

1. Εισαγωγή

Το κάπνισμα αποτελεί μέθοδο συντήρησης μιας ευπαθούς ομάδας τροφίμων όπως είναι τα αλιεύματα, αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής τους ως αποτέλεσμα της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης ορισμένων συστατικών του καπνού (φορμαλδεΐδη, φαινόλες) (Daun, 1979).

Η επεξεργασία του καπνίσματος εμπεριέχει και κάποιες άλλες διεργασίες όπως την ξήρανση, το αλάτισμα και την διεύθυνση συστατικών του καπνού που είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό χρώμα και άρωμα των αλιευμάτων. Το χρονικό διάστημα που θα μπορέσει να συντηρηθεί αναλλοίωτο ένα καπνιστό αλίευμα εξαρτάται από τη διάρκεια του χρόνου ξήρανσης και επεξεργασίας και από τη μέθοδο καπνίσματος που θα εφαρμοστεί (Pigott & Tucker, 1990a).

Μελέτες έδειξαν ότι το κάπνισμα οδηγεί σε μείωση του pH των τροφίμων καθώς επίσης και της διαθέσιμης για τον ανθρώπινο οργανισμό λυσίνης (Siskos *et al.*, 2005).

Το υγρό κάπνισμα αποτελεί μια σχετικά νέα τεχνική επεξεργασίας για τα προϊόντα τροφίμων. Τα υγρά υδατοδιαλυτά συμπυκνώματα καπνού έχουν από καθόλου μέχρι υπερβολικά χαμηλές συγκεντρώσεις σε ουσίες με καρκινογόνες ιδιότητες (Guillen *et al.*, 1995), δίνουν προϊόντα με χαμηλές τοξικολογικές επιπτώσεις (χαμηλή συγκέντρωση ισταμίνης) και ελάχιστες απώλειες σε διατροφικά συστατικά.

Η διάρκεια ζωής των καπνιστών προϊόντων εξαρτάται από την συγκέντρωση βακτηρίων στην πρώτη ύλη, τη μείωση της a_w λόγω του αλατίσματος και της ξήρανσης, την

αποτελεσματική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας, την ποσότητα των συστατικών του καπνού που εισχωρούν στο προϊόν καθώς και από την θερμοκρασία, την υγρασία και το οξυγόνο κατά την διάρκεια της αποθήκευσης (Sikorski *et al.*, 1998).

Όπως ανακοινώθηκε από τους Muenker & Meyer (1994) η εφαρμογή του υγρού καπνίσματος δεν οδηγεί σε προϊόντα αποδεκτά ως προς το χρώμα, το άρωμα και τη γενικότερη εμφάνιση σε όλα τα αλιεύματα.

Σκοπός της εργασίας ήταν η παραγωγή καπνιστών φιλέτων πέστροφας (*Salmo gairdnerii*) με χρησιμοποίηση συμπυκνωμάτων καπνού σε τρεις (3) πιέσεις (1, 1,5 και 2bar) και σε τρεις χρόνους επεξεργασίας (30, 45 και 60min) μετά από προηγούμενη εκτίμηση των άριστων συνθηκών ξήρανσης και αλατίσματος. Η εκτίμηση της ποιότητας των καπνιστών προϊόντων με χημικές αναλύσεις και μέσω των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Η εκτίμηση του χρόνου συντήρησής τους σε διάφορες θερμοκρασίες μέσω μικροβιολογικών, χημικών και οργανοληπτικών αναλύσεων. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της κατάψυξης στην ποιότητα των καπνιστών φιλέτων πέστροφας.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1. Η επεξεργασία του καπνίσματος

Το κάπνισμα χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν με κύριο σκοπό τη συντήρηση των αλιευμάτων. Η σύνθετη επεξεργασία του καπνίσματος επιφέρει αλλαγές στο χρώμα, στην οσμή, στη γεύση και την υφή των καπνιστών προϊόντων (Guillen *et al*, 2006).

Κατά την επεξεργασία του καπνίσματος ουσίες που περιέχονται στον καπνό απορροφώνται από την επιφάνεια των αλιευμάτων και αντιδρούν ή αλληλεπιδρούν με τα συστατικά τους. Τα καπνιστά αλιεύματα περιέχουν ενώσεις του καπνού όπως αλδεΐδες, κετόνες και αλκοόλες με έξι, οκτώ και εννέα άτομα άνθρακα (Guillen *et al*, 2006).

Ο καπνός έχει διαπιστωθεί ότι έχει αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Hattula *et al.*, 2001).

Η ικανότητα της επεξεργασίας του καπνίσματος να οδηγεί σε προϊόντα με δυνατότητα μακροχρόνιας συντήρησης οφείλεται:

Στην επιφανειακή ξήρανση του προϊόντος, ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας ξήρανσης, όπου δημιουργείται ένα φυσικό φράγμα στην είσοδο των μικροοργανισμών και ένα εχθρικό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό των αερόβιων βακτηρίων.

Στη μείωση της ενεργότητας νερού (a_w), μέσω της επεξεργασίας του αλατίσματος και ξήρανσης, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ανάπτυξης των βακτηρίων αλλοίωσης αλλά και των παθογόνων.

Στην εναπόθεση φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών, που οδηγούν σε καθυστέρηση της φωτοξείδωσης και αυτοξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των λιπαρών υλών.

Στην εναπόθεση φαινολικών αντιμικροβιακών ουσιών και φορμαλδεϋδης η οποία έχει αντιβακτηριακή δράση (Horner, 1997).

Η επεξεργασία του καπνίσματος περιλαμβάνει τέσσερα κύρια στάδια: το αλάτισμα, την ξήρανση, το κάπνισμα και την θερμική επεξεργασία. Όλα τα παραπάνω στάδια συμβάλλουν στην συντήρηση των παραγόμενων προϊόντων, μειώνοντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Iliadis, 2004).

2.1.1 Προετοιμασία των δειγμάτων

Προτού εφαρμοστούν τα στάδια που προαναφέρθηκαν για την παρασκευή καπνιστών προϊόντων, είναι απαραίτητη η προετοιμασία των αλιευμάτων. Βασική προϋπόθεση για την παρασκευή προϊόντων υψηλής ποιότητας είναι η άριστη κατάσταση της πρώτης ύλης. Η προετοιμασία περιλαμβάνει το καλό πλύσιμο, τον καθαρισμό (αποκεφαλισμό, εκσπλαχνισμό, κοπή πτερυγίων κ.λ.π.) και μερικές φορές τη φιλλετοποίηση (Παπαναστασίου, 1990).

2.1.2 Αλάτισμα

Η είσοδος του χλωριούχου νατρίου στους ιστούς εξαρτάται από διάφορους φυσικούς παράγοντες, όπως είναι η διάχυση και η ώσμωση αλλά και από σειρά χημικών

διεργασιών που έχουν άμεση σχέση με τη μεταβολή βασικών συστατικών των αλιευμάτων και κυρίως των πρωτεϊνών τους (Iliadis, 2004). Ο χρόνος αλατίσματος και η μέθοδος αλατίσματος που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το ποσοστό λίπους του αλιεύματος, την παρουσία ή απουσία του δέρματος και το είδος του προϊόντος (Horner, 1997; Iliadis, 2004).

Τα καπνιστά προϊόντα περιέχουν συνήθως 2-4% χλωριούχο νάτριο (Hansen *et al.*, 1995; Sigurgisladottir *et al.*, 2000).

Οι μέθοδοι αλατίσματος που χρησιμοποιούνται πριν το κάπνισμα των αλιευμάτων είναι οι εξής:

- α) το ξηρό αλάτισμα (dry salted),
- β) το ξηρό-υγρό αλάτισμα (pickling)
- γ) υγρό αλάτισμα (brining)

Το ξηρό αλάτισμα είναι κατάλληλο και χρησιμοποιείται μόνο σε μη λιπαρά αλιεύματα (Gram & Huss, 1996). Τα αλιεύματα μετά τον εκσπλαχνισμό και τη φιλετοποίηση τοποθετούνται σε στρώσεις που διαχωρίζονται από στρώσεις ξηρού αλατιού. Το αλάτι διεισδύει μετωπικά στη σάρκα ενώ ταυτόχρονα υγρασία εξέρχεται από τη σάρκα του αλιεύματος. Η άλμη που σχηματίζεται από την έξοδο οπού της σάρκας των αλιευμάτων απομακρύνεται από οπές που υπάρχουν στον πυθμένα των δοχείων (Ζώτος, 2003).

Παραλλαγή της μεθόδου αυτής αποτελεί η μέθοδος κατά την οποία ο μυϊκός οπός που εξέρχεται κατά τη διάρκεια του αλατίσματος δεν απομακρύνεται αλλά παραμένει στο δοχείο αλατίσματος, με αποτέλεσμα τα αλιεύματα να υποβάλλονται ταυτόχρονα σε ξηρό-υγρό αλάτισμα

(pickling) για 2 - 3 ημέρες. Κατόπιν ξεπλένονται και ξηραίνονται στον αέρα ή στο καπνιστήριο (Horner, 1997).

Εκτός από το ξηρό αλάτισμα τα αλιεύματα μπορούν να εμβάπτιστούν σε προπαρασκευασμένα διαλύματα άλμης υψηλής συγκέντρωσης, για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται άλμη συγκέντρωσης 15%-20% (Gram & Huss, 1996). Τα αλιεύματα παραμένουν στην άλμη λίγα λεπτά της ώρας για να απορροφήσουν μικρή ποσότητα χλωριούχου νατρίου, το οποίο συμβάλλει κυρίως στη γεύση και στο άρωμα του τελικού προϊόντος (Martin, 1994; Hall, 1997). Η εμβάπτιση σε άλμη είναι η μέθοδος που προτιμάται για λιπαρά αλιεύματα. Κατά την εμβάπτιση των αλιευμάτων στην άλμη παρατηρείται μείωση του οξυγόνου του συστήματος και έτσι περιορίζονται σημαντικά οι αντιδράσεις οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων της σάρκας τους (Doe *et al.*, 1998).

Η επεξεργασία της εμβάπτισης σε άλμη είναι ταχύτερη διαδικασία από το ξηρό αλάτισμα, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας επαφής του χλωριούχου νατρίου με τη σάρκα του αλιεύματος. Έτσι το υγρό αλάτισμα χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα γιατί βοηθάει στο σχεδιασμό ήπιων επεξεργασιών με χαμηλή περιεκτικότητα χλωριούχου νατρίου στα τελικά προϊόντα που προτιμούνται από τους καταναλωτές (Ζώτος, 2003).

Το αλάτισμα των αλιευμάτων πριν το κάπνισμα συμβάλλει στη συντήρησή τους λόγω μείωσης της ενεργότητας νερού (a_w). Ο όρος ενεργότητα νερού είναι η μέτρηση του

ελεύθερου νερού μέσα στο αλεύμα το οποίο μπορεί να αντιδράσει χημικά ή να βοηθήσει στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες (Waterman,1976). Ένα κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου έχει a_w περίπου 0,75. Τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε ενεργότητα νερού τόσο χαμηλή. Τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για τροφικές δηλητηριάσεις όπως *Clostridium* ή *Salmonella*, αναπτύσσονται όταν $a_w > 0,91$. Με τη μείωση λοιπόν της a_w προλαμβάνεται η ανάπτυξη βακτηρίων (Daun, 1979).

Η ενεργότητα νερού σχετίζεται με την απόδοση του καπνιστού προϊόντος και με την περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο στη σάρκα των αλιευμάτων. Για να εξασφαλιστεί μακρύς χρόνος συντήρησης (shelf life) (μήνες), τα αλιεύματα θα πρέπει να απολέσουν νερό σε ποσοστό της τάξης του 30-50%. Συγχρόνως, θα πρέπει ικανοποιητική ποσότητα καπνού να εναποτεθεί και διαχυθεί στη σάρκα τους. Τα ελαφρά καπνισμένα προϊόντα που περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και συστατικών του καπνού και έχουν υψηλά ποσοστά υγρασίας, θα πρέπει να συντηρούνται σε συνθήκες ψύξης για μερική επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης (Doe *et al.*, 1998).

2.1.3 Ξήρανση

Η ξήρανση είναι η διαδικασία απομάκρυνσης νερού. Η απομάκρυνση του νερού έχει δύο συνιστώσες: τη φυσική απομάκρυνση του νερού (ξηράνση) και την ακινητοποίηση

του νερού με υγροσκοπικούς παράγοντες όπως άλατα, σάκχαρα και γλυκερόλη. Οι λειτουργικές ομάδες των συστατικών αυτών δεσμεύουν το νερό, μειώνοντας έτσι το διαθέσιμο νερό που ευνοεί τις χημικές και μικροβιολογικές αντιδράσεις (Doe *et al.*, 1998).

Η ξήρανση μπορεί να επιτευχθεί με τις εξής μεθόδους:

Ξήρανση στον αέρα ή με επαφή, που γίνεται με την βοήθεια θερμού αέρα ή θερμαινόμενης επιφάνειας.

Ξήρανση υπό κενό. Πλεονεκτεί έναντι της προηγούμενης μεθόδου γιατί η ταχύτητα ξήρανσης είναι εντονότερη, οπότε η δομή της σάρκας των αλιευμάτων δεν μεταβάλλεται σημαντικά.

Ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying). Στηρίζεται στην κατάψυξη με εφαρμογή πολύ χαμηλών πιέσεων (0,64kPa) που βοηθούν στην απομάκρυνση των υδρατμών (Horner, 1997).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ξήρανσης κατά την διάρκεια του καπνίσματος είναι η ταχύτητα του καπνού/αέρα που περνάει πάνω από το προϊόν, το ποσοστό της υγρασίας στο αλίευμα, η θερμοκρασία του καπνιστηρίου και η υγρασία που παραμένει σε αυτό καθώς και η περιεκτικότητα του αλιεύματος σε αλάτι. Όσο πιο ζεστός είναι ο αέρας τόσο περισσότερη υγρασία απομακρύνει (Dillon *et al.*, 1992).

2.1.4 Καπνός

2.1.4.1 Παραγωγή και σύσταση καπνού

Η σύνθεση του καπνού και οι συνθήκες επεξεργασίας της πρώτης ύλης επηρεάζουν την ποιότητα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, τη διάρκεια ζωής και την θρεπτική αξία του προϊόντος.

Ο καπνός που χρησιμοποιείται για το κάπνισμα προϊόντων παράγεται με ατελή καύση ξύλου. Η θερμοκρασία παραγωγής του είναι 650-700°C, ωστόσο η θερμοκρασία αυτή μπορεί να μειωθεί όταν η υγρασία του ξύλου είναι αυξημένη. Συνήθως χρησιμοποιείται η ξυλεία φυλλοβόλων δέντρων όπως οξιά, άσπρη καρυδιά και βελανιδιά αλλά και η ξυλεία κωνοφόρων δέντρων όπως πεύκο και έλατο. Τα τρία κύρια συστατικά του ξύλου είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη (Stolyhwo & Sikorski, 2005).

Ο καπνός είναι ένα μίγμα αέρα, υδρατμών, CO₂, CO και εκατοντάδων οργανικών ενώσεων. Οι οργανικές ενώσεις σχηματίζονται με τη θερμική αποικοδόμηση του ξύλου, η οποία ακολουθείται από την οξειδωση ορισμένων προϊόντων πυρόλυσης σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Τα κύρια συστατικά του ξύλου όπως προαναφέρθηκε είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Κατά την πυρόλυσή τους τα παραπάνω πολυμερή δίνουν διαφορετικά προϊόντα. Η θερμική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης, της κυτταρίνης και της λιγνίνης του ξύλου γίνεται σε θερμοκρασίες 180-300, 260-350 και 300-500°C αντίστοιχα (Stolyhwo & Sikorski, 2005). Η αποικοδόμηση της κυτταρίνης οδηγεί σε παραγωγή οξικού οξέος ως κύριου

προϊόντος πυρόλυσης καθώς και σε μικρές ποσότητες φουρανών και φαινολών. Η ημικυτταρίνη είναι περισσότερο ασταθής στη θέρμανση, συγκριτικά με τα άλλα δύο συστατικά του ξύλου, και δίνει διαφορετικά παράγωγα ανάλογα με το είδος του ξύλου. Οι λιγνίνες, είναι οι σημαντικότερες από τα συστατικά του ξύλου διότι παράγουν ουσίες που είναι υπεύθυνες για το άρωμα των καπνιστών προϊόντων (Doe *et al.*, 1998).

Η ποιότητα του ξύλου επιδρά σημαντικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των καπνιστών προϊόντων. Κατά τη διάρκεια της καύσης του ξύλου, τα παραπάνω πολυμερή συμπεριφέρονται ως ένα μίγμα. Έτσι ο καπνός του ξύλου που χρησιμοποιείται για το κάπνισμα των αλιευμάτων και γενικότερα των τροφίμων περιέχει ένα τεράστιο αριθμό από διαφορετικά συστατικά ως συνέπεια της καύσης του μίγματος των τριών παραπάνω πολυμερών. Έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί περισσότερες από 350 ουσίες στον παραγόμενο καπνό και πιθανόν να ανιχνευθούν ακόμη περισσότερες στο μέλλον (Doe *et al.*, 1998) (Πίνακας 1, 2).

Πίνακας 1: Κυριότερες ομάδες οργανικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στον παραγόμενο καπνό από την ατελή καύση ξύλων.

Είδος ενώσεων	Αριθμός ενώσεων
Καρβοξυλικά οξέα	66
Αλκοόλες	24
Εστέρες	18
Λακτόνες	13
Αλδεΐδες	22
Κετόνες	86
Αιθέρες	14
Φουράνες	9
Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες	4
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	82
Αζωτούχες ενώσεις	8

(Doe *et al.*, 1998)

Πίνακας 2: Οργανικές ουσίες των προαναφερόμενων ομάδων.

Οξέα	Φαινόλες	Καρβονύλια	Αλκοόλες	Υδρογονάνθρακες
Φορμικό	Συριγγόλη	Φορμαλδεΐδη	Αιθανόλη	Βενζοπυρένιο
Οξικό	Γουαϊακόλη	Προπιοναλδεΐδη	Μεθανόλη	Βενζανθρακένιο
Βουτυρικό	Κρεσόλη	Φουρφουραλδεΐδη	Προπανόλη	Ναφθαλένιο
Καπρυλικό	Ξυλενόλη	Ακρολεΐνη		Φαινανθρένιο
Οξαλικό		Μεθυλο-		
Βανιλλικό		αιθυλοκετόνη		
Συριγγικό				
Φθαλικό				

(Horner, 1997)

Ορισμένες από τις παραπάνω ενώσεις είναι επιθυμητές, γιατί συμβάλουν σε επιθυμητά αποτελέσματα όπως το άρωμα, την ικανότητα συντήρησης νερού και το χρώμα, ενώ κάποιες άλλες έχουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως την επιβάρυνση του τροφίμου με τοξικές ουσίες και την καταστροφή κάποιων βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών (Hamm, 1977).

Είναι σήμερα γενικά αποδεκτό ότι το χαρακτηριστικό άρωμα των καπνιστών τροφίμων οφείλεται στις φαινολικές ουσίες, ενώ οι καρβονυλικές ενώσεις και τα οξέα πιθανά συμμετέχουν ελάχιστα στην διαμόρφωση του αρώματος. Το αντιοξειδωτικό και βακτηριοστατικό αποτέλεσμα προέρχεται επίσης κύρια από την παρουσία συγκεκριμένων φαινολών. Το χαρακτηριστικό χρυσό-καφέ χρώμα είναι αποτέλεσμα των καρβονυλικών ενώσεων οι οποίες αντιδρούν με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών και δίνουν τον επιθυμητό αυτό

χρωματισμό “μη-ενζυμικό μαύρισμα”. Τα οξέα επίσης συμμετέχουν στο χρωματισμό προκαλώντας υδρόλυση των πρωτεϊνών της επιφάνειας και δημιουργώντας μαύρα πηγάματα τα οποία, όταν παράγονται σε μεγάλη έκταση εμποδίζουν τη διείσδυση στο εσωτερικό της σάρκας των συστατικών του καπνού. Ο καπνός όμως περιέχει και κάποια τοξικά συστατικά, κυρίως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως το βενζο(a)πυρενίο το οποίο έχει καρκινογόνες ιδιότητες (Ζώτος, 2003).

2.1.4.2 Φυσικές ιδιότητες του καπνού

Ο καπνός αποτελείται από δύο φάσεις, τη στερεά φάση (πίσσα) και την αέρια φάση (κυρίως πτητικές ενώσεις). Η χημική σύνθεση της στερεάς και αέριας φάσης είναι όμοιες, με τη διαφορά ότι τα μόρια της στερεάς φάσης έχουν υψηλότερο ποσοστό ουσιών με υψηλό μοριακό βάρος. Η συγκέντρωση και η χημική σύσταση της στερεάς και αέριας φάσης του καπνού εξαρτάται από το είδος του ξύλου και τις συνθήκες στις οποίες γίνεται η καύση. Στη στερεά φάση επικρατούν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ενώ στην αέρια φάση του καπνού υπερέχουν οι φαινολικές και καρβονυλικές ουσίες.

Στα αρχικά στάδια του καπνίσματος ο ρυθμός ξήρανσης και η απόθεση του καπνού είναι έντονες εξαιτίας της υγρής και κολλοειδούς επιφάνειας των αλιευμάτων. Κατά τη διάρκεια του καπνίσματος τόσο ο ρυθμός ξήρανσης όσο και η απόθεση του καπνού στα αλιεύματα μειώνονται. Η απορρόφηση και διάχυση των συστατικών του καπνού στα

αλιεύματα οδηγούν στη δημιουργία των ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των καπνιστών αλιευμάτων (χρώμα, άρωμα) (Iliadis, 2004).

2.1.4.3 Παραγωγή υγρού καπνού

Κατά την παραγωγή υγρού καπνού το πριονίδι αναμειγνύεται με υπέρθερμο ατμό, ο οποίος περιέχει και ανάλογες ποσότητες θερμού αέρα. Στις συνθήκες αυτές το ξύλο (πριονίδι) πυρολύεται και παράγεται καπνός. Η παραγωγή του καπνού πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες της τάξης των 300-400°C, ενώ η θερμοκρασία του καπνού είναι περίπου 80°C. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι παράγεται καπνός μέσω ατελούς καύσης, η παραγωγή του καπνού είναι ταχύτερη και έχει υψηλή απόδοση (Maga, 1988).

Ο συμπυκνωμένος καπνός διαλύεται σε νερό ή σε λάδι ή ακόμη ορισμένα κλάσματά του σε οργανικούς διαλύτες. Τέλος, τα συμπυκνώματα του καπνού μπορεί να προσροφηθούν από στερεές ουσίες, όπως καρυκεύματα, αλάτι, σάκχαρα, άμυλο ή ακόμη και πρωτεΐνες. Έτσι, κυκλοφορούν στο εμπόριο διάφορα συμπυκνώματα καπνού σε στερεά μορφή.

Το χρώμα του φρέσκου υγρού καπνού σε νερό είναι λαμπερό κίτρινο, ενώ κατά την διάρκεια της αποθήκευσής του γίνεται πιο σκούρο εξαιτίας του σχηματισμού καφέ ιζήματος και προϊόντων πολυμερισμού. Για την αποφυγή σχηματισμού ιζήματος μπορεί να προστεθεί στον υγρό

καπνό οξύ ή κάποιος οργανικός διαλύτης (Toth & Potthast, 1984).

2.1.4.4 Σύνθεση υγρού καπνού

Η σύνθεση του υγρού καπνού μελετήθηκε με αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιώντας ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID) καθώς και με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας (GC-MS). Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν είναι παράγωγα φαινόλης, καρβονυλικές ενώσεις, αλκυλο-αρυλο-αιθέρες, υδρογονάνθρακες, τερπενικά παράγωγα και άλλες (Martinez *et al.*, 2004). Ο υγρός καπνός έχει χαμηλότερη συγκέντρωση σε βενζο(α)πυρένιο (B(α)P) και δεν υπάρχουν ενδείξεις για μεταλλακτική δραστικότητα (Dillon *et al.*, 1992).

2.1.5 Μέθοδοι καπνίσματος

Στα αλιεύματα εφαρμόζονται δύο παραδοσιακές μέθοδοι καπνίσματος, το θερμό και το ψυχρό κάπνισμα, ενώ έχουν αναφερθεί και νεότερες μέθοδοι όπως το ηλεκτροστατικό και το υγρό κάπνισμα (Goulas & Kontominas, 2005; Siskos, 2004).

2.1.5.1 Ψυχρό ή κρύο κάπνισμα

Συνίσταται στην έκθεση των προϊόντων σε καπνό θερμοκρασίας έως 35°C, μέσα σε ειδικούς θαλάμους (καπνιστήρια). Στη θερμοκρασία αυτή αποφεύγεται η μετουσίωση των πρωτεϊνών των αλιευμάτων (Pigott & Tucker, 1990a). Το κάπνισμα διαρκεί από μερικές ώρες

μέχρι αρκετές εβδομάδες, ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν (Toth & Potthast, 1982). Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, π.χ. κάπνισμα λιπαρών αλιευμάτων όπως η ρέγγα και το σκουμπρί, η θερμοκρασία μπορεί να φθάσει έως τους 40°C, έτσι ώστε το λίπος των παραπάνω αλιευμάτων να κατανεμηθεί ομοιόμορφα στην επιφάνεια προσδίδοντας καλύτερη εμφάνιση (Martin, 1994).

Η επεξεργασία περιλαμβάνει δύο στάδια: κατά το πρώτο στάδιο το προϊόν τοποθετείται μέσα σε καπνιστήρια, όπου και ξηραίνεται με ελαφρώς θερμό αέρα (30-38°C). Η φάση αυτή είναι μικρής διάρκειας. Κατά το δεύτερο στάδιο, στο οποίο λαμβάνει χώρα το κάπνισμα, διαβιβάζεται μέσα στους θαλάμους καπνίσματος άφθονος και πυκνός καπνός θερμοκρασίας 24-33°C (Siskos, 2004, Iliadis, 2004).

Καθώς η θερμοκρασία του καπνού δεν ξεπερνάει τους 35°C, το καπνιστό αλίευμα δεν έχει καθόλου μαγειρευτεί. Το καπνιστό προϊόν συνήθως μαγειρεύεται πριν την κατανάλωση του, με εξαίρεση τον καπνιστό σολομό (Martin, 1994).

2.1.5.2 Θερμό κάπνισμα

Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μεγάλη βιομηχανική εφαρμογή και περιλαμβάνει τη χρήση θερμού καπνού ή και θερμού αέρα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Η θερμοκρασία του καπνού ή του αέρα μπορεί να φτάσει ακόμη και τους 120°C ενώ η θερμοκρασία στο κέντρο του αλιεύματος τους 82,2°C (180°F). Στη θερμοκρασία αυτή το αλίευμα παστεριώνεται και αδρανοποιούνται τα ένζυμα, οπότε μειώνεται ο κίνδυνος

για την κατανάλωσή του. Ο χρόνος καπνίσματος του αλιεύματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του σε χλωριούχο νάτριο. Τα θερμά καπνισμένα αλιεύματα πρέπει να συντηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης (4°C) και ιδιαίτερα αυτά τα οποία συσκευάζονται σε κενό, διότι ο κίνδυνος ανάπτυξης του *C. botulinum* είναι αρκετά υψηλός (Pigott & Tucker, 1990a).

Το θερμό κάπνισμα περιλαμβάνει τρία ξεχωριστά στάδια: Μερική ξήρανση στους 30°C, κατά την οποία παρατηρείται σκλήρυνση του δέρματος και αποφυγή σχισίματος στα επόμενα στάδια. Ο καπνός είναι σχετικά αραιός ενώ η παροχή του αέρα είναι αρκετά υψηλή. Το στάδιο αυτό διαρκεί συνήθως 30- 60min.

Κάπνισμα και μερικό ψήσιμο στους 50°C, διάρκειας 45-60min, με μείωση της παροχής αέρα.

Τελικό ψήσιμο και κάπνισμα στους 70-90°C για 1-2 ώρες. Η τελική θερμοκρασία του προϊόντος, πριν την έξοδό του από το καπνιστήριο, πρέπει απαραίτητα να φτάσει τους 80°C.

Πριν από τη συσκευασία η θερμοκρασία του προϊόντος πρέπει να κατέβει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, κατά προτίμηση με φυσική έκθεση (Iliadis, 2004).

Αυτά τα προϊόντα παρουσιάζουν λιγότερους κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή δεδομένου ότι η θερμική επεξεργασία μειώνει το βακτηριακό πληθυσμό στο προϊόν (σε διαφορετική έκταση ανάλογα με τη θερμοκρασία παστερίωσης) και αδρανοποιεί τα ένζυμα (Siskos, 2004).

Οι βασικές διαφορές μεταξύ θερμού και ψυχρού καπνίσματος είναι η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται, η

ταχύτητα και η διάρκεια του καπνίσματος και η διαφορετική υφή και εμφάνιση του τελικού προϊόντος (Maga,1988).

2.1.5.3 Ηλεκτροστατικό κάπνισμα

Όπως έχει προηγουμένα αναφερθεί ο καπνός αποτελείται από δύο φάσεις, τα ορατά σταγονίδια πίσσας και τους αόρατους υδρατμούς. Η φάση των ορατών σταγονιδίων αποτελείται από υγρά σωματίδια πίσσας, ρητίνες και φαινόλες υψηλού και χαμηλού σημείου βρασμού των οποίων οι συγκεντρώσεις διαφέρουν ανάλογα με τη θερμοκρασία και την πυκνότητα του καπνού. Το γεγονός της ύπαρξης των δύο φάσεων του καπνού βοήθησε στην ανάπτυξη του ηλεκτροστατικού καπνίσματος. Στην επεξεργασία αυτή ο καπνός διέρχεται από ηλεκτρικό πεδίο με υψηλό δυναμικό (20-60kV). Τα σωματίδια του καπνού διερχόμενα του ηλεκτρικού πεδίου φορτίζονται θετικά και προσανατολίζονται, ώστε να επικαθίσουν στην αρνητικά φορτισμένη σάρκα των αλιευμάτων. Η ξήρανση των αλιευμάτων που πρόκειται να καπνιστούν με τη μέθοδο του ηλεκτροστατικού καπνίσματος γίνεται με υπέρυθη ακτινοβολία.

Είναι φανερό ότι η διαδικασία του ηλεκτροστατικού καπνίσματος αλλάζει τη σύσταση των πτητικών συστατικών του καπνού. Έχει διαπιστωθεί ότι τα κλάσματα των οξέων, των φαινολικών και καρβονυλικών ουσιών που ανιχνεύτηκαν στον καπνό που χρησιμοποιήθηκε για ηλεκτροστατικό κάπνισμα ήταν χαμηλότερης συγκέντρωσης από ότι σε

κανονικό καπνό. Επομένως, οι οργανοληπτικές ιδιότητες των καπνιστών αλιευμάτων που καπνίζονται με ηλεκτροστατικό κάπνισμα διαφέρουν από τις αντίστοιχες των αλιευμάτων που καπνίζονται με παραδοσιακές μεθόδους (Maga, 1988).

2.1.5.4 Υγρό κάπνισμα

Το κάπνισμα με τη χρήση του υγρού καπνού δεν είναι καινούρια μέθοδος, εφαρμόζεται για περισσότερο από 30 χρόνια ως μια μέθοδος που προσφέρει συντήρηση και χαρακτηριστικό άρωμα καπνιστού στα προϊόντα (Hattula *et al.*, 2001). Σε ορισμένες χώρες τα προϊόντα με υγρό κάπνισμα έχουν γίνει αρκετά δημοφιλή (Siskos, 2004).

Η χρησιμοποίηση υγρού καπνού παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων καπνίσματος που αναφέρθηκαν.

Οι αρωματικές ουσίες του υγρού καπνού διαχέονται ομοιόμορφα στη μάζα του προϊόντος που πρόκειται να υποστεί κάπνισμα. Το προϊόν παρουσιάζει την ίδια ένταση αρώματος τόσο εξωτερικά όσο και στις εσωτερικές του στοιβάδες. Αντίθετα, στα αλιεύματα που καπνίζονται με τις κλασικές μεθόδους, η ένταση του αρώματος του καπνού είναι μεγαλύτερη στην εξωτερική τους επιφάνεια.

Μπορεί να ρυθμιστεί η ένταση της γεύσης και του αρώματος των καπνιστών προϊόντων.

Μπορεί να γίνει επιλογή των επιθυμητών για την επεξεργασία του καπνίσματος ουσιών και απομάκρυνση ενδεχομένως επιβλαβών.

Μπορεί να γίνει εφαρμογή της μεθόδου σε προϊόντα που δεν μπορούν να καπνιστούν με τις παραδοσιακές μεθόδους.

Μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κόστους της επεξεργασίας, αφού δεν απαιτούνται ειδικές εγκαταστάσεις.

Μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στον έλεγχο της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης (μείωση ανεπιθύμητων ρύπων).

Μπορεί να εφαρμοστεί με ποικίλους τρόπους όπως ψεκασμός στην επιφάνεια και εμβάπτιση.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε εμπορικό όσο και σε οικιακό επίπεδο (Siskos, 2004).

Διαπιστώθηκε ότι αλιεύματα που καπνίστηκαν με τη μέθοδο του υγρού καπνίσματος ήταν λιγότερο αρωματικά και γευστικά σε σύγκριση με αντίστοιχα που είχαν καπνιστεί με τις παραδοσιακές μεθόδους. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στη σάρκα των αλιευμάτων που καπνίστηκαν με υγρό καπνό κυμαίνονταν μεταξύ 1,14 - 1,75mg/100g, ενώ στα δείγματα που είχαν καπνιστεί με παραδοσιακή μέθοδο μεταξύ 5,94 - 13,55mg/100g. Επίσης, οι συγκεντρώσεις των καρβονυλικών ενώσεων και των οργανικών οξέων ήταν 22,8 και 0,59mg/100g αντίστοιχα στα δείγματα που καπνίστηκαν με υγρό καπνό, ενώ στα καπνισμένα με παραδοσιακή μέθοδο 23,7 και 0,69 mg/100g σάρκας αντίστοιχα (Maga, 1988).

2.2 Φυσικοχημικές μεταβολές των αλιευμάτων κατά την επεξεργασία τους

Τα αλιεύματα κατά την επεξεργασία τους (κατάψυξη, αλάτισμα, κάπνισμα κ.λ.π.) υφίστανται μεταβολές στη σύνθεσή τους. Οι μεταβολές αυτές σχετίζονται κυρίως με την ποσότητα και την ποιότητα λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών που οδηγούν στη συνέχεια σε αλλοιώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Μεταβολές στη γεύση την υφή αλλά και το χρώμα του προϊόντος.

2.2.1 Φυσικοχημικές μεταβολές κατά το κάπνισμα των αλιευμάτων

2.2.1.1 Μεταβολές στο λίπος

Το λίπος έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την ποιότητα του προϊόντος (υφή, γεύση και άρωμα) ενώ μπορεί επίσης να συμβάλλει στο χρώμα των καπνιστών αλιευμάτων (Roga *et al.*, 1998). Το ποσοστό λίπους στα αλιεύματα κυμαίνεται από 1% έως και 30%. Στο λίπος περιέχονται ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, όπως το εικοσιπενταενοϊκό (C20:5ω-3, EPA) και το εικοσιδυεξαενοϊκό (C22:6ω-3, DHA), τα οποία είναι σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία (Kinsella, 1987).

Η οξειδωση του λίπους οδηγεί στην παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων, όπως τα υδροϋπεροξειδία και σε ποικιλία τελικών προϊόντων όπως αλδεΐδες και κετόνες μαζί με άλλα προϊόντα διάσπασης. Τα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης, ιδιαίτερα οι αλδεΐδες, είναι υπεύθυνα για τις εμφανιζόμενες ξένες γεύσεις στα αλιεύματα οι οποίες μοιάζουν με αυτές

ταγγισμένων λαδιών. Επιπρόσθετες αντιδράσεις είναι πολύ πιθανές μεταξύ των προϊόντων οξειδωσης και κάποιων συστατικών του τροφίμου π.χ. πρωτεΐνες, αμινοξέα και βιταμίνες. Ως αποτέλεσμα παρατηρούνται φαινόμενα όπως απώλεια της θρεπτικής αξίας, ανάπτυξη ανεπιθύμητων χρωματισμών καθώς και εμφάνιση τοξικότητας (Ζώτος, 2003).

Επειδή τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν άριστο υπόστρωμα οξειδωσης, η οποιαδήποτε θρεπτική τους αξία μπορεί να υποβαθμιστεί κατά τη διάρκεια της ξήρανσης και του καπνίσματος. Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη σημαντικής οξειδωτικής δράσης ως αποτέλεσμα των παραπάνω επεξεργασιών και δεν διαπιστώθηκε σημαντική μείωσή των ευεργετικών λιπαρών οξέων των αλιευμάτων (Bhuiyan *et al.*, 1986a).

Η θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του καπνίσματος προκαλεί οξειδωση του λίπους των αλιευμάτων με σημαντική αύξηση στην τιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και στην τιμή υπεροξειδίων (Sikorski *et al.*, 1998).

Σε μια εκτεταμένη μελέτη για τα αποτελέσματα του καπνίσματος σε ορισμένα βασικά συστατικά του ανοιξιάτικου και χειμερινού σκουμπριού του Ατλαντικού, οι Bhuiyan *et al.*, (1986a) ανακοίνωσαν ότι δεν διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή στην κατανομή των λιπαρών οξέων λόγω αλατίσματος, θέρμανσης, καπνίσματος και έκθεσης στο οξυγόνο. Οι τιμές TBA για το καπνιστό σκουμπρί ήταν σχεδόν διπλάσιες από αυτές για το μη καπνιστό 6,86 και 3,98 $\mu\text{mol/kg}$ δείγματος αντίστοιχα και οι τιμές υπεροξειδίων

είχαν ανοδική πορεία. Για το μη καπνιστό 1,30meq/kg λίπους και 8,96meq/kg λίπους για το καπνιστό. Το αλάτι εκτιμήθηκε ως παράγοντας που επιταχύνει την οξειδωση.

2.2.1.2 Μεταβολές πρωτεϊνών

Το αλάτισμα των αλιευμάτων που προηγείται του καπνίσματος προκαλεί απώλεια πρωτεϊνών η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση της άλμης και από το χρόνο αλατίσματος. Η απώλεια αυτή μπορεί να φτάσει έως 5% (Sikorski *et al.*, 1998).

Η θέρμανση των πρωτεϊνών προκαλεί μετουσίωσή τους, με αποτέλεσμα τη ρήξη της β-ταγούς και άνω δομής τους (Ledward, 1979). Η θερμοκρασία μετουσίωσης ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη πρωτεϊνών και στα διαφορετικά είδη αλιευμάτων και εξαρτάται από την θερμοκρασία περιβάλλοντος στην οποία ζουν. Οι πρωτεΐνες των αλιευμάτων που ζουν σε χαμηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες είναι λιγότερο σταθερές από τις πρωτεΐνες αντίστοιχων αλιευμάτων που ζουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η μείωση της εκχυλισιμότητας των μυϊκών πρωτεϊνών αρχίζει από τους 30°C. Διαπιστώθηκε ότι στους 40°C η εκχυλίσιμη πρωτεΐνη ήταν κατά 40% χαμηλότερη από την αντίστοιχη της πρώτης ύλης, ενώ στους 60-65 °C κατά 90%. Το εναπομείναν κλάσμα των 10% παραμένει σταθερό ακόμα και σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 100°C για μακρύ χρονικό διάστημα (Aitken & Connell, 1979).

Η διαδικασία του καπνίσματος επηρεάζει τη θρεπτική αξία των πρωτεϊνών. Σε μη επεξεργασμένα δείγματα πέστροφας

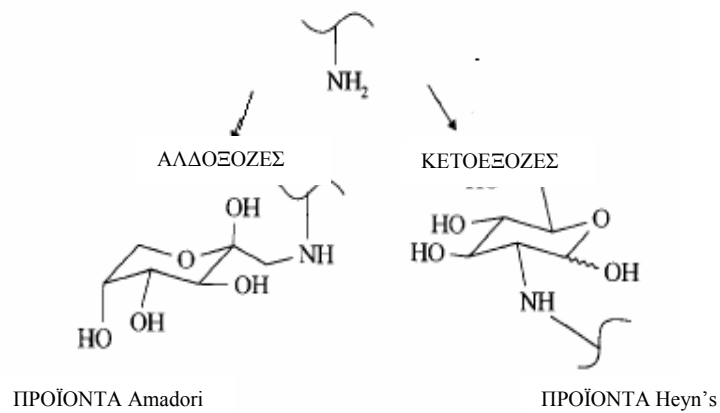
η περιεκτικότητα σε απαραίτητα αμινοξέα ήταν υψηλότερη από ότι στα επεξεργασμένα (βραστά ή καπνιστά) (El and Kavas, 1996). Σε καπνιστό φιλέτο σκουμπριού παρατηρήθηκε μέγιστη απώλεια διαθέσιμης λυσίνης 8,8% και τρυπτοφάνης 7,1% στην εξωτερική επιφάνεια του αλιεύματος (Sikorski *et al.*, 1998).

2.2.1.2.1 Διαθέσιμη λυσίνη

Η διατροφή του ανθρώπου πρέπει να περιέχει οπωσδήποτε απαραίτητα αμινοξέα και κυρίως λυσίνη, θρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, βαλίνη, μεθειονίνη, λευκίνη και ισολευκίνη. Τα αμινοξέα αυτά ονομάστηκαν απαραίτητα διότι δεν μπορεί να τα συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός αλλά τα προσλαμβάνει μέσω της τροφής του (Naranjo *et al.*, 1998). Η λυσίνη βρίσκεται σε επαρκείς ποσότητες στις πρωτεΐνες των αλιευμάτων (Iliadis, 2004).

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα στα τρόφιμα αντιδρούν με διαφορετικά συστατικά του καπνού. Το μη ενζυμικό μαύρισμα είναι μια από τις κύριες διεργασίες που οδηγεί σε απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητάς τους (Hidalgo *et al.*, 1999). Κατά τη διάρκεια θερμικών επεξεργασιών λαμβάνει χώρα η αντίδραση του μη ενζυμικού μαυρίσματος μεταξύ ελεύθερων αμινομάδων και καρβονυλικών ενώσεων. Η αντίδραση ξεκινάει με τη συμπύκνωση του α-υδροξυκαρβονυλίου και μιας αμινοομάδας της λυσίνης (Malec *et al.*, 2002). Όπως φαίνεται στο σχήμα 1, τα ενδιάμεσα προϊόντα που

σχηματίζονται είναι τα παράγωγα Amadori (ARP) και Heyn's (Lee *et al.*, 1984).



(Yaylayan, 1997)

Σχήμα 1: Η αρχική φάση της αντίδρασης του μη ενζυμικού μαυρίσματος: σχηματισμός των προϊόντων Amadori και Heyn's

Έχει ανακοινωθεί ότι η απώλεια σε διαθέσιμη λυσίνη κατά το κάπνισμα των αλιευμάτων οφείλεται στην αντίδραση ανάμεσα στη φορμαλδεΰδη και άλλες καρβονυλικές ουσίες του καπνού με την ε-αμινομάδα της λυσίνης των πρωτεϊνών (Sikorski *et al.*, 1998).

Όταν οι θερμικές συνθήκες δεν είναι έντονες τα ενδιάμεσα προϊόντα Amadori και Heyn's είναι σχετικά σταθερά (Malec *et al.*, 2002).

2.2.1.3 Μεταβολές στο pH

Το pH αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την τεχνολογία αλιευμάτων, διότι επιδρά στην υφή της σάρκας τους (Love, 1997). Αποτελεί επίσης δείκτη του βαθμού φρεσκότητας των αλιευμάτων (Παπαναστασίου, 1990). Το pH εξαρτάται από τη περιεκτικότητα γλυκογόνου στους συνδετικούς ιστούς των αλιευμάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι η σάρκα των θαλάσσιων αλιευμάτων είναι περισσότερο συνεκτική, λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας γλυκογόνου σε σχέση με τα αλιεύματα που προέρχονται από υδατοκαλλιέργειες, εξαιτίας της περιορισμένης κίνησής τους (Love, 1997).

Κατά τη μεταχείριση των αλιευμάτων (κύρια της οικογένειας γαδιδών) πολλές φορές παρατηρείται σχίσιμο μεταξύ των μυών, το φαινόμενο αποδόθηκε στη μηχανική αντοχή του συνδετικού ιστού συνδυαστικά με τη συμβολή του pH. Διαπιστώθηκε ότι σε ουδέτερες τιμές pH (7,0) ο συνδετικός ιστός είναι 4 φορές ανθεκτικότερος από τον αντίστοιχο σε pH 6,2 και ως εκ τούτου είναι ευκολότερη η ρήξη του σε χαμηλές τιμές pH (Love, 1997).

Τα μη επεξεργασμένα αλιεύματα έχουν pH ελαφρώς χαμηλότερο του 7,0 (Love, 1997). Κατά τη διαδικασία του καπνίσματος το pH στους ιστούς των αλιευμάτων μειώνεται συνήθως κοντά στο 6,5. Για την καπνιστή πέστροφα το pH κυμαίνεται μεταξύ 5,4-6,1, για το καπνιστό σκουμπρί 6,4-6,7, για την καπνιστή ρέγγα 6,4-6,5, και για τον καπνιστό σολομό 6,7-6,9 (Doe *et al.*, 1998).

2.2.1.4 Μεταβολές της υφής των αλιευμάτων

Η υφή της σάρκας των αλιευμάτων αποτελεί ένα αξιόλογο οργανοληπτικό χαρακτηριστικό τόσο για τους καταναλωτές όσο και για την επεξεργασία των φιλέτων από τη βιομηχανία. Η υφή επηρεάζεται από την διατροφή, τη βιολογική κατάσταση και τις συνθήκες αλίευσης και μεταχείρισης των αλιευμάτων (Johnston *et al.*, 2000). Κατά την επεξεργασία των αλιευμάτων η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί σταθερότητα στην υφή των φιλέτων λόγω μείωσης της υγρασίας τους και αυξημένη ελαστικότητα στο τελικό προϊόν (Rora *et al.*, 1998).

2.2.1.5 Μεταβολές του αρώματος (οσμή, γεύση)

Η πιο σημαντική επίδραση στο σχηματισμό του αρώματος αποδίδεται στις φαινόλες καθώς και σε άλλες πτητικές και υδατοδιαλυτές ουσίες (Maga, 1988). Το άρωμα των μη επεξεργασμένων νωπών αλιευμάτων οφείλεται σε ελεύθερα αμινοξέα, πεπτίδια, οργανικά οξέα, αμμωνιακές βάσεις και μεταλλικά στοιχεία. Πολλά από τα παραπάνω συστατικά συμβάλλουν και στο άρωμα των αφυδατωμένων προϊόντων (Sikorski *et al.*, 1990a).

Οι παράμετροι που επηρεάζουν το άρωμα του καπνιστού προϊόντος είναι ο χρόνος καπνίσματος, η θέρμανση, οι λιπαρές ύλες, τα άλατα, η ποσότητα των φαινολών και άλλων πτητικών και διαλυτών συστατικών του καπνού (Sikorski *et al.*, 1990a). Έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των φαινολών του καπνού και

του συνολικού αρώματος του τελικού προϊόντος (Cardinal *et al.*, 2004).

Ο Maga (1988) επίσης ανακοίνωσε ότι και οι φουράνες συμμετέχουν στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των καπνιστών αλιευμάτων και ότι τα συστατικά αυτά έχουν την τάση να μετριάζουν το έντονο άρωμα του καπνιστού προϊόντος που είναι αποτέλεσμα των διαφόρων φαινολικών ενώσεων.

2.2.1.6 Μεταβολές του χρώματος

Το χρώμα είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό του καπνιστού αλιεύματος. Εξαρτάται από τις χρωστικές του δέρματος και την ποσότητα τους αλλά και από την σύνθεση των συστατικών του καπνού και την αλληλεπίδρασή τους με τα συστατικά της σάρκας. Τα διαφορετικά είδη ξύλων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή καπνού δίνουν διαφορετικό χρώμα στα καπνιστά προϊόντα (Sikorski *et al.*, 1990a).

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές ουσίες που προσδίδουν το κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα των αλιευμάτων. Οι κυριότερες ομάδες είναι τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες. Οι χρωστικές αυτές όταν αντιδράσουν με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο αυτοοξειδώνονται. Ο ρυθμός της αυτοοξειδωσης τους εξαρτάται από το φως, τη θερμοκρασία και την παρουσία οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών (Sikorski *et al.*, 1990b). Αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μεταβολή του χρώματος και μείωση της σταθερότητας των καροτενοειδών (Rora *et al.*, 1998). Το φαινόμενο της

οξειδωσης των χρωστικών αυτών επηρεάζεται και από την παρουσία ενζύμων. Το αποτέλεσμα της οξειδωσης είναι η μείωση της έντασης του κόκκινου χρώματος σε αλιεύματα όπως η πέστροφα, ο σολομός και η γαρίδα. Οι μεταβολές των καρτενοειδών πραγματοποιούνται κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση των προϊόντων (Sikorski *et al.*, 1990a).

Στην πέστροφα το χρώμα της σάρκας εξαρτάται από το καρτενοειδές ασταξανθίνη, βασική χρωστική ουσία του αλιεύματος η οποία δεν συντίθεται στον οργανισμό αλλά προσλαμβάνεται μέσω της τροφής (Choubert *et al.*, 2005). Έχει βρεθεί σε συγκέντρωση $3-11\text{mg kg}^{-1}$ στον άγριο σολομό και $4-10\text{ mg kg}^{-1}$ στον προερχόμενο από υδατοκαλλιέργειες (Johnston *et al.*, 2000).

Αφού η αντίδραση ανάμεσα στις καρβονυλικές ενώσεις και τα αμινοξέα των πρωτεϊνών (μη ενζυμικό μαύρισμα, browning reactions) είναι ένα προϊόν συμπύκνωσης ακολουθούμενο από ανακατανομή των συστατικών και ξήρανση του προϊόντος, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να επικρατούν οι συνθήκες που επιτρέπουν το παραπάνω φαινόμενο να συμβεί. Ένας σημαντικός παράγοντας είναι το pH, το οποίο έχει συγκεκριμένη επίδραση στον χρωματισμό των καπνιστών προϊόντων. Έτσι όταν τα συστατικά του καπνού έχουν υψηλό pH προσδίδουν στο προϊόν σκουρότερα χρώματα, γι' αυτό μια οξίνιση των συστατικών του καπνού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης του σκούρου χρώματος στο τελικό προϊόν. Επίσης, μετά την απορρόφηση του καπνού από το προϊόν, είναι ανάγκη η

θερμοκρασία του καπνού να είναι υψηλή για το σχηματισμό σκούρου χρώματος και για την ξήρανση της επιφάνειας του προϊόντος, που είναι ένα επιθυμητό αποτέλεσμα. Αλιεύματα σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής σχετικής υγρασίας ανέπτυξαν πολύ ελάχιστα ή και καθόλου τον επιθυμητό χρωματισμό. Συμπερασματικά μπορεί να αναφερθεί ότι το υψηλό pH, υψηλή θερμοκρασία και χαμηλή υγρασία δίνουν προϊόντα με έντονο χρωματισμό, αλλά έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή κάποιων βασικών συστατικών όπως του αμινοξέος της λυσίνης. Αυτός είναι ένας λόγος που κάνει προτιμότερη την εφαρμογή του υγρού καπνίσματος, όπου μπορούν να επιτευχθούν οι παραπάνω συνθήκες για τα επιθυμητά αποτελέσματα χρωματισμού αλλά ταυτόχρονα δεν παρατηρείται σημαντική μείωση της διαθέσιμης λυσίνης (Zώτος, 2003).

Το μη ενζυμικό μαύρισμα στα αλιεύματα συμβαίνει μεταξύ ενός άμινο συστατικού με μια καρβονλική ομάδα (Sikorski *et al.*, 1998). Μεσολαβεί μια ποικιλία από αντιδράσεις με υδατάνθρακες, λιπίδια και αμινοξέα. Αυτές εξαρτώνται από τα ιόντα μετάλλων, τα αντιοξειδωτικά και τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται (Hidalgo *et al.*, 1999). Το τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι η μελανίνη, η οποία έχει κίτρινο, καφέ ή μαύρο χρώμα (Sikorski *et al.*, 1998). Κατά την επεξεργασία και αποθήκευση οι αντιδράσεις αυτές προκαλούν την απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων, την αναστολή των γλυκολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων, την αλληλεπίδραση με ιόντα μετάλλου και το σχηματισμό μη θρεπτικών και τοξικών ουσιών (Hidalgo *et al.*, 1999).

2.2.1.7 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs)

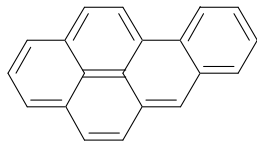
Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι μία κατηγορία ενώσεων που περιέχουν στο μόριο τους δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι μοιράζονται ένα άτομο άνθρακα (σχήμα 2). Οι ενώσεις αυτές είναι γενικά μη πολικές, αρωματικές και αποτελούνται από άτομα άνθρακα και υδρογόνου (Tamakawa *et al.*, 1996). Η περιβαλλοντική μόλυνση και η έντονη θερμική επεξεργασία είναι οι κύριες πηγές PAHs στα τρόφιμα. Το κάπνισμα, το ψήσιμο και το βράσιμο που εφαρμόζονται κατά την προετοιμασία και παραγωγή προϊόντων ευθύνονται για την παραγωγή PAHs. Ο σχηματισμός και η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από την αύξηση της θερμοκρασίας (Stolyhwo & Sikorski, 2005). Στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης οι PAHs εισέρχονται στο ζώο μέσω της τροφής του, εφόσον αυτή είναι επιβαρυσμένη με αυτές τις ουσίες (Yurchenco & Molder, 2005).

Το κάπνισμα των αλιευμάτων με χρήση υγρού καπνού μειώνει την περιεκτικότητα σε PAHs στα τρόφιμα (Siskos, 2004), σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους καπνίσματος όπου η ύπαρξή τους αποτελεί ένα από τα κυριότερα προβλήματα (Hattula *et al.*, 2001). Έχει αναφερθεί ότι τα συνολικά ποσά PAHs στα προϊόντα υγρού καπνού κυμαίνονται από 200–480 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ενώ στα προϊόντα που καπνίστηκαν με την παραδοσιακή μέθοδο του κρύου

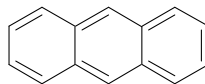
καπνίσματος η ποσότητα αυτή ήταν 650–1200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Hattula *et al.*, 2001).

Μεταξύ των πολυκυκλικών υδρογονανθράκων που έχουν απομονωθεί από τα καπνισμένα τρόφιμα περιλαμβάνεται το βενζο(α)πυρένιο. Θεωρείται παράγοντας βιολογικών μεταλλάξεων και καρκινογενής ένωση (Stolyhwo & Sikorski, 2005). Η συγκέντρωσή του στον υγρό καπνό και τα προϊόντα του βρέθηκε σε συγκεντρώσεις 0.1-36.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και 0.1-5.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ αντίστοιχα (Chen *et al.*, 1997). Το ανώτατο επιτρεπτό όριο του στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι 0,03ppb (Iliadis, 2004). Βρέθηκε ότι το Β(α)Ρ αποσυντίθεται παρουσία οξυγόνου, φωτός και σε αλκαλικές συνθήκες (Chen *et al.*, 1997).

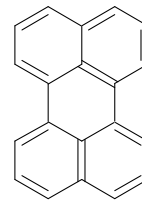
3,4-βένζο(α)πυρένιο



ανθρακένιο



περυλένιο



Σχήμα 2: Μοριακή δομή ορισμένων PAHs

2.2.1.8 Προϊόντα αποικοδόμησης ATP

Το ATP είναι ένα σημαντικό νουκλεοτίδιο στους μύς των ζωντανών οργανισμών. Μετά θάνατον το ATP αποικοδομείται από ενδογενή ένζυμα (Sikorski *et al.*, 1990α). Στους μύς των αλιευμάτων, το ATP μετατρέπεται σε AMP και εν συνεχεία σε IMP. Το πρώτο στάδιο της

αποικοδόμησης του ATP καταλύεται από ενδογενή ένζυμα και είναι μια πολύ γρήγορη διαδικασία. Η υδρόλυση του ATP σε IMP ολοκληρώνεται σε 2 περίπου ημέρες από την αλίευση (Sikorski *et al.*, 1990b). Στη συνέχεια το IMP μετατρέπεται σε Ino και Hx.

ATP → ADP → AMP → IMP → Inosine → Hypoxanthine

Η αποικοδόμηση του ATP επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αλιεύματος. Το IMP μάλλον είναι γλυκό και παίζει σημαντικό ρόλο στη γεύση των θαλασσινών. Η Hx είναι μια ελαφρώς πικρή ουσία που ο σχηματισμός της μπορεί να κάνει δυσάρεστη την γεύση του αλιεύματος κατά τη διάρκεια συντήρησής του.

Οι μεταβολές στα προϊόντα αποικοδόμησης του ATP μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες φρεσκάδας και φρεσκότητας (Regenstein & Regenstein, 1991).

2.2.1.9 Μικροβιακή χλωρίδα

Η ποιότητα των καπνιστών αλιευμάτων και η διάρκεια ζωής τους εξαρτάται από τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό, τις συνθήκες επεξεργασίας, τη μεταχείριση του τελικού προϊόντος και τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζεται από τη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, τη θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία και την πυκνότητα του καπνού (Kolodziejaska *et al.*, 2002) ενώ ο συνολικός αριθμός μεσοφίλων δεν συμβαδίζει με την ποιότητα και τη διάρκεια συντήρησης των τελικών

προϊόντων (Hansen *et al.*, 1996). Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης των καπνιστών αλιευμάτων σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι τα γαλακτικά βακτήρια, τα εντερικής φύσεως βακτήρια, οι μούχλες, κάποια Gram- αρνητικά βακτήρια και ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης η *Listeria monocytogenes* (Hansen *et al.*, 1995).

Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο Gram-θετικό, κυλινδρικό βακτήριο και έχει βρεθεί σε μη επεξεργασμένα και επεξεργασμένα αλιεύματα συμπεριλαμβανομένων και των καπνιστών (Seeling & Jones, 1986).

Εάν στο αρχικό αλίευμα υπάρχει ο παθογόνος μικροοργανισμός, η επεξεργασία του καπνίσματος δεν θα τον αδρανοποιήσει όπως συμβαίνει με πολλά βακτήρια (Espe *et al.*, 2004). Η *L. monocytogenes* επιβιώνει τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης (Espe *et al.*, 2004; Kolodziejaska *et al.*, 2002). Επίσης η συσκευασία των αλιευμάτων υπό αναερόβιες συνθήκες δεν παρεμποδίζει την ανάπτυξη της. Η παρουσία της *L. monocytogenes* σε καπνιστά αλιεύματα που καταναλώνονται ως έχουν χωρίς επιπλέον θερμική επεξεργασία αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών (Espe *et al.*, 2004).

Ανακοινώθηκε ότι η *L. monocytogenes* συναντάται συχνότερα σε αλιεύματα που έχουν υποστεί ψυχρό κάπνισμα (13,6%) ενώ η συχνότητα εμφάνισης του παθογόνου αυτού βακτηρίου σε θερμά καπνισμένα

αλιεύματα είναι χαμηλότερη (8,9%) (Jemmi & Keusch, 1992). Οι Kolodziejska *et al.*, (2002) ανακοίνωσαν συχνότητα εμφάνισης *L. monocytogenes* σε ψυχρά καπνισμένα αλιεύματα της τάξης του 11-60% ενώ σε θερμά καπνισμένα 4-12%. Σύμφωνα με τους Rovnik *et al.*, (1995) ο υγρός καπνός έχει ανασταλτική δράση στο συγκεκριμένο βακτήριο. Η πλειοψηφία της φυσικής μικροχλωρίδας των ψυχρά καπνισμένων αλιευμάτων συνίσταται από γαλακτικά βακτήρια τα οποία αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος σε ότι αφορά τον πληθυσμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως ως καλλιέργειες εκκίνησης σε διάφορες διεργασίες που σχετίζονται με τη μεταποίηση των τροφίμων καθώς παρουσιάζονται ικανά να αναστέλλουν την αλλοίωση και την ανάπτυξη όμοιων με αυτά στελεχών μικροοργανισμών ή στενά σχετιζόμενων με αυτά ειδών βακτηρίων (Cotte *et al.*, 1999). Παράγουν φυσικά συντηρητικά όπως οργανικά οξέα, υπεροξειδίο του υδρογόνου και διακετύλιο ενώ ταυτόχρονα μπορεί να μειώνουν το pH των τροφίμων κατά τη ζύμωσή τους. Επιπλέον, ορισμένα γαλακτικά βακτήρια παράγουν βακτηριοσίνες. Πρόκειται για πεπτιδία, τα οποία έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον για χρήση τους ως φυσικά συντηρητικά λόγω της βακτηριοστατικής και βακτηριοκτόνου δράσης τους έναντι ευαίσθητων ειδών βακτηρίων (Lyhs *et al.*, 1999).

3. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

- Η επιλογή των καταλληλότερων συνθηκών ξήρανσης και αλατίσματος μέσω οργανοληπτικού ελέγχου και φυσικοχημικών μεταβολών.
- Η παρασκευή καπνιστών φιλέτων πέστροφας με χρησιμοποίηση υδατοδιαλυτών φυσικών συμπυκνωμάτων καπνού, σε διαφορετικές συνθήκες πίεσης (1, 1,5 και 2bar) και διαφορετικούς χρόνους καπνίσματος (30, 45 και 60min).
- Ο έλεγχος της ποιότητας των τελικών προϊόντων μέσω μελέτης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και φυσικοχημικών μεταβολών (χρώμα, διαθέσιμη λυσίνη, PAHs).
- Η επιλογή του πιο αποδεκτού καπνιστού προϊόντος και η εκτίμηση του χρόνου συντήρησής μέσω μικροβιολογικών (ΟΜΧ, γαλακτικά βακτήρια, *L. monocytogenes*) και οργανοληπτικών ελέγχων καθώς και φυσικοχημικών μεταβολών (οξειδωση λίπους, προϊόντα αποικοδόμησης ATP, ολικές φαινόλες).
- Η παραγωγή καπνιστών φιλέτων πέστροφας με μια πιο γρήγορη και οικονομική μέθοδο (χρησιμοποιώντας συμπύκνωμα καπνού) από την παραδοσιακή με έμφαση στην υγιεινή και την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Υλικά και μέθοδοι

4.1.1 Αλιεύματα

Η προμήθεια της πρώτης ύλης, πέστροφα (*Salmo gairdneri*) με μέσο βάρος 400-600g, έγινε από ιχθυοτροφείο των Ιωαννίνων. Μετά την αλιεία τα δείγματα έφτασαν στο ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης σε κατάλληλη συσκευασία. Αμέσως μετά την άφιξή τους έγινε ο εκσπλαχνισμός, το καθάρισμα και η ζύγιση όλων των δειγμάτων πριν το στάδιο του αλατίσματος.

4.1.2 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ήταν αναλυτικής ή HPLC καθαρότητας.

4.1.3 Όργανα

-φούρνος τύπου σταθερής θερμοκρασίας για τον προσδιορισμό της υγρασίας.

-συσκευή καύσης και απόσταξης Kjeldahl τύπου Buchi 321 για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών.

-φυγόκεντρος Sorvall RC – 28S με ελεγχόμενη θερμοκρασία, για φυγοκέντρωση των δειγμάτων κατά τον προσδιορισμό του ολικού λίπους.

-περιστροφικός συμπυκνωτής κενού Buchi Re III για την εκχύλιση του λίπους.

-χρωματόμετρο τύπου Dr Lange για τον προσδιορισμό του χρώματος

-Ομογενοποιητής τύπου X620 CAT για την ομογενοποίηση των δειγμάτων

-VIDAS LMO2 συσκευή ανίχνευσης παρουσίας *Listeria monocytogenes*

-Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography) μοντέλο Focus GC (ThermoFinnigan Italia) με τριχοειδή στήλη μήκους 30m, με πόρους 0,25μm και εσωτερικής διαμέτρου (ID) 0,32mm για τον έλεγχο της κατανομής των λιπαρών οξέων και των PAHs.

-Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) μοντέλο Marathon IV συνδεδεμένο με ανιχνευτή FASMA 525 UV για προσδιορισμό της διαθέσιμης λυσίνης και των προϊόντων αποικοδόμησης ATP.

4.1.4 Μεταχείριση δειγμάτων για επιλογή κατάλληλης επεξεργασίας

Με την άφιξη των αλιευμάτων στον εργαστηριακό χώρο έγινε εκσπλαχνισμός, πλύσιμο και φιλετοποίησή τους. Τα φιλέτα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 20% για 1, 2, 3 και 16 ώρες. Προκειμένου να περιοριστεί η μικροβιακή ανάπτυξη η θερμοκρασία της άλμης διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα, στους $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Μετά το στάδιο του αλατίσματος τα μισά αλιεύματα επεξεργάστηκαν αμέσως ενώ τα υπόλοιπα ξηράθηκαν στους 43°C σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης, 0, 1, 2, 4 και 14 ώρες. Όλα τα φιλέτα επεξεργάστηκαν στις ίδιες συνθήκες (χρόνος καπνίσματος 1 ώρα και πίεση 2bar) χρησιμοποιώντας υδατοδιαλυτά φυσικά συμπυκνώματα καπνού. Μετά το κάπνισμα τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου και συντηρήθηκαν στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Ο συνδυασμός των δύο παραγόντων (χρόνος ξήρανσης-χρόνος αλατίσματος) οδήγησε σε 20 συνδυασμένα επίπεδα επεξεργασίας τα οποία αναλυτικά απεικονίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Πλάνο επεξεργασίας και κωδικοποίηση δειγμάτων.

Χρόνος αλατίσματος (ώρες)	Χρόνος ξήρανσης (ώρες)				
	0	1	2	4	14
1	A1	A2	A3	A4	A5
2	B1	B2	B3	B4	B5
3	C1	C2	C3	C4	C5
16	D1	D2	D3	D4	D5

4.1.5 Επεξεργασία καπνίσματος

Αλιεύματα αγοράστηκαν εκ νέου εκσπλαχνίστηκαν, πλύθηκαν και φιλετοποιήθηκαν. Τα φιλέτα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 20% και παρέμειναν για 1 ώρα σε χαμηλή θερμοκρασία ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$). Μετά το αλάτισμα τα μισά δείγματα επεξεργάστηκαν αμέσως ενώ τα υπόλοιπα ξηράθηκαν στους 43°C για 4 ώρες. Στα φιλέτα εφαρμόστηκαν διαφορετικές συνθήκες πίεσης (1, 1,5 και 2 bar) και χρόνοι επεξεργασίας (30, 45 και 60min). Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου και συντηρήθηκαν στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ο συνδυασμός των δύο παραγόντων (χρόνος επεξεργασίας-πίεση) συντέλεσε σε 9 διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας. Αυτό συνδυάστηκε με τα δύο επίπεδα της ξήρανσης (ξηραμένα ή μη) και έτσι το σχέδιο οδήγησε σε 18

συνδυασμένα επίπεδα επεξεργασίας τα οποία αναλυτικά απεικονίζονται στον πίνακα 4.

Το κάπνισμα όλων των δειγμάτων έγινε με τη χρήση μιας οικιακής χύτρας ατμού, η οποία βελτιώθηκε ως προς τα συστήματα ελέγχου στο ηλεκτρονικό εργαστήριο του Τμήματος, σε διάλυμα καπνού 2%. Η μέτρηση των θερμοκρασιών έγινε με την βοήθεια θερμοζεύγους.

Κατά τον χειρισμό της πρώτης ύλης τηρήθηκαν οι απαραίτητες συνθήκες υγιεινής επεξεργασίας: Χρήση καθαρών μαχαιριών, ψυχρού νερού για το πλύσιμο των δειγμάτων, συντήρηση σε συνθήκες ψύξης κατά τη διάρκεια αναμονής, χρησιμοποίηση γαντιών, εξέταση της συσκευασίας για ξένες ύλες, διατήρηση της χαμηλής θερμοκρασίας κατά τη φιλετοποίηση των δειγμάτων.

Πίνακας 4: Πλάνο επεξεργασίας και κωδικοποίηση δειγμάτων.

	Χρόνος επεξεργασίας (min)	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
Μη ξηραμένα	30	A1	B1	C1
	45	A2	B2	C2
	60	A3	B3	C3
Ξηραμένα (4 ώρες)	30	D1	E1	F1
	45	D2	E2	F2
	60	D3	E3	F3

4.2 Μέθοδοι Ανάλυσης

4.2.1 Προσδιορισμός υγρασίας

Ο προσδιορισμός της υγρασίας έγινε με βάση την προτεινόμενη από την CEC (Comission of European Communities) μέθοδο ISOR 1442 (EEC,1979). Η περιεχόμενη υγρασία μετρήθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα (3 επαναλήψεις).

Περίπου 5g αλιεύματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε τρυβλίο petri, στο οποίο προηγουμένως είχαν ζυγιστεί με ακρίβεια 20g άμμου και ένα μικρό γυάλινο ραβδάκι. Το μίγμα άμμου και αλιεύματος αναμίχθηκε καλά με το ραβδάκι ώστε η άμμος να απλωθεί σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Τα δείγματα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φούρνο με αέρα στους $100\pm 2^{\circ}\text{C}$, μέχρι σταθερού βάρους για τουλάχιστον 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα τρυβλία με το περιεχόμενο μίγμα άμμου- αλιεύματος μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα για να κρυώσουν και ακολούθησε η ακριβής ζύγιση τους.

Η περιεκτικότητα σε υγρασία υπολογίστηκε ως εξής:

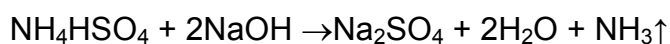
$$\% \text{ Υγρασία} = \frac{\text{ΑΡΧΙΚΟ ΒΑΡΟΣ} - \text{ΤΕΛΙΚΟ ΒΑΡΟΣ}}{\text{ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}}$$

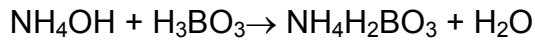
4.2.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Kjeldahl όπως περιγράφεται από τους Cowie & Mackie (1968). Η μέτρηση των πρωτεϊνών έγινε με 3 επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

Περίπου 1g σάρκας δείγματος ζυγίστηκε με ακρίβεια σε αναλυτικό ζυγό, μέσα σε άτεφρο ηθμό, το δείγμα τυλίχτηκε προσεκτικά με τον ηθμό και εισήλθε σε φιάλη Kjeldahl. Στη φιάλη προστέθηκαν δύο ταμπλέτες (kjeltabs) (3,5g K₂SO₄ και 0,4g CuSO₄·5H₂O) και 20mL 98% πυκνό θειικό οξύ. Η φιάλη στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 400 – 800°C σε ειδικό μπλοκ θέρμανσης, μέχρι το περιεχόμενο να γίνει πράσινο (λόγω θειικού χαλκού) και διαυγές, για περίπου 2 ώρες.

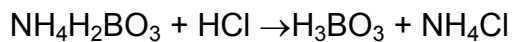
Μετά την καύση της οργανικής ύλης, που είχε ως αποτέλεσμα την μετατροπή της οργανικής ύλης σε αμμωνιακό άλας (NH₄HSO₄), ακολούθησε απόσταξη κατά την οποία, κάτω από έντονα αλκαλικό περιβάλλον (προσθήκη NaOH 50%) και με σημαντική συμμετοχή της θέρμανσης απελευθερώθηκε αμμωνία (σε αέρια μορφή) η οποία διέφυγε από την άκρη της αποστακτικής συσκευής και δεσμεύτηκε από 40mL βορικό οξύ συγκέντρωσης 4%. Το βορικό οξύ που βρισκόταν σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε στο τελευταίο άκρο της συσκευής απόσταξης, το οποίο ήταν εμβαπτισμένο μέσα στο οξύ έτσι ώστε να μην επιτρέπεται στην αμμωνία να διαφεύγει στο περιβάλλον, αλλά να δεσμεύεται αμέσως από το βορικό οξύ.





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

Η απόσταξη ολοκληρώθηκε με την συγκέντρωση 100mL αποστάγματος. Ακολούθησε ογκομέτρηση του παραπάνω ασταθούς συμπλόκου με 0,1N διάλυμα υδροχλωρικού οξέος.



Το % άζωτο υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\% \text{ Ολικό Άζωτο} = \frac{0.14(S - B)}{W}$$

όπου:

S: mL 0.1N οξέος που καταναλώθηκαν για την ογκομέτρηση του δείγματος

B: mL 0.1N οξέος που καταναλώθηκαν για την ογκομέτρηση του λευκού

W: βάρος δείγματος σε g

Για τον υπολογισμό της πρωτεΐνης το ολικό άζωτο πολλαπλασιάστηκε με τον εμπειρικό συντελεστή Kjeldahl, 6.25.

4.2.3 Προσδιορισμός ολικού λίπους

Ο προσδιορισμός του ολικού λίπους έγινε με τη μέθοδο Blight & Dyer (1959) όπως τροποποιήθηκε από τους Hanson & Olley (1963).

10g δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε φιάλη ομογενοποίησης 200mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 9mL απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε προσθήκη 20mL χλωροφόρμιου που περιείχε 0,01% BHT και 40mL μεθανόλης. Το μείγμα ομογενοποιήθηκε για 1min. Κατά την διάρκεια της ομογενοποίησης η θερμοκρασία του δείγματος διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Στη συνέχεια προστέθηκαν στη φιάλη ομογενοποίησης άλλα 20mL χλωροφόρμιου με 0,01% BHT και ακολούθησε νέα ομογενοποίηση για 30s. Ακολούθησε μια ακόμη ομογενοποίηση για 30s μετά την προσθήκη 20mL απεσταγμένου νερού.

Το ομογενοποιημένο μίγμα μεταφέρθηκε σε φιάλες φυγοκέντρησης οι οποίες αφού ζυγίστηκαν για ίσο βάρος, φυγοκεντρήθηκαν στις 2.000rpm για 20 min στους 4°C.

Μετά τη φυγοκέντρηση και με τη βοήθεια ενός σιφωνίου πληρώσεως μεταφέρθηκαν 20mL από τον πυθμένα της φιάλης φυγοκέντρησης σε αποξηραμένη και προζυγισμένη φιάλη του περιστροφικού συμπυκνωτή όπου ακολούθησε η συμπύκνωση του χλωροφορμίου. Μετά την συμπύκνωση η φιάλη με το λίπος τοποθετήθηκε σε φούρνο θερμοκρασίας 105°C για 10min και μετά την ψύξη της σε ξηραντήρα (περίπου 15min) ζυγίστηκε.

Η διαφορά του βάρους της πρώτης από τη δεύτερη ζύγιση της φιάλης οφειλόταν στο λίπος που βρισκόταν μέσα στη φιάλη. Η διαφορά αυτή πολλαπλασιάστηκε με το 2, γιατί χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 40mL χλωροφορμίου για την εκχύλιση του λίπους, ενώ συμπυκνώθηκαν μόνο τα 20mL.

Το ποσοστό του ολικού λίπους υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\% \quad \text{Ολικό} \quad \text{λίπος} \quad = \frac{\text{ΒΑΡΟΣ ΕΚΧΥΛΙΖΟΜΕΝΟΥ ΛΙΠΟΥΣ} \times 2}{\text{ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}} \times 100$$

4.2.4 Συγκέντρωση άλατος

Η μέθοδος Volhard χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του χλωριούχου νατρίου (AOAC, 1995).

Περίπου 1,5 g δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε κωνική φιάλη 100 mL. Το δείγμα θερμάνθηκε στους 80°C περίπου (για περίπου 5min) και προστέθηκαν 10mL πυκνού νιτρικού οξέος (στον απαγωγό), 25mL πρότυπου διαλύματος νιτρικού αργύρου 0,1 N και 10mL απεσταγμένο νερό.

Ακολούθησε ήπιος βρασμός του δείγματος για περίπου 20min. Αφού το δείγμα κρύωσε προστέθηκαν 25mL απεσταγμένο νερό, 1mL δείκτης στυπτηρίας σιδήρου και 1mL νιτροβενζόλιο. Το μίγμα (περίσσεια νιτρικού αργύρου) ογκομετρήθηκε με 0,1N θειοκυανιούχου καλίου μέχρι την απόκτηση μόνιμου πορτοκαλοκόκκινου χρώματος.

Ο λευκός προσδιορισμός έγινε ως εξής: 25mL 0,1N νιτρικού αργύρου, 25mL απεσταγμένο νερό, 10mL πυκνό νιτρικό οξύ,

1mL δείκτη στυπτηρίας σιδήρου και 1mL νιτροβενζολίου προστέθηκαν σε κωνική φιάλη. Το μίγμα ογκομετρήθηκε με θειοκυανιούχο κάλιο 0,1N μέχρι την απόκτηση μόνιμου πορτοκαλοκκόκινου χρώματος.

$$\% \text{ Χλωριούχο νάτριο} = \frac{(T_1 - T_2) \times 0,1 \times 58,5}{W}$$

T₁: mL 0,1N θειοκυανιούχου καλίου που καταναλώθηκαν για το λευκό προσδιορισμό

T₂: mL θειοκυανιούχου καλίου που καταναλώθηκαν για το δείγμα

W: βάρος του δείγματος σε g

4.2.5 Προσδιορισμός pH

Για να μετρηθεί το pH των φιλέτων της πέστροφας τα δείγματα προετοιμάσθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο των Cortes-Ruiz *et al.*, (2001).

4.3 Εκτίμηση των αλλαγών κατά το κάπνισμα

4.3.1 Τιμή υπεροξειδίων (PV)

Ο προσδιορισμός της τιμή υπεροξειδίων έγινε με τη μέθοδο Lea (1952). Γίνεται πρώτα η εκχύλιση του λίπους όπως περιγράφηκε στην 4.2.3.

Περίπου 0,1 με 0,5g λίπους ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε κωνική φιάλη 250mL με πώμα. Προστέθηκαν 20mL χλωροφορμίου για να διαλυτοποιήσουν το λίπος, 50mL

μίγματος οξικού οξέος: χλωροφορμίου (60:40) και 1mL κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Το περιεχόμενο της φιάλης αναδεύτηκε περιστροφικά για 30s και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σκοτεινό μέρος για 30 min. Μετά την πάροδο των 30s προστέθηκε 1mL 1% δείκτης αμύλου για την καλύτερη αναγνώριση του τέλους της ογκομέτρησης. Ο λευκός προσδιορισμός έγινε ακολουθώντας την ίδια ακριβώς διαδικασία αλλά χωρίς την προσθήκη λίπους.

$$\text{Τιμή Υπεροξειδίων} = \frac{N * 1000 * (S - B)}{W} \text{ meqO}_2 / \text{kg λίπους}$$

Όπου: S= ογκομέτρηση δείγματος σε mL

B= ογκομέτρηση λευκού σε mL

W= βάρος δείγματος σε g

N= κανονικότητα θειοθειϊκού νατρίου

4.3.2 Τιμή ανισιδίνης (AV)

Ο προσδιορισμός της τιμή ανισιδίνης έγινε με τη μέθοδο Egan *et al.*, (1981). Γίνεται πρώτα η εκχύλιση του λίπους όπως περιγράφηκε στην 4.2.3.

0,1 με 0,5g λίπους διαλύθηκαν σε 10mL ισο-οκτάνιο που περιείχε μερικές σταγόνες οξικού οξέος. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε 25mL ογκομετρική φιάλη η οποία συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με ισο-οκτάνιο.

1mL οξικού οξέος προστέθηκε σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες A και B. Στη συνέχεια 5mL ισο-οκτανίου προστέθηκαν στο σωλήνα A και 5mL διαλύματος λίπους στο σωλήνα B. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης (E) του B στα 350nm με το A ως λευκό.

Σε δύο άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες, C και D, προστέθηκε 1mL αντιδραστηρίου ανισιδίνης (0,25g παρα-ανισιδίνης, άχρωμη ή ελαφρά κίτρινη, σε 100 mL οξικό οξύ), και ακολούθησε προσθήκη 5mL ισο-οκτανίου στο σωλήνα C και 5mL λίπους στο σωλήνα D. Μετά από 15min παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου η απορρόφηση (Ea) του D μετρήθηκε στα 350nm με το C ως λευκό.

Η τιμή ανισιδίνης υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Τιμή ανισιδίνης} = \frac{20 * (Ea - E)}{W}$$

20 γιατί χρησιμοποιούνται 5mL διαλύματος λίπους από τα 25mL.

Όπου: E(a)= η απορρόφηση με την συμμετοχή της ανισιδίνης

E= η απορρόφηση του διαλύματος λίπους

W= βάρος του δείγματος σε g

4.3.3 Προσδιορισμός μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME)

Η μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων έγινε με μια απλή και γρήγορη μέθοδο που περιέγραψαν οι Zotos *et al.*, (1995). Η μέτρηση των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME) έγινε με 3 επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

Έγινε πρώτα η εκχύλιση του λίπους όπως περιγράφηκε παραπάνω (4.2.3), χωρίς το στάδιο της ξήρανσης στον φούρνο.

Περίπου 25 – 50mg λίπους ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε βιδωτό φιαλίδιο των 10mL και προστέθηκαν 1,5mL 0,5M NaOH σε μεθανόλη. Το φιαλίδιο βιδώθηκε ερμητικά, το περιεχόμενο του αναδεύτηκε, και θερμάνθηκε στους 100°C σε ειδική συσκευή θέρμανσης (heating block) για 15min. Μετά την θέρμανση αφέθηκε να κρυώσει και έγινε προσθήκη 2mL 14% τριφθοριούχου βορίου (boron trifluoride) σε μεθανόλη. Το φιαλίδιο βιδώθηκε ερμητικά, το περιεχόμενο του αναδεύτηκε και θερμάνθηκε στους 100°C στην ίδια συσκευή για 5min.

Ακολούθησε πτώση της θερμοκρασίας του μίγματος στους 30-40°C και προστέθηκε 1mL ισοοκτανίου. Το φιαλίδιο πωματίστηκε ερμητικά και το μίγμα αναδεύτηκε, με την χρησιμοποίηση αναδευτήρα δοκιμαστικών σωλήνων, για 30s. Ακολούθησε η προσθήκη 5mL κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου, και το μίγμα αναδεύτηκε, με την βοήθεια της παραπάνω συσκευής, για άλλα 30s.

Το φιαλίδιο αφέθηκε σε ηρεμία ώστε να επιτραπεί ο διαχωρισμός του ισοοκτανίου, το οποίο στην συνέχεια σιφωνίστηκε με πιπέτα Pasteur και μεταφέρθηκε σε ένα μικρό, σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο ειδικό για συντήρηση δειγμάτων. Τα εκχυλίσματα του ισο-οκτανίου τοποθετήθηκαν σε μικρά, σκοτεινά φιαλίδια και καταψύχθηκαν στους -30°C μέχρι την ανάλυση τους στην αέρια χρωματογραφία.

Στην ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε ήλιο ως αέριο μεταφοράς με ροή $1\text{mL}/\text{min}$. Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 150°C για 4min και ρυθμίστηκε έτσι ώστε να αυξάνει 4°C ανά λεπτό, με τελική θερμοκρασία τους 230°C . Η θερμοκρασία του χώρου όπου έγινε η έκχυση του δείγματος ρυθμίστηκε στους 230°C από την αρχή και διατηρήθηκε σταθερή. Η ποσότητα του ενέσιμου δείγματος ήταν $1\mu\text{L}$. Τα εξερχόμενα από την στήλη λιπαρά οξέα ανιχνεύτηκαν από ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) και αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού EZCHROM, το οποίο δίνει την ολοκλήρωση του εμβαδού της κάθε κορυφής καθώς και το ποσοστό της περιοχής που καταλαμβάνει η καμπύλη του κάθε λιπαρού οξέος εκφρασμένη στο σύνολο των λιπαρών οξέων και τον χρόνο κατακράτησης από την στήλη του κάθε λιπαρού οξέος.

Για την ποιοτική ανάλυση των λιπαρών οξέων ήταν απαραίτητη η χρησιμοποίηση πρότυπων διαλυμάτων λιπαρών οξέων των οποίων η ανάλυση από τον χρωματογράφο προηγήθηκε της ανάλυσης των δειγμάτων.

4.3.4 Προσδιορισμός διαθέσιμης λυσίνης

Ο προσδιορισμός της διαθέσιμης λυσίνης έγινε με τη μέθοδο Peterson & Warthesen (1979).

Περίπου 0,5g δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε 250mL φιάλη βρασμού και προστέθηκαν πετραδάκια βρασμού, αντιαφριστική σιλικόνη, 12,5mL, 0,95M όξινου ανθρακικού νατρίου και 15mL διαλύματος FDNB (1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο) που παρασκευάστηκε ως εξής, 0,4mL FDNB σε 15mL αιθυλικής αλκοόλης. Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (στο υδατόλουτρο με έντονη κίνηση). Μετά την ανάδευση, προστέθηκε νερό και θερμάνθηκε στους 80°C για την εξάτμιση της αιθανόλης. Προστέθηκαν 30mL 8,1M υδροχλωρικού οξέος και το μίγμα έβρασε με ταυτόχρονη ψύξη για αναρροή των υδρατμών (reflux) για 16 ώρες. Μετά την διαδικασία αναρροής το μίγμα και ενώ ήταν ακόμη θερμό διηθήθηκε από Whatman No1 διηθητικό χαρτί μέσα σε 250mL ογκομετρική φιάλη και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με αποσταγμένο νερό. Μια μικρή ποσότητα από το διήθημα διηθήθηκε από διηθητικό φίλτρο με πόρους 0,2μm και το νέο διήθημα ετοιμάστηκε για να αναλυθεί σε HPLC.

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης ε-DNP και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Λειτουργία χρωματογράφου (HPLC)

- Στήλη MicroBondapak-στατική φάση C18 (μήκος 30cm, διάμετρος 4mm).

- Κινητή φάση, 0,01M οξικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 4,0 και ακετονιτρίλιο 80:20 αντίστοιχα.
- Ταχύτητα ροής κινητής φάσης 2,0mL/mm.
- Ενέσιμη ποσότητα 10mL.
- Ανίχνευση ορατού 436nm.

4.3.5 Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου

Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

10g δείγματος ομογενοποιήθηκαν με 90mL αραιωτικού (υδατικό διάλυμα 0,1% πεπτόνης και 0,9% NaCl) σε stomacher bag mixer για 60s και με αυτό τον τρόπο παρασκευάστηκε η αρχική αραιώση 1/10. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν άλλες 7 δεκαδικές αραιώσεις με τη μεταφορά 1mL σε σωλήνα που περιείχε ποσότητα αραιωτικού 9mL.

Ενοφθαλμισμός και επώαση των τρυβλίων Petri

Ο ενοφθαλμισμός των τρυβλίων έγινε με την τεχνική της ενσωματώσεως. Δύο υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν: το άγαρ καταμετρήσεως (Plate Count Agar) το οποίο είναι θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιέχει καμία ανασταλτική ουσία με αποτέλεσμα να προσδιορίζεται ο ολικός πληθυσμός των μεσόφιλων αερόβιων βακτηρίων (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, OMX) και το MRS Agar, θρεπτικό υπόστρωμα για τον προσδιορισμό των γαλακτικών βακτηρίων. Από κάθε δεκαδική αραιώση μεταφέρθηκε 1mL

και τοποθετήθηκε στο κέντρο του πυθμένα αποστειρωμένου τρυβλίου Petri. Από κάθε αραίωση ο ενοφθαλμισμός έγινε σε δύο τρυβλία Petri. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 15mL υποστρώματος θερμοκρασίας 45-46°C. Η ανάμιξη του ενοφθαλμισματος με το υπόστρωμα έγινε με ήπιες κυκλικές κινήσεις ώστε η διασπορά των μικροβίων στη μάζα του υποστρώματος να είναι ομοιόμορφη. Μετά την πήξη του υποστρώματος τα τρυβλία Petri με το υπόστρωμα PCA τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα σε κλίβανο επώασης θερμοκρασίας 37°C για 48 ώρες ενώ τα τρυβλία με το υπόστρωμα MRS Agar τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 30°C για 3-5 ημέρες.

Μέτρηση αποικιών

Η μέτρηση των αποικιών έγινε με τη βοήθεια μετρητή αποικιών. Για την επιλογή των τρυβλίων και την αρίθμηση των αποικιών ακολουθήθηκαν οι κανόνες των Busta *et al.*, (1984).

Ο μικροβιολογικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε για το νωπό δείγμα αμέσως μετά τη φιλετοποίησή του. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις στα δύο δείγματα που επεξεργάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες και εξετάστηκε ο χρόνος συντήρησής τους έγιναν αμέσως μετά το κάπνισμα και στη συνέχεια κάθε εβδομάδα για 98 ημέρες.

4.3.5.1 Ανίχνευση *Listeria monocytogenes*

25g δείγματος ομογενοποιήθηκαν με 225mL ζωμού Half-Fraser και επώαστηκαν σε θερμοκρασία $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 24-26 ώρες. Μετά την επώαση 1mL από το παραπάνω αιώρημα μεταφέρθηκε σε σωλήνα που περιείχε 10mL ζωμό Fraser και τοποθετήθηκε σε θάλαμο επώασης $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 24-26 ώρες. Στη συνέχεια 500μL από το σωλήνα μεταφέρθηκαν στη συσκευή VIDAS LMO2 και το αποτέλεσμα ανίχνευσης παρουσίας *Listeria monocytogenes* ολοκληρώθηκε σε 70min ενώ το προεμπλουτισμένο αιώρημα αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία $2-8^{\circ}\text{C}$ για επιβεβαιωτική δοκιμή σε περίπτωση που το αποτέλεσμα ήταν θετικό. Σε περίπτωση παρουσίας *L. monocytogenes* ακολουθείται η εξής μέθοδος: απομόνωση σε δύο εκλεκτικά υποστρώματα Palkam και Oxford Άγαρ στους $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες. Οι αποικίες της *L. monocytogenes* που δημιουργούνται από το πρώτο είναι γκριζοπράσινες με μαύρη άλω ενώ από το δεύτερο υπόστρωμα σκούρες καφέ ως μαύρες με μαύρη άλω.

4.3.6 Οργανοληπτικός έλεγχος

Στον πρώτο οργανοληπτικό έλεγχο που διεξήχθη για τα αλιεύματα με μεταβαλλόμενους χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος έγινε με τη χρησιμοποίηση 21 δοκιμαστών. Η επανάληψη κάθε μεταχείρισης πραγματοποιήθηκε 5 φορές. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν ήταν: η ένταση του χρώματος των δύο όψεων του φιλέτου (σάρκα και δέρμα), η αλμυρότητα, το άρωμα καπνιστού (οσμή και

γεύση), η σκληρότητα και η αποδεκτότητα (έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου 1). Για την βαθμολόγηση της έντασης κάθε οργανοληπτικού χαρακτηριστικού χρησιμοποιήθηκε αδιαβάθμιτη κλίμακα μήκους 15cm, αυξανόμενης έντασης από 0 προς 15cm. Η αριστερή άκρη (0cm) της κλίμακας αντιπροσώπευε τη μηδενική ένταση των εξεταζόμενων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ενώ το τέλος της (15cm) την εντονότερη έντασή τους.

Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου εκτιμήθηκαν με εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης (general linear model). Όπου διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές η ανάλυση ($p < 0,05$) συνοδεύτηκε από τον έλεγχο του Tukey.

Στο δεύτερο οργανοληπτικό έλεγχο των καπνιστών φιλέτων πέστροφας εξετάστηκε η επίδραση των διαφορετικών πιέσεων 1, 1,5 και 2bar σε συνδυασμό με την επίδραση του χρόνου επεξεργασίας (30, 45, 60 min) και την επίδραση της ξήρανσης στα δείγματα (ξηραμένα ή μη ξηραμένα). Ο αριθμός των δοκιμαστών που πήραν μέρος στον έλεγχο αυτό ήταν 57. Σε καθένα από αυτούς παρουσιάστηκαν 3 δείγματα για αξιολόγηση. Η επανάληψη κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε 9 φορές. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν ήταν τα εξής: το χρώμα της σάρκας, η αρεστότητα ως προς το χρώμα, το άρωμα (οσμή και γεύση) καπνιστού, η αρεστότητα ως προς το άρωμα, η σκληρότητα και η αρεστότητα ως προς την σκληρότητα (έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου 2). Η αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε σε

αδιαβάθμιτη κλίμακα και τα αποτελέσματα του ελέγχου εκτιμήθηκαν βάσει της ανάλυσης της διακύμανσης όπως έγινε αναφορά στον προηγούμενο οργανοληπτικό έλεγχο.

Στον τρίτο οργανοληπτικό έλεγχο που διεξαγόταν κάθε εβδομάδα για 98 ημέρες, εξετάστηκαν τέσσερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (παρουσία εξωτερικής υγρασίας, οσμή, χρώμα, σκληρότητα) των δύο δειγμάτων που επιλέχθηκαν ως καταλληλότερα και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ (έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου 3). Στην τελευταία αυτή οργανοληπτική εξέταση εκτός των δύο δειγμάτων που ελέγχονταν κατά τη διάρκεια συντήρησής τους χρησιμοποιήθηκε κι ένα τρίτο δείγμα το οποίο είχε καπνιστεί την προηγούμενη ημέρα. Οι εξεταστές αξιολόγησαν και τα τρία δείγματα ως προς τα παραπάνω οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αγνοώντας την ταυτότητα του φρέσκου δείγματος.

4.3.6.1 Έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου 1

Παρουσιάζονται πέντε (5) διαφορετικά δείγματα επεξεργασμένης πέστροφας. Παρακαλούμε να εκτιμήσετε τα δείγματα χρησιμοποιώντας την παρακάτω αδιαβάθμιτη κλίμακα, γράφοντας τον κωδικό του κάθε δείγματος στο σημείο που επιθυμείτε. Αν νομίζετε ότι ένα ή περισσότερα δείγματα πρέπει να τοποθετηθούν στο ίδιο ακριβώς σημείο τότε γράψτε τα το ένα πάνω στο άλλο με τον ευκρινέστερο δυνατό τρόπο.

ΧΡΩΜΑ

Εκτιμήστε το χρώμα στην επιφάνεια της **σάρκας**.

Λευκό

Καφέ

ΧΡΩΜΑ

Εκτιμήστε το χρώμα του **δέρματος**.

Γκριζωπό

Καφετί

ΑΛΜΥΡΟΤΗΤΑ

Ανάλατο

Έντονα αλατισμένο

ΑΡΩΜΑ ΚΑΠΝΙΣΤΟΥ

Εκτιμήστε την ένταση της γεύσης και του αρώματος των καπνιστών προϊόντων

Καθόλου καπνιστό άρωμα

Έντονα καπνιστό άρωμα

ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑ

Η δύναμη που πρέπει να ασκηθεί έτσι ώστε τα πίσω δόντια να διαπεράσουν το δείγμα.

Καθόλου σκληρό

Πολύ σκληρό

ΑΠΟΔΕΚΤΟΤΗΤΑ

Αξιολογήστε τα δείγματα με βάση την προτίμησή σας στο αλάτι, το χρώμα, το άρωμα καπνιστού και τη σκληρότητα.

Καθόλου Αποδεκτό

Πολύ Αποδεκτό

4.3.6.2 Έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου 2

Παρουσιάζονται τρία (3) διαφορετικά δείγματα επεξεργασμένης πέστροφας. Παρακαλούμε να εκτιμήσετε τα δείγματα χρησιμοποιώντας την παρακάτω αδιαβάθμιτη κλίμακα, γράφοντας τον κωδικό του κάθε δείγματος στο σημείο που επιθυμείτε. Αν νομίζετε ότι ένα ή περισσότερα δείγματα πρέπει να τοποθετηθούν στο ίδιο ακριβώς σημείο τότε γράψτε τα με τον ευκρινέστερο δυνατό τρόπο. Στις ερωτήσεις που αφορούν την αρεστότητα ζητάμε την προσωπική σας, υποκειμενική άποψη για το κάθε δείγμα.

ΧΡΩΜΑ

Εκτιμήστε το χρώμα στην επιφάνεια της σάρκας.

Λευκό

Έντονα Καφετί

ΑΡΕΣΤΟΤΗΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΧΡΩΜΑ ΤΗΣ ΣΑΡΚΑΣ

Προσέγγιση χρώματος με το αναμενόμενο χρώμα καπνιστών προϊόντων.

Καθόλου Αρεστό

Έντονα Αρεστό

ΑΡΩΜΑ (ΟΣΜΗ, ΓΕΥΣΗ) ΚΑΠΝΙΣΤΟΥ

Εκτιμήστε την ένταση της γεύσης και του αρώματος των καπνιστών προϊόντων.

Απουσία Αρώματος Καπνιστού

Έντονο Άρωμα Καπνιστού

ΑΡΕΣΤΟΤΗΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΑΡΩΜΑ (ΟΣΜΗ, ΓΕΥΣΗ) ΚΑΠΝΙΣΤΟΥ

Προσέγγιση αρώματος με το αναμενόμενο άρωμα και την γεύση καπνιστών προϊόντων.

Καθόλου Αρεστό

Έντονα Αρεστό

ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑ

Η δύναμη που πρέπει να ασκηθεί έτσι ώστε τα πίσω δόντια να διαπεράσουν το δείγμα.

Καθόλου Σκληρό

Έντονα Σκληρό

ΑΡΕΣΤΟΤΗΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑ

Καθόλου Αρεστό

Έντονα Αρεστό

4.3.6.3 Έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου 3

Παρουσιάζονται τρία (3) διαφορετικά δείγματα καπνιστής πέστροφας. Παρακαλούμε να εκτιμήσετε τα παρακάτω χαρακτηριστικά των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε συνθήκες ψύξης, χρησιμοποιώντας την παρακάτω αδιαβάθμιτη κλίμακα, γράψτε τον κωδικό του κάθε δείγματος στο σημείο που επιθυμείτε.

Παρουσία Εξωτερικής Υγρασίας
Ελάχιστη Εξωτερική Υγρασία

Υπερβολική Εξωτερική Υγρασία

Σκληρότητα
Υπερβολικά Μαλακό

Υπερβολικά Σκληρό

Οσμή
Ξένες Οσμές

Οσμή Καπνιστού

Χρώμα
Λευκό

Έντονα Καφετί

Βασιζόμενοι στα παραπάνω οργανοληπτικά χαρακτηριστήκα, παρακαλώ εκτιμήστε αν τα δείγματα είναι κατάλληλα για κατανάλωση.

ΟΧΙ			ΙΣΩΣ			ΝΑΙ		
ΚΩΔΙΚΟΣ			ΚΩΔΙΚΟΣ			ΚΩΔΙΚΟΣ		

4.3.7 Στατιστική ανάλυση

Η εκτίμηση του χρόνου ξήρανσης και αλατίσματος έγινε με την χρήση ενός ατελώς ομαδοποιημένου πειράματος (balanced incompleted block design (BIBD)). Αυτό περιλάμβανε $t=21$ μεταχειρίσεις (5 διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και 4 διαφορετικούς χρόνους αλατίσματος), $r=5$ επαναλήψεις, $b=21$ δοκιμαστές και $\lambda=1$ (αριθμός συνεύρεσης των συνδυασμών των μεταχειρίσεων), $k=5$ μεταχειρίσεις για κάθε δοκιμαστή. Τα δείγματα του πειράματος ήταν 20. Έτσι, προστέθηκε στο στατιστικό σχέδιο ακόμα μία μεταχείριση υγρής καπνιστής πέστροφας ($5 \times 4 + 1$), ώστε να προσαρμοστούν στο πλάνο 13.13 που προτείνεται από τους Cochran & Cox (1957). Οι διορθωμένοι μέσοι όροι του οργανοληπτικού ελέγχου συγκεντρώθηκαν για τα 21 δείγματα για την κάθε επεξεργασία. Στο σημείο αυτό αποκλείστηκε το 21^ο δείγμα από περαιτέρω μελέτη και τα υπόλοιπα δείγματα μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την Ανάλυση Διακύμανσης δύο παραγόντων (two way ANOVA) (οι δύο παράγοντες ήταν ο χρόνος αλατίσματος και ξήρανσης).

Το ατελώς ομαδοποιημένο πείραμα (BIBD) επίσης εφαρμόστηκε για την εκτίμηση των φιλέτων πέστροφας που επεξεργάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. Δηλαδή 2 επίπεδα ξήρανσης (ξηραμένα, μη ξηραμένα), 3 επίπεδα πίεσης (1, 1,5 και 2 bar) και 3 επίπεδα χρόνου επεξεργασίας (30, 45 και 60min).

Έτσι, πραγματοποιήθηκε ο συνδυασμός $2 \times 3 \times 3 = 18$ δειγμάτων και στο πλάνο προστέθηκε ακόμα ένα δείγμα υγρής καπνιστής πέστροφας ($2 \times 3 \times 3 + 1$), ώστε να προσαρμοστούν στο πλάνο 13.15a των Cochran και Cox (1957). Το συγκεκριμένο πείραμα (BIBD) αποτελούνταν από $t=19$ μεταχειρίσεις, $r=9$ επαναλήψεις, $b=57$ δοκιμαστές και $\lambda=1$, $k=3$ μεταχειρίσεις για κάθε δοκιμαστή. Οι διορθωμένοι μέσοι όροι του οργανοληπτικού ελέγχου συγκεντρώθηκαν για τα 19 δείγματα για κάθε επεξεργασία. Το 19^ο δείγμα αποκλείστηκε από επιπλέον μελέτη. Όλα τα δείγματα μελετήθηκαν με την Ανάλυση Διακύμανσης τριών παραγόντων (three way ANOVA) για τα 3 επίπεδα και η αλληλεπίδραση των μέσων όρων αυτών για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ώστε να διαπιστωθούν πιθανές διαφορές τους.

Για να εκτιμηθεί ο χρόνος συντήρησης στους $4 \pm 1^\circ\text{C}$ τα φιλέτα της πέστροφας (0 και 4 ώρες ξήρανση πριν την επεξεργασία) δοκιμάστηκαν 14 φορές. Σε κάθε δοκιμή το ένα δείγμα ήταν καπνισμένο την προηγούμενη ημέρα. Το φρεσκοπαρασκευασμένο δείγμα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, άγνωστος στους δοκιμαστές, με σκοπό να γίνουν ευκολότερα αντιληπτές οι διαφορές. Τα αποτελέσματα μελετήθηκαν με την Ανάλυση Διακύμανσης δύο παραγόντων (two way ANOVA) (οι δύο παράγοντες ήταν ο χρόνος ξήρανσης και συντήρησης). Οι διαφορές ανάμεσα στους παράγοντες εκτιμήθηκαν με τον έλεγχο Tukey.

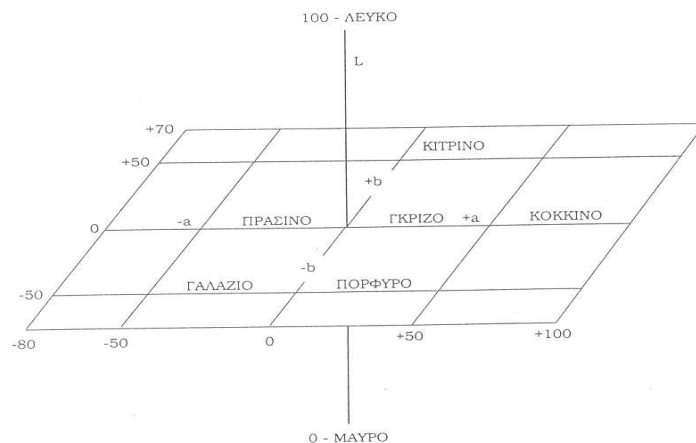
4.3.8 Προσδιορισμός χρώματος

Το χρωματόμετρο που χρησιμοποιήθηκε μετράει το χρώμα στη βάση του ορισμού ενός σημείου στον τρισδιάστατο χώρο. Διαθέτει λυχνία με αέριο ξένο (Xe) και το φως που εκπέμπει ανακλάται από το χρώμα του δείγματος. Με τον τρόπο αυτό μετρήθηκε το χρώμα και αναλύθηκε από μια σειρά φίλτρων (x, y, z) καθορισμένου χρώματος ταυτόχρονα με μια δέσμη αναφοράς. Τα αποτελέσματα μετά την επεξεργασία τους από το μικροεπεξεργαστή του οργάνου απεικονίστηκαν ηλεκτρονικά.

Η ρύθμιση του οργάνου έγινε με πλακίδια πρότυπου λευκού και μαύρου χρώματος.

Το χρώμα των δειγμάτων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τις μονάδες L, a, b του τρισδιάστατου χρωματικού πλέγματος του συστήματος Hunter (σχήμα 2), όπου L η φωτεινότητα, +a το κόκκινο, -a το πράσινο, +b το κίτρινο και -b το γαλάζιο.

Το χρώμα εκφράζεται με τις τιμές L και a/b και μετρήθηκε στο χρωματόμετρο σε μικρό εμβαδόν της επιφάνειας του τροφίμου, όπου τοποθετήθηκε μόνο η κεφαλή μέτρησης.



Σχήμα 2: Τρισδιάστατο χρωματικό πλέγμα του συστήματος Hunter (Παπαγρηγορίου, 2001)

4.3.9 Προσδιορισμός πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs)

Η μέθοδος προσδιορισμού των PAHs που εφαρμόστηκε βασίστηκε στη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τον Larsson (1982).

Ζυγίστηκαν 40g δείγματος σε σφαιρική φιάλη βρασμού 250mL και αναμίχθηκαν με 60mL μεθανολικό KOH 2M. Στη συνέχεια ακολούθησε βρασμός με αναρροή υδρατμών (reflux) για 2-4h, προστέθηκαν 50mL κυκλοεξάνιο και η αναρροή συνεχίστηκε για 5min.

Μετά την αλκαλική κατεργασία το δείγμα εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη με τη βοήθεια 30mL μεθανόλης-νερού (4:1). Αφού έγινε ο διαχωρισμός μεθανόλης-κυκλοεξανίου, το μεθανολικό εκχύλισμα πλύθηκε εκ νέου με 30mL κυκλοεξανίου. Το κυκλοεξάνιο αυτό της δεύτερης εκχύλισης ενώθηκε με εκείνο της πρώτης και ακολούθησε ξέπλυμα με την εξής σειρά:

- 30mL μεθανόλη-νερό (4:1)
- 30mL μεθανόλη-νερό (1:1)
- 2 φορές με 30mL νερό

Το τελικό εκχύλισμα του κυκλοεξανίου που λήφθηκε μετά από το σύνολο των παραπάνω πλύσεων αναμίχθηκε με 50mL DMF-νερού (9:1) αρχικά για τον καθαρισμό του. Έγινε

και δεύτερη ανάμιξη με 30mL DMF-νερού (9:1). Λήφθηκε το εκχύλισμα DMF-νερού, προστέθηκαν 80mL νερού και το μίγμα DMF-νερού εκχυλίστηκε με 50mL και 30mL κυκλοεξάνιο.

Τέλος, το εκχύλισμα του κυκλοεξανίου που πάρθηκε πλύθηκε δύο φορές με 30mL νερού και οδηγήθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή στους 35°C, όπου τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη 150mL και συμπυκνώθηκε σε όγκο περίπου 1mL. Ο προσδιορισμός των PAHs ολοκληρώθηκε με την ανάλυσή τους με αέρια χρωματογραφία.

Στην ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε ήλιο ως αέριο μεταφοράς με ροή 1mL/min. Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 165°C για 6min και ρυθμίστηκε έτσι ώστε να αυξάνει 4°C ανά λεπτό, με τελική θερμοκρασία τους 340°C. Η θερμοκρασία του χώρου όπου έγινε η έκχυση του δείγματος ρυθμίστηκε στους 260°C από την αρχή και διατηρήθηκε σταθερή. Η ποσότητα του ενέσιμου δείγματος ήταν 1μL.

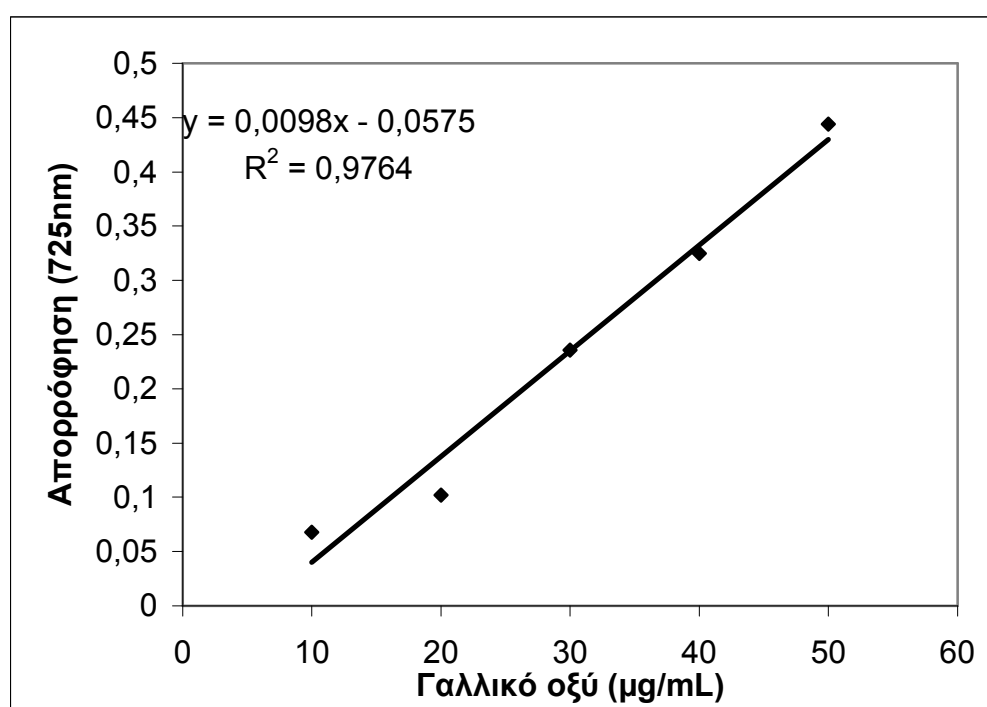
4.3.10 Ολικές φαινόλες

Οι ολικές φαινόλες προσδιορίστηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Randhir *et al.*, (2004).

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 50mg δείγματος, εμβαπτίστηκαν σε 2,5mL, 95% αιθανόλης και παρέμειναν στο ψυγείο 48-72h. Το δείγμα ομογενοποιήθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 13000rpm για 13min. 1mL από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 1mL

95% αιθανόλης, 5mL απεσταγμένο νερό και 0,5mL διαλύματος αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu (Sigma Chemical Co.). Αφού παρέμειναν για 5min προστέθηκε 1mL Na_2CO_3 έγινε καλή ανάμιξη και τα δείγματα παρέμειναν στο σκοτάδι για μια ώρα. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν καλά στο vortex και μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 725 nm.

Ο προσδιορισμός των φαινολών έγινε με την χρήση πρότυπης καμπύλης. Για την κατασκευή της χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (από 0 μέχρι 50μg/ mL, σχήμα 3).



Σχήμα 3 : Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό φαινολών

4.3.11. Προσδιορισμός προϊόντων αποικοδόμησης ATP

Τα προϊόντα αποικοδόμησης ATP προσδιορίστηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Veciana-Nogues *et al.*, (1997).

Η εκχύλιση έγινε στους 4°C. 10g ομογενοποιημένου δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε φιάλη φυγοκέντρησης 50mL. Προστέθηκαν 15mL 0,6M HClO₄ και ένας μαγνήτης. Το δείγμα αναμίχθηκε για 10min με μαγνητικό αναδευτήρα, φυγοκεντρήθηκε για 10min στις 3000rpm και παρέμεινε σε ηρεμία για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων.

Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό προστέθηκαν εκ νέου 10mL 0,6M HClO₄ στη στερεή φάση και αναμίχθηκαν για 10min και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση.

Μετά τη φυγοκέντρηση η στερεή φάση απομακρύνθηκε, οι δύο υπερχλωρικές φάσεις ενώθηκαν σε μια ογκομετρική φιάλη των 25mL η οποία συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με 0,6M HClO₄. Σε 10mL του υπερχλωρικού εκχυλίσματος έγινε ρύθμιση του pH στο 6,5-6,8 με 0.1N KOH και παρέμεινε στους 4°C για 30min. Στη συνέχεια διηθήθηκε για να απομακρυνθεί το KClO₄ και ο όγκος συμπληρώθηκε στα 25mL με φωσφορικό ρυθμιστικό (pH 7,0). Το εκχύλισμα τελικά διηθήθηκε μέσω φίλτρου 0,45μm πριν την ανάλυση στην HPLC χρησιμοποιώντας μεμβράνη HVLP 1300 0,45μm (Millipore).

Κινητή φάση A: 0.04M KH₂PO₄ και 0.06M K₂HPO₄·3(H₂O) σε pH 7,0 με 0.1M KOH.

Κινητή φάση B: Μεθανόλη

Ταχύτητα κινητής φάσης: 1mL/min. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το παρακάτω μεταβλητό διάλυμα:

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A %	Κινητή φάση B %
0	100	0
8	100	0
9	70	30
13	70	30

Η τιμή K υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Alasalvar *et al.*, (2002).

$$K = \frac{\text{Ino} + \text{Hx}}{(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{Ino} + \text{Hx})} \times 100$$

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Μέση σύσταση των μη επεξεργασμένων δειγμάτων πέστροφας

5.1.1 Ποσοστό υγρασίας, πρωτεϊνών και λίπους

Η μέση σύσταση των αλιευμάτων διαφέρει τόσο μεταξύ αλιευμάτων διαφορετικών ειδών όσο και του ίδιου είδους και εξαρτάται από το φύλο, την εποχή, τη διατροφή και το περιβάλλον στο οποίο ζουν (Puwastien *et al.*, 1999). Από τα παραπάνω προκύπτει η αναγκαιότητα ελέγχου της μέσης σύστασης των δειγμάτων.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 το ποσοστό της υγρασίας, των πρωτεϊνών και του λίπους των μη επεξεργασμένων δειγμάτων πέστροφας που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή αυτής της εργασίας δεν διαφέρουν από τα αντίστοιχα ποσοστά δειγμάτων ανάλογων ειδών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί η εμφανής αλληλεξάρτηση λίπους και υγρασίας, όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό υγρασίας τόσο χαμηλότερο το ποσοστό λίπους και αντίστροφα.

Πίνακας 5: Σύσταση των μη επεξεργασμένων δειγμάτων πέστροφας (*Salmo Gairdnerii*) και άλλων δειγμάτων από τη βιβλιογραφία

Δείγμα	Υγρασία %	Πρωτεΐνη %	Λίπος %
Πέστροφα ιχθυοτροφείου <i>Salmo Gairdnerii</i>	77,56±0,305	18,04±1,676	3,4±0,717
Πέστροφα λίμνης <i>Salvelinus Namaycush</i> Belinsky <i>et al.</i> , (1996)	79±3,47	13±3,7	10±3,7
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus Mykiss</i> Rasmussen & Ostefeld (2000)	75,1	19,4	5,5
Πέστροφα <i>Salmo Trutta</i> Regost <i>et al.</i> , (2001)	67,4	19,3	12,5

Οι Belinsky *et al.*, (1996) μελέτησαν διαφορετικά είδη πέστροφας στα οποία δεν παρατήρησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μέση σύσταση τους. Οι ίδιοι ερευνητές υποστήριξαν ότι ο τόπος αλιείας αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη σύσταση των αλιευμάτων. Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν από τους Puwastien *et al.*, (1999), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι τα θαλασσινά αλιεύματα περιείχαν χαμηλότερο ποσοστό λίπους από τα αντίστοιχα αλιεύματα του γλυκού νερού και ότι το ποσοστό της υγρασίας των αλιευμάτων της θάλασσας 71-80g/100g (μέσος όρος 74,7g/100g) παρουσίασε μικρότερη διακύμανση από τα αλιεύματα του γλυκού νερού 65-80g/100g (μέσος όρος 73,9g/100g).

Εκτός από τον τόπο αλιείας η σύσταση των αλιευμάτων επηρεάζεται και από τη διατροφή τους. Οι Rasmussen &

Ostenfeld (2000) μελέτησαν την επίδραση διαφορετικού διαιτολογίου σε δύο διαφορετικά είδη πέστροφας. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό πρωτεΐνης και υγρασίας μεταξύ των διαφορετικών ειδών πέστροφας, ενώ το ποσοστό λίπους κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα. Επιπλέον, το διαιτολόγιο που περιείχε υψηλότερο ποσοστό λίπους οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης του λίπους σε αμφότερα τα είδη. Άλλοι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση διαφορετικού διαιτολογίου σε διάρκεια τριών μηνών στην ιριδίζουσα πέστροφα και διαπίστωσαν υψηλότερο ποσοστό λίπους από τους Rasmussen & Ostenfeld (2000) καθώς και, όπως ήταν αναμενόμενο, χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας, ενώ στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές (Regost *et al.*, 2001).

5.1.2 Διαθέσιμη λυσίνη

Ο υπολογισμός της διαθέσιμης λυσίνης στα αλιεύματα και στα καπνιστά προϊόντά τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός διότι η απώλειά της σχετίζεται με μείωση της ποιότητας των πρωτεϊνών. Η λυσίνη είναι ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα και το πιο ευαίσθητο κατά την επεξεργασία του καπνίσματος (Siskos, 2004).

Το ποσοστό της διαθέσιμης λυσίνης στα μη επεξεργασμένα δείγματα ήταν $7,25 \pm 0,2g / 16g$ N (επί ξηρής ουσίας). Παρόμοια αποτελέσματα $7,03g$ λυσίνης/ $16g$ N σε μη επεξεργασμένα δείγματα ιριδίζουσας πέστροφας (*Salmo*

irideus) παρατηρήθηκαν από τους El & Kavas, (1996). Ωστόσο, οι Meinke *et al.*, (1972) διαπίστωσαν πολύ υψηλότερο ποσοστό διαθέσιμης λυσίνης (10,6g/ 16g N) σε μη επεξεργασμένα φιλέτα πέστροφας (*Cynoscion nothus*). Αυτές οι παρατηρούμενες σημαντικές διαφορές δείχνουν ότι ακόμη και το ποσοστό της διαθέσιμης λυσίνης ποικίλει ευρέως ανάμεσα στα αλιεύματα ακόμα και αν αυτά είναι του ίδιου είδους.

5.1.3 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs)

PAHs δεν ανιχνεύθηκαν με χρησιμοποίηση FID ανιχνευτή, τόσο στα μη επεξεργασμένα δείγματα όσο και στα συμπυκνώματα καπνού που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία στη συγκεκριμένη εργασία.

5.2 Η επίδραση της επεξεργασίας για την επιλογή του χρόνου ξήρανσης και αλατίσματος στα φιλέτα πέστροφας

5.2.1 Η επίδραση της επεξεργασίας στην απόδοση

Στο προκαταρκτικό στάδιο μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν οι καταλληλότεροι χρόνοι ξήρανσης και αλατίσματος. Για την επίτευξη του στόχου αυτού υπολογίστηκαν οι απώλειες βάρους των αλιευμάτων στις διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας. Στον Πίνακα 6 δίνονται οι απώλειες βάρους που σημειώθηκαν στους

διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος που επιλέχθηκαν στην εργασία.

Πίνακας 6: Απώλειες βάρους (%) των φιλέτων πέστροφας σε διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος

	Χρόνος ξήρανσης (h)				
Χρόνος αλατίσματος (h)	0	1	2	4	14
1	30,88	31,00	29,10	33,46	39,22
2	28,24	31,51	33,35	32,37	36,48
3	28,02	31,48	36,00	37,00	39,60
16	27,13	33,53	34,34	36,14	39,07

Από τον Πίνακα 6 μπορεί να παρατηρηθεί ότι η απώλεια βάρους των φιλέτων πέστροφας αυξήθηκε με την αύξηση του χρόνου ξήρανσης ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην απώλεια βάρους από το χρόνο αλατίσματος. Αξίζει να τονιστεί ότι οι απώλειες των φιλέτων πέστροφας προσέγγισαν το 38,59% κατά μέσο όρο στα δείγματα που παρέμειναν για 14h στους 43°C, ενώ τα φιλέτα πέστροφας που δεν υποβλήθηκαν σε ξήρανση παρουσίασαν απώλειες της τάξης 28% κατά μέσο όρο. Αξίζει επίσης να αναφερθεί η σημαντική απώλεια που παρατηρήθηκε ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας των φιλέτων, η οποία προσέγγισε το 42,28%. Οι Birkeland *et al.*, (2004) ανακοίνωσαν ότι η μηχανική φιλετοποίηση αλιευμάτων οδηγεί σε απώλειες που κυμαίνονται από 30 μέχρι και 45%.

Οι Birkeland *et al.* (2004) μελετώντας φιλέτα σολομού ανέφεραν ότι η απόδοση του τελικού προϊόντος εξαρτάται από την εφαρμοζόμενη επεξεργασία αλατίσματος. Το ξηρό αλάτισμα οδηγεί σε μείωση του βάρους των φιλέτων της τάξης του 3,6-7,4%, ενώ αντίθετα η εμβάπτιση των αλιευμάτων σε διάλυμα άλμης συνήθως οδηγεί σε αύξηση του βάρους τους και μάλιστα σε ποσοστό που κυμαίνεται από 4 μέχρι και 17%.

5.2.2 Επίδραση της επεξεργασίας στο ποσοστό υγρασίας

Το ποσοστό της υγρασίας σε όλα τα δείγματα κυμάνθηκε μεταξύ 55,74-69,08% ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Υγρασία (%) των φιλέτων πέστροφας σε διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος

Χρόνος αλατίσματος (h)	Χρόνος ξήρανσης (h)				
	0	1	2	4	14
1	67,67 (0,206)	66,96 (0,309)	64,98 (0,745)	63,45 (0,599)	62,18 (0,293)
2	63,13 (0,284)	63,53 (1,253)	62,83 (1,049)	62,68 (1,500)	61,34 (0,760)
3	69,08 (0,427)	64,15 (1,552)	64,34 (0,710)	64,92 (0,915)	55,74 (0,876)
16	65,86 (0,002)	64,34 (0,710)	59,26 (1,196)	58,26 (2,750)	57,55 (1,249)

Νωπό: 70,76 (0,305)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις δίνονται στην παρένθεση

Τα δείγματα που υπέστησαν ξήρανση για 14h παρουσίασαν το χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας. Το ποσοστό της υγρασίας των δειγμάτων χωρίς ξήρανση μειώθηκε μόλις κατά 14,34%, ενώ η μείωση της υγρασίας συνεχίστηκε με την αύξηση του χρόνου ξήρανσης ως εξής: για 1h ξήρανση 16,52%, για 2h 18,95%, για 4h 19,63% και τέλος για 14h 23,66%. Οι πιο έντονες συνθήκες επεξεργασίας (16h αλάτισμα, 2h, 4h, 14h ξήρανση) και (3h αλάτισμα, 14h ξήρανση) έδωσαν προϊόντα με το χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας.

5.2.3 Επίδραση της επεξεργασίας στη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου

Η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου που θα αποκτήσουν κατά την επεξεργασία τους τα αλιεύματα τα οποία πρόκειται να καπνιστούν εξαρτάται από δύο παράγοντες: τη φύση του αλιεύματος (αρχικό μέγεθος και σύσταση) και τη μέθοδο αλατίσματος που θα ακολουθηθεί. Τα αλιεύματα που εμβαπτίζονται σε διαλύματα άλμης εμφανίζουν υψηλότερη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου από αυτά που αλατίζονται με τη μέθοδο του ξηρού αλατίσματος (Cardinal *et al.*, 2001). Στη συγκεκριμένη εργασία τα δείγματα φιλέτων δεν είχαν σημαντικές διαφορές στο αρχικό τους μέγεθος και η μέθοδος αλατίσματος που εφαρμόστηκε αποκλειστικά ήταν η εμβάπτισή τους σε διάλυμα άλμης 20%. Επομένως, η

συγκέντρωση των φιλέτων πέστροφας σε χλωριούχο νάτριο εξαρτάται μόνο από το χρόνο παραμονής τους στο διάλυμα άλμης και από την ξήρανση που στη συνέχεια υπέστησαν.

Η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου ήταν υψηλότερη στα δείγματα που δέχτηκαν μακρύτερο χρόνο αλατίσματος και ξήρανσης (Πίνακας 8). Τα φιλέτα πέστροφας που εμφάνισαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε χλωριούχο νάτριο, όπως ήταν αναμενόμενο, ήταν εκείνα που παρέμειναν στο διάλυμα άλμης για 16 ώρες και υπέστησαν ξήρανση για 14 ώρες. Έχει διαπιστωθεί ότι η συνολική απόδοση της επεξεργασίας των αλιευμάτων αυξάνει όταν η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου κυμαίνεται σε επίπεδα της τάξης του 1-2%.

Πίνακας 8: Συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (%) των φιλέτων πέστροφας σε διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος

Χρόνος αλατίσματος (h)	Χρόνος ξήρανσης (h)				
	0	1	2	4	14
1	1,79 (0,114)	1,61 (1,016)	2,04 (0,078)	2,12 (0,205)	2,12 (0,207)
2	1,86 (0,030)	2,81 (1,016)	2,24 (0,055)	3,37 (0,773)	3,36 (0,288)
3	3,34 (0,137)	3,55 (0,356)	3,31 (0,088)	3,31 (0,066)	3,42 (0,126)
16	4,46 (0,076)	4,73 (0,032)	6,07 (0,260)	5,87 (0,270)	3,12 (0,118)

Νωπό : 0,23 (0,041)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπική απόκλιση δίνεται στη παρένθεση.

5.2.4 Επίδραση της επεξεργασίας στις πρωτεΐνες

Οι έντονες συνθήκες επεξεργασίας, προκάλεσαν σημαντική μείωση στο ποσοστό των αζωτούχων ενώσεων των δειγμάτων σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα δείγματα (Πίνακας 9). Τα φιλέτα πέστροφας που παρέμειναν σε διάλυμα άλμης για 16h και δεν δέχτηκαν ξήρανση παρουσίασαν τις χαμηλότερες απώλειες σε αζωτούχες ουσίες (4,1%). Η θέρμανση των πρωτεϊνών προκαλεί τη μετουσίωσή τους, με αποτέλεσμα τη ρήξη της δευτεροταγούς και άνω δομής τους. Η θερμοκρασία μετουσίωσης ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη. Αποτέλεσμα της μετουσίωσης είναι η συσσωμάτωση η οποία περιλαμβάνει τον σχηματισμό νέων δεσμών μερικοί από τους οποίους είναι ομοιοπολικοί (Ledward, 1979). Οι Orstvedt *et al.*, (1984) παρατήρησαν ότι όταν ένα αλίευμα θερμαίνεται με αυξανόμενη θερμοκρασία από 50-115°C επέρχεται μείωση των σουλφυδρυλικών ομάδων (-SH) και αύξηση των δισουλφυδρυλικών δεσμών (S-S).

Πίνακας 9: Συγκέντρωση πρωτεϊνών % σε διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος (επί ξηρού και μετά την αφαίρεση του χλωριούχου νατρίου)

Χρόνος αλατίσματος (h)	Χρόνος ξήρανσης (h)				
	0	1	2	4	14
1	71,40 (1,017)	67,84 (1,119)	67,24 (1,447)	68,88 (1,047)	67,25 (1,510)
2	67,68 (0,592)	65,47 (2,669)	65,98 (2,235)	66,12 (1,847)	56,17 (4,937)
3	75,05 (1,858)	69,66 (5,701)	67,08 (2,093)	63,05 (3,253)	57,36 (3,334)
16	77,91 (2,603)	76,53 (1,816)	72,78 (1,904)	65,79 (3,844)	65,50 (3,183)

Νωπό: 81,26 (1,676) Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις

5.2.5 Επίδραση της επεξεργασίας στο ποσοστό λίπους

Το ολικό λίπος επί ξηρού των επεξεργασμένων φιλέτων πέστροφας σε διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος φαίνεται στον Πίνακα 10. Η μέγιστη τιμή λίπους διαπιστώθηκε στα φιλέτα που αλατίστηκαν για δύο ώρες και ξηράθηκαν για 14 ώρες (38,91%) ενώ η χαμηλότερη τιμή στα αλιεύματα που παρέμειναν τις περισσότερες ώρες σε διάλυμα άλμης χωρίς να υποβληθούν σε ξήρανση (17,27%).

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από τους πίνακες 9 & 10 οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και λίπους εμφάνισαν αντίθετη συμπεριφορά. Η αύξηση δηλαδή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης του λίπους και αντίθετα.

Πίνακας 10: Συγκέντρωση λίπους % σε διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος (επί ξηρού και μετά την αφαίρεση του χλωριούχου νατρίου)

Χρόνος αλατίσματος (h)	Χρόνος ξήρανσης (h)				
	0	1	2	4	14
1	25,32 (1,043)	28,98 (1,144)	29,72 (1,496)	28,21 (1,113)	29,95 (1,487)
2	29,46 (0,592)	31,55 (2,778)	31,16 (2,320)	28,42 (2,277)	38,91 (3,755)
3	21,32 (1,927)	25,95 (5,639)	29,18 (2,165)	32,97 (3,254)	38,84 (3,514)
16	17,27 (2,357)	18,11 (0,851)	20,72 (1,861)	27,39 (3,535)	26,20 (3,242)

Νωπό: 15.35 (0.717). Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις

5.2.6 Επίδραση της επεξεργασίας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Από τον οργανοληπτικό έλεγχο που διεξήχθη στα επεξεργασμένα φιλέτα πέστροφας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλμυρότητας και σκληρότητας οδήγησαν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η αλμυρότητα επηρεάστηκε από το χρόνο αλατίσματος ($p=0.000$) και το χρόνο ξήρανσης ($p=0.040$) (Πίνακας 11), ενώ η σκληρότητα επηρεάστηκε μόνο από το χρόνο αλατίσματος ($p=0.007$) (Πίνακας 12).

Πίνακας 11: Ανάλυση διακύμανσης για την αλμυρότητα

Παράγοντας	DF	F	P*
Αλάτισμα	3	28,70	0,000
Ξήρανση	4	3,53	0,040
Σφάλμα	12		
Σύνολο	19		

*P<0.05 δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 12: Ανάλυση διακύμανσης για τη σκληρότητα

Παράγοντας	DF	F	P*
Αλάτισμα	3	6,55	0,007
Ξήρανση	4	0,85	0,522
Σφάλμα	12		
Σύνολο	19		

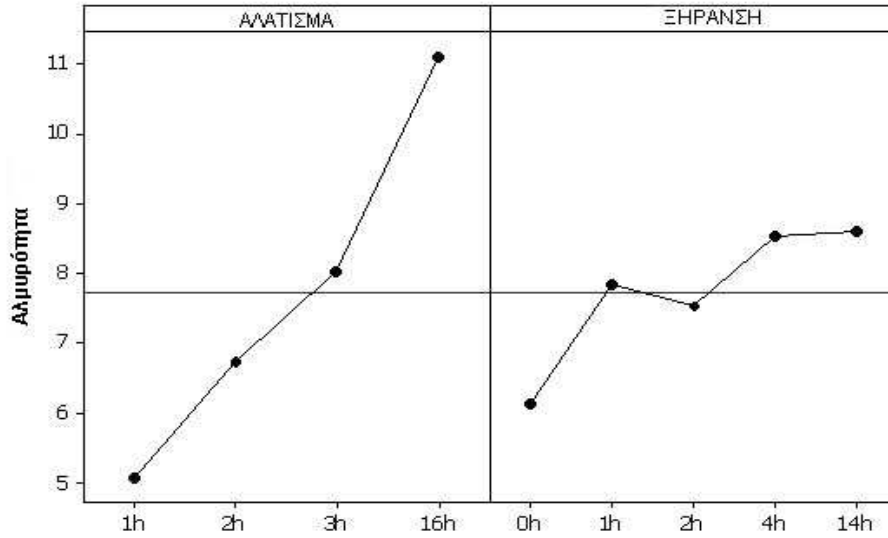
*P<0.05 δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Στο σχήμα 4 φαίνεται η επίδραση του χρόνου αλατίσματος, όπως ήταν αναμενόμενο, στην αλμυρότητα των δειγμάτων και προκύπτει η ικανότητα ανίχνευσης των δοκιμαστών. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί από το σχήμα 4 ότι οι δοκιμαστές ανίχνευσαν ως διαφορετικά τα φιλέτα πέστροφας που δεν δέχτηκαν ξήρανση πριν το κάπνισμά τους.

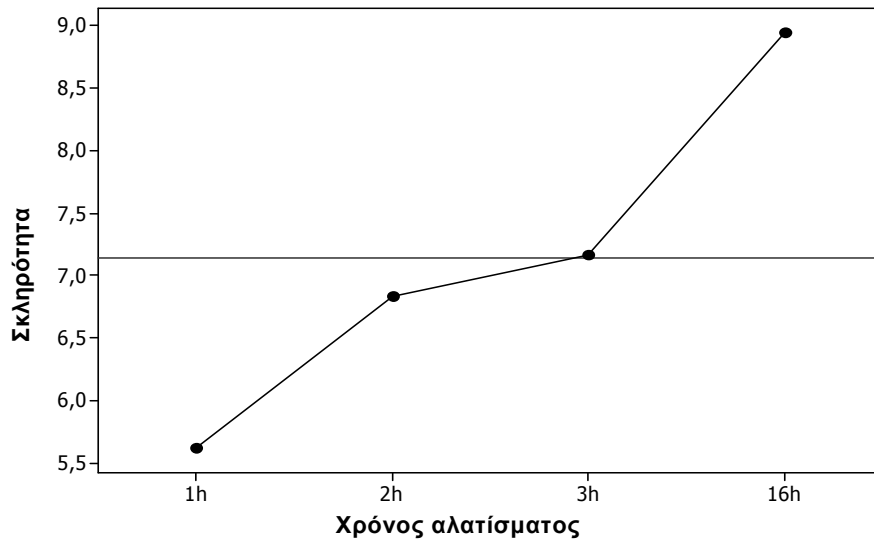
Από το σχήμα 5 μπορεί να παρατηρηθεί ότι η σκληρότητα των φιλέτων πέστροφας αυξήθηκε με την αύξηση του χρόνου αλατίσματος ενώ δεν επηρεάστηκε από το χρόνο ξήρανσης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη σκληρότητα παρατηρήθηκαν στα φιλέτα πέστροφας που

αλατίστηκαν για χρόνο 1h και 16h. Αντίθετα, τα επεξεργασμένα φιλέτα που παρέμειναν στο διάλυμα χλωριούχου νατρίου για 2 και 3h δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη σκληρότητα.

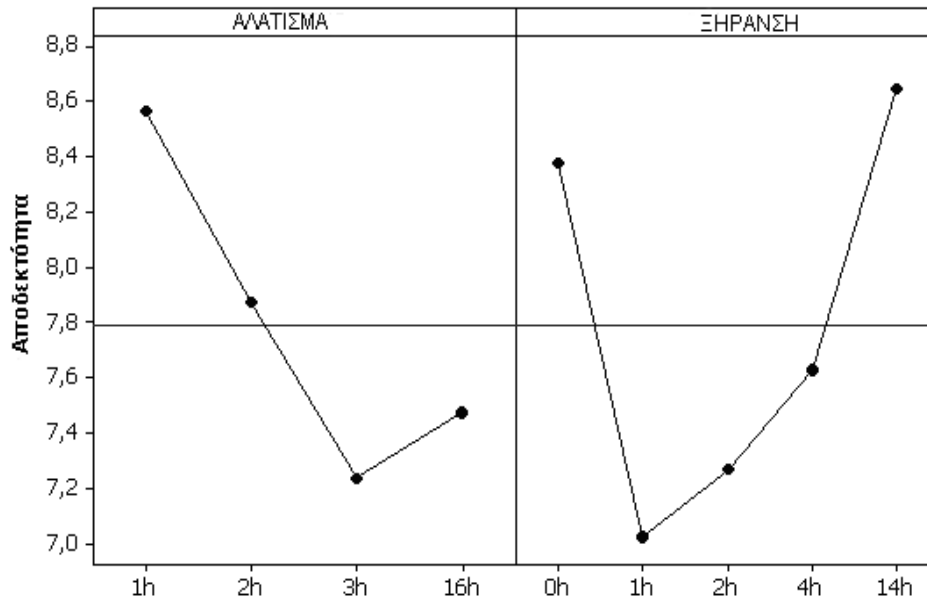
Οι διαφορετικοί χρόνοι αλατίσματος και ξήρανσης δεν επηρέασαν την αποδεκτότητα των δοκιμαστών για τα επεξεργασμένα αλιεύματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι δοκιμαστές ταξινόμησαν τα αλιεύματα σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα κατατάχθηκαν τα φιλέτα πέστροφας που προτιμήθηκαν περισσότερο από τους δοκιμαστές και ήταν εκείνα τα οποία δεν δέχτηκαν ξήρανση πριν την επεξεργασία του καπνίσματος και εκείνα που δέχτηκαν το μακρύτερο χρόνο ξήρανσης. Ενώ στη δεύτερη ομάδα τοποθετήθηκαν τα δείγματα που δέχτηκαν ξήρανση για 1, 2 και 4 ώρες πριν το κάπνισμά τους. Όσον αφορά το χρόνο αλατίσματος οι δοκιμαστές επέλεξαν ως περισσότερο αποδεκτά τα επεξεργασμένα φιλέτα πέστροφας με τη συντομότερη παραμονή στην άλμη (1h), ενώ η προτίμηση που έδειξαν για τα υπόλοιπα ήταν παρόμοια (Σχήμα 6).



Σχήμα 4: Επίδραση του χρόνου ξήρανσης και αλατίσματος στην αλμυρότητα



Σχήμα 5: Επίδραση του χρόνου αλατίσματος στη σκληρότητα



Σχήμα 6: Επίδραση του χρόνου ξήρανσης και αλατίσματος στην αποδεκτότητα

5.2.7 Επίδραση της επεξεργασίας στο χρώμα

Η μέτρηση του χρώματος των αλιευμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω των παραμέτρων L^* (φωτεινότητα), a^* (ερυθρότητα) και b^* (ωχρότητα) με τη βοήθεια του χρωματόμετρου Dr Lange. Οι τιμές των παραπάνω παραμέτρων δίνονται στους Πίνακες 13, 14 και 15. Οι τιμές των παραμέτρων L^* , a^* , b^* της επιφάνειας της σάρκας των φιλέτων δεν φάνηκε να επηρεάστηκαν από τους διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος, καθώς δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Η φωτεινότητα αυξήθηκε ελάχιστα με το

χρόνο αλατίσματος, ωστόσο η αύξηση δεν ήταν σημαντική. Η ίδια παράμετρος φάνηκε να επηρεάζεται σε μικρό βαθμό από την πολύωρη ξήρανση (14h) με μείωση της τιμής της, όχι όμως σημαντικά. Οι παράμετροι a^* και b^* , δεν επηρεάστηκαν από τους διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος αλλά αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές τους αυξήθηκαν σημαντικά στα καπνιστά αλιεύματα σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα, αναδεικνύοντας τις αντιδράσεις μη ενζυμικού μαυρίσματος που λαμβάνουν χώρα κατά το κάπνισμα των αλιευμάτων. Οι Espe *et al.*, (2004) μελέτησαν την επίδραση της επεξεργασίας του καπνίσματος σε φιλέτα σολομού σε δύο διαφορετικές εγκαταστάσεις, διαπίστωσαν διαφορές στην παράμετρο L^* . Οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν στη διαφορετική επεξεργασία καπνίσματος που εφαρμόστηκε. Οι Birkeland *et al.*, (2004) επεξεργάστηκαν φιλέτα σολομού με ψυχρό κάπνισμα με ήπια και έντονη μεταχείριση των φιλέτων. Οι παράμετροι L^* και a^* έδωσαν χαμηλότερες τιμές στις μεταχειρίσεις της ήπιας μεθόδου ενώ υψηλότερες η παράμετρος b^* , δείχνοντας την μεγαλύτερη έκταση των αντιδράσεων του μη ενζυμικού μαυρίσματος στις εντονότερες επεξεργασίες.

Πίνακας 13: Παράμετρος L^* (φωτεινότητα) στους διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος

Χρόνος αλατίσματος (h)	Χρόνος ξήρανσης (h)				
	0	1	2	4	14
1	54,21 (2,065)	50,65 (2,420)	57,68 (3,610)	51,33 (2,898)	44,10 (4,705)
2	56,34 (2,704)	55,77 (4,874)	55,87 (3,756)	50,80 (4,656)	50,24 (5,314)
3	53,69 (3,141)	54,59 (2,845)	50,88 (1,794)	57,38 (3,859)	47,12 (3,859)
16	48,91 (9,961)	55,01 (3,347)	57,90 (2,635)	56,31 (2,340)	54,33 (1,498)

Νωπό: 41,36 (3,216)

Οι τιμές των πινάκων είναι μέσοι όροι έντεκα επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις

Πίνακας 14: Παράμετρος b^* (ωχρότητα) στους διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος

Χρόνος αλατίσματος (h)	Χρόνος ξήρανσης (h)				
	0	1	2	4	14
1	20,44 (3,769)	23,51 (4,271)	21,60 (3,111)	19,70 (1,403)	18,50 (5,034)
2	22,90 (3,608)	22,62 (4,002)	22,67 (3,897)	17,99 (2,966)	23,62 (4,815)
3	21,36 (4,574)	22,74 (4,230)	22,58 (4,490)	23,90 (5,044)	23,78 (3,248)
16	22,77 (4,685)	20,73 (4,987)	19,63 (3,491)	19,87 (4,264)	20,12 (4,498)

Νωπό: 5,00 (0,967)

Οι τιμές των πινάκων είναι μέσοι όροι έντεκα επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις

Πίνακας 15: Παράμετρος a^* (ερυθρότητα) στους διαφορετικούς χρόνους ξήρανσης και αλατίσματος

Χρόνος αλατίσματος (h)	Χρόνος ξήρανσης (h)				
	0	1	2	4	14
1	4,24 (1,786)	9,30 (2,029)	3,40 (2,594)	4,51 (1,073)	8,09 (3,540)
2	4,71 (3,742)	4,30 (3,556)	4,29 (3,225)	3,64 (1,950)	5,99 (2,668)
3	4,24 (2,621)	2,93 (2,765)	5,43 (3,092)	4,27 (1,796)	6,20 (1,776)
16	6,94 (3,593)	2,58 (1,579)	2,10 (1,480)	0,50 (2,178)	1,60 (1,513)

Νωπό: -3,76 (0,966)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι έντεκα επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις

5.2.8 Επιλογή των καταλληλότερων συνθηκών χρόνου ξήρανσης και αλατίσματος

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα ο καταλληλότερος χρόνος αλατίσματος επιλέχθηκε η 1 ώρα σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 20%. Οι διαφορετικοί χρόνοι ξήρανσης δεν επηρέασαν την ποιότητα των τελικών προϊόντων. Γι' αυτό επιλέχθηκαν 2 διαφορετικοί χρόνοι ξήρανσης για περαιτέρω μελέτη (0 και 4 ώρες). Τα μη ξηραμένα δείγματα έδωσαν αποδεκτά τελικά προϊόντα, με σχετικά γρήγορη και οικονομική διαδικασία. Τα δείγματα με 4 ώρες ξήρανση παρουσίασαν ελαφρώς καλύτερη ποιότητα σε σχέση με τους υπόλοιπους χρόνους ξήρανσης (1, 2 και 14 ώρες).

Η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο ήταν 1,79% για τα μη ξηραμένα δείγματα και 2,12% για αυτά που ξηράθηκαν για 4

ώρες. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο (1-2%) είναι γνωστό ότι βελτιώνει την απόδοση και την ικανότητα συγκράτησης νερού των μυών του αλιεύματος (Sigurgisladottir *et al*, 2000). Γενικά οι μικρότερες απώλειες παρατηρήθηκαν στα μη ξηραμένα φιλέτα. Η απώλεια των πρωτεϊνών δεν βρέθηκε πολύ υψηλή. Όσον αφορά τη συνεκτικότητα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών χρόνων αλατίσματος (1, 2 και 3 ώρες), γι' αυτό και η επιλογή της 1 ώρας θεωρήθηκε η καλύτερη λόγω συντομίας. Το χρώμα των καπνιστών προϊόντων δεν επηρεάστηκε από τους διαφορετικούς χρόνους αλατίσματος και ξήρανσης γι' αυτό επιλέχθηκε το κάπνισμα χωρίς ξήρανση για να απλοποιηθεί η συνολική επεξεργασία. Σημαντικός παράγοντας στην επιλογή των καταλληλότερων συνθηκών επεξεργασίας είναι η γνώμη των καταναλωτών. Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, ωστόσο οι δοκιμαστές ήταν σε θέση να τις αναγνωρίσουν.

Η επιλογή των συνθηκών αυτών έγινε κυρίως λαμβάνοντας υπόψη την ποιότητα των τελικών προϊόντων, τη μείωση κόστους και χρόνου της επεξεργασίας. Έτσι παράχθηκε ένα τελικό προϊόν σχεδόν όμοιο με αυτό του παραδοσιακού καπνίσματος.

5.3 Η επίδραση της ξήρανσης, πίεσης και του χρόνου καπνίσματος στα φιλέτα πέστροφας

5.3.1 Επίδραση των διαφορετικών επεξεργασιών στην απόδοση

Η ποιότητα και η απόδοση των καπνιστών αλιευμάτων εξαρτώνται από την αρχική ποιότητα της πρώτης ύλης και τις διεργασίες που ακολουθούνται για την παραγωγή των τελικών προϊόντων. Σε αυτές τις διεργασίες ανήκουν: ο αποκεφαλισμός, η φιλετοποίηση, η απομάκρυνση ακανόνιστων σημείων του αλιεύματος, η επιλογή της επεξεργασίας που θα ακολουθηθεί και η οποία σχετίζεται με τη διάρκεια της επεξεργασίας και τις εφαρμοζόμενες θερμοκρασίες (Cardinal *et al.*, 2001).

Έχει διαπιστωθεί ότι όταν τα αλιεύματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα άλμης απορροφούν ή αποβάλλουν νερό και οργανικά συστατικά ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία του διαλύματος. Συγκεκριμένα, τα αλιεύματα που εμβαπτίζονται σε διαλύματα με χαμηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου αυξάνουν τον όγκο τους ενώ εκείνα που εμβαπτίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου αυξάνουν το ποσοστό άλατος στη σάρκα τους και σε μικρό βαθμό τη συγκέντρωση του νερού (Horneg, 1997).

Το αρχικό βάρος των φιλέτων πέστροφας ήταν 12,64kg. Η απομάκρυνση της κεφαλής, σπονδυλικής στήλης, αίματος και πτερυγίων οδήγησε σε απώλεια βάρους της τάξης του 47,3%. Οι απώλειες βάρους λόγω επεξεργασίας ήταν υψηλότερες στα φιλέτα που υπέστησαν ξήρανση για 4h

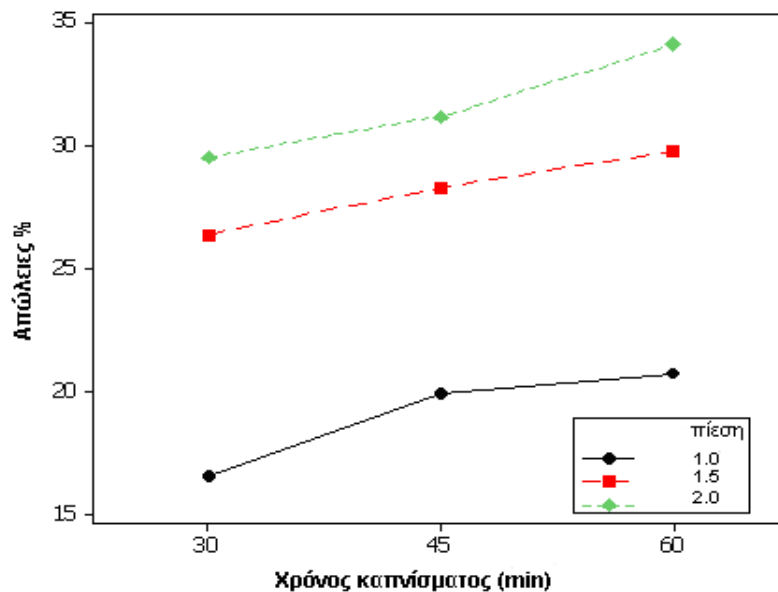
στους 43°C (28,8%) έναντι των απωλειών που παρατηρήθηκαν στα φιλέτα πέστροφας που επεξεργάστηκαν χωρίς προηγούμενη ξήρανση (23,7%). Στον πίνακα 16 δίνονται οι απώλειες που παρατηρήθηκαν στις διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας των καπνιστών φιλέτων πέστροφας. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από τον Πίνακα 16 όσο εντονότερες οι συνθήκες επεξεργασίας τόσο υψηλότερες οι απώλειες στα τελικά προϊόντα.

Πίνακας 16: Απώλειες βάρους (%) των φιλέτων πέστροφας κατά την επεξεργασία

		Συνθήκες πίεσης		
Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	12,8	22,9	28,2
	45 min	15,6	28,6	29,1
	60 min	17,4	25,9	33,2
Ξηραμένα (4h)				
	30 min	20,4	29,9	30,9
	45 min	24,2	28,0	33,3
	60 min	24,1	33,7	35,0

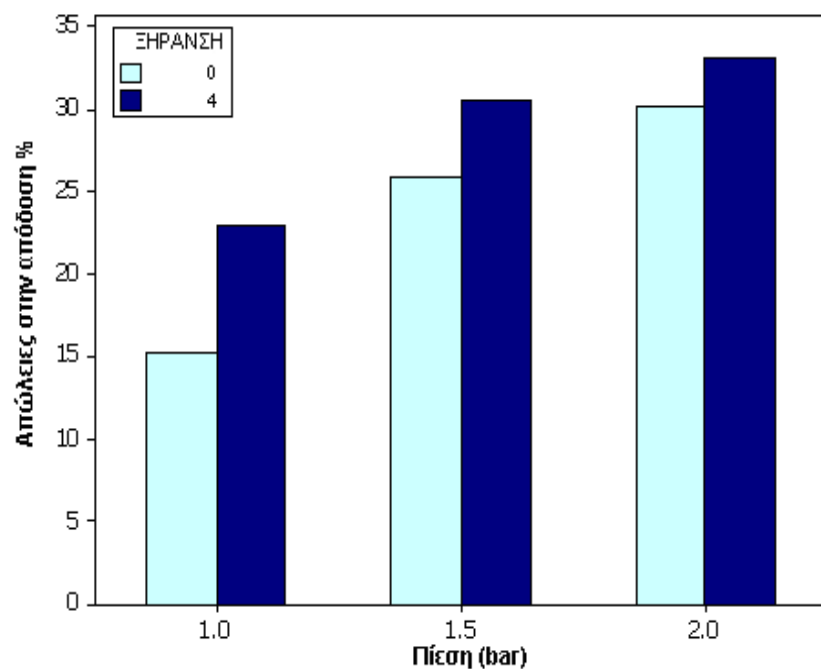
Το αλάτισμα των δειγμάτων σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 20% για 1h οδήγησε σε αύξηση του βάρους των δειγμάτων της τάξης του 2,9%, ενώ η ξήρανση των 4h οδήγησε σε απώλειες της τάξης του 9%. Ανακοινώθηκε σε παρόμοια επεξεργασία ότι η αύξηση βάρους που παρατηρήθηκε κατά την επεξεργασία του αλατίσματος ήταν της τάξης του $1,3\pm 1\%$ (Siskos *et al.*, 2005).

Διαπιστώθηκε ότι οι απώλειες στα φιλέτα πέστροφας που προήλθαν από διαφορετικές συνθήκες πίεσης παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,002$), σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης και μεταξύ των απωλειών των δειγμάτων που προήλθαν από τις διαφορετικές συνθήκες ξήρανσης $p=0,010$ (0 και 4h) (Σχήμα 6). Από το σχήμα 6 μπορεί επίσης να παρατηρηθεί ότι τα φιλέτα που καπνίστηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση παρουσίασαν απώλειες που δεν ξεπέρασαν το 20%. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα καπνιστά προϊόντα που παρασκευάστηκαν σε 1,5 και 2,0bar συνθήκες πίεσης δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



Σχήμα 7: Απώλειες που παρατηρήθηκαν στα φιλέτα πέστροφας σε διαφορετικές συνθήκες πίεσης

Οι απώλειες βάρους επίσης των ξηραμένων και μη ξηραμένων δειγμάτων πριν το κάπνισμα εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση και αυτών που επεξεργάστηκαν σε 1,5 και 2,0bar (Σχήμα 8). Οι απώλειες που παρατηρήθηκαν στα δείγματα που προήλθαν με εφαρμογή πίεσης 1,5 και 2,0bar δεν είχαν σημαντικές διαφορές.



Σχήμα 8: Απώλειες που παρατηρήθηκαν σε ξηραμένα και μη φιλέτα πέστροφας

5.3.2 Επίδραση των διαφορετικών επεξεργασιών στην υγρασία

Από τον Πίνακα 17 φαίνεται ότι η συγκέντρωση της υγρασίας των καπνιστών φιλέτων πέστροφας κυμάνθηκε μεταξύ 63,52% και 69,53% ενώ ο μέσος όρος μείωσης της υγρασίας για όλα τα δείγματα κατά την επεξεργασία ήταν 7,27%. Διαφορές στην απώλεια υγρασίας μεταξύ των δειγμάτων παρατηρήθηκαν μόνο σε αυτά τα οποία ξηράθηκαν πριν την επεξεργασία του καπνίσματος και στα μη ξηραμένα ($p=0,016$). Έτσι, τα μεν ξηραμένα φιλέτα είχαν μέσες απώλειες της τάξης του 8,90%, ενώ αυτά που δεν δέχτηκαν ξήρανση πριν το κάπνισμα είχαν μέσες απώλειες 5,65%. Οι διαφορετικοί χρόνοι επεξεργασίας και οι συνθήκες πίεσης δεν φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά τις απώλειες υγρασίας των καπνιστών αλιευμάτων. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συνδυασμένες δράσεις των παραγόντων: χρόνος επεξεργασίας - πίεση, χρόνος επεξεργασίας - ξήρανση, ξήρανση-πίεση (Πίνακας 18).

Πίνακας 17: Υγρασία % στα διαφορετικά επεξεργασμένα φιλέτα πέστροφας

Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	66,39 (0,762)	69,53 (1,277)	67,34 (0,332)
	45 min	66,01 (1,002)	67,59 (1,578)	68,52 (0,313)
	60 min	67,00 (0,476)	68,85 (1,311)	68,40 (0,368)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	67,26 (0,838)	64,69 (0,569)	63,70 (0,558)
	45 min	65,20 (1,98)	63,52 (0,088)	64,69 (0,546)
	60 min	65,60 (1,534)	68,61 (1,639)	65,39 (0,840)

Νωπό: 71,79 (0,298)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις.

Οι επιλεγόμενες επεξεργασίες στη συγκεκριμένη εργασία οδήγησαν στην παραγωγή φιλέτων πέστροφας υψηλότερου ποσοστού υγρασίας συγκριτικά με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών. Οι Goulas & Kontominas, (2004) ανέφεραν ότι το ποσοστό υγρασίας νωπών φιλέτων σκουμπριού μειώθηκε από 75,2% σε 59% λόγω της επεξεργασίας του καπνίσματος. Η απώλεια αυτή ήταν 21,2%, 3 φορές υψηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μέσος όρος υγρασίας (66,57%) των φιλέτων πέστροφας είναι περίπου ίσος με την επιθυμητή από τη βιομηχανία (65%) (Cardinal *et al.*, 2001).

Πίνακας 18: Ανάλυση διακύμανσης υγρασίας

Παράγοντας	DF	F	P*
Χρόνος	2	1,89	0,264*
Ξήρανση	1	15,83	0,016
Πίεση	2	0,92	0,468
Χρόνος*Ξήρανση	2	0,48	0,652
Χρόνος*Πίεση	4	1,27	0,411
Ξήρανση*Πίεση	2	2,63	0,186
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0.05 δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Οι Puwastien *et al.* (1999) μελέτησαν τις χημικές μεταβολές σε αλιεύματα του γλυκού και αλμυρού νερού που μαγειρεύτηκαν με διαφορετικές μεθόδους. Ανέφεραν ότι η μείωση της υγρασίας κατά την επεξεργασία των δειγμάτων με ατμό ήταν 7,8%, ποσοστό παρόμοιο με αυτό της συγκεκριμένης εργασίας, ενώ με το ψήσιμο και το τηγάνισμα οι απώλειες αυξήθηκαν σε 18-37% και 17-54% αντίστοιχα. Σε δείγματα τόνου παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού υγρασίας κατά την επεξεργασία με ατμό της τάξης του 8,5%. Διαπιστώθηκε επίσης ότι με την αύξηση του χρόνου επεξεργασίας αυξήθηκε η μείωση του ποσοστού υγρασίας, συγκεκριμένα η μείωση της υγρασίας ανήλθε στο 10% για επεξεργασία 55min και στο 14,8% για επεξεργασία 90min (Garcia-Agias *et al.*, 1994). Αντίθετα στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος επεξεργασίας δεν οδήγησε σε διαφορετικές απώλειες υγρασίας.

5.3.3 Επίδραση των διαφορετικών επεξεργασιών στο ολικό λίπος

Η συγκέντρωση του λίπους στα φιλέτα πέστροφας δίνονται στον Πίνακα 19 εκφρασμένα επί ξηρού και ελεύθερα χλωριούχου νατρίου για την ευκολότερη ερμηνεία τους. Οι υψηλές τιμές των τυπικών αποκλίσεων δείχνουν τη σημαντική διακύμανση της κατανομής του λίπους στο σώμα των φιλέτων έτσι είναι πιθανές μεγάλες διαφορές.

Ο μέσος όρος του ποσοστού λίπους συνολικά στα δείγματα πέστροφας βρέθηκε 19.83% με ελάχιστη τιμή 16,16% και μέγιστη 23,71% (επί ξηρού και μετά την αφαίρεση του χλωριούχου νατρίου) (Πίνακας 19).

Ο χρόνος ξήρανσης πριν το κάπνισμα ήταν ο παράγοντας που επηρέασε σημαντικά τη συγκέντρωση του λίπους ($p=0,004$) (Πίνακας 20). Έτσι, τα φιλέτα πέστροφας που υπέστησαν ξήρανση πριν την επεξεργασία τους παρουσίασαν αύξηση της συγκέντρωσης του λίπους της τάξης του 39,70%, ενώ αυτά που δεν ξηράθηκαν πριν το κάπνισμα είχαν αύξηση της τάξης του 21,11%.

Οι Garcias-Arias *et al.*, (1994) ανακοίνωσαν ότι το ποσοστό λίπους αυξήθηκε κατά την επεξεργασία αλιευμάτων σε ατμό, κυρίως λόγω της απώλειας νερού. Οι Espe *et al.*, (2002) παρατήρησαν ότι το ποσοστό λίπους μειώθηκε κατά την επεξεργασία φιλέτων σολομού με ψυχρό κάπνισμα. Ανέφεραν επίσης ότι όταν το κάπνισμα πραγματοποιήθηκε σε υψηλότερες θερμοκρασίες η τιμή του ποσοστού λίπους

ήταν υψηλότερη, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 19: Συγκέντρωση λίπους % στα διαφορετικά επεξεργασμένα προϊόντα (επί ξηρού και μετά την αφαίρεση χλωριούχου νατρίου)

Μη Ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	19,99 (0,136)	16,16 (1,392)	16,31 (1,306)
	45 min	20,07 (2,76)	20,29 (3,00)	19,99 (0,567)
	60 min	17,61 (3,31)	20,04 (1,89)	16,36 (1,117)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	23,02 (4,24)	20,88 (3,14)	20,40 (2,36)
	45 min	19,37 (1,196)	17,76 (0,502)	21,44 (2,75)
	60 min	22,35 (0,335)	23,71 (6,53)	21,10 (0,53)

Νωπό: 15,11 (4,04)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις.

Πίνακας 20: Ανάλυση διακύμανσης για το ολικό λίπος

Παράγοντας	DF	F	P*
Χρόνος	2	0,99	0,449
Ξήρανση	1	35,75	0,004
Πίεση	2	2,30	0,216
Χρόνος*Ξήρανση	2	13,63	0,016
Χρόνος*Πίεση	4	6,50	0,049
Ξήρανση*Πίεση	2	1,05	0,430
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0.05 δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Οι Puwastien *et al.*, (1999) μελέτησαν τις μεταβολές στη συγκέντρωση λίπους μετά από τηγάνισμα και ψήσιμο των δειγμάτων. Διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση του λίπους αυξήθηκε με τις επεξεργασίες, η αύξηση αυτή αποδόθηκε στην απώλεια νερού και στην απορρόφηση λίπους από το μαγειρικό λάδι που χρησιμοποιήθηκε. Αντίθετα, τα δείγματα που επεξεργάστηκαν σε ατμό δεν παρουσίασαν διαφορές στη συγκέντρωση του λίπους με τα μη επεξεργασμένα. Ανάλογες διαπιστώσεις έγιναν και από άλλους ερευνητές μελετώντας την επίδραση των διαφορετικών μεθόδων μαγειρέματος στη σύσταση της πέστροφας.

Η αύξηση στη συγκέντρωση του λίπους που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία πιθανά να ήταν αποτέλεσμα αποκλειστικά της μείωσης των αζωτούχων ενώσεων που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των εφαρμοζόμενων επεξεργασιών. Έτσι, οι υψηλότερες απώλειες αζωτούχων ενώσεων οδήγησαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις λιπαρών υλών και αντίθετα.

5.3.4 Επίδραση των διαφορετικών επεξεργασιών στις πρωτεΐνες

Οι απώλειες των αζωτούχων ενώσεων επηρεάστηκαν σημαντικά από την ξήρανση που εφαρμόστηκε πριν το κάπνισμα ($p=0,013$) (Πίνακας 21, 22). Ακριβώς αντίθετα ήταν και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για τις μεταβολές των λιπαρών υλών (5.3.3). Οι μεγαλύτερες απώλειες αζωτούχων ενώσεων παρατηρήθηκαν στα φιλέτα

πέστροφας που ξηράθηκαν για 4h πριν την επεξεργασία τους (16,14%), ενώ οι απώλειες στα δείγματα που δεν δέχτηκαν ξήρανση ήταν της τάξης του 10,14%.

Ανάλογα αποτελέσματα σχετικά με απώλειες πρωτεϊνών κατά την επεξεργασία ανακοινώθηκαν και από άλλους ερευνητές (Bhuiyan *et al.*, 1986b). Η μείωση του ποσοστού των πρωτεϊνών, σε σκουμπρί που προήλθε από τον Ατλαντικό και επεξεργάστηκε με θερμό κάπνισμα ήταν 10%. Άλλοι ερευνητές ασχολήθηκαν με την ξήρανση κυπρίνων σε διαφορετικές θερμοκρασίες (50, 60, 70°C) για χρόνο (0, 2, 4, 6, 8, 12, 24h) και παρατήρησαν σημαντική μείωση των σουλφιδριλικών ομάδων. Η μέγιστη μείωση πραγματοποιήθηκε τις πρώτες 2-4h (Raghunath *et al.*, 1995).

Πίνακας 21: Ανάλυση διακύμανσης για το συγκέντρωση πρωτεϊνών

Παράγοντας	DF	F	P*
Χρόνος	2	4,60	0,092
Ξήρανση	1	18,04	0,013
Πίεση	2	6,24	0,059
Χρόνος*Ξήρανση	2	2,98	0,161
Χρόνος*Πίεση	4	1,27	0,412
Ξήρανση*Πίεση	2	7,04	0,046
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0.05 δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 22: Συγκέντρωση πρωτεϊνών % στα διαφορετικά επεξεργασμένα προϊόντα (επί ξηρού και μετά την αφαίρεση χλωριούχου νατρίου)

Μη Ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	76,21 (2,26)	74,92 (1,77)	81,49 (0,557)
	45 min	65,53 (0,205)	69,69 (3,18)	76,72 (1,90)
	60 min	66,89 (1,48)	77,49 (3,95)	79,39 (4,29)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	68,77 (2,99)	68,35 (4,81)	69,81 (0,586)
	45 min	67,09 (0,372)	71,50 (1,43)	66,43 (0,145)
	60 min	70,81 (4,43)	73,01 (0,815)	69,81 (3,12)

Νωπό: 82,89 (8,34)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις.

5.3.5 Επίδραση των διαφορετικών επεξεργασιών στο pH

Η τιμή pH των αλιευμάτων είναι συνήθως υψηλότερη του 6,0. Όσο υψηλότερο είναι το pH στα επεξεργασμένα αλιεύματα τόσο αυξάνει η πιθανότητα ανάπτυξης βακτηρίων που θα το οδηγήσουν σε αλλοίωση τους (Regenstein & Regenstein, 1991).

Οι μεταβολές του pH ανάλογα με την επεξεργασία που υπέστησαν τα φιλέτα πέστροφας φαίνονται στον Πίνακα 23.

Πίνακας 23: Μεταβολές pH στις διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας

		Συνθήκες πίεσης		
Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	1 bar	1.5 bar	2 bar
	30 min	6,40 (0,141)	6,40 (0,141)	6,30 (0,028)
	45 min	6,50 (0,071)	6,58 (0,226)	6,28 (0,354)
	60 min	6,57 (0,396)	6,40 (0,141)	6,24 (0,10)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	6,53 (0,014)	6,37 (0,085)	6,33 (0,057)
	45 min	6,39 (0,085)	6,30 (0,028)	6,22 (0,057)
	60 min	6,28 (0,057)	6,43 (0,057)	6,22 (0,071)

Νωπό: 6,50 (0,141)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στις παρενθέσεις.

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 23 οι διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας δεν φαίνεται να επηρέασαν την τιμή του pH των δειγμάτων. Μικρή μείωση στην τιμή pH παρατηρήθηκε στα επεξεργασμένα αλιεύματα σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα. Η μείωση της τιμής του pH στις καπνιστές πέστροφες παρεμποδίζει τη βακτηριακή ανάπτυξη και αυξάνει το χρόνο συντήρησής τους. Η μεταβολή του pH που παρατηρήθηκε, συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών. Οι Espe *et al.*, (2002) ανέφεραν ότι το pH σε φιλέτα σολομού που επεξεργάστηκαν με ψυχρό κάπνισμα, μειώθηκε σε κάθε στάδιο επεξεργασίας και ότι η μείωση αυτή αυξανόταν με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σε

παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν οι Goulas & Kontominas, (2004) οι οποίοι απέδωσαν τη μείωση του pH στη συγκέντρωση άλατος και στο χαμηλό ποσοστό υγρασίας.

5.3.6 Επίδραση των διαφορετικών επεξεργασιών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

5.3.6.1 Χρώμα

Στατιστικά σημαντικές διαφορές στο χρώμα των τελικών προϊόντων παρατηρήθηκαν στα δείγματα που προήλθαν από διαφορετικές συνθήκες πίεσης ($p=0,001$) (Πίνακας 24, 25). Η αύξηση της πίεσης οδήγησε σε εντονότερο σκούρο χρώμα στα τελικά καπνιστά φιλέτα.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 9 τα φιλέτα που καπνίστηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση δεν είχαν έντονο χρώμα καπνιστού προϊόντος. Με την αύξηση της πίεσης, η οποία συνοδεύτηκε με ανάλογη αύξηση της θερμοκρασίας, το χρώμα των δειγμάτων έγινε εντονότερο (καφέ-κίτρινο). Ωστόσο, τα φιλέτα που επεξεργάστηκαν σε συνθήκες πίεσης 1,5 και 2,0bar δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την ένταση του επιφανειακού χρώματος.

Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει τις αντιδράσεις μη ενζυμικού μαυρίσματος (Maillard) και το σχηματισμό χρώματος στα καπνιστά προϊόντα είναι η θερμοκρασία, η οποία αυξάνει με την αύξηση της πίεσης.

Πίνακας 24: Ανάλυση διακύμανσης για τις τιμές του επιφανειακού χρώματος

Παράγοντας	DF	F	P*
Ξήρανση	1	0,68	0,457
Χρόνος	2	4,76	0,088
Πίεση	2	69,09	0,001
Ξήρανση*Χρόνος	2	0,55	0,615
Ξήρανση*Πίεση	2	0,54	0,621
Χρόνος*Πίεση	4	0,12	0,967
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0,05 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές

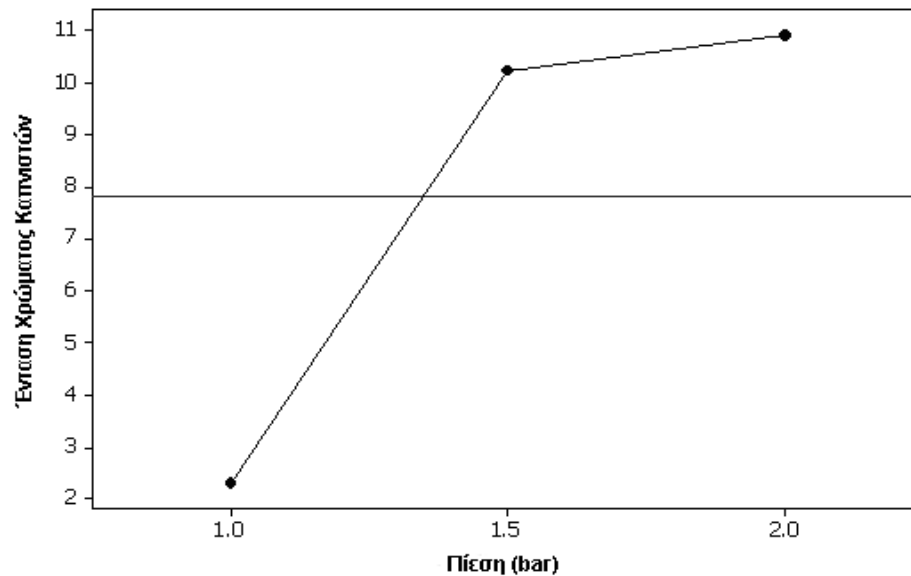
Πίνακας 25: Ανάπτυξη χρώματος στις διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας

Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	1,34	8,80	9,07
	45 min	2,14	12,83	10,39
	60 min	4,51	11,10	12,71
Ξηραμένα 4h	30 min	0,67	9,08	9,35
	45 min	3,45	9,37	12,32
	60 min	1,78	10,36	11,59

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων.

Οι Siskos *et al.*, (2005) εφάρμοσαν πίεση 2bar σε φιλέτα πέστροφας και διαπίστωσαν αύξηση της έντασης του χρώματος των προϊόντων. Μελετήθηκε το μη ενζυμικό μαύρισμα σε μοντέλο σύστημα με βάση το νερό με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιδρώντων, σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας και διαφορετικές θερμοκρασίες. Ανακοινώθηκε ότι η κινητική σταθερά της αντίδρασης αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας (Carabasa-

Giribet & Ibarz-Ribas, 2000). Σύμφωνα με τους Fogliano et al., (1999) δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στην ένταση του χρώματος σε θερμοκρασίες άνω των 120°C, ωστόσο σε θερμοκρασίες άνω των 150°C η αύξηση του μη ενζυμικού μαυρίσματος ήταν πολύ έντονη.



Σχήμα 9: Μέσες τιμές της μεταβλητής χρώμα ως προς τον παράγοντα πίεση

5.3.6.2 Αποδεκτότητα ως προς το χρώμα

Η αποδεκτότητα των δοκιμαστών ως προς το χρώμα επηρεάστηκε από τις συνθήκες πίεσης ($p=0,008$) όπως συνέβη και με την ένταση του χρώματος (Πίνακας 26, 27).

Πίνακας 26: Αποδεκτότητα των δοκιμαστών ως προς το χρώμα των τελικών προϊόντων

Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	4,19	7,42	9,76
	45 min	5,37	11,02	10,77
	60 min	6,12	6,67	11,92
Ξηραμένα 4h				
	30 min	2,07	7,88	9,10
	45 min	4,93	9,31	10,52
	60 min	2,24	10,52	9,62

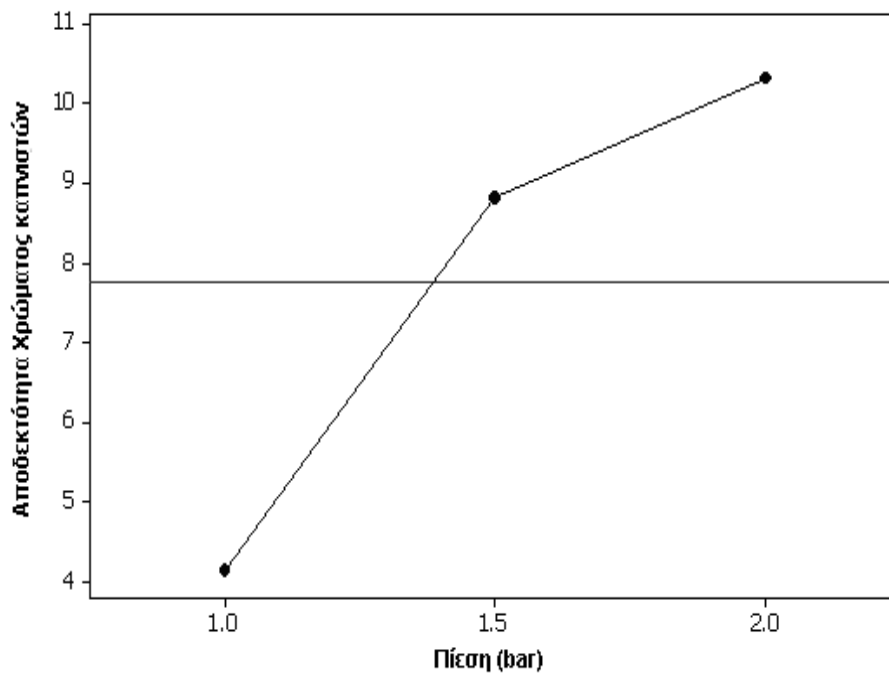
Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων

Πίνακας 27: Ανάλυση διακύμανσης για την αποδεκτότητα των προϊόντων ως προς το χρώμα

Παράγοντας	DF	F	P
Ξήρανση	1	0,87	0,404
Χρόνος	2	1,90	0,263
Πίεση	2	20,64	0,008
Ξήρανση*Χρόνος	2	0,00	1,000
Ξήρανση*Πίεση	2	1,16	0,401
Χρόνος*Πίεση	4	0,13	0,966
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0,05 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές

Οι δοκιμαστές επέλεξαν ως περισσότερο αποδεκτά τα φιλέτα που επεξεργάστηκαν σε πίεση 1,5 και 2,0bar, τα δείγματα δηλαδή με την εντονότερη ένταση καφέ – κίτρινου χρώματος (Σχήμα 10). Δεν διαπιστώθηκαν επίσης σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που προήλθαν με εφαρμογή 1,5 και 2,0bar πίεσης (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Αποδεκτότητα των φιλέτων πέστροφας ως προς το χρώμα.

5.3.6.3 Άρωμα καπνιστού προϊόντος

Η επεξεργασία του καπνίσματος προσδίδει στα αλιεύματα το χαρακτηριστικό άρωμα των καπνιστών προϊόντων. Η διαφορετικές εφαρμοζόμενες πιέσεις ήταν ο παράγοντας που επηρέασε την ανάπτυξη του αρώματος ($p=0,003$) (Πίνακας 28, 29). Τα αλιεύματα που επεξεργάστηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση δεν έδωσαν προϊόντα με ικανοποιητικό άρωμα. Αντίθετα, το άρωμα των φιλέτων που επεξεργάστηκαν σε πιέσεις 1,5 και 2,0bar ήταν σημαντικά εντονότερο. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές

μεταξύ των δειγμάτων που προήλθαν υπό συνθήκες πίεσης (1,5 και 2,0bar).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι σε συνθήκες πίεσης, όπου οι θερμοκρασίες είναι υψηλότερες, είναι εντονότερη η παραγωγή ουσιών που σχετίζονται με το άρωμα των καπνιστών προϊόντων (φαινολικών ουσιών).

Πίνακας 28: Έκταση αρώματος (οσμή, γεύση) στις διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας

Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	2,70 (3,031)	7,17 (2,302)	9,92 (3,007)
	45 min	4,45 (3,082)	10,75 (2,527)	10,30 (2,643)
	60 min	4,98 (3,026)	10,75 (3,032)	10,33 (2,316)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	3,28 (3,317)	9,58 (1,889)	10,11 (2,094)
	45 min	6,96 (3,935)	8,38 (3,806)	12,00 (1,888)
	60 min	3,79 (3,001)	11,66 (1,796)	10,43 (3,763)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων

Πίνακας 29: Ανάλυση διακύμανσης για τις τιμές του αρώματος

Παράγοντας	DF	F	P*
Ξήρανση	1	0,85	0,410
Χρόνος	2	2,52	0,196
Πίεση	2	34,42	0,003
Ξήρανση*Χρόνος	2	0,27	0,778
Ξήρανση*Πίεση	2	0,01	0,995
Χρόνος*Πίεση	4	0,96	0,515
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0,05 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές

Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν από τους Siskos *et al.*, (2005), οι οποίοι διαπίστωσαν ένταση του αρώματος σε φιλέτα πέστροφας σε συνθήκες πίεσης. Οι Cardinal *et al.*, (2001) παρατήρησαν ότι κατά το κάπνισμα, η θερμοκρασία και η τεχνική καπνίσματος που εφαρμόστηκε, διαφοροποίησαν τα προϊόντα ως προς το άρωμα καπνιστού.

5.3.6.4 Αποδεκτότητα των καπνιστών προϊόντων ως προς το άρωμα

Ανάλογα με την ένταση του αρώματος ήταν τα αποτελέσματα και για την αποδεκτότητα ως προς το άρωμα. Τα καπνιστά φιλέτα πέστροφας που παρασκευάστηκαν σε συνθήκες πίεσης ήταν τα περισσότερο αποδεκτά (Πίνακας 30, 31) ($p=0,002$). Διαπιστώνεται έτσι ότι τόσο ως προς το χρώμα και την αποδεκτότητα του όσο και ως προς το άρωμα και την αποδεκτότητα του η εφαρμογή πίεσης (1,5 ή 2bar) οδηγεί σε παραγωγή προϊόντων με εντονότερη εμφάνιση του χαρακτηριστικού (χρώμα, άρωμα) και καλύτερη αποδοχή

από τους δοκιμαστές που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

Πίνακας 30: Αποδεκτότητα ως προς το άρωμα

Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	2,70 (3,927)	7,94 (3,125)	10,65 (3,988)
	45 min	3,69 (4,306)	10,32 (2,888)	10,66 (2,989)
	60 min	6,23 (3,366)	9,24 (4,212)	11,12 (2,338)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	2,81 (4,400)	8,93 (4,645)	10,70 (2,840)
	45 min	5,51 (4,068)	8,92 (3,159)	13,03 (1,984)
	60 min	4,58 (3,225)	11,19 (2,574)	10,79 (3,724)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων

Πίνακας 31: Ανάλυση διακύμανσης της αποδεκτότητας του αρώματος

Παράγοντας	DF	F	P*
Ξήρανση	1	0,28	0,628
Χρόνος	2	1,93	0,259
Πίεση	2	39,17	0,002
Ξήρανση*Χρόνος	2	0,21	0,821
Ξήρανση*Πίεση	2	0,18	0,843
Χρόνος*Πίεση	4	0,34	0,841
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0,05 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές

5.3.6.5 Σκληρότητα

Σύμφωνα με τους δοκιμαστές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία η σκληρότητα επηρεάστηκε τόσο από την ξήρανση που προηγήθηκε του καπνίσματος ($p=0,006$), όσο από την πίεση που εφαρμόστηκε για την επεξεργασία ($p=0,001$) αλλά και από το χρόνο καπνίσματος ($p=0,016$) (Πίνακας 32, 33, Σχήμα 11).

Τα καπνιστά φιλέτα πέστροφας που δέχτηκαν ξήρανση πριν την επεξεργασία ήταν περισσότερο σκληρά από εκείνα που δεν ξηράθηκαν.

Τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε πίεση 1,5 και 2,0bar για την παραγωγή τους ήταν σκληρότερα από τα αντίστοιχα που παρασκευάστηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που προήλθαν από διαφορετικές συνθήκες πίεσης (1,5 ή 2bar).

Πίνακας 32: Σκληρότητα των φιλέτων πέστροφας στις διαφορετικές συνθήκες

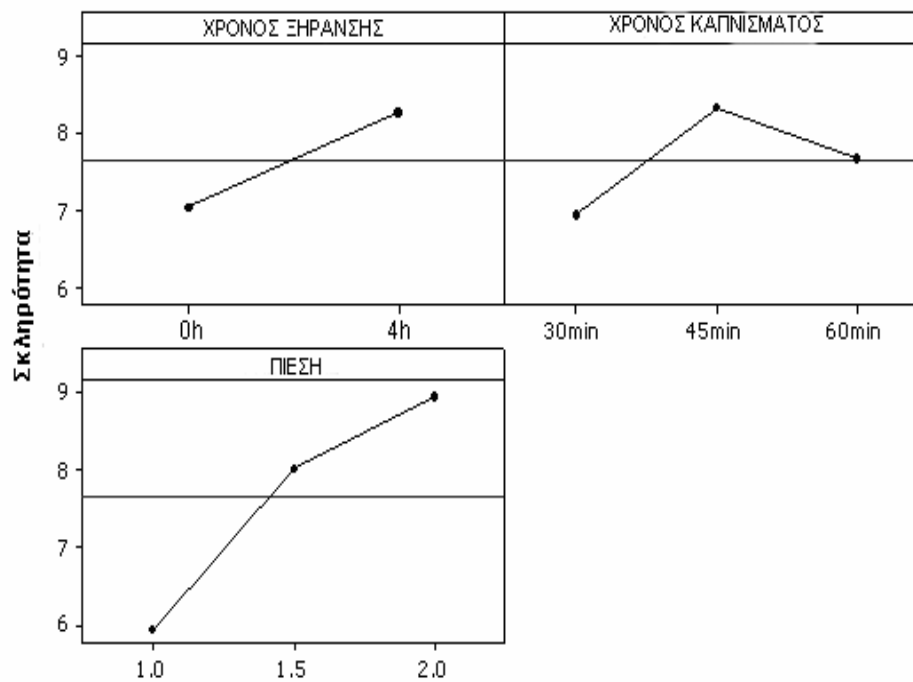
Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	3,12 (3,755)	6,99 (3,305)	10,65 (1,984)
	45 min	6,82 (3,908)	7,78 (2,413)	10,66 (4,605)
	60 min	4,31 (1,591)	8,44 (2,879)	9,49 (1,239)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	5,98 (4,138)	6,83 (4,190)	9,76 (1,221)
	45 min	9,35 (3,529)	9,39 (2,242)	9,15 (3,089)
	60 min	6,09 (4,443)	8,79 (3,887)	8,93 (3,667)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων

Πίνακας 33: Ανάλυση διακύμανσης για τη σκληρότητα

Παράγοντας	DF	F	P*
Ξήρανση	1	29,65	0,006
Χρόνος	2	13,77	0,016
Πίεση	2	65,59	0,001
Ξήρανση*Χρόνος	2	3,26	0,145
Ξήρανση*Πίεση	2	7,22	0,051
Χρόνος*Πίεση	4	14,83	0,056
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

*P<0,05 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές



Σχήμα 11: Επίδραση της ξήρανσης του χρόνου καπνίσματος και της πίεσης στη σκληρότητα των φιλέτων πέστροφας

Από το σχήμα 11 και πίνακα 32 & 33 φαίνεται ότι τα φιλέτα πέστροφας που καπνίστηκαν για 45min εμφάνισαν μεγαλύτερη σκληρότητα από αυτά που επεξεργάστηκαν για 30 και 60min. Από τον έλεγχο Tukey οι διαφορές των μέσων όρων των τριών διαφορετικών χρόνων καπνίσματος δεν ήταν αρκετά εμφανείς με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η επιλογή του κατάλληλου χρόνου επεξεργασίας.

5.3.6.6 Αποδεκτότητα της σκληρότητας

Η αποδεκτότητα των φιλέτων ως προς τη σκληρότητα επηρεάστηκε από το χρόνο καπνίσματος ($p=0,015$) και από τις συνθήκες πίεσης ($p=0,000$) (Πίνακας 34, 35). Ο έλεγχος του Tukey έδειξε ότι με την αύξηση της πίεσης αυξήθηκε η αποδεκτότητα της σκληρότητας των προϊόντων από τους δοκιμαστές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία. Τα δείγματα που προήλθαν από εφαρμογή πίεσης 2bar χαρακτηρίστηκαν από τους δοκιμαστές ως τα περισσότερο αποδεκτά ως προς τη σκληρότητα και ακολούθησαν αυτά που επεξεργάστηκαν σε πίεση 1,5bar (Σχήμα 12). Τα αποτελέσματα του ελέγχου Tukey για το χρόνο καπνίσματος έδειξαν ότι τα φιλέτα που επεξεργάστηκαν για 45min ήταν αυτά που προτιμήθηκαν από τους δοκιμαστές ως προς τη σκληρότητά τους (Σχήμα 12).

Πίνακας 34: Ανάλυση διακύμανσης για την αποδεκτότητα ως προς τη σκληρότητα διορθώνω

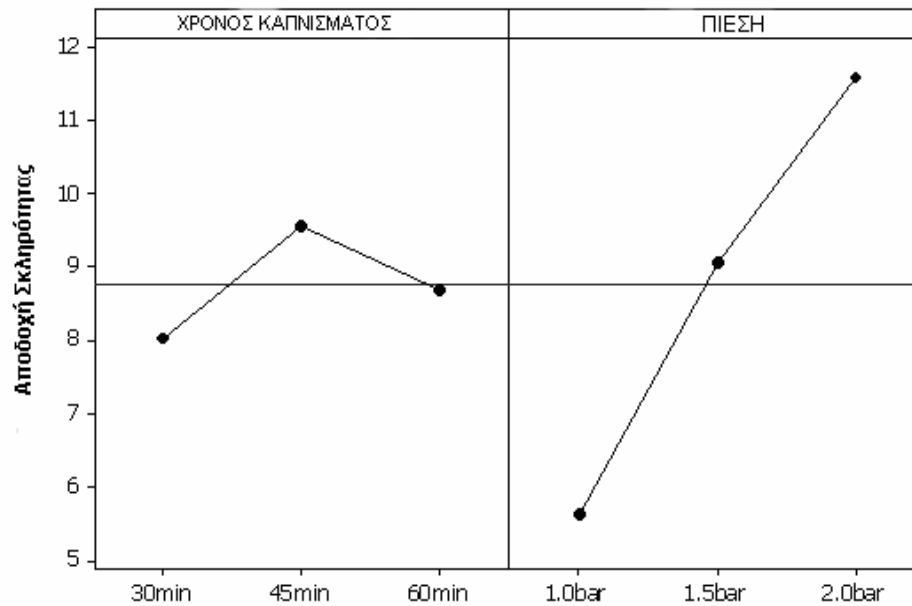
Παράγοντας	DF	F	P*
Ξήρανση	1	0,09	0,782
Χρόνος	2	14,07	0,015
Πίεση	2	215,58	0,000
Ξήρανση*Χρόνος	2	5,87	0,065
Ξήρανση*Πίεση	2	6,16	0,060
Χρόνος*Πίεση	4	2,76	0,174
Σφάλμα	4		
Σύνολο	17		

* $P<0,05$ υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 35: Αποδεκτότητα των φιλέτων πέστροφας ως προς τη σκληρότητα

Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	4,85 (3,658)	8,27 (3,386)	11,92 (2,740)
	45 min	6,20 (3,610)	8,65 (2,594)	12,04 (2,121)
	60 min	6,44 (4,325)	8,44 (4,042)	11,79 (1,232)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	3,74 (2,691)	8,69 (4,050)	10,79 (1,299)
	45 min	7,25 (3,407)	11,59 (2,681)	11,65 (1,657)
	60 min	5,39 (3,861)	8,75 (3,372)	11,38 (1,867)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων



Σχήμα 12: Επίδραση του χρόνου καπνίσματος και της πίεσης στην αποδεκτότητα των φιλέτων πέστροφας ως προς την σκληρότητα

5.3.7 Επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας στο χρώμα των φιλέτων

Οι μεταβολές στο χρώμα των καπνιστών προϊόντων υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του χρωματόμετρου Dr Lance. Οι τιμές των παραμέτρων L^* , a^* και b^* ήταν υψηλότερες στα καπνιστά προϊόντα από ότι στα μη επεξεργασμένα δείγματα (Πίνακες 36, 37, 38). Οι παράμετροι του χρώματος επηρεάστηκαν από τις διαφορετικές συνθήκες πίεσης. Με την αύξηση της πίεσης παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών των παραμέτρων a^* και b^* ενώ μείωση στις τιμές της παραμέτρου L^* (Πίνακες 36, 37, 38). Τα φιλέτα που

παρασκευάστηκαν σε πίεση 1,5 και 2bar δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μετρούμενες παραμέτρους. Η παράμετρος a^* (ερυθρότητα) φάνηκε ότι επηρεάστηκε από το χρόνο επεξεργασίας ($p=0,020$), τα φιλέτα που επεξεργάστηκαν για 45 και 60min έδωσαν υψηλότερες τιμές a^* (Σχήμα 13).

Η θερμοκρασία είναι ο κυριότερος παράγοντας για την ανάπτυξη του χρώματος (Lingert, 1990; Zotos *et al.*, 2001). Οι Carabasa-Giribet & Ibarz-Ribas, (2000) μελέτησαν την ανάπτυξη του χρώματος σε μοντέλο σύστημα που είχε ως βάση νερό, γλυκόζη και αμινοξέα και κατέληξαν ότι η ταχύτητα της αντίδρασης Maillard εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Ειδικότερα με την αύξηση της θερμοκρασίας μεγάλωνε ο ρυθμός σχηματισμού των έγχρωμων και των ενδιάμεσων άχρωμων προϊόντων των αντιδράσεων Maillard, με αποτέλεσμα τη μείωση της φωτεινότητας L^* . Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι έπειτα από 80h σε θερμοκρασία 100°C η τιμή της παραμέτρου L^* μειώθηκε. Σύμφωνα με τους Cardinal *et al.*, (2001) κατά την επεξεργασία του καπνίσματος παρατηρείται μείωση της παραμέτρου a^* και L^* ενώ αύξηση της παραμέτρου b^* .

Πίνακας 36: Επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας στην παράμετρο L*

Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	Συνθήκες πίεσης		
		1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	63,27 (3,340)	57,46 (6,480)	57,33 (3,800)
	45 min	64,38 (1,836)	51,87 (3,450)	55,25 (2,263)
	60 min	61,28 (3,970)	55,59 (3,014)	54,46 (4,050)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	60,85 (4,120)	56,62 (3,950)	55,55 (2,293)
	45 min	64,16 (4,800)	51,60 (3,420)	50,99 (3,860)
	60 min	63,25 (5,610)	53,04 (4,570)	54,71 (3,078)

Νωπό: 43,00 (10,05)

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων, η τυπική απόκλιση δίνεται στην παρένθεση

Πίνακας 37: Επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας στην παράμετρο a^*

		Συνθήκες πίεσης		
Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	1 bar	1,5 bar	2 bar
	30 min	-2,56 (0,721)	1,04 (3,900)	1,66 (4,140)
	45 min	-1,76 (0,920)	5,94 (3,217)	3,670 (3,340)
	60 min	-0,52 (0,994)	3,85 (3,340)	5,51 (3,139)
Ξηραμένα 4h				
	30 min	-3,58 (1,564)	1,26 (2,006)	2,66 (3,020)
	45 min	-2,00 (0,869)	3,56 (2,732)	5,85 (3,093)
	60 min	-1,22 (1,153)	2,03 (2,738)	4,15 (2,450)

Νωπό: -3,55 (3,188)

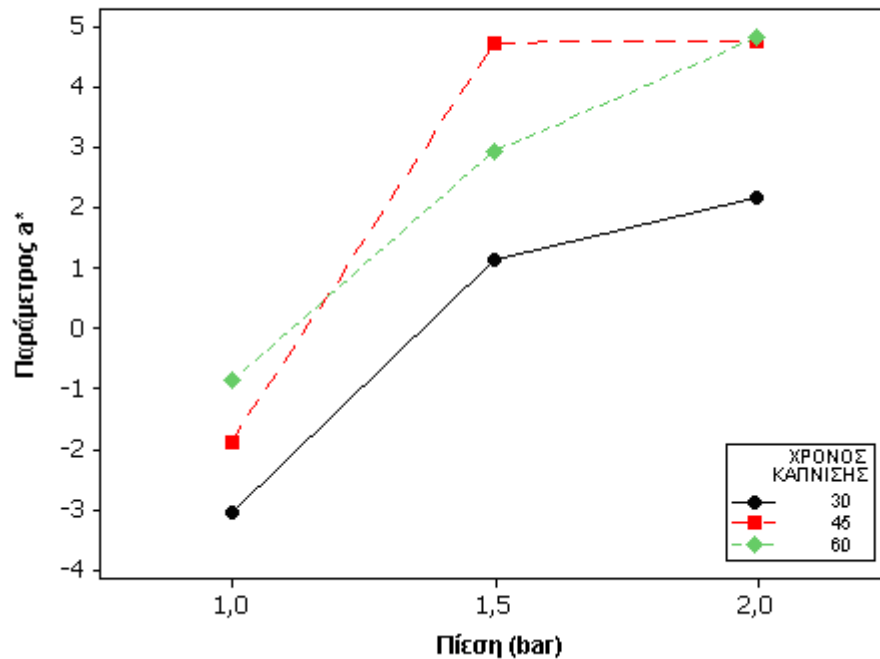
Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων, η τυπική απόκλιση δίνεται στην παρένθεση

Πίνακας 38: Μεταβολές της παραμέτρου b^* στις διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας

		Συνθήκες πίεσης			
Μη ξηραμένα	Χρόνος επεξεργασίας	1 bar	1,5 bar	2 bar	Νωπό
	30 min	12,93 (2,448)	15,09 (6,730)	18,33 (3,139)	5,609 (2,744)
	45 min	14,48 (2,828)	23,44 (3,990)	23,24 (4,920)	
	60 min	15,58 (2,496)	19,30 (3,126)	21,81 (3,305)	
Ξηραμένα 4h					
	30 min	10,64 (3,610)	17,64 (3,380)	22,82 (4,280)	
	45 min	12,65 (3,560)	16,31 (5,590)	24,65 (5,210)	
	60 min	11,20 (2,542)	18,27 (2,762)	22,97 (5,390)	

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι εννέα επαναλήψεων, η τυπική απόκλιση δίνεται στην παρένθεση

Πολλοί είναι οι ερευνητές που ασχολήθηκαν με τις μεταβολές που παρατηρούνται στο χρώμα κατά την εφαρμογή διαφορετικών πιέσεων. Οι Sequeira-Munoz *et al.*, (2006) ασχολήθηκαν με φιλέτα κυπρίνων τα οποία συσκεύασαν υπό κενό χρησιμοποιώντας διαφορετικές πιέσεις για 15 και 20min. Η τιμή της παραμέτρου L^* δεν άλλαξε σε πίεση 100MPa ενώ σε πίεση 140MPa και άνω η τιμή της αυξήθηκε. Οι τιμές των παραμέτρων a^* και b^* αυξήθηκαν όταν εφαρμόστηκε μεγαλύτερη πίεση. Σε ανάλογα αποτελέσματα κατέληξαν οι Chevallier *et al.*, (2006).



Σχήμα 13: Μεταβολές της παραμέτρου a^* σε διαφορετικές συνθήκες πίεσης και χρόνους καπνίσματος

5.4 Εκτίμηση του χρόνου συντήρησης στους $4\pm 1^\circ\text{C}$

Τα φιλέτα πέστροφας, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, που προτιμήθηκαν από τους δοκιμαστές ήταν αυτά που επεξεργάστηκαν σε πίεση 2 bar για 45min. Η αρχική επιλογή αφορούσε τα δείγματα που δεν δέχτηκαν ξήρανση πριν την επεξεργασία και αυτά που ξηράθηκαν για 4h σε κλίβανο θερμοκρασίας 43°C . Έτσι παρασκευάστηκαν φιλέτα πέστροφας και τα μισά καπνίστηκαν για 45min σε πίεση 2bar, ενώ τα άλλα μισά ξηράθηκαν για 4h στους 43°C και στη συνέχεια καπνίστηκαν στις ίδιες συνθήκες. Όλα τα

δείγματα συντηρήθηκαν σε συνθήκες ψύξης ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) και μελετήθηκε ο χρόνος της συντήρησής τους.

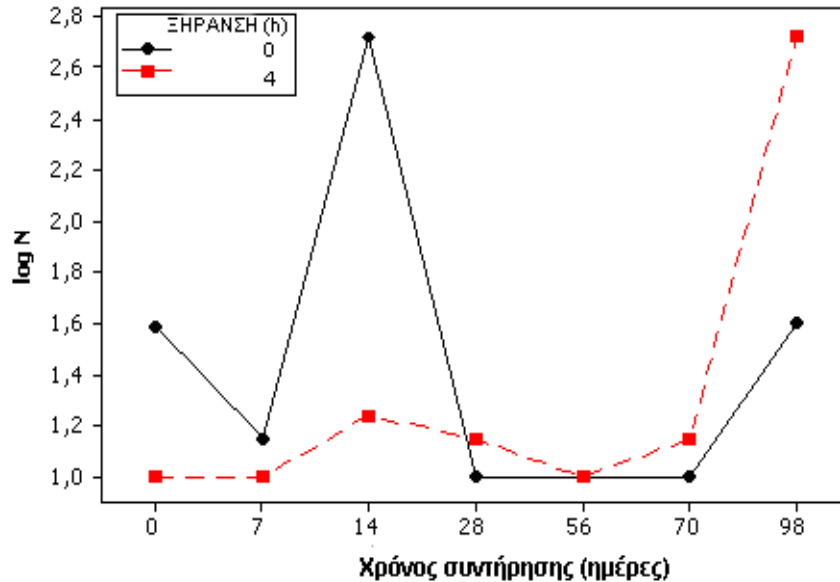
5.4.1 Ολική μεσόφιλη χλωρίδα

Προτού πραγματοποιηθεί η επεξεργασία του καπνίσματος, ποσότητα από το αρχικό νωπό αλείωμα χρησιμοποιήθηκε για μικροβιολογικό έλεγχο. Η μέση τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του νωπού δείγματος βρέθηκε $5,9 \times 10^5$ cfu/g.

Μετά την επεξεργασία του υγρού καπνίσματος παρατηρήθηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου σε όλα τα αλιεύματα (25 cfu/g) (Σχήμα 14). Η μείωση αυτή οφείλεται στην υψηλή θερμοκρασία ($105-115^{\circ}\text{C}$) που εφαρμόστηκε στα φιλέτα πέστροφας κατά την επεξεργασία του καπνίσματος. Στη θερμοκρασία αυτή παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των gram-θετικών κόκκων που συνήθως εμφανίζονται στα καπνιστά αλιεύματα. Οι κόκκοι είναι ευαίσθητοι σε θερμοκρασίες 66 και 82°C (Pigott & Tucker, 1990a). Το μικροβιακό φορτίο παρέμεινε σταθερό σε όλα τα δείγματα τις πρώτες 7 ημέρες συντήρησης. Μικρή αύξηση στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα (μη σημαντική) παρατηρήθηκε στα αλιεύματα που δεν ξηράθηκαν (6×10^2 cfu/g) την $14^{\text{η}}$ ημέρα συντήρησης, η οποία ήταν πιθανά αποτέλεσμα επιμόλυνσης κατά την εφαρμογή της μεθόδου. Ανάλογη επιμόλυνση παρατηρήθηκε και για τα γαλακτικά βακτήρια. Έπειτα από 21 ημέρες συντήρησης το μικροβιακό φορτίο παρέμεινε χαμηλό (30 cfu/g). Τα αλιεύματα που υπέστησαν ξήρανση παρουσίασαν μία μικρή αύξηση από 35 cfu/g σε

$1,1 \times 10^2$ cfu/g στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα έπειτα από 91 ημέρες συντήρησης στους $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Στο τέλος του πειράματος (98^η ημέρα) το μικροβιακό φορτίο για τις δύο μεταχειρίσεις παρέμεινε χαμηλό, 40 cfu/g στα δείγματα με 0h ξήρανση και $5,5 \times 10^2$ cfu/g στα δείγματα με 4h ξήρανση. Αξίζει να τονιστεί η μακρά περίοδος συντήρησης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας, καθώς και η ταχύτερη αλλοίωση που παρατηρήθηκε στα δείγματα που ξηράθηκαν πριν την επεξεργασία τους. Οι Hansen *et al.*, (1996) εφάρμοσαν δύο μεθόδους αλατίσματος σε φιλέτα σολομού που επεξεργάστηκαν με ψυχρό κάπνισμα και μελέτησαν τη μικροβιακή ανάπτυξη στα συσκευασμένα υπό κενό δείγματά τους κατά τη συντήρηση τους στους 5°C . Βρέθηκε ότι η ολική μεσόφιλη χλωρίδα στα δείγματα που προήλθαν από υγρό αλάτισμα ήταν 5×10^7 cfu/g, ενώ σε αυτά που προήλθαν από ξηρό 10^7 cfu/g σε χρόνο συντήρησης 35 ημερών, μικροβιακές τιμές σημαντικά υψηλότερες από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και μάλιστα σε συντομότερο χρόνο. Σύμφωνα με τους Liston & Matches (1976) η τιμή 10^6 cfu/g αποτελεί δείκτη αλλοίωσης για τα καπνιστά αλιεύματα. Η επεξεργασία του καπνίσματος θεωρείται σημαντικός παράγοντας της διάρκειας ζωής των καπνιστών αλιευμάτων. Οι υψηλές θερμοκρασίες (105 - 115°C) και η πίεση (2bar) που εφαρμόστηκαν στην επεξεργασία του καπνίσματος μείωσαν το αρχικό μικροβιακό φορτίο και παρέτειναν το χρόνο συντήρησης των καπνιστών αλιευμάτων.

Η διάρκεια ζωής των καπνιστών αλιευμάτων δεν συμβαδίζει με τη μικροβιακή ανάπτυξη και επομένως η μέτρηση του



Σχήμα 14: Μεταβολές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας με το χρόνο συντήρησης

μικροβιακού φορτίου δεν αποτελεί δείκτη ποιότητας του τροφίμου (Hansen *et al.*, 1995).

Πολλοί ερευνητές ασχολήθηκαν με τη συντήρηση καπνιστών αλιευμάτων. Οι Dondero *et al.*, (2004) μελέτησαν τις μεταβολές του μικροβιακού φορτίου συσκευασμένων υπό κενό καπνιστών σολομών με ψυχρό κάπνισμα σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης. Ο συνολικός αριθμών αερόβιων μικροβίων στην αρχή της συντήρησης

τους κυμαίνονταν σε επίπεδα $150-174 \times 10^3 \text{cfu/g}$. Η διάρκεια συντήρησης του καπνιστού σολομού σύμφωνα με τον οργανοληπτικό έλεγχο ήταν 20 ημέρες σε θερμοκρασία συντήρησης 4°C .

Φιλέτα σολομού αλατίστηκαν με τη μέθοδο του ξηρού αλατίσματος για 3 ώρες, στη συνέχεια ξηράθηκαν και καπνίστηκαν στους 22°C για 3 ώρες και συσκευάστηκαν υπό κενό σε θερμοκρασία -4°C . Μελετήθηκε η μικροβιακή τους ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε θερμοκρασία 8°C για 5 εβδομάδες. Αμέσως μετά την επεξεργασία του καπνίσματος ο αριθμός των αποικιών των αερόβιων μικροβίων βρέθηκε $3 \times 10^3 \text{cfu/g}$. Παρά το γεγονός ότι το μικροβιακό φορτίο του σολομού αυξήθηκε ραγδαία τις πρώτες 6 ημέρες ($3 \times 10^6 \text{cfu/g}$), το προϊόν δεν αλλοιώθηκε πριν το πέρας της δεύτερης και τρίτης εβδομάδας παρότι τα σημάδια αλλοίωσης εμφανίστηκαν μετά από 13 ημέρες (Leroi *et al.*, 1998).

Σύμφωνα με άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε φιλέτα πέστροφας παρασκευασμένα με ψυχρό κάπνισμα και συσκευασμένα υπό κενό η ολική μεσόφιλη χλωρίδα έφτασε την τιμή 10^7 μετά την ολοκλήρωση της δεύτερης εβδομάδας συντήρησής τους σε θερμοκρασία 4°C (Hyytia *et al.*, 1997).

Ερευνητές μελέτησαν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα, σε φιλέτα σολομού που καπνίστηκαν σε θερμοκρασία 26°C για 6h. Τα αλιεύματα με υψηλή συγκέντρωση άλατος (4,6%) που συντηρήθηκαν σε

θερμοκρασία 5 και 10°C βρέθηκαν αποδεκτά για διάστημα 2-3 εβδομάδων περισσότερο από τα αλιεύματα με τη χαμηλή συγκέντρωση άλατος (2,2%) στις ίδιες θερμοκρασίες συντήρησης. Το μικροβιακό φορτίο κυμάνθηκε μεταξύ 103 και 106 cfu/g στην αρχή της συντήρησης. Έπειτα από 12 ημέρες η ολική μεσόφιλη χλωρίδα έφτασε την τιμή 107-108 cfu/g και παρέμεινε στην τιμή αυτή για 60 ημέρες (Hansen *et al.*, 1995).

Μια νέα τεχνική αλατίσματος-καπνίσματος χρησιμοποιήθηκε από τους Bugueno *et al.*, (2003). Φιλέτα σολομού εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα που περιείχε 370g/L χλωριούχου νατρίου και 1,5% υγρού καπνού. Τα αλιεύματα παρέμειναν στο διάλυμα αυτό για 50min και εφαρμόστηκε πίεση 50mbar. Η συσκευασία έγινε με δύο τρόπους: υπό κενό και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Η αρχική τιμή του μικροβιακού φορτίου μετά το κάπνισμα ήταν 2,6 και 1log cfu/g. Αύξηση παρατηρήθηκε από την 7^η ημέρα χωρίς να διαπιστωθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικά συσκευασμένων αλιευμάτων ενώ την 30^η ημέρα συντήρησης η ολική μεσόφιλη χλωρίδα έφτασε τους 5log cfu/g.

Οι Kolodziejaska *et al.*, (2002) παρήγαγαν καπνιστό σκουμπρί με τη μέθοδο ήπιου θερμού καπνίσματος (57°C για 85min) το οποίο εμβαπτίστηκε αρχικά σε 200g/L χλωριούχου νατρίου σε θερμοκρασία 7°C για χρονικό διάστημα 2,5-3 ώρες. Μετά το αλάτισμα ακολούθησε ξήρανση για 30-60min. Στη συνέχεια τα καπνιστά προϊόντα παρέμειναν σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (2 και 8°C). Το αρχικό μικροβιακό των νωπών δειγμάτων

κυμάνθηκε μεταξύ $1,1 \times 10^2$ και $4,5 \times 10^4$ cfu/g. Η συντήρηση των αλιευμάτων σε θερμοκρασία 2°C παρουσίασε ελάχιστη μικροβιακή ανάπτυξη τις πρώτες 21 ημέρες. Άλλοι ερευνητές όπως οι Deng *et al.*, (1974) ανέφεραν ότι δεν παρατηρήθηκε καμία μικροβιακή ανάπτυξη για περισσότερες από 45 ημέρες σε σκουμπρί που επεξεργάστηκε σε θερμοκρασία 67°C και συντηρήθηκε στους $3,3^\circ\text{C}$.

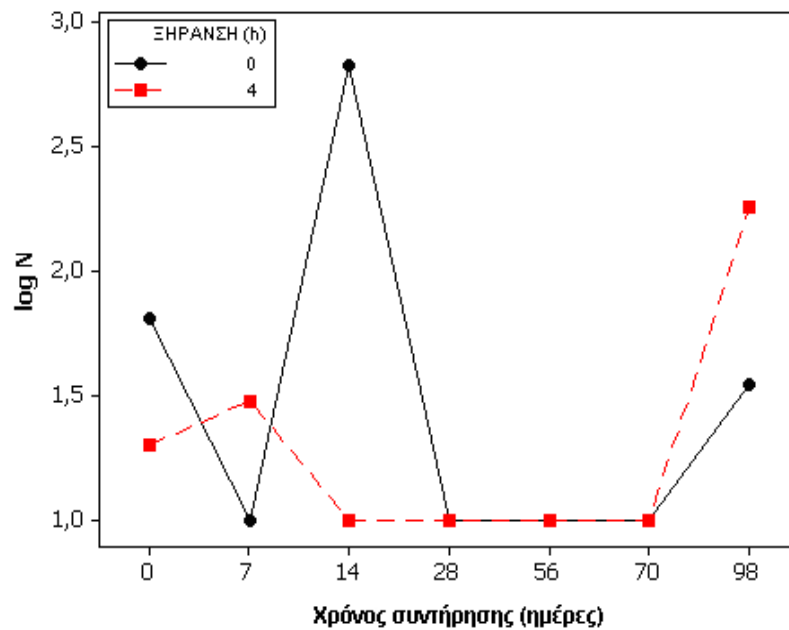
Φιλέτα πέστροφας που ξηράθηκαν για 16h και επεξεργάστηκαν για 30min και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία $4 \pm 1^\circ\text{C}$ για 25 ημέρες παρουσίασαν μικρή ανάπτυξη των ολικών μεσόφιλων βακτηρίων, ενώ αυτά που επεξεργάστηκαν για περισσότερο χρόνο (45 και 60min) ο χρόνος συντήρησης αυξήθηκε στις 48 ημέρες (Siskos *et al.*, 2006). Η παραπάνω επεξεργασία ήταν ίδια με την εφαρμοζόμενη στη συγκεκριμένη εργασία, ωστόσο ο χρόνος συντήρησης πολύ συντομότερος. Η μακρύτερη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων πέστροφας που διαπιστώθηκε στη συγκεκριμένη εργασία πιθανά οφείλεται στην επεξεργασία ξήρανσης πριν το κάπνισμα, η οποία είναι πολύ πιθανό να οδηγεί σε βακτηριακή επιβάρυνση των δειγμάτων.

5.4.2 Γαλακτικά βακτήρια

Το μικροβιακό φορτίο των γαλακτικών βακτηρίων αμέσως μετά την επεξεργασία βρέθηκε 30cfu/g (Σχήμα 15). Τα επίπεδα των μικροοργανισμών αυτών παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της συντήρησης των καπνιστών φιλέτων σε θερμοκρασία $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Την τελευταία ημέρα διεξαγωγής του

πειράματος ο αριθμός των γαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε και είχε τιμή $1,8 \times 10^2$ cfu/g στα καπνιστά αλιεύματα που είχαν ξηραθεί για 4 ώρες πριν το κάπνισμα (Σχήμα 15).

Οι Leroi *et al.*, (1998) ανέφεραν μετά την επεξεργασία του καπνίσματος μικρή ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Ραγδαία ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών παρατηρήθηκε την πρώτη εβδομάδα (15×10^5 cfu/g) ενώ μέγιστη ανάπτυξη εμφανίστηκε έπειτα από 4 εβδομάδες συντήρησης. Σύμφωνα με τους Tome *et al.*, (2005) ο αρχικός συνολικός αριθμός των γαλακτικών βακτηρίων σε σολομό, επεξεργασμένο με ψυχρό κάπνισμα, κυμάνθηκε μεταξύ 10^2 και 10^4 cfu/g. Ο αριθμός των γαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε με τον χρόνο συντήρησης στους 5°C του σολομού που ήταν συσκευασμένος υπό κενό.



Σχήμα 15: Μεταβολές στον αριθμό των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια συντήρησης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας.

Οι Lyhs *et al.*, (2001) παρασκεύασαν φιλέτα πέστροφας συγκέντρωσης 3,5% σε χλωριούχο νάτριο τα οποία στη συνέχεια τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια, προστέθηκε άνιθος και συσκευάστηκαν υπό κενό. Αμέσως μετά την επεξεργασία η τιμή των γαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε χαμηλότερη της τάξης των 100cfu/g. Η συντήρησή τους σε θερμοκρασία 3°C μελετήθηκε για 30 ημέρες και η τιμή των γαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε μεταξύ 10⁴ και 10⁶ το χρονικό διάστημα από τη 10^η ως την 30^η ημέρα.

Η παρουσία των γαλακτικών βακτηρίων σε αλιεύματα, που είχαν επεξεργαστεί με ψυχρό κάπνισμα, αλατιστεί σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου, μαριναριστεί, χωρίς θερμική επεξεργασία, βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα (10^7 - 10^8 cfu/g) για αρκετές εβδομάδες πριν απορριφθεί το τρόφιμο οργανοληπτικά (Gram & Huss, 1996).

5.4.3 *Listeria monocytogenes*

Σε κανένα από τα αλιεύματα που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία $4\pm 1^\circ\text{C}$ δεν εμφανίστηκε το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν οι Dondero *et al.*, (2004) και οι Tome *et al.*, (2005) οι οποίοι παρασκεύασαν και συντήρησαν καπνιστό σολομό με τη μέθοδο του ψυχρού καπνίσματος. Οι Basti *et al.*, (2006) ερεύνησαν την παρουσία παθογόνων μικροβίων όπως η *Listeria monocytogenes* σε φρέσκο, καπνιστό και αλατισμένο αλιεύμα. Το αποτέλεσμα ήταν θετικό σε όλα τα δείγματα. Η παρουσία του παθογόνου αυτού βρέθηκε σε επίπεδα μεγαλύτερα της τάξης του 10^2 /g στο 10% των αλατισμένων αλιευμάτων και στο 5,1% των αλιευμάτων μετά το κάπνισμα. Επειδή η κατανάλωση των ψυχρά καπνισμένων αλιευμάτων γίνεται χωρίς περαιτέρω επεξεργασία η παρουσία της *L. monocytogenes* σε επίπεδα μεγαλύτερα του 10^2 /g αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών.

Οι Espe *et al.*, (2004) παρήγαγαν καπνιστό σολομό με ψυχρό κάπνισμα και από τις αναλύσεις που έγιναν σε 44

δείγματα βρέθηκε ότι τα 5 ήταν θετικά σε *Listeria sp.* ενώ από αυτά στα 3 δείγματα βρέθηκε *Listeria monocytogenes*.

Η χρησιμοποίηση χαμηλών θερμοκρασιών (<30°C) και χαμηλών συγκεντρώσεων σε αλάτι (<5%) κατά το ψυχρό κάπνισμα δεν αρκούν για να αδρανοποιήσουν το παθογόνο μικρόβιο *Listeria monocytogenes*. Η εμφάνιση της *Listeria* μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της συντήρησης του αλιεύματος (Vaz-Velho *et al.*, 2005).

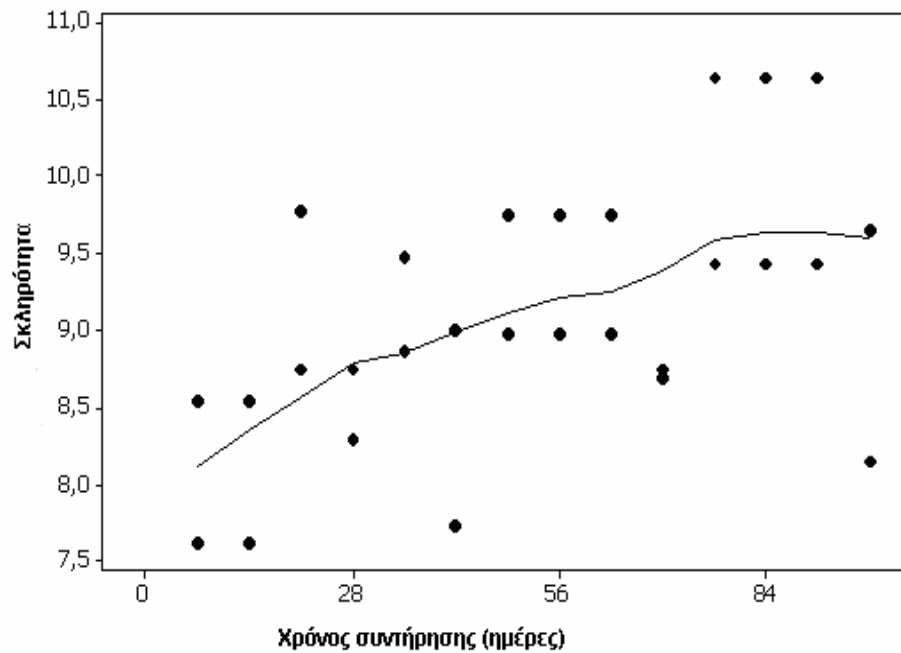
Οι Johansson *et al.*, (1999) μελέτησαν την παρουσία *Listeria monocytogenes* σε 110 αλιεύματα, συσκευασμένα σε κενό, 12 παραγωγών. Εξετάστηκαν 48 λευκόσαρκα αλιεύματα που επεξεργάστηκαν με θερμό κάπνισμα, 30 πέστροφες ψυχρού καπνίσματος και 32 πέστροφες ψυχρού αλατίσματος. Το 20% των δειγμάτων που εξετάστηκαν βρέθηκε θετικό σε *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα το 50% των ψυχρά αλατισμένων φιλέτων πέστροφας, το 17% των ψυχρά καπνισμένων φιλέτων πέστροφας και το 2% των θερμά καπνισμένων δειγμάτων. Από τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν φαίνεται ότι η παρουσία της *Listeria monocytogenes* επηρεάζεται από τη θερμοκρασία επεξεργασίας καθώς στα αλιεύματα που επεξεργάστηκαν με θερμό κάπνισμα το ποσοστό των θετικών στη *L. monocytogenes* ήταν αρκετά χαμηλό. Έχει αναφερθεί ότι η *L. monocytogenes* είναι ανθεκτικότερη στη θερμοκρασία συγκριτικά με άλλα μη σπορογόνα βακτήρια (π.χ. 4 φορές ανθεκτικότερη από τη *Salmonella*) (Jemmi & Keusch, 1992).

5.5 Μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων πέστροφας

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευμάτων που μελετήθηκαν κατά τη συντήρηση τους παρουσίασαν βαθμιαία διασπορά όπως φαίνεται στα σχήματα 16,17,18,19.

5.5.1 Σκληρότητα

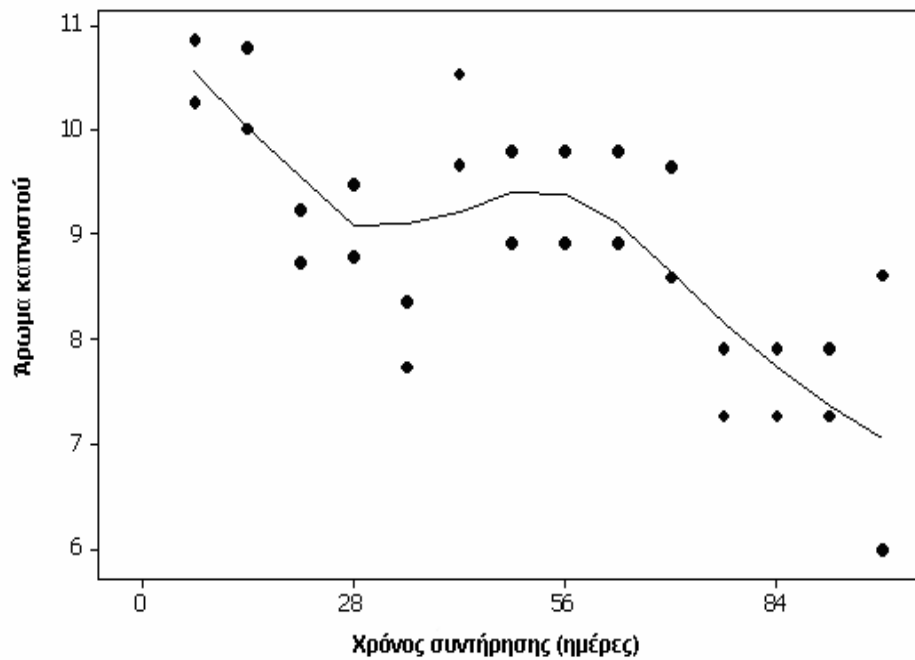
Η σκληρότητα των δειγμάτων αυξήθηκε βαθμιαία κατά τη συντήρηση στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, όπως ήταν αναμενόμενο, λόγω της αφυδάτωσης που υπέστησαν κατά τη συντήρησή τους. Η μέγιστη σκληρότητα παρατηρήθηκε έπειτα από 70 ημέρες συντήρησης (Σχήμα 16). Παρόμοιες μεταβολές στη σκληρότητα λόγω συντήρησης παρατηρήθηκαν και σε καπνιστό σολομό από τους Leroi *et al.*, (1998) έπειτα από 13 ημέρες συντήρησης, οπότε και οι φέτες καπνιστού σολομού χαρακτηρίστηκαν ως περισσότερο κολλώδη και λιπαρά σε ότι αφορά την υφή.



Σχήμα 16: Μέσοι όροι της σκληρότητας των φιλέτων πέστροφας κατά τη συντήρησή τους στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$

5.5.2 Οσμή καπνιστού

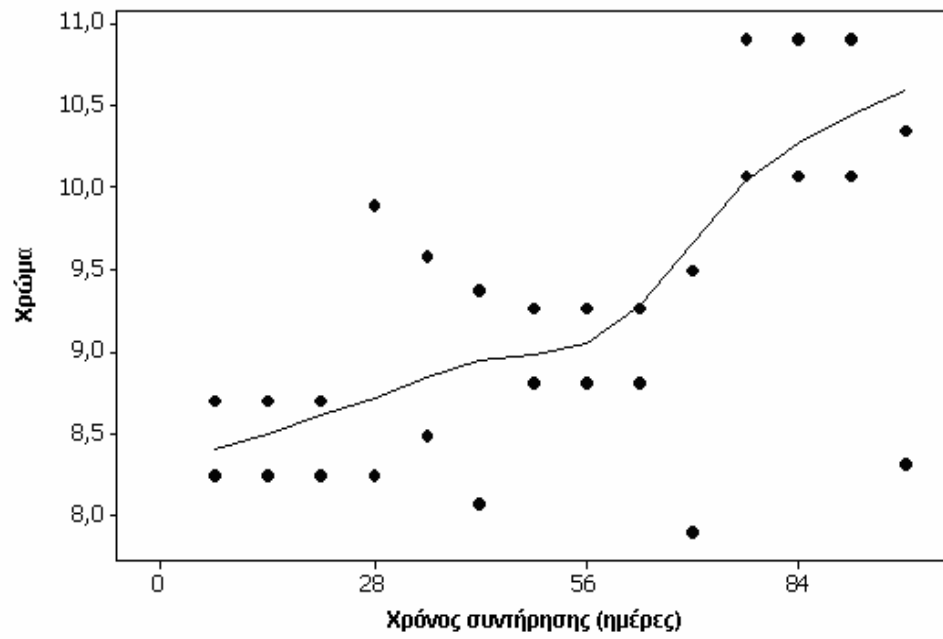
Σε αντίθεση με τη σκληρότητα, η ένταση της οσμής των καπνιστών φιλέτων πέστροφας μειώθηκε βαθμιαία κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους (Σχήμα 17). Η οσμή καπνιστού παρέμεινε σχεδόν σταθερή για 42 ημέρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δοκιμαστές δεν παρατήρησαν καμία μεταβολή στην οσμή (ξένη - δυσάρεστη οσμή) και έκριναν τα δείγματα κατάλληλα για κατανάλωση μετά το πέρας των 98 ημερών.



Σχήμα 17: Μέσοι όροι του αρώματος των καπνιστών φιλέτων πέστροφας κατά τη συντήρησή τους στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$

5.5.3 Χρώμα

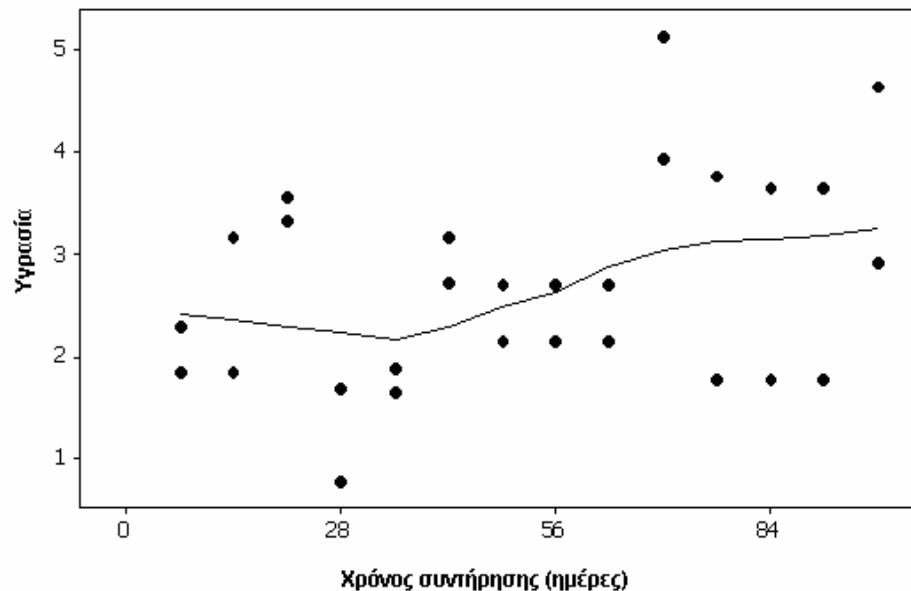
Το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα των καπνιστών προϊόντων αυξήθηκε βαθμιαία όσο παρέμεναν τα φιλέτα πέστροφας σε συντήρηση στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Σχήμα 18). Η αύξηση της έντασης του χρώματος ολοκληρώθηκε την 77^η ημέρα. Αυτό πιθανώς αποδίδεται στις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης που συμβαίνουν μεταξύ των καρβονυλικών συμπυκνωμάτων του καπνού ή των οξειδωμένων λιπαρών υλών και των πρωτεϊνών κατά τη συντήρηση οπότε και εντείνεται επιπλέον ο σχηματισμός του καφέ χρωματισμού.



Σχήμα 18: Μέσοι όροι του χρώματος των φιλέτων πέστροφας κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$

5.5.4 Παρουσία εξωτερικής υγρασίας

Την 42^η ημέρα συντήρησης των φιλέτων σε θερμοκρασία ψύξης στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ήταν εμφανής η παρουσία υγρασίας στην εξωτερική επιφάνεια των φιλέτων πέστροφας. Από την 42^η ως την 98^η ημέρα συντήρησης παρατηρήθηκε βαθμιαία μικρή αύξηση της υγρασίας αυτής, όμοια με την παρατηρούμενη αύξηση της σκληρότητας στα δείγματα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη σταδιακή αφυδάτωση που συμβαίνει κατά τη συντήρηση υπό ψύξη, η οποία όμως εξελίσσεται με σχετικά αργό ρυθμό (Σχήμα 19).



Σχήμα 19: Μέσοι όροι της εξωτερικής υγρασίας που εμφάνισαν τα φιλέτα πέστροφας κατά τη συντήρησή τους στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$

5.6 Εκτίμηση του χρόνου συντήρησης στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$

Τα μη-ξηραμένα, καπνισμένα για 45min σε πίεση 2bar φιλέτα πέστροφας συντηρήθηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ($6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$) με σκοπό να εκτιμηθεί ο χρόνος συντήρησής τους. Οι δύο αυτές θερμοκρασίες επιλέχθηκαν γιατί είναι αυτές που συναντώνται πιο συχνά στο λιανικό εμπόριο.

5.6.1. Ολική μεσόφιλη χλωρίδα

Η μέση τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του νωπού δείγματος βρέθηκε $5,0 \times 10^4 \text{cfu/g}$. Μετά την επεξεργασία η τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας μειώθηκε σε 15cfu/g εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας που χρησιμοποιήθηκε ($113\pm 1^{\circ}\text{C}$). Υψηλότερες τιμές μικροβιακής χλωρίδας βρέθηκαν από τους Siskos *et al.*, (2006) μετά από το υγρό κάπνισμα πέστροφας (16h ξήρανση σε πίεση 2 bar για 30, 45 and 60 min). Πιθανό αίτιο για τις υψηλές αυτές τιμές ήταν η πολύωρη (16h) ξήρανση που έγινε πριν την επεξεργασία. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας παρέμεινε σχεδόν σταθερή τις πρώτες 21 ημέρες της συντήρησης και στις δύο θερμοκρασίες (Σχήμα 20).

Την 28^η ημέρα της συντήρησης μια αύξηση στην τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (10^3cfu/g) παρατηρήθηκε στα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, ενώ η τιμή για τα δείγματα που συντηρούνταν στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ παρέμεινε χαμηλή (25cfu/g) (Σχήμα 20).

Αύξηση παρατηρήθηκε στην τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και στα δύο δείγματα την 35^η ημέρα της συντήρησης. Στα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ η τιμή έφτασε $6,5 \times 10^2 \text{cfu/g}$ ενώ σε εκείνα που ήταν αποθηκευμένα στους $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, $9,2 \times 10^3 \text{cfu/g}$ (Σχήμα 20).

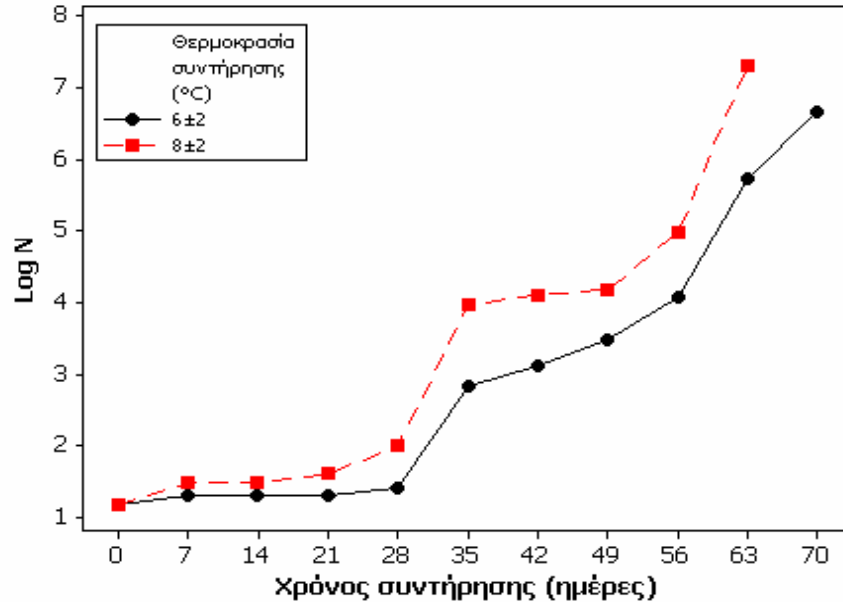
Την 56^η ημέρα μούχλα εμφανίστηκε στην επιφάνεια και των δύο δειγμάτων, παρόλα αυτά, η τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ήταν χαμηλότερη από το όριο 10^6cfu/g που προτάθηκε ως δείκτης αλλοίωσης των καπνιστών αλιευμάτων. Οι Truelstrup *et al.*, (1996) ανέφεραν ότι οι ζύμες και οι μύκητες φαίνεται να μην έχουν ιδιαίτερη εμπλοκή στην αλλοίωση των καπνιστών προϊόντων.

Μια απότομη αύξηση στην τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας παρατηρήθηκε την 63^η ημέρα (Σχήμα 20) και τα δείγματα που συντηρούνταν στους $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ έφτασαν τις μέγιστες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης ($2,1 \times 10^7 \text{cfu/g}$).

Τα φιλέτα που ήταν αποθηκευμένα στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ εμφάνισαν υψηλές τιμές μικροβιακής μόλυνσης ($4,6 \times 10^6 \text{cfu/g}$) μετά από 70 ημέρες.

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την διάρκεια ζωής των προϊόντων είναι η θερμοκρασία συντήρησης. Αυξανόμενης της θερμοκρασίας, μειώνεται ο χρόνος συντήρησης (Dondero *et al.*, 2004). Γίνεται εύκολα αντιληπτό από τα σχήματα 14 και 20 ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ δεν εμφάνισαν σημάδια αλλοίωσης ακόμα και μετά από 98 ημέρες. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ίδια για τα φιλέτα της καπνιστής πέστροφας που συντηρήθηκαν στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$. Τα

δείγματα αυτά απορρίφθηκαν μετά από 70 και 63 ημέρες αντίστοιχα με κριτήριο τα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου.



Σχήμα 20: Μεταβολές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας με το χρόνο συντήρησης

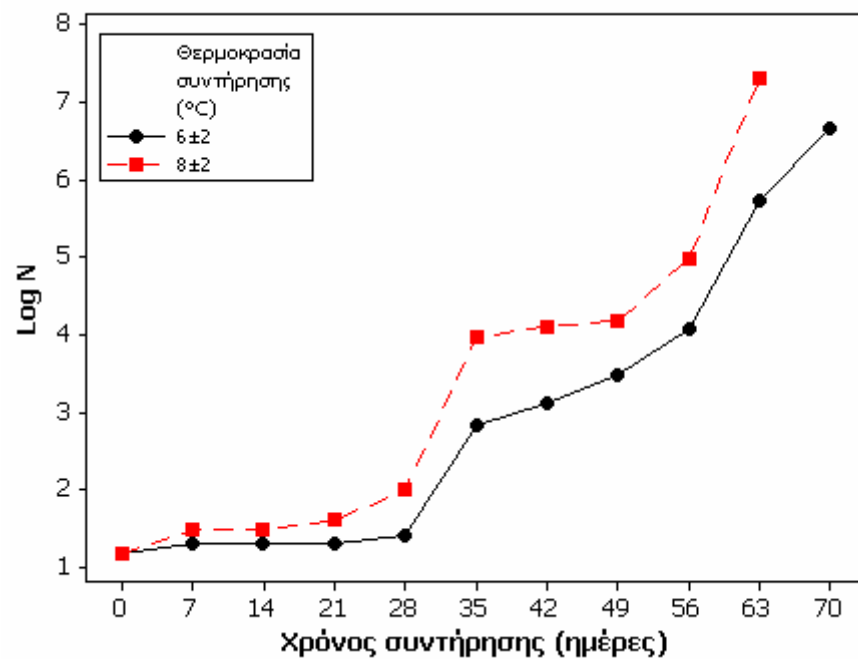
5.6.2 Γαλακτικά βακτήρια

Η αύξηση της τιμής των γαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε να είναι παρόμοια με αυτή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας αλλά δεν έφτασε την τιμή 10^7 cfu/g.

Η αρχική τιμή των γαλακτικών βακτηρίων ήταν χαμηλή (10^2 cfu/g) και αυξήθηκε κατά την διάρκεια της συντήρησης. Μέχρι την 42^η ημέρα, τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους $6\pm 2^\circ\text{C}$ είχαν μια σταθερή μικροβιακή ανάπτυξη. Η αύξηση ήταν απότομη ανάμεσα στην 42^η και 49^η ημέρα και

στην ημερομηνία λήξης του πειράματος, όπως αυτή ορίστηκε από την τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, έφτασε στην τιμή $9,5 \times 10^4$ cfu/g (Σχήμα 21).

Όσο αναφορά τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους $8 \pm 2^\circ\text{C}$, η τιμή των γαλακτικών βακτηρίων άρχισε να αυξάνεται νωρίτερα (21 ημέρα). Τελικά, την τελευταία μέρα του πειράματος η τιμή ήταν 2×10^5 cfu/g (Σχήμα 21).



Σχήμα 21: Μεταβολές στον αριθμό των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια συντήρησης των καπνιστών φιλέτων πέστροφας

Παρόμοια αποτελέσματα στις τιμές των γαλακτικών βακτηρίων με μικρότερη διάρκεια ζωής βρέθηκαν από τους Lyhs *et al.*, (2001). Την ημέρα της αλλοίωσης, μετά από 27 και 20 ημέρες αποθήκευσης στους 3°C and 8°C αντίστοιχα, οι τιμές των γαλακτικών βακτηρίων για συσκευασμένη υπό κενό, κρύα καπνιστή πέστροφα βρέθηκαν να είναι 10^4 - 10^6 cfu/g έως 10^5 - 10^7 cfu/g.

Όπως φαίνεται από τα σχήματα 20 & 21, η τιμή των γαλακτικών βακτηρίων επηρεάστηκε από την θερμοκρασία αποθήκευσης με τον ίδιο τρόπο που επηρεάστηκε και η τιμή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Όσο προχωρούσε ο χρόνος συντήρησης τα γαλακτικά βακτήρια παρουσίασαν αυξητική τάση.

5.6.3. Επίδραση της συντήρησης στα προϊόντα αποικοδόμησης του ATP

Τα προϊόντα αποικοδόμησης του ATP μετά την επεξεργασία φαίνονται στον πίνακα 39. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις τιμές που βρέθηκαν στο νωπό δείγμα, είναι φανερό ότι η άτμιση προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στο ATP στα δείγματα. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους $6 \pm 2^\circ\text{C}$, το ADP παρέμεινε σχεδόν σταθερό μέχρι την 35^η ημέρα και στη συνέχεια αυξήθηκε, το IMP μειώθηκε την τελευταία μέρα του πειράματος, τα AMP και Hx αυξήθηκαν ενώ η Ipo και το ATP δεν μεταβλήθηκαν. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Η μείωση του IMP ήταν σταδιακή σε όλη της διάρκεια συντήρησης των φιλέτων πέστροφας και την τελευταία μέρα η τιμή ήταν πολύ

χαμηλή (0,002 $\mu\text{mol/g}$) (Πίνακας 39). Τα προϊόντα αποικοδόμησης του ATP δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της συντήρησης γιατί τα ένζυμα που αποικοδομούν τα νουκλεοτίδια πιθανά μετουσιώθηκαν κατά την διάρκεια του υγρού καπνίσματος ($\Theta=113\pm 1^\circ\text{C}$).

Οι Hattula & Kiesvaara (1996) μελέτησαν την επίδραση της θέρμανσης στα προϊόντα αποικοδόμησης του ATP και βρήκαν ότι το IMP μειώθηκε από 5,1 σε 2,7mmol/kg όταν το αλεύμα θερμάνθηκε στους 65°C . Την ίδια στιγμή η Ino αυξήθηκε από 1,3 σε 3,2mmol/kg και η Hx από 0,09 σε 0,45 mmol/kg. Η ποσότητα των προϊόντων αποικοδόμησης του ATP δεν μεταβλήθηκαν κατά την θέρμανση στους 70 και 75°C , γεγονός που καταδεικνύει την μετουσίωση των ενζύμων που αποικοδομούν τα νουκλεοτίδια. Τα ένζυμα στην πραγματικότητα μετουσιώθηκαν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 70°C .

Πίνακας 39: Μεταβολές των προϊόντων αποικοδόμησης ATP των φιλέτων πέστροφας κατά την συντήρησή τους στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$

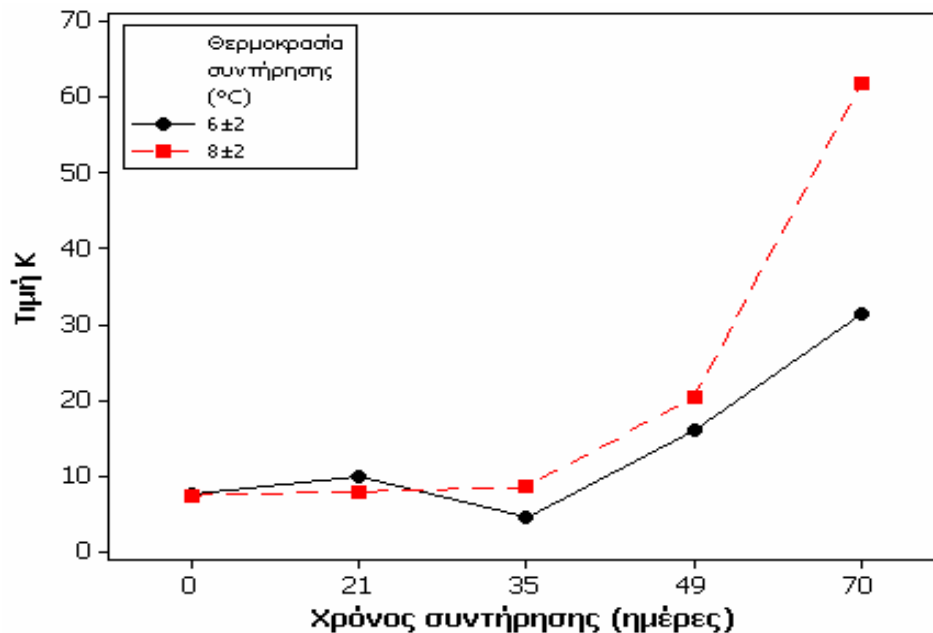
	Συγκέντρωση των προϊόντων αποικοδόμησης ATP ($\mu\text{mol/g}$ λιπαρών)					
	ATP	ADP	AMP	IMP	Ino	Hx
Νωπό	0,323	0,002	0,006	0,004	0,008	0,013
Ημέρες συντήρησης($6\pm 2^{\circ}\text{C}$)						
0	0,176	0,003	0,038	0,128	0,008	0,018
21	0,194	0,004	0,026	0,115	0,008	0,028
35	0,219	0,003	0,038	0,121	0,007	0,028
49	0,184	0,040	0,040	0,127	0,007	0,050
70	0,162	0,057	0,057	0,057	0,009	0,102
Ημέρες συντήρησης($8\pm 2^{\circ}\text{C}$)						
0	0,176	0,003	0,015	0,128	0,008	0,018
21	0,192	0,002	0,013	0,097	0,007	0,023
35	0,224	0,003	0,039	0,033	0,007	0,025
49	0,194	0,030	0,050	0,003	0,007	0,039
70	0,182	0,030	0,082	0,002	0,004	0,290

5.6.4. Επίδραση της συντήρησης στην τιμή K

Η τιμή K αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της φρασκάδας και φρεσκότητας των αλιευμάτων. Η σχέση ανάμεσα στην τιμή K και στον χρόνο συντήρησης ή την οργανοληπτική φρεσκότητα δεν είναι ίδια για όλα τα είδη αλιευμάτων και θα πρέπει να προσδιορίζεται για το κάθε είδος (Whittle & Howgate, 2002). Η διάρκεια ζωής για το λαβράκι (*Leteolabrax japonicus*) ήταν 13 ημέρες στους 0°C και η τιμή K έφτασε το 55%. Η τιμή K για την πέστροφα αυξήθηκε από 3,4% (0 ημέρες) σε 83% κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 5°C (Alasalvar *et al.*, 2002). Στην παρούσα μελέτη η τιμή K για τα ατμισμένα με υγρό καπνό φιλέτα πέστροφας μετρήθηκε από την συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων. Από το σχήμα 22 γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχουν αλλαγές στην τιμή K κατά την διάρκεια την συντήρησης (70 ημέρες). Η τιμή K του νωπού δείγματος ήταν 6,0% και παρέμεινε σχεδόν σταθερή τις πρώτες 35 ημέρες της συντήρησης. Στη συνέχεια αυξήθηκε γραμμικά. Ο χρόνος συντήρησης επηρέασε στατιστικά σημαντικά την μετρούμενη τιμή ενώ δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Θα μπορούσε η τιμή K πιθανά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ποιότητας/ αποδεκτότητας των ατμισμένων με υγρό καπνό προϊόντων. Περαιτέρω έρευνα θα πρέπει να διεξαχθεί προκειμένου να προσδιοριστεί η τιμή K που σχετίζεται με το όριο της αποδεκτότητας. Η τιμή K που βρέθηκε στην παρούσα έρευνα είναι πολύ χαμηλότερη από αυτές που

αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αυτό αναδεικνύει την υψηλή ποιότητα των ατμισμένων με υγρό καπνό φιλέτων πέστροφας.



Σχήμα 22: Μεταβολές στην τιμή K των φιλέτων πέστροφας κατά την συντήρησή τους στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$

5.6.5 Επίδραση της συντήρησης στην οξειδωση του λίπους

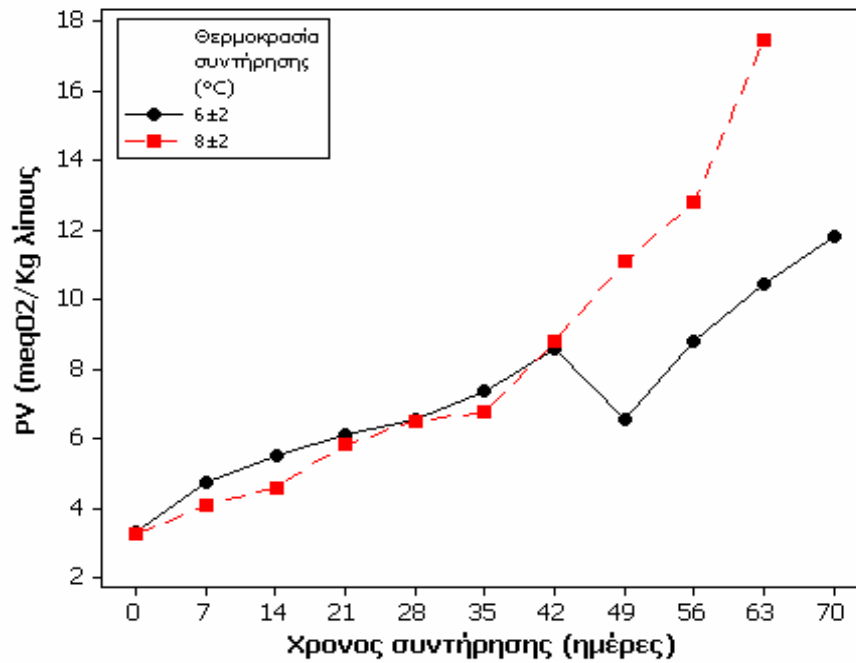
5.6.5.1 Τιμή υπεροξειδίων (PV)

Κατά την διάρκεια της συντήρησης δεν παρατηρήθηκε σημαντική οξειδωση στα δείγματα των καπνιστών φιλέτων πέστροφας καθώς παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στην PV. Πιο συγκεκριμένα, η PV κυμάνθηκε μεταξύ $2,9\text{meqO}_2/\text{kg}$

και $18,0 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ σε όλα τα δείγματα από την αρχή της συντήρησης μέχρι την ημερομηνία της απόρριψης (Σχήμα 23).

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα των Siskos *et al.*, (2007). Η PV ήταν μεταξύ $15,6 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ και $26,9 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ σε όλα τα δείγματα στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε δηλαδή μια σταθερή αυξητική τάση ανεξάρτητα από το χρόνο επεξεργασίας.

Οι Bhuiyan *et al.*, (1986b) μελέτησαν την σταθερότητα του λίπους κατά τη διάρκεια του καπνίσματος φιλέτων σκουμπριού και βρήκαν μια αύξηση από 1,30 σε $8,96 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ που ήταν αποτέλεσμα της μετατροπής κάποιων ακόρεστων λιπαρών οξέων της επιφάνειας του αλιεύματος σε υπεροξειδία.



Σχήμα 23: Μεταβολές στην τιμή υπεροξειδίων (PV) των φιλέτων πέστροφας κατά την συντήρησή τους στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$

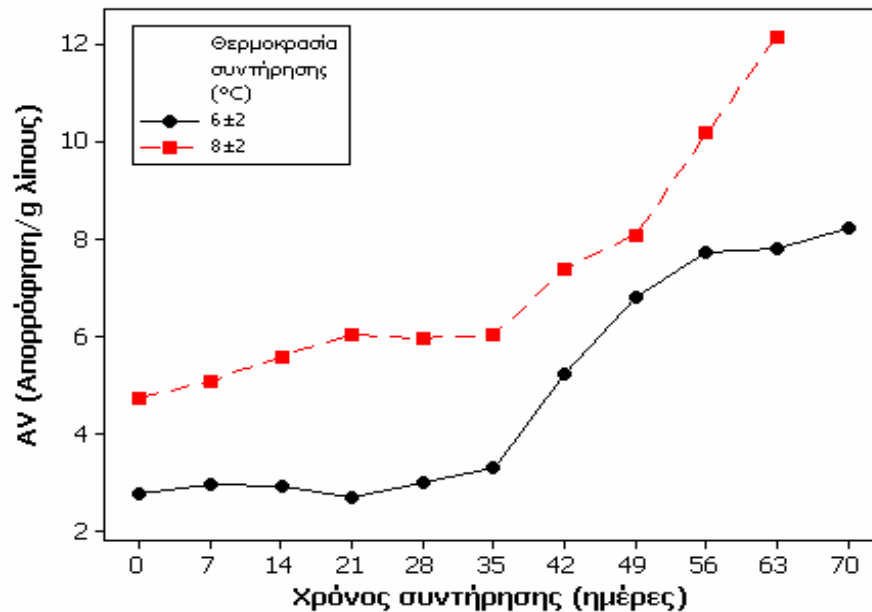
5.4.2. Τιμή ανισιδίνης (AV)

Η AV έδειξε ότι επηρεάστηκε από το χρόνο συντήρησης. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το σχήμα 24 υπάρχει μια αύξηση στην AV και στα δυο δείγματα που είχαν συντηρηθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Μέχρι την 35^η ημέρα η AV ήταν σχεδόν σταθερή, με τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές. Ακολουθώντας αυξητική τάση, στην ημερομηνία της απόρριψης η AV ήταν 8,2 Abs/g για τα δείγματα που ήταν

αποθηκευμένα στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $12,2 \text{ Abs/g}$ για αυτά που ήταν αποθηκευμένα στους $8\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Αύξηση στην AV παρατηρήθηκε επίσης από τους Guillen & Cabo (2002) οι οποίοι υπέβαλαν βρώσιμα λίπη (καρδαμέλαιο, ηλιέλαιο, πυρηνέλαιο και ελαιόλαδο) σε συνθήκες οξειδωσης, κάτω από σταθερή ροή αέρα, στο σκοτάδι και στους 70°C . Η αύξηση της AV ακολούθησε ένα γενικό πρότυπο σε όλα τα δείγματα. Όλα παρουσίασαν αρχικά ένα πρώτο στάδιο στο οποίο η AV ήταν σταθερή (καρδαμέλαιο, ηλιέλαιο) ή παρουσίασαν μια μικρή αύξηση (ελαιόλαδο) ή η αύξηση ήταν σημαντική (πυρηνέλαιο). Στο δεύτερο μέρος η αύξηση ήταν σημαντική για όλα τα δείγματα.

Παρόλη την αύξηση, οι τελικές τιμές της AV παρέμειναν χαμηλές. Λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα της PV προκύπτει ότι η οξειδωση των συντηρημένων καπνιστών φιλέτων πέντροφας δεν ήταν εκτεταμένη.



Σχήμα 24: Μεταβολές στην τιμή ανισιδίνης (AV) των φιλέτων πέστροφας κατά την συντήρησή τους στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$

5.6.5.3 Εκτίμηση της οξειδωσης μέσω των μεταβολών του λόγου των λιπαρών οξέων C22:6ω-3 /C16:0

Προκειμένου να εκτιμηθεί η έκταση της οξειδωσης των ατμισμένων με υγρό καπνό φιλέτων πέστροφας χρησιμοποιήθηκε ο λόγος C22:6n-3/C16:0 ο οποίος σύμφωνα με τους Castrillon *et al.*, (1996) είναι πιο αξιόπιστος δείκτης από τις PV και TBA.

Η μείωση του λόγου (μείωση του C22:6n-3 και σταθερότητα του C16:0), καταδεικνύει την αύξηση της οξειδωσης. Η οξειδωση δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τον χρόνο συντήρησης ή από την θερμοκρασία συντήρησης (Πίνακας 40). Στο τέλος της περιόδου συντήρησης η μείωση του

λόγου ήταν 16,9% για τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$, ενώ για αυτά που συντηρήθηκαν στους $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ το ποσοστό της μείωσης έφτασε το 20,8%

Αυτή η μείωση δείχνει μια αυξημένη ταχύτητα στην οξείδωση του λίπους, η οποία ωστόσο, δεν είναι σημαντική συγκρινόμενη με τα αποτελέσματα των Siskos *et al.*, (2007) οι οποίοι βρήκαν μείωση 50% μετά από 70 ημέρες συντήρησης ατμισμένων φιλέτων πέστροφας.

Πίνακας 40: Μεταβολές του λόγου των λιπαρών οξέων C22:6ω-3 /C16:0 στα φιλέτα πέστροφας κατά την συντήρησή τους στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$

Ημέρες συντήρησης	C22:6ω-3 /C16:0	
	($6\pm 2^{\circ}\text{C}$)	($8\pm 2^{\circ}\text{C}$)
7	0,53	0,48
21	0,46	0,47
35	0,46	0,37
49	0,42	0,37
63	0,42	0,42
70	0,44	-

Συγκρίνοντας τις τιμές του λόγου C22:6ω-3 /C16:0 ανάμεσα στο νωπό (0,53) και τα ατμισμένα δείγματα, δεν παρατηρήθηκε καμία μείωση στα φιλέτα της πέστροφας που ήταν αποθηκευμένα στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ για 7 ημέρες γεγονός που δείχνει ότι η άτμιση δεν οδήγησε σε οξείδωση των λιπαρών υλών. Στην περίπτωση των φιλέτων που συντηρήθηκαν στους $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ υπήρξε μια μείωση της τάξεως του 5%.

5.6.6 Επίδραση της συντήρησης στις ολικές φαινόλες

Οι ολικές φαινόλες μετρήθηκαν στην παρούσα έρευνα κατά την διάρκεια της συντήρησης των ατμισμένων φιλέτων

πέστροφας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 41, οι φαινόλες στο νωπό δείγμα ήταν 4,88mg/100g. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινόλες (11,0mg/100g) παρατηρήθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, αμέσως μετά το κάπνισμα. Τις πρώτες 21 ημέρες συντήρησης οι φαινόλες μειώθηκαν και στη συνέχεια παρέμειναν σταθερές μέχρι την 63^η για τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους 6±2°C και την 49^η για αυτά που ήταν αποθηκευμένα στους 8±2°C. Την ημέρα της απόρριψης τα δείγματα είχαν τις πιο χαμηλές τιμές τους.

Πίνακας 41: Μεταβολές στη συγκέντρωση των φαινολών των καπνιστών φιλέτων πέστροφας κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 6±2°C και 8±2°C

Ημέρες συντήρησης	Ολικές φαινόλες (mg/100g σάρκας)	
	(6±2°C)	(8±2°C)
0	11,0 (0,2)	11,0 (0,2)
7	9,9 (0,2)	10,6 (0,6)
21	8,2 (0,4)	8,7 (0,9)
35	8,2 (0,2)	8,8 (0,1)
49	8,3 (0,5)	8,7 (0,1)
63	8,2 (0,1)	7,8 (0,1)
70	7,9 (0,0)	-

Οι τιμές του πίνακα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Οι τυπικές αποκλίσεις δείχνονται εντός των παρενθέσεων.

Δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου πληροφορίες που να αφορούν τις φαινόλες στα καπνιστά υγρά καπνισμένα αλιεύματα. Πρόσφατα οι Cardinal *et al.*, (2004) προσδιόρισαν φασματοφωτομετρικά τις ολικές φαινόλες σε μεγάλο αριθμό κρύα καπνισμένων σολομών και ανέφεραν τιμές από 0,04 mg/100g μέχρι το μέγιστο 2,0 mg/100g. Αυτή η μεγάλη διαφορά στις τιμές μπορεί να εξηγηθεί από τον

τρόπο παραγωγής του καπνού, τον τύπο του καπνιστηρίου και τον χρόνο καπνίσματος.

Οι Cardinal *et al.*, (2001) βρήκαν ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας καπνίσματος, αυξάνεται και η συγκέντρωση των φαιολών (20°C: από 0,75 σε 1.2 mg/100g, 30°C: πάνω από 3 mg/100g). Η θερμοκρασία των 30°C που χρησιμοποιείται στο παραδοσιακό κάπνισμα επιτρέπει ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος, όπως οι φαινόλες, να παραμένουν στην αέρια φάση, αυτή δηλαδή που σχετίζεται περισσότερο με τα αποτελέσματα του καπνίσματος. Με αυτόν τον τρόπο τα δείγματα μπορεί να έχουν υψηλές συγκεντρώσεις φαιολών.

Σύμφωνα με τους Birkeland *et al.*, (2004) όχι μόνο η διάρκεια αλλά και η θερμοκρασία του καπνίσματος φαίνεται να επηρεάζει την εναπόθεση φαιολών στα καπνιστά φιλέτα περισσότερο από την μέθοδο αλατίσματος και την περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε λίπος.

Χαμηλή συγκέντρωση λίπους, υψηλή συγκέντρωση φαιολών στα καπνιστά δείγματα (Clifford *et al.*, 1980).

Η συγκέντρωση φαιολικών ουσιών στους μύς του αλιεύματος αυξάνει μέχρι τους 75°C και στη συνέχεια μειώνεται. Μέγιστη εναπόθεση καπνού επιτυγχάνεται με σχετική υγρασία 60%.

6 Συμπεράσματα

- Η εφαρμογή της τεχνικής της άτμισης χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στην παραγωγή καπνιστών προϊόντων υψηλής ποιότητας
- Ως καταλληλότερος χρόνος αλατίσματος επιλέχθηκε η 1 ώρα σε διάλυμα 20% NaCl και ξήρανσης 0 & 4ώρες. Με τις συνθήκες αυτές έγιναν οι περαιτέρω επεξεργασίες
- Μεγαλύτερη αποδοχή από την ομάδα των δοκιμαστών είχαν τα φιλέτα πέστροφας που α) δεν ξηράθηκαν πριν την επεξεργασία καπνίσματος β) ξηράθηκαν για 4h (43°C) πριν το κάπνισμα και επεξεργάστηκαν για 5 min σε πίεση 2 bar
- Οι απώλειες βάρους ήταν χαμηλότερες συγκρινόμενες με αυτές που παρατηρούνται στο παραδοσιακό κάπνισμα. Η ξήρανση και η αύξηση της πίεσης προκάλεσαν μεγαλύτερες απώλειες
- Η μείωση της διαθέσιμης λυσίνης δεν ήταν σημαντική και δεν επηρεάστηκε από την ξήρανση πριν την επεξεργασία, την πίεση και το χρόνο άτμισης
- Δεν ανιχνεύθηκαν ποσότητες βενζο(a)πυρενίου, σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους καπνίσματος
- Οι διαφορετικές πίεσης που εφαρμόστηκαν επηρέασαν το χρώμα των προϊόντων. Ο δείκτης λαμπρότητας L^* μειώθηκε ενώ οι δείκτες a^* και b^* αυξήθηκαν. Ωστόσο, καμιά στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο χρώμα των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με πίεση 1,5 και 2bar
- Η εφαρμοζόμενη πίεση ήταν ο μόνος παράγοντας που επηρέασε όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
- Η ξήρανση πριν την επεξεργασία επηρέασε αρνητικά την ποιότητα και το χρόνο συντήρησης στους $4\pm 1^\circ\text{C}$, ενώ δεν βελτίωσε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
- Ο χρόνος συντήρησης στους $4\pm 1^\circ\text{C}$ ήταν >98 ημέρες, στους $6\pm 2^\circ\text{C}$ 70 και στους $8\pm 2^\circ\text{C}$ 63 ημέρες.
- Ο λόγος C22:6ω-3/C16:0, που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της οξειδωσης, μειώθηκε κατά την διάρκεια της συντήρησης. Αυτή η μείωση δεν ήταν σημαντική που έμμεσα δείχνει μη σημαντική

οξειδωση. Οι τιμές υπεροξειδίων και ανισιδίνης δεν αυξήθηκαν σημαντικά κατά την διάρκεια της συντήρησης στους $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ και επιβεβαιώνουν την προηγούμενη διαπίστωση.

- Η τεχνική της άτμισης προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στα προϊόντα αποικοδόμησης ATP. Κατά την διάρκεια όμως της συντήρησης των φιλέτων της πέστροφας οι μεταβολές αυτές δεν ήταν σημαντικές. Η τιμή *K* μπορεί πιθανά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ποιότητας ατμισμένων με υγρό καπνό φιλέτων πέστροφας.
- Οι ολικές φαινόλες μειώθηκαν κατά τη συντήρηση των φιλέτων πέστροφας, ανάλογα με την εξασθένιση του αρώματος.
- Η τεχνική που εφαρμόστηκε πλεονεκτεί σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους καπνίσματος αλιευμάτων
 - Απλούστερη
 - Συνομότερη
 - Εφαρμόσιμη σε οικιακό επίπεδο
 - Παράγει υψηλής ποιότητας καπνιστά προϊόντα
 - Φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος επεξεργασίας

7 Βιβλιογραφία

- Aitken A. and Conell J.J. (1979). Fish In: Effects on Heating on Foodstuffs. (ed. R.J. Pristley), pp. 219-54, Applied Science Publishers. London.
- Alasalvar C., Taylor K.D.A., Oksuz A., Shahidi F. and Alexis M. (2002). Comparoson of freshness quality of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Food Science*, 67(9), 3220-3226.
- AOAC, (1995). Salt (Chlorine as Sodium Chlorine). Seafood. Volumetric Method. In: *AOAC Official Method* 937.09. 35. pp 7.
- Basti A.A., Taghi A.M., Salehi Z. and Kamkar A. (2006). Bacterial pathogens in fresh smoked and salted Iranian fish. *Food Control*, 17, 183–188
- Belinsky D.L., Kuhlein H.V., Yeboah F., Penn A.F. and Chan H. M. (1996). Composition of fish consumed by the James Bay Cree. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9, 148-154
- Bhuiyan A.A.K.M., Ackman R.G. and Lall S.P. (1986a). Effects of smoking on protein quality of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Journal Food Process Preservation*, 10, 115-126.
- Bhuiyan A.A.K.M, Ratnayake W.M.N. and Ackman R.G. (1986b). Stability of lipids polyunsaturated fatty acids during smoking of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus L.*). *Journal of American Oil Chemist Society*, 63, 324-328.
- Birkeland S., Rora A.M.B., Skara T. and Bjerkeng B. (2004). Effects of cold smoking procedures and raw material characteristics on product yield and quality parameters of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) filets. *Food Research International*, 37, 273-286.
- Blight E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian. Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

- Bugueno G., Escriche I., Martinez-Navarrete N., Del Mar Camacho M. And Chiralt A. (2003). Influence of storage conditions on some physical and chemical properties of smoked salmon (*Salmo salar*) processed by vacuum impregnation techniques. *Food Chemistry*, 81, 85-90.
- Busta F.F., Peterson E.H., Adams D.M. and Jonson M.G., (1984). Colony count methods. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods, pp 62-63, APHA.
- Carabasa-Giribet M. and Ibarz-Ribas A. (2000). Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *Journal of Food Engineering*, 44, 181-189.
- Cardinal M., Gunnlaugsdottir H., Bjoernevik M., Ouisse A., Vallet J.L. and Leroi, F. (2004). Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International*, 37, 181–193.
- Cardinal M., Knoakaert C., Torrissen O., Sigurgisladottir S., Morkore T., Thomassen M. and Vallet J.L. (2001). Relation of smoking parameters to the yield, colour and sensory of smoked Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Food Research International*, 34, 537-550.
- Castrillon A.M., Navaro M.P. and Garcia-Arias, M.T. (1996). Tuna protein quality changes after canning. *Journal of Food Science*, 61, 1250-1253.
- Catte M., Gancel F., Dzierzinski F. and Tailliez R. (1999). Effects of water activity, NaCl and smoke concentrations on the growth of *Lactobacillus plantarum* ATCC 12315. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 105-108.
- Chen B.H. and Lin Y.S. (1997). Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during processing of duck meat. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, 1394-1403.
- Chevallier D., Le Bail A. and Choul M. (2006). Effects of high pressure treatment (100-200MPa) at low temperature on turbot

(*Scophthalmus maximus*) muscles. *Food Research International*, 34, 425-429

- Choubert G., Dentella E., Atgie C. and Baccaunaud M. (2005). Effect of light on colour stability of sliced smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed astaxanthin. *Food Research International*, 38, 949-952.
- Clifford M.N., Tang S.L. and Eyo A.A. (1980). Smoking of foods. *Process Biochemistry*, 15(5), 8-26.
- Cochran W.G. and Cox G.M. (1957). *Experimental Designs*. John Wiley & Sons. Chichester.
- Cortes-Ruiz J.A., Pacheco-Aguilar R., Garcia-Sanchez G. and Lugo-Sanchez M.E. (2001). Functional characterization of a protein concentrates from bristly sardine made under acidic conditions. *Journal of Aquatic Food Production Technology*, 10, 5-23.
- Cowie W.P. and Mackie I.M. (1968). Examination of the protein extractability method for determining cold storage protein denaturation in cod. *Journal of Food Science and Agriculture*, 19, 696 – 700.
- Daun H. (1979). Interaction of wood smoke components and foods. *Journal of Food Technology*, 33, 65-71.
- Dillon R., Pattel T. and Ratman S. (1992). Prevalance of *Listeria* in smoked fish. *Journal of Food Protection*, 55(11), 866-870.
- Deng J., Toledo R.T. and Lillard D.A., (1974). Effect of smoking temperatures on acceptability and storage stability of smoked Spanish mackerel. *Journal of Food Science*, 39, 596-601.
- Doe P.E., Sikorski Z., Haard N., Olley J. and Sun Pan B. (1998). Smoking, (Salting). In: *Fish drying and smoking production and quality* (ed. P.E. Doe), pp 37-45. Technomic publishing CO, INC. Lancaster, Basel.
- Dondero M., Cisternas F., Carvajal L. and Simpson R. (2004). Changes in quality of vacuum-packed cold-smoked salmon

(*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chemistry*, 87, 543–550

- EEC. (1979). Commission of European communities. Method - ISQ 1442-1973.
- Egan H., Kirk R.S. and Sawyer R. (1981). Pearson's chemical analysis of foods, 8th edition, London. Churchill-Livingstone.
- El S.N. and Kavas A. (1996). Determination of protein quality of rainbow trout (*Salmo iriedus*) by in vitro protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS). *Food Chemistry*, 5, 221-223.
- Espe M., Kiessling A., Lunestad B.T., Torrissen O.L. and Rora A.M.B. (2004). Quality of cold smoked salmon collected in one French hypermarket during a period of 1 year. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 37, 627-638.
- Espe M., Nortvedt R., Lie O., and Hafsteinsson H. (2002). Atlantic salmon (*salmo salar*) as raw material for the smoking industry. II: Effect of different smoking methods on losses of nutrients and on the oxidation of lipids. *Food Chemistry*, 77, 41 - 47.
- Fogliamo V., Monti M.M., Musella T., Randazzo G. and Ritieni A. (1999). Formation of coloured Maillard reaction products in a gluten-glucose model system. *Food Chemistry*, 66, 293-299.
- Garcia-Arias M.T., Sanchez-Muniz J.F., Castrillon A.M. and Navaro M.P. (1994). White tuna canning, total fat, and fatty acid changes during processing and storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 7, 119-130.
- Goulas E.A. and Kontominas G.K. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of club mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93, 511-520.
- Gram L. and Huss H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.

- Guillen M.D. and Cabo N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, 77, 503-510.
- Guillen M.D., Errecalde M.C., Salmeron J. and Casas C. (2006). Headspace volatile components of smoked swordfish (*Xiphias gladius*) and cod (*Gadus morhua*) detected by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 94, 151-156.
- Guillen M.D., Manzaros M.J. and Zabal L. (1995). Study of a commercial liquid smoke flavouring by means of gas chromatography/mass spectrometry and fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 463-468.
- Hamm R. (1977). Analysis of smoke and smoked foods. *Pure and Applied Chemistry*, 49, 1653 - 1660.
- Hansen L.T., Gill T. and Huss H.H. (1995). Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International*, 28(2), 123-130.
- Hansen T.L., Gill T., Rontved S.D. and Huss H.H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International*, 29, 181-188
- Hanson S.W.F. and Olley J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101-108.
- Hattula T., Elfving K., Mroueh U.M. and Luoma T. (2001). Use of liquid smoke flavouring as an alternative to traditional flue gas smoking of rainbow trout fillets. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, 34, 521-525.
- Hattula T. and Kiesvaara M. (1996). Breakdown products of adenosine triphosphate in heated fishery products as an indicator of raw material freshness and storage quality. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 29, 135-139.

- Hidalgo J.F., Alaiz M. and Zamora R. (1999). Effect of pH and temperature on comparative nonenzymatic browning of proteins produced by oxidized lipids and carbohydrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 742-747.
- Horner W.F.A. (1997). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In: *Fish Processing Technology* (ed G.M. Hall), pp 31-71, Blackie Academic and Professional, London.
- Hyytia E., Eerola S., Hielm S. and Korkeala H. (1997). Sodium nitrite and potassium nitrate in control of nonproteolytic *Clostridium botulinum* outgrowth and toxigenesis in vacuum-packed cold-smoked rainbow trout. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 63-72.
- Iliadis N.K. (2004). Effect of the different treatment and smoking process (cold and hot) on chemical, microbiological and sensory quality of mackerel (*Scomber scombrus*). M. Phill. Thesis, University of Lincoln.
- Jemmi T. and Keusch A. (1992). Behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 339-346.
- Johansson T., Rantala L., Palmu L. and Honkanen-Buzalski T. (1999). Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed products and in a production plant. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 111-119.
- Johnston A., Alderson R., Sandham C., Dingwall A., Mitchell D., Selkirk C., Nickell D., Baker R., Robertson B., Whyte D. and Springate J. (2000). Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic (*Salmo salar L*). *Aquaculture*, 189, 335-349.
- Kinsella J.E. (1987). Seafoods and fish oils in human health and disease, pp 312-330, Marcel Dekker Inc., New York.
- Kolodziejska I., Niecikowska C., Januszewska E. and Sikorski Z.E., (2002). The microbial and sensory quality of mackerel hot

smoked in mild conditions. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, 35, 87-92.

- Larsson B.K. (1982). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Fish. *Lebensmittel Unters Forschung*, 174, 101-107.
- Lea, C.H., (1952). Methods for determining peroxide in lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3, 586-594.
- Ledward D.A. (1979). Proteins. In: Effects on Heating on Foodstuffs (ed. R.J. Priestley), pp 1-34, Applied Science Publishers, London.
- Lee M.C., Sherr B., and Koh Y.N. (1984). Evaluation of kinetic parameters for a glucose–lysine Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 379-382.
- Leroi F., Joffraud J.J., Chevalier F. and Cardinal M. (1998). Study on the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 11-121.
- Lingert H. (1990). 'Studies in model systems' Development of the Maillard reaction during food processing. In: The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology (ed. P.A. Finot, H.U. Aeschbacher, R.F. Hurrell, and R. Liardon) pp 177-200, Birkhauser Verlag Basel, Boston, Berlin.
- Liston J. and Matches J.R. (1976). Fish, crustaceans and precooked seafoods. In: Compendium of methods for the microbial examination of foods. (ed. M.L. Speck) pp. 507-521, American Public Health Association, Washington, DC.
- Love M.R. (1997). Summary of considerations of biological condition and quality, Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. In: Fish processing technology, (ed. M.G. Hall), pp 24-26, Blackie Academic and professional, London.
- Lyhs U., Bjorkroth J. and Korkeala H. (1999). Characterization of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 77-84.

- Lyhs U., Lahtinen J., Fredriksson-Ahomaa M., Hyytia-Trees E., Elfing K. and Korkeala H., (2001). Microbiological quality and self life of vacuum-packaged 'gravard' rainbow trout stored at 3 and 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 221-230.
- Maga J.A. (1988). Smoke in Food Processing, pp 39-46, 89-91, 93-96, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Malec S.L., Pereyra S.A., Naranjo B.G. and Vigo S.M. (2002). Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system. *Food Research International*, 35, 849-853.
- Martin A.M. (1994). Microbiological control for fish smoking operations. In: Fisheries Processing, pp 51-75, Chapman and Hall, London.
- Martinez O., Salmeron J., Guillen M.D. and Cass C. (2004). Texture profile analysis of meat products treated with commercial liquid smoke flavorings. *Food Control*, 15, 457-461.
- Meinke W.W., Mattil K.F. and Rahman M.A. (1972). Some factors influencing production of protein isolates from whole fish. *Journal of Food Science*, 37, 195-198.
- Muenker W. and Meyer C. (1994). Use of liquid smoke: a new technology. II. Studies on use of liquid smoke for manufacture of smoked fish products. *Informationen fuer die Fleischwirtschaft*, 40(4) 169-180
- Naranjo B.G., Malec S.L. and Vigo S.M. (1998). Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chemistry*, 62, 309-313.
- Opstvedt J., Miller R., Hardy R.W. and Spinelli J. (1984). Heat-induced changes in sulfhydryl groups and disulfide bonds in fish protein and their effect on protein and amino acid digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 32, 929-935.

- Peterson W.R. and Warthesen J.J. (1979). Total available lysine determinations using High-Pressure liquid Chromatography. *Journal of Food Science*, 44, 994-997.
- Pigott G.M. and Tucker B.W. (1990a). Controlling water activity, In: *Seafood effects of technology on nutrition*, pp 137, 169. Marcel Dekker, INC, New York.
- Puwastien P., Judprasong K., Kettwan E., Vasanachitt K., Nakngamanong Y. and Bhattacharjee L. (1999). Proximate composition of raw and cooked Thai fresh water and marine fish. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 9-16.
- Raghunath R.M., Thazhakote V.S., Kunhihtyil A. and Devadasan K. (1995) Biochemical and Nutritional Changes in fish proteins during drying. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 67, 197-203.
- Randhir R., Lin Y.T. and Shetty K. (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39, 637–646.
- Rasmussen R.S. and Ostenfeld T.H. (2000). Effect of growth rate on quality traits and feed utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184, 32-38.
- Regenstein J.M. and Regenstein C.E. (1991). Introduction to fish technology, pp 1 – 269, Can Nostrant Reinhold, New York.
- Regost C., Arzel J., Cardinal M., Laroche M. and Kaushik S.L. (2001). Fat deposition and flesh quality in seawater reared, triploid brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary fat levels and starvation. *Aquaculture*, 193, 325-330.
- Rora A.M.B., Kvale A., Morkore T., Rorvik K., Steien S.H. and Thommassen M.S. (1998). Process yield color and sensory quality of smoked Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) in relation to raw material characteristics. *Food Research International*, 31, 601-609.

- Rorvik L.M., Caugant D.A., Yndestad M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. In a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 19-27.
- Seeling H.P.R. and Jones D. (1986). Genus *Listeria* Perie 1940, 383AL, in Bergeys' Manual Systematic Bacteriology, (ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair M.E. Sharpe and J.G. Holt), pp.1235-1245, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Sequeira-Munoz A., Chevalier D., LeBail A., Ramaswamy S.H. and Benjamin K.S. (2006). Physicochemical changes induced in carp (*Cyprinus carpio*) fillets by high pressure processing at low temperature. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 13–18
- Sigurgisladdottir S., Sigurdardottir M., Tirrisen O., Vallet J. and Hafsteisson H. (2000). Effects of different salting and smoking processes on the microstructure, the texture and the yield of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Food Research International*, 33, 847-855.
- Sikorski Z., Haard N., Motohiro T. and Bonnie S.P. (1998). Quality. In: Fish Drying and smoking, production and quality (ed P.E. Doe), pp 89-115, Technomic publishing CO, INC. Lancaster, Basel.
- Sikorski Z.E., Kolakowska A. and Burt J.R. (1990a). Post-harvest biochemical and microbial changes. In: Seafood: Resources, nutritional composition and preservation (ed Z.E. Sikorski), pp 55-76, CRC Press, Boca Raton.
- Sikorski Z.E., Kolakowska A. and Sun P.B. (1990b). The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In: Seafood: Resources, nutritional composition and preservation (ed Z.E. Sikorski), pp 29-54, CRC Press, Boca Raton.
- Siskos I. (2004). Production and quality assessment of a new smoked fish product. M. Phill. Thesis, University of Lincoln.

- Siskos I., Zotos A. and Taylor K.D.A. (2005). The effect of drying pressure and processing on the quality of liquid-smoked trout (*Salmo-gairdnerii*) fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2054-2060.
- Siskos I., Zotos A., Melidou St. and Tsikritzi R. (2007). The effect of liquid smoking of fillets of trout (*Salmo gairdnerii*) on sensory, microbiological and chemical changes during chilled storage. *Food Chemistry*, 101, 458-464.
- Stolyhwo A., Sikorski Z.E. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish- a critical review. *Food Chemistry*, 91, 303-311.
- Tamakawa K., Kato T. and Oda M. (1996). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: Handbook of Food Analysis, (ed. L.M.L. Nollet), pp 1641-1661, Dekker Inc., New York and London
- Tome E., Teixeira P. and Gibbs P. (2005) Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold-smoked salmon. *Food Microbiology*, in press.
- Toth L. and Potthast K. (1984). Chemical aspects of the smoking of meat and meat products. *Advances in Food Research*, 29, 87-92.
- Truelstrup L., Gill T., Drewes S. and Huss H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International*, 29(2), 181–188.
- Vaz-Velho M., Todorov S., Ribeiro J. and Gibbs P. (2005). Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium Divergens* V41 culture and supernatant. *Food Control*, 16, 541-549.
- Veciana-Nogues M.T., Marine-Font A. and Vidal-Carou M.C. (1997). Biogenic Amines in Fresh and Canned Tuna. Effects of Canning on Biogenic Amine Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4324-4328.

- Waterman J.J. (1976). The production of dried fish. FAO Fish Technology Paper, 160, 28
- Whittle J.K. and Howgate P. (2002). Glossary of Fish Technology Terms, Prepared under contract to the Fisheries Industries Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Yaylayan A.V. (1997). Classification of the Maillard reaction: A conceptual approach. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 15-21.
- Yurchenco S. and Molder U. (2005). The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 857-869.
- Zotos A. (1991). Investigation into the effect of prior frozen storage (20°C) on the quality of hot-smoked cod (*Gadus morhua*) and mackerel (*Scomber scombrus*). M. Phill. Thesis, Loughborough University of Technology
- Zotos A., Hole M. and Smith G. (1995). The effect of frozen storage of Mackerel (*Scomber scombrus*) on its quality when hot-smoked. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 43-48.
- Zotos A., Petridis D., Siskos I. and Gougoulis C. (2001). Production and quality assessment of a smoked tuna (*Euthynnus affinis*) product. *Journal of Food Science*, 66(8), 1184-1190.
- Παπαγρηγορίου Ν. (2001). Μη δημοσιευμένη εργασία. Εφαρμογή της Στατιστικής Ανάλυσης των Κυρίων Συνιστωσών (Principal Components Analysis), Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ-Θεσσαλονίκης.
- Παπαναστασίου Δ.Π. (1990). Διατήρηση των αλιευμάτων με κάπνισμα.: Τεχνολογία και ποιοτικός έλεγχος αλιευμάτων, Τόμος Β', pp 243-277, Εκδόσεις Ίων, Αθήνα.

- Ζώτος Α. (2003). Τεχνολογία και ποιοτικός έλεγχος αλευμάτων. pp 92-121 Σημειώσεις για το τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙΘ.

8 Appendix



Available online at www.sciencedirect.com

Food Chemistry 101 (2007) 458–464

www.elsevier.com/locate/foodchem

The effect of liquid smoking of fillets of trout (*Salmo gairdnerii*) on sensory, microbiological and chemical changes during chilled storage

Ilias Siskos, Anastasios Zotos*, Styliani Melidou, Roussa Tsikritzi

Technological Educational Institution of Thessaloniki, School of Food Technology and Nutrition, Department of food Technology, 57400 Thessaloniki, P.O. Box 141, Greece

Received 10 October 2005; received in revised form 15 November 2005; accepted 1 February 2006

Abstract

The storage time at 4 ± 1 °C of liquid smoked fillets of trout (*Salmo gairdnerii*) produced with a new smoking technique, using a combination of liquid smoke and steaming at 2 bar pressure for 30, 45 and 60 min, was studied. Maximum total viable counts (TVC) were reached after 25 days in the samples processed for 30 min and after 48 days in those processed for 45 and 60 min. However, panellists rejected the samples long after maximum TVC was observed. The increase of TVC was also confirmed using a particle size analyser, indicating a possible direct detection of microbial growth. A reduction of about 50% in the C22:6w – 3C:16:0 ratio was found across the whole period of storage, indicating lipid oxidation. The hypoxanthine/inosine (Hx/Ino) ratio showed a good relationship with both TVC and sensory results. Thus, when the Hx/Ino ratio was higher than 1.3, the products had reached their maximum acceptable TVC and were approaching their rejection time by the panellists, indicating that the Hx/Ino ratio is a good indicator of the shelf-life of smoked products of trout (*S. gairdnerii*).

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Liquid smoked; Hx/Ino ratio; Pressure; TVC; Trout fillets; Particle size analyser

1. Introduction

The shelf-life of smoked fish products depends largely on the initial bacterial contamination of the raw material; on the decrease of a_w in the tissues due to brining and pre-drying, on the inactivation of putrefactive microflora due to the heat treatment, on the amount of smoke components that penetrate the product, and on the temperature, air humidity, and oxygen levels during storage (Sikorski, Haard, Motohiro, & Bonnie, 1998).

No relationship between the shelf life of smoked salmon and total numbers of bacteria has been found (Gibson & Ogden, 1986; Hansen, Gill, & Huss, 1995), which makes the use of any criteria based on total viable counts irrelevant as a quality parameter. It was found that immediately after cold-smoking of salmon fillets the aerobic plate count

was 3×10^7 cfu/g. The maximum acceptable microbial count has been reported 6 days after smoking but spoilage of the product was only detected by panellists after 2–3 weeks (Leroi, Joffraud, Chevalier, & Cardinal, 1998). The authors also reported that although the aerobic plate count reached maximum acceptable levels after 6 days, the product was not completely spoiled until after 2–3 weeks of storage, despite the fact that spoilage signs were observed at 13 days. It was also reported that fish smoked for 3 days at 50–65 °C to a moisture content of 14% and stored at 79–85% relative humidity, remained at an acceptable quality for 6 months.

Leroi, Joffraud, Chevalier, and Cardinal (2001) reported that the shelf-life of cold smoked salmon was very variable (1–6 weeks) and was related to the initial Enterobacteriaceae load, which was dependant on hygienic conditions in the smokehouse. High correlations existed between the remaining shelf-life and lactobacilli count, yeast count and total volatile base (TVBN) concentration.

* Corresponding author. Tel.: +30 2310 791333; fax: +30 2310 791360.
E-mail address: zotos@food.tetm.tg (A. Zotos).

Leroi and Joffraud (2000) also reported that the ability of the process to preserve fish and other products is due to the synergistic action of salting and smoking procedures. Researchers have noticed that salt concentration is the primary factor affecting the storage life of the fish product. Apart from brining time, smoking temperature and time play a key role in preservation.

Hot smoking at temperatures up to 120 °C or higher is much more effective than cold smoking, where the temperature should not rise above 30 °C. All gram-positive *coxi* predominant in smoked fish are very sensitive to heat (Pigott & Tucker, 1990).

Among potential chemical quality indicators, the development of total volatile bases (TVB-N) (Cann et al., 1984), the production of trimethylamine (TMA), the increase in volatile acids (Hansen et al., 1995), the degradation of nucleotides expressed as an increase in hypoxanthine (Cann et al., 1984; Hansen et al., 1995; Martin, Gray, & Pierson, 1978) and the oxidation of lipids (Zotos, Petridis, Siskos, & Gougoulas, 2001) have been considered. However, the origins of these chemical changes and their relationship to product quality are not well established, making their use uncertain as objective quality indicators.

Accurate shelf life information reassures consumers and enhances the quality of the specific product (Sikorski et al., 1998). Thus, the aim of this work was to assess the storage time at 4 ± 1 °C of liquid smoked trout filets processed for 30, 45 and 60 min at 2 bar pressure through total viable count (TVC), microbial changes (using a particle size analyser), lipid oxidation, changes in adenosine triphosphate (ATP) degradation products and sensory analysis.

2. Materials and methods

2.1. Analytical reagents

Inosine (Ino), hypoxanthine (Hx) and fatty acid methyl esters (FAME) standards were purchased from Sigma Chemical Co. Ltd. (Poole, UK). All reagents used were analytical grade.

2.2. Smoking process

Farmed trout (*Salmo gairdneri*) (24) samples was purchased from Ioannina, Greece. Immediately after arrival, fish samples were stored in ice at 0–1 °C. The average weight of the samples was 900 g to 1 kg. About 20 h after harvesting the fish were eviscerated, their heads were removed and the bodies brined in 20% sodium chloride solution for 2 h. The brine temperature was kept low (5 °C) in order to minimize microbiological contamination. Consequently, all samples were filleted and placed in drying racks for 16 h. The smoking process was conducted using a 10 L electrical commercial steamer, electronically modified in the workshop to improve its precision. Liquid smoke condensate 40 ml; (Nefeloudis SA) was added to the steamer and diluted in 2 l of tap water (2%) with a final temper-

ature of 20 ± 2 °C. Thereafter, the smoking process continued, due to the smoky steam produced from the liquid smoke solution. Samples were placed on one level with the flesh facing the smoke liquid and processed at three different processing times: 30, 45 and 60 min. Processing time was measured from the moment the required pressure in the steamer was achieved (approximately 10–12 min). The applied steam pressure was 2 bar and the resulting temperature 115 °C. The above conditions were chosen from previous work in which these processes were found to produce high quality smoked products (Siskos, Zotos, & Taylor, 2005). After each process the liquid smoke solution was discarded and a new solution was used. After cooling the samples to room temperature, under sanitary conditions, the skin was removed from the filets. The front part (6–8 cm) from each fillet was removed carefully, packed in polypropylene bags, stored at 4 ± 1 °C and used for sensory analysis. The remainder of the filets was homogenised at low temperature, in order to avoid possible oxidation, mixed thoroughly and stored in polyethylene bags at 4 ± 1 °C until further analysis (Siskos et al., 2005).

2.3. Sensory analysis

Five experienced panellists, who were members of the academic staff, were used to assess the quality of trout filets during storage. The panellists were asked to estimate firmness, smoked flavour and the presence of external moisture on the samples tested. The evaluation took place in separate booths under daylight illumination. A quality scale from 1 to 6 was used. A score of 6 was defined as extremely low firmness, intensely smoked flavoured and negligible presence of external moisture. Finally, according to their evaluation on the above variables, the panellists were asked to characterise the products as acceptable for consumption, border-line quality or unacceptable for consumption. When a sample was characterised as unacceptable by 3 out of the 5 panellists, this sample was excluded from further investigation. Sensory analysis was repeated 4 times.

2.4. ATP degradation compounds

The ATP-related compounds were determined by the method of Veciana-Norgues, Marine-Font, and Vidal-Carou (1997). The extraction procedure was performed at 4 °C. Homogenised sample (10 g) was accurately weighed into a 50 ml centrifuge tube. Perchloric acid (15 ml, 0.6 M) and a magnetic stirring bar were added. The mixture was thoroughly mixed for 10 min on a magnetic stirring plate, centrifuged for 10 min at 3000 rpm and left to separate into two phases. Perchloric acid (0.6 M, 10 ml) was added to the solid residue obtained, mixed thoroughly for 10 min and the centrifugation was repeated. After centrifugation the solid phase was discarded. The two perchloric extracts were combined in a 25 ml volumetric flask and made up to volume with 0.6 M HClO₄. An ali-

quot of 10 ml was adjusted to pH 6.5–6.8 with 0.1 N potassium hydroxide and left to stand for 30 min at 4 °C. Then, the aliquot was filtered to remove potassium perchlorate and made up to 25 ml with phosphate buffer (pH 7.0). The neutral extracts were finally filtered through a 0.45 µm filter before HPLC analysis using an HVLP 1300 membrane.

Mobile phase A was 0.04 M potassium dihydrogen orthophosphate and 0.06 M dipotassium hydrogen orthophosphates, adjusted to pH 7.0 with 0.1 M potassium hydroxide.

Mobile phase B was methanol.

The column used was an Ultrasphere C18, (5 µm, 250 × 4.6 mm).

The flow rate of mobile phase was 1 ml/min. The analysis was performed using a gradient program as follows:

Time (min)	0	8	9	13	0
Mobile phase A (%)	100	100	70	70	100
Mobile phase B (%)	0	0	30	30	0

2.5. Total lipid peroxide value (PV) and FAME profiles

Total lipid content was determined by the Bligh and Dyer (1959) method, as modified by Hanson and Oiley (1963). Fatty acids methyl esters (FAME) were made using the method of Zotos, Hole, and Smith (1995). The method used for peroxide value was adapted from that of Lea (1952).

2.6. Total stable counts

Ten gram of each sample homogenate was diluted to 100 ml with peptone (1% in water) buffered at pH 7.5. Serial dilutions were made until 10^{-7} g/ml samples were obtained. A 1 ml aliquot of each dilution was placed in a petri dish and approximately 15 ml plate agar count was added. Each petri dish was carefully shaken, in order to achieve a homogeneous distribution of the sample. After several minutes all petri dishes were inverted and placed in an oven at 37 °C for 48 h. After 48 h of incubation, all colonies were counted, following the rules reported by Gilliland, Busta, Brinda, and Campbell (1976).

2.7. Detection of microbial changes using the Mastersizer 2000 particle size analyser

The microbial contamination due to storage was also assessed with the measurement of the particles in the samples, using the Mastersizer 2000 particle size analyser equipment. The instrument's capability has a range from 20 µm to 2000 µm. A portion of each sample (10 g) with 100 ml of distilled water was placed in a stomacher bag and treated for 1 min. The treated sample was further diluted with 900 ml of distilled water. The solution was

filtered using a filter paper, in order to discard all large particles. A 600 ml portion of diluted sample was measured. Care was taken to avoid protein aggregation and thus the samples were agitated before their measurement. Each measurement was repeated six times, in order to confirm repeatability. This analysis was performed on the samples processed for 60 min and stored for 0, 25 and 62 days.

3. Results and discussion

The chemical composition of the samples was relatively stable: 68.5–69.8% moisture, 22.4–24.2% protein and 5.5–7.8% lipid, indicating that small changes should be probably expected from farmed fish.

3.1. Sensory changes due to storage

3.1.1. Firmness

The firmness of all samples was assessed as being quite low [values above the average (3) of the structured scale used] at 14 days of storage (Fig. 1). However, as the storage time increased, the products became more firm, according to the panelists. The highest increasing rate of firmness (decreasing rate of values) was observed in the samples processed for 60 min at 2 bar pressure. The trout fillets processed for 30 and 45 min at 2 bar pressure showed almost the same rate of increase of firmness during the 50 days of storage. At the same storage period, samples processed for 60 min reached the highest values in firmness (Fig. 1). At the rejection time (62 days of storage) of the samples processed for 30 and 45 min, a slight decrease in firmness was observed. A similar decrease in firmness was also observed in the samples processed for 60 min, but their firmness remained higher than the other products. However, the trout fillets processed for 60 min lost their firm-

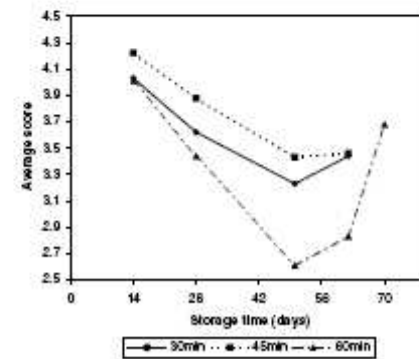


Fig. 1. Average score of firmness during storage of the trout fillets at 4 ± 1 °C. (Data are means of triplicate determinations.)

ness after 70 days storage (Fig. 1). These results indicate that protein changes occurred during storage and this was more obvious in the trout filets processed for 60 min. They also indicate possible enzymatic protein decomposition at the end of the storage time of the products. Changes in firmness due to storage were also reported by Leroi et al. (1998).

3.1.2. Smoked flavour

The smoked flavour intensity changed in two out of the three samples examined with storage time (Fig. 2). An increase in smoked flavour intensity in the samples processed for 45 and 60 min was observed between 14 and 28 days of storage. This strong smoked flavour remained nearly constant until 50 and 62 days of storage in the trout filets processed for 45 and 60 min respectively, thereafter a decline in smoked flavour was observed and off-flavours were detected by the panellists. It should also be noted that the smoked flavour intensity remained stable and at nearly average levels in the samples processed for 30 min throughout the entire storage period. This was probably due to the low smoked flavour intensity that these samples showed, even at the beginning of the storage time (Fig. 2).

Microbiological contamination is reported as the main factor producing off-flavours and off-odours. Development of off-flavours and odours during storage time was also reported by Lyhs et al. (2001). They reported that freshly produced "gravad" rainbow trout filets were judged by the panellists as firm with fresh odour, and fresh rich taste, but at the rejection time the samples were described as fruity, bitter, fishy or neutral off-taste and ammonia off-odour.

3.1.3. Presence of surface moisture

The presence of external surface moisture as assessed by the panellists was almost the same in the samples processed for 60 and 45 min in the first 14 days (Fig. 3). However, the

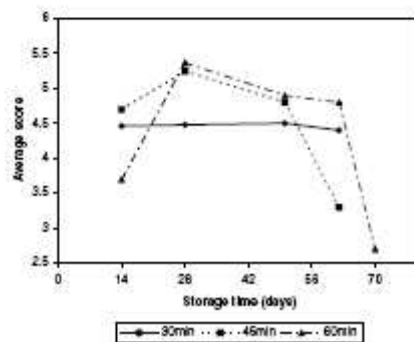


Fig. 2. Average score of smoked flavour intensity during storage of the trout filets at 4 ± 1 °C. (Data are means of triplicate determinations.)

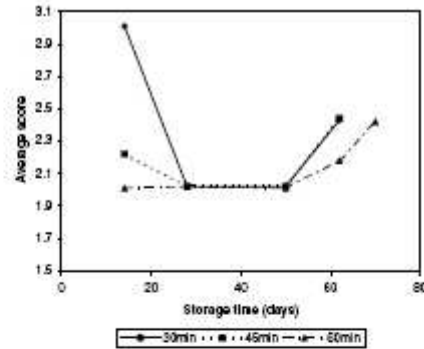


Fig. 3. Average score of external moisture presence during storage of the trout filets at 4 ± 1 °C. (Data are means of triplicate determinations.)

samples processed for 30 min showed significantly higher external surface moisture in the same storage period. After 28 days of storage, according to the panellists, all samples had the same external surface moisture. It remained at the same level on the samples processed for 45 and 60 min but dramatically decreased on the samples processed for 30 min.

The external moisture did not show any changes during the next 22 days (50 days total storage) on all samples assessed. At the rejection time of the first two samples (62 days of storage and processed for 30 and 45 min,) the presence of surface moisture increased. However, the samples processed for 60 min showed the lowest increase compared with the other two rejected samples (Fig. 3). Finally, after 70 days of storage, the filets processed for 60 min showed a further increase in external surface moisture, reaching the values of the other two already rejected samples. These results also indicate protein changes due to storage of the smoked trout filets.

3.1.4. Total viable counts (TVC)

After processing, the TVC in all samples were at low levels with an average of 5.3×10^3 cfu/g, regardless of the processing time. The microbiological flora remained stable in all samples for 14 days of storage. The same initial TVC were also observed by Lyhs et al. (2001).

After 25 days of storage at 4 ± 1 °C a striking increase in microbial count was detected in the samples processed for 30 min (Fig. 4). The TVC reached at a value of 1.8×10^6 cfu/g, indicating spoilage and possible rejection of the samples (Liston & Maches, 1976). However, these samples, which were simultaneously assessed by the panellists, were not organoleptically characterised as spoiled. After 48 days of storage at 4 ± 1 °C, the TVC of the samples processed at 30 min remained stable at high levels (7×10^6 cfu/g). Additionally, high levels of microbial contamination were also

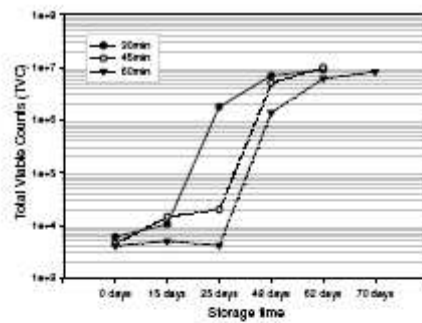


Fig. 4. Changes in TVC of the trout filets during storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. (Data are mean of triplicate determinations.)

observed in the samples processed either for 45 min (5.1×10^6 cfu/g) or for 60 min (1.4×10^6 cfu/g), indicating that the storage time had reached its maximum and that the trout filets should be rejected. However, the samples were also not rejected by the panellists. Rejection by the panellists of the samples processed at 30 and 45 min at 2 bar pressure occurred after 62 days of storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$, despite the fact that the maximum microbiological growth had already been reached 14 days earlier in the samples processed for 45 min and at 37 days in the samples processed for 30 min. These results indicate that spoilage sensory characteristics are generally microbiological products but their production reaches detectable levels long after maximum acceptable microbial growth. In the same period of time the microbial contamination of the samples processed for 60 min was 6.1×10^6 cfu/g and the samples were assessed as still acceptable products by the panellists. Similar results were also found by Gram and Huss (1996) investigating the maximum storage life of cold smoked salmon. Despite the fact that maximum aerobic plate count was reached after one week of storage, the product was characterised as spoiled after 2–3 weeks storage.

The trout filets processed for 60 min at 2 bar pressure were characterised as unacceptable for consumption by the panellists after 70 days of storage, 22 days after the maximum acceptable TVC was found. These maximum TVC levels were also observed by other authors (Dondoro, Cisernas, Carvajal, & Simpson, 2004; Gram & Huss, 1996; Lyhi et al., 2001).

3.1.5. Estimation of total microbial counts using the particle size analyser (MasterSizer 2000)

As can be seen from Fig. 5, the total amount of microorganisms detected increased as storage time increased. The most characteristic change occurred in the samples stored for 62 days whereas a higher microbial count was measured. These results confirm the accumulation of

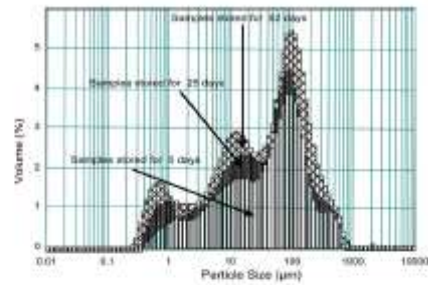


Fig. 5. Particle size differences between samples extracts stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ for 0, 25 and 62 days. (Data are mean of six fold determinations.)

microorganisms observed during storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ of the processed filets and possibly introduces a new technique to detect microbial changes very quickly. Cotte, Gancel, Dzierzinski, and Taillier (1999) measured optical density (OD) at 600 nm using a Uvikon 940 spectrophotometer and reported that OD was significantly affected by liquid smoke and salt concentration. OD increased while salt and liquid smoke concentrations decreased. These results also indicate that microbiological growth affects optical density and it could be used as an indicator for microbiological spoilage.

3.2. Peroxide value (PV)

The storage time had little effect on lipid oxidation, as monitored by peroxide value (PV). Particularly, the peroxide value ranged between 15.6 meq O_2/kg and 22.5 meq O_2/kg in all samples at the beginning and at the end of storage respectively. Additionally, PV had an almost constant, increasing trend during the entire storage period in all samples, regardless of the processing time. In contrast, Medina, Satue-Gracia, German, and Frankel (1999) reported that lipid oxidation of tuna samples, as measured by PV, had a higher rate during the first 24 h at 40°C while after this period, PV decreased significantly as a result of peroxide decomposition. Much higher levels of PV was reported by Zotos et al. (1995), indicating quite extensive lipid oxidation (PV 108 meq O_2/kg) in smoked mackerel that have been previously stored frozen.

3.3. Detection of lipid oxidation due to storage via changes in C22:6n-3/C16:0 ratio

The storage time significantly affected the C22:6n-3/C16:0 ratio, which showed a decreasing trend, due to storage time and ranged between 0.33 and 0.15 at the beginning and at the end of storage respectively (Fig. 6). This is in contrast with the results of Rora, Regost, and Lampe (2003), who failed to detect any significant changes in fatty

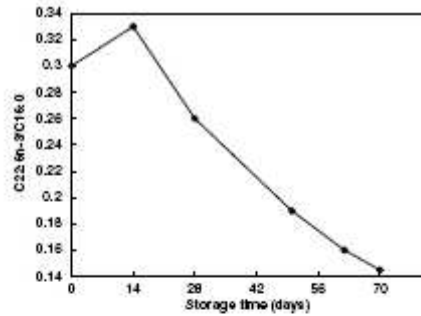


Fig. 6. Effect of storage time on C22:6n-3/C16:0 ratio in all samples regardless the processing conditions. (Data are means of triplicate determinations.)

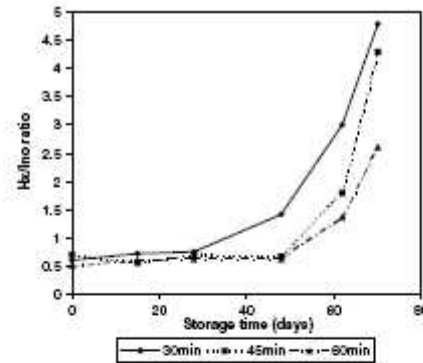


Fig. 7. Changes of hypoxanthine/inosine ratio in the trout filets during storage at 4 ± 1 °C. (Data are means of triplicate determinations.)

acid profiles due to storage or temperature in salted and smoked salmon filets. These results indicate an increasing rate of lipid oxidation, which was followed by the degradation of polyunsaturated fatty acids. The lipid oxidation rate as measured using the present index slightly increased (10%) in the first 14 days of storage. However, after 25 days of storage the decline of the index was 14.3% and reached 50% by the end of storage in all samples, regardless of the processing conditions (Fig. 6). It was accordingly reported that chicken frankfurters enriched with fish oil showed thiobarbituric acid (TBA) values higher than the control stored for 30 days. It was concluded that this was due to higher percentage of unsaturated fatty acids (Hong, Lebanc, Hawrysh, & Hardin, 1996).

3.4. Effect of storage on Hypoxanthine/Inosine (Hx/Ino) ratio

In this work the Hx/Ino ratio was investigated because a relationship in their changes was observed. Thus, it was found that the Hx/Ino ratio was affected by the storage period. In all samples tested, Hx production increased due to microbiological activity throughout the entire time of storage. The tested ratio of Hx/Ino remained practically stable for the first 48 days of storage for the samples processed for 60 and 45 min. This indicates low microbiological activity, which held back the degradation rate of inosine to hypoxanthine. Woyewoda, Shaw, Ke, and Burns (1986) also reported a relationship between microbiological spoilage and ATP degradation. However, in the samples processed for 30 min a small increase of hypoxanthine production was detected. At 48 days, the Hx/Ino ratio was 0.62, 0.67 and 1.42 for the samples processed for 60, 45 and 30 min respectively (Fig. 7). None of the samples tested was assessed as unacceptable for consumption during the first 48 days of storage. However, the samples pro-

cessed for 30 min should have been rejected on the 25th day of storage (23 days earlier) because of their TVC values, and their Hx/Ino ratio was 1.42, confirming the microbial spoilage.

During the next 14 days of storage (62 days) two of the three samples were assessed as unacceptable for consumption. Thus, the samples processed for 30 and 45 min were not assessed as acceptable by the panellists and at the same time the ratio of Hx/Ino reached values of 3.00 and 1.80, respectively (Fig. 7). However, the samples processed for 60 min extended their shelf-life (according to panellists) above 62 days of storage. However, their microbial growth reached its maximum on the 48th day of storage and Hx/Ino ratio on the 62nd day was 1.36, confirming the microbial growth. Considering the results it could possibly be concluded that when the hypoxanthine content becomes 1.3 times more than inosine content, (Hx/Ino \geq 1.3) the products become spoiled. At 62 days of storage the Hx/Ino ratio exceeded 1.3 for all samples. Similar relationships between microflora and hypoxanthine production have been already reported (Hansen et al., 1995; Veciana-Norques et al., 1997).

4. Conclusions

The liquid smoked trout filets processed for 30 min showed a storage time at 4 ± 1 °C of 25 days while those processed for 45 and 60 min up to 48 days, as assessed by the TVC values. However, the panellists rejected the samples long after maximum total viable counts were observed in all samples. The measurement of TVC via the particle size analyser (Mastersizer 2000) showed an increase of the particles throughout the storage of the trout filets, indicating that might be a direct measurement for TVC changes.

Hypoxanthine/Inosine ratio showed a good relationship with either TVC or sensory results. When the Hx/Ino ratio became more than 1.3, the products have already reached their maximum acceptable TVC values and they were rejected by the panellists.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Ministry of Education and Religious Affairs of Greece and the European Union (EU) which financed this work by 25% and 75% respectively.

References

- Bigh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid oxidation and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*, 91.
- Cann, D. C., Houston, N. C., Taylor, L. V., Smith, G. L., Smith, A. B., & Craig, A. (1984). *Studies of salmonids packed and stored under a modified atmosphere*. Aberdeen Scotland, UK: Tomy Research Station, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Catto, M., Gasco, F., Dzieminski, F., & Tailliez, R. (1999). Effects of water activity, NaCl and smoke concentrations on the growth of *Lactobacillus plantarum* ATCC 12315. *International Journal of Food Microbiology*, *52*, 105–108.
- Dondoro, M., Coterma, F., Cervajal, L., & Simpson, R. (2004). Change in quality of vacuum-packed salmon (*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chemistry*, *87*, 543–550.
- Gibson, D. M., & Ogden, I. D. (1986). Estimating shelf life of packaged fish. In D. E. Kramer & J. Liston (Eds.), *Seafood Quality Determination* (pp. 437–451). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Gilliland, S. E., Basta, F. F., Brinda, J. J., & Campbell, J. E. (1976). Aerobic Plate Count. In M. L. Speck (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 107–131). Washington: American Public Health Association, Inc.
- Gunn, L., & Haas, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish products. *International Journal of Food Microbiology*, *33*, 121–137.
- Hansen, L. T., Gill, T., & Haas, H. H. (1995). Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International*, *28*(2), 123–130.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Bigh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, *89*, 101.
- Hong, I. C., Leliane, E. L., Hawesoh, Z. L., & Haido, R. T. (1996). Quality of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus* L.) filets during modified atmosphere storage. *Journal of Food Science*, *61*, 646–651.
- Lu, C. H. (1952). Methods for determining peroxide in lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *3*, 585.
- Leroi, F., & Joffraud, J. J. (2000). Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5 °C storage predicted using factorial design. *Journal of Food Protection*, *63*(9), 1222–1227.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevillon, F., & Casalini, M. (2001). Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology*, *90*, 578–587.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevillon, F., & Cardinal, M. (1998). Study of the microbiological ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 °C. *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 111–121.
- Liston, J., & Mairies, J. R. (1976). Fish, Crustaceans and Processed Seafoods. In M. L. Speck (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 507–521). Washington: American Public Health Association, Inc.
- Lyba, U., Lahtinen, J., Frohniksson-Ahromaa, M., Hyttia-Trees, E., Eling, K., & Korhonen, H. (2001). Microbiological quality and shelf life of vacuum-packaged "gravid" rainbow trout stored at 3 and 8 °C. *International Journal of Food Microbiology*, *70*, 221–230.
- Marin, R. E., Gray, R. J. H., & Pierson, M. D. (1978). Quality assessment of fresh fish and the role of naturally occurring micro flora. *Food Technology*, *32*, 188–193.
- Medina, I., Sano-Garcia, T. M., German, B. J., & Frankel, E. N. (1999). Comparison of natural polyphenol antioxidants from extra virgin olive oil with synthetic antioxidants in tuna lipids during thermal oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 4873–4879.
- Pigott, G. M., & Tucker, B. W. (1990). Quality of smoked fish. (C. Temperature effects). In G. M. Pigott & B. W. Tucker (Eds.), *Seafood Effects of Technology on Nutrition* (pp. 170–175). New York: Marcel Dekker Inc.
- Rora, A. M. B., Regost, C., & Lampe, J. (2003). Liquid holding capacity, texture and fatty acid profile of smoked filets of Atlantic salmon fed diets containing fish oil or soybean oil. *Food Research International*, *36*, 231–239.
- Sikorski, Z., Haerd, N., Mochtero, T., & Bonini, S. P. (1981). Quality. In P. E. Doe (Ed.), *Fish Drying and Smoking, Production and Quality* (pp. 89–94). Lancaster: Basil Technomic publishing Co Inc.
- Sikos, I., Zotos, A., & Taylor, K. D. A. (2005). The effect of drying, pressure and processing time on the quality of liquid smoked trout (*Salmo gairdnerii*) filets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(12), 2065.
- Vouziata-Nougata, M. T., Mazine-Frost, A., & Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, A TP-related compounds, volatile amines and organoleptic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2056–2061.
- Woyewoda, A. D., Shaw, S. J., Ke, P. J., & Burns, B. G. (1986). Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. *Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Science*, No. 1448.
- Zotos, A., Hole, M., & Smith, G. (1995). The effect of frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*) on its Quality when hot-smoked. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *67*, 43–48.
- Zotos, A., Petridis, D., Sikos, I., & Gougozian, C. (2001). Production and quality assessment of a smoked tuna (*Sarda sarda*) product. *Journal of Food Science*, *68*(8), 1184–1190.



Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads

Maria Michail, Maria Vasiliadou, Anastasios Zotos *

Technological Educational Institution of Thessaloniki, School of Food Technology and Nutrition, Department of Food Technology, 57400 Thessaloniki, P.O. Box 141, Greece

Received 20 December 2004; received in revised form 11 March 2005; accepted 11 March 2005

Abstract

Proteolytic enzymes have been detected and partially purified from trout (*Salmo gairdnerii*) heads, which were preserved at -20°C . Proteolytic enzymes, either in crude extract or in partial purified samples, were stable for 15 days with an optimum temperature of 55°C . Proteolytic activity was very high in either alkaline or acidic pH regions. A particular ratio of cold acetone to crude extract (1.25:1) was found to be best for the partial purification of proteases, with a 99% recovery, compared with the partial purifications achieved using different cold acetone ratios or ammonium sulphate. This recovery was also confirmed via measurement of the particles (particle size analyser) contained either in crude extract or in the precipitated samples. The existence of mainly Zn-serine and possibly some Zn-acidic proteases was observed.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Trout (*Salmo gairdnerii*); Proteolytic enzymes; Partial purification; Acetone precipitation; Ammonium sulphate precipitation

1. Introduction

Proteases constitute the most important group of industrial enzymes used in the world today and have several applications in the food industry (El-Beltagy, El-Adaway, Rahma, & El-Bedawey, 2004). Fish is regarded to be one of the richest sources of proteolytic enzymes and fish processing generates large amounts of solid and liquid wastes, such as heads, tails, skin, bones and intestines (El-Beltagy et al., 2004; Hordur & Rasco, 2000; Regenstein & Regenstein, 1991; Shahidi & Kamil, 2002).

Utilization of these wastes is a major problem for fishermen and the fish industry. Their disposal has a major economic and environmental impact (Hordur & Rasco, 2000; Regenstein & Regenstein, 1991; Shahidi & Kamil, 2002).

Liver is the organ that has been mostly utilized in order to produce fish oil, while bones and intestines are used for the production of fish flour. In some cases, even the skin is used (Regenstein & Regenstein, 1991; Shahidi & Kamil, 2002).

A variety of digestive proteolytic enzymes has been isolated from the internal organs of fish and crustaceans. The fish proteases, found in the pyloric caeca as active forms, have also been purified from different species, such as cod, rainbow trout and salmon (Hernández-Santoyo, Hernández-Arana, Arreguin-Espinosa, & Rodríguez-Romero, 1998).

An intensive effort to utilize fish wastes has been made by isolating and purifying proteolytic enzymes and fatty acids, which can be used in the food or pharmaceutical industry. This effort leads to the isolation, purification and characterization of many proteolytic enzymes, such as serine proteases and many alkaline proteases (Regenstein & Regenstein, 1991).

* Corresponding author. Fax: +30 2310 791360.
E-mail address: zotos@food.tehnig.gr (A. Zotos).

Thus, whereas the usage of the intestines has been successfully developed (mostly regarding the isolation and purification of proteolytic enzymes) utilization of the rest of wastes (e.g., heads, tails) is not proportionally developed (Regenstein & Regenstein, 1991; Shahidi & Kamil, 2002).

Thus, the aim of this research was to partially purify and identify proteolytic enzymes from the heads of trout (*Salmo gairdnerii*) and to evaluate the purification techniques used, an attempt that might be further used by the food and pharmaceutical industries.

2. Materials and methods

2.1. Rainbow trout heads

Farmed trout (*Salmo gairdnerii*) was purchased from Ioannina Greece. Immediately after arrival, fish samples were stored in ice at 0–1 °C. The average weight of the samples was 900 g to 1 kg. About 20 h after harvesting, they were eviscerated, head removed and stored at –20 °C.

2.2. Analytical reagents

Inhibitors: Iodoacetamide, phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF), *p*-benzoquinone, silver nitrate, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), copper sulfate, zinc sulfate and soybean trypsin inhibitor were purchased from Sigma Chemical Co. Ltd., Fancy Road, Poole, Dorset. All reagents used were of analytical grade.

2.3. Preparation of crude extract

Head samples were thawed for about 2 h at room temperature and 60 g of minced head were weighed on an analytical balance and homogenized with 600 ml of 0.1 M phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$) buffer, pH 7.0, for 2 min. The homogenisation was performed in ice in order to avoid increase in temperature. The mixture was centrifuged at 12,100g for 30 min at 4 °C. The supernatant was collected and used as crude protease extract.

2.4. Assay of protease activity

The reaction mixture contained 2.5 ml of 0.5 % casein (except where otherwise stated) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, and 0.3 ml of the supernatant. The mixture was incubated in a water bath at 55 °C for 40 min. Then, 2.8 ml of 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) was added to stop the reaction and to precipitate protein. The mixture was allowed to stand for 1 h at room temperature. The precipitate was removed by filtration through Whatman No. 1 filter paper. The absorbance of the

supernatant was measured at 280 nm in a 1-cm silica cell. A blank was run by adding the enzyme solution after TCA was added.

HCl-glycine, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$, NaOH-glycine and NaOH- Na_2HPO_4 (at final concentration of 0.1 M) buffers were used in the pH ranges of 2.4–3.6, 6.4–7.4, 8.6–10.6 and 11.0, respectively. The 40-min time and 55 °C temperature were chosen after incubation of the mixture at 20, 30, 40, 50 and 55 °C for 20, 25, 30, 35 and 40 min (Zotos & Taylor, 1996). One unit of protease is defined as the amount of enzyme that catalyses the release of 1 μmol of *L*-tyrosine per minute under the above assay conditions (Alam et al., 2005).

2.5. Acetone precipitation

Acetone, which was precooled to about –15 °C, was slowly added to the crude protease preparations until the ratio between enzyme solutions and acetone was 1:0.75 and the mixture were stirred for 10 min. The precipitates were separated from the supernatant after centrifuging at 12,100g (Sorval RC-28S) for 10 min at 4 °C.

Precooled acetone was added to the supernatants until the ratios between enzyme solutions and acetone were 1:0.75 (no further acetone was added), 1:1 and 1:1.25, the solutions were stirred for another 10 min before being centrifuged at 12,100g for 10 min at 4 °C. The precipitates collected were dissolved in 40 ml phosphate buffer, pH 7.0. After standing of about 2 h at 4 °C, the protease preparations were centrifuged at 12,100g for 15 min at 4 °C to remove inactive residues (Zotos & Taylor, 1996).

2.6. Ammonium sulfate precipitation

Ammonium sulfate solutions (30% and 50%) were slowly added to the crude protease preparations until the ratio between enzyme solutions and ammonium sulfate was 1:0.75 and the mixtures were stirred for 10 min. The precipitates were separated from the supernatant after centrifuging at 12,100g (Sorval RC-28S) for 10 min at 4 °C.

Ammonium sulfate solutions (30 and 50%) were further added to the supernatant until the ratios between enzyme solution and ammonium sulfate were 1:1.25, the solutions were stirred for another 10 min before being centrifuged at 12,100g for 10 min at 4 °C. The precipitates collected were dissolved in 40 ml of 0.2 M phosphate buffer, pH 7.0. After standing for about 2 h at 4 °C, the protease preparations were centrifuged at 12,100g for 15 min at 4 °C to remove inactive residues.

2.7. Inhibition of proteases

The effect of inhibitors on protease activity was determined by preincubating the protease preparation with

the inhibitor at room temperature for 30 min before assay and the residual activity was estimated by the standard protease assay at pH 7.0. $\text{CoCl}_2\text{MnCl}_2$, PMSF, *p*-benzoquinone, AgNO_3 , iodoacetamide, EDTA, CuSO_4 , and ZnSO_4 were dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, at a concentration of 2 mM, whilst the trypsin inhibitor was in a concentration of 0.5 mg/ml. A control was run by pre-incubating the protease preparation with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 (Zotos & Taylor, 1996).

2.8. Protein content

Protein concentration was determined using the method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall (1951).

2.9. Particle size measurement using the Mastersizer 2000 particle size analyser

Fifty millilitre of crude extracts, partially purified with cold acetone 1:0.75, 1:1 and 1:1.25 and partially purified with 30% and 50% ammonium sulfate samples were diluted to 1 l with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, and the size of their contained particles was measured using the Using Mastersizer 2000 particle analyser. Care was taken to avoid protein aggregation and thus the samples were agitated before their measurement. The instrument's capability has a range from 20 to 2000 μm . This measurement was conducted in order to estimate the suitability of the applied precipitation methods: An analysis of variance (ANOVA) was applied to detect any differences between the subtraction of the particles in the 5 precipitated samples (cold acetone: crude extract 1.25:1, 1:1, 0.75:1 and ammonium sulfate (30% and 50%): crude extract 1.25:1) from the crude extract.

3. Results and discussion

3.1. Optimum temperature, incubation time and stability

It can be observed from Fig. 1 that the protease activity at pH 7.0 was independent of the incubation time between 25 and 40 min. It can also be seen that higher protease activities were obtained at 55 and 50 °C. These results are similar to those presented by Cao, Osatomi, Hara, and Ishihara (2000) and Hernández-Santoyo et al. (1998). However, optimum temperatures of 35–40 °C have also been reported (El-Beltagy et al., 2004; Nielsen & Nielsen, 2001). It can also be seen, from Fig. 2, that protease activity was almost linearly increased by increasing temperature, except from the samples incubated for 20 min, in which uneven results were obtained. The stability of the proteases at room temperature was also checked and it was found that their activity remained stable even after 15 days, indicating that these proteases might be used by the industry in mild heating processes (data not shown).

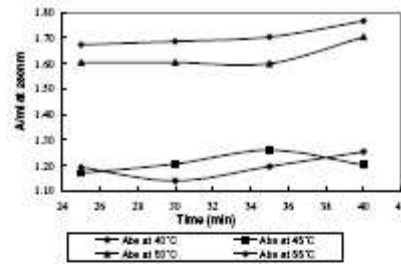


Fig. 1. Effect of incubation time on protease activity.

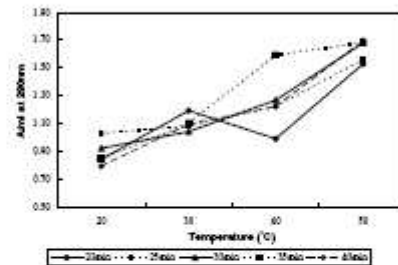


Fig. 2. Effect of temperature on protease activity.

ity remained stable even after 15 days, indicating that these proteases might be used by the industry in mild heating processes (data not shown).

3.2. Optimum pH

The activity of proteolytic enzymes was determined at different pH values (2.4–3.6, 6.4–7.4, 8.6–11.0). In the 2.8–3.6 pH range, casein was diluted to a concentration of 0.2% (w/v) instead of 0.5%, due to the fact that casein is nearly insoluble at this pH because of its isoelectric point (~4.6).

As shown in Fig. 3, both acidic and alkaline proteases were observed in the crude extract, indicating that trout heads may be a promising source of proteolytic enzymes.

These results are in agreement with those reported in the literature. Proteolytic enzymes with optimum pHs of 2.4 and 3.5 have been reported (Chong, Hashim, Chow-Yang, & Ali, 2002; Wilhite, Elden, Brzin, & Smigocki, 2000). Besides, other authors have reported optimum pHs of 7.0 and 10.0 (Giménez, Suddert, Sánchez, & De Castro, 2000; Wang, Hsiao, & Ghang, 2002), confirming the results found in this work.

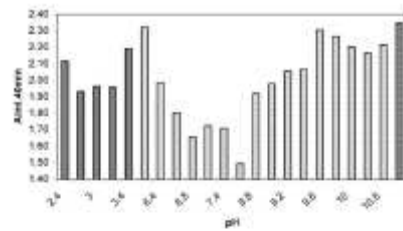


Fig. 3. Effect of pH on enzymic activity.

3.3. Partial purification of the proteolytic enzymes

The results of the two applied purification methods (cold acetone and ammonium sulfate precipitation) and the recoveries obtained are shown in Table 1.

As can be seen from Table 1, the precipitation of proteolytic enzymes, achieved using cold acetone (-15°C) in a ratio of acetone to crude extract of 1.25:1 was much higher than any other ratio of acetone:crude extract used. Besides, all acetone ratios were also much higher than the precipitation obtained using the 30% or 50% ammonium sulfate technique. It should be noted that the recovery of protease activity using the ratio of acetone to crude extract of 1.25:1 was 99% (Table 1). These results indicate that cold acetone is probably the most effective agent for the initial step of protease purification.

The effectiveness of cold acetone as a purification agent for proteolytic enzymes was reported by Popova and Pishtitski (2001). Also, insufficient partial purification by ammonium sulfate was observed by Wang et al. (2002), Mashashi et al. (2002) and Olivis-Burrola et al. (2001) also reported that cold acetone was a much better purification agent.

The purification results were further confirmed through the measurement of the particles contained in all samples (crude extract and precipitated) using the particle size analyser (Mastersizer 2000). The one-way analysis of variance (ANOVA) of the samples obtained by the subtraction of the particles in the 5 precipitated samples (cold acetone: crude extract 1.25:1, 1:1, 0.75:1 and ammonium sulfate (30% and 50%): crude extract 1.25:1) from

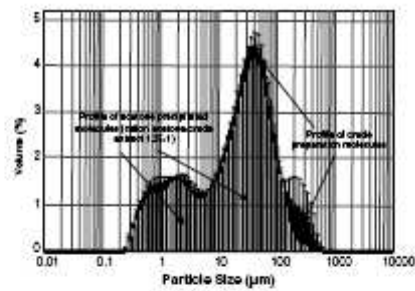


Fig. 4. Comparison of the particles between crude preparation and acetone-precipitated molecules (acetone: crude extract 1.25:1).

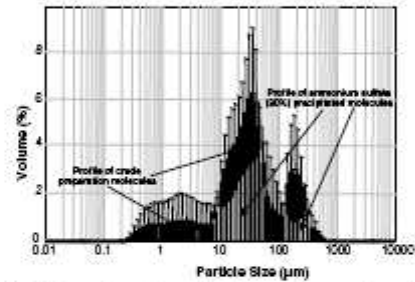


Fig. 5. Comparison of the particles between crude preparation and ammonium sulfate precipitated molecules (ammonium sulfate 30%:crude extract 1.25:1).

the crude extract, revealed that the sample precipitated using cold acetone in the ratio 1.25:1 was statistically different ($p = 0.000$) from all others. The mean subtraction value of the samples precipitated with cold acetone in the ratio 1.25:1 was 0.288 ± 0.25 , and 1.30 ± 1.05 , 1.29 ± 1.07 , 1.26 ± 1.14 and 1.55 ± 1.02 for the samples precipitated with cold acetone in a ratio of 1:1, 0.75:1 and ammonium sulfate 50%, 30%, respectively. The distribution of the 1.25:1 cold acetone: crude extract and

Table 1
Partial purification of proteases with cold acetone and ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Fraction	Total protease activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
Crude extract	31426 (830)	660	47.6	100
Acetone:crude extract 1:0.75	17195 (490)	12	1433	55
Acetone:crude extract 1:1	15507 (289)	16	969	49
Acetone:crude extract 1:1.25	31177 (295)	30	1539	99
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30% 1:1.25	2489 (176)	1.6	1556	8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% 1:1.25	814.5 (95)	1.2	679	3

Activity was measured at pH 7.0 with casein as substrate. Data are means of sixfold determinations. Standard deviations are shown in parentheses.

30% ammonium sulfate precipitated particles in comparison with the particles identified in crude extract are representatively shown in Figs. 4 and 5. It can be seen from the figures that successful precipitation was achieved with cold acetone in the above ratio, which is in line with the 99% recovery obtained and the high difference in the distribution of the particles observed between crude extract and 30% ammonium sulfate precipitation. Similar were the distribution of the particles in all other precipitated samples.

3.4. Effect of protease inhibitors

The effect of a range of inhibitors on crude extract and on the sample wherein better precipitation was achieved (1:25:1 cold acetone: crude extract) was investigated (Table 2). It was found that proteases, particularly in the precipitated sample, were strongly inhibited by PMSF, trypsin inhibitor, Ag^+ , Co^{2+} and strongly activated by Zn^{2+} , clearly indicating the existence of Zn-serine proteases. Similar results were reported by Cheng et al. (2002) and Barata et al. (2002), confirming the existence of serine proteases. Besides, the inhibition achieved by EDTA, a classic metalloprotease inhibitor, may indicate the existence of further metalloproteases in the head samples of trout and, due to the action observed at low pHs (Fig. 3), they might be acidic metalloproteases, probably Zn-acidic proteases. These results are in agreement with those reported by Capiralla, Hiroi, Hirokawa, and Maeda (2002), Munilla-Morán and Saborido-Rey (1996), Barata, Andrade, Dias Rodrigues, and Castro (2002).

The activation observed due to the action of iodoacetamide and *p*-benzoquinone possibly excludes the existence of thiol proteases either in crude extract or in the acetone precipitated samples.

Table 2
Effect of some inhibitors on proteases in crude extract and 1:25:1 cold acetone:crude extract partial by purified samples

	Final concentration (mM)	Activity retained (%)	
		Crude extract	Partial purified
Control	–	100	100
PMSF	2	105 (2.60)	59 (1.45)
Trypsin inhibitor	0.5 mg/ml	89 (3.25)	75 (2.38)
ZnCl_2	2	100 (1.34)	228 (2.27)
EDTA	2	108 (2.32)	83 (2.34)
Iodoacetamide	2	123 (3.43)	157 (3.41)
<i>p</i> -Benzoquinone	2	136 (3.28)	358 (4.53)
AgNO_3	2	64 (1.45)	38 (0.93)
CoCl_2	2	60 (3.34)	53 (1.74)
CaSO_4	2	97 (2.10)	70 (1.24)
MnCl_2	2	89 (1.51)	114 (2.49)

Activity was measured at pH 7.0 with casein as substrate. Data are means of sixfold determinations. Standard deviations are shown in parentheses.

4. Conclusions

Whole heads (waste) from trout (*Salmo gairdneri*) could be considered as a good source of proteolytic enzymes, mainly Zn-serine proteases and Zn-acidic proteases, which have shown optimum temperature at 55 °C and sufficient stability.

Cold acetone precipitation in two steps (1:0.75 and 1:1.25 crude extract:acetone) was indicated to be the best precipitation method, with a 99% recovery. This effectual precipitation technique was confirmed through measurement of the particles obtained in the different precipitated samples in comparison with the crude extract.

References

- Allen, S. I., Dube, S., Reddy, G. S. N., Bhattacharya, B. K., Srinivas, S., & Singh, I. (2005). Purification and characterization of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from *Shimadzu* ovis. *Antonie van Leeuwenhoek and Microbial Technology*, 30, 324–331.
- Barata, R. A., Andrade, M. H. G., Dias Rodrigues, R., & Castro, I. M. (2002). Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Flaobacterium oxysporum* var. *int.* *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 54(4), 304–308.
- Cao, M. J., Ogasumi, K., Hara, K., & Ishihara, T. (2000). Identification of a myofibril-bound serine protease (MBSP) in the skeletal muscle of loach fish *Squalius laietanus* which specifically cleaves the arginine site. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 25, 255–264.
- Capiralla, H., Hiroi, T., Hirokawa, T., & Maeda, S. (2002). Purification and characterization of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, 38, 571–579.
- Cheng, A. S. C., Hashim, R., Chow-Yang, L., & Ali, R. A. (2002). Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of dace fish (*Symphysodon aeneogracilis*). *Aquaculture*, 203, 321–333.
- El-Belghy, A. E., El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., & El-Belghy, A. A. (2004). Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of beld fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry*, 86, 33–39.
- González, M. I., Suddert, C. A., Sánchez, I. J., & De Castro, R. E. (2000). Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 4, 181–188.
- Hernández-Soto, A., Hernández-Arana, A., Arregui-Espinoza, R., & Rodríguez-Romero, A. (1998). Purification and characterization of several digestive proteases from the blue halibut *Halibut halibut*. *Aquaculture*, 159, 203–216.
- Hordur, K. G., & Rason, B. A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 657–666.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, K. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 50, 265–275.
- Machado, K., Abe, T., Yamahara, T., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., & Utsuki, S. (2002). Purification and characterization of a novel glutamyl aminopeptidase from chicken meat. *Meat Science*, 64, 163–168.
- Munilla-Morán, R., & Saborido-Rey, F. (1996). Digestive enzymes in marine species. I. Protease activities in gut from midfish (*Sobarda*

- monella), Sea bass (*Sparus aurata*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 133(2), 395–402.
- Nielsen, B. L., & Nielsen, H. H. (2001). Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128B, 351–363.
- Ojima-Barroil, H., Equera-Brauer, M. J., Rosendo-Sánchez, O., & Pacheco-Aguilar, R. (2001). Protease activity and partial characterization of the trypsin-like enzyme in the digestive tract of the tropical snail *Acembronaria acembronaria*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(4), 51–63.
- Popova, V., & Pohnyski, I. (2001). Isolation of cyclodextrin-glucanotransferase preparations of different purities. *European Food Research Technology*, 213, 67–71.
- Regenstein, J. M., & Regenstein, E. C. (1991). *Specialty products and by-products: Introduction to fish technology* (pp. 169–174). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Shahidi, F., & Kamil, J. Y. V. A. (2002). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 1–30.
- Wang, S., Hsiao, W., & Chang, W. (2002). Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *moraxella purpurus* CCR C31409 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2240–2255.
- Willie, S. E., Eiden, T. C., Binn, J., & Smigocki, A. C. (2000). Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the shellfish weevil midgut with biochemical and plant-derived protease inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 1131–1138.
- 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.

Improvement studies of different steps included in the production of steamed with liquid smoke trout fillets (*Salmo gairdnerii*)

Despoina Dimitriadou, Anastasios Zotos*, Dimitris Petridis, Anthony K.D. Taylor

Alexander Technological Educational Institution of Thessaloniki (ATEI), School of Food Technology and Nutrition, Dept. of Food Technology, 57400 Thessaloniki, P.O. Box 141, Greece

Author Prof K.D.A. Taylor, Faculty of Technology, University of Lincoln, Bayford Pool, Lincoln LN6 7TS, UK

*Correspondence author: Dr Anastasios Zotos, Tel. +30 2310 791353, Fax: +30 2310 791375, zotos@food.teithe.gr

ABSTRACT

A fish smoking process was applied using a combination of liquid smoke and steaming at pressures up to 1 bar above atmospheric. Drying and brining prior to smoking have not shown any significant effect on the quality of the trout fillets. The non-dried and dried for 4h trout fillets prior to processing were assessed as slightly more acceptable products. Processing yield, sensory analysis, instrumental colour, pH, available lysine, PAHs and preservation time were estimated. The losses due to processing of the non-dried samples were 23.7%, while 28.8% for those dried for 4h. The fillets processed at 1.5 & 2 bar steam pressure were assessed as highly acceptable. Lightness (L^*) showed a decreasing trend due to pressure while redness (a^*) and yellowness (b^*) an increasing one. The destruction of available lysine was low ($13.20\% \pm 1.01$) and it was slightly dependent upon the process. No PAHs were detected. The preservation time, studied via Total Viable Count (TVC), Lactic Acid Bacteria (LAB), existence of *Listeria monocytogenes* and sensory analysis, extended to more than 98 days at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. The drying prior to processing seems to affect the preservation time. This processing technique is much simpler, faster, environmentally effective and leads to high quality smoked products.

Keywords: Smoked Trout, Steaming, Colour, Total Viable Count, Lactic Acid Bacteria.

INTRODUCTION

The use of liquid smoke has several advantages over traditional smoking procedures having no detectable levels of benzo[*a*]pyrene and no mutagenic activity. Liquid smoke performs all the desired functions, allows more rigid flavour control and has the added advantages of lowered costs, less environmental damage and greater availability and variety of application methods (Dillon et al., 1994).

Drying prior to smoking is a common process and extensively used. Significant differences were found on flavour and colour between the trout fillets that were dried at 20°C for 2, 4, 6, 8, 16 and 24 h prior to steaming for 60 min at 2 bar pressure. The trout samples dried for 16 and 24 h prior to processing were assessed as more brown coloured and smoke flavoured than the samples dried for 2, 4, 6 and 8 (Siskos et al., 2005).

It is well known that lysine participates with the e-amino group in the early steps of Maillard reaction pathways and the rate of the reactions increases with temperature. Carbonyl compounds present in smoke or arising from lipid oxidation may react with the e-NH₂ group of lysine. The impact of these reactions is a reduction in protein utilisation mainly by the reduction of lysine through its e-amino group (Opstvedt, 1989). An average reduction of available lysine at $21.1 \pm 8.4\%$ was observed in steamed with liquid smoke trout fillets and it was dependent upon the process (Siskos et al., 2005).

One of the major problems with traditional smoking is the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons, which are

well-established as carcinogens (Lawrence and Weber, 1984). It was reported a total amount of polyaromatic hydrocarbons ranged between 200 to 480 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in liquid smoked products and 650 to 1200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in traditionally cold smoked fillets (Hattula et al., 2001). A concentration of 0.63 – 3.2 ng g^{-1} PAHs in steamed with liquid smoke trout was detected (Siskos et al., 2005).

The shelf-life of smoked fish products depends largely upon the initial bacterial contamination of the raw material; on the extent of brining and pre-drying, on the heat treatment, on the amount of smoke components that penetrate the product and on temperature, air humidity and oxygen levels during storage (Siskos et al., 2007). According to Siskos et al., 2007 TVC values of $7 \times 10^6 \text{ cfu g}^{-1}$, $5.1 \times 10^6 \text{ cfu g}^{-1}$ and $1.4 \times 10^6 \text{ cfu g}^{-1}$ reached in liquid smoked trout fillets, dried for 16 h prior to smoking and steamed at 2 bar pressure for 30, 45 and 60 min respectively, after 48 days of storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Thus, the aim of this work was to produce smoked trout fillets (*Salmo gairdnerii*) using a new steaming process, based on liquid smoke and supported by the application of minor pressures and to assess the quality of the products via sensory characteristics, available lysine and PAHs, with a previous estimation of the effect of drying and brining times prior to processing. Besides to estimate the preservation time at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ of the products via TVC, LAB, existence of *Listeria monocytogenes* and sensory analysis.

MATERIALS and METHODS

Optimisation of Drying and Brining Times during Pre-smoking

The initial step of this work was to find out the most suitable drying and brining times. Trout purchased from the fish farm (mentioned below) were brined in 20% sodium chloride solution (four fillets in 1 L of brine), at four different brining times (1, 2, 3 and 16 h). The temperature of the brine was kept low ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) in order to minimize microbiological growth. After brining some samples were processed immediately and all others were dried in an oven, at 43°C , using four different drying times (1, 2, 4 and 14 h). All fillets were steamed (using liquid smoke solution) at the same conditions (smoking time 1 h and pressure 2 bar).

After cooling [approximately 1 h at ambient temperature ($17 \pm 2^{\circ}\text{C}$)] the smoked products were packed in polyethylene bags and stored at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Smoking (Steaming) Process

Farmed trout (*Salmo gairdnerii*) samples was purchased from an aquaculture farm in Ioannina Greece. Immediately after the arrival, fish samples were stored in ice at $0-1^{\circ}\text{C}$. The weight of the samples was between 400 g and 600 g. About 24 h after harvesting trout samples were eviscerated, head removed, filleted and brined in 20% sodium chloride solution for 1h at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. After brining half of the samples were processed immediately and the other half were dried for 4 h at 43°C . The smoking process was conducted using

a 10 L electrical commercial steamer, electronically modified in the workshop to improve its precision and 40 mL of liquid smoke condensate (Nefeloudis SA) was added and diluted in 2 L tap water (2%). Therefore, the smoking process took place by the smoky steam produced by the liquid smoke solution. Samples were placed at one layer with the flesh facing the smoke liquid and were processed at three different processing times: 30, 45 and 60 min. Processing time was measured from the moment the required pressure in the steamer was achieved (approximately 12 to 15 min). The applied steam pressure conditions were: 1 (atmospheric pressure), 1.5 and 2 bar and the subsequent temperatures were 100, 104 ± 1 and $113\pm 1^{\circ}\text{C}$ respectively. After each process the liquid smoke solution was discarded and a new solution was used. After cooling at room temperatures, at sanitary conditions, the smoked products were packed in polyethylene bags and stored at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ until further analysis. The combination of the two factors mentioned above resulted in 9 different processing levels. These combined with the two drying levels (dried and non-dried), resulted in 18 different ways of processing.

Weight Loss

All samples were weighed before and after all processing steps. After processing fillets were left to equilibrate at room temperature before weighting.

Proximate Analysis

Moisture content was determined by the Commission of European Communities recommended method ISOR 1442 (EEC 1979). Lipid content was determined by the Bligh and Dyer (1959) method as modified by Hanson and Olley (1963). Total protein (crude protein, N x 6.25) content was determined using the Kjeldahl method according to Cowie and Mackie, (1968). Salt content was determined by the volumetric method of the AOAC (1995).

Available Lysine Analysis

The available lysine was determined using the HPLC method with the FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene) reagent, described by Peterson and Warthesen (1979). The HPLC was operated using: Microbondapac C18 column, Mobile phase 0.01M acetate buffer pH 4.0 and acetonitrile (80:20), Flow rate 2.0 mL min⁻¹, Detection at 435 nm, Injection volume 10 µL.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Analysis

PAHs content was determined using the method described by Larsson (1982). This method includes digestion in methanolic solution of potassium hydroxide, partitioning in dimethylsulfoxide and a column clean up procedure. The chromatogram was obtained using a Focus GC (ThermoFinnigan Italia SpA) packed with a capillary 30m column purchased from Alltech with film thickness of 0.25µm and ID 0.32mm. The GC conditions were: initial

temperature 180°C for 3 , rate 8°C min⁻¹ until 320°C and 20 min isothermal. The injection and detection temperatures were 270°C and 350°C respectively. The carrier gas was helium with a flow rate of 1.5 mL min⁻¹.

Determination of pH

The pH of trout flesh was measured with a Hanna Instruments HI 8424 microcomputer pH-meter. Samples were prepared according to Cortes-Ruiz et al. (2001) by blending 2 g of trout mince with 18 mL of distilled water.

Instrumental Colour Measurement

Colour was measured directly on the flesh of the fish fillets. The colour measurement was conducted using a colour difference measuring instrument ('Micro Colour LMC' colourimeter, Dr Lange, • Germany) which is a AQ3 tristimulus colourimeter (Siskos et al., 2005). Each measurement was repeated nine times for each sample. L^* (lightness/darkness), a^* (redness/greenness) and b^* (yellowness/blueness), values were measured.

Sensory Analysis

Sensory analyses were conducted at three different stages. The first one in order to assess the trout fillets regarding their different pre-treatment conditions (drying and brining times). This sensory analysis was performed using 21 experienced panellists. Five (5) samples were presented to panellists (2 days after processing) asking to evaluate 4

sensory variables: colour of the flesh, saltiness, smoked flavour and firmness. The intensity of all four variables was recorded on a 15cm unstructured scale line. The left end of the line was marked at 0cm for all variables and characterized as white colour, non-salted, non-smoked flavour and extremely soft, whereas the right end was marked at 15cm as brown colour, extremely salted, strong smoked flavour and extremely firm. Samples were coded with three-digit random numbers and served in random order.

The second sensory analysis was performed in order to assess the different processed trout fillets regarding their drying, pressure and processing time. 29 experienced panellists were used twice apart from one ($b = 57$) (see below statistical analysis), testing 3 samples each time. Colour, flavour and firmness (3 variables) were assessed as well as the acceptability regarding these variables.

The third sensory analysis was performed in order to estimate the preservation time at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ of the smoked trout fillets. In this sensory analysis 10 experienced panellists were used every 7 days, for 98 days. They were asked to estimate 3 attributes (presence of external moisture, firmness and odour) of the samples which have been stored at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. They were also asked, based upon the above sensory attributes, to judge the suitability of the samples to be consumed.

Statistical Analysis

The estimation of drying and brining times were performed by the application of a balanced incomplete block design (BIBD) including $t=21$ treatments, $r=5$ replicates per each process with only one pair of similar samples $\lambda=1$, $k=5$ treatments per panellist and $b=21$ panellists. The samples in this experiment were twenty (20) (5 different drying times x 4 brining times) therefore the design was increased with one more liquid smoked trout fillet ($5 \times 4 + 1$) in order to conform to the particular plan 13.13 obtained by Cochran and Cox (1957). Adjusted sensory mean scores were deduced for the 21 samples for each process and at this point the 21th sample was excluded from further investigation and were then analyzed using a two-way ANOVA (two fixed factors: drying and brining time).

A BIBD was performed for the estimation of the different processed trout fillets on factors dried/non dried (2 levels), pressure conditions, 1, 1.5 & 2 bar (3 levels) and processing times, 30, 45 & 50 min (3 levels). Thus a combination of $2 \times 3 \times 3 = 18$ samples was achieved and the design was again increased with one more sample of liquid smoked trout ($2 \times 3 \times 3 + 1$) in order to conform to the particular plan 13.15a obtained from Cochran and Cox (1957). This design included $t=19$, $r=9$, $\lambda=1$, $k=3$ and $b=57$. Adjusted sensory mean scores were deduced for the 19 samples for each process and at this point the 19th sample was excluded from further investigation. A three-way ANOVA for the three factors and their interaction terms was attempted on the set of sensory variables to detect significant differences.

The two preserved trout fillets (0h and 4h drying time prior to processing) were assessed by the panellists 14 times, using every time an additional newly prepared smoked sample (as a control) unknown to the panellists in order to identify possible differences. The results were analyzed using a two-way ANOVA (two fixed factors: drying and preservation time) Statistically significant differences between factor levels were tested using the Tukey test for comparison of level mean values.

Total Viable Count (TVC) and Lactic Acid Bacteria (LAB)

10 g of each sample was diluted in 90 mL peptone water 1% buffered at pH 7.5 with 9% NaCl. Serial dilutions were made until a 10^{-5} g mL⁻¹ sample was obtained. 1mL of each dilution was placed in a Petri dish and approximately 15mL plate agar count was added for total viable count and 15mL de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar for lactic acid bacteria. Each Petri dish was carefully shaken in order to achieve a homogenous distribution of the sample. After about 10 min all Petri dishes were inverted and placed in an oven at 35°C for 48 h for TVC and at 30°C for 36 h for LAB. All developed colonies were counted following the rules reported by Busta et al. (1984).

Listeria Monocytogenes

Aseptically 25 g of the sample was added in 225 mL of half-fraser broth (suitable for *Listeria monocytogenes* growth). It

was stomached and incubated for 25 h at $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. After incubation 1 mL of the suspension was transferred into 10 mL of fraser broth and it was incubated for 25 h at $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. 500 μL of the incubated samples were pipetted into the strips. The strips were inserted in the mini-VIDAS instrument which is capable to determine the presence or absence of *Listeria monocytogenes* in the samples. The assay was completed within approximately 70 min.

RESULTS and DISCUSSION

The chemical composition of the samples was relatively stable through out the study: 71.79% \pm 0.30 moisture, 23.20% \pm 0.35 protein and 4.23% \pm 0.33 lipid content, indicating that small changes should be probably expected from farmed fish.

Optimisation of Drying and Brining Times

The sensory analysis performed on the liquid smoked trout fillets to estimate the drying and brining times was revealed significant differences only in the saltiness and firmness of the products. Saltiness has been affected by either different brining ($p=0.000$) or drying time ($p=0.040$) while firmness only by the brining time ($p=0.007$) (Fig. 1a & 1b). As it can be seen from figure 1a the panellists were detected that saltiness, as expected, was highly influenced by the brining time. As far as the drying time concerns, only the samples that were not dried prior to processing seem to be different

and identified as less salty than all others (Fig. 1b). This should be expected since it was the samples with lower water losses due to processing, as shown below. Regarding the firmness of the samples, panellists detected that increased with the increase of brining time, and it was not influenced by the drying time, despite the long period used in the work (16h). However, only the samples salted for 16h were identified as statistically significant different from all others ($1h = 2h = 3h < 16h$) (Fig. 1a).

Regarding smoked flavour and colour no significant differences was panellists were detected that saltiness, as expected, was highly influenced by the brining time. As far as the drying time concerns, only the samples that were not dried prior to processing seem to be different and identified as less salty than all others (Fig. 1b). This should be expected since it was the samples with lower water losses due to processing, as shown below. Regarding the firmness of the samples, panellists detected that increased with the increase of brining time, and it was not influenced by the drying time, despite the long period used in the work (16h). However, only the samples salted for 16h were identified as statistically significant different from all others ($1h = 2h = 3h < 16h$) (Fig. 1a).

Regarding smoked flavour and colour no significant differences was observed due to different pre-treatments (drying and brining). The results for the L^* , a^* and b^* colour parameters were similar, with no significant differences due to different pre-treatments but they were increased due to

processing (steamed with liquid smoke at 2 bar for 1 h) (Table 1). The high increase of a^* and b^* values due to smoking indicated the extension of browning reactions occurred in the process, leading in well browned (yellow/red) smoked products. Temperature and time of heating are known to strongly influence the colour properties of food, which develops faster as the product surface temperature increases (Maga 1988). These results indicate that the drying process prior to steaming is not an important factor and it does not influence the quality regarding colour and flavour of the steamed (with liquid smoke solution) products. Thus, the 16h drying process prior to smoking reported by Siskos et al. (2005) for better coloured smoked trout fillets it should be probably attributed to the homogenation technique used to measure the colour of the samples.

Subsequently, evaluating the above results and considering the hygiene of the final smoked products, the 1h in 20% NaCl solution was decided as a more appropriate brining time. As far as drying time concerns, no significant differences was observed between the samples produced at different times and therefore two different drying times (0h and 4h) were chosen. The drying time of 4h was chosen for a further study on the effect of drying, while the 0h drying time prior to smoking leads in a quick and economic process, with probably better quality final products. The salt content of these samples was 1.79% for the non-dried fillets and 2.12% for the 4h dried ones. Low salt content (1-2%)

has been reported that improve the yield and the liquid holding capacity of fish muscles (Sigurgisladottir et al. 2000).

Yield Losses due to Drying (0, 4 h), Pressure and Processing Time

During the brining process, fillets were soaked in a liquid solution so that water and sodium chloride diffused in the samples; therefore the increase of $2.9\pm 1.2\%$ in weight found it should be expected. These results were similar with those reported by Siskos et al. (2005). They found an increase of $1.3\pm 1\%$ in obtained weight due to brining of the trout fillets. Statistical analysis revealed significant differences between the dried and non-dried fillets ($p=0.010$) and between those that were processed under different steam pressure conditions ($p=0.002$). As the pressure increased, yield losses were also increased. During smoking at atmospheric pressure yield losses were not more than 20% and became higher (more than 30%) when more intense conditions were used (Fig. 2). Although, yield losses seemed to be depended on the different applied pressures, no significant differences were identified between the trout fillets produced at 1.5 bar and 2.0 bar pressure conditions. The mean losses for the fillets that have not been previously dried were 23.7% due to processing (smoking) while the pre-dried fillets showed an average of 28.8% which came from either the drying (9%) or the smoking (19.8%) processes. These results indicate that the non-dried prior to processing trout fillets lead to better quality regarding yield losses smoked products.

Effect of Processing on Moisture, Protein and Lipid Content

Moisture content in all samples varied between 63.5% and 69.5% (Table 2). Moisture was influenced only by the drying prior to processing, where statistically significant differences were observed ($p=0.016$). Thus, a decrease of 8.90% in moisture content was detected in the pre-dried for 4h samples while the reduction in moisture content in the samples processed without prior drying was only 5.65%. Neither the smoking time nor the applied pressure was shown to have any significant effect in moisture content. The combined treatments used in this study led to the production of trout fillets with relatively high moisture content. A moisture reduction of 21.2% was reported by Goulas and Kontominas (2004), during hot smoking (30 min at 40°C, 30 min at 50°C, 30 min at 55°C, 30 min at 60°C and 30 min at 70°C) of club mackerel (*Scomber japonicus*) fillets. These results confirm the results of the yield losses and the effectiveness of the process and particularly of the non-dried prior to processing trout fillets.

Protein content was also significantly influenced ($p=0.013$) by the drying time. Higher proteinaceous material reduction (16.14%) was observed in the trout fillets processed with 4h drying time prior to processing, while this reduction in the samples processed without any pre-drying treatment was 10.42% (Table 2). Castrillon et al. (1996) found a reduction in proteinaceous material of 8.5% in steamed and canned

sterilized for 55 min tuna samples. Additionally, when the canning process was extended to 90 min the protein content reduction was 13.6%. These results indicate the significance of the processing time, which is a crucial factor of protein loss.

The percentage lipid content seemed to be increased reversely to protein content due to processing. The average lipid content in all samples was 19.83% with 16.16% minimum and 23.71% maximum (on dry weight free salt basis) (Table 2). Lipid content was significantly affected only by the drying prior to processing ($p=0.004$), reversely to protein content. Increase of lipid content due to processing was also reported by Garcias-Arias et al. (1994). Steamed samples showed a higher lipid content mainly due to the water loss during steaming. However, the increase lipid content in steamed samples cannot be only explained by water loss, without ruling out other possible factors in sample composition, such as loss of nitrogen as amino acid and other nitrogen compounds. The increase of lipid content in this work should be arisen by either water loss or mainly the reduction of protein content due to processing.

Effects of Processing on pH

The initial pH of the untreated fillets was 6.50 ± 0.14 . The pH values of the samples were not significantly influenced by the different processing conditions (Table 3). The slight decrease in pH observed was probably due to reduction of moisture content, to brining prior to processing as well as

due to the high temperature of the process. These slight changes in pH values are in agreement with those reported by Espe et al. (2002). Similar differences have been also noticed by Goulas and Kontominas, (2004) which were ascribed to the lower moisture content of the smoked samples and to the brining process.

Effect of Processing on Available Lysine

As shown in table 4 the reduction in lysine availability was low, indicating a slight nutritional effect in the samples. The reduction showed a possible slight trend due to all different parameters considered in the study. However, no statistical differences were identified between the samples and the average value was $13.20 \pm 1.01\%$. Losses in available lysine have been reported at 50 to 63% due to hot smoking of mackerel (Zotos et al. 1995). Losses of $21.1\% \pm 8.4$ in available lysine were also reported by Siskos et al. (2005). They also found that the drying time prior to processing significantly affected the destruction of available lysine. This once more confirms the effectiveness of these processes and particularly of the non-dried prior to processing trout fillets in the quality of the smoked products.

Effects of Processing on PAHs

No detectable amounts of any PAHs were found either in smoke condensates or as expected in the steamed (with liquid smoke solution) trout fillets using an FID detector.

Sensory Analysis and Instrumental Colour

The steam pressure was the only factor that influenced all determined variables ($p < 0.05$) (Fig. 3a & 3b). Drying prior to smoking process and smoking time influenced only firmness and firmness acceptability. The significance of the main effects was tested through a three-way ANOVA in all measured variables. Thus, the smoked colour intensity and acceptability, the smoked flavour intensity and acceptability and the firmness and its acceptability seemed to be increased with the increase of steam pressure conditions (Fig. 3a & 3b). However, the differences between the trout fillets processed at 1.5 bar and 2.0 bar pressure conditions were not statistically significant different. The effect of pressure on smoked flavour and colour of trout fillets was also reported by Siskos et al. (2005). They found that all fillets that were processed at 2.0 bar showed more intense smoked flavour and were browner in colour. This should be expected since the higher the applied pressure the higher the temperatures and consequently the higher the production of carbonyl and phenolic compounds that led to more coloured and flavoured final products, respectively.

The drying factor was significant only in firmness of the final products. The dried trout fillets seemed to be more firm than the non-dried ones. Firmness and firmness acceptability were also influenced by the time of processing. The firmer smoked products were those that processed for 45 min, while the smoked products processed for 30 min and 60 min were quite similar in firmness as assessed by the panellists.

The trout fillets processed for 45 min at 2 bar steam pressure were assessed as the most acceptable products regarding colour, flavour and firmness by the panellists.

The different steam pressure conditions also affected the instrumentally measured colour parameters. The L^* values decreased with the increase of pressure 1 to 1.5 or 2 bar (Table 5).

Conversely a^* and b^* values were increased (Table 5). However, no significant differences were observed in all colour parameters between the smoked trout fillets processed at 1.5 bar and 2.0 bar pressure. As far as a^* parameter concerns, it was also affected by the different smoking times ($p=0.020$). Redness (a^*) of the samples became higher at the processing time of 45 min and was similar with the a^* values at the processing time of 60 min. The L^* , a^* and b^* values found in this work were different from those reported by Siskos et al. (2005). They reported a decrease in L^* values while no significant differences were detected for a^* and b^* values. This should be probably attributed to the different applied technique by the authors. In this work the colour was measured directly on the flesh, while they measured colour after homogenation of the flesh in order to avoid flesh porosity, however, this could be possibly involve air bubbles in the flesh, leading in higher L^* values. Estimation of Preservation Time at $4\pm 1^\circ\text{C}$

The samples processed without any previous drying and those that were dried for 4h at 43°C prior to smoking, were processed at 2 bar steam pressure (shown to give better

smoked colour, flavour and firmer products and more acceptable regarding these attributes) for 45 min smoking time (which gave products similar to those processed for 60 min), preserved at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ and weekly studied for their microbiological and sensory changes for up to 98 days.

Total Viable Counts (TVC)

Average TVC of fresh samples was 5.9×10^5 cfu g^{-1} . After processing a TVC reduction in all samples was observed (25 cfu g^{-1}). This was mainly because the temperature was between $105\text{-}113\pm 1^{\circ}\text{C}$, too high for all gram-positive cocci predominant on smoked fillets to survive. This microbiological flora remained stable in all samples for 7 days of storage at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. A slight increase at 6×10^2 cfu g^{-1} of TVC was observed on the 14th day in the samples processed without the drying pre-treatment.

However, this increase disappeared on the 21st day indicating that it came from a probable contamination during determination. An exactly similar contamination was also found for the lactic acid bacteria (LAB).

A slight increase in TVC values from 35 cfu g^{-1} to 1.1×10^2 cfu g^{-1} was observed only in the smoked fillets that were dried for 4h at 43°C prior to smoking after 91 days storage at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. The TVC values in the smoked trout fillets produced without any drying pre-treatment were still low (35 cfu g^{-1}), even after 91 days at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

On the 98th day, the microbial numbers were only 40 cfu g^{-1} for the smoked trout fillets produced without any drying pre-

treatment and 5.5×10^2 cfu g⁻¹ for those that dried for 4h at 43°C prior to processing. The high temperatures (105-113±1°C), and pressure (2 bar) used in this investigation reduced the initial microflora and the spoilage that occurred was mainly due to contamination after processing. The higher TVC values observed in the dried prior to processing samples should be probably attributed to possible bacteria contamination occurred during the drying process.

Very high TVC values were reported much earlier (max 48 days) for the same products (trout fillets) by Siskos et al. (2007). They were processed their products with a prior drying time of 16 h at ambient temperature. These results confirm that the drying process prior to processing leads to a high bacteria contamination that significantly affects the preservation time of the smoked products.

Storage of smoked fish has been already investigated by many researchers. Dondero et al. (2004) studied changes in quality of vacuum-packed, cold-smoked salmon (*Salmo salar*) during storage at different temperatures. Total aerobic count at the beginning of storage ranged between 150 and 174×10^3 cfu g⁻¹. According to sensory analysis salmon presented a shelf life of 20 days at 4°C. As it can be seen, the microbial loads are much higher than those found in the present work.

Longer shelf life was observed by Kolodziejska et al. (2002). They produced mild hot smoked Atlantic mackerel (57°C for 85 min) from defrosted raw material which was immersed in 200 g L⁻¹ NaCl at 7°C for 2.5 to 3 h. Drying took place at

ambient temperature for 30 and 60 min. The samples stored at two different temperatures 2 and 8°C. The initial microbial count was less than 10^4 cfu g⁻¹. Storage of the smoked fish at 2°C did not affect the microbiological quality for 21 days. The bacterial growth in the meat of such product kept at 8°C is not sufficiently retarded even during 7 days.

Comparing the results found in this work with those in literature it can be concluded that this simple and quick smoking method, based upon one hygienic processing method (steaming), followed by the absence of any pre-drying treatment could lead in high quality smoked products with a preservation time up to 100 days.

Lactic Acid Bacteria (LAB)

Very similar to TVC, the LAB values in all samples were very low (30 cfu g⁻¹). During storage at 4±1°C the count of these micro-organisms remained almost stable. On the 98th day the LAB in the smoked fillets produced with drying pre-treatment increased at 1.8×10^2 cfu g⁻¹. These results are in accordance with the results found in sensory analysis and confirm the results found for TVC. The results found in literature are totally different with those found in this work. Leroi at al. (1998) reported that farmed salmon, salted in dry salt for 3 h dried for 3 h at 22°C and smoked at 22°C for 3 h at relative humidity 70%, had immediately after smoking very low count of LAB. During the first week the LAB increased to 15×10^5 cfu g⁻¹ and reached a maximum after 4 weeks of storage.

Listeria Monocytogenes

Listeria monocytogenes was not detected in any sample. This is in accordance with the results reported by Dondero et al. (2004); they did not also find *L. monocytogenes* during storage of cold-smoked salmon.

However, Basti et al. (2006) investigating bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish, detected *L. monocytogenes* in fresh, cultivated fish, smoked fish and salted fish. The occurrence of *L. monocytogenes* in a farm environment was due to the faeces of cow which commonly used for fertilizing Iranian fish farms. They found the presence of the organism in 51% of the cow faeces.

Firmness

The firmness of all samples (Fig. 4) gradually increased as expected, probably due to dehydration occurred during storage at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. The highest values in firmness observed after 70 days of storage. Changes in firmness due to storage were also reported by Leroi et al. (1998). Smoked salmon slices, after 13 days of storage were more pasty and fatty in texture.

Smoked Odour

The smoked odour intensity was gradually decreased during storage (Fig. 4). The smoked odour remained nearly constant until 42 days of storage. It is important that even after 98 days of storage the panellists did not detect any off-

odours. The samples were in a good condition and according to the panellists, suitable for consumption.

Colour

The brown colour of all samples was gradually increased during the preservation of the trout fillets at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4). This increase in brownish occurred until the 77th day. This should be probably due to the further development of browning reactions between either carbonyls from the smoke condensates or oxidized lipids and proteins during storage.

Presence of Surface Moisture

The presence of external surface moisture was observed after 42 days of storage at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4). From the 42nd day until the 98th a slight gradually increase was observed quite similar with the increase observed in firmness, confirming a gradual dehydration but quite slow. These results also indicate probable protein changes due to storage of the smoked trout fillets. A much faster increase in external surface moisture during storage of trout fillets at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ was also observed by Siskos et al. (2005) followed by an increase in TVC and a rejection of the samples. This should be probably ascribed on the drying prior to smoking process which was 16 h.

Thus high quality smoked products regarding their colour, flavour, firmness, weight loss, reduction of available lysine, PAHs and preservation time, were produced in this work using the steaming technique, well known for its beneficial effect on cooking food. It was observed that the non-dried prior to processing smoked trout fillets were either better in quality or prolong their preservation (up to 100 days at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$); therefore the drying process should be avoided since it does not have any effect on the sensory characteristics of the products. This processing technique is much simpler and faster (without drying prior to processing) than the traditional methods of smoking, it could be homemade and leads to high quality smoked products and environmentally effective since no smoke was generated.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Ministry of Education & Religious Affairs of Greece and the European Union (EU) which co-funded this work by 25 and 75% respectively.

REFERENCES

AOAC, (1995). Salt (Chlorine as Sodium Chlorine). In: Seafood. Volumetric Method. AOAC Official Method 937.09. 35 pp. 7.

Basti A.A., Taghi A.M., Salehi Z. and Kamkar A. (2006). Bacterial pathogens in fresh smoked and salted Iranian fish. *Food Control* 17: 183-188.

Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid oxidation and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.

Busta F.F., Peterson E.H., Adams D.M. and Jonson M.G. (1984). Colony count methods. In: Speck M.L. (ed) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA. pp. 62-83.

Castrillon A.M., Navaro M.P. and Garcia-Arias M.T. (1996). Tuna protein quality changes after canning. *Journal of Food Science* 61: 1250-1253.

Cochran W.G. and Cox G.M. (1957). *Incomplete Latin Squares. Experimental designs*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 528 and 542.

Cortes-Ruiz J.A., Pacheco-Aguilar R., Garcia-Sanchez G. and Lugo-Sanchez, M.E. (2001). Functional characterization of a protein concentrates from bristly sardine made under acidic conditions. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 10: 5–23.

Cowie W.P. and Mackie I.M. (1968). Examination of the protein extractability method for determining cold storage

protein denaturation in cod. *Journal of Food Science and Agriculture* 19: 696–700.

Dillon R., Pattel T. and Martin A.M. (1994). Microbiological control of smoking operations. In: Martin A.M. (ed), *Fisheries processing*, Memorial University of Newfoundland, St. Johns' Canada: Chapman and Hall. pp. 51-81.

Dondero M., Cisternas F., Carvajal L. and Simpson R. (2004). Changes in quality of vacuum-packed salmon (*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chemistry* 87: 543-550.

EEC. (1979). Commission of European communities. Method - ISQ 1442-1973.

Espe M., Nortvedt R., Lie O. and Hafsteinsson H. (2002). Atlantic salmon (*salmo salar*) as raw material for the smoking industry. II: Effect of different smoking methods on losses of nutrients and on the oxidation of lipids. *Food Chemistry* 77: 41-46.

Garcia-Arias M.T., Sanchez-Muniz J.F., Castrillon A.M. and Navaro M.P. (1994). White tuna canning, total fat, and fatty acid changes during processing and storage. *Journal of Food Composition and Analysis* 7: 119-130.

Goulas E.A. and Kontominas G.M. (2005). Effect of smoking-method on the keeping quality of club mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. Food Chemistry 93: 511-520.

Hanson S.W.F. and Olley J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. Biochemical Journal 89: 101-102.

Hattula T., Elfving K., Mrouch U.M. and Luoma T. (2001). Use of liquid smoke flavouring as an alternative to traditional flue gas smoking of rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*). Lebensmittel – -Wissenschaft und Technologie 34: 521-525.

Kolodziejaska I., Niecikowska C., Januszewska E. and Sikorski Z.E. (2002). The microbial and sensory quality of mackerel hot smoked in mild conditions. Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie 35: 87-92.

Larsson B.K. (1982). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Fish. Lebensmittel Unters Forschung 174: 101-107.

Lawrence J.F. and Weber D.F. (1984). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Canadian commercial fish, shellfish and meat products by liquid chromatography with confirmation by capillary gas

chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 789-794.

Leroi F., Jorffaud J.J., Chevalier F. and Cardinal M. (1998). Study of the microbiological ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology* 39: 111-121.

Peterson W.R. and Warthesen J.J. (1979). Total available lysine determinations using High-Pressure liquid Chromatography. *Journal of Food Science* 44: 994-997.

Sigurgisladottir S., Sigurdardottir M., Tirrisen O., Vallet J. and Hafsteisson H. (2000). Effects of different salting and smoking processes on the microstructure, the texture and the yield of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Food Research International* 33: 847-855

Siskos I., Zotos A. and Taylor K.D.A. (2005). The effect of drying, pressure and processing time on the quality of liquid smoked trout (*Salmo gairdnerii*) fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2054-2060.

Siskos I., Zotos A., Melidou S. and Tsikritzi R. (2007). The effect of liquid smoking of fillets of trout (*Salmo gairdnerii*) on sensory, microbiological and chemical changes during chilled storage. *Food Chemistry* 101: 458-464.

Zotos A., Hole M. and Smith G. (1995). The effect of frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*) on its quality when hot-smoked. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67: 43-48.

Maga J.A. (1988). Factors influencing rate of colour formation. In:

Maga J.A. (ed), *Smoked and food colour*, Florida: Boca Raton, CRC Press Inc. pp. 103-106.

Opstvedt J., (1989). Influence of drying and smoking on protein quality. In: Burt J.R. (ed), *The effect of smoking and drying on the nutritional properties of fish*, London and New York: Elsevier Applied Science, pp. 23-36.

Table 1: The effect of drying and brining times prior to processing at 2 bar for 1 h on L^* , a^* and b^* values of the steamed with liquid smoke trout fillets.

	Drying time (h)					
	Fresh	0	1	2	4	14
L^*	41.36 (3.22)	53.29 (3.14)	54.00 (2.29)	55.58 (3.26)	53.95 (3.37)	48.95 (4.38)
a^*	-3.76 (0.97)	5.03 (1.29)	4.78 (3.11)	3.81 (1.41)	3.23 (1.86)	5.47 (2.75)
b^*	5.00 (0.97)	21.87 (1.18)	22.40 (1.18)	21.62 (1.41)	20.36 (2.50)	21.50 (2.62)

The values are means of thirty six (36) (4 brining times x 9 measurements) fold determinations. Standard deviations are shown in parentheses

Table 2: Protein, lipid content (on dry weight free salt basis) and moisture content, of the unprocessed and processed at different conditions steamed with liquid smoke trout fillets.

	Unprocessed	Non-dried	Dried
Moisture %	71.79 (0.30)	67.73 (1.17)	65.40 (1.63)
Protein %	82.89 (0.35)	74.25 (5.60)	69.50 (2.10)
Lipid %	15.11 (0.33)	18.53 (1.88)	21.11 (1.83)

The values are means of three fold determinations for the unprocessed samples and 27 fold determinations for the processed ones. Standard deviations are shown in parentheses

Table 3: pH changes via three way ANOVA of steamed with liquid smoke trout fillets due to different pressures (1, 1.5 and 2 bar), processing times (30, 40 and 60 min) and drying (0, 4 h) at 43°C prior to processing.

	1 bar (atm pressure)			1.5 bar pressure			2 bar pressure		
Time (min)	30	45	60	30	45	60	30	45	60
Non-dried	6.40 (0.14)	6.50 (0.07)	6.57 (0.40)	6.40 (0.14)	6.58 (0.23)	6.40 (0.14)	6.30 (0.03)	6.28 (0.35)	6.24 (0.10)
Dried 4h	6.53 (0.01)	6.39 (0.08)	6.28 (0.06)	6.37 (0.08)	6.30 (0.03)	6.43 (0.06)	6.33 (0.06)	6.22 (0.06)	6.22 (0.07)

The values are means of three fold determinations. Standard deviations are shown in parentheses

Table 4: Available lysine content and losses of steamed with liquid smoke trout fillets dried at 0 and 4 h at 43°C prior to processing.

	Fresh	30 min	45 min	60 min	1 bar	1.5 bar	2 bar
Protein mg/g	70.80 (0.85)	62.31 (3.63)	61.44 (3.47)	60.60 (3.50)	62.29 (4.90)	61.12 (3.66)	60.94 (0.70)
Loss (%)		12	13.2	14.4	12.0	13.7	13.9

Data are means of six fold determinations. Standard deviations are shown in parenthesis

Table 5: Changes via three way ANOVA of L^* , a^* and b^* values in steamed with liquid smoke trout fillets due to different pressures (1, 1.5 and 2 bar), processing times (30, 40 and 60 min) and drying (0, 4 h) at 43°C prior to processing.

	1 bar (atm. pressure)			1.5 bar pressure			2 bar pressure		
Time (min)	30	45	60	30	45	60	30	45	60
L^*									
Non-dried	63.27 (3.34)	64.38 (1.84)	61.28 (3.97)	57.46 (6.48)	51.87 (3.45)	55.59 (3.01)	57.33 (3.80)	55.25 (2.26)	54.46 (4.05)
Dried 4h	60.85 (4.12)	64.16 (4.80)	63.25 (5.61)	56.62 (3.95)	51.60 (3.42)	53.04 (4.57)	55.55 (2.29)	50.99 (3.86)	54.71 (3.08)
a^*									
Non-dried	-2.56 (0.72)	-1.76 (0.92)	-0.52 (1.00)	1.04 (3.90)	5.94 (3.22)	3.85 (3.34)	1.66 (4.14)	3.670 (3.34)	5.51 (3.14)
Dried 4h	-3.58 (1.56)	-2.00 (0.87)	-1.22 (1.15)	1.26 (2.01)	3.56 (2.73)	2.03 (2.74)	2.66 (3.02)	5.85 (3.09)	4.15 (2.45)
b^*									
Non-dried	12.93 (2.45)	14.48 (2.83)	15.58 (2.50)	15.09 (6.73)	23.44 (3.99)	19.30 (3.13)	18.33 (3.14)	23.24 (4.92)	21.81 (3.31)
Dried 4h	10.64 (3.61)	12.65 (3.56)	11.20 (2.54)	17.64 (3.38)	16.31 (5.59)	18.27 (2.76)	22.82 (4.28)	24.65 (5.21)	22.97 (5.39)

The values are means of nine fold determinations. Standard deviations are shown in parentheses

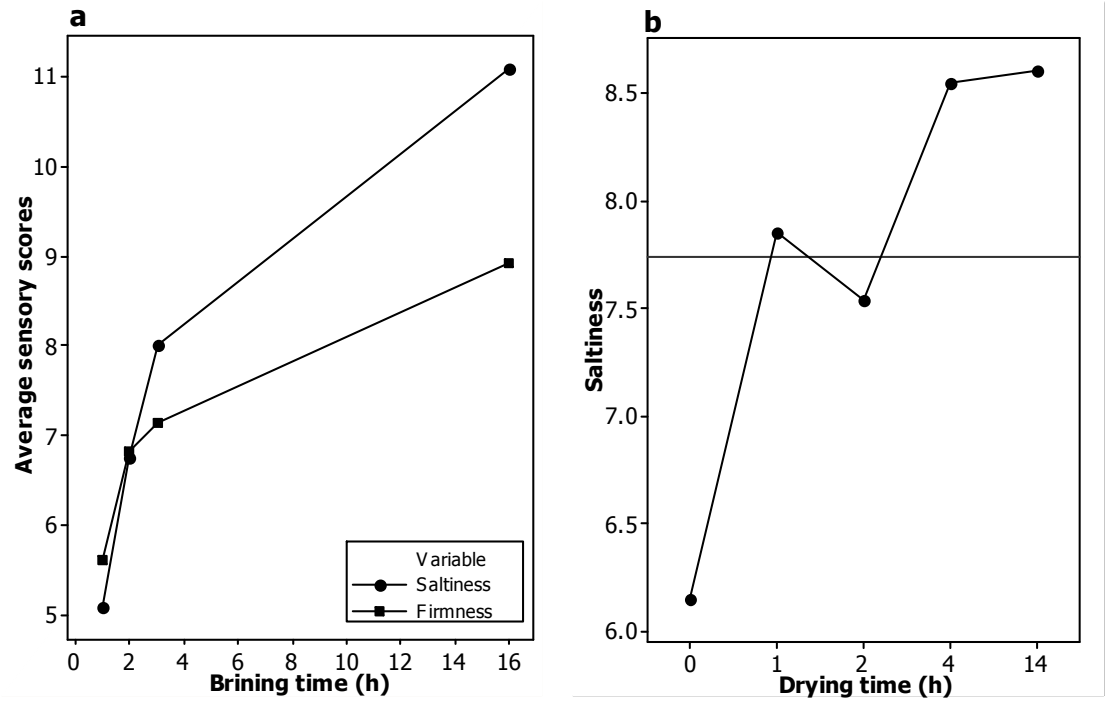


Figure 1

Despoina Dimitriadou, Anastasios Zotos*, Dimitris Petridis,
K.D. Anthony Taylor

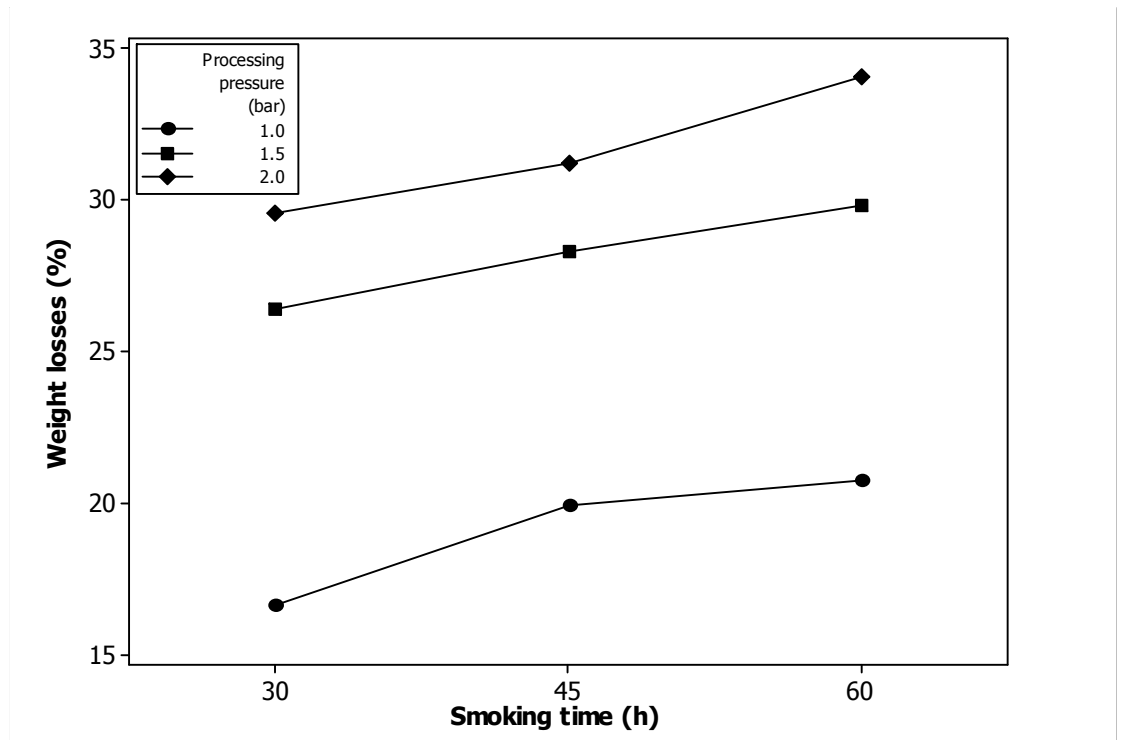


Figure 2

Despoina Dimitriadou, Anastasios Zotos*, Dimitris Petridis,
K.D. Anthony Taylor

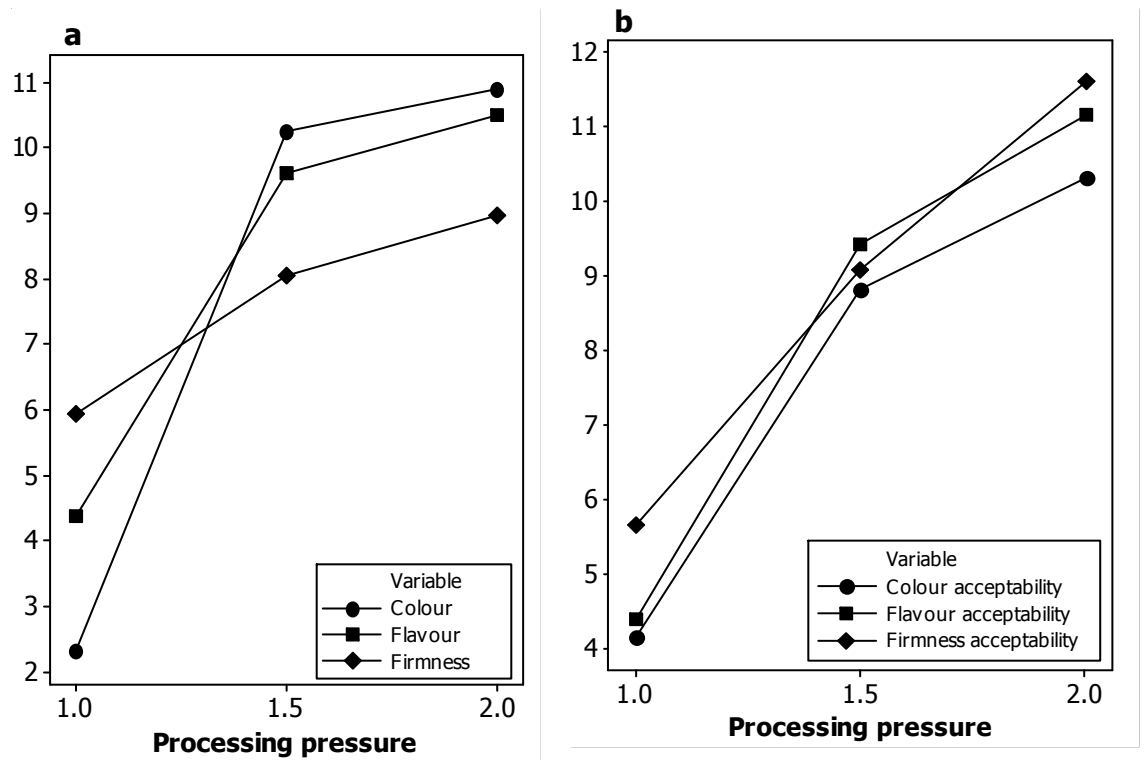


Figure 3

Despoina Dimitriadou, Anastasios Zotos*, Dimitris Petridis,
K.D. Anthony Taylor

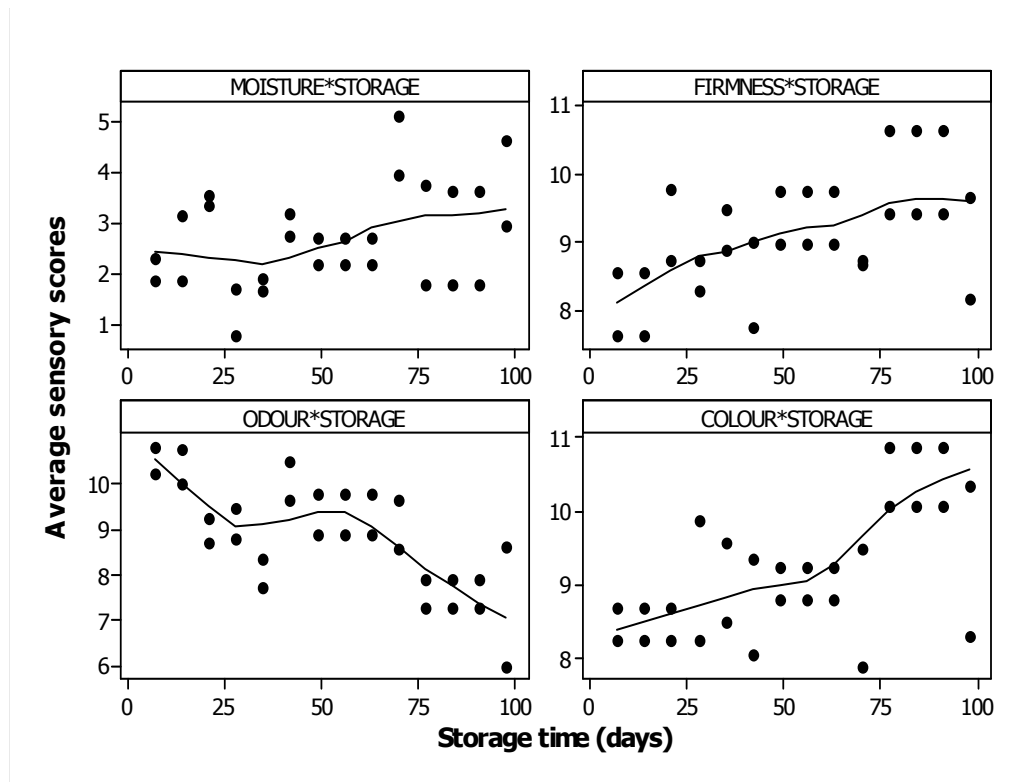


Figure 4

Despoina Dimitriadou, Anastasios Zotos*, Dimitris Petridis,
K.D. Anthony Taylor

Legends

Fig. 1: a. The effect of the different brining time prior to processing on saltiness and firmness of the steamed with liquid smoke at 2 bar for 1 h trout fillets and b. the effect of the different drying time prior to processing on saltiness of the steamed with liquid smoke at 2 bar for 1 h trout fillets

Fig. 2: Yield losses of the steamed with liquid smoke trout fillets in line with time of processing and pressure conditions regardless the drying process prior to processing.

Fig. 3: a. Changes in colour, smoked flavour and firmness of the steamed with liquid smoke trout fillets due to increase of steam pressure and b. changes in their acceptability regarding colour, smoked flavour and firmness

Fig. 4: Changes of surface moisture, firmness, odour and smoked colour due to preservation at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ of the trout steamed at 2 bar for 45 min of the non-dried and dried for 4h prior to processing fillets

