

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΜΟΝΑΔΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Π. ΚΑΝΔΥΛΙΑΡΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΚΑΨΟΚΕΦΑΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ, 2020

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Π. ΚΑΝΔΥΛΙΑΡΗ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ**

ANALYSIS OF BY-PRODUCTS OF FISH AQUACULTURE AND EVALUATION OF
THEIR BIOACTIVITY

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΡΙΑ ΚΑΨΟΚΕΦΑΛΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ
Α' ΜΕΛΟΣ: ΜΑΡΙΑ ΚΑΨΟΚΕΦΑΛΟΥ
Β' ΜΕΛΟΣ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΠΑΝΔΡΟΥΛΑΚΗΣ
Γ' ΜΕΛΟΣ: ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΛΛΟΥΧΟΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Α' ΜΕΛΟΣ: ΜΑΡΙΑ ΚΑΨΟΚΕΦΑΛΟΥ
Β' ΜΕΛΟΣ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΠΑΝΔΡΟΥΛΑΚΗΣ
Γ' ΜΕΛΟΣ: ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΛΛΟΥΧΟΣ
Δ' ΜΕΛΟΣ: ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΠΡΟΕΣΤΟΣ
Ε' ΜΕΛΟΣ: ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΔΑΣΕΝΑΚΗΣ
Ζ' ΜΕΛΟΣ: ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΖΑΜΠΕΛΑΣ
ΣΤ' ΜΕΛΟΣ: ΣΤΑΥΡΟΣ ΖΩΓΡΑΦΑΚΗΣ

Περίληψη

Η έννοια της κυκλικής οικονομίας και της ορθής αξιοποίησης ανεκμετάλλευτων πρώτων υλών είναι πιο επίκαιρη από ποτέ. Το μοντέλο της κυκλικής οικονομίας, επιδιώκοντας τη χρήση δευτερογενών υλικών και αποβλήτων ως παραγωγικών πόρων και χρήσιμων υλών, έρχεται να ανταποκριθεί στην φιλοδοξία για αειφόρο ανάπτυξη και να συνεισφέρει στην αντιμετώπιση μιας από τις μεγαλύτερες παγκόσμιες προκλήσεις, αυτή της επισιτιστικής ανασφάλειας.

Ωστόσο, για την επίτευξη των παραπάνω, απαιτείται λεπτομερής ανάλυση κάθε φάσης της αγροδιατροφικής παραγωγής ώστε να επισημανθούν οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην απόρριψη τροφίμων στα διάφορα στάδια αυτής, και κυρίως σε τομείς όπως η παραγωγή φρούτων και λαχανικών, προϊόντων κρέατος και ιχθυρών. Ειδικά για τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας, με την ετήσια παραγωγή να ανέρχεται στους 131 εκατομμύρια τόνους ψαριών, η αντίστοιχη ποσότητα υποπροϊόντων ψαριών που παράγονται φτάνει τους 32 εκατομμύρια τόνους.

Η αξιοποίηση των υποπροϊόντων της ιχθυοκαλλιέργειας για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης και διατροφικής αξίας αποτελεί επομένως μια πρόκληση, η οποία εντάσσεται στο πλαίσιο της σύγχρονης σκέψης για ελαχιστοποίηση των αποβλήτων τροφίμων (κυκλική οικονομία) και την αξιοποίησή τους για νέα τρόφιμα για την αντιμετώπιση της διατροφικής επισφάλειας.

Στόχος της παρούσας έρευνας αποτελεί η μελέτη των υποπροϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας με σκοπό την διερεύνηση δυνατότητας αξιοποίησής τους, συμβάλλοντας έτσι στην αειφορία του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας. Από τα εκτρεφόμενα ελληνικά είδη, επιλέχθηκαν να εξετασθούν οι τσιπούρες, ως ένα από τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη, καθώς επίσης και οι κρانيοί, ως ένα από τα «νέα» και υποσχόμενα είδη εκτροφής.

Ειδικότερα με την παρούσα έρευνα επιδιώκεται να δοθεί απάντηση στα παρακάτω ερευνητικά ερωτήματα:

- Ποια η διατροφική σύνθεση των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας και αν διαφέρει ανά κατηγορία υποπροϊόντος, είδος ψαριού και ηλικία ψαριού;
- Ποια η σύσταση των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας σε μέταλλα, βαρέα μέταλλα και ιχνοστοιχεία καθώς και του αντίστοιχου θαλάσσιου περιβάλλοντος από το οποίο αυτά προήλθαν;
- Ποια είναι η βιοδραστικότητά των υποπροϊόντων ψαριών όσον αφορά την αντικαρκινική τους δράση και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου;
- Ποια η δυνατότητα αξιοποίησης των υποπροϊόντων ή κλασμάτων αυτών ώστε να δημιουργηθεί νέο καινοτόμο προϊόν;

Μελέτη Α. Σύσταση υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας

Η μεταποίηση ψαριών στην υδατοκαλλιέργεια δημιουργεί σημαντικές ποσότητες υποπροϊόντων οι οποίες παραμένουν ανεπαρκώς χρησιμοποιημένες ή / και αναξιοποίητες. Στη μελέτη αυτή, αξιολογήθηκε η σύσταση των υποπροϊόντων (κεφάλι, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα και δέρμα) ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας, προκειμένου να εκτιμηθεί η διατροφική τους αξία για μελλοντική ανάπτυξη προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η χημική σύσταση των δειγμάτων ψαριών (περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, λίπος, τέφρα, υγρασία και ανόργανα συστατικά) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τις πρότυπες μεθόδους από την Ένωση Επίσημων Αναλυτικών Χημικών (AOAC) και του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO). Το προφίλ των λιπαρών οξέων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία και το πρωτεϊνικό προφίλ εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών. Η χημική σύσταση των υποπροϊόντων

των ψαριών παρουσίασε διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων υποπροϊόντων. Το δέρμα φάνηκε πως αποτελεί σημαντική πηγή πρωτεϊνών, τα πτερύγια και τα κόκκαλα είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο, και τα κεφάλια, τα εντόσθια και τα κόκκαλα ήταν μια καλή πηγή λιπιδίων. Τα πλέον άφθονα λιπαρά οξέα που βρέθηκαν στα υποπροϊόντα ήταν το ελαϊκό, παλμιτικό, λινελαϊκό και εικοσενοϊκό οξύ, ενώ οι πλέον άφθονες πρωτεΐνες ήταν υπομονάδα συνθετάσης έψιλον της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), η αφυδρογονάση της μιτοχονδριακής νικοτιναμιδικής αδενίνης δινουκλεοτιδίου (NADH) και της μιτοχονδριακής συνθετάση της υπομονάδας 8 του κυτοχρώματος b-c1. Αυτά τα δεδομένα υπέδειξαν ότι τα υποπροϊόντα συνιστούν πολύτιμες πηγές θρεπτικών συστατικών και συνεπώς θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σύμφωνα με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας.

Μελέτη Β. Ασφάλεια υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας ως προς τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων

Τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών αποτελούν μια εξαιρετική πηγή θρεπτικών συστατικών ωστόσο μπορεί ταυτόχρονα να περιέχουν και τοξικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό τα υποπροϊόντα να χαρακτηρίζονται πλήρως, πέρα από τη χημική τους σύσταση (Μελέτη Α) και για την ασφάλειά τους. Στόχος της μελέτης Β ήταν συνεπώς ο προσδιορισμός των μετάλλων σε δείγματα ιστών ψαριών, ζωοτροφών, θαλασσινού νερού και αιωρούμενης σωματιδιακής ύλης για να προσδιοριστούν τα επίπεδα μετάλλων στα αντίστοιχα δείγματα. Τα φιλέτα και υποπροϊόντα (κόκκαλα, βράγχια, εντόσθια, κεφάλι, δέρμα, πτερύγια) από τσιπούρες και κρانيούς, δύο διαφορετικών ηλικιών, και οι αντίστοιχες ιχθυοτροφές των ψαριών αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του Αρσενικού (As), Καδμίου (Cd), Κοβαλτίου (Co), Χρωμίου (Cr), Χαλκού (Cu), Σιδήρου (Fe), Μαγγανίου (Mn), Νικελίου (Ni), Μόλυβδου (Pb), Βαναδίου (V) και Ψευδαργύρου (Zn). Τα δείγματα

θαλασσινού νερού και αιωρούμενης σωματιδιακής ύλης συλλέχθηκαν από 4 διαφορετικές τοποθεσίες (εντός και εκτός της μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας αντίστοιχα) και σε 2 διαφορετικά βάθη και αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V και Zn. Από τις αναλύσεις των δειγμάτων φάνηκε ότι τα φιλέτα παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε μέταλλα έναντι των άλλων ιστών των ψαριών, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε μεταξύ των δύο διαφορετικών ηλικιών, ούτε μεταξύ των δύο διαφορετικών ειδών. Όλα τα υποπροϊόντα των ψαριών, με εξαίρεση τη συγκέντρωση καδμίου στα εντόσθια, ακολουθούσαν τα αντίστοιχα νομοθετικά όρια της ΕΕ για τη συγκέντρωση μετάλλων καθιστώντας τα ασφαλή για κατανάλωση. Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στις ιχθυοτροφές, όχι μόνο πληρούσαν τα όρια που θέτει η Ευρωπαϊκή Ένωση, αλλά ήταν μάλιστα σημαντικά χαμηλότερες. Τέλος, όσον αφορά το περιβάλλον των ψαριών, οι μετρήσεις των μετάλλων στο θαλασσινό νερό ήταν μικρότερες από τα αντίστοιχα όρια της Ευρωπαϊκής Οδηγίας για τη Θαλάσσια Στρατηγική, υποδηλώνοντας απουσία ρύπανσης. Ο παραπάνω προσδιορισμοί έδειξαν επομένως πως τα υποπροϊόντα των ψαριών και το αντίστοιχο περιβάλλον τους δεν αποτελεί δυνητικό κίνδυνο για τον άνθρωπο όσον αφορά τα βαρέα μέταλλα.

Μελέτη Γ. Βιοδραστικότητα υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας

Η κατανάλωση ψαριών ενθαρρύνεται στις διατροφικές κατευθυντήριες γραμμές λόγω της σχέσης της με τα οφέλη για την υγεία. Συγχρόνως, η επεξεργασία των ψαριών δημιουργεί υποπροϊόντα τα οποία μπορούν να ανέλθουν έως και 50-70% του βάρους των ψαριών μετά από φιλετοποίηση. Η διερεύνηση επομένως της βιοδραστικότητας των υποπροϊόντων ψαριών και η πιθανή αξιοποίησή τους για την ανάπτυξη συστατικών τροφίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας ή / και συμπληρωμάτων διατροφής, θα συνέβαλε στη μείωση των αποβλήτων μέσω της δημιουργίας νέων προϊόντων υψηλής θρεπτικής αξίας. Σκοπός της παρούσας

μελέτης αποτέλεσε η *in vitro* διερεύνηση της βιοδραστικότητας των υποπροϊόντων ψαριών και η πιθανή τους δράση ως προς την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και ως προς την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου. Το δείγμα για τις αναλύσεις διερεύνησης αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων προήλθε από κεφάλι, βράγχια, πτερύγια, κόκκαλα και δέρμα από κρανιούς και τσιπούρες. Τα δείγματα αυτά υδρολύθηκαν παρουσία ενζύμων και τα παραγόμενα πρωτεϊνικά υδρολύματα εξετάστηκαν σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου ανθρώπου (κύτταρα COLO320) και κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπου (κύτταρα MCF7A) για 48 ώρες. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTT. Για τις αντίστοιχες αναλύσεις διερεύνησης της δράσης στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, το δείγμα που εξετάστηκε αποτελούνταν από 36 άτομα κρανιού και 60 τσιπούρας για τα υποπροϊόντα από κεφάλι, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα και δέρμα καθώς και από το φιλέτο των αντίστοιχων ψαριών. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε *in vitro* μεθοδολογία πέψης παρουσία προσθήκης σιδήρου και προσδιορίστηκε το ποσοστό συνολικού διαλυτού σιδήρου με ατομική απορρόφηση. Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι μερικά πρωτεϊνικά υδρολύματα υποπροϊόντων ψαριών, ασκούν μια σημαντική *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε επιλεκτική αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων MCF7A και COLO320 όταν αυτά υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πρωτεϊνικό υδρόλυμα από βράγχια τσιπούρας και τα MCF7A με πρωτεϊνικό υδρόλυμα από δέρμα κρανιού και τσιπούρας. Ωστόσο στην περίπτωση της μελέτης που αφορούσε την επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, δεν παρατηρήθηκε θετική επίδραση των δειγμάτων που μελετήθηκαν, παρά μόνο στην περίπτωση των εντοσθίων, τα οποία ωστόσο παραμένουν τα πιο δύσκολα αξιοποιήσιμα υποπροϊόντα λόγω του υψηλού τους μικροβιολογικού φορτίου. Οι παραπάνω δραστικότητες φαίνεται πως οφείλονται στην παρουσία βιοδραστικών πεπτιδίων. Επομένως η

απομόνωση αυτών από υποπροϊόντα ψαριών και η ενσωμάτωσή τους σε συμπληρώματα διατροφής πιθανώς να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Μελέτη Δ. Προτάσεις αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας

Τα προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης όπως ψάρια, θαλασσινά και φύκη αποτελούν, όπως φαίνεται και από τις ως άνω μελέτες Α, Β και Γ, σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών και βιολογικά δραστικών ενώσεων. Συστατικά όπως τα ιχθυέλαια, οι πρωτεΐνες ψαριών και τα φύκη, έχουν ήδη βρει εφαρμογή στην αρτοποιία, τα γαλακτοκομικά, τα ζαχαρωτά και τα ζυμαρικά. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και με σκοπό τη μελέτη της επιχειρηματικής αξιοποίησης των υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας, συντάχθηκε το επιχειρηματικό σχέδιο της ιδέας αυτής με την ονομασία ProsPer (by-PROductSPowdERs). Το σχέδιο βασίστηκε στην ιδέα της δημιουργίας μιας spin-off εταιρίας, που θα χρησιμοποιεί τα εργαστήρια και τον αντίστοιχο εξοπλισμό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για να παράγει μια σειρά από πούδρες από υποπροϊόντα ψαριών. Η παρουσίαση του σχεδίου σε διαγωνισμούς επιχειρηματικότητας και η απόκτηση βραβείων καινοτομίας από αυτούς, υποδεικνύει πως τα υποπροϊόντα ψαριών έχουν ενδιαφέρον να αξιοποιηθούν για την παραγωγή νέων τροφίμων και να αποτελέσουν μια πραγματική διατροφική επιλογή.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη παραδίδει ένα ερευνητικό πρωτόκολλο που περιγράφει πλήρως τα υποπροϊόντα ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας και ειδικότερα κρانيού και τσιπούρας, όσον αφορά α) τη σύσταση σε θρεπτικά στοιχεία, β) την ασφάλειά τους σχετικά με τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων και γ) τη βιοδραστικότητά τους σχετικά με την αντικαρκινική τους δράση και την επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητά του σιδήρου, με απώτερο σκοπό την διερεύνηση πρακτικών αξιοποίησης αυτών.

Επιστημονικός Τομέας: Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Λέξεις κλειδιά: υποπροϊόντα; ψάρια; ιχθυοκαλλιέργεια; διατροφική σύσταση; βιοδραστικότητα; κυκλική οικονομία

Abstract

The concept of circular economy and the proper use of unexploited raw materials is more relevant than ever. The circular economy model, seeking to use byproducts and wastes as productive resources and beneficial materials, comes to meet the goal for sustainable development and to contribute towards tackling one of the world's biggest challenges, that of food insecurity.

However, in order to achieve the above, a detailed analysis of each phase of agri-food production chain is required, to identify the main factors that contribute to food waste, and especially in areas such as fruit, vegetable, meat and fish production. Especially for the fish aquaculture industry, with annual production amounting to 131 million tons of fish, the corresponding amount of fish by-products reaches 32 million tons.

Utilizing fish by-products for the production of high added value and nutritious products, is therefore a challenging option that supports the minimization of food waste (circular economy) and contributes to address food shortages.

The aim of the present research is to study fish by-products in order to investigate the possibility of their utilization, thus contributing to the sustainability of the fish farming industry. From the breeding Greek species, it was chosen to study gilthead sea bream, as one of the most popular cultivated fish species, as well as meagre, as one of the "new" and promising cultivated fish species.

In particular, the present study aims to answer the following research questions:

- What is the nutritional composition of fish by-products and whether it differs by category of by-product, fish type and age of the fish?
- What is the composition of the fish by-products of fish farming in metals, heavy metals and trace elements as well as the corresponding marine environment from which they originated?

- What is the bioactivity of fish by-products in terms of their anti-cancer activity and increased iron bioavailability?
- What is the possibility of using these by-products or fractions to create a new innovative product?

In order to achieve the above objectives of this study, the individual studies A, B, C and D respectively were carried out:

Study A. Nutritional content of by-products of Greek aquaculture

The processing of fish in aquaculture generates significant amounts of by-products which remain underutilized and / or unused. In this study, the nutritional content of fish by-products (head, gills, guts, fins, bones and skin) was evaluated in order to assess their nutritional value for future development of products of high added value. The chemical composition of fish samples (total protein, total lipid, ash, moisture, and their content in macro-elements) was determined according to AOAC and ISO official methodology. The profile of fatty acids was determined using capillary gas chromatography and the protein profile was assessed using a conjugate mass spectrometry methodology. The nutrient content of fish by-products varied between different by-products. The skin appeared to be an important source of protein, the fins and bones were high in calcium, and the heads, guts and bones were a good source of lipids. The most abundant fatty acids that were found in the by-products were oleic, palmitic, linoleic and eicosenoic acid, while the most abundant proteins were ATP synthase subunit epsilon and mitochondrial cytochrome b-c1 complex subunit 8. These data suggest that by-products are a valuable source of nutrients and could therefore be exploited according to the principles of circular economy.

Study B. Safety of by-products of Greek aquaculture in terms of heavy metal content

Fish and fish products are an excellent source of nutrients, but they may also contain toxic substances, such as heavy metals. For this reason, it is important by-products to be fully characterized, besides their chemical composition (Study A) also for their safety. Therefore, the aim of study B. was to determine metal content of different fish tissues, animal feed, seawater and suspended particulate matter. The fillets and by-products (bones, gills, entrails, head, skin, wings) of Gilthead sea bream and Meagre, of two different ages, and the corresponding fish feed were analyzed to determine the concentrations of As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Fe , Mn, Ni, Pb, V and Zn. The samples of seawater and suspended particulate matter were collected from 4 different sites (inside and outside the respective fish farm) and at 2 different depths, and then were analyzed to determine the concentration of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V and Zn. The analyses of samples showed that the fillets had higher concentrations in metals compared to other fish tissues, while no statistically significant differences were observed either between the two different ages or between the two different species. All fish by-products' metal concentrations, with the exception of cadmium concentrations in the guts, complied with the relevant EU legislation on the concentration of metals, making them safe to consume. The concentrations of metals in fish feed, not only met the limits set by the European Commission, but were even significantly lower. Finally, in terms of fish's environment, the measurements of metals in seawater were less than the corresponding limits of the Marine Strategy Framework Directive, indicating the absence of pollution. The above definitions have therefore shown that, fish by-products and their environment, do not pose a risk to human health.

Study C. Bioactivity of fish by-products of Greek Aquaculture

Fish consumption is encouraged according to the dietary guidelines as it is related with various health benefits. At the same time, fish processing produces by-products

that can raise up to 50-60% of the weight of fish, after filleting. Therefore, investigating the bioactivity of fish by-products and their potential use for the development of high value-added food ingredients and / or dietary supplements would contribute to reducing waste, by forming new products of high nutritional value. The aim of this study was to investigate *in vitro* the bioactivity of fish by-products and their potential effect on the inhibition of the proliferation of cancer cells and predicted enhancement of iron bioavailability. The potential anticancer bioactivity was studied in the samples of heads, gills, fins, bones and skin, from 6 Meagres ($1256.45 \pm 232.32\text{g}$) and 16 Sea Breams ($403.47 \pm 72.92\text{g}$). These samples were hydrolyzed with enzymes and the resulting protein hydrolysates were examined on human colon adenocarcinoma cells (COLO320 cells) and human breast adenocarcinoma cells (MCF7A cells) for 48 h. Cell proliferation was measured using the MTT assay. In addition, predicted enhancement of iron bioavailability was estimated in the samples of 36 Meagres (6 with an average body weight of 1256.45 ± 232.32 g and 30 average body weight 235.76 ± 38.45 g) and 60 Gilthead Sea Breams (16 with average body weight 403.47 ± 72.92 g and 44 with average body weight 160.16 ± 30.79 g) for the by-products of head, gills, entrails, fins, bones and skin as well as the fillet of the respective fish. The samples were subjected to *in vitro* digestion methodology in the presence of added iron and the percentage of total soluble bivalent iron was determined. The present study demonstrates that some protein hydrolysate of fish by-products had a significant *in vitro* anti-proliferative effect on human cancer cell lines. In particular, selective inhibition of the proliferation of cancer cells MCF7A and COLO320 was observed when they were treated with protein hydrolysates of sea bream gills and MCF7A with protein hydrolysis of meagre and sea bream skin. However, no positive effect of the studied samples was observed on the predicted enhancement of iron bioavailability, except in the case of guts. These data suggest that certain fish by-products could represent a source of bioactive peptides. Therefore, the isolation of responsible bioactive

peptides from fish byproducts and the integration of them into food supplements can have beneficial effects on human health.

Study D. Proposed use of fish by-products

Products of marine origin such as fish, seafood and seaweed constitute, as proven in the above studies, an important source of nutrients and biologically active compounds. Ingredients such as fish oils, fish protein and seaweed have already found application in bakery, dairy, pastry and pasta products. In the context of this doctoral dissertation and in order to study the potential business exploitation of fish by-products, a business plan was developed under the name ProsPer (by-PROductSPowdERs). The project was based on the idea of creating a spin-off company, which will use the infrastructure and equipment of the Agricultural University of Athens, to produce a series of powders from fish by-products. The presentation of the business plan in entrepreneurial competitions and the subsequent acquisition of innovation awards, indicates that fish by-products are of great interest to be utilized for the production of new and innovative food products.

In conclusion, the present study delivers a research protocol that fully describes the fish by-products of meagre and seabream, in terms of a) nutrient composition, b) their safety regarding the concentration of heavy metals and c) their antiproliferative effect on cancer cells and the effect on the predicted enhancement of iron bioavailability, with an ultimate goal of exploring practices for their utilization.

Scientific Field: Food Chemistry and Technology, Food Science and Human Nutrition

Key words: by-products; fish; aquaculture; nutrient composition; bioactivity; circular economy

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, με τη συνεργασία του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών, του Τμήματος Χημείας του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου του Γέιλ στις ΗΠΑ, στο διάστημα 2015-2020.

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Μαρία Καψοκεφάλου για τη διαρκή υποστήριξη, τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις, τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Νικόλαο Παπανδρουλάκη και τον Δρ. Αθανάσιο Μαλλούχο για τη συνεχή στήριξη και συμβουλές στην υλοποίηση της μελέτης. Χωρίς τη συμβολή και καθοδήγησή όλων τους δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερα επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές και ερευνητές του Τμήματος Χημείας του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Δρ. Χαράλαμπος Προεστό, Δρ. Αικατερίνη Σακελλάρη, Δρ. Σωτήριο Καραβόλτσο, Δρ. Εμμανουήλ Δασενάκη για την συνεχή και πολύτιμη συνεργασία και βοήθεια τους, από το πέρας των προπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Χημείας, μέχρι και την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Αντώνιο Ζαμπέλα και Δρ. Χρυσανγή Γαρδέλη και τους ερευνητές του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών, κ. Παναγιώτη Αναστασιάδη και κ. Μιχάλη Ασδέρη, των οποίων η ενεργός συνεισφορά και οι συμβουλές τους στην επιστημονική έρευνα, υπήρξαν πολύτιμες καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ένα ευχαριστώ οφείλω ακόμα στους καθηγητές Dr. Vasilis Vasiliou και Dr. Tassos Kyriakides, και στους ερευνητές Dr. Jaya Golla, Dr. Ying Chen, Dr. Tukiet Lam για τη συνεργασία και καθοδήγησή τους κατά την εκπόνηση της έρευνάς μου στο Πανεπιστήμιο του Γέιλ στις ΗΠΑ.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλουν να αποδοθούν στους συναδέλφους αλλά πάνω απ' όλα φίλους μου Δρ. Όλγα Μαλισόβα, Δρ. Αδελαΐς Αθανασάτου και στον Δρ. Αντώνη Βλασσόπουλο για τις εποικοδομητικές συμβουλές και τη στήριξη τους, καθώς επίσης στη Θεανώ Μικρού, στη Νικολία Σάμαρη και στον Ανδρέα Γκουγκούση για τη συμβολή τους στην υλοποίηση του business plan της ιδέας. Τέλος ευχαριστώ τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος, που εργάστηκαν και συνέβαλλαν σε διάφορα κομμάτια της έρευνας και ειδικότερα, την Angela Lee, την Κάτια Δασκαλάκη, την Έφη Τραμπάκουλου, την Κωνσταντίνα Φιλίππου και τον Στέφανο Τζέλλα-Κουκά.

Θα ήθελα ακόμα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς το Ίδρυμα Fulbright, που μου έδωσε την ευκαιρία μέσω ερευνητικής υποτροφίας, να διενεργήσω μέρος της έρευνας στο Πανεπιστήμιο του Γέιλ των ΗΠΑ και να ζήσω μια καθοριστική για την πορεία μου, πολιτισμική και ακαδημαϊκή εμπειρία.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την υποστήριξη, τη συμπαράσταση και τη στήριξή τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Στη μητέρα μου

Περιεχόμενα

Περίληψη	I
Abstract.....	VIII
Ευχαριστίες	XIII
Περιεχόμενα	1
Λίστα Συντομογραφιών	4
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	6
1.1 Κυκλική Οικονομία.....	6
1.2 Παγκόσμιες προκλήσεις για επισιτιστική επάρκεια	8
1.3 Υδατοκαλλιέργειες σήμερα.....	8
1.4 Υποπροϊόντα ψαριών	11
1.5. Χρήσεις των υποπροϊόντων των ψαριών	12
1.5.1. Ζωοτροφές/Ιχθυάλευρα.....	12
1.5.2. Βιοντίζελ.....	13
1.5.3. Φυσικές Χρωστικές ουσίες.....	14
1.5.4. Βιομηχανία τροφίμων / καλλυντικών	14
1.6 Αντικείμενο και στόχοι της μελέτης	15
Κεφάλαιο 2. Σύσταση υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας	18
2.1 Εισαγωγή	18
2.2 Μεθοδολογία	20
2.2.1 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων	20
2.2.2. Διατροφική σύσταση	21
2.2.3 Προσδιορισμός μετάλλων	23
2.2.4 Προετοιμασία των ενοποιημένων δειγμάτων	23
2.2.5 Σύσταση λιπαρών οξέων.....	24
2.2.6 Πρωτεϊνικό προφίλ	24
2.2.7 Στατιστική ανάλυση.....	25
2.3 Αποτελέσματα.....	26
2.4 Συζήτηση	36
2.5. Συμπεράσματα.....	39
Κεφάλαιο 3. Ασφάλεια υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας ως προς τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων.....	41
3.1 Εισαγωγή	41
3.2 Μεθοδολογία	44
3.2.1 Δειγματοληψία θαλασσινού νερού.....	44
3.2.2 Προσδιορισμός μετάλλων σε θαλασσινό νερό.....	45
3.2.3 Προσδιορισμός μετάλλων στις ιχθυοτροφές	46
3.2.4 Δειγματοληψία και προετοιμασία υποπροϊόντων ψαριών.....	47
3.2.5 Προσδιορισμός μετάλλων σε υποπροϊόντα ψαριών	48
3.2.6 Στατιστική ανάλυση.....	50
3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση	51

3.3.1 Περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις μετάλλων	51
3.3.2 Συγκεντρώσεις μετάλλων στις ιχθυοτροφές.....	55
3.3.3 Μέταλλα στα φιλέτα των ψαριών και στα υποπροϊόντα.....	57
3.3.4 Συσχέτιση μεταξύ των ειδών ψαριών και διαφορετικών μεγεθών ψαριών	62
3.3.5 Νομοθεσία	65
3.3.6 Συγκριτική μελέτη με την υπάρχουσα βιβλιογραφία	68
3.4 Συμπεράσματα.....	69
Κεφάλαιο 4. Βιοδραστικότητα υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας	70
4.1 Εισαγωγή.....	70
4.2 Μεθοδολογία	73
4.2.1 Συλλογή αρχικών δειγμάτων.....	73
4.2.2 Διερεύνηση αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας.....	74
4.2.3 Διερεύνηση δράσης υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας στη προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητά σιδήρου	78
4.3. Αποτελέσματα.....	83
4.3.1 Αποτελέσματα πιλοτικού πειράματος προσδιορισμού αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων ψαριών.....	83
4.3.2 Αποτελέσματα πειράματος προσδιορισμού επίδρασης στη προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου υποπροϊόντων ψαριών.....	90
4.4 Συζήτηση	95
4.4.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μελέτης αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων.....	95
4.4.2 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μελέτης δράσης υποπροϊόντων ψαριών στην απορρόφηση του σιδήρου	97
4.5 Συμπεράσματα.....	100
Κεφάλαιο 5. Προτάσεις αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας	102
5.1 Κανονισμοί για τη χρήση και διάθεση υποπροϊόντων τροφίμων.....	102
5.2 Εφαρμογές βιοδραστικών συστατικών προϊόντων ψαριών στον τομέα των τροφίμων.....	103
5.2.1 Εφαρμογές σε προϊόντα αρτοποιίας.....	103
5.2.2. Εφαρμογές σε προϊόντα ζυμαρικών	106
5.2.3. Εφαρμογές στην παραγωγή τυριών και στην επεξεργασία ψαριών ...	108
5.2.4. Εφαρμογές στη παραγωγή σαλτσών	109
5.2.5. Εφαρμογές στη παραγωγή νέων προϊόντων ψαριού.....	111
5.3 Επιχειρηματικό σχέδιο αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας	111
5.3.1. Περίληψη του Επιχειρηματικού Σχεδίου	114
5.3.2. Γενική Περιγραφή της Εταιρείας.....	116
5.3.3. Προϊόντα και Υπηρεσίες.....	120

5.3.4 Business Model Canvas	125
5.3.5. Σχέδιο Μάρκετινγκ.....	127
5.3.6. Σχέδιο Λειτουργίας.....	135
5.3.7. Διοίκηση και Οργάνωση	148
5.3.8. Δαπάνες Έναρξης και Κεφαλαιοποίησης	153
5.3.9. Χρηματοοικονομικό Σχέδιο.....	155
5.3.10. Παρατηρήσεις – Συμπεράσματα Επιχειρηματικού Σχεδίου	165
Κεφάλαιο 6. Γενικά Συμπεράσματα	167
Γ. Βιβλιογραφία.....	171
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	190
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	203
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....	205

Λίστα Συντομογραφιών

AES	Atomic Emission Spectroscopy
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATP	Adenosine Triphosphate
B2B	Business to Business
B2C	Business to Consumers
CRM	Certified Reference Material
DHA	Docosahexaenoic Acid
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
FAO	Food and Agriculture Organization
FEAP	Federation of European Aquaculture Producers
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FENS	Federation of European Nutrition Societies
FPH	Fish Protein Hydrolysates
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HDL	High Density Lipoprotein
ISO	International Organization of Standardization
MEGM	Mammary Epithelial Cell Growth Medium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PCB	Polychlorinated Biphenyl
PBS	Phosphate Buffered Saline
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
R&D	Research and Development
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SPM	Suspended Particulate Matter
SFA	Saturated Fatty Acids
SWOT	Strength Weakness Opportunity Threads Analysis
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
AA	Atomic Absorption
ΑΕ	Ανώνυμη Εταιρεία
ΑΕΠ	Ακαθάριστο Εγχώριο Προϊόν
ΑΜΕΑ	Άτομα με Ειδικές Ανάγκες
ΑΠΔ	Αναλυτική Περιοδική Δήλωση
ΓΤΕΤ	Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
ΓΕΜΗ	Γενικό Εμπορικό Μητρώο
ΓΠΑ	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΔΟΥ	Δημόσια Οικονομική Υπηρεσία
ΔΣ	Διοικητικό Συμβούλιο

ΕΒΕΑ	Εμπορικό και Βιομηχανικό Επιμελητήριο Αθηνών
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Επιτροπή
ΕΚ	Ευρωπαϊκή Κοινότητα
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΕΛΚΕΘΕ	Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών
ΕΠΑΝ	Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα
ΕΠΕ	Εταιρεία Περιορισμένης Ευθύνης
ΕΠΕΤ	Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Έρευνας & Τεχνολογία
ΕΣΠΑ	Εθνικό Στρατηγικό Πλαίσιο Αναφοράς
ΕΦΕΤ	Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων
ΕΦΚΑ	Ενιαίος Φορέας Κοινωνικής Ασφάλισης
ΙΚΕ	Ιδιωτική Κεφαλαιουχική Εταιρεία
ΚΠΣ	Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης
ΚΥΑ	Κοινή Υπουργική Απόφαση
ΚΥΕ	Καταστήματος Υγειονομικού Ενδιαφέροντος
ΝΠΔΔ	Νομικά Πρόσωπα Δημοσίου Δικαίου
ΝΠΙΔ	Νομικά Πρόσωπα Ιδιωτικού Δικαίου
ΠΑΕ	Προσωπική Ανώνυμη Εταιρεία
ΠΔ	Προεδρικό Διάταγμα
ΤΕΑΥΕΤ	Ταμείο Επικουρικής Ασφάλισης Υπαλλήλων Εμπορίου Τροφίμων
ΦΕΚ	Φύλλο Εφημερίδας Κυβερνήσεως

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Κυκλική Οικονομία

Η κυκλική οικονομία στηρίζεται στην ορθή αξιοποίηση των πόρων, στην ιδέα της ανακύκλωσης-επαναχρησιμοποίησης και στο μοντέλο της βιομηχανικής συμβίωσης.

Η έννοια της κυκλικής οικονομίας, έρχεται να ανταποκριθεί στην φιλοδοξία για αειφόρο ανάπτυξη στα πλαίσια της αυξανόμενης πίεσης του περιβάλλοντος του πλανήτη από την παραγωγή και κατανάλωση των πόρων. Έως τώρα, η οικονομία λειτουργούσε κυρίως σύμφωνα με το μοντέλο «παίρνω-φτιάχνω-απορρίπτω» - ένα γραμμικό μοντέλο στο οποίο κάθε προϊόν αναπόφευκτα φτάνει στο «τέλος της ωφέλιμης ζωής» του. Η μετάβαση σε μια κυκλική οικονομία προϋποθέτει αλλαγή της εστίασης στην επαναχρησιμοποίηση, επισκευή, ανανέωση και ανακύκλωση υφιστάμενων υλικών και προϊόντων. Ότι προηγουμένως θεωρούνταν «απόβλητο», μπορεί να μετατραπεί σε πρώτη ύλη (Εικόνα 1.1). Επιδιώκει και ενθαρρύνει επομένως, την χρήση δευτερογενών υλικών και αποβλήτων ως παραγωγικών πόρων και χρήσιμων υλικών, προσδίδοντας μια αειφορική διάσταση στο παραγωγικό μοντέλο και μπορεί με αυτό τον τρόπο να αποτελέσει καταλύτη για την παραγωγική ανασυγκρότηση (1, 2).



Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση μοντέλου κυκλικής οικονομίας (Πηγή: Υπουργείο Περιβάλλοντος, 2013 ⁽²⁾)

Μέτρα όπως ο βελτιωμένος οικολογικός σχεδιασμός, η πρόληψη και επαναχρησιμοποίηση αποβλήτων μπορούν να επιφέρουν καθαρή εξοικονόμηση έως και 604 δις € για τις επιχειρήσεις σε ολόκληρη την ΕΕ, ποσό που αντιστοιχεί στο 8% του ετήσιου κύκλου εργασιών τους, μειώνοντας παράλληλα τις συνολικές ετήσιες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου κατά 2-4 % (3). Συνολικά, η υλοποίηση πρόσθετων μέτρων για την αύξηση της παραγωγικότητας των πόρων κατά 30 % έως το 2030 μπορεί να ενισχύσει το ΑΕΠ της Ε.Ε. κατά σχεδόν 1 %, δημιουργώντας ταυτόχρονα πάνω από 2 εκατομμύρια νέες θέσεις εργασίας σε ένα σενάριο κοινής πρακτικής (4).

Σύμφωνα με τη στρατηγική της ΕΕ αναφορικά με τη κυκλική οικονομία, δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στις δραστηριότητες έρευνας και καινοτομίας που θα έχουν ουσιαστικό ρόλο στον προσδιορισμό και την ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών και τεχνικών που θα εξασφαλίζουν την εφαρμογή αυτού του νέου οικονομικού μοντέλου (5). Η αντιμετώπιση της επισιτιστικής ανασφάλειας αποτελεί ένα ακόμα πλεονέκτημα της κυκλικής οικονομίας που στηρίζεται στην καινοτόμο και διαρκή διαχείριση των απορριμμάτων τροφίμων. Έτσι, τα τελευταία χρόνια

δίδεται έμφαση στον σχεδιασμό μεθόδων για τη μείωση και την επαναχρησιμοποίηση του πλεονάσματος των τροφίμων και ερευνητικές μελέτες επικεντρώνονται στις ιδιότητες αυτών.

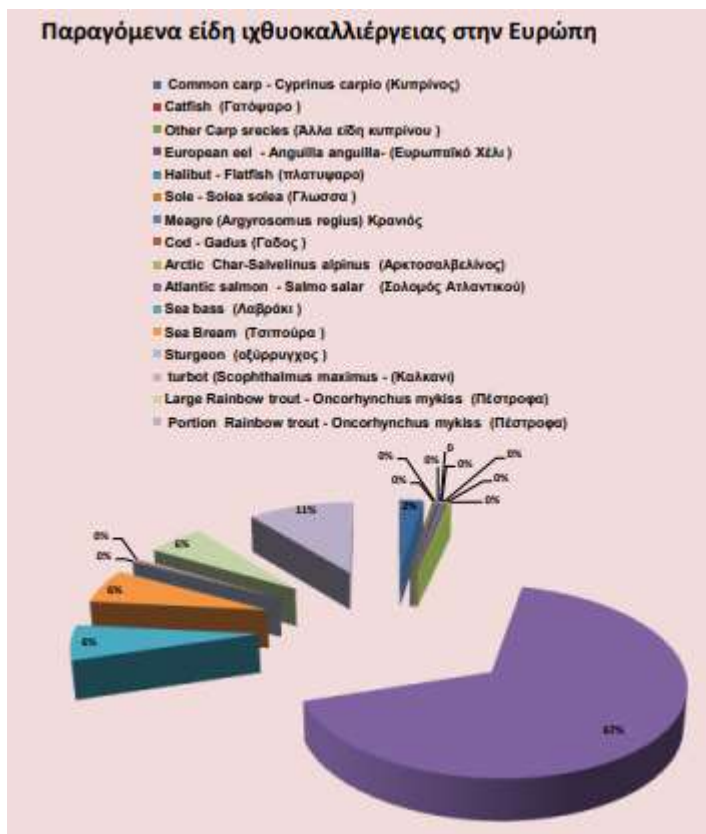
1.2 Παγκόσμιες προκλήσεις για επισιτιστική επάρκεια

Η επισιτιστική επάρκεια αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες παγκόσμιες προτεραιότητες. Η ανάπτυξη μιας βιώσιμης τροφικής αλυσίδας αποτελεί μόνιμη πρόκληση ιδίως λόγω των διαφόρων παραγόντων, όπως η αύξηση της τάσης του παγκόσμιου πληθυσμού, η ρύπανση, η εξάντληση των υδάτινων πόρων και, κυρίως, η αυξανόμενη ζήτηση τροφίμων. Αν και η ποσότητα των τροφίμων που παράγονται σήμερα είναι αρκετή για να παρέχει τροφή σε ολόκληρη την ανθρωπότητα, πάνω από ένα δισεκατομμύριο άνθρωποι υποφέρουν από πείνα. Η άνιση αυτή κατανομή τροφίμων οφείλεται σε οικονομοπολιτικούς παράγοντες, σε συνδυασμό με την τάση που παρατηρείται στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου η αφθονία των τροφίμων οδηγεί συχνά σε μεγάλη ποσότητα αποβλήτων. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, τα απόβλητα τροφίμων αντιπροσωπεύουν το 40% ολόκληρης της παραγωγής τροφίμων (6, 7). Για το λόγο αυτό, απαιτείται λεπτομερής ανάλυση κάθε φάσης της αγροδιατροφικής παραγωγής για να επισημανθούν οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην απόρριψη τροφίμων στα διάφορα στάδια αυτής και σε τομείς όπως η παραγωγή φρούτων και λαχανικών, προϊόντων κρέατος και ιχθυών.

1.3 Υδατοκαλλιέργειες σήμερα

Οι υδατοκαλλιέργειες έχουν αυξηθεί σημαντικά σε αρκετές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης την τελευταία 40ετία. Η μείωση των αποθεμάτων άγριων ιχθύων για αλίευση και η αύξηση της δημόσιας ζήτησης για πόρους ψαριών και οστρακοειδών οδήγησε στην ανάπτυξη της θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας όπως

είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση του σολομού του Ατλαντικού στη Σκωτία, τη Νορβηγία και την Ιρλανδία, του λαβρακιού και τσιπούρας στη Μεσόγειο και μυδιών στην Ιρλανδία, την Ισπανία και τη Γαλλία (8). Έτσι σήμερα, τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις βόρειες ευρωπαϊκές χώρες είναι ο σολομός, του οποίου η παραγωγή αντιπροσωπεύει το 66% περίπου της Ευρωπαϊκής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας (συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ψαριών στην Τουρκία), ενώ στις Μεσογειακές χώρες πραγματοποιείται η εκτροφή ενδημικών ειδών και κυρίως τσιπούρας και λαβρακιού (9) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Κύρια εκτρεφόμενα είδη ψαριών στην Ευρώπη (Πηγή FEAP ⁽⁸⁾)

Και ενώ η αλιεία δεν καλύπτει την παγκόσμια ζήτηση, η ετήσια κατανάλωση θαλασσινών όλο και αυξάνεται, έχοντας διπλασιαστεί σε τρεις δεκαετίες (10). Η κατανάλωση θαλασσινών ανέρχεται στους 148.8 εκατομμύρια τόνους το χρόνο παγκόσμιος, και ειδικότερα στην Ευρώπη ανέρχεται στους 16.8 εκατομμύρια

τόνους. Σήμερα, η παραγωγή από υδατοκαλλιέργεια αυξάνεται συνεχώς με το 2016 η παγκόσμια συμβολή έφτασε το 46,8% έναντι της συνολικής παραγωγής ψαριών και θαλασσινών. Μάλιστα σύμφωνα με τον FAO μέχρι το έτος 2030 η παραγωγή θαλασσινών υδατοκαλλιέργειας θα αυξηθεί στην Ευρώπη κατά 34.2% (11).

Η Ελλάδα είναι πρωτοπόρος στη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια, με σημαντική επέκταση που παρατηρήθηκε μετά το 1985, στην οποία έχει συμβάλει μια σειρά παραγόντων, όπως οι επικρατούσες γεωμορφολογικές και υδροβιολογικές συνθήκες και το κλίμα της. Θεωρείται από τις σημαντικές χώρες, καθώς καταλαμβάνει την 5η θέση στην Ε.Ε. ως προς τον όγκο της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας (12). Στην παραγωγή ειδών ψαριών της Μεσογείου, η Ελλάδα κατατάσσεται πρώτη στην παραγωγή τσιπούρας και δεύτερη στην παραγωγή λαβρακιού, που μεταφράζεται αντίστοιχα στο 55% και 40% της συνολικής παραγωγής, με το 80% αυτής να εξάγεται. Το 2017 η εκτροφή τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 112.000 τόνους αξίας 545.9 εκ. ευρώ. Παράλληλα στις ελληνικές θάλασσες εκτρέφονται και σε ένα μικρότερο ποσοστό (3%) «νέα είδη» όπως κρανιός, μυτάκι, φαγκρί, συναγρίδα κ.α. (13)

Ο κλάδος της θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας σήμερα στην Ελλάδα, εκπροσωπείται από 65 εταιρείες με 328 μονάδες καλλιέργειας και με τη συνολική θαλάσσια περιοχή που καταλαμβάνεται να είναι στα ~ 78 Km². Το επενδυμένο κεφάλαιο στον τομέα ανέρχεται σε 740 εκατομμύρια €, με 10.000 άτομα να απασχολούνται άμεσα και 8.000 έμμεσα. Η παραγωγή θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας ανήλθε στους 134.000 τόνους το 2015 (κυρίως τσιπούρα και λαβράκι, αλλά και είδη όπως ο κρανιός). Ο ετήσιος κύκλος εργασιών ανήλθε σε 628 εκατομμύρια €, και το ήμισυ αυτού αντιστοιχεί σε εξαγωγές. Τα ψάρια από την υδατοκαλλιέργεια είναι το δεύτερο εξαγόμενο ελληνικό προϊόν μετά από τα φρούτα και λαχανικά στη βιομηχανία τροφίμων, τα οποία αποτελούν περίπου το 1/3 των ελληνικών εξαγωγών. Ο στόχος της παραγωγής για το 2030 ορίζεται

σε 350.000 τόνους. Η ελληνική θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει το 63% της ΕΕ και το 36% της μεσογειακής παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού της Ευρώπης (14, 15).

Η παραγωγή ψαριών και θαλασσινών έχει σταθερά αυξανόμενη τάση την τελευταία δεκαετία και αυτή η τάση αναμένεται να συνεχιστεί. Ωστόσο, ως εξαιρετικά ευαλλοίωτο εμπόρευμα, τα ψάρια παρουσιάζουν σημαντική ανάγκη για επεξεργασία. Ειδικότερα, το 2000, περισσότερο από το 60% της συνολικής παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής υπέστη κάποια μορφή επεξεργασίας (16). Προς αυτή τη κατεύθυνση συντελεί η τάση και η αυξανόμενη ζήτηση για έτοιμο (προ-επεξεργασμένο φαγητό) (17).

1.4 Υποπροϊόντα ψαριών

Με τον όρο υποπροϊόντα τροφίμων νοούνται όλα εκείνα τα δευτερεύοντα προϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία και μεταποίηση των τροφίμων. Στην περίπτωση των ψαριών αυτά αποτελούνται από βράγχια και εντόσθια που παράγονται κατά την απεντέρωση των ψαριών και από κεφάλια, κόκκαλα, δέρματα και πτερύγια που παράγονται κατά την φιλετοποίηση αυτών.

Τα υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων αποτελούν σημαντική πηγή περιβαλλοντικής μόλυνσης και για το λόγο αυτό έχουν διεξαχθεί έρευνες για να αναπτυχθούν μέθοδοι για τη μετατροπή αυτών των αποβλήτων σε χρήσιμα προϊόντα (18-20). Ειδικότερα για την περίπτωση των ψαριών, περισσότερο από το 50% του εναπομένοντος ιστού μετά από τη μεταποίηση των ψαριών δεν χρησιμοποιείται ως τροφή και φτάνει περίπου τους 32 εκατομμύρια τόνους η ποσότητα που απορρίπτεται (21).

1.5. Χρήσεις των υποπροϊόντων των ψαριών

Μια σημαντική στρατηγική μείωσης των απορριπτόμενων για τη βιομηχανία είναι η ανάκτηση εμπορεύσιμων υποπροϊόντων από τα απόβλητα των ιχθύων. Οι συνηθέστερες μέθοδοι αξιοποίησης των υποπροϊόντων ψαριών (είτε αυτά προέρχονται από την υδατοκαλλιέργεια είτε από άγριους πληθυσμούς) είναι η παρασκευή ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου, η παραγωγή ζωοτροφών και η χρήση τους στην παρασκευή οργανικών λιπασμάτων (22). Άλλες σημαντικές χρήσεις περιλαμβάνουν την απομόνωση κολλαγόνου και αντιοξειδωτικών για τα καλλυντικά, το βιοαέριο / βιοντίζελ, τα λιπάσματα, για διαιτολογικές εφαρμογές (χιτοζάνη), τη συσκευασία τροφίμων (ζελατίνη, χιτοζάνη) και την απομόνωση ενζύμων (πρωτεάσες). Η χρήση των υποπροϊόντων αποτελεί επομένως μια σημαντική παραγωγική ευκαιρία για τη βιομηχανία, καθώς μπορεί να δημιουργήσει πρόσθετα έσοδα και συγχρόνως, να μειώσει το κόστος απόρριψης αυτών των υλικών. Η μεταφορά των υπολειμμάτων και των υποπροϊόντων ιχθύων απουσία νερού αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αποτελεσματική συλλογή και χρήση αυτών (23).

1.5.1. Ζωοτροφές/Ιχθυάλευρα

Σήμερα, η χρήση των αποβλήτων τροφίμων ως ζωοτροφών είναι μια εναλλακτική λύση που συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον, διότι αποτελεί περιβαλλοντικό και δημόσιο όφελος, πέρα από τη μείωση του κόστους της ζωικής παραγωγής (24, 25). Τα υποπροϊόντα της αλιείας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικό ζωοτροφών, καθώς αποτελούν σημαντική πηγή υψηλής ποιότητας πρωτεΐνης και ενέργειας (26, 27).

Ακόμα, το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα προϊόντων ζύμωσης υπολειμμάτων ιχθύων, είναι πλούσιο σε απαραίτητα αμινοξέα και έχει υψηλή θρεπτική αξία (28). Λόγω του χαμηλού μέσου μοριακού βάρους του, είναι επομένως κατάλληλο

και εύπεπτο συμπλήρωμα πρωτεΐνης στη παραγωγή ζωοτροφών που απευθύνονται για κατανάλωση από νεαρά ψάρια και κατοικίδια ζώα (29, 30).

Αποτελέσματα που έχουν προκύψει από *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα σε ψάρια έχουν δείξει ότι τα κλάσματα πεπτιδίων χαμηλού μοριακού βάρους (μεταξύ 500-3000 Da) που προκύπτουν μετά από ζύμωση του στομάχου του μπακαλιάρου Ατλαντικού, διεγείρουν τις μη ειδικές αντιδράσεις ανοσοαπόκρισης και βελτιώνουν την αντίσταση κατά διαφόρων ασθενειών στο σολομό (31).

1.5.2. Βιοντίζελ

Το καύσιμο βιοντίζελ που λαμβάνεται από τα έλαια και τα λίπη των φυτικών και ζωικών προϊόντων αποτελεί υποκατάστατο ή πρόσθετο του υγρού ντίζελ που παράγεται από πετρέλαιο . Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, δοκιμές σε κινητήρες έδειξαν ότι η καύση των φυτικών ελαίων προκαλεί προβλήματα ανθεκτικότητας που σχετίζονται με την ατελή καύση. Επιπλέον, το υψηλότερο ιξώδες των φυτικών ελαίων σε σύγκριση με το πετρέλαιο ντίζελ φάνηκε πως προκαλεί υπερβολική εναπόθεση άνθρακα και ήταν σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνο για τα προβλήματα που δημιουργούν τα φυτικά έλαια ως καύσιμο ντίζελ, ιδιαίτερα σε σχετικά ψυχρές περιοχές και κατά τη διάρκεια κρύων εποχών (32, 33). Ωστόσο, σε μελέτη όπου αξιολογήθηκε το επεξεργασμένο ιχθυέλαιο ως καύσιμο ντίζελ παρατηρήθηκε ότι αυτό έχει κατάλληλες ιδιότητες για χρήση σε πετρελαιοκινητήρες, με χαμηλότερες εκπομπές, καθιστώντας το έτσι κατάλληλο για κινητήρες ντίζελ (34). Ωστόσο λόγω του χαμηλότερου κόστους της διαδικασίας αξιοποίησης των λιπαρών οξέων προς άλλες χρήσεις, όπως ζωοτροφές, η ιδέα της αξιοποίησης των λιπαρών οξέων προς παραγωγή καυσίμων δεν έχει βρει εκτεταμένη εφαρμογή.

1.5.3. Φυσικές Χρωστικές ουσίες

Τα καροτενοειδή είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα πολλών προϊόντων ψαριών και οστρακοειδών όπως η γαρίδα, ο αστακός, τα καβούρια, οι καραβίδες, η πέστροφα, ο σολομός, το κοκκινόψαρο και ο τόνος (35). Για το λόγο αυτό, τα υποπροϊόντα γαρίδας όπως το κεφάλι και το κελυφωτό σώμα, αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές φυσικές πηγές καροτενοειδών (36). Τα ανακτηθέντα καροτενοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά, αντί των αντίστοιχων συνθετικών, σε σκευάσματα ζωοτροφών υδατοκαλλιέργειας καθώς και στη παρασκευή χιτίνης / χιτοζάνης με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών από τις βιομηχανίες καλλυντικών και φαρμάκων (36).

1.5.4. Βιομηχανία τροφίμων / καλλυντικών

Η ανάκτηση χημικών συστατικών από τα απόβλητα θαλάσσιων οργανισμών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλα τμήματα της βιομηχανίας τροφίμων, είναι ένας ελπιδοφόρος τομέας έρευνας και ανάπτυξης για τη χρήση υποπροϊόντων θαλάσσιων οργανισμών. Έρευνες έχουν δείξει ότι μπορεί να απομονωθεί ένας αριθμός χρήσιμων ενώσεων από υποπροϊόντα θαλάσσιων οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων, της ζελατίνης και των πρωτεϊνών που έχουν αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ικανότητες (37).

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι τα προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών από το δέρμα μπακαλιάρου Αλάσκας, υπολειμμάτων γαρίδας, το κεφάλι του μπακαλιάρου και της σαρδέλας, είχαν κάποια ανασταλτική επίδραση στο ένζυμο μετατροπής της αγγειοτεϊνάσης I (38, 39). Φαίνεται επομένως πως η εφαρμογή τέτοιων υδρολυμάτων στα τρόφιμα μπορεί να συνεισφέρει στη προσπάθεια για μείωση της αρτηριακής πίεσης.

Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που λαμβάνονται με τα πεπτίδια του δέρματος των ψαριών υποδεικνύουν ότι τα προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών που

προκύπτουν από υποπροϊόντα ψαριών ενδέχεται να έχουν δυνατότητες ως συμπληρώματα σε φαρμακευτικά προϊόντα διατροφής (40).

Στα υποπροϊόντα ψαριών περιλαμβάνεται ακόμα και σημαντική ποσότητα δέρματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανή πηγή για απομόνωση κολλαγόνου και μετά από μετουσίωση αυτού, ζελατίνης. Το κολλαγόνο είναι το κύριο δομικό συστατικό του δέρματος, των κοκάλων, των πτερυγίων, των τενόντων και των χόνδρων όλων των ζώων. Παραδοσιακά, το κολλαγόνο προέρχεται κυρίως από χοίρους και βοοειδή. Ωστόσο, η χρήση κολλαγόνου και ζελατίνης από δέρμα ψαριών προσελκύει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας ως ασφαλέστερης πηγής για την απομόνωση αυτού (41, 42). Το κολλαγόνο έχει πολλές εφαρμογές, όπως στη βιομηχανία καλλυντικών και στη φαρμακοβιομηχανία, ιδιαίτερα ως φορέας φαρμάκων (43-45). Ακόμα, η ζελατίνη λόγω των μοναδικών φυσικών ιδιοτήτων της, έχει βρει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων ως μόριο για μικροενθυλάκωση βιοδραστικών ουσιών και ως πρόσθετο τροφίμων για τη βελτίωση της υφής, την ικανότητα διατήρησης υγρασίας και τη σταθερότητα των τροφίμων (46).

1.6 Αντικείμενο και στόχοι της μελέτης

Η παραγωγή ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας αποτελεί ένα δυναμικό κλάδο της ελληνικής οικονομίας. Στην Ελλάδα κατά την μεταποίηση των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας παράγεται πλήθος υποπροϊόντων (εντόσθια, βράγχια, κόκκαλα, δέρμα, κεφάλια) τα οποία είτε υπο-χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων χαμηλής αγοραστικής αξίας όπως οι ζωοτροφές, βιοκαύσιμα και λιπάσματα είτε απορρίπτονται επιβαρύνοντας το περιβάλλον (23). Η αξιοποίηση των υποπροϊόντων της ιχθυοκαλλιέργειας για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης και διατροφικής αξίας αποτελεί επομένως μια πρόκληση. Αυτή η επιλογή, εντάσσεται στο πλαίσιο της σύγχρονης σκέψης

για ελαχιστοποίηση των αποβλήτων τροφίμων (κυκλική οικονομία) και την αξιοποίησή τους για νέα τρόφιμα για την αντιμετώπιση της διατροφικής επισφάλειας.

Έχουν διερευνηθεί σε μικρό βαθμό για την αξιοποίησή τους σε ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων υποπροϊόντα ψαριών ατλαντικού, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης τους σε ανόργανα στοιχεία (κυρίως ασβέστιο), πρωτεΐνες, λιποειδή κ.α (47, 48).

Τα υποπροϊόντα ψαριών περιέχουν ενδεχομένως και βιοδραστικά συστατικά (42). Βιοδραστικά συστατικά, ειδικότερα πεπτίδια, έχουν μελετηθεί εκτενέστερα σε φιλέτα ψαριών για την αντιυπερτασική, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική (49-51) δράση, όπως αναπτύχθηκε και προηγούμενα, αλλά και για ιδιότητες που συμβάλλουν στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου (52). Το ενδιαφέρον για βιοδραστικά πεπτίδια είναι ευρύτερο και αντλείται και από μελέτες σε αντίστοιχα πεπτίδια γάλακτος, κρέατος και κατεργασμένων προϊόντων κρέατος (53, 54). Έτσι, τα κλάσματα υποπροϊόντων τα οποία είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας τα οποία συμβάλλουν στην διατροφική αντιμετώπιση προβλημάτων δημόσιας υγείας, όπως είναι η αντιμετώπιση του καρκίνου, η σιδηροπενία και η υπέρταση.

Στόχος της παρούσας έρευνας αποτελεί η μελέτη των υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας με σκοπό την διερεύνηση δυνατότητας αξιοποίησής τους, συμβάλλοντας έτσι στην αειφορία του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας. Από τα εκτρεφόμενα ελληνικά είδη, επιλέχθηκαν να εξετασθούν οι τσιπούρες, ως ένα από τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη, καθώς επίσης και οι κρानιοί, ως ένα από τα «νέα» και υποσχόμενα είδη εκτροφής.

Με την παρούσα έρευνα επιδιώκεται να δοθεί απάντηση στα παρακάτω ερευνητικά ερωτήματα:

- Ποια είναι η διατροφική σύνθεση των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας και αν διαφέρει ανά κατηγορία υποπροϊόντος, είδος ψαριού και ηλικία ψαριού;
- Ποια είναι η σύσταση των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας σε μέταλλα, βαρέα μέταλλα και ιχνοστοιχεία καθώς και του αντίστοιχου θαλάσσιου περιβάλλοντος από τα οποία αυτά προήλθαν;
- Ποια είναι η βιοδραστικότητά των υποπροϊόντων ψαριών όσον αφορά την επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό αντικαρκινικών κυττάρων και στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου;
- Ποια είναι η δυνατότητα επιχειρηματικής αξιοποίησης των υποπροϊόντων ή κλασμάτων αυτών ώστε να δημιουργηθεί νέο καινοτόμο προϊόν;

Κεφάλαιο 2. Σύσταση υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας

2.1 Εισαγωγή

Κατά τη μεταποίηση των ψαριών παράγονται υποπροϊόντα (κόκκαλα, δέρμα, κεφάλι, εντόσθια), τα οποία μπορούν να ανέλθουν στο 15% του βάρους του ψαριού κατά την απεντέρωση και απολέπιση, ή ακόμα και μέχρι το 70% του βάρους του ψαριού κατά τη φιλετοποίηση (55). Σύμφωνα με πρόσφατη έκθεση του FAO, εκτιμάται ότι ετησίως απορρίπτονται 7.3 εκατομμύρια τόνοι υποπροϊόντων ψαριών (56). Στην Ελλάδα συγκεκριμένα, το ποσοστό των απορρίψεων φθάνει το 15% της συνολικής παραγωγής (57).

Τα υποπροϊόντα ψαριών, στις περισσότερες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή ζωοτροφών και βιοκαυσίμων, δηλαδή προϊόντων χαμηλής προστιθέμενης αξίας ή αποτεφρώνονται και απορρίπτονται, αυξάνοντας έτσι τις ενεργειακές, οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις της διαδικασίας (23). Η έρευνα σχετικά με την εκμετάλλευση υποπροϊόντων ψαριών για την ανάπτυξη προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από αυτά, όπως νέα τρόφιμα, αποτελεί μια επιστημονική, οικονομική και διατροφική πρόκληση η οποία συμβάλλει στη βιωσιμότητα του τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Αυτό ισχύει και για την ελληνική υδατοκαλλιέργεια, η οποία είναι ένας δυναμικός τομέας με παγκόσμια παρουσία. Σύμφωνα με τον Σύνδεσμο Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, η Ελλάδα κατέχει περί το 24% της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών όπως η τσιπούρα και το λαβράκι, και εξάγει ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας σε 32 χώρες(12).

Από την άλλη πλευρά, ο τομέας των τροφίμων, ακολουθώντας τις διατροφικές απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού (58), παρουσιάζει ανάγκη για φυσικά

συστατικά υψηλής θρεπτικής αξίας. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα υποπροϊόντα ψαριών μπορούν να αποτελέσουν ένα ελκυστικό συστατικό για καινοτόμα τρόφιμα, είναι σημαντικό να υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα για το θρεπτικό τους περιεχόμενο, όπως είναι η σύσταση σε πεπτίδια και λιπαρά οξέα (59, 60), τα οποία έχουν μελετηθεί και συνδεθεί με αντιυπερτασική, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση (42, 49, 61, 62). Ωστόσο, η σύσταση των ψαριών και των υποπροϊόντων τους παρουσιάζει διαφορές και εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος και η προέλευσή τους (63, 64). Αυτό σημαίνει πως είναι σημαντική η εκτενής αξιολόγηση της διατροφικής σύστασης υποπροϊόντων από διάφορα είδη ιχθυρών με σκοπό την εκμετάλλευσή τους.

Στην Ελλάδα, υπάρχει κενό στη βιβλιογραφία σχετικά με τη διατροφική σύσταση των υποπροϊόντων ψαριών. Υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία σχετικά με την περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα του φιλέτου κρانيού (*Argyrosomus regius*) (65) και των υποπροϊόντων του ενώ υπάρχουν ορισμένα στοιχεία για το φιλέτο της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και το φιλέτο λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (66). Τα εκτρεφόμενα είδη επομένως, συμπεριλαμβανομένων των κυρίαρχων στον ελληνικό χώρο, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι, καθώς και τα προσφάτως εισαχθέντα στην βιομηχανική παραγωγή, όπως ο κρانيός, πρέπει να μελετηθούν εκτενώς, επιτρέποντας στον κλάδο μια καλύτερη και πιο βιώσιμη εκμετάλλευση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι η αξιολόγηση του θρεπτικού περιεχομένου των υποπροϊόντων τσιπούρας και κρانيού που καλλιεργήθηκαν στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, σε μια σειρά από υποπροϊόντα που συλλέχθηκαν από 36 άτομα κρانيού και 60 ατόμων τσιπούρας, διαφορετικών μεγεθών, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των συνολικών πρωτεϊνών, λιπών, υγρασίας, τέφρας και κύριων μετάλλων και χαρακτηρίστηκε το προφίλ τους σε λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες.

2.2 Μεθοδολογία

2.2.1 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Συνολικά 36 άτομα κρανιού (*Argyrosomus regius*) (6 με ηλικία 1+ και 30 με ηλικία 0+) και 60 ατόμων τσιπούρας (*Sparus aurata*) (16 με ηλικία 1+ και 44 με ηλικία 0+) συλλέχθηκαν από την πιλοτική μονάδα ιχθυοκλωβών του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών στην Σούδα της Κρήτης, τον Ιούνιο του 2017.

Όλα τα ψάρια εκτράφηκαν στις εγκαταστάσεις πιλοτικής κλίμακας του ΕΛΚΕΘΕ. Πρόκειται για αδειοδοτημένες εγκαταστάσεις, από την Περιφέρεια Κρήτης και τη Γενική Διεύθυνση Γεωργίας και Κτηνιατρικής με αριθ. 3989 / 01.03.2017, εκτροφής θαλασσινών ψαριών. Επιπλέον οι εγκαταστάσεις έχουν άδεια για εκτροφή και πειραματισμούς θαλασσινών ψαριών και έχουν καταχωρηθεί με τους ακόλουθους κωδικούς έγκρισης: EL91-BIObr-03 και EL91-BIOexp-04. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από ομάδες ψαριών που εκτρέφονταν υπό κανονικές συνθήκες και μετά τη συλλογή τους, υποβλήθηκαν σε ευθανασία χρησιμοποιώντας παγωμένο νερό. Το προσωπικό που διενήργησε τη δειγματοληψία έχει εκπαιδευτεί και έχει διαπιστεύσεις για τον χειρισμό των ψαριών, με πιστοποίηση από την Ομοσπονδία Ευρωπαϊκών Ενώσεων Εργαστηριακών Ζώων (FELASA) σχετικά με τη "Φροντίδα και χρήση πειραματόζων".



Εικόνα 2.1. Μέτρηση μορφομετρικών χαρακτηριστικών

Μετά τη μέτρηση των μορφομετρικών χαρακτηριστικών (βάρος και μήκος) κάθε ψαριού (Εικόνα 2.1), ελήφθησαν και απομονώθηκαν από το κάθε άτομο έξι διαφορετικά δείγματα ως πιθανά υποπροϊόντα: πτερύγια, δέρμα, εντόσθια, κόκκαλα, κεφάλι και βράγχια (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. Διαχωρισμός των διαφορετικών υποπροϊόντων από κάθε ψάρι.

Αυτά τα διαφορετικά υποπροϊόντα διατηρήθηκαν χωριστά σε ερμητικά κλειστές συσκευασμένες σακούλες πολυπροπυλενίου, στους -80°C . Όλα τα δείγματα λυοφυλιώθηκαν για 48 ώρες (Telstar Cryodos 50, Telstar, Terrassa, Spain) και κατόπιν ομογενοποιήθηκαν με μύλο άλεσης (Retsch ZM 200, Retsch, Hann, Germany). Οι ομογενοποιημένες σκόνες διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

2.2.2. Διατροφική σύσταση

Η διατροφική σύσταση των δειγμάτων των υποπροϊόντων ψαριών προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες μεθόδους AOAC (67) και ISO. Η περιεκτικότητα σε υγρασία προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας φούρνο κενού (AOAC 952.08).

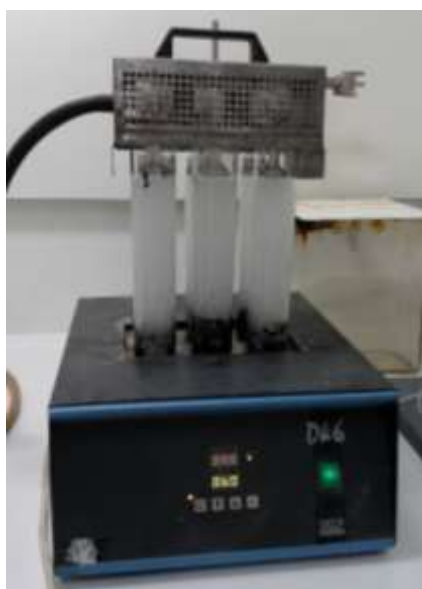


Εικόνα 2.3. Κάψες πορσελάνης κατά τον προσδιορισμό τέφρας



Εικόνα 2.4. Ποτήρια ζέσεως μετά τον προσδιορισμό ολικών λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός της ολικής τέφρας διεξήχθη σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC 938.08 (Εικόνα 2.3) και η συνολική λιποπεριεκτικότητα σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC 948.15 (Εικόνα 2.4). Η περιεκτικότητα σε άζωτο προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μια αυτοματοποιημένη συσκευή Kjeldahl (Kjeltec 8100, Foss Analytical, Hilleroed, Denmark) ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στο ISO 5983-2: 2005 (Εικόνες 2.5 και 2.6. Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την περιεκτικότητα αζώτου με τον συντελεστή μετατροπής 6.25 (68).



Εικόνα 2.5. Συσκευή χώνευσης για τον προσδιορισμό συνολικής περιεκτικότητας πρωτεϊνών



Εικόνα 2.6. Συσκευή απόσταξης Kjeldahl

Οι συνολικοί υδατάνθρακες υπολογίστηκαν αφαιρώντας το άθροισμα των εκατοστιαίων ποσοστών της περιεκτικότητας σε τέφρα, λίπος και πρωτεΐνη από το 100 (69). Όλες οι αναλύσεις διεξήχθησαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα για την περιεκτικότητα σε υγρασία εκφράστηκαν σε g / 100 g νωπού δείγματος, ενώ τα αντίστοιχα για τέφρα, πρωτεΐνη, λίπος και υδατάνθρακες σε g / 100 g λυοφιλιωμένου δείγματος.

2.2.3 Προσδιορισμός μετάλλων

Τα μακροστοιχεία (Ca, Na, K, Mg) προσδιορίστηκαν στις έξι διαφορετικές κατηγορίες υποπροϊόντων (κεφάλι, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα, δέρμα). Τα λυοφιλιωμένα δείγματα υπέστησαν πέψη με υπερκάθαρο HNO₃ 65% και στη συνέχεια προστέθηκε 30% H₂O₂, σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο Islam et al., de Macêdo et al. και Milanov et al. (70-72). Η μέτρηση των μακροστοιχείων K, Na, Ca και Mg πραγματοποιήθηκε με Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής (AES), με τη χρήση φασματόμετρου Varian SpectrAA 200 (Varian, Mulgrave, Αυστραλία). Όλες οι αναλύσεις διεξήχθησαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg g⁻¹ λυοφιλιωμένου δείγματος.

2.2.4 Προετοιμασία των ενοποιημένων δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό του προφίλ των πρωτεϊνών και των λιπαρών οξέων, τα λυοφιλιωμένα δείγματα από τα κεφάλια, δέρματα, κόκκαλα, πτερύγια και βράγχια ενοποιήθηκαν ανά είδος ψαριού. Τα εντόσθια εξαιρέθηκαν από τα συγκεντρωμένα δείγματα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι διακυμάνσεις, σε περίπτωση που τα ψάρια δεν ήταν πλήρως νηστικά. Το θρεπτικό προφίλ των δύο τελικών ενοποιημένων δειγμάτων υποπροϊόντων κρανιού και τσιπούρας, αναλύθηκαν περαιτέρω σύμφωνα με τις ακόλουθες μεθόδους.

2.2.5 Σύσταση λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC 996.06. Το λίπος εκχυλίστηκε από δείγματα ψαριών χρησιμοποιώντας όξινη υδρόλυση και μετά από μεθυλίωση, οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων προσδιορίστηκαν ποσοτικά με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (Simadzu GC-210 Plus, Simadzu Corporation, Kyoto, Ιαπωνία) έναντι εσωτερικού προτύπου τριακυλογλυκερόλης (τριενδεκανοΐνη). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g / 100 g λυοφιλιωμένου δείγματος.

2.2.6 Πρωτεϊνικό προφίλ

Τα ενοποιημένα δείγματα υποπροϊόντων διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα RIPA, στο οποίο προστέθηκε μίγμα αναστολέων πρωτεάσης και φωσφατάσης. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπερήχους σε τρεις επαναλήψεις των 15 δευτερολέπτων με ψηφιακό όργανο υπερήχων (Branson Ultrasonics, Branson, Danbury, Connecticut). Το ομογενοποίημα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 16,000 g για 10 λεπτά στους 4°C και προστέθηκαν 150 μL από το υπερκείμενο σε 750 μL μίγματος μεθανόλη:χλωροφόρμιο (σε αναλογία 4:1% v/v, αντίστοιχα) για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Μετά από φυγοκέντρηση (16.000g για 1 λεπτό), το υπερκείμενο (υγρή φάση) απορρίφθηκε προσεκτικά και προστέθηκαν επιπλέον 400 μL μεθανόλης. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 16.000g για 2 λεπτά και η μεθανόλη απορρίφθηκε προσεκτικά. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 82 μL 8M ουρίας σε 0.4 M διάλυμα NH₄HCO₃ και στη συνέχεια μετρήθηκε με NanoDrop (2000 / 2000c Thermo Scientific, Fisher Scientific, Wilmington, Delaware) για να ληφθεί η ίδια ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης από όλα τα δείγματα. Ακολούθως, προστέθηκε διθειοθρεϊτόλη (DTT) στο προκύπτον δείγμα με αναλογία 10:1 v/v (δείγμα: DTT) και το μίγμα επώαστηκε στο σκοτάδι (Isotemp Incubator, Fischer Scientific,

Wilmington) στους 37°C για 30 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκαν 8 μL ιωδοακεταμιδίου (100 mM) για την αλκυλίωση του δείγματος, το οποίο περαιτέρω αραιώθηκε με βαθμιαία προσθήκη καθαρού H_2O , προκειμένου να ρυθμιστεί η συγκέντρωση ουρίας σε τιμή μικρότερη από 2M. Το δείγμα στη συνέχεια υποβλήθηκε σε ενζυματική πέψη με Lys C (σε αναλογία ενζύμου: πρωτεΐνης 1:50 w/w) στους 37°C για 16 ώρες. Η πέψη συνεχίστηκε με θρυψίνη (σε αναλογία ενζύμου: πρωτεΐνης 1:50 w/w) και το δείγμα αφέθηκε στον επωαστήρα στους 37°C για 7 ώρες. Η αντίδραση χώνευσης τερματίστηκε με τριφθοροοξικό οξύ (TPA) σε τελική συγκέντρωση 10% v/v και το δείγμα στη συνέχεια αφαλατώθηκε με στήλες C18 UltraMicroSpin (The Nest Group Inc., Southborough, MA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο παραγωγής. Το έκλουσμα στη συνέχεια αραιώθηκε σε υδατικό διάλυμα 98% βαθμού υπερκάθαρου H_2O , 0.1% φορμικού οξέος (FA) και 2% ακετονιτριλίου (ACN). Η συγκέντρωση του πεπτιδίου προσδιορίστηκε για όλα τα δείγματα και αραιώθηκε αναλόγως προς $0.05 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ με 0,1% FA. Στη συνέχεια 5 μL από κάθε δείγμα φορτώθηκαν στη στήλη για αναλύσεις LC MS / MS. Η συλλογή δεδομένων για την πρωτεϊνωματική Label-free quantification (LFQ) διεξήχθη σε φασματοόμετρο μάζας (Thermo Scientific Orbitrap Fusion) συνδεδεμένο με σύστημα UPLC (Waters nanoACQUITY) εφοδιασμένο με προστήλη Waters Symmetry® C18 180 μm x 20 mm και αναλυτική στήλη (250 μm X 750 mm, 1,7- μm) NANO ACQUITY UPLC (35 ° C). Η επεξεργασία των συλλεχθέντων δεδομένων από Label-free quantification (LFQ), πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη δημοσιευμένη μεθοδολογία από το κέντρο Keck Mass Spectrometry (MS) & Proteomics Resource (73).

2.2.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS, έκδοση 16.1 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Η κανονική κατανομή όλων των συνεχών

μεταβλητών αξιολογήθηκε γραφικά με ιστογράμματα και ελέγχθηκε με την δοκιμασία Shapiro-Wilk. Οι διαφορές μεταξύ των μεταβλητών ελέγχθηκαν με Student's t-test για τις μεταβλητές που ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Οι διαφορές στις υπόλοιπες μεταβλητές, όπως οι διάφορες περιεκτικότητες, ελέγχθηκαν με το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney U-test. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%.

2.3 Αποτελέσματα

Το συνολικό δείγμα που μελετήθηκε αποτελούνταν από 36 άτομα κρανιού και 60 άτομα τσιπούρας. Τα ψάρια κατατάχθηκαν ανάλογα με την ηλικία και το αντίστοιχο σωματικό τους μέγεθος.

Για την τσιπούρα, τα 16 άτομα με ηλικία 1⁺ είχαν μέσο σωματικό βάρος $403,47 \pm 72,92$ g και μέσο μήκος 28.3 ± 1.7 cm. Τα 44 άτομα ηλικίας 0⁺ είχαν μέσο σωματικό βάρος $160,16 \pm 30,79$ g και μέσο μήκος 21.4 ± 1.5 cm.

Για τον κρανιό, τα 6 άτομα με ηλικία 1⁺ είχαν μέσο σωματικό βάρος $1256,45 \pm 232,32$ g και μέσο μήκος 53.8 ± 3.9 cm. Τα 30 άτομα ηλικίας 0⁺ είχαν μέσο σωματικό βάρος $235,76 \pm 38,45$ g και μέσο μήκος 26.9 ± 1.8 cm.

Ο πίνακας 2.1 συνοψίζει τα έξι διαφορετικά υποπροϊόντα (κεφάλια, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα, δέρμα) ως ποσοστό του συνολικού βάρους, για τα δύο διαφορετικά είδη και τις δύο διαφορετικές ηλικίες. Συγκρίνοντας τις ηλικίες των ψαριών, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά το ποσοστό των βράγχιων, του κεφαλιού, του δέρματος και των κόκκαλων. Ωστόσο, το ποσοστό των εντόσθιων επί του συνολικού βάρους των ψαριών, ήταν μικρότερο στα μεγάλα ψάρια ($4.78 \pm 0.71\%$), σε σύγκριση με τα μικρά ($6.44 \pm 0.91\%$), ($p < 0,001$). Το ποσοστό των πτερυγίων σε σχέση με το συνολικό βάρος ψαριών ήταν $1.79 \pm 0.46\%$ σε μικρά ψάρια, υπερέχοντας έναντι του αντίστοιχου στα μεγάλα ψάρια ($1.64 \pm 0.19\%$), ($p = 0.007$). Κατά τη σύγκριση των δύο ειδών, δεν παρατηρήθηκαν

διαφορές όσον αφορά το ποσοστό των εντόσθιων, των βραγχίων, του κεφαλιού και του δέρματος. Ωστόσο, το ποσοστό των πτερυγίων ήταν χαμηλότερο στους κρανιούς σε σχέση με τις τσιπούρες (1.79 ± 0.46) (1.64 ± 0.19), ($p < 0.001$), ενώ τα κόκκαλα ήταν υψηλότερα στους κρανιούς (6.86 ± 1.78) απ' ό τι στις τσιπούρες (5.78 ± 0.74), ($p < 0.001$).

Οι πίνακες 2 και 3 παρουσιάζουν τη σύσταση των θρεπτικών συστατικών (μέσες τιμές) των δειγμάτων των υποπροϊόντων (κεφάλια, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα, δέρμα) των δύο κατηγοριών μεγέθους (μικρού και μεγάλου μεγέθους) αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ειδών ψαριών ή των διαφορετικών ηλικιών για την κάθε κατηγορία υποπροϊόντων ξεχωριστά, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε υγρασία, τέφρα, ολικό λίπος, ολική πρωτεΐνη, υδατάνθρακες, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο και μαγνήσιο.

Πίνακας 2.1. Ποσοστό σωματικού βάρους έξι διαφορετικών κατηγοριών υποπροϊόντων (κεφάλια, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα, δέρμα) κρανιού και τσιπούρας δύο διαφορετικών ηλικιών (0+ και 1+).

g υποπροϊόντος / 100 g ψαριού	Κρανιός 1+ (n=6)		Κρανιός 0+ (n=30)		Τσιπούρα 1+ (n=16)		Τσιπούρα 0+ (n=44)		P ₁	P ₂
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση		
Κεφάλι	18.74	3.27	17.09	1.74	18.49	1.42	16.70	1.27	0.09	0.61
Βράγχια	3.18	0.31	3.01	0.32	2.54	0.27	2.42	0.22	0.58	0.38
Εντόσθια	5.07	0.53	7.44	0.95	4.49	0.90	5.44	0.87	<0.001	0.08
Πτερύγια	1.65	0.19	1.32	0.29	1.62	0.19	2.27	0.63	0.007	<0.001
Κόκκαλα	8.76	3.09	6.53	0.76	4.95	0.47	5.04	0.72	0.50	<0.001
Δέρμα	6.25	1.68	7.06	1.06	6.35	1.04	6.22	0.99	0.38	0.43
Σύνολο	43.65	4.84	42.46	2.41	38.45	2.06	38.07	2.08	0.98	<0.001

¹ Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (τυπική απόκλιση) για τις κανονικές μεταβλητές. Τα P₁ και P₂ αντιστοιχούν στις στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών μεγεθών και μεταξύ των δύο διαφορετικών ειδών, αντιστοίχως. Οι τιμές p-value έχουν προκύψει από το Student's t-test με $\alpha=0.05$

Πίνακας 2.2. Μέσες τιμές διατροφικής σύστασης των υποπροϊόντων (κεφάλια, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα, δέρμα) από κρανιούς δύο διαφορετικών ηλικιών (0+ και 1+).

	Κρανιοί																							
	Κεφάλι				Βράγχια				Εντόσθια				Πτερύγια				Κόκκαλα				Δέρμα			
	1+		0+		1+		0+		1+		0+		1+		0+		1+		0+		1+		0+	
(g / 100g)*	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
Υγρασία	64.0	0.5	68.9	0.7	68.3	0.2	74.3	0.4	73.0	0.2	59.2	0.4	63.1	0.7	57.0	0.1	63.2	0.7	40.6	0.2	58.4	0.3	65.3	0.2
Τέφρα	20.95	0.37	21.27	1.04	15.59	0.98	19.18	0.32	4.77	0.08	2.25	0.05	49.12	1.91	48.51	2.55	21.00	0.58	23.30	1.23	20.24	0.53	15.23	1.06
Πρωτεΐνη	40.41	0.16	47.50	1.25	45.62	0.16	48.46	0.32	59.62	0.08	29.79	0.64	45.87	0.91	45.98	1.92	32.07	0.25	36.41	0.13	75.16	1.87	75.15	0.03
Λίπος	28.88	1.60	23.34	0.74	19.71	1.33	21.31	0.45	17.09	0.19	54.05	4.94	3.00	1.50	4.35	0.69	34.96	0.10	31.07	2.10	6.12	0.42	9.61	1.60
Υδατάνθρακες	9.76	1.65	7.89	1.78	19.08	1.66	11.05	0.63	18.52	0.22	13.91	4.98	2.01	2.59	1.16	3.27	11.97	0.64	9.22	2.44	1.01	0.01	0.99	0.01
Ασβέστιο (Ca)	5.02	0.72	8.59	1.13	5.88	0.23	6.80	0.12	0.61	0.04	0.58	0.10	12.82	0.34	46.58	1.34	6.39	0.93	9.58	0.57	5.59	0.71	3.90	0.08
Νάτριο (Na)	4.07	0.37	4.92	0.56	5.52	0.13	5.92	0.27	2.53	0.12	2.12	0.57	5.87	0.99	3.72	0.43	3.46	0.11	2.76	0.73	4.42	0.28	3.15	0.17
Κάλιο (K)	6.31	1.05	8.30	0.87	8.55	1.06	9.34	0.77	8.92	1.03	4.86	1.13	6.92	1.02	6.65	0.66	7.62	0.24	8.92	0.23	8.46	1.03	9.33	1.12
Μαγνήσιο (Mg)	0.24	0.19	1.34	0.44	1.37	0.17	3.52	0.82	2.51	0.55	1.49	0.67	0.71	0.04	2.46	0.25	0.67	0.13	0.45	0.12	0.43	0.03	0.76	0.32

* Όπου μ είναι η μέση τιμή, και σ τυπική απόκλιση. Η περιεκτικότητα σε τέφρα, πρωτεΐνη, λίπος, υδατάνθρακες, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο και μαγνήσιο εκφράζεται σε λυοφιλωμένο δείγμα. Οι υδατάνθρακες υπολογίζονται εκ διαφοράς.

** αριθμός δειγμάτων n = 6 για τους κρανιούς 1+ και n= 30 για τους κρανιούς 0+

Πίνακας 2.3. Μέσες τιμές διατροφικής σύστασης των δειγμάτων υποπροϊόντων (κεφάλια, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα, δέρμα) από τσιπούρες δύο διαφορετικών ηλικιών (0+ και 1+).

	Τσιπούρες																							
	Κεφάλι				Βράγχια				Εντόσθια				Πτερύγια				Κόκκαλα				Δέρμα			
	1+		0+		1+		0+		1+		0+		1+		0+		1+		0+		1+		0+	
(g / 100g)*	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
Υγρασία	57.3	0.7	62.4	0.2	66.6	0.3	62.9	0.8	67.1	1.0	57.15	0.5	48.6	0.1	53.1	0.2	53.3	0.7	74.5	0.8	53.0	0.5	61.2	0.1
Τέφρα	18.11	1.24	21.39	1.33	16.60	0.40	17.49	0.30	3.57	0.06	2.62	0.07	45.76	2.29	47.26	0.73	26.62	0.10	27.70	0.58	6.02	0.17	4.36	0.17
Πρωτεΐνη	32.40	0.45	37.19	0.67	31.49	0.42	38.50	1.47	37.23	0.75	26.87	0.35	41.85	1.00	45.10	2.30	34.02	0.98	40.74	1.57	43.16	0.89	49.67	0.11
Λίπος	37.08	4.19	28.76	0.47	37.46	1.16	26.69	0.23	43.19	0.35	55.12	0.98	5.45	0.09	4.09	0.33	30.56	0.11	21.47	0.54	46.39	3.45	45.94	0.54
Υδατάνθρακες	12.41	4.39	12.66	1.56	14.45	1.30	17.32	1.52	16.01	0.83	15.39	1.04	6.94	2.50	3.55	2.44	8.80	0.99	10.09	1.75	4.43	3.56	0.03	0.02
Ασβέστιο (Ca)	8.59	0.43	5.62	1.02	4.52	0.72	7.59	0.33	0.24	0.09	0.67	0.25	42.38	0.11	11.49	0.45	9.23	0.34	7.92	1.10	2.10	0.92	0.50	0.02
Νάτριο (Na)	3.68	0.21	3.28	0.21	4.26	0.82	4.54	0.72	3.01	0.79	2.39	1.01	6.81	0.35	6.08	0.26	3.43	0.14	3.79	0.99	3.52	0.13	1.34	0.22
Κάλιο (K)	6.47	0.92	6.40	1.02	7.04	0.11	8.16	0.13	4.65	0.15	7.83	1.73	7.09	0.13	8.09	1.00	6.92	0.88	8.35	0.37	7.44	0.32	8.66	0.64
Μαγνήσιο (Mg)	0.86	0.43	0.28	0.29	0.64	0.31	2.49	0.46	1.61	0.17	2.84	0.12	3.34	1.04	0.77	0.25	0.33	0.06	0.30	0.09	0.58	0.36	2.10	0.03

* Όπου μ είναι η μέση τιμή, και σ τυπική απόκλιση. Η περιεκτικότητα σε τέφρα, πρωτεΐνη, λίπος, υδατάνθρακες, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο και μαγνήσιο εκφράζεται σε λυοφιλωμένο δείγμα. Οι υδατάνθρακες υπολογίζονται εκ διαφοράς.

** αριθμός δειγμάτων n = 6 για τις τσιπούρες 1+ και n= 30 για τις τσιπούρες 0+

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα των ενοποιημένων δειγμάτων από τα υποπροϊόντα ψαριών από κρανιούς και τσιπούρες παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Η πλειονότητα των συγκεντρώσεων των λιπαρών οξέων, βρέθηκε στατιστικά σημαντικώς διαφορετική μεταξύ των δύο ειδών ψαριών. Τα πλέον άφθονα λιπαρά οξέα στα υποπροϊόντα και από τα δύο είδη ψαριών ήταν το ελαϊκό (18: 1), παλμιτικό (16: 0), λιγνελαιϊκό οξύ (18: 2) και εικοσενοϊκό οξύ (20: 1). Η περιεκτικότητα σε ολικά λιπαρά οξέα καθώς και η περιεκτικότητα σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα (PUFA) λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερη στα υποπροϊόντα της τσιπούρας έναντι του κρανιού.

Πίνακας 2.4. Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων (g/100 g) των ενοποιημένων δειγμάτων υποπροϊόντων από κρανιούς και τσιπούρες.

Λιπαρά οξέα	Κρανιός		Τσιπούρα		P
	Μέση τιμή	σ	Μέση τιμή	σ	
14:0	0.63	0.08	1.40	0.27	<0.05
15:0	0.06	0.004	0.10	0.01	<0.05
16:0	3.19	0.001	4.85	0.003	0.08
16:1	0.94	0.002	2.23	0.003	<0.001
17:0	0.05	0.01	0.08	0.02	0.19
18:0	0.71	0.01	0.78	0.05	0.91
18:1	6.63	0.001	11.34	0.01	<0.05
18:2 n-6	2.60	0.12	4.24	0.18	0.11
18:3 n-6	0.03	0.37	0.07	1.06	<0.001
18:3 n-3	0.47	0.002	0.81	0.02	<0.05
18:4 n-3	0.15	0.003	0.31	0.02	<0.05
20:0	0.07	0.07	0.09	0.21	0.39
20:1 n-9	1.14	0.03	1.53	0.09	0.32
20:2 n-9	0.02	0.01	0.09	0.02	<0.001
20:2 n-6	0.13	0.13	0.20	0.37	0.12
20:3 n-6	0.04	0.004	0.09	0.03	<0.05
20:3 n-3	0.12	0.02	0.14	0.04	0.35
20:4 n-6	0.04	0.01	0.09	0.02	<0.001
20:4 n-3	0.10	0.03	0.26	0.02	<0.001

20:5 n-3	0.23	0.01	0.42	0.02	<0.05
22:1	1.09	0.04	1.30	0.13	0.58
22:2 n-6	-	-	0.03	0.001	<0.05
23:0	0.04	0.01	0.10	0.02	<0.001
22:5 n-3	0.26	0.04	0.70	0.23	<0.001
22:6 n-3	0.30	0.05	0.53	0.15	<0.05
Συνολικά Λιπαρά				7.85	
Οξέα	19.15	2.62	31.86		<0.05
SFA	4.84	0.69	7.45	1.71	0.05
PUFA	4.60	0.67	8.16	2.11	<0.05
MUFA	9.71	1.27	16.25	4.05	<0.05

Τα λιπαρά οξέα εκφράζονται ως g/100g λυοφιλιωμένου δείγματος. Όπου σ εννοείται η τυπική απόκλιση της μέτρησης. Το P (πιθανότητα σφάλματος) αναφέρεται στις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών ψαριών.

Οι μέσες τιμές των πρωτεϊνών των ενοποιημένων δειγμάτων υποπροϊόντων ψαριών από κρانيούς παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών προέκυψε από την εφαρμογή της βαθμολογίας με το σύστημα emPAI score (74). Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα που εμφάνισαν οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στα υποπροϊόντα Κρانيών, αφορούσαν τις πρωτεΐνες της υπομονάδας της συνθετάσης ATP, της μιτοχονδριακής NADH αφυδρογονάσης, της υπομονάδας 1 του υποσυμπλέγματος 1, της ριβοσωματικής πρωτεΐνη L35a, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και της μιτοχονδριακής κυτοχρώμικης c οξειδάσης με βαθμολογία emPAI υψηλότερη από 1.00.

Πίνακας 2.5. Δεδομένα πρωτεϊνικού προφίλ των ενοποιημένων δειγμάτων υποπροϊόντων ψαριών από κρανιούς.

Κρανιός			
Λατινική Ονομασία Πρωτεΐνης	ID Πρωτεΐνης*	MB	emPAI
ATP synthase subunit epsilon. mitochondrial	XP_010742784.1	5730	4.97
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	XP_019118827.2	6895	1.75
60S ribosomal protein L35a	XP_010748069.1	12478	1.38
cytochrome c oxidase subunit 5B. mitochondrial	XP_010737425.2	14265	1.13
cytochrome c oxidase subunit 6B1	XP_010734575.1	10226	1.01
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2	XP_010737833.1	10846	0.93
calcineurin subunit B type 1	XP_010728630.1	19248	0.77
RNA-binding protein 8A isoform X1	XP_010747091.1	19985	0.73
glutathione S-transferase omega-1	XP_010742490.3	27659	0.7
histidine triad nucleotide-binding protein 1	XP_010741018.2	13526	0.7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6.	XP_027142854.1	13890	0.68
fatty acid-binding protein. liver	XP_010731481.1	13998	0.67
gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	XP_010747638.1	14628	0.64
prefoldin subunit 6	XP_010731190.1	14578	0.64
acylphosphatase-2 isoform X1	XP_010745126.2	14823	0.63
high mobility group protein B1	ADX06860.1	23528	0.59
allograft inflammatory factor 1-like	XP_027142939.1	16708	0.54
hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. partial	ASW22527.1	18060	0.49
myeloid-derived growth factor	XP_019112401.2	18073	0.49
nucleoplasmin-3	XP_027133567.1	18296	0.49
thioredoxin domain-containing protein 12	XP_010739874.1	19055	0.46
translationally-controlled tumor protein	XP_010747176.1	19174	0.46
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G. partial	AFU54186.1	30487	0.43
proliferation-associated protein 2G4	XP_010747198.1	43338	0.41
glutathione peroxidase 7	XP_010740942.1	21100	0.41
uricase	XP_010745371.2	34496	0.38
dehydrogenase/reductase SDR family member 7C-A	XP_010739765.1	34007	0.38
lambda-crystallin homolog isoform X1	XP_010748901.2	35361	0.37
T-complex protein 1 subunit epsilon	XP_010731936.1	59425	0.37
aldose reductase	XP_019116037.1	35655	0.36
histone-binding protein RBBP4	XP_010731001.1	47510	0.36
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	XP_019115322.1	36318	0.36
programmed cell death protein 10	XP_027130892.1	24431	0.35
LRP chaperone MESD	XP_010746988.1	24919	0.34
erlin-2 isoform X1	XP_027133320.1	37660	0.34
aspartyl aminopeptidase isoform X2	XP_010748612.3	52042	0.33
adenylate kinase 4. mitochondrial	XP_019125546.1	25473	0.33

NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2.	XP_019124447.1	26706	0.32
core histone macro-H2A.1 isoform X1	XP_010735833.1	39251	0.32
mast cell protease 1A	XP_010728896.2	26502	0.32
RNA-binding protein FUS	XP_010735714.2	43968	0.29
prohibitin	XP_010738397.1	29782	0.28
aspartate--tRNA ligase. cytoplasmic	XP_019124484.1	60564	0.28
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3	XP_027141505.1	45435	0.28
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D isoform X1	XP_027141552.1	64192	0.26
nucleophosmin	XP_010729733.2	32171	0.26
trimeric intracellular cation channel type A	XP_027145915.1	32271	0.26
uncharacterized protein LOC113746832	XP_027139706.1	33344	0.25
pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 1	XP_010728080.2	33127	0.25
WD repeat-containing protein 61	XP_010733492.1	33241	0.25
homogentisate 1.2-dioxygenase	XP_010754782.3	49895	0.25
mitochondrial 2-oxodicarboxylate carrier isoform X1	XP_010742940.1	33148	0.25
actin-related protein 2/3 complex subunit 2	XP_019118121.1	34256	0.24
protein phosphatase 1B isoform X1	XP_010733968.1	52276	0.24
uncharacterized protein LOC104934800	XP_010748848.3	34731	0.24
tyrosine-protein kinase CSK	XP_010731405.1	51060	0.24
adenylosuccinate lyase	XP_019121532.1	54567	0.23
hydroxymethylglutaryl-CoA lyase. mitochondrial	XP_010729592.3	35462	0.23
eukaryotic translation initiation factor 4B isoform X1	XP_010751826.3	70327	0.23
fructose-1.6-bisphosphatase 1	XP_010746269.1	36921	0.22
ELAV-like protein 1 isoform X1	XP_010754002.1	38262	0.21
O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1 isoform X1	XP_010737474.3	39367	0.21
ankyrin repeat domain-containing protein 34C	XP_010727747.2	57267	0.21
importin subunit alpha-3	XP_010736490.1	57568	0.21
serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha	XP_010752215.1	60014	0.2
calcium-binding protein 39	XP_010729707.1	39843	0.2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	XP_010739959.1	40133	0.2
alkaline phosphatase	AEL33276.1	59799	0.2

* Αριθμός αναφοράς του NCBI

Οι μέσες τιμές των πρωτεϊνών των ενοποιημένων δειγμάτων υποπροϊόντων ψαριών από Τσιπούρες παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών προέκυψε από την εφαρμογή της βαθμολογίας με το σύστημα emPAI score (74). Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα που εμφάνισαν οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στα υποπροϊόντα τσιπούρας, αφορούσαν τις πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής

υπομονάδας 8 κυτοχρώματος b-c1, της υπομονάδας 6B1 του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c οξειδάσης και της αφυδρογονάσης NADH με βαθμολογία emPAI υψηλότερη από 0.85.

Πίνακας 2.6 Δεδομένα πρωτεϊνικού προφίλ των ενοποιημένων δειγμάτων υποπροϊόντων ψαριών από τσιπούρες.

Τσιπούρα			
Λατινική Ονομασία Πρωτεΐνης	ID	MB	EMpai Score
mitochondrial cytochrome b-c1 complex subunit 8	ATN38476.1	9671	1.09
mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 6B1 isoform A	ATN38445.1	10139	1.02
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	AGV76781.1	17214	0.88
very long chain acyl-CoA synthetase. partial	AFP97557.1	46175	0.27
mitochondrial NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3	AHX56275.1	48263	0.26
carnitine palmitoyltransferase 2. partial	AUN35172.1	68338	0.24
mitochondrial ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	ATN38406.1	35887	0.23
alkaline phosphatase	AAP04486.1	57515	0.21
cullin 5. partial	AKN80426.1	52490	0.15
mitochondrial Rho GTPase 1-A	AGU38816.1	71045	0.11
macrophage mannose receptor 1. partial	AIT83004.1	114777	0.07
insulin-like growth factor-I receptor b	ALO75807.1	159047	0.07
acetyl-CoA carboxylase alpha	ANJ04915.1	176414	0.04

* Αριθμός αναφοράς του NCBI

2.4 Συζήτηση

Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση υποπροϊόντων τροφίμων, τα οποία παράγονται κυρίως από διαδικασίες επεξεργασίας που αναπτύσσονται κατά μήκος της αγροδιατροφικής αλυσίδας, σύμφωνα με την ιδέα της κυκλικής οικονομίας και την ανάγκη για αειφόρο ανάπτυξη. Μελέτες όπως το πρόγραμμα REFRESH έχουν αναπτύξει το εργαλείο FoodWasteExplorer, μια βάση δεδομένων, που επιχειρεί να χαρτογραφήσει και να συγκεντρώσει τη πληροφορία γύρω από τα υποπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων με σκοπό να προσφέρει εναλλακτικές χρήσεις (75). Επομένως, προκειμένου να αξιοποιηθούν, ανεπαρκώς χρησιμοποιούμενα, υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, απαιτούνται επιστημονικές προσπάθειες για τον πλήρη χαρακτηρισμό τους ως προς τη σύνθεση και τις ιδιότητες των θρεπτικών τους συστατικών. Στην παρούσα μελέτη, επιδιώξαμε να αξιολογήσουμε τα υποπροϊόντα που προκύπτουν κατά τη διαδικασία φιλετοποίησης ψαριών και να περιγράψουμε την χημική τους σύσταση, καθώς και τα προφίλ λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών, προκειμένου να δώσουμε μια εικόνα για τις πιθανές μελλοντικές τους χρήσεις.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, η χημική σύσταση των υποπροϊόντων ψαριών έδειξε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των υποπροϊόντων. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, χωρίς να παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ακολουθούσε την φθίνουσα σειρά: δέρμα> πτερύγια> βράγχια> κόκκαλα> κεφάλι> εντόσθια. Όταν τα δείγματα αναλύθηκαν ανά είδος η φθίνουσα σειρά περιεκτικότητας πρωτεΐνης μεταβλήθηκε ως εξής: στην περίπτωση του κρانيού δέρμα>

βράγχια> κόκκαλα> κεφάλι> εντόσθια> πτερύγια ενώ στην αντίστοιχη της τσιπούρας, η σειρά ήταν πτερύγια> δέρμα> κόκκαλα> βράγχια> εντόσθια. Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε ολικό λίπος για τους κρانيούς, η αντίστοιχη σειρά ήταν κόκκαλα> κεφάλι> εντόσθια> βράγχια> πτερύγια> επιδερμίδα, ενώ για την τσιπούρα η σειρά μεταβλήθηκε σε δέρμα> εντόσθια> κεφάλι> βράγχια> κόκκαλα> πτερύγια. Πρόσφατη μελέτη σχετικά με τα υποπροϊόντα των ψαριών έδειξε ότι το δέρμα είχε την υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης, ακολουθούμενη από το κεφάλι (65). Οι μέσες τιμές, υπολογιζόμενες επί ξηρού βάρους όλων των υποπροϊόντων ψαριών, στην περίπτωση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη ($44.27 \pm 13.35\%$), του ολικού λίπους ($26.48 \pm 15.97\%$) και της τέφρας ($20.78 \pm 14.44\%$) ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες για τα υποπροϊόντα ψαριών, όπου η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη κυμαινόταν μεταξύ 49.22 και 57.92% και η τέφρα μεταξύ 21.79 και 30.16%. Ωστόσο, στη περίπτωση του ολικού λίπους ήταν μεταξύ 7.16 και 19.10%, το οποίο είναι λίγο υψηλότερο σε σύγκριση με τη δική μας μελέτη (47, 76, 77).

Και για τα δύο είδη ψαριών, το ελαϊκό οξύ (18:1 n-9) ήταν το κύριο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ (MUFA) και το κυρίαρχο μεταξύ όλων των λιπαρών οξέων. Ακολουθούσαν το εικοσενοϊκό οξύ (20: 1n-9) και ερουκικό οξύ (22: 1). Το παλμιτικό οξύ (16: 0) ήταν το κύριο κορεσμένο λιπαρό οξύ (SFA). Το κύριο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (PUFA) ήταν το λινελαϊκό (18: 2n-6). Αυτά τα πέντε λιπαρά οξέα αντιπροσωπεύουν περίπου το 75% και το 71% των συνολικών λιπαρών οξέων, για τον κρانيό και την τσιπούρα αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα των μελετών που διεξήχθησαν στην Ελλάδα σε δείγματα υποπροϊόντων και φιλέτων

τσιπούρας (65, 78) και κρανιού (79). Σύμφωνα με τους Costa et al , το φιλέτο κρανιού ήταν επίσης υψηλό σε εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ (22: 6n-3 ή DHA) (80). Ωστόσο, στα δείγματα υποπροϊόντων ψαριών της δικής μας μελέτης αυτό το λιπαρό οξύ είχε μικρή συγκέντρωση.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η πρωτεϊνική σύνθεση και η περιεκτικότητα των υποπροϊόντων κρανιού και τσιπούρας, εκμεταλλευτήκαμε τα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών (MS) για την ταυτοποίηση πολύπλοκων πρωτεϊνικών μορίων (81). Για την προσθήκη της ποσοτικής πληροφορίας στα πρωτεωμικά μας αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε η βαθμολογία emPai, η οποία είναι αναλογική της πρωτεϊνικής περιεκτικότητας ενός δείγματος (74). Μεταξύ των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, μόνον η υπομονάδα της συνθετάσης ATP και η οξειδάση του κυτοχρώματος C ήταν άφθονες στα δείγματα υποπροϊόντων κρανιού, και παρουσίασαν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των ειδών. Αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι χαρακτηριστικές των υποπροϊόντων κρανιού. Επιπλέον, η αλληλουχία αυτών των πρωτεϊνών συγκρίθηκε με ήδη γνωστά βιοδραστικά πεπτίδια (82). Δύο από τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, η 60S ριβοσωματική πρωτεΐνη L35a και η μιτοχονδριακή σύνθετη υπομονάδα 8 του κυτοχρώματος b-c1, οι οποίες βρέθηκαν σε μεγάλη συγκέντρωση στα υποπροϊόντα και των δύο ειδών, έδειξαν ότι περιέχουν την αλληλουχία λευκίνης-τρυπτοφάνης και βαλίνης-τυροσίνης αντίστοιχα. Σύμφωνα με μελέτη των Sato et al αυτά τα πεπτίδια από ένα είδος φυκιού, το wakame, φάνηκε πως έχουν αντιυπερτασική δράση (83) .

Η ποσότητα των υποπροϊόντων εκτιμάται ότι αντιστοιχεί σε 43% του βάρους του ψαριού για τον κρανιό και 38% του βάρους του ψαριού για την τσιπούρα. Σε μερικές μελέτες έχουν αναφερθεί μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων ψαριών που φτάνουν έως και το 70-85% (42, 84), ενώ σε άλλες μελέτες αναφέρεται ότι, για είδη ψαριών όπως το λαβράκι, ο βακαλάος, ο τόνος κ.λπ., τα απόβλητα φτάνουν το 40-65% (85-88). Αυτά περιλαμβάνουν κυρίως μυϊκούς ιστούς (15-20%), δέρμα και πτερύγια (1-3%), κόκκαλα (9-15%), κεφάλια (9-12%), εντόσθια (12-18%) και βράγχια (5%) (89). Στην παρούσα μελέτη, τα αντίστοιχα ποσοστά υπολογίζονται σε 1-2% για τα πτερύγια, το 5-9% για τα κόκκαλα, το 6-7% για το δέρμα, το 2-3% για τα βράγχια, το 5-7% για τα εντόσθια και το κεφάλι 17-19%. Στη παρούσα μελέτη ο σκελετός των ψαριών καθαρίστηκε ενδελεχώς από το φιλέτο. Συνεπώς, μικρές διαφοροποιήσεις μπορούν να αποδοθούν στα διαφορετικά είδη ψαριών καθώς και σε διαφορές της διαδικασίας μεταποίησης, χειροκίνητα ή μηχανικά.

2.5. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι τα υποπροϊόντα ψαριών αποτελούν σημαντική, διατροφικά πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και μετάλλων, καθώς η σύνθεσή τους είναι παρόμοια με εκείνη των φιλέτων και άλλων προϊόντων διατροφής που συνιστώνται για κατανάλωση. Κάθε κατηγορία υποπροϊόντων έχει ειδικά θρεπτικά χαρακτηριστικά. Επομένως, πιθανή εκμετάλλευσή τους εξαρτάται από τα επιθυμητά ειδικά διατροφικά χαρακτηριστικά των προϊόντων τροφίμου που

επιθυμούμε να δημιουργήσουμε από αυτά. Στην παρούσα μελέτη, το δέρμα ήταν η υψηλότερη πηγή πρωτεϊνών, τα πτερύγια και τα κόκκαλα ήταν πλούσια σε ασβέστιο, ενώ το κεφάλι, τα εντόσθια και τα κόκκαλα ήταν καλή πηγή λιπιδίων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών και των συνθηκών καλλιέργειας. Κατά συνέπεια, είναι αναγκαία η συστηματική συγκέντρωση πληροφορίας για διάφορα είδη και υποπροϊόντα ψαριών για τη λεπτομερή και ακριβή αξιολόγηση της προτεινόμενης εκμετάλλευσής τους.

Η αντίστοιχη δημοσίευση στο επιστημονικό περιοδικό με κριτές Foods, MDPI παρατίθεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.

Κεφάλαιο 3. Ασφάλεια υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας ως προς τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων

3.1 Εισαγωγή

Τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών αποτελούν μια εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών, ωμέγα-3 λιπαρών οξέων, υδατανθράκων και λιποδιαλυτών βιταμινών (90) η κατανάλωση των οποίων συμβάλλει σε μία ισορροπημένη διατροφή και καλύτερη υγεία (91). Έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση ψαριών σχετίζεται με την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (92), της υπέρτασης(93), της έλλειψης σιδήρου (94), των διάφορων τύπων καρκίνου (95, 96), της κατάθλιψης (97) και της νόσου του Alzheimer (98).

Ωστόσο, τα ψάρια μπορεί ταυτόχρονα να περιέχουν και τοξικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα, PAH και PCB. Δεδομένου ότι τα ψάρια παραμένουν σε σχετικά υψηλό επίπεδο στην υδατική τροφική αλυσίδα, υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος βιοσυσσώρευσης μετάλλων, ιδίως στα μεγαλύτερα ψάρια (99). Τα μέταλλα μπορούν να εισέλθουν στην αλυσίδα των ψαριών μέσω του υδάτινου περιβάλλοντος ή / και της τροφής, στην περίπτωση των εκτρεφόμενων ψαριών (100, 101), με την περιεκτικότητα των μετάλλων των ψαριών να επηρεάζεται επίσης και από την επεξεργασία κατά το μαγείρεμα (80, 102). Η ανησυχία για τη συγκέντρωση των μετάλλων στη διατροφή μας και τις αρνητικές επιπτώσεις της στην ανθρώπινη υγεία (103-105) επεκτείνεται και σε όλα τα προϊόντα ιχθυρών που πωλούνται στην

αγορά, ιδιαίτερα σε αυτά που προωθούνται σύμφωνα με τις διατροφικές συμβουλές και προτείνεται η συχνή κατανάλωσή τους, 2-3 φορές την εβδομάδα (106-109).

Η ταχέως αυξανόμενη ζήτηση για ψάρια που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο, οδηγεί στη σταδιακή εκμετάλλευση πολλών άγριων αποθεμάτων (110). Υπό αυτήν την προοπτική, η υδατοκαλλιέργεια αναμένεται να προσφέρει αποτελεσματικές λύσεις για τον συνεχώς αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό (111), και είναι ένας από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς τροφίμων στον κόσμο (10). Μια από τις λύσεις αυτές αποτελεί και η αξιοποίηση των υποπροϊόντων ψαριών.

Οι θετικές επιπτώσεις στην υγεία που σχετίζονται με την κατανάλωση ψαριών, σε συνδυασμό με την ανάγκη για βιώσιμη παραγωγή τροφίμων, έχουν οδηγήσει σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εκμετάλλευση των υποπροϊόντων των ψαριών σύμφωνα με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας (55). Για έναν παραγωγό ψαριών μεγάλης κλίμακας, όπως η Ελλάδα, η εκμετάλλευση των υποπροϊόντων ψαριών έχει ιδιαίτερη σημασία. Σε προηγούμενη μελέτη, τα υποπροϊόντα ψαριών μελετήθηκαν ως προς την περιεκτικότητά σε πεπτίδια και λιπαρά οξέα, ως πιθανή πηγή βιοδραστικών ενώσεων (42). Έτσι, η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων που υπόκεινται σε ανθρώπινη κατανάλωση υποστηρίζει τη βιωσιμότητα της υδατοκαλλιέργειας και της ανθρώπινης διατροφής γενικά. Ωστόσο, είναι σημαντικό αυτά τα υποπροϊόντα να χαρακτηρίζονται πλήρως, όσον αφορά τη χημική τους σύσταση και την ασφάλειά τους.

Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί κάποια δεδομένα σχετικά με την περιεκτικότητα μετάλλων σε ιστούς ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας (112, 113). Ωστόσο, παρατηρείται έλλειψη βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με τις συγκεντρώσεις μετάλλων σε διάφορα υποπροϊόντα ψαριών, πληροφορίες που θα ήταν απαραίτητες για να διασφαλιστεί η ασφάλειά τους. Οι περισσότερες μελέτες για παρουσία βαρέων μετάλλων που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής επιχειρούν να αξιολογήσουν την επίδραση της υδατοκαλλιέργειας στην ποιότητα του περιβάλλοντος (114-116) και όχι στην ποιότητα των εκτρεφόμενων ατόμων. Αυτό παρατηρείται τόσο σε μελέτες που αφορούν την Ελλάδα όσο και την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, καταδεικνύοντας μια αύξηση των συγκεντρώσεων μετάλλων στα ιζήματα κάτω από τους κλωβούς ιχθυοτροφείων (112).

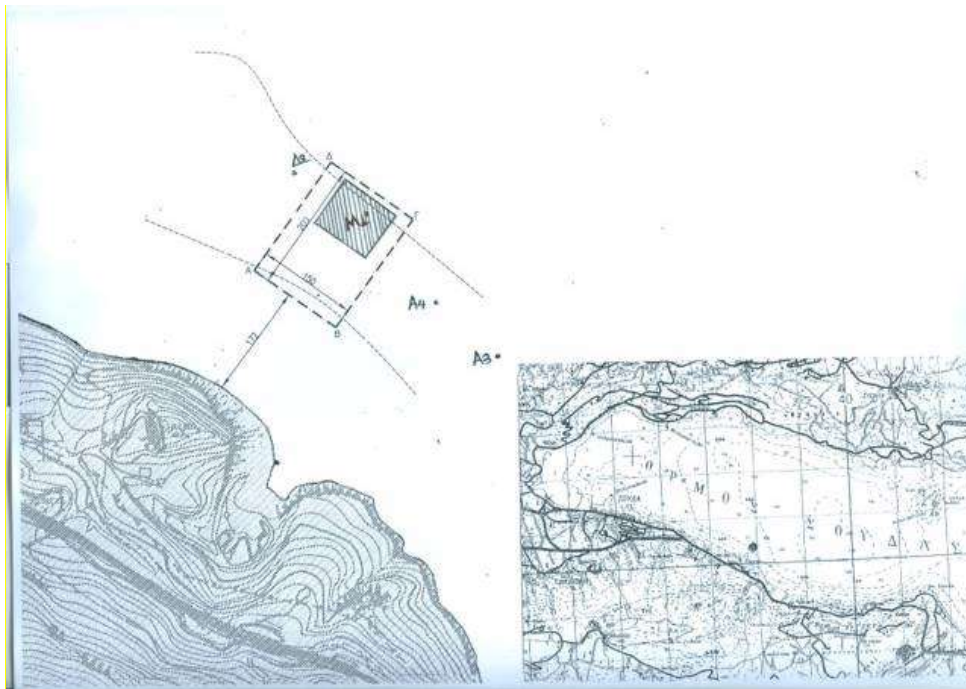
Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν συνεπώς ο προσδιορισμός 11 μετάλλων στα ψάρια (φιλέτα) τσιπούρας και κρανιού, καθώς επίσης και στα 6 διαφορετικά υποπροϊόντα (κόκκαλα, βράγχια, εντόσθια, κεφάλι, δέρμα, πτερύγια). Από τα εκτρεφόμενα ελληνικά είδη, επιλέχθηκαν να εξετασθούν οι τσιπούρες, ως ένα από τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη, καθώς επίσης και οι κρανιοί, ως ένα από τα «νέα» και υποσχόμενα είδη εκτροφής. Παράλληλα, εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις των μετάλλων του θαλάσσιου περιβάλλοντος και των ζωοτροφών των ψαριών.

3.2 Μεθοδολογία

3.2.1 Δειγματοληψία θαλασσινού νερού

Τα δείγματα θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν σε δοχεία PP εμποτισμένα για 1 εβδομάδα σε 10% supra pure HNO₃ (Merck, Darmstadt, Γερμανία), ξεπλύθηκαν με υπερκάθαρο νερό 18.2 ΜΩ cm (Millipore, Bedford, MA, USA) και φυλάχθηκαν μέσα σε διπλή σακούλα.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν δύο φορές, τον Οκτώβριο του 2017 και τον Μάιο του 2018 στη θαλάσσια περιοχή των εγκαταστάσεων του ΕΛΚΕΘΕ στον Κόλπο της Σούδας, στην Κρήτη (Σχήμα 3.1). Συλλέχθηκαν συνολικά 16 δείγματα θαλασσινού νερού (2 L το καθένα) και στις δύο δειγματοληψίες, από τέσσερα διαφορετικά σημεία και σε δύο διαφορετικά βάθη. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν δείγματα από κάθε σημείο σε 2 βάθη, 0,5 m πάνω από τον πυθμένα-βυθό της θάλασσας (δείγματα Β) και 0,5 m κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας (δείγματα Ε). Τα σημεία δειγματοληψίας ήταν i) εντός της μονάδας υδατοκαλλιέργειας (συνολικό βάθος 65 m, δείγματα Μ1Β και Μ1Ε), ii) σε απόσταση 65 m δυτικά της μονάδας (συνολικό βάθος 55 m, δείγματα Δ2Β και Δ2Ε), iii) στα 125 m ανατολικά της μονάδας (συνολικό βάθος θάλασσας 77 m, δείγματα Α3Β και Α3Ε) και iv) στα 250 m ανατολικά της μονάδας (συνολικό βάθος θάλασσας 86 m, δείγματα Α4Β και Α4Ε).



Σχήμα 3.1. Θέσεις δειγματοληψίας δειγμάτων ψαριών και νερών

3.2.2 Προσδιορισμός μετάλλων σε θαλασσινό νερό

3.2.2.1 Διαλυμένα μέταλλα

Οι συγκεντρώσεις των συνολικών διαλυμένων μετάλλων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική ταχείας εκχύλισης διαλύτη που περιγράφεται από τους Danielsson et al. (117). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε μέσα σε καθαρό δωμάτιο (clean room) για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων με μέταλλα. Ο προσδιορισμός των μετάλλων στα προσυμπυκνωμένα δείγματα πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) χρησιμοποιώντας ένα όργανο Thermo Scientific ICAP Qc (Waltham, MA USA). Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε λειτουργία απλής

σύγκρουσης, με διάκριση κινητικής ενέργειας (KED) χρησιμοποιώντας καθαρό He. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) των μετάλλων στο θαλασσινό νερό σε ng L⁻¹ ήταν ίσα με 0.60 για As, 0.36 για Cd, 0.24 για Co, 1.2 για Cr, 4.8 για Cu, 36 για Fe, 2.4 για Mn, 4.8 για Ni, 0.60 για Pb και V και 12 για Zn. Τα μέτρα ποιοτικού ελέγχου περιλάμβαναν τη χρήση τυφλών εργαστηριακών αντιδραστηρίων, τριπλών επαναλήψεων των δειγμάτων και πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM) «NASS-6, Υλικό αναφοράς θαλασσινού νερού για μέταλλα» (National Research Council Canada), το οποίο αναλύθηκε για την αξιολόγηση της ακρίβειας και της ορθότητας της μέτρησης. Οι ληφθείσες ανακτήσεις υπολογίστηκαν στο εύρος $\pm 20\%$.

3.2.2.2 Μέταλλα αιωρούμενης σωματιδιακής ύλης

Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων σε αιωρούμενα σωματίδια (SPM) προσδιορίστηκαν μετά από διήθηση 2 λίτρων θαλασσινού νερού μέσω προζυγισμένων φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης 0.45 μm (Millipore, Bedford, MA, USA), και πέψη των φίλτρων με την προσθήκη supra pure HNO₃ 65 % (Merck, Darmstadt, Germany) και αραίωση σε τελικό όγκο 25 mL. Οι συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων στα ληφθέντα διαλύματα προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ICP-MS όπως περιγράφεται παραπάνω.

3.2.3 Προσδιορισμός μετάλλων στις ιχθυοτροφές

Οι ιχθυοτροφές είχαν τη μορφή συσσωματωμάτων (pellets). Τρεις τύποι ζωοτροφών, (σημειώνονται σαν F1, F2 και F3) χρησιμοποιήθηκαν για τη

σίτιση της τσιπούρας και του κρανιού. Η F1, με μέγεθος pellets 4.5 μm, χρησιμοποιήθηκε για τη σίτιση μικρών ψαριών μεταξύ 100 και 300 g, η F2, με μέγεθος pellets 6.0 μm, για ψάρια με μέγεθος μεταξύ 300 και 800 g και η F3, με μέγεθος pellets 8.0 μm, για ψάρια με μεγέθη μεγαλύτερα από 800 g. Οι τροφές αποτελούνταν από ιχθυάλευρα, γλουτένη αραβοσίτου, ιχθυέλαιο, αλεύρι ηλίανθου και αλεύρι σόγιας και η χημική τους σύσταση αποτελούνταν από 43.0% πρωτεΐνη, 17.0% λίπος, 2.7% φυτικές ίνες, 8.2% τέφρα, 8.5% υγρασία, 1.15% συνολικό P, 1.5% συνολικό Ca, Vit. A 10.000 IU, Vit. D3 2.000 IU, Vit. E 400 mg, Vit. C 500 mg, χολίνη 750 mg. Ο προσδιορισμός των μετάλλων των δειγμάτων τροφής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε προηγουμένως για το As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V και Zn χρησιμοποιώντας ICP-MS.

3.2.4 Δειγματοληψία και προετοιμασία υποπροϊόντων ψαριών

Τα δείγματα υποπροϊόντων προήλθαν από συνολικά 36 άτομα κρανιού (*Argyrosomus regius*) (6 με ηλικία 1⁺ και 30 με ηλικία 0⁺) και 60 ατόμων τσιπούρας (*Sparus aurata*) (16 με ηλικία 1⁺ και 44 με ηλικία 0⁺) που συλλέχθηκαν από την πιλοτική μονάδα ιχθυοκλωβών του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών στην Σούδα της Κρήτης.

Όλα τα ψάρια εκτράφηκαν στις εγκαταστάσεις πιλοτικής κλίμακας του ΕΛΚΕΘΕ. Πρόκειται για αδειοδοτημένες εγκαταστάσεις, από την Περιφέρεια Κρήτης και τη Γενική Διεύθυνση Γεωργίας και Κτηνιατρικής με αριθ. 3989 / 01.03.2017, εκτροφής θαλασσινών ψαριών. Επιπλέον οι εγκαταστάσεις έχουν άδεια για εκτροφή και πειραματισμούς θαλασσινών

ψαριών και έχουν καταχωρηθεί με τους ακόλουθους κωδικούς έγκρισης: EL91-BIObr-03 και EL91-BIOexp-04. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από ομάδες ψαριών που εκτρέφονταν υπό κανονικές συνθήκες και μετά τη συλλογή τους, υποβλήθηκαν σε ευθανασία χρησιμοποιώντας παγωμένο νερό. Το προσωπικό που διενήργησε τη δειγματοληψία έχει εκπαιδευτεί και έχει διαπιστεύσεις για τον χειρισμό των ψαριών, με πιστοποίηση από την Ομοσπονδία Ευρωπαϊκών Ενώσεων Εργαστηριακών Ζώων (FELASA) σχετικά με τη "Φροντίδα και χρήση πειραματόζων".

Κατά την ανάλυση, κάθε άτομο ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό απομονώθηκαν έξι διαφορετικά υποπροϊόντα, δηλαδή πτερύγια, δέρμα, εντόσθια, κόκκαλα, κεφάλι και βράγχια, τα οποία διατηρήθηκαν χωριστά σε ερμητικά συσκευασμένες σακούλες από πολυπροπυλένιο -80°C , όπως περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 2.2.1.

3.2.5 Προσδιορισμός μετάλλων σε υποπροϊόντα ψαριών

Όλα τα υλικά που ήρθαν σε επαφή με τα δείγματα πλύθηκαν προηγουμένως καλά, εμποτίστηκαν σε αραιό διάλυμα HNO_3 (Merck, Darmstadt, Γερμανία) και ξεπλύθηκαν με υπερκάθαρο νερό 18.2 MΩ cm (Millipore, Bedford, MA, USA). Για την προετοιμασία όλων των απαιτούμενων διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ογκομετρικά γυάλινα σκεύη κατηγορίας A. Για τον προσδιορισμό του Αρσενικού (As), Καδμίου (Cd), Κοβαλτίου (Co), Χρωμίου (Cr), Χαλκού (Cu), Σιδήρου (Fe), Μαγγανίου (Mn), Νικελίου (Ni), Μολύβδου (Pb), Βαδανίου (V) και Ψευδαργύρου (Zn) τα δείγματα υπεβλήθησαν σε πέψη με supra pure HNO_3 65% (Merck) με

επακόλουθη προσθήκη H_2O_2 30% (χώνευση), σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται από τους de Macêdo et al., Islam et al. και Milanov et al. (70-72).

Ο προσδιορισμός των ιχνοστοιχείων στα δείγματα μετά από διαδικασία χώνευσης, πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS), χρησιμοποιώντας όργανο Thermo Scientific ICAP Qc (Waltham, MA, USA). Οι μετρήσεις διεξήχθησαν με ρύθμιση σε λειτουργία μίας σύγκρουσης, με προσδιορισμό κινητικής ενέργειας (KED) χρησιμοποιώντας καθαρό He.

Τα όρια ανίχνευσης (LODs) (σε ng g⁻¹ που αναφέρεται σε ξηρό βάρος) υπολογίστηκαν σύμφωνα με το USEPA (1997) (118) και βρέθηκαν ίσα με 75.0 για Fe, 25.0 για Zn και κάτω από 10.0 για όλα τα άλλα μέταλλα που εξετάστηκαν. Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, στις τιμές που ήταν χαμηλότερες από το LOD, αποδόθηκε η υποδιπλάσια τιμή του LOD.

Για σκοπούς ελέγχου ποιότητας, σε κάθε παρτίδα δειγμάτων που αναλύθηκαν, συμπεριλήφθηκε τουλάχιστον ένα τυφλό δείγμα αναφοράς, στο οποίο δεν ανιχνεύθηκαν αναλυτές καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η επαλήθευση της ακρίβειας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRM) IAEA-436 ομογενοποιημένου φιλέτου τόνου (Υλικά αναφοράς IAEA) και πρωτεΐνης ψαριού DORM-4, για ιχνοστοιχεία. Οι ανακτήσεις των ιχνοστοιχείων που μετρήθηκαν ήταν στην περιοχή 94 - 105% (Πίνακας 3.1). Διεξήχθησαν επίσης δοκιμές ανάκτησης, με την αποτελεσματικότητα ανάκτησης για την

ανάλυση δειγματοληψίας να είναι $\pm 25\%$ για όλα τα στοιχεία. Η ακρίβεια υπολογίστηκε να κυμαίνεται από 2.9% έως 18%.

Πίνακας 3.1. Πιστοποιημένες και καθορισμένες τιμές ($\mu\text{g g}^{-1}$) των συγκεντρώσεων των μετάλλων στα υλικά αναφοράς.

Μέταλλα	DORM-4 (πρωτεΐνη ψαριού)			ΙΑΕΑ-436 (φιλέτο ψαριού)		
	Πιστοποιημένη τιμή	Καθορισμένη τιμή	% Ανάκτηση	Πιστοποιημένη τιμή	Καθορισμένη τιμή	% Ανάκτηση
As	6.87 \pm 0.44	6.89 \pm 0.56	100	1.98 \pm 0.17	2.00 \pm 0.15	101
Cd	0.299 \pm 0.018	0.298 \pm 0.038	100	0.052 \pm 0.007	0.054 \pm 0.006	104
Co				0.042 \pm 0.006	0.044 \pm 0.004	105
Cr	1.87 \pm 0.18	1.82 \pm 0.84	97	0.194 \pm 0.058	0.204 \pm 0.016	105
Cu	15.7 \pm 0.5	15.6 \pm 0.5	99	1.73 \pm 0.19	1.76 \pm 0.09	102
Fe	343 \pm 20	346 \pm 29	101	89.3 \pm 4.2	86.5 \pm 4.4	97
Mn	3.17 \pm 0.26	3.30 \pm 0.25	104	0.238 \pm 0.042	0.244 \pm 0.036	102
Ni	1.34 \pm 0.14	1.31 \pm 0.21	98	0.069 \pm 0.041	0.071 \pm 0.051	103
Pb	0.404 \pm 0.062	0.417 \pm 0.070	103	0.068 \pm 0.057	0.064 \pm 0.009	94
V	1.57 \pm 0.14	1.51 \pm 0.13	96	0.014 \pm 0.020	0.014 \pm 0.005	100
Zn	51.6 \pm 2.8	49.0 \pm 2.6	95	19.0 \pm 1.3	19.5 \pm 1.2	103

3.2.6 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο SPSS 16.1 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Η κανονική κατανομή των συνεχών μεταβλητών αξιολογήθηκε γραφικά με ιστογράμματα. Οι διαφορές μεταξύ των μεταβλητών ελέγχθηκαν με το Student t-test για τις κανονικές μεταβλητές (βάρος και μήκος των ψαριών). Οι διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών ειδών ψαριών και δύο κατηγοριών διαφορετικών μεγεθών δοκιμάστηκαν με τη δοκιμή Mann Whitney U-test και μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών υποπροϊόντων, με τη δοκιμή Kruskal Wallis. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%.

3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.3.1 Περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις μετάλλων

Ο Πίνακας 3.2. παρουσιάζει τις συγκεντρώσεις των μετάλλων που μετρήθηκαν σε δείγματα θαλασσινού νερού και στην αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη (SPM) από τις δύο δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 3.2 Συγκεντρώσεις μετάλλων σε δείγματα θαλασσινού νερού και αιωρούμενης σωματιδιακής ύλης (SPM) (B: 0.5 m πάνω από τον πυθμένα της θάλασσας; E: 0.5 m κάτω από την επιφάνεια του νερού).

Δείγμα	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	V	Zn
Θαλασσινό νερό	(ng L⁻¹)	(ng L⁻¹)	(ng L⁻¹)	(μg L⁻¹)	(μg L⁻¹)	(μg L⁻¹)	(μg L⁻¹)	(ng L⁻¹)	(ng L⁻¹)	(μg L⁻¹)
<i>Οκτώβριος 2017</i>										
M1B	9.85	9.39	73.1	0.102	0.867	0.110	0.264	18.2	122	0.239
M1E	4.57	10.0	68.3	0.226	0.852	0.092	0.215	12.1	150	0.222
Δ2B	6.28	10.6	35.1	0.237	0.258	0.093	0.262	6.77	170	0.233
Δ2E	6.47	13.3	54.9	0.295	0.371	0.097	0.270	10.1	149	0.380
A3B	6.05	5.67	49.2	0.191	0.291	0.077	0.209	5.30	192	0.148
A3E	4.65	10.9	56.8	0.243	0.308	0.085	0.240	8.08	190	0.185
A4B	3.43	5.78	66.0	0.128	0.469	0.162	0.103	5.84	186	0.186
A4E	4.61	9.64	54.2	0.116	0.319	0.070	0.186	7.76	155	0.283
<i>Μάιος 2018</i>										
M1B	23.8	11.6	25.4	0.315	1.09	0.053	0.239	28.6	40.3	0.461
M1E	25.6	11.7	24.2	0.354	0.887	0.028	0.273	21.8	156	0.591
Δ2B	5.57	10.6	18.9	0.189	0.660	0.029	0.179	10.8	77.0	0.270
Δ2E	5.57	8.89	17.0	0.208	0.920	0.041	0.162	14.9	32.2	0.454
A3B	6.78	7.38	14.4	0.191	0.691	0.038	0.194	9.65	22.3	0.286
A3E	5.06	8.68	13.1	0.372	0.638	0.038	0.161	12.3	20.9	0.399
A4B	8.55	9.67	15.9	0.211	0.828	0.032	0.164	7.91	16.8	0.204
A4E	13.6	11.6	14.2	0.224	0.693	0.045	0.186	11.6	27.3	0.383
Δείγμα	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	V	Zn
SPM	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)	(μg g⁻¹)
<i>Οκτώβριος 2017</i>										
M1B	0.245	0.564	13.7	10.0	2268	42.5	11.2	8.50	9.74	8.81
M1E	0.480	0.244	18.9	9.38	500	7.46	11.9	3.24	4.21	7.97

Δ2B	0.106	0.508	10.2	7.05	1838	41.4	8.88	4.76	7.99	8.98
Δ2E	0.079	0.136	8.33	7.36	394	6.37	5.55	2.30	3.30	7.96
A3B	0.063	0.431	10.8	5.52	1599	37.1	5.16	4.38	6.60	8.56
A3E	0.069	0.141	9.38	6.82	527	6.79	5.05	2.24	2.79	8.35
A4B	0.056	0.171	12.7	4.98	420	7.21	6.59	2.24	6.06	7.95
A4E	0.003	0.022	3.89	2.11	79.3	1.25	1.00	2.63	0.668	8.36
<i>Μάιος 2018</i>										
M1B	0.099	0.411	10.6	4.74	1303	30.1	3.05	7.05	5.29	16.6
M1E	0.099	0.229	9.09	9.42	534	7.78	4.13	6.20	1.87	12.9
Δ2B	0.038	0.385	8.83	4.52	1248	30.0	2.43	4.57	4.79	16.1
Δ2E	0.038	0.091	6.43	4.82	350	5.93	1.64	1.82	1.41	9.82
A3B	0.036	0.447	7.75	3.24	1008	33.8	2.03	2.99	3.55	8.49
A3E	0.043	0.156	8.83	17.4	396	6.73	1.54	1.89	1.80	12.3
A4B	0.059	0.451	8.89	4.77	1321	33.0	2.38	5.02	4.78	18.1
A4E	0.111	0.178	7.31	5.10	397	7.35	1.88	1.95	1.74	11.2

** Στην περίπτωση των δειγμάτων του θαλασσινού νερού οι μονάδες για το Co, Cr, Pb και B είναι σε **ng g⁻¹**

Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των εποχών παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις θαλασσινού νερού των μετάλλων για τις περιπτώσεις του Cr, Fe, Mn, Pb, V και Zn ($p < 0.05$). Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των μετάλλων μεταξύ των δύο διαφορετικών βαθών που εξετάστηκαν (0.5 m πάνω από τον πυθμένα της θάλασσας και 0.5 m κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας). Τα δείγματα θαλασσινού νερού που συλλέχθηκαν από τις διάφορες τοποθεσίες δειγματοληψίας που μελετήθηκαν, δεν έδειξαν ιδιαίτερες διαφορές ως προς τα επίπεδα των μετάλλων, εξαιρουμένου του Pb, οι συγκεντρώσεις του οποίου ποικίλλουν μεταξύ των διαφορετικών τοποθεσιών δειγματοληψίας, καθώς ήταν συγκριτικά υψηλότερες εντός της μονάδας υδατοκαλλιέργειας ($20.2 \pm 6.9 \text{ ng L}^{-1}$)

Τα επίπεδα των μετάλλων του θαλασσινού νερού που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά που αναφέρονται σε άλλες περιοχές θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας καθώς και από σχετική μελέτη που εκπονήθηκε το 2008 στον κόλπο της Σούδας (119). Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στη μελέτη των Dolores Galindo et al. για τα Cd, Cu, Pb και Zn στο θαλασσινό νερό στον κόλπο του Κάντιθ της Ισπανίας, υπερβαίνουν επίσης αυτά της παρούσας μελέτης (120). Οι Lao et al. (121) έχουν βρει σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd, Pb Cr, Zn και Cu στον κόλπο Βεΐβι στη Νότια Κίνα, τάση που ακολουθείται από τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν για το Fe και Mn από τους Steckert et al. (2019) στη Santa Catarina, νότια Βραζιλία (122).

Σε σύγκριση με τις τυπικές συγκεντρώσεις μετάλλων στο θαλασσινό νερό (οι οποίες παρουσιάζονται στις παρενθέσεις) σύμφωνα με τη μελέτη των

Bruland and Lohan, 2003 (123) τα επίπεδα Cd, Cr, Mn, Ni και V που μετρήθηκαν στα δείγματα θαλασσινού νερού της παρούσας μελέτης βρέθηκαν χαμηλότερα (Cd: 0.115-115 ng L⁻¹; Cr: 0.160-0.266 ng L⁻¹; Mn: 0.004-0.282 μg L⁻¹; Ni: 0.123-0.738 μg L⁻¹; V: 1.57-1.88 μg L⁻¹), τα επίπεδα Co, Cu, Pb και Zn ήταν συγκρίσιμα (Co: 0,241-18,1 ng L⁻¹; Cu: 0.032-0.293 μg L⁻¹; Pb: 1.08-32.3 ng L⁻¹; Zn: 0.033-0.603 μg L⁻¹), ενώ τα επίπεδα Fe ήταν υψηλότερα (Fe: 0.001-0.1515 μg L⁻¹). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι επίσης συγκρίσιμα με αυτά που ανέφεραν οι Cotte-Krief et al. για την Κελτική Θάλασσα (Cd: 0.122-33.7 ng L⁻¹; Cu: 0.064-0.127 μg L⁻¹; Ni: 0.118-0.252 μg L⁻¹) (124) και από τους Morley et al. για τη Δυτική Μεσόγειο Θάλασσα (Cd: 0-33.7 ng L⁻¹; Cu: 0.064-0.127 μg L⁻¹; Ni: 0.120-3.60 μg L⁻¹; Fe: 0.045-0.196 μg L⁻¹; Mn: 0.017-0.302) (125), ενώ είναι χαμηλότερο από εκείνο που ανέφεραν οι Tang et al. για το Galveston Bay, του Τέξας (Cd: 0,122-7,87 ng L⁻¹; Cu: 0.064-0.508 μg L⁻¹; Ni: 0.240-1.20 μg L⁻¹; Fe: 1.68-3.36 μg L⁻¹) (126).

Όσον αφορά την αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη (SPM) που μετρήθηκε σε δείγματα θαλασσινού νερού που συλλέχθηκαν στην παρούσα εργασία, οι συγκεντρώσεις των μετάλλων έδειξαν μια μικρή διακύμανση, που κυμαινόταν μεταξύ 10.3 mg L⁻¹ στο σημείο δειγματοληψίας A4E και 12.0 mg L⁻¹ στα σημεία δειγματοληψίας M1B και A4B. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζουν την SPM των διαφορετικών βαθών που συλλέχθηκαν δείγματα, όσον αφορά τις συγκεντρώσεις του σε Co, Fe, Mn, Pb και V.

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων τοποθεσιών δειγματοληψίας, ενώ οι εποχιακές διαφορές χαρακτηρίζουν μόνο τις συγκεντρώσεις Ni και Zn ($p < 0.05$) της SPM.

Παρόμοιες συγκεντρώσεις Cd, Fe, Mn, Ni και Zn στην SPM αναφέρθηκαν στην παρούσα μελέτη σε σύγκριση με αυτές που καταγράφηκαν από τους Dolores Galindo et al. ενώ ήταν χαμηλότερες για Co και υψηλότερες για Cu και Pb (120).

3.3.2 Συγκεντρώσεις μετάλλων στις ιχθυοτροφές

Οι Πίνακες 3.3 α) και β) συνοψίζουν τα μέσα δεδομένα των συγκεντρώσεων μετάλλων που μετρήθηκαν στις διάφορες τροφές ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ζωοτροφών, οι οποίες στην πραγματικότητα δεν διαφέρουν ως προς το περιεχόμενο τους σε μέταλλα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η κύρια διαφορά τους σχετίζεται με το αντίστοιχο μέγεθος pellet και όχι με τα συστατικά που χρησιμοποιούνται από τον κατασκευαστή. Με στόχο την προστασία της υγείας των καταναλωτών, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει ορίσει μέγιστα επίπεδα για συγκεκριμένα βαρέα μέταλλα στις ιχθυοτροφές. Τα όρια κανονισμού της ΕΕ για το As, Cd, F και Pb είναι ίσα με 10, 2, 150 και 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ αντίστοιχα (127-129). Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη όχι μόνο πληρούσαν τα όρια της νομοθεσίας, αλλά ήταν πολύ χαμηλότερες. Επιπρόσθετα, οι συγκεντρώσεις μετάλλων στην τροφή των ψαριών ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις υπολογισμένες συγκεντρώσεις επί νωπού βάρους των διαφόρων φιλέτων των ψαριών, το οποίο είναι σύμφωνο με προηγούμενη δημοσιευμένη μελέτη των Kanlantzi et al. (113). Η συγκέντρωση του Pb αποτέλεσε την μόνη εξαίρεση, καθώς η συγκέντρωσή του που μετρήθηκε στην τροφή των ψαριών ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με τη

συγκέντρωση Pb στο φιλέτο. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι αν και η τροφή ψαριών αποτελεί την κύρια πηγή μετάλλων που ανιχνεύονται στα φιλέτα των ψαριών, ενδέχεται να υπάρχουν και άλλες πηγές που συμβάλλουν στη συνολική περιεκτικότητα των μετάλλων στα ψάρια, όπως το θαλασσινό νερό και ιζήματα (130, 131)(Ferreira et al., 2008; Alhashemi et al. , 2011; Kanlantzi et al., 2016).

Πίνακας 3.3α. Συγκεντρώσεις μετάλλων ($\mu\text{g g}^{-1}$) στις τροφές ψαριών (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση).

	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
F1	1.83 \pm 0.04	0.285 \pm 0.030	0.252 \pm 0.010	0.824 \pm 0.060	27.0 \pm 1.2	446 \pm 12
F2	2.60 \pm 0.03	0.242 \pm 0.001	0.262 \pm 0.001	1.45 \pm 0.01	25.7 \pm 0.4	361 \pm 56
F3	1.69 \pm 0.10	0.232 \pm 0.001	0.208 \pm 0.010	0.456 \pm 0.050	27.0 \pm 1.6	255 \pm 49

*F1, F2 και F3 είναι οι τροφές 1, 2 και 3 αντίστοιχα

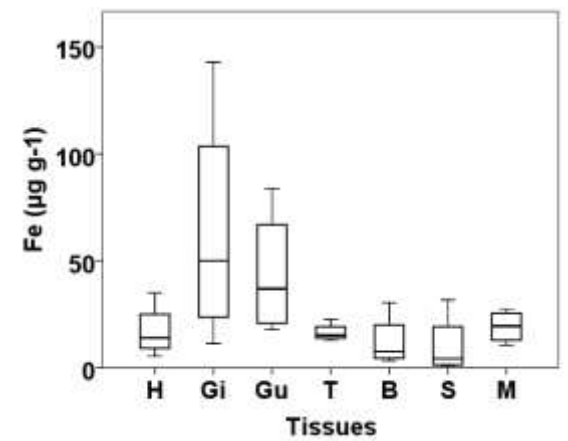
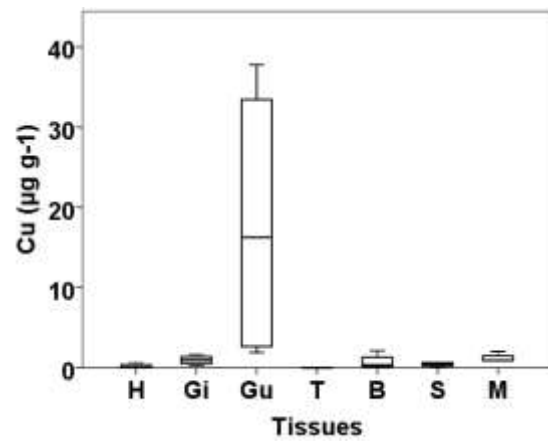
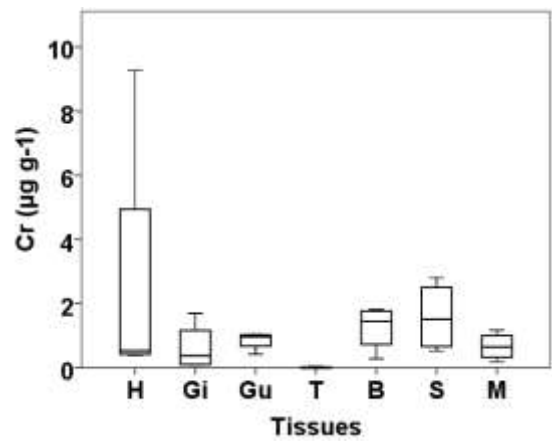
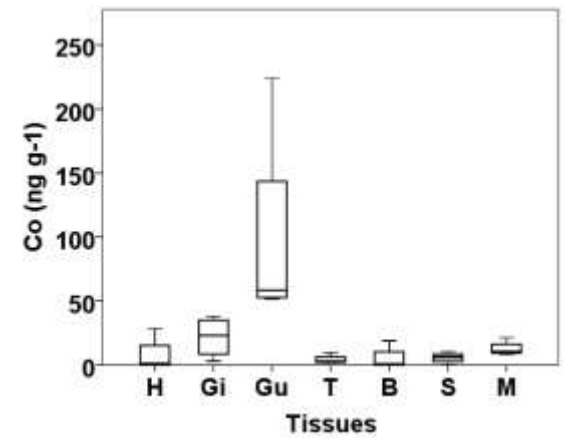
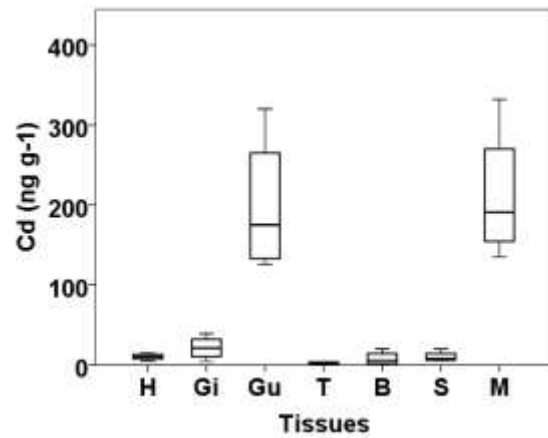
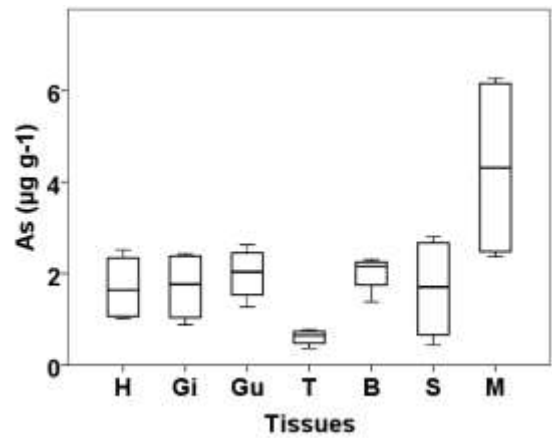
Πίνακας 3.3β. Συγκεντρώσεις μετάλλων ($\mu\text{g g}^{-1}$) στις τροφές ψαριών (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση).

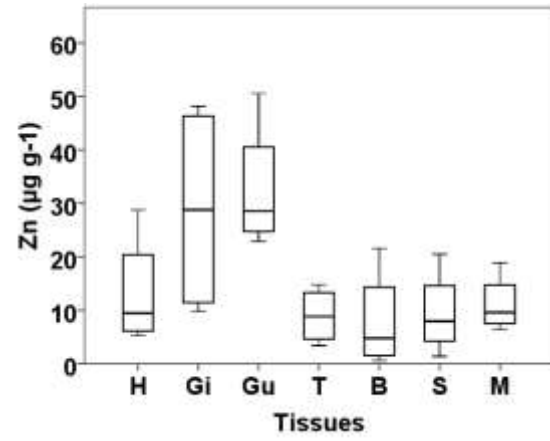
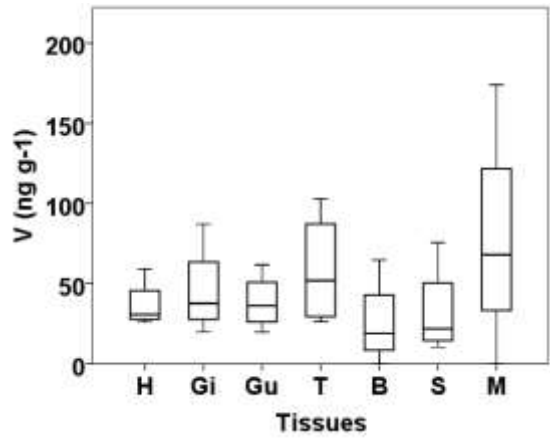
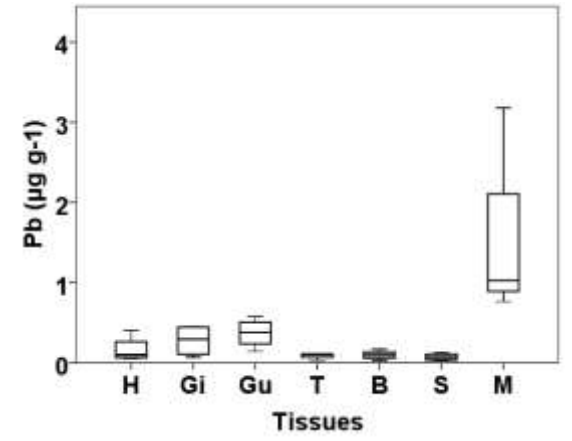
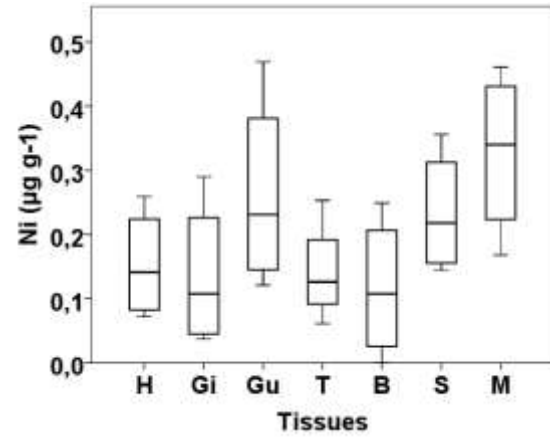
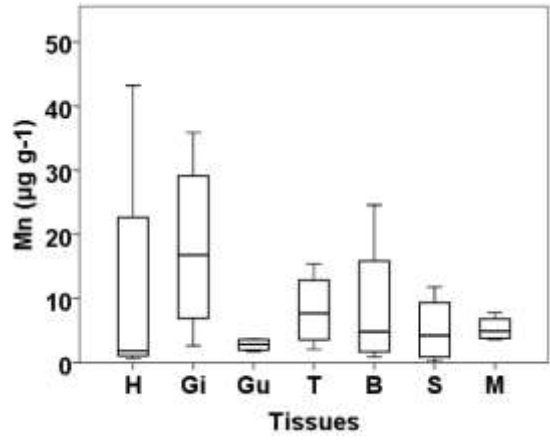
	Mn	Ni	Pb	V	Zn
F1	171 \pm 40	3.22 \pm 0.12	0.773 \pm 0.280	1.73 \pm 0.24	118 \pm 6
F2	112 \pm 10	3.19 \pm 0.14	0.337 \pm 0.070	1.68 \pm 0.04	140 \pm 5
F3	103 \pm 6	2.61 \pm 0.02	0.287 \pm 0.001	1.36 \pm 0.06	146 \pm 5

*F1, F2 και F3 είναι οι τροφές 1, 2 και 3 αντίστοιχα

3.3.3 Μέταλλα στα φιλέτα των ψαριών και στα υποπροϊόντα

Οι συγκεντρώσεις των 11 μετάλλων μετρήθηκαν σε φιλέτα ψαριών (M) και σε υποπροϊόντα ψαριών (κόκκαλα/B, βράγχια/Gi, εντόσθια/Gu, κεφάλι/H, δέρμα/S, πτερύγια/T) όπως συνοψίζονται στο Διάγραμμα 3.2. Σύμφωνα με τη μέση συγκέντρωση του κάθε μετάλλου μετρημένη σε ξηρό βάρος (dry weight d.w.), η ακολουθία των επιπέδων των μετάλλων κατά φθίνουσα σειρά ήταν η ακόλουθη: Fe> Zn> Mn> Cu> As> Cr> Pb> Ni> Cd> V> Co. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει ότι μέταλλα όπως Fe, Zn και Mn χαρακτηρίζονται από συγκριτικά υψηλότερα επίπεδα, όπως επίσης παρατηρήθηκε και από τους Aydin-Önen και Öztürk (2017) (132). Από τις 6 κατηγορίες υποπροϊόντων ψαριών που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε στα εντόσθια να συσσωρεύονται As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, στα βράγχια Cd, Co, Fe, Mn, Zn, στα κόκκαλα As, Cr, στο δέρμα Cr, Ni και στα πτερύγια V. Στα κόκκαλα, προσδιορίστηκαν συγκριτικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων σε σχέση με τα υπόλοιπα υποπροϊόντα (Σχήμα 3.2).





Διάγραμμα 3.2. Παρουσίαση των συγκεντρώσεων των μετάλλων με boxplots για τα διάφορα υποπροϊόντα ψαριών και για τα φιλέτα (H: Κεφάλι, Gi: Βράγχια, Gu: Εντόσθια; T: Πτερύγια, B: Κόκκαλα, S: Δέρμα; M: Φιλέτο).

Οι μέσες συγκεντρώσεις του αρσενικού (As) στα φιλέτα των ψαριών και στα υποπροϊόντα που μελετήθηκαν βρέθηκαν να ακολουθούν τη φθίνουσα σειρά Φιλέτο> Κόκκαλα, Εντόσθια> Βράγχια, Δέρμα, Κεφάλι> Πτερύγια. Για το κάδμιο (Cd) Φιλέτο, Εντόσθια >> Βράγχια> Κεφάλι, Δέρμα, Κόκκαλα, Πτερύγια. Για το κοβάλτιο (Co): Εντόσθια> Βράγχια >> Φιλέτο> Δέρμα> Πτερύγια, Κεφάλι> Κόκκαλα. Για το χρώμιο (Cr) Δέρμα, Κόκκαλα> Εντόσθια> Φιλέτο, Κεφάλι> Βράγχια> Πτερύγια. Για το χαλκό (Cu) Εντόσθια >> Βράγχια, Φιλέτο> Δέρμα, Κόκκαλα> Κεφάλι> Πτερύγια. Για το σίδηρο (Fe) Βράγχια, Εντόσθια> Φιλέτο, Πτερύγια, Κεφάλι> Κόκκαλα, Δέρμα. Για το μαγγάνιο (Mn) Βράγχια >> Πτερύγια, Φιλέτο, Κόκκαλα, Δέρμα> Εντόσθια, Κεφάλι. Για το νικέλιο (Ni) Φιλέτο> Εντόσθια, Δέρμα> Κεφάλι, Πτερύγια, Βράγχια, Κόκκαλα. Για τον μόλυβδο (Pb) Φιλέτο >> Εντόσθια, Βράγχια> Πτερύγια, Κεφάλι, Κόκκαλα, Δέρμα. Για το βανάδιο (V) Φιλέτο, Πτερύγια> Βράγχια, Εντόσθια, Κεφάλι> Δέρμα, Κόκκαλα. Και για το ψευδάργυρο (Zn) Βράγχια, Εντόσθια >> Φιλέτο, Κεφάλι, Πτερύγια, Δέρμα> Κόκκαλα (Σχήμα 3.2). Τόσο οι κύριες οδοί πρόσληψης μετάλλων όσο και οι ιστοί - στόχοι των αντίστοιχων μετάλλων, ρυθμίζονται από τη συγκέντρωση του ρυπογόνου παράγοντα καθώς και από την ηλικία, το μέγεθος, τη φυσιολογία, το περιβάλλον, τη διατροφή και τον ρυθμό ανάπτυξης του ζωντανού οργανισμού (133). Η απορρόφηση και η προσρόφηση μέσω ενεργών και παθητικών ανταλλαγών μεταξύ ψαριών και νερού αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς πρόσληψης μετάλλων από τα βράγχια ψαριών (134). Αν και το φιλέτο των ψαριών εμφανίζει σχετικά χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα (135, 136), μπορεί να υπάρξει συσσώρευση μετάλλων λόγω μακροχρόνιας έκθεσης και μεταφοράς, από άλλους ιστούς (131). Παρομοίως, τα συσσωρευμένα μέταλλα

στα εντόσθια ενδέχεται να περιέχουν χωνευμένο ή / και άπεπτο υλικό που σχετίζεται με τροφιογενείς ρυπογόνες ουσίες (113). Σύμφωνα με αυτά, δεδομένου ότι προσδιορίστηκαν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις Mn στα βράγγια ψαριών, φαίνεται ότι το θαλασσινό νερό μπορεί να αποτελεί σημαντική πηγή πρόσληψης για τα ψάρια που εξετάστηκαν. Θεωρώντας τη διατροφή ως σημαντικό παράγοντα μακροχρόνιας έκθεσης σε μέταλλα, είναι πιθανό ότι, σύμφωνα με τις μέσες συγκεντρώσεις μετάλλων στο φιλέτο και στα εντόσθια των ψαριών, η διατροφή αποτελεί σημαντική πηγή As και Ni. Επιπλέον, η διατροφή και το θαλασσινό νερό αντιπροσωπεύουν σημαντικές πηγές Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V και Zn. Παρά το γεγονός ότι η σίτιση φαίνεται να αποτελεί σημαντική οδό πρόσληψης για το Cr, δεδομένου ότι σημαντικές συγκεντρώσεις καθορίστηκαν στα εντόσθια και στα φιλέτα, το Cr φαίνεται να διαφοροποιείται σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέταλλα που εξετάστηκαν, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του να χαρακτηρίζουν τα κόκκαλα και το δέρμα. Τα κόκκαλα θεωρούνται ως ένας σημαντικός χώρος αποθήκευσης μετάλλων (137). Οι Outridge και Scheuhammer (1993) ανέφεραν ότι ο οστικός ιστός συσσωρεύει συχνά υψηλότερες συγκεντρώσεις από άλλους ιστούς σε ζώα που παρουσιάζουν χρόνια έκθεση σε Cr (138). Ομοίως, σχετικά αυξημένες συγκεντρώσεις As προσδιορίστηκαν στα κόκκαλα. Οι Tokar et al. αναφέρουν ότι το As μπορεί να εναποτεθεί στα κόκκαλα, κυρίως σε περιπτώσεις χρόνιας έκθεσης (139).

3.3.4 Συσχέτιση μεταξύ των ειδών ψαριών και διαφορετικών μεγεθών ψαριών

Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται η μέση τιμή των συγκεντρώσεων των διαφόρων μετάλλων, όπως αυτά μετρήθηκαν στα δείγματα φιλέτου και υποπροϊόντων σε δύο είδη ψαριών, κρυνιό και τσιπούρα, δύο διαφορετικών ηλικιών. Μεταξύ των δύο ειδών παρατηρήθηκαν διαφορές για τις συγκεντρώσεις του As ($p < 0.05$), V ($p < 0.05$) και Mn ($p < 0.05$). Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μεγάλων και μικρών ψαριών. Ακόμα, παρατηρήθηκαν διαφορές, μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών υποπροϊόντων καθώς και των διαφορετικών φιλέτων ψαριών για τα μέταλλα Cr, Co, Cu, As, Cd και Pb, ($p < 0.05$). Σε πρόσφατη μελέτη των Zhab et al. όπου εξετάστηκαν τσιπούρες μικρού και μεγάλου μεγέθους, βρέθηκε να υπάρχει μια αρνητική σχέση μεταξύ μεγέθους και συγκέντρωσης μετάλλων (140). Έτσι οι τσιπούρες μεγαλύτερου μεγέθους (και ηλικίας), εμφάνισαν μικρότερα επίπεδα σε As, Se, and Zn.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που παίζουν ρόλο στη βιοσυσσώρευση μετάλλων στους θαλάσσιους οργανισμούς είναι η μεταβολική τους δραστηριότητα (141). Η μεταβολική δραστηριότητα των νεότερων οργανισμών είναι συνήθως υψηλότερη από αυτή των ηλικιωμένων το οποίο έχει ως αποτέλεσμα, η βιοσυσσώρευση μετάλλων να είναι υψηλότερη στα νεότερα άτομα από ό,τι στα μεγαλύτερα (142-144). Αναφέρθηκε επίσης ότι η συσσωρευση μετάλλων θα μπορούσε να φτάσει σε σταθερή κατάσταση μετά από μια ορισμένη ηλικία (145). Στη δική μας μελέτη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ειδών. Ενδεχομένως με

διαφοροποιημένο μεθοδολογικό σχεδιασμό θα μπορούσαν να αναδειχθούν πιθανές διαφορές.

Πίνακας 3.4. Συγκεντρώσεις μετάλλων σε φιλέτα και υποπροϊόντα από δύο είδη ψαριών, κρانيού και τσιπούρας, δύο διαφορετικών ηλικιών (1+ και 0+).

Δείγματα	V (ng g ⁻¹)	Cr (μg g ⁻¹)	Mn (μg g ⁻¹)	Fe (μg g ⁻¹)	Co (ng g ⁻¹)	Ni (μg g ⁻¹)	Cu (μg g ⁻¹)	Zn (μg g ⁻¹)	As (μg g ⁻¹)	Cd (ng g ⁻¹)	Pb (μg g ⁻¹)
Κεφάλι BM*	29.6	0.447	0.647	5.36	<0.500	0.189	<0.005	5.31	1.01	4.99	0.052
Κεφάλι SM*	31.9	9.27	43.2	35.0	28.4	0.259	0.642	28.8	1.12	15.3	0.400
Κεφάλι BB*	59.1	0.395	2.13	12.9	<0.500	0.072	0.025	12.0	2.52	10.0	0.126
Κεφάλι SB*	26.0	0.612	1.53	15.0	2.06	0.093	0.071	6.95	2.16	10.7	0.075
Βράγχια BM	19.8	0.097	11.2	36.0	13.9	0.053	0.752	13.1	0.876	17.0	0.146
Βράγχια SM	35.6	1.70	35.9	64.1	37.9	0.290	1.65	44.5	1.20	25.2	0.447
Βράγχια BB	39.8	0.114	2.65	11.3	2.92	0.037	0.275	9.81	2.43	4.18	0.069
Βράγχια SB	87.1	0.628	22.4	143	32.1	0.162	1.13	48.2	2.33	39.0	0.441
Εντόσθια BM	39.8	1.01	3.74	83.7	224	0.293	37.8	50.6	1.27	320	0.578
Εντόσθια SM	19.7	0.420	3.50	23.8	53.8	0.121	29.1	30.5	1.80	126	0.330
Εντόσθια BB	32.5	0.935	1.74	17.9	62.9	0.469	1.90	22.9	2.27	140	0.141
Εντόσθια SB	61.8	1.04	2.21	50.1	51.6	0.169	3.40	26.6	2.63	210	0.432
Πτερύγια BM	26.3	<0.002	15.4	14.9	9.34	0.122	0.017	11.8	0.362	2.69	0.108
Πτερύγια SM	32.5	<0.002	10.3	15.6	2.54	0.253	0.017	3.38	0.594	<2.50	0.106
Πτερύγια BB	103	<0.002	5.12	22.7	1.86	0.130	0.012	14.8	0.695	4.22	0.106
Πτερύγια SB	71.3	0.037	2.07	12.8	3.11	0.061	0.017	5.88	0.768	2.54	0.031
Κόκκαλα BM	<3.75	1.81	7.13	5.56	<0.500	0.164	2.12	2.49	1.38	3.43	0.099
Κόκκαλα SM	64.7	1.72	24.6	30.4	18.9	0.249	0.502	21.6	2.12	8.34	0.168
Κόκκαλα BB	21.1	0.280	2.54	9.63	<0.500	<0.002	0.208	7.06	2.30	20.1	0.089
Κόκκαλα SB	16.9	1.18	0.901	3.27	1.62	0.051	0.042	0.605	2.20	<2.50	0.027
Δέρμα BM	18.6	2.80	1.56	6.76	<0.500	0.144	0.059	1.37	0.441	8.27	0.026
Δέρμα SM	10.4	0.806	6.95	1.74	6.68	0.167	0.629	8.75	0.881	6.70	0.087
Δέρμα BB	25.1	2.21	0.246	0.97	5.44	0.356	0.384	7.14	2.53	5.46	0.046
Δέρμα SB	75.6	0.524	11.8	31.7	10.3	0.269	0.614	20.5	2.81	20.1	0.128
Φιλέτο BM	<3.75	1.17	4.02	27.4	21.3	0.461	2.03	18.9	2.37	332	3.18
Φιλέτο SM	69.4	0.836	5.85	15.2	8.36	0.279	0.896	8.59	2.59	208	1.02
Φιλέτο BB	66.6	0.183	3.63	10.6	11.0	0.168	0.931	6.43	6.27	135	0.763
Φιλέτο SB	174	0.462	7.78	23.7	10.2	0.401	0.882	10.6	6.04	174	1.03

*BM και SM αναφέρεται στο 1+ Κρانيό (Big Meagre) 0+ Κρانيό (Small Meagre), αντίστοιχα. Το BB και SB αναφέρεται στη 1+ τσιπούρα (Big Sea Bream) και 0+ Τσιπούρα (Small Sea Bream), αντίστοιχα.

**V, Co και Cd σε ng g⁻¹

3.3.5 Νομοθεσία

Πολλοί εθνικοί φορείς έχουν ορίσει μέγιστα επιτρεπόμενα επίπεδα για τα διάφορα μέταλλα. Συγκεκριμένα για As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb και Zn τα όρια είναι ίσα με 13.5, 0.05, 4, 20, 80, 0.3 και 50 mg kg⁻¹ αντίστοιχα, μετρημένα επί νωπού δείγματος (146-148). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις για τα μέταλλα Fe, Co, Mn και V δεν έχουν προσδιοριστεί με νομοθετικά όρια. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.5, η συγκέντρωση αρσενικού στους διαφορετικούς ιστούς της παρούσας μελέτης ήταν μικρότερη από τα αντίστοιχα νομοθετικά όρια. Ωστόσο, η συγκέντρωση καδμίου σε ορισμένα δείγματα ιστού ψαριών δεν ήταν σύμφωνη με τα όρια της ΕΕ. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του Cd των εντόσθιων και του φιλέτων τόσο για τον κρανιό όσο και για την τσιπούρα, ήταν υψηλότερη από το αντίστοιχο όριο ρύθμισης για το κάδμιο. Η κυβέρνηση του Χονγκ Κονγκ έχει εκδώσει μέγιστα επίπεδα ρύθμισης για τη συγκέντρωση χρωμίου. Όλοι οι ιστοί ψαριών ήταν πολύ κάτω από αυτά τα όρια (149). Το ίδιο ίσχυε για τις συγκεντρώσεις κοβαλτίου, χαλκού και νικελίου για τα αντίστοιχα όρια ρύθμισης που αναφέρονται από FAO, MAFF και IELC (147-149). Τα φιλέτα τόσο από τσιπούρες όσο και από κρανιούς, είχαν υψηλότερη συγκέντρωση μολύβδου και ψευδαργύρου από τα όρια ρύθμισης EU και MAFF (147, 150) και επομένως μπορεί να είναι δυνητικά τοξικά για την ανθρώπινη κατανάλωση. Ωστόσο, τα υποπροϊόντα από βράγχια, εντόσθια και δέρμα όλων των ειδών που μελετήθηκαν πληρούσαν τα αντίστοιχα όρια.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει επίσης ορίσει μέγιστα επίπεδα για συγκεκριμένα βαρέα μέταλλα στις ιχθυοτροφές. Στην περίπτωση των

ιχθυοτροφών, τα μέγιστα επίπεδα για As, Cd, F, Pb και Hg είναι ίσο με 10, 2, 150, 5 και 0.2 ppm, αντίστοιχα (127-129). Τα επίπεδα μετάλλων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη όχι μόνο πληρούσαν τα όρια ρύθμισης αλλά ήταν σημαντικά χαμηλότερα.

Στο πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Οδηγίας για τη Θαλάσσια Στρατηγική (Marine Strategy Directive) προβλέπονται μεταξύ άλλων και όρια συγκεντρώσεων ρύπων για τον ορισμό της Καλής Περιβαλλοντικής Κατάστασης (Good Environmental Status) των θαλάσσιων περιοχών. Συγκεκριμένα, τα όρια αυτά για τη συγκέντρωση των μετάλλων στα νερά, αφορούν τη συγκέντρωση Cu, Zn, Cd, και Pb ως 10, 100, 1 και 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ αντίστοιχα. Οι μετρήσεις στην παρούσα μελέτη για τη περίπτωση των μετάλλων στο θαλασσινό νερό ήταν μικρότερες από τα αντίστοιχα όρια της ΚΠΚ, υποδηλώνοντας απουσία ρύπανσης.

Πίνακας 3.5. Συγκεντρώσεις μετάλλων (σε mg kg^{-1}) σε διάφορους ιστούς από τσιπούρα και κρانيό όπως έχουν δημοσιευθεί στην αντίστοιχη βιβλιογραφία.

Είδη Ψαριών	Ιστός	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	V	Zn
<i>Sparus aurata</i> ^a	w.w. Φιλέτο		0.2							0.19		
<i>Sparus aurata</i> ^b	w.w. Φιλέτο	2.739	0.004		0.014	0.497	2.475	0.247		0.013	0.001	4.345
<i>Sparus aurata</i> ^c	w.w. Φιλέτο	1.06	n.d.	0	0.06	n.d.	5.49		n.d.	n.d.	0.02	6.38
<i>Sparus aurata</i> ^c	w.w. Βράγχια	0.50	0.00	0.05	0.08	n.d.	56.7		0.32	0.05	0.10	20.52
<i>Sparus aurata</i> ^c	w.w. Κόκαλα	0.92	n.d.	0.13	0.06	n.d.	14.47		0.78	n.d.	0.09	23.87
<i>Sparus aurata</i> ^c	w.w. Εντόσθια	1.38	0.08	0.030	0.21	3.73	45.51		0.14	0.03	0.08	29.03
<i>Sparus aurata</i> ^d	d.w. Φιλέτο				0.13	0.36						2.12
<i>Sparus aurata</i> ^d	d.w. Βράγχια				0.25	0.64						23.97
<i>Sparus aurata</i> ^e	d.w. Φιλέτο	4.9				1.3	10.3	0.5				15.9
<i>Sparus aurata</i> ^f	w.w. Φιλέτο		0.003							0.101		
<i>Sparus aurata</i> ^g	w.w. Φιλέτο	1.83	<0.01		<0.01	0.119			0.036	<0.02	<0.002	
<i>Sparus aurata</i> ^h	w.w. Φιλέτο						225	6.44				1.081
<i>Sparus aurata</i> ⁱ	w.w. Φιλέτο				0.31	0.71	4.8	0.14	0.04			4.9
<i>Sparus aurata</i> ^j	w.w. Φιλέτο		0.001			0.59	3.09	0.18	0.027	0.007		8.11
<i>Sparus aurata</i> ^k	w.w. Φιλέτο					0.85						18.13
<i>Sparus aurata</i> ^k	w.w. Βράγχια					1.26						23.72
<i>Sparus aurata</i> ^l	w.w. Βράγχια		0.29			2.35						
<i>Sparus aurata</i> ^l	w.w. Φιλέτο	3.8	0.004	0.008	0.24	0.99	9.4	0.45	nd	0.02	nd	12.7
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^l	w.w. Φιλέτο	14.9	0.005	0.023	0.25	1.38	16.8	0.31	0.1	0.05	0.01	16

Είδη Ψαριών	Ιστός	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	V	Zn	
<i>Sparus aurata</i> ^u	d.w.	Φιλέτο		0.001			61.04	241.11				24.53	
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^v	w.w.	Φιλέτο		0.073						nd			
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^w	w.w.	Φιλέτο	0.273		0.018	0.349	4.087	0.433	0.079				
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^x	w.w.	Δέρμα		2.044		1.534	19.583	63.194	3.946		3.052	133.38	
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^x	w.w.	Φιλέτο		1.255		0.573	6.237	17.310	2.006		3.830	14.349	
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^x	w.w.	Βράγχια		0.188		3.920	8.264	33.349	20.433		2.428	141.807	
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^x	w.w.	Εντόσθια		0.433		0.456	16.905	124.743	12.728		2.032	38.165	
<i>Sparus aurata</i> (wild) ^y	w.w.	Βράγχια	1.92			1.21	4.99		0.37		3.21	12.44	
<i>Sparus aurata</i> ^z	d.w.	Βράγχια					1.5					27.9	
<i>Sparus aurata</i> ^z	d.w.	Εντόσθια					2.8					19.5	
<i>Sparus aurata</i> ^p	w.w.	Φιλέτο	2.54	0.06	0.004	0.13	0.37	7.08	2.36	0.12	0.37	0.05	3.52
<i>Sparus aurata</i> ^p	w.w.	Βράγχια	0.84	0.01	0.01	0.13	0.25	27.18	4.41	0.04	0.09	0.02	10.22
<i>Sparus aurata</i> ^p	w.w.	Εντόσθια	0.93	0.07	0.02	0.37	1.00	12.88	0.75	0.12	0.11	0.02	9.38
<i>Sparus aurata</i> ^p	w.w.	Κόκκαλα	0.81	0.004	0.000	0.26	0.05	2.33	0.62	0.01	0.02	0.01	1.38
<i>Sparus aurata</i> ^p	w.w.	Δέρμα	1.15	0.01	0.003	0.59	0.21	7.01	2.58	0.13	0.04	0.02	5.93
<i>Sparus aurata</i> ^p	d.w.	Φιλέτο	6.16	0.15	0.01	0.32	0.91	17.15	5.71	0.28	0.90	0.12	8.52
<i>Sparus aurata</i> ^p	d.w.	Βράγχια	2.38	0.02	0.02	0.37	0.70	77.15	12.53	0.10	0.26	0.06	29.01
<i>Sparus aurata</i> ^p	d.w.	Εντόσθια	2.45	0.18	0.06	0.99	2.65	34.00	1.98	0.32	0.29	0.05	24.75
<i>Sparus aurata</i> ^p	d.w.	Κόκκαλα	2.25	0.01	0.001	0.73	0.13	6.45	1.72	0.03	0.06	0.02	3.83
<i>Sparus aurata</i> ^p	d.w.	Δέρμα	2.67	0.01	0.01	1.37	0.50	16.34	6.02	0.31	0.09	0.05	13.82
<i>Argyrosomus regius</i> ^k	d.w.	Φιλέτο		0.03		0.81	1.0	9		0.25	<0.03		15
<i>Argyrosomus regius</i> ^l	w.w.	Φιλέτο	0.54	0.003			0.19	5.83	0.09	n.d.	0.009		5.32
<i>Argyrosomus regius</i> ^q	w.w.	Φιλέτο	0.240	0.001		0.011	0.29		0.16		0.004	n.d.	4.5
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	w.w.	Φιλέτο	1.03	0.11	0.01	0.42	0.61	8.85	2.05	0.15	0.87	0.03	5.71
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	w.w.	Βράγχια	0.30	0.01	0.01	0.26	0.34	14.37	6.76	0.05	0.09	0.01	8.27
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	w.w.	Εντόσθια	0.52	0.08	0.05	0.24	11.34	18.22	1.23	0.07	0.15	0.01	13.75
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	w.w.	Κόκκαλα	0.84	0.00	0.00	0.85	0.63	8.64	7.63	0.10	0.06	0.02	5.79
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	w.w.	Δέρμα	0.25	0.00	0.00	0.69	0.13	1.62	1.62	0.06	0.02	0.01	1.93
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	d.w.	Φιλέτο	2.48	0.27	0.01	1.00	1.46	21.30	4.94	0.37	2.10	0.06	13.75
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	d.w.	Βράγχια	1.04	0.02	0.03	0.90	1.20	50.05	23.55	0.17	0.30	0.03	28.80
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	d.w.	Εντόσθια	1.54	0.22	0.14	0.72	33.45	53.75	3.62	0.21	0.45	0.03	40.55
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	d.w.	Κόκκαλα	1.75	0.01	0.01	1.77	1.31	17.98	15.87	0.21	0.13	0.03	12.05
<i>Argyrosomus regius</i> ^p	d.w.	Δέρμα	0.66	0.01	0.003	1.80	0.34	4.25	4.26	0.16	0.06	0.01	5.06
Νομοθετικά όρια	w.w.		3.5 (149)	0.05 (150)	10 (149)	1 ⁽¹⁴⁹⁾	20 ⁽¹⁴⁷⁾			80.0 (148)	0.3 (150)	50 ⁽¹⁴⁷⁾	

^aMilenkovic et al. (151); ^bMarengo et al (152); ^cKalantzi et al. (113); ^dCastritsi et al. (153); ^eMinganti et al. (154); ^fRenieri et al. (155); ^gIamiceli et al. (156); ^hErkan et al. (157); ⁱLourenco et al. (158); ^jRubio et al. (159); ^kCarvalho et al. (160); ^lCosta et al. (161); ^pPresent study; ^qAmmoussou et al. (75); ^rCirillo et al. (162); ^sGhedira et al. (163); ^tZvab et al (140); ^uPerez et al (164); ^vNaccari et al. (165); ^wGungor et al (166); ^xDural et al.(167); ^yBeg et al. (168); ^zMinghetti et al. (169); ¹FAO 1983; ²EC 2006; ³MAFF 2000; ⁴IEIC 2002

**w.w. (wet weight) επί νωπού βάρους, d.w. (dry weight) επί ξηρού βάρους

3.3.6 Συγκριτική μελέτη με την υπάρχουσα βιβλιογραφία

Όπως συνοψίζεται στον Πίνακα 3.5 οι συγκεντρώσεις των μετάλλων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μελετών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για την τσιπούρα γενικά βρίσκονται εντός του εύρους που αναφέρεται σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες σε φιλέτα ψαριών (113, 151-158) και για τα βράγχια και εντόσθια (169).

Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στα φιλέτα, τα βράγχια, τα εντόσθια και τα κόκκαλα της τσιπούρας ήταν παρόμοιες με αυτές που μετρήθηκαν στη μελέτη των των Kalantzi et al.(113) (Πίνακας 3.5). Οι μελέτες των Zvab et al., Perez et al. και Rubio et al. παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές αποτελέσματα παρόμοια με τις συγκεντρώσεις μετάλλων που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, ωστόσο αυτό εξαρτάται από το είδος του μετάλλου (140). Οι άγριες τσιπούρες που εκτρέφονται στην Αδριατική Θάλασσα (167), στη Θάλασσα του Μαρμαρά (166), στη θαλάσσια περιοχή του Κουβέιτ (168) και στην ακτή της Σικελίας (165) παρουσίασαν υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων μετάλλων σε σύγκριση με τα ψάρια υδατοκαλλιέργειας. Στη μελέτη των Minganti et al. όπου συγκρίθηκε η περιεκτικότητα μετάλλων άγριας τσιπούρας και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη τσιπούρας υδατοκαλλιέργειας, αναφέρθηκαν υψηλότερα επίπεδα As στην άγρια (154). Τα δεδομένα σχετικά με τις συγκεντρώσεις των μετάλλων ήταν ιδιαίτερα περιορισμένα για τους Κρανιούς, για τους οποίους δεν βρέθηκαν μελέτες που να αξιολογούν τις συγκεντρώσεις των μετάλλων στους διάφορους ιστούς. Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων σε φιλέτα κρανιών που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη

βρέθηκαν υψηλότερες σε σχέση με εκείνες που ανέφεραν οι Costa et al. και Amoussou et al (75, 80). Ωστόσο βρέθηκαν να είναι στο ίδιο εύρος με τα αποτελέσματα που παρουσίασαν οι Carvalho et al. εξαιρουμένων των επιπέδων Fe και Pb (160). Στη βιβλιογραφία δεν βρέθηκαν δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με τις συγκεντρώσεις μετάλλων για βράγχια, δέρμα, κόκκαλα ή εντόσθια κρανίων.

3.4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν οι διαφορετικοί ιστοί από τσιπούρες και κρανιούς, τα οποία αποτελούν δύο από τα πιο δημοφιλή ήδη εκτρεφόμενων ψαριών στην Μεσόγειο. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν δεδομένα για τα επίπεδα μετάλλων σε τσιπούρες αλλά για τη περίπτωση των κρανίων τα δεδομένα είναι περιορισμένα. Ειδικότερα, από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν βρέθηκαν αντίστοιχες μελέτες που να αξιολογούν τα επίπεδα μετάλλων σε 6 διαφορετικούς τύπους ιστού ψαριών και ειδικότερα τσιπούρας και κρανιού. Από τις αναλύσεις των δειγμάτων φάνηκε ότι τα φιλέτα παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε μέταλλα έναντι άλλων ιστών των ψαριών. Όλα τα υποπροϊόντα των ψαριών, με εξαίρεση τη συγκέντρωση καδμίου στα εντόσθια, πληρούσαν τα αντίστοιχα νομοθετικά όρια της ΕΕ για τη συγκέντρωση μετάλλων καθιστώντας τα ασφαλή για κατανάλωση.

Η αντίστοιχη δημοσίευση έχει υποβληθεί προς δημοσίευση σε έγκριτο επιστημονικό περιοδικό.

Κεφάλαιο 4. Βιοδραστικότητα υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας

4.1 Εισαγωγή

Πέρα από την αναγνώριση των ψαριών και θαλασσινών ως σημαντικές πηγές θρεπτικών συστατικών, πρόσφατα έχει αναπτυχθεί στην ερευνητική κοινότητα μεγάλο ενδιαφέρον και ως προς τις φυσικές βιοδραστικές ενώσεις που αυτά περιέχουν. Ως βιοδραστικές ενώσεις τροφίμων ορίζονται τα συστατικά των τροφίμων που επηρεάζουν τις φυσιολογικές ή κυτταρικές δραστηριότητες των ζώων ή των ανθρώπων που τα καταναλώνουν (170). Στην περίπτωση των ψαριών και θαλασσινών, η βιοδραστικότητα που παρουσιάζουν έχει φανεί πως οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη βιοδραστικών πεπτιδίων.

Τα βιοδραστικά πεπτιδία είναι αλληλουχίες μήκους μεταξύ 2-30 αμινοξέων που επιδρούν θετικά στην υγεία, κατά την κατανάλωσή τους, καθώς έχει φανεί πως εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντιυπερτασική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση (171-173). Τα πεπτιδία αυτά είναι ανενεργά στην αλληλουχία των γονικών πρωτεϊνών και μπορεί να γίνουν δραστικά μετά από υδρόλυση ή πέψη (174). Λόγω των πλεονεκτημάτων της, η ενζυματική υδρόλυση έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην εκχύλιση και απομόνωση βιοδραστικών πεπτιδίων από υποπροϊόντα ψαριών. Η ποιότητα και οι ιδιότητες των πεπτιδίων που απελευθερώνονται μετά την ενζυματική

υδρόλυση εξαρτώνται από τον τύπο των πρωτεασών και των πειραματικών συνθηκών κατά την διάρκεια της υδρόλυσης (175).

Μετά την πέψη και την απορρόφηση από το πεπτικό σύστημα και το λεπτό έντερο, τα βιοδραστικά πεπτίδια εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και φτάνουν στο σημείο-στόχο, για να ασκήσουν τη βιοδραστικότητά τους (176). Για το λόγο αυτό, τα βιοδραστικά πεπτίδια κερδίζουν όλο και μεγαλύτερη προσοχή ως εναλλακτικό φάρμακο για θεραπείες καρκίνου. Οι φαρμακευτικές θεραπείες με πεπτίδια είναι γνωστές λόγω της ισχυρής ειδικότητάς τους, της ικανότητας διείσδυσης σε καρκινικούς όγκους και του χαμηλού προφίλ τοξικότητας που εμφανίζουν (177). Μελέτες έχουν αναφέρει την απομόνωση και ταυτοποίηση πεπτιδίων με αντικαρκινογόνο δράση από γάλα (178, 179) και από θαλάσσια είδη (51). Πρόσφατες αναφορές δείχνουν επίσης ότι τα υποπροϊόντα ψαριών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολύτιμες πηγές αντικαρκινογόνων πεπτιδίων (180). Λόγω της βιοποικιλότητας του θαλάσσιου περιβάλλοντος ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα και διερεύνηση αντικαρκινικών πεπτιδίων που απομονώνονται από υποπροϊόντα διαφόρων ειδών ψαριών.

Παράλληλα, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα πεπτίδια που σχετίζονται με τους μηχανισμούς απορρόφησης του σιδήρου. Ο σίδηρος είναι ζωτικής σημασίας για τον οργανισμό, καθώς συντελεί σε μια σειρά από τις λειτουργίες του. Η κυριότερη όλων είναι η οξυγόνωση των ιστών από τους πνεύμονες από την αιμοσφαιρίνη των ερυθρών κυττάρων. Στην περίπτωση, επομένως, που απαντάται έλλειψη σιδήρου ο οργανισμός αδυνατεί να επιτελέσει τις λειτουργίες, στις οποίες εμπλέκεται ο σίδηρος. Εντούτοις, οι

ανάγκες του οργανισμού σε σίδηρο ποικίλλουν ανάλογα με τη φάση του κύκλου ζωής στην οποία βρίσκεται το εκάστοτε άτομο. Ο οργανισμός είναι δε, σε θέση να διατηρεί την ομοιόσταση του σιδήρου μέσω του μηχανισμού απορρόφησης αυτού (181).

Η απορρόφηση του σιδήρου από τις διάφορες πηγές τροφίμων εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητά του. Ως βιοδιαθεσιμότητα στην περίπτωση του σιδήρου, ορίζεται, το χρήσιμο ποσοστό του σιδήρου το οποίο απορροφάται από τον οργανισμό. Ο διατροφικός σίδηρος που ενυπάρχει στα τρόφιμα συναντάται σε δύο μορφές, τον αιμικό και το μη-αιμικό (ολικός διαλυτός). Οι δύο αυτές μορφές σιδήρου μεταβολίζονται διαφορετικά από τον αυλό του εντέρου. Ο αιμικός σίδηρος προέρχεται από την αιμοσφαιρίνη και τη μυογλοβίνη και βρίσκεται σε τρόφιμα ζωικής προελεύσεως όπως το κρέας, το ψάρι και τα πουλερικά. Από την άλλη, ο μη-αιμικός σίδηρος αποτελεί το 90% του προσλαμβανόμενου σιδήρου και περιέχεται σε τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης με τη μορφή τρισθενούς σιδήρου και σιδηρούχων αλάτων (181). Το κλάσμα του σιδήρου που απορροφάται μέσω της διατροφικής πρόσληψης είναι συνήθως χαμηλό, και κυμαίνεται από 5% έως 35% ανάλογα με τις συνθήκες και τον τύπο του σιδήρου (182). Ειδικότερα, ο αιμικός σίδηρος είναι εξαιρετικά βιοδιαθέσιμος σε ποσοστό 15%-35% και οι διατροφικοί παράγοντες έχουν μικρή επίδραση στην απορρόφηση του, ενώ η απορρόφηση του μη-αιμικού σιδήρου είναι πολύ χαμηλότερη (2%-20%) και επηρεάζεται έντονα από την παρουσία άλλων συστατικών τροφίμων (183). Σε μια διαίτα, ωστόσο, υπερτερεί ο μη-αιμικός σίδηρος (181).

Από μελέτες, έχει προκύψει πως βιοδραστικά πεπτιδία, τόσο γάλακτος (184-186) όσο και κρέατος (187, 188), είναι πιθανό να επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου. Κατά αντιστοιχία, ερευνάται η ύπαρξη βιοδραστικών πεπτιδίων στα υποπροϊόντα ψαριών (189). Με βάση τα παραπάνω ευρήματα αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω η δράση των υποπροϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας στη βιοδιαθεσιμότητα του πρόσθετου σιδήρου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η *in vitro* διερεύνηση της βιοδραστικότητας των υποπροϊόντων ψαριών και η δράση που εμφανίζουν ως προς την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και ως προς την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου.

4.2 Μεθοδολογία

4.2.1 Συλλογή αρχικών δειγμάτων

Τα δείγματα των υποπροϊόντων ψαριών, αποτελούνταν από κεφάλι, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα και δέρμα, τα οποία προήλθαν από κρανιό και τσιπούρα ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας. Τα ψάρια συλλέχθηκαν από τις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ στη Σούδα της Κρήτης και επεξεργάστηκαν στα εργαστήρια του ΕΛΚΕΘΕ σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1 «Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων» της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Το δείγμα για τις αναλύσεις διερεύνησης αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων προήλθε από 6 κρανιούς ($1256.45 \pm 232.32\text{g}$) και 16 τσιπούρες ($403.47 \pm 72.92\text{g}$) από κεφάλι,

βράγχια, πτερύγια, κόκκαλα και δέρμα. Για τις αντίστοιχες αναλύσεις διερεύνησης της δράσης στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, το δείγμα που εξετάστηκε αποτελούνταν από 36 ψάρια κρασιού (6 μέσου σωματικού βάρους 1256.45 ± 232.32 g και 30 μέσου σωματικού βάρους 235.76 ± 38.45 g) και 60 ψάρια τσιπούρας (16 μέσου σωματικού βάρους 403.47 ± 72.92 g και 44 μέσου σωματικού βάρους 160.16 ± 30.79 g) για τα υποπροϊόντα από κεφάλι, βράγχια, εντόσθια, πτερύγια, κόκκαλα και δέρμα καθώς και από το φιλέτο των αντίστοιχων ψαριών.

4.2.2 Διερεύνηση αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας

4.2.2.1 Παρασκευή πρωτεϊνικών υδρολυμάτων υποπροϊόντων ψαριών

Τα λυοφιλωμένα δείγματα (2 g) αναμείχθηκαν με νερό (1:6 w/v) και το pH ρυθμίστηκε στο 10.8 με διάλυμα 1M NaOH, για τη διαλυτοποίηση μυοϊνώδων και σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν από τα λιπίδια, τις μεμβράνες, το δέρμα και τα κόκκαλα με φυγοκέντρηση (3000xg, 10 λεπτά). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης ελήφθησαν δύο φάσεις: μία στερεή φάση που περιείχε μεμβράνες, δέρμα και κόκκαλα (ίζημα) και μια διαλυτή φάση που περιείχε διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες. Η διαλυτή φάση συλλέχθηκε προσεκτικά και το pH ρυθμίστηκε σε 5.6 με διάλυμα HCl 1 M, για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες, οι οποίες και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (3000 x g, 10 λεπτά). Το ίζημα διαλύθηκε εκ

νέου σε δύο μέρη νερού (pH 7.5) και υδρολύθηκε στους 55-57°C για 106 λεπτά με την προσθήκη των ενζύμων Protamex 98 g / 1000 kg και Alcalase 20 mL / 1000 kg. Τα ένζυμα αδρανοποιήθηκαν στη συνέχεια με θέρμανση του εναιωρήματος που προέκυψε, στους 90°C για 10 λεπτά. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (3000xg, 10 λεπτά) για να καθιζάνουν οι αδρανοποιημένες πρωτεάσες και οι μη υδρολυμένες πρωτεΐνες ψαριών. Το υπερκείμενο πρωτεϊνικό υδρόλυμα υποπροϊόντων (fish protein hydrolysate FPH), που περιείχε τα διαλυτά πεπτίδια, συλλέχθηκε και ξηράνθηκε με λυοφιλίωση για 24 ώρες.

4.2.2.2 Κυτταρική καλλιέργεια

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού MCF7A, ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου COLO320 και ανθρώπινες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές MCF10A επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Το κυτταρικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε στα MCF7A ήταν το DMEM-Ham's F12 (1:1 v/v, Gibco), συμπληρωμένο με 10% αδρανοποιημένου με θερμότητα (56 °C, 30min) εμβρυϊκού ορού μόσχου (Fetal Bovine Serum-FBS) στον οποίο προστέθηκαν πενικιλίνη 100 U mL⁻¹ και στρεπτομυκίνη 100 mg mL⁻¹. Για την ανάπτυξη των COLO320 χρησιμοποιήθηκε το RPMI 1640 κυτταρικό μέσο, εμπλουτισμένο με 10% αδρανοποιημένου με θερμότητα (56 °C, 30min) εμβρυϊκού ορού μόσχου, πενικιλίνη 100 U ml⁻¹ και στρεπτομυκίνη 100 mg mL⁻¹. Τέλος, για την κυτταρική σειρά MCF10A χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό μέσο σύμφωνα με το kit: MEGM (Lonza, Lonza/Clonetics Corporation, US). Όλες οι κυτταρικές

σειρές αναπτύχθηκαν στους 37 °C σε ατμόσφαιρα σύστασης 5% αέρα - 95% CO₂.

4.2.2.3 Αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα

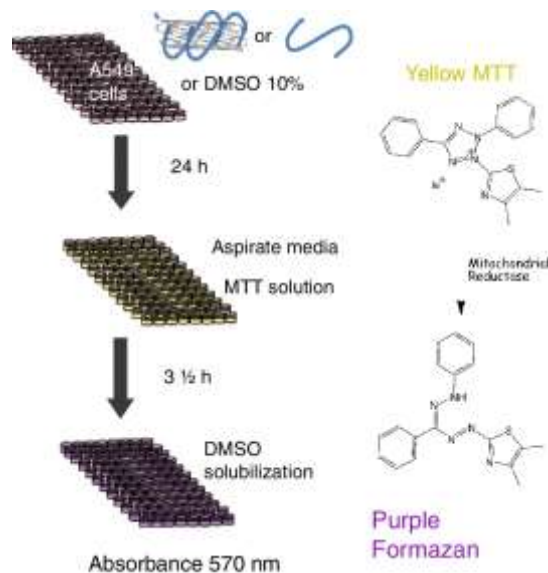
Για την διερεύνηση της αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε πρωτεϊνικού υδρολύματος υποπροϊόντων ψαριών (0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg mL⁻¹). Για να αποφευχθεί η μεταβολή του pH του μέσου κυτταροκαλλιέργειας, κατά τη διάρκεια της διαλυτοποίησης του υδρολύματος, παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα υδρολύματος 10 g L⁻¹ σε PBS 0.1 M pH 7.4, διηθημένο από αποστειρωμένα φίλτρα και στη συνέχεια πενταπλάσια αραιωμένο στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (συγκέντρωση FPH 2 mg mL⁻¹). Τυφλό δείγμα στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις παρασκευάστηκε με αντικατάσταση των FPH με αντίστοιχες ποσότητες PBS (μέσο καλλιέργειας ελέγχου).

Χρησιμοποιώντας μηχανικό σιφώνιο πολλαπλών καναλιών, 50 μL από κάθε μέσο διοχετεύθηκαν με σιφώνιο σε ξεχωριστά πηγαδάκια ενός δοχείου 96 θέσεων (96-well-plate) και επώαστηκαν στους 37°C. Τα καρκινικά κύτταρα που πολλαπλασιάστηκαν ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS στους 37°C, αποκολλήθηκαν, συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν (3000 g, 3 λεπτά). Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν με φρέσκο κυτταρικό μέσο και επαναιωρήθηκαν σε μέσο καλλιέργειας σε συγκέντρωση περίπου 105 κύτταρα ανά mL. Στη συνέχεια προστέθηκε το εναιώρημα κυττάρων (50 μL) σε κάθε πηγάδι για την εναπόθεση 5000 κυττάρων και ρύθμιση των τελικών

συγκεντρώσεων υδρολυμάτων. Το δοχείο 96 θέσεων (96-well-plate) στη συνέχεια επώαστηκε στους 37 ° C για 48 ώρες.



Εικόνα 4.6. Δοχείο 96 θέσεων (96-wellplate) μετά το τεστ MTT



Σχήμα 4.1. Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης MTT

Στο τέλος της επώασης, προστέθηκαν 15 μ L διαλύματος MTT (κιτρικό άλας τετραζολίου) σε κάθε πηγάδι και η πλάκα επώαστηκε για περαιτέρω 4 ώρες για να επιτραπεί ο μεταβολισμός του MTT σε φορμαζάνη, η οποία δίνει και το χαρακτηριστικό ερυθρό χρώμα, διαδικασία που συμβαίνει μόνο από τα ζωντανά κύτταρα (Εικόνα 4.6). Η δοκιμασία MTT χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας ως δείκτη της κυτταρικής βιωσιμότητας του πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας. Αυτή η φασματοφωτομετρική δοκιμασία βασίζεται στην αναγωγή ενός κίτρινου άλατος τετραζολίου (βρωμιούχο3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο ή MTT) σε πορφυρούς

κρυστάλλους φορμαζάνης με μεταβολικώς δραστικά κύτταρα (Σχήμα 4.1). Τα βιώσιμα κύτταρα περιέχουν ένζυμα οξειδοοξειδοκτάσης εξαρτώμενα από NAD(P)H τα οποία μειώνουν την MTT σε φορμαζάνη.

Η απορρόφηση διαβάστηκε σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (VERSAmax, Molecular Devices France,) στα 570 nm. Τα δεδομένα αναλύθηκαν για να υπολογιστεί το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης που επάγεται από την παρουσία FPH και κανονικοποιήθηκαν ως προς την αναστολή παρουσία PBS.

Η αντιπολλαπλασιαστική δραστικότητα των FPH συγκρίθηκε με εκείνη της ετοποσίδης (τοποϊσομεράση II αναστολέας) που αποτελεί αντικαρκινική χημική ένωση αναφοράς (Sigma-Aldrich). Αυτή διαλύθηκε σε DMSO και προστέθηκε στα κύτταρα COLO320 και MCF7AA σε συγκεντρώσεις 1.56, 3.13, 12.50, 25.00, 50.00 και 100.00 μM .

4.2.3 Διερεύνηση δράσης υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας στη προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητά σιδήρου

4.2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνη με την μελέτη των Argyri et al (190) με ορισμένες τροποποιήσεις. Ειδικότερα, αρχικά σε πηγάδια από δοχεία 6 θέσεων (6-well-plates) προστέθηκε δείγμα υποπροϊόντων ψαριών ώστε το τελικό δείγμα να περιλαμβάνει 8 g πρωτεΐνης ανά 100 mL δείγματος. Το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε στο 2.8 με την προσθήκη διαλύματος HCl συγκεντρώσεως 0.1M, 1M ή/και 6M και στη συνέχεια προστέθηκε HCl 0.01M

μέχρι τελικού όγκου 2ml. Συγχρόνως παρασκευάστηκαν δείγματα σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία στα οποία προστέθηκαν επιπλέον 20 μL FeCl_3 . Ως αρνητικό δείγμα (τυφλό) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα (2 ml) FeCl_3 τελικής συγκέντρωσης 12 mg L^{-1} αραιωμένο σε διάλυμα HCl 0.01 M. Ως θετικό δείγμα ελέγχου (positive control) χρησιμοποιήθηκε όξινο διάλυμα (HCl 0,01M) που περιείχε ασκορβικό οξύ (AA) και FeCl_3 σε συγκέντρωση 240 mg/L και 12 mg/L , αντιστοίχως.

4.2.3.2 *In vitro* πέψη δειγμάτων

Σε κάθε πηγάδι που περιείχε ένα από τα παραπάνω δείγματα προστέθηκε διάλυμα πεψίνης (0,1 mL) και τα πηγάδια καλύφθηκαν με πλαστικό καπάκι. Τα δοχεία 6 θέσεων τοποθετήθηκαν σε ένα ανακινούμενο θερμοθάλαμο διατηρούμενο στους 37°C και επώαστηκαν για 2 ώρες. Στη συνέχεια, σε κάθε πηγάδι τοποθετήθηκε κυλινδρικό ένθετο, στο οποίο ήταν στερεωμένο ένα τεμάχιο μεμβράνης διαπίδυσης (Spectra/Por 6-8kD) με ελαστικό δακτύλιο. Το ένθετο τοποθετήθηκε πάνω από κάθε φρεάτιο με τέτοιο τρόπο ώστε η μεμβράνη να έρχεται σε επαφή με την πέψη που πραγματοποιείται σε αυτό (Εικόνα 4.7). Στο ένθετο προστέθηκαν 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος PIPES (pH 6,3). Κατά αυτόν το τρόπο το ρυθμιστικό διαχέεται διαμέσου της μεμβράνης ρυθμίζοντας το pH των διαλυμάτων από 2.8 σε 6.3, προσομοιώνοντας τη μεταφορά του φαγητού από το στομάχι στο έντερο. Τα πλακίδια, στα οποία τοποθετήθηκε το ένθετο με το περιεχόμενό του, επώαστηκαν στον θερμοθάλαμο για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της μισής ώρας, σηκώθηκε ελαφρά το ένθετο και προστέθηκε σε κάθε πηγάδι 0.5 mL

μείγματος παγκρεατίνης/χολικών διαλυμένα σε 0.1M NaHCO₃. Τα δοχεία 6 θέσεων καλυφθήκαν και πάλι με πλαστικό καπάκι και τοποθετήθηκαν ξανά στον ανακινούμενο θερμοθάλαμο προς επώαση για άλλες δύο ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, αφαιρέθηκε το ένθετο με τη μεμβράνη. Στο κάθε πηγάδι υπήρχαν οι αδιάλυτες ενώσεις και οι διαλυτές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, ενώ στην επιφάνεια της μεμβράνης οι διαλυτές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Οι διαλυτές ενώσεις της μεμβράνης φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 20 λεπτά και στο υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης σιδήρου με τη μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 4.7. Δείγμα πέψης σε πηγάδια από δοχεία 6 θέσεων (well plate) με το αντίστοιχο ένθετο που φέρει μεμβράνη στο ένα του άκρο.

Το κάθε ένα από τα δείγματα, α) δείγματα υποπροϊόντων χωρίς σίδηρο, β) δείγματα υποπροϊόντων με προσθήκη σιδήρου, γ) αρνητικό δείγμα ελέγχου και δ) θετικό δείγμα ελέγχου, χωνεύθηκε δύο φορές κάθε εργαστηριακή ημέρα, για τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες.

4.2.3.3 Μέτρηση σιδήρου

Η ολική συγκέντρωση του σιδήρου (δισθενούς και τρισθενούς) και η συγκέντρωση του δισθενούς σιδήρου των υπερκείμενων φάσεων, που προέκυψαν από τη φυγοκέντρωση των διαλυτών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους της μεμβράνης, μετρήθηκαν με τροποποίηση της μεθόδου φερροζίνης (191). Συγκεκριμένα, για τον υπολογισμό του δισθενούς διαλυτού σιδήρου σε φιαλίδιο τύπου erpendorf (2mL) προστέθηκαν 0.25mL μη-αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης (non-reducing protein precipitant solution) και 0.5 mL της υπερκείμενης φάσης που περιέχει τις διαλυτές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρήθηκαν σε 5.000 g για 10 λεπτά. Οι ποσότητες των υπερκείμενων (0.1 mL εις διπλούν) μεταφέρθηκαν σε πλακίδιο μικροκυψελίδων 96 θέσεων (96 well plate). Σε κάθε θέση προστέθηκαν 0.225 mL διαλύματος φερροζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (1:9 v/v φερροζίνη:HEPES). Αμέσως μετά την προσθήκη του χρωμογόνου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 562 nm.

Αντίστοιχα, για τον υπολογισμό του ολικού διαλυτού σιδήρου σε φιαλίδιο τύπου erpendorf (2 mL) προστέθηκαν 0.25 mL αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης (reducing protein precipitant solution) σε 0.5 mL του υπερκείμενου, που περιέχει τις διαλυτές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρήθηκαν σε 5000 g για 10 λεπτά και οι ποσότητες των υπερκείμενων (0.1 mL εις διπλούν) μεταφέρθηκαν σε πλακίδιο μικροκυψελίδων 96 θέσεων (96 well plate). Σε κάθε θέση προστέθηκαν 0.225 mL διαλύματος φερροζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (1:9 v/v φερροζίνη:

HEPES). Μια ώρα μετά την προσθήκη του χρωμογόνου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 562 nm.

Ο διαλυτός δισθενής σίδηρος και ο συνολικός σίδηρος εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά της αρχικής συγκέντρωσης σιδήρου. Θεωρήθηκε ότι ο δισθενής διαλυτός σίδηρος είχε εξισορροπηθεί κατά μήκος της μεμβράνης διαπίδυσης μέχρις ότου απομακρυνθεί το ένθεμα δακτυλίου με την μεμβράνη στο τέλος της πέψης. Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με τις παρακάτω σχέσεις.

$$\text{Δισθενής διαλυτός σίδηρος} = \frac{\text{Δισθενής σίδηρος (mg/mL)} \times \text{Συνολικός όγκος (mL)}}{\text{Σίδηρος στο αρχικό δείγμα (mg)}} \times 100$$

$$\text{Συνολικός διαλυτός σίδηρος} = \frac{\text{Συνολικός διαλυτός σίδηρος (mg/mL)} \times \text{Συνολικός όγκος (mL)}}{\text{Σίδηρος στο αρχικό δείγμα (mg)}} \times 100$$

Όπου:

Δισθενής σίδηρος= συγκέντρωση δισθενή σιδήρου στην υπερκείμενη φάση

Συνολικός όγκος= συνολικός όγκος των προστιθέμενων αντιδραστηρίων (4.6 mL)

Σίδηρος στο αρχικό δείγμα= ποσότητα σιδήρου σε mg που περιέχεται στο δείγμα (έχει συνυπολογιστεί ο σίδηρος που έχει προστεθεί στα δείγματα).

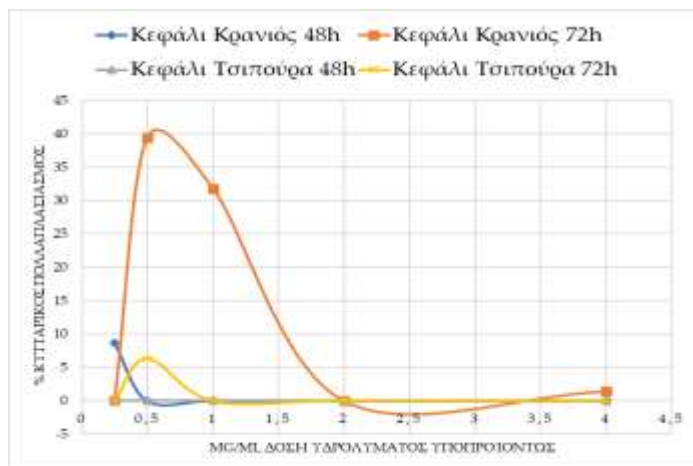
4.3. Αποτελέσματα

4.3.1 Αποτελέσματα πιλοτικού πειράματος προσδιορισμού αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων ψαριών

Για την επιλογή της βέλτιστης δόσης πρωτεϊνικού υδρολύματος υποπροϊόντων, τα κύτταρα MCF7A και COLO320 καλλιεργήθηκαν παρουσία 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 και 4,00 mg ml⁻¹ από το κάθε πρωτεϊνικό υδρόλυμα υποπροϊόντων Κρασιού και Τσιπούρας.

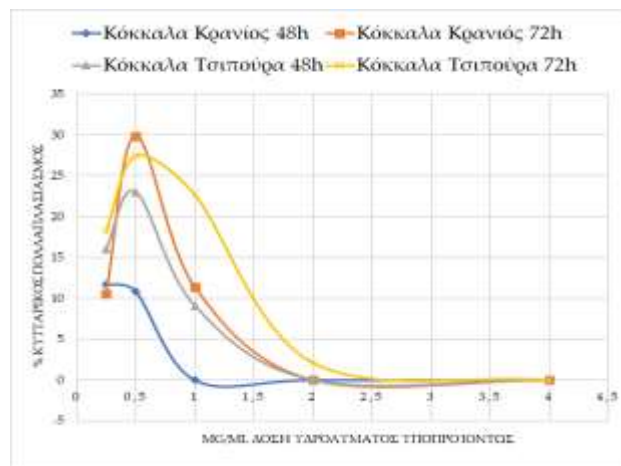
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχήματα 4.1-4.5) παρουσιάζεται το ποσοστό κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF7A για τις πέντε διαφορετικές δόσεις, για τα πέντε διαφορετικά πρωτεϊνικά υδρόλυματα υποπροϊόντων (κεφάλι, κόκκαλα, βράγχια, δέρμα και πτερούγια) για τα δύο είδη ψαριών, κρασιό και τσιπούρα.

Σ1



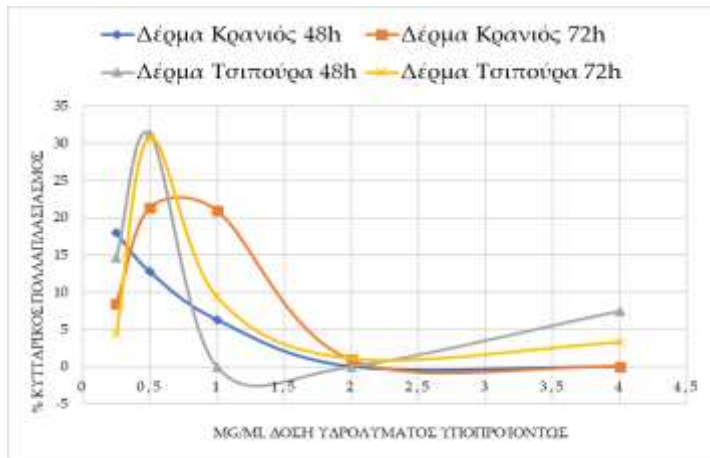
Σχήμα 4.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων MCF7A για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από κεφάλι ψαριών

Σ2



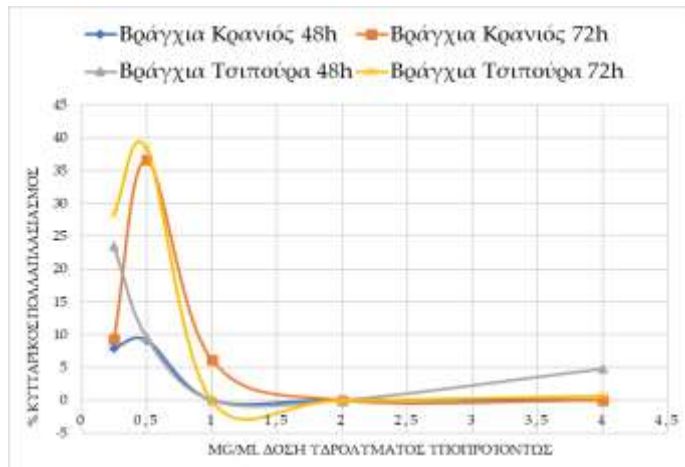
Σχήμα 4.2. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων MCF7A για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από κόκκαλα ψαριών

Σ3



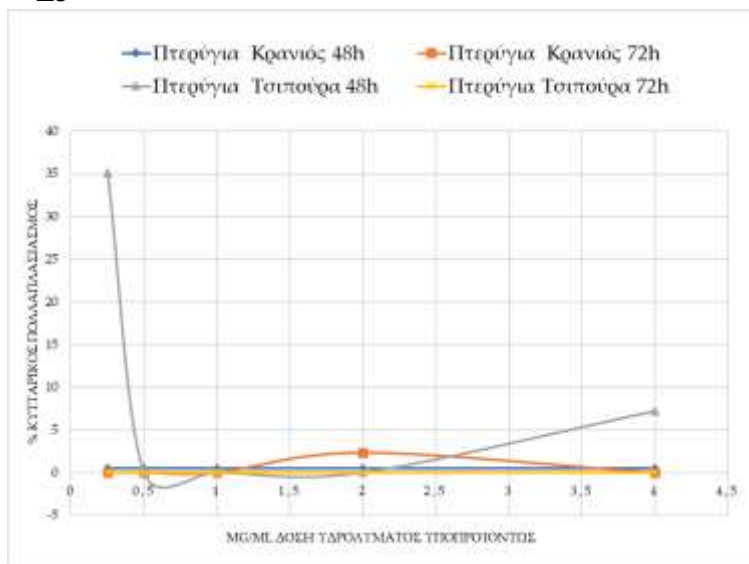
Σχήμα 4.3. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων MCF7A για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από δέρμα ψαριών

Σ4



Σχήμα 4.4. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων MCF7A για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από βράγχια ψαριών

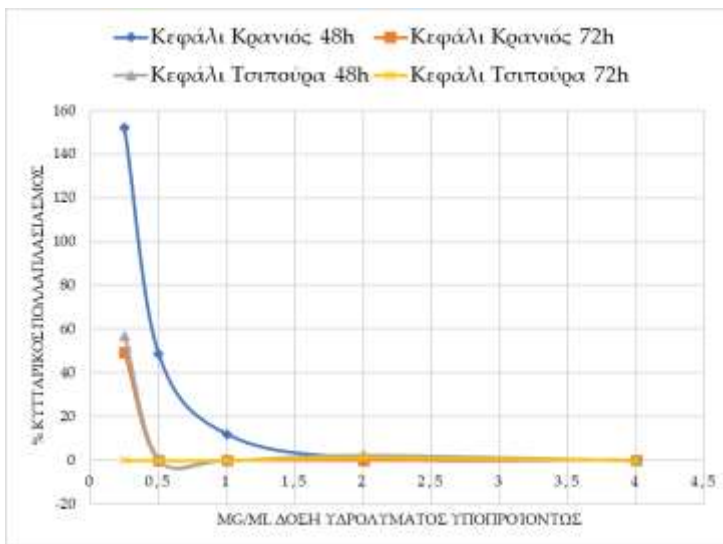
Σ5



Σχήμα 4.5. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων MCF7A για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από πτερόγια ψαριών

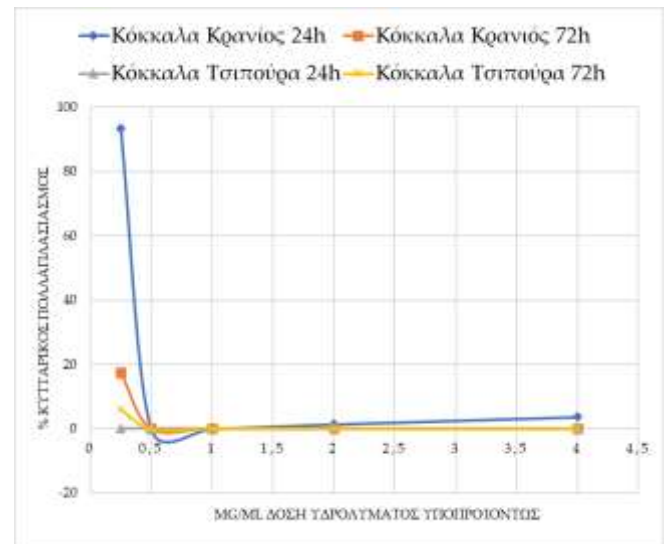
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχήματα 4.6-4.11) παρουσιάζεται το ποσοστό κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων COLO320 για τις πέντε διαφορετικές δόσεις, για τα πέντε διαφορετικά πρωτεϊνικά υδρολύματα υποπροϊόντων (κεφάλι, κόκκαλα, βράγχια, δέρμα και πτερύγια) για τα δύο είδη ψαριών, Κρασιό και Τσιπούρα

Σ6



Σχήμα 4.6. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων COLO320 για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από κεφάλι ψαριών

Σ7



Σχήμα 4.7. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων COLO320 για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από κόκκαλα ψαριών

Σ8



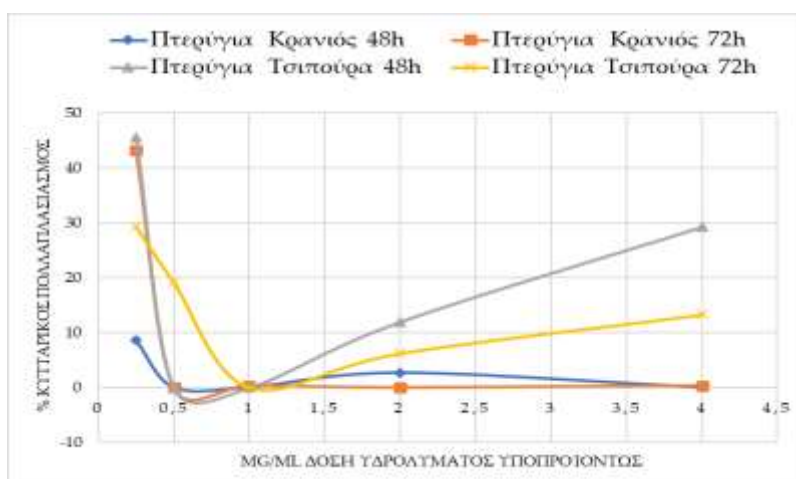
Σχήμα 4.8 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων COLO320 για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από δέρμα ψαριών

Σ9



Σχήμα 4.9. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων COLO320 για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από βράγχια ψαριών

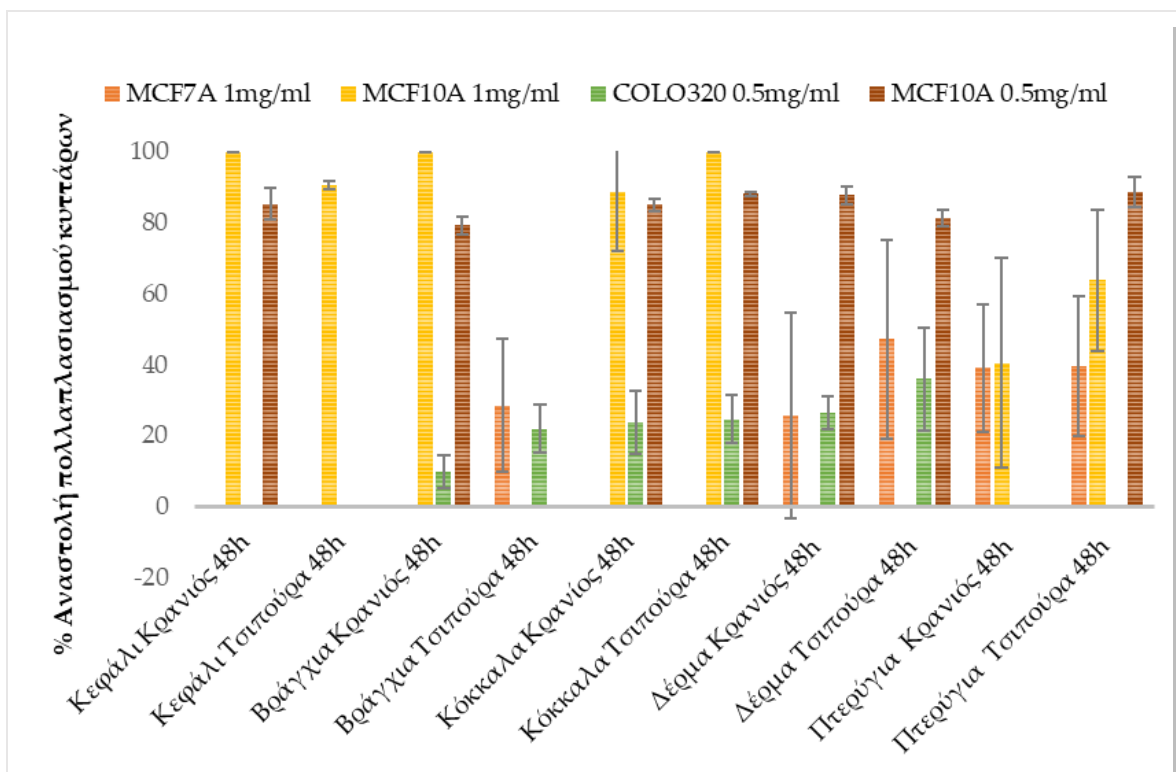
Σ10



Σχήμα 4.10. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός (%) των κυττάρων COLO320 για τις πέντε διαφορετικές δόσεις υδρολυμάτων από πτερύγια ψαριών

Από τα παραπάνω γραφήματα φαίνεται πως στην περίπτωση των κυττάρων MCF7A, όταν προστέθηκαν τα υδρολύματα υποπροϊόντων αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στη δόση των 1 mg ml^{-1} της πλειοψηφίας των υδρολυμάτων. Αντίστοιχα στα καρκινικά κύτταρα COLO320 στα περισσότερα υδρολύματα υποπροϊόντων παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στη δόση των 0.5 mg ml^{-1} . Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν: α) η δόση των 1 mg ml^{-1} να δοκιμαστεί στα MCF7A και β) η δόση των 0.5 mg ml^{-1} να δοκιμαστεί στα COLO320, για 48 ώρες σε πέντε συνολικά επαναλήψεις. Παράλληλα εξετάστηκε πιθανή αναστολή των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων MCF10A για τις συγκεντρώσεις 1 mg ml^{-1} και 0.5 mg ml^{-1} . Στο παρακάτω γράφημα (Σχήμα 4.11), παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μελέτης αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF7A με δόση 1 mg ml^{-1} υδρολύματος υποπροϊόντων, MCF10A με δόση 1 mg/ml υδρολύματος υποπροϊόντων, COLO320 με δόση 0.5 mg ml^{-1} υδρολύματος υποπροϊόντων και MCF10A με δόση 0.5 mg/ml υδρολύματος υποπροϊόντων.

Στα ίδια κύτταρα εξετάστηκε η επίδραση της ετοποσίδης, που αποτελεί αντικαρκινική ένωση αναφοράς, σε συγκεντρώσεις για 1.56, 3.13, 12.50, 25.00, 50.00 και 100.00 μM . Στην περίπτωση των κυττάρων COLO320 η αντίστοιχη αναστολή παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 3.1 μM ετοποσίδης και στα MCF7A όμοια αναστολή παρατηρήθηκε στα 50 μM .



Σχήμα 4.11. Αναστολή πολλαπλασιασμού κυττάρων MCF7A, MCF10A και COLO320 για τα διάφορα υδρολύματα υποπροϊόντων ψαριών μετά από 48 ώρες.

Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 4.11, αναστολή των καρκινικών κυττάρων, χωρίς αντίστοιχη αναστολή των φυσιολογικών, παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα MCF7A και COLO320 υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πρωτεϊνικό υδρόλυμα από βράγχια Τσιπούρας και στα MCF7A με πρωτεϊνικό υδρόλυμα από δέρμα Κρανιού και Τσιπούρας. Ο πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών κυττάρων MCF10A φαίνεται να επηρεάζεται παρουσία των περισσότερων υδρολυμάτων υποπροϊόντων το οποίο σημαίνει ότι η αναστολή δεν πραγματοποιείται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα αλλά και στα φυσιολογικά. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε αναστολή στα

καρκινικά κύτταρα MCF7A παρουσία υδρολυμάτων δέρματος κρανίου και τσιπούρας, 25.5% και 47.1% αντίστοιχα, υδρολυμάτων πτερυγίων κρανίου και τσιπούρας, 39.0% και 39.6% αντίστοιχα και υδρολύματος από βράγχια τσιπούρας σε ποσοστό 28.5%. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων COLO320 παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων όταν σε αυτά προστέθηκαν πρωτεϊνικά υδρολύματα από κόκκαλα κρανίου και τσιπούρας σε ποσοστό 23.7% και 24.6%, βράγχια κρανίου και τσιπούρας, 9.9% και 21.9% αντίστοιχα, και πτερύγια κρανίου και τσιπούρας σε ποσοστό 26.4% και στα δύο ψάρια.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν προκύψει μετά από κανονικοποίηση ως προς την αναστολή που παρατηρήθηκε, μόνο παρουσία PBS στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Κατά το σχεδιασμό του πειράματος και σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Picot et al. (192), τα πρωτεϊνικά υδρολύματα των υποπροϊόντων αφού λυοφυλιώθηκαν διαλυτοποιήθηκαν σε PBS. Κατά την επεξεργασία των κυττάρων με δείγμα ελέγχου, τα οποία περιείχαν μόνο PBS χωρίς πρωτεϊνικό υδρόλυμα, διαλυμένα σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα διάφορα μέσα καλλιέργειας, παρατηρήθηκε σε ορισμένες περιπτώσεις υψηλή αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (πίνακα 4.1).

Πίνακας 4.1. Ποσοστιαία αναστολή κυττάρων μετά την επεξεργασία τους παρουσία PBS για 48 ώρες.

Κυτταρική σειρά	Συγκέντρωση PBS (mg ml ⁻¹)	Μέση τιμή (%αναστολή)	Τυπική απόκλιση
MCF7A	0.25	100.0	1.0
	0.50	100.0	4.1
	1.00	83.1	3.1
	2.00	22.1	1.6
	4.00	6.9	3.4
COLO320	0.25	100.0	3.4
	0.50	70.6	4.8
	1.00	0.3	0.1
	2.00	0.2	0.3
	4.00	0.0	0.2
MCF10A	0.50	3.2	2.1
	1.00	72.6	2.7

4.3.2 Αποτελέσματα πειράματος προσδιορισμού επίδρασης στη προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου υποπροϊόντων ψαριών

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.2) παρουσιάζονται οι μετρήσεις ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση του ολικού διαλυτού σιδήρου και ολικού δισθενούς σιδήρου, για το εκάστοτε δείγμα μικρού και μεγάλου μεγέθους κρανιού και τσιπούρας, με και χωρίς την προσθήκη σιδήρου. Στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) το ποσοστό δισθενούς διαλυτού σιδήρου αντιστοιχούσε στο 45.3%. Το αντίστοιχο ποσοστό για το αρνητικό δείγμα ελέγχου ήταν 2.6%. Στην περίπτωση του ολικού διαλυτού

σιδήρου υψηλότερα ποσοστά παρουσίασαν τα δείγματα από δέρμα μεγάλης τσιπούρας και μεγάλου κρανιού. Ωστόσο το ποσοστό του δισθενούς διαλυτού σιδήρου για τα αντίστοιχα δείγματα ήταν μηδενικό, ενώ μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρήθηκε στη περίπτωση των εντόσθιων τσιπούρας και κρανιού, με και χωρίς τη προσθήκη πρόσθετου σιδήρου.

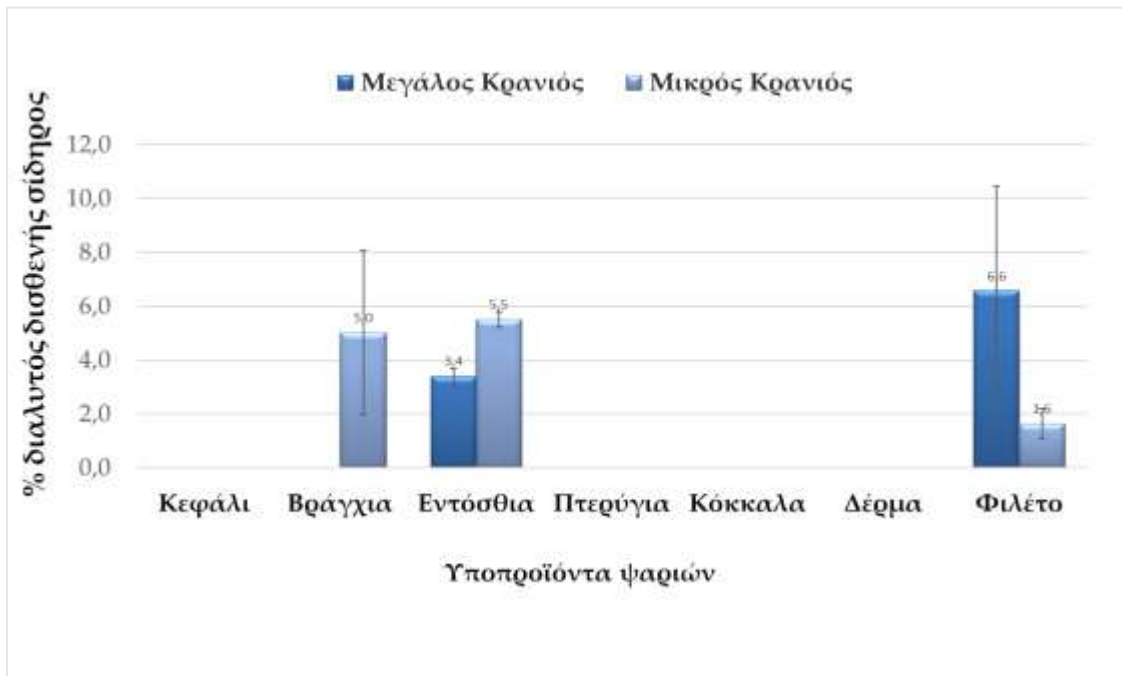
Πίνακας 4.2. Μέσος ολικός διαλυτός σίδηρος και μέσος ολικός δισθενής σίδηρος διαφορετικών δειγμάτων υποπροϊόντων, κρανιού και τσιπούρας ηλικίας 1⁺ και 0⁺ με και χωρίς την προσθήκη σιδήρου.

Είδος δείγματος υποπροϊόντος	Μέγεθος και Είδος Αντίστοιχου Ψαριού/Δείγματος	Σίδηρος στο αρχικό δείγμα (mg)	% Μέσος ολικός διαλυτός σίδηρος	τ.α.	% Μέσος δισθενής διαλυτός σίδηρος	τ.α.
Fe+AA*	Θετικό ΔΕ	0.024	43.6	2.5	45.3	4.6
Fe*	Αρνητικό ΔΕ	0.024	3.7	3.2	2.6	0.9
Κεφάλι + Fe	Κρανιός 1 ⁺	0.025	0.3	0.5	0.0	0.0
Κεφάλι	Κρανιός 1 ⁺	0.001	0.2	0.3	0.0	0.0
Κεφάλι + Fe	Κρανιός 0 ⁺	0.033	0.2	0.3	0.0	0.0
Κεφάλι	Κρανιός 0 ⁺	0.009	5.2	8.9	0.0	0.0
Βράγχια + Fe	Κρανιός 1 ⁺	0.030	1.3	6.0	0.0	0.0
Βράγχια	Κρανιός 1 ⁺	0.006	15.0	13.1	0.0	0.0
Βράγχια + Fe	Κρανιός 0 ⁺	0.040	25.0	7.0	7.3	3.0
Βράγχια	Κρανιός 0 ⁺	0.016	26.4	9.5	15.2	13.0
Εντόσθια + Fe	Κρανιός 1 ⁺	0.046	15.5	0.9	15.3	0.3
Εντόσθια	Κρανιός 1 ⁺	0.022	11.4	4.3	23.9	6.3
Εντόσθια + Fe	Κρανιός 0 ⁺	0.029	12.3	1.7	9.6	0.3
Εντόσθια	Κρανιός 0 ⁺	0.005	21.8	8.6	28.8	2.8
Πτερύγια + Fe	Κρανιός 1 ⁺	0.027	0.2	0.3	0.0	0.0
Πτερύγια	Κρανιός 1 ⁺	0.003	0.9	1.1	0.0	0.0
Πτερύγια + Fe	Κρανιός 0 ⁺	0.027	0.5	0.4	0.0	0.0
Πτερύγια	Κρανιός 0 ⁺	0.003	0.4	0.3	0.0	0.0
Κόκκαλα + Fe	Κρανιός 1 ⁺	0.026	1.2	1.5	0.0	0.0
Κόκκαλα	Κρανιός 1 ⁺	0.002	9.7	0.0	0.0	0.0
Κόκκαλα + Fe	Κρανιός 0 ⁺	0.031	6.6	0.4	0.0	0.0
Κόκκαλα	Κρανιός 0 ⁺	0.007	2.2	0.0	0.0	0.0
Δέρμα +Fe	Κρανιός 1 ⁺	0.025	27.8	24.1	0.0	0.0
Δέρμα	Κρανιός 1 ⁺	0.001	0.0	0.0	0.0	0.0
Δέρμα +Fe	Κρανιός 0 ⁺	0.024	0.7	0.1	0.0	0.0

Δέρμα	Κρανιός 0 ⁺	0.000	0.0	0.0	0.0	0.0
Φιλέτο +Fe	Κρανιός 1 ⁺	0.027	5.3	4.1	7.6	3.9
Φιλέτο	Κρανιός 1 ⁺	0.003	0.0	0.0	6.8	4.6
Φιλέτο +Fe	Κρανιός 0 ⁺	0.025	0.7	0.1	3.1	0.6
Φιλέτο	Κρανιός 0 ⁺	0.001	0.3	0.6	10.4	12.3
Κεφάλι + Fe	Τσιπούρα 1 ⁺	0.026	0.3	0.5	0.0	0.0
Κεφάλι	Τσιπούρα 1 ⁺	0.002	0.2	0.3	0.0	0.0
Κεφάλι + Fe	Τσιπούρα 0 ⁺	0.0025	0.2	0.3	0.0	0.0
Κεφάλι	Τσιπούρα 0 ⁺	0.001	5.2	8.9	0.0	0.0
Βράγχια + Fe	Τσιπούρα 1 ⁺	0.027	1.8	0.4	0.0	0.0
Βράγχια	Τσιπούρα 1 ⁺	0.003	1.8	0.2	0.0	0.2
Βράγχια + Fe	Τσιπούρα 0 ⁺	0.030	0.6	0.3	0.0	0.0
Βράγχια	Τσιπούρα 0 ⁺	0.054	0.9	0.7	0.0	0.2
Εντόσθια + Fe	Τσιπούρα 1 ⁺	0.028	14.6	0.3	10.2	1.2
Εντόσθια	Τσιπούρα 1 ⁺	0.04	8.2	0.7	5.4	0.0
Εντόσθια + Fe	Τσιπούρα 0 ⁺	0.039	13.0	1.8	9.7	1.7
Εντόσθια	Τσιπούρα 0 ⁺	0.015	5.2	0.3	2.5	0.5
Πτερύγια + Fe	Τσιπούρα 1 ⁺	0.027	0.2	0.3	0.0	0.0
Πτερύγια	Τσιπούρα 1 ⁺	0.003	0.9	1.1	0.0	0.0
Πτερύγια + Fe	Τσιπούρα 0 ⁺	0.027	0.5	0.4	0.0	0.0
Πτερύγια	Τσιπούρα 0 ⁺	0.003	0.4	0.3	0.0	0.0
Κόκκαλα + Fe	Τσιπούρα 1 ⁺	0.032	1.2	1.5	0.0	0.0
Κόκκαλα	Τσιπούρα 1 ⁺	0.008	9.7	0.0	0.0	0.0
Κόκκαλα + Fe	Τσιπούρα 0 ⁺	0.026	6.6	0.4	0.0	0.0
Κόκκαλα	Τσιπούρα 0 ⁺	0.002	2.2	0.0	0.0	0.0
Δέρμα +Fe	Τσιπούρα 1 ⁺	0.025	27.8	24.1	0.0	0.0
Δέρμα	Τσιπούρα 1 ⁺	0.001	0.0	0.0	0.0	0.0
Δέρμα +Fe	Τσιπούρα 0 ⁺	0.025	0.7	0.1	0.0	0.0
Δέρμα	Τσιπούρα 0 ⁺	0.001	0.0	0.0	0.0	0.0
Φιλέτο +Fe	Τσιπούρα 1 ⁺	0.025	6.4	4.1	5.6	3.9
Φιλέτο	Τσιπούρα 1 ⁺	0.001	0.7	0.6	0.2	4.6
Φιλέτο +Fe	Τσιπούρα 0 ⁺	0.026	4.2	0.1	3.5	0.6
Φιλέτο	Τσιπούρα 0 ⁺	0.002	0.5	0.6	0.2	12.3

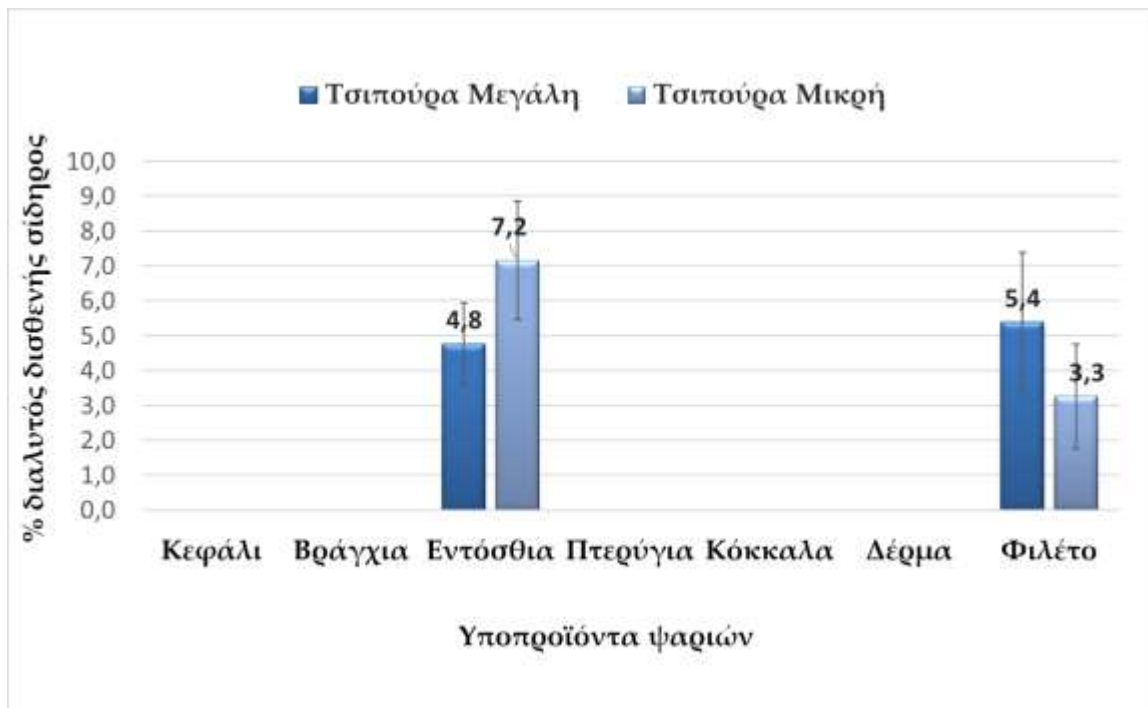
*Οι μετρήσεις παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (τ.α.); Το ασκορβικό οξύ (AA) είναι το θετικό δείγμα ελέγχου (ΔΕ) και ο σκέτος Fe το αρνητικό δείγμα ελέγχου (ΔΕ).

Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 4.12.), παρουσιάζεται η μέση τιμή και τυπική απόκλιση της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου δειγμάτων υποπροϊόντων κρανιού 0⁺ και 1⁺. Όπως φαίνεται και από το σχήμα, αύξηση στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου παρατηρείται στα εντόσθια σε μικρούς (0⁺) και μεγάλους(1⁺) κρανιούς καθώς και στα αντίστοιχα φιλέτα. Στην περίπτωση του κρανιού επίδραση στη προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου φαίνεται να έχουν και τα βράγχια μόνο ωστόσο από το μικρά ψάρια.



Σχήμα 4.12. Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων κρανιού.

Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 4.13.), παρουσιάζεται η μέση τιμή και τυπική απόκλιση της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου δειγμάτων υποπροϊόντων μικρής (0⁺) και μεγάλης (1⁺) τσιπούρας. Όπως φαίνεται και από το σχήμα, αύξηση στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου παρατηρείται στα εντόσθια σε τσιπούρες μικρού και μεγάλου μεγέθους καθώς και στα αντίστοιχα φιλέτα.



Σχήμα 4.13. Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων τσιπούρας.

4.4 Συζήτηση

4.4.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μελέτης αντικαρκινικής δράσης υποπροϊόντων

Αντικαρκινικά μόρια που απομονώνονται από θαλάσσιους οργανισμούς ανήκουν σε διάφορες ομάδες χημικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των πολυκετιδίων, τερπενίων, στεροειδών και πεπτιδίων (193). Αυτά τα μόρια απαντώνται σε οργανισμούς όπως είναι τα κοράλλια, τα σφουγγάρια και τα ασκίδια, τα οποία προστατεύονται από την καταστροφή μέσω της σύνθεσης ισχυρών κυτταροτοξικών μορίων. Ωστόσο, οι ιστοί ψαριών αποτελούν επίσης μια πιθανή πηγή αντικαρκινικών μορίων που πρέπει να διερευνηθούν. Για παράδειγμα, η σκουαλαμίνη, μια αμινοστερόλη που απομονώθηκε από το ήπαρ του σκυλόψαρου *Squalus acanthias* (194), αποδείχθηκε ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας αγγειογένεσης και ανάπτυξης όγκων σε διάφορα ζωικά μοντέλα (195, 196). Οι ακυλογλυκερόλες, τα φυσικά λιπίδια που περιέχονται σε αφθονία στο σκώτι καρχαριών, περιγράφηκαν πρόσφατα ως αναστολείς της ανάπτυξης και μετάστασης όγκου (197). Από ψάρι αντζούγια έχει προσδιοριστεί υδρόφοβο πεπτίδιο 440.9 Da με αντικαρκινική δράση, ικανό να επάγει απόπτωση ανθρώπινων κυττάρων λεμφώματος (198, 199).

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι μερικά πρωτεϊνικά υδρολύματα υποπροϊόντων ψαριών, που λαμβάνονται με ελεγχόμενη ενυδατική υδρόλυση μυϊκών πρωτεϊνών, ασκούν μια σημαντική *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, αναστολή των καρκινικών κυττάρων, χωρίς αντίστοιχη αναστολή των φυσιολογικών, παρατηρήθηκε όταν τα καρκινικά κύτταρα

MCF7A και COLO320 υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πρωτεϊνικό υδρολύμα από βράγχια τσιπούρας και τα MCF7A με πρωτεϊνικό υδρολύμα από δέρμα κρανιού και τσιπούρας, γεγονός που σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα πρωτεϊνικά υδρολύματα παρουσιάζουν επιλεκτική αναστολή του πολλαπλασιασμού μόνο των καρκινικών κυττάρων.

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση θα μπορούσε να σχετίζεται με την παρουσία ειδικών πεπτιδίων που ασκούν άμεση κυτταροτοξικότητα επί των καρκινικών κυττάρων, όπως έχει παρατηρηθεί σε αντίστοιχες μελέτες (198, 199). Η υπόθεση ανταγωνισμού δεσμεύσεως μεταξύ των πεπτιδίων από τους ιστούς των ψαριών και των αυξητικών παραγόντων από εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) επί υποδοχέων κυτταρικής μεμβράνης δεν μπορεί επίσης να αποκλεισθεί (192). Αιτία μπορεί ακόμα να αποτελεί και η παρουσία πιθανών βιοδραστικών λιπιδίων στα υδρολύματα τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αντιπολλαπλασιαστική δράση.

Αυτά τα προκαταρκτικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι πρωτεϊνικά υδρολύματα υποπροϊόντων ψαριών θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια ενδιαφέρουσα πηγή αντικαρκινικών πεπτιδίων ή λιπιδίων. Ωστόσο, μέσω της μελέτης αυτής δεν μπορεί να υπάρξει συσχέτιση της αντιπολλαπλασιαστικής δραστηριότητας με την παρουσία συγκεκριμένων μορίων, όπως πεπτιδίων καθορισμένου μοριακού βάρους.

Πρέπει ακόμα να τονιστεί πως η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε με τη χρήση PBS ως μέσου διάλυσης, επηρέασε την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συγχρόνως, η επίδειξη βιοδραστικών ιδιοτήτων σε *in vitro* μελέτες δεν αποδεικνύει ότι τα πεπτίδια ψαριών (ή οι

φυσικές πρωτεΐνες) ασκούν τα ίδια ευεργετικά αποτελέσματα όταν καταναλώνονται από τον άνθρωπο (186) Η πέψη των πρωτεϊνών στο στομάχι και στο λεπτό έντερο παράγει μια τεράστια ποικιλία πεπτιδίων βραχείας αλυσίδας, μεταξύ των οποίων μόνο τα δι- και τριπεπτίδια απορροφώνται σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα από ενεργούς μεταφορείς που βρίσκονται στην κορυφαία μεμβράνη των εντεροκυττάρων (200). Απαιτούνται επομένως περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί εάν η κατανάλωση ψαριών και υποπροϊόντων αυτών, μπορεί να διαμορφώσει την υγεία μέσω της παρουσίας βιοδραστικών πεπτιδίων στην κυκλοφορία του αίματος, ενεργώντας σε κυτταρικούς φαρμακολογικούς στόχους. Προτείνεται σε μελλοντικά πειράματα τα πρωτεϊνικά υδρολύματα υποπροϊόντων ψαριών να διαλυθούν απευθείας στα διάφορα κυτταρικά μέσα.

4.4.2 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μελέτης δράσης υποπροϊόντων ψαριών στην απορρόφηση του σιδήρου

Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση των υποπροϊόντων των ψαριών κρانيού και τσιπούρας ιχθυοκαλλιέργειας, μικρού και μεγάλου μεγέθους, στη βιοδιαθεσιμότητα πρόσθετου σιδήρου, δεδομένου πως το ποσοστό διαλυτότητας που προκύπτει από την *in vitro* πέψη, αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου [107].

Όπως έχει διατυπωθεί, ο δισθενής διαλυτός σίδηρος αποτελεί καλύτερο δείκτη απορρόφησης του σιδήρου σε σχέση με τον ολικό διαλυτό σίδηρο.

Αυτό το συμπέρασμα εξήχθη από προηγούμενη μελέτη μέσω της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης, από όπου προέκυψε πως ο δισθενής διαλυτός σίδηρος εξηγούσε μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης (75,4%) απορρόφησης σιδήρου, συγκριτικά με τον ολικό διαλυτό σίδηρο (67,2%) (186). Το εύρημα αυτό, είναι σύμφωνο με άλλες παρατηρήσεις που αποδεικνύουν ότι ο δισθενής διαλυτός σίδηρος πιθανόν να αποτελεί πιο αξιόπιστο δείκτη, συγκριτικά με τον ολικό διαλυτό σίδηρο, της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου (201). Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε το περιεχόμενο της μεμβράνης διάλυσης με πόρους διατομής μοριακού βάρους 6.000-8.000 Da. Συνεπώς, τα αποτελέσματα περί του ολικού και δισθενούς διαλυτού σιδήρου αφορούν μόρια με μοριακό βάρος < 6.000 Da

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση πιθανής επίδρασης των υποπροϊόντων ψαριών στην προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, ώστε να μπορούν αυτά να αξιοποιηθούν για την ενίσχυση της προσπάθειας καταπολέμησης της σιδηροπενίας και την πρόληψη της σιδηροπενικής αναιμίας. Δεδομένου ότι η σιδηροπενία, ακόμη και πριν την εξέλιξή της σε αναιμία συνδέεται με νοσηρές καταστάσεις όπως λόγου χάρη η μειωμένη ανάπτυξη και η προβληματική κύηση, υπογραμμίζεται πως το πραγματικό της κόστος είναι σημαντικό (181). Συνεπώς, στα πλαίσια υιοθέτησης ισορροπημένων διατροφικά συνηθειών, με σκοπό την κάλυψη των αναγκών του ατόμου σε σίδηρο, η ανεύρεση νέων ενισχυτών της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου θα έπαιζε καταλυτικό ρόλο στην άμβλυση του ζητήματος.

Από την παρούσα έρευνα δεν κατέστη δυνατή η ανάδειξη της θετικής επίδρασης των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, παρά μόνο στην περίπτωση των εντοσθίων, τα οποία ωστόσο παραμένουν το πιο δύσκολα αξιοποιήσιμο υποπροϊόν λόγω του υψηλού τους μικροβιολογικού φορτίου (202). Από μελέτες έχει φανεί ότι αυτή η θετική επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου πιθανώς να οφείλεται σε πρωτεΐνες και κατ' επέκταση σε αμινοξέα (203). Σε μελέτη όπου εξετάστηκε η απορρόφηση σιδήρου από τα μαύρα φασόλια, όταν αυτά συνδυάστηκαν με φιλέτο ψαριού, φάνηκε ότι αυξήθηκε περίπου δύο φορές φτάνοντας σε ποσοστό 4.7% (204). Αυτό είναι σύμφωνο με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας όπου εξετάστηκε η προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου παρουσία φιλέτου κρانيού και τσιπούρας και αυτή αντιστοιχούσε σε ποσοστό 6.6% και 5.4%.

Παρ' ότι τα δεδομένα των *in vitro* μελετών είναι χρήσιμα για την εκτίμηση της απορρόφησης του σιδήρου και για τη μελέτη μηχανισμών που μπορεί να επισυμβαίνουν, εν τούτοις απαιτείται προσοχή κατά την ερμηνεία τους. Το pH και η ρύθμιση του pH σε οποιοδήποτε σύστημα προσομοίωσης της πέψης αποτελεί κομβικό σημείο. Προφανώς, το pH του στομάχου και του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου επηρεάζονται από τον τύπο του γεύματος που καταναλώνεται. Στις *in vivo* μελέτες τόσο το pH, όσο και οι ρυθμοί διέλευσης ελέγχονται από πολλούς και εξαιρετικά πολύπλοκους παράγοντες, γεγονός που καθιστά δύσκολη την πιστή προσομοίωση των *in vivo* μελετών. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί και η δυσκολία ρύθμισης του pH κάθε δείγματος, καθώς η μικρή τους ποσότητα αλλά και η

μεγάλη τους ρυθμιστική ικανότητα, απαιτούσε ιδιαίτερη προσοχή κατά τη μεταχείρισή τους (205).

Περιορισμένος αριθμός μελετών εκτός Ελλάδος έχουν διερευνήσει αντιαναιμική δράση υποπροϊόντων ψαριών. Ειδικότερα, το ενζυμικό υδρόλυμα που απομονώθηκε από λεπτούροσπαθόψαρο (*Largehead hairtail*) φάνηκε να αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου σε *in vivo* πείραμα με αρουραίους (189). Επομένως σε μελλοντικές μελέτες, αν απομονωθούν πρωτεϊνικά υδρόλυματα από τα υποπροϊόντα ψαριών, πιθανώς αυτά να παρουσιάζουν επίδραση στην αύξηση της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου σε αντίθεση με ολόκληρα τα υποπροϊόντα.

4.5 Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι μερικά πρωτεϊνικά υδρόλυματα υποπροϊόντων ψαριών, παρουσιάζουν *in vitro* βιοδραστικότητα. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και ειδικότερα επιλεκτική αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων MCF7A και COLO320 όταν αυτά υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πρωτεϊνικό υδρόλυμα από βράγχια τσιπούρας και τα MCF7A με πρωτεϊνικό υδρόλυμα από δέρμα κρανιού και τσιπούρας. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε θετική επίδραση των δειγμάτων που μελετήθηκαν, παρά μόνο στην περίπτωση των εντοσθίων στην περίπτωση της μελέτης που αφορούσε την επίδραση στην προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου. Οι παραπάνω δραστικότητες φαίνεται πως οφείλονται στην παρουσία βιοδραστικών πεπτιδίων. Επομένως η απομόνωση

αυτών από υποπροϊόντα ψαριών και η ενσωμάτωσή τους σε συμπληρώματα διατροφής πιθανώς να έχει ευεργετικές επιδράσεις την υγεία του ανθρώπου.

Οι προαναφερθείσες μελέτες βιοδραστικότητας παρουσιάστηκαν υπό την μορφή ανηρτημένων ανακοινώσεων (πόστερ) στα επιστημονικά συνέδρια με κριτές AQUA 2018 (Μονπελιέ, Γαλλία) και FENS 2019 (Δουβλίνο, Ιρλανδία) και συμπεριλαμβάνονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ της παρούσας διατριβής.

Κεφάλαιο 5. Προτάσεις αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας

5.1 Κανονισμοί για τη χρήση και διάθεση υποπροϊόντων τροφίμων

Οι παραγωγοί που αναλαμβάνουν τη μεταποίηση υποπροϊόντων ιχθυρών που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο, δεσμεύονται να διαθέτουν στην αγορά ασφαλή προϊόντα. Οι κανονισμοί που ισχύουν άμεσα για την ένδειξη των χημικών και μικροβιακών ορίων είναι οι εξής: Κανονισμός (ΕΚ αριθ. 2073/2005, Σύσταση 2004/705 / ΕΚ, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 178/2002) (206). Ο κανονισμός για τα ζωικά υποπροϊόντα ή ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1774/2002 άρχισαν να ισχύουν τον Μάιο του 2003. Στόχος της νομοθεσίας είναι να αποτρέπει κάθε κίνδυνο για τη δημόσια υγεία ή την υγεία των ζώων από τα ζωικά υποπροϊόντα. Ο κανονισμός ελέγχει τη συλλογή, τη μεταφορά, την αποθήκευση, τον χειρισμό, τη μεταποίηση και τη χρήση ή τη διάθεση ζωικών υποπροϊόντων. Η εφαρμογή του κανονισμού σε όλα τα κράτη μέλη της ΕΕ επανεξετάστηκε το 2004 και τροποποιήθηκε για να αυξηθεί η ευελιξία των ελέγχων, ανάλογα με τον κίνδυνο. Ο κανονισμός 1774/2002 αντικαταστάθηκε από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1069/2009. Η αλλαγή αυτή τέθηκε σε ισχύ το 2011.

5.2 Εφαρμογές βιοδραστικών συστατικών προϊόντων ψαριών στον τομέα των τροφίμων

Τα προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης όπως ψάρια, θαλασσινά και φύκη αποτελούν όπως φαίνεται και από την μέχρι στιγμής παρουσίαση της παρούσας μελέτης, σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών και βιολογικά δραστικών ενώσεων. Συστατικά όπως τα ιχθυέλαια, οι πρωτεΐνες ψαριών και τα φύκη έχουν βρει εφαρμογή στην αρτοποιία, τα γαλακτοκομικά, τα ζαχαρωτά και τα ζυμαρικά.

5.2.1 Εφαρμογές σε προϊόντα αρτοποιίας

Στη βιομηχανία της αρτοποιίας, τα ιχθυέλαια που είναι πλούσια σε ωμέγα-3 λιπαρά χρησιμοποιούνται τόσο στο ψωμί όσο και σε άλλα προϊόντα. Τα προϊόντα παρουσιάζουν σημαντική βελτίωση όσον αφορά τη συγκέντρωση σε EPA και DHA, λιπαρά οξέα που έχουν συνδεθεί με τη μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων (207). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα φύκια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πλούσια πηγή καροτενοειδών, όπως η ασταξανθίνη, η φουκοξανθίνη και οι διαιτητικές ίνες που αυτά περιλαμβάνουν, ενώ μπορούν να ενσωματωθούν σε προϊόντα ζυμαρικών χωρίς σημαντικές αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Η ενσωμάτωση των φύλλων Wakame (*U. pinnatifida*) στα ζυμαρικά έχει δείξει μεγάλη δυνατότητα βελτίωσης της περιεκτικότητας σε φουκοξανθίνη. Επίσης, το σουρίμι φαίνεται να γίνεται αποδεκτό από τους καταναλωτές σε μέτριες συγκεντρώσεις στα προϊόντα ζυμαρικών.

Πίνακας 5.1: Λειτουργικά συστατικά θαλάσσιας προέλευσης σε προϊόντα αρτοποιίας και ζυμαρικών.

Συστατικό	Προϊόν
Μικροενθυλακωμένο έλαιο τόνου	Ψωμί
Θαλάσσια υδροκολλοειδή	Ψωμί
Συμπυκνώματα ιχθυελαίου	Ψωμί
Ιχθυέλαιο	Ψωμί
n-3 PUFA	Ψωμί
DHA	Μπισκότο, κράκερ
Ενθυλακωμένο ιχθυέλαιο	Ζυμαρικά
1.2% Ενθυλακωμένο ιχθυέλαιο	Ζυμαρικά
Ινδικά καφέ φύκη	Ζυμαρικά
Wakame	Ζυμαρικά
Surimi	Ζυμαρικά

5.2.1.1 Λιπαρά οξέα θαλάσσιας προέλευσης σε προϊόντα αρτοποιίας

Τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα ενσωματώνονται σε αρτοσκευάσματα, ζυμαρικά και γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γάλα, το γιαούρτι καθώς και σε χυμούς και μπάρες δημητριακών.

Σε μελέτη των Liu et al παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα στο πλάσμα και στην χοληστερόλη HDL (High Density Lipoprotein) καθώς και μείωση των τριγλυκεριδίων, σε 36 ασθενείς με υπερλιπιδαιμία που τράφηκαν με ψωμί που περιείχε ιχθυέλαιο (208). Οι Yee et al. (209) έδειξαν ότι το ψωμί που εμπλουτίζεται με μικροενθυλακωμένο έλαιο τόνου (Microencapsulated Tuna Oil), ήταν βιοδιαθέσιμο και προκάλούσε αύξηση των επίπεδων εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA) στο πλάσμα. Οι Harrison et al. (210), ανέπτυξαν λειτουργικά τρόφιμα ικανά να μειώσουν τους βασικούς παράγοντες κινδύνου σε άτομα που κινδυνεύουν να αναπτύξουν

στεφανιαία καρδιακή νόσο. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε αν η κατανάλωση ψωμιού, μπισκότων και μπαρών δημητριακών ενισχυμένων με DHA, θα είχε θετικό αντίκτυπο στα επίπεδα χοληστερόλης και στην αρτηριακή πίεση.

Το 2003 κατοχυρώθηκε μάλιστα με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μια μέθοδος ενσωμάτωσης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της σταθερότητας των ωμέγα-3 λιπιδίων (211). Κατά αυτή τη μέθοδο, έγινε μια προσέγγιση «πολλαπλών πυρήνων», ξεκινώντας από την «ενθυλάκωση» των λιπιδίων ωμέγα-3 και στη συνέχεια με την εφαρμογή ενός δεύτερου κελύφους πάνω από τα συσσωματωμένα λιπίδια. Αυτή η προσέγγιση οδηγεί σε ένα προϊόν που έχει πολλαπλά στρώματα προστασίας. Επί του παρόντος, η Ocean Nutrition Canada χρησιμοποιεί την τεχνολογία αυτή υπό το σήμα Powder-loc για να παράγει κάψουλες σκόνης ωμέγα-3. Η σκόνη που προκύπτει από αυτή τη διαδικασία μπορεί να περιέχει 500-800 mg ελαίου ανά γραμμάριο ξηρής σκόνης. Αντίθετα, στις τυπικές κάψουλες σκόνης, περιέχονται 200-350 mg ελαίου ανά γραμμάριο ξηράς σκόνης (207).

Στην Ευρώπη, η κατανάλωση ψωμιού που έχει εμπλουτιστεί με ωμέγα-3 PUFA, αυξάνεται σταθερά καθώς αναγνωρίζονται τα οφέλη αυτών των προϊόντων. Ως εκ τούτου, η χρήση του ψωμιού ως «τρόφιμο-φορέα» θα μπορούσε να επεκταθεί και σε άλλα, διαφορετικά θρεπτικά συστατικά (207).

5.2.1.2. Υδροκολλοειδή θαλάσσιας προέλευσης σε προϊόντα αρτοποιίας

Τα υδροκολλοειδή ή αλλιώς γνωστά ως κόμμεα, είναι μια κατηγορία μη αμυλούχων υδατοδιαλυτών υδατανθράκων που αποτελούν ένα από τα κύρια συστατικά των διαιτητικών ινών. Είναι ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και προέρχονται από φυτά, σπόρους, φύκη και μικροοργανισμούς.

Η επίδραση των υδροκολλοειδών που προέρχονται από την θάλασσα (αλγινικό νάτριο, κ-καραγενάνη) στην ποιότητα του φρέσκου ψωμιού και η επίδρασή τους στην διατήρηση της φρεσκότητας του ψωμιού μελετήθηκε από τους Guarda et al (212). Στη μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν οι φυσικές ιδιότητες (υγρασία, σκληρότητα και όγκος) και οι οργανοληπτικές ιδιότητες σε ψωμί, και φάνηκε πως τα υδροκολλοειδή θαλάσσιας προέλευσης συνείσφεραν στη μείωση της απώλειας υγρασίας και στο ρυθμό αφυδάτωσης της ψίχας κατά την αποθήκευση του ψωμιού. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, το αλγινικό άλας φάνηκε να δρα υπέρ της διατήρησης της φρεσκότητας, επιβραδύνοντας τη σκλήρυνση της ψίχας του ψωμιού.

5.2.2. Εφαρμογές σε προϊόντα ζυμαρικών

Τα ζυμαρικά αποτελούν ένα ακόμη τρόφιμο που έχει μελετηθεί ως πιθανός φορέας για την ενσωμάτωση σε αυτό συστατικών που προέρχονται από θαλάσσιους οργανισμούς.

Ειδικότερα, οι Prabhasankar et al. (213) ανέπτυξαν ζυμαρικά που περιείχαν καστανά ινδικά φύκια (*Sargassum marginatum*) ως συστατικό για τη βελτίωση

των βιολειτουργικών και θρεπτικών τους ιδιοτήτων. Διαφορετικές συγκεντρώσεις από φύκη σε ζυμαρικά, έδειξαν ότι η ενσωμάτωση των θαλάσσιων φυκών σε ποσοστό έως και 2.5%, συνείσφερε στη βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών καθώς και συνέβαλε στη δέσμευση και εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών.

Επιπλέον, διαφορετικά επίπεδα καφέ φυκών, *U. pinnatifida*, όταν ενσωματώθηκαν στην παρασκευή ζυμαρικών, παρουσίασαν επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τη θρεπτική αξία και τη βιολειτουργική ποιότητα των ζυμαρικών. Η αντικατάσταση των συστατικών των ζυμαρικών με σκόνη wakame βελτίωσε σημαντικά την περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνες και λίπη. Ομοίως, τα αυξημένα επίπεδα σκόνης wakame είχαν ως αποτέλεσμα και αυξημένη περιεκτικότητα στη συγκέντρωση των διαιτητικών ινών των ζυμαρικών. Η οργανοληπτική ανάλυση διαφόρων δειγμάτων ζυμαρικών έδειξε ότι τα δείγματα ζυμαρικών που περιέχουν σκόνη φυκών μέχρι 10% είχαν πιο βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Υψηλότερη ωστόσο περιεκτικότητα σε σκόνη wakame, είχε σαν αποτέλεσμα υψηλότερη αλατότητα στο τελικό προϊόν με αποτέλεσμα χαμηλότερο οργανοληπτικό προφίλ (214).

Τα ζυμαρικά και τα άλλα προϊόντα δημητριακών, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια καλή ευκαιρία για την επίτευξη της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου (LC n-3 PUFA), όπως είναι το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (DHA). Τα ζυμαρικά έχουν μελετηθεί για την ενσωμάτωση μικροενθυλακωμένων θρεπτικών ουσιών, όπως είναι η σκόνη

υψηλή σε LC n-3 PUFA, σταθεροποιημένη με τοκοφερόλες, παλμιτικό ασκορβύλιο και εκχύλισμα δενδρολίβανου. Η συγκεκριμένη μελέτη, έδειξε ότι αυτά παρουσιάζουν βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μειωμένες απώλειες EPA και DHA μετά το μαγείρεμα (215).

5.2.3. Εφαρμογές στην παραγωγή τυριών και στην επεξεργασία ψαριών

Τα υποπροϊόντα ψαριών έχουν μελετηθεί για την απομόνωση πεψινών από αυτά, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογές σε διαδικασίες ζύμωσης κατά την παραγωγή τυριών και κατά την επεξεργασία ιχθυρών.

Οι έρευνες γύρω από τις πεψίνες ψαριών όπως του σολομού Ατλαντικού και του μπακαλιάρου Ατλαντικού, ξεκίνησαν αρχικά με την απομόνωση των πεψινών αυτών και στη συνέχεια με τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής και αλληλουχίας των αμινοξέων τους (216-218). Γενικά, οι πεψίνες ιχθύων και θηλαστικών είναι δομικά παρόμοιες, ωστόσο υπάρχουν μερικές σημαντικές διαφορές που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του pH και την θερμοκρασία στην οποία εμφανίζουν τη βέλτιστη δραστηριότητα. Ιδιαίτερα οι πεψίνες από είδη ψαριών που ζουν σε κρύα νερά, είναι πιο δραστικές σε χαμηλές θερμοκρασίες και λιγότερο σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με τις πεψίνες των θηλαστικών. Παρουσιάζουν δε, βέλτιστη δραστηριότητα σε λιγότερο όξινες συνθήκες. Αυτές οι διαφορές καθιστούν τις πεψίνες των ιχθύων περισσότερο χρήσιμες από τις πεψίνες των θηλαστικών, σε περιπτώσεις όπου απαιτείται ήπια φυσική και χημική επεξεργασία προϊόντων τροφίμων (62).

Στη δεκαετία του 1980, η εφαρμογή πεψινών ιχθύων ως υποκατάστατων πυτιάς στην παραγωγή τυριού διερευνήθηκε διεξοδικά (219, 220). Παρόλο που ήταν δυνατή η παραγωγή τυριού καλής ποιότητας με τη χρήση διαφόρων πεψινών ιχθύων, η παραγωγή αυτή δεν ήταν ποτέ εμπορική, πιθανώς επειδή η βιομηχανία ανέπτυξε ανασυνδυασμένη παραγωγή χυμοσίνης κατά την ίδια περίοδο.

Στη Νορβηγία δοκιμάστηκε η χρήση της πεψίνης μπακαλιάρου Ατλαντικού για ήπια επεξεργασία ορισμένων πρώτων υλών ιχθύων. Μετά από ήπια επεξεργασία ψαριών, όπως είδη μπακαλιάρου, με πεψίνη σε ασθενείς όξινες συνθήκες, το δέρμα του ψαριού μπορούσε εύκολα να απομακρυνθεί με γρήγορο πέρασμα του από ένα σύστημα εκτόξευσης νερού (221).

5.2.4. Εφαρμογές στη παραγωγή σαλτσών

Αν και η σάλτσα ψαριών (fish sauce) ξεκίνησε να καταναλώνεται στη Νότια Ευρώπη πριν από περισσότερα από 2000 χρόνια (222), εξαφανίστηκε από το Δυτικό Κόσμο εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Στη Νοτιοανατολική Ασία όμως, η σάλτσα ψαριών έχει αναγνωριστεί ως ένα δημοφιλές είδος διατροφής εδώ και αιώνες (223). Σήμερα, μια αναβίωση στη κατανάλωση του προϊόντος συμβαίνει τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αμερική. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στη διεθνοποίηση των διατροφικών συνηθειών, λόγω της αυξημένης μετανάστευσης και του τουρισμού (62).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες, καθώς και η βιομηχανία, δείχνουν αυξημένο ενδιαφέρον για τη σάλτσα ψαριών. Λόγω μάλιστα της περιορισμένης

ποσότητας κατάλληλης πρώτης ύλης στην Ανατολή, το ενδιαφέρον για τη δημιουργία παραγωγής στη Δύση αυξάνεται (62).

Η σάλτσα ψαριών παρασκευάζεται από μικρά πελαγικά είδη ψαριών και υποπροϊόντα ψαριών, μετά από ζύμωση, παρουσία άλατος. Το μείγμα ψαριών-άλατος (σε αναλογία 3:1), αποθηκεύεται σε δεξαμενή, σε υψηλές θερμοκρασίες, για τουλάχιστον μισό χρόνο. Στο τέλος της διαδικασίας, αποστραγγίζεται ένα διάλυμα πρωτεΐνης από τον πυθμένα της δεξαμενής. Το αλμυρό υγρό που συλλέγεται αποτελεί τη σάλτσα ψαριού. Η σάλτσα ψαριών χρησιμοποιείται κυρίως σε πιάτα λαχανικών, είναι επομένως μια πλούσια πηγή απαραίτητων αμινοξέων για ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπων που ακολουθούν χορτοφαγική διατροφή (223).

Παρά το γεγονός ότι έχουν αποδοθεί αρκετές ιδιότητες στη σάλτσα ψαριών, συμπεριλαμβανομένου των θετικών επιδράσεων κατά των γαστρεντερικών ασθενειών, έχουν γίνει λίγες έρευνες για την επαλήθευση των ευεργετικών ιδιοτήτων της σάλτσας ψαριών. Σε πρόσφατη μελέτη ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων λευκών αιμοσφαιρίων κατά την *in vitro* καλλιέργεια των κυττάρων, παρουσίας πεπτιδίων που προέκυψαν μετά την υδρόλυση εμπορικής σάλτσας ψαριού αντσούγιας Ταϊλάνδης (224). Το αν η παρατήρηση αυτή αποκαλύπτει μια σημαντική πτυχή της υγείας που συνδέεται με την κατανάλωση σάλτσας ψαριών παραμένει προς επαλήθευση.

5.2.5. Εφαρμογές στη παραγωγή νέων προϊόντων ψαριού

Τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει επίσης η παραγωγή κιμά από υποπροϊόντα σολομού και θαλασσινών. Ο κιμάς αυτός χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή μπιφτεκιών και λουκάνικων (225). Ακόμα, στον ευρωπαϊκό διαγωνισμό καινοτόμων προϊόντων διατροφής Ecotrophelia 2011, που πραγματοποιήθηκε στην Κολονία της Γερμανίας, στο πλαίσιο της Έκθεσης Τροφίμων και Ποτών Anuga 2011, την πρώτη θέση κατέλαβε η ομάδα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου, παρουσιάζοντας ένα πρωτοποριακό αλλαντικό με το όνομα «Da Vero - Eco Seafood Cold Cuts». Το αλλαντικό αυτό αξιοποιούσε υποπροϊόντα θαλασσινών συνδυάζοντας έτσι τη διατροφική αξία των θαλασσινών και την οικολογική αξιοποίηση των υποπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων (30).

5.3 Επιχειρηματικό σχέδιο αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και με σκοπό τη μελέτη της επιχειρηματικής αξιοποίησης των υποπροϊόντων ψαριών ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας, συντάχθηκε το επιχειρηματικό σχέδιο της ιδέας αυτής με την ονομασία ProsPer (by-PROductSPowdERs). Παρακάτω παρουσιάζεται το επιχειρηματικό σχέδιο το οποίο κέρδισε το 2^ο βραβείο στο διαγωνισμό InnovinAgri του ΓΠΑ το 2018, το 1^ο βραβείο στο διαγωνισμό Trophy-Τροφή Challenge της Νέας Γεωργίας για τη Νέα Γενιά το 2019, ενώ τιμήθηκε και με το βραβείο “Maria Vlachou 2019” από το Future Agro Challenge στα πλαίσια

του Global Agripreneur Summit, και παρουσιάστηκε σε ραδιοφωνικές εκπομπές της Ελληνικής Ραδιοφωνίας Τηλεόρασης ΕΡΤ στο Πρώτο Πρόγραμμα, και του Αθηναϊκού Μακεδονικού Πρακτορείου Ειδήσεων ΑΜΝΑ. Ακόμα συνεντεύξεις της ομάδας συμπεριλήφθηκαν στα περιοδικά «Υπαιθρος Χώρα», «Agricola-BHMagazino» και «Επί Γης-Τράπεζα Πειραιώς» (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ).

Επιχειρηματικό Σχέδιο



Ιούνιος 2018

ProsPer
prosper.aua@gmail.com

5.3.1. Περίληψη του Επιχειρηματικού Σχεδίου

Η **ProsPer** (by**PRO**duct**SP**owd**ERs**) αποτελεί μια περιβαλλοντικά ευσυνείδητη εταιρεία που συμβάλλει στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, μέσω της παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από αυτά.

Ο κλάδος των ιχθυοκαλλιεργειών είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένος στη χώρα μας, ωστόσο η αξιοποίηση των υποπροϊόντων τους με τον τρόπο που προτάσσεται από την επιχείρησή μας δεν υφίσταται ακόμη.

Πρόκειται για μια spin-off εταιρία με τη νομική μορφή της Ιδιωτικής Κεφαλαιουχικής Εταιρείας (ΙΚΕ). Θα είναι μία εταιρία που θα έχει ως έδρα τα Πετράλωνα και θα χρησιμοποιεί τα εργαστήρια και τον αντίστοιχο εξοπλισμό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εταιρία θα απαρτίζεται από πέντε φυσικά πρόσωπα, ένα εκ των οποίων θα είναι μέλος ΔΕΠ του Γεωπονικού Πανεπιστημίου.

Η δραστηριότητα της εταιρίας θα περιλαμβάνει την δημιουργία πούδρων από υποπροϊόντα ψαριών με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Πούδρα με υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο
- Πούδρα με υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης.

Τα παραπάνω προϊόντα θα διανέμονται σε:

- Μικρομεσαίες Βιοτεχνίες και Συνεταιρισμούς τροφίμων με σκοπό την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας των προϊόντων τους.
- Χώρους μαζικής εστίασης όπου θα χρησιμοποιούνται ως ενισχυτικό γεύσης.

Στόχος της επιχείρησης είναι από την πρώτη ημέρα της λειτουργίας της να εστιάσει το ενδιαφέρον της στην ποιοτική εξυπηρέτηση της πελατείας της και στην κάλυψη των προσωπικών αναγκών τους, δημιουργώντας ένα ισχυρό όνομα αναγνωρισμένης υψηλής ποιότητας και διαφοροποιημένων προϊόντων στον κλάδο.

Στρατηγική μας είναι η κατάκτηση υψηλής θέσης στην αγορά, με την εμβάθυνση και διεύρυνση των ανταγωνιστικών πλεονεκτημάτων μας, που αφορούν κυρίως στην καταναλωτική αποδοχή του ονόματος και στην υγιή χρηματοοικονομική βάση της εταιρίας.

Σύμφωνα με την οικονομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, η εταιρία αρχίζει και δίνει κέρδη στους μετόχους από τον τρίτο χρόνο λειτουργίας της, κάτι το οποίο είναι φυσιολογικό και αποδεκτό από τους μετόχους.

Σκοπός αυτού του επιχειρηματικού σχεδίου είναι να παρατεθεί γραπτώς η παραπάνω ιδέα, ούτως ώστε να είναι εφικτή η αναγνώριση των δυνατών της σημείων, των αδυναμιών της, των ευκαιριών και των απειλών που μπορούν να προκύψουν κατά την υλοποίησή της.

5.3.2. Γενική Περιγραφή της Εταιρείας

Όραμά μας αποτελεί η δημιουργία μιας περιβαλλοντικά ευσυνείδητης εταιρείας που θα συμβάλλει στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, μέσω της παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από αυτά.

Στοχεύουμε στη δημιουργία προϊόντων πούδρας από τα υποπροϊόντα ψαριών, τα οποία θα χρησιμοποιούνται σαν πρώτη ύλη από πελάτες σε μικρομεσαίες βιοτεχνίες και συνεταιρισμούς τροφίμων.

Τα προϊόντα πούδρας θα διατίθενται επίσης σε χώρους μαζικής εστίασης (εστιατόρια, ψαροταβέρνες κ.α.) και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικά γεύσης ή ως πρώτες ύλες στην παρασκευή συνταγών.

Επιχειρηματική Φιλοσοφία

Στην Ελλάδα υπάρχει μια προσπάθεια για αειφόρο διαχείριση και προστασία των φυσικών πόρων. Στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, κατά την επεξεργασία των ψαριών παράγεται πλήθος υποπροϊόντων (κόκκαλα, δέρμα, κεφάλια) που μπορεί να ανέρχεται στο 50-60 % μετά από φιλετοποίηση. Αυτά δύναται να χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων πολύ χαμηλής αξίας (ζωοτροφές, βιοκαύσιμα και λιπάσματα) ή απορρίπτονται αυξάνοντας το ενεργειακό, περιβαλλοντικό και οικονομικό κόστος της μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας.

Η μεταποίηση των υποπροϊόντων για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας αποτελεί μια οικονομική, διατροφική και οικολογική

πρόκληση και στηρίζει την βιωσιμότητα της ιχθυοκαλλιέργειας στη χώρα, ενώ παράλληλα προάγει την αειφορία στα τρόφιμα από τον πρωτογενή τομέα μέχρι την κατανάλωση.

Πιστεύουμε ότι τα προϊόντα μας θα συμβάλλουν αφενός στην αειφορία του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας και την ελαχιστοποίηση των αποβλήτων. Αφετέρου δε, θα έχουν απήχηση σε εταιρείες και καταναλωτές που ψάχνουν υψηλής διατροφικής αξίας προϊόντα.

Τμηματοποίηση της αγοράς

Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την τμηματοποίηση της αγοράς βιομηχανικών προϊόντων (χονδρική πώληση) είναι το μέγεθος των επιχειρήσεων, ο κλάδος στον οποίο αυτές δραστηριοποιούνται και ο τρόπος χρήσης προϊόντων και υπηρεσιών.

Τμήμα I	Μικρο-μεσαίες βιοτεχνίες τροφίμων
	Βιομηχανίες που αναζητούν την καινοτομία και την πώληση τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας (αλευροποιίες, μακαρονοποιίες, βιομηχανίες παραγωγής σαλτσών και αλοιφών).
Τμήμα II	Χώροι μαζικής εστίασης
	Εστιατόρια και ψαροταβέρνες που επιθυμούν την δημιουργία νέων συνταγών με ενισχυμένη γεύση και

	διατροφική αξία.
--	------------------

Για την τμηματοποίηση της αγοράς καταναλωτικών προϊόντων (λιανική πώληση) χρησιμοποιήθηκαν δημογραφικά κριτήρια και προέκυψαν έτσι τρία τμήματα αγοράς:

Τμήμα I	Άνθρωποι με ενδιαφέρον στην κατανάλωση τροφίμων πλούσια σε ασβέστιο
	Καταναλωτές τρίτης ηλικίας (50 ετών και πάνω) κυρίως γυναίκες και οι care takers που ψωνίζουν για κάποιον άλλο (π.χ. για τα μικρά παιδιά).
Τμήμα II	Άνθρωποι με ενδιαφέρον στην κατανάλωση τροφίμων πλούσια σε πρωτεΐνη
	Κυρίως άτομα με έντονη αθλητική δραστηριότητα και fish-eating vegetarians.
Τμήμα III	Καταναλωτές που ενδιαφέρονται για την αγορά eco-friendly προϊόντων

Νομική μορφή εταιρείας

Πρόκειται για μια spin-off εταιρία με τη νομική μορφή της Ιδιωτικής Κεφαλαιουχικής Εταιρείας (ΙΚΕ). Θα είναι μία εταιρία που θα έχει ως έδρα τα Πετράλωνα και θα χρησιμοποιεί τα εργαστήρια και τον αντίστοιχο εξοπλισμό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εταιρία θα

απαρτίζεται από πέντε φυσικά πρόσωπα ένα εκ των οποίων θα είναι μέλος ΔΕΠ του Γεωπονικού Πανεπιστημίου . Βασικά χαρακτηριστικά της εταιρίας ΙΚΕ, είναι ότι πρόκειται για κεφαλαιουχική εταιρία και εντάσσεται στις εταιρίες που διαθέτουν αφενός κεφάλαιο κι αφετέρου περιορισμένη ευθύνη των μελών τους για τα εταιρικά χρέη. Το κεφάλαιο της ΙΚΕ καθορίζεται από τους εταίρους χωρίς περιορισμό. Το ελάχιστο κεφάλαιο είναι ένα ευρώ (1€), χωρίς ωστόσο να αποκλείεται να οριστεί από τους ενδιαφερόμενους υψηλότερο μέγεθος κεφαλαίου.

Ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη νομική μορφή για την εταιρεία μας είναι η ανάγκη για πρόσβαση στον εργαστηριακό εξοπλισμό του ΓΠΑ και η spin-off αποτελεί την πλέον συμφέρουσα οικονομικά λύση. Ακόμα η μορφή ΙΚΕ παρέχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Όπως προαναφέρθηκε, ο νόμος δεν ορίζει συγκεκριμένο ποσό κεφαλαίου για την σύστασή τους. Έτσι μία Ιδιωτική Κεφαλαιουχική Εταιρία μπορεί να συσταθεί με ελάχιστο δυνατό κεφάλαιο.
- Τα τέλη ίδρυσης και λειτουργίας είναι πολύ μικρότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα τέλη για την ίδρυση Ο.Ε, Ε.Ε, Ε.Π.Ε και Α.Ε.
- Για τους εταίρους της Ι.Κ.Ε η ασφάλιση είναι προαιρετική, ενώ ασφαρίζεται υποχρεωτικά μόνο ο διαχειριστής της ΙΚΕ, που ορίστηκε με το καταστατικό ή με απόφαση των εταίρων.
- Στις Ι.Κ.Ε οι εταίροι δεν ευθύνονται με την προσωπική τους περιουσία για τα χρέη της εταιρίας. Συνεπώς στις Ι.Κ.Ε για τις εταιρικές

υποχρεώσεις ευθύνεται μόνο η εταιρία με την περιουσία της και όχι με την περιουσία των εταίρων.

5.3.3. Προϊόντα και Υπηρεσίες

Η εταιρεία **ProsPer** θα παρέχει προϊόντα υψηλής απόδοσης για ποικίλες εφαρμογές και λειτουργίες στη βιομηχανία τροφίμων. Αρχικά θα ξεκινήσουμε με α) πούδρα πλούσια σε ασβέστιο και β) πούδρα υψηλή σε πρωτεΐνη.

Οι ισχυρισμοί διατροφής που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνοι με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τρόφιμα υψηλά σε ασβέστιο και υψηλά σε πρωτεΐνη (Κανονισμός (ΕΕ) Νο 1047/2012).

Σκοπεύουμε η γκάμα των προϊόντων μας να αυξάνεται σταθερά μέσω της συνεχούς ανάπτυξης νέων προϊόντων και τεχνολογιών διαμόρφωσης στους τομείς της σύστασης και της γεύσης.

Επενδύουμε έντονα στον τομέα των τροφίμων τον οποίο αναγνωρίζουμε ως έναν από τους σημαντικότερους τομείς ανάπτυξης μας.

Παράγοντες με ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα

Τα συστατικά και ο τρόπος παρασκευής των πουδρών της ProsPer είναι παράγοντες που προσφέρουν τα εξής πλεονεκτήματα στο προϊόν:

- Η υψηλής διατροφικής αξίας προϊόντα
- Η δυνατότητα στη βιομηχανία τροφίμων να δημιουργήσει νεωτεριστικά προϊόντα.

Ανάλυση Ανταγωνιστικότητας

Ανάλυση σύμφωνα με τις 5 δυνάμεις Porter:

Δυνάμεις	Στοιχεία	Απειλή
Είσοδος νέων ανταγωνιστών	Απαιτείται: <ul style="list-style-type: none">• Τεχνογνωσία• Μεγάλες Επενδύσεις σε R&D	Χαμηλή
Διαπραγματευτική δύναμη των προμηθευτών	<ul style="list-style-type: none">• Αρχικά λίγοι προμηθευτές• Δυνατότητα αλλαγής προμηθευτή	Χαμηλή
Διαπραγματευτική Δύναμη αγοραστών	<ul style="list-style-type: none">• Δυσμετάβλητα κόστη• Μικρό πλήθος μικρών αγοραστών	Χαμηλή
Απειλή υποκατάστατων προϊόντων	Υπαρξη γνωστών φαρμακευτικών σκευασμάτων με παρόμοια οφέλη για την υγεία του ανθρώπου	Υψηλή

Ανταγωνισμός μεταξύ υφιστάμενων επιχειρήσεων	Υψηλή Διαφοροποίηση προϊόντος Ειδικός μηχανολογικός εξοπλισμός	Χαμηλή
---	---	--------

Ανάλυση Κατάστασης SWOT

Η ανάλυση SWOT αναφέρεται περισσότερο στην επιχειρηματική ιδέα της αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών στην Ελλάδα, μιας και δεν υπάρχει ακόμη άμεσος ανταγωνισμός, και τα όποια δυνατά σημεία και πλεονεκτήματα της ProsPer, θα προκύψουν από την επιχειρηματική στρατηγική που προτείνεται στην συνέχεια. Με την ανάλυση SWOT θα μελετηθούν τα δυνατά (strengths) και τα αδύνατα (weaknesses) σημεία του κλάδου, καθώς και οι ευκαιρίες (opportunities) και απειλές (threats). Παρακάτω ακολουθεί συγκεκριμένη, απλή, σύντομη και ρεαλιστική παράθεση των στοιχείων SWOT, που αποτελεί την βάση για την αξιολόγηση και ιεράρχηση των κύριων θεμάτων και των στρατηγικών κατευθύνσεων marketing που θα προταθούν στη συνέχεια. Η συνδυαστική ανάλυση ευρημάτων SWOT, θα υποστηρίξει και θα τεκμηριώσει τις στρατηγικές μας κατευθύνσεις.

Strengths

- Καινοτόμο προϊόν
- Συνεργασία με ΓΠΑ που προσδίδει κύρος στο προϊόν μας και απαιτεί μικρή επένδυση
- Στηρίζει την αειφορία
- Συμβάλει στην μείωση των αποβλήτων
- Απευθύνεται σε niche market
- Υπάρχουν διαθέσιμοι πόροι
- Διαθέτουμε εκπαιδευμένους υπαλλήλους με γνώση του αντικειμένου
- Υπάρχει ποικιλία προϊόντων

Weaknesses

- Απευθυνόμαστε σε μη εξοικειωμένο κοινό
- Διεκδικούμε νέο μερίδιο στην αγορά
- Δεν υπάρχει προηγούμενη τιμολόγηση
- Υπάρχει πιθανή ανάγκη επέκτασης της εφοδιαστικής αλυσίδας στο μέλλον

Opportunities

- Δυνατότητα ένταξης στο ευρωπαϊκό πρόγραμμα Horizon 2020 για περαιτέρω χρηματοδότηση της έρευνάς μας
- Ο αριθμός των ευσυνείδητων καταναλωτών υπέρ της ευφορίας, προστασίας του περιβάλλοντος και «φυσικών» προϊόντων αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια
- Υπάρχουν “κενά” στην αγορά που να μπορεί να τα καλύψει η επιχείρηση, όπως ενισχυτικά γεύσης για ψάρια

Threats

- Εξάρτηση από λίγους πελάτες στο αρχικό στάδιο λειτουργίας της εταιρείας.
- Χρήση υποπροϊόντων ως ζωοτροφές
- Είσοδος νέων επιχειρήσεων
- Μείωση της αγοραστικής δύναμης
- Προγραμματισμένος μικροβιολογικός έλεγχος

Κύρια θέματα που προκύπτουν από την ανάλυση κατάστασης

Η ανάλυση SWOT καταδεικνύει πως η ProsPer, πρέπει να αντιμετωπίσει σημαντικά πρωταρχικά θέματα, των οποίων η σωστή αντιμετώπιση θα κρίνει την πορεία της.

Όπως προκύπτει, τα κύρια προβλήματα (και ευκαιρίες) που θα αντιμετωπίσει η εταιρεία αφορούν στο χώρο του μάρκετινγκ. Η στρατηγική μάρκετινγκ και επικοινωνίας θα πρέπει να απαντήσει πειστικά και κυρίως δημιουργικά σε βασικές ερωτήσεις όπως:

- Με τι χρήματα και με ποια στρατηγική θα αντιμετωπιστεί η έλλειψη αναγνωρισιμότητας και χρήσης του προϊόντος ;
- Πως θα προσελκύσουμε περισσότερους πελάτες;
- Πως θα προβλέψουμε σωστά τις μελλοντικές πωλήσεις μας ώστε να κάνουμε σωστό οικονομικό προγραμματισμό;
- Σε τι τιμή, με ποιες συσκευασίες και με ποιους όρους πληρωμής θα πρέπει να βγούμε στην αγορά;

5.3.4 Business Model Canvas

Κύριοι Συνεργάτες	Κύριες Δραστηριότητες	Πρόταση αξίας	Σχέσεις Πελατών	Ομάδες Πελατών
<ul style="list-style-type: none"> • Προμηθευτές (ιχθυοκαλλιέργειες) • Ιδιοκτήτες εστιατορίων, ταβερνών • Βιομηχανίες τροφίμων • Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 	<ul style="list-style-type: none"> • Παραγωγή σκόνης υποπροϊόντων • Διανομή • Επιστημονική έρευνα 	<ul style="list-style-type: none"> • Προσφορ ά 1ης ύλης υψηλής θρεπτικής αξίας • Καινοτόμο προϊόν • Προσφορ ά επιστημονικού υπόβαθρου • Κυκλική οικονομία 	<ul style="list-style-type: none"> • Προσωπική εξυπηρέτηση μέσω Internet 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρο-μεσαίες επιχειρήσεις τροφίμων (με ανάγκη από επιστημονική στήριξη) • Χώροι μαζικής εστίασης
	Κύριοι πόροι		Κανάλια επικοινωνίας	
	<ul style="list-style-type: none"> • Τεχνογνωσία παραγωγής • Επιστημονική κατάρτιση • Εργαστηριακός εξοπλισμός 		<ul style="list-style-type: none"> • Προσωπική επαφή με εταιρείες • Social media • E-mail • Υπεύθυνος πωλήσεων 	

Δομή κόστους	Ροές εσόδων
<ul style="list-style-type: none"> • Πάγια στοιχεία • Έξοδα λειτουργίας και marketing • Μισθοί/αμοιβές • Αναλώσιμα • Συντήρηση 	<ul style="list-style-type: none"> • Έσοδα από την πώληση της σκόνης • Έσοδα από την πώληση επιστημονικού υπόβαθρου

5.3.5. Σχέδιο Μάρκετινγκ

Οικονομικοί Παράγοντες

Η συνεχής αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και η βελτίωση του βιοτικού επιπέδου δημιουργούν αυξημένες ανάγκες για σίτιση και ιδιαίτερα για τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας. Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν ένα βήμα προς τη κατεύθυνση της κάλυψης των αναγκών αυτών. Συγκεκριμένα, η Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια επικεντρώνεται στην καλλιέργεια ψαριών όπως το λαβράκι και η τσιπούρα, αν και η καλλιέργεια των νέων παρεμφερών ειδών (κρانيός, μαγιάτικο, φαγκρί κλπ.) αναπτύσσεται συνεχώς.

Η Ελλάδα, η Τουρκία και η Ισπανία αποτελούν τις βασικές χώρες παραγωγούς τσιπούρας και λαβρακιού, παράγοντας περίπου το 80% της παγκόσμιας παραγωγής. Για την χώρα μας, ο κλάδος αυτός συγκαταλέγεται ανάμεσα στις μεγαλύτερες εξαγωγικές δυνάμεις της, καθώς περίπου το 78% της συνολικής παραγωγής του κλάδου εξάγεται, με κύρια κατεύθυνση την Ευρώπη. Σαν σύνολο, οι εξαγωγές αυτές καλύπτουν πάνω από το 2% των συνολικών εξαγωγών της χώρας και περίπου το 10% των εξαγωγών του πρωτογενούς τομέα. Οι μεγαλύτερες ελληνικές εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας μέχρι πρότινος στην Ελλάδα ήταν οι Νηρέυς, Σελόντα Ανδρομέδα Γαλαξίδι, κλπ.¹

¹ Το κείμενο αυτό φτιάχτηκε το 2018. Μετά την τελευταία αναδιάρθρωση του κλάδου το 2020 οι εταιρείες ΝΗΡΕΥΣ και ΣΕΛΟΝΤΑ εξαγοράστηκαν από την Ανδρομέδα. Έτσι σήμερα Οι μεγαλύτερες ελληνικές εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας για την Ελλάδα είναι η Ανδρομέδα, η Κεφαλλονιά, η Φιλοσοfish, το Γαλαξίδι, κλπ

Ενδεικτικά, για τον όμιλο ιχθυοκαλλιέργειών ΝΗΡΕΥΣ, που αποτελεί τον μεγαλύτερο όμιλο αυτή τη στιγμή στην Ελλάδα, όπως αναφέρεται στο έντυπο της έκθεσης Βιώσιμης Ανάπτυξης 2016 και στο κεφάλαιο για τα στερεά απόβλητα, τα υποπροϊόντα μεταποίησης ανέρχονται στους 1.203 τόνους ετησίως με άμεσο τρόπο διαχείρισής τους να αποτελεί η δημιουργία πρώτων υλών για ζωοτροφές.

Ακόμα, το ψάρι αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής και βασική πηγή πρωτεϊνών. Από τα πλέον σημαντικά θρεπτικά συστατικά των ψαριών είναι τα ω-3 λιπαρά, τα οποία δρουν προστατευτικά για τον οργανισμό μας. Ταυτόχρονα, τα ψάρια είναι πλούσια σε φώσφορο, ασβέστιο και μαγνήσιο, τρία μεταλλικά στοιχεία σημαντικά για τη σωστή ανάπτυξη των κοκάλων και τη διατήρηση ενός γερού σκελετού.

Έχοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, σκοπός της ProsPer είναι η αξιοποίηση των υπολειμμάτων από τη φιλετοποίηση των ψαριών για τη δημιουργία νέων προϊόντων πούδρας με υψηλή προστιθέμενη αξία για τη χρήση ως πρώτη ύλη σε:

- Μικρομεσαίες βιοτεχνίες και συνεταιρισμούς τροφίμων με σκοπό την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας των προϊόντων τους.
- Χώρους μαζικής εστίασης όπου θα χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης.

Οι παραπάνω αγορές στις οποίες στοχεύουμε φαίνεται να έχουν αρκετά μεγάλη απήχηση στον τελικό καταναλωτή. Για το λόγο αυτό είναι αρκετά συνετό να θεωρήσουμε ότι οι παραπάνω επιχειρήσεις στον εκάστοτε κλάδο είναι οι πλέον κατάλληλες για επενδυτικές δραστηριότητες. Συγκεκριμένα,

σε ότι αφορά τις μικρομεσαίες βιοτεχνίες και συνεταιρισμούς τροφίμων στους οποίους η χρήση της πούδρας ενδείκνυται ως ενισχυτικό θρεπτικής αξίας των τελικών τους προϊόντων, έρευνες έχουν δείξει ότι οι καταναλωτές δείχνουν θετική πρόθεση αγοράς σε καινοτόμα προϊόντα, και κυρίως σε ό,τι αφορά την υγιεινή διατροφή (<http://dspace.aua.gr/xmlui/handle/10329/6007>). Τέλος, η απόλαυση ενός υγιεινού και ταυτόχρονα θρεπτικού πιάτου είναι ο κατάλληλος συνδυασμός, τον οποίο στοχεύουμε να επιτύχουμε παρέχοντας το προϊόν μας σε χώρους μαζικής εστίασης.

Ωστόσο, για καινοτόμα προϊόντα, όπως αυτά της ProsPer, υπάρχουν και διάφορα εμπόδια εισόδου στην αγορά που οφείλουν να ξεπεραστούν. Πρωταρχικό εμπόδιο αποτελεί η αποδοχή και η αναγνώριση της μάρκας από τους πελάτες μας. Η έννοια της αξιοποίησης υποπροϊόντων για τη δημιουργία ενός καινούριου προϊόντος προς κατανάλωση, δεν είναι αποδεκτή. Για το λόγο αυτό απευθυνόμαστε σε εταιρείες που έχουν ενσωματώσει ή είναι στη διαδικασία ενσωμάτωσης του όρου της αειφορίας, όπου έννοιες όπως η κυκλική οικονομία και η μείωση της σπατάλης τροφίμων αποτελούν δύο από τους βασικούς πυλώνες της. Σαφώς, σημαντικό ρόλο στην αποδοχή της εταιρίας θα διαδραματίσει το marketing της ίδιας και των προϊόντων της, το κόστος του οποίου αναμένεται να είναι υψηλό προκειμένου να καταφέρουμε να κατακτήσουμε ένα μερίδιο στην αγορά. Όντας μία spin-off, η οποία θα αξιοποιεί τις εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τα πάγια κόστη της επιχείρησης αναμένονται να είναι χαμηλά γεγονός που δίνει την ευκαιρία για επενδύσεις σε άλλους τομείς όπως το marketing, τη βελτίωση του προϊόντος κ.λ.π. και ταυτόχρονα προσδίδει κύρος στο προϊόν μας.

Η στροφή προς τη αειφόρα ανάπτυξη αποτελούσε και συνεχίζει να αποτελεί σημαντικό μέρος για την επιτυχία μιας επιχείρησης ανεξαρτήτου μεγέθους. Η ProsPer όντας μια περιβαλλοντικά ευσυνείδητη εταιρεία που συμβάλλει στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, μέσω της παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από αυτά, δε σκοπεύει να απέχει από τη κατεύθυνση αυτή.

Γνωρίζουμε ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης, και οι αλλαγές που επέρχονται με αυτούς τη σήμερον ημέρα, είναι αρκετά ταχείς και σημαντικές αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, έχουμε ως στόχο την απασχόληση μόνιμου προσωπικού, το οποίο θα μοιράζεται το ίδιο πάθος και σοβαρότητα για το όραμα στο οποίο στοχεύουμε. Προκειμένου να συμβεί αυτό, οι συνεχείς εκπαιδεύσεις και ενημερώσεις για τις τελευταίες τάσεις στα θέματα τεχνολογίας είναι απαραίτητες για όλους τους εταίρους της ProsPer. Επιπλέον, είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη μας και τη πολιτική αστάθεια και τις συνεχείς αλλαγές τόσο σε νομοθετικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο. Σκοπός της εταιρείας μας είναι η εναρμόνιση της λειτουργίας της σε οποιαδήποτε αλλαγή επέλθει στους παραπάνω τομείς.

Προϊόν/Υπηρεσία

Τα προϊόντα της ProsPer προέρχονται από την αξιοποίηση των υποπροϊόντων ιχθυοκαλλιεργειών της Ελλάδας. Υπάρχουν ποικίλοι τρόποι με τους οποίους αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ωστόσο τα προϊόντα της ProsPer προσφέρουν τη δυνατότητα δημιουργίας τροφίμων πρόσθετης διατροφικής αξίας για ανθρώπους. Με την κατάλληλη επεξεργασία

προκύπτουν τα παρακάτω τρία είδη προϊόντων πούδρας που θα προωθηθούν στην αγορά.

- Πούδρα με υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο.
- Πούδρα με υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης.

Το κυριότερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι, όλα τα παραπάνω προϊόντα προέρχονται από την αξιοποίηση των υποπροϊόντων που προκύπτουν από τις ιχθυοκαλλιέργειες. Έχοντας το επιστημονικό υπόβαθρο, η ProsPer είναι ικανή να προσφέρει στην αγορά πρώτες ύλες με προσαρμοσμένες ιδιότητες στις απαιτήσεις του εκάστοτε πελάτη-εταιρεία. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, θα υπάρχει άμεση τεχνική υποστήριξη για οποιοδήποτε προβληματισμό από τα κατάλληλα μέλη της ProsPer. Επιπλέον, όντας μια εταιρεία με όραμα για συνεχή ανάπτυξη και βελτίωση θέλουμε να γνωρίζουμε την αντίληψη του κάθε πελάτη, πράγμα που θα υλοποιείται με τη συμπλήρωση ενός σύντομου ηλεκτρονικού ερωτηματολογίου στον καθένα από αυτούς.

Πελάτες

Όπως προαναφέρθηκε η ProsPer απευθύνεται σε μικρομεσαίες βιοτεχνίες και συνεταιρισμοί τροφίμων και σε χώρους μαζικής εστίασης.

Για το σκοπό αυτό, η περιοχή στην οποία θα δραστηριοποιηθεί η ProsPer προκειμένου να διανέμει τα προϊόντα της είναι η Αττική. Η επιλογή της παραπάνω τοποθεσίας προκύπτει από το γεγονός ότι θέλουμε οι πελάτες μας τα πρώτα χρόνια λειτουργίας της εταιρείας να βρίσκονται κοντά στην

έδρα και στα εργαστήρια αυτής ώστε να έχουμε μειωμένα κόστη διανομής και διαφήμισης.

Ανταγωνισμός

Ουσιαστικά, στη φάση που βρισκόμαστε σήμερα, δεν υπάρχει άμεσος ανταγωνισμός μεταξύ επιχειρήσεων που αξιοποιούν υποπροϊόντα ψαριών με σκοπό να αξιοποιηθούν για τη δημιουργία προϊόντων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση σε επίπεδο B2B.

Αυτή τη στιγμή υπάρχουν εταιρείες που αξιοποιούν τα υποπροϊόντα των ψαριών για τη παραγωγή ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων, τα οποία αποτελούν κύριο συστατικό των ιχθυοτροφών. Ωστόσο εμείς, ξεκινώντας από μια μικρού κόστους πρώτη ύλη και με χαμηλό κόστος λειτουργείας και παραγωγής, μπορούμε να διεκδικήσουμε μεγαλύτερη ποσότητα πρώτης ύλης από την αγορά και να αυξήσουμε τα μεγέθη της παραγωγής μας όταν υπάρξει η αντίστοιχη ζήτηση.

Εκτός όμως από τους παραπάνω προφανείς ανταγωνιστές, η επιχείρησή μας έχει και σημαντικούς έμμεσους ανταγωνιστές, κυρίως εταιρείες που παράγουν έτοιμες σάλτσες, χωρίς προστιθέμενη αξία, και τις προωθούν προς κατανάλωση στο ευρύ κοινό. Αν και οι παραπάνω εταιρείες είναι διαφορετικού τύπου (B2C), θα πρέπει να ληφθούν υπόψη, εφόσον οι μικρομεσαίες επιχειρήσεις για σάλτσες που επιθυμούμε να απευθυνθούμε υπάγονται στην ίδια κατηγορία με αυτές (B2C) και θα αξιοποιούν το καινοτόμο προϊόν μας για τη δημιουργία μιας σάλτσας με υψηλή διατροφική αξία.

Η «Θέση» μας στην Αγορά (your niche)

Αν και υπάρχουν αρκετές εταιρείες, οι οποίες ασχολούνται με τη προώθηση και πώληση φυσικών πρώτων υλών, αυτές αφορούν κυρίως προϊόντα φυτικής προέλευσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να χρειαστεί να χτίσουμε τη «θέση» μας στην αγορά που απευθυνόμαστε, παραμένοντας σταθεροί στις αξίες που πρεσβεύουμε.

Στρατηγική Μάρκετινγκ

Σαν πρώτο βήμα στη προώθηση των προϊόντων θα είναι η προσωπική προσέγγιση των πελατών μας. Θεωρούμε ιδιαίτερα σημαντική την προσωπική επαφή μαζί τους καθώς έτσι θα μπορέσουμε να καλύψουν οποιαδήποτε απορία γεννηθεί, σχετικά με τα προϊόντα μας. Σε οποιαδήποτε προσωπική επαφή που θα έχουμε με τους ενδιαφερόμενους πελάτες μας, θα παρέχονται φυλλάδια-μπροσούρες, με τη γκάμα των προϊόντων που προσφέρουμε και τις ιδιότητες του καθενός, καθώς και πληροφορίες για την ίδια την επιχείρηση (διεύθυνση, τηλέφωνο, κλπ). Επιπλέον, η τακτική ενημέρωση τους μέσω της ιστοσελίδας μας και τακτικών e-mail με newsletter, για τα προϊόντα και τις τελευταίες τάσεις στο κλάδο που έχει επιλέξει να δραστηριοποιηθεί η επιχείρηση μας, αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της προώθησης των προϊόντων μας.

Αναγνωρίζουμε τη δύναμη του διαδικτύου τη σημερινή εποχή. Για το λόγο αυτό, πρωταρχικό μέσο προώθησης θα αποτελεί η ιστοσελίδα της εταιρείας μας. Μέσα από την ιστοσελίδα μας ο εκάστοτε ενδιαφερόμενος θα μπορεί να λαμβάνει οποιαδήποτε πληροφορία για την επιχείρηση μας (όραμα, μέλη, τοποθεσία, επικοινωνία κλπ.) καθώς και για τη γκάμα των προϊόντων μας.

Ταυτόχρονα, στοχεύουμε στη πλήρη αξιοποίηση των σύγχρονων μέσων μαζικής ενημέρωσης (δημιουργία σελίδας στο Facebook και εταιρικού profile στο LinkedIn), προκειμένου ο εκάστοτε ενδιαφερόμενος να μπορεί να ενημερώνεται για τις δραστηριότητες της εταιρείας.

Μέρος της φιλοσοφίας μας αποτελεί η συνεχής ανάπτυξη και βελτίωση της επιχείρησής μας. Έχοντας αυτό κατά νου θέλουμε να συμμετέχουμε σε εκθέσεις που αφορούν επαγγελματίες του χώρου των τροφίμων (π.χ. Food EXPO), ώστε να μπορέσουμε να έρθουμε σε επαφή με αυτούς και να διευρύνουμε το πελατολόγιο μας.

Κανάλια Διανομής

Τα προϊόντα μας σε αρχική φάση θα τα διανέμουμε οι ίδιοι στους πελάτες μας. Επομένως αρχικά δεν υπάρχει ανάγκη για μεσάζοντα. Στο μέλλον, και εφόσον η παραγωγή το απαιτεί, θα εξετάσουμε εκ νέου το ενδεχόμενο για χρήση μεσαζόντων.

Πρόβλεψη Πωλήσεων

Για την καλύτερη πρόβλεψη των πωλήσεων έγινε χρήση του μοντέλου Bass. Το μοντέλο προβλέπει την υιοθέτηση των νέων προϊόντων με βάση την προβολή της επιχείρησης και συγκεκριμένα την διαφημιστική εκστρατεία στα μέσα μαζικής ενημέρωσης αλλά και την φήμη που απόκτά το νέο προϊόν. Η επιρροή των μεσών μαζικής ενημέρωσης αφορά εκείνους τους καταναλωτές οι οποίοι είναι καινοτομικοί. Η επιρροή της φήμης του νέου προϊόντος από την άλλη, επηρεάζει εκείνους τους καταναλωτές οι οποίοι είναι μιμητές αφού αυτοί στηρίζονται σε άλλους προκειμένου να δοκιμάσουν το νέο προϊόν. Έτσι το μοντέλο με βάση την υιοθέτηση από τους

καινοτομικούς καταναλωτές και τους μιμητές ποσοτικοποιεί την εισαγωγή του νέου προϊόντος υπολογίζοντας αντίστοιχα τους ρυθμούς αποδοχής και υιοθέτησης.

Η καλύτερη εκτίμηση των πωλήσεων είναι η συνεχόμενη αύξηση της παραγωγής κάθε χρόνο. Σε αυτή την περίπτωση η επιχείρηση θα αυξήσει και τα κέρδη της.

Το χειρότερο σενάριο είναι το γεγονός να υπάρχει αποθεματικό προϊόν, το οποίο είναι ένα μη επικερδές σενάριο για την εταιρία και θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με εναλλακτικές λύσεις.

5.3.6. Σχέδιο Λειτουργίας

Προτεινόμενη Τοποθεσία της Επιχείρησης

Η έδρα της εταιρείας θα βρίσκεται στα Κάτω Πετράλωνα, σε ιδιόκτητο διαμέρισμα 70τμ, εξοπλισμένο με υπολογιστές, διαδίκτυο και τηλέφωνο ώστε να γίνεται εύκολα η επικοινωνία με τους πελάτες και τους προμηθευτές και τα meetings της εταιρείας. Το προσωπικό της εταιρείας θα μπορεί εύκολα να κινείται μεταξύ Γεωπονικού Πανεπιστημίου και έδρας όταν είναι απαραίτητο.

Η εταιρεία μας θα λειτουργεί ως μια spin-off. Τα εργαστήρια της εταιρείας όπου θα γίνεται η παραγωγή των προϊόντων και το R&D θα βρίσκονται εντός του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Έτσι θα έχουμε εύκολη πρόσβαση σε σύγχρονο εργαστηριακό εξοπλισμό χωρίς να είναι απαραίτητη η αγορά καινούργιου. Το ΓΠΑ είναι εύκολα προσβάσιμο καθώς βρίσκεται

κοντά σε σταθμό του μετρό και διαθέτει χώρο στάθμευσης αυτοκινήτων. Το γεγονός ότι η εταιρεία θα μπορεί να χρησιμοποιήσει εργαστήρια του ΓΠΑ θα λειτουργήσει θετικά σε θέματα ποιότητας και μάρκετινγκ και θα προσθέσει στα προϊόντα μας επιστημονικό κύρος.

Τα εργαστήρια στα οποία θα πραγματοποιείται η παρασκευή των προϊόντων πούδρας, η αποθήκευση αυτών και οι απαραίτητες μελέτες R&D θα πραγματοποιούνται σε τρία εργαστήρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η εταιρεία χρησιμοποιώντας τα εργαστήρια του ΓΠΑ θα διαθέτει, λυοφιλιωτή, βαθιά κατάψυξη και όλα τα απαραίτητα όργανα για τις αναλύσεις όπως GC, φωτόμετρο, συσκευή καύσης Kjeldahl.

Στο γεωπονικό θα καταβάλετε ετησίως ποσό για την χρησιμοποίηση των χώρων (3-10% επί των κερδών).

Τα μέλη της εταιρείας έχουν το επιστημονικό υπόβαθρο και την εκπαίδευση ώστε να συμμετέχουν στην παραγωγή του προϊόντος, στον ποιοτικό έλεγχο αυτού και στην ανάπτυξη νέας έρευνας και τεχνολογίας. Ακόμα τα ίδια μέλη, θα επικοινωνούν με τους πελάτες και τους προμηθευτές.

Πρόσβαση

Οι εγκαταστάσεις μας είναι εύκολα προσβάσιμες όσον αφορά στη συγκοινωνία. Τόσο η έδρα μας όσο και τα εργαστήρια είναι πλησίον στάσεων μετρό και λεωφορειών, ενώ η εθνική οδός βρίσκεται σε κοντινή επίσης απόσταση. Αυτό θα διευκολύνει τους προμηθευτές μας.

Το ωράριο εργασίας θα είναι ευέλικτό και κατά μέσο όρο θα είναι οκτάωρο.

Παραγωγή

Τα προϊόντα θα παράγονται στο χώρο του ΓΠΑ. Ειδικότερα η πρώτη ύλη θα έρχεται στο χώρο του πανεπιστημίου υπό ψύξη με φορτηγά της εταιρείας ιχθυοκαλλιέργειας. Άμεσα θα πραγματοποιούνται οι απαραίτητοι έλεγχοι ποιότητας και ασφάλειας (μικροβιολογικός έλεγχος, έλεγχος βαρέων μετάλλων) και παστερίωση των πρώτων υλών. Η πρώτη ύλη θα αποθηκεύεται στους -80 °C.

Ακολούθως για την παραγωγή των τριών προϊόντων πούδρας, η πρώτη ύλη θα λυοφιλιώνεται υπό ψύξη και θα ομογενοποιείται.

- Για το προϊόν πούδρας υψηλό σε ασβέστιο θα γίνονται πιστοποιήσεις για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους πελάτες ο εν λόγω ισχυρισμός.
- Για το προϊόν πούδρας υψηλό σε πρωτεΐνη θα γίνονται πιστοποιήσεις για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους πελάτες ο εν λόγω ισχυρισμός.

Η ποσότητα του τελικού προϊόντος θα είναι η μισή της χρησιμοποιηθείσας πρώτης ύλης καθώς στο στάδιο της λυοφιλίωσης εξαχνώνεται το σύνολο του ύδατος (50% επί του αρχικού τροφίμου) που περιέχεται στην πρώτη ύλη. Έτσι το εκάστοτε τελικό προϊόν ζυγίζει την μισή ποσότητα του αρχικού.



Στο τέλος των διαδικασιών αυτών, τα προϊόντα μας θα ελέγχονται και πάλι για το μικροβιολογικό τους φορτίο, θα συσκευάζονται και θα αποθηκεύονται υπό ψύξη.

Η επικοινωνία με τους προμηθευτές και η εξυπηρέτηση των πελατών θα γίνεται στα γραφεία μας στην έδρα της εταιρείας, ενώ αν κάποιος πελάτης θα θελήσει να δει τα εργαστήρια, θα μπορεί να μας επισκεφτεί στο ΓΠΑ.

Γραφειοκρατικές Απαιτήσεις:

Άδεια λειτουργίας

Όλες οι επιχειρήσεις τροφίμων και ποτών που ανήκουν στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας Διάταξης, υποχρεούνται να κατέχουν ΑΔΕΙΑ ίδρυσης και λειτουργίας της αρμόδιας αρχής, σύμφωνα με τις διαδικασίες της κείμενης Νομοθεσίας, βάσει της Υ.Α. Υ1γ/Γ.Π/ οικ. 96967/8-10-2012 (ΦΕΚ 2718, τ.β', 8-10-2012) και βάσει της Εγκύκλιου 2 Αριθ.Πρωτ.Υ1γ/Γ.Π/οικ.4476.

Απαιτούμενα δικαιολογητικά για άδεια ίδρυσης και λειτουργίας

1. Αίτηση-Υπεύθυνη Δήλωση με Δύο φωτογραφίες

2. Αντίγραφο οικοδομικής άδειας

3. Σχεδιαγράμματα & τομές του καταστήματος εις τριπλούν (3) υπογεγραμμένα από Μηχανικό, από τα οποία να προκύπτει ότι ο χώρος είναι κύριας χρήσης προοριζόμενος για ΚΥΕ, σε κλίμακα που θα αναφέρεται ρητά επί του σχεδίου και στο οποίο θα αποτυπώνονται όλοι οι χώροι του Κ.Υ.Ε. περιλαμβανομένων και διατάξεις του ισχύοντος νομικού πλαισίου (π.χ. τουαλέτες για Α.Μ.Ε.Α.) και ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ

4. Βεβαίωση καταλληλότητας ηλεκτρολογικού, μηχανολογικού εξοπλισμού και εγκαταστάσεων από τον κατά περίπτωση αρμόδιο εγκαταστάτη μηχανικό (αγωγοί μεταφοράς οσμών, αερίων, καπνών, συστημάτων Α.Π.Ε. κλπ)

5. Υπεύθυνη Δήλωση του Ν. 1599/1986 στην οποία να δηλώνονται τα ακόλουθα : «Ο/Η κάτωθι υπογράφων/ουσα δεν έχω καταδικαστεί τελεσίδικα για κανένα από τα αδικήματα που αναφέρονται στις διατάξεις του άρθρου 1 παρ. 2 του π.δ. 180/1979, όπως αυτό ισχύει» - Στην περίπτωση όπου την αίτηση υποβάλλει εταιρεία, κατατίθενται υπεύθυνες δηλώσεις του Ν. 1599/1986 του εκπροσώπου και του υγειονομικού υπευθύνου της εταιρίας, όλων των μελών της εταιρίας και του Διοικητικού Συμβουλίου καθώς και την υπεύθυνη δήλωση αποδοχής από τον ορισθέντα

6. Πιστοποιητικό πυροπροστασίας, ανάλογα με το είδος του καταστήματος, σύμφωνα με τις 3/1981 (B 20) και 8γ/2007 (B 12) Πυροσβεστικές Διατάξεις όταν η οικ. άδεια έχει εκδοθεί μέχρι 17/2/89 ή σύμφωνα με το Π.Δ. 71/1988 (A 32) όταν η οικ. άδεια έχει εκδοθεί μετά τις 17/2/1989
7. Παράβολο σύμφωνα με την ΚΥΑ 61167/17-12-2007 (ΦΕΚ 2438 Β), (185 ΕΥΡΩ)
8. Έναρξη επιτηδεύματος από την Εφορία
9. Βεβαίωση περί μη οφειλής στο Δήμο
10. Πιστοποιητικό υγείας
11. Τίτλοι κυριότητας του καταστήματος και πρόσφατο πιστοποιητικό μετεγγραφής από το υποθηκοφυλακείο ή συμφωνητικό μισθώσεως, θεωρημένο από την Εφορία ή άλλο νόμιμο έγγραφο από το οποίο θα αποδεικνύεται η κυριότητα ή η μίσθωση
12. Άδεια άσκησης επαγγέλματος ή σχ. Βεβαίωση, για τις περιπτώσεις όπου απαιτείται (π.χ. κουρέα, κομμωτή κ.λ.π) του προσώπου στο όνομα του οποίου εκδίδεται η άδεια ή προσώπου που δηλώνεται ότι θα απασχοληθεί στο κατάστημα και είναι κάτοχος αντίστοιχης άδειας. Στην περίπτωση που η άσκηση του συγκεκριμένου επαγγέλματος διέπεται από τις διατάξεις των άρθρων 1,2, & 3 του Ν. 3919/2011(ΦΕΚ 32/Α/2-3-2011), αντί της άδειας άσκησης επαγγέλματος, δύναται να απαιτηθεί απλή βεβαίωσης της αρμόδιας αρχής ότι ο ενδιαφερόμενος πληροί όλες τις νόμιμες προϋποθέσεις για την άσκηση του επαγγέλματος αυτού.

13. Πιστοποιητικό εκπαίδευσης του υπευθύνου της επιχείρησης στην υγιεινή και ασφάλεια τροφίμων.

Αφού εγκριθεί η άδεια ίδρυσης και λειτουργίας στη συνέχεια απαιτείται η έγκριση κωδικού αριθμού της εγκατάστασης που δίνεται από τον ΕΦΕΤ. Η λειτουργία της εταιρείας μας διέπεται από τις πιο κάτω προϋποθέσεις:

Την τήρηση των διατάξεων των Κανονισμών 852/04 συστήματος αυτοελέγχου (HACCP), 853/04, 854/04, 882/04 και 2073/05 που αφορούν τους βασικούς κανόνες υγιεινής και τους ελέγχους στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Αυτό σημαίνει ότι τηρούνται όλες οι Ευρωπαϊκές Προδιαγραφές και οι κανόνες υγιεινής για τα εργαστήρια τροφίμων σε όλα τα επίπεδα.

Κανονισμοί υγείας, εργασιακού χώρου και περιβάλλοντος

Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων και ποτών οφείλουν να εγκαθιστούν, να εφαρμόζουν και να διατηρούν διαδικασίες που βασίζονται στις 7 αρχές του HACCP, σύμφωνα με το άρθρο 5 του Κανονισμού 852/2004.

Άρθρο 5 ΕΚ 852/2004 : Ανάλυση κινδύνων και κρίσιμα σημεία ελέγχου :

1. Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων θεσπίζουν, εφαρμόζουν και διατηρούν πάγια διαδικασία ή διαδικασίες βάσει των αρχών HACCP.
2. Οι αρχές HACCP που αναφέρονται στην παράγραφο 1 είναι:

1) να εντοπίζονται οι τυχόν πηγές κινδύνου οι οποίες πρέπει να προληφθούν, να εξαλειφθούν ή να μειωθούν σε αποδεκτά επίπεδα·

- 2) να εντοπίζονται τα κρίσιμα σημεία ελέγχου στο ή στα στάδια στα οποία ο έλεγχος είναι ουσιαστικής σημασίας για την πρόληψη ή την εξάλειψη μιας πηγής κινδύνου ή τη μείωσή της σε αποδεκτά επίπεδα·
- 3) να καθορίζονται κρίσιμα όρια στα κρίσιμα σημεία ελέγχου, με τα οποία χωρίζεται το αποδεκτό από το μη αποδεκτό όσον αφορά την πρόληψη, την εξάλειψη ή τη μείωση των εντοπιζόμενων πηγών κινδύνου·
- 4) να καθορίζονται και να εφαρμόζονται αποτελεσματικές διαδικασίες παρακολούθησης στα κρίσιμα σημεία ελέγχου·
- 5) να καθορίζονται τα διορθωτικά μέτρα όταν διαπιστώνεται κατά την παρακολούθηση ότι ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου δεν βρίσκεται υπό έλεγχο·
- 6) να καθορίζονται διαδικασίες, οι οποίες διεξάγονται τακτικά, για να επαληθεύεται ότι τα μέτρα που αναφέρονται να λειτουργούν αποτελεσματικά
- 7) να καταρτίζονται έγγραφα και φάκελοι ανάλογα με τη φύση και το μέγεθος της επιχείρησης τροφίμων, ώστε να αποδεικνύεται η ουσιαστική εφαρμογή των μέτρων που αναφέρονται

Ειδικοί κανονισμοί που καλύπτουν τον κλάδο

Το νομοθετικό πλαίσιο που διέπει τις εταιρείες Spin-Off στην Ελλάδα χαρακτηρίζεται από τους νομικούς ως ένα πολύπλοκο νομικό πλαίσιο, όπου κάθε νόμος συμπληρώνει και τροποποιεί τον προηγούμενο. Πέντε είναι τα βασικά νομοθετήματα που αφορούν την ίδρυση Spin-Off εταιρειών, που συμπληρώνονται από Προεδρικά Διατάγματα και Υπουργικές αποφάσεις,

ενώ ακολουθούν πάντα τις οδηγίες και τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Γραφειοκρατικά, απαιτείται η δημιουργία ενός καταστατικού καθώς και ένα έγγραφο σύμβασης της σχέσης της εταιρείας μας με το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και στην συνέχεια η έγκρισή τους από την Σύγκλητο του Πανεπιστημίου.

Ιστορικά προπομπός των Spin-Off εταιρειών θεωρείτε ο Νόμος 1514/1985, όπου προβλέπει, στο άρθρο 3 παρ. 5, τη σύσταση επιχειρήσεων «με σκοπό την εφαρμογή και αξιοποίηση των αποτελεσμάτων της επιστημονικής έρευνας και τεχνολογίας», μετά από την έκδοση Προεδρικού Διατάγματος. Η ίδρυση εταιριών για την αξιοποίηση των ερευνητικών αποτελεσμάτων και της γνώσης, θεσμοθετείται για πρώτη φορά νομοθετικά στην Ελλάδα με τον Ν. 274Ι/1999, ενώ οι επιχειρήσεις αυτές θα ονομαστούν ρητά Spin-Off, λίγο αργότερα, με το Π.Δ. 17/2001 που εκδόθηκε κατ' εξουσιοδότηση του παραπάνω νόμου. Το νομοθετικό πλαίσιο των Spin-off συμπληρώνεται και τροποποιείται από τον Ν. 2843/2000, τον Ν. 2919/2001 και τον Ν. 3440/2006. Τέλος, σύμφωνα με τον νέο Ν. 3653/2008 «Θεσμικό πλαίσιο έρευνας και τεχνολογίας και άλλες διατάξεις», η δημιουργία εταιριών έντασης γνώσης, μπορεί να εντάσσεται στο εκάστοτε Ε.Π.Ε.Τ. (Εθνικό Πρόγραμμα Έρευνας & Τεχνολογίας). (ΓΓΕΤ 3, 2010) Επίσης έχουν δημιουργηθεί 2 προγράμματα ενίσχυσης και χρηματοδότησης για την δημιουργία Spin-Off εταιριών που έχουν εκπονηθεί από το ελληνικό κράτος σε συνεργασία 19 με την Ευρωπαϊκή Ένωση. Το πρώτο εντάσσεται και λειτούργησε στο πλαίσιο του Προγράμματος "Ανταγωνιστικότητα" του Γ' Κ.Π.Σ., 2000-2006, ενώ το δεύτερο

βρισκόταν σε φάση ανάπτυξης το προηγούμενο έτος του 2010 στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» (ΕΠΑΝ-II) του ΕΣΠΑ, 2007- 2013 (ΓΓΕΤ 2, 2010).

Ασφαλιστική κάλυψη

Το «Ταμείο Επαγγελματικής Ασφάλισης Υπαλλήλων Εμπορίου Τροφίμων Ν.Π.Ι.Δ.» αποτελεί καθολικό διάδοχο του «Τομέα Επικουρικής Ασφάλισης Υπαλλήλων Εμπορίου Τροφίμων» (Τ.Ε.Α.Υ.Ε.Τ.) του Ν.Π.Δ.Δ., σύμφωνα με τις διατάξεις της παρ. 4 του άρθρου 36 του Ν. 4052/2012 (Φ.Ε.Κ. 41Α'/1-3-2012) και κατά τα οριζόμενα στα άρθρα 7 και 8 του Ν. 3029/2002 (Φ.Ε.Κ. 160Α'/11-7-2002) και των κατ' εξουσιοδότηση των άνω νόμων εκδοθεισών Υπουργικών Αποφάσεων από το Κοινοτικό Δίκαιο που ενσωματώνεται στην Εθνική Νομοθεσία.

Δικαιολογητικά απογραφής νέων επιχειρήσεων

- 1) Υπεύθυνη Δήλωση του εργοδότη στην οποία θα αναφέρεται το είδος της επιχείρησης, η ταχυδρομική διεύθυνση και η ημερομηνία της πρώτης πρόσληψης υπαλλήλου
- 2) Επικυρωμένο αντίγραφο βεβαίωσης έναρξης εργασιών Δ.Ο.Υ
- 3) Επικυρωμένο Καταστατικό εφ' όσον η επιχείρηση είναι εταιρεία και ΦΕΚ εφόσον η εταιρεία είναι Α.Ε. ή Ε.Π.Ε.
- 4) Πρακτικό συνεδρίασης του Δ.Σ. της Α.Ε. για τον ορισμό Διευθύνοντος ή Συμπράττοντος Συμβουλίου.

Προσωπικό

Το προσωπικό αρχικά θα αποτελείται από 4 άτομα. Τα άτομα αυτά είναι και οι τέσσερις από τους πέντε εταίρους της εταιρείας. Τα τέσσερα αυτά άτομα είναι ειδικευμένα με σπουδές πάνω στο αντικείμενο απασχόλησης τους. Οι ανάγκες της εταιρείας θα καλύπτονται πλήρως από τα τέσσερα αυτά άτομα τα οποία συμμετέχουν και στη διαμόρφωση της παρούσας ιδέας από την αρχή αυτής.

Εβδομαδιαίως θα πραγματοποιούνται συναντήσεις όλης της ομάδας ώστε να εξασφαλίζεται η αρμονική και ομαλή λειτουργία της εταιρείας.

Τον πρώτο χρόνο λειτουργίας της εταιρείας τα πρόσωπα που θα απασχολούνται θα είναι αυτά τα τέσσερα. Σε βάθος χρόνου θα εξετασθεί αν υπάρχει η ανάγκη για χρήση προσωπικού με σύμβαση πλέον του μόνιμου προσωπικού.

Αποθέματα

Η εταιρεία θα λειτουργήσει τον πρώτο καιρό με τόσα αποθέματα όσα της είναι απαραίτητα. Αυτό σημαίνει ότι θα προμηθευόμαστε τόση πρώτη ύλη όση είναι απαραίτητη για τις ανάγκες των πωλήσεων μας με τους ήδη υπάρχοντες πελάτες.

Υπολογίζουμε λοιπόν στο τέλος του χρόνου και στοχεύουμε να μην έχουμε απόθεμα της πρώτης μας ύλης. Αν για κάποιο λόγο κάτι τέτοιο δεν συμβεί, ό,τι απόθεμα μείνει θα γίνεται ζωοτροφή και θα πωλείται σε τιμή κόστους ώστε να μην έχουμε φύρα.

Οι προμηθευτές μας θα πρέπει να μας αποστέλλουν την πρώτη ύλη δύο φορές τον μήνα. Κατά την διάρκεια του χρόνου δεν υπάρχει εποχικότητα, ωστόσο καθώς η πρώτη ύλη είναι ευαλλοιώτη θα πρέπει να τηρούνται αυστηρά η προβλεπόμενες ημερομηνίες αποστολής.

Προμηθευτές

Τον πρώτο χρόνο λειτουργίας της εταιρείας, ένας από τους βασικούς μας προμηθευτές θα είναι τα Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς. Τα Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς με έδρα την Κεφαλονιά, θα μας στέλνουν δύο φορές τον μήνα την πρώτη ύλη.

Τα Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς, όπως και τα περισσότερα ιχθυοτροφεία στην Ελλάδα, μέχρι στιγμής αφήνουν τα υποπροϊόντα ψαριών ανεκμετάλλευτα, καίγοντας τα. Η διαδικασία της καύσης τους επιβαρύνει οικονομικά. Οπότε η αγορά αυτών των πρώτων υλών και η αποστολή των υποπροϊόντων σε εμάς αποτελεί μια συμφέρουσα προσφορά για τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, ενώ τα κόστη προμηθειών είναι σταθερά καθόλη τη διάρκεια του χρόνου.

Πιστωτική Πολιτική

Ακόμα δεν έχει ξεκαθαριστεί η πιστωτική μας πολιτική. Πιστεύουμε πως για τη βέλτιστη λειτουργία της εταιρείας μας οι πελάτες μας στα πρώτα στάδια λειτουργίας της ProsPer θα πληρώνουν μετρητής Αργότερα, αν αυξηθεί η παραγωγή μας, και ανάλογα με τις ανάγκες των πελατών μας, θα εξετάσουμε το ενδεχόμενο πληρωμής με πίστωση. Ωστόσο η πίστωση αυτή δεν θα ξεπερνάει το διάστημα των 30 ημερών.

Διαχείριση των Εισπρακτέων Λογαριασμών

Για την διαχείριση των εισπρακτέων λογαριασμών θα πραγματοποιείται σε μηνιαία βάση μια χρονολογική κατάταξη των λογαριασμών, ώστε να είναι γνωστό πόσα από τα χρήματά μας είναι δεσμευμένα σε πιστώσεις σε πελάτες, και να αντιμετωπίζονται τυχόν προβλήματα πληρωμών. Η χρονολογική κατάταξη των εισπρακτέων λογαριασμών μοιάζει με τον ακόλουθο πίνακα:

	Σύνολο	Τρέχοντες Λογαριασμοί	30 Ημέρες	60 Ημέρες	90 Ημέρες	Άνω των 90 Ημερών
Χρονολογική κατάταξη Εισπρακτέων Λογαριασμών						

Στους πελάτες που καθυστερούν τις πληρωμές τους θα γίνεται μια υπενθύμιση τρεις μέρες πριν λήξει η προθεσμία πληρωμής τηλεφωνικώς αλλά και μέσω αποστολής γράμματος ενώ δέκα μέρες μετά την λήξη του τριμήνου θα έρχεται σε επαφή με αυτές ο δικηγόρος της εταιρείας μας.

Διαχείριση των Πληρωτέων Λογαριασμών

Ακόμα θα πραγματοποιείται μια χρονολογική κατάταξη των πληρωτέων λογαριασμών, ώστε να είναι γνωστό τι οφείλουμε στους προμηθευτές μας. Η χρονολογική κατάταξη των πληρωτέων λογαριασμών μοιάζει με τον ακόλουθο πίνακα:

	Σύνολο	Τρέχοντες Λογαριασμοί	30 Ημέρες	60 Ημέρες	90 Ημέρες	Ανω των 90 Ημερών
Χρονολογική κατάταξη Πληρωτέων Λογαριασμών						

5.3.7. Διοίκηση και Οργάνωση

Ο διαχειριστής της εταιρείας είναι αρμόδιος για όλα τα τμήματα αυτής. Συνεργάζεται με τους διευθυντές των επιμέρους τμημάτων που υποβάλλουν εκθέσεις και αναφορές σε αυτόν. Ο διαχειριστής είναι αρμόδιος και για το γενικό στρατηγικό προγραμματισμό και την κατεύθυνση της επιχείρησης ή της οργάνωσης και αφήνει την καθημερινή διαχείριση των διαφόρων λειτουργιών στους διευθυντές.

Ως διαχειριστής έχει οριστεί η κ. Κανδυλιάρη Αικατερίνη, υποψήφια διδάκτορας του Εργαστηρίου Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το επιστημονικό υπόβαθρο και η εμπειρία της θα φανούν χρήσιμα στην διοίκηση αλλά και στην επιστημονική στήριξη και την τεχνογνωσία που χρειάζεται για την παραγωγή του προϊόντος.

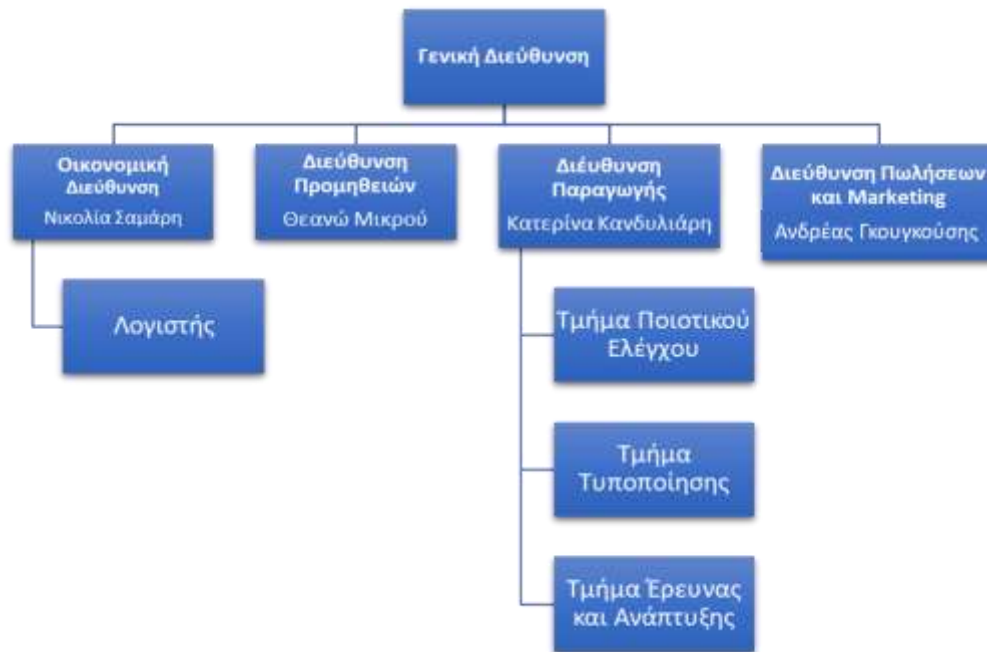
Κύριες Αρμοδιότητες

- Εξασφάλιση της εύρυθμης λειτουργίας του εσωτερικού περιβάλλοντος, του συνεχούς- έγκαιρου προγραμματισμού και της

αποτελεσματικής διοικητικής και παραγωγικής διαδικασίας της Εταιρείας.

- Εποπτεία των Διευθύνσεων και συνεργασία για την εκπλήρωση των υποχρεώσεών τους.
- Διαχείριση εισερχόμενης αλληλογραφίας - υπογραφή εξερχόμενων εγγράφων.
- Δικαίωμα υπογραφής για οικονομικές συναλλαγές.
- Προετοιμασία και εισήγηση στο Συμβούλιο Διεύθυνσης θεμάτων ανάληψης, ανάθεσης και προγραμματισμού Δράσεων.
- Σχεδιασμός - υλοποίηση και παρακολούθηση του ετήσιου Business Plan της Εταιρείας και συμμετοχή στην προετοιμασία των πενταετών επιχειρησιακών προγραμμάτων.

Η κατανομή των υπόλοιπων θέσεων της εταιρείας, είναι ευθέως συνδεδεμένη με τις δεξιότητες του κάθε μέλους της ομάδας και το οργανόγραμμα της εταιρείας έχει όπως πιο κάτω.



Κυριότερος ρόλος του οικονομικού διευθυντή είναι να ηγείται του Οικονομικού Τμήματος, να βοηθά την ομάδα πωλήσεων για να κλείσει μια συμφωνία και το τμήμα προμηθειών στις διαπραγματεύσεις με προμηθευτές καθώς επίσης και να συμμετέχει σε έργα και δραστηριότητες που δεν περιορίζονται στο Οικονομικό Τμήμα. Κύριες αρμοδιότητες είναι, η τήρηση βιβλίων και η υποβολή εκθέσεων των οικονομικών δεδομένων, η κατανόηση της στρατηγική της κατεύθυνσης, καθώς και να είναι σε θέση να διοικήσει τις περισσότερες λειτουργίες του Οικονομικού Τμήματος όπως η υποβολή χρηματοοικονομικών εκθέσεων και ο πιστωτικός έλεγχος, που θα διεκπεραιώνονται από τους υφισταμένους του. Ο οικονομικός διευθυντής πρέπει να ηγείται αυτών των ατόμων. Είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη των κατάλληλων επαγγελματιών, την αναγνώριση αυτών με προοπτικές και την επαγγελματική τους ανάπτυξη.

Όσον αφορά τον διευθυντή προμηθειών, είναι υπεύθυνος για τη διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων σε όλες τις φάσεις παραγωγής. Κυριότερες αρμοδιότητές του είναι να καθορίζει τις προδιαγραφές των προϊόντων (συνεργασία με τον διευθυντή παραγωγής και προώθησης πωλήσεων) αλλά και να διαχειρίζεται κάθε πρώτη ύλη καθώς και των πάγιων στοιχείων που απαιτούνται, να ελέγχει συνεχώς τα στάδια παραγωγής του προϊόντος και να καθορίζει το είδος του ελέγχου της ποιότητας σε κάθε φάση παραγωγής.

Ο διευθυντής παραγωγής είναι υπεύθυνος για τον συντονισμό και την υλοποίηση των προγραμμάτων παραγωγής με σκοπό να παράγουν προϊόντα υψηλής ποιότητας με το μικρότερο δυνατό κόστος. Τα καθήκοντα του είναι να ρυθμίζει την διαδικασία παραγωγής, και να την μεταβάλλει αν διαπιστωθεί ότι ο αρχικός σχεδιασμός παραγωγής δεν είναι αποδοτικός, να αναλύει όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της παραγωγής, να καθορίζει, σε συνεργασία με τον διευθυντή Ποιοτικού Ελέγχου, το σύστημα και τα σημεία ελέγχου της παραγωγής και να επιβλέπει όλες τις φάσεις παραγωγής για να διαπιστώσει ότι όλα γίνονται με τις προδιαγραφές που έχουν οριστεί.

Ο διευθυντής προώθησης πωλήσεων (marketing) είναι υπεύθυνος για τη στρατηγική που θα ακολουθήσει η επιχείρηση στον τομέα των πωλήσεων των προϊόντων. Ο διευθυντής μάρκετινγκ αποφασίζει για τον τρόπο προβολής και προώθησης των πωλήσεων των προϊόντων με βάση τις προτιμήσεις των καταναλωτών. Ειδικότερα ο διευθυντής μάρκετινγκ πραγματοποιεί έρευνες αγοράς με σκοπό να προσδιορίσει τον τρόπο προσέγγισης των καταναλωτών, επιλέγει τον τρόπο διαφήμισης των

προϊόντων της επιχείρησης, παρακολουθεί την πορεία των πωλήσεων και παρεμβαίνει ανάλογα, όταν οι πωλήσεις ενός ή περισσότερων προϊόντων αντιμετωπίζουν προβλήματα, διενεργεί έρευνες για την καταγραφή του βαθμού ικανοποίησης των καταναλωτών από τα προϊόντα της επιχείρησης και συνεργάζεται με τον διευθυντή οικονομικών για τον καθορισμό της οικονομικής πολιτικής της εταιρείας.

Τέλος, στο διοικητικό συμβούλιο της εταιρείας θα ανήκουν οι κ. Μαρία Καψοκεφάλου, Καθηγήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς και οι υπόλοιποι 4 μέτοχοι της εταιρείας.

Διοικητικό συμβούλιο

Μέσω γενικής συνέλευσης εκλέγονται τα μέλη που ανήκουν στο Δ.Σ τα οποία είναι πάντα επανεκλέξιμα και στο καταστατικό αναφέρονται οι όροι κάτω από τους οποίους τα πρόσωπα είναι εφικτό να εκλεγούν ως μέλη του. Το Δ.Σ. είναι αρμόδιο να αποφασίζει οποιαδήποτε πράξη αφορά στην διοίκηση της εταιρείας, την διαχείριση της περιουσίας της και γενικά στην επιδίωξη του σκοπού της εταιρείας.

Για συμβουλές πάνω σε όλα τα νομικά ζητήματα που απασχολούν την εταιρεία έχει προσληφθεί δικηγόρος καθώς και ένας ασφαλιστικός πράκτορας για να διαμεσολαβεί ανάμεσα στην ασφαλιστική εταιρεία και την εταιρεία μας.

5.3.8. Δαπάνες Έναρξης και Κεφαλαιοποίησης

Η ιδιωτική κεφαλαιουχική εταιρεία (ΙΚΕ) αποτελεί ευέλικτη μορφή επιχείρησης με εμπορικό σκοπό. Συστήνεται μέσω της υπηρεσίας μιας στάσης και το καταστατικό της καταρτίζεται με ιδιωτικό συμφωνητικό. Γίνεται δημοσίευση μόνο στο ΓΕΜΗ.

Τα τέλη ίδρυσης και λειτουργίας είναι πολύ μικρότερα, σε σχέση με άλλου τύπου εταιρείας. Παρακάτω αναφέρονται οι δαπάνες αναλυτικά:

- Υποχρεωτική είναι μόνο η καταβολή του τέλους καταχώρισης στο ΓΕΜΗ (10 €)
- Κόστους εγγραφής στο επιμελητήριο (41 € στο ΕΒΕΑ)
- Πληρωμή γραμματίου για τη σύσταση της εταιρείας (περίπου 75 €/εταίρο).
- Η συνδρομή συμβολαιογράφου για το ιδιωτικό έγγραφο που θα ορίζει το καταστατικό (300 €)
- Τέλος, 5,80 € προς το Ταμείο Πρόνοιας Δικηγόρων Αθηνών

Αρχικό Κεφάλαιο

Αρχικά, πρέπει να αναφέρουμε ότι η ProsPer πρόκειται για μια μικρή επιχείρηση που οι ιδιοκτήτες, τα πρώτα χρόνια, θα προσφέρουν τις υπηρεσίες τους στην επιχείρηση. Απολαβές θα πραγματοποιούνται στο τέλος κάθε χρονιάς, σύμφωνα με τα μερίσματα που αναλογούν στο κάθε ένα. Επειδή οι

ιδιοκτήτες είναι όλοι φοιτητές (μεταπτυχιακοί-διδακτορικοί) δεν διαθέτουν κάποιο περιουσιακό στοιχείο ακόμα, εκτός βέβαια από την εταιρεία αυτή.

Η χρηματοδότηση της εταιρείας θα γίνει από τους ίδιους τους ιδιοκτήτες με χρήματα τα οποία έχουν δοθεί κατά κύριο λόγο από το στενό οικογενειακό τους κύκλο. Πιο συγκεκριμένα ο κάθε ιδιοκτήτης - μέτοχος θα διαθέσει 15.000 ευρώ. Άρα, η ProsPer αρχίζει την λειτουργία της με ένα κεφάλαιο των 60.000 ευρώ. Τα πρώτα χρόνια λειτουργίας της εταιρίας έχει υπολογίσει ότι δεν θα γίνει κάποια χρηματοδότηση από κάποια τράπεζα ή κάποιον επενδυτή.

Εξάλλου δεν ξεχνάμε ότι η ProsPer είναι μια μικρή επιχείρηση που έχει γίνει με μεγάλη προσωπική εργασία των ιδιοκτητών και έτσι θα συνεχίσει την λειτουργία της για τα επόμενα 5 χρόνια σίγουρα.

Πηγές Χρηματοδότησης	Ποσά σε €	Ποσά σε €
Επιχορήγηση	-	0%
Δανειακά Κεφάλαια	-	0%
Συμμετοχή μετόχων	€ 60.000,00	100%

5.3.9. Χρηματοοικονομικό Σχέδιο

Στον Πίνακα 5.2 αναφέρονται αναλυτικά τα έσοδα τα πρώτα πέντε χρόνια λειτουργίας της εταιρείας.

Σε αυτό το σημείο χρειάζεται να τονίσουμε ότι η τιμή του κάθε τεμαχίου θα είναι στα 30 ευρώ. Η τιμή αυτή έχει οριστεί μετά από έρευνα αγοράς και μετά από τηλεφωνική επικοινωνία με μελλοντικούς πελάτες της εταιρείας. Οι ευεργετικές ιδιότητες του προϊόντος εξασφαλίζονται με την χρήση 10 γραμμαρίων από αυτό. Επομένως τα προϊόντα μας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περισσότερες από μία παρασκευές.

Στον Πίνακα 5.3 αναφέρονται αναλυτικά τα έξοδα τα πρώτα πέντε χρόνια λειτουργίας της εταιρείας.

Όπως όλες οι κεφαλαιουχικές, έτσι και η Ι.Κ.Ε στηρίζεται στο κεφάλαιο της για την επιχειρηματική δραστηριότητα. Στο σημείο αυτό χρειάζεται να αναφερθεί ότι το καταστατικό έχει ορισθεί ως κεφαλαιούχο σχήμα. Οι 4 μέτοχοι της εταιρείας θα προσφέρουν μέσω της προσωπικής τους εργασίας και γνωρίζουν ότι σύμφωνα με το χρηματοοικονομικό πλάνο δεν θα έχουν κέρδη τα πρώτα 2 χρόνια, αλλά στηρίζουν το όραμα και την ιδέα της εταιρείας και περιμένουν να καρποφορήσει.

Οι εταίροι έχουν επιλέξει να ακολουθήσουν ένα αποκλειστικά κεφαλαιουχικό σχήμα, με μόνο κεφαλαιακές εισφορές και για το λόγο αυτό έχουν διαμορφώσει με αυτόν το τρόπο και το καταστατικό. Στο καταστατικό έχει σχεδιαστεί χωρίς έντονα προσωπικά στοιχεία, όπως παροχή εργασίας και ανάληψη ευθύνης για τα χρέη της εταιρείας. Οι εταίροι δεν ευθύνονται

για τα χρέη της, με την επιφύλαξη του άρθρου 79, που προβλέπει εγγυητικές εισφορές, μέσω των οποίων ο εταίρος αναλαμβάνει ευθύνη για τα χρέη της εταιρείας μέχρι ενός ορισμένου ποσού, το οποίο αναφέρεται στο καταστατικό.

Πίνακας 5.2: Παραδοχές Εσόδων (ποσά σε €)

	2019	2020	2021	2022	2023
Πρώτη ύλη (σε κιλά)	40.000,00	75.000,00	90.000,00	100.000,00	110.000,00
Προϊόν 1					
Κιλά προϊόντος 1	13.333,33	25.000,00	30.000,00	33.333,33	36.666,67
Όγκος για παραγωγή προϊόντος 1	13.333,33	25.000,00	30.000,00	33.333,33	36.666,67
Σχέση μετατροπής (1:100)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Τεμάχια προϊόντος 1	133,33	250,00	300,00	333,33	366,67
Τιμή προϊόντος 1	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Κύκλος εργασιών προϊόντος 1	4.000,00	7.500,00	9.000,00	10.000,00	11.000,00
Προϊόν 2					
Κιλά προϊόντος 2	13.333,33	25.000,00	30.000,00	33.333,33	36.666,67
Όγκος για παραγωγή προϊόντος 2	13.333,33	25.000,00	30.000,00	33.333,33	36.666,67
Σχέση μετατροπής (1:100)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Τεμάχια προϊόντος 2	133,33	250,00	300,00	333,33	366,67
Τιμή προϊόντος 2	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Κύκλος εργασιών προϊόντος 2	4.000,00	7.500,00	9.000,00	10.000,00	11.000,00
Προϊόν 3					
Κιλά προϊόντος 3	13.333,33	25.000,00	30.000,00	33.333,33	36.666,67
Όγκος για παραγωγή προϊόντος 3	13.333,33	25.000,00	30.000,00	33.333,33	36.666,67
Σχέση μετατροπής (1:100)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Τεμάχια προϊόντος 3	133,33	250,00	300,00	333,33	366,67
Τιμή προϊόντος 3	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Κύκλος εργασιών προϊόντος 3	4.000,00	7.500,00	9.000,00	10.000,00	11.000,00
Συνολικά Έσοδα από Πωλήσεις :	12.000,00	22.500,00	27.000,00	30.000,00	33.000,00
% ετήσια μεταβολή		87,5%	20,0%	11,1%	10,0%

Πίνακας 5.3: Έξοδα Λειτουργίας

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΕΞΟΔΑ ΕΜΠΟΡΙΑΣ (ποσά σε €)	2019	2020	2021	2022	2023
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΤΗΣ (12 μήνες)	3.000,00	3.000,00	3.000,00	3.000,00	3.000,00
ΕΦΚΑ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ (ΧΑΜΗΛΟΤΕΡΗ ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ)	2.179,20	2.179,20	2.179,20	2.179,20	2.179,20
Αμοιβές Προσωπικού	5.179,2	5.179,2	5.179,2	5.179,2	5.179,2
ως % των Συνολικών Δαπανών	24,7%	32,7%	31,4%	29,2%	28,7%
% αύξηση		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
ΑΓΟΡΑ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ	800,00	1.500,00	1.800,00	2.000,00	2.200,00
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ ΣΤΟ ΧΩΡΟ ΜΑΣ	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
Αγορές Α' Υλών	1.300,0	2.000,0	2.300,0	2.500,0	2.700,0
ως % των Συνολικών Δαπανών	6,2%	12,6%	14,0%	14,1%	15,0%
% Αύξηση		53,8%	15,0%	3,0%	3,0%
ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΓΙΑ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ	1.000,00	2.000,00	2.000,00	3.000,00	3.000,00
ΔΕΗ (12 μήνες)	400,00	400,00	400,00	400,00	400,00
ΤΗΛΕΦΩΝΟ- ΙΝΤΕΡΝΕΤ (12 μήνες)	216,00	216,00	216,00	216,00	216,00
ΕΞΟΔΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΦΗΜΗΣΗ (12 μήνες)	2.000,00	400,00	600,00	600,00	600,00
ΛΟΓΙΣΤΗΣ	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00
ΔΙΚΗΓΟΡΟΣ	1.800,00	0,00	0,00		
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ	1.000,00	1.000,00	1.000,00	1.000,00	1.000,00
ΤΑΞΙΔΙ ΣΤΗ ΚΕΦΑΛΟΝΙΑ	100,00				
ΓΡΑΦΙΚΗ ΥΛΗ Κ ΤΑΧΥΔΡΟΜΙΟ	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑΣ	1.000,00				
ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ	300,00	562,50	675,00	750,00	825,00
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΤΟΥΣ ΑΓΟΡΑΣΤΕΣ	600,00				
ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑΣ - ΑΣΦΑΛΙΣΤΗΣ	1.600,00	1.600,00	1.600,00	1.600,00	1.600,00
ΕΝΟΙΚΙΟ ΕΔΡΑΣ (ΕΤΗΣΙΟ)	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00
ΕΞΟΔΑ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	2.000,00				
Λοιπά έξοδα	14.516,0	8.678,5	8.991,0	10.066,0	10.141,0
ως % των Συνολικών Δαπανών	69,1%	54,7%	54,6%	56,7%	56,3%
% αύξηση		-40,2%	3,6%	4,0%	4,0%
Συνολικές Δαπάνες	20.995,2	15.857,7	16.470,2	17.745,2	18.020,2
% ετήσια μεταβολή		-24,5%	3,9%	7,7%	1,5%

Για την κάλυψη των ασφαλιστικών υποχρεώσεων απέναντι στον διαχειριστή της επιχείρησης είναι υπεύθυνη ολοκληρωτικά η εταιρεία. Πιο συγκεκριμένα, αυτός θα ασφαρίζεται με ΕΦΚΑ, το οποίο το χρεώνεται η ίδια η εταιρεία για κάθε μήνα ξεχωριστά. Ο διαχειριστής ασφαρίζεται σύμφωνα με το άρθρο 39 ως ελεύθερος επαγγελματίας στην περίπτωση της συγκεκριμένης εταιρίας και δηλώνεται στην ΑΠΔ ως μισθωτός επειδή έχει καταβάλλει ποσό και συνεχίζει να παρέχει εργασία στην επιχείρηση. Αυτό αναφέρεται διότι ο διαχειριστής που έχει οριστεί είναι και μέτοχος της εταιρίας.

Η έδρα της εταιρίας θα διαθέτη πλήρη ασφαλιστική κάλυψη πυρός και λοιπών κινδύνων της εταιρίας & περιεχομένου αυτής (έπιπλα , σκεύη, TV, Η/Υ κλπ.). Τα εργαστήρια του ΓΠΑ, των κτιριακών εγκαταστάσεων, των μηχανημάτων τα ασφαρίζει το ίδιο το πανεπιστήμιο και η εταιρεία δεν φέρει κάποια ευθύνη. Επίσης υπάρχει αστική ευθύνη για κάλυψη ατυχημάτων του προσωπικού, σε συνεργασία με μεγάλη ασφαλιστική εταιρεία.

Προκειμένου να καταφέρουμε να διαχειριστούμε την ποσότητα της πρώτης ύλης παραλαμβάνουμε την πρώτη ύλη δύο φορές κάθε μήνα. Σε αυτό το σημείο χρειάζεται να αναφερθεί ότι η πρώτη ύλη μαζί με την μεταφορά της, οι οποία θα πραγματοποιείται με φορτηγά της ιχθυοκαλλιέργειας, εξοφλείται μια φορά τον χρόνο. Όσο αυξάνεται η ποσότητα της πρώτης ύλης θα αυξάνεται και το κόστος αγοράς της.

Επίσης χρειάζεται να αναφερθεί ότι η πληρωμή του ενοικίου στο γεωπονικό θα πραγματοποιείται κάθε 1η Σεπτεμβρίου κάθε έτους. Τα εργαστήρια του

πανεπιστημίου μπορούμε να τα χρησιμοποιούμε τα επόμενα 10 χρόνια μετά από την υπογραφή συμφωνητικού ανάμεσα στην εταιρία και το ΓΠΑ.

Όσο αναφορά τα αναλώσιμα που θα χρησιμοποιηθούν στο εργαστήριο του Γεωπονικού για την παρασκευή των προϊόντων της εταιρία και το R&D, θα επιβαρύνουν την ίδια την εταιρία. Τον πρώτο χρόνο λειτουργίας της εταιρίας τα αναλώσιμα κοστολογούνται στη τιμή των 1000 ευρώ το χρόνο. Τα αναλώσιμα κοστολογούνται βάση των κιλών πρώτης ύλης που επεξεργάζονται ώστε να καταλήξουμε στο τελικό προϊόν μας. Με άλλα λόγια, με την αύξηση της παραγωγής αυξάνονται και τα αναλώσιμα που χρειάζεται η εταιρία το εργαστήριο του Γεωπονικού.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ProsPer θα λειτουργήσει κανονικά από τον μήνα Σεπτέμβριο χωρίς καθυστέρηση από εξωτερικά γεγονότα και ότι η πρώτη ύλη θα βρίσκεται στον χώρο μας την 1η Σεπτεμβρίου η όλη διαδικασία ώστε να είναι έτοιμο το τελικό μας προϊόν, θα έχει ολοκληρωθεί βάσει προγράμματος.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.4) περιγράφεται η κατάσταση αποτελεσμάτων χρήσεως για τα πρώτα πέντε χρόνια λειτουργίας της εταιρείας.

Πίνακας 5.4 Κατάσταση Αποτελεσμάτων Χρήσεως (ποσά σε €)

Κατηγορίες	2019	2020	2021	2022	2023
I. Αποτελέσματα Εκμεταλλεύσεως					
Κύκλος Εργασιών (Πωλήσεις)	12.000,0	22.500,0	27.000,0	30.000,0	33.000,0
<i>% αύξηση των εσόδων</i>		87,5%	20,0%	11,1%	10,0%
Μείον:					
Σύνολο Λειτουργικών Εξόδων	20.995,2	15.857,7	16.470,2	17.745,2	18.020,2
<i>ως % του κύκλου εργασιών</i>	175,0%	70,5%	61,0%	59,2%	54,6%
Μερικά Αποτελέσματα (Κέρδη ή Ζημιές) Εκμεταλλεύσεως	-8.995,2	6.642,3	10.529,8	12.254,8	14.979,8
<i>ως % του κύκλου εργασιών</i>	-75%	30%	39%	41%	45%
Μείον:					
3. Χρεωστικοί Τόκοι & συναφή Έξοδα					
Ολικά Αποτελέσματα (Κέρδη ή Ζημιές) Εκμεταλλεύσεως	-8.995,2	6.642,3	10.529,8	12.254,8	14.979,8
Μείον:					
Σύνολο Αποσβέσεων Παγίων Στοιχείων	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Μείον: Οι απο αυτές ενσωματωμένες στο λειτουργικό κόστος	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Καθαρά Κέρδη ή ζημιές Χρήσεως προ Φόρων	-8.995,2	6.642,3	10.529,8	12.253,8	14.977,8
<i>ως % του κύκλου εργασιών</i>	<i>-75%</i>	<i>30%</i>	<i>39%</i>	<i>41%</i>	<i>45%</i>
Tax Shield					
Κέρδη Προ Φόρων, Τόκων & Αποσβέσεων (EBITDA)	-8.995,2	6.642,3	10.529,8	12.254,8	14.979,8
<i>ως % του κύκλου εργασιών</i>	<i>-75%</i>	<i>30%</i>	<i>39%</i>	<i>41%</i>	<i>45%</i>
Διάθεση Κερδών					
Καθαρά Αποτελέσματα (κέρδη ή ζημιές) χρήσεως	-8.995,2	6.642,3	10.529,8	12.253,8	14.977,8

Υπόλοιπο κερδών ή ζημιών προηγούμενων χρήσεων	0,0	-8.995,2	-4.073,3	3,3	478,2
Διαφορές φορολογικού ελέγχου προηγούμενων χρήσεων	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Αποθεματικά προς διάθεση	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Σύνολο:	-8.995,2	-2.352,9	6.456,5	12.257,1	15.456,0
Μείον: (chq taxes)	-1.978,9	1.461,3	2.316,6	2.695,8	3.295,1
1. Φόρος Εισοδήματος	0,0	1.461,3	2.316,6	2.695,8	3.295,1
ως % επί των κερδών προ φόρων	22,0%	22,0%	22,0%	22,0%	22,0%
2. Λοιποί μη ενσωματωμένοι στο Λειτουργικό κόστος φόροι	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Σύνολο:	0,0	1.461,3	2.316,6	2.695,8	3.295,1
Κέρδη προς Διάθεση	-8.995,2	-3.814,2	4.140,0	9.561,3	12.160,9
1. Τακτικό Αποθεματικό	0,0	259,0	410,7	477,9	584,1
ως % επί των κερδών μετά φόρων	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
2. Πρώτο Μέρισμα	0,0	0,0	3.726,0	8.605,2	10.944,8
ως % επί των κερδών προς διάθεση μετά αποθεματικών & αμοιβών ΔΣ	0,0%	0,0%	90,0%	90,0%	90,0%

Η εταιρεία έχει σκοπό από τον δεύτερο χρόνο της να αύξηση την παραγωγή της 87,5%, ελπίζοντας ότι σε αυτή την αύξηση θα βοηθήσει η ιστοσελίδα προώθησης των προϊόντων και το μάρκετινγκ της εταιρείας. Τον πρώτο χρόνο η εταιρεία θα αγοράσει 40.000 κιλά πρώτης ύλης, που ως τελικό προϊόν σκόνης μένουν 20.000 κιλά τα οποία θα πωληθούν σε συνεταιρισμούς σαλτσών και σε χώρους εστίασης.

Η ProsPer θέλει να κάνει μικρά και σταθερά βήματα ώστε να καταφέρει να αντέξει στο χρόνο και στις απαιτήσεις της αγοράς. Πιστεύουμε ότι δεν αρκεί μια επιχείρηση να έχει καλό προϊόν, αλλά χρειάζεται να έχει βρει και την αγορά που θα το προωθήσει. Για το λόγο αυτό η ProsPer την πρώτη χρονιά θα παράγει μόνο όσο προϊόν έχει υπολογίσει ότι πουλήσει και αυτή θα είναι η φιλοσοφία της όλα τα χρόνια ύπαρξής της.

Σε αυτό το σημείο χρειάζεται να τονίσουμε ότι η τιμή του κάθε τεμαχίου θα είναι στα 30 ευρώ. Η τιμή αυτή έχει οριστεί μετά από έρευνα αγοράς και μετά από τηλεφωνική επικοινωνία με μελλοντικό πελάτη του προϊόντος μας. Οι ευεργετικές ιδιότητες του προϊόντος εξασφαλίζονται με την χρήση 10 γραμμαρίων από αυτό. Επομένως τα προϊόντα μας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περισσότερες από μία παρασκευές-μερίδες. Παραδείγματος χάρη, το πρώτο έτος λειτουργίας η επιχείρηση θα πουλήσει όλη την παραγωγή της σε συνεταιρισμούς που παράγουν έτοιμες σάλτσες. Σε κάθε βαζάκι σάλτσας ο αγοραστής θα χρησιμοποιεί 10 γραμμάρια σκόνης.

Σε αυτό το σημείο χρειάζεται να αναφερθούν τα έσοδα της επιχείρησης σύμφωνα με την φορολογία που ισχύει μέχρι αυτή την στιγμή για τις

εταιρείες ΙΚΕ. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα καθαρά έσοδα της εταιρίας και η σταδιακή ανάπτυξή της.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα η εταιρία αρχίζει και δίνει κέρδη στους μετόχους από τον τρίτο χρόνο λειτουργίας της, κάτι το οποίο είναι φυσιολογικό και αποδεχτό από τους μετόχους.

5.3.10. Παρατηρήσεις – Συμπεράσματα Επιχειρηματικού Σχεδίου

Ιδέες για παράλληλα έσοδα της ProsPer

Με δεδομένο ότι τα πρώτα χρόνια η ProsPer θα έχει από μηδενικά έως ελάχιστα έσοδα, προτείνονται στην συνέχεια κάποιοι δυνητικοί τρόποι προσπορισμού εσόδων όπως:

- Εμπλουτισμός της γκάμας των προϊόντων μας με πούδρες και από άλλα υποπροϊόντα τροφίμων. Συγκεκριμένα, πούδρα από υποπροϊόντα τομάτας (φλοιός, υποπροϊόντα κατά την παρασκευή σαλτσών, κακοσχηματισμένες τομάτες) και πούδρα από υποπροϊόντα μήλων (φλοιός, υποπροϊόντα κατά την παρασκευή χυμών, κακοσχηματισμένα μήλα) τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικά γεύσης και συστατικά τροφίμων ή/και συνταγών. Τα προϊόντα αυτά έχουν ήδη αρχίσει να μελετώνται και να κατασκευάζονται σε πειραματική κλίμακα στα εργαστήρια της εταιρείας μας.
- Δημιουργία ενός ProsPer e-shop, με προϊόντα που θα απευθύνονται στον καταναλωτή παράλληλα με την προώθηση πρωτοποριακών ιδεών και συνταγών.
- Διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής, συσκευασίας και προώθησης έτοιμου σνάκ όπως σούπας, ή/και τσιπς (τύπου «τσιπς-γαρίδας») με κύριο συστατικό την πούδρα ψαριών.

Η οικονομική επίπτωση των παραπάνω ιδεών δεν έχει συμπεριληφθεί στις οικονομικές καταστάσεις που επισυνάπτονται.

Συμπεράσματα παρόντος επιχειρηματικού σχεδίου

Το παρόν επιχειρηματικό σχέδιο σχεδιάστηκε και έχει στηριχθεί στην ιδέα του να δημιουργήσουμε τη δική μας εταιρεία που θα παράγει προϊόντα με πρώτη ύλη υποπροϊόντα ψαριών. Σε περίπτωση που δεν λειτουργήσει το σχέδιο αυτό, σκοπεύουμε, είτε να πουλήσουμε την τεχνογνωσία γύρω από την επεξεργασία υποπροϊόντων σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειών, είτε να προτείνουμε τη συνεκμετάλλευση. Εκτιμούμε πως η εναλλακτική λύση της συνεκμετάλλευσης, παρότι θα σήμαινε χαμηλότερες απολαβές για εμάς, θα ήταν βιώσιμη λόγω του ότι οι ιχθυοκαλλιέργειες έχουν ήδη μια σημαντική υποδομή για να στηρίξουν το εγχείρημα αυτό. Πιστεύουμε ότι με μια επένδυση της τάξεως των 50.000 € από την εκάστοτε εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας και με την κατοχύρωση της πατέντας για το προϊόν μας από την εταιρεία μας με κόστος περίπου 1500 € μπορεί να αποτελέσει μια βιώσιμη ιδέα.

Επομένως, σε πρώτη φάση, στοχεύουμε να αξιοποιήσουμε τα μικρά κόστη που δίνει η μορφή της εταιρείας μας ως spin-off και με η χρήση των χώρων του ΓΠΑ και θα αξιολογήσουμε την πορεία της εταιρείας μας. Βάσει των υποθέσεών μας, η επιχείρηση δεν θα είναι μια κερδοφόρα επιχείρηση τα πρώτα χρόνια, ωστόσο στην πορεία και όσο αυξάνεται η ζήτηση του προϊόντος μας θα αυξήσουμε την παραγωγή και τα κέρδη μας. Εναλλακτικά θα ακολουθήσουμε τη λύση που προαναφέραμε.

Κεφάλαιο 6. Γενικά Συμπεράσματα

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη των υποπροϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας με σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο, τόσο στην αειφορία του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας, όσο και στην κάλυψη των αναγκών των καταναλωτών με νέα προϊόντα.

Με την παρούσα έρευνα δόθηκαν οι παρακάτω απαντήσεις στα ερευνητικά ερωτήματα της μελέτης, όπως αυτά διατυπώθηκαν στην εισαγωγή (Κεφάλαιο 1).

Με την διερεύνηση της διατροφικής σύνθεσης των υποπροϊόντων των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας διαπιστώθηκε ότι τα υποπροϊόντα ψαριών αποτελούν σημαντική και διατροφικά πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και απαραίτητων μετάλλων, καθώς η σύνθεσή τους είναι παρόμοια με εκείνη των φιλέτων ψαριών και άλλων προϊόντων διατροφής που συνιστώνται για κατανάλωση. Κάθε κατηγορία υποπροϊόντων έχει ειδικά θρεπτικά χαρακτηριστικά. Έτσι η πιθανή εκμετάλλευσή της εξαρτάται από τα επιθυμητά ειδικά διατροφικά χαρακτηριστικά των προϊόντων που θέλουμε να σχηματίσουμε. Στην παρούσα μελέτη, το δέρμα είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, τα πτερύγια και τα κόκκαλα ήταν πλούσια σε ασβέστιο και το κεφάλι, τα εντόσθια και τα κόκκαλα ήταν μια καλή πηγή λιπιδίων. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών και των συνθηκών καλλιέργειας. Αν και δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικώς στατιστικά διαφορές ανάμεσα στις δύο διαφορετικά μεγέθη ψαριών και μεταξύ των διαφορετικών ειδών, εντούτοις παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις όπου σε μεγαλύτερο δείγμα πιθανώς να ήταν στατιστικώς σημαντικές.

Η συγκέντρωση των μετάλλων στα υποπροϊόντα των ψαριών τόση για τη τσιπούρα όσο και για τον κρانيό ήταν στο ίδιο εύρος με την δημοσιευμένη βιβλιογραφία και χαμηλότερη από τα αντίστοιχα νομοθετικά όρια. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η συγκέντρωση του μολύβδου στα βράγχια ψαριών, που ήταν πάνω από τα νομοθετικά όρια. Μάλιστα η συγκέντρωση αρκετών βαρέων μετάλλων ήταν χαμηλότερη στην περίπτωση των υποπροϊόντων έναντι των φιλέτων που σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπέρασε τα αντίστοιχα νομοθετικά όρια. Αυτό βέβαια επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι η βιοσυσσώρευση των μετάλλων είναι εντονότερη στα φιλέτα των ψαριών. Τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν τα υποπροϊόντα ψαριών ασφαλή, όσον αφορά τη συγκέντρωσή τους σε βαρέα μέταλλα, για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Αλλά και το θαλασσινό περιβάλλον από το οποίο αλιεύθηκαν τα ψάρια παρουσίασε απουσία ρύπανσης με χαμηλές τιμές συγκέντρωσης μετάλλων.

Τα υποπροϊόντα ψαριών εξετάστηκαν *in vitro* για τη βιοδραστικότητά τους. Ειδικότερα φάνηκε πως παρουσιάζουν αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF7A) παρουσία πρωτεϊνικών υδρολυμάτων από δέρμα και πτερύγια κρانيού και τσιπούρας και από βράγχια τσιπούρας. Παράλληλα παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (COLO320) από υδρολύματα από κόκκαλα, πτερύγια και βράγχια κρانيού και τσιπούρας. Μάλιστα τα πρωτεϊνικά υδρολύματα από βράγχια τσιπούρας και από δέρμα κρانيού και τσιπούρας, φάνηκε πως παρουσιάζουν επιλεκτική αναστολή του πολλαπλασιασμού μόνο των καρκινικών κυττάρων και όχι των αντίστοιχων φυσιολογικών. Όσον αφορά την αύξηση της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου μόνο τα υποπροϊόντα από

εντόσθια σε μορφή σκόνης (και όχι πρωτεϊνικό υδρόλυμα) παρουσίασαν σε ποσοστό δισθενούς σιδήρου έως 7.2%.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα και σε συνδυασμό με την εκπόνηση του επιχειρηματικού σχεδίου φάνηκε πως υπάρχει δυνατότητα αξιοποίησης των υποπροϊόντων ή κλασμάτων αυτών ώστε να δημιουργηθεί νέο καινοτόμο προϊόν. Η ιδέα κέρδισε τρία βραβεία σε διαγωνισμούς καινοτομίας και επιχειρηματικότητας, γεγονός που αποδεικνύει τις επιχειρηματικές δυνατότητες που παρουσιάζει η αξιοποίηση των υποπροϊόντων.

Με σκοπό την περεταίρω αξιοποίηση των υποπροϊόντων ψαριών θα είχε ενδιαφέρον να εξεταστούν οι παρακάτω ερευνητικά ερωτήματα:

- Ποια είναι η σύσταση των υποπροϊόντων ψαριών μετά από επεξεργασία (πχ βρασμό).
- Ποια είναι η βιοδραστικότητα τους όσον αφορά την αύξηση της απορρόφησης του σιδήρου, όταν αυτά πρώτα υποστούν πέψη με ένζυμα και παραχθούν τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά υδρόλυματα.
- Ποια είναι η βιοδραστικότητα τους όσον αφορά την αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων όταν πρωτεϊνικά υδρόλυματα ψαριών διαλυθούν απευθείας σε κυτταρικό μέσο.
- Ποια είναι η διατηρησιμότητα των υποπροϊόντων ψαριών και των αντίστοιχων πουδρών που προτείνει η ProsPer.

- Ποια είναι τα πιο γευστικά προϊόντα από αυτά που προτείνει η ProsPer ώστε να μπορούν να αποτελέσουν πραγματική διατροφική επιλογή υψηλού γαστρονομικού ενδιαφέροντος.

Τέλος στο πρωτόκολλο που παραδίδεται με την παρούσα έρευνα, θα μπορούσε να βασιστεί η μελέτη πληθώρας υποπροϊόντων τροφίμων όπως, υποπροϊόντα ζυθοποιίας, τομάτας, φρουτοχυμών.

Γ. Βιβλιογραφία

1. European Commission. Circular Economy: Connecting, creating and maintaining value. 2013.
2. Ministry of Environment and Energy GR. National Strategy for Circular Economy. 2018.
3. Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Η κυκλική οικονομία. Γενική Διεύθυνση Περιβάλλοντος,. 2019.
4. Cambridge Econometrics. Modelling the economic and environmental impacts of change in raw material consumption. 2014.
5. European Commission. Communication from the commission to the European parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions closing the loop-an EU action plan for the circular economy. . In: European Commission, editor. Brussels, Belgium2015.
6. FAO. Food wastage footprint: Full-cost accounting. . Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations ,; 2014.
7. FAO. The state of food insecurity in the world. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations,; 2015.
8. Fernandes TF, Miller KL, Read PA. Monitoring and regulation of marine aquaculture in Europe. Journal of Applied Ichthyology. 2000;16(4-5):138-43.
9. European Commission. Έκθεση Εμπορίας των ειδών Υδατοκαλλιέργειας που παράγονται στην Ελλάδα. Αθήνα, Ελλάδα: 2016.
10. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 20142014.
11. FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2018.
12. Federation of Greek Mariculture. Annual report aquaculture in Greece 2017. Athens, Greece: 2017.
13. Federation of Greek Mariculture. Annual report aquaculture in Greece 2019. Athens, Greece: 2019.
14. Papandroulakis N. Aquaculture of warm-water marine species: The economic importance of aquaculture. 2019.
15. FMG. ANNUAL REPORT 2019. 2019.
16. FAO. FAO Fisheries Statistical Yearbook 2002. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2002.

17. Kearney J. Food consumption trends and drivers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1554):2793-807.
18. Perea A, Ugalde U Fau - Rodriguez I, Rodriguez I Fau - Serra JL, Serra JL. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. (0141-0229 (Print)).
19. Larsen T, Thilsted Sh Fau - Kongsbak K, Kongsbak K Fau - Hansen M, Hansen M. Whole small fish as a rich calcium source. (0007-1145 (Print)).
20. Guérard F, Dufossé L, Broise D, Binet A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic.* 2001;11:1051-9.
21. Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. (1040-8398 (Print)).
22. Galvez; RP, Berge; J-P. *Utilization of Fish Waste*: CRC Press; 2013.
23. Arvanitoyannis IS, Kassaveti A. Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology.* 2008;43(4):726-45.
24. Samuels WA, Fontenot Jp Fau - Allen VG, Allen Vg Fau - Abazinge MD, Abazinge MD. Seafood processing wastes ensiled with straw: utilization and intake by sheep. (0021-8812 (Print)).
25. Powell TW. Converting garbage (food waste) into a safe animal feed ingredient (Biomeal). *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 1975(79):278-9.
26. FAO. *Aquaculture development. 5. Use of wild fish as feed in aquaculture.* Rome: FAO, 2011.
27. Gabrielsen BO, Austreng E. Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed wet feed with alginate. *Aquaculture Research.* 2008;29:397-401.
28. Strøm T, Eggum BO. Nutritional value of fish viscera silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1981;32(2):115-20.
29. Raa JAN, Gildberg A. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. *International Journal of Food Science & Technology.* 1976;11(6):619-28.
30. Raghunath MR, Gopakumar K. Trends in production and utilization of fish silage. *Journal of Food Science and Technology -Mysore-.* 2002;39:103-10.
31. Gildberg A, Bøgwald J, Johansen A, Stenberg E. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 1996;114(1):97-101.

32. Dinakarkumar Y, Bharathiraja DB, Rithika J, Dhanasree S, Ezhilarasi V, Lavanya A, et al. Production of biofuels from fish wastes: an overview. *Biofuels*. 2016;1-7.
33. Girish CR, Gambhir MM, Deshmukh T. Production of biodiesel from fish waste and characterization of produced biodiesel. *International Journal of Civil Engineering and Technology*. 2017;8:1-6.
34. Kato S, Kunisawa K, Kojima T, Murakami S. Evaluation of Ozone Treated Fish Waste Oil as a Fuel for Transportation. *Journal of Chemical Engineering of Japan - J CHEM ENG JPN*. 2004;37:863-70.
35. Haard N.F., B.K. S. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In: A.M M, editor. *Fisheries Processing*. Boston, MA: Springer; 1994.
36. Shahidi F, Metusalach Fau - Brown JA, Brown JA. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. 1998(1040-8398 (Print)).
37. Varun TK, Senani S, Jayapal N, Chikkerur J, Roy S, Tekulapally VB, et al. Extraction of chitosan and its oligomers from shrimp shell waste, their characterization and antimicrobial effect. *Vet World*. 2017;10(2):170-5.
38. Bordenave S, Fruitier I Fau - Ballandier I, Ballandier I Fau - Sannier F, Sannier F Fau - Gildberg A, Gildberg A Fau - Batista I, Batista I Fau - Piot J-M, et al. HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on guinea pig ileum and ACE activity. 2002(1082-6068 (Print)).
39. Byun H-G, Kim S-K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*. 2001;36(12):1155-62.
40. Kim SK, Kim Yt Fau - Byun HG, Byun Hg Fau - Nam KS, Nam Ks Fau - Joo DS, Joo Ds Fau - Shahidi F, Shahidi F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. 2001(0021-8561 (Print)).
41. Helcke T. Gelatin. The food technologist's friend or foe? *International Food Ingredients*, . 2000;1:6-8.
42. Kim SK, Mendis E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Research International*. 2006;39(4):383-93.
43. Swatschek D, Schatton W, Kellermann J, Müller WEG, Kreuter J. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002;53(1):107-13.
44. Senaratne LS, Park P-J, Kim S-K. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*. 2006;97(2):191-7.

45. Tanaka M, Koyama Y-i, Nomura Y. Effects of Collagen Peptide Ingestion on UV-B-Induced Skin Damage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2009;73(4):930-2.
46. Borderías J, Martí MA, Montero P. Influence of collagenous material during frozen storage when added to minced cod (*Gadus morhua*). . *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, . 1994;199, :255–61.
47. Abbey L, Glover-Amengor M, Atikpo MO, Atter A, Toppe J. Nutrient content of fish powder from low value fish and fish byproducts. *Food Sci Nutr*. 2017;5(3):374-9.
48. Shaviklo AR. Development of fish protein powder as an ingredient for food applications: a review. (0022-1155 (Print)).
49. Kim SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2010;2(1):1-9.
50. De Leo F, Panarese S, Gallerani R, Ceci LR. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(31):3622-43.
51. Suarez-Jimenez G, Burgos-Hernández A, Brauer J. Bioactive Peptides and Dipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals. *Marine drugs*. 2012;10:963-86.
52. Lin HM, Deng SG, Huang SB, Li YJ, Song R. The effect of ferrous-chelating hairtail peptides on iron deficiency and intestinal flora in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015(October).
53. Lafarga T, Hayes M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. (1873-4138 (Electronic)).
54. Argyri K, Theophanidi E, Kapna A, Staikidou C, Pounis G, Komaitis M, et al. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. *Food Chem*. 2011;127(2):716-21.
55. Olsen RL, Toppe J, Karunasagar I. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;36(2):144-51.
56. Kelleher K. Discards in the world's marine fisheries. An update. . Rome: FAO, 2005 Contract No.: 470.
57. Gonçalves JMS, Stergiou KI, Hernando JA, Puente E, Moutopoulos DK, Arregi L, et al. Discards from experimental trammel nets in southern European small-scale fisheries. *Fisheries Research*. 2007;88(1):5-14.
58. Sloan EA. Top 10 Food Trends. IFT's Food Technology 2019.

59. Roslan J, Yunos KFM, Abdullah N, Kamal SMM. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2014;2:312-9.
60. Khoddami a, Ariffin aa, Bakar J, Ghazali HM. Fatty Acid Profile of the Oil Extracted from Fish Waste (Head , Intestine and Liver) (*Sardinella lemuru*). *World Applied Sciences Journal*. 2009;7(1):127-31.
61. Ngo DH, Wijesekara I, Vo TS, Van Ta Q, Kim SK. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*. 2011;44(2):523-9.
62. Gildberg A. Enzymes and Bioactive Peptides from Fish Waste Related to Fish Silage, Fish Feed and Fish Sauce Production. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2004;8850(September 2013):37-41.
63. Silva A. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*. 2003;60(6):1352-60.
64. Caponio F, Lestingi A, Summo C, Bilancia MT, Laudadio V. Chemical characteristics and lipid fraction quality of sardines (*Sardina pilchardus* W.): influence of sex and length. *Journal of Applied Ichthyology*. 2004;20(6):530-5.
65. Sinanoglou VJ, Proestos C, Lantzouraki DZ, Calokerinos AC, Miniadis-Meimaroglou S. Lipid evaluation of farmed and wild meagre (*Argyrosomus regius*). *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014;116(2):134-43.
66. Yiannopoulos S, Christodoulidou M, Kontoghiorghe K, Ioannou E, Nicolaidou P. Cyprus Food Composition Tables. In: Ministry of Health State General Laboratory, editor. 3rd ed: Press and Information Office; 2013.
67. Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. Maryland: AOAC International; 1998.
68. ISO. ISO 5983-2:2009 Animal feeding stuffs -Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content -Part 2: Block digestion and steam distillation method. ISO/TC 34/SC 10, 2009.
69. Onyeike EN, Ayalogu EO, Ibegbulem CO. Evaluation of the nutritional value of some crude oil polluted freshwater fishes. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*. 2000;6(2):227-33.
70. Islam MS, Ahmed MK, Habibullah-Al-Mamun M. Determination of Heavy Metals in Fish and Vegetables in Bangladesh and Health Implications. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2015;21(4):986-1006.
71. de Macêdo GR, B. Tarantino T, Barbosa IS, Pires TT, Rostan G, Goldberg DW, et al. Trace elements distribution in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) and green

turtle (*Chelonia mydas*) tissues on the northern coast of Bahia, Brazil. *Marine pollution bulletin*. 2015;94(1):284-9.

72. Raša Milanov Đ, Krstić M, Markovic R, Dragoljub Jovanović A, Baltić M, Ćirić J, et al. Analysis of Heavy Metals Concentration in Tissues of Three Different Fish Species Included in Human Diet from Danube River. *Acta Veterinaria*. 2016;66.

73. Charkoftaki G, Thompson DC, Golla JP, Garcia-Milian R, Lam TT, Engel J, et al. Integrated multi-omics approach reveals a role of ALDH1A1 in lipid metabolism in human colon cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2019;304:88-96.

74. Ishihama Y, Oda Y Fau - Tabata T, Tabata T Fau - Sato T, Sato T Fau - Nagasu T, Nagasu T Fau - Rappsilber J, Rappsilber J Fau - Mann M, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. 2015(1535-9476 (Print)).

75. Amoussou N, Marengo M, Durieux EDH, Douny C, Scippo M-L, Gobert S. Trace Elements and Fatty Acid Profile of *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) from Mediterranean Aquaculture. *Biological Trace Element Research*. 2019.

76. Esteban MB, García AJ, Ramos P, Márquez MC. Evaluation of fruit-vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets. *Waste Management*. 2007;27(2):193-200.

77. Vidotti RM, Viegas EMM, Carneiro DJ. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*. 2003;105(1):199-204.

78. Grigorakis K, N. Alexis M, Taylor KDA, Hole M. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); Composition, appearance and seasonal variations 2002. 477-84 p.

79. Grigorakis K, Fountoulaki E, Vasilaki A, Mittakos I, Nathanailides C. Lipid quality and filleting yield of reared meagre (*Argyrosomus regius*). *International Journal of Food Science & Technology*. 2011;46:711-6.

80. Costa S, Afonso C Fau - Bandarra NM, Bandarra Nm Fau - Gueifao S, Gueifao S Fau - Castanheira I, Castanheira I Fau - Carvalho ML, Carvalho MI Fau - Cardoso C, et al. The emerging farmed fish species meagre (*Argyrosomus regius*): how culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance. 2013(1873-6351 (Electronic)).

81. Carbonaro M. Proteomics: present and future in food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*. 2004;15(3):209-16.

82. Harnedy PA, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*. 2012;4(1):6-24.

83. Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T, et al. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Their Antihypertensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(21):6245-52.
84. Shahidi F, Janak Kamil YVA. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*. 2001;12(12):435-64.
85. Grigorakis K. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*. 2007;272:55-75.
86. Torres JA, Chen YC, Rodrigo-García J, Jaczynski J. 4 - Recovery of by-products from seafood processing streams. In: Shahidi F, editor. *Maximising the Value of Marine By-Products*: Woodhead Publishing; 2007. p. 65-90.
87. Guerard F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002;19-20:489-98.
88. Rustad T, Storrø I, Slizyte R. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology*. 2011;46(10):2001-14.
89. Martínez-Alvarez O, Chamorro S, Brenes A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*. 2015;73:204-12.
90. Alasalvar C, Taylor KDA, Zubcov E, Shahidi F, Alexis MN. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*. 2002;79:145-50.
91. Oken E, Choi A, Karagas M, Mariën K, Rheinberger C, Schoeny R, et al. Which Fish Should I Eat? Perspectives Influencing Fish Consumption Choices. *Environmental health perspectives*. 2012;120:790-8.
92. Maehre HK, Jensen I-j, Elvevoll EO, Eilertsen K-e. ω -3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases : Effects , Mechanisms and Dietary Relevance. 2015(*Cvd*):22636-61.
93. Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation*. 1993;88(2):523-33.
94. Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Sarriá B, Carbajal A, Pedrosa MM, Roe Ma, et al. Oily fish increases iron bioavailability of a phytate rich meal in young iron deficient women. *Journal of the American College of Nutrition*. 2008;27(1):96-101.

95. Fernandez E, Chatenoud L, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Fish consumption and cancer risk. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(1):85-90.
96. Wu Y-zWQ-j, Zhu J, Wu L. Fish consumption and risk of myeloma : a meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes & Control*. 2015;26(9):1307-14.
97. Li F, Liu X, Zhang D. Fish consumption and risk of depression: a meta-analysis. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 2015;jech-2015-206278.
98. Kröger E, Laforce R. Fish Consumption, Brain Mercury, and Neuropathology in Patients With Alzheimer Disease and Dementia. *JAMA*. 2016;315(5):465-6.
99. Zhang L, Wang WX. Size-dependence of the potential for metal biomagnification in early life stages of marine fish. 2007(0730-7268 (Print)).
100. Streit B. Bioaccumulation of contaminants in fish. 1998(1023-294X).
101. ShaAto R, Eneji IS, Annune PA. Bioaccumulation of Heavy Metals in Fish (Tilapia Zilli and Clarias Gariepinus) Organs from River Benue, North Central Nigeria. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*; Vol 12 No 1 & 2 (2011); *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*. 2011.
102. Kalogeropoulos N, Karavoltos S, Sakellari A, Avramidou S, Dassenakis M, Scoullou M. Heavy metals in raw, fried and grilled Mediterranean finfish and shellfish. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(10):3702-8.
103. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. 2003(0007-1420).
104. Zheng J, Chen K-h, Yan X, Chen S-J, Hu G-C, Peng X-W, et al. Heavy metals in food, house dust, and water from an e-waste recycling area in South China and the potential risk to human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013;96:205-12.
105. Afonso C, Costa S, Cardoso C, Bandarra NM, Batista I, Coelho I, et al. Evaluation of the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked farmed meagre based on the bioaccessibility of selenium, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, total mercury, and methylmercury determined by an in vitro digestion model. *Food Chemistry*. 2015;170:249-56.
106. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American journal of clinical nutrition*. 1995;61(6 Suppl):1402S-6S.
107. USDA. *Dietary Guidelines for Americans 2015-2010*. 2015.
108. F AO. *FAO Fisheries and Aquaculture Report No . 978 Report of the JOINT FAO / WHO EXPERT CONSULTATION ON THE RISKS AND BENEFITS OF FISH CONSUMPTION*2010. 25-9 p.

109. D'Alessandro A, Lampignano L, De Pergola G. Mediterranean Diet Pyramid: A Proposal for Italian People. A Systematic Review of Prospective Studies to Derive Serving Sizes. *Nutrients*. 2019;11(6).
110. Christensen V, Coll M, Piroddi C, Steenbeek J, Buszowski J, Pauly D. A century of fish biomass decline in the ocean. *Marine Ecology Progress Series*. 2014;512.
111. Duarte CM, Holmer M, Olsen Y, Soto D, Marbà N, Guiu J, et al. Will the Oceans Help Feed Humanity? *BioScience*. 2009;59(11):967-76.
112. Kalantzi I, Shimmield TM, Pergantis SA, Papageorgiou N, Black KD, Karakassis I. Heavy metals, trace elements and sediment geochemistry at four Mediterranean fish farms. *Science of The Total Environment*. 2013;444:128-37.
113. Kalantzi I, Pergantis SA, Black KD, Shimmield TM, Papageorgiou N, Tsapakis M, et al. Metals in tissues of seabass and seabream reared in sites with oxic and anoxic substrata and risk assessment for consumers. *Food Chemistry*. 2016;194:659-70.
114. Pergent G, Mendez S, Pergent-Martini C, Pasqualini V. Preliminary data on the impact of fish farming facilities on *Posidonia oceanica* meadows in the Mediterranean. *Oceanologica Acta*. 1999;22(1):95-107.
115. Belias CV, Bikas Vg Fau - Dassenakis MJ, Dassenakis Mj Fau - Scoullou MJ, Scoullou MJ. Environmental impacts of coastal aquaculture in eastern Mediterranean bays: the case of Astakos Gulf, Greece. 2003(0944-1344).
116. Basaran AK, Aksu M Fau - Egemen O, Egemen O. Impacts of the fish farms on the water column nutrient concentrations and accumulation of heavy metals in the sediments in the eastern Aegean Sea (Turkey). 2010(1573-2959).
117. Danielsson L-G, Magnusson B, Westerlund S, Zhang K. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Analytica Chimica Acta*. 1982;144:183-8.
118. USEPA. Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants (App. B, Part 136, Definition and procedures for the determination of the method detection limit): US Code of Federal Regulations. In: US Environmental Protection Agency, editor. revised July 1 ed1997. p. 265-7.
119. ΕΚΠΑ. Επιστημονική Μελέτη: Διερεύνηση Υφιστάμενης Περιβαλλοντικής Κατάστασης του Κόλπου της Σούδας. 2008.
120. Galindo-Riaño M, Jurado-González J, García M, Canales M, Oliva M, López F, et al. Trace metal accumulation in tissues of sole (*Solea senegalensis*) and the relationships with the abiotic environment. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2012;92:1072-92.

121. Lao Q, Su Q, Liu G, Shen Y, Chen F, Lei X, et al. Spatial distribution of and historical changes in heavy metals in the surface seawater and sediments of the Beibu Gulf, China. *Marine pollution bulletin*. 2019;146:427-34.
122. Steckert LD, Furtado WE, Jeronimo GT, Pereira SA, Jesus GFA, Mourino JLP, et al. Trace elements and microbiological parameters in farmed Nile tilapia with emphasis on muscle, water, sediment and feed. 2019(1532-4109 (Electronic)).
123. Bruland KW, Lohan MC. 6.02 - Controls of Trace Metals in Seawater. In: Holland HD, Turekian KK, editors. *Treatise on Geochemistry*. Oxford: Pergamon; 2003. p. 23-47.
124. Cotté-Krief M-H, Alain T, Martin J-M. Trace metal (Cd, Cu, Ni and Pb) cycling in the upper water column near the shelf edge of the European continental margin (Celtic Sea). *Marine Chemistry - MAR CHEM*. 2002;79:1-26.
125. Morley NH, Burton JD, Tankere SPC, Martin JM. Distribution and behaviour of some dissolved trace metals in the western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 1997;44(3):675-91.
126. Tang D, Warnken KW, Santschi PH. Distribution and partitioning of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) in Galveston Bay waters. *Marine Chemistry*. 2002;78(1):29-45.
127. European Commission Regulation. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement. 2002.
128. European Commission Regulation. EC No 2015/186 of 6 February 2015 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for arsenic, fluorine, lead, mercury, endosulfan and Ambrosia seeds Text with EEA relevance. 2015.
129. European Commission. Commission Regulation (EU) 2017/2229 of 4 December 2017 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for lead, mercury, melamine and decoquinate (Text with EEA relevance.) C/2017/7972. 2017.
130. Ferreira M, Caetano M, Costa J, Pousão-Ferreira P, Vale C, Reis-Henriques MA. Metal accumulation and oxidative stress responses in, cultured and wild, white seabream from Northwest Atlantic. *Sci Total Environ*. 2008;407(1):638-46.
131. Hosseini Alhashemi A, Karbassi A Fau - Hassanzadeh Kiabi B, Hassanzadeh Kiabi B Fau - Monavari SM, Monavari Sm Fau - Sekhavatjou MS, Sekhavatjou MS. Bioaccumulation of trace elements in different tissues of three commonly available fish species regarding their gender, gonadosomatic index, and condition factor in a wetland ecosystem. 2012(1573-2959 (Electronic)).

132. Aydin-Onen S, Ozturk M. Investigation of heavy metal pollution in eastern Aegean Sea coastal waters by using *Cystoseira barbata*, *Patella caerulea*, and *Liza aurata* as biological indicators. 2017(1614-7499 (Electronic)).
133. Alam MG, Tanaka A Fau - Allinson G, Allinson G Fau - Laurenson LJB, Laurenson Lj Fau - Stagnitti F, Stagnitti F Fau - Snow ET, Snow ET. A comparison of trace element concentrations in cultured and wild carp (*Cyprinus carpio*) of Lake Kasumigaura, Japan. 2002(0147-6513 (Print)).
134. Dural M, Goksu MZL, Ozak AA. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chem.* 2007;102(1):415-21.
135. Matasin Z, Orescanin V, Jukic VV, Nejedli S, Matasin M, Tlak Gajger I. Heavy Metals in Mud, Water and Cultivated Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Bighead Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Croatia. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2011;10:1069-72.
136. Tapia J, Vargas-Chacoff L Fau - Bertran C, Bertran C Fau - Pena-Cortes F, Pena-Cortes F Fau - Hauenstein E, Hauenstein E Fau - Schlatter R, Schlatter R Fau - Jimenez C, et al. Heavy metals in the liver and muscle of *Micropogonias manni* fish from Budi Lake, Araucania Region, Chile: potential risk for humans. 2012(1573-2959 (Electronic)).
137. Kelly B, Ikonomou M, Higgs D, Oakes J, Dubetz C. Mercury and other trace elements in farmed and wild salmon from British Columbia, Canada. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC.* 2008;27:1361-70.
138. Outridge PM, Scheuhammer AM. Bioaccumulation and toxicology of chromium: implications for wildlife. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1993;130:31-77.
139. Tokar EJ, Boyd WA, Freedman JH, Waalkes MP. Toxic effects of metals. *Casarett and Doull's Toxicology.* 2015;8th ed.(McGraw-Hill):933-80.
140. Zvab Rozic P, Dolenc T Fau - Bazdaric B, Bazdaric B Fau - Karamarko V, Karamarko V Fau - Kniewald G, Kniewald G Fau - Dolenc M, Dolenc M. Element levels in cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Adriatic Sea and potential risk assessment. 2014(1573-2983 (Electronic)).
141. Langston WJ. Toxic effects of metals and the incidence of marine ecosystems. . In R. W. Furness & P.S. Rainbow (Eds.), editor. New York: CRC Press.1990.
142. Nussey G, Van Vuren J, Preez H. Bioaccumulation of Chromium, Manganese, Nickel and Lead in the Tissues of the Moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), From Witbank Dam, Mpumalanga. *Water SA.* 2000;26.
143. Widianarko B, Van Gestel Ca Fau - Verweij RA, Verweij Ra Fau - Van Straalen NM, Van Straalen NM. Associations between trace metals in sediment, water, and

- guppy, *Poecilia reticulata* (Peters), from urban streams of Semarang, Indonesia. 2000(0147-6513 (Print)).
144. Canli M, Atli G. The relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987). 2003;121:129-36.
145. Douben PE. Lead and cadmium in stone loach (*Noemacheilus barbatulus* L.) from three rivers in Derbyshire. *Ecotoxicology and environmental safety*. 1989;18(1):35-58.
146. Nauen C. Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products. In: Ministerio de Agricultura PyA, editor. Madrid Spain: FAO Fisheries Circular;; 1983.
147. MAFF. Monitoring and Surveillance of Non-radioactive Contaminants in the Aquatic Environment and Activities Regulating the Disposal of Wastes At Sea. (No. 52). In: Aquatic Environment Monitoring, editor. Lowestoft, UK: Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science; 2000.
148. India Export Inspection Council (IEIC). Maximum Residual Limits (MRLs) for Pesticides, Heavy Metals and Antibiotics and Other Pharmacologically Active Substances in Fish and Fishery Products. . In: Council; IEI, editor. New Delhi, India2002.
149. FAO. Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products. In: Ministerio de Agricultura PyA, editor. Madrid Spain: FAO Fisheries Circular;; 1983.
150. European Commission Regulation. EC No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. 2006.
151. Milenkovic B, Stajic JM, Stojic N, Pucarevic M, Strbac S. Evaluation of heavy metals and radionuclides in fish and seafood products. *Chemosphere*. 2019;229:324-31.
152. Marengo M, Durieux EDH, Ternengo S, Lejeune P, Degrange E, Pasqualini V, et al. Comparison of elemental composition in two wild and cultured marine fish and potential risks to human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018;158:204-12.
153. Castritsi-Catharios J, Neofitou N, Vorloou AA. Comparison of heavy metal concentrations in fish samples from three fish farms (Eastern Mediterranean) utilizing antifouling paints. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2015;97(1):116-23.
154. Minganti V, Drava G, De Pellegrini R, Siccardi C. Trace elements in farmed and wild gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Marine pollution bulletin*. 2010;60(11):2022-5.
155. Renieri EA, Safenkova IV, Alegakis AK, Slutskaya ES, Kokaraki V, Kentouri M, et al. Cadmium, lead and mercury in muscle tissue of gilthead seabream and seabass: Risk evaluation for consumers. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;124:439-49.

156. Iamiceli A, Ubaldi A, Lucchetti D, Brambilla G, Abate V, De Felip E, et al. Metals in Mediterranean aquatic species. *Marine pollution bulletin*. 2015;94(1):278-83.
157. Erkan N, Özden Ö. Proximate composition and mineral contents in aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) analyzed by ICP-MS. *Food Chemistry - FOOD CHEM*. 2007;102:721-5.
158. Lourenço H, Afonso C, Anacleto P, Martins M, Nunes M, Lino A. Elemental composition of four farmed fish produced in Portugal. *International journal of food sciences and nutrition*. 2012;63:853-9.
159. Rubio C, Jalilli A, Gutiérrez A, González-Weller D, Hernández FJ, Melón E, et al. Trace Elements and Metals in Farmed Sea Bass and Gilthead Bream from Tenerife Island, Spain. *Journal of food protection*. 2011;74:1938-43.
160. Carvalho ML, Santiago S, Nunes ML. Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005;382(2):426-32.
161. Costa S, Afonso C, Bandarra NM, Gueifao S, Castanheira I, Carvalho ML, et al. The emerging farmed fish species meagre (*Argyrosomus regius*): how culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013;60:277-85.
162. Cirillo T, Amodio R, Fasano E, Lucisano A, Tafuri S, Ferrante M, et al. Cadmium Accumulation and Antioxidant Responses in *Sparus aurata* Exposed to Waterborne Cadmium. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2011;62:118-26.
163. Ghedira J, Jebali J Fau - Bouraoui Z, Bouraoui Z Fau - Banni M, Banni M Fau - Guerbej H, Guerbej H Fau - Boussetta H, Boussetta H. Metallothionein and metal levels in liver, gills and kidney of *Sparus aurata* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. 2010(1573-5168 (Electronic)).
164. Perez C, Martínez-Sánchez M, López S, Martínez M, Guardiola F, Esteban M. Influence of waterborne arsenic on nutritive and potentially harmful elements in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Environmental monitoring and assessment*. 2016;188.
165. Naccari C, Cicero N, Ferrantelli V, Giangrosso G, Vella A, Macaluso A, et al. Toxic Metals in Pelagic, Benthic and Demersal Fish Species from Mediterranean FAO Zone 37. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2015;95.
166. Güngör A, Kara D. Toxicities and risk assessment of heavy metals of the six most consumed fish from the Marmara Sea. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017;25.

167. Dural Eken M, Genc E, Sangun M, Güner O. Accumulation of some heavy metals in *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda) and its host sea bream, *Sparus aurata* (Sparidae) from North-Eastern Mediterranean Sea (Iskenderun Bay). *Environmental monitoring and assessment*. 2011;174:147-55.
168. Beg M, Aljandal N, Al-Subiai S, Karam Q, Husain S, Butt S, et al. Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwait's marine area. *Marine pollution bulletin*. 2015;100.
169. Minghetti M, Leaver M, Carpena E, George SG. Copper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase genes are differentially expressed in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) after exposure to dietary or waterborne copper. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2008;147:450-9.
170. Wang Y, Miao X, Sun J, Cai L. Chapter 6 - Oxidative Stress in Diabetes: Molecular Basis for Diet Supplementation. In: Mauricio D, editor. *Molecular Nutrition and Diabetes*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 65-72.
171. Nikoo M, Xu X, Ahmadi Gavlighi H. Chapter 17 - Seafood Waste-Derived Peptides: Their Antioxidant Activity and Potential as Alternative Preservatives in Fish Products. In: Singh Dhillon G, editor. *Protein Byproducts*: Academic Press; 2016. p. 315-32.
172. Korczek K, Tkaczewska J, Władysław M. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates in fish products - A Review. *Czech Journal of Food Sciences*. 2018;36.
173. Nurdiani R, Vasiljevic T, Singh TK, Donkor ON. Bioactive peptides from fish by-products with anticarcinogenic potential. *International Food Research Journal*. 2016;24(5): 1840-1849.
174. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. 2010(1873-5169 (Electronic)).
175. Nazeer RA, Anila Kulandai K. Evaluation of antioxidant activity of muscle and skin protein hydrolysates from giant kingfish, *Caranx ignobilis* (Forsskal, 1775). *International Journal of Food Science & Technology*. 2012;47(2):274-81.
176. Erdmann K, Cheung Bw Fau - Schroder H, Schroder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. 2008(0955-2863 (Print)).
177. Barras D, Widmann C. Promises of apoptosis-inducing peptides in cancer therapeutics. 2011(1873-4316 (Electronic)).
178. Gill H, Doull F, Rutherford-Markwick K, Cross M. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *The British journal of nutrition*. 2000;84 Suppl 1:S111-7.

179. Sah BN, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor O. Identification of Anticancer Peptides from Bovine Milk Proteins and Their Potential Roles in Management of Cancer: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015;14.
180. Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, Arnaudin I, Gómez-Guillén MC, Montero P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Res Int*. 2011;44(4):1044-51.
181. Καψοκεφάλου Μ. Διατροφική αντιμετώπιση της σιδηροπενίας. 2005.
182. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014;19(2):164-74.
183. Monsen ER. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *J Am Diet Assoc*. 1988;88(7):786-90.
184. Argyri K, Miller Dd Fau - Glahn RP, Glahn Rp Fau - Zhu L, Zhu L Fau - Kapsokafalou M, Kapsokafalou M. Peptides isolated from in vitro digests of milk enhance iron uptake by caco-2 cells. 2007(0021-8561 (Print)).
185. Argyri K, Tako E, Miller D, Glahn R, Komaitis M, Kapsokafalou M. Milk peptides increase iron dialyzability in water but do not affect DMT-1 expression in Caco-2 cells. 2009(1520-5118 (Electronic)).
186. Argyri K, Theophanidi E, Kapna A, Staikidou C, Pounis G, Komaitis M, et al. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. *Food Chemistry*. 2011;127(2):716-21.
187. Lafarga T, Hayes M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*. 2014;98(2):227-39.
188. Ryder K, Bekhit Ael D, McConnell M, Carne A. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. 2016(1873-7072 (Electronic)).
189. Lin HM, Deng SG, Huang SB, Li YJ, Song R. The effect of ferrous-chelating hairtail peptides on iron deficiency and intestinal flora in rats. 2016(1097-0010 (Electronic)).
190. Argyri K, Birba A, Miller DD, Komaitis M, Kapsokafalou M. Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: New developments. *Food Chemistry*. 2009;113(2):602-7.
191. Reddy Mb Fau - Chidambaram MV, Chidambaram Mv Fau - Fonseca J, Fonseca J Fau - Bates GW, Bates GW. Potential role of in vitro iron bioavailability studies in

- combatting iron deficiency: a study of the effects of phosvitin on iron mobilization from pinto beans. 1986(0252-1164 (Print)).
192. Picot L, Bordenave S, Didelot S, Fruitier-Arnaudin I, Sannier F, Thorkelsson G, et al. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*. 2006;41(5):1217-22.
193. Mayer AM, Gustafson KR. Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. 2004(0959-8049 (Print)).
194. Moore KS, Wehrli S Fau - Roder H, Roder H Fau - Rogers M, Rogers M Fau - Forrest JN, Jr., Forrest Jn Jr Fau - McCrimmon D, McCrimmon D Fau - Zasloff M, et al. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. 1993(0027-8424 (Print)).
195. Sills AK, Jr., Williams Ji Fau - Tyler BM, Tyler Bm Fau - Epstein DS, Epstein Ds Fau - Sipos EP, Sipos Ep Fau - Davis JD, Davis Jd Fau - McLane MP, et al. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. 1998(0008-5472 (Print)).
196. Cho J, Kim Y. Sharks: a potential source of antiangiogenic factors and tumor treatments. 2002(1436-2228 (Print)).
197. Pedrono F, Martin B Fau - Leduc C, Leduc C Fau - Le Lan J, Le Lan J Fau - Saiag B, Saiag B Fau - Legrand P, Legrand P Fau - Moulinoux J-P, et al. Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice. 2004(0163-5581 (Print)).
198. Lee YG, Kim Jy Fau - Lee KW, Lee Kw Fau - Kim KH, Kim Kh Fau - Lee HJ, Lee HJ. Peptides from anchovy sauce induce apoptosis in a human lymphoma cell (U937) through the increase of caspase-3 and -8 activities. 2003(0077-8923 (Print)).
199. Lee YG, Lee Kw Fau - Kim JY, Kim Jy Fau - Kim KH, Kim Kh Fau - Lee HJ, Lee HJ. Induction of apoptosis in a human lymphoma cell line by hydrophobic peptide fraction separated from anchovy sauce. 2004(0951-6433 (Print)).
200. Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. 2004(0066-4278 (Print)).
201. Kapsokefalou M, Miller DD. Effects of Meat and Selected Food Components on the Valence of Nonheme Iron during In Vitro Digestion. *Journal of Food Science*. 1991;56(2):352-5.
202. Noornissabegum M, Revathi K. Analysis of gut bacterial flora from edible marine fishes of South east coast of India. 2014.
203. Storcksdieck genannt Bonsmann S, Hurrell RF. Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. 2007(1750-3841 (Electronic)).
204. Martinez-Torres C Fau - Layrresse M, Layrresse M. Effect of amino acids on iron absorption from a staple vegetable food. 1970(0006-4971 (Print)).

205. Miller Dd Fau - Schricker BR, Schricker Br Fau - Rasmussen RR, Rasmussen Rr Fau - Van Campen D, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. 1981(0002-9165 (Print)).
206. Thorkelsson G, Kristinsson H. Bioactive Peptides from Marine Sources. State of Art. Report to the NORA fund. Food Res Inn Safe. 2009;1.
207. Kadam SU, Prabhasankar P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. Food Research International. 2010;43(8):1975-80.
208. Liu M, Wallin R, Saldeen T. Effect of bread containing stable fish oil on plasma phospholipid fatty acids, triglycerides, HDL-cholesterol, and malondialdehyde in subjects with hyperlipidemia. Nutrition Research. 2001;21:1403-10.
209. Yep Y, Mann N, Bode O, Sinclair A. Bread enriched with microencapsulated tuna oil increases plasma omega-3 fatty acids in humans. Asia Pacific journal of clinical nutrition. 2002;11:285-91.
210. Harrison RA, Sagara M, Rajpura A, Armitage L, Birt N, Birt CA, et al. Can foods with added soya-protein or fish-oil reduce risk factors for coronary disease? A factorial randomised controlled trial. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2004;14(6):344-50.
211. Yan N, inventor Encapsulated agglomeration of microcapsules and their preparation, 2003.
212. Bárcenas M-E, Benedito C, Rosell C. Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage. Food Hydrocolloids. 2004;18:769.
213. Prabhasankar P, Ponesakki G, Bhaskar N. Influence of Indian Brown Seaweed (*Sargassum marginatum*) as an Ingredient on Quality, Biofunctional, and Microstructure Characteristics of Pasta. Food Science and Technology International - FOOD SCI TECHNOL INT. 2009;15:471-9.
214. Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N, Hirose A, Stephen N, Gowda LR, et al. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. Food Chemistry. 2009;115(2):501-8.
215. Iafelice G, Caboni MF, Cubadda R, Di Criscio T, Trivisonno MC, Marconi E. Development of Functional Spaghetti Enriched with Long Chain Omega-3 Fatty Acids. Cereal Chemistry. 2008;85(2):146-51.
216. Norris ER, Elam DW. Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. Biol Chem. 1940;134: 443-454.
217. Gildberg A, Mikkelsen H. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture. 1998;167(1):103-13.

218. Karlsen S, Hough E, Olsen RL, Olsen RL. Structure and proposed amino-acid sequence of a pepsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). 1998(0907-4449 (Print)).
219. Brewer P, Helbig N, Haard NF. Atlantic Cod Pepsin — Characterization and Use as a Rennet Substitute. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 1984;17(1):38-43.
220. Haard N. Atlantic Cod Gastric Protease. Characterization with Casein and Milk Substrate and Influence of Sepharose Immobilization on Salt Activation, Temperature Characteristics and Milk Clotting Reaction. Journal of Food Science. 2006;51:313-6.
221. Joakimsson KG. Enzymatic deskinning of herring (*Clupea harengus*). : University of Tromsø.; 1984.
222. Corcoran TH. Roman fish sauces. Classical. 1963.
223. Saisithi P. Traditional fermented fish: Fish sauce production. pp. 111-131. . Fisheries Processing: Biotechnological Applications,. London: Chapman and Hall; 1994. p. pp. 111-31.
224. Thongthai C, Gildberg A. Asian fish sauce as a nutritional source. In: Shi CTHaFS, editor. Asian Functional Foods: Marcel Dekker; 2003.
225. Ramirez A. Salmon by-products. In: FAO, editor. Rome: FAO Fisheries; 2007.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



Article

Nutrient Composition and Fatty Acid and Protein Profiles of Selected Fish By-Products

Aikaterini Kandyliari ¹, Athanasios Mallouchos ¹, Nikos Papandroulakis ²,
Jaya Prakash Golla ³, TuKiet T. Lam ^{4,5}, Aikaterini Sakellari ⁶, Sotirios Karavoltzos ⁶,
Vasilis Vasiliou ³ and Maria Kapsokefalou ^{1,*}

¹ Unit of Human Nutrition, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, 11855 Athens, Greece; kandyliari@aua.gr (A.K.); amallouchos@aua.gr (A.M.)

² Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Center for Marine Research, 71003 Heraklion, Greece; npap@hcmr.gr

³ Department of Environmental Health Sciences, Yale School of Public Health, New Haven, CT 06510, USA; jayaprakashgolla@gmail.com (J.P.G.); vasilis.vasiliou@yale.edu (V.V.)

⁴ Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA; tukiet.lam@yale.edu

⁵ Keck MS & Proteomics Resource, WM Keck Biotechnology Resource Laboratory, New Haven, CT 06510, USA

⁶ Laboratory of Environmental Chemistry, Department of Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Pirepistinioupolis, Zografou, 15784 Athens, Greece; esakel@chem.uoa.gr (A.S.); skarav@chem.uoa.gr (S.K.)

* Correspondence: kapsok@aua.gr; Tel: +30-210-529-4708

Received: 13 January 2020; Accepted: 12 February 2020; Published: 14 February 2020



Abstract Processing of fish in aquaculture generates considerable amounts of by-products that remain underused and/or unexploited. We evaluated the nutritive content of fish by-products (head, gills, intestines, trimmings, bones, and skin) from meagre and gilthead sea bream fish species reared in Greece in order to estimate their nutritional value for future development of high added-value products. The proximate composition of the fish samples (total protein, total lipid, ash, moisture, and macro-element content) was determined using the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) and International Organization for Standardization (ISO) official methods. The content of fatty acids was determined using capillary gas chromatography, and the protein profile was estimated employing scientific orbitrap mass spectrophotometer methodology. The nutrient composition of fish by-products presented fluctuations among the different by-products. Skin was the most significant protein source, trimmings and bones were high in calcium, and the head, intestines, and bones were a good source of lipids. The most abundant lipid acids found in by-products were oleic, palmitic, linoleic, and eicosenoic acids, whereas the most abundant proteins were adenosine triphosphate (ATP) synthase subunit epsilon, mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase, and mitochondrial cytochrome b-c1 complex subunit 8. These data suggest that by-products constitute valuable sources of nutrients and could therefore be exploited in accordance with the principles of a circular economy.

Keywords: fish waste; circular economy; sea bream; meagre; nutrient content; proximate composition; proteomics; aquaculture

1. Introduction

Processing of fish generates by-products (bones, skin, head, viscera), which may constitute up to 15% of fish weight when gutting and scaling or even up to 70% of fish weight when filleting [1]. According to Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) report, 9.1 million tons

of fish waste are estimated to be discarded annually [2]. Thus, fish by-products have become a global concern and also threaten the sustainability of fish aquaculture. Fish by-products are, in most cases, either incorporated into animal feed or biofuels, i.e., low added-value products, or incinerated and discarded, thus increasing the energy consumption, financial cost, and environmental impact of their management process [3].

There are emerging exploitation opportunities for fish by-products. Producers' demand for natural ingredients of high nutritional value is currently being reported in accordance with the public's nutritional requirements [4]. These natural ingredients may derive from food by-products produced along the agri-food chain. A database containing the nutritional composition and alternative uses of food waste [5] demonstrates that in order to valorize underutilized food materials, the complete characterization of their nutrient composition and properties is required. Fish by-products may be an important source for such ingredients. For example, protein, hydrolysates, peptides, and fatty acids [6–11] have been determined in fish by-products and linked to antihypertensive, antioxidant, and antimicrobial activities [12–15].

Research on the exploitation of fish by-products for the development of high added-value products, such as novel foods, constitutes a financial and nutritional challenge which will significantly ameliorate the aquaculture sector's performance, in regard to sustainability. To address this challenge, a systematic approach to the study of fish-products is required with country-specific information in order to address a variety of factors, such as fish species, size, and environmental conditions that affect nutrient composition [16,17].

There are limited data from aquaculture units in Greece, despite the size and penetration of the industry. Greek aquaculture exports 80% of its production to 32 countries [18]. Species of interest include gilthead sea bream (*Sparus aurata*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), and meagre (*Argyrosomus regius*) [19]. Limited data on the fatty acid content of farmed meagre fillet and its by-products [20] and gilthead sea bream and sea bass fillet [21] are available. Thus, there is a gap in the nutritional content of the by-products of those fish species, which creates a barrier to their potential exploitation.

The purpose of this study was to evaluate the nutritional content of fish by-products from meagre and gilthead sea bream produced during fish filleting procedures to provide insight into their possible future uses. Specifically, in a series of filleting by-products from meagre and gilthead sea bream fishes of different size classes, the contents of total protein, fat, hydration, ash, and main minerals were determined, and their fatty acid and protein profiles were characterized.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

All chemicals and reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

2.2. Fish Sample Collection and Preparation

A total of 36 individuals of meagre and 60 individuals of gilthead sea bream, of two different size classes (small and large), were obtained from the pilot-scale cage farm of the Hellenic Centre for Marine Research (HCMR) in Crete, Greece, in June 2017. The size class (small and large) was defined by the weight of the fish; small fishes were assumed to have a body weight less than 300 g for meagre and less than 200 g for gilthead sea bream. Fishes were fed with commercial feed pellets (Irida S.A., Arta, Greece) consisting of fishmeal, maize gluten, fish oil, sunflower flour, and soy flour. The chemical composition of the pellets was as follows: 43.0% crude protein, 17.0% crude fat, 2.7% crude fiber, 8.2% ash, 8.5% moisture, 1.15% total P, 1.5% total Ca, Vit. A 10,000 IU, Vit. D3 2,000 IU, Vit. E 400 mg, Vit. C 500 mg, choline 750 mg. Among the 36 individuals of meagre, 6 large fish had a mean body weight of 1256.45 ± 232.32 g and 30 small fish had a mean body weight of 235.76 ± 38.45 g. Among 60 individuals of gilthead sea bream, 16 large fish had a mean body weight of

403.47 ± 72.92 g and 44 small fish had a mean body weight 160.16 ± 30.79 g. After measuring the morphometric characteristics of each fish, we examined six different by-products: head, gills, intestines, trimmings, bones, and skin. These different by-products were kept separately in tightly packaged polypropylene bags at −80 °C. To perform the analysis, the same types of by-product categories from different individuals were pooled together to obtain a sample of approximately 100 g, following the methodology of previous studies [22–26]. For this purpose, more than 72 pooled samples of fish by-products were obtained (2 fish species, 2 sizes of each species, 6 fish by-products, 3–4 individual pool replicates). Specifically, pooling of by-products was performed according to their six categories, species and size class, providing triplicates for a total of 24 different sample categories. All samples were lyophilized for 48 h (Telstar Cryodos 50, Telstar, Terrassa, Spain) and then homogenized with a knife mill for 10 s at a revolution speed of 10000 rpm (Retsch ZM 200, Retsch, Hahn, Germany). Homogenized powders were stored at −80 °C until further analysis.

All fishes were reared at the pilot scale in the growing facilities of HCMR. The installations are licensed facilities for operations of breeding and experimentation use of fish issued by the Region of Crete, General Directorate of Agricultural and Veterinary No 3989/01.03.2017. The breeding and experimental facilities were registered with the following approval codes: EL91-BIObr-03 and EL91-BIOexp-04. The fish samples were collected from groups reared under normal conditions and after harvesting, were euthanized using ice water. The personnel that performed the sampling has degrees accredited by the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) on the “care and use of laboratory animals” for persons carrying out procedures on animals, designing procedures and projects, taking care of animals, and killing animals.

2.3. Proximate Composition

The proximate composition of the different fish by-product samples was determined using the following Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [27] and International Organization for Standardization (ISO) methods. The moisture content of samples was determined using a vacuum oven (AOAC 952.08) prior to sample lyophilization. The samples were kept in properly sealed containers and carefully resuspended after thawing to avoid any losses. Total ash determination was conducted according to AOAC 938.08, and the total fat content according to AOAC 948.15. The nitrogen content was determined using an automated Kjeldahl apparatus (Kjeltec 8100, Foss Analytical, Hillerød, Denmark) following the procedure described in ISO 5983-2:2005 [28]. The total protein content was calculated by multiplying the nitrogen content by a conversion factor of 6.25. Total carbohydrates were determined by subtracting the sum of the ash, fat, and protein contents from 100 [29]. All analyses were conducted in triplicates. The results for the moisture content are expressed as g/100 g of sample, whereas those for ash, protein, fats, and carbohydrates as g/100 g of dry matter.

2.4. Mineral Analysis

Macro-elements (Ca, Na, K, Mg) were determined in the different fish by-product samples. The lyophilized samples were digested with HNO₃ 65% supra pure, and H₂O₂ 30% was subsequently added according to the procedures described in Milanov et al. [30]. Measurement of the macro-elements K, Na, Ca, and Mg was performed by atomic emission spectrometry, employing a Varian SpectrAA 200 (Varian, Mulgrave, Australia) instrument. All analyses were conducted in triplicate. The results are expressed as mg/g of dry matter. The percentages of recommended dietary allowances (RDA) and adequate intake (AI) were calculated based on the suggestions of the European Parliament and of the Council [31] and in accordance with the study of Montowska et al. [32].

2.5. Preparation of Samples for Fatty Acid and Protein Profile Analyses

For the determination of protein and fatty acid profiles, lyophilized samples of heads, skin, bones, trimmings, and gills were pooled together according to the two different species. The intestines were excluded from the pooled samples in order to minimize the variation in the case of non-fully

fastened fishes. The nutrient profiles of the two final pooled samples of meagre and gilthead sea bream by-products were further analyzed and characterized according to the following methods.

2.6. Fatty Acid Profile

Fatty acids were determined in the above samples according to AOAC 996.06. Fat was extracted from fish samples using acidic hydrolysis, and after methylation, the fatty acid methyl esters (FAMEs) were quantitatively measured by capillary gas chromatography (Simadzu GC-2010 Plus, Simadzu Corporation, Kyoto, Japan) against a triglyceride (triundecanoic C11:0) internal standard. Separation of FAMEs was accomplished on a DB-wax capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Agilent). Helium was used as a carrier gas at a constant linear velocity of 30 cm/s. The split ratio was set at 1/10. Oven temperature was maintained at 100 °C for 1 min, programmed at 25 °C/min to 100 °C and after 1 min, it was raised to 240 °C at a rate of 5 °C/min and held for 2 min. Then, the temperature was raised to 250 °C at a rate of 5 °C/min and held for 10 min. Inlet and Flame Ionization Detector (FID) temperatures were set to 250 °C and 270 °C, respectively. Peak identification and response factor calculation were accomplished using a FAME standard mixture (Supelco 37 Component FAME mix, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Calculations were performed according to AOAC 996.06. The results were expressed as g/100 g of dry matter.

2.7. Protein Profile

For the determination of their protein profile, the above pooled by-product samples were dissolved in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, supplemented with complete protease and phosphatase inhibitor cocktail. Then, the specimens ($n = 3$ for each pooled sample) were sonicated at 15 s bursts three times with a digital sonifier (Branson Ultrasonics, Branson, Danbury, Connecticut). The homogenate was then centrifuged at $16,000\times g$ for 10 min at 4 °C, and 150 µL of the supernatant was added to methanol:chloroform (at ratio of 4:3 %v/v) for protein precipitation. Following vortex and centrifugation ($16,000\times g$ for 1 min), the supernatant was carefully discarded and an additional 400 µL of methanol was added. The mixture was centrifuged at $16,000\times g$ for 2 min, and methanol was carefully discarded. The pellet was dissolved in 82 µL of 8 M urea in 0.4 M NH_4HCO_3 solution and then measured with a NanoDrop (2000/2000c Thermo Scientific, Fisher Scientific, Wilmington, DC, USA) to obtain the same amount of total protein from all the samples. Dithiothreitol (DTT) was then added to the resultant sample at a ratio of 10:1 %v/v (sample:DTT), and the mixture was incubated in the dark in an oven (Isotemp Incubator, Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA) at 37 °C for 30 min. Subsequently, 8 µL of iodoacetamide (100 mM) was added to alkylate the sample, which was further diluted with mass spectrometry grade H_2O in order to adjust the urea concentration to lower than 2 M. The sample was then enzymatically digested with Lys C (at 1:50 enzyme:protein ratio) at 37 °C for 16 h. The digestion continued with trypsin (at a 1:50 enzyme:protein ratio), and the sample was left in the incubator at 37 °C for 7 h. The digestion reaction was quenched with trifluoroacetic acid at a final 10% concentration, and the sample was then desalted with C18 UltraMicroSpin columns (The Nest Group Inc., Southborough, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The eluate was subsequently dissolved in a mixture of 98% mass spectrometry-grade H_2O , 0.1% formic acid, and 2% acetonitrile. Peptide concentration was determined for all samples and diluted accordingly to 0.05 µg/µL with 0.1% FA; then 5 µL of each sample was loaded onto the column for Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (LC MS/MS) analyses. Data collection for label-free quantitation (LFQ) proteomics was carried out on a mass spectrometer (Thermo Scientific Orbitrap Fusion) connected to a Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC) system (Waters nano ACQUITY) equipped with a Waters Symmetry® C18 180 µm × 20 mm trap column and a 1.7-µm, 75 µm × 250 mm nano ACQUITY UPLC column (35 °C). Data processing of collected LFQ was performed similarly to the methodology published by the Keck Mass Spectrometry & Proteomics Resource [33]. For the addition of quantitative information to our proteomic results, the Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPai) score was employed, which is proportional to the protein content of a protein sample [34].

2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS package, version 16.1 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). We deemed statistical significance at $\alpha = 0.05$. Morphometric characteristics of the different fish as well as the percentage of weight of the different by-products are expressed as the mean \pm standard deviation (SD); for these variables, normality was confirmed graphically with histograms (Figures S1–S6, Supplementary Material), and the differences between two different size classes (large and small) and two different species (meagre and gilthead sea bream) were tested using Student's *t*-test (unpaired analysis). The nutrient content is presented as the mean \pm SD, and the non-parametric Mann–Whitney test was used to statistically compare values between two groups due to the small sample size.

3. Results

The studied sample consisted of 36 and 60 individuals of meagre and gilthead sea bream, respectively. They were classified according to their body size into large and small fishes. Specifically, the meagre sample consisted of 6 large individuals of mean length 53.8 ± 3.9 cm, and 30 small individuals of mean length 26.9 ± 1.8 cm. Accordingly, the gilthead sea bream sample consisted of 16 large fish of mean length 28.3 ± 1.7 cm and 44 small fish of mean length 21.4 ± 1.5 cm.

Table 1 summarizes the six different by-products (head, gills, intestines, trimmings, bones, skin) as a percentage of the total weight for the two different species and the two different size classes. Comparing the sizes of the fish, no differences were observed for the percentage of head, gills, bones, and skin. However, the percentage of intestines relative to the total fish weight was lower in large fishes ($4.78 \pm 0.84\%$) compared to small ones ($6.44 \pm 1.33\%$), ($p < 0.001$). The percentage of trimmings relative to the total fish weight was $1.79 \pm 0.69\%$ in small fishes, exceeding the corresponding value for large fishes ($1.64 \pm 0.18\%$), ($p = 0.007$). No statistically important differences were observed between the two different size classes for the total by-product percentage. When comparing the two species, no differences were observed for the percentage of head, gills, intestines, and skin. However, the percentage of trimmings was lower in the meagre ($1.48 \pm 0.30\%$) compared to the gilthead sea bream ($1.94 \pm 0.61\%$), ($p < 0.001$), whereas that of bones was higher in meagre ($7.65 \pm 1.60\%$) than in gilthead sea bream ($5.00 \pm 0.66\%$), ($p < 0.001$). Finally, the total by-product percentage was different between the two fish species ($p < 0.001$); meagre by-product yield percentage was higher ($43.06 \pm 3.24\%$) than that of gilthead sea bream ($38.26 \pm 1.90\%$).

Table 2 present the nutrient composition (mean values) of the by-product samples (head, gills, intestines, trimmings, bones, skin) of the two size classes (large and small) for meagre and gilthead sea bream. No statistically significant differences, either between fish species or size classes, were observed for the different by-products based on the measured moisture, ash, total fat, total protein, carbohydrate, calcium, sodium, potassium, and magnesium contents. The mean values on a dry weight basis of all fish by-products for protein, fat, and ash contents were calculated. Specifically, the mean protein content was $44.27 \pm 13.35\%$, the mean fat content was $26.48 \pm 15.97\%$, and the mean ash content was $20.78 \pm 14.44\%$.

The content of minerals, i.e., calcium (Ca), potassium (K), magnesium (Mg), and sodium (Na), in the different by-products is presented in Table 3. No statistical differences were observed between the two different size classes or between the two species with respect to the different minerals. Percentages of RDA and AI for Ca, K, Mg, and Na were calculated for all the different by-products for the content of 100 g of dried sample. By-products such as trimmings presented a valuable source of Ca, with RDA percentage reaching 466% for meagre and 424% for gilthead sea bream fishes. The RDA percentage of Na did not exceed 39% for meagre and 45% for gilthead sea bream. Skin was a source of potassium, i.e., reaching 20% and 18% for meagre and gilthead sea bream, respectively. The Mg percentage was 110% of the RDA for meagre gill samples and 104% for gilthead sea bream trimming samples.

Table 1. Percentage weight¹ of the six different by-products (intestines, gills, trimmings, head, skin) of meagre and gilthead sea bream in two different size classes.

g By-Product/100 g Fish	Large Meagre (n = 6)		Small Meagre (n = 30)		Large Gilthead Sea Bream (n = 16)		Small Gilthead Sea Bream (n = 44)		P ₁	P ₂
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
Head	18.74	3.27	17.09	1.74	18.49	1.42	16.70	1.27	0.09	0.61
Gills	3.18	0.31	3.01	0.32	2.54	0.27	2.42	0.22	0.58	0.38
Intestines	5.07	0.53	7.44	0.95	4.49	0.90	5.44	0.87	<0.001	0.08
Trimmings	1.65	0.19	1.32	0.29	1.62	0.19	2.27	0.63	0.007	<0.001
Bones	8.76	3.09	8.53	0.76	4.95	0.47	5.94	0.72	0.50	<0.001
Skin	6.25	1.68	7.06	1.06	6.35	1.04	6.22	0.99	0.38	0.43
Sum	43.65	4.84	42.46	2.41	38.45	2.06	38.07	2.08	0.98	<0.001

¹ Results are presented as the mean (SD) for normally distributed variables; P₁ and P₂ denote statistical significance between the two different size classes and between the two fish species, respectively; p-values derived through independent Student's t-test with α = 0.05.

Table 2. Mean data for the nutrient composition of by-product samples (head, gills, intestines, trimmings, bones, skin) of meagre and gilthead sea bream fishes in two different size classes (large and small).

	By-Product Nutrient Composition																									
	Head		Gills		Intestines		Trimmings		Bones		Skin		Head													
	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small												
Meagre (g/100 g)*	Moisture	84.0	0.5	86.9	0.7	88.3	0.2	74.3	0.4	73.0	0.2	36.2	0.4	65.1	0.7	57.0	0.1	63.2	0.7	40.6	0.2	38.4	0.3	60.3	0.2	
	Ash	20.9	0.39	21.29	1.04	15.39	0.98	19.18	0.82	4.77	0.88	2.85	0.92	39.12	1.71	38.91	2.55	21.09	0.38	28.90	1.23	20.24	0.93	19.23	1.86	
	Protein	40.41	0.36	47.50	1.25	45.62	0.16	48.46	0.32	39.62	0.08	29.79	0.64	45.87	0.91	45.98	1.92	32.07	0.25	36.41	0.15	75.16	1.07	75.15	0.03	
	Fat	38.88	1.60	23.34	0.74	19.71	1.33	21.31	0.45	17.09	0.19	34.05	4.94	3.00	1.30	4.33	0.69	34.96	0.10	31.07	2.10	6.12	0.42	9.61	1.60	
	Carbohydrates	9.76	1.65	7.89	1.78	19.08	1.66	11.05	0.63	18.32	0.22	15.91	4.98	2.01	2.39	1.16	3.27	11.97	0.64	9.32	2.44	1.01	0.01	0.99	0.01	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean
Gilthead Sea Bream (g/100 g)*	Moisture	57.3	0.7	62.4	0.2	66.6	0.3	62.9	0.8	67.1	1.0	57.15	0.5	48.6	0.1	50.1	0.2	53.3	0.7	74.5	0.8	53.0	0.5	61.2	0.1	
	Ash	18.11	1.34	21.39	1.33	16.69	0.40	17.49	0.90	3.37	0.36	2.62	0.08	45.76	2.29	47.26	0.73	26.62	0.10	27.70	0.38	6.02	0.17	4.36	0.17	
	Protein	32.40	0.45	37.19	0.67	31.49	0.42	38.50	1.47	37.23	0.75	26.87	0.35	41.85	1.00	43.10	2.30	34.02	0.98	40.74	1.37	45.16	0.89	49.67	0.11	
	Fat	37.68	4.19	28.76	0.47	37.46	1.16	26.69	0.23	43.19	2.33	30.12	0.68	7.45	0.09	4.09	0.33	33.56	0.11	21.47	0.34	45.39	3.45	45.94	0.34	
	Carbohydrates	12.41	1.39	12.66	1.56	11.42	1.30	17.32	1.52	16.01	0.83	15.39	1.58	6.78	2.50	3.59	2.44	8.80	0.99	10.09	1.73	4.45	3.56	0.03	0.02	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean

* ash, protein, fat, and carbohydrate contents are expressed on a dry weight basis; carbohydrate were calculated by difference; no statistically significant differences were observed between the different by-products, either between fish species or size classes.

Table 3. Data of mineral composition of by-product samples (head, gills, intestines, trimmings, bones, skin) of meagre and gilthead sea bream fishes in two different size classes (large and small) and the RDA and AI percentages.

	By-Product Nutrient Composition																									
	Head		Gills		Intestines		Trimmings		Bones		Skin		Head													
	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small	Large	Small												
Meagre (mg/g)	Calcium (Ca)	5.02	0.72	8.59	1.13	5.88	0.23	6.80	0.12	0.61	0.04	0.38	0.10	12.82	0.34	46.38	1.34	6.39	0.93	9.38	0.37	3.59	0.71	3.90	0.08	
	Sodium (Na)	4.07	0.37	4.92	0.56	5.32	0.13	5.92	0.27	2.53	0.12	2.12	0.37	3.67	0.99	3.72	0.43	3.46	0.11	2.76	0.73	4.42	0.58	3.15	0.17	
	Potassium (K)	5.31	1.26	8.30	0.67	8.33	1.96	9.34	0.77	8.92	1.03	4.86	1.13	8.92	1.02	4.63	0.66	7.62	0.21	8.92	0.23	8.46	1.03	9.33	1.12	
	Magnesium (Mg)	0.24	0.19	1.34	0.44	1.37	0.17	3.52	0.62	2.31	0.53	1.49	0.67	0.71	0.04	2.46	0.23	0.67	0.13	0.45	0.12	0.43	0.03	0.76	0.32	
	% RDA/AI (Ca)*	30		36		39		68		6		6		128		466		64		36		36		39		
	% RDA/AI (Na)*	27		33		37		39		17		14		39		25		23		18		29		21		
	% RDA/AI (K)*	13		18		18		20		19		10		15		14		16		19		18		20		
	% RDA/AI (Mg)*	8		42		43		110		78		47		22		77		21		14		13		24		
	Gilthead Sea Bream (mg/g)	Calcium (Ca)	8.59	0.43	3.62	1.02	4.32	0.22	7.59	0.33	0.28	0.09	0.67	0.25	42.38	0.11	11.89	0.45	9.23	0.34	7.92	1.10	2.10	0.92	0.50	0.02
		Sodium (Na)	3.68	0.21	3.28	0.21	4.26	0.02	4.94	0.72	3.01	0.79	2.39	1.01	6.81	0.35	6.08	0.26	3.43	0.14	3.79	0.99	3.52	0.13	1.34	0.22
Potassium (K)		4.47	0.92	4.40	1.02	7.04	0.11	8.16	0.13	4.65	0.13	7.83	1.73	7.09	0.15	8.09	1.03	4.92	0.88	8.35	0.37	7.44	0.32	8.66	0.64	
Magnesium (Mg)		0.86	0.43	0.28	0.29	0.64	0.31	2.49	0.46	1.23	0.17	2.84	0.12	3.34	1.04	0.77	0.25	0.33	0.06	0.30	0.09	0.58	0.36	2.10	0.03	
% RDA/AI (Ca)*		86		36		45		76		2		7		423		115		92		79		21		3		
% RDA/AI (Na)*		25		22		28		30		20		16		45		41		23		25		23		9		
% RDA/AI (K)*		14		14		15		17		10		17		15		17		15		18		16		18		
% RDA/AI (Mg)*		27		9		20		78		50		89		104		24		10		9		18		66		

* Mineral concentration was calculated as mg/g of dry matter; RDA/AI percentages for the content of 100 g of dried sample were calculated based on the following values: 1000 mg for Ca, 4700 mg for K, 329 mg for Mg, and 1500 mg for Na [31].

The fatty acid content of the pooled samples from by-products of meagre and gilthead sea bream fishes is shown in Table 4. The majority of the fatty acid concentrations were statistically different between the two fish species. The most abundant fatty acids in the by-products from both fish species were oleic (18:1), palmitic (16:0), linoleic acid (18:2), and eicosenoic (20:1) acids. The total fatty acid content as well as the content of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids was significantly higher in the gilthead sea bream by-products.

Table 4. Fatty acid content (g/100 g) of the pooled by-products from meagre and gilthead sea bream fishes.

Fatty Acids	Meagre (<i>Argyrosomus regius</i>)		Gilthead Sea Bream (<i>Spicara aurata</i>)		p
	Mean	SD	Mean	SD	
14:0	0.63	0.08	1.40	0.27	<0.05
15:0	0.06	0.004	0.10	0.01	<0.05
16:0	3.19	0.001	4.85	0.003	0.08
16:1	0.94	0.002	2.23	0.003	<0.001
17:0	0.05	0.01	0.08	0.02	0.19
18:0	0.71	0.01	0.78	0.05	0.91
18:1	6.63	0.001	11.34	0.01	<0.05
18:2 n-6	2.60	0.12	4.24	0.18	0.11
18:3 n-6	0.03	0.37	0.07	1.06	<0.001
18:3 n-3	0.47	0.002	0.81	0.02	<0.05
18:4 n-3	0.15	0.003	0.31	0.02	<0.05
20:0	0.07	0.07	0.09	0.21	0.39
20:1 n-9	1.14	0.03	1.53	0.09	0.32
20:2 n-9	0.02	0.01	0.09	0.02	<0.001
20:2 n-6	0.13	0.13	0.20	0.37	0.12
20:3 n-6	0.04	0.004	0.09	0.03	<0.05
20:3 n-3	0.12	0.02	0.14	0.04	0.35
20:4 n-6	0.04	0.01	0.09	0.02	<0.001
20:4 n-3	0.10	0.03	0.26	0.02	<0.001
20:5 n-3	0.23	0.01	0.42	0.02	<0.05
22:1	1.09	0.04	1.30	0.13	0.58
22:2 n-6	-	-	0.03	0.001	<0.05
23:0	0.04	0.01	0.10	0.02	<0.001
22:5 n-3	0.26	0.04	0.70	0.23	<0.001
22:6 n-3	0.30	0.05	0.53	0.15	<0.05
Total Fatty Acids	19.15	2.62	31.86	7.85	<0.05
SFA	4.84	0.69	7.45	1.71	0.05
PUFA	4.60	0.67	8.16	2.11	<0.05
MUFA	9.71	1.27	16.25	4.05	<0.05

Fatty acids are expressed as g/100 g of the lyophilized sample; p presents the differences between the two fish species.

Mean data of the proteomic profile of meagre and gilthead sea bream fish by-product samples are presented in Table 5. The determination of the abundance of each protein was derived through the application of the emPAI score [34]. The most abundant proteins identified in meagre by-products were adenosine triphosphate (ATP) synthase subunit epsilon, mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase 1 beta subcomplex subunit 1, 60S ribosomal protein L35a, cytochrome c oxidase, and mitochondrial cytochrome c. For gilthead sea bream by-products, the most abundant proteins were mitochondrial cytochrome b-c1 complex subunit 8, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 6B1, and NADH dehydrogenase, with an emPAI score higher than 0.85.

Table 5. Protein profile data of meagre and gilthead sea bream fish by-product samples.

Meagre (<i>Aegrosomus regius</i>)			
Protein Name	Protein ID *	MW	emPAI
ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	XP_010742784.1	5730	4.97
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	XP_019118827.2	6895	1.75
60S ribosomal protein L35a	XP_010748069.1	12,478	1.38
cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	XP_010737425.2	14,265	1.13
cytochrome c oxidase subunit 6B1	XP_010734575.1	10,226	1.01
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2	XP_010737833.1	10,846	0.93
calnexin subunit B type 1	XP_010728630.1	19,248	0.77
RNA-binding protein 8A isoform X1	XP_010747091.1	19,985	0.73
glutathione S-transferase omega-1	XP_010742490.3	27,659	0.7
histidine triad nucleotide-binding protein 1	XP_010741018.2	13,526	0.7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	XP_027142854.1	13,890	0.68
fatty acid-binding protein, liver	XP_010731481.1	13,998	0.67
gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	XP_010747638.1	14,628	0.64
profolin subunit 6	XP_010731190.1	14,578	0.64
acylphosphatase-2 isoform X1	XP_010745126.2	14,823	0.63
high mobility group protein H1	A DX06860.1	23,528	0.59
allograft inflammatory factor 1-like	XP_027142939.1	16,708	0.54
hypoxanthine-guanine phosphotransferase, partial	ASW22527.1	18,060	0.49
myeloid-derived growth factor	XP_019112401.2	18,073	0.49
nucleoplasmin-3	XP_027133567.1	18,296	0.49
thiosudocin domain-containing protein 12	XP_010739874.1	19,055	0.46
translationally-controlled tumor protein	XP_010747176.1	19,174	0.46
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G, partial	AFU54186.1	30,487	0.43
proliferation-associated protein 2G4	XP_010747198.1	43,338	0.41
glutathione peroxidase 7	XP_010740942.1	21,100	0.41
uricase	XP_010745371.2	34,496	0.38
dehydrogenase/reductase SDR family member 7C-A	XP_010739765.1	34,007	0.38
lambda-crystallin homolog isoform X1	XP_010748901.2	35,361	0.37
T-complex protein 1 subunit epsilon	XP_010731936.1	59,425	0.37
aldose reductase	XP_019116037.1	35,635	0.36
histone-binding protein RBBP4	XP_010731001.1	47,510	0.36
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	XP_019115322.1	36,318	0.36
programmed cell death protein 10	XP_027130892.1	24,431	0.35
LRP chaperone MESD	XP_010746988.1	24,919	0.34
erin-2 isoform X1	XP_027133320.1	37,660	0.34
aspartyl aminopeptidase isoform X2	XP_010748612.3	52,042	0.33
adenylate kinase 4, mitochondrial	XP_019125946.1	25,473	0.33
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	XP_019124447.1	26,706	0.32
core histone macro-H2A.1 isoform X1	XP_010735833.1	39,251	0.32
mast cell protease 1A	XP_010728896.2	26,502	0.32
RNA-binding protein FUS	XP_010735714.2	43,968	0.29
prohibitin	XP_010738397.1	29,782	0.28
aspartate-tRNA ligase, cytoplasmic	XP_019124484.1	60,564	0.28
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3	XP_027141505.1	45,435	0.28
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D isoform X1	XP_027141552.1	64,192	0.26
nucleophosmin	XP_010729733.2	32,171	0.26
trimeric intracellular cation channel type A	XP_027144915.1	32,271	0.26
uncharacterized protein LOC113746832	XP_027138706.1	33,344	0.25
pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 1	XP_010728080.2	33,127	0.25
WD repeat-containing protein 61	XP_010733482.1	33,241	0.25
homogentisate 1,2-dioxygenase	XP_010754782.3	49,895	0.25
mitochondrial 3-oxodicarboxylate carrier isoform X1	XP_010742940.1	33,148	0.25
actin-related protein 2/3 complex subunit 2	XP_019118121.1	34,256	0.24
protein phosphatase 1B isoform X1	XP_010733968.1	52,276	0.24
uncharacterized protein LOC104934800	XP_010748848.3	34,731	0.24
tyrosine-protein kinase CSK	XP_010731405.1	51,060	0.24
adenylosuccinate lyase	XP_019121532.1	54,567	0.23
hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	XP_010729892.3	35,462	0.23
eukaryotic translation initiation factor 4B isoform X1	XP_010751826.3	70,327	0.23
fructose-1,6-bisphosphatase 1	XP_010746269.1	36,921	0.22
ELAV-like protein 1 isoform X1	XP_010754002.1	38,262	0.21
O-acetyl-LDP-ribose deacetylase MACROD1 isoform X1	XP_010737474.3	39,367	0.21
ankyrin repeat domain-containing protein 34C	XP_010727747.2	57,267	0.21
importin subunit alpha-3	XP_010736490.1	57,568	0.21
serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform X1	XP_010752215.1	60,014	0.2
calcium-binding protein 39	XP_010729707.1	39,843	0.2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	XP_010739969.1	40,133	0.2
alkaline phosphatase	A EL33276.1	59,799	0.2
mitochondrial cytochrome b-c1 complex subunit 8	ATN38476.1	9671	1.09

Table 5. Cont.

Meagre (<i>Aeglefinus regius</i>)			
Protein Name	Protein ID *	MW	emPAI
mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 6B1 isoform A	ATN38445.1	10,139	1.02
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	AGV76781.1	17,214	0.88
very long chain acyl-CoA synthetase, partial	AFP97957.1	46,175	0.27
mitochondrial NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3	AHX56275.1	48,263	0.26
carotene palmitoyltransferase 2, partial	AUN35172.1	68,338	0.24
mitochondrial ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	ATN38406.1	30,887	0.23
alkaline phosphatase	AAPO4486.1	57,515	0.21
calin 5, partial	AKN80426.1	52,490	0.15
mitochondrial Rho GTPase 1-A	AGU38816.1	71,045	0.11
macrophage mannose receptor 1, partial	AT783004.1	114,777	0.07
insulin-like growth factor-1 receptor b	ALC075807.1	139,047	0.07
acetyl-CoA carboxylase alpha	ANJ049151.1	176,414	0.04

* NCBI reference sequence; emPAI score according to Ishihama et al. [34].

4. Discussion

The exploitation of fish by-products may support the sustainability of aquaculture. High by-product yields signify that a large part of fish is discarded and remains unexploited. In our study, this yield was estimated to be 43% for meagre and 38% for gilthead sea bream. Some studies have reported greater amounts of discards, i.e., up to 70–85% [15,35], while for finfish species such as sea bream, cod, tuna, etc., the discards can reach 40–65% [36–39]. The discards mainly include muscle-trimmings (15–20%), skin and fins (1–3%), bones (915%), heads (9–12%), viscera (12–18%), and scales (5%) [40]. In the present study, these percentages were calculated as 1–2% for trimmings, 5–9% for bones, 6–7% for skin, 2–3% for scales, 5–7% for intestines, and 17–19% for heads. Small variations can be attributed to the different fish species as well as processing, i.e., manual or mechanical.

In the present study, data on the composition of fish by-products were obtained. The nutrient content of total protein, fat, ash, and minerals was demonstrated in fish by-products of all species, size classes, and fish part categories. The mean values calculated on a dry weight basis of all fish by-products for protein, fat, and ash contents are in accordance with previous studies on fish waste, estimating a total protein content between 49.22 and 57.92% and a total ash content between 21.79 and 30.16%; however, total fat was between 7.16 and 19.10%, which is slightly higher than our study [5,41,42]. The nutrient content of specific by-product categories is comparable to that of fish fillets. For meagre fillets, the protein content was 75% of dry matter, the fat content was 19%, and the ash content was 5%. Corresponding values for gilthead sea bream fillet were 57% protein, 40% fat, and 4% ash, calculated on dry matter [21]. Some variation between the different categories exists although the differences were not statistically significant in the present study. The study by Sinanoglou et al. [20] on the by-products of meagre fishes showed that the skin had the highest protein concentration, followed by the head.

In the study reported herein, another important finding is the detailed characterization of the fatty acid profile of fish by-products. For both species, oleic acid (18:1n-9) was the main monosaturated fatty acid (MUFA) and predominated all fatty acids, followed by icosenoic acid (20:1n-9) and erucic acid (22:1). Palmitic acid (16:0) was the main saturated fatty acid (SFA). The principal polyunsaturated fatty acid (PUFA) was linoleic acid (18:2n-6). These five fatty acids accounted for approximately 75% and 71% of total fatty acids for meagre and gilthead sea bream, respectively. These findings are similar to those of studies conducted in Greece on gilthead sea bream by-product and fillet samples [20,25] and on meagre [43]. According to Costa et al., meagre fillet was also high in docosahexaenoic acid (22:6n-3 or DHA). However, this was not abundant in our fish by-product samples [44]. This can be due to possible differences in the fish diets.

To define the protein composition and content of meagre and gilthead sea bream by-products, we exploited MS analysis for complex protein identification [45]. Among the identified proteins, only ATP synthase subunit epsilon and cytochrome c oxidase, which were abundant in the meagre samples, were significantly different between the species. This may suggest that these proteins are characteristic

of meagre by-products. In addition, the sequence of these proteins was compared with bioactive peptides already published [46]. Two of the peptides, 60S ribosomal protein L35a and mitochondrial cytochrome b-c1 complex subunit 8, that were characterized as abundant in meagre and gilthead sea bream by-products, were proved to have the sequence of leucine-tryptophan and valine-tyrosine, respectively. According to Sato et al., these peptides from wakame showed an antihypertensive effect [47].

The interpretation of our findings must consider the following limitations. The sampling was conducted in a specific month; therefore, seasonality is a factor not considered in our experimental design. Quantities of fish by-product samples were not adequate for the analyses of all the parameters examined in the cases of gills and trimmings and in many small-sized fish regarding heads, intestines, bones, and skins. Pooling of samples masks the potential variations between individuals [48]. Studying the different by-products individually would demonstrate variations among different aquaculture units, seawater environments, and processing procedures.

5. Conclusions

Our results suggest that fish by-products constitute an important and nutritionally valuable source of proteins, fatty acids, and minerals since their composition is similar to those of fish fillet and other food products recommended for consumption. Each by-product category has specific nutritional features; thus, its potential exploitation depends on the desired specific nutritional characteristics of the products that we wish to formulate. In the present study, skin had the highest protein content, trimmings and bones were rich in calcium, and the head, intestines, and bones were a good source of lipids. However, these results may vary between different fish species and conditions of cultivation. Systematic information on different fish species and by-products is therefore necessary for the detailed and accurate evaluation of their exploitation.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2304-8158/9/2/190/s1>, Figure S1: Histogram of head percentage per total body weight of fish, Figure S2: Histogram of gills percentage per total body weight of fish, Figure S3: Histogram of intestines percentage per total body weight of fish, Figure S4: Histogram of trimmings percentage per total body weight of fish, Figure S5: Histogram of bones percentage per total body weight of fish, Figure S6: Histogram of skin percentage per total body weight of fish.

Author Contributions: Conceptualization, A.K. and M.K.; Data curation, A.K., A.M., T.T.L., A.S., and S.K.; Formal analysis, A.K., A.M., T.T.L., A.S., and S.K.; Investigation, A.K., J.P.G., and M.K.; Methodology, A.K., A.M., N.P., and J.P.G.; Project administration, M.K.; Resources, N.P., T.T.L., A.S., S.K., V.V., and M.K.; Supervision, V.V. and M.K.; Validation, A.K., A.M., N.P., J.P.G., A.S., and S.K.; Writing—original draft, A.K. and M.K.; Writing—review & editing, A.K., A.M., N.P., J.P.G., T.T.L., A.S., S.K., V.V., and M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially supported by the Student Grant Fulbright foundation. Proteomics data were collected on a mass spectrometer supported by NIH SIG S10OD0018034.

Acknowledgments: We thank Wendy Wang and Jean Kanyo from the Keck MS & Proteomics Resource for preparing the proteomics samples and for LC-MS/MS data collection, respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Olsen, R.L.; Toppe, J.; Karunasagar, I. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *36*, 144–151. [\[CrossRef\]](#)
- FAO. *A Third Assessment of Global Marine Fisheries Discards*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2019; p. 78.
- Arvanitoyannis, I.S.; Kassaveti, A. Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 726–745. [\[CrossRef\]](#)
- Sloan, E.A. *Top 10 Food Trends*; IFT's Food Technology: Chicago, IL, USA, 2019.

5. Esteban, M.B.; García, A.J.; Ramos, P.; Márquez, M.C. Evaluation of fruit-vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets. *Waste Manag.* **2007**, *27*, 193–200. [CrossRef] [PubMed]
6. Mangano, V.; Gervasi, T.; Rotondo, A.; De Pasquale, P.; Dugo, G.; Macri, F.; Salvo, A. Protein hydrolysates from anchovy waste: Purification and chemical characterization. *Nat. Prod. Res.* **2019**. [CrossRef]
7. Saisavoeay, T.; Sangtanoo, P.; Reamtong, O.; Karichanant, A. Free radical scavenging and anti-inflammatory potential of a protein hydrolysate derived from salmon bones on RAW 264.7 macrophage cells. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 5112–5121. [CrossRef]
8. Saliu, E.; Magoni, C.; Lasagni, M.; Della Pergola, R.; Labra, M. Multi-analytical characterization of perigonadal fat in bluefin tuna: From waste to marine lipid source. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 4571–4579. [CrossRef]
9. Ahmad, T.B.; Rudd, D.; Kotiw, M.; Liu, L.A.-O.; Benkendorf, K. Correlation between Fatty Acid Profile and Anti-Inflammatory Activity in Common Australian Seafood by-Products. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 155. [CrossRef]
10. Roslan, J.; Yunos, K.F.M.; Abdullah, N.; Kamal, S.M.M. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) by-Product. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2014**, *2*, 312–319. [CrossRef]
11. Khoddami, A.; Ariffin, A.A.; Bakar, J.; Ghazali, H.M. Fatty Acid Profile of the Oil Extracted from Fish Waste (Head, Intestine and Liver) (*Sardinella lemuru*). *World Appl. Sci. J.* **2009**, *7*, 127–131.
12. Ngo, D.H.; Wijesekara, I.; Vo, T.S.; Van Ta, Q.; Kim, S.K. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 523–529. [CrossRef]
13. Gildberg, A. Enzymes and Bioactive Peptides from Fish Waste Related to Fish Silage, Fish Feed and Fish Sauce Production. *J. Aquat. Food Product Technol.* **2004**, *8850*, 37–41. [CrossRef]
14. Kim, S.K.; Wijesekara, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods* **2010**, *2*, 1–9. [CrossRef]
15. Kim, S.K.; Mendis, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts—A review. *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 383–393. [CrossRef]
16. Silva, A. Morphometric variation among sardine (*Sardinia pilchardus*) populations from the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES J. Mar. Sci.* **2003**, *60*, 1352–1360. [CrossRef]
17. Caponio, F.; Lestingi, A.; Summo, C.; Bilancia, M.T.; Laudadio, V. Chemical characteristics and lipid fraction quality of sardines (*Sardinia pilchardus* W.): Influence of sex and length. *J. Appl. Ichthyol.* **2004**, *20*, 530–535. [CrossRef]
18. Federation of Greek Mariculture. *Annual Report Aquaculture in Greece 2017*; Federation of Greek Mariculture: Athens, Greece, 2017.
19. FGM. *Aquaculture in Greece*; Federation of Greek Mariculture: Athens, Greece, 2016; p. 8.
20. Sinanoglou, V.J.; Proestos, C.; Lantzouraki, D.Z.; Calokerinos, A.C.; Miniadis-Meimaroglou, S. Lipid evaluation of farmed and wild meagre (*Agyrosomus regius*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 134–143. [CrossRef]
21. Yiannopoulos, S.; Christodoulidou, M.; Kontoghiorghis, K.; Ioannou, E.; Nicolaidou, P. *Cyprus Food Composition Tables*. Available online: [https://www.moh.gov.cy/MOH/SGI/sgl.nsf/All/72C8C9F6F124F979C22583C5003E694F/\\$file/Cyprus%20Food%20Composition%20Tables%20-%203rd%20Edition.pdf](https://www.moh.gov.cy/MOH/SGI/sgl.nsf/All/72C8C9F6F124F979C22583C5003E694F/$file/Cyprus%20Food%20Composition%20Tables%20-%203rd%20Edition.pdf) (accessed on 13 January 2020).
22. Zheng, J.; Chen, K.-H.; Yan, X.; Chen, S.-J.; Hu, G.-C.; Peng, X.-W.; Yuan, J.-G.; Mai, B.-X.; Yang, Z.-Y. Heavy metals in food, house dust, and water from an e-waste recycling area in South China and the potential risk to human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, *96*, 205–212. [CrossRef]
23. Sakellari, A.; Karavoltsos, S.; Theodorou, D.; Dassenakis, M.; Scoullou, M. Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves *M. galloprovincialis*, *P. radiata*, *V. verrucosa* and *C. chione* in Mediterranean coastal microenvironments: Association with metal bioavailability. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 3383–3395. [CrossRef]
24. Vassiliadou, I.; Costopoulou, D.; Kalogeropoulos, N.; Karavoltsos, S.; Sakellari, A.; Zafeiraki, E.; Dassenakis, M.; Leondiadis, I. Levels of perfluorinated compounds in raw and cooked Mediterranean finfish and shellfish. *Chemosphere* **2015**, *127*, 117–126. [CrossRef]
25. Grigorakis, K.; Alexis, M.N.; Taylor, K.A.; Hole, M. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Composition, appearance and seasonal variations. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, *37*, 477–484. [CrossRef]

26. Tsangaris, C.; Kaberi, H.; Catsiki, V.A. Metal levels in sediments and transplanted mussels in Pagassitikos Gulf (Aegean Sea, Eastern Mediterranean). *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 6077–6087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 1998.
28. ISO. ISO 5983-2: 2009 Animal Feeding Stuffs—Determination of Nitrogen Content and Calculation of Crude Protein Content. Part 2: Block Digestion and Steam Distillation Method. Available online: <https://www.sis.se/api/document/preview/911249/> (accessed on 13 January 2020).
29. Onyeike, E.N.; Ayalogu, E.O.; Ibegbulem, C.O. Evaluation of the nutritional value of some crude oil polluted freshwater fishes. *Glob. J. Pure Appl. Sci.* **2000**, *6*, 227–233.
30. Raša Milanov, D.; Krstić, M.; Marković, R.; Dragoljub Jovanović, A.; Baltić, M.; Čirić, J.; Jovetić, M.; Milan Baltić, Z. Analysis of Heavy Metals Concentration in Tissues of Three Different Fish Species Included in Human Diet from Danube River. *Acta Vet.* **2016**, *66*. [[CrossRef](#)]
31. European Parliament and Council. Regulation (EU) No 1169/2011 of 25 October 2011 on the Provision of Food Information to Consumers, Amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and Repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004 Text with EEA Relevance. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R1169> (accessed on 13 January 2020).
32. Montowska, M.; Kowalczewski, P.L.; Rybicka, I.; Fornal, E. Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food Chem.* **2019**, *289*, 130–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Charkoftaki, G.; Thompson, D.C.; Golla, J.P.; Garcia-Milian, R.; Lam, T.T.; Engel, J.; Vasilou, V. Integrated multi-omics approach reveals a role of ALDH1A1 in lipid metabolism in human colon cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *304*, 88–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteom.* **2005**, *4*, 1265–1272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shahidi, F.; Janak Kamil, Y.V.A. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *12*, 435–464. [[CrossRef](#)]
36. Grigorakis, K. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* **2007**, *272*, 55–75. [[CrossRef](#)]
37. Torres, J.A.; Chen, Y.C.; Rodrigo-García, J.; Jaczynski, J. 4—Recovery of by-products from seafood processing streams. In *Maximising the Value of Marine By-Products*; Shahidi, F., Ed.; Woodhead Publishing: Shaston, UK, 2007; pp. 65–90. [[CrossRef](#)]
38. Guérand, F.; Guimas, L.; Binet, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19–20*, 489–498. [[CrossRef](#)]
39. Rustad, T.; Storro, I.; Slizyte, R. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2001–2014. [[CrossRef](#)]
40. Martínez-Alvarez, O.; Chamorro, S.; Brenes, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Res. Int.* **2015**, *73*, 204–212. [[CrossRef](#)]
41. Vidotti, R.M.; Viegas, E.M.M.; Carneiro, D.J. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2003**, *105*, 199–204. [[CrossRef](#)]
42. Abbey, L.; Glover-Amengor, M.; Atikpo, M.O.; Atter, A.; Toppe, J. Nutrient content of fish powder from low value fish and fish byproducts. *Food Sci. Nutr.* **2017**, *5*, 374–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Grigorakis, K.; Fountoulaki, E.; Vasilaki, A.; Mittakos, I.; Nathanailides, C. Lipid quality and filleting yield of reared meagre (*Argyrosomus regius*). *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 711–716. [[CrossRef](#)]
44. Costa, S.; Afonso, C.; Bandarra, N.M.; Gueifão, S.; Castanheira, I.; Carvalho, M.L.; Cardoso, C.; Nunes, M.L. The emerging farmed fish species meagre (*Argyrosomus regius*): How culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 277–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Carbonaro, M. Proteomics: Present and future in food quality evaluation. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 209–216. [[CrossRef](#)]
46. Harnedy, P.A.; FitzGerald, R.J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 6–24. [[CrossRef](#)]
47. Sato, M.; Hosokawa, T.; Yamaguchi, T.; Nakano, T.; Muramoto, K.; Kahara, T.; Funayama, K.; Kobayashi, A.; Nakano, T. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Their Antihypertensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6245–6252. [[CrossRef](#)]
48. Lazic, S.E.; Clarke-Williams, C.J.; Munafo, M.R. What exactly is 'N' in cell culture and animal experiments? *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e2005282. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

NUTRIENT COMPOSITION AND PREDICTION OF IRON BIOAVAILABILITY OF FISH BY-PRODUCTS



A. Kandyliari, A. Mallouchos, A. Sakellari, N. Papandroulakis, S. Karavoltzos, M. Kapsokefalou*



Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, Greece

*Corresponding author: E-mail: kapsok@aua.gr, Tel: +30 210 5294969

Introduction

Processing of fish in aquaculture generates by-products that are either used to produce low value products or are incinerated and discarded, thus increasing the energy, environmental and the financial costs of the process. Therefore, it is important to evaluate the nutritional value of fish by-products.

For this reason, we estimated the nutrient composition and bioactivity with regards to iron bioavailability of fish by-products (fins, skin, guts, bones, head, and gills).

Materials and Methods

A total of 36 Meagres (6 big (1256,45 ± 232,32 g), 30 small (235,76 ± 38,45g)) and 60 Gilthead Breams (16 big (403,47 ± 72,92 g), 44 small (160,16 ± 30,79g)) were obtained by HCMR Institute in Crete, Greece. The fins were cut, lyophilized, homogenized and kept separately in sealed plastic boxes in deep freezer. Similar treatments were given to the skin, guts, bones, head, gills and flesh. Nutrient composition analysis was conducted according to AOACs. Iron bioavailability was estimated with *in vitro* digestion methodology. Each analysis was conducted in triplicate. The results are expressed as % per lyophilized sample.

Results

Table 1. Nutrient composition of by-product samples (head, gills, guts, fins, bones, skin) and flesh of Meagre fishes of two different ages (big and small).

% w/w of dry fish weight	Meagre (<i>Argyrosomus regius</i>)													
	Head		Gills		Guts		Fins		Bones		Skin		Flesh	
	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small
Moisture*	64.0	68.9	68.3	74.3	73.0	59.2	63.1	57.0	63.2	40.6	65.3	65.3	59.4	57.5
Ash	20.95	21.27	15.59	19.18	4.77	2.25	49.12	48.51	21.00	23.30	20.24	15.23	6.34	6.38
Total protein	40.41	47.50	45.62	48.46	59.62	29.79	45.87	45.98	32.07	36.41	76.16	76.15	89.14	88.10
Total lipids	28.88	23.34	19.71	21.31	17.09	54.05	3.00	4.35	34.96	31.07	6.12	9.61	4.17	3.37
Carbs**	9.76	7.89	19.08	11.05	18.52	13.91	2.01	1.16	11.97	9.22	0	0	0.35	2.15

Results represent means ± SD; *moisture is %w/w of fish weight; ash, protein, lipids and carbohydrates are % w/w of dry fish weight; **carbohydrates are determined by difference

Table 2. Nutrient composition of by-product samples (head, gills, guts, fins, bones, skin) and flesh of Gilthead Bream fishes of two different ages (big and small).

% w/w of dry fish weight	Gilthead Bream (<i>Sparus Aurata</i>)													
	Head		Gills		Guts		Fins		Bones		Skin		Flesh	
	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small	Big	Small
Moisture*	57.3	62.4	66.6	62.9	67.1	57.2	48.6	53.1	53.3	74.5	53.0	61.2	58.6	58.9
Ash	18.11	21.39	16.60	17.49	3.57	2.62	45.76	47.26	26.62	27.70	6.02	4.36	5.70	6.18
Total protein	32.40	37.19	31.49	38.50	37.23	26.87	41.85	45.10	34.02	40.74	43.16	49.67	84.19	82.89
Total lipids	37.08	28.76	37.46	26.69	43.19	55.12	5.45	4.09	30.56	21.47	46.39	45.94	8.94	9.52
Carbs**	12.41	12.66	14.45	17.32	16.01	15.39	6.94	3.55	8.80	10.09	4.43	0.03	1.17	1.41

Results represent means ± SD; *moisture is %w/w of fish weight; ash, protein, lipids and carbohydrates are % w/w of dry fish weight; **carbohydrates are determined by difference

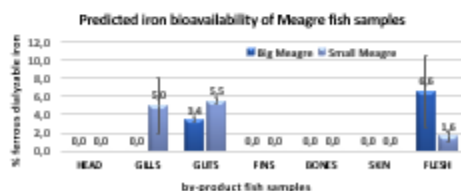


Figure 1. Effect of Meagre fish by-products on predicted iron bioavailability evaluated as % dialyzable iron with *in vitro* digestion methodology.

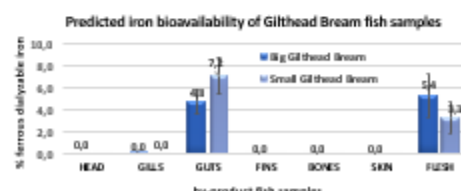


Figure 2. Effect of Gilthead Bream fish by-products on predicted iron bioavailability evaluated as % dialyzable iron with *in vitro* digestion methodology.

Conclusions

These findings suggest that fish by-products have considerable nutrient composition and predicted iron bioavailability and are exploitable.

In particular:

- High in protein are the skin samples.
- High in inorganic content (ash) are the fins.
- High in total lipids are the guts.
- Bigger effect on predicted iron bioavailability have the guts.

Antiproliferative activity of protein hydrolysates derived from fish by-products on human colon and breast cancer cells



A. Kandyliari^{1,2}, J. P. Golla², Y. Chen², N. Papandroulakis³, M. Kapsokefalou¹, V. Vasilioy²
¹Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Human Nutrition, Athens, Greece
²Yale School of Public Health, Department of Environmental Health Sciences, New Haven, CT, USA
³Hellenic Centre of Marine Research, Heraklion, Crete, Greece



Background

The consumption of fish is encouraged in dietary guidelines because of its association with health benefits; however, fish processing generates by-products (gills, bones, skin, head), which can rise up to 50-60% of fish weight after filleting. The investigation of bioactivity of fish by-products and subsequent utilization for the development of high added-value food ingredients and/or supplements will reduce waste and create new products of high nutritional value.

Aim

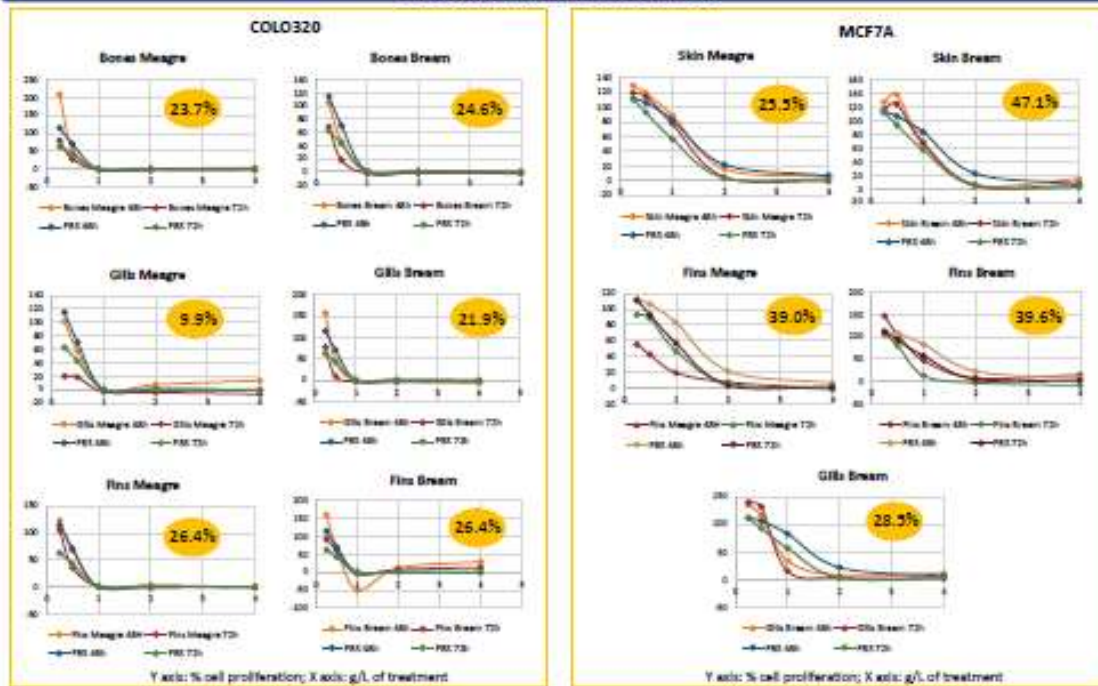
Study the antiproliferative activity of fish by-product protein hydrolysates (FPH) on human colon and breast cancer cells.

Method

A total of 6 Meagres "*Argyrosomus Regius*" (1256,43 ± 232,32g) and 16 Gilthead Sea Breams "*Sparus Aurata*" (403,47±72,92g) were obtained by HCMR Institute in Crete, Greece. The fins, skin, bones, head, and gills were isolated, lyophilized, homogenized and stored separately at -80°C. The protein hydrolysates from each byproduct were prepared using a pH extraction method and resuspended in PBS. Human colorectal adenocarcinoma cells (COLO320 cells) and human breast adenocarcinoma cells (MCF7A cells) were treated with different FPH for 48 hours and 72 hours, and cellular proliferation was measured using the MTT assay. Results are given as mean percentage of triplicate independent analyses. Statistical significance of growth inhibition was estimated following Wilcoxon Signed-Ranks test with $\alpha=0.05$.

Results

Cell Proliferation after FPH treatment



The above values are in the same range with stoposide (reference anticancer molecule) in the concentration of 3.1µM for COLO320 cells and 50µM for MCF7A.

Conclusions

- ◆ In COLO320 cells, FPH induced a significant antiproliferative activity at 0.5g/L for 48h.
- ◆ In MCF7A cells, FPH exerted a significant growth inhibition at 1g/L for 48h.
- ◆ Certain fish by-products could represent a source of anticancer peptides and may cause growth inhibition of human cancer cells.
- ◆ The proliferation activity varies between the different fish species and byproducts.

Partially funded by fellowship from Fulbright Foundation Greece; more info: Mandyliari@us.g

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ



6 **ΤΡΟΦΥ - ΤΡΟΦΗ CHALLENGE**
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΝΕΑΝΙΚΗ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ

PROSPER Τα απόβλητα των ψαριών γίνονται πούδρα... γεύσης

Τίνα από τα απόβλητα ψαριών, κρέμα και όσπρια από τα σπείρθηττα και άλλων αγροτικών προϊόντων, διατίθενται σε 1.200 νέους υποψήφιους φοιτητές-επιχειρηματίες εδαφικά. Μια σύγχρονη ψηφ-οff εταιρεία με το βασικό κέντρο της δραστηριότητας στην Πάτρα, ζητάει να αλλάξει το πρόσωπό της με την αεικίνηση, και να παράγει μια νέα φιλική προς το περιβάλλον, που ξεκινάει από βιολογικά υλικά και περνάει από βιολογική διασπορά, που αποκαθάρσει από τα μεταλλικά στοιχεία από την ομάδα Παναγιώτη Βασιλείου, η οποία θα λειτουργήσει με τη Οικονομία Μερική, τη βιώσιμη Σύμβαση και τον Άλφα Πανταχούρου. Είναι ένας από τους πρώτους κλάδους με μέλη που από τα Ίντερνέτ, Κοινωνικές, Επιχειρηματικές και Μεταφορές Τεχνολογίες και UMEC (το ελληνικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) σε 10 μήνες από την ίδρυσή τους, και την πρώτη γηραιά κερδοφόρα Μικρομεσαία Επιχειρηματικότητα στην Ελλάδα.

«Ο καιρός αλλάζει και οι επιχειρηματίες από ελεύθερο ερευνητικό χώρο, στη γήραια, να βιώσουν τον επιχειρηματικό με τον τρόπο που προκύπτει από την απασχόληση. Δεν υπάρχει αμφισβήτηση ότι η ανάπτυξη των επιχειρηματιών είναι ότι υπάρχει η «ψαλίδα» ή η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από το επιχειρηματικό πεδίο».

Το μέγεθος των επιχειρηματιών με τη χρήση της ψηφιακής τεχνολογίας, χρησιμοποιώντας για την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας, όπως διασπορά, ή απορροφητικότητα αυτών των επιχειρηματιών, υψηλά κέρδη και οικονομική αεικίνηση, τη διαθεσιμότητα. Η Προσφύρα είναι ένα σημαντικό βήμα, με την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, με σκοπό την ενίσχυση της μισθώσεως μεταξύ των επιχειρηματιών. Το πρώτο βήμα με την παραγωγή, είναι η διασπορά και η απορροφητικότητα των υποπροϊόντων της αεικίνησης, στην Ελλάδα.

Επισημαίνεται η σημασία της αεικίνησης, που αποκαθάρσει από τα μεταλλικά στοιχεία από την ομάδα Παναγιώτη Βασιλείου, η οποία θα λειτουργήσει με τη Οικονομία Μερική, τη βιώσιμη Σύμβαση και τον Άλφα Πανταχούρου.



Η Προσφύρα είναι μια νέα εταιρεία που παράγει προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.



«Το πρώτο βήμα είναι η διασπορά υψηλής προστιθέμενης αξίας, που αποκαθάρσει από τα μεταλλικά στοιχεία από την ομάδα Παναγιώτη Βασιλείου, η οποία θα λειτουργήσει με τη Οικονομία Μερική, τη βιώσιμη Σύμβαση και τον Άλφα Πανταχούρου. Είναι ένας από τους πρώτους κλάδους με μέλη που από τα Ίντερνέτ, Κοινωνικές, Επιχειρηματικές και Μεταφορές Τεχνολογίες και UMEC (το ελληνικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) σε 10 μήνες από την ίδρυσή τους, και την πρώτη γηραιά κερδοφόρα Μικρομεσαία Επιχειρηματικότητα στην Ελλάδα».

Η Προσφύρα είναι μια νέα εταιρεία που παράγει προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, με σκοπό την ενίσχυση της μισθώσεως μεταξύ των επιχειρηματιών. Το πρώτο βήμα με την παραγωγή, είναι η διασπορά και η απορροφητικότητα των υποπροϊόντων της αεικίνησης, στην Ελλάδα.

Επισημαίνεται η σημασία της αεικίνησης, που αποκαθάρσει από τα μεταλλικά στοιχεία από την ομάδα Παναγιώτη Βασιλείου, η οποία θα λειτουργήσει με τη Οικονομία Μερική, τη βιώσιμη Σύμβαση και τον Άλφα Πανταχούρου.

Δημιουργία τροφίμου από υποπροϊόντα ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας για πρώτη φορά στην Ελλάδα

12.03.2022



gaisense **ΜΑΧ** ηγετικό ομίλο **www.gaisense.gr**

Βρίσκονται να κλείνουν τα μάτια για αξιοποιήσιμα υποπροϊόντα ψαριών της αλιείας: αλκυονίδες, πεταλούδες, πεταλίσκοι και βελανιδιές που κολλάνε στην επιφάνεια των καλαμιών, αλλά και τα κελύφη των αχιβάδων. Αυτά τα υποπροϊόντα θα μετατραπούν σε ζωοτροφές για ψάρια, κοτόπουλα και χοίρους.

Ο λόγος για τη νεοειδίκτη εταιρεία **gaisense**, η οποία ελπίζει να γίνει βασικός παρτίκι στην Ελλάδα στην Ευρωπαϊκή **Trophy Challenge**. Η **Εταιρεία Ενδοαλιείας** από τον περασμένο και το επόμενο χρόνο, σκοπεύει μέσω επενδύσεων της στην ITO, να φέρει με την σειρά της στην αγορά νέες λύσεις και να συμβάλει στην ανάπτυξη της ψαροαλιείας στην Ελλάδα. Η **gaisense** θα λειτουργήσει ως κεντρικός σταθμός κατανομής.

Δείτε δημοσίευσή μας στο YouTube. Δεν είναι τίποτα για μια νέα τα έσοδα από αυτό.

Η **gaisense** δημοσιεύθηκε μέσω Ηλεκτρονικού Πρωτοκόλλου (ΕΠ) στο πλαίσιο των 200.000 ευρώ που είναι διαθέσιμα στο Ταμείο Επένδυσης Αλιείας και είναι ανοικτά στο πλαίσιο του 700 της Αλιείας, η οποία θα αξιοποιήσει τα υποπροϊόντα ψαριών.



ΣΕΙΡΕΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

- Η Πρωτοβουλία Έρευνας και Καινοτομίας για την Αλιεία στην Ελλάδα**
12.03.2022
- Αναπτύσσεται η επένδυση στην Αλιεία στην Ελλάδα**
12.03.2022
- Διαμόρφωση της Αλιείας στην Ελλάδα**
12.03.2022
- Η Αλιεία στην Ελλάδα**
12.03.2022

ΠΩΣ ΕΠΙΣΤΡΕΦΕΙ

- Ποιο είναι το μέγεθος της αλιείας στην Ελλάδα**
12.03.2022
- Το μέγεθος της αλιείας στην Ελλάδα**
12.03.2022
- Μεγάλο Αποθέμα στην Αλιεία στην Ελλάδα**
12.03.2022
- Η Αλιεία στην Ελλάδα**
12.03.2022



Πούδρες φαριού για πρώτη φορά στην Ελλάδα από την Prosper

02.03.2022



Το Εμπόσιο Ψαριών για πρώτη φορά στην Ελλάδα από την Prosper, η οποία και κερδίζει με το βραβείο **Μαδα Μαδα Μαδα 2021** το βραβείο **Golden Trophy** στην Ευρώπη.

Πούδρες φαριού με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, κορυφαία ποιότητα, κατασκευασμένες αποκλειστικά από ψάρια στην Ελλάδα. Η **Prosper**, η οποία και κερδίζει με το βραβείο **Μαδα Μαδα Μαδα 2021** το βραβείο **Golden Trophy** στην Ευρώπη, ανακοινώνει την είσοδό της στην Ελλάδα με την παρουσία της **gaisense**. Το νέο είδος φαριού κατασκευάζεται με πρώτη φορά στην Ελλάδα από την **Prosper**, η οποία και κερδίζει με το βραβείο **Μαδα Μαδα Μαδα 2021** το βραβείο **Golden Trophy** στην Ευρώπη.

TEC

TEC

ΕΡΓΑΕΙΑ

ΕΡΓΑΕΙΑ

TEC

TEC

TEC

TEC

TEC

TEC

TEC

TEC

ΑΝΤΙ-ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΑ 2014

Η ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ

Agricola

ΓΙΑ ΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ, ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΡΟΦΙΑ, ΤΗΝ ΑΙΧΙΑ



«Ζεσταίνεται» το ενδιαφέρον για αγροτική γη
Πώς διαμορφώνονται οι τιμές σε όλη τη χώρα

Στο 75% η αυτάρκεια της Ελλάδας στα κοτόπουλα σελ. 34

ProsPer

Τα υποπροϊόντα ψαριών που ενισχύουν τη γεύση

Είναι μεσογειακά προϊόντα που προσφέρουν γεύση και ενισχύουν τον οργανισμό. Τα υποπροϊόντα ψαριών είναι πλούσια σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες και βιταμίνες. Τα προϊόντα αυτά είναι κατάλληλα για άτομα που ακολουθούν διατροφή με χαμηλά λιπαρά και για άτομα που έχουν προβλήματα με την πέψη. Τα προϊόντα αυτά είναι κατάλληλα για άτομα που ακολουθούν διατροφή με χαμηλά λιπαρά και για άτομα που έχουν προβλήματα με την πέψη.



Oilway

Το έλαιο GLA με τις ιατρικές ιδιότητες

Το έλαιο GLA είναι πλούσιο σε γαμμα-λινολενικό οξύ, το οποίο έχει αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά αποτελέσματα. Το έλαιο GLA είναι κατάλληλο για άτομα που έχουν αρθρίτιδα, ρευματισμό και άλλα προβλήματα με τις αρθρώσεις. Το έλαιο GLA είναι κατάλληλο για άτομα που έχουν αρθρίτιδα, ρευματισμό και άλλα προβλήματα με τις αρθρώσεις.