

DONDURULMUŞ BALIKLARDA FARKLI ÇÖZÜNDÜRME ŞEKİLLERİNİN PROTEİN KALİTESİNE OLAN ETKİLERİ**Bahar Tokur*, Seval Kandemir**

Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balcalı-Adana

Özet:

Bu çalışmada, donmuş alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*)'ın protein kalitesine, mikrodalgada, akan su altında ve oda sıcaklığında çözündürmenin etkileri araştırılmıştır. Balıkların protein kalitesinde meydana gelen değişimi belirlemek için myofibriller protein miktarı, protein çözünürlüğü ve sodyum dodesil sülfat poli-akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizleri yapılmıştır. Alabalık ve sardalyada dondurma ve çözündürme işlemi myofibriller proteinlerin miktarında azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$). Genel olarak dondurma ve çözündürme işlemi her iki balık türü için protein çözünürlüğünde önemli bir azalmaya neden olurken ($p<0.05$), farklı çözündürme işlemlerinin protein çözünürlüğüne olan etkisi balık türlerine göre değişmiştir. Her iki balık türü için en yüksek protein çözünürlüğü akan su altında çözündürülme ile sağlanmıştır ($p<0.05$). SDS-PAGE analizi sonucunda ise farklı çözündürme metotlarının disülfid kovalent bağlarla protein denatürasyonuna neden olmadığı bulunmuştur. Elde edilen veriler, proteinlerin non-disülfid kovalent bağlarla veya protein-lipit gibi diğer bileşiklerle olan interaksiyonunun protein çözünürlüğünün azalmasının nedeni olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Dondurulmuş balık kalitesi, farklı çözündürme metotları, protein çözünürlüğü, SDS-PAGE analizi

Abstract:**The effects of different thawing methods on protein quality of frozen fish**

In this study, the effects of thawing in running water, microwave and room temperature on protein quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sardine (*Sardina pilchardus*) were investigated. The amounts of myofibriller protein, protein solubility and Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were analyzed to determine the protein quality of fish. The amount of myofibriller protein significantly decreased in each two fish species as a result of freezing-thawing process ($p<0.05$). Thawing in microwave and room temperature caused a decrease in the amount of myofibriller proteins of rainbow trout and sardine ($p<0.05$). In general, freezing-thawing process caused a significant decrease in protein solubility ($p<0.05$), while the effect of different thawing process on protein solubility changed depending on fish species. The highest protein solubility in rainbow trout and sardine obtained with thawing in running water. As a result of SDS-PAGE, it was found that the different thawing methods didn't cause protein denaturation via disulfide covalent bonds. According to these data, it was suggested that the reason of the decrease in protein solubility could be re-

* **Correspondence to:** Dr. Bahar TOKUR, Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, 01330 Balcalı, Adana-TÜRKİYE
Tel: (+90 322) 338 60 84 -2961 Fax: (+90 322) 338 64 39

E-mail: b_tokur@yahoo.com

sulted from polymerization of protein via non-disulfite covalent bonds and/or interaction of protein with other compounds such as the lipid-protein interaction.

Keywords: Frozen fish quality, different thawing methods, protein solubility, SDS-PAGE

Giriş

Su ürünlerinin dondurularak depolanması en önemli muhafaza yöntemlerinden birisidir. Ancak, dondurma ve çözündürme işlemleri esnasında istenmeyen bir çok kalite kayıpları meydana gelir. Dondurulmuş su ürünlerinde kalite kaybına neden olan en önemli faktörler arasında depolama sıcaklığı, dondurma-çözündürmenin sayısı, sıcaklık dalgalanmaları ve uygunsuz dondurma-çözündürme işlemleri verilebilir (Sikorski ve ark., 1976).

Dondurulmuş balığın kas proteinlerinde geri dönüşümü olmayan değişimler, balığın kas proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinin bozulmasına, su tutma kapasitesinin azalmasına ve balıkta sulu-yumuşak ya da kuru ve sert bir kas dokusu oluşmasına neden olur. Protein denatürasyonu olarak bilinen bu değişimler, yapısal kas proteinlerinin özellikle de myofibrillar proteinlerin çökmesi/indirgenmesi sonucu ortaya çıkar. Proteinlerin çökmesi/indirgenmesi, disülfite, hidrojen ve hidrofobik bağlarla proteinlerde dimerler, trimerler ve yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin oluşması veya kısım-kısım çökmesi ile oluşur. Dondurulmuş balıklarda yapılan çoğu çalışma, protein-protein kros-linklerle olduğu gibi (Sikorski, 1978; Del Mazo ve ark., 1999; Jasra ve ark., 2001), protein-lipit interaksyonuyla da (Haard, 1992; Saeed ve ark., 1999; Saeed ve Howell, 2002) balık kas proteinlerinin polimerleştiğini veya bölündüğünü göstermiştir. Kontraktil proteinler içerisinde myosin ağır zinciri (MHC), M-protein, tropomyosin ve Troponin I, C en fazla denatürasyona uğrayan proteinler olduğu fakat bu oluşumların balık türlerine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (Benjakul ve Bauer, 2000).

Genellikle, doğal kas yapısı hidrojen bağları, dipole-dipole interaksyonu, elektrostatik interaksyonlar ve disülfite linkleri içeren bir çok kuvvet tarafından stabildirler. Proteinler, kuvvetlerin stabilitesinin bozulması ile denatüre olabilirler ve bu durum dondurma çözündürme döngüsü gibi sıcaklığın uygunsuz bir şekilde kullanılması ile artabilir (Wagner ve Anon 1985; Benjakul ve Bauer, 2000). Çözündürme genellikle dondurmadan çok daha yavaş

oluşur ve dondurulmuş ürünün tekstürel yapısına zarar verir (Nott ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2004). Çözündürme metotlarının duyu analizi kadar membran integresinde önemli rol oynadığı ve hızlı çözündürmenin yavaş çözündürmeye oranla daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur (Nilsson ve Ekstrand, 1994;1995).

Mol ve ark. (2004), farklı çözündürme yöntemlerinin (su içerisinde, oda sıcaklığında ve buzdolabı sıcaklığında) dondurulmuş uskumruların (*Scomber scombrus*) kalitesini önemli bir şekilde değiştirmediğini bulmuşlardır. Yapılan araştırmalara göre en iyi çözündürme ile ilgili genel ve geçerli bir bilgi verilebilmenin mümkün olmadığı belirtilmektedir (Baygar ve ark., 2004). García-Arias ve ark. (2003) taze ve dondurulmuş sardalyaların buzdolabında +4°C' de veya mikrodalgada çözüldükten sonra ızgara yapılması sonucu protein kalitesinde meydana gelen değişimi incelemişler ve bunun sonucunda buzdolabında çözündürmenin protein çözünürlüğünü azalttığını bulmuşlardır. Balıkların dondurulması, dondurma-çözündürme döngüsüne ilişkin bir çok çalışma olmasına rağmen farklı çözündürme metotlarının balığın protein kalitesine olan etkisi ile ilgili çok az çalışma bulunabilmiştir. Bu çalışma ile, dondurarak depolanmış alabalık ve sardalyada farklı çözündürme şekilleri sonucu protein kalitesinde meydana gelen değişimler incelenerek konuya ışık tutulmaya çalışılmıştır.

Materyal ve Metod

Araştırmada, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*) kullanılmıştır. Lokal balıkçılardan satın alınan balıklar buz içinde laboratuvara getirilerek 2 lota ayrılmıştır. Balıkların bir kısmı taze balıktaki kimyasal parametrelerin belirlenmesi için ayrılmış diğerleri ise hemen buzdolabı poşetleri içinde -18°C' de dondurularak 3 ay boyunca depolanmıştır. Dondurulmuş balıkların çözündürülmesinde en fazla uygulanan çözündürme metotlarından mikrodalgada çözündürme (180 W), akan su altında çözündürme ve oda sıcaklığında (24°C) çözündürme olmak üzere 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Çalışmada kimyasal analizler her bir lota 3 paralel olarak yapılmıştır.

Kimyasal analizler

Balığın başlangıç ve dondurmadan önceki-sonraki tazeliğini belirlemek için toplam uçucu bazik azot (TVB-N, mg N /100 gr örnek) tayini Antonocopoulos (1973)' a göre ve pH ölçümleri Santos (1981)' a göre yapılmıştır.

Myofibriller proteinlerin çözünürlüğü Dyer ve ark. (1950)' nin yöntemine göre belirlenmiştir. Bunun için 0.5 gr balık örneği 10 ml 0.6 M NaCl ve 50 mM sodyum fosfat buffer solüsyonunda ultra-turax kullanılarak 1 dakika buz içinde homojenize edilmiştir. Örneklerin ekstraksiyon esnasında oksitlenmesini önlemek için %0.1 oranında butil-hidroksi-toluen (BHT) kullanılmıştır. Ekstrakte edilen örnekler daha sonra 5000 rpm de ve 4 °C' de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklerdeki protein miktarı Lowry ve ark. (1951) metoduna göre saptanmıştır. Protein standardı olarak bovine serum albümin kullanılmıştır.

Balıkların çözündürülmesi esnasındaki proteinlerde meydana gelen denatürasyonu incelemek için, BioRad marka mini vertikal sodyum dodesil sülfat (SDS)- poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi %10' luk poliakrilamid jel ile Laemmli (1970) metoduna göre yapılmıştır. Jeller, % 0.025 Coomassie Blue R-250, %40 metanol ve %7 asetik asit ile boyanmıştır ve fazla boya % 5 metanol ve% 7 asetik asit ile 24 saat bekletilerek alınmıştır. Proteinlerin moleküler kütlelerini belirlemek için, myosin (211,24 kDa), β -galaktosidaz (117,76 kDa), bovin serum albumin (99,81 kDa) ve ovalalbumin (49,78 kDa) içeren SDS-PAGE standardı (BioRad-161-0309) kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Farklı çözündürme metotları uygulanan alabalık ve sardalyanın pH, toplam uçucu bazik azot (TVB-N, mg/ 100 gr), myofibriller proteinler ve protein çözünürlüğündeki değişimler Tablo1 de verilmiştir.

Her iki balık türünde TVB-N düzeylerinin dondurma-çözündürme işlemleri esnasında yükseldiği görülmüştür. Oda sıcaklığında çözündürülmüş alabalık ve sardalyaların TVB-N düzeylerinin akan su ve mikrodalga ile çözündürülenlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Benzer şekilde, Mol ve ark. (2004) oda sıcaklığında çözdürülen dondurulmuş ithal uskumru balıklarının TVB-N düzeylerinin suda çözdürülenlere göre daha yük-

sek olduğunu bulmuşlardır. Balıkların TVB-N düzeyleri taze balık için Avrupa Birliği Kriterlerine göre belirtilen düzeylerin (35mg/100g et) altında bulunmuştur (EC, 1995). Buna göre balıkların dondurma ve çözündürme işlemleri esnasında tüketilebilirlik sınırını aşmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre, TVB-N miktarının balık türlerine ve çözündürme şekline göre değiştiği bulunmuştur. Balık etinde tespit edilen TVB-N değerleri üzerine başlıca balığın cinsi, avlama mevsimi, avlama derinliği, avlanma bölgesi, balığın beslenme durumu, olgunluk derecesi, cinsiyeti ve yaşı oldukça etkilidir (Oehlenschläger, 1989). Araştırma sonucuna göre, TVB-N düzeyleri bakımından sardalya için akan su ve mikrodalga en uygun çözündürme işlemleri olarak önerilebilir ($p<0.05$).

Tablo 1. Farklı çözündürme metotları uygulanan alabalık ve sardalyanın pH, TVB-N, myofibriller protein ve protein çözünürlüğündeki değişimleri^{1,2} (The changes of pH, TVB-N, myofibrillar protein and protein solubility of rainbow trout and sardine thawed with different methods).

	Alabalık	Sardalya
TVB-N (mg /100 gr et)		
Taze	16.33±0.81 ^a	14.00±1.40 ^a
Mikrodalga	18.15±0.65 ^b	17.44±0.73 ^b
Akan su	19.77±1.09 ^c	17.78±0.33 ^b
Oda sıcaklığı	20.96±0.01 ^c	22.62±0.30 ^c
pH		
Taze	6.41±0.01 ^a	6.46±0.00 ^a
Mikrodalga	6.52±0.01 ^a	6.48±0.01 ^a
Akan su	6.35±0.01 ^b	6.70±0.00 ^a
Oda sıcaklığı	6.43±0.05 ^{ab}	6.66±0.10 ^a
Myofibrillar proteinler (mg/100 gr et)		
Taze	16.63±1.44 ^a	12.74±0.18 ^a
Mikrodalga	12.41±1.54 ^{bc}	8.04±0.24 ^b
Akan su	10.93±0.26 ^b	6.52±1.03 ^c
Oda sıcaklığı	13.64±1.54 ^c	9.71±1.16 ^d
Protein Çözünürlüğü (%)		
Taze	100 ^a	100 ^a
Mikrodalga	84.00±4.35 ^b	63.12±1.09 ^b
Akan su	91.54±0.11 ^c	70.44±1.42 ^c
Oda sıcaklığı	65.97±3.37 ^d	54.89±3.89 ^d

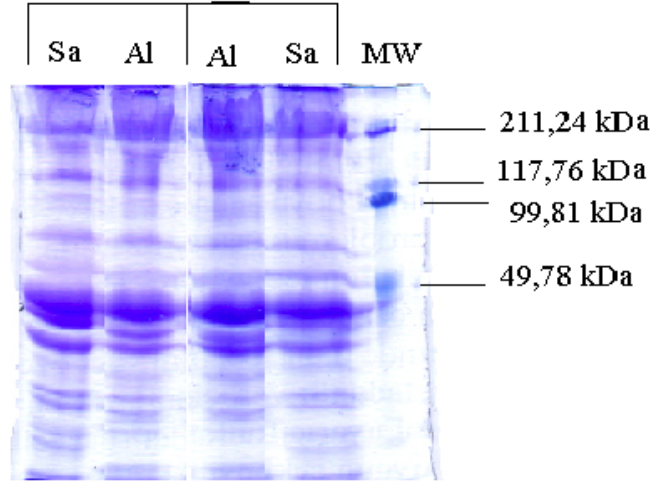
¹ Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir

² Aynı sütunda üstsimge olarak verilen farklı harfler istatistiksel olarak $p<0.05$ düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir.

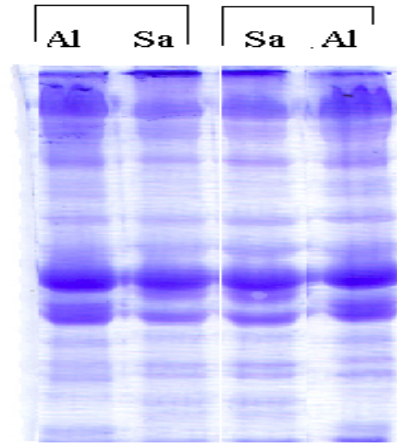
Sardalya için farklı koşullarda çözündürmenin pH üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Benzer sonuçlar, dondurulmuş ithal uskumru balıklarında da bulunmuştur (Mol ve ark., 2004).

Alabalık ve sardalyada taze balığa göre dondurma ve çözündürme işlemleri myofibriller proteinlerin miktarında azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$). Genel olarak dondurma ve çözündürme işlemi her iki balık türünde de protein çözünürlüğünde önemli bir azalmaya neden olurken ($p<0.05$), farklı çözündürme işleminin protein çözünürlüğüne olan azaltıcı etkisi alabalıkta daha az olmuştur. En yüksek protein çözünürlüğü, akan su altında çözündürülme ile sağlanmıştır. Benjakul ve Bauer (2000), dondurma ve çözündürme işlemi sırasında morinada meydana gelen protein çözünürlüğündeki azalmanın proteinlerin denatüre olmasından kaynaklandığını öne sürmektedirler. Dondurma ve çözündürme işlemi sırasında meydana gelen bu denatürasyonun balığın tekstürel yapısında önemli değişimlere neden olduğu belirtilmektedir (Ang ve Hultin,1989; Ragnarrsson ve Regenstein, 1989). García-Arias ve ark. (2003) buzdolabında çözündürülen sardalya filetolarının protein çözünürlüğünün azaldığı fakat mikrodalgada arttığını bulmuşlardır. Bu sonuca göre, genel olarak farklı çözündürme işlemlerinin balığın proteinlerinde çok önemli değişimlere neden olmadığı vurgulanmaktadır. Buna rağmen, Tejada ve ark. (1985) dondurulmuş sardalya balığında protein çözünürlüğünde önemli bir azalma meydana geldiğini ve bunun nedeninin stabil kovalent bağların oluşmasından kaynaklandığını belirtmektedirler. Srinivasan ve ark. (1997) mikrodalganın daha hızlı çözündürmeye neden olduğu fakat protein denatürasyonuna sebep olduğu ve büyük karidesler için arzu edilmeyen bir çözündürme metodu olduğunu belirtmişlerdir.

Kontrol-Taze Mikrodalga



Akan su Oda sıcaklığı



Şekil 1. Farklı çözündürme metotları uygulanan alabalık ve sardalyaya ait protein profillerinin molekül ağırlıklarına göre dağılımı (MW; moleküler ağırlık, kDa; kilodalton, Sa; sardalya, Al; alabalık)

Figure 1. Distribution of electrophoretic protein profile of rainbow trout and sardine thawed with different methods based on molecular weights (MW; molecular weight, kDa; kilo Dalton, Sa; sardine, Al; trout).

Bu çalışmada, di-sulfit bağları indirgeyen β -mercaptoethanol ile reaksiyona sokulan örneklerin SDS-PAGE analizi ile özellikle proteinlerde di-sulfit ve non-disulfit kovalent bağlarla meydana gelen protein-protein interaksyonu saptanmaya çalışılmıştır (Şekil 1). Buna göre, alabalık ve sardalyanın kas proteinlerinde farklı çözündürme metotlarının dikkate değer bir değişim meydana getirmedığı

tespit edilmiştir. Sadece akan su altında ve oda sıcaklığındaki bantların yoğunluğunda taze ve mikrodalgaya göre çok zayıf bir azalma görülmektedir. Taze balıkla tüm çözündürme işlemleri karşılaştırıldığında dikkate değer bir değişimin olmaması, çözündürme işleminin balık proteinleri üzerine çok büyük bir değişime neden olmadığını göstermektedir. Bantlarda görülen azalma ise balıklarda belirli molekül ağırlığına sahip proteinlerin non-disülfid kovalent bağlarla denatüre olduğunu göstermektedir. Proteinlerin sadece disülfid bağlarla değil non-disülfid kovalent bağlarla bağlanarak da yüksek moleküler ağırlıklı polimerler oluşturduklarını ve çökerek proteinlerin denatürasyonuna yol açtıkları da söylenebilir (Ragnarsson ve Regenstein, 1989). Ayrıca, dondurarak depolama sırasında meydana gelen protein denatürasyonunun protein çözünürlüğünü azalttığı ve bunun nedeninin disülfid bağlar ve protein molekülleri arasındaki iyonik etkileşimler olduğu kadar intermoleküler hidrojen veya hidrofobik bağlarla da oluşabileceği belirtilmektedir (Matsumoto 1980; Akahane 1982; Badii ve Howell 2002). Jiang ve ark. (1987), dondurarak depolama esnasında protein moleküllerinin $-C=O$ ve $-N-H$ gruplarıyla olan hidrofilik etkileşimlerinin proteinlerin denatürasyonuna ve çökmesine neden olabileceğini ve bunda protein çözünürlüğünü ve Ca-ATPase aktivitesini azaltabileceğini belirtmektedirler. Bunun yanında, proteinlerin fonksiyonel gruplarının çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünleriyle olan reaksiyonlarından da çökme ve karşı-bağlanma olabileceği belirtilmektedir (Saeed ve Howell, 2002). Bu çalışmada, SDS-PAGE analizi sonucunda protein çözünürlüğündeki azalmanın disülfid kovalent bağlar sonucu oluşmadığı, ancak diğer non-disülfid kovalent bağlar ve/veya diğer bağlar ve etkileşimlerle oluştuğu söylenebilir.

Sonuç

Farklı çözündürme işlemleri, protein çözünürlüğünde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Fakat bu azalmanın balığın türüne ve çözündürme işlemine bağlı olarak değiştiği bulunmuştur. SDS-PAGE analizi, di-sulfide kovalent bağlarla herhangi bir denatürasyonun olmadığını göstermiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, protein çözünürlüğündeki azalmanın ancak non-disülfid kovalent bağlarla veya proteinlerin diğer bileşimlerle olan etkileşimiyle oluşabileceği

söylenebilir. Ancak, farklı çözündürme şekillerinin sebep olduğu denatürasyonun tam olarak tespiti için daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

- Akahane T. (1982). Freeze denaturation of fish muscle proteins [pHD thesis]. Tokyo: Sophia Univ.
- Ang, J. F., Hultin, H. O. (1989). Denaturation of cod myosin during freezing after modification with formaldehyd. *Journal of Food Science*, **54**: 814-818.
- Antonocopoulos, N. (1973). Bestimmung des flüchtigen basenstickstoffs, in: Ludorf, W., Meyer, V, (eds) Fische und Fischerzeugnisse, AuflageVerlag Paul Parey 224-225, Berlin und Hamburg
- Badii, F, Howell, N.K. (2002). A comparison of biochemical changes in cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) filets during frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**(1): 87-97.
- Baygar, T., Özden, Ö., Üçok, D. (2004). Dondurma ve çözündürme işleminin balık kalitesi üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, **28**: 173-178
- Benjakul, S., Bauer, F. (2000). Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze \pm thaw cycles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1143-1150
- Del Mazo, M., Torrejon, P., Careche, M., Tejada, M. (1999). Characteristics of the Salt Soluble Fraction of Hake Filets Stored at -20 and $-30^{\circ}C$. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 1372-1377
- Dyer, W.J., Fench, H.V., Snow, J.M. (1950). Proteins in fish muscle. 1. Extraction of protein fraction in fresh fish. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, **7**: 585.
- EC (1995). Directive 95/149/EC, Commission decision of 8 March, 1995, fixing the total volatile base nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. Official Journal L 097, 29/04/1995, 0084-0087.

- García-Arias, M.T., Álvarez, E.P., García-Linares, M.C., García-Fernández, M.C., Sánchez-Muniz, F.J. (2003). Grilling of sardine fillets. Effects of frozen and thawed modality on their protein quality. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, **36**: 763–769
- Haard, N.F. (1992). Biochemical Reactions in Fish Muscle during Frozen Storage, in: E.G. Bligh (Eds), *Seafood Science and Tehcnology*, Fishing News Boks 176-209, Oxford, UK.
- Jasra, S.K., Jasra, P.K., Talesara, C.L. (2001). Myofibrillar protein degradation of carp (*Labeo rohita* (Hamilton)) muscle after post-mortem unfrozen and frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**(5): 519-524.
- Jiang, S., Hwang, B., Tsao, C. (1987). Effect of adenosine-nucleotides and their derivates on the denaturation of myofibrillar proteins in vitro during frozen storage at -20°C. *Journal of Food Science*, **52**(1): 117-123.
- Nott, K.P., Evans, S. D. and Hall, L.D., (1999). The effect of freeze-thawing on the magnetic resonance imaging parameters of cod and mackerel. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **32**: 261-268.
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- Matsumoto, J.J. (1980). Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage, in: Whitaker JR, Fujimoto M, (Eds.), *Chemical deterioration of proteins*, ACS Symposium Series 123, Washington, D.C
- Mol, S., Özden, Ö., Erkan, N., Baygar, T. (2004). İthal uskumruların değişik çözümlere koşullarındaki kalite parametrelerinin belirlenmesi. *Journal of Veterinary Animal Science*, **28**: 1071-1077.
- Nilsson, K., Ekstrand, B. (1994). Enzyme leakage in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) related to various thawing treatments. *Z. Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **198**: 253-257.
- Nilsson, K., Ekstrand, B., (1995). Frozen storage and thawing methods affect biochemical and sensory attributes of rainbow trout. *Journal of Food Science*, **60**: 627-630.
- Nott, K.P., Evans, S. D., Hall, L.D. (1999). The effect of freeze-thawing on the magnetic resonance imaging parameters of cod and mackerel. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **32**: 261-268
- Oehlenschläger, J. (1989). Die Gehalte an Flüchtigen Amininen und Trimethylaminoxid in Fangfrischen Rotbarschen aus Verschiedenen Fanggebieten des Nordatlantiks. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **40**: 55-58.
- Ragnarrsson, K., Regenstein, J. M. (1989). Changes in electrophoretic patterns of gadoid and non-gadoid muscle during frozen storage. *Journal of Food Science*, **54**: 819-823.
- Saeed, S., Fawthrop, S.A., & Howell, N.K. (1999). Electron spin resonance (ESR) study on free radical transfer in fish-protein interaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**: 1809-1816.
- Saeed, S., Howell, N.K. (2002). Effect of lipid oxidation and frozen storage on muscle proteins of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **579**-586.
- Santos, C.L.D., James, D., Teutscher, F. (1981). Guidelines for chilled fish storage experiments. FAO. Fish Tech. Paper 210s.
- Sikorski, Z., Olley, J., Kostuch, S. (1976). Protein changes in frozen fish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **8**: 97–129.
- Sikorski, Z.E. (1978). Protein changes in muscle foods due to freezing and frozen storage. *International Journal of Refrigeration*, **1**(3): 173-180.
- Srinivasan, S., Xiong, Y.L., Blanchard, S.P. (1997). Effects of freezing and thawing methods and storage time on thermal properties of freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **75**: 37-44.

- Tejada, M., Moral, A., Borderias, A. J. (1985). Preservation of sardine mince in the frozen state: mince obtained from whole, headed and eviscerated fish. *International Journal of Refrigeration*, 8(5): 294–304.
- Wagner, J. R., Anon, M. C. (1985). Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *Journal of Food Technology*, 20: 735-744.
- Zhu, S., Ramaswamy, H.S., Simpson, B.K. (2004). Effect of high-pressure versus conventional thawing on color, drip loss and texture of Atlantic salmon frozen by different methods. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37: 291-299.