



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &

ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Θέμα

Παραγωγή ζελατίνης από δέρματα γαλέου (*Galeus melastomus*) και μελέτη της επίδρασης διαφόρων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών στις λειτουργικές ιδιότητες

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ

ΓΙΝΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΨΗ

ΠΕΤΡΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

Θεσσαλονίκη 2015

Τίτλος

**Παραγωγή ζελατίνης από δέρματα γαλέου (*Galeus melastomus*) και
μελέτη της επίδρασης διαφόρων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών
στις λειτουργικές ιδιότητες**

ΧΡΗΣΤΟΣ ΓΙΝΟΣ

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Ημερομηνία:
9\2\2015

Εισηγητής
ΠΕΤΡΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων Δημήτρη Πετρίδη και Αναστάσιο Ζώτο, καθώς και στον Παναγιώτη Καραγιαννακίδη, μεταδιδακτορικό ερευνητή του Τμήματος, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την καθοδήγηση που μου προσέφεραν σε όλη την διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας που χρηματοδότησε το πρόγραμμα με τίτλο "Αποδοτική συνεκχύλιση ζελατίνης και λιπιδίων από υποπροϊόντα επεξεργασίας λιπαρών ψαριών".



Η πρόταση υλοποιείται στο πλαίσιο της Δράσης «Ενίσχυση Μεταδιδασκτόρων Ερευνητών/τριών» του ΕΠΕΔΒΜ με Δικαιούχο την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και από Εθνικούς Πόρους.

Τίτλος

ΓΙΝΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα

Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης των δερμάτων γαλέου (*Galeus melastomus*), για την παραγωγή ζελατίνης, προς αντικατάσταση της εμπορικά διαθέσιμης βόειας ζελατίνης. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παραγωγή ζελατίνης ήταν ιδιαίτερα αποδοτικό με μέση απόδοση περί τα 12,70 g ξηρής ζελατίνης/100 g δερμάτων. Η παραχθείσα ζελατίνη παρουσίασε μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (~92%) και χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (~5,6%) και τέφρα (~0,60%). Επίσης, τα υδατικά διαλύματα της παραχθείσας ζελατίνης ήταν διαυγή, άχρωμα και άοσμα, κατόπιν κατεργασίας με ενεργό άνθρακα. Η ζελατίνη από δέρματα γαλέου εμφάνισε υψηλή τιμή Bloom (~309 g στους 10°C) και σημείο τήξεως (~28°C) και σχετικά υψηλό ιξώδες (~4 cP στους 60°C). Ωστόσο, το ιξώδες και το σημείο τήξεως της ζελατίνης από δέρματα γαλέου ήταν χαμηλότερα από αυτά του εμπορικού παρασκευάσματος.

Σε ακόλουθη πειραματική μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση τριών οξειδωμένων φαινολικών ουσιών (ταννικό, φερουλικό και καφεϊκό οξύ) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1, 0,5 και 1,0 g φαινολικής ουσίας/100 g ζελατίνης) στις φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης από δέρματα γαλέου. Τόσο το ταννικό όσο και το καφεϊκό οξύ προκάλεσαν σημαντική αύξηση στην τιμή Bloom και το ιξώδες της ζελατίνης από δέρματα γαλέου, καθώς η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα αυξήθηκε, και αμφότερες οι φυσικές ιδιότητες παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές από το εμπορικό παρασκεύασμα. Το φερουλικό οξύ βελτίωσε ορισμένες από τις φυσικές ιδιότητες της παραχθείσας ζελατίνης σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Το σημείο τήξεως βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη ταννικού οξέος και εμφάνισε παρόμοιες τιμές με το εμπορικό παρασκεύασμα, όταν το ταννικό οξύ προστέθηκε σε επίπεδο συγκέντρωσης 1%. Η βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων της ζελατίνης από δέρματα γαλέου με την προσθήκη ταννικού και καφεϊκού οξέος, επισκιάστηκε από την ανάπτυξη καφέ χρώματος, του οποίου η ένταση αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσής τους στη ζελατίνη.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	1
1. Εισαγωγή.....	3
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	5
2.1 Κολλαγόνο και ζελατίνη.....	5
2.2 Εφαρμογές της ζελατίνης στη βιομηχανία τροφίμων	6
2.3 Πρώτες ύλες για την παραγωγή ζελατίνης σε βιομηχανική κλίμακα	6
2.4 Τα υποπροϊόντα επεξεργασίας αλιευμάτων ως εναλλακτική πηγή κολλαγόνου για την παραγωγή ζελατίνης	7
2.5 Μέθοδοι παραγωγής ζελατίνης	8
2.6 Ιδιότητες ζελατίνης	8
2.7 Μειονεκτήματα της ζελατίνης από δέρματα ψαριών.....	10
2.8 Χρήση ουσιών για τη βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων της ζελατίνης.....	10
2.9 Στόχοι της παρούσας έρευνας.....	12
3. Υλικά και μέθοδοι	13
3.1 Υλικά.....	13
3.2 Προετοιμασία δερμάτων	13
3.3 Παραγωγή ζελατίνης.....	13
3.4 Χημική σύσταση ζελατίνης	14
3.4.1 Προσδιορισμός υγρασίας	15
3.4.2 Προσδιορισμός πρωτεΐνης	15
3.4.3 Προσδιορισμός λίπους	16
3.4.4 Προσδιορισμός τέφρας	16
3.5 Υπολογισμός της απόδοσης σε ζελατίνη	17
3.8 Προσδιορισμός τιμής Bloom	18

3.9 Προσδιορισμός ιξώδους.....	18
3.10 Προσδιορισμός σημείου τήξης.....	19
3.11 Ηλεκτρόφρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	19
3.12 Χρώμα των πηκτών ζελατίνης	20
3.13 Στατιστική ανάλυση	20
4. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	21
4.1 Απόδοση σε ζελατίνη.....	21
4.2 Χημική σύσταση.....	21
4.3 Οσμή και χρώμα	22
4.4 Φυσικές ιδιότητες.....	24
4.5 Επίδραση των φαινολικών ουσιών στις φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης	25
4.6 Χρώμα των πηκτών ζελατίνης	30
5. Συμπεράσματα.....	32
6. Βιβλιογραφία	34

1. Εισαγωγή

Η ζελατίνη είναι ένα λειτουργικό βιοπολυμερές που παραλαμβάνεται από τη μερική υδρόλυση του κολλαγόνου, την κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού των ζώων. Παρουσιάζει μεγάλο εύρος εφαρμογών σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς, όπως η βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών και φωτογραφίας. Κύριες πηγές για την παραγωγή ζελατίνης αποτελούν τα δέρματα και τα οστά των χερσαίων ζώων και συγκεκριμένα τα δέρματα και τα οστά των χοίρων και των βοοειδών. Ωστόσο, λόγω της έξαρσης θανατηφόρων μεταδοτικών νόσων στα παραπάνω είδη ζώων, όπως για παράδειγμα της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας και του αφθώδους πυρετού, η κατανάλωση βόειας και χοιρινής ζελατίνης, καθώς και των προϊόντων στα οποία προστίθεται, έχει περιοριστεί σημαντικά. Επιπλέον, η κατανάλωση βόειας ή χοιρινής ζελατίνης απαγορεύεται από ορισμένες θρησκείες, όπως είναι ο ινδουισμός, ο ισλαμισμός και σε μερικές περιπτώσεις ο ιουδαϊσμός (Karayannakidis και Zotos, 2014a). Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η εύρεση εναλλακτικών πηγών ζελατίνης, που θα είναι αποδεκτή από το ευρύτερο καταναλωτικό κοινό και που θα μπορεί να καταναλώνεται χωρίς να θέτει σε κίνδυνο την παγκόσμια υγεία.

Είναι γνωστό ότι τα υποπροϊόντα (π.χ. δέρματα, οστά, λέπια κ.ά.) που προκύπτουν κατά την επεξεργασία των ψαριών περιέχουν σημαντικές ποσότητες κολλαγόνου και κατά συνέπεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ζελατίνης. Η αξιοποίηση των παραπάνω υποπροϊόντων, τα οποία συνήθως απορρίπτονται στο περιβάλλον ή στη θάλασσα ή χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων χαμηλής εμπορικής αξίας (π.χ. ιχθυάλευρα, ενσιρώματα,

οργανικά λιπάσματα κ.ά.), θα βοηθήσει, όχι μόνο στην επίλυση περιβαλλοντικών προβλημάτων, αλλά ταυτόχρονα θα οδηγήσει στη δημιουργία προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως είναι η ζελατίνη (Karayannakidis και Zotos, 2014b).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να παραχθεί ζελατίνη από τα δέρματα (κύριο υποπροϊόν) που προκύπτουν κατά τη φιλετοποίηση του γαλέου (*Galeus melastomus*) και να μελετηθούν οι φυσικοχημικές της ιδιότητες (χημική σύσταση και φυσικές ιδιότητες ζελατίνης όπως τιμή Bloom, ιξώδες και σημείο τήξης) σε σύγκριση με αυτές της εμπορικά διαθέσιμης βόειας ζελατίνης. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της συγκέντρωσης διαφόρων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών στις φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης και στο χρώμα των πηκτών που παράχθηκαν σε σύγκριση με το εμπορικό παρασκεύασμα.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Κολλαγόνο και ζελατίνη

Το κολλαγόνο, η πρόδρομος ένωση της ζελατίνης, είναι η κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού των ζώων (Pati *et al.*, 2010). Από χημικής απόψεως, το κολλαγόνο δεν είναι σφαιρική πρωτεΐνη, αλλά ινώδης και αποτελείται από 3 πολυπεπτιδικές α-αλυσίδες που ενώνονται μεταξύ τους προς σχηματισμό μίας τριπλής έλικας (Schrieber και Gareis, 2007; Senaratne *et al.*, 2006). Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της δομής αυτής είναι η επαναλαμβανόμενη παρουσία της αλληλουχίας τριών αμινοξέων και συγκεκριμένα της Gly-X-Y, όπου X και Y μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ, αλλά συνήθως το X είναι προλίνη (Pro) και το Y, υδρόξυ-προλίνη (HyPro) (Burjanadze, 2000). Πιστεύεται ότι τα τελευταία δύο αμινοξέα είναι αυτά που σχηματίζουν τους δεσμούς υδρογόνου που σταθεροποιούν την τριπλή έλικα του κολλαγόνου (Norziah *et al.*, 2009; Wasswa *et al.*, 2007). Κατά τη θέρμανση του κολλαγόνου σε θερμοκρασίες περί τους 40°C, οι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν την ελικοειδή διάταξη του κολλαγόνου, σπάνε, οδηγώντας στο σχηματισμό υδατοδιαλυτού κολλαγόνου, δηλαδή ζελατίνης.

Η ζελατίνη είναι το υδατοδιαλυτό μίγμα πρωτεϊνών και πεπτιδίων που προκύπτει από τη μερική υδρόλυση του κολλαγόνου. Τα παρασκευάσματα ζελατίνης δεν είναι "καθαρά" από χημικής απόψεως καθότι αυτά περιέχουν νερό, άλατα και ενδεχομένως μικρές ποσότητες σακχάρων αλλά και άλλων μη-κολλαγονούχων πρωτεϊνών (Schrieber και Gareis, 2007). Γενικά, η χημική σύσταση της ζελατίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πρώτη ύλη καθώς και τη μέθοδο που εφαρμόζεται για την παραγωγή της (Jongjareonrak *et al.*, 2006; Cheow *et al.* 2007; Rahman *et al.* 2008). Λόγω της πρωτεϊνικής της φύσης, η ζελατίνη αποτελείται από αμινοξέα, η αλληλουχία των οποίων καθορίζει τις λειτουργικές της ιδιότητες (Muyonga *et al.* 2004; Fernández-Díaz *et al.* 2001). Έχει αναφερθεί ότι όλα τα αμινοξέα που υπάρχουν στις πρωτεΐνες των τροφίμων υπάρχουν στη ζελατίνη, με εξαίρεση την τρυπτοφάνη (Try) και την κυστεΐνη (Cys) (Eastoe και Leach, 1977).

Επιπλέον, η περιεκτικότητα της ζελατίνης σε μεθειονίνη (Met) και τυροσίνη (Tyr) είναι χαμηλή, ενώ η γλυκίνη (Gly) είναι το κύριο αμινοξύ και αντιπροσωπεύει περί το 33% του συνόλου των αμινοξέων.

2.2 Εφαρμογές της ζελατίνης στη βιομηχανία τροφίμων

Η ζελατίνη παρουσιάζει μεγάλο εύρος εφαρμογών στη βιομηχανία των τροφίμων και χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για τη βελτίωση της ικανότητας σχηματισμού πηκτής, της ικανότητας κατακράτησης νερού, του ιξώδους, καθώς και των αφριστικών και γαλακτωματοποιητικών ιδιοτήτων των τροφίμων (Ritzoulis & Karayannakidis, 2015). Η πιο σημαντική ιδιότητα της ζελατίνης, από τεχνολογικής απόψεως, είναι η ικανότητά της να σχηματίζει θερμοαντιστρεπτές πηκτές, που σημαίνει ότι κατά την ψύξη των υδατικών διαλυμάτων ζελατίνης σχηματίζεται πηκτή, ενώ κατά τη θέρμανση σχηματίζεται διάλυμα (λύμα) (Schrieber & Gareis, 2007; Karim & Bhat, 2008). Αν και πολλοί πολυσακχαρίτες (π.χ. αγαρόζη, πηκτίνη, καραγεννάνη) σχηματίζουν θερμοαντιστρεπτές πηκτές, ωστόσο τα σημεία τήξεώς τους είναι κατά πολύ υψηλότερα από αυτά της ζελατίνης, που τήκεται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από αυτές του ανθρώπινου σώματος, με αποτέλεσμα να μην δίνουν την αίσθηση της "τήξης στο στόμα - melt in mouth" που δίνει η ζελατίνη (Karim & Bhat, 2008).

2.3 Πρώτες ύλες για την παραγωγή ζελατίνης σε βιομηχανική κλίμακα

Για την παραγωγή ζελατίνης σε βιομηχανική κλίμακα, χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά τα δέρματα και τα οστά των χερσαίων ζώων και συγκεκριμένα τα δέρματα των χοίρων και βοοειδών, καθώς και τα οστά αυτών. Στην Ευρώπη περί το 80% της παραγόμενης ζελατίνης προέρχεται από δέρματα χοίρων, το 15% από τα δέρματα βοοειδών και το υπόλοιπο 5% από τα οστά των χοίρων και βοοειδών, καθώς και από τα δέρματα των πουλερικών και τα λέπια των ψαριών (GME, 2015). Ωστόσο, λόγω της έξαρσης θανατηφόρων μεταδοτικών νόσων στα ανωτέρω είδη χερσαίων ζώων, όπως για παράδειγμα της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας και του

αφθώδους πυρετού ή για καθαρά αισθητικούς λόγους, η κατανάλωση βόειας και χοιρινής ζελατίνης, καθώς και των τροφίμων, στα οποία αυτή προστίθεται, έχει περιοριστεί σημαντικά. Επιπλέον, η βόεια ζελατίνη δεν καταναλώνεται από τους ινδουιστές, ενώ η χοιρινή από τους ισλαμιστές (Pranoto et al., 2007; Choi & Regenstein, 2000; Zhou & Regenstein, 2005). Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι η εύρεση εναλλακτικών πρώτων υλών για την παραγωγή ζελατίνης σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα κρίνεται απαραίτητη.

2.4 Τα υποπροϊόντα επεξεργασίας αλιευμάτων ως εναλλακτική πηγή κολλαγόνου για την παραγωγή ζελατίνης

Είναι γνωστό ότι τα υποπροϊόντα (π.χ. δέρματα, οστά, λέπια κ.ά.) που προκύπτουν κατά την επεξεργασία των ψαριών περιέχουν σημαντικές ποσότητες κολλαγόνου και κατά συνέπεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ζελατίνης. Η αξιοποίηση των παραπάνω υποπροϊόντων, τα οποία συνήθως απορρίπτονται στο περιβάλλον ή στη θάλασσα ή χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων χαμηλής εμπορικής αξίας (π.χ. ιχθυάλευρα, ενσιρώματα, οργανικά λιπάσματα κ.ά.), θα βοηθήσει, όχι μόνο στην επίλυση περιβαλλοντικών προβλημάτων, αλλά ταυτόχρονα θα οδηγήσει στη δημιουργία προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως είναι η ζελατίνη (Karayannakidis & Zotos, 2014b). Την τελευταία δεκαετία έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες αναφορικά με την αξιοποίηση των δερμάτων που προκύπτουν από τη φιλετοποίηση των αλιευμάτων για την παραγωγή ζελατίνης. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε χώρες όπως η Ισπανία, η Ταϊλάνδη, οι Η.Π.Α., η Ιαπωνία, η Ινδία και η Ν. Κορέα αφορούν στην αξιοποίηση των δερμάτων εμπορεύσιμων γηγενών ειδών αλιευμάτων (Zhou & Regenstein, 2004; Montero & Gómez-Guillén, 2000; Jongjareonrak et al., 2006; Pranoto et al. 2011; Liu et al. 2008; Cho et al. 2004).

Στην Ελλάδα ο γαλέος (*Galeus melastomus*) είναι ένα εμπορεύσιμο είδος ψαριού, του οποίου τα φιλέτα παραδοσιακά τηγανίζονται. Ωστόσο, κατά τη φιλετοποίηση του ψαριού, που συνήθως λαμβάνει μέρος αμέσως μετά την αλίευσή του, σχηματίζονται υποπροϊόντα, όπως δέρματα, οστά και εντόσθια μεταξύ άλλων,

τα οποία ως επί το πλείστον απορρίπτονται στη θάλασσα. Ένας από τους στόχους της παρούσας έρευνας όπως θα αναφερθεί και παρακάτω είναι η αξιοποίηση αυτών των υποπροϊόντων και συγκεκριμένα των δερμάτων.

2.5 Μέθοδοι παραγωγής ζελατίνης

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, η ζελατίνη είναι το υδατοδιαλυτό μίγμα πρωτεϊνών και πεπτιδίων που προκύπτει από τη μερική υδρόλυση του κολλαγόνου (Ledward, 1986). Οι μεταβολές στην τριτοταγή, δευτεροταγή και μερικώς στην πρωτοταγή δομή του κολλαγόνου μπορούν να προκληθούν είτε με χημικά μέσα (κατεργασία με οξύ ή άλκαλι) είτε ενζυμικά (Schrieber & Gareis, 2007). Σε βιομηχανική κλίμακα, η ζελατίνη παράγεται κατά κύριο λόγο με τη χρήση οξέων ή βάσεων. Για παράδειγμα, για την παραγωγή ζελατίνης από δέρματα χοίρου εφαρμόζεται όξινη κατεργασία για περίπου 24 h, ενώ στην περίπτωση των βόειων δερμάτων εφαρμόζεται αλκαλική κατεργασία έως και 20 εβδομάδες. Στη συνέχεια τα δέρματα εξουδετερώνονται και στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε θερμό νερό για την εκχύλιση της ζελατίνης. Το εκχύλισμα της ζελατίνης που λαμβάνεται υποβάλλεται σε συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση και στη συνέχεια αφυδατώνεται για να ληφθεί στερεό παρασκεύασμα (Hinterwaldner, 1977; GME 2015). Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την παρασκευή ζελατίνης από δέρματα ψαριών στηρίζονται στις συμβατικές μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Διαφέρουν ωστόσο ως προς το χρόνο της κατεργασίας με οξύ ή άλκαλι, που είναι κατά πολύ μικρότερος από τους ανωτέρω.

2.6 Ιδιότητες ζελατίνης

Οι ιδιότητες των παρασκευασμάτων ζελατίνης μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει εκείνες τις ιδιότητες που σχετίζονται με τη ρεολογία (π.χ. ικανότητα σχηματισμού πηκτής - τιμή Bloom, ιξώδες, σημείο τήξεως κ.λπ.), ενώ η δεύτερη κατηγορία, τις ιδιότητες που σχετίζονται με την επιφανειακή συμπεριφορά της ζελατίνης (π.χ. αφρισμός, γαλακτωματοποίηση κ.λπ.) (Schrieber & Gareis, 2007). Από τις ιδιότητες τις

ζελατίνης που αναφέρθηκαν μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν αυτές που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Από τις φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης η πιο σημαντική είναι η τιμή Bloom. Η τιμή Bloom ορίζεται ως το βάρος σε g που απαιτείται για να παραμορφώσουμε κατά 4 mm, με τυποποιημένο κυλινδρικό έμβολο διαμέτρου 1,27 cm και ταχύτητα 1 mm/min, μία υδροπηκτή ζελατίνης (6,67%), που έχει προηγουμένα ωριμάσει στους 10°C για 16-18 h (Karim & Bhat, 2009; BSI 1975). Τα περισσότερα εμπορικά παρασκευάσματα ζελατίνης παρουσιάζουν τιμές Bloom που κυμαίνονται από 50 έως 320 g (Waineright, 1977). Παρασκευάσματα ζελατίνης με τιμή Bloom <150 g χαρακτηρίζονται ως ζελατίνη χαμηλού Bloom, ενώ εκείνα με τιμές από 150-220 g ή >220 g ως μέτριου και υψηλού Bloom, αντίστοιχα (Badii & Howell, 2006; Anonymous, 2015).

Το ιξώδες των παρασκευασμάτων ζελατίνης είναι η δεύτερη κατά σειρά πιο σημαντική φυσική ιδιότητα. Γενικά, οι μετρήσεις του ιξώδους των διαλυμάτων ζελατίνης πραγματοποιούνται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των σημείων τήξεώς τους και συνήθως στους 60°C (Waineright, 1977; Avena-Bustillos et al. 2006; BSI 1975). Συνήθως τα εμπορικά παρασκευάσματα ζελατίνης εμφανίζουν τιμές ιξώδους που κυμαίνονται από 2 έως 7 cP και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάνουν μέχρι και τα 13 cP. Τα παρασκευάσματα ζελατίνης με υψηλές τιμές ιξώδους χρησιμοποιούνται για την σταθεροποίηση του αφρού σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής όπως το μαντολάτο, τα gummy bears κ.λπ. (Anonymous, 2015).

Το σημείο τήξεως των παρασκευασμάτων ζελατίνης αποτελεί επίσης σημαντικό ποιοτικό δείκτη (Karayannakidis & Zotos, 2014b). Όντας θερμοαντιστρεπτές, 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. Για το προσδιορισμό του σημείου τήξεως της ζελατίνης, σε πηκτή ζελατίνης 6,67% (β/ο) προστίθενται σταγόνες τετραχλωράνθρακα παρουσία μίας λιποδιαλυτής κόκκινης χρωστικής, η οποία διαχέεται μέσα στη ζελατίνη όταν αυτή αρχίσει να τήκεται. Η θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει αυτό το φαινόμενο είναι ουσιαστικά το σημείο τήξης της ζελατίνης (BSI, 1975; Waineright, 1977). Ωστόσο, μία σαφώς πιο γρήγορη, αξιόπιστη και με ελάχιστο χρόνο προετοιμασίας δείγματος μέθοδος είναι η

θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης, όπου το δείγμα υποβάλλεται σε ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα (Karayannakidis & Zotos, 2014b).

2.7 Μειονεκτήματα της ζελατίνης από δέρματα ψαριών

Γενικά τα παρασκευάσματα ζελατίνης θα πρέπει να είναι ευδιάλυτα σε θερμό νερό, να δίνουν διαυγή διαλύματα, να είναι άοσμα, άχρωμα ή με ελαφρώς κίτρινο χρώμα και να μην προσδίδουν ανεπιθύμητη οσμή, γεύση ή χρώμα στα τρόφιμα στα οποία προστίθενται (Giménez *et al.*, 2005; Montero & Gómez-Guillén, 2000). Στην περίπτωση της ζελατίνης από δέρματα ψαριών, τα κύρια μειονεκτήματα είναι το σκούρο χρώμα και η ανεπιθύμητη οσμή που σχετίζεται γενικά με τα προϊόντα των αλιευμάτων (Wasswa *et al.*, 2007). Επίσης, η ζελατίνη από δέρματα ψαριών, που ζουν κατά κύριο λόγο σε ψυχρά νερά, παρουσιάζει χαμηλότερη τιμή Bloom και σημείο τήξεως από αυτή των ψαριών που ζουν σε θερμά νερά, που με τη σειρά τους δίνουν παρασκευάσματα ζελατίνης με υποδεέστερες φυσικές ιδιότητες από αυτή των χερσαίων ζώων (Karayannakidis & Zotos, 2014b).

2.8 Χρήση ουσιών για τη βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων της ζελατίνης

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η ζελατίνη που λαμβάνεται από δέρματα ψαριών που ζουν σε ψυχρά νερά είναι υποδεέστερη, αναφορικά με τις φυσικές της ιδιότητες (τιμή Bloom, ιξώδες και σημείο τήξεως), ως προς τη ζελατίνη των χερσαίων ζώων, καθώς και αυτής που προέρχεται από δέρματα ψαριών που ζουν σε θερμά νερά. Επίσης, η ζελατίνη που προέρχεται από τα δέρματα ψαριών που ζουν σε θερμά νερά εμφανίζεται υποδεέστερη από αυτή των χερσαίων ζώων (Karayannakidis & Zotos, 2014b). Για το λόγο αυτό διάφορες ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί, με στόχο τη βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων της ζελατίνης από δέρματα ψαριών. Οι ενώσεις αυτές, γνωστές και ως βελτιωτικά (coenhancers), μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- **Ένζυμα:** Κατά κύριο λόγο τρανσγλουταμινάση (Fernández-Díaz *et al.*, 2001; Kołodziejaska *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2006; Jongjareonrak *et al.*, 2006; Norziah *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2009).

- **Πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες:** Για παράδειγμα αλβουμίνη αυγού, κ-καραγεννάνη, χιτοζάνη (Gómez-Estaca *et al.*, 2011; Haug *et al.*, 2004; Pranoto *et al.*, 2007; Badii και Howell, 2006).
- **Αναστολείς πρωτεασών:** Η χρήση αναστολέων πρωτεολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια της εκχύλισης της ζελατίνης από δέρματα ψαριών έχει αναφερθεί ότι αποτρέπει την υδρόλυση της ζελατίνης από τις πρωτεάσες (Nalinanon *et al.* 2008).
- **Άλλες ενώσεις:** Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν όλες εκείνες οι ενώσεις οι οποίες δεν μπορούν να ταξινομηθούν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες, όπως για παράδειγμα διάφορα άλατα (NaCl, NaH₂PO₄, MgCl₂, CaCl₂), η σουκρόζη κ.ά. (Karayannakidis & Zotos, 2014a; Zhou & Regenstein, 2000).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ουσίες ταννικό οξύ, φερουλικό οξύ και καφεϊκό οξύ βελτίωσαν σημαντικά τις ρεολογικές ιδιότητες πηκτών σουρίμι από σάρκα σκουμπριού (*Rastrelliger kanagurta*). Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση των παραπάνω φαινολικών ουσιών ήταν η οξείδωσή τους προς τις αντίστοιχες κινόνες, οι οποίες στη συνέχεια αντέδρασαν με τις πλευρικές αμινομάδες των πρωτεϊνών προς πολυμερισμό των τελευταίων (Balange & Benjakul, 2009a, 2009b). Κατά συνέπεια η χρήση των ανωτέρω φαινολικών ουσιών για τη βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων της ζελατίνης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ενδιαφέροντα.

2.9 Στόχοι της παρούσας έρευνας

Οι στόχοι της παρούσας έρευνας είναι οι ακόλουθοι:

- Η εφαρμογή μίας σύντομης τεχνολογίας για την παραγωγή ζελατίνης από δέρματα γαλέου (*Galeus melastomus*)
- Ο υπολογισμός της απόδοσης σε ζελατίνη (g ξηρής ζελατίνης/100 g δερμάτων)
- Ο χαρακτηρισμός της χημικής σύστασης της παραχθείσας ζελατίνης σε σχέση με εμπορικό παρασκεύασμα
- Ο χαρακτηρισμός των φυσικών ιδιοτήτων της παραχθείσας ζελατίνης σε σύγκριση με το εμπορικό παρασκεύασμα
- Ο χαρακτηρισμός του χρώματος της ζελατίνης με τη χρήση χρωματόμετρου σε σχέση με το εμπορικό παρασκεύασμα
- Ο μακροσκοπικός χαρακτηρισμός του χρώματος και της οσμής των διαλυμάτων της παραχθείσας ζελατίνης
- Ο έλεγχος τριών οξειδωμένων φαινολικών ουσιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στις φυσικές ιδιότητες της παραχθείσας ζελατίνης και η σύγκρισή τους με αυτές του εμπορικού παρασκευάσματος
- Ο μακροσκοπικός έλεγχος των πηκτών της παραχθείσας ζελατίνης, κατόπιν προσθήκης των οξειδωμένων φαινολικών ουσιών.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

Για την παραγωγή ζελατίνης χρησιμοποιήθηκαν δέρματα γαλέου (*Galeus melastomus*), τα οποία αποτελούν το κύριο υποπροϊόν που σχηματίζεται κατά την φιλετοποίηση του ψαριού. Τα δέρματα μεταφέρθηκαν σε ισοθερμικά κιβώτια από την ιχθυόσκαλα της Νέας Μηχανιώνας στο εργαστήριο Τεχνολογίας και Ελέγχου Ποιότητας Αλιευμάτων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Α.Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη (-20°C), πριν την έναρξη των πειραμάτων. Ως εμπορικό παρασκεύασμα χρησιμοποιήθηκε βόεια ζελατίνη (225 Bloom), τύπου Β (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν αναλυτικής καθαρότητας.

3.2 Προετοιμασία δερμάτων

Πριν την εφαρμογή του πρωτόκολλου εκχύλισης της ζελατίνης, τα δέρματα αποψύχθηκαν και στη συνέχεια με τη χρήση μαχαιριού απομακρύνθηκαν τυχόν υπολείμματα σάρκας. Τα καθαρισμένα πλέον δέρματα τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια (<2 cm²) με ένα ψαλίδι και ακολούθως χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ζελατίνης.

3.3 Παραγωγή ζελατίνης

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παραγωγή της ζελατίνης από δέρματα γαλέου ήταν ουσιαστικά αυτό που αναπτύχθηκε από τους Karayannakidis & Zotos (2014a). Εκατό γραμμάρια δερμάτων γαλέου τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 1000 mL και αναμίχθηκαν με 400 mL υδατικού διαλύματος NaOH 0,2 Μ. Η αλκαλική κατεργασία πραγματοποιήθηκε για 30 min υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 30 min, τα δέρματα στραγγίστηκαν και κατεργάστηκαν για άλλα 30 min όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μετά τη δεύτερη

αλκαλική κατεργασία τα δέρματα πλύθηκαν με νερό, μέχρι την επίτευξη τιμής pH 7,0-7,5. Στη συνέχεια τα εξουδετερωμένα δέρματα στραγγίστηκαν και κατεργάστηκαν για 60 min με 400 mL υδατικού διαλύματος CH₃COOH 0,1 M υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την όξινη κατεργασία, τα δέρματα πλύθηκαν με νερό, μέχρι την επίτευξη τιμής pH 6,5-7,0. Ακολούθως, τα εξουδετερωμένα δέρματα αναμίχθηκαν με 400 mL προθερμασμένου (~80°C) νερού και το μίγμα (νερό+δέρματα, ~56°C) τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο (WB-6; Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Germany) στους 55±1°C, όπου και παρέμεινε για 60 min (εκχύλιση ζελατίνης) υπό συνεχή ανάδευση. Το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από τα δέρματα με τη χρήση κόσκινου 25 mesh και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε διήθηση υπό ελαττωμένη πίεση (φίλτρο 5-13 μm) και ακολούθως σε κατεργασία με ενεργό άνθρακα, με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων οσμών. Το εκχύλισμα ζελατίνης τοποθετήθηκε σε πλαστικούς περιέκτες, οι οποίοι εν συνεχεία τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για 18 h. Το νερό απομακρύνθηκε από τα εκχυλίσματα με λυοφιλίωση, η οποία πραγματοποιήθηκε στους -20°C και πίεση 1,013 mbar για 96 h. Η θερμοκρασία των ραφιών του λυοφιλιωτή ρυθμίστηκε στους 25°C κατά τη διάρκεια της ξήρανσης. Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, τα δείγματα της ζελατίνης τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα, όπου και παρέμειναν μέχρι την έναρξη των αναλύσεων.

3.4 Χημική σύσταση ζελατίνης

Ο προσδιορισμός της χημικής σύστασης (υγρασία, πρωτεΐνη και τέφρα) των παρασκευασμάτων ζελατίνης (εμπορικής και ψαριού), καθώς και των δερμάτων του γαλέου, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους ανάλυσης (AOAC, 1990). Ο συντελεστής 5,4 χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή του αζώτου σε πρωτεΐνη, θεωρώντας ότι η κύρια πρωτεΐνη των δερμάτων από τα οποία προήλθαν τα παρασκευάσματα είναι το κολλαγόνο. Ο προσδιορισμός του ολικού λίπους έγινε με τη μέθοδο των Bligh και Dyer (1959) όπως τροποποιήθηκε από τους Hanson και Olley (1963).

3.4.1 Προσδιορισμός υγρασίας

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε υγρασία προσδιορίστηκε σταθμικά. Περίπου 2 g δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε προζυγισμένο μεταλλικό περιέκτη. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο στους $103 \pm 2^\circ\text{C}$ για 18 h και εν συνεχεία σε ξηραντήριο για 30 min. Μετά το πέρας των 30 min τα δείγματα ξαναζυγίστηκαν και η υγρασία υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{Υγρασία} = \frac{B_1 + B_2 - B_3}{B_2} \times 100$$

όπου B_1 το βάρος του μεταλλικού περιέκτη σε g, B_2 το βάρος του δείγματος πριν την ξήρανση σε g και B_3 το βάρος του δείγματος και του μεταλλικού περιέκτη μετά την ξήρανση σε g.

3.4.2 Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Το περιεχόμενο ολικό άζωτο προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl. Περίπου 1 g δείγματος ζυγίστηκε με ακρίβεια σε άτεφρο διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε φιάλη Kjeldahl. Στη φιάλη προστέθηκαν πετραδάκια βρασμού, 20 mL πυκνού H_2SO_4 (98%) και δύο ταμπλέτες (kjeltabs - 3,5 g K_2SO_4 και 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Το περιεχόμενο θερμάνθηκε σε ειδικό μπλοκ θέρμανσης μέχρι να ληφθεί διαυγές πράσινο διάλυμα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε συσκευή απόσταξης, όπου το περιεχόμενο άζωτο συλλέχθηκε σε κωνική φιάλη 250 mL, στην οποία προηγουμένα είχαν προστεθεί 40 mL υδατικού διαλύματος H_3BO_3 (4%, β/ο) παρουσία μίγματος δεικτών (μπλε του μεθυλενίου με ερυθρό του μεθυλίου σε αλκοόλη). Μετά τη λήψη 150 mL αποστάγματος, πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση με πρότυπο διάλυμα HCl (0,100 N). Από τα καταναλωθέντα mL του HCl , υπολογίστηκε το περιεχόμενο στο δείγμα άζωτο και στη συνέχεια η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, με χρήση του εμπειρικού συντελεστή 5,4.

$$\% \text{Πρωτεΐνη} = \frac{V \times 0,1 \times 14 \times 5,4}{B_1 \times 1000} \times 100$$

όπου V ο όγκος του διαλύματος HCl σε mL και B_1 το βάρος του δείγματος σε g.

3.4.3 Προσδιορισμός λίπους

Για το σκοπό αυτό ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10 g δείγματος σε φιάλη φυγοκέντρησης, στην οποία προστέθηκαν επίσης 40 mL μεθανόλης και 20 mL χλωροφορμίου, το τελευταίο με ακρίβεια (σιφώνιο πληρώσεως 20 mL). Η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο και το περιεχόμενο ομογενοποιήθηκε για 1 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 20 mL χλωροφορμίου με ακρίβεια και ακολούθησε ομογενοποίηση για άλλα 30 s. Η τρίτη ομογενοποίηση πραγματοποιήθηκε για 30 s, μετά την προσθήκη 20 mL αποσταγμένου νερού. Το δείγμα στη συνέχεια υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές (1363 g) για 20 min στους 4°C. Η φυγοκέντρηση οδήγησε στο σχηματισμό 3 στιβάδων. Με τη βοήθεια σιφώνιου πληρώσεως λήφθηκαν 20 mL χλωροφορμίου από την βαριά φάση και μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη με επίπεδο πυθμένα. Ακολούθησε η απομάκρυνση του χλωροφορμίου με περιστροφικό εξατμιστήρα και η τοποθέτηση της φιάλης σε φούρνο στους $103 \pm 2^\circ\text{C}$ για 30 min.

Έπειτα, η φιάλη τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για άλλα 30 min και κατόπιν ζυγίστηκε. Η λιποπεριεκτικότητα υπολογίστηκε από την ακόλουθη σχέση:

$$\% \text{ Λίπος} = \frac{(B_3 - B_2) \times 2}{B_1} \times 100$$

όπου B_1 το βάρος του δείγματος σε g, B_2 το βάρος της σφαιρικής φιάλης σε g και B_3 το βάρος της σφαιρικής φιάλης με το περιεχόμενο λίπος μετά την ξήρανση.

3.4.4 Προσδιορισμός τέφρας

Για τον προσδιορισμό της τέφρας περίπου 5 g δείγματος ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε προζυγισμένη χαλαζιακή κάψα. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποτέφρωσης στους $550 \pm 5^\circ\text{C}$ για 18 h. Μετά το πέρας των 18 h το δείγμα τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για 1 h και κατόπιν ζυγίστηκε. Η περιεχόμενη τέφρα υπολογίστηκε από την ακόλουθη σχέση:

$$\%Tέφρα = \frac{B_3 + B_1}{B_2} \times 100$$

όπου B_1 το βάρος της χαλαζιακής κάψας σε g, B_2 το βάρος του δείγματος σε g και B_3 το τελικό ολικό βάρος μετά την αποτέφρωση σε g.

3.5 Υπολογισμός της απόδοσης σε ζελατίνη

Η % απόδοση σε ζελατίνη υπολογίστηκε από το βάρος της ζελατίνης που λήφθηκε μετά τη λυοφιλίωση και το αρχικό βάρος των δερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή της, ως εξής:

$$\% \text{ Απόδοση σε ζελατίνη} = \frac{\text{Βάρος ζελατίνης μετά τη λυοφιλίωση (g)}}{\text{Αρχικό βάρος δερμάτων γαλέου (g)}} \times 100$$

3.6 Χρώμα και οσμή

Ο προσδιορισμός του χρώματος των δειγμάτων ζελατίνης (βόειας και ψαριού) έγινε με τη χρήση χρωματομέτρου (MICRO COLOR; Dr. Lange GmbH, Düsseldorf, Germany). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο Petri μέχρι πλήρωσής του και στη συνέχεια λήφθηκαν μετρήσεις από 5 διαφορετικά σημεία του τρυβλίου. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν αφορούσαν την τιμή L^* (0-100, λαμπρότητα/σκοτεινότητα), a^* (+ ερυθρό, - πράσινο) και b^* (+ κίτρινο, - κυανό). Η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με πρότυπη άσπρη και μαύρη πλάκα ($X=77,7$, $Y=82,8$ και $Z=89,7$).

Η ύπαρξη ανεπιθύμητης οσμής στο παρασκεύασμα ζελατίνης από δέρματα γαλέου έγινε μακροσκοπικά.

3.7 Παρασκευή πηκτών ζελατίνης

Για την παρασκευή πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου και βοοειδών, ζυγίστηκαν 1,334 g παρασκευάσματος σε ποτήρι ζέσεως 50 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 mL απιονισμένου νερού και το προκύπτον διάλυμα, αφού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο, το οποίο είχε

προηγούμενα ρυθμιστεί στους 60°C. Το κάθε διάλυμα ζελατίνης (6,67% β/ο) παρέμεινε στο υδατόλουτρο για 60 min με ενδιάμεση ανάδευσή του, ανά 10 min. Στη συνέχεια τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 10±1°C για 16 h πριν τον προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων (τιμή Bloom, ιξώδες και σημείο τήξης) τους.

Πηκτές ζελατίνης από δέρματα γαλέου παρασκευάστηκαν και με την προσθήκη τριών οξειδωμένων φαινολικών ουσιών (ταννικό, φερούλικό και καφεϊκό οξύ) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1, 0,5 και 1,0 g φαινολικής ουσίας/100 g ζελατίνης). Αναλυτικά, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των παραπάνω φαινολικών ουσιών σε τιμή pH 8,00±0,02, το οποίο ρυθμίστηκε με την προσθήκη σταγόνων NaOH 6 N. Στη συνέχεια σε διαλύματα ζελατίνης από δέρματα γαλέου προστέθηκαν διαφορετικοί όγκοι των ανωτέρω διαλυμάτων και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 8,00±0,02, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα διαλύματα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο τους 40°C, όπου υποβλήθηκαν σε οξυγόνωση για 1 h. Στη συνέχεια ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και η τιμή pH ρυθμίστηκε στο 7,00±0,02. Σε κάθε διάλυμα προστέθηκε αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 mL, αναδεύτηκε για 2 min και τοποθετήθηκε στο ψυγείο για 16 h, πριν των προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων.

3.8 Προσδιορισμός τιμής Bloom

Η τιμή Bloom προσδιορίστηκε με όργανο μέτρησης μηχανικών ιδιοτήτων (TA.XT.plus, Stable Micro Systems, Ltd., Godalming, Surrey, UK) στους 10°C. Για τον προσδιορισμό της τιμής Bloom χρησιμοποιήθηκε ειδικό τυποποιημένο κυλινδρικό έμβολο από τεφλόν (διάμετρος 1,27 cm). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ταχύτητα παραμόρφωσης 1mm/min. Η τιμή Bloom ορίστηκε ως το βάρος σε g που απαιτείται για να παραμορφωθεί η πηκτή της ζελατίνης κατά 4 mm.

3.9 Προσδιορισμός ιξώδους

Η μέτρηση του ιξώδους πραγματοποιήθηκε με ιξωδόμετρο κώνου-πλάκας (DV-II; Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA, USA) στους 60°C και

στα 100 grm. Αρχικά, οι πηκτές ζελατίνης τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους $60\pm 1^{\circ}\text{C}$, όπου και παρέμειναν μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας. Στη συνέχεια 2 mL από το διάλυμα της ζελατίνης μεταφέρθηκαν στο ιξωδόμετρο για την πραγματοποίηση των μετρήσεων.

3.10 Προσδιορισμός σημείου τήξης

Το σημείο τήξης των πηκτών ζελατίνης προσδιορίστηκε με θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (differential scanning calorimetry). Περίπου 10 mg πηκτής ζελατίνης ζυγίστηκαν με ακρίβεια σε καψίδιο αλουμινίου και τοποθετήθηκαν σε θερμιδόμετρο διαφορικής σάρωσης (DSC 6; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), το οποίο είχε προηγουμένα βαθμονομηθεί με ίνδιο ($T_o=156.6^{\circ}\text{C}$, $\Delta H=28.45\text{ J/g}$). Το δείγμα υποβλήθηκε σε θερμική σάρωση από τους 10 έως τους 45°C με ρυθμό σάρωσης $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας τήξης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια λογισμικού (DSC 6 V2.0; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) και ουσιαστικά ήταν η θερμοκρασία στην οποία παρατηρήθηκε η μέγιστη θερμοροή.

3.11 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η κατανομή των μοριακών βαρών μελετήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Laemmli (1970). Οι πηκτές ζελατίνης (~10 mg) αναμίχθηκαν σε σωλήνες Eppendorf με 500 μL διαλύματος Laemmli και θερμάνθηκαν σε βράζον υδατόλουτρο για 10 min. Στη συνέχεια τα δείγματα ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρθηκαν σε έτοιμη πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που είχε προηγουμένα τοποθετηθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 45 mA για 50 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίστηκε σε χρώση (Coomassie Brilliant Blue) για 20 min και στη συνέχεια αποχρωματίστηκε με υδατικό διάλυμα που περιείχε 10% (o/o) μεθανόλη και 5% (o/o) οξικό οξύ. Ακολούθως, η αποχρωματισμένη πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους εξοπλισμένη με φίλτρο μετατροπής UV σε ορατό και λήφθηκαν φωτογραφίες της πηκτής. Η ταυτοποίηση

των μορίων έγινε με πρότυπο πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών και το λογισμικό VisionWorksLS (UVP, Inc. Upland, CA, USA).

3.12 Χρώμα των πηκτών ζελατίνης

Το χρώμα όλων των πηκτών ζελατίνης που παρασκευάστηκαν εξετάστηκε μακροσκοπικά. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν φωτογραφίες των παραχθέντων πηκτών που παρασκευάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες 10 mL, κατόπιν τοποθέτησής τους σε λευκό υπόβαθρο.

3.13 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Statistica (version 12, Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της χημικής σύστασης, των χρωματικών παραμέτρων και των φυσικών ιδιοτήτων μεταξύ των δειγμάτων ζελατίνης από δέρματα γαλέου και βοοειδών έγινε με εφαρμογή της δοκιμής Student (δίπλευρος έλεγχος). Για τη σύγκριση των φυσικών ιδιοτήτων (τιμή Bloom, ιξώδες και σημείο τήξης) των δειγμάτων ζελατίνης από δέρματα γαλέου, παρουσία ποικίλων φαινολικών ουσιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, εφαρμόστηκε ανάλυση της διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (One-way ANOVA). Η σύγκριση των μέσων όρων, όταν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), πραγματοποιήθηκε βάσει των 95% ορίων εμπιστοσύνης, που υπολογίστηκαν από την κοινή διακύμανση (pooled variance) της ANOVA.

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Απόδοση σε ζελατίνη

Η % απόδοση σε ζελατίνη, από το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παραγωγή της από δέρματα γαλέου, βρέθηκε ίση με $12,70 \pm 0,27\%$ (g ξηρής ζελατίνης/100 g δερμάτων γαλέου). Η απόδοση της παρούσας μελέτης ήταν μεγαλύτερη από αυτή που έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες για δέρματα ψαριών, όπως γλώσσας (*Solea vulgaris*), μπακαλιάρου (*Gadus morhua*) και οξύρρυγχου (*Acipenser baeri*) με απόδοσεις 8,3, 7,2 και 2,4%, αντίστοιχα (Gómez-Guillén *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2009). Αξίζει να αναφερθεί ότι η σχετικά μεγάλη απόδοση σε ζελατίνη της παρούσας μελέτης επιτεύχθηκε με μόνο μία ώρα εκχύλισης στους 55°C, ενώ στις ανωτέρω μελέτες οι χρόνοι εκχύλισης ξεπερνούν τη μία ώρα και φθάνουν έως και τις δώδεκα ώρες. Γενικά η διαφοροποίηση στην απόδοση σε ζελατίνη μεταξύ διαφορετικών πρώτων υλών αλλά και για την ίδια πρώτη ύλη οφείλεται σε μία σειρά από παράγοντες όπως το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για την εκχύλισή της, τη φύση της πρώτης ύλης (είδος κολλαγόνου), την περιεκτικότητα των δερμάτων σε κολλαγόνο, καθώς και τη χημική σύσταση των δερμάτων (Jongjareonrak *et al.*, 2006).

4.2 Χημική σύσταση

Στον Πίνακα 1 φαίνεται η χημική σύσταση των δερμάτων γαλέου, καθώς και αυτή των ζελατινών. Το κύριο συστατικό των δερμάτων ήταν το νερό, με δεύτερο κύριο συστατικό την πρωτεΐνη και τρίτο κατά σειρά την τέφρα, ενώ η ποσότητα του περιεχόμενου λίπους ήταν αμελητέα. Η μεγάλη περιεκτικότητα των δερμάτων σε πρωτεΐνη σε συνδυασμό με τη χαμηλή λιποπεριεκτικότητα αυτών, υποδηλώνει ότι τα δέρματα του γαλέου αποτελούν μία δυνητική πηγή κολλαγόνου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ζελατίνης, χωρίς να χρειάζεται ενδιάμεσο στάδιο απομάκρυνσης του λίπους, που εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή ζελατίνης από δέρματα χερσαίων ζώων (χοίρων και βοοειδών).

Πίνακας 1. Χημική σύσταση (g/100 g) δερμάτων γαλέου και ζελατίνης από δέρματα γαλέου και βοοειδών.

Δείγμα	%Υγρασία	%Πρωτεΐνη	%Λίπος	%Τέφρα
Δέρματα γαλέου	61,78±3,00	26,27±0,48	0,12±0,02	10,38±0,39
Ζελατίνη γαλέου	5,64±0,42 ^b	91,71±1,53 ^a	0,01±0,00 ^a	0,60±0,23 ^b
Βόεια ζελατίνη	8,05±0,07 ^a	89,63±0,25 ^b	0,02±0,00 ^a	0,31±0,07 ^a

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση τριών προσδιορισμών (n=3). Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες είναι στατιστικά σημαντικοί (p<0,05).

Αναφορικά με τη χημική σύσταση των δύο ζελατινών, το κύριο συστατικό ήταν η πρωτεΐνη, με δεύτερο το νερό και τρίτο την τέφρα. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στη χημική σύσταση μεταξύ των δύο ζελατινών πιθανότατα να οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν για την παραγωγή τους. Γενικά, τα εμπορικά παρασκευάσματα ζελατίνης περιέχουν 84-90% πρωτεΐνη, 1-2% μεταλλικά άλατα και το υπόλοιπο είναι νερό (GME, 2015). Από τα αποτελέσματα, αναφορικά με τη χημική σύσταση της ζελατίνης που παράχθηκε από δέρματα γαλέου, είναι φανερό ότι το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παραγωγή της ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό (μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και χαμηλή περιεκτικότητα σε τέφρα) και συγκεκριμένα στο να απομακρυνθούν μεταλλικά άλατα αλλά και να ανακτηθούν μεγάλες ποσότητες υδρολυμένου κολλαγόνου (ζελατίνης).

4.3 Οσμή και χρώμα

Τα κύρια μειονεκτήματα της ζελατίνης από δέρματα ψαριών είναι το σκούρο χρώμα και η ανεπιθύμητη οσμή, που συχνά εμφανίσουν τα ψάρια (Wasswa *et al.* 2007). Γενικά το χρώμα και η οσμή ενός παρασκευάσματος ζελατίνης εξαρτάται από την πρώτη ύλη και το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για την παραγωγή του. Τόσο το χρώμα όσο και η οσμή, δεν επηρεάζουν τις φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης (τιμή Bloom, ιξώδες, σημείο τήξης κ.λπ.). Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα σημαντικό τα παρασκευάσματα ζελατίνης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τροφίμων να

μην προσδίδουν ανεπιθύμητες οσμές και γεύσεις στο τρόφιμο, πέρα από τη βελτίωση των λειτουργικών του ιδιοτήτων (Karayannakidis & Zotos, 2014b).

Στην παρούσα εργασία το εκχύλισμα ζελατίνης που λήφθηκε αμέσως μετά την κατεργασία με ενεργό άνθρακα ήταν άοσμο, όπως επίσης και το τελικό προϊόν. Σε προηγούμενη μελέτη, οι Mu Yongga *et al.* (2004) έδειξαν ότι η κατεργασία των εκχυλισμάτων ζελατίνης από δέρματα και οστά της πέρκας του Νείλου (*Lates niloticus*), απομάκρυνε αποτελεσματικά την ανεπιθύμητη οσμή από τα αντίστοιχα παρασκευάσματα ζελατίνης.

Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι χρωματομετρικές παράμετροι της ζελατίνης από δέρματα γαλέου, καθώς και του εμπορικού παρασκευάσματος.

Πίνακας 2. Χρωματομετρικές παράμετροι (L^* , a^* και b^*) βόειας ζελατίνης και ζελατίνης από δέρματα γαλέου.

Δείγμα	L^*	a^*	b^*
Ζελατίνη γαλέου	64.0 ± 2.5^a	-1.4 ± 0.2^b	2.1 ± 1.8^b
Βόεια ζελατίνη	49.2 ± 2.9^b	1.1 ± 1.0^a	21.0 ± 2.1^a

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση πέντε προσδιορισμών ($n=5$). Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες είναι στατιστικά σημαντικοί ($p<0,05$).

Η ζελατίνη από δέρματα γαλέου παρουσίασε μεγαλύτερη τιμή L^* από τη βόεια ζελατίνη και υποδεκαπλάσια τιμή b^* , που στην προκειμένη περίπτωση αποτελεί δείκτη της ύπαρξης κίτρινου χρώματος. Οι τιμές a^* , αν και διαφορετικές μεταξύ τους ($p<0,05$) και μάλιστα με διαφορετικό πρόσημο σε κάθε περίπτωση, που υποδηλώνει διαφορετικό χρωματισμό (+ κόκκινο, - πράσινο), δεν ήταν αντιληπτές μακροσκοπικά, όπως οι τιμές b^* . Στηριζόμενοι στις τιμές L^* , a^* και b^* , μπορούμε να πούμε ότι η ζελατίνη από δέρματα γαλέου παρουσίασε ανοιχτόχρωμο πρασινοκίτρινο χρώμα, ενώ η βόεια ζελατίνη εμφάνισε σκοτεινόχρωμο κοκκινο-κίτρινο χρώμα. Το γεγονός ότι η ζελατίνη από δέρματα γαλέου εμφάνισε λευκό χρώμα και ήταν άοσμη, πιθανά να σημαίνει ότι αυτή μπορεί να προστεθεί σε τρόφιμα, στα οποία θέλουμε να βελτιώσουμε τις λειτουργικές τους ιδιότητες, χωρίς να προσδώσει κάποιο ανεπιθύμητο χρωματισμό αλλά και ανεπιθύμητη οσμή.

4.4 Φυσικές ιδιότητες

Η τιμή Bloom είναι η κύρια φυσική ιδιότητα που καθορίζει την εμπορική αξία ενός παρασκευάσματος ζελατίνης (Wainwright, 1977). Όσο μεγαλύτερη η τιμή Bloom, τόσο μεγαλύτερη και η τιμή πώλησης της ζελατίνης. Σύμφωνα με τους Schrieber & Gareis (2007) τα περισσότερα εμπορικά παρασκευάσματα ζελατίνης παρουσιάζουν τιμές Bloom που κυμαίνονται από 50 έως 300 g. Στην παρούσα εργασία η τιμή Bloom της ζελατίνης από δέρματα γαλέου ήταν 309.8 ± 8.7 g, που ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη από την τιμή Bloom του εμπορικού παρασκευάσματος (232.4 ± 11.4 g) (Πίνακας, 3).

Το ιξώδες είναι η δεύτερη κατά σειρά πιο σημαντική φυσική ιδιότητα των παρασκευασμάτων ζελατίνης (Karayannakidis & Zotos, 2014b). Η ζελατίνη από δέρματα γαλέου εμφάνισε ιξώδες $4,06 \pm 0,06$ cP, που ήταν μικρότερο του $4,95 \pm 0,21$ cP, που εμφάνισε η βόεια ζελατίνη. Γενικά το ιξώδες των εμπορικών παρασκευασμάτων ζελατίνης κυμαίνεται από 2 έως 7 cP και όπως και στην περίπτωση της τιμής Bloom, όσο μεγαλύτερο το ιξώδες της ζελατίνης, τόσο μεγαλύτερη η εμπορική της αξία (Badii & Howell, 2006).

Πίνακας 3. Φυσικές ιδιότητες (τιμή Bloom, ιξώδες και σημείο τήξεως) παρασκευασμάτων ζελατίνης.

Δείγμα	Τιμή Bloom (g)	Ιξώδες (cP)	Σημείο τήξεως (°C)
Ζελατίνη γαλέου	$309,8 \pm 8,7^a$	$4,06 \pm 0,06^b$	$27,9 \pm 0,1^b$
Βόεια ζελατίνη	$232,4 \pm 11,4^b$	$4,95 \pm 0,21^a$	$32,1 \pm 0,2^a$

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικές αποκλίσεις τριών προσδιορισμών ($n=3$). Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες είναι στατιστικά σημαντικοί ($p < 0,05$).

Το σημείο τήξης ενός παρασκευάσματος ζελατίνης αποτελεί επίσης σημαντικό ποιοτικό δείκτη (Karayannakidis & Zotos, 2014a). Γενικά το σημείο τήξεως των παρασκευασμάτων ζελατίνης από δέρματα χερσαίων ζώων κυμαίνεται από 28 έως 32°C, ενώ αυτών που προκύπτουν από δέρματα ψαριών κυμαίνεται από 11 έως 28°C (Karim & Bhat, 2009). Το μεγάλο εύρος τιμών στα σημεία τήξεως των παρασκευασμάτων ζελατίνης από δέρματα ψαριών οφείλεται στη διαφορετική

θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν. Έτσι τα δέρματα ψαριών που ζουν σε θερμά νερά δίνουν παρασκευάσματα ζελατίνης με υψηλό σημείο τήξεως, ενώ στην περίπτωση των ψαριών που ζουν σε ψυχρά νερά, από τα δέρματά τους προκύπτουν παρασκευάσματα με χαμηλά σημεία τήξεως. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 η ζελατίνη από δέρματα γαλέου εμφάνισε σαφώς μικρότερο σημείο τήξεως ($27,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$) από αυτό του εμπορικού παρασκευάσματος ($32,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$), αλλά μεγαλύτερο σε σχέση με τα σημεία τήξεως παρασκευασμάτων ζελατίνης από άλλα δέρματα ψαριών, το οποίο πιθανότητα να σχετίζεται με το περιβάλλον στο οποίο ζει (θερμά νερά).

Τα αποτελέσματα σχετικά με τις φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης από δέρματα γαλέου έδειξαν ότι αυτή είναι ανώτερη ποιοτικά ως προς την τιμή Bloom αλλά υποδεέστερη σε σχέση με το ιξώδες και το σημείο τήξεως.

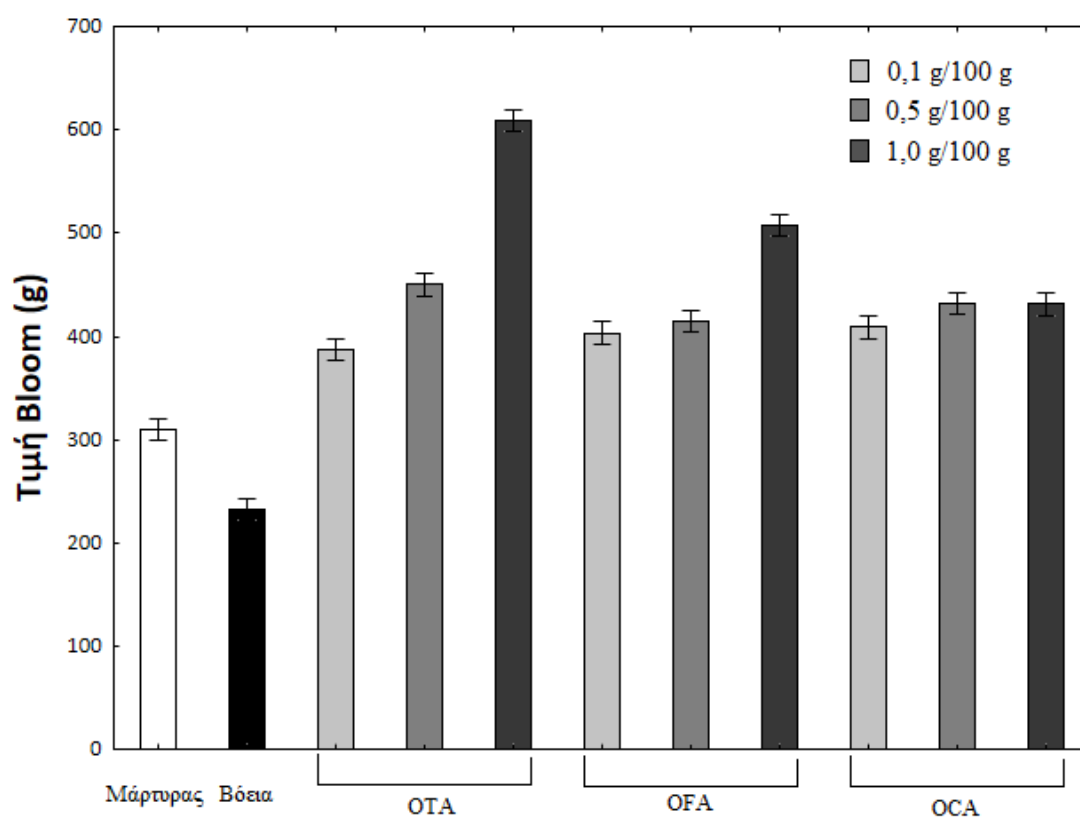
4.5 Επίδραση των φαινολικών ουσιών στις φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης

Η επίδραση της προσθήκης διάφορων οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων στην τιμή Bloom της ζελατίνης από δέρματα γαλέου φαίνεται στο Σχήμα 1. Το ταννικό οξύ παρουσίασε την πιο ισχυρή δράση από τις φαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν, αναφορικά με την τιμή Bloom των πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου. Η τιμή Bloom αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα σε όλες τις συγκεντρώσεις ταννικού οξέος που εξετάστηκαν και παρουσίασε αυξητική τάση με την αύξηση της συγκέντρωσής του στις πηκτές της ζελατίνης.

Η προσθήκη φερουλικού οξέος οδήγησε επίσης σε αύξηση της τιμής Bloom. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή Bloom των πηκτών που περιείχαν φερουλικό οξύ σε συγκεντρώσεις 0,1 και 0,5% (g φερουλικού οξέος/100 g ζελατίνης), ενώ αυτή αυξήθηκε σημαντικά με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του φερουλικού οξέος και συγκεκριμένα σε επίπεδο συγκέντρωσης 1,0%.

Αναφορικά με τη δράση του καφεϊκού οξέος, σημαντική αύξηση στην τιμή Bloom σε σχέση με το μάρτυρα παρατηρήθηκε σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης που εξετάστηκαν. Η τιμή Bloom των πηκτών ζελατίνης αυξήθηκε σημαντικά σε

επίπεδα συγκέντρωσης μέχρι 0,5%, ενώ παραπέρα αύξησή της σε ποσοστό 1,0% δεν έδειξε να επιφέρει σημαντική μεταβολή.

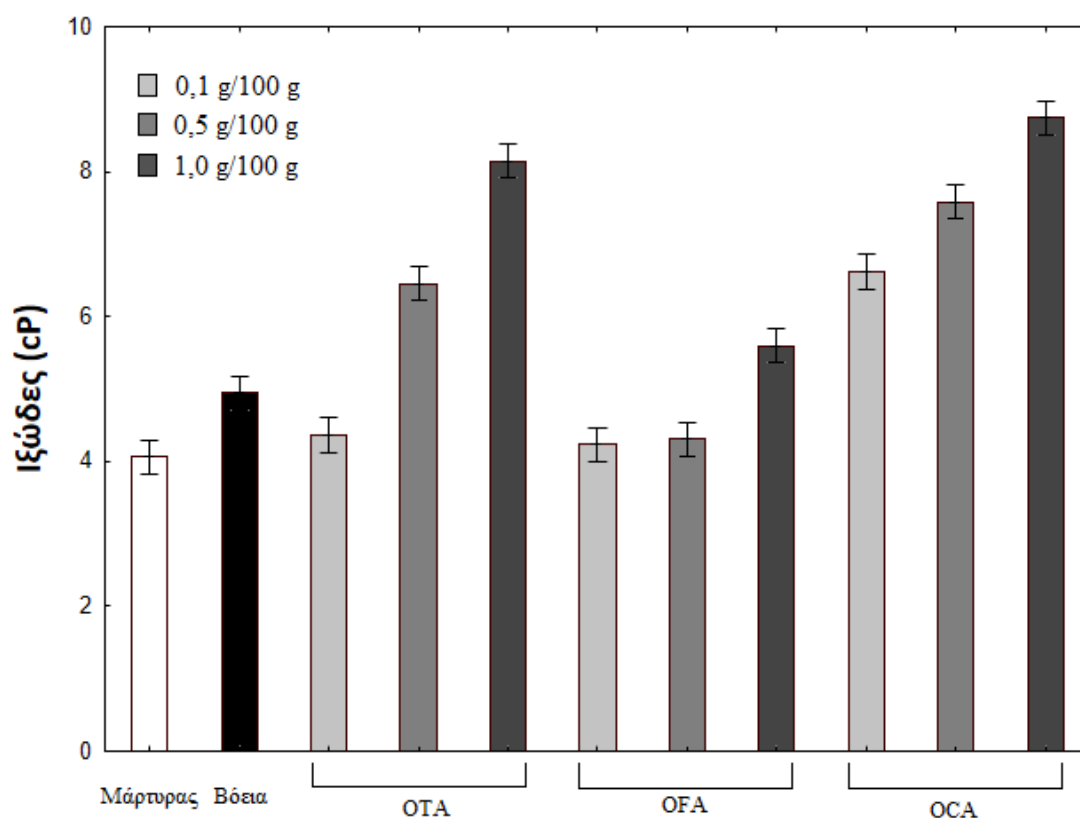


Σχήμα 1. Επίδραση διάφορων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών σε ποικίλες συγκεντρώσεις στην τιμή Bloom (10°C) πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι τριών προσδιορισμών (n=3) και συνοδεύονται από τα 95% όρια εμπιστοσύνης που προέκυψαν από την κοινή διακύμανση (pooled variance) της ANOVA. Μπάρες των οποίων τα όρια εμπιστοσύνης δεν αλληλοκαλύπτονται είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$). OTA: οξειδωμένο ταννικό οξύ, OFA: οξειδωμένο φερουλικό οξύ και OCA: οξειδωμένο καφεϊκό οξύ.

Η επίδραση των φαινολικών ουσιών (ταννικό, φερουλικό και καφεϊκό οξύ) στο ιξώδες των διαλυμάτων ζελατίνης από δέρματα γαλέου φαίνεται στο Σχήμα 2. Την πιο ισχυρή δράση αναφορικά με το ιξώδες των διαλυμάτων ζελατίνης την παρουσίασε το ταννικό και το καφεϊκό οξύ. Σε αμφότερες τις φαινολικές ενώσεις, η αύξηση της συγκέντρωσής τους στα διαλύματα ζελατίνης από δέρματα γαλέου προκάλεσε σημαντική αύξηση στην τιμή του ιξώδους, η οποία, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2, διπλασιάστηκε σε επίπεδα συγκέντρωσης 1,0% σε σχέση με το μάρτυρα, τόσο για το ταννικό όσο και για το καφεϊκό οξύ. Η προσθήκη ταννικού οξέος στα διαλύματα ζελατίνης από δέρματα γαλέου σε συγκέντρωση 0,1% δεν προκάλεσε

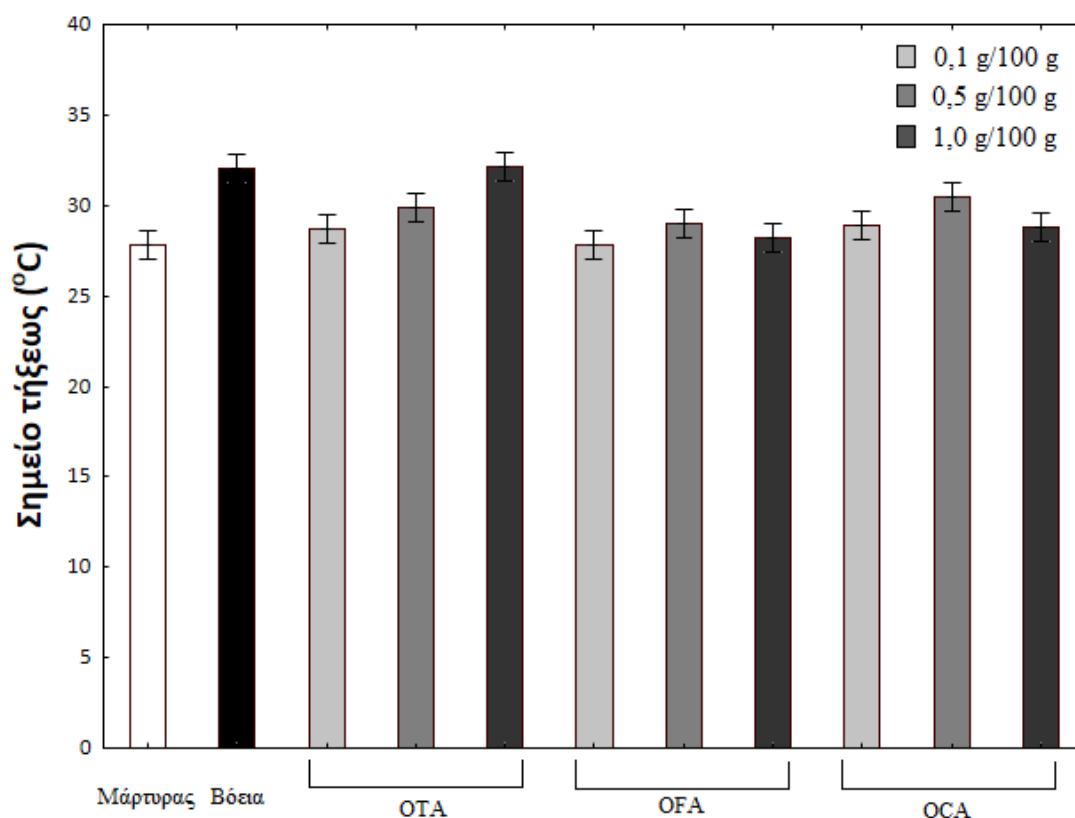
καμία μεταβολή στο ιώδες του διαλύματος. Η διαφορά στην τιμή του ιώδους της ζελατίνης από δέρματα γαλέου έγινε αισθητή σε επίπεδα συγκέντρωσης ταννικού οξέος άνω του 0,5%. Τόσο το δείγμα ζελατίνης με 0,5% ταννικό οξύ όσο και εκείνο στο οποίο το ταννικό οξύ προστέθηκε σε συγκέντρωση 1,0%, παρουσίασαν ιώδες μεγαλύτερο από αυτό του εμπορικού παρασκευάσματος (βόεια ζελατίνη).

Σε αντίθεση με το ταννικό και το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο ιώδες της ζελατίνης από δέρματα γαλέου σε επίπεδα συγκέντρωσης 0,1 και 0,5%. Ωστόσο, το ιώδες της ζελατίνης στην οποία προστέθηκε φερουλικό οξύ σε ποσοστό 1,0% αυξήθηκε σημαντικά και εμφάνισε παραπλήσια τιμή με αυτή του εμπορικού παρασκευάσματος.



Σχήμα 2. Επίδραση διάφορων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών σε ποικίλες συγκεντρώσεις στο ιώδες (60°C) διαλυμάτων ζελατίνης από δέρματα γαλέου. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι τριών προσδιορισμών (n=3) και συνοδεύονται από τα 95% όρια εμπιστοσύνης που προέκυψαν από την κοινή διακύμανση (pooled variance) της ANOVA. Μπάρες των οποίων τα όρια εμπιστοσύνης δεν αλληλοκαλύπτονται είναι στατιστικά σημαντικές (p<0,05). OTA: οξειδωμένο ταννικό οξύ, OFA: οξειδωμένο φερουλικό οξύ και OCA:οξειδωμένο καφεϊκό οξύ.

Στο Σχήμα 3 φαίνεται η επίδραση διάφορων φαινολικών ουσιών σε ποικίλες συγκεντρώσεις στο σημείο τήξης των πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου, καθώς και στο σημείο τήξης του μάρτυρα αλλά και του εμπορικού παρασκευάσματος. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3 το φερουλικό οξύ δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο σημείο τήξεως των πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου. Στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος, μία μικρή αύξηση, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, παρατηρήθηκε στο σημείο τήξης της πηκτής ζελατίνης που περιείχε 0,5% καφεϊκό οξύ, το οποίο επανήλθε στην αρχική τιμή με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος (1,0%) στη ζελατίνη.



Σχήμα 3. Επίδραση διάφορων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών σε ποικίλες συγκεντρώσεις στο σημείο τήξεως πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι τριών προσδιορισμών ($n=3$) και συνοδεύονται από τα 95% όρια εμπιστοσύνης που προέκυψαν από την κοινή διακύμανση (pooled variance) της ANOVA. Μπάρες των οποίων τα όρια εμπιστοσύνης δεν αλληλοκαλύπτονται είναι στατιστικά σημαντικές ($p<0,05$). OTA: οξειδωμένο ταννικό οξύ, OFA: οξειδωμένο φερουλικό οξύ και OCA: οξειδωμένο καφεϊκό οξύ.

Από τις φαινολικές ενώσεις που εξετάστηκαν, μόνο το ταννικό οξύ έδειξε αυξητική τάση στο σημείο τήξεως της ζελατίνης καθώς αυξήθηκε η συγκέντρωσή

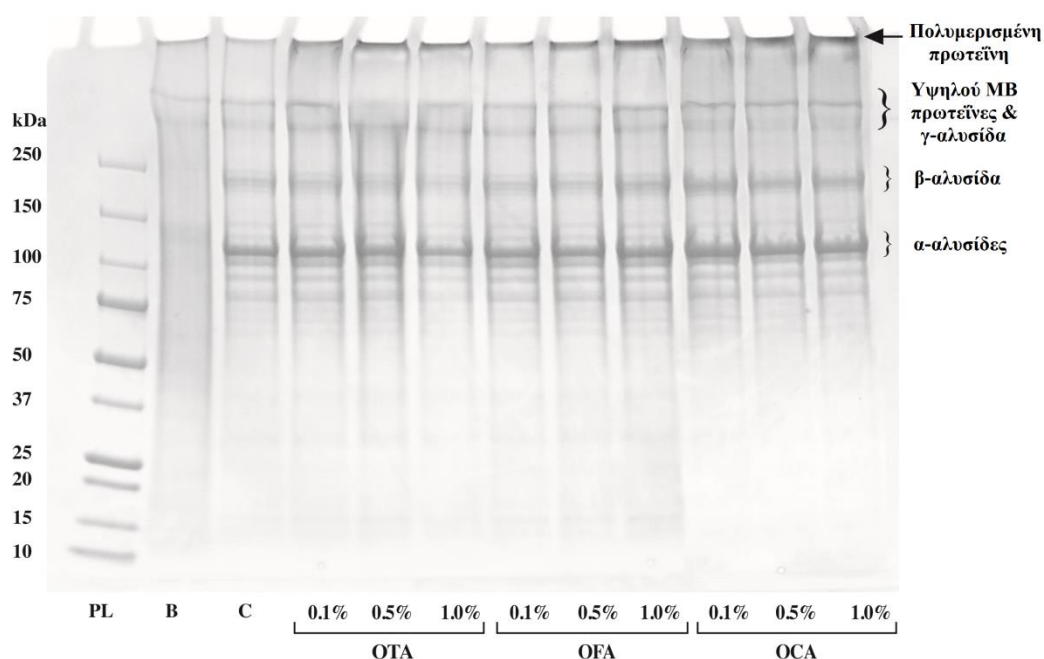
του. Η πηκτή ζελατίνης από δέρματα γαλέου στην οποία προστέθηκε το ταννικό οξύ σε συγκέντρωση 1,0% παρουσίασε σημείο τήξεως ίδιο με αυτό του εμπορικού παρασκευάσματος.

Σε προηγούμενες μελέτες οι Balange & Benjakul (2009a, 2009b) έδειξαν ότι πολλές από τις παραπάνω φαινολικές ενώσεις στην οξειδωμένη τους μορφή και συγκεκριμένα τα ταννικό, φερουλικό, και καφεϊκό οξύ, καθώς και η κατεχίνη βελτίωσαν σημαντικά τις ρεολογικές ιδιότητες πηκτών σουρίμι από σκουμπρί (*Rastrelliger kanagurta*) σε συγκεντρώσεις 0,50, 0,40, 0,50 και 0,10% (g φαινολικής ένωσης/100 g πρωτεΐνης), αντίστοιχα. Οι κοινές πολυφαινόλες συνήθως εμφανίζουν δομή όρθο-διφαινόλης. Με οξείδωσή τους, που μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε ενζυμικά είτε με μοριακό οξυγόνο, προκύπτουν οι ορθο-κινόνες, οι οποίες αντιδρούν με τις πλευρικές αμινομάδες των πρωτεϊνών προς σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών C-N. Κατά συνέπεια η αύξηση της τιμής Bloom, του ιξώδους και σε ορισμένες περιπτώσεις του σημείου τήξεως των πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου να οφείλεται στον πολυμερισμό των πρωτεϊνών λόγω της παραπάνω αντίδρασης.

Ο πολυμερισμός των πρωτεϊνών των παρασκευασμάτων ζελατίνης από δέρματα γαλέου επιβεβαιώθηκε από την μελέτη της κατανομής των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία δωδέκυλο θειικού νατρίου και β-μερκαπτοαιθανόλης (Σχήμα 4). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4, τόσο η βόεια όσο και η ζελατίνη που εκχυλίστηκε από τα δέρματα του γαλέου παρουσίασαν παραπλήσια πρωτεϊνικά προφίλ, αποτελούμενα από τη γ-αλυσίδα (~300 kDa), τη β-αλυσίδα (~200 kDa) και τις α-αλυσίδες (~100 kDa). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για παρασκευάσματα ζελατίνης από δέρματα άλλων ειδών ψαριών. Η ύπαρξη πρωτεϊνικών μορίων υψηλού μοριακού βάρους και ιδιαίτερα α- και β-αλυσίδων στο παρασκεύασμα ζελατίνης από δέρματα γαλέου πιθανά να αιτιολογεί τη μεγαλύτερη τιμή Bloom σε σχέση με το εμπορικό παρασκεύασμα. Επίσης, η απουσία πρωτεϊνικών μορίων μικρού μοριακού βάρους <75 kDa στο παρασκεύασμα ζελατίνης από δέρματα γαλέου να αιτιολογεί την μικρότερη τιμή ιξώδους που αυτό παρουσίασε σε σχέση με τη βόεια ζελατίνη.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4, με την προσθήκη των οξειδωμένων φαινολικών ουσιών στα διαλύματα της ζελατίνης που εκχυλίστηκε από δέρματα γαλέου,

εμφανίστηκε ένα νέο πρωτεϊνικό μόριο υψηλού μοριακού βάρους, το οποίο δεν εισήλθε στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι η ένταση του χρώματος της πολυμερισμένης πρωτεΐνης αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης της εκάστοτε οξειδωμένης φαινολικής ένωσης και ήταν πιο έντονη για το ταννικό και καφεϊκό οξύ. Αυτό πιθανά να σημαίνει ότι τα ταννικό και καφεϊκό οξύ να οδήγησαν στο σχηματισμό πιο καλά οργανωμένου πρωτεϊνικού πλέγματος και κατά συνέπεια σε πηκτές/διαλύματα ζελατίνης με μεγαλύτερη τιμή Bloom και ιξώδες.

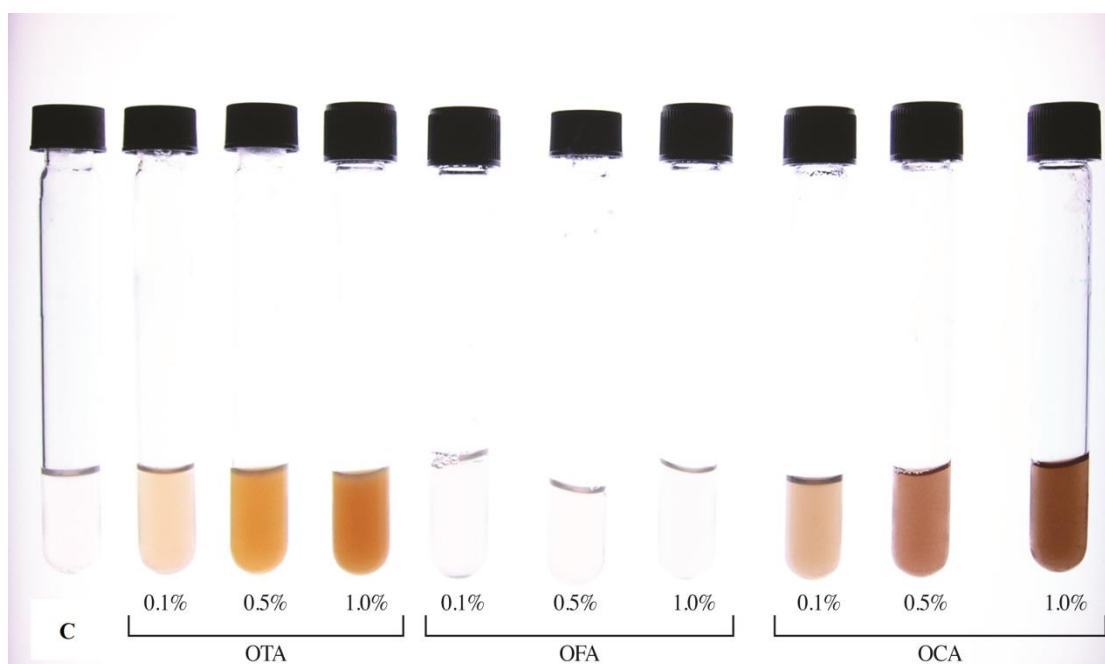


Σχήμα 4. Προφίλ πρωτεϊνών παρασκευασμάτων βόειας ζελατίνης, καθώς και ζελατίνης από δέρματα γαλέου χωρίς ή με την προσθήκη διάφορων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών σε ποικίλες συγκεντρώσεις. PL: πρότυπο μοριακών βαρών, B: βόεια ζελατίνη, C: μάρτυρας (ζελατίνη από δέρματα γαλέου).

4.6 Χρώμα των πηκτών ζελατίνης

Όπως αναφέρθηκε στα υλικά και μέθοδοι, των χρώμα των πηκτών ζελατίνης που εκχυλίστηκε από δέρματα γαλέου χωρίς ή με την προσθήκη οξειδωμένων φαινολικών ουσιών, εξετάστηκε μακροσκοπικά. Η ζελατίνη από δέρματα γαλέου (μάρτυρας) σχημάτισε υδροπηκτές που δεν εμφάνισαν κανένα χρωματισμό (άχρωμες) (Σχήμα 5). Ωστόσο, με την προσθήκη οξειδωμένων φαινολικών ουσιών

και συγκεκριμένα ταννικού και καφεϊκού οξέος, οι πηκτές ζελατίνης εμφάνισαν καφέ χρώμα, η ένταση του οποίου αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης. Παρόλα αυτά οι πηκτές παρέμειναν διάφανες. Αντίθετα, το φερουλικό οξύ δεν επηρέασε το χρώμα των πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.



Σχήμα 5. Πηκτές ζελατίνης από δέρματα γαλέου χωρίς ή με την προσθήκη διάφορων οξειδωμένων φαινολικών ουσιών σε ποικίλες συγκεντρώσεις. OTA: οξειδωμένο ταννικό οξύ, OFA: οξειδωμένο φερουλικό οξύ και OCA:οξειδωμένο καφεϊκό οξύ.

5. Συμπεράσματα

Τα δέρματα του γαλέου (*Galeus melastomus*) αποτελούν μία δυνητική πηγή κολλαγόνου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως είναι η ζελατίνη. Στην παρούσα εργασία το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παραγωγή ζελατίνης από δέρματα γαλέου ήταν πολύ πιο σύντομο από τις συμβατικές μεθόδους που εφαρμόζονται για την παραγωγή ζελατίνης σε βιομηχανική κλίμακα και εμφάνισε απόδοση περί το 12,70% (g ξηρής ζελατίνης/100 g δερμάτων). Η ζελατίνη που παράχθηκε παρουσίασε καλύτερο χρώμα από το αντίστοιχο εμπορικό παρασκεύασμα και ήταν άοσμη. Επίσης, οι πηκτές ζελατίνης (6,67%, β/ο) από δέρματα γαλέου εμφάνισαν υψηλή τιμή Bloom (~310 g) και υψηλό σημείο τήξεως (~28°C). Ωστόσο, τόσο το σημείο τήξεως όσο και το ιζώδες της ζελατίνης από δέρματα γαλέου ήταν μικρότερα από αυτά του εμπορικού παρασκευάσματος (βόεια ζελατίνη).

Η προσθήκη φαινολικών ουσιών στην οξειδωμένη τους μορφή και συγκεκριμένα του ταννικού, φερουλικού και καφεϊκού οξέος στη ζελατίνη που εκχυλίστηκε από δέρματα γαλέου επηρέασε τις φυσικές της ιδιότητες. Η προσθήκη ταννικού οξέος οδήγησε σε πηκτές με μεγάλη τιμή Bloom, η οποία αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του ταννικού οξέος. Παρόμοιες τάσεις παρατηρήθηκαν και για το ιζώδες και στο σημείο τήξης. Η προσθήκη του καφεϊκού οξέος είχε ευεργετική δράση κατά κύριο λόγο στο ιζώδες της ζελατίνης από δέρματα γαλέου, ενώ μικρή αύξηση προκάλεσε στην τιμή Bloom, σε συγκέντρωση 0,5%. Ωστόσο, το σημείο τήξεως των πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη καφεϊκού οξέος σε καμία από τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Το φερουλικό οξύ παρουσίασε ευεργετική δράση στην τιμή Bloom και το ιζώδες των πηκτών ζελατίνης από δέρματα γαλέου σε συγκέντρωση 1,0% για το ιζώδες και σε όλο των εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν για την τιμή Bloom. Ωστόσο δεν είχε καμία επίδραση στο σημείο τήξεως της ζελατίνης.

Η ευεργετική δράση του ταννικού οξέος και του καφεϊκού οξέος στην οξειδωμένη τους μορφή σε επιλεγμένες φυσικές ιδιότητες του παρασκευάσματος

ζελατίνης από δέρματα γαλέου επισκιάστηκε από την ανάπτυξη καφέ χρώματος, του οποίου η ένταση αυξήθηκε καθώς η συγκέντρωσή τους στη ζελατίνη αυξήθηκε. Από τις φαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν, μόνο το φερουλικό οξύ δεν φάνηκε να επιφέρει στο χρώμα των πηκτών της ζελατίνης. Συμπερασματικά μπορεί να λεχθεί, ότι η ζελατίνη που παράχθηκε με το προτεινόμενο πρωτόκολλο εκχύλισης από δέρματα γαλέου μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές στα τρόφιμα προς αντικατάσταση των εμπορικά διαθέσιμων παρασκευασμάτων ζελατίνης. Επίσης, οι φυσικές ιδιότητες της ζελατίνης από δέρματα γαλέου μπορούν να βελτιωθούν με τη χρήση οξειδωμένων φαινολικών ουσιών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της προσθήκης των ανωτέρω παρασκευασμάτων ζελατίνης και ιδιαίτερα αυτών που περιέχουν ταννικό και καφεϊκό οξύ και συγκεκριμένα στο κατά πόσο μπορούν να επηρεάσουν το χρώμα του τελικού προϊόντος ή αν η συνεισφορά τους στο χρώμα είναι αμελητέα.

6. Βιβλιογραφία

- Anonymous, (2013). Gelatin Technical Info. http://www.pbgelatins.com/binaries/Gelatin%20uk_tcm11-12472.pdf
- AOAC, (1990). Official Methods of Analysis, 15th Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Avena-Bustillos, C.W., Olsen, D.A., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P.J. & Mchugh, T.H. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71, E202-E207.
- Bae, H.J., Darby, D.O., Kimmel, R.A., Park, H.J. & Whiteside, W.S. (2009). Effects of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin-nanoclay composite film. *Food Chemistry*, 114, 180-189.
- Balange, A.K. & Benjakul, S. (2009a). Effect of oxidized tannic acid on the gel properties of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) mince and surimi prepared by different washing processes. *Food Hydrocolloids*, 23, 1963-1701.
- Balange, A.K. & Benjakul, S. (2009b). Effect of oxidized phenolic compounds n the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *Food Science and Technology*, 42, 1059-1064.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid oxidation and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- BSI (British Standards Institution). 1975. Methods for sampling and testing gelatine (physical and chemical methods), BS 757, London.
- Burjanadze, T.V. (2000). New analysis of the phylogenetic change of collagen thermostability. *Biopolymers*, 53, 523-528.
- Cheow, C.S., Norizah, M.S., Kyaw, Z.Y. & Howell, N.K. (2007). Preparation and characterization of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chemistry*, 101, 386-391.
- Cho, S.M., Kwak, K.S., Park, D.C., Gu, Y.S., Ji, C.I., Jang, D.H., Lee, E.B. & Kim, S.B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids*, 18, 573-579.

- Choi, S.-S. & Regenstein, J.M. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, 65, 194-199.
- Eastoe, J.E. & Leach, A.A. (1977). Chemical constitution of gelatin. In: *The Science and Technology of Gelatin*. (Ward, A.G. & Courts, A. Eds.). pp.73-107, Academic Press, London.
- Fernández-Díaz, M.D., Montero, P. & Gómez-Guillén, M.C. (2001). Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. *Food Chemistry*, 74, 161-167.
- Fernández-Díaz, M.D., Montero, P. & Gómez-Guillén, M.C. (2001). Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. *Food Chemistry*, 74, 161-167.
- Gelatine Manufacturers of Europe (GME), (2014). <http://www.gelatine.org/about-gelatine/manufacturing/raw-materials.html>. Accessed on January 2nd, 2015.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-Martín F. & Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25, 1461-1469.
- Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A. & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.
- Hanson, S.W.F. & Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemistry Journal*, 89, 101-102.
- Hao, S., Li, L., Yang, X., Cen, J., Shi, H., Bo, Q. & He, J. (2009). The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments. *Food Chemistry*, 115, 124-128.
- Haug, I.J., Draget, K.I. & Smidsrod, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 203-213.

- Hinterwaldner, R. (1977). Technology of gelatin manufacture. In: The Science and Technology of Gelatin. (Ward, A.G. and Courts, A. Eds.). pp. 315-364, Academic Press, London.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Tanaka, M. (2006). Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 20, 1216-1222.
- Karayannakidis, P.D. & Zotos, A. (2014a). Physicochemical characterization of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin and its modification by the addition of various coenhancers. *Journal of Food Processing and Preservation* (In press).
- Karayannakidis, P.D. & Zotos, A. (2014b). Fish processing byproducts as a potential source of gelatin: A review. *Journal of Aquatic Food Production and Technology* (In press).
- 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.
- Kołodziejska, I., Kaczorowski, K., Piotrowska, B. & Sadowska, M. (2004). Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chemistry*, 86, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage of T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Ledward, D.A. (1986). Gelation of gelatin. In: Functional properties of food macromolecules. (Mitchell, J.R. and Ledward, D.A. Eds.), pp. 171-201, Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Liu, H.Y., Li, D. & Guo, S.D. (2008). Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin from fish skins preserved by different methods. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 41, 1425-1430.

- Montero, P. & Gómez-Guillén, M.C. (2000). Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*, 65, 434-438.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B. & Duodu, K.G. (2004). Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 581-592.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Kishimura, H. (2008). Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids*, 22, 615-622.
- Norziah, M.H., Al-Hassan, A., Khairulnizam, A.B., Mordi, M.N. & Norita, M. (2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 23, 1610-1616.
- Norziah, M.H., Al-Hassan, A., Khairulnizam, A.B., Mordi, M.N. & Norita, M. (2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 23, 1610-1616.
- Pati, F., Adhikari, B. & Santanu, D. (2010). Isolation of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101, 3737-3742.
- Pranoto, Y., Lee, C.M & Park, H.J. (2007). Characterizations of gelatin films added with gellan and κ -carrageenan. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 40, 766-774.
- Rahman, M.S., Al-Saidi, G.S. & Guizani, N. (2008). Thermal characterization of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and mammalian gelatin. *Food Chemistry*, 108, 472-481.
- Schrieber, R. & Gareis, H. (2007). *Gelatine Handbook*, pp. 45-117, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Senaratne, L.S., Park, P.-J. & Kim, S.-K. (2006). Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97, 191-197.

- Wainwright, F.W. (1977). Physical tests for gelatin and gelatin products. In *The Science and Technology of Gelatin*, (A.G. Ward and A. Courts, eds.) pp. 507-534, Academic Press, London.
- Wasswa, J, Tang, J. & Gu, X. (2007). Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. *Food Reviews International*, 23, 159-174.
- Yi, J.B., Kim, Y.T., Bae, H.J., Whiteside, W.S. & Park, H.J. (2006). Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71, E376-E383.
- Zhou, P. & Regenstein, J.M. (2004). Optimization of extraction conditions for pollock skin gelatin. *Journal of Food Science*, 69, C393-C398.
- Zhou, P. & Regenstein, J.M. (2005). Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*, 70, C392-C396.