώς επίσης και κίτρινης χροιάς (+*b**) του μη πλυμένου κιμά σαρδέλας αποδίδεται σε οξείδωση της μυοσφαιρίνης (κοκκινωπή χροιά) σε μεταμυοσφαιρίνη (κιτρινωπή χροιά) καθώς επίσης και στην αντίδραση της μυοσφαιρίνης με τριμεθυλαμινοξείδιο (TMAO) (πρασινωπή χροιά) κατά τη διάρκεια της φιλετοποίησης και της παρασκευής κιμά (Suvanich *et al*., 2000).

5.2.2 Επίδραση του πλυσίματος στα χαρακτηριστικά του χρώματος του κιμά σαρδέλας

Η ευεργετική επίδραση του πλυσίματος στα χαρακτηριστικά του χρώματος του κιμά σαρδέλας φαίνεται στον πίνακα 5. Η λαμπρότητα (L*) και ο δείκτης λευκότητας (WI) αυξήθηκαν σημαντικά ανεξάρτητα από την εφαρμοζόμενη διαδικασία πλυσίματος ($p<0,05$), ενώ μια σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στις τιμές b* ($p<0,05$). Όμως, η ολική βελτίωση του χρώματος επισκιάστηκε από την αύξηση που παρατηρήθηκε στην πρασινωπή χροιά (-a*) ($p<0,05$). Ο κιμάς σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 5,5 έδωσε τις υψηλότερες L* τιμές και WI. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές L* και WI μεταξύ των δειγμάτων κιμά σαρδέλας που πλύθηκαν σε pH 4,0 και 8,5 ($p\geq0,05$).

Πίνακας 5: Τιμές χρώματος *L**, *a**, *b**, και *WI* μη πλυμένου και πλυμένου κιμά σαρδέλας

Επεξεργασία	*L**	*a**	*b**	*WI*
Μάρτυρας	33,0 ± 0,8[a]	-0,9 ± 1,2[a]	4,8 ± 0,8[a]	32,8 ± 0,8[a]
$pH_{4,0}$	36,3 ± 0,6[b]	-4,1 ± 0,2[c]	0,4 ± 0,3[b]	36,2 ± 0,6[b]
$pH_{5,5}$	40,2 ± 1,3[c]	-3,7 ± 0,7[b,c]	0,5 ± 1,5[b]	40,1 ± 1,3[c]
$pH_{8,5}$	37,0 ± 0,8[b]	-3,6 ± 0,4[b]	0,2 ± 0,8[b]	36,9 ± 0,8[b]

Οι τιμές είναι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

5.2.3 Χαρακτηριστικά χρώματος των πηκτών σουρίμι που δέχτηκαν θερμική επεξεργασία

5.2.3.1 Κύριες επιδράσεις

5.2.3.1.1 Επίδραση των συνθηκών πλυσίματος

Η επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στις τιμές L*, a*, και b* καθώς επίσης και στο WI των παραγόμενων πηκτών φαίνεται στον πίνακα 6. Το πλύσιμο σε pH 5,5 οδήγησε σε πηκτές με υψηλότερες τιμές L* και WI σε σύγκριση με τις πηκτές που παρασκευάστηκαν από κιμά σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 4,0 ή 8,5 ($p<0,05$). Επίσης οι τιμές L* και WI ήταν υψηλότερες στα δείγματα που πλύθηκαν σε pH 8,5 από τις αντίστοιχες των δειγμάτων που πλύθηκαν σε pH 4,0. Παρόμοια αποτελέσματα ανακοινώθηκαν ως προς το WI από τους Perez-Mateos & Lanier (2006) σε πηκτές ρέγγας του Ατλαντικού που παρασκευάστηκαν σε όξινο (pH 2,5) και αλκαλικό περιβάλλον (pH 10,0). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι πηκτές που παρασκευάστηκαν μετά από πλύσιμο στην όξινη

περιοχή ήταν περισσότερο πρασινωπές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες που πλύθηκαν σε αλκαλικές συνθήκες ($p<0,05$). Επιπλέον, το πλύσιμο σε pH 5,5 έδωσε πηκτές που σύμφωνα με τη σύγκριση των μέσων όρων μέσω του SNK ελέγχου ήταν περισσότερο κιτρινωπές ($p<0,05$).

Πίνακας 6: Επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στις τιμές *L**, *a**, *b**, και *WI* των πηκτών μετά τη θερμική τους επεξεργασία.

Επεξεργασία	*L**	*a**	*b**	*WI*
$pH_{4,0}$	$60,4 \pm 1,1^{c}$	$-3,4 \pm 0,3^{b}$	$7,0 \pm 0,7^{b}$	$59,7 \pm 1,1^{c}$
$pH_{5,5}$	$65,7 \pm 1,3^{a}$	$-3,5 \pm 0,4^{b}$	$7,3 \pm 0,4^{a}$	$64,7 \pm 1,3^{a}$
$pH_{8,5}$	$64,7 \pm 1,6^{b}$	$-3,2 \pm 0,4^{a}$	$6,9 \pm 0,6^{b}$	$63,9 \pm 1,6^{b}$

Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριάντα (30) επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

5.2.3.1.2 Η επίδραση προσθήκης της MTGασης

Η προσθήκη της MTGασης στο σουρίμι επηρέασε σημαντικά τα χαρακτηριστικά του χρώματος των παραγόμενων πηκτών ($p<0,05$) (Πίνακας 7). Οι πηκτές που περιείχαν MTGαση ήταν λαμπρότερες και περισσότερο κιτρινωπές, ενώ οι πηκτές μετά τη θερμική επεξεργασία χωρίς την προσθήκη MTGασης περισσότερο πρασινωπές ($p<0,05$). Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν από τους Uresti *et al.*, (2003) σε πηκτές από γλώσσα του Μεξικού όταν προστέθηκε MTGαση σε συγκέντρωση 0,1%. Έχει ανακοινωθεί ότι οι πρωτεΐνες σχηματίζουν αδιαφανείς πηκτές, οι οποίες διαχέουν αποτελεσματικά το φως, όταν παρατηρούνται μεταβολές κατά τις

οποίες η πυκνότητα των πολυμερών προσεγγίζει το μακροσκοπικό μέγεθος (Oakenfull *et al*., 1997). Επιπλέον, η TGαση καθώς και η MTGαση καταλύουν αντιδράσεις των μορίων της μυοσίνης (Ramírez *et al*., 2000) οδηγώντας στο σχηματισμό ενδομοριακών ομοιοπολικών δεσμών (Joseph *et al*., 1994). Επομένως, οι παρατηρούμενες διαφορές στην έκταση της λαμπρότητας και του *WI* μεταξύ των μεταχειρίσεων μπορεί να αποδοθούν στην αύξηση της αδιαφάνειας των πηκτών ως αποτέλεσμα της δράσης της MTGασης.

Πίνακας 7: Επίδραση της MTGασης στις τιμές *L**, *a**, *b**, και *WI* των πηκτών μετά τη θερμική τους επεξεργασία.

Επεξεργασία	*L**	*a**	*b**	*WI*
No MTGase	63,3 ± 2,5[b]	-3,4 ± 0,4[b]	6,8 ± 0,7[b]	62,5 ± 2,5[b]
MTGase	63,9 ± 2,8[a]	-3,2 ± 0,3[a]	7,4 ± 0,4[a]	63,0 ± 2,7[a]

Οι τιμές είναι μέσοι όροι σαράντα πέντε (45) επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

5.2.3.1.3 Η επίδραση προσθήκης των διαφορετικών αλάτων

Η επίδραση των προστιθέμενων αλάτων στα χαρακτηριστικά του χρώματος των πηκτών φαίνεται στον πίνακα 8. Οι υψηλότερες τιμές λαμπρότητας και WI παρατηρήθηκαν στις θερμικά επεξεργασμένες πηκτές που περιείχαν $CaCl_2$ ή $MgCl_2$, ενώ η προσθήκη του NH_4Cl οδήγησε στο σχηματισμό σκουρότερων πηκτών ($p<0,05$). Οι Benjakul *et al*., (2004) χαρακτήρισαν το $CaCl_2$ ως ενεργοποιητή της δράσης της ενδογενούς TGασης, ενώ το NH_4Cl ως αναστολέα της δράσης της ενδογενούς TGασης. Κατά συνέπεια, όπως

προαναφέρθηκε, οι παρατηρούμενες διαφορές στην έκταση της λαμπρότητας και *WI* ως αποτέλεσμα της προσθήκης των αλάτων και NH_4Cl μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη αδιαφάνεια των δειγμάτων όπου προστέθηκε $CaCl_2$ λόγω δράσης της TGασης. Τα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη εργασία δείχνουν ότι και τα ιόντα του Mg^{2+} είναι πιθανόν να ενεργοποιούν στην ενδογενή TGαση. Όμως, τόσο τα ιόντα Ca^{2+} όσο και αυτά του Mg^{2+} είναι επίσης πιθανό να αντιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των πρωτεϊνών των δειγμάτων και να σχηματίζουν ιονικούς ενδομοριακούς δεσμούς. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι τιμές *a** επηρεάστηκαν σημαντικά από την προσθήκη των αλάτων ($p<0,05$), με τις πηκτές που περιείχαν NH_4Cl να είναι περισσότερο πρασινωπές, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές *b** των πηκτών που προέκυψαν με την προσθήκη των διαφορετικών αλάτων ($p\geq0,05$), δείχνοντας ότι τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία δεν συμβάλουν στην κιτρινωπή χροιά των πηκτών.

Πίνακας 8: Επίδραση των διαφορετικών αλάτων στις τιμές *L**, *a**, *b**, και *WI* των πηκτών μετά τη θερμική τους επεξεργασία.

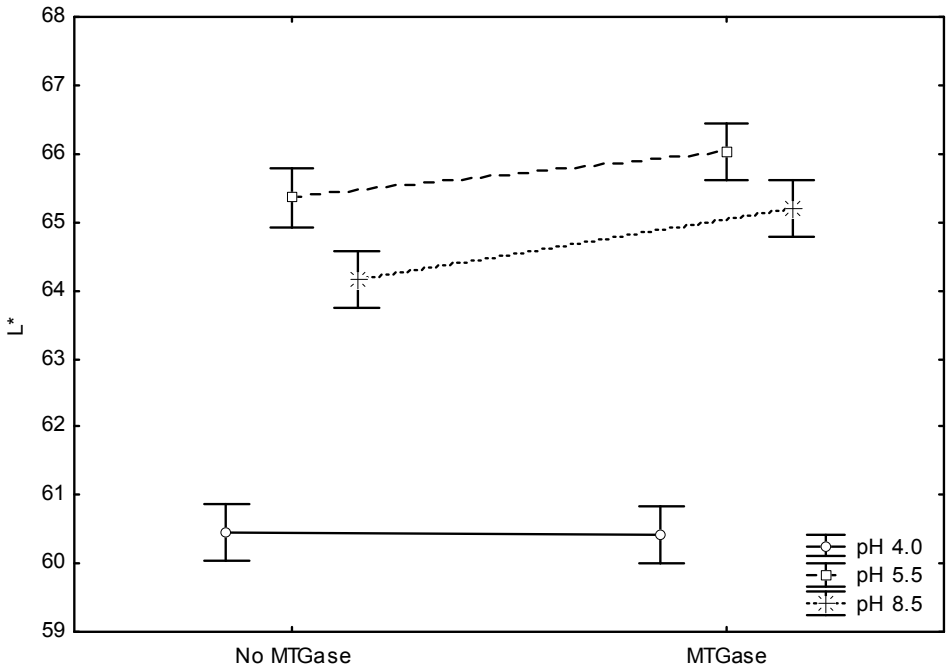
Επεξεργασία	*L**	*a**	*b**	*WI*
$CaCl_2$	$64,4 \pm 2,4^a$	$-3,2 \pm 0,4^a$	$7,0 \pm 0,6^a$	$63,6 \pm 2,3^a$
$MgCl_2$	$64,2 \pm 2,7^a$	$-3,3 \pm 0,3^a$	$7,2 \pm 0,6^a$	$63,3 \pm 2,6^a$
NH_4Cl	$62,2 \pm 2,3^b$	$-3,5 \pm 0,3^b$	$7,0 \pm 0,6^a$	$61,4 \pm 2,3^b$

Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριάντα (30) επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

5.2.3.2 Παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις

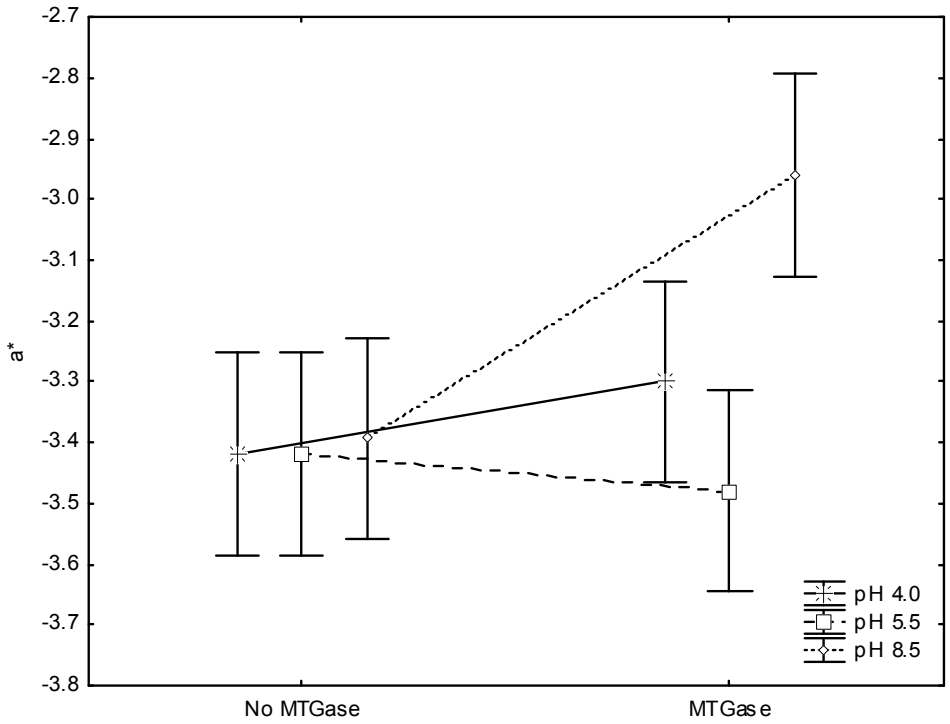
Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ο συνδυασμός συνθηκών πλυσίματος x απουσία ή παρουσία MTGασης οδήγησε σε σημαντικές διαφορές στις τιμές *L**, *a**, *b**, και *WI* των πηκτών ($p<0,05$) (Σχήματα 10, 11 και 12).

Η λαμπρότητα των πηκτών που προήλθαν από κιμά σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 5,5 και στον οποίο προστέθηκε MTGαση ήταν εντονότερη σε σύγκριση με τη λαμπρότητα των αντίστοιχων πηκτών που ο κιμάς προηγούμενα πλύθηκε σε pH 4,0 ή 8,5 με προσθήκη ή χωρίς προσθήκη MTGασης ($p<0,05$). Επιπλέον, οι πηκτές που προήλθαν από κιμά σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 5,5 ή 8,5 και στις οποίες προστέθηκε MTGαση ήταν λαμπρότερες από τις αντίστοιχες στις οποίες όμως δεν έγινε προσθήκη MTGασης ($p<0,05$). Η αυξημένη αυτή λαμπρότητα είναι αποτέλεσμα, όπως και προηγούμενα αναφέρθηκε, της αυξημένης αδιαφάνειας των πηκτών λόγω της δράσης της MTGασης. Όμως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη λαμπρότητα των πηκτών που προήλθαν από κιμά σαρδέλας που προηγούμενα πλύθηκε σε pH 4,0 ως αποτέλεσμα προσθήκης MTGασης ($p\geq0,05$). Στη περίπτωση αυτή μπορεί να υποτεθεί, ότι οι ομάδες της γλουταμίνης και λυσίνης που ενώνονται με τα πρωτεϊνικά μόρια εγκλωβίστηκαν στο εσωτερικό των πρωτεϊνικών μορίων λόγω μεταβολών στην πρωτεϊνική διαμόρφωση που συνέβη κατά τις ρυθμίσεις του pH κατά τον πρώτο και δεύτερο κύκλο πλυσίματος. Έτσι, δεν δημιουργήθηκαν οι αναμενόμενοι ε-(γ-γλουταμύλ)λυσίνης δεσμοί. Ανάλογα με τα αποτελέσματα της λαμπρότητας ήταν και αυτά του *WI*.



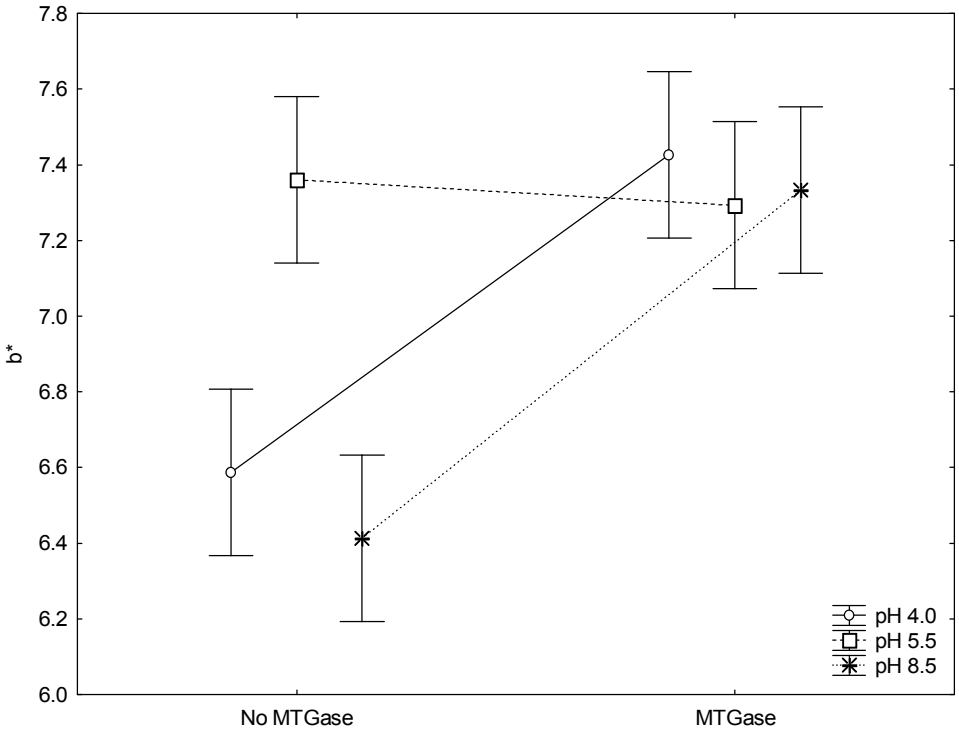
Σχήμα 10: Επίδραση του συνδυασμού συνθηκών πλυσίματος x προσθήκη ή μη MTGασης στην ένταση της λαμπρότητας των πηκτών (οι κάθετες γραμμές δείχνουν τα όρια εμπιστοσύνης στο 95%)

Η σύγκριση των μέσων όρων μέσω του SNK ελέγχου έδειξε ότι η εντονότερη πρασινωπή χροιά εμφανίστηκε στις πηκτές που προήλθαν από κιμά που πλύθηκε σε όξινες συνθήκες και η ένταση της ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία της MTGασης. Έντονη πρασινωπή χροιά είχαν επίσης οι πηκτές που προήλθαν από κιμά που πλύθηκε σε αλκαλικές συνθήκες χωρίς όμως προσθήκη MTGασης ($p<0,05$).



Σχήμα 11: Επίδραση του συνδυασμού συνθηκών πλυσίματος x προσθήκη ή μη MTGασης στην ένταση της πρασινωπής χροιάς των πηκτών (οι κάθετες γραμμές δείχνουν τα όρια εμπιστοσύνης στο 95%)

Από το σχήμα 12 φαίνεται ότι η προσθήκη της MTGασης στις πηκτές που προήλθαν από κιμά σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 4,0 ή 8,5 επηρέασε σημαντικά τις τιμές *b** ($p<0,05$). Ωστόσο, η προσθήκη της MTGασης δεν επηρέασε τις τιμές *b** των πηκτών που προήλθαν από κιμά που πλύθηκε σε pH 5,5 ($p\geq0,05$).



Σχήμα 12: Επίδραση του συνδυασμού συνθηκών πλυσίματος x προσθήκη ή μη MTGασης στην ένταση της κιτρινωπής χροιάς των πηκτών (οι κάθετες γραμμές δείχνουν τα όρια εμπιστοσύνης στο 95%)

5.3 Μετρήσεις υφής

5.3.1 Κύριες επιδράσεις

5.3.1.1 Η επίδραση των συνθηκών πλυσίματος

Η επίδραση του πλυσίματος σε όξινες και αλκαλικές συνθήκες στα χαρακτηριστικά της υφής των παραγόμενων πηκτών φαίνεται στον πίνακα 9. Η σύγκριση των μέσων όρων μέσω του ελέγχου SNK έδειξε ότι την υψηλότερη σκληρότητα έδωσαν οι πηκτές που προήλθαν από κιμά που προηγούμενα πλύθηκε σε pH 5,5, ενώ οι πηκτές που προήλθαν από κιμά που προηγούμενα πλύθηκε σε pH 4,0 ήταν οι λιγότερο σκληρές ($p<0,05$). Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι πηκτές που προήλθαν από κιμά που

προηγούμενα πλύθηκε σε pH 5,5 ή 8,5 ήταν περισσότερο συνεκτικές ($p<0,05$). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ελαστικότητα των πηκτών που προήλθαν από διαφορετικές μεταχειρίσεις ($p\geq0,05$).

Πίνακας 9: Επίδραση των όξινων και αλκαλικών συνθηκών πλυσίματος στα χαρακτηριστικά της υφής των πηκτών σουρίμι

Επεξεργασία	Σκληρότητα (N)	Συνεκτικότητα (αδιάστατη)	Ελαστικότητα (mm)
$pH_{4,0}$	$56,50 \pm 11,17^{c}$	$0,15 \pm 0,04^{b}$	$2,69 \pm 0,26^{a}$
$pH_{5,5}$	$89,25 \pm 36,53^{a}$	$0,19 \pm 0,04^{a}$	$2,67 \pm 0,24^{a}$
$pH_{8,5}$	$72,88 \pm 23,70^{b}$	$0,20 \pm 0,04^{a}$	$2,66 \pm 0,19^{a}$

Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριάντα (30) επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

5.3.1.2 Η επίδραση της MTGασης

Οι πηκτές στις οποίες προστέθηκε MTGαση έδωσαν υψηλότερες τιμές σκληρότητας και συνεκτικότητας σε σύγκριση με τις πηκτές όπου δεν έγινε προσθήκη MTGασης ($p<0,05$) (Πίνακας 10). Σε πηκτές που παρασκευάσθηκαν από κέφαλο (*Mugil cephalus*) οι Ramírez *et al*., (2000) παρατήρησαν ότι η προσθήκη MTGασης σε ποσοστό 0,93% και 0,05% βελτίωσε τη σκληρότητα και τη συνεκτικότητα, αντίστοιχα. Ανάλογη επίδραση της προσθήκης MTGασης σε συγκέντρωση 0,2% (w/w) στα χαρακτηριστικά της υφής των πηκτών που προήλθαν από ποικίλα είδη αλιευμάτων διαπιστώθηκε από πολλούς ερευνητές (Lee *et al*., 1997; Dondero *et al*., 2002) και αποδόθηκε στη δημιουργία ομοιοπολικών μη

δισουλφιδικών δεσμών άρα στην αυξημένη ύπαρξή τους και στις αντιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων μέσω των ε-(γ-γλουταμύλ)λυσίνης δεσμών. Στη συγκεκριμένη εργασία, τόσο η σκληρότητα όσο και η συνεκτικότητα των πηκτών επηρεάστηκαν από την προσθήκη της MTGασης ($p<0,05$), όμως, στην ελαστικότητα των πηκτών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p\geq0,05$).

Πίνακας 10: Επίδραση της MTGασης στα χαρακτηριστικά υφής των πηκτών σουρίμι

Επεξεργασία	Σκληρότητα (N)	Συνεκτικότητα (αδιάστατη)	Ελαστικότητα (mm)
No MTGase	$60,12 \pm 16,50^{b}$	$0,16 \pm 0,04^{b}$	$2,71 \pm 0,21^{a}$
MTGase	$85,49 \pm 32,84^{a}$	$0,20 \pm 0,04^{a}$	$2,64 \pm 0,24^{a}$

Οι τιμές είναι μέσοι όροι σαράντα πέντε (45) επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

5.3.1.3 Η επίδραση των διαφορετικών αλάτων

Η επίδραση των διαφορετικών αλάτων που προστέθηκαν στις πηκτές σουρίμι στην υφή των παραγόμενων προϊόντων φαίνεται στον πίνακα 11. Σύμφωνα με τη σύγκριση μέσων όρων μέσω του SNK ελέγχου οι πηκτές στις οποίες προστέθηκαν $CaCl_2$ ή $MgCl_2$ ήταν σκληρότερες σε σύγκριση με αυτές στις οποίες προστέθηκε NH_4Cl ($p<0,05$). Οι Benjakul & Visessanguan, (2003) επισήμαναν την ενισχυτική επίδραση του $CaCl_2$ στην MTGαση με αποτέλεσμα αύξηση της σκληρότητας των πηκτών kamaboko από πέρκα γλυκού

νερού (*Bigeye snapper*) και την ανασταλτική δράση του NH_4Cl στην MTGαση και μείωση της σκληρότητας. Η ενισχυτική και ανασταλτική δράση των ιόντων Ca^{2+} και NH_4^+, αντίστοιχα, στα χαρακτηριστικά της υφής των πηκτών (suwari και Kamaboko) που προέρχονται από ποικίλα είδη αλιευμάτων, λόγω δράσης τους στην ενδογενή TGαση έχει ανακοινωθεί και από άλλους ερευνητές (Kumazawa *et al*., 1995; Benjakul *et al*., 2004; Morales *et al*., 2001). Τα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη εργασία επιβεβαιώνουν ότι εκτός από ιόντα Ca^{2+} και τα ιόντα Mg^{2+} ενεργοποιούν την ενδογενή TGασης. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ελαστικότητα και συνεκτικότητα των πηκτών που προήλθαν από διαφορετικές προσθήκες αλάτων ($p \geq 0,05$).

Πίνακας 11: Επίδραση των προστιθέμενων αλάτων στα χαρακτηριστικά υφής των πηκτών σουρίμι

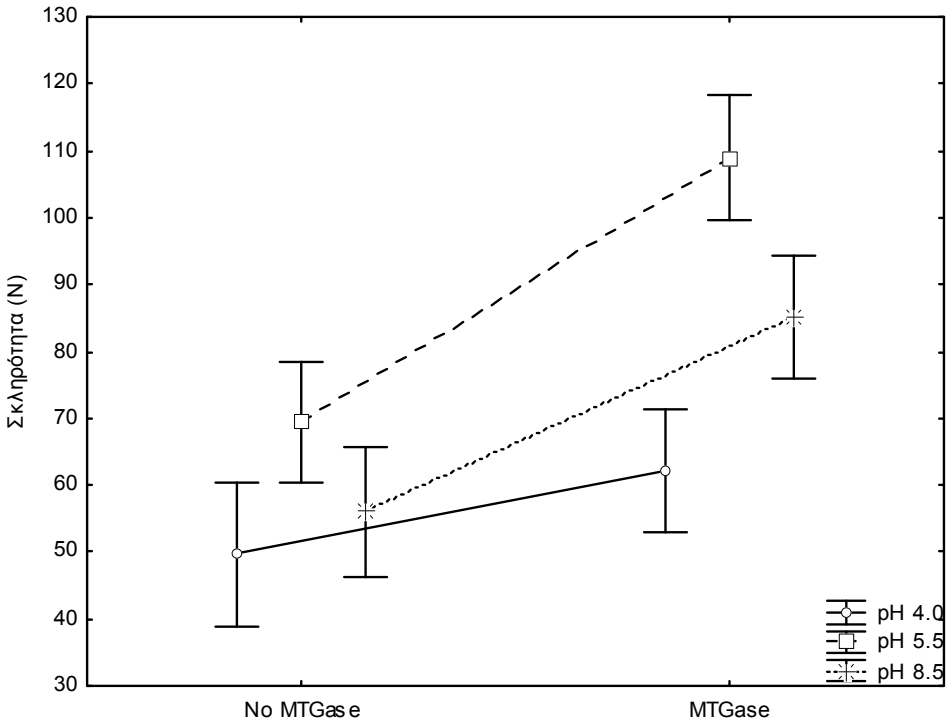
Επεξεργασία	Σκληρότητα (N)	Συνεκτικότητα (αδιάστατη)	Ελαστικότητα (mm)
$CaCl_2$	$82,03 \pm 26,94^a$	$0,17 \pm 0,05^a$	$2,68 \pm 0,28^a$
$MgCl_2$	$76,93 \pm 39,36^a$	$0,19 \pm 0,05^a$	$2,74 \pm 0,19^a$
NH_4Cl	$60,88 \pm 11,58^b$	$0,18 \pm 0,04^a$	$2,61 \pm 0,20^a$

Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριάντα (30) επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

5.3.2 Παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις

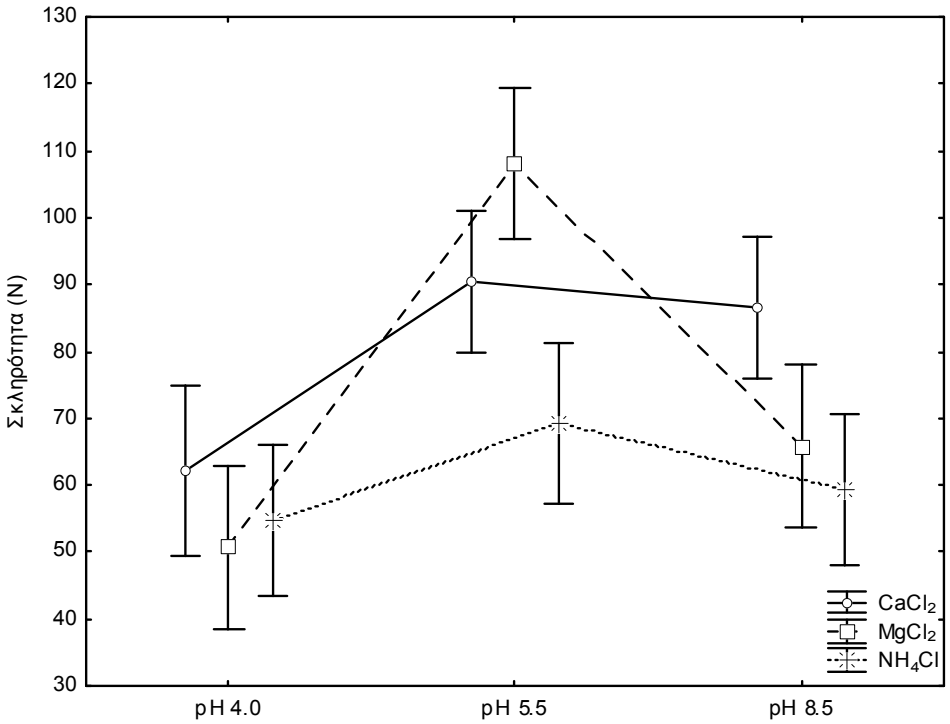
Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ο συνδυασμός συνθηκών πλυσίματος x προσθήκη ή μη MTGασης οδήγησε σε σημαντικές διαφορές στη σκληρότητα των πηκτών ($p<0,05$). Οι πηκτές που

προήλθαν από κιμά που πλύθηκε σε pH 5,5 όπου προστέθηκε MTGαση ήταν σκληρότερες σε σχέση με τις πηκτές που προήλθαν από κιμά που πλύθηκε σε pH 4,0 ή 8,5 ανεξάρτητα της προσθήκης MTGασης ($p<0,05$) (Σχήμα 13). Επιπλέον, οι πηκτές που προήλθαν από κιμά που πλύθηκε σε pH 5,5 ή 8,5 και που προστέθηκε MTGαση ήταν σκληρότερες από τις αντίστοιχες πηκτές όπου δεν έγινε προσθήκη MTGασης ($p<0,05$). Όμως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σκληρότητα των πηκτών που προήλθαν από κιμά που πλύθηκε σε pH 4,0 με ή χωρίς την προσθήκη MTGασης ($p\geq0,05$). Το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στην προαναφερόμενη υπόθεση ότι οι ομάδες της γλουταμίνης και λυσίνης που ενώνονται με τα πρωτεϊνικά μόρια εγκλωβίστηκαν στο εσωτερικό των πρωτεϊνικών μορίων λόγω μεταβολών στην πρωτεϊνική διαμόρφωση που συνέβη κατά τις ρυθμίσεις του pH κατά τον πρώτο και δεύτερο κύκλο πλυσίματος. Έτσι, δεν δημιουργήθηκαν οι αναμενόμενοι ε-(γ-γλουταμύλ) λυσίνη δεσμοί.



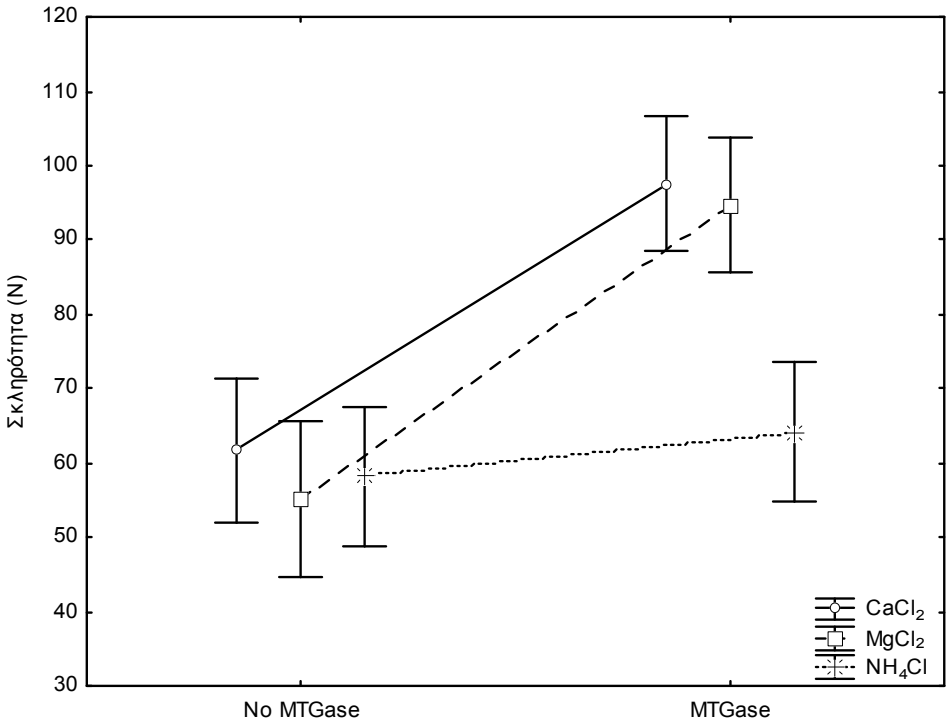
Σχήμα 13: Αλληλεπίδραση συνθηκών πλυσίματος x προσθήκη ή μη MTGαση στη σκληρότητα των πηκτών σουρίμι (οι κάθετες γραμμές δείχνουν τα όρια εμπιστοσύνης στο 95%)

Η αλληλεπίδραση συνθηκών πλυσίματος x διαφορετικών προστιθέμενων αλάτων οδήγησε επίσης σε στατιστικά σημαντικά διαφορετικές πηκτές ως προς τη σκληρότητα ($p<0,05$). Οι πηκτές που προήλθαν από κιμά σαρδέλας που πλύθηκε σε pH 5,5 ή 8,5 και περιείχαν $CaCl_2$ ή $MgCl_2$ ήταν σκληρότερες από τις αντίστοιχες που περιείχαν NH_4Cl ($p<0,05$) (Σχήμα 14). Όμως, το πλύσιμο του κιμά σαρδέλας σε pH 4,0 δεν οδήγησε σε πηκτές με βελτιωμένη σκληρότητα ανεξάρτητα της παρουσίας ιόντων Ca^{2+} ή Mg^{2+} ($p\geq0,05$).



Σχήμα 14: Αλληλεπίδραση συνθηκών πλυσίματος x προσθήκη διαφορετικών αλάτων στη σκληρότητα των πηκτών σουρίμι (οι κάθετες γραμμές δείχνουν τα όρια εμπιστοσύνης στο 95%)

Από το σχήμα 15 προκύπτει ότι τα ιόντα NH_4^+ κατέστειλαν τη δράση της MTGασης ($p \geq 0,05$), ενώ τα ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} παραπέρα ενίσχυσαν το πρωτεϊνικό πλέγμα οδηγώντας σε ακόμη σκληρότερες πηκτές ($p < 0,05$).



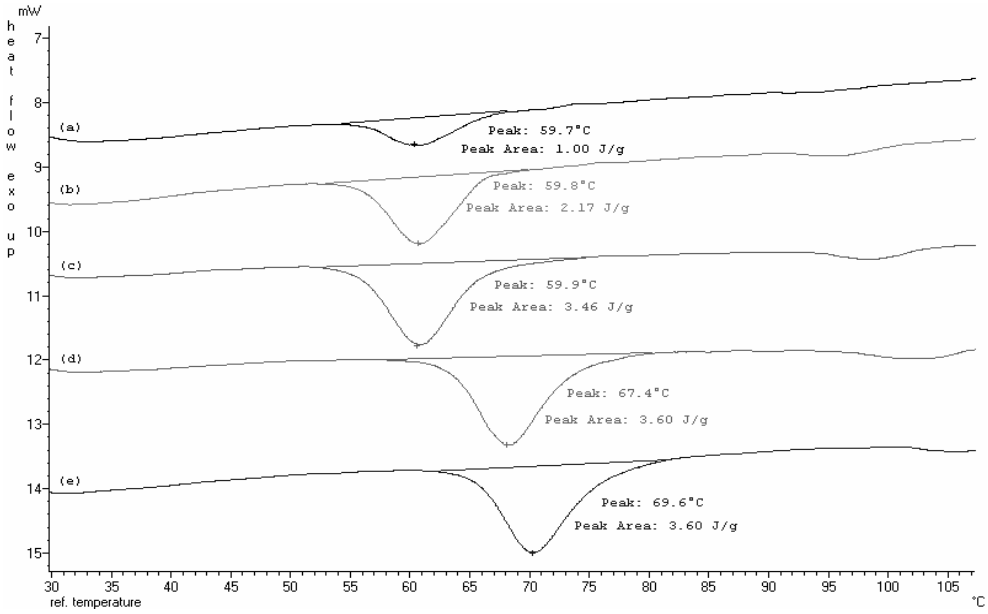
Σχήμα 15: Αλληλεπίδραση προσθήκης MTGασης x προσθήκη διαφορετικών αλάτων στη σκληρότητα των πηκτών σουρίμι (οι κάθετες γραμμές δείχνουν τα όρια εμπιστοσύνης στο 95%)

5.4 Έλεγχος πρωτεϊνικών μορίων και αμύλου μέσω θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης (DSC)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η συνεισφορά του προστιθέμενου στον κιμά σαρδέλας μη τροποποιημένου αμύλου σίτου (UWS) στις λειτουργικές ιδιότητες των πηκτών, μελετήθηκαν μέσω του DSC οι επιπτώσεις του νερού, του χλωριούχου νατρίου και των πρωτεϊνών των δειγμάτων καθώς επίσης η προσθήκη των διαφόρων ουσιών στη ζελατινοποίηση του αμύλου.

Η ζελατινοποίηση του αμύλου αρχικά μελετήθηκε σε αιωρήματα αμύλου – νερού σε συγκεντρώσεις UWS της τάξης του 10%, 20%,

και 30% (w/w). Αντιπροσωπευτικά DSC θερμοδιαγράμματα του κάθε αιωρήματος δίνονται στο σχήμα 16. Δύο ενδοθερμικές κορυφές παρατηρήθηκαν για κάθε αιώρημα. Η πρώτη κορυφή αποδόθηκε στη ζελατινοποίηση του αμύλου, ενώ το δεύτερο στο διαχωρισμό του συμπλόκου αμυλόζης – λίπους (Lund, 1983; Vermeylen *et al.*, 2005). Η μέση θερμοκρασία ζελατινοποίησης του αμύλου (*TG*) και η ενθαλπία (ΔH_g) του κάθε αιωρήματος δίνονται στον πίνακα 12. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 12 δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη *TG* των αιωρημάτων ($p \geq 0,05$), όμως η ΔH_g αυξήθηκε σημαντικά σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης του UWS στο αιώρημα ($p < 0,05$). Τα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη εργασία είναι όμοια με αυτά που ανακοινώθηκαν από τους Wu *et al.*, (1985a) σε άμυλο πατάτας.



Σχήμα 16. DSC θερμοδιαγράμματα αιωρημάτων αμύλου – νερού: (a) 10% (w/w) UWS, (b) 20% (w/w) UWS, (c) 30% (w/w) UWS, (d) 30% (w/w) UWS + 2.5% (w/w) NaCl, (e) 30% (w/w) UWS + 5% (w/w) NaCl.

Πίνακας 12: Επίδραση του νερού και της ιονικής ισχύος στις θερμικές μεταπτώσεις του UWS

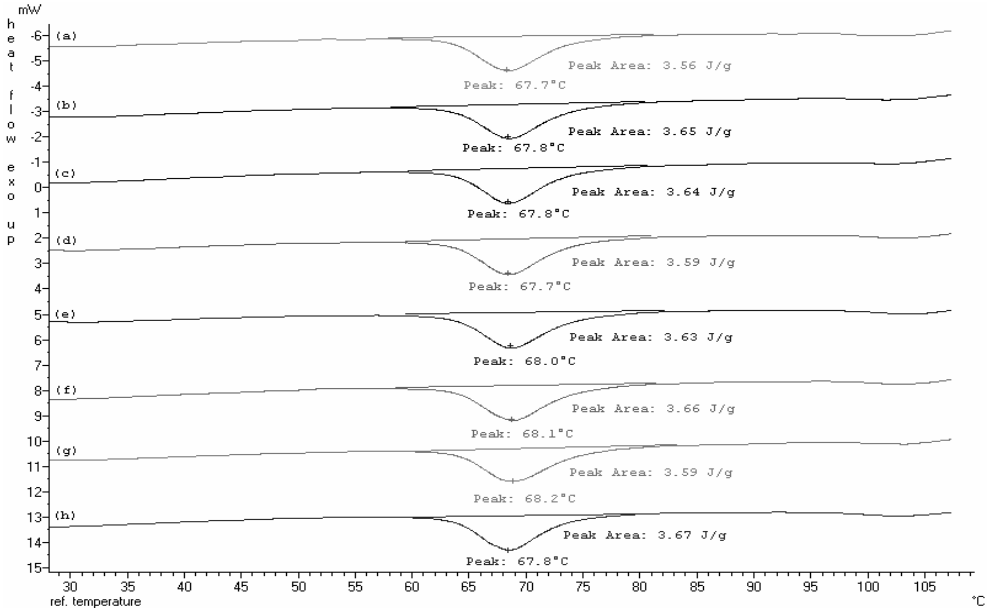
Αιώρημα Αμύλου - Νερού	T_g (^oC)	ΔH_g (J/g)
10% UWS	59,4 ± 0,5^c	1,00 ± 0,00^d
20% UWS	59,8 ± 0,1^c	2,16 ± 0,01^c
30% UWS	59,9 ± 0,0^c	3,43 ± 0,04^b
30% UWS + 2,5% NaCl	67,6 ± 0,2^b	3,59 ± 0,02^a
30% UWS + 5% NaCl	69,6 ± 0,1^a	3,59 ± 0,02^a

Οι τιμές είναι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του χλωριούχου νατρίου σε συγκεντρώσεις 0%, 2,5% και 5% (w/w) σε αιώρημα 30% (w/w) αμύλου – νερού στην *TG* και ΔH_g (Σχήμα 16). Η σύγκριση των μέσων όρων των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η *TG* αυξήθηκε σημαντικά σε αμφότερα τα αιωρήματα που περιείχαν χλωριούχο νάτριο σε σχέση με το αιώρημα όπου δεν έγινε προσθήκη του ($p<0,05$) (Πίνακας 12). Παρουσία χλωριούχου νατρίου η *TG* μετακινήθηκε από 59,9^{o}C σε 67,6^{o}C και 69,6^{o}C στα αιωρήματα αμύλου – νερού που περιείχαν 0%, 2,5%, και 5% (w/w) NaCl, αντίστοιχα. Η ενθαλπία μετάπτωσης του αμύλου αυξήθηκε ελαφρά στα αιωρήματα αμύλου – νερού που περιείχαν χλωριούχο νάτριο σε σχέση με αυτά στα οποία δεν έγινε προσθήκη χλωριούχου νατρίου ($p<0,05$), ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ΔH_g των αιωρημάτων που περιείχαν ($p\geq0,05$) (Πίνακας 12).

Η πιθανή συνεισφορά των $CaCl_2$, $MgCl_2$, NH_4Cl, και MTGασης στην πήξη του σουρίμι επίσης μελετήθηκε μέσω της ζελατινοποίησης του

αμύλου. Εφτά (7) διαφορετικά αιωρήματα αμύλου – νερού σε συγκέντρωση 30% (w/w) UWS τα οποία περιείχαν 2,5% (w/w) NaCl προετοιμάστηκαν. Σε κάθε αιώρημα προστέθηκαν $CaCl_2$, $MgCl_2$, NH_4Cl και MTGαση σε συγκέντρωση 0,2% (w/w) και $CaCl_2$+MTGαση, $MgCl_2$+MTGαση και NH_4Cl+MTGαση σε συγκέντρωση 0,4% (w/w) (αναλογία 1:1) (Σχήμα 17). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη *TG* και ΔH_g μεταξύ των παραπάνω ποικίλων αιωρημάτων και του δείγματος αναφοράς ($p \geq 0,05$) (τα αποτελέσματα δεν φαίνονται). Το παραπάνω αποτέλεσμα δείχνει ότι οι προαναφερόμενες ουσίες στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις είναι απίθανο να επηρεάσουν την *TG* και ΔH_g των πηκτών σουρίμι.



Σχήμα 17: DSC θερμοδιαγράμματα 30% (w/w) αιωρημάτων αμύλου – νερού που περιέχουν 2,5% (w/w) NaCl: (a) δείγμα αναφοράς, (b) 0,2% (w/w) $CaCl_2$, (c) 0,2% (w/w) $MgCl_2$, (d) 0,2% (w/w) NH_4Cl, (e) 0,2% (w/w) MTGαση, (f) 0,2% (w/w) $CaCl_2$ + 0,2% (w/w) MTGαση, (g) 0,2% (w/w) $MgCl_2$ + 0,2% (w/w) MTGαση, (h) 0,2% (w/w) NH_4Cl + 0,2% (w/w) MTGαση

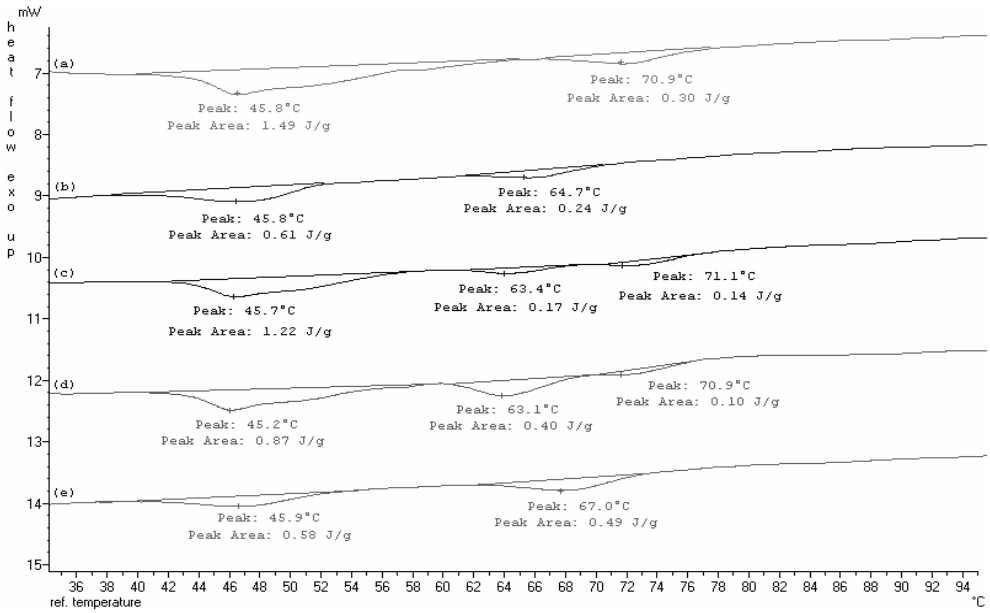
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η *TG* επηρεάστηκε από την ιονική ισχύ, ενώ η ΔH_g από το περιεχόμενο νερό. Όμως, ένας περισσότερο σημαντικός παράγοντας που μπορεί να έχει συμβολή είναι οι πρωτεΐνες των δειγμάτων. Ένα αντιπροσωπευτικό DSC θερμοδιάγραμμα σουρίμι σαρδέλας δίνεται στο σχήμα 14. Μπορούν να παρατηρηθούν δύο ενδοθερμικές κορυφές στους 45,7^{o}C και 70,7^{o}C οι οποίες αποδόθηκαν στη μετουσίωση της μυοσίνης και της ακτίνης αντίστοιχα (Σχήμα 18) (Πίνακας 13). Οι Wu *et al.*, (1985b) ανακοίνωσαν ότι στο DSC θερμοδιάγραμμα σουρίμι από μπακαλιάρο του Ατλαντικού προέκυψαν τρεις ενδοθερμικές κορυφές στους 43°C, 54°C και 71°C. Οι ερευνητές απέδωσαν τις δύο πρώτες κορυφές στη μετουσίωση της μυοσίνης ενώ την τρίτη στη μετουσίωση της ακτίνης.

Η παρουσία του NaCl, το οποίο προστίθεται, σε συγκέντρωση 2,5% (w/w) στο βάρος του κιμά, προκειμένου να βοηθήσει στη διαλυτοποίηση των μυϊκών πρωτεϊνών, οδήγησε σε σημαντική μείωση της ενθαλπίας μετουσίωσης τόσο της μυοσίνης (ΔH_{dm}) όσο και της ακτίνης (ΔH_{da}) ($p<0,05$) δείχνοντας ότι αμφότερες οι πρωτεΐνες μετουσιώθηκαν σε κάποιο βαθμό (Πίνακας 13). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο σπάσιμο των ιονικών δεσμών μεταξύ των μυϊκών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τους Lanier *et al.*, (2004) όταν προστίθεται χλωριούχο νάτριο στο σουρίμι τα ιόντα Na^+ και Cl^- επιλεκτικά δεσμεύονται με αντίθετα φορτισμένες ομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών μορίων. Επομένως, οι ενδομοριακοί ιονικοί δεσμοί μεταξύ των μυϊκών πρωτεϊνών διασπώνται και οι πρωτεΐνες διαλύονται λόγω αύξησης της επαφής του μεγαλομορίου με το νερό. Επιπλέον, η T_{da} μετακινήθηκε σε

χαμηλότερη θερμοκρασία από 70,7^{o}C σε 64,6^{o}C ($p<0,05$), ενώ η T_{dm} παρέμεινε η ίδια ($p\geq0,05$).

Όταν άμυλο προστέθηκε στην πηκτή του σουρίμι σε μια συγκέντρωση της τάξης του 5% (w/w) του βάρους του κιμά, μια τρίτη ευδιάκριτη κορυφή έκανε την εμφάνισή της σε θερμοκρασία 63,3^{o}C και αποδόθηκε στη ζελατινοποίηση του αμύλου (Σχήμα 18). Η παρατηρούμενη αύξηση της *TG* του UWS μέσα από το σουρίμι, από ~60°C σε 63,3^{o}C, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ιονικής ισχύος που υπάρχει στη σάρκα των αλιευμάτων, αφού οι μυϊκές πρωτεΐνες βρίσκονται διαλυμένες σε αλατοδιάλυμα μέσα στη σάρκα των αλιευμάτων (Hultin & Kelleher, 2000). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές T_{dm} και T_{da} στα μίγματα αμύλου – νερού ($p\geq0,05$), όμως οι ΔH_{dm} και ΔH_{da} μειώθηκαν σημαντικά πιθανά λόγω μείωσης των περιεχόμενων πρωτεϊνών ($p<0,05$).

Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αμύλου, η ζελατινοποίηση συνέβη στην ίδια θερμοκρασία ($p\geq0,05$), ενώ η ΔH_g αυξήθηκε πιθανά λόγω μείωσης του διαθέσιμου νερού ($p<0,05$) (Πίνακας 13). Επιπλέον, οι τιμές, T_{dm} και T_{da} δεν επηρεάστηκαν από την αύξηση της συγκέντρωσης του αμύλου στην πηκτή του σουρίμι ($p\geq0,05$), όμως οι τιμές ΔH_{dm} και ΔH_{da} μειώθηκαν εκ νέου ($p<0,05$). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η τρίτη μετάπτωση που παρατηρήθηκε στους ~ 63°C οφείλεται στη ζελατινοποίηση του αμύλου και ότι οι πρωτεΐνες της πηκτής σουρίμι και το άμυλο υφίστανται ανεξάρτητες μεταπτώσεις κατά τη θερμική τους επεξεργασία.



Σχήμα 18. DSC θερμοδιαγράμματα μιγμάτων σουρίμι σαρδέλας (Sardine Surimi, SS): (a) SS, (b) SS + 2,5% (w/w) NaCl, (c) SS + 5% (w/w) UWS, (d) SS + 10% (w/w) UWS, (e) SS + 2,5% (w/w) NaCl+5% (w/w) UWS.

Με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου και UWS σε συγκεντρώσεις της τάξης του 2,5% και 5% (w/w) του βάρους του κιμά αντίστοιχα, η δεύτερη κορυφή που αποδόθηκε στη ζελατινοποίηση του αμύλου επικάλυψε την τρίτη κορυφή που αποδόθηκε στη μετουσίωση της ακτίνης. Επομένως, καταγράφηκαν δύο μεταπτώσεις στους 45,9^{o}C και 66,5^{o}C (Πίνακας 13). Οι τιμές T_{dm}, των διαφορετικών μιγμάτων σουρίμι – αμύλου δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p \geq 0,05$), ενώ οι ΔH_{dm} διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών μιγμάτων ($p < 0,05$).

Πίνακας 13: Θερμοκρασίες μετάπτωσης και ενθαλπίες των μιγμάτων σουρίμι – UWS

Μεταχείριση	T_{dm} (°C)	ΔH_{dm} (J/g)	T_{da} (°C)	ΔH_{da} (J/g)	T_g (°C)	ΔH_g (J/g)
Σουρίμι*	45,7 ± 0,2[a]	1,51 ± 0,09[a]	70,7 ± 0,4[a]	0,32 ± 0,02[a]	-	-
Σουρίμι με 2.5% NaCl	45,9 ± 0,1[a]	0,60 ± 0,02[d]	64,6 ± 0,4[b]	0,21 ± 0,04[b]	-	-
Σουρίμι με 5% UWS	45,2 ± 0,5[a]	1,15 ± 0,05[b]	71,4 ± 0,3[a]	0,16 ± 0,02[c]	63,3 ± 0,3[a]	0,17 ± 0,06[b]
Σουρίμι με 10% UWS	45,4 ± 0,4[a]	0,84 ± 0,04[c]	71,3 ± 0,5[a]	0,09 ± 0,01[d]	63,0 ± 0,1[a]	0,45 ± 0,05[a]
Σουρίμι με 2.5% NaCl και 5% UWS	45,9 ± 0,1[a]	0,59 ± 0,01[d]	66,5 ± 0,5**	0,44±0,05**	66,5 ± 0,5**	0,44 ± 0,05**

* Σουρίμι με πλύσιμο του κιμά σαρδέλας σε pH 5,5

** Επικάλυψη θερμοκρασιών μεταπτώσεως της ακτίνης και του UWS

Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών (3) επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. Οι μέσοι όροι της ίδιας στήλης με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0,05$)

Σχετικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των θερμικά επεξεργασμένων πηκτών (kamaboko), η ζελατινοποίηση του αμύλου επηρεάζει τόσο το χρώμα όσο και την υφή του τελικού προϊόντος. Κατά τη ζελατινοποίηση του αμύλου μέσα στο σουρίμι, τα μόρια του αμύλου απορροφούν νερό και διογκώνονται μέχρι να εμποδιστούν από το πρωτεϊνικό δίκτυο. Αυτό οδηγεί σε ενίσχυση του δικτύου της παραγόμενης πηκτής και σε μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού πηκτής. Όμως, η προσθήκη του αμύλου μπορεί να οδηγήσει και σε ανεπιθύμητη επίπτωση στην υφή της πηκτής, εάν τα μόρια του αμύλου δεν ζελατινοποιηθούν. Επιπλέον, η λαμπρότητα και ο *WI*

μπορεί να μειωθούν στο σουρίμι όταν τα μόρια του αμύλου διογκωθούν ολοκληρωτικά (οι πηκτές γίνονται διαφανείς), καθώς επίσης και να αυξηθούν όταν τα μη διογκωμένα μόρια του αμύλου αυξηθούν (οι πηκτές γίνονται περισσότερο αδιαφανείς) (Yang & Park, 1998).

5.5. Μεταβολές Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) κατά την επεξεργασία

Οι μεταβολές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ) στα στάδια επεξεργασίας και στις δύο μεταχειρίσεις δίνονται στον πίνακα 14. Όπως φαίνεται στον πίνακα 14 στα δείγματα, όπου η επεξεργασία έγινε με τη συνήθη διαδικασία (συνήθης χειρονακτική εφαρμογή στη βιομηχανία) (α), παρατηρήθηκε αύξηση της ΟΜΧ μετά το στάδιο της κιμαδοποίησης. Αυτό πιθανά οφείλεται είτε σε επιμόλυνση των φιλέτων από υπολείμματα εντοσθίων, αίματος και δέρματος, είτε σε βακτηριακή επιβάρυνση από σκεύη, χέρια και επιφάνειες κατά το στάδιο της χειρονακτικής φιλετοποίησης, με αποτέλεσμα την αύξηση της ΟΜΧ στον κιμά.

Ενώ, στην επεξεργασία όπου έγινε απολύμανση των σκευών και επιφανειών με αιθυλική αλκοόλη πριν τη χρησιμοποίησή τους και επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν χειρουργικά γάντια (β), παρατηρήθηκε μείωση της ΟΜΧ στον κιμά των φιλέτων. Αυτό πιθανά οφείλεται αφενός στην απουσία βακτηρίων από τα σημεία επαφής των φιλέτων, αφετέρου σε μείωση του επιφανειακού βακτηριακού φορτίου των δειγμάτων λόγω άμεσης επαφής τους με το απολυμαντικό μέσο.

Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί από τον πίνακα 14 ότι κατά το πρώτο πλύσιμο της επεξεργασίας (α) παρατηρήθηκε μείωση της ΟΜΧ δείχνοντας ότι το πλύσιμο μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση

ενός βακτηριακά βεβαρημένου δείγματος. Αντίθετα, κατά το πρώτο πλύσιμο της επεξεργασίας (β) σημαντική ήταν η αύξηση της ΟΜΧ, παρέμεινε όμως σημαντικά χαμηλότερη της αντίστοιχης επεξεργασίας (α), οφείλεται πιθανά σε επιβάρυνση από το νερό πλυσίματος (τόσο ως μέσω πλυσίματος όσο και λόγω κατακράτησής του) στο χαμηλό βακτηριακό φορτίο των δειγμάτων ή σε ενδεχόμενο εργαστηριακό λάθος.

Τα δύο στάδια πλυσίματος που ακολούθησαν οδήγησαν σε σημαντική μείωση της ΟΜΧ σε αμφότερες τις επεξεργασίες, δείχνοντας τη συμβολή του πλυσίματος στο βακτηριακό φορτίο των δειγμάτων.

Η θερμική επεξεργασία στους 90°C για 30 min μείωσε την ΟΜΧ και στους δύο τρόπους επεξεργασίας.

Ανακοινώθηκε ότι σε βιομηχανική κλίμακα παρασκευής σουρίμι με μηχανικά μέσα τα εφαρμοζόμενα πλυσίματα οδήγησαν σε αύξηση της ΟΜΧ (Himelbloom *et al*., 1991). Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη μεγάλη σημασία των πλυσιμάτων στην ποιότητα των προϊόντων σουρίμι, επιβεβαιώνουν επίσης την αναγκαιότητα απολύμανσης των μηχανημάτων που χρησιμοποιούνται στη γραμμή επεξεργασίας.

Πίνακας 14. Μεταβολές της ΟΜΧ με τους δύο τρόπους επεξεργασίας.

	Συνήθης τρόπος επεξεργασίας (α)	Επεξεργασία με απολύμανση (β)
Δείγμα	$8,4 \times 10^3$	
Κιμάς	$4,45 \times 10^5$	3×10^3
Κιμάς από πλύσιμο σε pH 5,50	$3,2 \times 10^5$	$8,2 \times 10^4$
Κιμάς από πλύσιμο σε pH 7,00	$3,6 \times 10^5$	4×10^4
Κιμάς από πλύσιμο σε διάλυμα 0,3% NaCl	4×10^4	3×10^4
Κιμάς μετά από θερμική επεξεργασία στους 90^oC	9 x 10	9 x10

Οι τιμές είναι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε CFU/g (Μονάδες σχηματιζόμενων αποικιών)

6. Συμπεράσματα

Το πλύσιμο του κιμά σαρδέλας σε pH 5,5 έδωσε πηκτές με τις υψηλότερες τιμές *L** και *WI*, ακολουθούμενες από τις πηκτές που πλύθηκαν σε pH 8,5 και 4,0.

Παρόμοια ήταν η τάση που διαπιστώθηκε για τη σκληρότητα.

Η προσθήκη της MTGασης στον κιμά σαρδέλας οδήγησε σε σημαντική αύξηση των τιμών *L** και *WI* των παραγόμενων πηκτών (kamaboko).

Επιπλέον, η προσθήκη της MTGασης στον κιμά σαρδέλας οδήγησε σε πηκτές με βελτιωμένη σκληρότητα και συνεκτικότητα.

Οι πηκτές που περιείχαν $CaCl_2$ ή $MgCl_2$ ήταν λαμπρότερες και σκληρότερες από αυτές που περιείχαν NH_4Cl.

Οι θερμικές μεταπτώσεις των μιγμάτων σουρίμι – αμύλου έλαβαν χώρα στους 45,2^{o}C, 63,3^{o}C και 71,4^{o}C ανεξάρτητα από την ποσότητα αμύλου που προστέθηκε στον κιμά σαρδέλας.

Η ζελατινοποίηση του αμύλου και η μετουσίωση της ακτίνης επικαλύφθηκαν όταν στα μίγματα προστέθηκε χλωριούχο νάτριο.

Τα πλυσίματα που εφαρμόζονται στην παραγωγή σουρίμι μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα των πηκτών σουρίμι (μείωση βακτηριακού φορτίου), με την προϋπόθεση ότι θα τηρηθούν οι απαραίτητες συνθήκες υγιεινής.

7. Βιβλιογραφία

AbuDagga Y & Kolbe E, 1997. Thermophysical Properties of Surimi Paste at Cooking Temperature, *Journal of Food Engineering*, 32, 325-337.

Alam SI, Dube S, Reddy GSN, Bhattacharya BK, Shivaji S & Singh L, 2005. Purification and characterization of extracellular protease produced by Clostridium sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5,6), 824-831.

Alvarez C, & Tejada M, 1997. Influence of texture of suwari gels on kamaboko gels made from sardine (*Sardina poilchardus*) surimi. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 472-480*.

An H, Peters MY & Seymour TA, 1996. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 321-327.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Ashie INA & Lanier TC, 2000. Transglutaminase in seafood processing. In: *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*, Haard NF & Simpson BK (Eds), pp 147-166. Marcel Dekker, New York, USA.

Benjakul S, Chantarasuwan C & Visessanguan W, 2003. Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from some tropical fish. *Food Chemistry*. 82, 567-574.

Benjakul S, Seymour TA, Morrissey MT & An HJ, 1997. Physicochemical Changes in Pacific Whiting Muscle Proteins during Iced Storage. *Journal of Food Science,* 62(4), 729-733.

Benjakul S & Visessanguan W, 2003. Transglutaminase-mediated setting in bigeye snapper Surimi. *Food Research International*, 36, 253-266.

Benjakul S, Visessanguan W & Pecharat S, 2004. Suwari gel properties as affected by transglutaminase activator and inhibitors. *Food Chemistry*, 85, 91-99.

Benjakul, S, Visessanguan W, Riebroy S, Ishizaki S, & Tanaka M, 2002. Gel-forming properties of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *P. macracanthus,* stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 82*,* 1442-1451.

Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C & Tanaka M, 2005. Effect of frozen storage on chemical and gel-forming properties of fish commonly used for surimi production in Thailand. *Food Hydrocolloids*, 19, 197-207.

Bentis CA, Zotos A, Petridis D. 2005. Production of fish-protein products (surimi) from small pelagic fish (*Sardinops pilchardusts*), underutilized by the industry. *Journal of Food Engineering,* 68*,* 303-308.

Bligh EG & Dyer WJ, 1959. A rapid method of total lipid oxidation and purification. *Canadian Journal of Biochemistry & Physiology*, 37, 911-917.

Boyer C, Joandel S, Roussilhes V, Culioli J & Ouali A, 1996. Heat-induced gelation of myofibrillar proteins and myosin from fast-and slow- twitch rabbit muscles. *Journal of Food Science*, 61, 1138-1142, 1164.

Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W & Faustman C, 2004. Characteristics and gel properties of muscles from sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) caught in Thailand. *Food Research International*, 37, 1021-1030.

Chen HH, 2002. Decoloration and gel-forming ability of horse mackerel mince by air-flotation washing. *Journal of Food Science,* 67*,* 2970-2975

Chen, HH, Chiu, EM & Huang JR, 1997. Color and gel-forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonucus*) as related to washing conditions. *Journal of Food Science, 62,* 985-991.

Commission of European Communities.1979. Oven drying method SQ 1442.

Cortés-Ruiz JA, Pacheco-Aguilar R, García-Sánchez G & Lugo-Sánchez ME, 2001. Functional characterization of a protein concentrate from bristly sardine made under acidic conditions. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(4), 5-23.

Deng JC, Toledo RT & Lillard DA, 1976. The effect of temperature and pH on protein-protein interaction in actomyosin solutions. *Journal of Food Science,* 41, 273-277.

DeWitt CAM & Morrissey MT, 2002. Parameters for the recovery of proteases from surimi wash water. *Bioresource Technology*, 81(3), 241-247.

Dondero M, Curotto E & Figueroa V, 2002. Transglutaminase effects on gelation of jack mackerel surimi (*Trachurus murphyi*). *Food Science & Technology International*, 8(1), 49-54.

Douglas-Schwarz M & Lee CM, 1988. Comparison of the thermostability of Red Hake and Alaska Pollock surimi during processing, *Journal of Food Science*, 53, 1347-1351

Esquível MM, Bandarra NM, Fontan I, Bernardo-Gil MG, Batista I, Nunes ML & Empis JA, 1997. Supercritical carbon dioxide extraction of sardine *Sardina pilchardus* oil. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(7), 715-720.

Faustman C, Yin MC, & Nadeau DB, 1992. Color stability, lipid stability, and nutrient composition of red and white veal. *Journal of Food Science,* 57, 302-304.

Flick GJ & Martin RE, 1992. Advances in Seafood Biochemistry. pp 312-319. Technomic Publishing Co, Inc USA.

Folk JE, & Chung SI, 1973. Molecular and catalytic properties of transglutaminase. *Advance in Enzymology,* 38, 109-191.

Haard NF, 1992. Biochemistry and chemistry of color and color change in seafoods. In *Advances in seafood biochemistry.* Flick GJ & Martin RE (Eds), pp. 312-319. Technomic Publishing Co, Inc.USA.

Haard NF, Simpson BK & Pan BS, 1994. Sarcoplasmic proteins and other nitrogenous compounds. In: *Seafood proteins.* Sikorski ZE, Pan BS & Shahidi (Eds), pp. 13-39. Chapman & Hall, New York.

Hall GM and Ahmad NH, 1997. Surimi and fish-mince products. In: *Fish processing technology.* Hall GM (Ed), pp 74-90. Blackie academic and professional. London.

Hamm R, 1986. Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. In: *Muscle as Food*. Bechtel PJ. (Ed), pp 135-199. Academic Press, Inc. Orlando.

Hanan T & Shaklai N, 1995. Peroxidative interaction of myoglobin and myoglobin and myosin. *European Journal of Biochemistry,* 233*,* 930-936.

Hashimoto K, Watabe S, Kono M & Shiro K, 1979. Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,* 45*,* 1435-1441.

Hanson SWF & Olley J, 1963. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101-103.

Himelbloom BH, Brown EK & Lee JS, 1991. Microbiological evaluation of Alaska shore-based surimi production. *Journal of food science*. 25, 291-293.

Hultin HO & Kelleher SD, 2000. Surimi processing from dark muscle fish. In: *Surimi and surimi seafood.* Park JW (Ed), pp 59-77. Marcel Dekker, New York.

Hutchings JB, 1999. Food colour and appearance. Aspen Publishers, Inc. pp 411-416, Gaithersburg, Maryland

Joseph D, Lanier TC & Hamann DD, 1994. Temperature and pH affect transglutaminase-catalyzed “setting” of crude fish actomyosin. *Journal of Food Science*, 59(5), 1018-1023, 1036.

Geist GM and Crawford DL, 1974. Muscle cathepsins in three species of Pacific sole. *Journal of Food Science*, 39, 548-551.

Karayannakidis PD, Zotos A, Petridis D & Taylor KDA, 2007. The effect of initial wash at acidic and alkaline pHs on the properties of protein concentrate (kamaboko) products from sardine (*Sardina pilchardus*) samples. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 775-783**.**

Kelleher SD, Hultin, HO & Wilhelm KA, 1994. Stability of mackerel surimi prepared under lipid-stabilizing processing conditions. *Journal of Food Science*, 59, 269-271.

Kim SM, 2003. Surimi-alginate gels as affected dy setting: a study based on mixture design and regression models. *Food research international*, 36, 295-302.

Kim JM, Liu CH, Eun JB, Park JW, Oshimi R & Hayashi K, 1996. Surimi from fillet frames of channel catfish. *Journal of Food Science,* 61*,* 428-431, 438.

Konakaya S, 1983. Enhanced Protease Activity in the muscle of Chum Salmon during spawning migration with reference to softening of lyzing phenomenon of the meat, *Bulletin of the Tokai Regulatory Fisheries Research Laboratory,* 109*,* 41-55.

Kristinsson HG, Theodore AE, Demir N & Ingadottir B, 2005. A comparative study between acid- and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. *Journal of Food Science*, 70(4), 298-306.

Kumazawa Y, Numazawa T, Seguro K & Motoki M, 1995. Suppression of surimi gel setting by transglutaminase inhibitors. *Journal of Food Science,* 60*,* 715-717.

Lanier TC, 1992. Measurement of surimi composition and functional properties. In: *Surimi Technology*, Lanier TC and Lee CH (Eds), pp 273, Marcel Dekker, New York, Hong Kong.

Lanier TC, Carvajal P & Yongsawatdigul J, 2004. Surimi gelation chemistry. In: Surimi and surimi seafood. 2nd Ed. Park JW (Ed), pp 435-489. Taylor and Francis. New York.

Lanier TC & Lee CM, 1992. *Surimi technology.* pp 4-20, Marcel Dekker Inc. New York.

Lawrie RA, 1992. Conversion of muscle into meat: Biochemistry. In: *the chemistry of muscle-based foods*, Ledward DA, Johnston DE, & Knight MK (Eds), pp 43-61. Redwood Press Ltd, Cambridge.

Lee CM, Wu MC & Okada M, 1992. Ingredient and Formulation Technology for Surimi- Based products. In: *Surimi Technology*, Lanier TC and Lee CH (Eds), pp 273-320, Marcel Dekker, New York, Hong Kong.

Lee JS, 1992. Microbiological considerations in surimi manufacturing. In: Surimi Technology, Lanier TC and Lee CH (Eds), pp 113-155, Marcel Dekker, New York, Hong Kong.

Lee CM, 1986a. Surimi manufacturing and fabrication of surimi-based products, *Food Technology*, 40, 115-124.

Lee CM, 1986b. Surimi Technology from Dark Fleshed Fish Species. *Food Technology*, 40, 115-124.

Lee CM & Toledo RT, 1976. Factors affecting textural characteristics of cooked comminuted fish muscle, *Journal of Food Science,* 41, 391-397.

Lee HG, Lanier TC, Hamann DD & Knopp JA, 1997. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *Journal of Food Science*, 62(1), 20-24.

Lin TM, Park JW & Morrissey MT, 1995. Recovered protein and reconditioned water from surimi processing waste, *Journal of Food Science*, 60(1), 4-9.

Lippincott RK & Lee CM, 1983. Factors affecting gel characteristics of Red Hake surimi, Paper No. 426. Presented at the Forty-Third IFT Annual Meeting New Orleans, LA.

Livingston DJ & Brown WD, 1981. The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 25(3), 224-252.

Lund DB, 1983. Applications of differential scanning calorimetry in foods. In: *Physical properties of foods*. Peleg M and Bugley EB (Eds), pp 125-143. AVI, Westport, Connecticut.

Matsumoto JJ & Noguchi SF, 1992. Cryostabilization of protein in surimi. In: *Surimi Technology*, Lanier TC and Lee CH (Eds), pp 273-350. Marcel Dekker, New York, Hong Kong.

McDonald RE & Hultin HO, 1987. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeleton muscle. *Journal of Food Science,* 52*,* 15-21, 27.

Montejano JG, Hamann DD & Lanier TC, 1985. Comparison of two instrumental methods with sensory texture of protein gels. *Journal of Texture Studies*, 16, 403-408.

Morales OG, Ramirez JA, Vivanco DI & Manuel V, 2001. Surimi of fish species from the Gulf of Mexico: evaluation of the setting phenomenon, *Food Chemistry*, 75, 43-48.

Oakenfull D, Pearce J & Burley RW, 1997. Protein gelation. In: *Food proteins and their applications*. Damodaran S & Paraf A (Eds), pp 111-142. Marcel Dekker, New York: Inc.

Ochiai Y, Ochiai L, Hashimoto K & Watabe S, 2001. Quantitative estimation of dark muscle content in the mackerel meat paste and its products using antisera against myosin light chains. *Journal of Food Science,* 66*,* 1301-1305.

Ohshima T, Suzuki T & Koizumi C, 1993. New developments in surimi technology. *Trends in Food Science & Technology,* 4*,* 157-159.

Ohshima T, Wada S & Koizumi C, 1988. Influences of heme pigment, non-heme iron, and nitrite on lipid oxidation in cooked mackerel meat. *Nippon Suisan Gakkaishi,* 54(12), 2165-2171.

Okada M, 1963. Elastic property of Kamaboko, *Bulletin of the Tokai Regulatory Fisheries Research Laboratory,* 36, 22-126.

Osatomi K, Sasai H, Cao M, Hara K & Ishihara T, 1997. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from Carp Cyprinus carpio ordinary muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 116, 183-190.

Pacheco-Aguilar R & Crawford DL, 1994. Effect of potassium bromate in the gel forming ability of Pacific whiting (*Merluccius products*) surimi, *Journal of Food Science,* 59, 786-791.

Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME & Robles-Burgueňo MR, 2000. Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. *Journal of Food Science*, 65(1), 40-47.

Pacheco-Aguilar R, Ramírez-Suárez JC & Mazorra-Manzano MA, 2001. Effect of Alkaline and Acidic Wash Treatments on Functional Properties and Color of Monterey Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Minced Flesh. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10, 85-99.

Perez-Borla O, Martone CB & Sanchez JJ, 1998. Protease inhibitor system in fish muscle: a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 119, 101-105.

Perez-Borla O, Roura SI, Montecchia CL, Roldan H & Crupkin M, 2002. Proteolytic Activity of Muscle in Pre- and Post-Spawing Hake (*Merluccius hubbsi Marini*) After Frozen Storage, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35, 325-330.

Pérez-Mateos M & Lanier TC, 2006. Comparison of Atlantic menhaden gels from surimi processed by acid or alkaline solubilization. *Food Chemistry*, In press.

Phatcharat S, Benjakul S & Visessanguan W, 2005. Effects of washing with oxidising agents on the gel-forming ability and physicochemical properties of surimi produced from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, In press.

Ramirez JA, Rodriguez-Sosa R, Morales OG & Vaszquez M, 2000. Surimi gels from stripped mullet (*Mugil cephalus*) employing microbial transglutaminase, *Food chemistry*, 70, 443-449.

Ramírez-Suárez JC, Pacheco-Aguilar R & Mazorra-Manzano MA, 2000. Washing effects on gelling properties and color of Monterey sardine (Sardinops sagax caerulea) minced flesh. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(2), 55-67.

Rawdkuen S, Benjakul S, Visessanguan W & Lanier TC, 2005. Combination effects of chicken plasma protein and setting phenomenon on gel properties and cross-linking of bigeye snapper muscle proteins, *LWT Food Science & Technology*, 38, 353-362.

Renerre M & Labas R, 1987. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Science,* 19, 151-165.

Saeed S, Fawthrop SA & Howell NK, 1999. Electron spin resonance (ESR) study on free-radical transfer in fish lipid-protein interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 79*,* 1809-1816.

Shenouda SYK, 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Advances in Food Research,* 26, 276-302.

Shahidi F, 1994. Seafood proteins and preparation of protein concentrates. In: *Seafoods Chemistry, Processing technology and quality*, Shahidi F and Botta JR (Eds), pp 3-8. Blackie academic & professional, London.

Shimizu Y, Haruhiko T & Lanier TC, 1992. Surimi production from fatty and darked-fleshed fish species. In: *Surimi technology*. Lanier TC and Lee CM (Eds), pp 181-207, Marcel Dekker, New York.

Shimizu Y, Toyohara H & Lanier TC, 1992. Surimi production from fatty and dark-fleshed fish species. In: *Surimi technology.* Lanier T. C. and Lee C.M. (Eds). pp 181-207. Marcel Dekker, New York.

Shimizu Y & Wendakoon CN, 1990. Effects of maturation and spawning on the gel-forming ability of Lizard fish (*Saurida elongata*) muscle tissues. *Journal of Science and Food Agriculture,* 52, 321-338.

Siebert G & Schmitt A, 1965. Fish Tissue Enzymes and their Role in the Deteriorative Changes in Fish. In: *The Technology of Fish Utilization.* Fishing News (Books) Ltd, London.

Sikorski ZE. 1994. The myofibrillar proteins in seafoods. In: *Seafood proteins.* Sikorski ZE, Pan BS & Shahidi F (Eds), pp. 40-57. Chapman & Hall, New York.

Sikorski ZE & Kolakowska A. 1994. Changes in proteins in frozen stored fish. In: *Seafoods Proteins*. Sikorski ZE, Pan BS & Shahidi F (Eds). pp. 99-112, Chapman & Hall, New York.

Sikorski ZE, Kolakowska A & Pan BS, 1990. The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In: *Resources, Nutritional Composition, and Preservation Seafood.* Sikorski ZE (Ed), pp 30-54. CRC Press, Boca Raton.

Spinelli J & Dassow JA. 1982. Fish proteins: their modification and potential uses in the food industry. In: *Chemistry* & *biochemistry of marine food products.* Martin RE, Flick GJ & Ward DR. (Eds), pp 13-25. AVI, Westport.

Suvanich V, Marshall DL & Jahncke ML, 2000. Microbiological and color quality changes of channel catfish frame mince during chilled and frozen storage. *Journal of Food Science*, 65(1), 151-154.

Suzuki T, 1981. Fish and Krill Proteins, Processing Technology. pp 115-143. Applied Science Publishers Ltd., London

Tamoto T, 1971. Effect of leaching on the freezing denaturation of surimi proteins, *New Food Industry,* 13, 61-69.

Toyoda K, Kimura I, Fujita T, Noguchi SH and Lee CM, 1992. The surimi manufacturing process, In: *Surimi technology*. Lanier TC and Lee CH (Eds), pp 79-112, Marcel Dekker, New York, Hong Kong.

Trondsen T. 1998. Blue whiting surimi: new perspectives on the market value. *Fisheries Research,* 34, 1-15.

Uresti RM, Ramírez JA, López-Arías N & Vazquez M, 2003. Negative effect of combining microbial transglutaminase with low methoxyl pectins on the mechanical properties and colour attributes of fish gels, *Food Chemistry,* 80, 551-556.

Venugopal V and Shahidi F 1995. Value added products from under utilized fish species. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, 35(5), 431-453

Vermeylen R, Goderis B, Reynaers H & Delcour JA, 2005. Gelatinization related structural aspects of small and large wheat starch granules. *Carbohydrate Polymer*, 62(2), 170-181.

Vojdani F, 1996. Solubility. In: *Methods of testing protein functionality*, Hall GM (Eds), pp 11-60, Blackie Academic & Professional, New York.

Watabe S, Kamal M & Hashimoto K, 1991. Postmortem changes in ATP, creatinine phosphate, and lactate in sardine muscle. *Journal of Food Science,* 56, 151-153.

Wu J, Li CY, Ho ML & Jiang ST, 2000. Quality improvement of mackerel surimi with NADPH-sulfite reductase from *Escherichia coli. Journal of Food Science,* 68*,* 1400-1403.

Wu MC, Akahane T, Lanier TC & Hamann DD, 1985b. Thermal transitions of actomyosin and surimi prepared from Atlantic croaker as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science*, 50(1), 10-13.

Wu MC, Lanier TC & Hamann DD, 1985a. Thermal transitions of admixed starch/fish protein systems during heating. *Journal of Food Science,* 50(1), 20-25.

Yang H & Park JW, 1998. Effects of starch properties and thermal-processing conditions on surimi-starch gels. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie,* 31(4), 344-353.

Zayas JF, 1997. Functionality of Proteins in Food, pp 6-75 & 331-334. Berlin: Springer.

Zhou A, Benjakul S, Pan K, Gong J & Liu X, 2005. Cryoprotective effects of trehalose and sodium lactate on tilapia (*Sarotherodon nilotica*) surimi during frozen storage. *Food Chemistry*. In press.

Zotos A & Taylor KDA. 1996. Partial purification and characterization of proteases from Norway lobster (Nephrops norvegicus) and their role in the phenolase activation process. *Food Chemistry,* 56(1), 61-68.

8. Appendix

Journal of Food Engineering

The effect of initial wash at acidic and alkaline pHs on the properties of protein concentrate (kamaboko) products from sardine (*Sardina pilchardus*) samples.

Panayotis D. Karayannakidis, Anastasios Zotos*, Dimitrios Petridis and K.D.A. Taylor

Technological Educational Institute (TEI) of Thessaloniki, School of Food Technology and Nutrition, Department of Food Technology, 57400 Thessaloniki, P.O. Box 141, Greece.
Authors Panayotis D. Karayannakidis, Anastasios Zotos and Dimitrios Petridis are affiliated with Technological Educational Institute of Thessaloniki, School of Food Technology and Nutrition, Department of Food Technology, Greece.
Author Prof. K.D.A. Taylor is Head of Food Research Centre, Department of Biological Sciences, Faculty of Health and Life Sciences, University of Lincoln, UK.

Abstract

Sardine samples were initially washed at acidic (2.50, 4.00 and 5.50) and alkaline (8.50, 10.00 and 11.50) pHs, followed by two washing cycles at pH 7.2±0.15. Final recoveries for total solids were 77.5, 71.5 and 63.1% at 4.00, 2.50 and 5.50 pHs and 48.3, 43.3 and 29.3% at 8.50, 10.0 and 11.5 pHs respectively. Consequently, similar were the results for protein recoveries (higher at acidic conditions) and lipid elimination (higher at alkaline conditions), indicating higher solubility of molecules in alkaline

solutions. Lightness and whiteness index improved due to washing cycles, the thermal process further increased them and this was more evident in the samples washed at acidic conditions ($p<0.05$). Kamaboko gels washed at acidic conditions showed higher values in firmness and more cohesive and elastic texture ($p<0.05$). Evaluation analysis using sum scores revealed that initial wash at pH 5.50 is the most suitable treatment for kamaboko gels from sardine.

*to whom correspondence should be addressed.

Key words: kamaboko, pH, washing efficiency, colour properties, gel properties

Introduction

The use of alternative fish species in order to obtain surimi of good gel-forming ability is one of the aims of the fishing industry. Due to Its high potential for capture and its low price, there is a sustained interest at present in small pelagic species (Alvarez, Couso, Solas and Tejada, 1992). However, the use of pelagic species with a high lipid content, like sardine, presents particular problems, mainly due to the high lipid content, which depends on the season, showing a maximum of 220g kg^{-1} fish around September and a minimum of 10g kg^{-1} during February (Mendes, Gómez-Guillén and Montero, 1997; Esquivel *et al*., 1997).

Other problems faced with producing surimi from small pelagic species, such as sardine, is the dark muscle content, poor stability and, in some cases, the presence of histidine, which rapidly changes after death into histamine, a possible cause of allergy (Suzuki, 1981, Hall and Ahmad, 1997). Moreover, dark muscles, both superficial and deep-seated, contain more hemoglobin and myoglobin, which play an essential role in the whiteness, one of the factors determining the

quality of surimi (Chaijan, Benjakul, Visessanguan and Faustman, 2004).

Ochiai, Ochiai, Hashimoto and Watabe, (2001) reported that in order to prepare high-quality surimi and process it into kamaboko of higher gel strength and better whiteness, it is necessary to remove dark muscle as much as possible. However, attempts to remove dark muscle with a meat separator at higher levels in processing resulted in lower yield of surimi and higher costs of the products. Thus, an intensive washing protocol is required in order to produce high quality surimi, which ideally should have good gel-forming ability, elastic texture, good taste and white appearance (Pacheco-Aguilar, Ramírez-Suárez and Mazorra-Manzano, 2001).

The objective of this study was to apply six different washing treatments at acidic (2.50, 4.00 and 5.50) and alkaline (8.50, 10.00 and 11.50) pH areas for protein concentrate (kamaboko) production from sardine (*Sardina Pilchardus*) and to evaluate their effect on washing efficiency, colour and gels properties of the final product.

Materials & Methods

Materials

Fresh sardines (*Sardina pilchardus*) were purchased from the local fish-market of Thessaloniki (permanent supplier of the department) during the period of November 2004 to February 2005. Sardine samples were covered with crushed ice, in order to avoid temperature rise during transportation, and directly brought to the laboratory for further processing. Whole sardines (size: 11.7 – 16.1 cm; weight: 13.6 – 33.4 g) were processed into skinless fillets

manually and minced using a Clatronic FW 2684 mincing machine with a 3mm plate.

Kamaboko production

Washing conditions

Equal portions of sardine mince (~500g) were weighed in a 2L beaker and washed in a ratio of 3:1, washing medium:sardine mince respectively, for 10min under continuous agitation. The average temperature during washing was 11.8±1.4^{o}C.

Three washing cycles were applied as follows:

1st washing cycle: In order to ascertain the effect of pH on the quality of kamaboko, six (6) different pHs were studied (2.50, 4.00, 5.50, 8.50, 10.00 and 11.50). The acidic pHs (2.50, 4.00 and 5.50) were obtained using 0.1M $NaH_2PO_4.H_2O$ solution, which was further enforced (for low pHs 2.50 and 4.00) with gradually added 85% H_3PO_4. The alkaline pHs (8.50, 10.00 and 11.50) were achieved using 0.1M $Na_2HPO_4.2H_2O$, which was also further enforced (for high pHs 10.00 and 11.50) with gradually added 30% NaOH solution. All samples were washed at the above pHs for 10min.

2nd washing cycle: All above pHs were readjusted in the range of 7.00 – 7.50 with phosphate solution (0.1M $Na_2HPO_4.2H_2O$ solution was adjusted in the range of 7.00 – 7.50 with gradually added 85% H_3PO_4). All samples were washed at the above pH for 10min.

3rd washing cycle: Final wash of sardine mince was conducted with 0.3% NaCl solution in order to facilitate dewatering. All samples were washed at the above solution for 10 min. The moisture content of the washed sardine mince samples was adjusted in the range of 78 – 80% using a cheesecloth.

Gel preparation

The washed sardine mince samples were (a) mixed for 1min with salt equivalent to 2.5% of the mince's weight, (b) stuffed into metal rings of uniform dimensions (9.7mm height, 25mm diameter), (c) vacuum-sealed in moisture/vapour-proof film bags, (d) preheated at 40°C for 40min, (e) heated at 90°C for 30min and (f) held in refrigeration overnight prior to texture evaluation.

pH measurement

The pH of sardine flesh was measured with a Hanna Instruments HI 8424 microcomputer pH-meter. Samples were prepared according to Cortés-Ruiz, Pacheco-Aguilar, García-Sánchez and Lugo-Sánchez, (2001) by blending 2g of sardine mince with 18mL of distilled water.

Washing efficiency

Washing efficiency was estimated as reported by Pacheco-Aguilar *et al*., (2001) as the percent recovery of total solids and proteins and the percent removal of lipids and ash:

% recovered total solids or proteins=(amount of solids or proteins recovered after washing)/(amount of solids or proteins of unwashed mince)%;

% removed lipids or ash=100-[(amount of lipids or ash recovered after washing)/(amount of lipids or ash of unwashed mince)%].

Proximate analysis

Moisture content was determined by the CEC (Commission of European Communities) recommended method ISOR 1442 (CEC, 1979). The lipid content was determined by the Bligth and Dyer (1959) method as modified by Hanson and Olley (1963). Total protein (crude protein, N x 6.25) content of sample was determined using the Kjeldahl method according to standard AOAC methods (1990). The ash content was determined by mineralisation at 550°C according to standard AOAC methods (1990)

Assay of protease activity

Protease activity was measured in surimi wash water, which was collected after the first, second and third washing cycle. The reaction mixture contained 2.5mL of 0.5% casein in 0.1M phosphate buffer pH 7.00 and 0.3mL of the liquid waste. The mixture was incubated in a water bath at 40°C for 30min. Then, 2.8mL of 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) were added to stop the reaction and to precipitate protein. The mixture was allowed to stand for 1h at room temperature. The precipitate was removed by filtration through Whatman No1 filter paper. The absorbance of the supernatant was measured using a Spectronic 601 (Bausch & Lomb) spectrophotometer at 280 nm in a 1cm silica cell. A blank was run by adding the enzyme solution after TCA was added (Zotos and Taylor, 1996). One unit (U) of protease is defined as the amount of enzyme that catalyses the release of one µmol of L-tyrosine per minute under the above assay conditions (Alam, Dube, Reddy, Bhattacharya, Shivaji and Singh, 2005). All analyses were carried out in duplicate.

Colour measurement

Colour was not measured directly on the fish fillet surface. Unwashed and washed sardine mince were put in transparent petri dishes, while a transparent membrane was used in the case of heat-induced gels. The colour measurement was conducted using a colour difference measuring instrument ("Micro Color LMC" Colorimeter, DR LANGE, Germany), which is a tristimulus colourimeter with the following optical structure. An Ulbricht globe, in conjunction with xenon flash lamp, which generates lightning conditions approximating those of standard illuminant D 65 and standard observer 10°, served to diffusely illuminate the sample to be measured. The diffuse reflection of the sample at an angle of 8° is measured in accordance with German Industrial Standard DIN 5033. Each measurement was repeated three times for each sample. L* (lightness/ darkness), a* (redness/ greenness) and b* (yellowness/ blueness) were measured and whiteness index was calculated using the following equation: $WI=100-[(100-L^*)^2+a^{*2}+b^{*2}]^{1/2}$ (Lanier, 1992).

Textural measurements

Texture analysis was performed using an Instron Universal Testing Machine Model 1140 (Instron Ltd UK) with a flat probe of 6.0cm diameter attached to a 50kg load cell. Deformation rate was set at 80mm min^{-1} and compression forces at 75% (double byte analysis). Three (3) textural parameters were determined by the compression

curve: firmness, cohesiveness and elasticity. The mean value of at least 6 replicates per washing treatment was determined.

Statistical analyses

One-way analysis of variance was employed on the variables of the study to find potential significant effects of the various pH treatments. Whenever significant effects were detected, the Student-Newman-Keuls multiple range test of mean comparisons between pH levels was applied (Zar, 1984).

To elucidate the effects of the chemical variables as independent set on the mechanical characteristics of the product, taken as dependent variables, at increasing pH levels of the product samples, a redundancy analysis was used as described by Ter Braak & Jaap (1994), and performed by the CANOCO statistical software (Ter Braak & Smilauer, 2002). In simple terms, the set of chemical variables is regressed against the major axes 1 and 2 composed by the principal component analysis between pH treatments and mechanical profile of the product.

Washing procedures were evaluated by standardizing all variables, in the range from –1 to +1, and summing them up. The washing process with the highest scores was then suggested as the most suitable for kamaboko production from sardine samples.

Results & Discussion

Muscle composition

The effect of sampling period on weight, size, pH and filleting yield of sardines is shown in Table 1. The one-way analysis of variance

revealed that there were no differences on the weight of sardines ($p \geq 0.05$) obtained between 24th November 2004 and 08th February 2005. Similar results were also observed for the total size of sardines (including head and caudal fin) with the exception of the samples obtained on 16th December 2004, whereat an increase on the total size of the samples has been observed ($p < 0.05$) (Table 1). These results indicate that sardine samples were quite similar during the period they have been obtained, thus the possibility to affect kamaboko properties was minimized. The average yield due to filleting was found 34.83±2.11%, very similar with the 34.8±2.6% average yield for sardine (*Opisthonema libertate*) reported by Cortés-Ruiz *et al*., (2001).

Table 1. Effect of the sampling period on the weight, size, pH and yield due to filleting of sardines.

Sampling period	Weight (g)[1]	Total size (cm)[1]	pH	Yield (%)
24 Nov. 2004	24.80±3.49[a]	13.98±0.73[a]	6.86	33.18
08 Dec. 2004	23.12±4.36[a]	13.34±0.87[a]	6.26	33.40
16 Dec. 2004	20.48±3.58[a]	14.96±0.92[b]	6.26	34.09
13 Jan. 2005	21.23±4.98[a]	13.53±1.20[a]	6.16	33.56
20 Jan. 2005	22.23±4.99[a]	13.31±1.09[a]	6.23	36.28
08 Feb. 2005	22.64±2.86[a]	13.56±0.92[a]	6.31	38.46

[1] Values are means of 10 fold determinations ± standard deviations. Means in the same column with the same superscript are statistically equal ($p \geq 0.05$).

The chemical composition of the unwashed sardine mince as related to sampling period is shown in Table 2. A variation in sardine muscle composition was observed with lipid being the most predominant component. However, a lipid variation from 0.97 to 2.86% and 4.70 to 12.46% on wet and dry weight basis respectively was not considered as quite wide for sardine samples. It has been reported by Nunes *et*

al., (1992) for Atlantic sardine (*Sardina pilchardus*) variation in lipid content from 4.9 to 11.1% (wet weight basis) as well as for Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) from 10.2 to 36.8% (dry weight basis) (Pacheco-Aguilar *et al*., 2001), while Shirai, Terayama and Takeda (2002) reported a range from 1.8 to 7.2% (wet weight basis) for Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). The above variations should be expected since lipid content in sardine is a season dependent phenomenon. In this study, lipid content was considered low (0.97 – 2.86% wet weight basis), which could favour the application of the proposed methodology for such fish species.

Table 2: Effect of the sampling period on chemical composition of unwashed sardine mince.

Sampling Period	% Moisture	Dry weight basis		
		% Protein	% Lipid	% Ash
24 Nov. 2004	77.77±0.38[a]	86.53±0.61[a]	12.46±0.24[a]	6.52±0.13[a,b]
08 Dec. 2004	77.48±0.66[a]	85.73±0.40[a]	8.67±0.27[b]	6.20±0.07[a,b]
16 Dec. 2004	76.57±0.25[a]	84.49±1.47[a]	12.22±0.74[a]	6.05±0.17[b]
13 Jan. 2005	79.25±0.89[b]	94.12±3.59[b]	4.70±0.37[c]	6.48±0.24[a,b]
20 Jan. 2005	77.24±0.12[a]	90.64±0.77[b]	5.95±0.16[d]	6.81±0.27[a]
08 Feb. 2005	77.26±0.41[a]	95.06±3.75[b]	6.20±0.19[d]	7.31±0.44[c]

Values are means of triplicate determinations ± standard deviation. Means in the same column with the same superscript are statistically equal ($p \geq 0.05$).

Process yields

The effect of washing treatments on the % recovery of total solids and proteins is shown in Figures 1 and 2. It can be observed that the

acidic wash treatments led in products with higher recovery of total solids and proteins, while higher losses occurred in sardine mince samples washed at alkaline conditions ($p<0.05$). It was reported by Kristonsson & Hultin (2003) studing the structural changes of cod myosin at pH 2.5 and 11 and after subsequent pH readjustment to pH 7.5, that on acid unfolding, the myosin rod may fully dissociate due to electrostatic repulsion within the coiled coil, while it does not dissociate at alkaline pH. Both pHs led to significant conformational changes in the globular head fraction of the myosin heavy chains, suggesting that it takes on a molten globular configuration. On pH readjustment to neutrality, the heavy chains take on a structural form similar to the native state with the coiled-coil rod reassociating from acid pH while leaving the globular head less packed, more hydrophobic and structurally less stable.

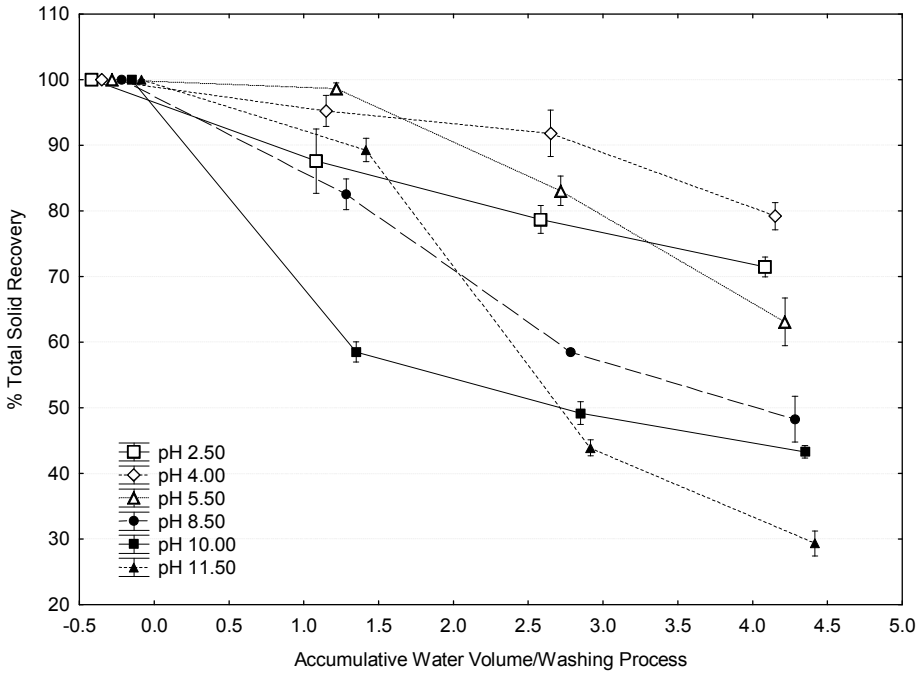


Fig 1: Effect of different washing conditions on % recovery of solids of sardine mince.

Furthermore, dark muscles have a larger amount of alkali soluble proteins than ordinary ones (Chaijan, Benjakul, Visessanguan and Faustman, 2004). Similar results have been reported by Chen, Chiu and Huang (1997) during washing of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) mince. In their study, the total protein recovery of mince washed with alkaline solution was lower than that washed with cold water or ozonized water for the same washing time. SNK's multiple range test of mean comparisons for protein recovery resulted in the following descending order: $pH_{4.00}=pH_{2.50}>pH_{5.50}>pH_{8.50}>pH_{10.00}>pH_{11.50}$. A quite similar pattern was also observed for total solid recovery $pH_{4.00}>pH_{2.50}>pH_{5.50}>pH_{8.50}>pH_{10.00}>pH_{11.50}$.

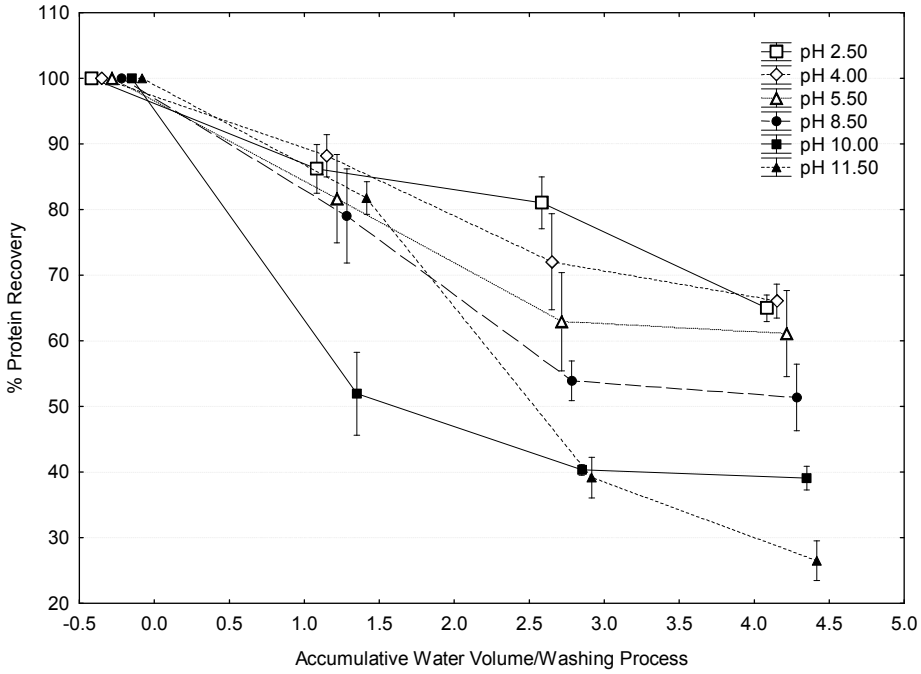


Fig 2: Effect of different washing conditions on % recovery of proteins of sardine mince.

Moreover, it was found that washing in alkaline solutions was more effective in removing lipids from the unwashed sardine mince ($p<0.05$). (Figure 3). Chen *et al*., (1997) reported that oil elimination efficiency of horse mackerel mince washed with alkaline solution was greater than that washed with cold water or ozonized water. In the present study, lipid elimination efficiency reached a maximum of 73.29% when sardine mince was washed at pH 11.50, while a minimum was observed for sardine mince samples washed at pHs 2.50 and 4.00 with average values of 33.84% and 37.28%, respectively. However, washing near the isoelectric point of fish muscle proteins (pH 5.50) enabled more efficient removal of lipids (58.9%) than washing at the other acidic processes ($p<0.05$). Since pH adjustment was near the pI, most proteins precipitated out; hence lipids were easily released to the surface by differences in density (Pacheco-Aguilar *et al*., 2001). The pattern obtained for lipid removal as indicated by SNK's multiple range test of mean comparisons was as follows: $pH_{11.50}>pH_{8.50}=pH_{5.50}=pH_{10.00}>pH_{4.00}=pH_{2.50}$.

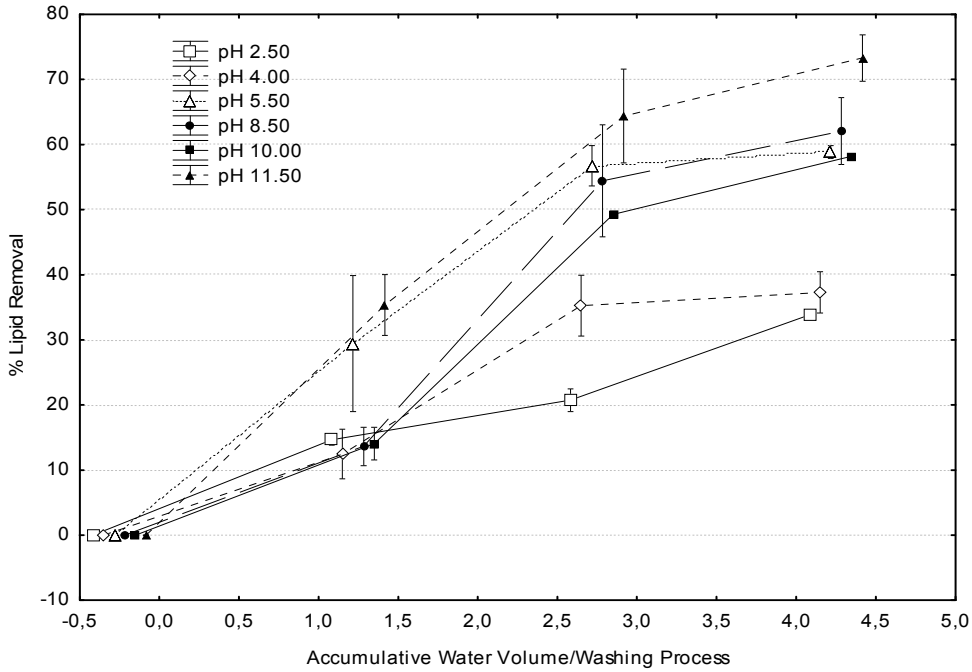


Fig 3: Effect of different washing conditions on % lipid removal of sardine mince

Differences between the washing treatments were also observed in ash removal ($p<0.05$) as shown in Figure 4. These results may indicate that the excess in addition of phosphates, to achieve low pHs, can contribute in the increase of the ash content during the first and second washing exchange.

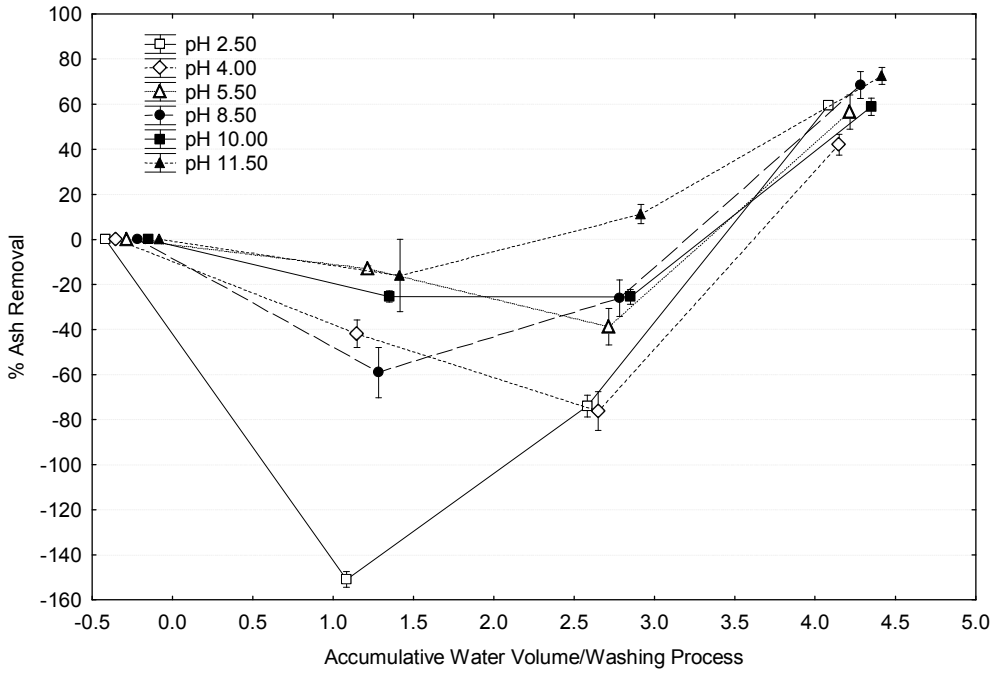


Fig 4: Effect of different washing conditions on % ash removal of sardine mince.

Protease activity

The presence of proteases in sardine muscle tissue was supported by the proteolytic activity detected in the wastes of the three washing exchanges. Generally, proteases were mainly removed at the first washing treatment (6883±630 U) and thereafter protease activity showed a downward trend (2196±460, 822±271 U). However, no differences ($p>0.05$) were observed in overall protease activity between the treatments (9901±982 U), indicating that the initial wash at different pHs can hardly affect protease removal. Hence, protease activity was omitted from CANOCO analysis. Dewitt and Morrissey (2002) reported that surimi process water carries not only proteases, but also myofibrillar proteins, heme pigments and other bioactive substances. Therefore, recovery of these bioactive compounds from

process waters would serve to increase economic value and better utilize out natural resources.

Colour properties

The unwashed sardine mince sample (control) showed a dark green/yellow hue with average values for L*, a*, b* and whiteness index of 31.1, –5.2, 3.8 and 30.8, respectively (Tables 3 & 4). It has been suggested that the initial dark colour of the mince occurring immediately after deboning is caused by structural damage and the release of black melanin pigments from the skin (Hutchings, 1999). Insufficient removal of the kidney tissue and black peritoneum may lead to darkening as well (Suzuki, 1981). Since both kidney tissue and black lining of the belly cavity were removed during filleting, the dark colour of the unwashed sardine mince was considered to be attributed mainly to the contamination of fish muscle from skin pigments.

Table 3: Colour parameters L*, a*, b* and whiteness index of unwashed and washed sardine mince

Processes	L*	a*	b*	WI
Control	31.1 ± 1.5^{a}	$-5.2\pm2.1^{a,b}$	3.8 ± 1.2^{a}	30.8 ± 1.6^{a}
pH2.50	43.4 ± 1.4^{b}	-3.9 ± 0.6^{a}	5.2 ± 0.3^{a}	43.0 ± 1.4^{b}
pH4.00	40.4 ± 0.2^{c}	$-6.0\pm0.1^{a,b}$	1.6 ± 0.6^{b}	40.1 ± 0.2^{c}
pH5.50	37.5 ± 0.6^{d}	$-5.2\pm0.3^{a,b}$	$-2.0\pm0.9^{c,d}$	37.3 ± 0.6^{d}
pH8.50	$38.3\pm0.6^{c,d}$	$-4.4\pm2.0^{a,b}$	-1.3 ± 0.3^{c}	$38.1\pm0.6^{c,d}$
pH10.00	36.2 ± 1.3^{d}	$-6.3\pm2.1^{a,b}$	-2.9 ± 0.9^{d}	35.8 ± 1.5^{d}
pH11.50	31.7 ± 0.5^{a}	-9.0 ± 1.0^{b}	$-1.8\pm1.3^{c,d}$	31.1 ± 0.6^{a}

Values are means of 18 determinations ± standard deviation for unwashed sardine mince and 3 determinations ± standard deviation for washed sardine mince samples. Means in the same column with the same superscript are statistically equal ($p\geq0.05$).

Other chemical groups that involve in the colour of the fish flesh are the heme pigments: hemoglobin and myoglobin, which are the most abundant compounds found in vivo (Wilska-Jeszka, 1997; Hutchings 1999; Baron and Andersen, 2002). Therefore, it was assumed that the brown colour of the unwashed sardine mince and consequent loss in redness were due to the oxidation of myoglobin (purplish red) to metmyoglobin (brown) during the filleting and mincing processes (von Elbe, 1986; Wilska-Jeszka, 1997). Fish oil pigment oxidation may have also contributed in the development of the yellow or brown colour of the unwashed sardine mince (Hutchings, 1999; Wetterskog & Undeland, 2004). Hutchings (1999) reported that holding the fish on ice before filleting results in a darker red or brown colour as the hemoglobin oxidizes. However, the contribution of the latter in the colour of the unwashed sardine mince was not considered significant since hemoglobin is lost rather easily during handling and storage, while myoglobin is retained by the muscle intracellular structure (Chaijan *et al*., 2004).

Generally, washing had a beneficial effect on the colour of the protein concentrates, when compared with the control, resulting in higher L* values and whiteness index as shown in Table 3 ($p<0.05$). The only exception was the sardine mince washed at pH 11.50 which accodring to SNK's multiple range test of mean comparisons revealed no statistical differences from the control. Further improvements in the degree of lightness and whiteness index were achieved during heating, which reflected the increasing opacity of the gels, due to protein denaturation and aggregation and this was more evident in the samples washed at acidic conditions (Klesk,

Yongsawatdigul, Park, Viratchakul and Virulhakul, 2000). Similar results have been reported by Chen *et al*., (1997). In their study, the L* values and whiteness index of washed mince were lower than that of kamaboko.

The a* values of the protein concentrates were in all cases negative and differentiated between treatments ($p<0.05$) reaching a minimum during alkaline washing at pH 11.50, indicating high greenness (–a*) (Table 3). Although the one-way analysis of variance detected statistically significant differences between the applied treatments for this colour trait (a*) ($p<0.05$), however, comparison of data means revealed no differences between control and the produced protein concentrates as well as their heat-induced gels.

Modification of the pH during washing showed a significant effect on the b* values of the protein concentrates ($p<0.05$). Sardine mince samples subjected to processes $pH_{2.50}$ and $pH_{4.00}$ presented a yellow hue (+b*), while a blue hue (–b*) was observed for the alkaline treated protein concentrates and sardine mince washed near the pI of muscle proteins (Table 3). However, a marked increase in the b* values of the heat-induced gels was observed and ascribed to the formation of the brown denatured globin hemichromes (Hutchings, 1999).

Table 4: Colour parameters L*, a*, b* and whiteness index of unwashed sardine mince and heat-induced gels.

Processes	L*	a*	b*	WI
Control	31.1±1.5[a]	-5.2±2.1[a]	3.8±1.2[a]	30.8±1.6[a]
pH2.50	51.5±1.6[b]	-4.8±0.6[a]	10.8±0.4[b]	50.1±1.5[b]
pH4.00	63.4±0.5[c]	-2.7±0.1[a]	9.2±0.8[b,c]	62.2±0.3[c]
pH5.50	61.1±0.9[c]	-4.6±0.3[a]	5.3±0.1[a]	60.4±0.9[c]
pH8.50	58.5±1.0[d]	-6.2±0.1[a]	4.1±1.6[a]	57.8±1.1[d]
pH10.00	57.0±1.6±[d]	-4.3±0.4[a]	7.4±1.4[c]	56.1±1.3[d]
pH11.50	±57.7±0.7[d]	-4.3±0.4[a]	8.5±0.9[b,c]	56.6±0.6[d]

Values are means of 18 determinations ± standard deviation for unwashed sardine mince and 3 determinations ± standard deviation for heat-induced gels. Means in the same column with the same superscript are statistically equal ($p \geq 0.05$).

Gel properties

The effect of different washing treatments on the mechanical properties of the produced gels is shown in Table 5. Generally, washing at acidic conditions resulted in highly firm kamaboko gels ($p<0.05$). Maximal gel firmness was attained by washing the sardine mince at pH 2.50, while sardine mince samples washed at pHs 10.00 and 11.50 yielded the most brittle gels. In addition, washing sardine mince at pHs 4.00 and 11.50 resulted in significantly less cohesive gels ($p<0.05$). The acid washed sardine protein concentrates produced gels that exhibited more elastic behaviour ($p<0.05$), indicating a fine, more homogeneous structure. This has also been observed by Pan (1986).

Table 5. Textural characteristics of heat-induced gels produced from washed sardine mince

Processes	Firmness (N)	Cohesiveness	Elasticity (mm)
$pH_{2.50}$	327.98±125.57[a]	0.397±0.08[a]	5.30±0.44[a]
$pH_{4.00}$	172.24±33.72[b]	0.293±0.06[b]	4.72±0.67[a,b]
$pH_{5.50}$	140.89±28.37[b,c]	0.382±0.13[a,b]	5.33±0.42[a]
$pH_{8.50}$	120.66±21.84[c]	0.299±0.08[a,b]	5.03±0.57[a,b]
$pH_{10.00}$	63.72±10.65[d]	0.323±0.05[a,b]	4.46±0.88[b]
$pH_{11.50}$	56.27±16.43[d]	0.284±0.09[b]	2.96±0.55[c]

Values are mean ± standard deviation of at least 6 replicates. Means in the same column with the same superscript are statistically equal ($p \geq 0.05$).

Five factors have been reported to affect the gelling properties of fish muscle actomyosin: protein concentration, pH, ionic strength, time and temperature of heating (Zayas, 1997). Since the final pH of all treatments was adjusted at an average of 7.21±0.15 and the protein concentrates were subjected to similar processing conditions (mixing with salt equal to 2.5% of the mince's weight for 1min, preheated at 40°C for 40min and heated at 90°C for 30min), it was assumed that protein-protein interactions were affected in the same degree during gel formation. In addition, final moisture content of the washed sardine mince was adjusted in the range of 78 – 80%. However, the dewatering process became difficult for the samples washed at pHs 10.00 and 11.50. Neither pH readjustment in the range of 7.00 – 7.50 nor the use of 0.3% NaCl solution, during the second and third washing cycle, facilitated the dewatering process, resulting in protein

concentrates with moisture contents of 82.67% and 83.36%, respectively. Therefore, the observed differences in the textural characteristics of the produced fish gels were mainly attributed to differences in final moisture content as well as in the chemical composition of the dewatered sardine mince, since various amounts of proteins, lipids and ash were recovered by applying the acidic and alkaline washing treatments.

CANOCO analysis

Redundancy analysis presented that the overall dependent mechanical and explanatory (chemical) variables relation explained 98.6% of the total variation regarding the first two major axes. Mechanical variables alone, explained 75.1% of the total variation.

Three criteria of variable importance for the redundancy analysis, that is, forward selection of variables, t-values of the regression coefficients and interset correlation coefficients with axis 1 and 2, were employed (Ter Braak & Jaap, 1994). Total solids were omitted from further analysis due to high multicolinearity effects produced between chemical variables (variance inflation factor: 100.3>20, acceptable limit). The stepwise forward procedure revealed that protein recovery was the most important variable in the analysis (R^2=0.41) followed by lipid (R^2=0.22) and ash removal (R^2=0.14). All the above variables were important for a second reason: the t-values of their regression coefficients concerning the major axis 2 are statistically significant (greater than 2): 5.85, 7.31 and –5.62, respectively. Protein recovery and lipids removal showed good

interset correlation for axis 1 (0.732 and –0.719, respectively) and ash removal for axis 2 (-0.626).

Figure 5 gives a global view of the effect of all variables both dependent and explanatory on the six pH samples based on the results of the redundancy analysis. Variables with longer arrows are more important in producing effects, while those with the same direction show positive correlation. The intensity of this correlation increases as the angle between the variable diminishes. The opposite condition holds for arrows with opposing direction. Samples positioned close to an arrow of a variable show strong relationship. Thus, protein recovery and elasticity were strongly positively correlated and showed a negative response with lipids and ash removal. Whiteness showed the highest values at pHs 4.00 and 5.50 and the lowest at pH 2.50. Increasing values of lipids and ash removal were indicative of high pH values (10.00 and 11.50) and of low quality of firmness and cohesiveness of the product.

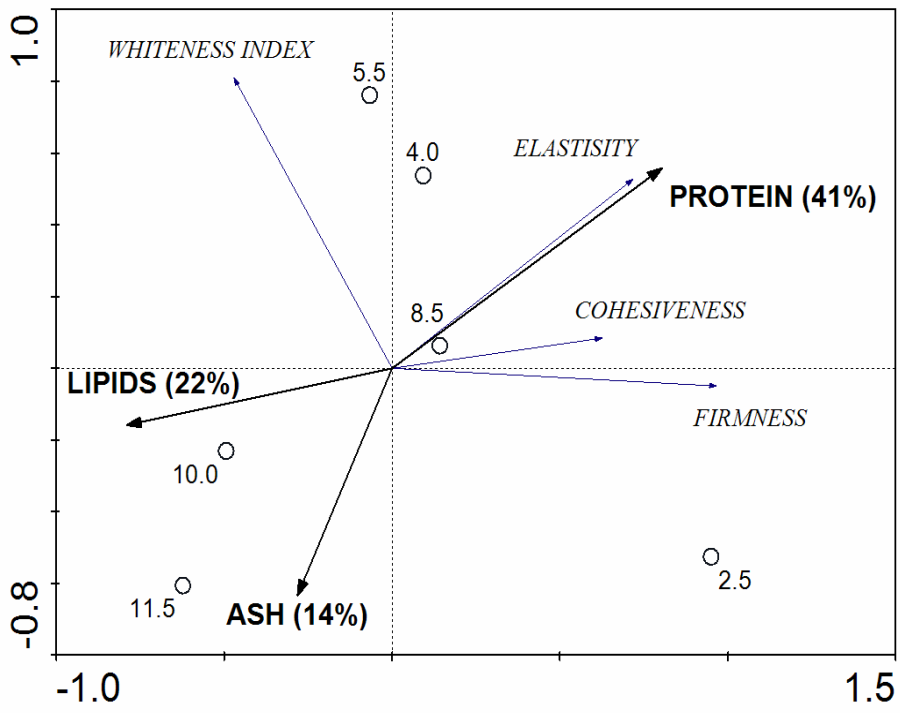


Fig. 5. Redundancy ordination analysis showing pH gradient as influenced by mechanical and chemical variables. Conditional R^2 percentages of the forward selection of variables are shown in brackets.

Sum Score Analysis

Sum scores analysis is shown in Table 6. All parameters were estimated as equivalent in their contribution to the properties of high quality protein concentrate gel products. As it can be revealed from Table 6 the most suitable treatment to prepare kamaboko gels from sardine mince was the one with higher values. Therefore, the sardine samples initially washed at pH 5.50 followed by those washed at pH 8.50 seem to lead in kamaboko gels with higher properties.

Table 6: The sum Scores of the parameters after being standardised (-1 to +1).

	Processes					
Parameters	$pH_{2.50}$	$pH_{4.00}$	$pH_{5.50}$	$pH_{8.50}$	$pH_{10.00}$	$pH_{11.50}$
Firmness	0.015	-0.524	-0.632	-0.702	-0.900	-0.925
Cohesiveness	-0.023	-0.442	-0.086	-0.417	-0.320	-0.477
Elasticity	0.614	0.275	0.632	0.457	0.122	-0.759
Whiteness	-0.749	0.972	0.721	0.348	0.106	0.182
Solids recovery	0.665	0.896	0.340	-0.235	-0.428	-0.969
Protein recovery	0.853	0.903	0.579	0.201	-0.355	-0.942
Lipid removal	-0.920	-0.758	0.258	0.437	0.228	0.938
Ash removal	0.123	-0.912	-0.044	0.670	0.092	0.955
Enzymes	-0.654	0.372	0.154	0.633	-0.514	-0.777
Sum scores	**-0.076**	**0.782**	**1.922**	**1.392**	**-1.969**	**-2.774**

Conclusions

The acidic wash treatments led in products with higher recovery of total solids and proteins while washing in alkaline solutions was more effective in removing lipids.

Lightness and whiteness index improved due to washing and further increased due to the applied thermal process, particularly in the samples washed at acidic conditions.

Kamaboko gels washed at acidic conditions was shown higher values in firmness and more cohesive and elastic texture

The CANOCO analysis revealed that protein recovery and elasticity were positively correlated. Whiteness showed the highest values at pHs 4.00 and 5.50. Increasing values of lipids and ash removal were

indicative of high pH values (10.00 and 11.50) and of low quality of firmness and cohesiveness of the product.

From the sum scores of the applied parameters in this work can be concluded that sardine samples initially washed at pH 5.50 can lead in high quality kamaboko gels.

References

Alam, S. I., Dube, S., Reddy, G. S. N., Bhattacharya, B. K., Shivaji S. & Singh, L. (2005). Purification and characterisation of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme and Microbial Technology, 36*, 824-831.

Alvarez, C., Couso, I., Solas, M. T., & Tejada, M. (1992). Influence of Manufacturing Process Conditions on Gels Made from Sardine Surimi. In K. D. Schwenke & R. Mothes (Eds), *Foods Proteins, Structure and Functionality*, (pp. 347-353). Weinheim: VCH.

AOAC (1990). Offcial methods of analysis (15th ed.). Washington DC: Association of Offcial Analytical Chemists.

Baron, C. P., & Andersen H. J. (2002). Myoglobin-Induced Lipid Oxidation. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3887-3897.

Bligth, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid oxidation and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37*, 911.

Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Faustman, C. (2004). Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry* (In press).

Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Faustman, C. (2004). Characteristics and gel properties of muscles from sardine (*Sardinella gibosa)* and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) caught in Thailand. *Food Research International*, 37, 1021-1030.

Chen, H-H., Chiu, E-M., & Huang J-R. (1997). Color and Gel-forming Properties of Horse Mackerel (*Trachurus japonicus*) as Related to Washing Conditions. *Journal of Food Science*, 62, 985-991.

Commission of European Communities, 1979. *Oven drying method* SQ 1442

Cortés-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., García-Sánchez, G., & Lugo-Sánchez, M. E. (2001). Functional Characterization of a Protein Concentrate from Bristly Sardine Made Under Acidic Conditions. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10, 5-23.

DeWitt, M. C. A., & Morrissey, M. T. (2002). Parameters for the recovery of proteases from surimi wash water. *Bioresource Technology*, 81, 241-247.

Esquivel, M. M., Bandarra, N. M., Fontan, I., Bernardo-Gil, M. G., Batista I., Nunes M. L., & Empis, J. A. (1997). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Sardine *Sardina Pilchardus* Oil. *Lebensmittel – Wissenschaft und - Technologie*, 30, 715-720.

Hall, G. M. and Ahmad, N. H. (1997). Surimi and fish mince products. In G. M. Hall, *Fish Processing Technology*, (2nd Ed, pp. 74-91). London: Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall.

Hanson, S. W. F., & Olley. J. (1963). Application of the Bligth and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal, 89,* 101.

Hutchings, J. B. (1999). Food Colour and Appearance, (pp. 414-416). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.

Klesk, K., Yongsawatdigul, J., Park, J. W., Viratchakul, S. & Virulhakul, P. (2000). Gel Forming Ability of Tropical Tilapia Surimi as Compared with Alaska Pollock and Pacific Whiting Surimi. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 3, 91-104.

Kristinsson, H. G. & Hultin, H. O. (2003). Changes in Conformation and Subunit Assembly of Cod Myosin at Low and High pH and after Subsequent Refolding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7187-7196

Lanier, T. C. (1992). Measurement of Surimi Composition and Functional Properties. In T. C. Lanier, & C. M. Lee, *Surimi Technology*, (pp. 123-163). New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc.

Mendes, R., Gómez-Guillén, C., & Montero, P. (1997). Effect of a new leaching technology on the textural characteristics of sardine mince. *Zeitschrift Fur Lebensmittel Untersuchung Und – Forschung*, 204, 113-120.

Nunes L. M., Cardinal, M., Mendes, R., Campos, M. R., Bandarra, N. M., Lourenço, H. & Jerome, M. (1992). Effect of season and storage on proteins and lipids of sardine (*Sardina pilchardus*) minces and surimi. In H. H. Huss, M. Jakobsen and J. Liston, *Quality Assurance in the Fish Industry*. (pp. 73-79). London: Elsevier.

Ochiai, Y., Ochiai, L., Hashimoto, K., & Watabe, S. (2001). Quantitative Estimation of Dark Muscle Content in the Mackerel Meat Paste and its Products Using Antisera Against Myosin Light Chains. *Journal of Food Science*, 66, 1301-1305.

Pacheco-Aguilar, R., Ramírez-Suárez, J. C., & Mazorra-Manzano, M. A. (2001). Effect of Alkaline and Acidic Wash Treatments on Functional Properties and Color of Monterey Sardine (Sardinops sagax caerulea) Minced Flesh. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10, 85-99.

Pan, B. S. (1986) Texture and Chemical Properties of Minced Fish Products as Affected by Physical Treatments. In O. R. Fennema, W-H Chang, & C-Y Lii, *Role of Chemistry in the Quality of Processed Food*, (pp. 225-237) Westport, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc.

Shirai, N., Terayama, M., and Takeda, H. (2002). Effect of season on the fatty acid composition and free amino acid content of the sardine *Sardinops melanostictus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 131, 387-393.

Suzuki, T. (1981). Fish and Krill Protein: Processing Technology, (pp. 62-113). London: Applied Science Publishers LTD.

Ter Braak, C. J. F. & Jaap W. (1994). On the statistical analysis of vegetation change: a wetland affected by water extraction and soil acidification. *Journal of Vegetation Science*, 5, 361-372.

Ter Braak, C. J. F. & Smilauer P. (2002). *CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination. Microcomputer Power*. (Version 4.5, pp. 500-501). New York: Ithaca.

von Elbe J. H. (1986). Changes in Plant and Animal Pigments During Food Processing. In O. R. Fennema, W-H Chang, & C-Y Lii, *Role of Chemistry in the Quality of Processed Food*, (pp. 42-44) Westport, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc.

Wetterskog, D., & Undeland, I. (2004). Loss of Redness (a*) as a Tool To Follow Hemoglobin-Mediated Lipid Oxidation in Washed Cod Mince. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7214-7221.

Wilska-Jeszka, J. (1997). Food Colorants. In Z. E. Sikorski, *Chemical and Functional Properties of Food Components*, (pp. 200-201). Lancaster, Basel: Technomic Publishing Co. Inc.

Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. (2nd Ed. p.190). Englewiid Cliffs, N.J: Prentice Hall Inc.

Zayas, J. F., (1997). Functionality of Proteins in Food, (pp. 6-75 & 331-334). Berlin: Springer.

Zotos, A. & Taylor K. D. A. (1996). Partial purification and characterization of proteases from Norway lobster (Nephrops norvegicus) and their role in the phenolase activation. *Food Chemistry, 56(1)*, 61-68.