



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

*Θέμα*

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΗΚΤΩΝ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΑΠΟ ΔΕΡΜΑΤΑ ΓΑΛΕΟΥ ΓΙΑ  
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

**ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ**

**ΚΑΡΑΦΥΛΛΙΔΟΥ ΜΑΡΘΑ**

**ΣΕΛΙΔΟΥ ΕΛΙΖΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ**

**ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΒΑΣΙΛΗΣ**

*Θεσσαλονίκη 2015*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστούμε τον καθηγητή του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων Βασίλη Καραγεωργίου και Παναγιώτη Καραγιαννακίδη μεταδιδακτορικό ερευνητή του τμήματος για τη πολύτιμη βοήθεια τους και την καθοδήγησή τους σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αυξανόμενη ζήτηση για το κολλαγόνο και τη ζελατίνη από τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων σε όλο τον κόσμο. Η ζελατίνη των θηλαστικών (χοίρων και βοοειδών), είναι η πιο δημοφιλής αλλά η χρήση της άρχισε να μειώνεται λόγω της ανησυχίας των καταναλωτών για την υγεία τους αλλά και για κοινωνικούς και πολιτιστικούς λόγους. Έτσι η παραγωγή της ζελατίνης των ψαριών άρχισε να χρησιμοποιείται ως μια εναλλακτική λύση για τα τρόφιμα, για την ικανοποίηση των αναγκών των καταναλωτών αλλά και να εκμεταλλευτούν κάποια από τα παραπροϊόντα της αλιείας.

Σε αυτή τη πειραματική μελέτη εξετάστηκε η παραγωγή πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου προς αντικατάσταση της εμπορικά διαθέσιμης βόειας ζελατίνης και η δημιουργία πηκτών με τη προσθήκη ταννικού οξέος με σκοπό τη δημιουργία σταυροδεσμών. Μελετήθηκε το πορώδες και η % διόγκωση των πηκτών και παρατηρήθηκε ότι αυξάνονται με την αύξηση του ταννικού οξέος, το μέτρο Young των πηκτών που φάνηκε να μην επηρεάζεται σημαντικά με τη προσθήκη του ταννικού οξέος και η % μεταβολή του βάρους των πηκτών στο νερό η οποία μειώνεται με τη αύξηση του ταννικού οξέος. Γενικά παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του ταννικού οξέος αυξάνει την αντοχή της πηκτής στο νερό.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
2. ΒΙΒΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	6
2.3 ΠΗΚΤΕΣ.....	6
2.3.1 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΟΡΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ.....	9
2.4 ΖΕΛΑΤΙΝΗ.....	11
2.4.1 ΖΕΛΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ.....	11
2.4.2 ΖΕΛΑΤΙΝΗ ΨΑΡΙΩΝ.....	12
2.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	13
2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ.....	15
2.7 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ.....	17
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
3.1. ΥΛΙΚΑ.....	21
3.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ.....	21
3.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΗΚΤΩΝ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ.....	21
3.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ.....	22
3.5. % ΔΙΟΓΚΩΣΗ ΠΗΚΤΩΝ.....	22
3.6. ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	22
3.7. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ.....	22
3.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	22
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
4.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ.....	23
4.2. % ΔΙΟΓΚΩΣΗ ΠΗΚΤΩΝ.....	23
4.3. ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	24
4.4. % ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΒΑΡΟΥΣ.....	25
4.5. % ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ ΒΑΡΟΣ.....	26
4.6. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ.....	26
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	28
6. ΜΕΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	29
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	30
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	34

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η ζελατίνη είναι ένα πρωτεϊνικό προϊόν που προέρχεται από μερική υδρόλυση του κολλαγόνου που εξάγεται από το δέρμα, τα οστά, τους χόνδρους, τους συνδέσμους, κ.τ.λ. Η ζελατίνη είναι λειτουργική πρωτεΐνη υψηλής αξίας, λόγω της ικανότητάς της να σχηματίζει διαφανείς πηκτές. Γενικά λαμβάνεται με θερμική διάλυση σε αλκαλικό ή όξινο pH και μερική υδρόλυση του κολλαγόνου. Η ζήτηση για κολλαγόνο και ζελατίνη από τη βιομηχανία σε όλο τον κόσμο είναι σημαντική και βρίσκεται σε άνοδο (Wasswa *et al.*, 2007). Η παγκόσμια ζήτηση για τη ζελατίνη έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και πρόσφατες εκθέσεις αναφέρουν ότι η ετήσια παγκόσμια παραγωγή ζελατίνης είναι σχεδόν 326.000 τόνους (Karim & Bhat 2009). Το κολλαγόνο είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη ζωικής προέλευσης, η οποία περιλαμβάνει περίπου το 30% του συνόλου των ζωικών πρωτεϊνών, και είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο δέρμα και στα οστά όλων των ζώων. Η δομή του κολλαγόνου είναι μια τριπλή έλικα που αποτελείται από τρεις διακριτές α-αλυσίδες που υιοθετούν μια 3-τρισδιάστατη δομή. Η ζελατίνη είναι ένα συστατικό που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων. Η ζελατίνη χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων για τη βελτίωση της υφής, την ικανότητα συγκράτησης νερού και τη σταθερότητα σε πολλά προϊόντα τροφίμων. Ακόμη, έχει χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητής και σαν προστατευτικό υλικό επικάλυψης. Σημαντικές ποσότητες ζελατίνης χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, όπως σε επιδόρπια, καραμέλες, προϊόντα αρτοποιίας, ζελέ, παγωτό, και γαλακτοκομικά προϊόντα. Η ζελατίνη βρίσκει επίσης εφαρμογή στη φαρμακευτική βιομηχανία για την παρασκευή φαρμακευτικών καψουλών, αλοιφών, καλλυντικών και γαλακτωμάτων. Τέλος η ζελατίνη βρίσκει εφαρμογή και στη φωτογραφία για κάποιες εξειδικευμένες βιομηχανίες (Wasswa *et al.*, 2007). Ωστόσο, αν και η ζελατίνη ζωικής προέλευσης έχει πολλές χρήσιμες εφαρμογές, οι καταναλωτές προβληματίζονται και ανησυχούν για τη χρήση της. Αυτό οφείλεται κυρίως σε θρησκευτικούς λόγους του Ιουδαϊσμού και του Ισλάμ όπου απαγορεύουν την κατανάλωση χοιρινού κρέατος και του Ινδουισμού όπου δεν καταναλώνουν την αγελάδα καθώς και προϊόντα της, τέλος οφείλεται και στην υπέρχει αυστηρών χορτοφάγων. Έτσι μέσα στην τελευταία δεκαετία υπήρξε έντονο ενδιαφέρον για την αγορά σε ζελατίνη που προέρχεται από τα ψάρια και τα πουλερικά. Το δέρμα και τα οστά των πουλερικών αναμένεται να αποδώσουν ζελατίνη στο μέλλον. Η ζελατίνη ψαριού έχει επισημανθεί ως καλύτερη εναλλακτική λύση για ζελατίνες θηλαστικών, ιδιαίτερα λόγω του χαμηλού σημείου τήξης που έχει, με αποτέλεσμα την ταχύτερη διάλυση στο στόμα. Ωστόσο, η παραγωγή της ζελατίνης ψαριών είναι ακόμα πολύ μικρή,

συμβάλλοντας μόνον κατά περίπου 1% στην ετήσια παγκόσμια παραγωγή ζελατίνης (Karim & Bhat 2009).

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η παραγωγή ζελατίνης από δέρματα γαλέου για να σχηματιστούν πηκτές και να μελετηθεί ο χρόνος διάλυσης των πηκτών, οι μηχανικές ιδιότητες, το πορώδες και η διόγκωση τους στο νερό.

## **2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

### **2.3 ΠΗΚΤΕΣ**

Πηκτές ζελατίνης χρησιμοποιούνται από βιομηχανίες τροφίμων για πύκνωση και σταθεροποίηση προϊόντων όπως καραμέλες, γιαούρτια επιδόρπια και ζελέ. Οι μηχανικές ιδιότητες των πηκτών παίζει σημαντικό ρόλο στην τελική υφή του προϊόντος.

Οι πηκτές ορίζονται ως στερεά όπως είναι τα συστήματα που αποτελούνται από μία στερεή ουσία διεσπαρμένη ή διαλυμένη στην υγρή φάση. Οι δύο αυτές φάσεις αλληλοσυνδέονται με ένα δίκτυο το οποίο εκτείνεται σε όλο το σύστημα. Η διασύνδεση αυτή μπορεί να είναι είτε φυσική είτε χημική προκαλώντας τους φυσικούς ή χημικούς όρους αντίστοιχα (D'Amico *et al.*, 2014).

Η ζελατίνη διαλύεται σε νερό > 40°C όπου υπάρχουν ουσιαστικά απομονωμένες και ελαφρώς διασταυρωμένες αλυσίδες. Τα διαλύματα ζελατίνης σχηματίζουν πηκτές κατά την ψύξη κάτω από τη θερμοκρασία ζελατινοποίησης. Πιστεύεται ότι οι πηκτές ζελατίνης περιέχουν εκτεταμένους φυσικούς σταυροειδείς δεσμούς ή ζώνες διασταύρωσης που σχηματίζονται από τη μερική αναστροφή της τριπλής έλικας του κολλαγόνου. Η ενεργειακά πιο ευνοϊκή δομή της ζελατίνης θα είναι ίση με αυτή του φυσικού κολλαγόνου. Ωστόσο η πλήρης αναδιάταξη εμποδίζεται από τις περιπλέξεις των αλυσίδων στο διάλυμα το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα ένα τρισδιάστατο δίκτυο. Η ζώνη διασταύρωσης που δημιουργήθηκε κατά την πήξη είναι πλούσια σε (Cly- Pro-Hyp) τα οποία είναι σημαντικά για το σχηματισμό της τριπλής έλικας του κολλαγόνου (Isaksson & Segtnan 2002).

Έχει προταθεί μία ταξινόμηση των διαφόρων τύπων πηκτών. Δεν λαμβάνεται υπόψη μόνο η φαινομενολογική συμπεριφορά αλλά και η μικροσκοπική περιγραφή βασισμένη στη μοριακή φύση του διασκορπισμένου συστατικού και στην αρχιτεκτονική του σκελετού. Έτσι ο όρος πηκτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να περιγράψει συστήματα που χαρακτηρίζονται από τα εξής:

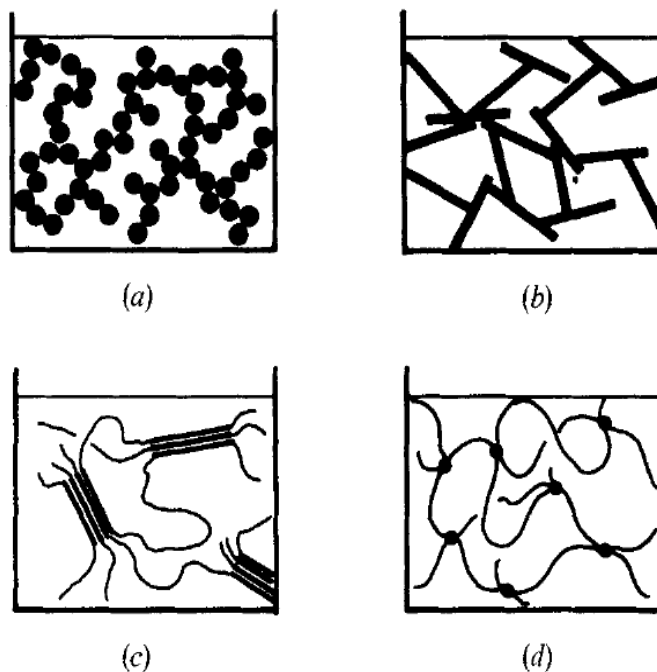
- 1) Θα πρέπει να είναι συνεκτικά συστήματα δύο συστατικών που σχηματίζονται από μία στερεά ουσία τέλεια διασκορπισμένη ή διαλυμένη στην υγρή φάση.
- 2) Θα πρέπει να εμφανίζουν στερεά συμπεριφορά υπό την επίδραση μηχανικών δυνάμεων.
- 3) Τόσο η διεσπαρμένη φάση όσο και ο διαλύτης θα πρέπει να αλληλοσυνδέονται και να επεκτείνονται συνεχώς σε όλο το σύστημα.

Το τελευταίο σχετίζεται άμεσα με τη μικροσκοπική παρατήρηση της δομής της πηκτής η οποία έγινε εφικτή μόνο με τη χρήση της υπερμικροσκοπίας και των ηλεκτρικών μικροσκοπίων.

Προτάθηκαν τέσσερις διαφορετικοί τύποι δομής οι οποίοι παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.

Το σχήμα 1a δείχνει τη διάταξη των κολλοειδών σφαιρικών σωματιδίων όπου το καθένα αντιπροσωπεύει ένα συσσωμάτωμα μικρών μορίων είτε κρυσταλλικής είτε άμορφης φύσης. Το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να είναι της τάξης 5 έως 100 nm. Τέτοιες δομές σχηματίζονται σε διαλύματα υπεροξειδίων των μετάλλων υπό ορισμένες συνθήκες ηλεκτρόλυσης.

Το σχήμα 1b δείχνει ένα πλαίσιο από ραβδοειδή σωματίδια από ίνες κατασκευασμένες από μικρού μοριακού βάρους κρυσταλοποιήσιμα μόρια. Οι ίνες μπορούν να φθάσουν



Σχήμα 1. Διάφοροι τύποι δομής πηκτώματος:

(Djabourou, 2006)

σε μήκος 10  $\mu\text{m}$ . Το σχήμα 1c και το σχήμα 1d αναφέρονται ειδικότερα σε πολυμερές πηκτές. Το σχήμα 1c είναι ένα δίκτυο από γραμμικά μακρομόρια που πραγματοποιήθηκε εν μέρει μαζί με κρυσταλλικές διασταυρωμένες ζώνες. Οι διασταυρώσεις σχηματίζονται όταν υποβάλλονται σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Αυτές οι πηκτές ονομάζονται φυσικές. Το σχήμα 1d αντιπροσωπεύει μία πηκτή χημικά πολυμερή από γραμμικά μακρομόρια που γεφυρώνονται από ομοιοπολικούς δεσμούς.

Οι δεσμοί μεταξύ των στερεών σωματιδίων ή μεταξύ των μακρομορίων παίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της θερμικής και μηχανικής σταθερότητας του πλαισίου. Οι δυνάμεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση των σωματιδίων είναι οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου και οι χημικοί δεσμοί (δεσμοί σθένους). Οι δύο πρώτοι τύποι είναι ευαίσθητοι στις μεταβολές της θερμοκρασίας, στο pH και στις ιοντικές δυνάμεις του διαλύματος. Όταν οι δυνάμεις είναι πολικής φύσεως ο ίδιος ο διαλύτης συμμετέχει στο



σχηματισμό των δεσμών. Αυτό είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην περίπτωση των μορίων του νερού σε υδατικά θερμοαντιστρεπτά τζελ (όπως η ζελατίνη και η αγαρόζη) (Djabourou, 2006).

Δεδομένου ότι οι πηκτές ζελατίνης που σχηματίστηκαν με απλή θερμική επεξεργασία διαλύονται εύκολα σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, συνήθως υποβάλλονται σε μη αναστρέψιμη κατεργασία διασύνδεσης προκειμένου να ενισχυθεί η θερμική και μηχανική σταθερότητά τους καθώς και να επιβραδυνθεί ο ρυθμός αποικοδόμησής τους. Μόνιμη διασταυρωμένη σύνδεση επιτυγχάνεται με την εισαγωγή διαμοριακών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων ζελατίνης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με φυσικές μεθόδους όπως επεξεργασία με θερμότητα ή με ακτινοβολία, είτε με χημικές μεθόδους δηλαδή με αντίδραση της ζελατίνης με διάφορους τύπους χημικών παραγόντων.

Αλδεΰδες όπως η φορμαλδεΰδη η γλουταραλδεΰδη είναι αποτελεσματικοί παράγοντες σταυροειδούς διασύνδεσης της ζελατίνης και του κολλαγόνου. Δυστυχώς η χρήση τους προκαλεί προβλήματα όπως κυτταροτοξικότητα και ασβεστοποίηση, πράγμα το οποίο οδηγεί σε διαδικασία με πιο συμβατές ουσίες που σχηματίζουν σταυροδεσμούς όπως το υδατοδιαλυτό 1-αιθυλο-3- καρβοδιιμίδιο (EDC). Επίσης άλλες μη τοξικές φυσικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία σταυροειδούς σύνδεσης είναι η γενιπίνη (genipin) και φαινολικές ουσίες όπως το ταννικό οξύ. Η ζελατίνη μπορεί επίσης να σχηματίσει σταυροειδείς δεσμούς με τη χρήση τρανσγλουταμινάσης, όπου σε αυτήν την περίπτωση τα ένζυμα λειτουργούν ως καταλύτες των αντιδράσεων, όπου δημιουργούν ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων ζελατίνης. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται χημικοί παράγοντες σταυροειδούς σύνδεσης.

Πίνακας 1. Χρήσεις διαφόρων παραγόντων χημικής σταυροειδούς σύνδεσης.

<b>Ουσίες δημιουργίας σταυροδεσμών</b>	<b>Αναφορά</b>
EDC	Coimbra <i>et al</i> ,2014 , Giorgiera & Kokol, 2014 , Kuijpers <i>et al</i> , 1999 , Cristiano <i>et al</i> , 2010
Γλουταραλδεΰδη	Zhiyuan <i>et al</i> , 2012 , Buhus <i>et al</i> ,2009 , Darline <i>et al</i> , 2006
Βόρακας	Fang <i>et al</i> , 2014 , William <i>et al</i> , 2010
Τρανσγλουταμινάση	Barbari <i>et al</i> , 2010 , Fang <i>et al</i> , 2014
Φορμαλδεΰδη	Grattam, 2012

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που επιλέγεται για την παρασκευή χημικών σταυροειδών δεσμών στη ζελατίνη το φαινόμενο της φυσικής ζελατινοποίησης θα είναι πάντα παρόν και θα συμβεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό αμέσως μόλις η θερμοκρασία είναι επαρκώς χαμηλή. Έτσι η τελική δομή και οι ιδιότητες του δικτύου των χημικών σταυρωδεσμών θα καθορίζονται από τον τρόπο που οι δύο διαδικασίες θα λαμβάνουν χώρα. Αυτή η ιδιαίτερη πτυχή έχει ερευνηθεί με τη χρησιμοποίηση ρεολογικών και οπτικών μετρήσεων περιστροφής που ακολουθούν το σχηματισμό δικτύων ζελατίνης κάτω από διαφορετικά θερμικά πρωτόκολλα στα οποία η φυσική και χημική διασταυρούμενη σύνδεση έγιναν ταυτόχρονα ή διαδοχικά. Επίσης αυτή η έρευνα έδειξε ότι οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες των σχηματιζόμενων δικτύων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλουχία του σχηματισμού και από την ποσότητα των τριπλών ελίκων και τους ομοιοπολικούς δεσμούς που σχηματίζονται (Coimbra & Figyeiredo, 2014).

### **2.3.1 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΟΡΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ**

Η έλλειψη δωρητών οργάνων και ιστών έχει δημιουργήσει την ανάγκη για αντικατάσταση τους από νέα βιολογικά υποκατάστατα που δημιουργούνται από ειδικά κύτταρα ιστών και φυσικά η πολυμερή πλέγματα. Αυτά τα πολυμερή παίζουν σημαντικό ρόλο στη μηχανική των ιστών ως ικριώματα που υποστηρίζουν τα κύτταρα και ως φορείς των παραγόντων ανάπτυξης που επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση τους. Η κατασκευή τρισδιάστατων πορωδών ικριωμάτων με αυστηρά ελεγχόμενη πορώδη δομή είναι μία από τις πλέον σημαντικές απαιτήσεις για την επιτυχή αναγέννηση ιστού, η οποία δε προσδιορίζει κατά κύριο λόγο μόνο την απόδοση με σπορά του κυττάρου αλλά επίσης και την προσκόλληση των κυττάρων, τη μετανάστευση, την εξέλιξη της διαφοροποίηση και τη δημιουργία νέου ιστού. Ως υλικό ικριώματος η ζελατίνη θεωρείται ως ένα από τα πλέον υποσχόμενα βιοαποικοδομίσια οργανικά υλικά δεδομένου ότι μπορεί και μοιάζει με τη χημική δομή και τις βιολογικές λειτουργίες του κολλαγόνου χωρίς ανοσογονικές ανησυχίες. (Jo *et al.*, 2014).

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται για αυτούς τους σκοπούς πρέπει να πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις. Πρώτον το υψηλό πορώδες είναι αναγκαίο για να παρέχει επαρκεί χώρο και επιφάνεια για κυτταρική σπορά στο προσωρινό ικρίωμα πριν την εμφύτευση. Επιπλέον αυτό το πορώδες ικρίωμα θα πρέπει να αναστέλλει τη διάχυση των σπόρων των κυττάρων στους περιβάλλοντες ιστούς μετά την εμφύτευση και θα πρέπει να προωθεί την αγγείωση του αναπτυσσόμενου ιστού. Δεύτερον τα πορώδη βιολικά πρέπει να είναι εντελώς

βιοαποικοδομίσιμα και να αποβάλλονται από το σώμα καθώς αυτά τα τεχνητά υποστρώματα χρειάζονται μόνο προσωρινά. Προσφάτως η κατασκευή των πορώδη βιοϋλικών έχει επιτευχθεί μεταξύ άλλων με λυοφιλίωση .

Σε γενικές γραμμές οι πηκτές τύπου ‘σφουγγάρι’ έχουν αναπτυχθεί με την τεχνική της κατάψυξης και χρησιμοποιούνται σαν επίδεσμοι τραυμάτων.

Η τεχνική της λυοφιλίωσης έχει υιοθετηθεί ευρέως σε φαρμακευτικές και βιομηχανίες τροφίμων δεδομένου ότι η τεχνική αυτή έχει αυξημένη σταθερότητα και παράγει προϊόντα τα οποία μπορούν να διαλυθούν ταχύτατα σε πολλές εφαρμογές, όπως η μεταφορά φαρμάκου συμπεριλαμβανομένων και των αντιβιοτικών συστημάτων. Μετά από μία σύγκριση δύο τεχνικών ξήρανσης (ξήρανση με αέρα και ξήρανση με κατάψυξη) έχει διαπιστωθεί ότι οι ιδιότητες απελευθέρωσης του φαρμάκου από το πολυμερές δίκτυο εξαρτώνται από τη μέθοδο ξήρανσης. Ακόμα και αν η τεχνική της λυοφιλίωσης παράγει πορώδη και με μορφολογία σφουγγαριού τα πολυμερή που υπέστηκαν αυτή τη διαδικασία είναι συχνά άμορφα και έχουν χαμηλό βαθμό κρυσταλλικότητας όπου αυτό σε ορισμένα φαρμακευτικά προϊόντα μειώνει τη σταθερότητά τους (Ikada *et al.*, 1999).

Μέχρι τώρα έχουν αναπτυχθεί μία σειρά από μεθόδους που παράγουν εξαιρετικά πορώδη πολυμερή με πορώδες > 90% κατ’ όγκο συμπεριλαμβανομένης της λυοφιλίωσης, της χύτευσης και εξάτμισης διαλύτη, την έκπλυση άλατος και το φυσικό αέριο που βασίζεται σε τεχνικές αφρισμού.

Η λυοφιλίωση μπορεί να δημιουργήσει πόρους στην καθαρή ζελατίνη. Το φυσικό αέριο που βασίζεται στην τεχνική αφρισμού μπορεί να επιτεύξει πολύ υψηλό πορώδες, μεγάλους πόρους και μεγάλες διασυνδέσεις μεταξύ των πόρων, είτε με ενσωμάτωση αερίου είτε με χημική αντίδραση. Το πρόβλημα αυτής της μεθόδου είναι η επίπλευση φυσαλίδων του ελαφριού αερίου με αποτέλεσμα την ανομοιομορφη πορώδη δομή.

Έχει προταθεί μία καινούργια τεχνική ‘αφρισμού / κατάψυξης’ ως νέος τρόπος παραγωγής εξαιρετικά πορώδους ζελατίνης με υψηλό πορώδες >90%, μεγάλους πόρους (>200nm) και μεγάλες διασυνδέσεις μεταξύ πόρων (100-200nm) καθώς και προσαρμοσμένες επιφανειακές υφές . Αυτή η τεχνική μπορεί να ενσωματώσει άμεσα φυσαλίδες αέρα εντός της ζελατίνης και να σταθεροποιηθούν χωρίς επίπλευση μέσω της ταχείας κατάψυξης στους -70° C (Jo *et al.*, 2014).

## 2.4 ΖΕΛΑΤΙΝΗ

Η Ζελατίνη παράγεται μέσω μερικής υδρόλυσης του φυσικού κολλαγόνου. Οι πηγές παραγωγής ζελατίνης είναι το δέρμα χοίρου (46%), τα δέρματα βοοειδών (29,4%) και τα οστά των χοίρων και των βοοειδών (23,1%). Η ζελατίνη των ψαριών αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1,5% της συνολικής παραγωγής ζελατίνης (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Η ζελατίνη είναι ένα ετερογενές μίγμα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με υψηλό μοριακό βάρος. Οι εμπορικές ζελατίνες περιέχουν περίπου 88% πρωτεΐνες, 10% υγρασία, και 1-2% άλατα και μπορούν να διατηρούν περισσότερο από 50 φορές σε βάρος του νερού εντός των δομών του πήγματος (Wasswa *et al.*, 2007). Ως ένα είδος πρωτεΐνης, η ζελατίνη που λαμβάνεται με μερική αποδόμηση του κολλαγόνου έχει αποκτήσει όλο και περισσότερη σημασία εξαιτίας της αφθονίας, βιοσυμβατότητας, εδωδιμότητας και βιοδιασπασιμότητας. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων, τα υλικά με βάση ζελατίνη έχουν μεγαλύτερες δυνατότητες εφαρμογής στη συσκευασία των τροφίμων, στη μηχανική ιστών, και στη χορήγηση φαρμάκων. Σε σύγκριση με το κολλαγόνο, η ζελατίνη είναι φθηνότερη και δεν παρουσιάζει αντιγονικότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες (Shengbin *et al.*, 2014).

### 2.4.1 ΖΕΛΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 27 διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου. Το κολλαγόνο είναι ινώδης πρωτεΐνη, που αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές α-αλυσίδες που ενώνονται μεταξύ τους για τη δημιουργία μια τριπλής έλικας. Κάθε αλυσίδα στην έλικα περιστρέφεται αριστερόστροφα. Η τριπλή έλικα έχει μήκος περίπου 300 nm και η αλυσίδα έχει μοριακό βάρος περίπου 105 kDa. Οι τριπλές έλικες σταθεροποιούνται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων. Η μετουσίωση του κολλαγόνου προκαλεί διαχωρισμό των αλυσίδων λόγω της καταστροφής των δεσμών υδρογόνου, προκαλώντας απώλεια της διαμόρφωσης τριπλής έλικας. Η σύνθεση του κολλαγόνου περιλαμβάνει και τα 20 αμινοξέα. Είναι η μόνη πρωτεΐνη θηλαστικού που περιέχει μεγάλες ποσότητες σε υδροξυπρολίνη και σε υδροξυλυσίνη, και το συνολικό ιμινο οξύ (προλίνη και υδροξυπρολίνη) σε υψηλή περιεκτικότητα. Η σύνθεση αμινοξέων της ζελατίνης χαρακτηρίζεται από μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 3 αμινοξέων Gly-X-Y, όπου το X είναι η προλίνη και το Y είναι η υδροξυπρολίνη (Karim & Bhat 2009). Τα κολλαγόνα ψαριών έχουν αποδειχθεί ότι ποικίλουν ευρέως ως προς τη σύνθεση των αμινοξέων τους. Ειδικότερα, τα επίπεδα των αμινοξέων προλίνης και υδροξυπρολίνης ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των διάφορων ειδών ψαριών. Η ποσότητα των αμινοξέων, ιδιαίτερα της υδροξυπρολίνης, εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν τα ψάρια και αυτό επηρεάζει τη θερμική

σταθερότητα του κολλαγόνου. Κολλαγόνα που προέρχονται από τα είδη ψαριών που ζουν σε ψυχρό περιβάλλον έχουν χαμηλότερο περιεχόμενο σε υδροξυπρολίνη και παρουσιάζουν μικρότερη θερμική σταθερότητα από ότι εκείνα που προέρχονται από τα ψάρια που ζουν σε θερμό περιβάλλον. Αυτό συμβαίνει επειδή η υδροξυπρολίνη επηρεάζει το δεσμό υδρογόνου, ο οποίος σταθεροποιεί την τριπλή ελικοειδή δομή του κολλαγόνου (Wasswa *et al.*, 2007 ; Duconseille *et al.*, 2014). Το κολλαγόνο είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη που αντιπροσωπεύει το 30% περίπου του συνόλου των πρωτεϊνών στο σώμα του ζώου. Είναι το κύριο συστατικό του εξωκυτταρικού πλέγματος και είναι ζωτικής σημασίας για τη μηχανική προστασία των ιστών και οργάνων. Η χρήση του κολλαγόνου αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς σε καλλυντικά και στη φαρμακευτική βιομηχανία. Μεταξύ των διαφόρων τύπων, το κολλαγόνο τύπου I έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως βιοϋλικό για την ανάπτυξη ικριωμάτων μηχανικής ιστού. Ωστόσο, λόγω της εμφάνισης της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (ΣΕΒ), της μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας (ΜΣΕ), του αφθώδη πυρετού (FMD) σε χοίρους και βοοειδή, η χρήση του κολλαγόνου και παράγωγων προϊόντων από τις πηγές αυτές έχουν περιοριστεί. Το κολλαγόνο τύπου I εξάγεται από το δέρμα, τα οστά, τα πτερύγια και τα λέπια ψαριών και οι πηγές αυτές εκτιμήθηκαν για την πιθανή εφαρμογή τους ως εναλλακτική λύση στο κολλαγόνο θηλαστικών (Pati *et al.*, 2010).

#### **2.4.2 ΖΕΛΑΤΙΝΗ ΨΑΡΙΩΝ**

Η ζελατίνη ψαριών είναι μια πιθανή εναλλακτική λύση για την ζελατίνη βοοειδούς. Η ζελατίνη ψαριών είναι αποδεκτή για το Ισλάμ, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ελάχιστους περιορισμούς στον Ιουδαϊσμό και τον Ινδουισμό. Επιπλέον, το δέρμα των ψαριών, το οποίο είναι ένα σημαντικό υποπροϊόν της βιομηχανίας μεταποίησης ιχθύων, προκαλώντας απόβλητα και ρύπανση, θα μπορούσε να προσφέρει μια πολύτιμη πηγή ζελατίνης. Το δέρμα των ψαριών περιέχει μεγάλη ποσότητα κολλαγόνου. Η παραγωγή ζελατίνης ψαριών δεν είναι κάτι καινούριο δεδομένου ότι έχει παραχθεί από το 1960 με εκχύλιση οξέος (Karim & Bhat 2009). Έτσι, η βιομηχανική χρήση του κολλαγόνου ή ζελατίνης που προέρχεται από είδη μη-θηλαστικά είναι ολοένα και μεγαλύτερης σημασίας. Τα τελευταία χρόνια δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις πρώτες ύλες από τα ψάρια και τα πουλερικά. Σε ό,τι αφορά τη ζελατίνη ψαριού, ο τεράστιος αριθμός των ειδών που έχουν πολύ διαφορετικά εγγενή χαρακτηριστικά, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εξόρυξης, καθώς και της παραγωγής ζελατίνης, που λαμβάνεται κυρίως από το δέρμα και τα κατάλοιπα των οστών (Lassoued *et al.*, 2014 ; Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Το ψάρεμα χρησιμοποιείται κυρίως για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Τα ψάρια που

χρησιμοποιούνται ως ανθρώπινη τροφή υπολογίζονται σε 78% του συνόλου των αλιευμάτων στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες, όπου περίπου το 21% είναι απόβλητα ψαριών (π.χ., το δέρμα, τα οστά), το οποίο γενικά απορρίπτεται (~ 7,3 εκατομμύρια τόνοι / έτος). Κατά συνέπεια, έρευνα έχει αρχίσει να γίνεται για τη χρησιμοποίηση κολλαγόνου από τα απόβλητα των ψαριών για την παραγωγή ζελατίνης. Παρά το γεγονός ότι η ζελατίνη ψαριού έχει μελετηθεί από το 1950, οι περισσότερες μελέτες σχετικά με ζελατίνη αναφέρονται σε ζελατίνη θηλαστικών, και μόνο τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει μελέτες για τη ζελατίνη ψαριών και άρχισαν να εμφανίζονται στη βιβλιογραφία (Gómez-Guillén *et al* 2011).

## **2.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Η ζελατίνη ψαριών που χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, θα πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: να βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα, να είναι οικονομική, βιοσυμβατή, βιοδιασπώμενη και να διατηρεί τις ρεολογικές ιδιότητες (αντοχή γέλης, σημεία τήξης, κλπ). Παρά το γεγονός ότι η ζελατίνη ψαριών δεν αποτελεί ιδιαίτερα ισχυρή γέλη, είναι κατάλληλη για ορισμένες βιομηχανικές εφαρμογές, για παράδειγμα, μικρο-εγκλεισμούς και φωτοευαίσθητα επιχρίσματα. Επίσης χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία καλλυντικών ως δραστικό συστατικό (π.χ., σαμπουάν με πρωτεΐνη). Η ζελατίνη ψαριών επειδή έχει διαφορετικές ιδιότητες από τη ζελατίνη θηλαστικών και επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα όπου η ζελατίνη θηλαστικών δεν μπορεί για πολιτιστικούς ή θρησκευτικούς λόγους μπορεί να δημιουργήσει νέες εφαρμογές ως συστατικό των τροφίμων. Για παράδειγμα, μη τροποποιημένες κρύες ζελατίνες ψαριών θα μπορούσαν πιθανόν να χρησιμοποιηθούν σε κατεψυγμένα προϊόντα και σε καταστάσεις όπου απαιτείται χαμηλή θερμοκρασία πηκτωματοποίησης (Wasswa *et al.*, 2007). Οι εφαρμογές του κολλαγόνου από διάφορες πηγές εξαρτώνται από τη θερμική σταθερότητα τους, η οποία έχει άμεση σχέση με το περιβάλλον διαβίωσης και τη θερμοκρασία των διαφόρων πηγών. Η κατώτερη θερμική σταθερότητα του κολλαγόνου ψαριών από εκείνη του κολλαγόνου θηλαστικού περιορίζει την εφαρμογή της ζελατίνης. Αν η θερμική σταθερότητα του κολλαγόνου από οποιοδήποτε είδος ψαριού είναι κοντά σε αυτή του κολλαγόνου των θηλαστικών, μπορεί να χρησιμεύσει ως καλύτερη εναλλακτική λύση. Επιπλέον, η θερμική σταθερότητα του κολλαγόνου έχει άμεση σχέση με την ύπαρξη ιμινο οξέων (υδροξυπρολίνη και προλίνη). Υψηλότερες περιεκτικότητες αυτών των ιμινο οξέων αυξάνουν την θερμική σταθερότητα του κολλαγόνου λόγω δημιουργίας σταυροειδούς δεσμούς (Pati *et al.*, 2010).

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΝΩΝ

Η ζελατίνη που παράγεται από τα δέρματα ψαριών που ζουν σε κρύα νερά δεν πήζει σε θερμοκρασία δωματίου και η θερμοκρασία πήκτωματοποίησης είναι κάτω από 8-10 °C. Επίσης η ζελατίνη από τα ψάρια που ζουν σε κρύα νερά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ψύξη ή κατάψυξη προϊόντων που καταναλώνονται ταχέως μετά την απομάκρυνση από το ψυγείο ή την απόψυξη, όπως και σε εφαρμογές που δεν απαιτούν υψηλή τιμή Bloom. Ζελατίνες με χαμηλό σημείο τήξης μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε ξηρά προϊόντα όπως μικρο-ενθυλάκωση, και στην πραγματικότητα, μία από τις κύριες εφαρμογές της ζελατίνης ψαριού είναι η μικροενθυλάκωση των βιταμινών και άλλων πρόσθετων φαρμάκων, χρωστικών ουσιών, αρωμάτων των τροφίμων, όπως φυτικό έλαιο, έλαιο λεμονιού, άρωμα σκόρδου, άρωμα μήλου, ή μαύρο πιπέρι. Η χρήση της ζελατίνης ψαριών για μαλακές κάψουλες είναι πιο συχνή σε συμπληρώματα διατροφής. Ως πρωτεΐνη, η ζελατίνη είναι χαμηλή σε θερμίδες, και λιώνει στο στόμα για να δώσει εξαιρετικές αισθητικές ιδιότητες που μοιάζουν με το λίπος, καθιστώντας το ιδανικό για χρήση σε προϊόντα με χαμηλά λιπαρά (Karim & Bhat 2009). Η ζελατίνη χρησιμοποιείται και σε διαλύματα με σκοπό να αποκτήσουν διαύγεια αλλά και για τη σταθερότητά. Η συγκέντρωση είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την επίτευξη της αποδοτικότητας και της αποτελεσματικότητας κατά την εφαρμογή ζελατίνης. Η ζελατίνη έχει την ικανότητα αφρισμού, έτσι βοηθά στην παραγωγή ενός σταθερού αφρού που δίνει στο προϊόν ελαφριά και αέρινη υφή. Σε προϊόντα αρτοποιίας, η ζελατίνη χρησιμοποιείται ως ένας παράγοντας ρύθμισης, και σαν σταθεροποιητικό υλικό σε πίτες, ψωμί, κέικ, χρησιμοποιείται επίσης σε γκλασαρίσματα διαφόρων τύπων ως σταθεροποιητικός παράγοντας. Η ποσότητα ζελατίνης που απαιτείται διαφέρει ανάλογα με τα προϊόντα αρτοποιίας. Η βιομηχανία κρέατος είναι μια από τις σημαντικότερες πηγές τροφίμων, όπου μεγάλες ποσότητες από ζελατίνη βρίσκουν εφαρμογή, ιδιαίτερα στην προετοιμασία των μαγειρεμένων ζαμπόν, αλλαντικών, τυριών, κονσερβών ζαμπόν και ζελέ με βάση το κρέας. Η ζελατίνη ακόμα χρησιμοποιείται σε κατεψυγμένα φρούτα και κατεψυγμένα προϊόντα γαλοπούλας, καθώς και στην παραγωγή ζωμού της ντομάτας και ζελέ (Djagny *et al.*, 2001). Επιπλέον η ζελατίνη χρησιμοποιείται και σαν διαυγαστικό μέσο σε ποτά σε λευκά κρασιά, στη μύρα και σε χυμούς φρούτων και λαχανικών. Η ζελατίνη χρησιμοποιείται σε επιδόρπια στο 8-10% σε ξηρό βάρος, σε γιαούρτι σε 0.3-0.5% ως παχυντικό, σε επιχρίσματα ζαμπόν στο 2-3%, και στη ζαχαροπλαστική για κάψουλες (συμπληρώματα βιταμίνης) σε 1.5-2.5%. Περαιτέρω χρήσεις περιλαμβάνουν επικάλυψη φρούτων για ζαχαροπλαστική, άμεση σάλτσα, στιγμιαίες σάλτσες και σούπες, ως

σταθεροποιητής σε παγωτά, τυρί κρέμα, καθώς και σε αφρώδη τρόφιμα και φρουτοσαλάτες (Karim & Bhat 2008).

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Ένας άλλος τομέας ενδιαφέροντος εκτός από τη βιομηχανία τροφίμων, όπου η χρήση της ζελατίνης δεν μπορεί να αγνοηθεί, είναι η φαρμακευτική βιομηχανία. Στις αναπτυγμένες χώρες, σχεδόν το 10% της βρώσιμης ζελατίνης πηγαίνει σε αυτόν τον τομέα για χρήση της σε κάψουλες και γαλακτώματα. Τα προϊόντα υδρόλυσης της ζελατίνης χρησιμοποιούνται για να αντισταθμίσουν την ανεπάρκεια ασβεστίου κατά την παιδική ηλικία και την εφηβεία, την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία ή την αντιμετώπιση της έλλειψης του ασβεστίου που σχετίζεται με την οστεοπόρωση. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές που υποδεικνύουν τα οφέλη της ζελατίνης για την υγεία των οστών και των αρθρώσεων. Επίσης η ζελατίνη χρησιμοποιείται στην παρασκευή ενέσιμων βιοϋλικών για χειρουργική των οστών (Djagny *et al.*, 2001). Στο φαρμακευτικό και τον ιατρικό τομέα, η ζελατίνη ακόμη χρησιμοποιείται ως μήτρα για τα εμφυτεύματα, σε ενέσιμες μικροσφαίρες παροχής φαρμάκου, και σε ενδοφλέβιες εγχύσεις. Υπάρχουν επίσης αναφορές στις οποίες εμβόλια εξασθενημένων ιών που περιέχουν ζελατίνη ως σταθεροποιητή χρησιμοποιούνται για την ανοσοποίηση κατά της ιλαράς, παρωτίτιδας, ερυθράς, της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, της λύσσας, της διφθερίτιδας και του τετάνου. Στη φαρμακευτική βιομηχανία, η ζελατίνη χρησιμοποιείται επίσης ευρέως για την παραγωγή σκληρών και μαλακών καψουλών, αναπτύγματα πλάσματος, και στη φροντίδα τραύματος. Επιπλέον, η ζελατίνη χρησιμοποιείται για τη μείωση των επιπέδων υδατανθράκων σε τρόφιμα σχεδιασμένα για διαβητικούς ασθενείς. Η ζελατίνη ψαριού με τιμή Bloom μεγαλύτερη από 100, χρησιμοποιείται ως ένα συστατικό σε δισκία φαρμάκων (Karim & Bhat 2009).

### **2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ.**

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ζελατίνης και οι πρώτες ύλες από τις οποίες προέρχεται είναι τα οστά, το δέρμα χοίρου και το δέρμα των ψαριών. Η διαδικασία προεπεξεργασίας που απαιτείται για την παραγωγή ζελατίνης, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο τύπος του κολλαγόνου, ο ιστός, το είδος ζώου, η ηλικία. Για παράδειγμα η ηλικία του ζώου επηρεάζει την ευκολία παραγωγής της ζελατίνης και την υδρόλυση του πεπτιδίου κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Ο τύπος της ζελατίνης που παράγεται εξαρτάται από το είδος των ψαριών και τη διαδικασία παραγωγής.



Το είδος των ψαριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση ζελατίνης ψαριών σε 2 γενικές ταξινομήσεις:

1)ζελατίνες από ψάρια κρύου νερού (γάδος), όπου έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε υδροξυπρολίνη και μικρή ικανότητα σχηματισμού πηκτής.

2)ζελατίνες από ψάρια ζεστού νερού (τόνος), οι ζελατίνες τόνου οι οποίες έχουν σημείο τήξεως 25-27°C, ως εκ τούτου είναι κατάλληλες για τα προϊόντα σε χαμηλή θερμοκρασία δωματίου (Wasswa *et al.*, 2007).

Υπάρχουν 2 μέθοδοι με τις οποίες το κολλαγόνο επεξεργάζεται προς ζελατίνη: με οξύ και με αλκάλια.

#### Οξίνη διαδικασία.

Τα δέρματα των ψαριών καθαρίζονται, υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση σε ένα περιστρεφόμενο τύμπανο και θερμαίνονται με ατμό σε θερμοκρασίες μεταξύ 60-65°C. Τα δέρματα στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε pH 1-4 με ένα ανόργανο οξύ όπως υδροχλωρικό, φωσφορικό ή θειικό οξύ για 8 έως 30 ώρες. Τα κατεργασμένα με οξύ δερμάτων στη συνέχεια πλένονται με νερό για να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες. Τα δέρματα ακολούθως εκχυλίζονται με ζεστό νερό όχι πάνω από 55°C, και το εκχύλισμα διηθείται. Το εκχύλισμα ζελατίνης συμπυκνώνεται υπό κενό ή υπερδιηθείται, το PH ρυθμίζεται μεταξύ 3,5-6, αποστειρώνεται σε θερμοκρασία μεταξύ 120-150°C για 13 δευτερόλεπτα, έπειτα ψύχεται, ξηραίνεται μέσω ενός κλιβάνου στους 70°C, αλέθεται στο καθορισμένο μέγεθος σωματιδίων και συσκευάζεται. Η ζελατίνη που προκύπτει έχει pH 7-9 (Wasswa *et al.*, 2007).

#### Αλκαλική διαδικασία.

Λόγω της περιεκτικότητας των οστών σε ανόργανα άλατα χρειάζεται περισσότερος χρόνος επεξεργασίας για την παραγωγή ζελατίνης. Το οστό θραύεται, θερμαίνεται σε 82-121°C, φυγοκεντρείται, και ξηραίνεται στους 71-132°C. Το οστό απομεταλλοποιείται με υδροχλωρικό οξύ. Η οστεΐνη πλένεται με νερό για την απομάκρυνση ακαθαρσιών. Στη συνέχεια διεξάγεται ασβέστωση με υδροξείδιο του ασβεστίου και ρυθμίζεται το pH σε 12 - 12,7 για 35 έως 70 ημέρες, κάτω από συνεχή ανάδευση και εβδομαδιαίες αλλαγές ασβέστη για να απομακρυνθούν όλα τα συστατικά πλην του κολλαγόνου. Η οστεΐνη στη συνέχεια πλένεται, κατά τη διαδικασία της πλύσεως προστίθεται ένα ανόργανο οξύ (υδροχλωρικό ή θειικό οξύ) για να εξουδετερωθεί η περίσσεια ασβέστου και να προσαρμόσει το pH στο 3. Το τελικό pH μετά από όλες τις πλύσεις είναι μεταξύ 5-7. Η ζελατίνη στη συνέχεια εκχυλίζεται από την οστεΐνη με απιονισμένο ζεστό νερό. Για την περαιτέρω απομάκρυνση προσμείξεων, το υγρό διάλυμα ζελατίνης μπορεί να διηθηθεί. Το διάλυμα ζελατίνης εξατμίζεται έως μια συγκέντρωση μεταξύ 15 και 45%. Η συμπυκνωμένη ζελατίνη διηθείται, το pH ρυθμίζεται

μεταξύ 5-7, και αποστειρώνεται στους 138-143°C για 8-12 δευτερόλεπτα, ψύχεται και ξηραίνεται με θερμό αέρα για 1-3 ώρες. Στη συνέχεια αλέθεται και συσκευάζεται. Η αλκαλική διαδικασία μπορεί να διαρκέσει έως και 20 εβδομάδες. Η ζελατίνη που προκύπτει έχει pH 4,8 – 5 (Wasswa *et al.*, 2007).

## **2.7 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ.**

Εκτός από τις βασικές ιδιότητες ενυδάτωσης, όπως η διόγκωση και η διαλυτότητα, οι πιο σημαντικές ιδιότητες του κολλαγόνου και της ζελατίνης μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες:

- 1) Η πρώτη κατηγορία αφορά ιδιότητες που σχετίζονται με τη ρεολογική συμπεριφορά, δηλαδή σχηματισμός πηκτής, τιμή Bloom, ικανότητα συγκράτησης νερού, ιξώδες, κ.λπ, και
- 2) Η δεύτερη κατηγορία αφορά ιδιότητες που σχετίζονται με την επιφανειακή συμπεριφορά, όπως γαλακτώματα, αφρισμός, κολλοειδή.

Η ζελατίνη κατηγοριοποιείται ως ένα φυσικό πήκτωμα, δηλαδή οι αλληλεπιδράσεις ή οι δεσμοί μεταξύ των αλυσίδων που συνθέτουν το υλικό είναι φυσικοί (αλληλεπιδράσεις van der Waals και δεσμούς υδρογόνου). Η ζελατίνη είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεϊνούχα ουσία που βρίσκει εκτεταμένη εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Οι ιδιότητες ζελατίνης επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από δύο κύριους παράγοντες, τα αρχικά χαρακτηριστικά του κολλαγόνου και τη μέθοδο επεξεργασίας (Wasswa *et al.*, 2007).

### Οι ρεολογικές ιδιότητες συνοψίζονται:

Η τιμή Bloom ορίζεται ως το βάρος σε γραμμάρια που απαιτείται για να παραμορφώσουμε κατά 4 mm, με τυποποιημένο κυλινδρικό έμβολο διαμέτρου 1,27 cm και ταχύτητα 1 mm/min, μία υδροπηκτική ζελατίνης (6,67%), που έχει προηγουμένως ωριμάσει στους 10 °C για 16-18 h (Karim & Bhat, 2009). Η ζελατίνη ψαριών έχει χαμηλή τιμή Bloom που κυμαίνεται από 0 έως 270, σε σύγκριση με τις υψηλές τιμές Bloom για τα βοοειδή ή ζελατίνη χοίρου, που έχουν τιμή Bloom 200-240. Ορισμένες όμως ζελατίνες ψαριών του ζεστού νερού παρουσιάζουν σχετικά υψηλές τιμές Bloom, κοντά στις τιμές Bloom της ζελατίνης χοιρινού, αυτές λοιπόν οι ζελατίνες ψαριών από ζεστά νερά έχουν υψηλή αντοχή πηκτής όπως η τιλάπια. Από την άλλη πλευρά, διαλύματα ζελατίνης ψαριών κρύου νερού μπορούν να παραμείνουν σε υγρή κατάσταση υπό συνθήκες της πρότυπης δοκιμής Bloom στους 10°C. Το ευρύ φάσμα των τιμών Bloom για τις ζελατίνες οφείλεται από τις διαφορετικές περιεκτικότητες των κολλαγόνων σε προλίνη και υδροξυπρολίνη (Gómez-Guillén *et al* 2011).

Το ιζώδες είναι η δεύτερη πιο σημαντική εμπορική φυσική ιδιότητα της ζελατίνης. Το ιζώδες ενός πυκνού διαλύματος ζελατίνης εξαρτάται κυρίως από υδροδυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων ζελατίνης. Το ιζώδες εξαρτάται επίσης από τη θερμοκρασία (πάνω από 40°C το ιζώδες μειώνεται εκθετικά με την αύξηση της θερμοκρασίας), το pH, και από την συγκέντρωση. Το ελάχιστο ιζώδες ζελατίνης έχει παρατηρηθεί να είναι στην κλίμακα pH 6-8 για πολλές ζελατίνες. Το σημείο τήξης της ζελατίνης αυξάνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους (Wasswa *et al.*, 2007).

Το ισοηλεκτρικό σημείο της ζελατίνης κυμαίνεται μεταξύ 4,8 και 9,4 και οι ζελατίνες με επεξεργασία οξύ έχουν υψηλότερη ισοηλεκτρικά σημεία από τις ζελατίνες που επεξεργάζονται με αλκάλια. Η ζελατίνη σχηματίζει εύκολα πηκτές σε ένα ευρύ φάσμα pH και σε με μία ποικιλία διαλυμένων ουσιών. Είναι γενικά αναγνωρισμένο ότι τα αμινοξέα, όπως η προλίνη και υδροξυπρολίνη, είναι σημαντικά στην αναδιάταξη των υπομονάδων ζελατίνης κατά τη διάρκεια της ζελατινοποίησης. Ως αποτέλεσμα, η ζελατίνη με υψηλά επίπεδα αμινοξέων δημιουργεί ισχυρότερη πηκτή και έχει υψηλότερο σημείο τήξης. Για εφαρμογές τροφίμων, η πηκτή, το ιζώδες και το σημείο τήξης είναι οι πιο σημαντικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν την ζελατίνη. Οι λειτουργικές ιδιότητες της ζελατίνης σχετίζονται με τα χημικά χαρακτηριστικά. Η πηκτή, το ιζώδες και το σημείο τήξης της ζελατίνης εξαρτώνται από την κατανομή του μοριακού βάρους και της σύνθεσης των αμινοξέων. Η ποιότητα της ζελατίνης για μία συγκεκριμένη εφαρμογή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ρεολογικές ιδιότητες. Το σημείο τήξης και σχηματισμού πηκτής της ζελατίνης έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την αναλογία των αμινοξέων προλίνης και υδροξυπρολίνης στο αρχικό κολλαγόνου (Wasswa *et al.*, 2007).

Οι ζελατίνες ψαριών έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε αμινοξέα (προλίνη και υδροξυπρολίνη) σε σύγκριση με ζελατίνες θηλαστικών και αυτός μπορεί να είναι ο λόγος για την μετουσίωση τους σε χαμηλή θερμοκρασία. Η πηγή και ο τύπος του κολλαγόνου θα επηρεάσουν τις ιδιότητες της ζελατίνης που θα προκύψει. Οι ζελατίνες ψαριών ζεστού νερού (τόνου και τιλάπια) έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε αμινοξέα από ότι οι ζελατίνες ψαριών κρύου νερού (μπακαλιάρος, προσφυγάκι και ιππόγλωσσα). Τα περιεχόμενα σε προλίνη και σε υδροξυπρολίνη είναι περίπου 30% για τις ζελατίνες θηλαστικών, 22-25% για ζελατίνες ψαριών θερμού νερού και 17% για ζελατίνες ψαριών κρύου νερού. Μία μελέτη σχετικά με τις ρεολογικές ιδιότητες της ζελατίνης των ψαριών και των θηλαστικών, έδειξε ότι η κύρια διαφορά μεταξύ τους είναι η περιεκτικότητα των αμινοξέων (προλίνη και υδροξυπρολίνη), η οποία σταθεροποιεί τη μορφή της ζελατίνης. Η μικρή περιεκτικότητα σε

προλίνη και υδροξυπρολίνη δίνει στη ζελατίνη ψαριών μικρή ικανότητα σχηματισμού πηκτής και χαμηλή θερμοκρασία τήξης (Gómez-Guillén *et al* 2011).

#### Μοναδικές ιδιότητες ζελατίνης.

- Μια φυσική ιδιότητα της ζελατίνης είναι το ότι " λιώνει στο στόμα" και αυτό οδηγεί στην γρήγορη απελευθέρωση γεύσης και αρώματος. Η συμπεριφορά αυτή είναι ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των συστημάτων ζελατίνης και είναι δύσκολο να μιμηθεί από άλλα συστήματα βιοπολυμερών.
- Η ζελατίνη είναι θερμικά αναστρέψιμη, οι πηκτές ζελατίνης αρχίζουν να τήκονται όταν η θερμοκρασία αυξηθεί πάνω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, τη θερμοκρασία τήξης, η οποία συνήθως είναι χαμηλότερη της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος.
- Η ζελατίνη είναι ένα ευέλικτο, πολυ-λειτουργικό υδροκολλοειδές και θεωρείται ένα από τα πιο ευπροσάρμοστα υδροκολλοειδή στο βιομηχανία τροφίμων. Η ζελατίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία πηκτών, για τη δέσμευση νερού, για γαλακτώματα και αφρούς και για σχηματισμό φιλμ. Κανένα άλλο υδροκολλοειδές δεν προσφέρει τον ίδιο συνδυασμό αυτών των λειτουργιών.
- Η ζελατίνη μπορεί να δημιουργεί πηκτές εντός των φυσιολογικών τιμών pH των περισσότερων τροφίμων και δεν απαιτεί την προσθήκη αλάτων ή σακχάρων. Άλλα πηκτικά υδροκολλοειδή συχνά απαιτούν την προσθήκη αλάτων, οξέων ή σακχάρων για να σχηματίσουν μια πηκτή (Karim& Bhat 2008).

Τέλος η ζελατίνη έχει επίσης αναφερθεί ότι έχει αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Η ζελατίνη ήταν μία από τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκε ως φορείς βιοδραστικών συστατικών. Φυσικά αντιοξειδωτικά ή αντιμικροβιακές ουσίες, όπως η ρίγανη, το δεντρολίβανο και τα φύλλα μυρτιάς χρησιμοποιήθηκαν για να προσθέσουν αντιοξειδωτική ικανότητα στα φιλμ ζελατίνης ψαριών. Αυτά τα συστατικά ήταν σε θέση να επεκτείνουν τις λειτουργικές ιδιότητες αυτών των βιοαποικοδομήσιμων φιλμ και να δημιουργήσουν μια ενεργή συσκευασία βιολικό (Nur Hanani 2014).

### **3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ**

- Δέρματα γαλέου
- Ταννικό οξύ
- Ρυθμιστικά διαλύματα NaOH 6N και HCl 0,1N
- Αιθανόλη
- Αναλυτής υφής TA. XT plus (Stable Micro Systems)
- Λυοφιλιωτής Micromodulyo (Thermo Savant)
- Μικρόμετρο Vernier Caliper ( 0-150mm)

#### **3.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ**

Αρχικά δέρματα γαλέου αποψύχθηκαν από τους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια με τη χρήση μαχαιριών απομακρύνθηκαν υπολείμματα σάρκας και τεμαχίσθηκαν τα δέρματα σε μικρά κομμάτια. Σε 3 διαφορετικές μέρες πάρθηκαν από περίπου 100 γραμμάρια δερμάτων γαλέου, τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 1000 mL και αναμίχθηκαν με 400 ml υδατικού διαλύματος NaOH 0,2 M. Η αλκαλική κατεργασία πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αλκαλική διαδικασία ξεπλύθηκαν τα δέρματα 3 φορές με νερό υπό ανάδευση ανά 10 λεπτά μέχρι την επίτευξη τιμής pH 7,0-7,5. Στη συνέχεια τα εξουδετερωμένα δέρματα στραγγίστηκαν και κατεργάστηκαν για 1 ώρα με τη προσθήκη 400 ml υδατικού διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1M υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την όξινη κατεργασία τα δέρματα ξεπλύθηκαν 2 φορές με νερό υπό ανάδευση ανά 10 λεπτά μέχρι την επίτευξη τιμής pH 6,5-7,0. Τα εξουδετερωμένα δέρματα αναμίχθηκαν με 400 mL προθερμασμένου νερού στους  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  και το μίγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , όπου και παρέμεινε υπό συνεχή ανάδευση για 1 ώρα. Το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από τα δέρματα με τη χρήση κόσκινου 25 mesh και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε διήθηση υπό ελαττωμένη πίεση (φίλτρο 5-13  $\mu\text{m}$ ). Το εκχύλισμα ζελατίνης τοποθετήθηκε σε πλαστικούς περιέκτες, οι οποίοι τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη και έπειτα στο λυοφιλιωτή για τη παραλαβή τελικού προϊόντος ζελατίνης.

#### **3.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΗΚΤΩΝ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ**

Για την παραγωγή πηκτών χρησιμοποιήθηκαν 1,334 g ζελατίνης τα οποία αναμίχθηκαν με 10ml απιονισμένο νερό και έπειτα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους  $40^{\circ}\text{C}$  με ανάδευση μέχρι διάλυση της ζελατίνης. Για τη δημιουργία σταυροειδών δεσμών και

επομένως ισχυρότερης πηκτής προστέθηκε ταννικό οξύ σε κατά βάρος αναλογία με τη ζελατίνη 1:300, 1:100 και 1:33,3 διαλυμένο σε 5 ml νερό. Παρασκευάστηκε και ένα δείγμα χωρίς την παρουσία ταννικού οξέως. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH στην τιμή 8. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν ξανά στο υδατόλουτρο και υποβλήθηκαν σε αντίδραση παρουσία O<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 40 °C για 1 ώρα. Μετά την αντίδραση τοποθετήθηκαν σε καλούπια και ψύχθηκαν στο ψυγείο για 14 ώρες. Αφού αφαιρέθηκαν από τα καλούπια, οι πηκτές ψύχθηκαν στη κατάψυξη και τοποθετήθηκαν για ξήρανση στο λυοφιλιωτή. Μετά την ξήρανση οι πηκτές τοποθετήθηκαν σε αιθανόλη για 10 λεπτά και τέλος αφέθηκαν στον απαγωγό μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.

### **3.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ**

Για τη μέτρηση του πορώδους οι πηκτές ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν οι διαστάσεις τους και το πορώδες υπολογίστηκε από την παρακάτω εξίσωση:

$$\pi = (1 - \rho_{\pi}/\rho_{\mu}) \cdot 100$$

όπου:  $\rho_{\pi}$  είναι η πυκνότητα του πορώδους υλικού (υπολογιζόμενο από το βάρος και τον όγκο των δειγμάτων) και  $\rho_{\mu}$ = 1270 (Hallstrom *et al*, 1990) είναι η πυκνότητα της ζελατίνης.

### **3.5. % ΔΙΟΓΚΩΣΗ ΠΗΚΤΩΝ**

Αρχικά οι πηκτές ζυγίστηκαν, έπειτα οι πηκτές τοποθετήθηκαν στο νερό για 10 λεπτά και στη συνέχεια ζυγίστηκαν. Τέλος για τον υπολογισμό της % διόγκωσης των πηκτών χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$(\text{Τελικό βάρος}-\text{Αρχικό βάρος})/\text{Αρχικό βάρος} \cdot 100$$

### **3.6. ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

Για τον υπολογισμό μηχανικών ιδιοτήτων αφού οι πηκτές τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στο νερό στη συνέχεια συμπίεστηκαν σε αναλυτή υφής με ταχύτητα κεφαλής  $u=1\text{mm/s}$  και παραμόρφωση 40%. Από τις καμπύλες που προέκυψαν τα δεδομένα επεξεργαστήκαν με χρήση του προγράμματος excel και προέκυψαν διαγράμματα τάσης-παραμόρφωσης όπου επιλέχθηκαν τα αρχικά σημεία της ευθείας ελαστικής περιοχής για τα οποία η γραμμική γραμμή τάσης είχε κατ' ελάχιστο  $R^2 > 0.95$  και από την κλίση της ευθείας υπολογίστηκε το μέτρο Young του κάθε δείγματος.

### **3.7. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ**

Για την αποδόμηση των πηκτών, οι πηκτές αφού ζυγίστηκαν αφέθηκαν στο νερό και κάθε 24 ώρες επαναλαμβανόταν η ζύγιση των πηκτών μέχρι την ημέρα διάλυσής τους. Τα δείγματα φωτογραφίζονταν ανά 24 ώρες.

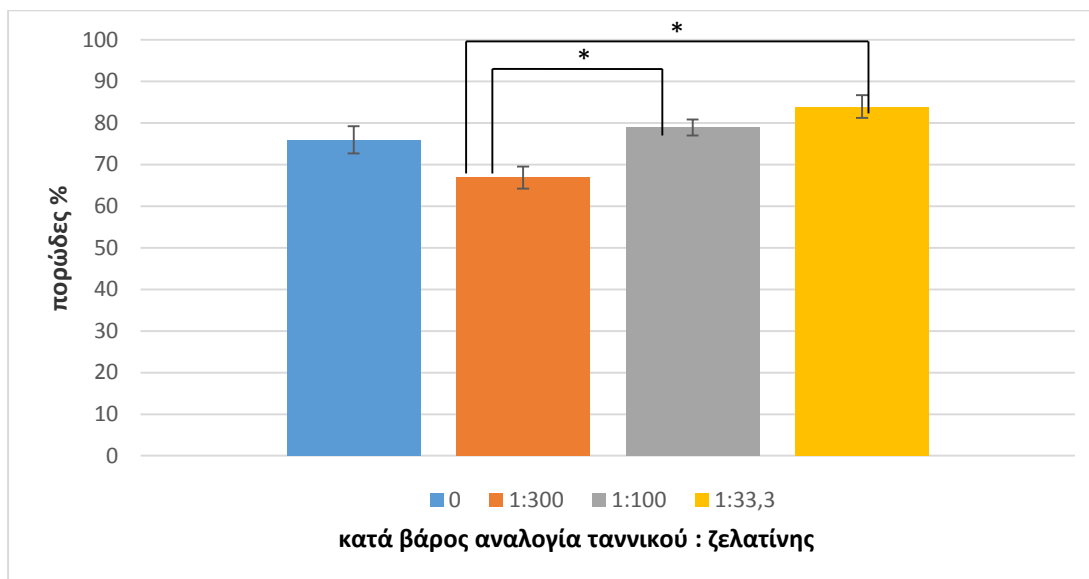
Άλλα δείγματα πηκτών ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν στο νερό για 4 μέρες. Στη συνέχεια καταψύχθηκαν για 3 ώρες, τοποθετήθηκαν στον λυοφιλιωτή για 1 μέρα και τέλος ξανά ζυγίστηκε το βάρος τους.

### **3.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab 15. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της διόγκωσης, του πορώδους, των μηχανικών ιδιοτήτων και της αποδόμησης των πηκτών έγινε με την ανάλυση της διακύμανσης μίας κατεύθυνσης ANOVA-One-way (unstacked). Στη συνέχεια η σύγκριση των μέσων όρων, πραγματοποιήθηκε βάσει του ελέγχου Tukey της ANOVA.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

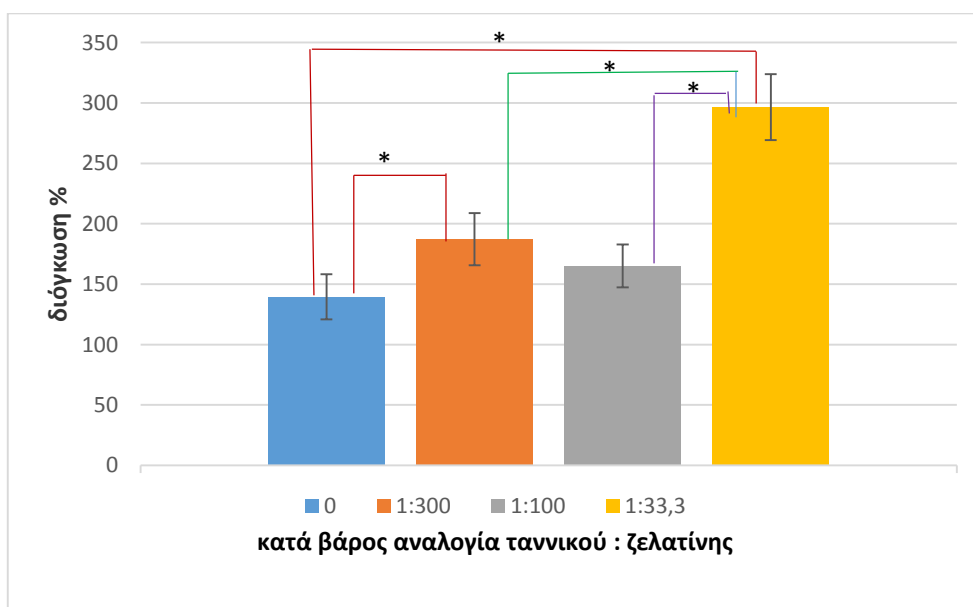
### 4.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ



**ΣΧΗΜΑ 1:** Επίδραση της συγκέντρωσης του ταννικού οξέος στο πορώδες των πηκτών. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή μέσων όρων  $\pm$  τυπική απόκλιση (\*  $p < 0,05$ )

Σύμφωνα με τον τύπο  $\pi = (1 - \rho_{\pi}/\rho_{\mu}) \cdot 100$  μετρήθηκε το πορώδες κάθε πηκτής και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις τους όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 1. Στατιστική σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ του δείγματος 1:300 με το 1:100 και το 1:33,3 δηλαδή η αύξηση του ταννικού οξέος συμβάλει και στην αύξηση του πορώδους των πηκτών.

### 4.2. % ΔΙΟΓΚΩΣΗ ΠΗΚΤΩΝ

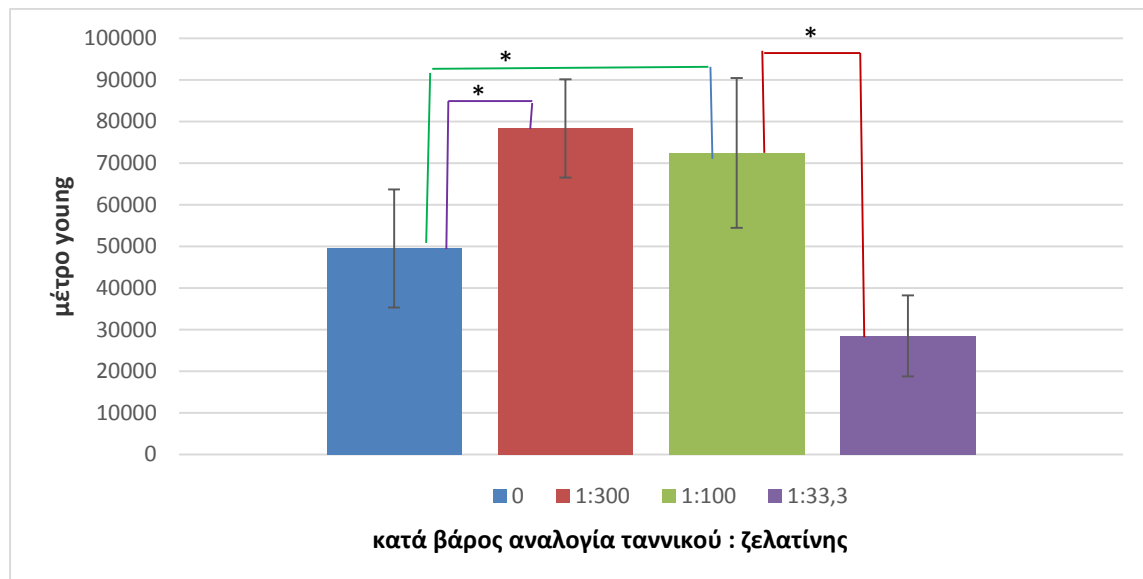




**ΣΧΗΜΑ 2:** : Επίδραση της συγκέντρωσης του ταννικού οξέος στη διόγκωση των πηκτών. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή μέσων όρων  $\pm$  τυπική απόκλιση (\*  $p < 0,05$ ).

Με τη χρήση του τύπου  $(\text{Τελικό βάρος}-\text{Αρχικό βάρος})/\text{Αρχικό βάρος} \cdot 100$  υπολογίστηκε η διόγκωση των πηκτών και στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Στατιστική σημαντική διαφορά παρουσιάζεται στο δείγμα που δεν περιείχε ταννικό οξύ με αυτά που περιείχαν ταννικό σε αναλογία 1:300 και 1:33,3. Επίσης σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των δειγμάτων με αναλογίες ταννικού 1:300 και 1:33,3 και μεταξύ του 1:100 με το 1:33,3. Η αύξηση της διόγκωσης είναι σχεδόν ανάλογη με την αύξηση του ταννικού οξέος. Στην περίπτωση όμως που χρησιμοποιήθηκε γενιπίνη για την δημιουργία σταυροειδών δεσμών η διόγκωση των πηκτών μειωνόταν με την αύξηση της ουσίας. (Bigi *et al.*, 2002). Στη παρούσα πειραματική διαδικασία μελετήθηκε και το πορώδες το οποίο αυξανόταν με την προσθήκη ταννικού οξέος οπότε λογικό είναι ότι θα υπάρχει και αυξημένη διόγκωση ενώ στο πείραμα με τη γενιπίνη δεν εξετάστηκε το πορώδες όπου θεωρητικά θα μειωνόταν με την προσθήκη γενιπίνης.

#### 4.3. ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

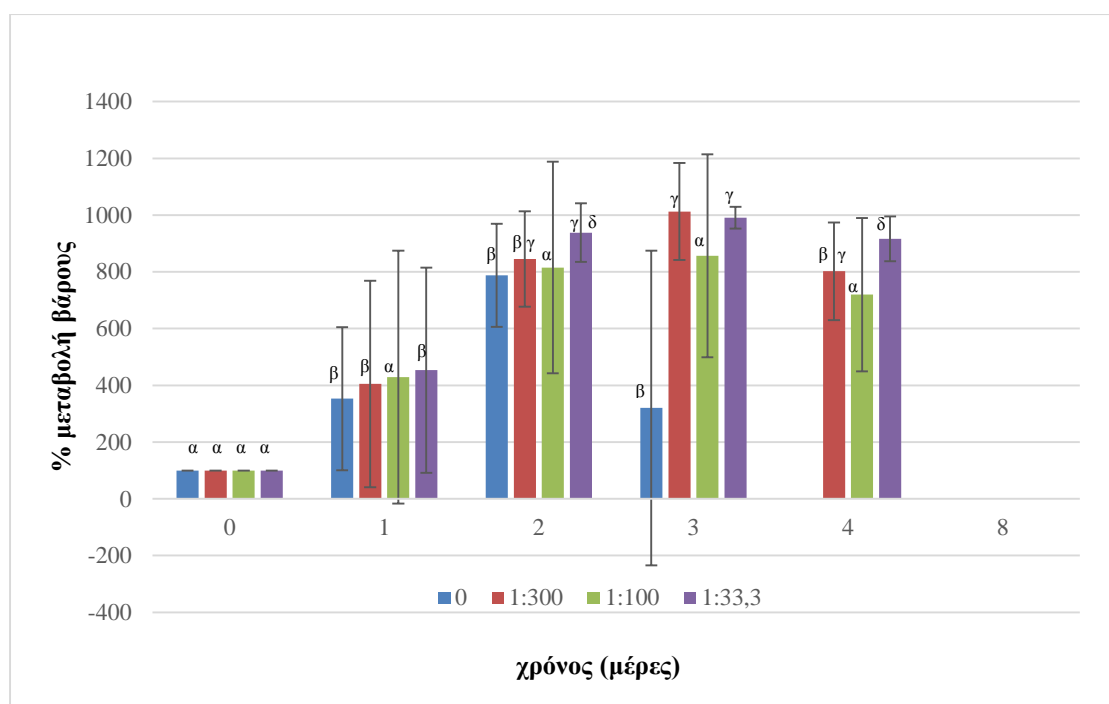


**ΣΧΗΜΑ 3:** Επίδραση του ταννικού οξέος στο μέτρο Young των πηκτών. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή μέσων όρων  $\pm$  τυπική απόκλιση (\*  $p < 0,05$ ).

Υπολογίστηκαν μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις του μέτρου young για κάθε δείγμα πηκτής. Στατιστική διαφορά παρατηρείται μεταξύ του δείγματος χωρίς ταννικό με αυτό με

αναλογία 1:300 και 1:100 και μεταξύ του 1:100 με 1:33,3. Γενικά παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη ταννικού δεν επηρεάζει σημαντικά το μέτρο Young. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε πείραμα με προσθήκη ECD όπου συμπεράναν ότι το μέτρο Young δεν αυξάνει απαραίτητα με την αύξηση της ποσότητας του ECD. (Coimbra *et al*,2014). Η εμπορική ζελατίνη ψαριών έχει μέτρο Young  $42.2 \cdot 10^4 \text{ N/m}^2$  ενώ η ζελατίνη από βοοειδή έχει τιμή  $32.5 \cdot 10^4 \text{ N/m}^2$ . Οι τιμές της ζελατίνης που μελετήθηκε με το ταννικό είναι κατά πολύ μικρότερες όπως και αυτές του πειράματος με το ECD οι οποίες ήταν  $7,5 - 8 \cdot 10^4 \text{ N/m}^2$  (Hassan *et al*, 2008).

#### 4.4. % ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΒΑΡΟΥΣ



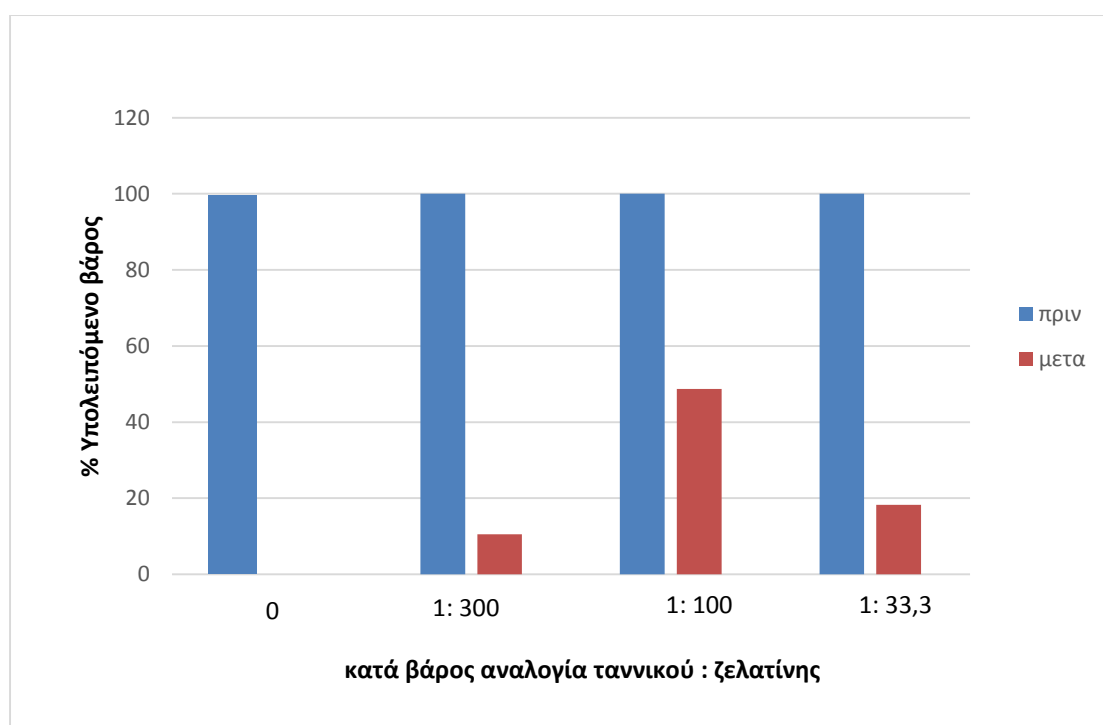
**ΣΧΗΜΑ 4.:** Μέσοι όροι της % μεταβολής βάρους των πηκτών στο νερό. (μπάρες ίδιου χρώματος με διαφορετικούς συντελεστές διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.)

Αρχικά διαφορές μεταξύ των δειγμάτων εμφανίζονται στο δείγμα χωρίς ταννικό με αυτό με αναλογία 1:33,3 και μεταξύ του 1:300 με το 1:100 κ με το 1:33,3. Η γενική μεταβολή του βάρους των πηκτών εξαρτάται από την ποσότητα του ταννικού οξέος που προστίθεται. Όσο περισσότερο το ταννικό οξύ τόσο μικρότερη είναι η % μεταβολή βάρους των δειγμάτων.

Κάνοντας σύγκριση μεταξύ των ημερών παρατηρείται ότι το δείγμα χωρίς ταννικό έχει αρχικά μία αύξηση του βάρους του, την 3<sup>η</sup> ημέρα μειώνεται αισθητά και την 4<sup>η</sup> διαλύεται εντελώς. Το δείγμα με αναλογία 1:300 έχει στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ της 0 ημέρας και όλων των υπολοίπων και μεταξύ της 1<sup>ης</sup> με την 3<sup>η</sup> ημέρα. Το δείγμα με αναλογία

1:100 δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών ενώ το δείγμα με αναλογία 1: 33,3 παρουσίασε περισσότερες στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών όπως φαίνεται στο Σχήμα 4. Οι μεγάλες τυπικές αποκλίσεις οφείλονται στον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων. Την 8<sup>η</sup> ημέρα υπήρχαν ίχνη από κάποια δείγματα τα οποία δεν ήταν εφικτό να μετρηθούν.

#### 4.5. % ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ ΒΑΡΟΣ



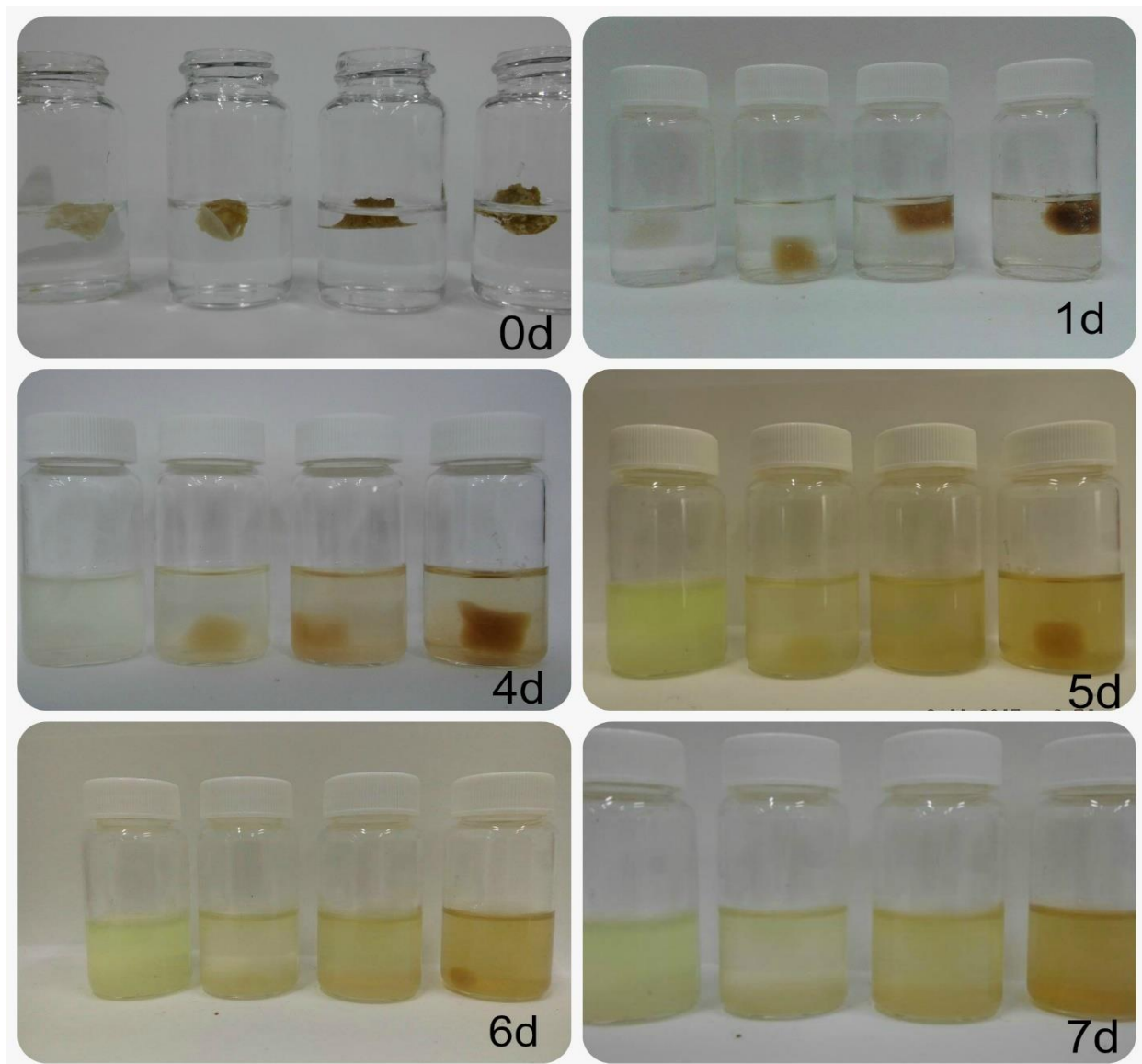
ΣΧΗΜΑ 5.: % υπολειπόμενο βάρος των πηκτών στο νερό.

Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν εξετάστηκε πλήθος δειγμάτων για κάθε κατηγορία οπότε τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να αποκλίνουν αρκετά. Το δείγμα χωρίς ταννικό οξύ την 4<sup>η</sup> ημέρα όπου έγινε η λυοφυλίωση είχε διαλυθεί οπότε δεν έγινε κάποιος υπολογισμός. Στα υπόλοιπα δείγματα παρατηρείται ότι σε αυτό με αναλογία 1:100 το % υπολειπόμενο βάρος είναι μεγαλύτερο από τα άλλα δύο.

#### 4.6. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ

Κατά την παραμονή των πηκτών στο νερό όπως παρατηρείται στο Σχήμα 6 το δείγμα χωρίς ταννικό οξύ διαλύθηκε πρώτο σε σχέση με τα υπόλοιπα και συγκεκριμένα την 4<sup>η</sup> ημέρα υπέστη την πλήρη διάλυση του. Τα δείγματα που περιείχαν ταννικό οξύ σε αναλογία 1:300

και 1:100 διαλύθηκαν την 6<sup>η</sup> ημέρα ενώ εκείνο με αναλογία 1:33,3 διαλύθηκε την 7<sup>η</sup>. Γενικά παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση του ταννικού αυξήθηκε και η αντοχή των πηκτών στο νερό.



**ΣΧΗΜΑ 6.:** Παραμονή πηκτών σε νερό για 7 ημέρες. **Μπουκαλάκι 1:** χωρίς προσθήκη ταννικού οξέος. **Μπουκαλάκι 2:** προσθήκη ταννικού σε κατά βάρος αναλογία με τη ζελατίνη 1:300. **Μπουκαλάκι 3:** προσθήκη ταννικού σε κατά βάρος αναλογία με τη ζελατίνη 1:100. **Μπουκαλάκι 4:** προσθήκη ταννικού σε κατά βάρος αναλογία με τη ζελατίνη 1:33,3.

## **5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων συμπεραίνουμε ότι

- ❖ Η αύξηση του ταννικού οξέος συμβάλει στην αύξηση του πορώδους των πηκτών.
- ❖ Η αύξηση της διόγκωσης των πηκτών είναι ανάλογη με την αύξηση του ταννικού οξέος.
- ❖ Το μέτρο Young δεν επηρεάζεται σημαντικά με τη προσθήκη του ταννικού οξέος.
- ❖ Η % μεταβολή του βάρους των πηκτών σε νερό εξαρτάται από την ποσότητα του ταννικού οξέος που προστίθεται.
- ❖ Η αύξηση του ταννικού οξέος αυξάνει και την αντοχή των πηκτών στο νερό.

## **6.ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ**

Η αύξηση της ζήτησης για τη ζελατίνη ψαριών μπορεί να ανοίξει το δρόμο για περαιτέρω έρευνα. Την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά την εκχύλιση ζελατίνης ψαριών από διάφορα μέρη του σώματος του ψαριού, όπως τα δέρματα, τα οστά, και ακόμη και τα εντόσθια. Οι συνθήκες επεξεργασίας (διαλύτης, χρόνος, και θερμοκρασία) για να μπορεί να παραχθεί η βέλτιστη απόδοση ποιότητας ζελατίνης ψαριών, η διαδικασία παραγωγής της ζελατίνης ψαριών, η εξασφάλιση του ελέγχου των συνθηκών εκχύλισης εξακολουθούν να αποτελούν ένα πρόβλημα για τους μεταποιητές. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να υπάρξει έρευνα για τεχνολογική ανάπτυξη. Το σύστημα HACCP δίνει όλο και μεγαλύτερη σημασία στον τομέα της μεταποίησης τροφίμων, έτσι μια μελλοντική έρευνα θα πρέπει να κατευθύνεται προς την ανάπτυξη του χαμηλού κόστους και ταυτόχρονα της υψηλής ποιότητας ζελατίνης ψαριών με ελάχιστες ή καθόλου προσμίξεις (χημικές ή μικροβιακές). Λεπτομερείς έρευνες πρέπει να διενεργούνται για την τυποποίηση της καθαρότητας των δειγμάτων της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται για να διασφαλιστεί η ομοιομορφία. Για να μπορέσει η ζελατίνη ψαριών να ανταγωνιστεί τη ζελατίνη θηλαστικών, προσθέτονται διάφοροι παράγοντες διασταυρώσεως έτσι ώστε οι πηκτές να γίνουν πιο ισχυρές. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η δράση του ταννικού οξέος ως παράγοντας διασταυρώσεως, σε μια μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να εξεταστεί και να συγκριθεί η δράση διαφόρων παραγόντων διασταυρώσεων. Σαν συνέχεια αυτής της έρευνας θα μπορούσε να εξεταστεί το % υπολειπόμενο βάρος των πηκτών στο νερό με περισσότερα δείγματα έτσι ώστε να βγει ένα πιο σαφές συμπέρασμα, ακόμα θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων ταννικού οξέος στις θερμοκρασίες πήξης και τήξης και τέλος θα μπορούσε να γίνει εγκλεισμός μια φαρμακευτικής ουσίας μέσα στη πηκτή και να μελετηθεί ο χρόνος απελευθέρωσής της, όπως επίσης πολύ ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η δυνατότητα δημιουργίας μαλακών καψουλών για φάρμακα από ζελατίνη ψαριών.

## **7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.**

- Bigi A. , Cojazzi G., Panzavolta S., Roveria N., Rubini K. (2002).Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. Elsevier. *Biomaterials* ,23, 4827–4832
- Bo Lei , Kwan-Ha Shin , In-Hwan Jo , Young-Hag Koh , Hyoun-Ee Kim.(2014). Highly porous gelatinesilica hybrid scaffolds with textured surfaces using new direct foaming/freezing technique. Elsevier. *Materials Chemistry and Physics*, 145, 397-402.
- Cláudia M. Z. Cristiano, Samira J. Fayad, Ledilege C. Porto and Valdir Soldi.(2010). Protein-Based Films Cross-Linked with 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC): Effects of the Cross-Linker and Film Composition on the Permeation Rate of p-Hydroxyacetanilide as a Model Drug. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(2), 340-348.
- Coimbra P., Gil M.H., Figueiredo M. (2014). Tailoring the properties of gelatin films for drug delivery applications: Influence of the chemical cross-linking method. Elsevier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70,10-119.
- Chong Wing Yung, William E. Bentley, Timothy A. Barbari.(2010). Diffusion of interleukin-2 from cells overlaid with cytocompatible enzyme-crosslinked gelatin hydrogels. *Wiley Periodicals*, 25-32.
- Darline Ky , Chi Kin Liu , Christopher Marumoto, Luciano Castaneda, Katarzyna Slowinska.(2006). Electrochemical Time-of-Flight in crosslinked collagen matrix solution: Implications of structural changes for drug delivery system. Elsevier. *Journal of Controlled Release*, 112, 214–222.
- Djagny Kodjo Boady, Wang Zhang, Xu Shiyong. (2001). Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41:6, 481-492.

- Duconseille Anne, Astruc Thierry, Quintana Naira, Meersman Filip, Sante-Lhoutellier Veronique. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, 43, 360-376.
- Forte A.E, D'Amico F., Charalambides M.N., Dini D., Williams J.G.(2014). Modelling and experimental characterisation of the rate dependent fracture properties of gelatine gels. Elsevier, *Food of hydrocolloids*, 46, 180-190.
- Hallstrom B. Skjolderbrand C and Tragardh C (1990). *Heat Transfer and Food Products*, Elsevier Applied Sci., 1-29.
- Hye-Won Kang, Yasuhiko Tabata, Yoshito Ikada.(1999). Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Elsevier. *Biomaterials*, 20, 1339-1344.
- Gómez-Guillén, M.C, Giménez, B, López-Caballero,M.E, Montero, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25, 1813-1827.
- Hassan A., Khairulnizam A.B., Mordi M.N., Norita M., Norzian M.H.(2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 23, 1610-1616.
- Josephine Y. Fang, Shih-Jye Tan, Zhi Yang, Charisse Tayag, Bo Han.(2014). Tumor Bioengineering Using a Transglutaminase Crosslinked Hydrogel. *PLOS ONE*.9(8),1-10.
- Karim, A.A. & Bhat R. (2008). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends Food Science and Technology*, 19, 644–656.
- Karim, A.A. & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23, 563-576.



- Kuijpers J. van Wachem P.B., van Luyn M. J. A., Plantinga J. A., Engbers G. H. M., J Krijgsveld J., Zaat S. A. J., Dankert J., Feijen J.(2000) *In vivo* compatibility and degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. John Wiley & Sons,136-145.
- Lassoued Imen, Jridi Mourad, Nasri Rim, Dammak Aicha, Hajji Mohamed, Nasri Moncef, Barkia Ahmed. (2014). Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 41, 309-318.
- Madeleine Djabourov (1988). Architecture of gelatin gels. *Taylor & Francis*, 29(3), 273-297
- Nur Hanani Z.A., Roos Y.H., Kerry J.P. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94–102.
- Pati Falguni, Adhikari Basudam & Dhara Santanu. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability . *Bioresource Technology*, 101, 3737-3742.
- Selestina Gorgieva, Vanja Kokol.(2014). Processing of gelatin-based cryogels with improved thermomechanical resistance, pore size gradient, and high potential for sustainable protein drug release. *Wiley Periodicals*,1119–1130.
- Shengbin He, Ting Yin, Jinwang Zhen, Xiaoping Xu. (2015). Cross-linking of gelatin by chlorine dioxide steam. *Food Hydrocolloids*, 45, 63-71
- Vegard H. Segtnan, Tomas Isaksson. (2002). Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. Elsevier. *Food Hydrocolloids*, 18, 1-11.

- Wasswa Joseph, Tang Jian & Gy Xiaohong. (2007). Utilization of Fish Processing By-Products in the Gelatin Industry. Taylor & Francis, 23, 159–174
- Zhiyuan Peng , Zhiping Li & Yongqiang Shen.(2012). Influence of Chemical Cross-Linking on Properties of Gelatin/Chitosan Microspheres. Taylor & Francis. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 51(4), 381-385.

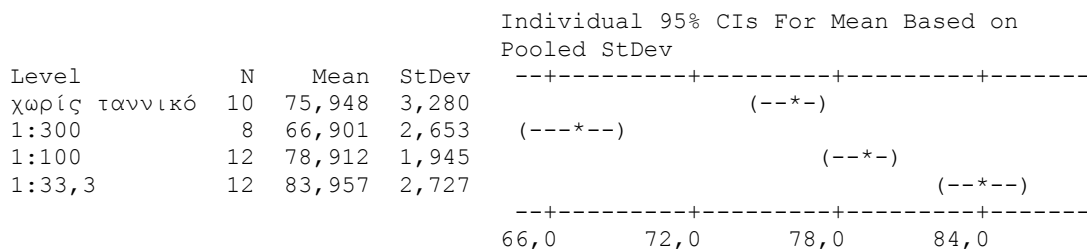
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1<sup>ο</sup> παράρτημα: πορώδες.

## One-way ANOVA: χωρίς ταννικό; 1:300; 1:100; 1:33,3

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	1446,28	482,09	67,97	0,000
Error	38	269,52	7,09		
Total	41	1715,80			

S = 2,663 R-Sq = 84,29% R-Sq(adj) = 83,05%

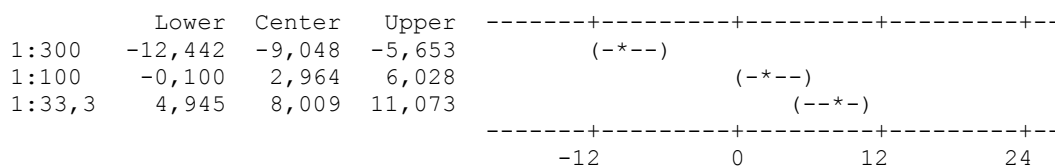


Pooled StDev = 2,663

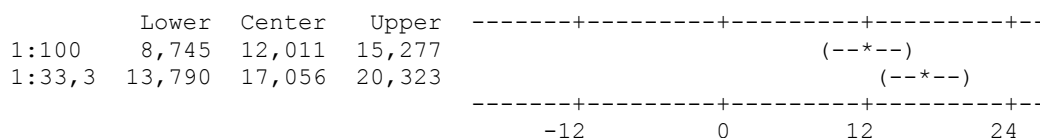
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 98,94%

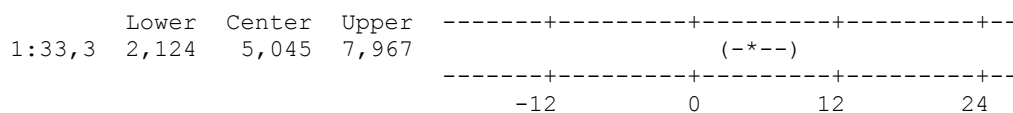
χωρίς ταννικό subtracted from:



1:300 subtracted from:



1:100 subtracted from:

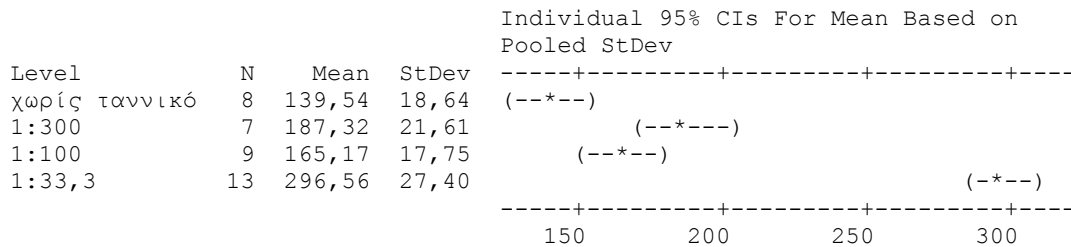


2<sup>ο</sup> παράρτημα: διόγκωση.

**One-way ANOVA: χωρίς ταννικό; 1:300; 1:100; 1:33,3**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	158802	52934	104,21	0,000
Error	33	16763	508		
Total	36	175565			

S = 22,54 R-Sq = 90,45% R-Sq(adj) = 89,58%

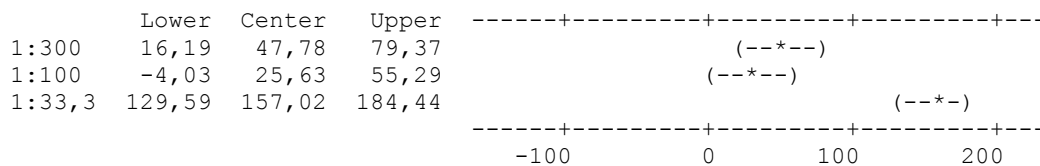


Pooled StDev = 22,54

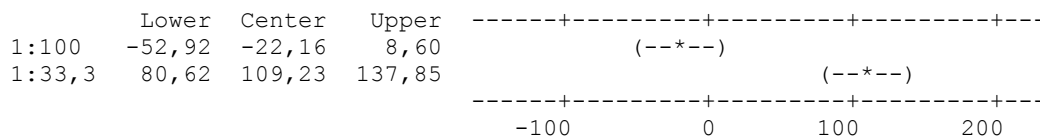
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 98,94%

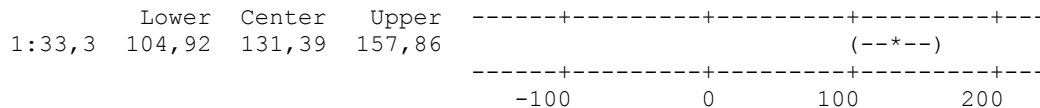
χωρίς ταννικό subtracted from:



1:300 subtracted from:



1:100 subtracted from:



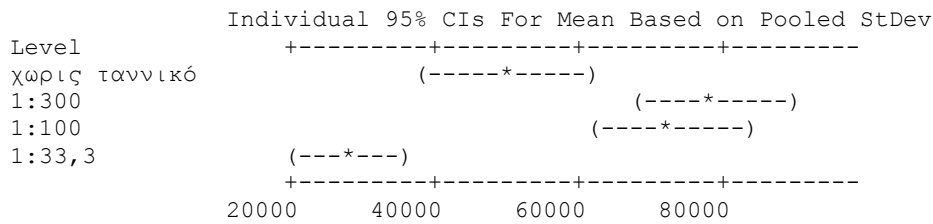
3<sup>ο</sup> παράρτημα: μηχανικές ιδιότητες

**One-way ANOVA: χωρίς ταννικό; 1:300; 1:100; 1:33,3**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	13333622615	4444540872	26,65	0,000
Error	25	4169846069	166793843		
Total	28	17503468683			

S = 12915 R-Sq = 76,18% R-Sq(adj) = 73,32%

Level	N	Mean	StDev
χωρίς ταννικό	5	49493	14204
1:300	6	78337	11829
1:100	6	72439	18024
1:33,3	12	28476	9719

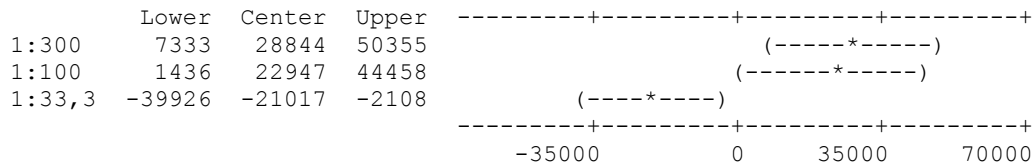


Pooled StDev = 12915

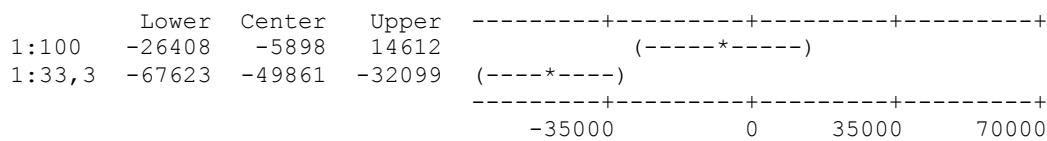
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 98,91%

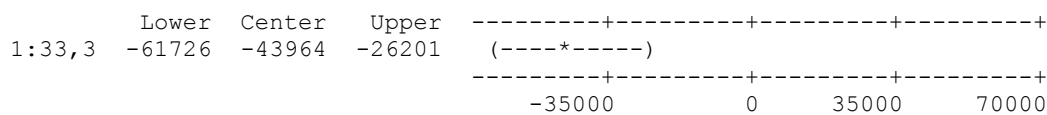
χωρίς ταννικό subtracted from:



1:300 subtracted from:



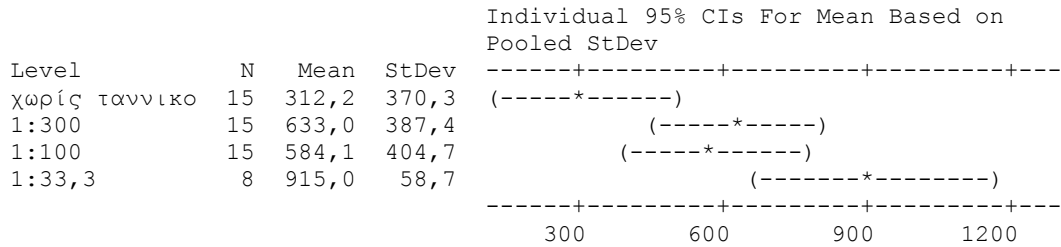
1:100 subtracted from:



4<sup>ο</sup> παράρτημα: Αποδόμηση πηκτών στον νερό  
**One-way ANOVA: χωρίς ταννικό; 1:300; 1:100; 1:33,3**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	2011227	670409	5,18	0,003
Error	49	6336822	129323		
Total	52	8348049			

S = 359,6    R-Sq = 24,09%    R-Sq(adj) = 19,44%

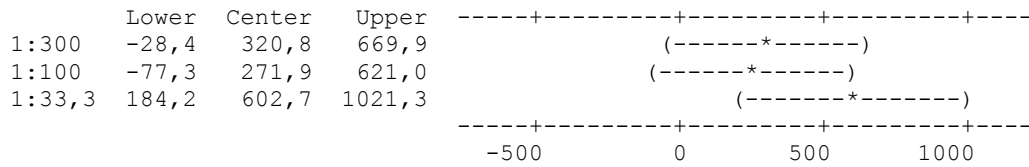


Pooled StDev = 359,6

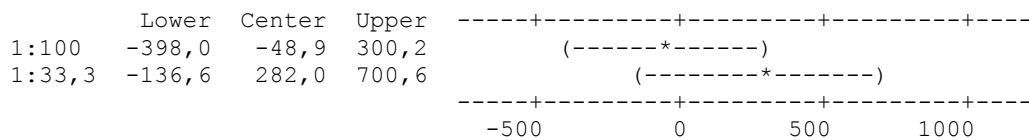
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
 All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 98,94%

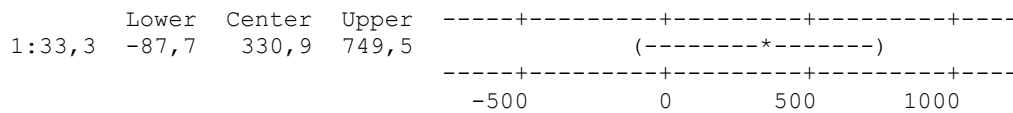
χωρίς ταννικό subtracted from:



1:300 subtracted from:



1:100 subtracted from:

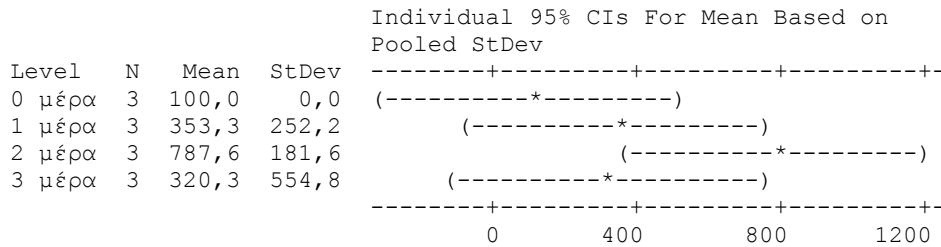


#### 4.1<sup>0</sup> παράρτημα: Αποδόμηση πηκτών στον νερό (χωρίς ταννικό)

### One-way ANOVA: 0 μέρα; 1 μέρα; 2 μέρα; 3 μέρα

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	745070	248357	2,46	0,138
Error	8	808681	101085		
Total	11	1553752			

S = 317,9    R-Sq = 47,95%    R-Sq(adj) = 28,44%

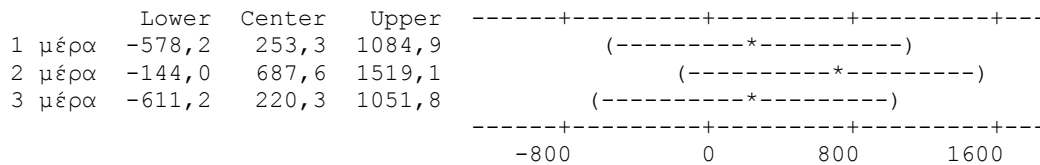


Pooled StDev = 317,9

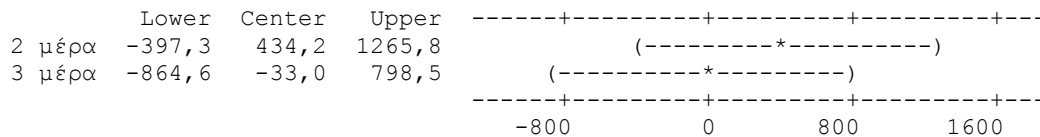
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 98,74%

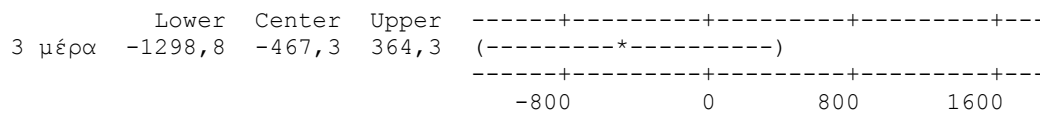
0 μέρα subtracted from:



1 μέρα subtracted from:



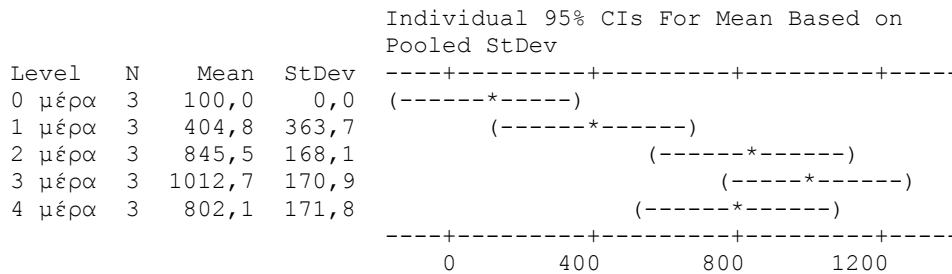
2 μέρα subtracted from:



4.2<sup>0</sup> παράρτημα: Αποδόμηση πηκτών στον νερό (1:300)  
**One-way ANOVA: 0 μέρα; 1 μέρα; 2 μέρα; 3 μέρα; 4 μέρα**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	1662095	415524	9,48	0,002
Error	10	438516	43852		
Total	14	2100612			

S = 209,4    R-Sq = 79,12%    R-Sq(adj) = 70,77%

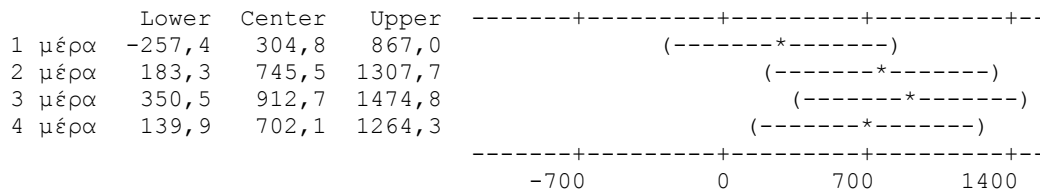


Pooled StDev = 209,4

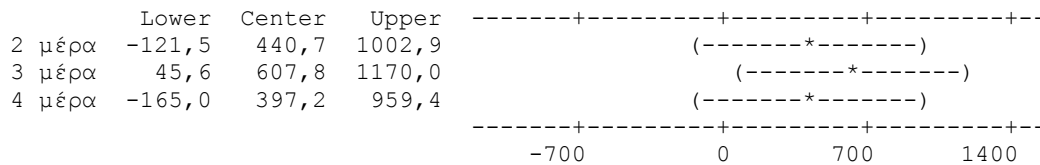
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
 All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 99,18%

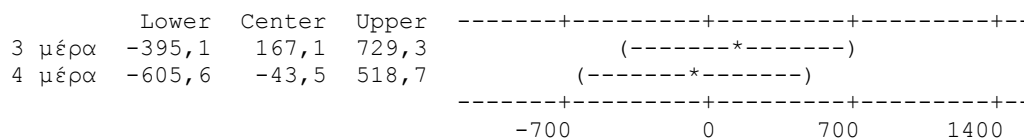
0 μέρα subtracted from:



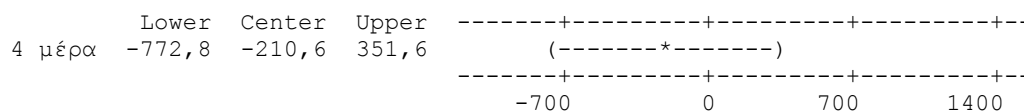
1 μέρα subtracted from:



2 μέρα subtracted from:



3 μέρα subtracted from:



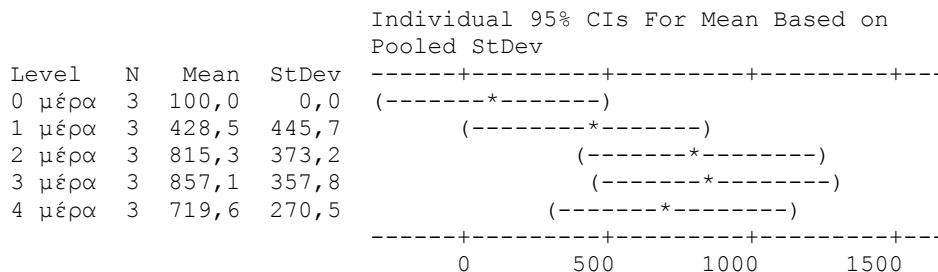


4.3<sup>0</sup> παράρτημα: Αποδόμηση πηκτών στον νερό (1:100)

**One-way ANOVA: 0 μέρα; 1 μέρα; 2 μέρα; 3 μέρα; 4 μέρα**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	1214590	303647	2,82	0,084
Error	10	1078191	107819		
Total	14	2292781			

S = 328,4 R-Sq = 52,97% R-Sq(adj) = 34,16%

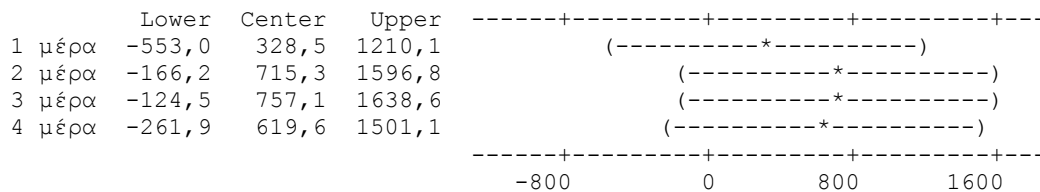


Pooled StDev = 328,4

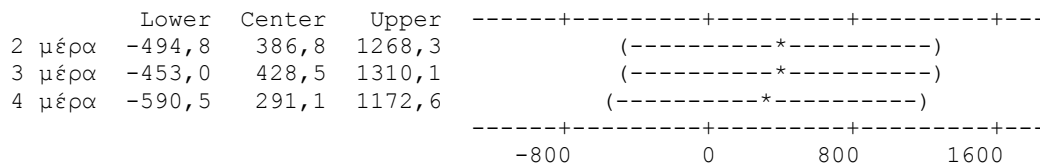
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 99,18%

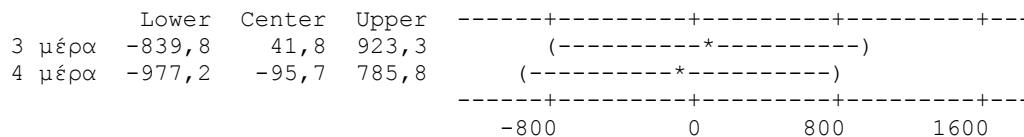
0 μέρα subtracted from:



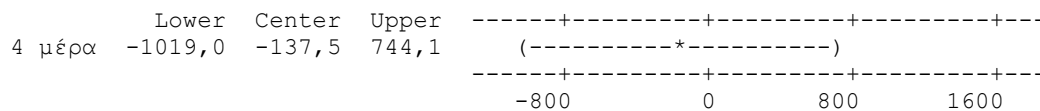
1 μέρα subtracted from:



2 μέρα subtracted from:



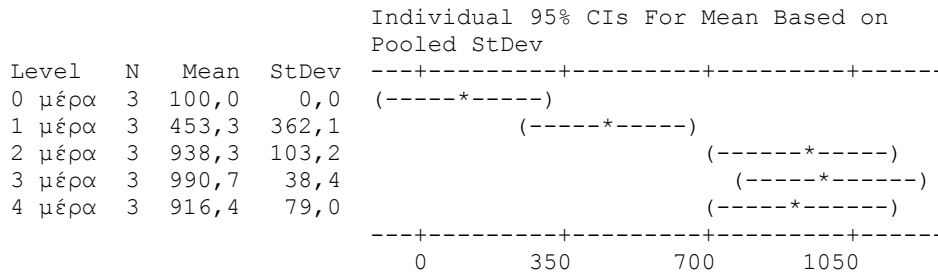
3 μέρα subtracted from:



4.4<sup>0</sup> παράρτημα: Αποδόμηση πηκτών στον νερό (1:33,3)  
**One-way ANOVA: 0 μέρα; 1 μέρα; 2 μέρα; 3 μέρα; 4 μέρα**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	1820797	455199	15,23	0,000
Error	10	298941	29894		
Total	14	2119738			

S = 172,9 R-Sq = 85,90% R-Sq(adj) = 80,26%

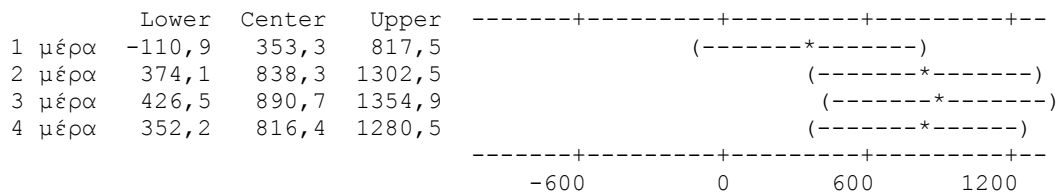


Pooled StDev = 172,9

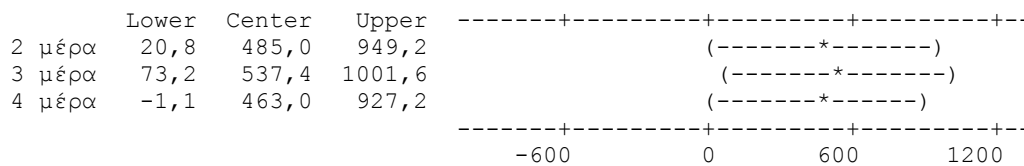
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
 All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 99,18%

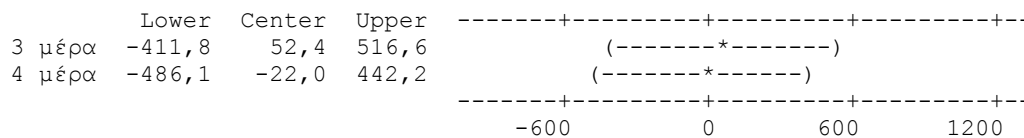
0 μέρα subtracted from:



1 μέρα subtracted from:



2 μέρα subtracted from:



3 μέρα subtracted from:

