

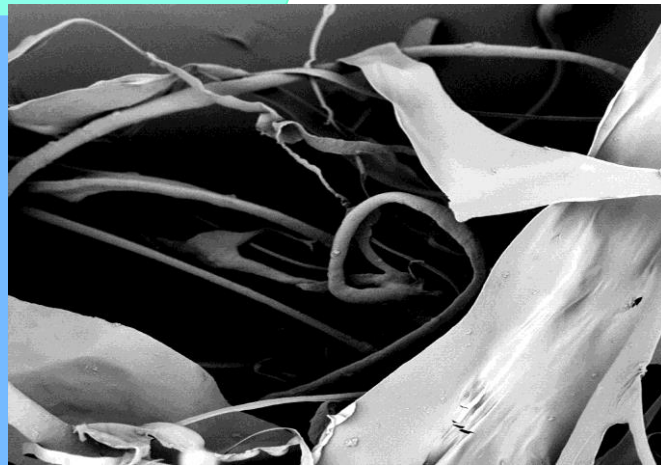


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Απομόνωση και χαρακτηρισμός κολλαγόνου και παραγώγων του από
Μεσογειακά είδη ιχθύων»



Λάμπρος Γ. Καρκατζούλης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μπεθάνης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2020

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Απομόνωση και χαρακτηρισμός κολλαγόνου και παραγώγων του από
Μεσογειακά είδη ιχθύων»

**« Isolation and characterization of collagen and its derivatives from
Mediterranean fish species»**

Λάμπρος Γ. Καρκατζούλης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Μπεθάνης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ρούσσης Βασίλειος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ιωάννου Ευσταθία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός κολλαγόνου και παραγώγων του από Μεσογειακά είδη ιχθύων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

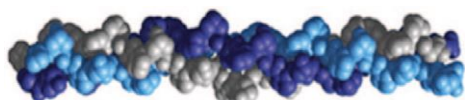
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κολλαγόνο είναι μια από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες στο ανθρώπινο σώμα, αλλά και το πιο άφθονο πολυμερές της φύσης. Αντιστοιχεί σε περισσότερο από το ένα τρίτο του συνόλου των πρωτεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς το δέρμα αποτελείται κατά 75% από αυτό. Όχι μόνο είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία του δέρματος και της ελαστικότητάς του, αλλά επίσης και της υγείας των χόνδρων και των αρθρώσεων.

Το κολλαγόνο μπορεί να απομονωθεί από διάφορες πηγές προέλευσης, όμως για εμπορικές εφαρμογές το κολλαγόνο προέρχεται από δέρμα βοοειδών, τένοντες, δέρμα χοίρων και ουρές ποντικών. Εντούτοις, το κολλαγόνο από βοοειδή ενδέχεται ότι μεταφέρει την σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών, γνωστή και ως “νόσο των τρελών αγελάδων”, προσθέτοντας πιθανούς κινδύνους στον άνθρωπο. Έτσι, η έρευνα για ασφαλέστερες πηγές κολλαγόνου έχει επεκταθεί τα τελευταία χρόνια και στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Σκοπός της μελέτης είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός κολλαγόνου και παραγώγων του από είδη ιχθύων που αφθονούν στην Ανατολική Μεσόγειο ως εναλλακτική πηγή ασφαλούς κολλαγόνου.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν είτε ολόκληροι ιχθύες από *Spicara smaris* (Μαρίδα) ή λέπια από πέντε αντιπροσωπευτικά είδη ιχθύων της τάξης των Perciformes, *Epinephelus marginatus* (Ροφός), *Mullus barbatus* (Κουτσομούρα), *Pagrus pagrus* (Φαγγρί), *Sparus aurata* (Τσιπούρα), *Umbrina cirrosa* (Μυλοκόπι) και ένα δείγμα ιχθύος της τάξης των Salmoniformes, *Salmo salar* (Σολωμός). Τα δείγματα αυτά ομογενοποιήθηκαν και ακολούθησαν διαδοχικές εκπλύσεις σε χαμηλή θερμοκρασία με αλατούχο διάλυμα και με διάλυμα EDTA για την απομάκρυνση αλάτων Ca, Mg και διήθηση για την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων υπολειμμάτων. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή κολλαγόνου ολικοί ιχθύες, ακολούθησε έκπλυση με βουτανόλη για την απομάκρυνση των λιπαρών συστατικών. Εν συνεχεία, έγινε επαναδιάλυση του κολλαγονούχου υπολείμματος σε

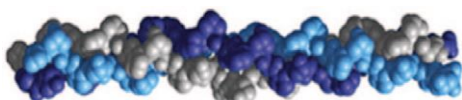


διάλυμα οξικού οξέος για την παραλαβή του διαλυτού σε οξύ κολλαγόνο. Το υπόλειμμα της προηγούμενης διαδικασίας μετά από επεξεργασία με πεψίνη απέδωσε κολλαγόνο διαλυτό σε πεψίνη. Ακολούθησε διαπίδυση αρχικά ως προς διάλυμα οξικού οξέος, στην συνέχεια ως προς απιονισμένο νερό και τέλος λυοφιλοποίηση. Μετά από την λυοφιλοποίηση παραλείφθηκε υψηλής καθαρότητας κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ ή σε πεψίνη. Επίσης, έγινε απομόνωση ζελατίνης από λέπια *E.marginatus* μετά από διαδοχικές εκλύσεις με αλατούχο διάλυμα και EDTA και επανεώρηση σε απιονισμένο νερό και θέρμανση στους 50, 60 και 70 °C.

Τέλος, η αξιολόγηση της ποιότητας του διαλυτού σε οξέα και πεψίνη κολλαγόνου καθώς και της ζελατίνης έγινε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR), απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), θερμοβαρμετρική ανάλυση (TGA) και περίθλαση ακτίνων-X (XRD).

Επιστημονική περιοχή: Φυσικό προϊόν κολλαγόνο

Λέξεις κλειδιά: κολλαγόνο • όξινη υδρόλυση • ενζυμική υδρόλυση • ζελατίνη • *C. umbrina* • *E. marginatus* • *M. barbatus* • *P. pagrus* • *S. aurata* • *S. salar* • *S. smaris* • SEM • IR • UV-Vis • TGA • XRD



Isolation and characterization of collagen and its derivatives from Mediterranean fish species

Department of Food Science & Human Nutrition

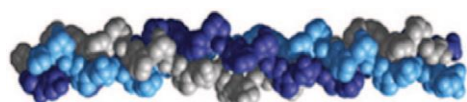
ABSTRACT

Collagen is one of the most important proteins in the human body, but also the most abundant polymer in nature. It accounts for more than a third of all proteins in the human body, as the skin is made up of 75% of it. Not only is it vital for the health of the skin and its elasticity, but also the health of the cartilage and joints.

Collagen can be isolated from a variety of sources, but for commercial applications the collagen comes from bovine skin, tendons, pig skin and mouse tails. However, bovine collagen may carry diseases like “Mad Cow Disease” (Bovine Spongiform Encephalopathy—BSE), Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE), adding potential risk to humans. Thus, research into safer collagen sources has expanded in recent years to the marine environment.

The aim of the study is to isolate and characterize collagen and its derivatives from fish species that abound in the Eastern Mediterranean as an alternative source of safer collagen.

Either whole *Spicara smaris* fish or scales from five representative species of Perciformes, *Epinephelus marginatus*, *Mullus barbatus*, *Pagrus pagrus*, *Sparus aurata*, *Umbrina cirrossa* were used in this project, and a fish sample of the order Salmoniformes, *Salmo salar*. These samples were homogenized and salted-out with NaCl solution at low temperature to remove non-collagenous residues. Then, the sample decalcified with EDTA solution to remove Ca and Mg salts and filtration to remove non-collagenous residues. In the case where whole fish were used as a source of collagen, the sample was defatted with butyl alcohol. The collagen residue was then redissolved in acetic acid solution to obtain the acid-soluble collagen. The residue of the previous procedure after treatment with pepsin gave pepsin soluble collagen. This was followed by dialysis first with acetic acid solution, then with deionized water and finally lyophilization. High purity collagen soluble in acid or pepsin was obtained after lyophilization. Also, gelatin was isolated from *E.*

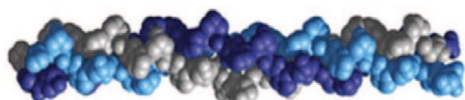


marginatus scales after successive washing with NaCl solution and EDTA and resuspended in deionized water and heating at 50, 60 και 70 °C.

Finally, the quality of acids and pepsin soluble collagens as well as gelatin was assessed by scanning electron microscopy (SEM), infrared (IR) spectroscopy, UV absorption (UV), thermogravimetric analysis (TGA)) and X-ray powder diffraction (XRD).

Scientific area thesis: Natural product collagen

Key Words: collagen • acid hydrolysis • enzymatic hydrolysis • gelatin • *C. umbrina* • *E. marginatus* • *M. barbatus* • *P. pagrus* • *S. aurata* • *S. salar* • *S. smaris* • SEM • IR • UV-Vis • TGA • XRD



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στη Φαρμακευτική του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο Εργαστήριο Θαλάσσιας Φαρμακογνωσίας του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με κατεύθυνση <<Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων>>, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018-2020.

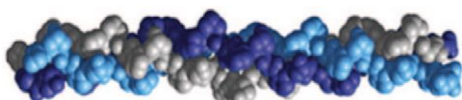
Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Κωνσταντίνο Μπεθάνη, για την προσφορά θέσης μεταπτυχιακής διατριβής, για την άριστη συνεργασία, την υποστήριξη του και την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της διατριβής.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής Ρούσση Βασίλειο και Ιωάννου Ευσταθία, για την ανάθεση θέματος μεταπτυχιακής διατριβής, για τις γνώσεις που μου προσέφεραν και τη συνολική τους συμβολή για την ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ, στην Δρ. Τζιβελέκα Αικατερίνη-Λητώ για την βοήθειά της, για την υπομονή και την καθοδήγηση της κατά την διάρκεια της εργασίας μου.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ, οφείλω στους συμφοιτητές μου Δημητρακοπούλου Ράνια και Θάνου Ιωάννα για όλη την στήριξη και την συμπαράσταση που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια της φοίτησής μου.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Γιώργο και Κατερίνα, στα αδέρφια μου Παναγιώτη, Ιωάννη και Μαρία στους οποίους αφιερώνω την εργασία αυτή, για την αμέριστη αγάπη τους, την υποστήριξη και την προτροπή τους να πραγματοποιώ κάθε όνειρο μου.

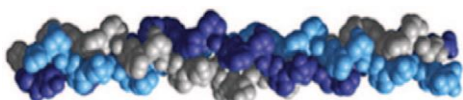


... Στους γονείς μου, Γιώργο-Κατερίνα

και στα αγαπημένα μου αδέρφια,

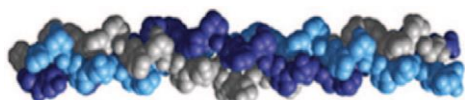
Παναγιώτη, Ιωάννη και Μαρία...

**Φωτογραφία εξωφύλλου: Φωτογραφία SEM του κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ απο δείγμα S. smar*

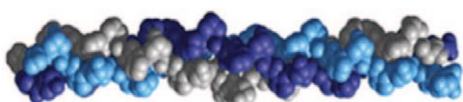


Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iii
Abstract	v
Ευχαριστίες	vii
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 Κολλαγόνο.....	1
1.1.1 Γενική εισαγωγή.....	1
1.1.2 Κολλαγόνο, η βασική δομική μονάδα	2
1.1.3 Κατανομή, δομή και λειτουργία διαφορετικών τύπου κολλαγόνου.....	6
1.1.4 Βιοσύνθεση κολλαγόνου	11
1.1.5 Εφαρμογές κολλαγόνου.....	13
1.2 Ζελατίνη, (gelatin).....	14
1.2.1 Γενικά	14
1.2.2 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες ζελατίνης	15
1.2.3 Εφαρμογές ζελατίνης.....	17
1.3 Ιχθύες.....	17
1.3.1 Γενικά	17
1.3.2 Μέγεθος, σχήμα, χρώμα, αναπαραγωγή και τροφή ιχθύων	19
1.3.3 <i>Sparus aurata</i> (Τσιπούρα).....	22
1.3.4 <i>Ragrus ragrus</i> (Φαγγρί)	23
1.3.5 <i>Mullus barbatus</i> (Κουτσομούρα)	24
1.3.6 <i>Umbrina cirrosa</i> (Μυλοκόπι).....	25
1.3.7 <i>Epinephelus marginatus</i> (Ροφός)	26
1.3.8 <i>Salmo salar</i> (Σολωμός).....	27
1.3.9 <i>Spicara smaris</i> (Μαρίδα).....	28
1.4 Απόβλητα ιχθύων ως οικονομική αξία πηγής κολλαγόνου.....	28
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	32
2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	32
2.2 Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια.....	32
2.3 Συλλογή πρώτων υλών	32
2.4 Απομόνωση κολλαγόνου και ζελατίνης	33
2.4.1 Απομόνωση κολλαγόνου διαλυτού σε οξικό οξύ, (Acid Soluble Collagen, ASC).....	33
2.4.2 Απομόνωση κολλαγόνου διαλυτού σε πεψίνη, (Pepsin Soluble Collagen, PSC).....	36
2.5 Απομόνωση ζελατίνης.....	38



2.6	Μέθοδοι χαρακτηρισμού	40
2.6.1	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)	40
2.6.2	Φασματοφωτομετρία UV-Vis	44
2.6.3	Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).....	47
2.6.4	Θερμοβαρμετρική ανάλυση – TGA	50
2.6.5	Φασματοσκοπία Περίθλασης Αχτίνων-X (XRD).....	52
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
3.1	Περιεκτικότητα ιχθύων σε κολλαγόνο.	60
3.2	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, SEM.....	64
3.3	Χαρακτηρισμός κολλαγόνου με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	71
3.4	Φασματοφωτομετρία απορρόφησης, UV-Vis	90
3.5	Θερμοβαρμετρική ανάλυση, TGA	101
3.6	Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων-X (XRD).....	115
3.7	Περιεκτικότητα <i>E. marginatus</i> σε ζελατίνη.	127
3.8	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, SEM ζελατίνης	129
3.9	Χαρακτηρισμός ζελατίνης με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	130
3.10	Φασματοφωτομετρία απορρόφησης UV-Vis, ζελατίνης.....	134
3.11	Θερμοβαρμετρική ανάλυση TGA, ζελατίνης.....	135
3.12	Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων-X (XRD), ζελατίνης	138
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	140
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	141



1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Κολλαγόνο

1.1.1 Γενική εισαγωγή

Το κολλαγόνο είναι η πιο άφθονη δομική πρωτεΐνη σε όλα τα ζώα. Στον άνθρωπο, το κολλαγόνο περιλαμβάνεται στο 1/3 των συνολικών πρωτεϊνών, αντιπροσωπεύει τα τρία τέταρτα του ξηρού βάρους του δέρματος και είναι το πιο διαδεδομένο συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας (extracellular matrix-ECM). Είκοσι οκτώ διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου αποτελούνται από τουλάχιστον 46 διακριτές πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχουν εντοπιστεί σε σπονδυλωτά ζώα, όπως και πολλές άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν κολλαγονούχες δομές (Brinckmann et al., 2005; Veit et al., 2006). Άθικτο κολλαγόνο φαίνεται να ανακαλύφθηκε σε μαλακό ιστό σε απολιθωμένα οστά ενός Τυραννόσαυρου 68-εκατομμυρίων-ετών, rex fossil (Schweizer et al., 2007, Asara et al., 2007), αποτελώντας τη μακράν παλαιότερη πρωτεΐνη που έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα. Ωστόσο, η ανακάλυψη αυτή είναι υπό αμφισβήτηση (Buckley et al., 2008; Pevzer et al., 2008).

Ανάλογα με τον βαθμό κατανομής ανόργανων συστατικών, όπως υδροξυαπατίτης ασβέστιο, μαγνήσιο, φωσφορικό άλας και άλλα άλατα, οι ιστοί κολλαγόνου μπορεί να είναι άκαμπτοι (οστά), συμβατοί (τένοντες), ή να έχουν κλίση από άκαμπτο έως συμβατό ιστό (χόνδρος), το κολλαγόνο δίνει στα οστά εφελκυσμό και αντοχή δηλαδή την αντίσταση και την απομάκρυνση και ο υδροξυαπατίτης δίνει στα οστά θλιπτική αντοχή ή αντίσταση στη συμπίεση (William Morrison et al., 2018). Το κολλαγόνο είναι επίσης άφθονο στον κερατοειδή, τα αιμοφόρα αγγεία, το έντερο, τους μεσοσπονδύλιους δίσκους και στην οδοντίνη στα δόντια. Στον μυϊκό ιστό, χρησιμεύει ως κύριο συστατικό του ενδομυίου. Το κολλαγόνο αποτελεί ένα έως δύο τοις εκατό του μυϊκού ιστού και αντιπροσωπεύει το 6% του βάρους των ισχυρών, τεντωμένων μυών (Sikorski et al., 2001). Ο ινοβλάστης είναι το πιο κοινό κύτταρο που δημιουργεί κολλαγόνο. Η ζελατίνη, που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα και στη βιομηχανία, είναι κολλαγόνο που έχει υδρολυθεί (Boque et al., 1923).

Προς το παρόν, οι κύριες πηγές κολλαγόνου τύπου I είναι από βοοειδή ή χοίρους (Ogawa et al., 2003). Ωστόσο, λόγω των επιδημιών όπως: Σπογγώδης

Εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (ΒΣΕ), Μεταδοτική Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια (ΜΣΕ), Νόσος του Αφθώδους Πυρετού (ΝΑΠ) σε χοίρους, βοοειδή κ.τ.λ. η χρήση κολλαγόνου προερχόμενο από αυτές τις πηγές σε περιορισμό. Το κολλαγόνο τύπου I έχει επίσης εξαχθεί από δέρμα, οστά, πτερύγια και λέπια από θαλάσσια θηλαστικά, ψάρια, καλαμάρια, χταπόδια, μέδουσες, αστερίες, σφουγγάρια κ.λπ. και αφού αξιολογήθηκαν για την πιθανή εφαρμογή τους ως εναλλακτική λύση στα θηλαστικά, έδειξαν θετικά αποτελέσματα (Nagai et al., 2000; Sadowska et al., 2003). Όμως, οι ιδιότητες του κολλαγόνου ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με το βιότοπο, το είδος και μέρος από τα οποία είναι απομονωμένο, γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον χαρακτηρισμό κάθε κολλαγόνου που προέρχεται από διαφορετικές πηγές (Kittiphattanabawon et al., 2005).

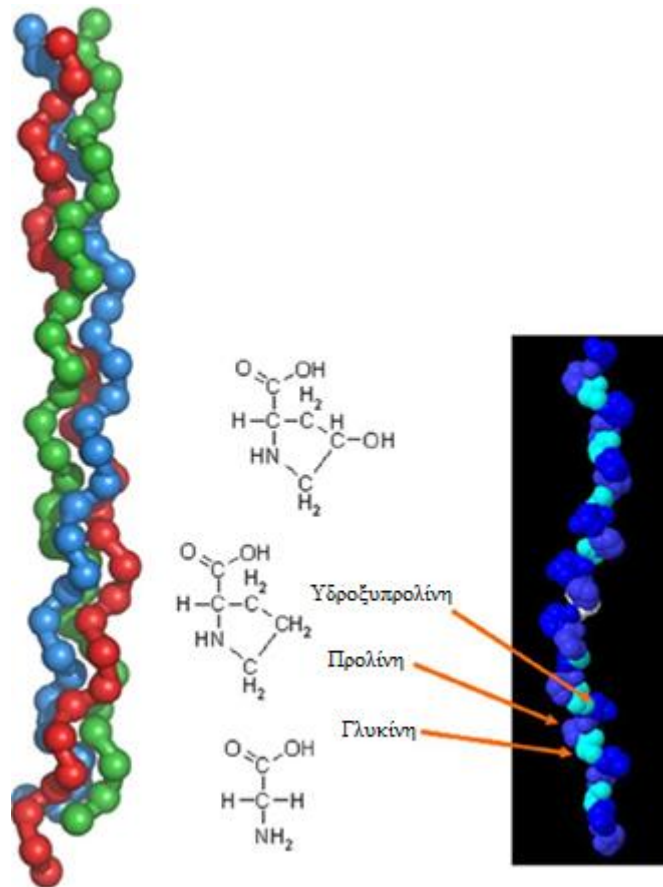
1.1.2 Κολλαγόνο, η βασική δομική μονάδα

Το 1940, οι Astbury & Bell, πρότειναν ότι το μόριο του κολλαγόνου αποτελείται από μία ενιαία εκτεταμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα με όλους τους αμιδικούς δεσμούς σε cis-διαμόρφωση. Μια σημαντική πρόοδος επιτεύχθηκε όταν στο ίδιο τεύχος του 1951 των Πρακτικών της Εθνικής Ακαδημίας των Επιστημών στην οποία πρόβαλαν τις σωστές δομές για την α-έλικα και το β-φύλλο, οι Pauling & Corey (Pauling & Corey et al., 1951) πρότειναν μια δομή για το κολλαγόνο. Σε αυτή τη δομή, τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες συγκρατούνται μαζί σε ελικοειδή διαμόρφωση με δεσμούς υδρογόνου. Μέσα σε κάθε τριπλέτα αμινοξέων, αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου δεσμεύουν τέσσερα από τα έξι κύρια ετεροάτομα και για τον σχηματισμό απαιτούνται δύο από τους τρεις πεπτιδικούς δεσμούς να βρίσκονται σε cis-διαμόρφωση. Το 1954, Οι Ramachandran & Kartha (Ramachandran et al., 1954; 1955) ανέπτυξαν μια δομή για την τριπλή έλικα κολλαγόνου με βάση τα δεδομένα περίθλασης ινών. Η δομή τους ήταν μια δεξιόστροφη τριπλή έλικα τριών στρωμάτων, πολύ-προλίνες με αριστερόστροφες έλικες, όλους τους πεπτιδικούς δεσμούς σε trans-διαμόρφωση και δύο δεσμούς υδρογόνου μέσα σε κάθε τριπλέτα. Το 1955, αυτή η δομή βελτιώθηκε από τους Rich & Crick (Rich & Crick et al., 1955; 1961), σε μια τριπλή ελικοειδή μορφή, που είναι αποδεκτή έως και σήμερα, η οποία έχει μια μονή διαδρομή N-

H(Gly)...O=C(Xaa) αλληλουχία ανά τριπλέτα και μια ελικοειδή συμμετρία με αξονική επανάληψη 28,6 Å (ελικοειδής κλίση 10/3).

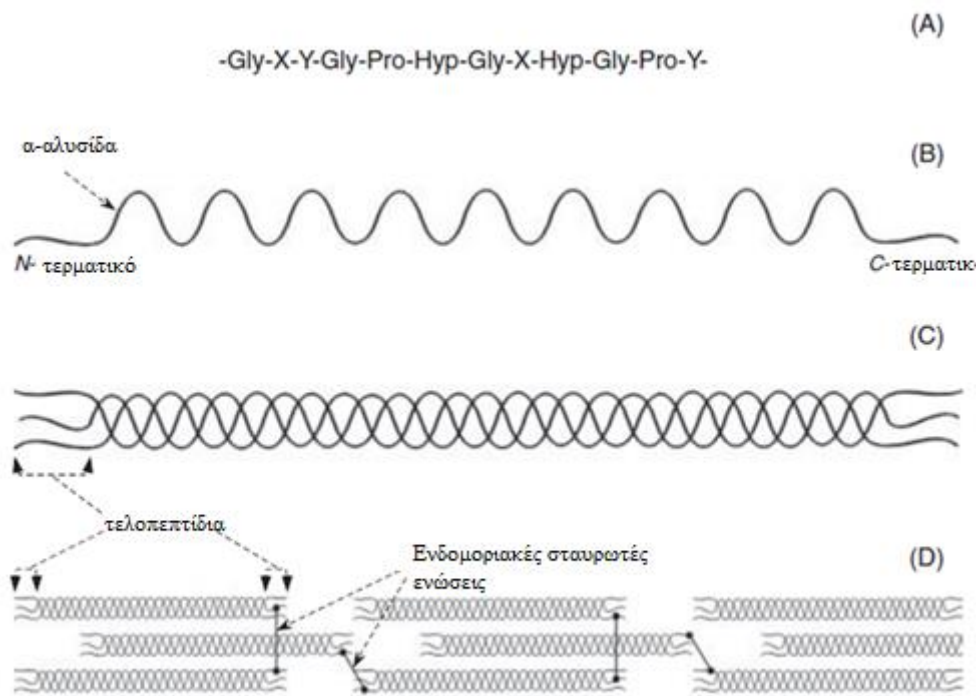
Μελέτες περίθλασης ινών δεν μπορούν να αποκαλύψουν τη δομή του κολλαγόνου σε ατομική ανάλυση. Το σημαντικό αυτής της δυσκολίας είναι στο μεγάλο μέγεθος, στη αδιαλυτότητα, στη επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και τη σύνθετη ιεραρχική δομή του, δυσχεραίνοντας έτσι τις περισσότερες βιοχημικές και βιοφυσικές αναλύσεις.

Ως εκ τούτου, μια αναγωγική προσέγγιση που χρησιμοποιεί πεπτιδικές τριπλές έλικες που σχετίζονται με κολλαγόνο (CRPs-collagen related peptides) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 (Fields et al., **1996**). Στα ζώα, παρατηρήθηκαν μεμονωμένες τριπλές έλικες κολλαγόνου, γνωστές ως tropocollagen (TC), να συγκεντρώνονται με πολύπλοκο ιεραρχικό τρόπο που οδηγεί τελικά στις μακροσκοπικές ίνες και δίκτυα που παρατηρούνται σε ιστούς, οστά και βασικές μεμβράνες (εικ. 2). Το τροποκολλαγόνο είναι μια υπομονάδα του συσσωματώματος του κολλαγόνου δηλαδή, έχει περίπου 300 nm μήκος και 1.5 nm διάμετρο και αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τις λεγόμενες α-αλυσίδες δημιουργώντας στον χώρο μια αριστερόστροφη τριπλή ελικοειδή δομή (εικ. 1). Αυτές οι τρεις αριστερόστροφες έλικες περιελίσσονται μεταξύ τους δημιουργώντας μια δεξιόστροφη έλικα που μοιάζει με σκοινί (Exposito et al., **2002**; Ehlich et al., **2010**), αυτή η δομή προσδίδει την αντοχή στους συνδετικούς ιστούς.



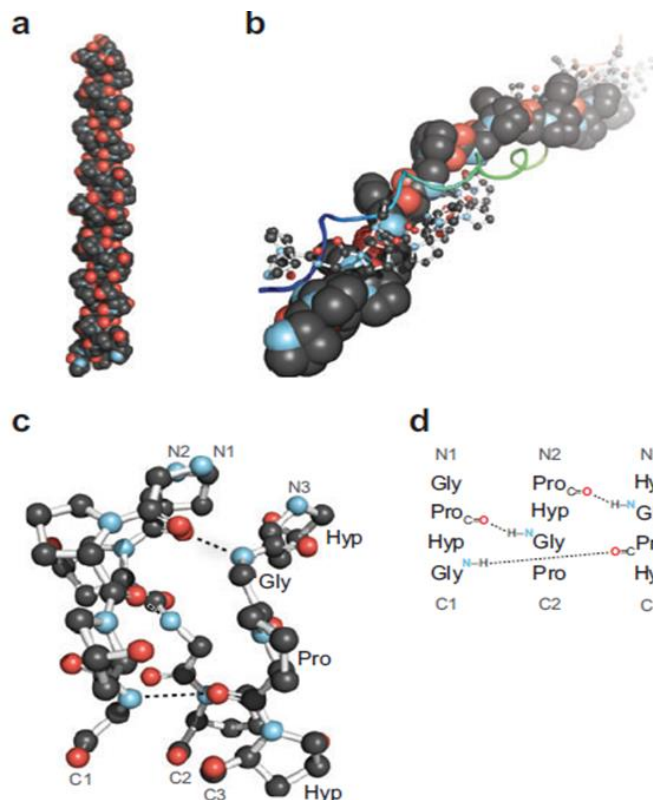
Εικόνα 1. Τρισδιάστατη απεικόνιση της χαρακτηριστικής τριπλέτας του κολλαγόνου Gly-Pro-Hyp.

Η σφιχτή διαμόρφωση (εικ. 3) των ελίκων εντός της τριπλής έλικας υποχρεώνει κάθε τρίτο υπόλειμμα να είναι Gly, με αποτέλεσμα μια επαναλαμβανόμενη ακολουθία XaaYaaGly, όπου τα Xaa και Yaa μπορούν να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ. Αυτή η επανάληψη συμβαίνει σε όλους τους τύπους κολλαγόνου, αν και διακόπτεται σε ορισμένες θέσεις εντός του τριπλού ελικοειδούς τομέα των μη ινωδών κολλαγόνων (Brazel D. et al., 1987).



Εικόνα 2. Σύνθεση ινιδίου κολλαγόνου σε ίνες κολλαγόνου. (A) Αλληλουχία αμινοξέων ενός πολυπεπτιδίου κολλαγόνου. (B) Πολυπεπτίδιο κολλαγόνου. (C) Τροποκολλαγόνο. (D) ινώδες κολλαγόνο.

Τα αμινοξέα στις θέσεις Xaa και Yaa του κολλαγόνου είναι συχνά (2S) -προλίνη (Pro, 28%) και (2S, 4R) - 4-υδροξυπρολίνη (Hyp, 38%), αντίστοιχα. Το ProHypGly είναι το πιο συνηθισμένο τρίδυμο (10,5%) στο κολλαγόνο (Ramshaw et al., 1998).



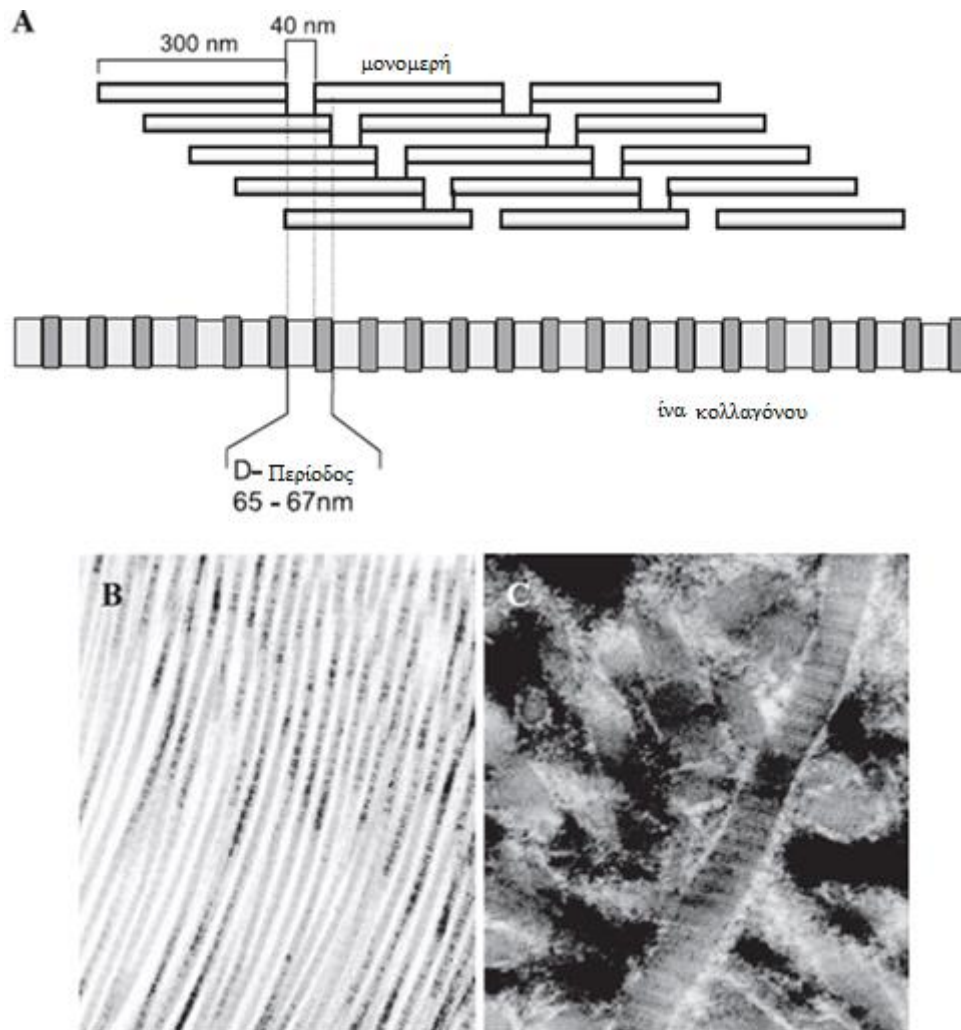
Εικόνα 3. Επισκόπηση της τριπλής έλικας κολλαγόνου. (α) κρυσταλλική δομή υψηλής ανάλυσης τριπλής έλικας κολλαγόνου, που σχηματίζεται από το (ProHypGly)₄-(ProHypAla) - (ProHypGly)₅ (β) Προβολή κάτω άξονα του τμήματος (ProProGly), (γ) Εικόνα με σφαιρίδια ενός τμήματος τριπλής έλικας κολλαγόνου επισημαίνοντας τη διαβάθμιση των δεσμών υδρογόνου (δ) Κατανομή των τριών κλώνων στο τμήμα του panel c.

1.1.3 Κατανομή, δομή και λειτουργία διαφορετικών τύπου κολλαγόνου

1.1.3.1 Τύποι κολλαγόνου I, II, III, IV και V - τα κολλαγόνα που σχηματίζουν ινίδια

Τα πιο σημαντικά κολλαγόνα για την υγεία που σχηματίζουν ινίδια περιλαμβάνουν κολλαγόνο τύπου I, II, III, V και XI (πίνακας 1). Αυτά τα κολλαγόνα χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να συναρμολογούνται σε πολύ προσανατολισμένα υπερμοριακά συσσωματώματα με χαρακτηριστική υπερδομή, την τυπική συστοιχία ινών με διάμετρο μεταξύ 25 και 400 nm (εικ. 4). Στο ηλεκτρονικό

μικροσκόπιο, τα ινίδια ορίζονται από ένα χαρακτηριστικό σχέδιο λωρίδας με περιοδικότητα περίπου 70 nm (ονομάζεται περίοδος D) με βάση μια κλιμακωτή διάταξη μεμονωμένων μονομερών κολλαγόνου (Hulmes D.J. et al., **1981**), όπως και πιο επιγραμματικά γίνεται αναφορά στον πίνακα 1, για την σύνθεση και κατανομή διαφόρων τύπου κολλαγόνων.



Εικόνα 4. (A) Σχηματική αναπαράσταση του υπερμοριακού συγκροτήματος των ινιδίων κολλαγόνου στη χαρακτηριστική τεταρτοταγής μορφή. Τα μονομερή έχουν μήκος 300 nm και κενά 40 nm χωριστά διαδοχικά μονομερή προκαλώντας τη χαρακτηριστική εμφάνιση των ινιδίων κολλαγόνου τύπου I στο υπερδομικό επίπεδο. (B + C) Τα ινίδια κολλαγόνου τύπου I (B) και II (C) καθώς είναι διατεταγμένα σε κανονικό τένοντα (B) και αρθρικό χόνδρο (C). Ενώ στον τένοντα είναι διατεταγμένα με παράλληλο τρόπο, στον αρθρικό χόνδρο παρουσιάζουν μια μάλλον δικτυωτή υπερμοριακή διάταξη.

- Κολλαγόνο τύπου I

Το κολλαγόνο τύπου I είναι το πιο άφθονο και καλύτερα μελετημένο κολλαγόνο. Αποτελεί περισσότερο από το 90% της οργανικής μάζας των οστών και είναι το κύριο κολλαγόνο των τενόντων, του δέρματος, των συνδέσμων, του κερατοειδούς και πολλών ενδιάμεσων συνδετικών ιστών. Η τριπλή έλικα κολλαγόνου τύπου I σχηματίζεται συνήθως ως ετεροτριμερές από δύο πανομοιότυπες αλυσίδες α1 (I) και μία αλυσίδα α2 (I). Οι τριπλές ελικοειδείς ίνες, *in vivo*, ενσωματώνονται ως επί το πλείστον σε σύνθετο υλικό που περιέχει είτε κολλαγόνο τύπου III (βρίσκεται σε δέρμα και δικτυωτές ίνες) (Fleischmajer R. et al., **1990**), είτε κολλαγόνο τύπου V (βρίσκεται σε οστά, τένοντες, κερατοειδή) (Niyibizi C. et al., **1989**). Στα περισσότερα όργανα και ιδίως στους τένοντες και στην περιτονία, το κολλαγόνο τύπου I παρέχει αντοχή σε εφελκυσμό, ενώ στα οστά, ορίζει σημαντικές βιομηχανικές ιδιότητες σχετικά με το φορτίο, την αντοχή σε εφελκυσμό και τη στρεπτική δυσκαμψία ιδίως μετά την ασβεστοποίηση.

- Κολλαγόνο τύπου II

Το κολλαγόνο τύπου II που σχηματίζει ινίδια είναι το χαρακτηριστικό και κυρίαρχο συστατικό του χόνδρου υαλίνης. Ωστόσο, δεν περιορίζεται ειδικά στον χόνδρο όπου αντιπροσωπεύει περίπου το 80% της συνολικής περιεκτικότητας του σε κολλαγόνο, καθώς βρίσκεται επίσης στο υαλώδες σώμα, το επιθήλιο του κερατοειδούς, στη νωτιαία χορδή, στον πυρήνα του πολτού του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις εμβρυϊκές επιθηλιακές μεσεγγυματικές μεταβάσεις (Von der Mark K. et al., **1999**). Η τριπλή έλικα του κολλαγόνου τύπου II αποτελείται από τρεις αλυσίδες α1 (II) που σχηματίζουν ένα ομοτριμερικό μόριο παρόμοιο σε μέγεθος και βιομηχανικές ιδιότητες με εκείνο του κολλαγόνου τύπου I (Bruckner P. et al., **1994**). Σε σύγκριση με το κολλαγόνο τύπου I, οι αλυσίδες κολλαγόνου τύπου II εμφανίζουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδροξυλυσίνη, καθώς και υπολείμματα γλυκοζυλίου και γαλακτοζυλίου που μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση με πρωτεογλυκάνες, ένα άλλο τυπικό συστατικό του πολύ ενυδατωμένου πλέγματος του χόνδρου υαλίνης (Mayne R. et al., **1989**).

- Κολλαγόνο τύπου III

Το κολλαγόνο τύπου III είναι ένα ομοτριμερές τριών αλυσίδων $\alpha 1$ (III) και διανέμεται ευρέως σε ιστούς που περιέχουν κολλαγόνο I, με εξαίρεση τα οστά (Rossert J. et al., **2002**). Είναι ένα σημαντικό συστατικό των δικτυωτών ινών στον διάμεσο ιστό των πνευμόνων, του ήπατος, του δέρματος, του σπλήνα και των αγγείων. Αυτό το ομοτριμερικό μόριο συμμετέχει επίσης συχνά σε μικτά ινίδια με κολλαγόνο τύπου I και είναι επίσης άφθονο σε ελαστικούς ιστούς (Von der Mark K. et al., **1981**).

- Κολλαγόνο τύπου IV - το κολλαγόνο των βασικών μεμβρανών

Το κολλαγόνο τύπου IV είναι το πιο σημαντικό δομικό συστατικό των βασικών μεμβρανών που ενσωματώνουν λαμινίνες, νιδογόνα και άλλα συστατικά. Η δομή του κολλαγόνου τύπου IV χαρακτηρίζεται από τρεις περιοχές: τον N-τερματικό τομέα 7S, έναν C-τερματικό σφαιρικό τομέα (NC1) και το κεντρικό τριπλό ελικοειδές τμήμα με μικρές διακοπές των επαναλήψεων Gly-X-Y με αποτέλεσμα μια ευέλικτη τριπλή έλικα (Von der Mark K. et al., **1981**).

- Κολλαγόνο τύπου V

Το κολλαγόνο τύπου V σχηματίζεται ως ετεροτριμερές τριών διαφορετικών α-αλυσίδων ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$). Έτσι, το κολλαγόνο τύπου V σχηματίζει μια υποοικογένεια μέσα σε κολλαγόνα που σχηματίζει ινίδια, αν και μοιράζεται παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες και λειτουργίες με άλλα μέλη αυτής της οικογένειας. Αυτά τα τυπικά ετεροϊνίδια με κολλαγόνα τύπου I και III συμβάλλουν στην οργανική μήτρα οστού, στο στρώμα του κερατοειδούς και στη διάμεση μήτρα μυών, ήπατος, πνευμόνων και πλακούντα (Birk D.E. et al., **1988**).

Πίνακας 1. Διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου

Τύπος	Κλάση	Σύνθεση	Κατανομή
I	Ινώδης	$\alpha 1[\text{I}]_2\alpha 2[\text{I}]$	δέρμα, οστά, τένοντες, σύνδεσμοι
II	Ινώδης	$\alpha 1[\text{II}]_3$	χόνδρος, υαλώδεις
III	Ινώδης	$\alpha 1[\text{III}]_3$	δέρμα, έντερο αιμοφόρα αγγεία,
IV	Δικτυωτό	$\alpha 1[\text{IV}]_2\alpha 2[\text{IV}]$	βασικές μεμβράνες

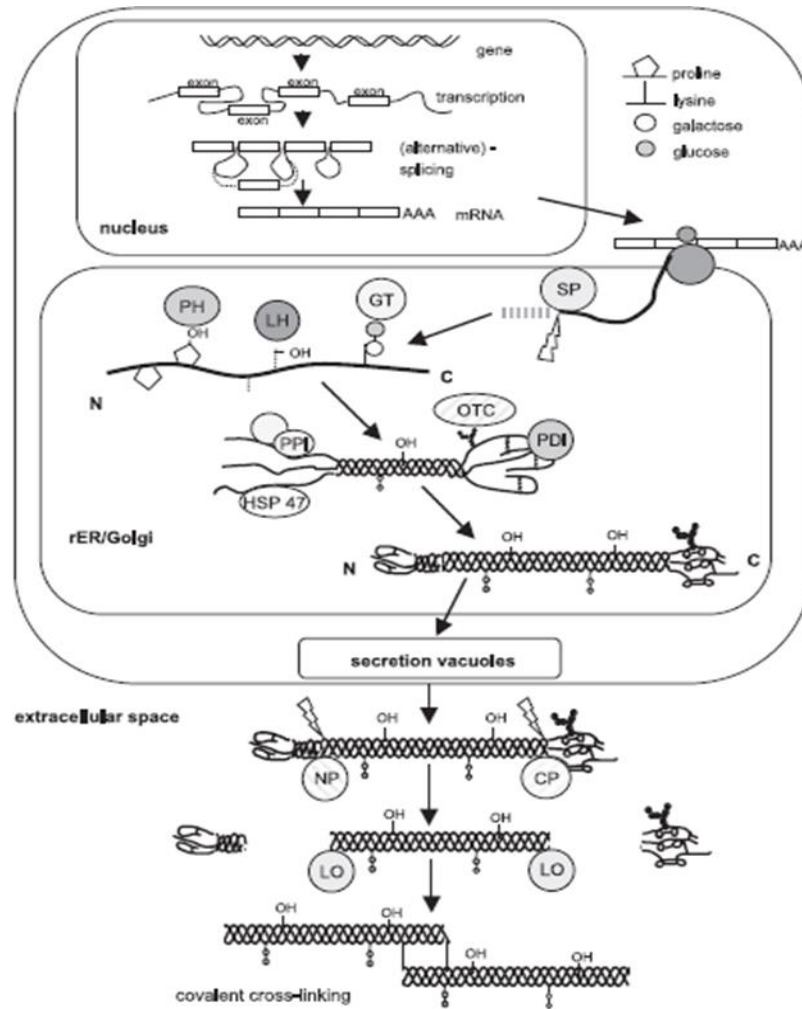
		$\alpha 3[\text{IV}] \alpha 4[\text{IV}]$ $\alpha 5[\text{IV}]$ $\alpha 5[\text{IV}]_2 \alpha 6[\text{IV}]$	
V	Ινώδης	$\alpha 1[\text{V}]_3$ $\alpha 1[\text{V}]_2 \alpha 2[\text{V}]$ $\alpha 1[\text{V}] \alpha 2[\text{V}] \alpha 3[\text{V}]$	δερματικά οστά, κερατοειδής, πλακούντας
VI	Δικτυωτό	$\alpha 1[\text{VI}] \alpha 2[\text{VI}]$ $\alpha 3[\text{VI}]$ $\alpha 1[\text{VI}] \alpha 2[\text{VI}]$ $\alpha 4[\text{VI}]$	οστά, χόνδρος, κερατοειδής, χόριο
VII	Ινίδια αγκύρωσης	$\alpha 1[\text{VII}]_2 \alpha 2[\text{VII}]$	χόριο, ουροδόχος κύστη
VIII	Δικτυωτό	$\alpha 1[\text{VIII}]_3$ $\alpha 2[\text{VIII}]_3$ $\alpha 1[\text{VIII}]_2 \alpha 2[\text{VIII}]$	χόριο, εγκέφαλος, καρδιά, νεφρό,
IX	FACIT	$\alpha 1[\text{IX}]_2 \alpha 2[\text{IX}]$ $\alpha 3[\text{IX}]$	χόνδρος, κερατοειδής, υαλώδες
X	Δικτυωτό	$\alpha 1[\text{X}]_3$	χόνδροι αρθρώσεων
XI	Ινώδης	$\alpha 1[\text{XI}] \alpha 2[\text{XI}]$ $\alpha 3[\text{XI}]$	χόνδρος, μεσοσπονδύλιος δίσκος
XII	FACIT	$\alpha 1[\text{XII}]_3$	χόριο, τένοντας
XIII	MACIT	-	ενδοθηλιακά κύτταρα, χόριο, μάτια, καρδιά
XIV	FACIT	$\alpha 1[\text{XIV}]_3$	οστά, χόριο, χόνδρο
XV	MULTIPLEXIN	-	τριχοειδή αγγεία, όρχεις, καρδιά
XVI	FACIT	-	χόριο, νεφρά
XVII	MACIT	$\alpha 1[\text{XVII}]_3$	ημιδιοσώματα στα επιθήλια
XVIII	MULTIPLEXIN	-	βασική μεμβράνη, ήπαρ
XIX	FACIT	-	υπόγειες μεμβράνες
XX	FACIT	-	Κερατοειδής, μάγουλα
XXI	FACIT	-	στομάχι, νεφρά
XXII	FACIT	-	συνδέσεις ιστών
XXIII	MACIT	-	καρδιά, αμφιβληστροειδής
XXIV	Ινώδης	-	οστό, κερατοειδής
XXV	MACIT	-	εγκέφαλος, καρδιά, όρχεις
XXXVI	FACIT	-	όρχεις, ωθήκες,
XXXVII	Ινώδης	-	χόνδροι αρθρώσεων
XXVIII	-	-	χόριο, ισχιακό νεύρο

1.1.4 Βιοσύνθεση κολλαγόνου

Η βιοσύνθεση του κολλαγόνου (εικ. 5) συντελείται μέσω μιας πολύπλοκης αλληλουχίας σταδίων, μερικά από τα οποία εξελίσσονται μέσα στα παράγωγα κύτταρα, ενώ τα υπόλοιπα στάδια, στον εξωκυττάριο χώρο. Καταρχήν σχηματίζεται αγγελιαφόρο RNA που κωδικοποιεί τη γενετική πληροφορία κι εποπτεύει την προσήλωση των πεπτιδίων για το σχηματισμό των πολυπεπτιδίων στα ριβοσωμάτια του ενδοπλασματικού δικτύου. Συντίθενται διαφορετικά αγγελιαφόρα RNA για κάθε τύπο α-αλυσίδας (Plow et al., 2000). Η παραγομένη προ-α-αλυσίδα υφίσταται ενζυματική υδροξυλίωση στις θέσεις της προλίνης και της υδροξυπρολίνης, η οποία απαιτεί την παρουσία O₂, Fe, α-κετογλουταρικού και ασκορβικού οξέος. Στο επόμενο στάδιο, συνδέεται ένα μόριο υδατάνθρακα με την υδροξυλυσίνη και συνενώνονται οι τρεις προ-α-αλυσίδες, προς σχηματισμό προπεπτιδικών επεκτάσεων. Έτσι, σχηματίζεται μια τριπλή έλικα, που ονομάζεται προκολλαγόνο, κι εξέρχεται από το κύτταρο (Schwartz et al., 2001).

Στο εξωκυττάριο περιβάλλον, το προκολλαγόνο μορφοποιείται σε μικρότερα μόρια κολλαγόνου, τα οποία, στη συνέχεια, συντάσσονται αυτόματα, προς σχηματισμό ινιδίων. Ο σχηματισμός αδρότερων ινών κολλαγόνου ολοκληρώνεται με τη συνένωση γειτονικών μορίων (Mead J. et al., 1967). Η συνένωση εξαρτάται από το σχηματισμό ομάδων αλδεϋδών που προέρχονται από την απαμίνωση της λυσίνης και της υδροξυλυσίνης, παρουσία της οξειδάσης της λυσίνης. Η συνένωση των ινιδίων εξελίσσεται βραδέως, ώστε η ωρίμανση του κολλαγόνου απαιτεί χρόνο για να ολοκληρωθεί. Μεταξύ των παραγόντων που επεμβαίνουν στη ρύθμιση της βιοσυνθέσεως του κολλαγόνου περιλαμβάνονται ορμόνες, όπως η θυροξίνη, τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα, τα κορτικοειδή, βιταμίνες όπως το ασκορβικό οξύ, που συμμετέχει στην ενζυματική υδροξυλίωση της προλίνης και της λυσίνης, ιχνοστοιχεία, όπως ο Cu, ο Fe και ο Zn (Bates et al., 1971). Τα κορτικοειδή, επεμβαίνουν στο σχηματισμό του κοκκιωματώδους ιστού και παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, καθώς και άλλων πρωτεϊνών (Barnes et al., 1988). Η έλλειψη βιταμίνης C συνεπάγεται βλάβη στη βιοσύνθεση των προ-α-αλυσίδων με αποτέλεσμα την παραγωγή παθολογικής συστάσεως συνδετικού ιστού (Bates D.V. et al., 1971). Έχει, τελευταία, αναγνωρισθεί ότι η βιοσύνθεση του κολλαγόνου στον πνεύμονα καταστέλλεται με τη διέγερση του β-αδρενεργικού συστήματος. Η

διέγερση του β-αδρενεργικού συστήματος προκαλεί αύξηση του κυκλικού AMP που αναστέλλει την παραγωγή του κολλαγόνου και αντίστροφα. Τέλος, οι προσταγλανδίνες και τα κύτταρα που εισέρχονται στις φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις επεμβαίνουν επίσης στην παραγωγή του κολλαγόνου.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης κολλαγόνου που αρχίζει από την πυρηνική μεταγραφή των γονιδίων κολλαγόνου συνεχίζει με την επεξεργασία mRNA, και την σύνθεση ριβοσωμικής πρωτεΐνης (μετάφραση) τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τελειώνει με έκκριση και τα τελικά στάδια του σχηματισμού ινιδίων.

1.1.5 Εφαρμογές κολλαγόνου

Χρήσεις στα τρόφιμα: Η πρωτεΐνη κολλαγόνου μπορεί να απομονωθεί έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος για τη βελτίωση της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών μέσω της ακινητοποίησης του ελεύθερου νερού, αυξάνοντας έτσι τη σταθερότητα του τελικού προϊόντος (Prabhu et al., 2004). Η ενσωμάτωση του κολλαγόνου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των απωλειών κατά το μαγείρεμα και την αύξηση της πρόσδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η προσθήκη κολλαγόνου είναι αποτελεσματική στην αύξηση της ικανότητας συγκράτησης του νερού και έχει τη δυνατότητα βελτίωσης ποιοτικών χαρακτηριστικών στα προϊόντα που παράγονται (Prabhu et al., 2004).

Βιοϊατρικές εφαρμογές: Ο πρωταρχικός λόγος της χρησιμότητας του κολλαγόνου στη βιοϊατρική είναι ότι μπορεί να σχηματίσει ίνες με επιπλέον αντοχή και σταθερότητα μέσω της αυτό-συσσωμάτωσης και της διασύνδεσης (Lee et al., 2001). Από τους δέκα τύπους κολλαγόνου που έχουν χαρακτηριστεί, οι τύποι I, III και V είναι οι πλέον επιθυμητοί για τη βιοϊατρική λόγω της υψηλής βιοσυμβατότητάς τους και της χαμηλής ανοσογονικότητας (Antiszko et al., 1996). Χρήσεις του κολλαγόνου έχουμε ως χειρουργικά ράμματα, σε αιμοστατικούς παράγοντες και στη μηχανική ιστών. Ως εμπορικό ιατρικό προϊόν, μπορεί να αποτελεί μέρος φυσικού σταθεροποιημένου ιστού που χρησιμοποιείται σε συσκευές, για παράδειγμα, όπως σε μια βιοπρόσθετη καρδιακή βαλβίδα (Ramshaw et al., 2009). Τα πλεονεκτήματα του κολλαγόνου για βιοϊατρική χρήση βασίζονται: (i) στις άφθονες πηγές υψηλής καθαρότητας (ιατρικού βαθμού) κολλαγόνου (ii), στη ικανότητα του για ανασύσταση σε υψηλά επίπεδα αντοχής χρήσιμα στη χειρουργική επέμβαση (iii), στο πλούτο της ερευνητικής βιβλιογραφίας σχετικά με τον χαρακτηρισμό του κολλαγόνου (iv), στην βελτίωση επεξεργασίας τεχνικών του (v), στην εισαγωγή πολλών εμπορικών προϊόντων και (vi), στις πρόσφατες εξελίξεις στη χρήση του κολλαγόνου ως ένα σύστημα στοματικής χορήγησης (Ramshaw et al., 2009).

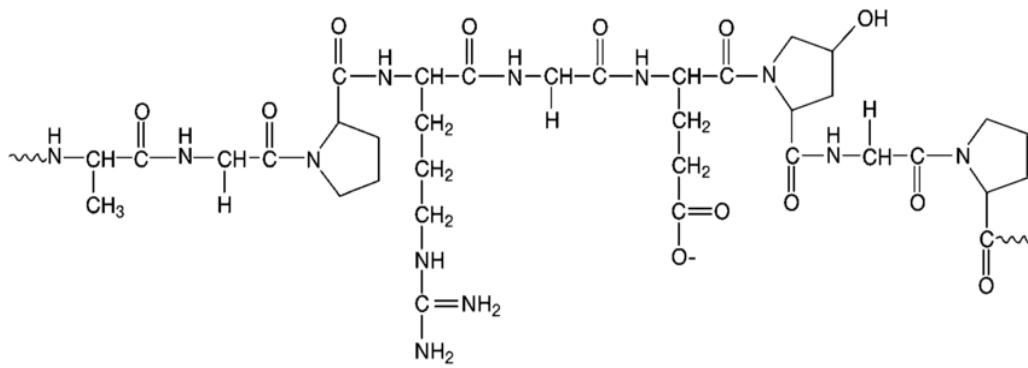
Φαρμακευτικές εφαρμογές: Είναι ευρέως γνωστό ότι η πέψη πρωτεϊνών κολλαγόνου ή υδρολυμάτων σε βιολογικό περιβάλλον παράγει πεπτίδια που μπορεί να είναι χρήσιμα για οργανικές βιοσυνθετικές διεργασίες (C'uneo et al., 2010). Έτσι, η κατανάλωση πλούσιων σε κολλαγόνο τροφίμων μπορεί να είναι ευεργετική για την

υγεία των οστών. Πολλές λειτουργικές ιδιότητες των ενζυμικών υδρολυμάτων κολλαγόνου έχουν διερευνηθεί και στην οστεοαρθρίτιδα και υποδηλώνουν την ευεργετική διέγερση στην αυξημένη σύνθεση μακρομορίων εξωκυτταρικής μήτρας που παράγονται από χονδροκύτταρα (C'uneo et al., **2010**). Οι κύριες εφαρμογές του κολλαγόνου βρίσκονται ως: συστήματα χορήγησης φαρμάκων όπως ασπίδα κολλαγόνου στην οφθαλμολογία, σφουγγάρια για εγκαύματα/τραύματα, μικροσφαιρίδια, δισκία για την παροχή πρωτεϊνών, μορφοποίηση πηκτής σε συνδυασμό με λιποσώματα για παρατεταμένη χορήγηση φαρμάκου, υλικό ελέγχου για διαδερμική απελευθέρωση και νανοσωματιδιακή γονιδιακή χορήγηση (Lee et al., **2001**).

1.2 Ζελατίνη, (gelatin)

1.2.1 Γενικά

Το κολλαγόνο αποτελεί ένα από τα κυριότερα βιοπολυμερή του ανθρώπινου οργανισμού, απαρτίζοντας το 70% της πρωτεΐνης που συνθέτει δέρμα, τένοντες και κόκκαλα. Οποιαδήποτε μορφή κολλαγόνου εκτός του φυσικού του περιβάλλοντος αναφέρεται ως ζελατίνη (εικ. 6) ή αποδομημένο κολλαγόνο, καθώς προκύπτει από τη μερική υδρόλυση του φυσικού κολλαγόνου και δεν απαντάται η ίδια στη φύση. Η ζελατίνη κυρίως προέρχεται από δέρμα και κόκκαλα θηλαστικών (χοιροειδή, βοοειδή), ενώ πρόσφατα άρχισε να απομονώνεται και ένα διαφορετικό είδος ζελατίνης από δέρμα ή λέπια ψαριών (Djabougon et al., **2013**). Ανάλογα με τις συνθήκες απομόνωσης και την προέλευση, η ζελατίνη διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: ζελατίνη τύπου Α, ζελατίνη τύπου Β και ζελατίνη από ιχθυώδη. Στη συγκεκριμένη μελέτη θα προσεγγίσουμε την απομόνωση και χαρακτηρισμό ζελατίνης από ιχθύες.



Εικόνα 6. Χημική δομή της ζελατίνης.

1.2.2 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες ζελατίνης

Η ζελατίνη ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών που σχηματίζουν γέλη. Φυσική γέλη, χαρακτηρίζεται εκείνη ή οποίας διεργασία μετατροπής βρίσκεται μεταξύ των δύο καταστάσεων, της στερεής (gelatin) και της υγρής (διάλυμα) είναι αντιστρεπτή και πραγματοποιείται με μείωση ή αύξηση της θερμοκρασίας αντίστοιχα. Η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων του συγκεκριμένου πολυμερούς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς επιτρέπει τη συλλογή αξιόπιστων πληροφοριών σχετικά με το σημείο τήξης και την ιξωδοελαστικότητα του υλικού, δηλαδή την ικανότητα να αντιστέκεται στην παραμόρφωση, κάτω από την άσκηση δύναμης συναρτήσει της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη ρεολογική ανάλυση είναι ενδιαφέροντες κυρίως δύο συντελεστές: ο συντελεστής αποθήκευσης ή δυναμική ακαμψία, G' (Pa), ο οποίος εκφράζει την ικανότητα του υλικού να αποθηκεύει ενέργεια την οποία και απελευθερώνει κατά την παραμόρφωση, και ο συντελεστής απώλειας, G'' (Pa), ο οποίος εκφράζει την ικανότητα του υλικού να χάνει ενέργεια υπό μορφή θερμότητας κατά τη διάρκεια της ασκούμενης παραμόρφωσης. Οι δύο συντελεστές συνδέονται μεταξύ τους με έναν συντελεστή απόσβεσης που δίνεται από τη σχέση (1) (Somwangthanaroj et al., 2010):

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (1)$$

Το στάδιο της διόγκωσης της ζελατίνης παίζει μεγάλο ρόλο, ιδιαίτερα στην περίπτωση υψηλών συγκεντρώσεων ζελατίνης, καθώς επιτρέπει τη διάλυση με ήπια θερμική επεξεργασία στους 40 °C (Djabourov et al., 2013; Haug et al., 2004). Οι παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό της έλικας στο μόριο της ζελατίνης, όταν βρίσκεται διαλυμένη σε κάποιο διαλύτη είναι:

- η συγκέντρωση της ζελατίνης, αύξηση της οποίας οδηγεί και σε αύξηση της ικανότητας σχηματισμού σταθερού gel. Το ποσοστό ανάκτησης της τριπλής έλικας στη ζελατίνη συγκριτικά με το μητρικό μόριο κολλαγόνου έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται επίσης από το ρυθμό και τη θερμοκρασία όπου λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των δεσμών υδρογόνου για το σχηματισμό της τελικής δομής της έλικας στη πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, σε υψηλότερες θερμοκρασίες (>20 °C) ο σχηματισμός της τριπλής έλικας πραγματοποιείται με πιο αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα την ανάκτηση δομών με ιδιότητες όμοιες με του φυσικού μορίου του κολλαγόνου συγκριτικά με την ωρίμανση της γέλης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.
- το μοριακό βάρος δηλαδή, υψηλά μοριακά βάρη ευνοούν το σχηματισμό σταθερής έλικας κατά τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο χώρο.
- η πηγή προέλευσης της ζελατίνης, η οποία καθορίζει και τα ποσοστά αμινοξέων στο μόριο της εκάστοτε ζελατίνης. Ειδικότερα τα αμινοξέα προλίνη και υδροξυπρολίνη σταθεροποιούν το μόριο της ζελατίνης για το σχηματισμό γέλης. Στη προερχόμενη από θηλαστικά ζελατίνη το ποσοστό των δύο κύριων αμινοξέων αποτελεί το 25% wt.
- το pH, σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις η επίδραση του pH στην περιοχή 4.0–10.0 δεν επηρεάζει σημαντικά το σχηματισμό γέλης.
- την ιονική ισχύ, προσθήκη NaCl έως 0.10 M δεν παίζει σπουδαίο ρόλο στο σχηματισμό γέλης. Αντιθέτως, υψηλές συγκεντρώσεις άλατος φαίνεται να επιδρούν αρνητικά στη σταθεροποίηση της ζελατίνης και την ανάπτυξη της τρισδιάστατης δομής.

1.2.3 Εφαρμογές ζελατίνης

Η χρήση της ζελατίνης στο σχηματισμό βιοσυμβατών υλικών για τη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας και ειδικότερα στην αποκατάσταση της σύστασης του αρθρικού υγρού / επιφάνειας χόνδρου είναι πολύ σημαντική. Στις μέρες μας η αύξηση του ορίου ηλικίας έχει οδηγήσει και σε εξαιρετικά αυξημένα ποσοστά ατόμων που πάσχουν από τη συγκεκριμένη ασθένεια. Από την άλλη μεριά, δυστυχώς, τα μέχρι στιγμής χρησιμοποιούμενα φάρμακα επικεντρώνονται στην ανακούφιση του πόνου και την προσωρινή μόνο αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας της άρθρωσης (Osteoarthritis O.A, **2013**). Για αυτό το λόγο κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης προηγμένων ενέσιμων υλικών που θα στοχεύουν στη θεραπεία της πάθησης χωρίς τη μεσολάβηση επεμβατικών μεθόδων και την αποφυγή της ταλαιπωρίας των ασθενών από μια μετεγχειρητική περίοδο.

1.3 Ιχθύες

1.3.1 Γενικά

Ιχθύς είναι κάθε μέλος μιας ομάδας υδρόβιων κρανιωτών ζωικών οργανισμών που δεν έχουν άκρα με δάκτυλα. Αποτελούνται από συνολικά 32.000 είδη οργανισμών. Κινούνται γενικά με πτερύγια, φέρουν λέπια και αναπνέουν με βράγχια. Πρόκειται για ζώα ψυχρόαιμα με έντονο το φαινόμενο της ποικιλοθερμίας. Βρίσκονται σχεδόν σε κάθε υδάτινο οικοσύστημα, από τα βουνά μέχρι τις αβύσσους.

Από τα απολιθώματα που έχουν βρεθεί φέρονται να ήταν τα πρώτα σπονδυλωτά που υπολογίζεται ότι έκαναν την εμφάνισή τους πριν από 400 εκατομμύρια χρόνια. Τα ψάρια αποτελούν την παλαιότερη και την πολυπληθέστερη σε αριθμό ειδών ομάδα μεταξύ των σπόνδυλο ζώων. Η κυριαρχία τους στις θάλασσες και τους ωκεανούς αποκαλύπτεται με τις εξαιρετικά επιτυχημένες φυσιολογικές προσαρμογές που έχουν αναπτύξει κατά την εξελικτική τους πορεία, αλλά και με τη μεγάλη ποικιλότητα που παρουσιάζουν στο μέγεθος, το σχήμα και τη μορφή. Πρώτα γνωστά ζώα που έμοιαζαν με ψάρια ήταν τα οστρακόδερμα. Σήμερα φέρονται αναγνωρισμένα περισσότερα από 30.000 είδη ψαριών. Κάποια από αυτά ζουν στο αλμυρό νερό και κάποια άλλα στο γλυκό χαρακτηριζόμενα αντίστοιχα, καθώς και

άλλα κοντά στην επιφάνεια του νερού (αφρόψαρα), άλλα κοντά σε βράχους (πετρόψαρα), και άλλα στο βυθό (βαθύβια ή αβυσσαία).

Η ιχθυοπανίδα των ελληνικών θαλασσών χαρακτηρίζεται από θερμόφιλα, τροπικά και υποτροπικά είδη, τα οποία είναι είτε απόγονοι ψαριών της Τηθύος Θάλασσας είτε είδη διαφορετικής προέλευσης, τα οποία έφθασαν στην περιοχή της Μεσογείου από τον Ινδικό Ωκεανό και την Ερυθρά θάλασσα σε διαφορετικές περιόδους. Τα τελευταία χρόνια το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη μελέτη των λεσεψιανών μεταναστών που εισέρχονται συχνότερα από τη διώρυγα του Σουέζ και εγκαθίστανται λόγω των κλιματικών αλλαγών στη Μεσόγειο, αλλά και ειδών του Ατλαντικού που εποικούν τη Μεσόγειο μέσω του στενού του Γιβραλτάρ οδήγησε στη προσθήκη νέων ειδών ψαριών στον κατάλογο των ήδη καταγεγραμμένων. Επίσης, η καταγραφή βαθύβιων ειδών, που αλιεύονται πλέον, λόγω της επέκτασης της αλιείας με συρόμενα εργαλεία σε μεγαλύτερα βάθη, αλλά και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών στη θαλάσσια έρευνα των βαθιών νερών συνέβαλε στην αύξηση του αριθμού των γνωστών ειδών (Papaconstantinou et al., **1988**). Μέχρι σήμερα, σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία, στις ελληνικές θάλασσες έχουν καταγραφεί συνολικά 476 είδη ψαριών (Fish base, IMAS Fish, Λαμπροπούλου **2007**). Από αυτά, τα 412 είδη ανήκουν στη ομοταξία των Ακτινοπτερύγιων (ψάρια με ακτίνες στα πτερύγιά τους), τα 63 στην ομοταξία των Χονδριχθίων (καρχαρίες, ράγιες-σαλάχια και χίμαιρες) και μόνο ένα στην ομοταξία των Κεφαλασπιδομόρφων (πετρόμουζα) που ανήκουν στα Άγναθα. Στη μεγάλη τους πλειονότητα είναι είδη ατλαντο-μεσογειακής προέλευσης (63%), ενώ ακολουθούν τα ενδημικά είδη της Μεσογείου (19%), τα είδη παγκόσμιας εξάπλωσης (10%), τα κοσμοπολίτικα είδη (5%) και οι λεσεψιανοί μετανάστες (3%). Το σύνολο των ψαριών των ελληνικών θαλασσών αποτελεί περίπου το 79% των ειδών που έχουν καταγραφεί στη Μεσόγειο και αποτελούν πλούσια πηγή πρόσληψης θρεπτικών συστατικών για τον άνθρωπο (πίνακας 2).

Πίνακας 2. Θρεπτική σύσταση ιχθύων (Τμήμα Διατροφικής Επιστήμης Παν. Guelph 2005).

Θρεπτικά συστατικά ψαριών	
Πρωτεΐνες	κολλαγόνο, ζελατίνη
Λιπαρά οξέα	Ω-3, Ω-6
Βιταμίνες	A, D, B3
Ιχνοστοιχεία & Μέταλλα	Ca, K, Na, I, Mn, Mg, Zn, P
Υδατάνθρακες	σε ποσοστό <1%

1.3.2 Μέγεθος, σχήμα, χρώμα, αναπαραγωγή και τροφή ιχθύων

Μέγεθος

Το μέγεθος των ενήλικων ιχθύων ποικίλει από ένα εκατοστόμετρο μέχρι 15 μέτρα. Τα μικρότερα σε μήκος ψάρια στον κόσμο είναι οι κοκκωβιοί των Φιλιππίνων που ζουν σε λίμνες και το μήκος τους φθάνει μόλις το 1 εκατοστό, αντίθετα το μεγαλύτερο ψάρι στον κόσμο θεωρείται ο φαλαινοκαρχαρίας ή ρινόδους, των τροπικών περιοχών, που πολλές φορές φθάνει και τα 15 μέτρα, ακολουθόμενος από τον καρχαρία προσκυνητή με μήκος περίπου 10 μέτρων, ενώ του γλυκού νερού ο οξύρρυγχος στην Ευρώπη, ένα είδος το οποίο στη Ρωσία φθάνει τα 5 μέτρα, και ο αραπαΐμας στη Ν. Αμερική, κυρίως στη Βραζιλία, που φθάνει επίσης τα 5 μέτρα. Γενικά τα ψάρια αναπτύσσονται σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Στην αρχή αναπτύσσονται γρήγορα και αργότερα όταν ενηλικιωθούν συνεχίζουν να αναπτύσσονται πολύ αργά. Στις επιμέρους αναφορές των ψαριών αναφέρεται πάντα το μέσο ενήλικο μήκος τους που έχει καταγραφεί και που μετράται από την άκρη του ρύγχους μέχρι την νοητή γραμμή που ενώνει τις άκρες του ουραίου πτερυγίου τους (Post G. Text Book of Fish Health).

Σχήμα

Όσο αναφορά το σχήμα, τρία είναι τα βασικά σχήματα που απαντώνται στα ψάρια και που οφείλονται κυρίως στο περιβάλλον και στον τρόπο που ζουν. Τα ψάρια για παράδειγμα που αναπτύσσουν ταχύτητα έχουν σχήμα ατράκτου όπως π.χ. οι ξιφίες, οι

πέστροφες, και γενικά τα αφρόψαρα. Αντίθετα τα βυθόβια, δηλαδή εκείνα που αναζητούν την τροφή τους στο βυθό και αναπαύονται σ' αυτόν είναι πλατειά όπως π.χ. τα σαλάχια, οι γλώσσες, οι πλευρονήκτες κ.ά. Άλλα επίσης έχουν μεγάλο ύψος σε βάρος του πάχους τους όπως είναι οι θαλάσσιες πεταλούδες ή χαιτοδοντίδες. Κάποια άλλα έχουν ανάπτυξη φιδοειδή όπως π.χ. τα σπαθόψαρα ή τα χέλια, προκειμένου να γλιστρούν ανάμεσα από τα υδρόβια φυτά, ή στους βράχους όπως οι σμέρνες. Σε μικρότερη κλίμακα παρουσιάζονται κάποια σφαιρικά όπως το ψάρι ακανθόχοιρος, ενώ τα όστρακα παρουσιάζουν από μπροστά μορφή τριγωνική.

Τέλος τα λεγόμενα αβυσσαία ψάρια παρουσιάζουν και τα πιο περίεργα σχήματα, πολλά από τα οποία φέρουν μακριά νηματοειδή πτερύγια με φωτογόνα κύτταρα στις άκρες τους (Post G. Text Book of Fish Health).

Χρώμα

Γενικά ως προς το χρώμα τα ψάρια είναι τα περισσότερο εντυπωσιακά ζώα στον κόσμο. Ιδιαίτερα το ασημί χρώμα των λεπιών που κυριαρχεί στα περισσότερα είδη οφείλεται σ' ένα στρώμα γουανίνης, που αποτελεί υποπροϊόν της πέψης των τροφών τους. Σε πολλές των περιπτώσεων η ουσία αυτή φέρεται σε κρυσταλλική μορφή σαν πλάκες που αναλύουν το φως έτσι ώστε να δημιουργούν ιριδισμούς με πολλά χρώματα. Οι δε πράσινες, οι κόκκινές κι οι θαλασσιές αποχρώσεις με τους διάφορους επιμέρους χρωματισμούς οφείλονται σε αναρίθμητα αστεροειδή κύτταρα που ονομάζονται «χρωματοφόρα» τα οποία και βρίσκονται διασκορπισμένα σ' όλο το δέρμα του ψαριού. Τα χρωματοφόρα αυτά περιέχουν μεγάλη ποικιλία χρωστικών ουσιών όπως καροτενοειδή, φλαβονοειδή, μελανίνη, γουανίνη κ.λπ. Πολλά ψάρια αλλάζουν το χρώμα τους ανάλογα με τη διάθεσή τους ή τον χώρο που βρίσκονται.. Η χρωστική ουσία ενός δερματικού κυττάρου ψαριού μπορεί να περιοριστεί τόσο ώστε να είναι σχεδόν άορατο. Υπό την επίδραση όμως συγκεκριμένης ορμόνης για κάθε χρωστική αυτή μπορεί να διασταλεί μέχρι να γεμίσει όλο το κύτταρο. Οι μεταβολές αυτές των χρωμάτων συμβαίνουν κυρίως όταν το ψάρι αλλάζει τόπο βυθού (περιβάλλον), διάθεση ή σε αιφνιδιασμό ή φόβο. Γενικά πάντως τα υγιή ψάρια έχουν περισσότερο γυαλιστερό και λαμπρό χρώμα παρά όταν αρρωσταίνουν. Οι δε αλλαγές των χρωμάτων που παρατηρούνται στα σώματα των ψαριών παρουσιάζουν μια

θαυμαστή κυματοειδή κίνηση, είτε από το ρύγχος προς την ουρά, είτε διαγώνια, είτε από τη ράχη προς τη κοιλιά (Post G. Text Book of Fish Health).

Αναπαραγωγή

Στα ψάρια δεν παρατηρείται έντονος φυλετικός διμορφισμός, με συνέπεια τα αρσενικά να μη διαφέρουν από τα θηλυκά. Βέβαια σε κάποια είδη είναι ευδιάκριτα όπως σε μερικούς καρχαρίες και ράγες. Κατά κανόνα όμως τα θηλυκά είναι μεγαλύτερα των αρσενικών. Τα θηλυκά ψάρια φέρουν δύο ωοθήκες που στη περίοδο της ωοτοκίας καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος στη κοιλιακή κοιλότητα. Οι ωοθήκες αυτές έχουν σχήμα λουκάνικου. Από τις αυγομένες ωοθήκες της μπάφας παράγεται το αυγοτάραχο. Τα δε αρσενικά ψάρια έχουν δύο επιμήκη υπόλευκα όργανα τριγωνικά που φέρουν το σπέρμα, οι σπερματοδόχοι κύστεις. Σημειώνεται πως όλα σχεδόν τα ψάρια είναι ωοτόκα, ενώ κάποια εξ αυτών κρατούν τα αυγά μέχρι να εκκολαφθούν όπου και γεννούν έτοιμα τα μικρά τους. Τα ωοτόκα ψάρια γεννούν τ' αυγά τους συνήθως ελεύθερα στο υγρό περιβάλλον και εκεί τα αρσενικά πλησιάζουν για να τα γονιμοποιήσουν με το σπέρμα τους. Η αναπαραγωγή των ψαριών με τον τρόπο αυτό παρουσιάζει τεράστιες απώλειες αφού το θηλυκό σε κάθε ωοτοκία υπολογίζεται (για κάποια είδη) ότι γεννά μέχρι και 10 εκατομμύρια αυγά όπου ένας πολύ μεγάλος αριθμός εξ αυτών καταστρέφεται (Post G. Text Book of Fish Health).

Τροφή

Γενικά τα ψάρια χαρακτηρίζονται παμφάγα με τάσεις άλλων σε σαρκοφαγία και άλλων σε χορτοφαγία. Τα περισσότερα όμως είναι σαρκοφάγα που τρέφονται με μικρότερα και άλλα υδρόβια ζώα τα οποία τρώνε ακόμη πιο μικρά και ούτω καθεξής μέχρι που φθάνουν στους μονοκύτταρους οργανισμούς που αποτελούν το πλαγκτόν, τη πρώτη βαθμίδα της τροφικής αλυσίδας. Όταν μάλιστα οι γενικές συνθήκες ζωής είναι πολύ ικανοποιητικές μπορεί να υφίστανται τόνοι πλαγκτόν σε κάθε τ. χλμ, ποσότητα που χρωματίζει τη θάλασσα σε πολύ μεγάλη έκταση. Οι κατώτεροι αυτοί οργανισμοί, αόρατοι με γυμνό μάτι, αποτελούν τη βασική τροφή όλων των ψαριών, μερικά είδη των οποίων και τρέφονται αποκλειστικά με αυτά (Post G. Text Book of Fish Health).

1.3.3 *Sparus aurata* (Τσιπούρα)



Πίνακας 3. Συστηματική κατάταξη.

<u>Βασίλειο</u>	Ζώα (Animalia)
<u>Συνομοταξία</u>	Χορδωτά (Chordata)
<u>Ομοταξία</u>	Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
<u>Τάξη</u>	Περκόμορφα (Perciformes)
<u>Οικογένεια</u>	Σπαρίδες (Sparidae)
<u>Γένος</u>	Σπάρος (<i>Sparus</i>)
<u>Είδος</u>	<i>Sparus aurata</i>

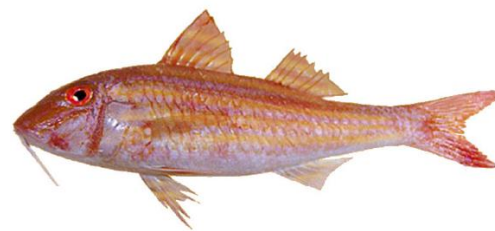
Εικόνα 7. *Sparus aurata*,

Τσιπούρα.

Μορφολογία.

Η τσιπούρα ανήκει στην οικογένεια Σπαρίδες (Sparidae) και η επιστημονική της ονομασία είναι *Sparus aurata*. Σχηματίζει, από μορφολογικής άποψη, ένα αρκετά ομοιογενές σύνολο ειδών που χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό και συμπιεσμένο πλευρικό σώμα. Το μέγιστο μήκος που μπορεί να φθάσει είναι 70 cm με συνηθισμένο τα 20 με 30 cm και το μέγιστο βάρος φθάνει τα 5 kgr, με συνηθισμένο το 1.5 με 2 kgr. Ζει κοντά σε ακτές, σε βάθος από 5 μέχρι 30 cm, και είναι ευαίσθητη σε χαμηλές θερμοκρασίες. Είναι ευρύαλο ψάρι και προτιμάει αλατότητες από 25 έως 42%. Είναι ευαίσθητη στην έλλειψη οξυγόνου. Μερικά από τα είδη της οικογένειας αυτής διαβιούν και στις λιμνοθάλασσες (Bauchot et al., 1990).

1.3.4 *Pagrus pagrus* (Φαγγρί)



Εικόνα 8. *Pagrus pagrus* (Φαγγρί).

Πίνακας 4. Συστηματική κατάταξη.

<u>Βασίλειο</u>	Ζώα (Animalia)
<u>Συνομοταξία</u>	Χορδωτά (Chordata)
<u>Ομοταξία</u>	Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
<u>Τάξη</u>	Περκόμορφα (Perciformes)
<u>Οικογένεια</u>	Σπαρίδες (Sparidae)
<u>Γένος</u>	Πάγκρους (<i>Pagrus</i>)
<u>Είδος</u>	<i>Pagrus pagrus</i>

Μορφολογία.

Το Φαγγρί ανήκει στην οικογένεια Σπαρίδες (Sparidae) και η επιστημονική του ονομασία είναι *Pagrus pagrus*. Το σώμα του είναι ωοειδές συμπιεσμένο στα πλάγια. Το μήκος του φτάνει τα 80 εκατοστά και το βάρος του μέχρι και 10 κιλά. Το είδος αυτό ζει σε πετρώδεις βυθούς και σε βάθος που ποικίλει ανάλογα με την εποχή, το καλοκαίρι είναι στα 30 με 40 μέτρα και το χειμώνα στα 200 μέτρα. Τρέφεται με ψάρια, μαλάκια και μαλακόστρακα (Bauchot et al., 1990).

1.3.5 *Mullus barbatus* (Κουτσομούρα)



Εικόνα 9. *Mullus barbatus*
(Κουτσομούρα).

Πίνακας 5. Συστηματική κατάταξη.

<u>Βασίλειο</u>	Ζώα (Animalia)
<u>Συνομοταξία</u>	Χορδωτά (Chordata)
<u>Ομοταξία</u>	Ακτινοπτερύγια (Actinopterygii)
<u>Τάξη</u>	Περκόμορφα (Perciformes)
<u>Οικογένεια</u>	Μουλλίδες (Mullidae)
<u>Γένος</u>	Μούλλος (<i>Mullus</i>)
<u>Είδος</u>	<i>Mullus barbatus</i>

Μορφολογία.

Η κουτσομούρα ανήκει στην οικογένεια Μουλλίδες και η επιστημονική ονομασία της είναι *Mullus barbatus*. Έχει σώμα λίγο συμπιεσμένο και επίμηκες με κεφάλι που κόβεται σχεδόν κάθετα (μοιάζει με κουτσή μούρη απ' όπου προέρχεται και η κοινή ονομασία). Φτάνει σε μήκος τα 25 cm είναι βαθύσαρο της λάσπης και της αμμολάσπης και ζει σε βάθη από 20 έως 300 m στις περιοχές της υφαλοκρηπίδας. Συναντάται επίσης σε χαλικώδεις και αμμώδεις βυθούς. Είναι χαρακτηριστικό κοπαδιάρικο ψάρι. Ακολουθεί την ίδια τακτική ανεύρεσης τροφής με το μπαρμπούνη και τρέφεται κυρίως με βενθικά ασπόνδυλα (μαλακόστρακα, σκουλήκια, μαλάκια). Διακρίνεται σε δύο υποείδη: 1.*M.barbatus barbatus*. Η κουτσομούρα των ελληνικών θαλασσών. 2.*M.barbatu sponticus*. Συναντάται στη Μαύρη και την Αζοφική θάλασσα (Ben-Tuvia et al., 1990).

1.3.6 *Umbrina cirrosa* (Μυλοκόπι)



Εικόνα 10. *Umbrina cirrosa*
(Μυλοκόπι).

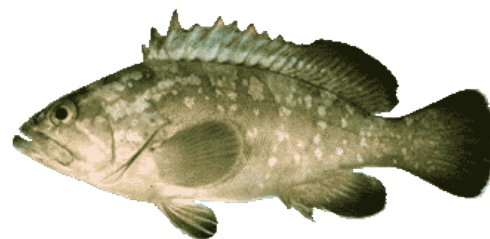
Πίνακας 6. Συστηματική κατάταξη.

<u>Βασίλειο</u>	Ζώα (Animalia)
<u>Συνομοταξία</u>	Χορδωτά (Chordata)
<u>Ομοταξία</u>	Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
<u>Τάξη</u>	Περκόμορφα (Perciformes)
<u>Οικογένεια</u>	Σκιανίδες (Sciaenidae)
<u>Γένος</u>	Ούμπρινα (<i>Umbrina</i>)
<u>Είδος</u>	<i>Umbrina cirrosa</i>

Μορφολογία.

Το Μυλοκόπι ανήκει στην οικογένεια Σκιανίδες και η επιστημονική ονομασία του είναι *Umbrina cirrosa*. Κάτω από το σαγόι του διακρίνουμε ένα γενάκι. Το σώμα του είναι φαρδύ και από την ράχη του μέχρι και το στόμα του καμπυλωτό. Το χρώμα του στη ράχη είναι σκούρο σταχτί ή ασημοπράσινο και στην κοιλιά ασημόλευκο. Στα πλευρά του έχει λοξές κυματοειδείς γραμμές που είναι ολόχρυσες με άσπρες και μαύρες ενδιάμεσα βουλίτσες. Σε κάθε μάγουλο έχει μια μαύρη βούλα. Το βάρος του κάποιες φορές μπορεί να φτάσει τα 15 kgf. Ζει κοντά στις ακτές σε βυθό με άμμο ή με βότσαλα, φύκια, αμμόλασπη. και στις εκβολές των ποταμών (Chao et al., 1990).

1.3.7 *Epinephelus marginatus* (Ροφός)



Εικόνα 11. *Epinephelus marginatus* (Ροφός).

Πίνακας 7. Συστηματική κατάταξη.

<u>Βασίλειο</u>	<u>Ζώα (Animalia)</u>
<u>Συνομοταξία</u>	<u>Χορδωτά (Chordata)</u>
<u>Ομοταξία</u>	<u>Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)</u>
<u>Τάξη</u>	<u>Περκόμορφα (Perciformes)</u>
<u>Οικογένεια</u>	<u>Σερανίδες (Serranidae)</u>
<u>Γένος</u>	<u>Επινέφελος (<i>Epinephelus</i>)</u>
<u>Είδος</u>	<u><i>Epinephelus marginatus</i></u>

Μορφολογία.

Ο Ροφός ανήκει στα περκοειδή, η επιστημονική ονομασία του είναι *Epinephelus marginatus* - Επινέφελος ο περιθωριοποιημένος ή Επινέφελος ο κρασπεδωτός ή *epinephelus guaza*, ή *serranus gigas*, και ανήκει στην οικογένεια των σερανιδών. Συγγενεύει με τη πέρκα το λαβράκι και μοιάζει πολύ με τη στήρα. Είναι πετρόψαρο και συχνάζει σε βραχώδεις βυθούς και σε βάθη από 5-300 m. Είναι μεγάλο ψάρι, το βάρος του μπορεί να φτάσει και τα 60 κιλά (στις ελληνικές θάλασσες μέχρι 25 kg βάρος και 1,5 m μήκος), ενώ η διάρκεια ζωής του μπορεί να φτάσει και τα 50 χρόνια. Το χρώμα του είναι σκούρο καφέ προς το μαύρο (ανάλογα την μορφολογία του βυθού που ζει) με κίτρινες κηλίδες σαν νέφη, γι' αυτό το λόγο ονομάζεται και "επινέφελος", δηλαδή νεφοσκεπής. Είναι το κυρίαρχο ψάρι στη Μεσόγειο ενώ συναντάται και στον Ανατολικό Ατλαντικό, στον Δυτικό Ινδικό ωκεανό στην Μοζαμβίκη, Μαδαγασκάρη, στην νότια Βραζιλία και από την Ουρουγουάη μέχρι την Αργεντινή. Λατρεύει τα ζεστά νερά. Ο ροφός ζει συνήθως μόνος του σε βραχώδεις εγκολπώσεις (θαλάμους) γύρω από τις οποίες περιφέρεται. Μόνο οι μικροί ροφοί ζουν κατά κοπάδια (Heemstra et al., 1993).

1.3.8 *Salmo salar* (Σολωμός)



Εικόνα 12. *Salmo salar*
(Σολωμός).

Πίνακας 8. Συστηματική κατάταξη.

<u>Βασίλειο</u>	Ζώα (Animalia)
<u>Συνομοταξία</u>	Χορδωτά (Chordata)
<u>Ομοταξία</u>	Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
<u>Τάξη</u>	Σολομόμορφα (Salmoniformes)
<u>Οικογένεια</u>	Σολομονίδες (Salmonidae)
<u>Γένος</u>	Σάλμο (<i>Salmo</i>)
<u>Είδος</u>	<i>Salmo salar</i>

Μορφολογία.

Ο Σολωμός ανήκει στην οικογένεια των Σολομονιδών και η επιστημονική του ονομασία είναι *Salmo salar*. Έχει μέγιστο μήκος 1,5 m και μέγιστο βάρος 47 kgr. Το μέσο μήκος του είναι 40 cm. Έχει επίμηκες σώμα. Τα σαγόνια φτάνουν μέχρι κάτω από το μάτι. Πριν την αναπαραγωγή το σαγόι γίνεται έντονα αγκιστρωτό. Η ράχη του έχει καφέ ή πράσινο/μπλε χρώμα, τα πλευρά είναι ασημί και η κοιλιά είναι λευκή. Πάνω από την πλευρική γραμμή στα πλευρά υπάρχουν στίγματα με σχήμα X. Η διατροφή τους περιλαμβάνει ρέγγες, σαρδέλες και καλαμάρια. Μετά, όταν ενηλικιωθούν σταματούν να τρώνε και επιστρέφουν πίσω στα ρυάκια και λίμνες όπου γεννήθηκαν για να αναπαραχθούν. (Page et al., 2011).

1.3.9 *Spicara smaris* (Μαρίδα)



Εικόνα 13. *Spicara smaris*
(Μαρίδα).

Πίνακας 9. Συστηματική κατάταξη.

<u>Βασίλειο</u>	<u>Ζώα</u> (Animalia)
<u>Συνομοταξία</u>	<u>Χορδωτά</u> (Chordata)
<u>Ομοταξία</u>	Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
<u>Τάξη</u>	Περκόμορφα (Perciformes)
<u>Οικογένεια</u>	Κεντρακανθίδες (Centranchidae)
<u>Γένος</u>	Σπικάρα (<i>Spicara</i>)
<u>Είδος</u>	<i>Spicara smaris</i>

Μορφολογία.

Η μαρίδα ανήκει στην οικογένεια των Κεντρακανθινών και η επιστημονική της ονομασία είναι *Spicara smaris*, φτάνει τα 15 εκατοστά σε μήκος. Τα αρσενικά κατά την αναπαραγωγική περίοδο φτάνουν τα 20 εκατοστά. Έχουν επίμηκες σώμα, που είναι πεπιεσμένο στα πλευρά. Το χρώμα της είναι καστανό στην ράχη, σταχτί στα πλευρά και πιο ανοικτό στην κοιλιά. Την εποχή του ζευγαρώματος η ράχη των αρσενικών γίνεται καστανοκίτρινη και παρουσιάζονται 3 με 4 γαλάζιες ταινίες, η μία καταλήγει στο μέτωπο και σχηματίζει ένα γαλαζοπράσινο πέταλο. Κάθε μαρίδα έχει μία βούλα στο πλευρό της. Επίσης, έχει μικρά λέπια. Ζει σε κοπάδια, κυρίως, σε περιοχές με πλούσια βλάστηση και σε αμμολασπώδεις βυθούς. Την συναντάμε σε βάθος από 5 έως 280 μέτρα. Τρέφεται με μικρά ασπόνδυλα και με πλαγκτονικούς οργανισμούς (Heemstra et al., 1990).

1.4 Απόβλητα ιχθύων ως οικονομική αξία πηγής κολλαγόνου.

Κάθε χρόνο, περισσότεροι από 100 εκατομμύρια τόνοι ψαριών συλλέγονται παγκοσμίως με το 29,5% της συλλογής να χρησιμοποιείται ως τροφή για τα ίδια τα ψάρια λόγω της έλλειψης λειτουργικών ιδιοτήτων τους, π.χ. αναπαραγωγή

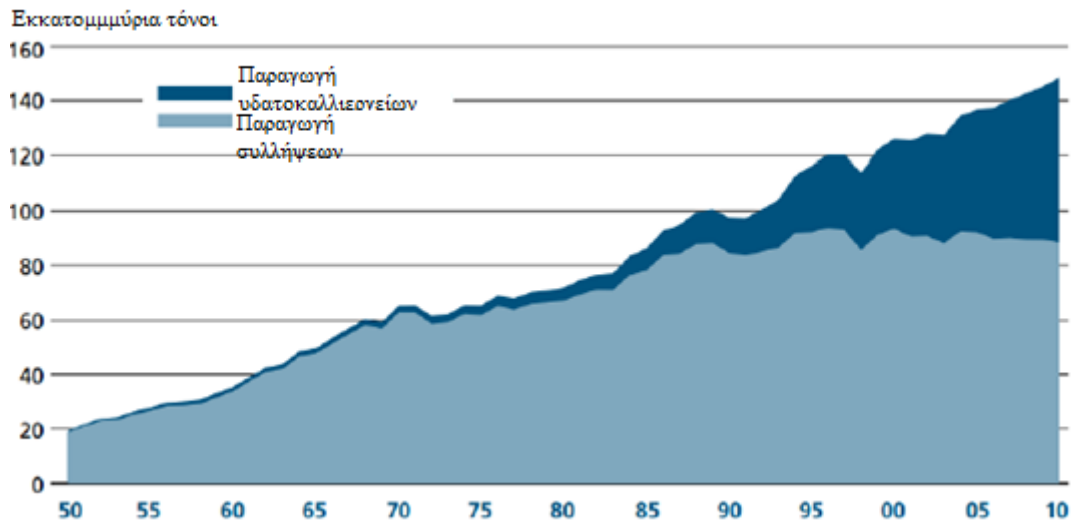
(Kristinsson and Rasco et al., 2000; See et al., 2010). Περίπου το 70-85% της δέσμευσης γίνεται απόβλητο επεξεργασίας αλιείας και το 30% αυτών των αποβλήτων είναι οστά, πτερύγια, λέπια, δέρμα που περιέχουν υψηλά επίπεδα κολλαγόνου, ανάλογα με τη διαδικασία που χρησιμοποιείται (Shahidi et al., 1994).

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία, από τους 126 εκατομμύρια τόνους για ανθρώπινη κατανάλωση, η Αφρική είχε τη χαμηλότερη κατανάλωση ψαριών (9,1 εκατομμύρια τόνους), ενώ η Ασία κάλυψε τα δύο τρίτα της συνολικής κατανάλωσης με 85,4 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2012). Τα στοιχεία έδειξαν ότι το 2011, ανακτήθηκε αύξηση 154 εκατομμυρίων τόνων ψαριών και 131 εκατομμύρια τόνοι από αυτά θα ληφθούν υπόψη ως τρόφιμα (πίνακας 9 και διάγραμμα 1). Τα τελευταία 50 χρόνια, υπήρχε κατά μέσο όρο ρυθμός ανάπτυξης 3,20% ετησίως κατά την περίοδο 1961 - 2009, ο οποίος αυξανόταν γρηγορότερα από τον παγκόσμιο ρυθμό αύξησης του πληθυσμού 1,7% ετησίως (διάγραμμα 2). Το 2010, οι αλιεύσεις και οι υδατοκαλλιέργειες προμήθευαν στον κόσμο 148 εκατομμύρια τόνους ψαριών, όπου 128 εκατομμύρια τόνοι χρησιμοποιήθηκαν ως τρόφιμα.

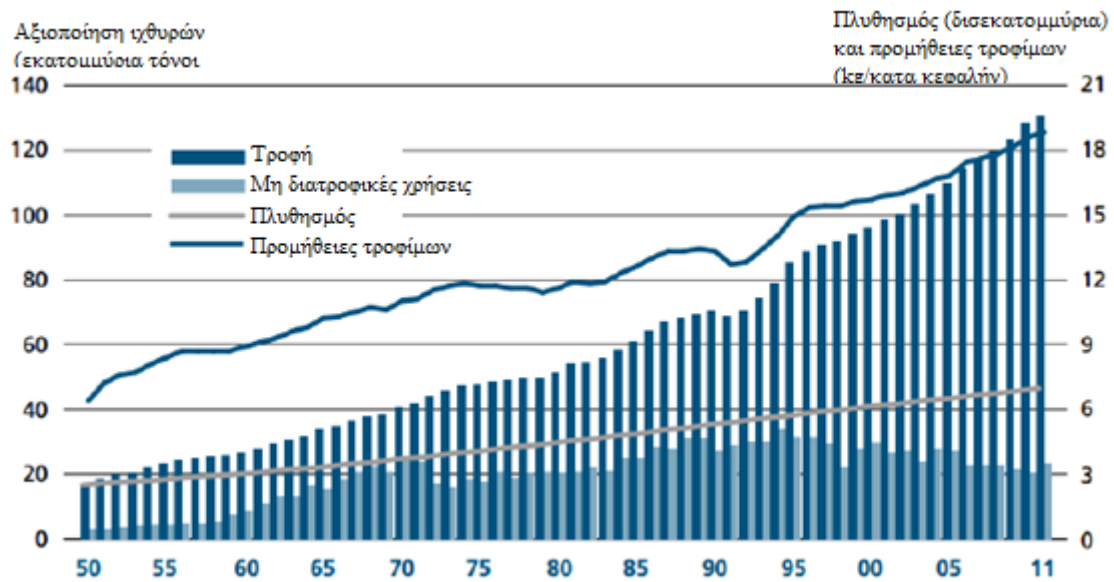
Πίνακας 9: Παγκόσμια παραγωγή και αξιοποίηση της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας (FAO, 2012).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Σύλληψη παραγωγής						
Εγχώρια	9.80	10.00	10.20	10.40	11.20	11.50
Θαλάσσια	80.20	80.40	79.50	79.20	77.40	78.90
Συνολική συλλογή	90.00	90.30	89.70	89.60	88.60	90.40
Υδατοκαλλιέργεια						
Εγχώρια	31.30	33.40	36.00	38.10	41.70	44.30
Θαλάσσια	16.00	16.60	16.90	17.60	18.10	19.30
Σύνολο υδατοκαλλιέργειας	47.30	49.90	52.90	55.70	59.90	63.60
Σύνολο παγκόσμιας αλιείας	137.30	140.20	142.60	145.30	148.50	154.00
Αξιοποίηση για ανθρώπινη κατανάλ.						
Μη διατροφικές χρήσεις	114.30	117.30	119.70	123.60	128.30	130.80
Πληθυσμός (δισεκατομμύρια)	23.00	23.00	22.90	21.80	20.20	23.20
	6.60	6.70	6.70	6.80	6.90	7.00

Παροχή ψαριών κατά κεφαλή τροφίμων (kg)

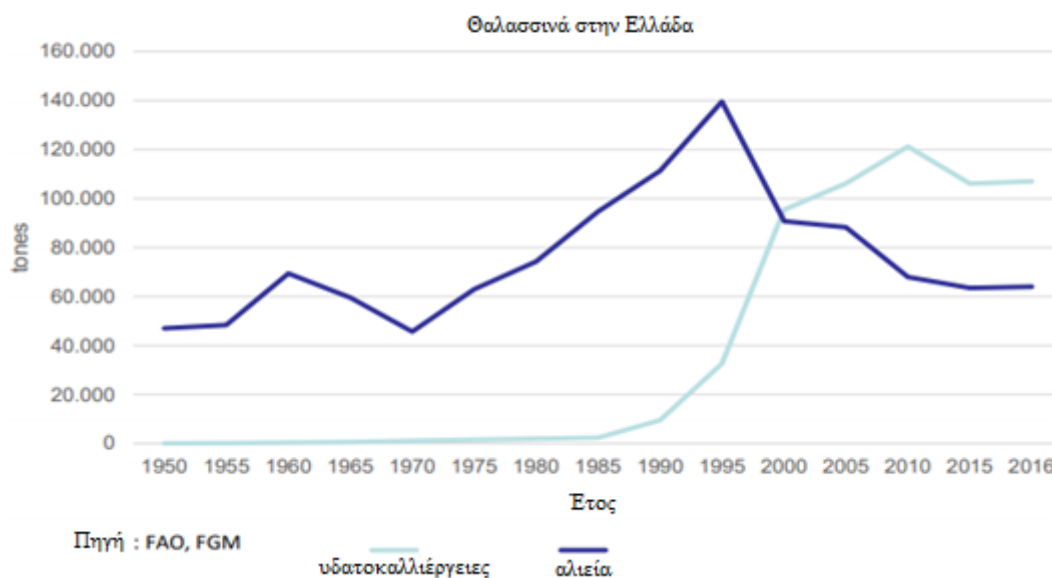


Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση της παγκόσμιας παραγωγής συλλογής αλιείας και υδατοκαλλιέργειας (FAO, 2012).



Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση της παγκόσμιας αξιοποίησης και προμήθειας ψαριών (FAO, 2012).

Το 2010, η παραγωγή υδατοκαλλιέργειας και αλίευσης της Ελλάδας έφτασε τους 120 χιλιάδες τόνους σε σύγκριση με τις 60 χιλιάδες τόνους ετησίως από την αλιεία, όπως φαίνεται στο (διάγραμμα 3) (FAO, 2013), όπου το 31% χαρακτηρίστηκε ως μη βρώσιμα απόβλητα ψαριών (FAO, 2016). Τα απορριπτόμενα αλιεύματα μπορούν να χρησιμεύσουν ως μη επεξεργασμένα υλικά για την παραγωγή τροφίμων υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη. Η τροποποίηση αυτών των απορριμμάτων σε προϊόντα ίδια προστιθέμενης αξίας έχει σημαντικά και οικολογικά οφέλη. Στη Ελλάδα, το 63% των θαλάσσιων ψαριών προέρχονται από τις υδατοκαλλιέργειες, ενώ το υπόλοιπο είναι ψάρια αλμυρού νερού από αλιεία. Περίπου το 75% της προσφοράς ψαριών προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Ενώ το 25% χρησιμοποιείται για ιχθυέλαια. Το 30% των αποθεμάτων ψαριών για ανθρώπινη κατανάλωση μεταποιούνται σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα, φιλέτα ψαριών, τσιπς και προϊόντα πρωτεΐνης. Τα απόβλητα προϊόντα προκύπτουν στο τέλος της επεξεργασίας και της ανθρώπινης κατανάλωσης. Η ίδια η επεξεργασία ψαριών αφήνει σημαντικό αποτύπωμα περιβαλλοντικής ρύπανσης και ιδιαίτερα προβλήματα οργανικής οσμής. Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για την επίλυση αυτών των προβλημάτων όπως π.χ. με την παρασκευή σάλτσας ψαριών, πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων και πρωτεϊνικών υδρολυμάτων (Ibrahim et al., 2013).



Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση της Ελληνικής συγκομιδής ψαριών αλιείας και υδατοκαλλιέργειας.

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Για την ανάδευση χρησιμοποιήθηκε μηχανικός αναδευτήρας (selecta Multimatic SN),). Το παγόλουτρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hetofrig (Heto Birkerød), οι φυγοκεντρήσεις έγιναν σε φυγόκεντρο ScanSpeed 2236R High speed Centrifuge (Labogene). Η λυοφιλοποίηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή ScanVac Coolsafe. Οι εικόνες SEM ελήφθησαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης PhenomWorld (Phenom). Τα φάσματα IR καταγράφηκαν σε φασματογράφο Bruker, ALPHA II, (platinum-ATR). Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν σε φασματογράφο, Lambda 40 (PerkinElmer instruments), οι θερμοβαρυμετρικές αναλύσεις (TGA) έγιναν σε συσκευή Discovery-series TA/ TGA 55 και η περίθλαση ακτίνων-X έγινε σε περιθλασίμετρο Bruker D8-VENTURE.

2.2 Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια.

Τα αντιδραστήρια iso-butyl ALCOHOL και Acetic Acid Glacial ήταν της εταιρείας BDH. Το αντιδραστήριο EDTA ήταν της εταιρείας Penta chemicals unlimited και πεψίνη (από γαστρικό βλεννογόνο χοίρου, ≥ 250 units/mg στερεού) ήταν της εταιρείας Sigma. Το Na_2HPO_4 ήταν της εταιρείας Merck. Το Tris-HCl ήταν της εταιρείας Mallinckrodt. Το αλάτι που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις παρασκευές ήταν εμπορίου της εταιρείας HPA/ΚΑΛΑΣ.

2.3 Συλλογή πρώτων υλών

Δείγματα συλλέχθηκαν από το ιχθυοπωλείο η "Αγορά του Καταναλωτή" στην κεντρική αγορά στον Αγ. Ι. Ρέντη. Τα δείγματα που συγκεντρώθηκαν ήταν λέπια από Ροφό (*E. marginatus*), Κουτσομούρα (*M. barbatus*), Φαγγρί (*P. pagrus*), Τσιπούρα (*S. aurata*), Σολωμό (*S. salar*), Μυλοκόπι (*U. cirrosa*), και ολόκληρος ιχθύς Μαρίδα (*S. smaris*). Τα λέπια, αφού καθαρίστηκαν από προσμίξεις, εκπλύθηκαν με θαλασσινό νερό και εν συνεχεία μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του

Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας τους.

2.4 Απομόνωση κολλαγόνου και ζελατίνης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός κολλαγόνου διαλυτού σε οξύ και σε πεψίνη, καθώς και η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ζελατίνης. Τα κολλαγόνα απομονώθηκαν από λέπια ψαριών Ροφό (*E. marginatus*), Κουτσομούρα (*M. barbatus*), Φαγγρί (*P. pagrus*), Τσιπούρα (*S. aurata*), Σολωμό (*S. salar*), Μυλοκόπι (*U. cirrosa*), και από ολικούς ιχθύς Μαρίδα (*S. smaris*), ενώ η ζελατίνη από Ροφό (*E. marginatus*).

2.4.1 Απομόνωση κολλαγόνου διαλυτού σε οξικό οξύ, (Acid Soluble Collagen, ASC)

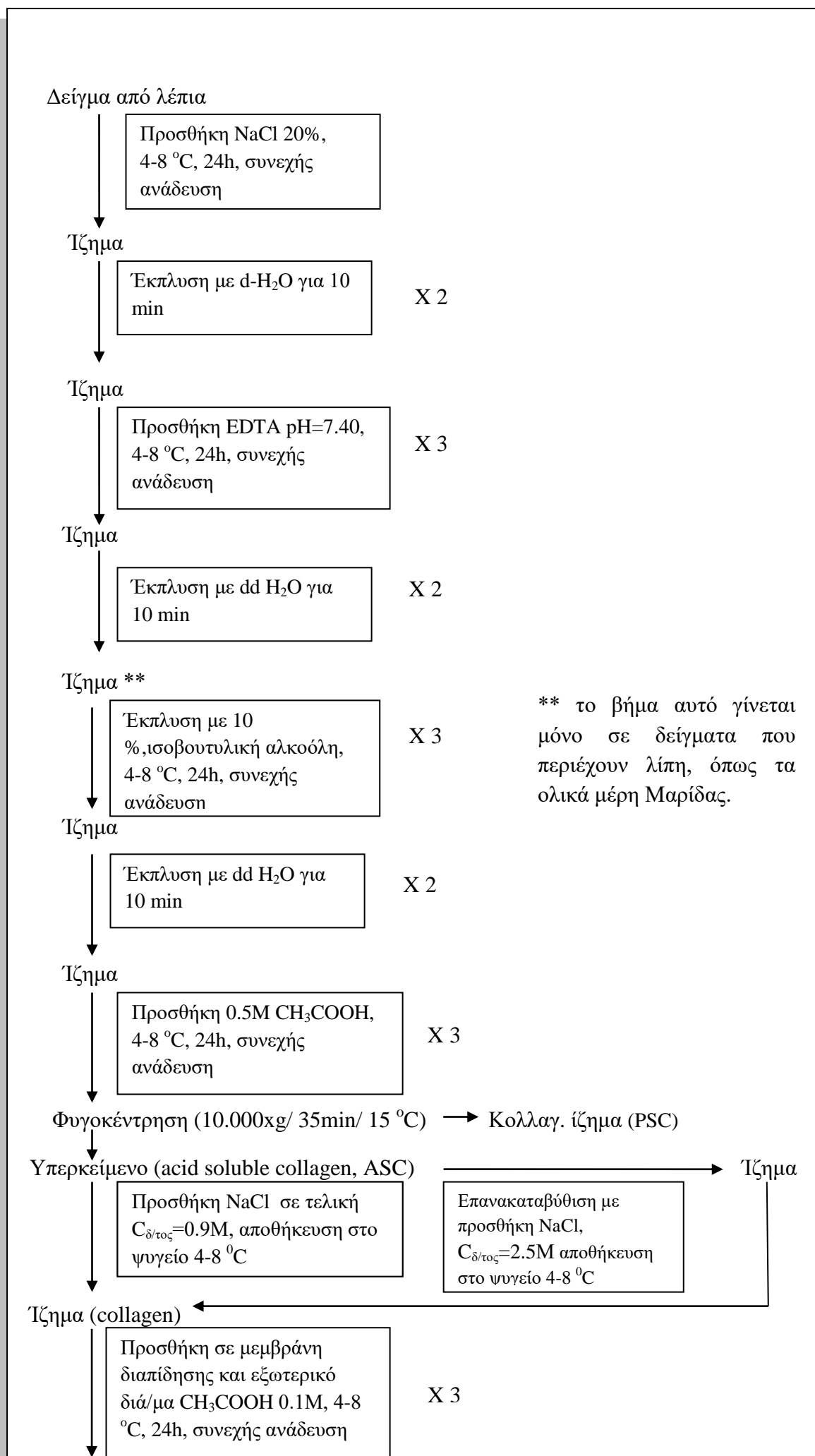
Η διαδικασία απομόνωσης του διαλυτού σε οξικό οξύ κολλαγόνου (διάγραμμα 4) έγινε συνδυάζοντας και τροποποιώντας την μεθοδολογία που αναφέρεται τις δημοσιεύσεις Wang Lin et al. **2008**; Ikoma Toshiyuki et al. **2003**; Nagai Takeshi et al. **2000**. Όλα τα στάδια απομόνωσης έλαβαν χώρα σε παγόλουτρο 4-8 °C, συγκεκριμένα, νωπή μάζα λεπιών από Τσιπούρα (43,4 g), Φαγγρί (46.7 g), Κουτσομούρα (30.3 g), Μυλοκόπι (50.8 g), Ροφό (150 g), Σολωμό (38.3 g) και Μαρίδα (1 kg) εκπλύθηκαν με νερό βρύσης για 10 min και στην συνέχεια τοποθετηθήκαν σε πλαστικά δοχεία τύπου Batch reactor με διάλυμα NaCl 20% με συνεχή ανάδευση για 24 h (εικ. 14), το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε συνολικά 4 φορές με αναλογία βιομάζα/νερό 1-3 (w/v). Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με απιονισμένο H₂O για 10 min και το βήμα αυτό επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές και στην συνέχεια έγινε προσθήκη διαλύματος EDTA (0.5 M, pH=7.40) για 24 h σε συνεχόμενη ανάδευση, το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε 3 φορές, ώστε με την απομάκρυνση αλάτων μαγνησίου και ασβεστίου να αυξηθεί η διαλυτότητα των λεπιών. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με ddH₂O για 10 min και συνεχίστηκε εκχύλιση με 0.5 M CH₃COOH για 24 h στους 4-8 °C με συνεχή ανάδευση. Το στάδιο

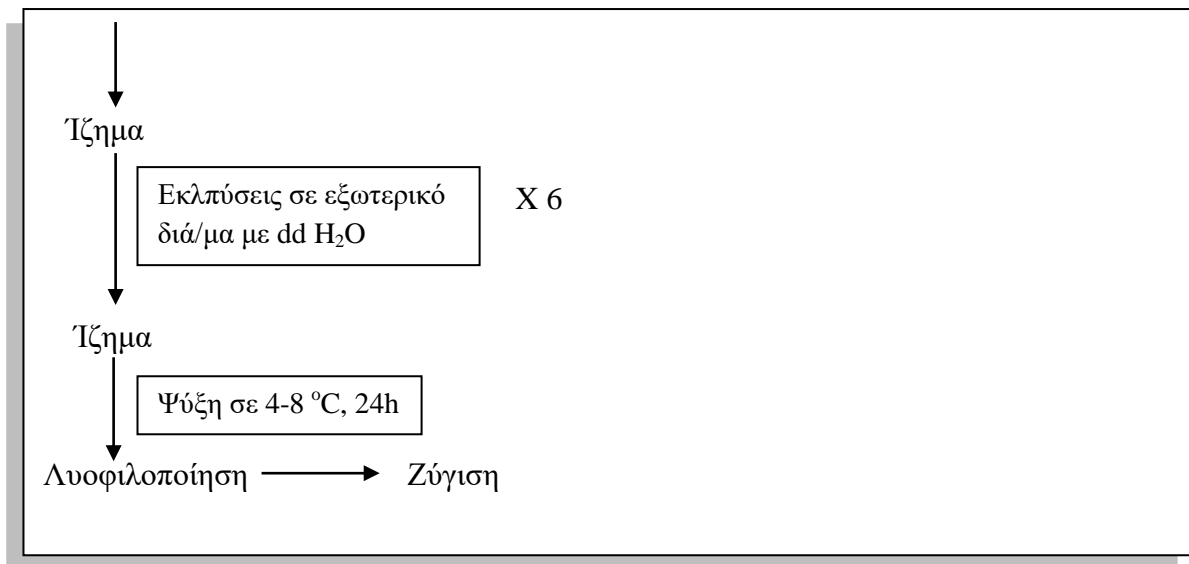
αυτό επαναλήφθηκε 3 φορές και μετά από κάθε εκχύλιση συλλέχτηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε διήθηση με χρήση φίλτρου διαπερατότητας 250 mm ώστε να γίνει ο καθαρισμός του κολλαγόνου από το οξικό οξύ σε νερό, και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και έγινε καταβύθιση με NaCl είτε 0.9 M και παραμονή στους 4 °C για 48 h. Στην περίπτωση της *S. smarís* η καταβύθιση έγινε είτε με 0.9 είτε με 2.5 M NaCl. Μετά το τέλος της καταβύθισης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 h στις 7.200 rpm. Ακολούθησε συλλογή των ιζημάτων, επαναδιάλυση σε διάλυμα 0.5 M CH₃COOH και διαπίδυση (εικ.15) ως προς διάλυμα 0.1 M CH₃COOH υπό συνεχόμενη ανάδευση, έγιναν αλλαγές διαλυμάτων 3 φορές ανά 2 h με 0.1 M CH₃COOH, στην συνέχεια με ddH₂O, 5 φορές ανά 2 h. Στο τέλος, συλλέχθηκαν τα ιζήματα και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη για 24 h και ακολούθησε η λυοφιλοποίηση των δειγμάτων.

Ως αναφορά την *S. smarís*, ακολουθήθηκε η ίδια πορεία μόνο που μετά την εκχύλιση με EDTA, έγινε έκπλυση με 10% ισοβουτυλική αλκοόλη, για 24 h σε συνεχόμενη ανάδευση για το λόγο ότι η αλκοόλη θα αφαιρέσει τις λιπαρές ουσίες και θα παραληφθεί όσο το δυνατόν καθαρότερο κολλαγόνο. Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε 3 φορές ακολούθησε έκπλυση με ddH₂O. Στην συνέχεια η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω.



Εικ.14 Εκχύλιση κολλαγόνου σε παγόλουτρο συνεχούς ροής.



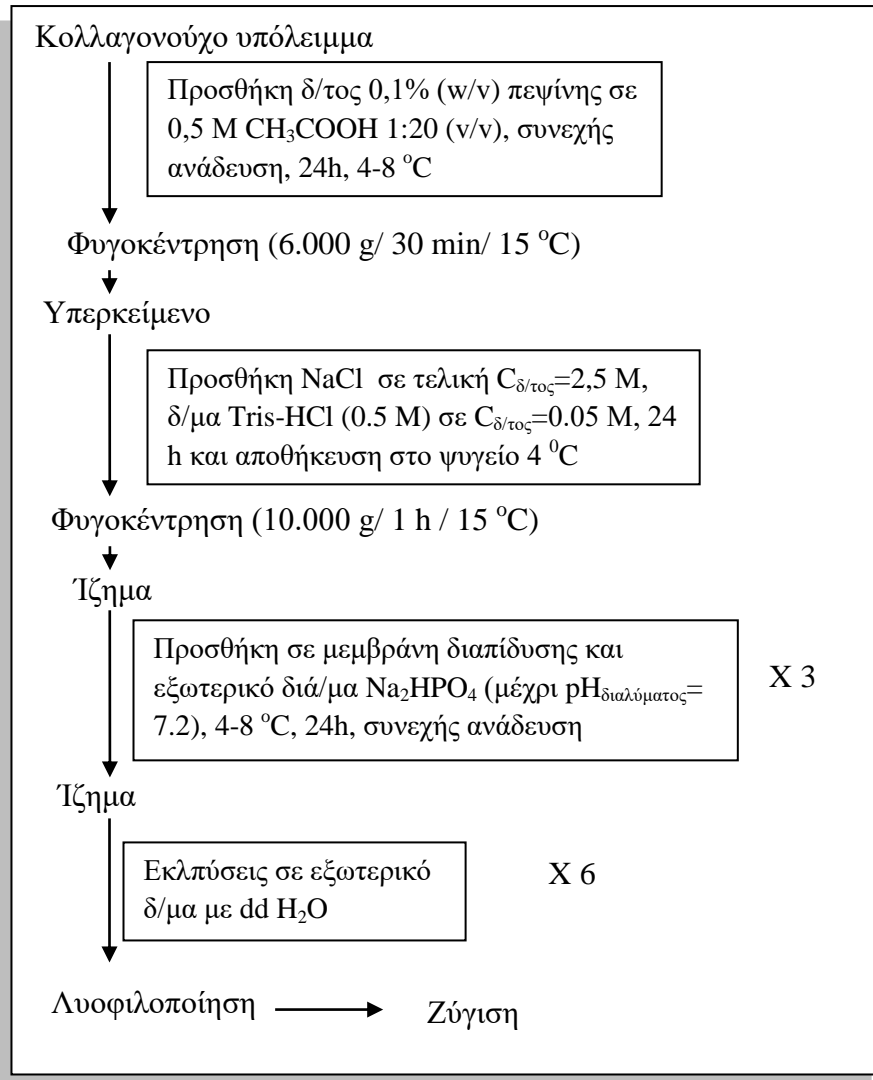


Διάγραμμα 4: Διάγραμμα ροής της απομόνωσης κολλαγόνου διαλυτού σε οξικό οξύ, (Acid Soluble Collagen, ASC).

2.4.2 Απομόνωση κολλαγόνου διαλυτού σε πεψίνη, (Pepsin Soluble Collagen, PSC)

Η διαδικασία απομόνωσης (διάγραμμα 5) του διαλυτού σε πεψίνη κολλαγόνου έγινε βάσει των δημοσιεύσεων των Rajy et al., **2019**; Hamdam F.S. et al., **2019** μετά από κάποιες τροποποιήσεις. Το υπόλειμμα που προέκυψε μετά από την παραλαβή του διαλυτού σε οξύ κολλαγόνου, χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια για την απομόνωση κολλαγόνου διαλυτού σε ένζυμα (πεψίνη). Συγκεκριμένα, στο κολλαγονούχου υπόλειμμα προστέθηκε διάλυμα 0,1% (w/v) πεψίνης σε 0.5 M οξικού οξέος σε αναλογία 1:20 (v/v) και παρέμεινε υπό μηχανική ανάδευση για 24 h στους 8 °C. Το διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο (PSC) παραλήφθηκε από το υπερκείμενο διάλυμα μετά από φυγοκέντρηση στα 6.000 x g x 30 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και προστέθηκε σε αυτό NaCl σε τελική συγκέντρωση 2.5M για την καταβύθιση του PSC και προστέθηκαν 80 mL (1:10) διάλυμα Tris-HCl (0.5 M) σε τελική συγκέντρωση 0.05 M Tris-HCl για 24 h,. Το διάλυμα παρέμεινε σε ηρεμία στους 4 °C όλο το βράδυ. Το PSC συλλέχθηκε ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση στα 10.000 x g x 1 h. Ακολούθησε συλλογή των ιζημάτων όπου και προστέθηκαν σε ημιπερατές μεμβράνες ώστε να πραγματοποιηθεί διαπίδυση σε διάλυμα Na₂HPO₄ (μέχρι pH_{διαλύματος}= 7.2) ώστε να απενεργοποιηθεί η πεψίνη, στην συνέχεια ως προς απιονισμένο νερό και

τέλος λυοφιλοποίηση. Μετά από την λυοφιλοποίηση παραλήφθηκε υψηλής καθαρότητας κολλαγόνο διαλυτό σε πεψίνη.



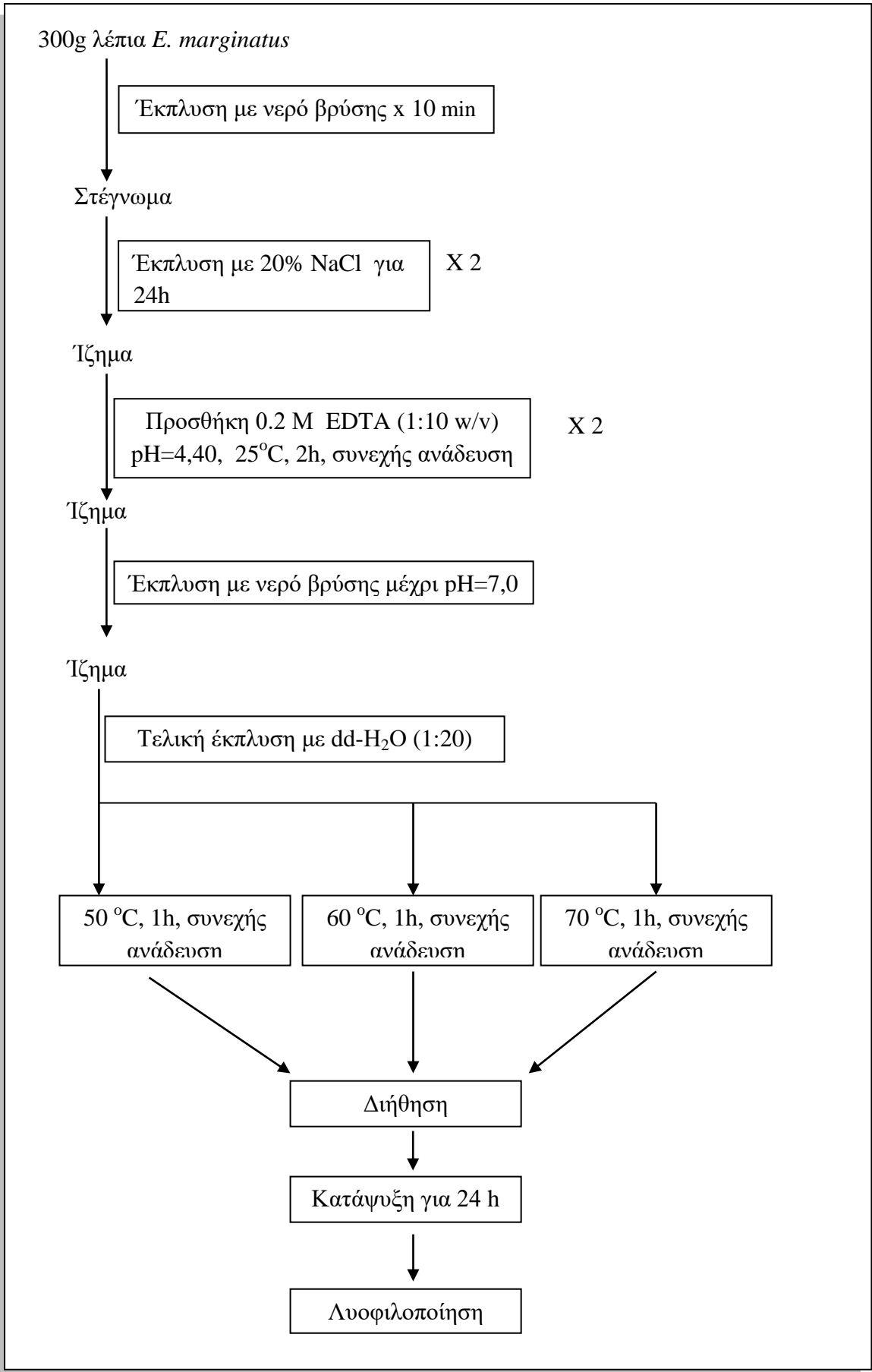
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα ροής της απομόνωσης κολλαγόνου διαλυτού σε πεψίνη, (Pepsin Soluble Collagen, PSC)



Εικόνα 15. Διαπίδυση κολλαγόνων σε παγόλουτρο συνεχής ροής.

2.5 Απομόνωση ζελατίνης

Η διαδικασία απομόνωσης της ζελατίνης (διάγραμμα 6) έγινε βάσει της δημοσίευσης των Wang Y et al., **2009**. Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε μόνο στον *E. Marginatus* (Ροφό). Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν 300 gr νωπού δείγματος από λέπια, ξεπλύθηκαν καλά σε νερό βρύσης και στεγνώθηκαν σε ένα πανί. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 20% NaCl (w/v) με αναλογία βιομάζα/νερό 1-3 (w/v) στους 25 °C, συνεχή ανάδευση για 24 h, έγιναν συνολικά 2 εκπλύσεις με αυτό το διάλυμα. Στην συνέχεια τα λέπια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0.2 M EDTA και pH= 4.40 για 2 h με συνεχόμενη ανάδευση, συνολικά έγιναν 2 επαναλήψεις. Στην συνέχεια, τα λέπια εκπλύθηκαν με νερό βρύσης έως ότου το pH=7.0 και μετά και με dd-H₂O (1:20 w/v). Συνεχίζοντας, τα λέπια χωρίστηκαν σε 3 ίσα μέρη των 100 g και στο καθένα από αυτά προστέθηκε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10 (w/v). Κάθε εναιώρημα θερμάνθηκε για 1h στους 50, 60 ή 70°C. Η ζελατίνη που παρελήφθη διαχωρίστηκε μετά από απομάκρυνση των αδιάλυτων συστατικών με διήθηση και με την χρήση φίλτρου διαπερατότητας 200 mesh. Τέλος, τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη για 24 h και ακολούθησε η λυοφιλοποίηση των δειγμάτων.



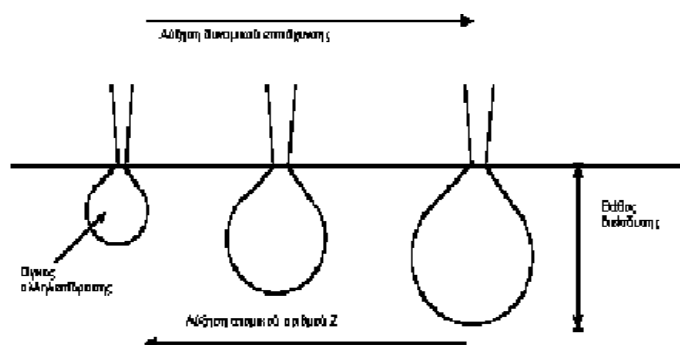
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα ροής της απομόνωση ζελατίνης από *E. marginatus*.

2.6 Μέθοδοι χαρακτηρισμού

2.6.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών.

Η βασική αρχή λειτουργίας περιλαμβάνει την ακτινοβολία του δείγματος με μια καλά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων. Η περιοχή όπου ηλεκτρονίων, μετά την επιτάχυνση σε κατάλληλη διαφορά δυναμικού αλληλεπιδρά με το στερεό (σχ. 1), εναποθέτοντας ενέργεια και παράγοντας εκείνες τις μορφές δευτερεύουσας ακτινοβολίας που μετράμε ονομάζεται *όγκος αλληλεπίδρασης*.



Σχήμα 1: Επίδραση ατομικού αριθμού και δυναμικού επιτάχυνσης στον όγκο αλληλεπίδρασης

Η διείδυση της δέσμης στο δείγμα καθορίζεται από τις παρακάτω 4 παραμέτρους και κυρίως τις δύο τελευταίες.

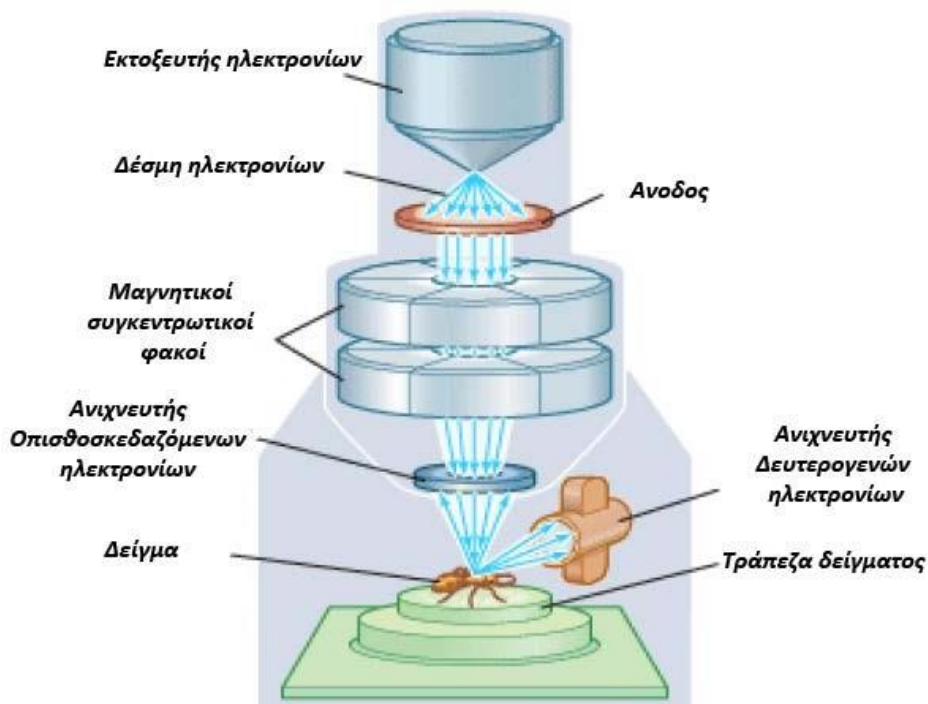
- 1) Πόσα ηλεκτρόνια έχουμε στην δέσμη (emission current)
- 2) Διάμετρο της δέσμης (spot size)
- 3) Ταχύτητα / Ενέργεια των ηλεκτρονίων (accelerating voltage)
- 4) Είδος του δείγματος (Μέσος ατομικός αριθμός του δείγματος)

Σε ένα SEM μικροσκόπιο καθώς το δείγμα σαρώνεται το παραγόμενο σήμα μετατρέπεται σε εικόνα με τη βοήθεια μίας φθορίζουσας οθόνης καθοδικού σωλήνα (cathode ray tube) καθώς αυτή σαρώνεται με τον ίδιο ρυθμό με το δείγμα. Η

μεγέθυνση ορίζεται ως το εμβαδόν της οθόνης προς το εμβαδόν της περιοχής όπου σαρώνεται. Ένα τυπικό SEM μικροσκόπιο αποτελείται από τα εξής:

1. Ένα πολυβόλο ηλεκτρονίων
2. Ένα σύστημα ανίχνευσης ηλεκτρονίων καθώς και μια μονάδα απεικόνισης
3. Ένα σύστημα κενού

Ο εκτοξευτής ηλεκτρονίων (electron gun, σχ.2) παράγει μια έντονη δέσμη ηλεκτρονίων η οποία εστιάζεται πάνω σε ένα μικρό σημείο στο εξεταζόμενο δείγμα - στόχο (target). Ένα σύστημα κενού είναι απαραίτητο προκειμένου να παραχθούν, ανιχνευτούν και να μετρηθούν τα ηλεκτρόνια. Τυπικές τιμές για το κενό είναι τα 10^{-6} mmHg. Καθώς η εξερχόμενη από τον εκτοξευτή δέσμη δεν είναι παράλληλη ένα μαγνητικό πεδίο αναλαμβάνει να εστιάσει τη δέσμη αυτή ακριβώς πάνω στο τελικό διάφραγμα. Το μαγνητικό πεδίο χαρακτηρίζεται από κυλινδρική συμμετρία και δημιουργείται από δύο κατάλληλα διατεταγμένα ζεύγη μαγνητικών πόλων. Τότε έχουμε έναν φακό συμπίκνωσης (condensation lens). Καθώς τα ηλεκτρόνια της δέσμης διέρχονται από το μαγνητικό φακό αναγκάζονται να διαγράψουν ελικοειδή τροχιά.



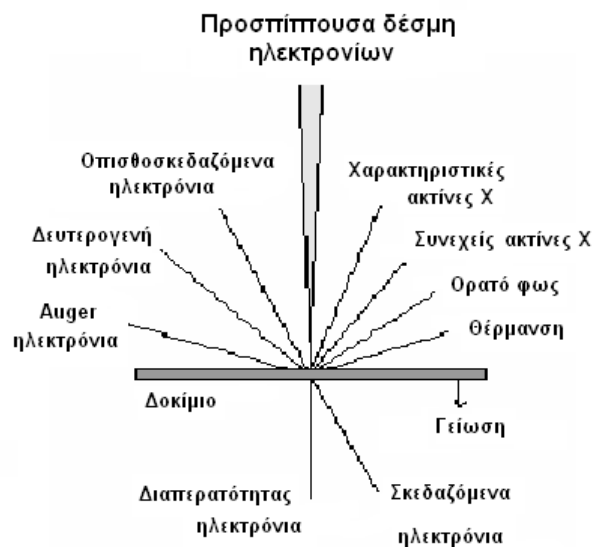
Σχήμα 2: Διάταξη ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Η μονάδα ανίχνευσης μετράει τον αριθμό των ηλεκτρονίων τα οποία προσπίπτουν σε αυτή και έχει τέτοια θέση έτσι ώστε μόνο ηλεκτρόνια από το δείγμα να ανιχνεύονται. Επιπλέον, η ποιότητα της τελικής εικόνας εξαρτάται και από τον ανιχνευτή κατά τους εξής τρόπους (Stokes et al., 2008):

- Την ευαισθησία του (υψηλότερη τόσο το καλύτερο).
- Το επίπεδο θορύβου του (είναι επιθυμητό να βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα).

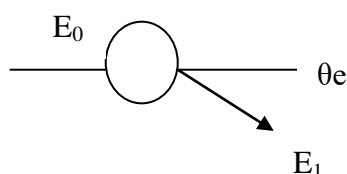
Οι αλληλεπιδράσεις (σχ. 3) που συμβαίνουν ανάμεσα στο δείγμα και τα ηλεκτρόνια της δέσμης παρουσιάζονται στο σχήμα 2 και περιλαμβάνουν:

1. Φόρτιση (Charging): Συσσώρευση φορτίου ηλεκτρονίων στο δείγμα (Για να μην συμβαίνει αυτό το δείγμα θα πρέπει να είναι αγώγιμο και συνδεδεμένο με γείωση ή να χρησιμοποιείται χαμηλό δυναμικό επιτάχυνσης).

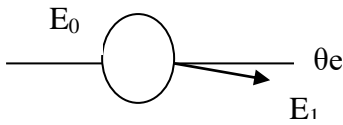


Σχήμα 3: Φαινόμενα αλληλεπίδρασης δέσμης - δείγματος

2. Ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων, μεγαλύτερη γωνία, μικρότερη απώλεια ενέργειας.



3. Μη ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων, μικρότερη γωνία, μεγαλύτερη απώλεια ενέργειας.



4. Θέρμανση του δείγματος.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλα τα πεδία που μας ενδιαφέρει η γεωμετρία και η σύσταση της μικροδομής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων όπως, βιολογικά υλικά, φιλμ, μεμβράνες, φίλτρα, ίνες, ρητίνες, τέφρες, τσιμέντα, χρώματα, μεταλλικές επιφάνειες, κλπ. Η μεγάλη δυνατότητα εστίασης και αλλαγής μεγέθυνσης σε ένα ευρύ πεδίο, η ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος και τα τρισδιάστατα διαγράμματα που μας προσφέρει το SEM το καθιστούν σημαντικό όργανο έρευνας (Stokes et al., **2008**).

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης παίρνουμε ποσοτικές αναλύσεις με γεωμετρικές λεπτομέρειες και έχουμε τη δυνατότητα να ξεχωρίζουμε φάσεις. Ο συνδυασμός του SEM με το XRD χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση σε ελατές και εύθραυστες φάσεις, για το βάθος των ρηγμάτων, το μέγεθος της ζώνης στη σχισμή, και τον τρόπο δημιουργίας ρωγμών με σκοπό να καθοριστεί ένα ποσοτικό μοντέλο σκληρότητας της δομής. Η διάβρωση και επικάλυψη επιφανειών μελετώνται επίσης με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, χρησιμοποιώντας όλα τα πλεονεκτήματα του για τον χαρακτηρισμό των τύπων της διάβρωσης και της επικάλυψης και τη κινητική μελέτη των διεργασιών. Οι δομές των προστατευτικών επικαλυπτικών και η αποτελεσματικότητά τους ελέγχονται με τις εικόνες του SEM (Stokes et al., **2008**).

2.6.2 Φασματοφωτομετρία UV-Vis

Η φασματοσκοπία ασχολείται με τον προσδιορισμό της συχνότητας ή του μήκους κύματος της απορροφημένης ή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας καθώς και με τον καθορισμό των σχέσεων και των νόμων που διέπουν τις μεταβολές αυτές.

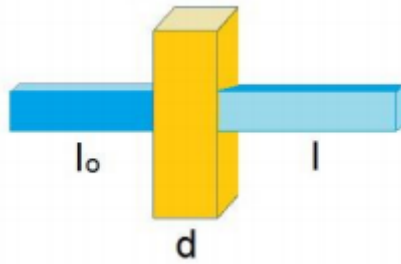
Η φασματοφωτομετρία είναι ένα τμήμα της φασματοσκοπίας, που μελετά τις ποσοτικές σχέσεις που διέπουν την ένταση της απορροφημένης (ή εκπεμπόμενης) ακτινοβολίας και τους νόμους της απορρόφησης του φωτός.

Στην πράξη το φως που χρησιμοποιείται στο φασματοφωτόμετρο επιλέγεται να είναι συγκεκριμένου μήκους κύματος λ . Όπως ήδη γνωρίζουμε, το ορατό φως αποτελεί τμήμα ενός μεγάλου αριθμού ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών που καλύπτουν ένα πολύ μεγάλο φάσμα μηκών κύματος. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται στα βιοϊατρικά εργαστήρια, μπορεί να διακριθεί σε δύο περιοχές (Burgoss C. et al., 1984):

1. στην υπεριώδη περιοχή (ultraviolet ή UV) που είναι αόρατη στον οφθαλμό, με μήκος κύματος 185 -380 nm,
2. στην ορατή περιοχή (visible ή Vis) που είναι ορατή στον οφθαλμό, με μήκος κύματος ακτινοβολίας 380 - 780 nm.

Ο νόμος Lambert – Beer

Οι Lambert & Beer μελετώντας μονοχρωματικές ακτινοβολίες κατέληξαν στον παρακάτω νόμο (γνωστός και ως νόμος Beer-Lambert), που αποτελεί την αρχή της φασματοφωτομετρίας (Bender W. et al., 2011):



Σχήμα 4: Αναπαράσταση της απορρόφησης του φωτός σε κυψελίδα με έγχρωμο διάλυμα.

Η απορρόφηση (A) για σταθερό πάχος στοιβάδας (d) και ορισμένο μήκος κύματος φωτός είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος (C) της ουσίας που απορροφά (σχ. 4). Συνεπώς:

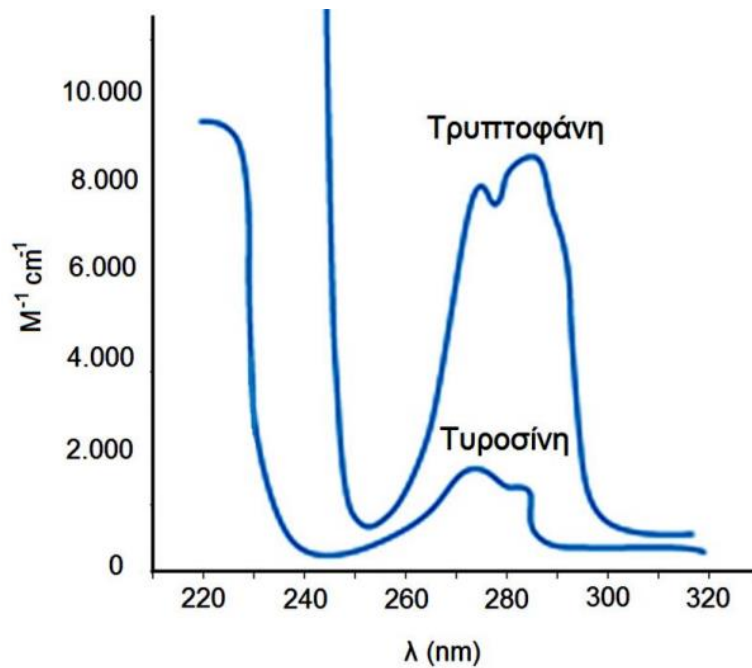
$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \varepsilon \cdot d \cdot C$$

Η διαπερατότητα (T) εκφράζεται σε % (Αν $T = 0\%$ τότε $A = \infty$ και αν $T = 100\%$ τότε $A = 0$). Η απεικόνιση της απορρόφησης (A) σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (λ) καλείται φάσμα απορρόφησης.

Οι προϋποθέσεις ισχύος του νόμου Lambert-Beer

Γενικά θα πρέπει:

- τα διαλύματα να μην είναι πυκνά ($0,1 < A < 1$),
- η ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική,
- η κυψελίδα να έχει ομοιόμορφη διατομή,
- τα μόρια της διαλυμένης ουσίας να μην αντιδρούν μεταξύ τους,
- η μέτρηση να γίνεται στο λ_{\max} (το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, χαρακτηριστικό για κάθε ένωση).



Σχήμα 5: Τυπικό φάσμα στο UV – Vis.

Το φάσμα της μετρούμενης ουσίας δίνεται συνήθως ως διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος, όπως φαίνεται στο σχήμα 5. Στο σχήμα παρατηρούμε δύο αμινοξέα την τρυπτοφάνη και την τυροσίνη τα οποία είναι χρωμοφόρα και αποδίδουν απορροφήσεις σε $\lambda=270-280$ nm.

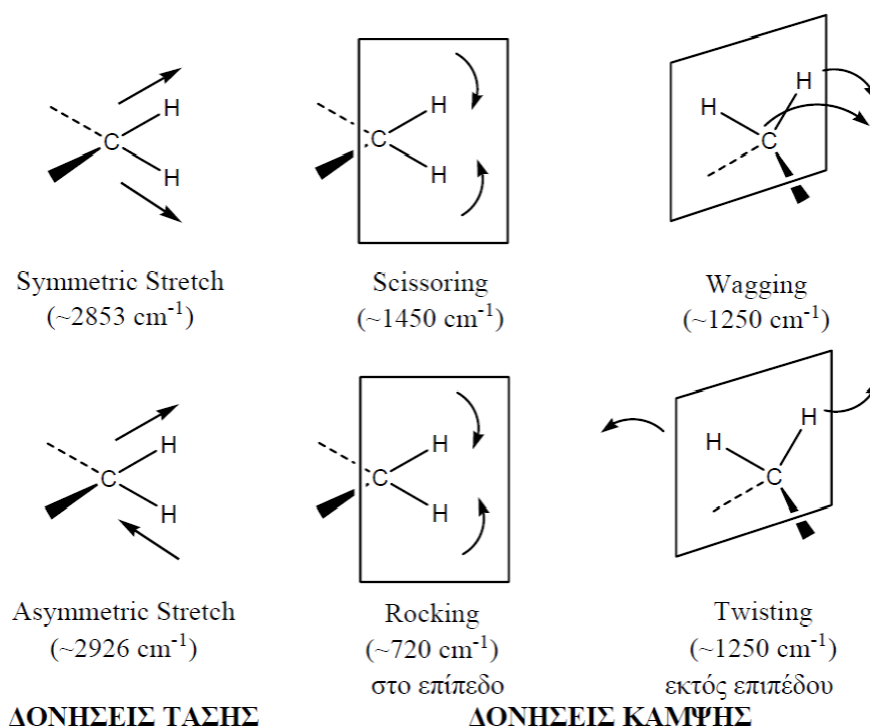
Η διαδικασία της Φωτομέτρησης

Γενικά πρέπει να ισχύουν τα παρακάτω:

- το διάλυμα που θα φωτομετρηθεί θα πρέπει να είναι σε ισορροπία.
- ο μηδενισμός του φωτόμετρου πραγματοποιείται με το τυφλό (blank) διάλυμα το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια και έχει υποστεί την ίδια διαδικασία με το προς μέτρηση διάλυμα, δεν περιέχει όμως την ένωση που θέλουμε να προσδιορίσουμε.
- οι κυψελίδες που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι ίδιες και καθαρές και κατάλληλες για το μήκος κύματος της μέτρησης (π.χ. στο υπεριώδες χρησιμοποιούνται κυψελίδες χαλαζία).

2.6.3 Φασματοσκοπία υπερόθρου (IR)

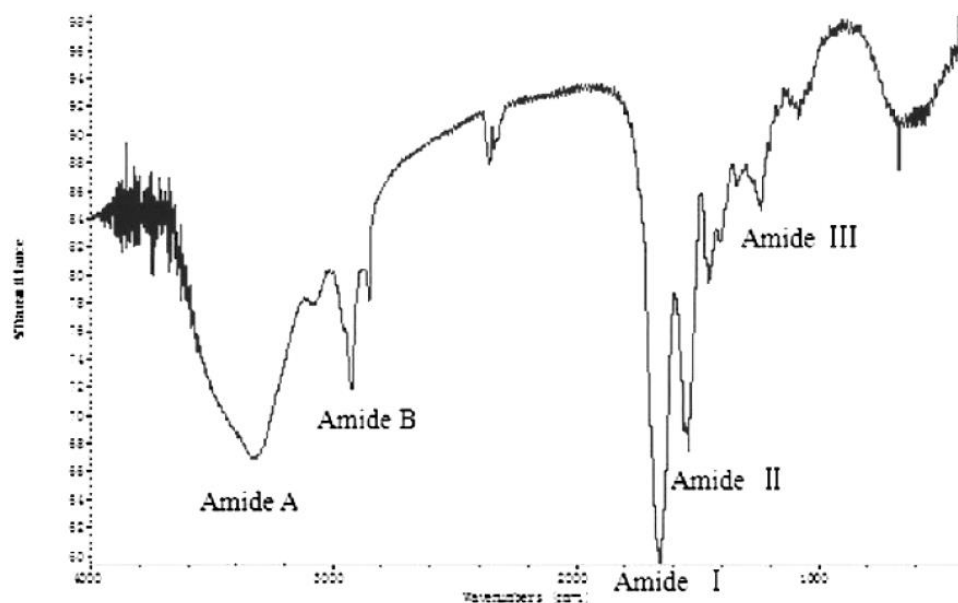
Η φασματοσκοπία υπερόθρου (Infra-Red, IR) στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με το υπερόθρο φως. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί αλλαγές στη διπολική ροπή του υπό μελέτη μορίου, δημιουργώντας δονήσεις σε ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, οι δονήσεις οφείλονται σε τάση ή κάμψη των δεσμών των μορίων (εικ. 16) και ως αποτέλεσμα τους παρατηρούνται ισχυρές απορροφήσεις στην περιοχή υπερόθρου, οι οποίες μπορούν να μας δώσουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ταυτότητα του δείγματος. Συνήθως μετράται η απορρόφηση της υπερόθρης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με τη συχνότητα της σύμφωνα με το νόμο των Beer-Lambert.



Εικόνα 16. Δονήσεις τάσης και κάμψης των μοριακών δομών και οι περιοχές απορρόφησης στην περιοχή υπερόθρου

Η φασματοσκοπία υπερόθρου χρησιμοποιείται για την μελέτη της δευτεροταγούς δομής του κολλαγόνου. Γνωρίζοντας τα βασικά χαρακτηριστικά της δομής του κολλαγόνου, υπάρχουν κάποιες χαρακτηριστικές απορροφήσεις στο φάσμα IR όπου είναι δυνατόν να διαπιστωθεί η καθαρότητα του, αλλά και τυχόν μετουσιώσεις που

μπορεί να προέκυψαν στο δείγμα. Αυτές οι απορροφήσεις, οι οποίες οφείλονται σε δονήσεις τάσης και κάμψης συγκεκριμένων δεσμών, είναι γνωστές ως απορροφήσεις A, B, I, II και III των αμιδίων (εικ. 17).



Εικόνα 17: Φάσμα IR από κολλαγόνο, όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις A, B, I, II και III των αμιδίων

Πίνακας 10: Απορροφήσεις αμιδίων και είδος δόνησης για κολλαγόνο από διαφορετικές πηγές.

Περιοχή	Απορροφήσεις (cm ⁻¹)			Είδος δόνησης
	Κολλαγόνο από δέρμα	Κολλαγόνο από λέπια	Κολλαγόνο από βοοειδή	
Αμίδιο A	3425	3296	3300	Δόνηση N-H συζευγμένη με δεσμό υδρογόνου
Αμίδιο B	2935	2926	2926	Ασύμμετρη δόνηση C-H
Αμίδιο I	1658	1653	1654	Δόνηση C=O συζευγμένη

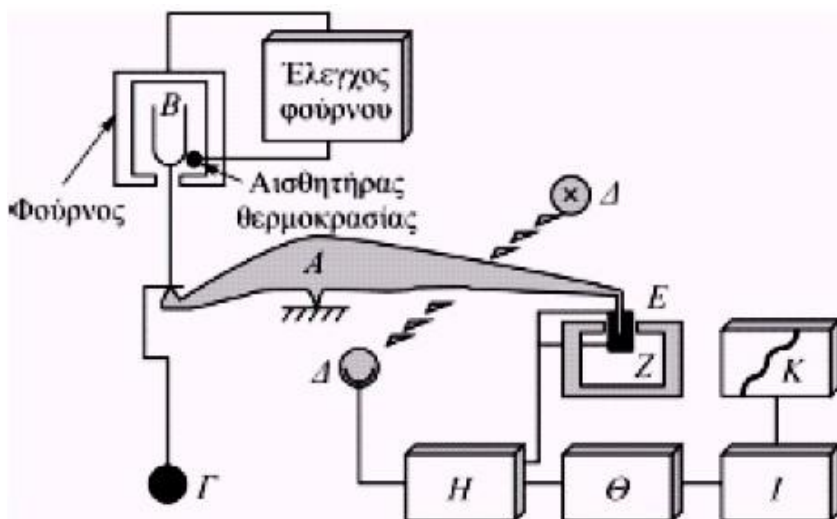
				με COOH
Αμίδιο II	1552	1541	1541	Κάμψη N-H συζευγμένη με δόνηση C-N
-	1454	1454	1456	Κάμψη C-H
-	1406	1406	1400	Συμμετρική δόνηση COO-
-	1338	1338	1338	Παλλόμενη δόνηση C-H
Αμίδιο III	1240	1242	1240	Κάμψη N-H συζευγμένη με δόνηση C-N
-	1083	1080	1082	Δόνηση C-O
-	568	660	702	Σκελετική δόνηση

Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις A, B, I, II και III των αμιδίων, όπως αυτές προέκυψαν από μετρήσεις δειγμάτων κολλαγόνου δέρματος, κολλαγόνου από λέπια και κολλαγόνου από βοοειδή. Επίσης, δίνονται πληροφορίες για το είδος της δόνησης στην οποία οφείλεται η συγκεκριμένη απορρόφηση. Συγκεκριμένα, η χαρακτηριστική απορρόφηση A των αμιδίων (Amide A), η οποία οφείλεται στην δόνηση του δεσμού N-H, εμφανίζεται συνήθως στα 3300 cm^{-1} . Η απορρόφηση αυτή συχνά εμφανίζεται ενισχυμένη λόγω της μεγάλης απορρόφησης στα 3400 cm^{-1} που πιθανόν οφείλεται σε δεσμούς υδρογόνου. Η απορρόφηση B των αμιδίων (Amide B), η οποία οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού C-H, εμφανίζεται συνήθως στα 2930 cm^{-1} . Η χαρακτηριστική απορρόφηση I των αμιδίων (Amide I), η οποία οφείλεται στην δόνηση του δεσμού C=O, εμφανίζεται περίπου στα 1650 cm^{-1} . Αυτή είναι μία περιοχή που επηρεάζεται εύκολα από μεταβολές της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης και χρησιμοποιείται σε τέτοιες περιπτώσεις ανάλυσης. Η ζώνη

απορρόφησης με τη διπλή κορυφή στα 1530 cm^{-1} περίπου εμφανίζεται λόγω κάμψης του δεσμού N-H συζευγμένης με δόνηση του δεσμού C-N και είναι γνωστή ως απορρόφηση II των αμιδίων (Amide II). Η ζώνη απορρόφησης III των αμιδίων (Amide III) εμφανίζεται στα 1240 cm^{-1} και πρόκειται για μια όχι και τόσο ευδιάκριτη ταινία απορρόφησης, η οποία οφείλεται στους δεσμούς N-H και C-N και συχνά μετατοπίζεται λόγω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων στο μόριο του κολλαγόνου, αλλά και από δονήσεις που προκύπτουν από μεθυλένια που βρίσκονται στις πλευρικές αλυσίδες. Η ένταση της ζώνης απορρόφησης στα 1230 cm^{-1} θα μπορούσε να προκύπτει και από θειικά και έτσι συχνά υποδεικνύεται η παρουσία θειικών υδατανθράκων. Μία επιπλέον απορρόφηση στα 1050 cm^{-1} πιθανόν να αντιστοιχεί σε σάκχαρα με αιθερικούς δεσμούς (Garrone et al., 1975).

2.6.4 Θερμοβαρυστρική ανάλυση – TGA

Η θερμοβαρυστρική ανάλυση (TGA - Thermogravimetric Analysis) είναι μια τεχνική κατά την οποία η μάζα του δείγματος μετριέται σαν ιδιότητα της θερμοκρασίας (ή του χρόνου) καθώς το δείγμα θερμαίνεται ή ψύχεται με σταθερό ρυθμό (δυναμικά). Το μέγεθος του δείγματος είναι μικρό για να αποφευχθούν σφάλματα λόγω θερμικών συνιστωσών. Οι μετρήσεις θερμοβαρυστρίας εκτελούνται με τη βοήθεια μικροζυγού ακριβείας (σχ. 6), σε κλίβανο όπου η θερμοκρασία μπορεί να προγραμματιστεί και να ελεγχθεί απόλυτα. Η θερμοκρασία του δείγματος μετριέται και καταγράφεται με ακρίβεια. Η ατμόσφαιρα στην οποία γίνεται η μέτρηση μπορεί να επιλεγεί και να ελεγχθεί. Οι τεχνικές TG δίνουν πληροφορίες για την αρχική και την τελική θερμοκρασία αντίδρασης καθώς και ποσοτική ανάλυση της διαφοράς βάρους. Το διάγραμμα της μάζας ή του ποσοστού απώλειας μάζας ως συνάρτηση του χρόνου ονομάζεται θερμογράφημα ή καμπύλη θερμοκικής διάσπασης (Hatakeyyama et al., 1998).



Σχήμα 6: Τμήματα ενός θερμικού ζυγού Α) βραχίονας, Β) δοχείο δείγματος και υποδοχέας, Γ) αντισταθμιστικό βάρος, Δ) λυχνία και φωτοδιόδοι, Ε) πηνίο, Ζ) μαγνήτης, Η) ενισχυτής ελέγχου, Θ) υπολογιστής απόβαρου, Ι) ενισχυτής, Κ) καταγραφικό.

Μεταβολή στη μάζα του δείγματος προκαλεί εκτροπή του βραχίονα, η οποία κινεί ένα πέτασμα φωτός μεταξύ μιας λυχνίας και μιας από τις φωτοδιόδους. Η προκαλούμενη ανισοτροπία στο ρεύμα της φωτοδιόδου ενισχύεται και τροφοδοτεί το σωληνοειδές Ε, το οποίο είναι τοποθετημένο μεταξύ των πόλων ενός μόνιμου μαγνήτη Ζ. Το μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται από το ρεύμα στο σωληνοειδές, επαναφέρει τον βραχίονα στην αρχική του θέση. Το ίδιο ρεύμα καταγράφεται και μετατρέπεται σε μάζα ή απώλεια μάζας από το σύστημα συλλογής των δεδομένων. Η γραφική παράσταση της μάζας ως προς την θερμοκρασία λαμβάνεται σε πραγματικό χρόνο. Οι περισσότεροι κλίβανοι καλύπτουν εύρος από θερμοκρασία περιβάλλοντος-έως 1500 °C. Συχνά ο ρυθμός θέρμανσης ή ψύξης του κλίβανου μπορεί να φθάσει και τους 200 °C/min. Συχνά χρησιμοποιείται άζωτο ή αργό σαν αέριο για τον καθαρισμό του κλίβανου και προστασία του δείγματος από την οξείδωση. Οι θερμοκρασίες μετρούνται συνήθως με ένα μικρό θερμοζεύγος, το οποίο τοποθετείται όσο το δυνατό πλησιέστερα στον υποδοχέα του δείγματος.

Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτη αντιδράσεων όπως αφυδρογόνωση, οξείδωση, εξάτμιση και ακόμα για υπολογισμό των θερμοκρασιών

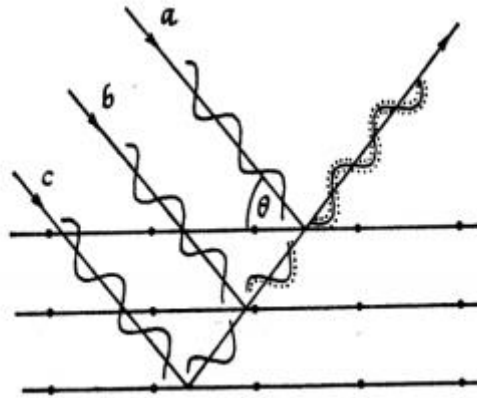
Curie τοποθετώντας τον κλίβανο σε μαγνητικό πεδίο, μία αναλυτική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει τη θερμική σταθερότητα ενός υλικού και το κλάσμα των πτητικών συστατικών του. Επίσης, γίνεται παρακολούθηση σύνθετων πολλαπλών συστημάτων, στη θερμική και οξειδωτική σταθερότητα τους, πληροφορίες στον υπολογισμό της διάρκειας ζωής ενός προϊόντος, στην κινητική αποσύνθεσης ενός προϊόντος, στην επίδραση διαβρωτικής ατμόσφαιρας στα υλικά, και στη μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία και πτητικών ουσιών ενός υλικού (T.Hatakeyyama et al., **1998**).

2.6.5 Φασματοσκοπία Περίθλασης Αχτίνων-X (XRD)

Περίθλαση ακτίνων-X – Γενικές Αρχές

Οι ακτίνες-X ανιχνεύθηκαν από τον Wilhelm Conrad Röntgen το 1895. Αποτελούν τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, διαθέτοντας υψηλή ενέργεια (10^3 - 10^5 eV) και μήκος κύματος που κυμαίνεται στην περιοχή $0,1$ - 1 \AA ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$) επικαλύπτοντας σε κάποιο βαθμό την περιοχή των ακτινών-γ.

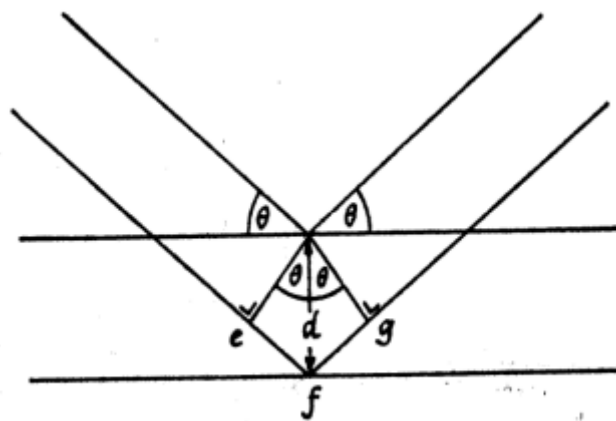
Ο William L. Bragg έδειξε ότι οι ακτίνες-X μπορούν να προσδιορίσουν δομικά στοιχεία της ύλης σε κρυσταλλική κατάσταση κατά την περίθλασή τους από αυτήν. Ερμήνευσε την περίθλαση των ακτίνων-X από έναν κρύσταλλο ως ανακλάσεις από υποθετικά επίπεδα του κρυσταλλικού πλέγματος. Σύμφωνα με αυτήν την ερμηνεία, όταν ακτίνες-X προσπίπτουν σε ένα κρυσταλλικό δείγμα, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι συναντούν τέτοια κρυσταλλικά επίπεδα υπό γωνία θ (συμπληρωματική της γωνίας πρόσπτωσης όπως ορίζεται στην ανάκλαση) και ανακλώνται υπό την ίδια γωνία (σύμφωνα με τον νόμο της ανάκλασης) από αυτά, όπως φαίνεται στο σχήμα 7.



Σχήμα 7: Ανάκλαση ακτίνων-Χ από παράλληλα επίπεδα

Εάν επικεντρωθούμε στην ανάκλαση των ακτίνων από δύο παράλληλα τέτοια επίπεδα (σχήμα 8), παρατηρούμε ότι οι ανακλώμενες ακτίνες θα βρίσκονται σε φάση θ και επομένως θα συμβάλουν ενισχυτικά) όταν η διαφορά δρόμου τους ($2d\sin\theta$) είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας ($n\lambda$, $n = 1, 2, \dots$).

Η σχέση αυτή εκφράζεται με τον νόμο του **Bragg** : $n\lambda=2d\sin\theta$, όπου: n ακέραιος αριθμός, λ το μήκος κύματος των ακτίνων-Χ, d η απόσταση μεταξύ των επιπέδων των ατόμων και θ η συμπληρωματική της γωνίας πρόσπτωσης. Αυτό μπορούμε να το δούμε και στο παρακάτω σχήμα



Σχήμα 8: Ανάκλαση ακτίνων Χ

Οι παράμετροι λοιπόν που βρίσκονται στην διάθεση ενός πειραματικού ερευνητή είναι το μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας και η γωνία θ . Ζητούμενο είναι τα διαφορετικά d . Έτσι τυπικά μπορεί κανείς να μεταβάλλει είτε το μήκος κύματος της

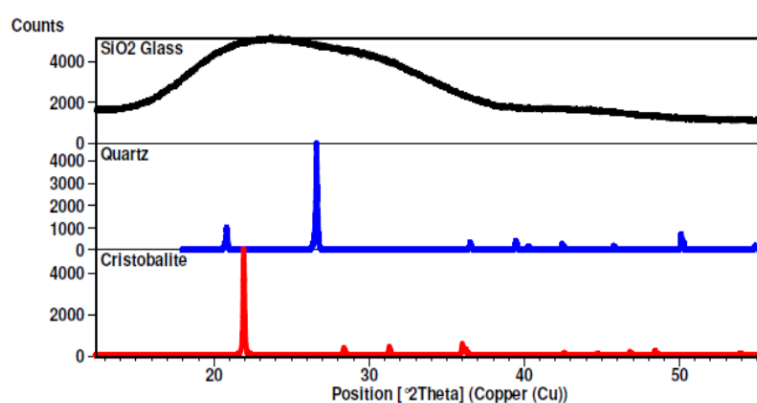
ακτινοβολίας με σταθερή γωνία είτε τη γωνία με σταθερό μήκος κύματος μέχρι να πάρει σύμφωνη σκέδαση. Έτσι είτε:

- κρατούμε σταθερό το θ και μεταβάλλουμε το λ (Μέθοδος Laue)
- κρατούμε σταθερό το λ και μεταβάλλουμε τη γωνία θ (Μέθοδοι κόνεως και περιστροφής).

Περίθλαση ακτίνων-X (XRD)

Η περίθλαση ακτίνων-X από δείγματα σε μορφή σκόνης (κόνεως), επιτρέπει τον προσδιορισμό της σύστασης του δείγματος (και υπό προϋποθέσεις ακόμα και της δομής του), το οποίο μπορεί να περιέχει περισσότερες από μία κρυσταλλικές ενώσεις. Μπορούν να μελετηθούν στερεά οιασδήποτε χημικής φύσης όπως απλές και σύνθετες χημικές ενώσεις, κράματα μετάλλων και ορυκτά, οργανικά μόρια και άλλα.

Σε ένα φάσμα περίθλασης ακτίνων-X κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια οικογένεια κρυσταλλικών επιπέδων (hkl). Για κάθε οικογένεια επιπέδων θα υπάρχει ένα μικρό ποσοστό κρυσταλλιτών οι οποίοι είναι κατάλληλα προσανατολισμένοι για να περιθλούν την προσπίπτουσα ακτινοβολία (Στεργιούδης, Γ. 2007-2008, Κανελλόπουλος Χ., 2017).



Εικόνα 18. Περιθλασιγράμματα από: Silica (SiO₂) (άμορφο κοινό γυαλί), quartz (SiO₂) (χαλαζίας, κρυσταλλικό) και κρυστοβαλίτη (κρυσταλλικό).

Το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X για κάθε κρυσταλλική φάση είναι μοναδικό, όπως ακριβώς και το δακτυλικό αποτύπωμα. Οπότε διαφορετικές φάσεις της ίδιας

χημικής σύστασης εμφανίζουν διαφορετικά διαγράμματα περίθλασης (π.χ. Silica (SiO₂) και quartz (SiO₂) βλέπε εικόνα 18).

Χρησιμοποιούμε την θέση και την σχετική ένταση μιας σειράς κορυφών έτσι ώστε να ταχτοποιήσουμε τα πειραματικά δεδομένα με αποθηκευμένα φάσματα σε μια βάση δεδομένων. Η περίθλαση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για: ποιοτική ανάλυση ποσοτική ανάλυση, ανάλυση δομής, προσδιορισμό τάσης στα μέταλλα, προσδιορισμό μεγέθους μορίων, αναγνώριση και αξιολόγηση πρώτων υλών.

Μέθοδος Σκόνης

Στη μέθοδο αυτή ο κρύσταλλος αλέθεται σε σκόνη, έτσι ώστε να αποτελείται από μικρούς (μm) κόκκους με τυχαίους προσανατολισμούς. Για δείγμα σκόνης, δεν υπάρχει ανάγκη να περιστραφεί το δείγμα, επειδή θα υπάρχουν πάντα κάποιοι κρύσταλλοι σε προσανατολισμό τέτοιο έτσι ώστε να επιτρέπεται η περίθλαση. Η μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-X προσπίπτει σε σκόνη ή πολυκρυσταλλικό δείγμα. Αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για δείγματα που δεν περιέχουν μια ενιαία κρυσταλλική μορφή. Ένας μονοκρύσταλλος δίνει οξεία κορυφή. Πολλοί μικροκρύσταλλοι δίνουν φαρδύτερη κορυφή. Από το εύρος της γραμμής υπολογίζεται το μέγεθος του κρυστάλλου μέσω της εξίσωσης Scherrer: $\tau = K \cdot \lambda / \beta \cdot \cos\theta$.

τ = διάμετρος κρυστάλλου

K = σταθερά που εξαρτάται από το σχήμα του κρυστάλλου (0.9 για σφαιρικό)

λ = μήκος κύματος ακτίνας-X

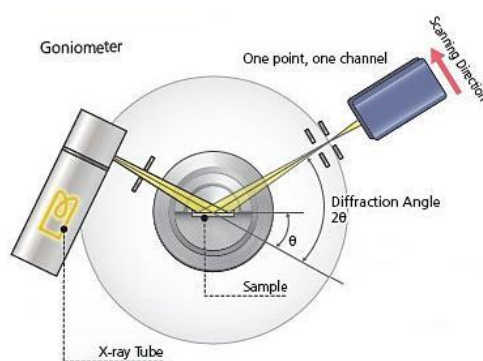
β = εύρος γραμμής FWHM (full width at half max)

θ = γωνία περίθλασης Bragg

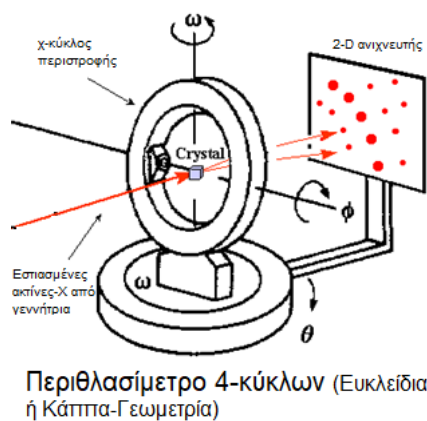
Περιθλασίμετρο ακτίνων-X

Η αρχή λειτουργίας της διάταξης ενός περιθλασιμέτρου ακτίνων-X βασίζεται στην καταγραφή των ανακλάσεων δέσμης ακτίνων-X από διάφορα πλεγματικά επίπεδα

(hkl) του δείγματος που συμβάλλουν ενισχυτικά σε συγκεκριμένες γωνίες πρόσπτωσης θ . Ένα τυπικό περιθλασίμετρο αποτελείται από τα εξής μέρη (σχ. 9 και 10): α) Πηγή ακτίνων X (περιλαμβάνει ηλεκτρικό σύστημα υψηλής τάσης και λυχνία ακτίνων-X), β) Τράπεζα δείγματος (για σκόνη, σχ. 9) ή γωνιομετρική κεφαλή (για μονοκρύσταλλο ή σκόνη σε τριχοειδή, σχ. 10) ανάλογα με την γεωμετρία του οργάνου γ) Αισθητήρα-μετρητή (συνήθως Coupled Charge Device - CCD με περιστροφή 2θ), δ) Σύστημα μετατροπής ηλεκτρικού σήματος σε ψηφιακό και συνδεδεμένο Η/Υ.



Σχήμα 9. Διάταξη περιθλασιμέτρου κόνεως (σκόνης) (XRD)



Σχήμα 10. Διάταξη περιθλασιμέτρου 4-κύκλων (Κάππα-Γεωμετρία)



Εικόνα 19. Περιθλασίμετρο ακτίνων-X D8 Venture της Bruker στο Εργαστήριο Φυσικής του ΓΠΑ



Εικόνα 20. Διάταξη του περιθλασίμετρου D8 Venture της Bruker.



Εικόνα 21. Γωνιομετρική κεφαλή στήριξης του τριχοειδούς σωλήνα που περιέχει το δείγμα.

Στο περιθλασίμετρο ακτίνων- X (εικ. 19-21), ο μετρητής-ανιχνευτής καταγράφει τις γωνίες στις οποίες τα πλεγματικά επίπεδα ανακλούν τις ακτίνες- X , καθώς και τις εντάσεις των ανακλώμενων ακτίνων- X . Ο μετρητής-ανιχνευτής σαρώνεται γύρω από το δείγμα κατά μήκος ενός νοητού κύκλου, έτσι ώστε να συλλέξει όλες τις ανακλώμενες ακτίνες- X .

Η γωνιακή θέση (2θ) και οι εντάσεις των ανακλώμενων κορυφών της ακτινοβολίας (ανακλάσεις ή peaks) παράγουν ένα περιθλασίγραμμα δύο διαστάσεων. Κάθε ανάκλαση αντιπροσωπεύει την ακτίνα- X που ανακλάστηκε από μια συγκεκριμένη οικογένεια πλεγματικών επιπέδων (hkl). Αυτό το περιθλασίγραμμα είναι το χαρακτηριστικό αποτύπωμα του αναλυμένου υλικού (Στεργιούδης, Γ. 2007-2008, Κανελλόπουλος Χ., 2017).

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δείγματα από λέπια πέντε αντιπροσωπευτικών ιχθύων της τάξης *Perciformes* (Περκόμορφα), και συγκεκριμένα από τα είδη *P. ragnus* (Φαγγρί), , *C. umbrina* (Μυλοκόπι), *M. barbatus* (Κουτσομούρα), *E. marginatus* (Ροφός) και ενός της τάξης *Salmoniformes* (Σολομόμορφα), συγκεκριμένα από το είδος *S. salar* (Σολωμός), καθώς και από ολικούς ιχθύς από το είδος *S. smaris* (Μαρίδα), χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση δύο τύπων κολλαγόνου με την εφαρμογή συνδυασμού πρωτοκόλλων και συγκεκριμένα κολλαγόνου διαλυτού σε οξύ, και διαλυτού σε πεψίνη. Επίσης απομονώθηκε ζελατίνη από λέπια *E. marginatus*. Στη συνέχεια έγινε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των διαφορετικών δειγμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και περίθλαση ακτίνων-X (XRD).

3.1 Περιεκτικότητα ιχθύων σε κολλαγόνο.

Στον πίνακα 11 παρουσιάζεται η επί τοις εκατό κατά βάρος περιεκτικότητα (% w/w) των 7 διαφορετικών ιχθύων σε κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ (ASC) και σε πεψίνη (PSC).

Πίνακας 11: Η επί τοις εκατό βάρος κατά βάρος περιεκτικότητα (% w/w) σε κολλαγόνο στους ιχθύες.

Είδη (εμπορική ονομασία)	ASC (% νωπό βαρος)	ASC (% ξηρό βάρος)	PSC (% νωπό βαρος)	PSC (% ξηρό βάρος)
<i>S. smaris</i> (Μαρίδα)	0.58	2.07	0.41	1.59
<i>S. aurata</i> (Τσιπούρα)	0.27	1.13	0.37	1.57
<i>P. pagrus</i> (Φαγγρί)	0.23	0.61	0.50	1.32
<i>P. pagrus</i> [2.5 M]	0.09	0.4	-	-
<i>M. barbatus</i> (Κουτσομούρα)	0.26	0.62	0.44	1.04
<i>C. umbrina</i> (Μυλοκόπι)	0.17	0.41	0.66	1.61
<i>S. salar</i> (Σολωμός)	0.27	0.87	0.63	2.04
<i>E. marginatus</i> (Ροφός)	0.21	0.39	0.86	1.59



Εικόνα 22. Κολλαγόνα ASC και PSC.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το είδος *S. smaris*, έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ ίση με 2.07%. Αυτό οφείλεται σίγουρα ότι τα μέρη που έγινε εκχύλιση π.χ κόκκαλα, δέρμα είναι περιοχές που είναι πλούσιες σε κολλαγόνο. Ακολουθούν τα είδη *S. aurata* με ποσοστό 1.13%, τρίτος ο *S. salmo*, με περιεκτικότητα ίση με 0.87%, *B. mullus*, με περιεκτικότητα ίση με 0.62%, και *P. pagrus*, με ποσοστό ίσο με 0.61%. Την χαμηλότερη περιεκτικότητα παρουσιάζουν τα είδη, *C. umbrina*, *E. marginatus*, με ποσοστά ίσα με 0,41% και 0.39% αντίστοιχα. Πρέπει να επισημανθεί ότι δεν δώσαμε βάση σε αποδόσεις που

οφείλονται σε καταβυθίσεις με 2.5 M NaCl π.χ. *P. Pagrus*, 2.5 M (πιν.11), για το λόγο ότι παραλάβαμε μικρή περιεκτικότητα κολλαγόνο και ακόμα πρέπει να ληφθεί υπόψη η κατανάλωση αντιδραστηρίων και το μεγάλο χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να καθαριστεί το κολλαγόνο.

Όσο αναφορά την *S. smaris*, επειδή η πρώτη ύλη ήταν όλο το σύνολο του ψαριού η απόδοση της συγκρίθηκε με διαφορετική βιβλιογραφία. Οι Sujithra S. et al., **2013**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια, δέρμα και πτερύγια (όχι κόκκαλα) *Oreochromis niloticus* με απόδοση 22,0% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Οι Vincenza Ferraro et al., **2013**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια, δέρμα και κόκκαλα ψαριού τύπου σαρδέλας και απορρίμματα υπολείμματα κονσερβοποίησης σκουμπριού με απόδοση 80,0% (ξηρό βάρος) ακολουθώντας πορεία ανάλογη με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Οι Raju Ahmed et al., **2019**, εκχύλισαν κολλαγόνο από ολικό ψάρι *Thunnus obesus* με απόδοση 13,65% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Σε σύγκριση με την βιβλιογραφία, όσο αναφορά τα δείγματα των λεπιών στην απόδοση κολλαγόνου διαλυτού σε οξύ, ASC, οι Sijin Chen et al., **2016**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Sciaenops ocellatus* με απόδοση 4.32% (ξηρό βάρος) χρησιμοποιώντας υδρόφιλη διαδικασία υπερδιήθησης που είναι πολύ πιο αποτελεσματική από την τυπική πορεία απομόνωσης κολλαγόνου. Επίσης, οι Pallabi Pal. et al., **2016**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Cirrhinus cirrhosus* με απόδοση 3,0% (ξηρό βάρος). Η πειραματική πορεία που ακολούθησαν ήταν ίδια με την δική μας και επομένως οι παρατηρούμενες διαφορές μπορεί να οφείλονται και στα διαφορετικά είδη ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν. Έπειτα οι Muthumari K. et al., **2016**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια ψαριού *Sardinella longiceps* με απόδοση 1,25% (ξηρό βάρος) οι οποίοι για απομετάλλωση χρησιμοποίησαν HCl αντί για EDTA. Συνεχίζοντας, οι Kittiphattanabawon P. et al., **2019**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια ψαριού *Oreochromis niloticus* με απόδοση 0.77% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και όλη η διαδικασία έγινε στους 10 °C. Οι Long-Yan Li et al., **2016**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Miichthys miiuy* με απόδοση 0.64% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών όπως και οι Aichayawanich S. et al., **2018**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια

Puntius orphoides με απόδοση 0.43% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και για απομετάλλωση χρησιμοποίησαν HCl αντί για EDTA και οι Chuaychan Sir. et al., **2015**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια ψαριού *Lates calcarifer* με απόδοση 0.38% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών.

Για την περιεκτικότητα του κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη υψηλότερη έχει ό *S. salmo*, με ποσοστό 2.04%. Ακολουθούν τα είδη, *C. umbrina*, με ποσοστό 1.61%, η *S. smaris*, και ο *E. marginatus*, με ποσοστό και τα δύο 1.59%, η *S. aurata*, με περιεκτικότητα ίση με 1.57%. Την χαμηλότερη περιεκτικότητα παρουσιάζουν τα είδη, *P. pagrus*, με ποσοστό 1.32% και η *B. mullus*, με ποσοστό 1.04%.

Σε σύγκριση με την βιβλιογραφία, όσο αναφορά την απόδοση κολλαγόνου διαλυτού σε πεψίνη, PSC, όσο αναφορά την *S. smaris*, επειδή η πρώτη ύλη ήταν όλο το σύνολο του ψαριού η απόδοση της συγκρίθηκε με διαφορετική βιβλιογραφία. Οι Sujithra S. et al., **2013**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια, δέρμα και πτερύγια (όχι κόκκαλα) *Oreochromis niloticus* με απόδοση 56,0% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και οι Raju Ahmed et al., **2019**, εκχύλισαν κολλαγόνο από ολικό ψάρι *Thunnus obesus* με απόδοση 23.9% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Όσο αναφορά την σύγκριση για την απόδοση στα λέπια, οι Pallabi Pal. et al., **2016**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Cirrhinus cirrhosus* με απόδοση 7,0% (ξηρό βάρος) η οποία πειραματική πορεία τους ήταν ίδια με την δική μας. Οι Raju Ahmed et al., **2019**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Thunnus obesus* με απόδοση 4.60% (ξηρό βάρος), οι Long-Yan Li et al., **2016**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Miichthys miuiy* με απόδοση 3.87% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και αναλογία δ/τος pepsin 1% w/w. Έπειτα οι Muthumari K. et al., **2016**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Sardinella longiceps* με απόδοση 3,0% (ξηρό βάρος) οι οποίοι για απομεταλλίωση χρησιμοποίησαν HCl αντί για EDTA. Συνεχίζοντας, οι Chuaychan Sir. et al., **2015**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Lates calcarifer* με απόδοση 1.06% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. οι Kittiphattanabawon P. et al., **2019**,

εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Oreochromis niloticus* με απόδοση 0.71% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και όλη η διαδικασία έγινε στους 10 °C, όπως και οι Aichayawanich S. et al., **2018**, εκχύλισαν κολλαγόνο από λέπια *Puntius orphoides* με απόδοση 0.60% (ξηρό βάρος) οι οποίοι χρησιμοποίησαν NaOH αντί NaCl για τη αφαίρεση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και για απομετάλλωση χρησιμοποίησαν HCl αντί για EDTA.

3.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, SEM

Τα απομονωμένα δείγματα κολλαγόνου διαλυτού σε οξύ και πεψίνη που προέκυψαν από τα λέπια των ψαριών που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

- *S. smarís*

Οι φωτογραφίες SEM για κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ και σε πεψίνη από ολικούς ιχθύς που ανήκουν στο είδος *S. smarís* φαίνονται στις εικόνες 23A, 23B. Όλα τα κολλαγόνα που απομονώθηκαν ήταν σαν μαλακό λευκό/γκρί σφουγγάρι με χαλαρή και πορώδη δομή που παρατηρείται και με γυμνό μάτι. Από φωτογραφίες που ελήφθησαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τόσο το ASC όσο και το PSC, φαίνονται σαν ένα ακανόνιστο πυκνό φιλμ που μοιάζει με φύλλα που συνδέονται με πλατιές γέφυρες ή νήματα σε τυχαίο προσανατολισμό. Παρατηρούνται πτυχώσεις σε μερικές επιφάνειες των φύλλων πιθανώς λόγω αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης (Hamdam P. S. et al. **2019**; Long-Yan. Li et al. **2018**).



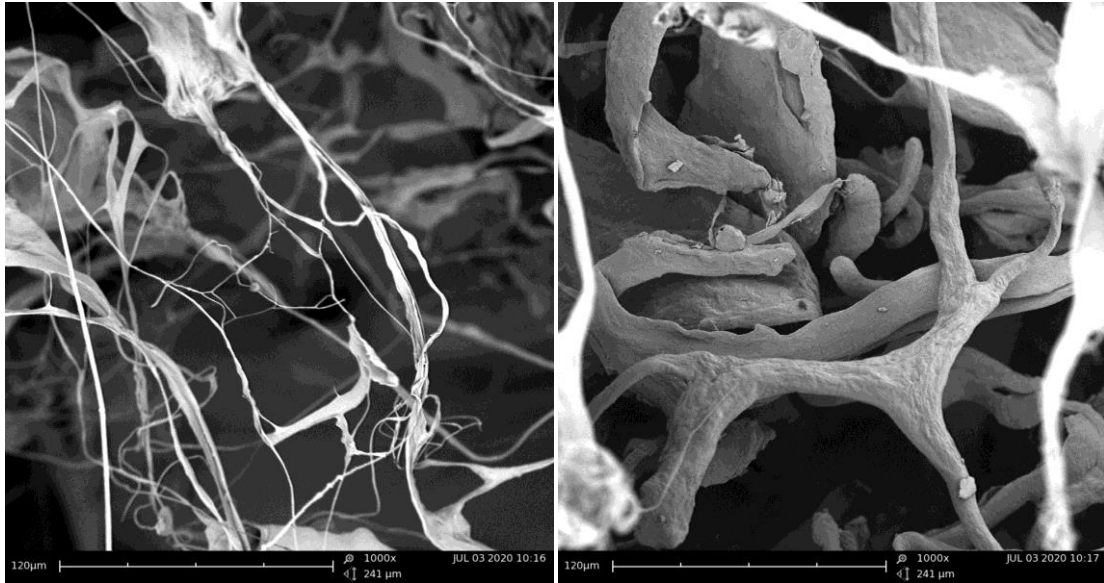
A.

B.

Εικόνες 23A, 23B. Εικόνες SEM από (A) κολλαγόνου διαλυτού σε οξύ (μεγέθυνση 1000x), (B) κολλαγόνου διαλυτού σε πεψίνη (μεγέθυνση 1000x) που απομονώθηκε από ολικούς ιχθύς που ανήκουν στο είδος *S. smarís*.

- *P. pagrus*

Οι φωτογραφίες SEM για κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ και σε πεψίνη δείγμα από λέπια που ανήκουν στο είδος *P. Pagrus* φαίνονται στις εικόνες 24A, 24B. Παρατηρούμε ότι στο ASC ένα διαμορφωμένο κολλαγόνο από ένα δίκτυο ινιδίων και νημάτων σε τυχαίους προσανατολισμούς και με διαφορετικές διαμέτρους, και στο PSC πάλι φαίνεται ένα δίκτυο διακλαδώσεων αλλά οι κλώνοι φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη διάμετρο σε σύγκριση με το ASC. Παρατηρούνται πτυχώσεις σε μερικές επιφάνειες των φύλλων πιθανώς λόγω αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης (Hamdam P. S. et al. 2019; Long-Yan. Li et al. 2018).



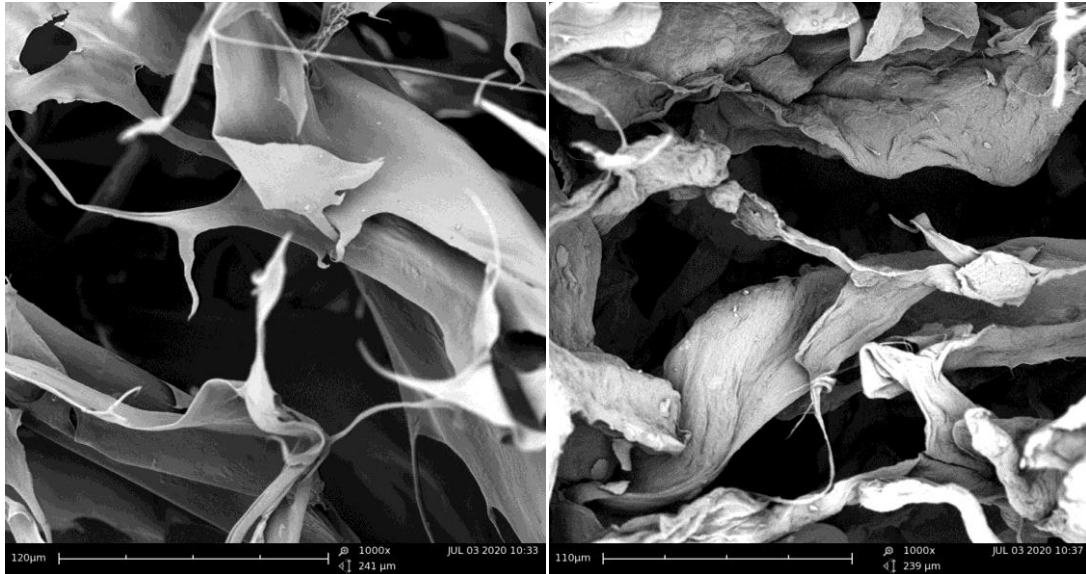
A.

B.

Εικόνες 24A, 24B: Εικόνες SEM από (A) κολλαγόνου διαλυτού σε οξύ (μεγέθυνση 1000x), (B) κολλαγόνου διαλυτού σε πεψίνη (μεγέθυνση 1000x) που απομονώθηκε από λέπια που ανήκουν στο είδος *P. ragrus*.

- *S. aurata*

Οι φωτογραφίες SEM για κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ και σε πεψίνη από λέπια που ανήκουν στο είδος *S. aurata*, φαίνονται στις εικόνες 25A, 25B και στα δύο δείγματα παρατηρούμε ένα διαμορφωμένο κολλαγόνο από επίπεδα τα οποία συνδέονται σε τυχαία σημεία με νήματα σε τυχαίους προσανατολισμούς και με διαφορετικές διαμέτρους. Στο PSC παρατηρούνται πτυχώσεις σε μερικές επιφάνειες των φύλλων περισσότερες σε σύγκριση με το ASC, πιθανώς λόγω αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης (Hamdam P. S. et al. **2019**; Long-Yan. Li et al. **2018**).



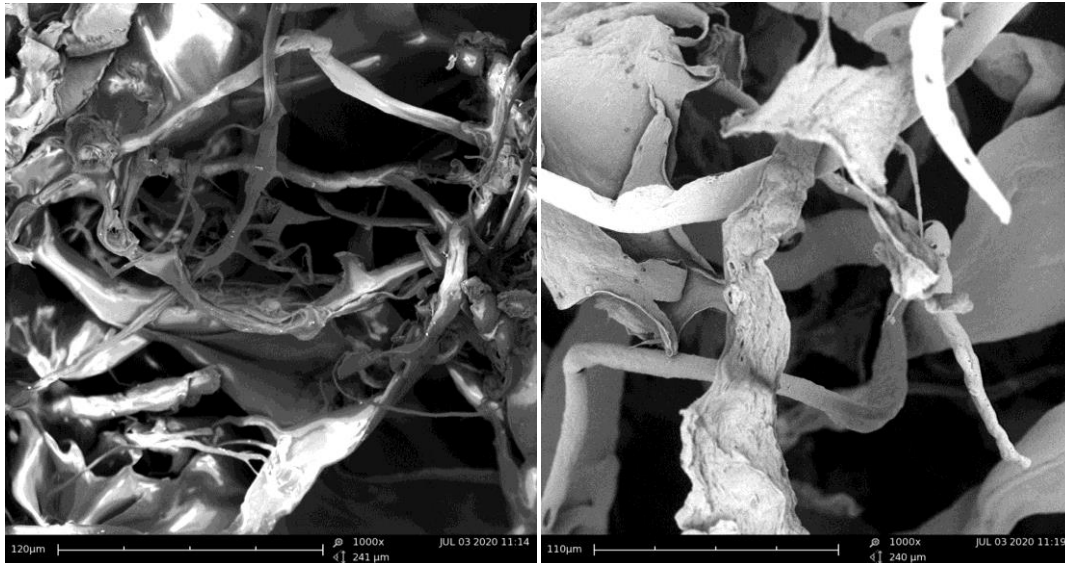
A.

B.

Εικόνες 25A, 25B. Εικόνες SEM από (A) κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ (μεγέθυνση 1000x), (B) κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη (μεγέθυνση 1000x) που απομονώθηκε από λέπια που ανήκουν στο είδος *S. aurata*.

- *U.cirrosa*

Οι φωτογραφίες SEM για κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ και σε πεψίνη δείγμα από λέπια που ανήκουν στο είδος *U.cirrosa* φαίνονται στις εικόνες 26A, 26B. Παρατηρούμε ότι και στα δύο ένα διαμορφωμένο κολλαγόνο από ένα δίκτυο ιών και νημάτων σε τυχαίους προσανατολισμούς, στο PSC παρατηρούνται πλατιές γέφυρες δημιουργώντας διασταυρώσεις ενώνοντας έτσι φύλλα στρωμάτων κολλαγόνου σε διαφορετικές διαμέτρους και στα δύο παρατηρούνται πτυχώσεις σε μερικές επιφάνειες των φύλλων, στο PSC περισσότερο σε σύγκριση με το ASC πιθανώς λόγω αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης (Hamdam P. S. et al. **2019**; Long-Yan. Li et al. **2018**).



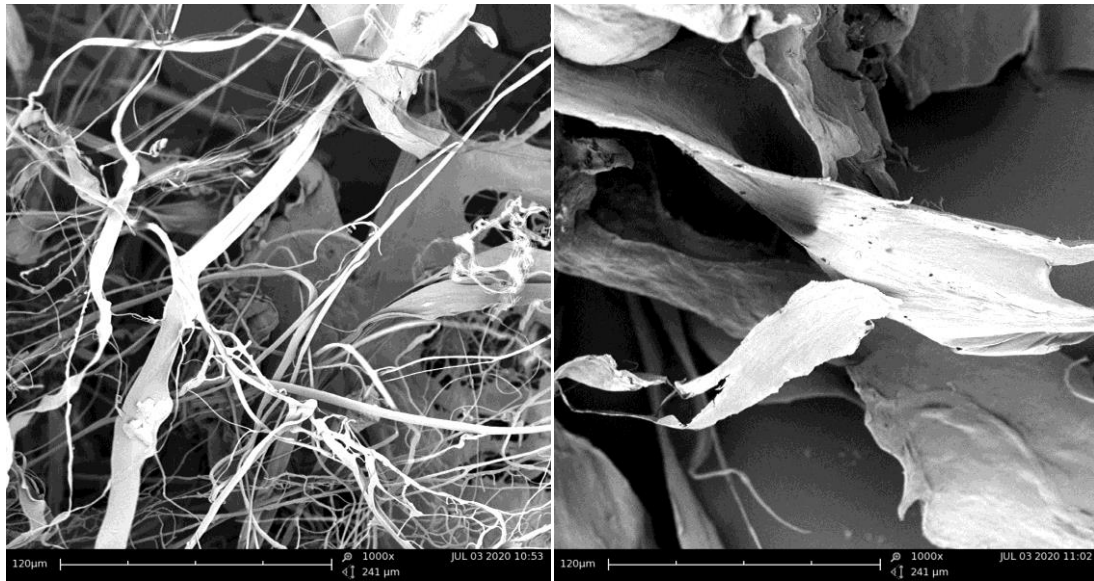
A.

B.

Εικόνες 26A, 26B. Εικόνες SEM από (A) κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ (μεγέθυνση 1000x), (B) κολλαγόνο διαλυτό σε πεψίνη (μεγέθυνση 1000x) που απομονώθηκε από λέπια που ανήκουν στο είδος *U. cirrosa*.

- *B. mullus*

Οι φωτογραφίες SEM για κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ και σε πεψίνη δείγμα από λέπια που ανήκουν στο είδος *B. Mullus* φαίνονται στις εικόνες 27A, 27B. Παρατηρούμε ότι το ASC κολλαγόνο είναι διαμορφωμένο από ένα δίκτυο ινιδίων και νημάτων σε τυχαίους προσανατολισμούς, στο PSC παρατηρείται μια μαζική και πορώδη φύση επιπέδων. Μόνο στο PSC παρατηρούνται τσαλακώματα σε μερικές επιφάνειες των επιπέδων, πιθανώς λόγω αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης (Hamdam P. S. et al. **2019**; Long-Yan. Li et al. **2018**).



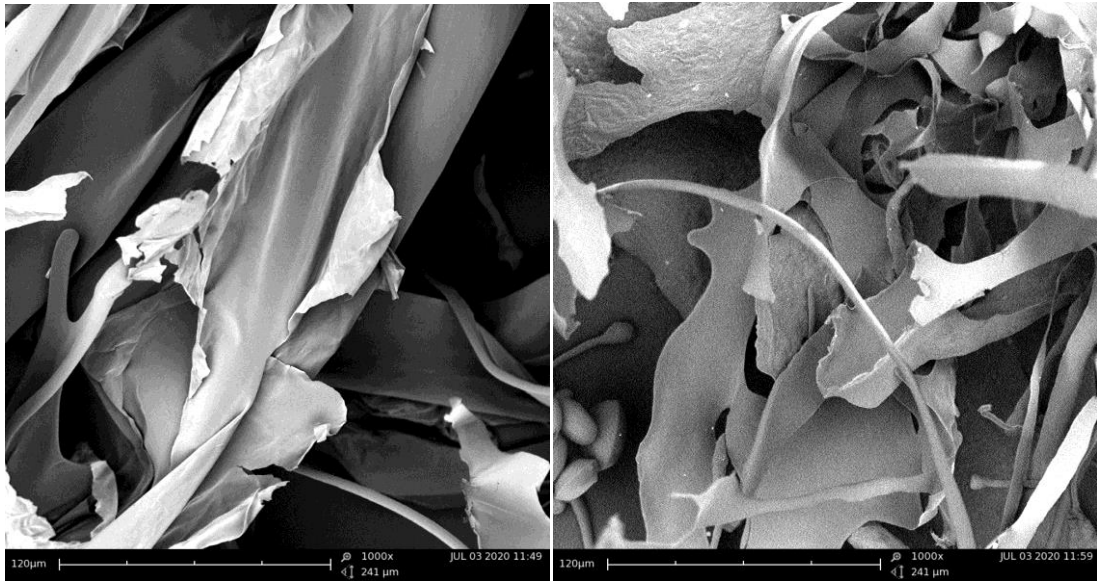
A.

B.

Εικόνες 27A, 27B. Εικόνες SEM από δείγμα (A) κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ (μεγέθυνση 1000x), (B) κολλαγόνο διαλυτό σε πεψίνη (μεγέθυνση 1000x) που απομονώθηκε από λέπια που ανήκουν στο είδος *B. mullus*.

- *S. salmo*

Οι φωτογραφίες SEM για κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ και σε πεψίνη δείγμα από λέπια που ανήκουν στο είδος *S. salmo* φαίνονται στις εικόνες 28A, 28B και στα δύο δείγματα παρατηρούμε μία μαζική πορώδη φύση, διαμορφωμένη από επίπεδα στρωμάτων κολλαγόνου, στρώματα τα οποία μοιάζουν με κομμάτια από σπασμένη λεπίδα. Παρατηρούνται πτυχώσεις και στα δύο σε μερικά σημεία των φύλλων, πιθανώς λόγω αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης (Hamdam P. S. et al. 2019; Long-Yan. Li et al. 2018).



A.

B.

Εικόνες 28A, 28B. Εικόνες SEM από (A) κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ (μεγέθυνση 1000x), (B) κολλαγόνο διαλυτό σε πεψίνη (μεγέθυνση 1000x) που απομονώθηκε από λέπια που ανήκουν στο είδος *S. salmo*.

- *E. marginatus*

Οι φωτογραφίες SEM για κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ και σε πεψίνη δείγμα από λέπια που ανήκουν στο είδος *E. Marginatus* φαίνονται στις εικόνες 29A, 29B και στα δύο παρατηρούμε ένα διαμορφωμένο κολλαγόνο από ένα δίκτυο ινών και νημάτων σε τυχαίους προσανατολισμούς, στο PSC παρατηρούνται πλατιές γέφυρες δημιουργώντας διασταυρώσεις ενώνοντας έτσι φύλλα στρωμάτων κολλαγόνου σε διαφορετικές διαμέτρους και στα δύο παρατηρούνται πτυχώσεις σε μερικές επιφάνειες των φύλλων, στο PSC περισσότερο σε σύγκριση με το ASC πιθανώς λόγω αφυδάτωσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης (Hamdam P. S. et al. **2019**; Long-Yan. Li et al. **2018**).



A.

B.

Εικόνες 29A, 29B. Εικόνες SEM από δείγμα (A) κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ (μεγέθυνση 1000x), (B) κολλαγόνο διαλυτό σε πεψίνη (μεγέθυνση 1000x) που απομονώθηκε από λέπια που ανήκουν στο είδος *E. marginatus*.

3.3 Χαρακτηρισμός κολλαγόνου με φασματοσκοπία υπερώθρου (IR)

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό με φασματοσκοπία IR είχαν προηγουμένως λυοφιλοποιηθεί, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία.

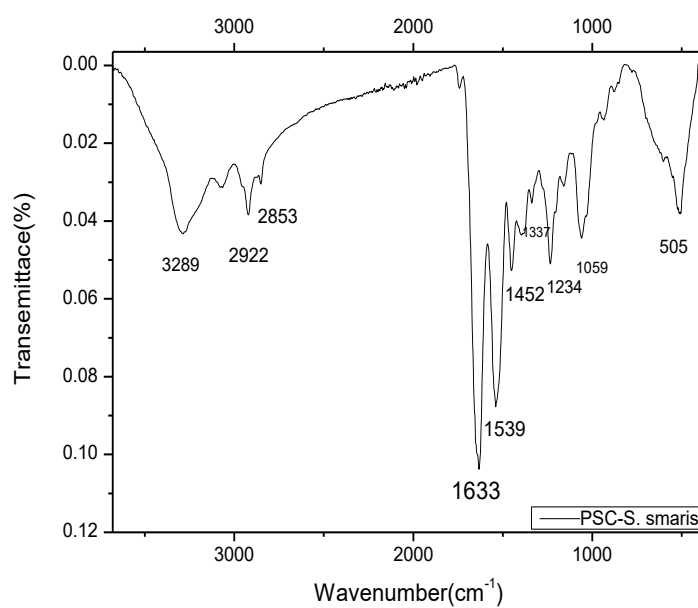
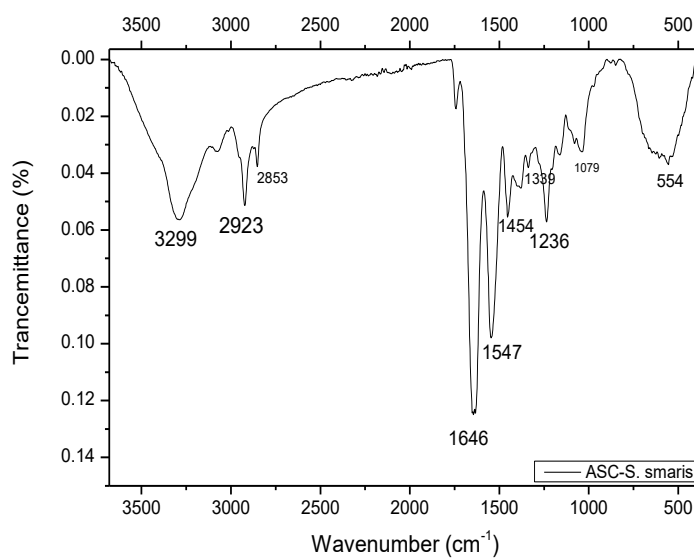
- Μαρίδα (*S. smaris*)

Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στα ASC και PSC που απομονώθηκαν από ολόκληρους ιχθύς *S. smaris*, εμφανίζονται στα διαγράμματα 7,8. Η ζώνη απορρόφησης του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N-H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3299 cm^{-1} για το ASC και 3289 cm^{-1} για το PSC, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β που σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας -CH₂ και παρατηρείται συνήθως στα $3100-2950\text{ cm}^{-1}$, βρέθηκε στα 2923 cm^{-1} για το ASC,

και στα 2922 cm^{-1} για το PSC (Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου I βρίσκεται συνήθως μεταξύ 1600 και 1700 cm^{-1} και σχετίζεται με την δόνηση δεσμού -C=O στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ή με δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με -COO- . Συχνά η κορυφή του αμιδίου I συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των πρωτεϊνών μια που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ 1645 - 1659 cm^{-1} για την διαμόρφωση της α -έλικας, η β -πτυχή εντοπίζεται στα από 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β -στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα 1637 - 1638 cm^{-1} και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., **2009**; Retibois et al., **2006**). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή εμφανίζεται στα 1646 cm^{-1} για το ASC και στα, 1633 cm^{-1} για το PSC (Payne K. et al., **1988**). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου II, αντιπροσωπεύει τις κάμπυεις -N-H συζευγμένες με τις δονήσεις -C-N , στο επίπεδο σύζευξης κάμπυης από αμιδικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων -CH_2 από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης. Αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα 1550 - 1450 cm^{-1} (Krimm S. et al., **1986**), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν στα 1547 cm^{-1} για το ASC και στα 1539 cm^{-1} για το PSC. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου III, εμφανίζεται συνήθως στα 1320 - 1220 cm^{-1} και οφείλεται στην δόνηση -NH με δόνηση -CN , τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν στα 1236 cm^{-1} για το ASC και στα 1234 cm^{-1} PSC, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., **1986**).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1454 cm^{-1} για το ASC και στα 1452 cm^{-1} για το PSC, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., **2004**). Η δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας με μόρια νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα. Η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ του των κορυφών $1236/1454\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 1 για το ASC, ενώ για το PSC η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ των κορυφών $1234/1452\text{ cm}^{-1}$

¹ είναι ίση με 0.97 σχεδόν 1, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη τριπλής έλικας και στα δυο είδη κολλαγόνου (Veeruraj A. et al., 2015).

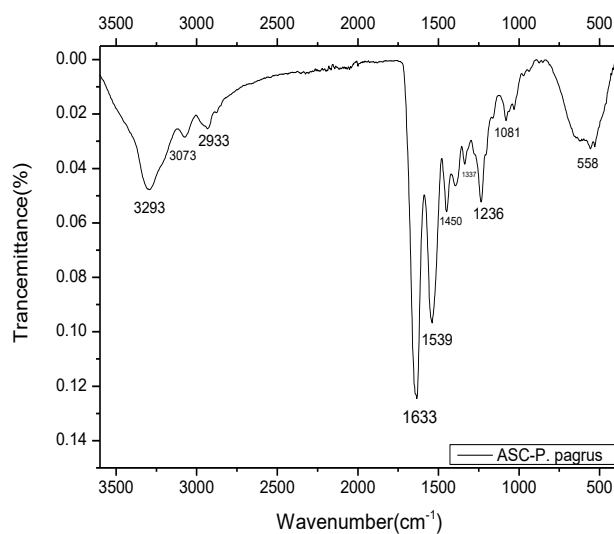


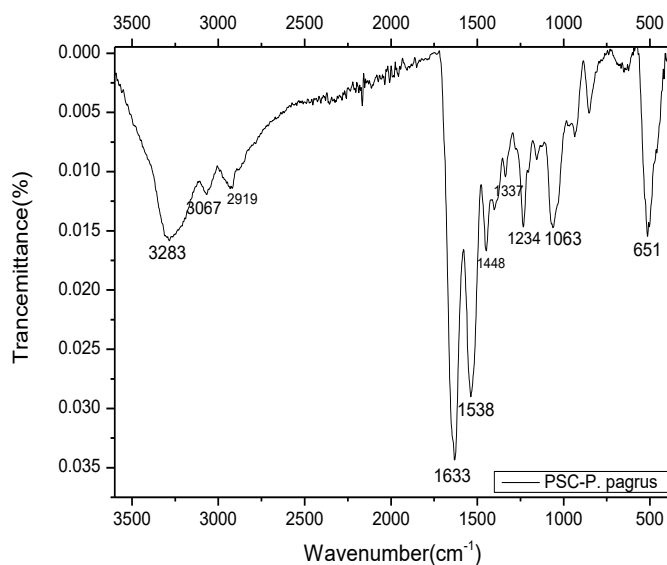
Διαγράμματα 7, 8: Φάσματα IR για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από ολικούς ιχθύες *S. smaris*.

- *P. pagrus*

Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στα ASC και PSC που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *P. Pagrus*, εμφανίζονται στα διαγράμματα 9, 10. Η ζώνη απορρόφησης του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N–H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3293 cm^{-1} για το ASC και 3280 cm^{-1} για το PSC, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β που σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας -CH₂ και παρατηρείται συνήθως στα $3100-2950\text{ cm}^{-1}$, βρέθηκε στα 3073 cm^{-1} για το ASC, 3067 cm^{-1} για το PSC (Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου Ι βρίσκεται συνήθως μεταξύ 1600 και 1700 cm^{-1} και σχετίζεται με την δόνηση δεσμού -C=O στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ή με δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με -COO-. Συχνά η κορυφή του αμιδίου Ι συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των πρωτεϊνών μια απορρόφηση που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ $1645-1659\text{ cm}^{-1}$ για την διαμόρφωση της α-έλικας, η β-πτυχή εντοπίζεται στα 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β-στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα $1637-1638\text{ cm}^{-1}$ και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., **2009**; Petibois et al., **2006**). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή εμφανίζεται στα 1633 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα (Payne K. et al., **1988**). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου ΙΙ, αντιπροσωπεύει τις κάμπυες -N-H συζευγμένες με τις δονήσεις -C-N, στο επίπεδο σύζευξης κάμψης από αμιδιτικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων -CH₂ από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης. Αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα $1550-1450\text{ cm}^{-1}$ (Krimm S. et al., **1986**), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν και στα 1539 cm^{-1} για το ASC, 1538 cm^{-1} για το PSC. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου ΙΙΙ, εμφανίζεται συνήθως στα $1320-1220\text{ cm}^{-1}$ και οφείλεται στην δόνηση -NH με δόνηση -CN, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν στα 1236 cm^{-1} για το ASC και στα 1234 cm^{-1} PSC, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., **1986**).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1450 cm^{-1} για το ASC και στα 1458 cm^{-1} για το PSC, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., **2004**). Η δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας με μόρια νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα. Η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ του των κορυφών $1236/1450\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.94 σχεδόν 1 για το ASC, ενώ για το PSC η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ των κορυφών $1234/1458\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.88 σχεδόν 1, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη τριπλής έλικας και στα δυο είδη κολλαγόνου (Veeruraj A. et al., **2015**).





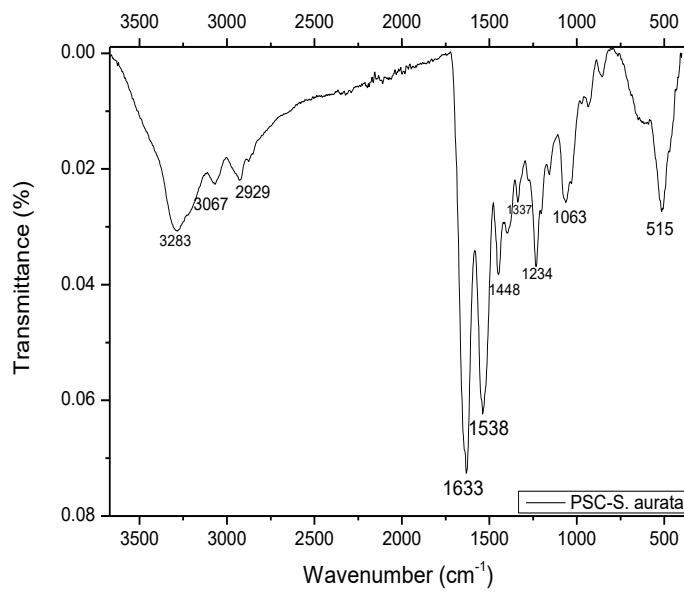
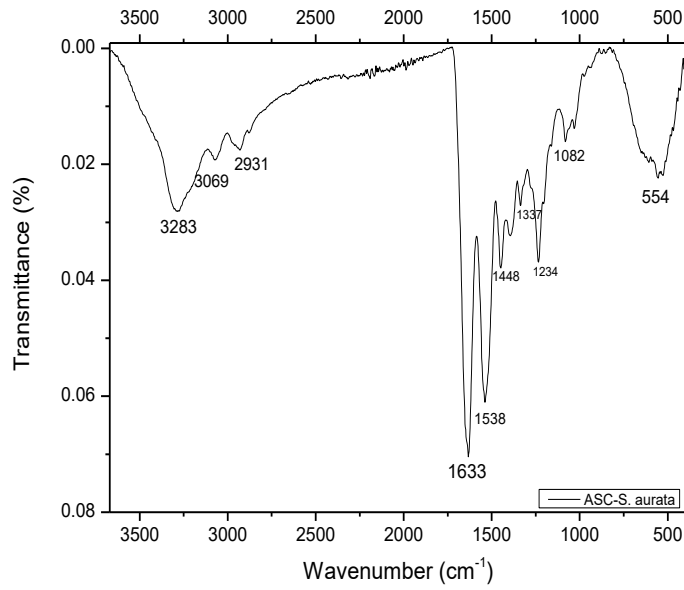
Διαγράμματα 9, 10: Φάσματα IR για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *P. Pagrus*.

- *S. aurata*

Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στα ASC και PSC που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *S. aurata*, εμφανίζονται στα διαγράμματα 11, 12. Η ζώνη απορρόφησης του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N-H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3283 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας $-\text{CH}_2$ και παρατηρείται συνήθως στα $3100-2950\text{ cm}^{-1}$, βρέθηκε στα 3069 cm^{-1} για το ASC, 3067 cm^{-1} για το PSC (Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου Ι βρίσκεται συνήθως μεταξύ 1600 και 1700 cm^{-1} σχετίζεται με την δόνηση δεσμού $-\text{C}=\text{O}$ στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ή σε δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με $-\text{COO}-$. Συχνά η κορυφή του αμιδίου Ι συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των πρωτεϊνών μια απορρόφηση που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ $1645-1659\text{ cm}^{-1}$ για την διαμόρφωση της α-έλικας, η

β-πτυχή εντοπίζεται στα από 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β-στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα 1637-1638 cm^{-1} και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., **2009**; Petibois et al., **2006**). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή βρέθηκε να είναι στα 1633 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα (Payne K. et al., **1988**). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου II, αντιπροσωπεύει τις κάμπυεις -N-H συζευγμένα με τις δονήσεις -C-N, στο επίπεδο σύζευξης κάμπυης από αμιδικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων -CH₂ από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης, αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα 1550-1450 cm^{-1} (Krimm S. et al., **1986**), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν στα 1533 cm^{-1} για το ASC, 1538 cm^{-1} για το PSC. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου III, εμφανίζεται συνήθως στα 1320–1220 cm^{-1} και οφείλεται στην δόνηση -NH με δόνηση -CN, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Οι οποίες τιμές βρέθηκαν στα 1234 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., **1986**).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1448 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., **2004**). Η δομή τριπλής έλικας κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές στη δευτερογενή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας μόριο νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα. Η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ του των κορυφών 1234/1448 cm^{-1} είναι 0.0369/0.0379 ίση με 0.97 σχεδόν 1 για το ASC, ενώ για το PSC η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ των κορυφών 1234/1448 cm^{-1} είναι 0.0369/0.0382 ίση με 0.97 σχεδόν 1, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη τριπλής έλικας και τα δυο είδη κολλαγόνου (Veeruraj A. et al., **2015**).



Διαγράμματα 11, 12: Φάσματα IR για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *S. aurata*.

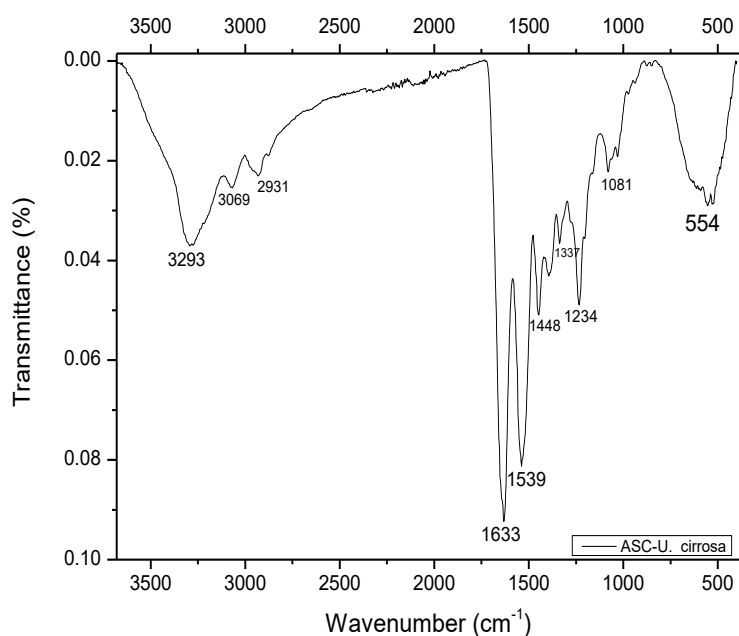
- *U. cirrosa*

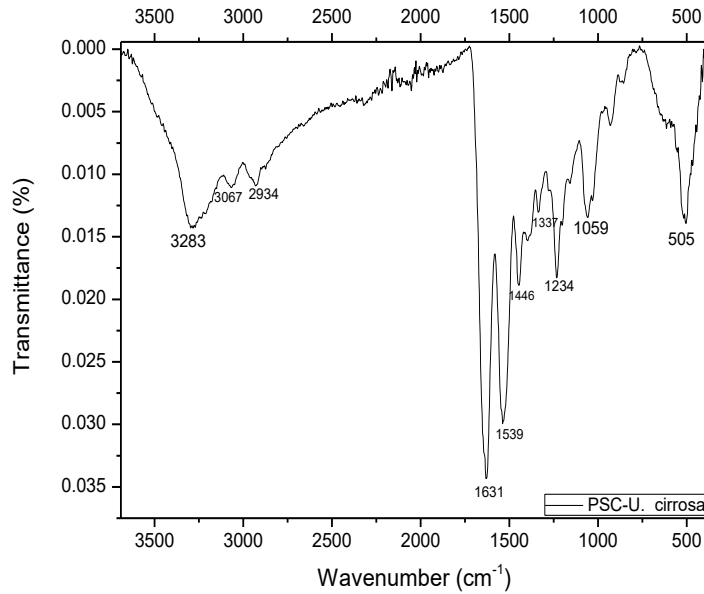
Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στα ASC και PSC που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *U. cirrosa*, εμφανίζονται στα διαγράμματα 13, 14. Η ζώνη απορρόφησης

του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N-H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3293 cm^{-1} για το ASC και 3283 cm^{-1} για το PSC, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β που σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας $-\text{CH}_2$ και παρατηρείται συνήθως στα $3100-2950\text{ cm}^{-1}$, βρέθηκε στα 3069 cm^{-1} για το ASC και στα 3067 cm^{-1} για το PSC (Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου Ι βρίσκεται συνήθως μεταξύ 1600 και 1700 cm^{-1} και σχετίζεται με την δόνηση δεσμού $-\text{C}=\text{O}$ στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ή με δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με $-\text{COO}-$. Συχνά η κορυφή του αμιδίου Ι συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των πρωτεϊνών μια απορρόφηση που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ $1645-1659\text{ cm}^{-1}$ για την διαμόρφωση της α -έλικας, η β -πτυχή εντοπίζεται στα 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β -στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα $1637-1638\text{ cm}^{-1}$ και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., **2009**; Petibois et al., **2006**). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή εμφανίζεται στα 1643 cm^{-1} για το ASC και στα 1631 cm^{-1} για το PSC (Payne K. et al., **1988**). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου ΙΙ, αντιπροσωπεύει τις κάμψεις $-\text{N}-\text{H}$ συζευγμένες με τις δονήσεις $-\text{C}-\text{N}$, στο επίπεδο σύζευξης κάμψης από αμιδικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων $-\text{CH}_2$ από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης. Αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα $1550-1450\text{ cm}^{-1}$ (Krimm S. et al., **1986**), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν και στα 1539 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου ΙΙΙ, εμφανίζεται συνήθως στα $1320-1220\text{ cm}^{-1}$ και οφείλεται στην δόνηση $-\text{NH}$ με δόνηση $-\text{CN}$, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Οι οποίες τιμές βρέθηκαν στα 1234 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., **1986**).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1448 cm^{-1} για το ASC και στα 1446 cm^{-1} για το PSC, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., **2004**). Η δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές

στη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας με μόρια νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα. Η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ του των κορυφών $1234/1448\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.96 σχεδόν 1 για το ASC, ενώ για το PSC η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ των κορυφών $1234/1446\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.97 σχεδόν 1, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη τριπλής έλικας και στα δυο είδη κολλαγόνου (Veeruraj A. et al., 2015).





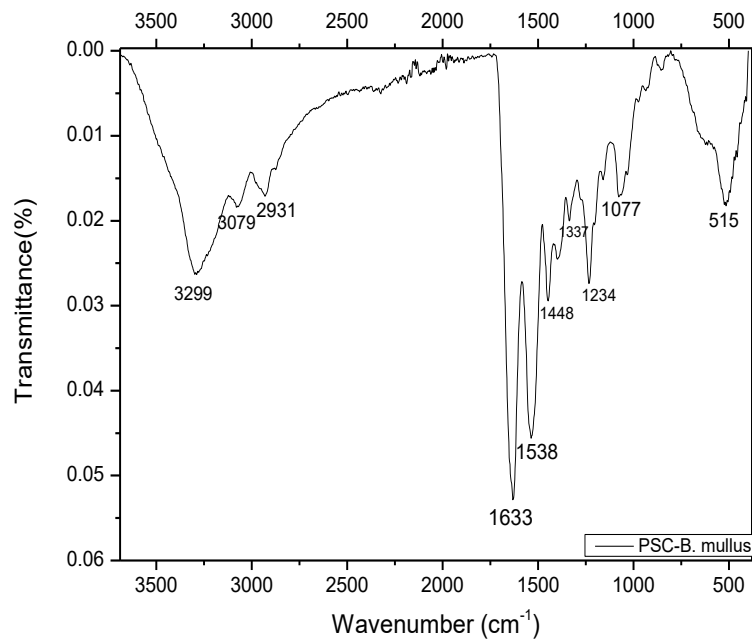
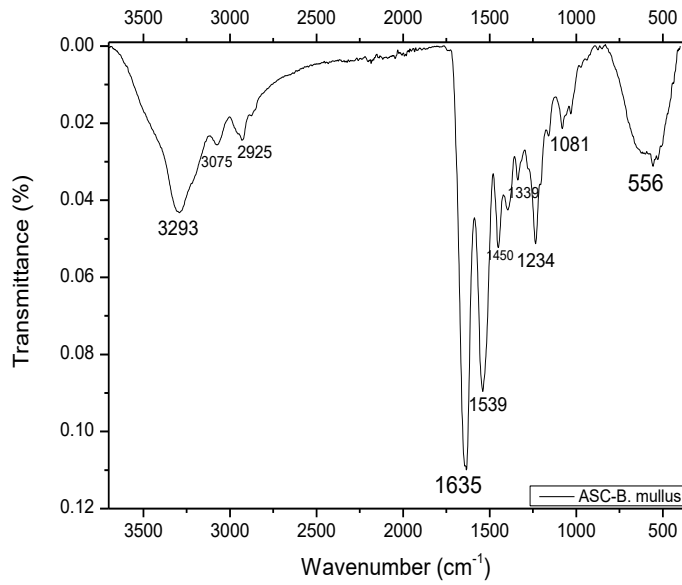
Διαγράμματα 13, 14: Φάσματα IR για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *U. cirrosa*.

- *B. mullus*

Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στα ASC και PSC που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *B. mullus*, εμφανίζονται στα διαγράμματα 15, 16. Η ζώνη απορρόφησης του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N-H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3293 cm^{-1} για το ASC και 3299 cm^{-1} για το PSC, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β που σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας -CH₂ και παρατηρείται συνήθως στα $3100-2950\text{ cm}^{-1}$, βρέθηκε στα 3075 cm^{-1} για το ASC και στα 3079 cm^{-1} για το PSC (Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου Ι βρίσκεται συνήθως μεταξύ $1600\text{ και }1700\text{ cm}^{-1}$ και σχετίζεται με την δόνηση δεσμού -C=O στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ή με δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με -COO-. Συχνά η κορυφή του αμιδίου Ι συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των

πρωτεϊνών μια απορρόφηση που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ $1645\text{-}1659\text{ cm}^{-1}$ για την διαμόρφωση της α -έλικας, η β -πτυχή εντοπίζεται στα 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β -στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα $1637\text{-}1638\text{ cm}^{-1}$ και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., 2009; Petibois et al., 2006). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή εμφανίζεται στα 1635 cm^{-1} για το ASC και στα 1633 cm^{-1} για το PSC (Payne K. et al., 1988). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου II, αντιπροσωπεύει τις κάμψεις -N-H συζευγμένες με τις δονήσεις -C-N , στο επίπεδο σύζευξης κάμψης από αμιδικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων -CH_2 από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης. Αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα $1550\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ (Krimm S. et al., 1986), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν στα 1539 cm^{-1} για το ASC και στα 1538 cm^{-1} για το PSC. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου III, εμφανίζεται συνήθως στα $1320\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ και οφείλεται στην δόνηση -NH με δόνηση -CN , τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν στα 1234 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., 1986).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1450 cm^{-1} για το ASC και στα 1448 cm^{-1} για το PSC, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., 2004). Η δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας με μόρια νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα. Η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ του των κορυφών $1234/1450\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.98 σχεδόν 1 για το ASC, ενώ για το PSC η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ των κορυφών $1234/1448\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.93 σχεδόν 1, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη τριπλής έλικας και στα δυο είδη κολλαγόνου (Veeruraj A. et al., 2015).

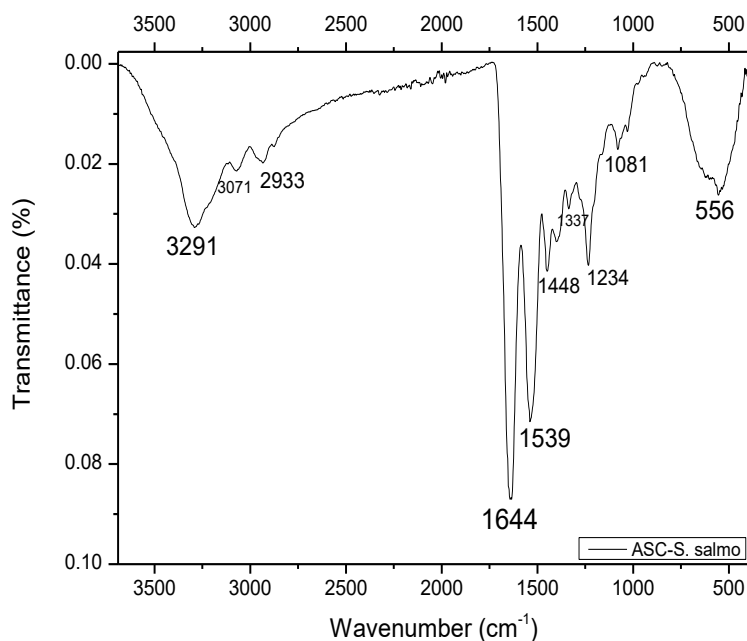


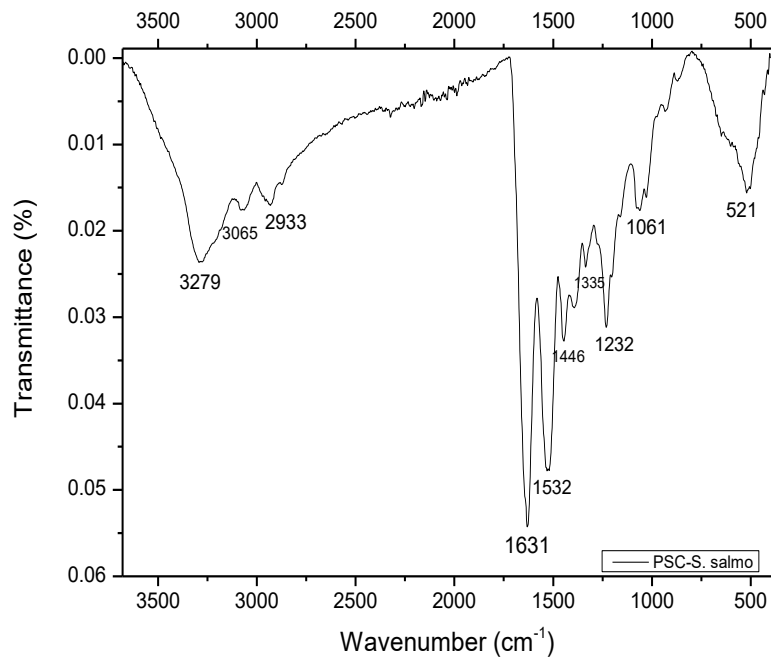
Διαγράμματα 15, 16: Φάσματα IR για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *B. mullus*.

- *S. salmo*

Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στα ASC και PSC που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *S. salmo*, εμφανίζονται στα διαγράμματα 17, 18. Η ζώνη απορρόφησης του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N–H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3291 cm^{-1} για το ASC και 3279 cm^{-1} για το PSC, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β που σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας -CH₂ και παρατηρείται συνήθως στα $3100-2950\text{ cm}^{-1}$, βρέθηκε στα 3071 cm^{-1} για το ASC και στα 3065 cm^{-1} για το PSC (Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου Ι βρίσκεται συνήθως μεταξύ 1600 και 1700 cm^{-1} και σχετίζεται με την δόνηση δεσμού -C=O στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ή με δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με -COO-. Συχνά η κορυφή του αμιδίου Ι συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των πρωτεϊνών μια απορρόφηση που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ $1645-1659\text{ cm}^{-1}$ για την διαμόρφωση της α-έλικας, η β-πτυχή εντοπίζεται στα 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β-στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα $1637-1638\text{ cm}^{-1}$ και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., **2009**; Petibois et al., **2006**). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή εμφανίζεται στα 1644 cm^{-1} για το ASC και στα, 1631 cm^{-1} για το PSC (Payne K. et al., **1988**). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου ΙΙ, αντιπροσωπεύει τις κάμπυεις -N-H συζευγμένες με τις δονήσεις -C-N, στο επίπεδο σύζευξης κάμπυης από αμιδικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων -CH₂ από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης. Αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα $1550-1450\text{ cm}^{-1}$ (Krimm S. et al., **1986**), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν στα 1539 cm^{-1} για το ASC και στα 1532 cm^{-1} για το PSC. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου ΙΙΙ, εμφανίζεται συνήθως στα $1320-1220\text{ cm}^{-1}$ και οφείλεται στην δόνηση -NH με δόνηση -CN, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν στα 1234 cm^{-1} για το ASC και στα 1232 cm^{-1} PSC, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., **1986**).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1448 cm^{-1} για το ASC και στα 1446 cm^{-1} για το PSC, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., **2004**). Η δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας με μόρια νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα. Η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ του των κορυφών $1234/1448\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.97 σχεδόν 1 για το ASC, ενώ για το PSC η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ των κορυφών $1232/1446\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.95 σχεδόν 1, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη τριπλής έλικας και στα δυο είδη κολλαγόνου (Veeruraj A. et al., **2015**).





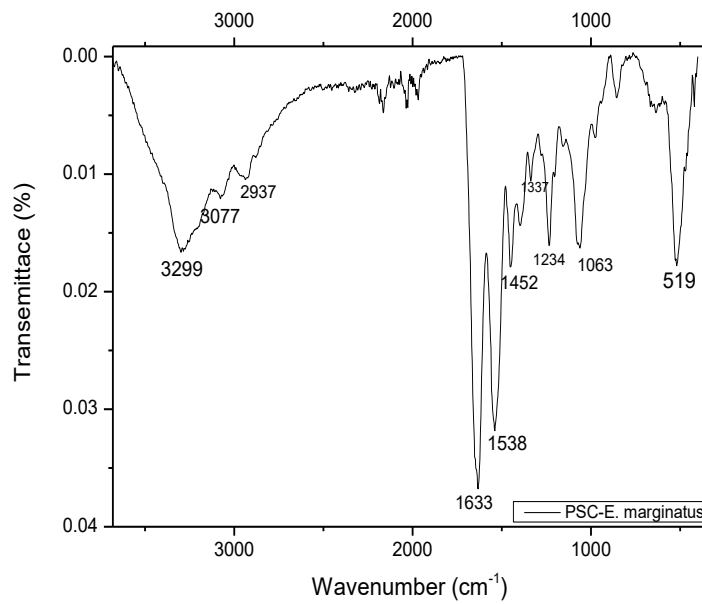
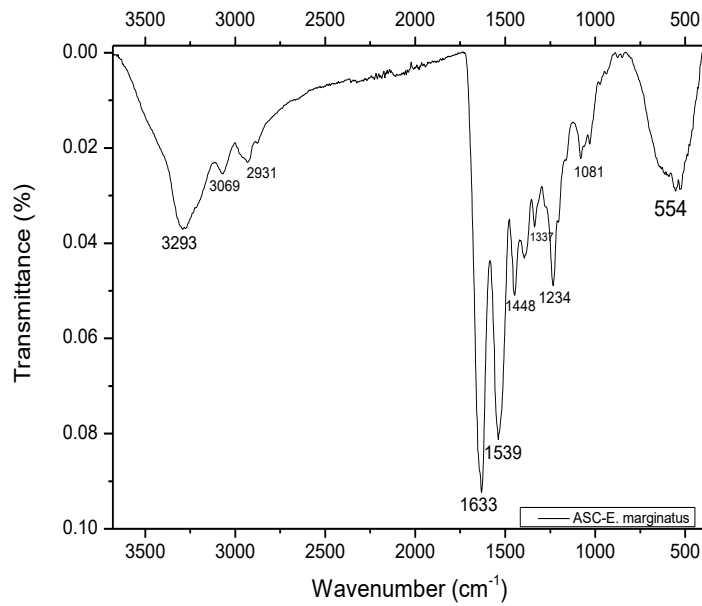
Διαγράμματα 17, 18: Φάσματα IR για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *S. salmo*.

- *E. marginatus*

Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στα ASC και PSC που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *E. marginatus*, εμφανίζονται στα διαγράμματα 19, 20. Η ζώνη απορρόφησης του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους $3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$ και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N–H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3293 cm^{-1} για το ASC και 3299 cm^{-1} για το PSC, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β που σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας -CH₂ και παρατηρείται συνήθως στα $3100\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, βρέθηκε στα 3069 cm^{-1} για το ASC και στα 3077 cm^{-1} για το PSC (Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου Ι βρίσκεται συνήθως μεταξύ $1600\text{ και }1700\text{ cm}^{-1}$ και σχετίζεται με την δόνηση δεσμού -C=O στην

πολυπεπτιδική αλυσίδα ή με δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με $-\text{COO}-$. Συχνά η κορυφή του αμιδίου I συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των πρωτεϊνών μια απορρόφηση που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ $1645\text{-}1659\text{ cm}^{-1}$ για την διαμόρφωση της α -έλικας, η β -πτυχή εντοπίζεται στα 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β -στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα $1637\text{-}1638\text{ cm}^{-1}$ και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., 2009; Petibois et al., 2006). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή εμφανίζεται στα 1633 cm^{-1} και για τα δύο κολλαγόνα (Payne K. et al., 1988). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου II, αντιπροσωπεύει τις κάμψεις $-\text{N-H}$ συζευγμένες με τις δονήσεις $-\text{C-N}$, στο επίπεδο σύζευξης κάμψης από αμιδικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων $-\text{CH}_2$ από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης. Αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα $1550\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ (Krimm S. et al., 1986), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν στα 1539 cm^{-1} για το ASC και στα 1538 cm^{-1} για το PSC. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου III, εμφανίζεται συνήθως στα $1320\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ και οφείλεται στην δόνηση $-\text{NH}$ με δόνηση $-\text{CN}$, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν στα 1234 cm^{-1} για το ASC και στα 1232 cm^{-1} PSC, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., 1986).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1448 cm^{-1} για το ASC και στα 1452 cm^{-1} για το PSC, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., 2004). Η δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας με μόρια νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα. Η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ του των κορυφών $1234/1448\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.96 σχεδόν 1 για το ASC, ενώ για το PSC η αναλογία των απορροφήσεων μεταξύ των κορυφών $1234/1452\text{ cm}^{-1}$ είναι ίση με 0.90 σχεδόν 1, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη τριπλής έλικας και στα δυο είδη κολλαγόνου (Veeruraj A. et al., 2015).



Διαγράμματα 19, 20: Φάσματα IR για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *E. marginatus*.

Πίνακας 12. Συγκριτικός πίνακας των απορροφήσεων αμιδίων για τα κολλαγόνα
ASC και PSC από ιχθύες.

	Αμίδιο A	Αμίδιο B	Αμίδιο I	Αμίδιο II	Αμίδιο III
<i>S.smaris</i> (Μαρίδα)					
ASC	3299	2923	1646	1547	1236
PSC	3289	2922	1633	1539	1234
<i>P.pragrus</i> (Φαγγρί)					
ASC	3293	3073	1633	1539	1236
PSC	3283	3067	1633	1538	1234
<i>S. aurata</i> (Τσιπούρα)					
ASC	3283	3069	1633	1538	1234
PSC	3283	3067	1633	1538	1234
<i>C.umbrina</i> (Μυλοκόπι)					
ASC	3293	3069	1633	1539	1234
PSC	3283	3067	1631	1539	1234
<i>B.mullus</i> (Κουτσομούρα)					
ASC	3293	3075	1635	1539	1234
PSC	3299	3079	1633	1538	1234
<i>S.salar</i> (Σολωμός)					
ASC	3291	3071	1644	1539	1234
PSC	3279	3065	1631	1532	1232
<i>E.marginatus</i> (Ροφός)					
ASC	3293	3069	1633	1539	1234
PSC	3299	3077	1633	1538	1234
^a <i>Thunnus obesus</i> (bone)					
ASC	3446	2926	1645	1554	1263
PSC	3352	2927	1646	1558	1262
^b <i>Mustelus mustelus</i> (skin)					
ASC	3294	2942	1630	1549	1238
PSC	3296	3092	1630	1545	1240
^c <i>Cirrhinus cirrhosis</i> (scales)					
ASC	3323	2938	1661	1548	1237
PSC	3300	2925	1633	1548	1237

a: Jeong Hee-Seok et al., **2013, b: Slimane Emna Ben et al., **2018**, c: Pallabi Pal. et al., **2016**

Συνολικά, οι συχνότητες των απορροφήσεων μεταξύ των ιχθύων που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές (πιν. 12). Αρχικά παρατηρούμε στο είδος *S. smaris*, ότι η ζώνη απορρόφησης που βρίσκεται 1750 cm^{-1} στο ASC και στο PSC, οφείλεται στις λιπαρές ουσίες, όπου με την βοήθεια εκπλύσεων βουτανόλης και H_2O παρατηρούμε πως μειώθηκε στο κολλαγόνο PSC, λόγω ότι βουτανόλη διάλυσε τις λιπαρές ουσίες οι οποίες περιέχονται στο δέρμα και στο σώμα του ιχθύ. Συνεχίζοντας, οι κορυφές αμιδίου I και αμιδίου II μαζί δείχνουν το βαθμό μοριακής τάξης (Pati et al., 2010), αυτό σημαίνει ότι στα δείγματα με τα λέπια ο *S. salar* έχει τον μεγαλύτερο βαθμό σε ASC αλλά ακόμα μεγαλύτερο η *S. smaris*. Βέβαια σε σύγκριση με την βιβλιογραφία ο ιχθύς *Cirrhinus cirrhosis* έχει τον μεγαλύτερο βαθμό. Στο κολλαγόνο PSC οι ιχθύς, *P. pagrus*, *S. aurata*, *B. mullus* και *E. marginatus* έχουν εξίσου τον ίδιο βαθμό μοριακής τάξης αλλά η *S. smaris* ακόμα μεγαλύτερο, συγκρίνοντας με βιβλιογραφία ο ιχθύς *Cirrhinus cirrhosis* έχει τον μεγαλύτερο βαθμό απ'όλα.

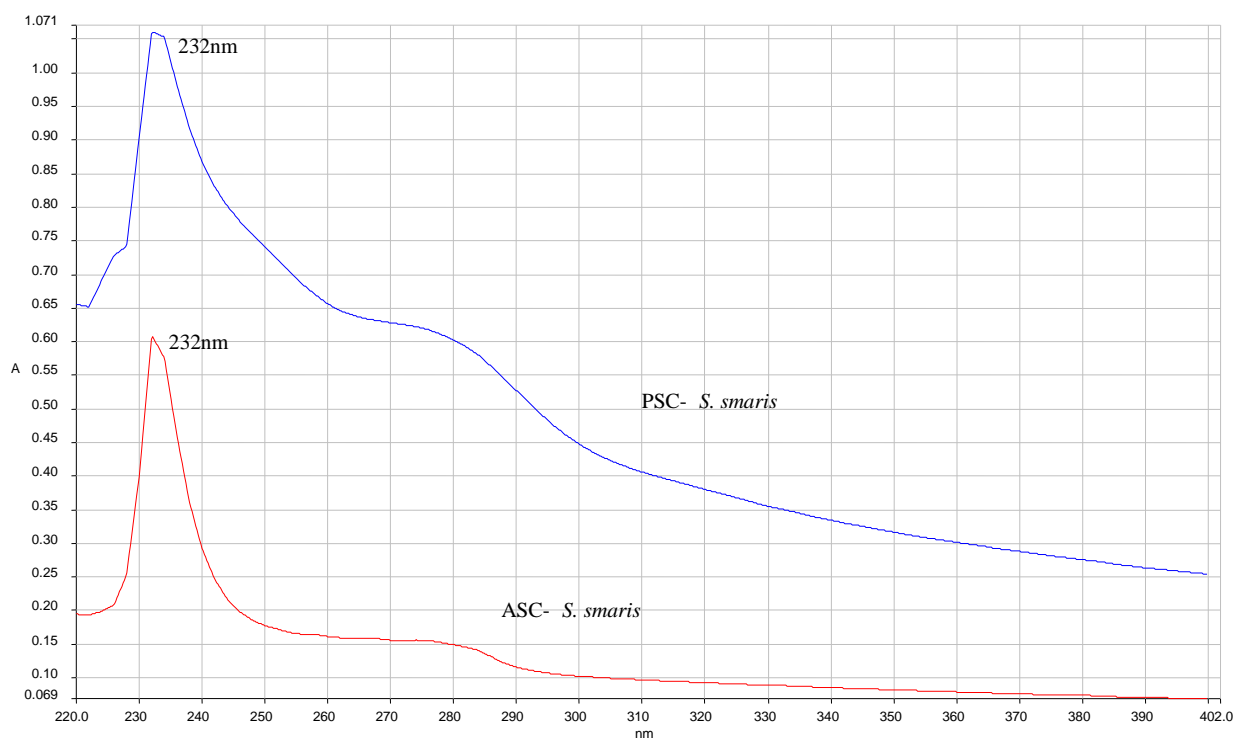
Παρατηρούμε πως σχεδόν σε όλα τα δείγματα βάση των αναφορών των Belbachir et al., 2009; Petibois et al., 2006, ότι έχουμε υψηλής ποιότητας κολλαγόνο σε τριπλές έλικες και μη οργανωμένες δομές. Τέλος, σε σύγκριση με την βιβλιογραφία δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές αλλά και για αυτές τις μικρές διαφορές των απορροφήσεων που παρατηρούνται πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα είδη είναι διαφορετικά όπως και ότι η βιβλιογραφία είναι ενδεικτική για να καταλάβουμε τις αποστάσεις των απορροφήσεων στα αποτελέσματα μας σε σύγκριση με άλλα.

3.4 Φασματοφωτομετρία απορρόφησης, UV-Vis

Τα φάσματα απορρόφησης UV των ASC, PSC ελήφθησαν σε φασματογράφο PerkinElmer instruments, Lambda 40. Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν $\approx 12\text{ mg}$ και διαλύθηκαν σε 5 mL διαλύματος CH_3COOH (0.5 M). Το υπεριώδες φάσμα μετρήθηκε σε μήκος κύματος μεταξύ 200 και 400 nm με ταχύτητα σάρωσης 240 nm/min με ένα διάστημα 2 nm , το τυφλό διάλυμα ήταν το CH_3COOH (0.5 M).

- *S. smarís*

Τα υπεριώδη φάσματα, που ελήφθησαν για τα ASC και PSC που απομονώθηκαν από το είδος *S. smarís* εμφανίζονται στο διάγραμμα 21. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Τα κολλαγόνα ASC και PSC παρουσίασαν μέγιστη απορρόφηση στα 232 nm. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη μέγιστη απορρόφηση του μορίου κολλαγόνου (230 nm) που συναντάται στην βιβλιογραφία (Sampath K. et al., **2012**). Η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως στις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ των ομάδων C=O, -COOH και CONH₂ που βρίσκονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου (Heredia A. et al., **2013**). Σε αντίθεση με άλλους τύπους πρωτεϊνών, ανιχνεύθηκε κορυφή στα 280 nm χαμηλής έντασης, που αποδίδεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κολλαγόνα ASC και PSC έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά αμινοξέα όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη (Rao, K.P. et al., **1992**)τα οποία έχουν ζώνες απορρόφησης στις περιοχές από 250 έως 270, 270 έως 290 και 280 έως 300 nm, αντίστοιχα. Αυτή η μειωμένη ένταση της απορρόφησης των αρωματικών ομάδων πιθανόν να οφείλεται στη όξινη εκχύλιση του κολλαγόνου ή λόγω των εκπλύσεων ως προς την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, γι αυτό το λόγο λαμβάνουμε αυτό το προφίλ στις τιμές, και αυτές είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε κολλαγόνο τύπου I και II, από λέπια *S. longiceps* των (K. Muthumari et al., **2016**) και λέπια από *M. miiuy* (Long-Yan Li. et al., **2016**).

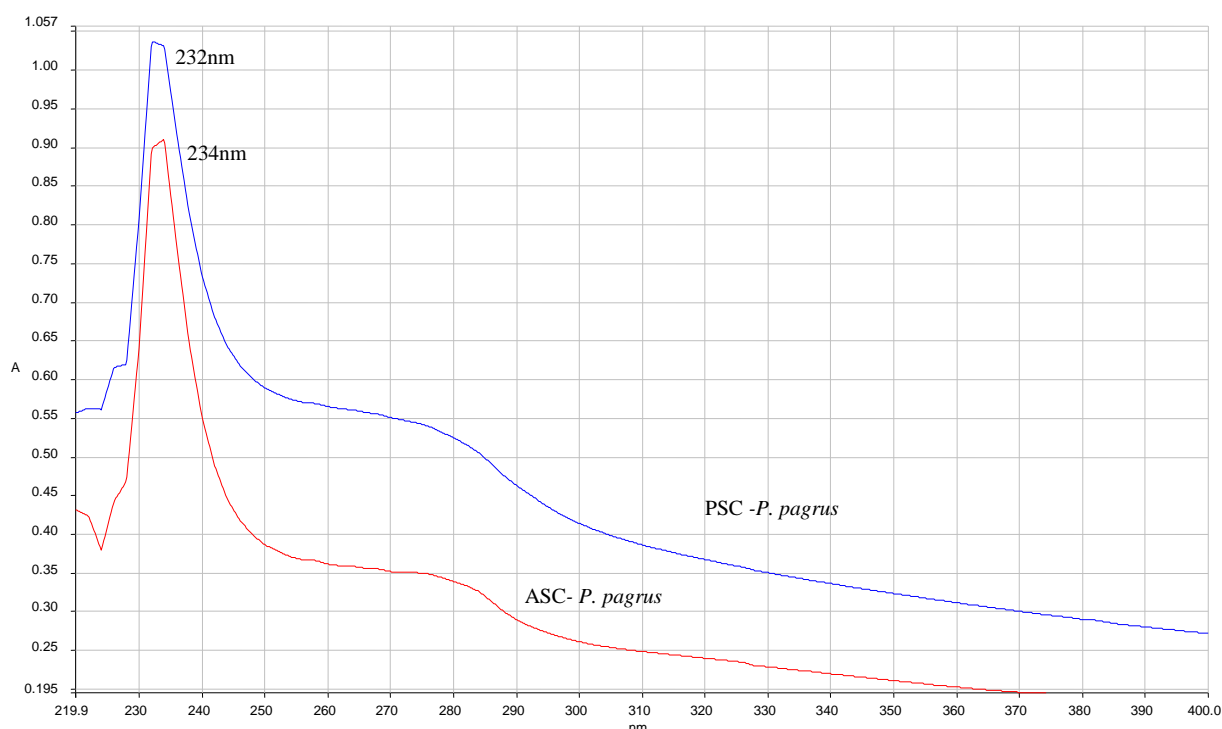


Διάγραμμα 21: Φάσμα UV για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *S. smarís*.

- *P. pagrus*

Τα υπεριώδη φάσματα, που ελήφθησαν για τα ASC και PSC που απομονώθηκαν από το είδος *P. Pagrus*, εμφανίζονται στο διάγραμμα 22. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Τα κολλαγόνα ASC και PSC παρουσίασαν μέγιστη απορρόφηση στα 234, 232 nm αντίστοιχα. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη μέγιστη απορρόφηση του μορίου κολλαγόνου (230 nm) που συναντάται στην βιβλιογραφία (Samrath K. et al., 2012). Η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως στις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ των ομάδων C=O, -COOH και CONH₂ που βρίσκονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου (Heredia A. et al., 2013). Σε αντίθεση με άλλους τύπους πρωτεϊνών, ανιχνεύθηκε κορυφή στα 280 nm χαμηλής έντασης, που αποδίδεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κολλαγόνα ASC και PSC έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά αμινοξέα όπως

φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη (Rao, K.P. et al., **1992**) τα οποία έχουν ζώνες απορρόφησης στις περιοχές από 250 έως 270, 270 έως 290 και 280 έως 300 nm, αντίστοιχα. Αυτή η μειωμένη ένταση της απορρόφησης των αρωματικών ομάδων πιθανόν να οφείλεται στη όξινη εκχύλιση του κολλαγόνου ή λόγω των εκπλύσεων ως προς την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, γι αυτό το λόγο λαμβάνουμε αυτό το προφίλ στις τιμές, και αυτές είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε κολλαγόνο τύπου I και II, από λέπια *S. longiceps* των (K. Muthumari et al., **2016**) και λέπια από *M.miiuy* (Long-Yan Li. et al., **2016**).

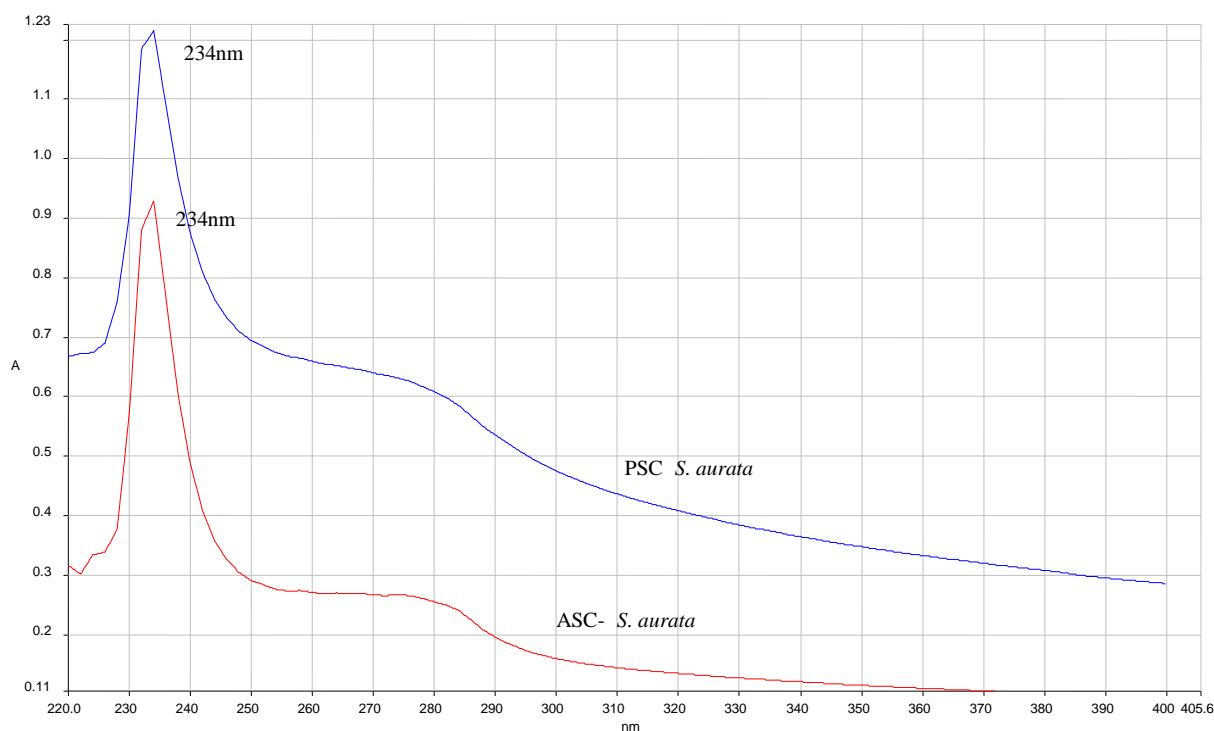


Διάγραμμα 22: Φάσμα UV για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *P. pagrus*.

- *S. aurata*

Τα υπεριώδη φάσματα, που ελήφθησαν για τα ASC και PSC που απομονώθηκαν από το είδος *S. aurata*, εμφανίζονται στο διάγραμμα 23. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Τα κολλαγόνα ASC και PSC παρουσίασαν μέγιστη απορρόφηση στα 234 nm. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη μέγιστη απορρόφηση του μορίου κολλαγόνου (230 nm) που συναντάται στην βιβλιογραφία (Sampath K. et al.,

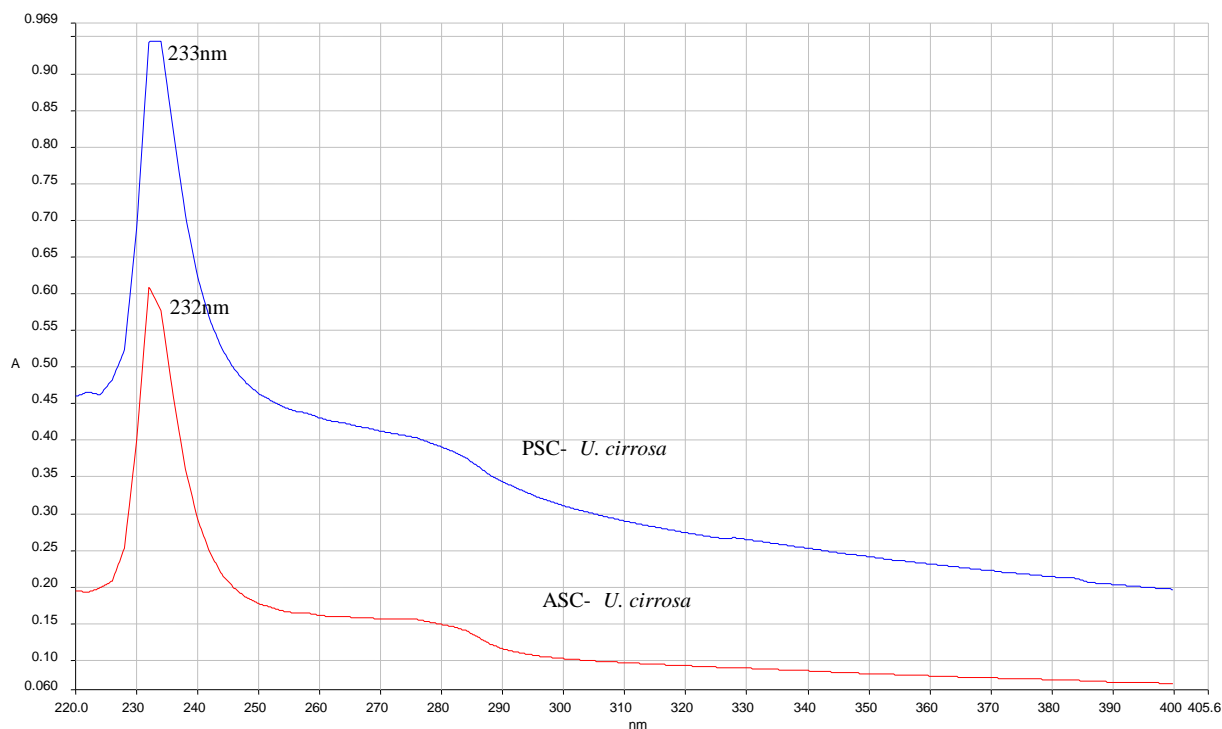
2012). Η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως στις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ των ομάδων C=O, -COOH και CONH₂ που βρίσκονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου (Heredia A. et al., **2013**). Σε αντίθεση με άλλους τύπους πρωτεϊνών, ανιχνεύθηκε κορυφή στα 280 nm χαμηλής έντασης, που αποδίδεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κολλαγόνα ASC και PSC έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά αμινοξέα όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη (Rao, K.P. et al., **1992**) τα οποία έχουν ζώνες απορρόφησης στις περιοχές από 250 έως 270, 270 έως 290 και 280 έως 300 nm, αντίστοιχα. Αυτή η μειωμένη ένταση της απορρόφησης των αρωματικών ομάδων πιθανόν να οφείλεται στη όξινη εκχύλιση του κολλαγόνου ή λόγω των εκπλύσεων ως προς την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, γι αυτό το λόγο λαμβάνουμε αυτό το προφίλ στις τιμές, και αυτές είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε κολλαγόνο τύπου I και II, από λέπια *S. longiceps* των (K. Muthumari et al., **2016**) και λέπια από *M. miiuy* (Long-Yan Li. et al., **2016**).



Διάγραμμα 23: Φάσμα UV για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *S. aurata*.

- *U. cirrosa*

Τα υπεριώδη φάσματα, που ελήφθησαν για τα ASC και PSC που απομονώθηκαν από το είδος *U. cirrosa*, εμφανίζονται στο διάγραμμα 24. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Τα κολλαγόνα ASC και PSC παρουσίασαν μέγιστη απορρόφηση στα 232, 233 nm αντίστοιχα. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη μέγιστη απορρόφηση του μορίου κολλαγόνου (230 nm) που συναντάται στην βιβλιογραφία (Samrath K. et al., **2012**). Η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως στις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ των ομάδων C=O, -COOH και CONH₂ που βρίσκονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου (Heredia A. et al., **2013**). Σε αντίθεση με άλλους τύπους πρωτεϊνών, ανιχνεύθηκε κορυφή στα 280 nm χαμηλής έντασης, που αποδίδεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κολλαγόνα ASC και PSC έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά αμινοξέα όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη (Rao, K.P. et al., **1992**) τα οποία έχουν ζώνες απορρόφησης στις περιοχές από 250 έως 270, 270 έως 290 και 280 έως 300 nm, αντίστοιχα. Αυτή η μειωμένη ένταση της απορρόφησης των αρωματικών ομάδων πιθανόν να οφείλεται στη όξινη εκχύλιση του κολλαγόνου ή λόγω των εκπλύσεων ως προς την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, γι αυτό το λόγο λαμβάνουμε αυτό το προφίλ στις τιμές, και αυτές είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε κολλαγόνο τύπου I και II, από λέπια *S. longiceps* των (K. Muthumari et al., **2016**) και λέπια από *M. miuuy* (Long-Yan Li. et al., **2016**).

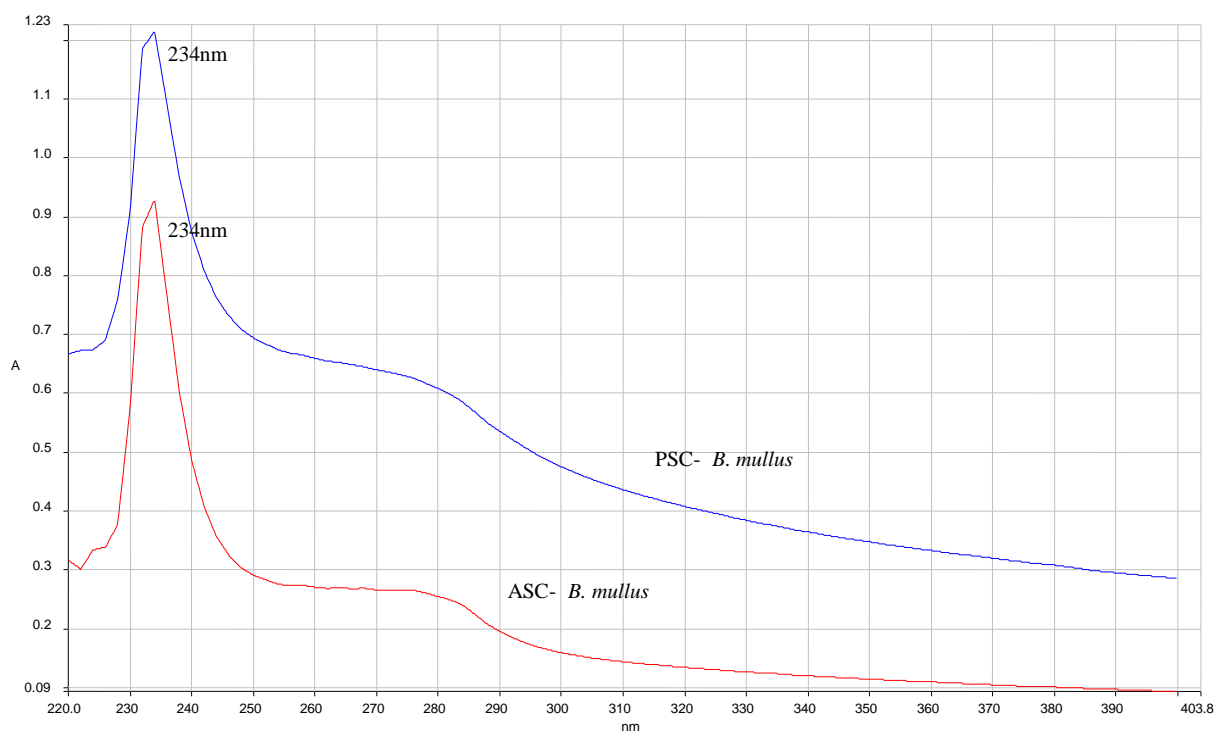


Διάγραμμα 24: Φάσμα UV για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *U. cirrosa*.

- *B. mullus*

Τα υπεριώδη φάσματα, που ελήφθησαν για τα ASC και PSC που απομονώθηκαν από το είδος *B. mullus*, εμφανίζονται στο διάγραμμα 25. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Τα κολλαγόνα ASC και PSC παρουσίασαν μέγιστη απορρόφηση στα 234 nm. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη μέγιστη απορρόφηση του μορίου κολλαγόνου (230 nm) που συναντάται στην βιβλιογραφία (Sampath K. et al., **2012**). Η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως στις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ των ομάδων C=O, -COOH και CONH₂ που βρίσκονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου (Heredía A. et al., **2013**). Σε αντίθεση με άλλους τύπους πρωτεϊνών, ανιχνεύθηκε κορυφή στα 280 nm χαμηλής έντασης, που αποδίδεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κολλαγόνα ASC και PSC έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά αμινοξέα όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη (Rao, K.P. et al., **1992**) τα οποία έχουν ζώνες απορρόφησης στις περιοχές από 250 έως 270, 270 έως 290 και 280 έως 300

nm, αντίστοιχα. Αυτή η μειωμένη ένταση της απορρόφησης των αρωματικών ομάδων πιθανόν να οφείλεται στη όξινη εκχύλιση του κολλαγόνου ή λόγω των εκπλύσεων ως προς την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, γι αυτό το λόγο λαμβάνουμε αυτό το προφίλ στις τιμές, και αυτές είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε κολλαγόνο τύπου I και II, από λέπια *S. longiceps* των (K. Muthumari et al., 2016) και λέπια από *M. miiuy* (Long-Yan Li. et al., 2016).

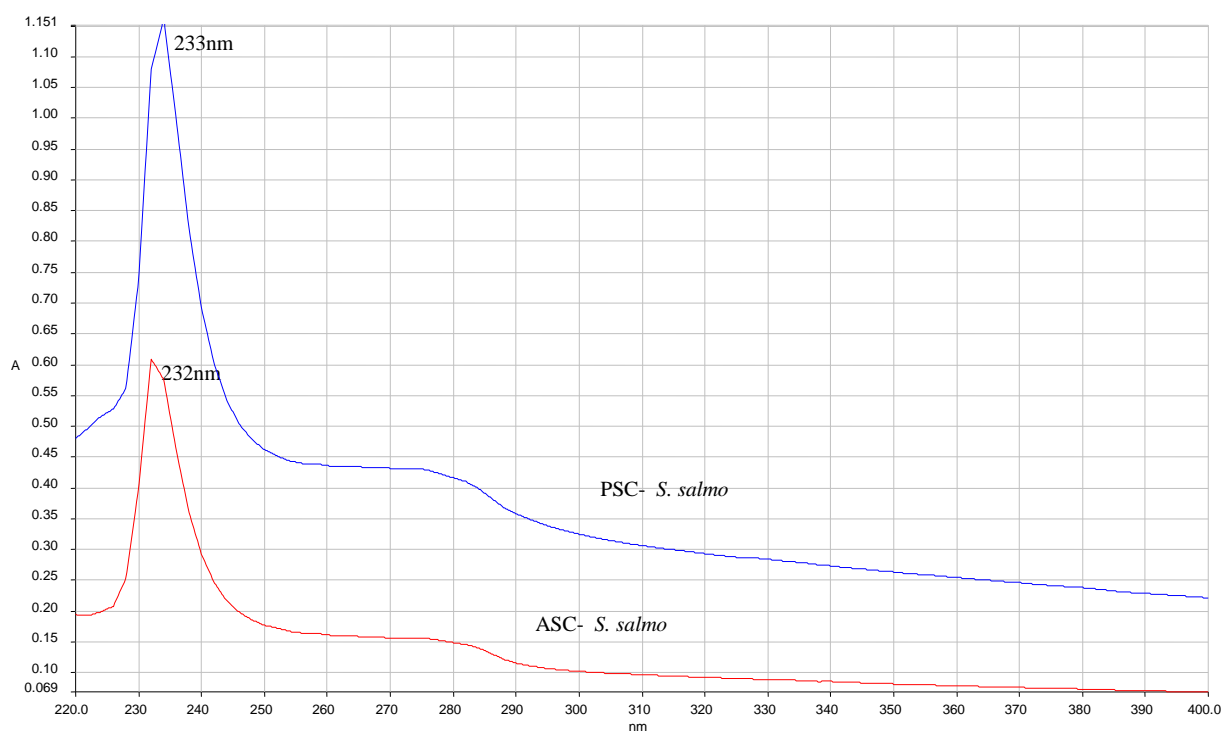


Διάγραμμα 25: Φάσμα UV για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *B. mullus*.

- *S. salmo*

Τα υπεριώδη φάσματα, που ελήφθησαν για τα ASC και PSC που απομονώθηκαν από το είδος *S. salmo*, εμφανίζονται στο διάγραμμα 26. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Τα κολλαγόνα ASC και PSC παρουσίασαν μέγιστη απορρόφηση στα 232, 233 nm αντίστοιχα. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη μέγιστη απορρόφηση του μορίου κολλαγόνου (230 nm) που συναντάται στην βιβλιογραφία (Sampath K. et al., 2012). Η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως στις μεταπτώσεις $n \rightarrow$

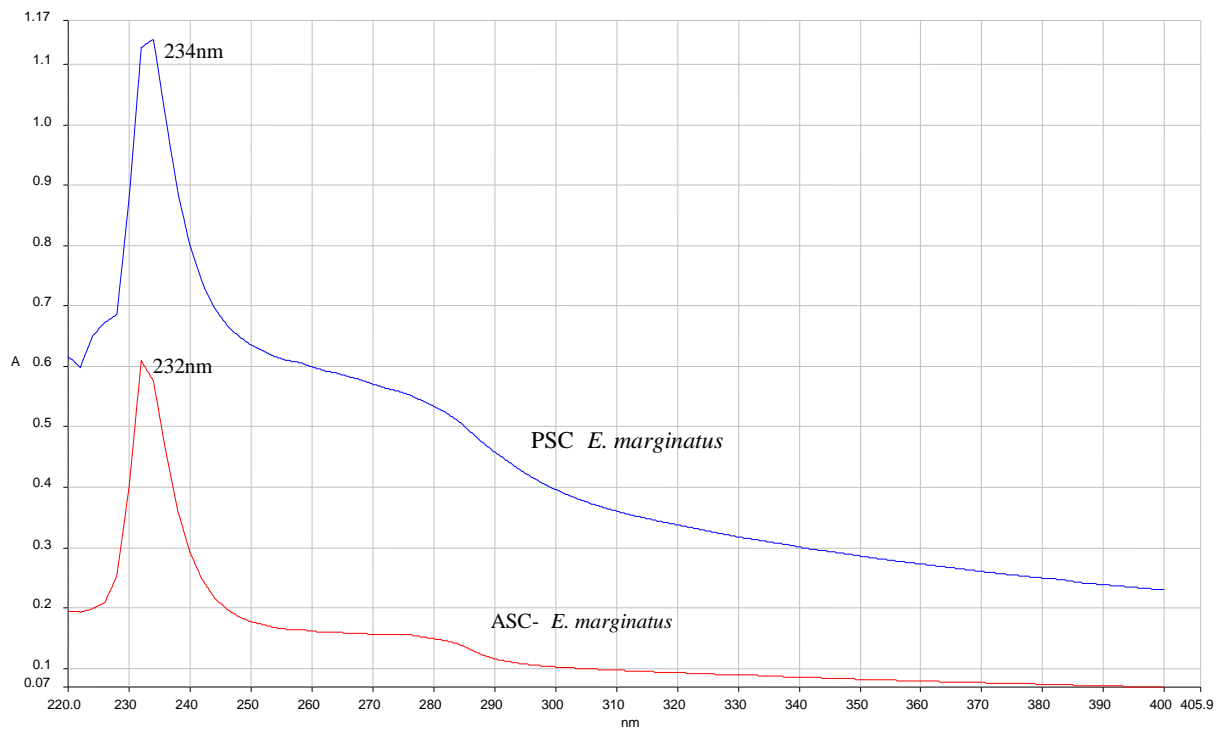
π^* των ομάδων C=O, -COOH και CONH₂ που βρίσκονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου (Heredia A. et al., 2013). Σε αντίθεση με άλλους τύπους πρωτεϊνών, ανιχνεύθηκε κορυφή στα 280 nm χαμηλής έντασης, που αποδίδεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κολλαγόνα ASC και PSC έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά αμινοξέα όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη (Rao, K.P. et al., 1992) τα οποία έχουν ζώνες απορρόφησης στις περιοχές από 250 έως 270, 270 έως 290 και 280 έως 300 nm, αντίστοιχα. Αυτή η μειωμένη ένταση της απορρόφησης των αρωματικών ομάδων πιθανόν να οφείλεται στη όξινη εκχύλιση του κολλαγόνου ή λόγω των εκπλύσεων ως προς την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, γι αυτό το λόγο λαμβάνουμε αυτό το προφίλ στις τιμές, και αυτές είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε κολλαγόνο τύπου I και II, από λέπια *S. longiceps* των (K. Muthumari et al., 2016) και λέπια από *M. miiuy* (Long-Yan Li. et al., 2016).



Διάγραμμα 26: Φάσμα UV για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *S. salmo*.

- *E. marginatus*

Τα υπεριώδη φάσματα, που ελήφθησαν για τα ASC και PSC που απομονώθηκαν από το είδος *E. marginatus*, εμφανίζονται στο διάγραμμα 27. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Τα κολλαγόνα ASC και PSC παρουσίασαν μέγιστη απορρόφηση στα 232, 234 nm αντίστοιχα. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη μέγιστη απορρόφηση του μορίου κολλαγόνου (230 nm) που συναντάται στην βιβλιογραφία (Samrath K. et al., **2012**). Η απορρόφηση αποδίδεται κυρίως στις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ των ομάδων C=O, -COOH και CONH₂ που βρίσκονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του κολλαγόνου (Heredia A. et al., **2013**). Σε αντίθεση με άλλους τύπους πρωτεϊνών, ανιχνεύθηκε κορυφή στα 280 nm χαμηλής έντασης, που αποδίδεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κολλαγόνα ASC και PSC έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αρωματικά αμινοξέα όπως φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη (Rao, K.P. et al., **1992**) τα οποία έχουν ζώνες απορρόφησης στις περιοχές από 250 έως 270, 270 έως 290 και 280 έως 300 nm, αντίστοιχα. Αυτή η μειωμένη ένταση της απορρόφησης των αρωματικών ομάδων πιθανόν να οφείλεται στη όξινη εκχύλιση του κολλαγόνου ή λόγω των εκπλύσεων ως προς την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, γι αυτό το λόγο λαμβάνουμε αυτό το προφίλ στις τιμές, και αυτές είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε κολλαγόνο τύπου I και II, από λέπια *S. longiceps* των (K. Muthumari et al., **2016**) και λέπια από *M. miuuy* (Long-Yan Li. et al., **2016**).



Διάγραμμα 27: Φάσμα UV για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *E. marginatus*.

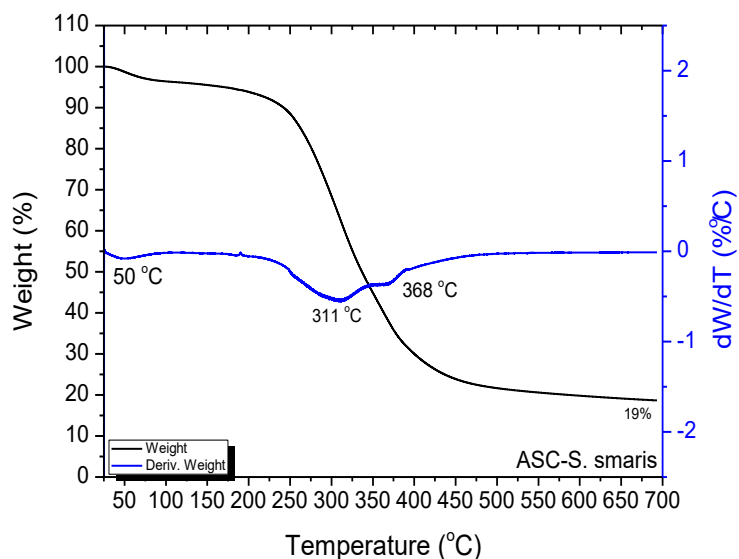
3.5 Θερμοβαρουμετρική ανάλυση, TGA

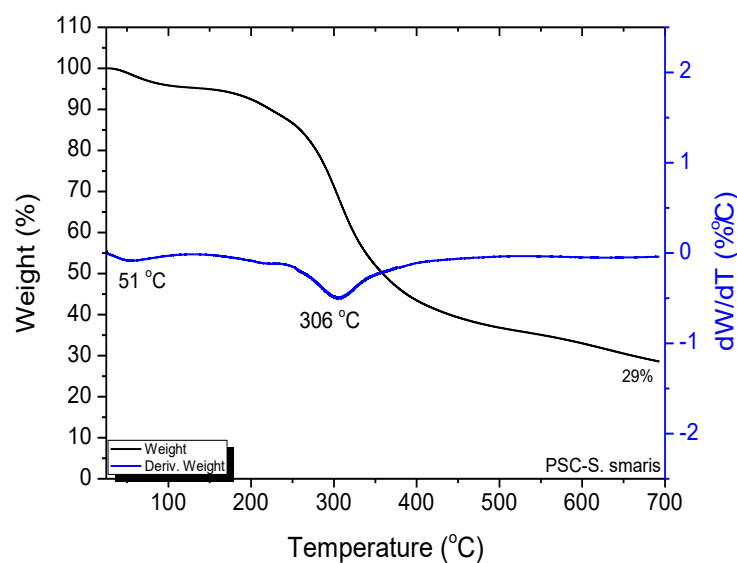
Τα φάσματα θερμοβαρουμετρικών αναλύσεων των ASC, PSC μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας εξοπλισμό Discovery-series TA/ TGA 55. Σε ένα δίσκο υποδοχής δείγματος ζυγίστηκε λυοφιλοποιημένο δείγμα μάζας ≥ 7 mg και ακολούθησε θέρμανση του από τους 25 °C (θερμοκρασία δωματίου) μέχρι τους 700 °C, με αύξηση της θερμοκρασίας 10 °C /min.

- *S. smarís*

Τα θερμογράμματα TGA για το διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από ολικούς ιχθύς που ανήκουν στο είδος *S. smarís* φαίνονται στα διαγράμματα 28, 29. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 50 και 51 °C για τα ASC και PSC, αντίστοιχα, λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{\max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 1.3% και 1,2% αντίστοιχα.. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης του κολλαγόνου αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του προσδεδμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης του κολλαγόνου παρουσιάζει $T_{\max,2}$ στους 311 °C και 306 °C για το ASC και PSC, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 37,4% και 31.7%. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση του κολλαγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH₃, CO₂, H₂S, SO₂ (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στην περίπτωση του ASC παρατηρείται και ένα επιπλέον σημείο καμπής (inflection point) στους 368 °C. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στις προσμίξεις που υπάρχουν στο συγκεκριμένο δείγμα, υπόθεση που ενισχύεται και από το υπέρυθρο φάσμα του (διάγραμμα 7). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση του κολλαγόνου από εκεί και μετά και μέχρι τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 19% και 29% για τα ASC και PSC, αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των κολλαγόνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην

βιβλιογραφία για ψάρια *L. rohita*, *L. catla* με τιμές $T_{max,1}= 88.68$ °C, $T_{max,2}= 334,43$ °C και $T_{max,3}= 636,53$ °C (Pati et al., 2010) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{max,1}= 174$ °C, $T_{max,2}= 411$ °C και $T_{max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.



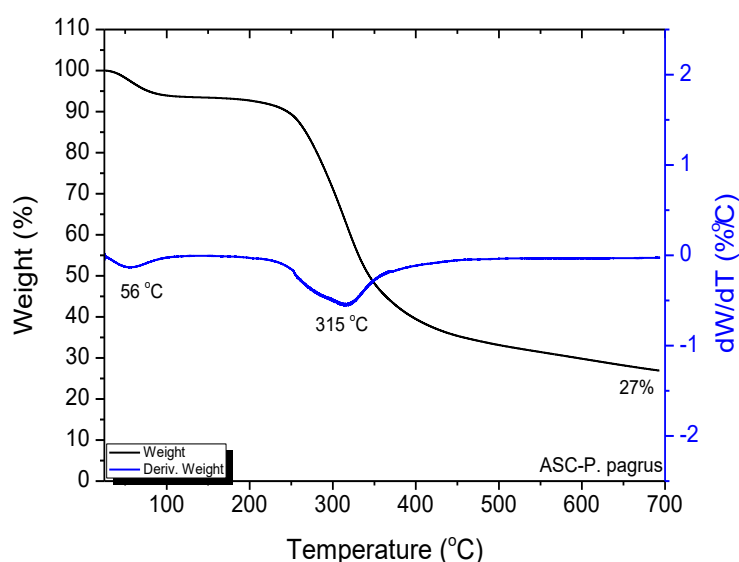


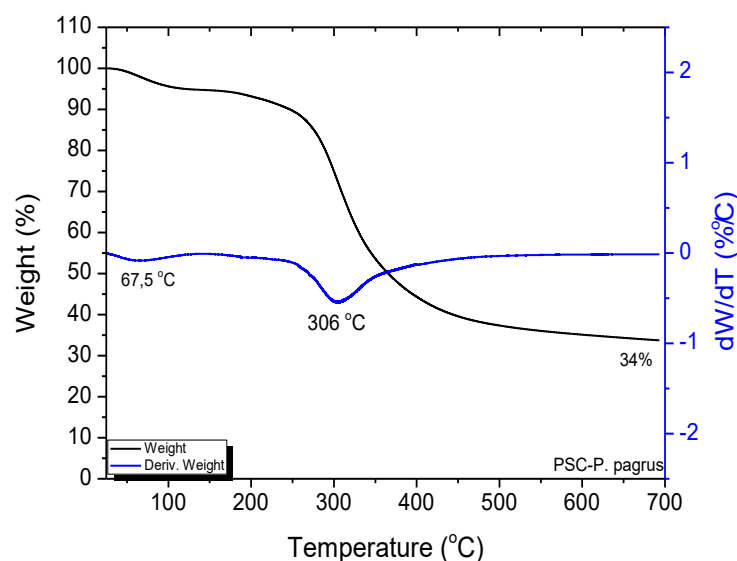
Διαγράμματα 28, 29: Θερμογράμματα TGA για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από ολικούς ιχθύες *S. smaris*.

- *P. pagrus*

Τα θερμογράμματα TGA για το διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια που ανήκουν στο είδος, *P. pagrus* φαίνονται στα διαγράμματα 30, 31. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 56 και 67 °C για τα ASC και PSC, αντίστοιχα, λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{\max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 2.5% και 2.2% αντίστοιχα. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης του κολλαγόνου αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του προσδεδεμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης του κολλαγόνου παρουσιάζει $T_{\max,2}$ στους 315 °C και 306 °C για το ASC και PSC, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 36.6% και 28.3%. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση του κολλαγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH_3 , CO_2 , H_2S , SO_2 (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση του κολλαγόνου από εκεί και

μετά και μέχρι τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 27% και 34% για τα ASC και PSC, αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των κολλαγόνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για ψάρια *L. rohita*, *L. catla* με τιμές $T_{max,1}= 88.68$ °C, $T_{max,2}= 334.43$ °C και $T_{max,3}= 636.53$ °C (Pati et al., 2010) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{max,1}= 174$ °C, $T_{max,2}= 411$ °C και $T_{max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.



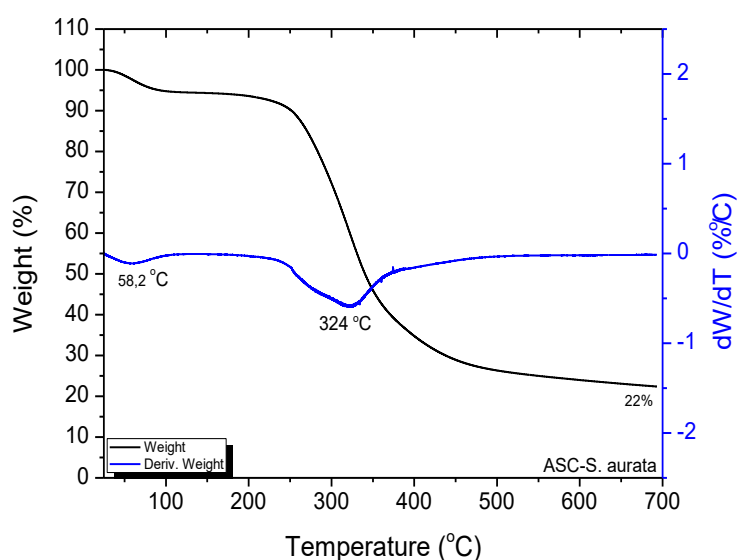


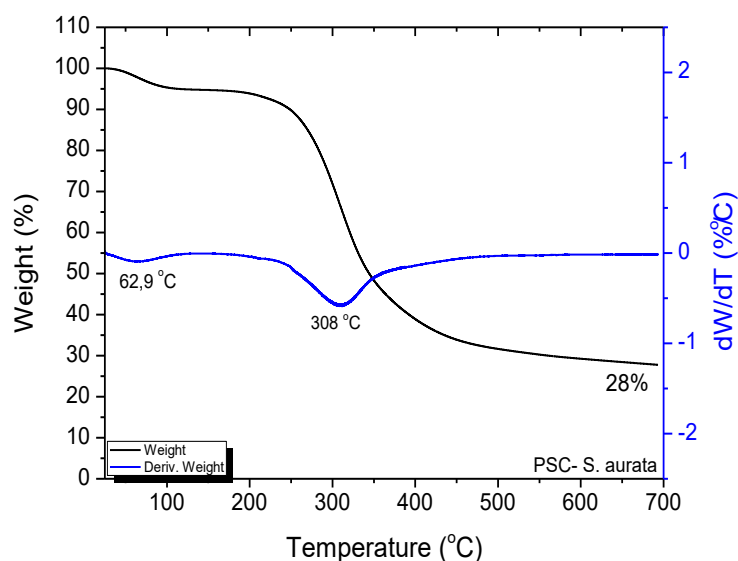
Διαγράμματα 30, 31: Θερμογράμματα TGA για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *P. pagrus*.

- *S. aurata*

Τα θερμογράμματα TGA για το διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια που ανήκουν στο είδος, *S. aurata* φαίνονται στα διαγράμματα 32, 33. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 58 και 63 °C για τα ASC και PSC, αντίστοιχα, λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 2.3% και 2.1% αντίστοιχα. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης του κολλαγόνου αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του προσδεδεμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης του κολλαγόνου παρουσιάζει $T_{max,2}$ στους 324 °C και 308 °C για το ASC και PSC, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 41.1% και 32.7% αντίστοιχα. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση του κολλαγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH_3 , CO_2 , H_2S , SO_2 (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση του κολλαγόνου από εκεί και

μετά και μέχρι τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 22% και 28% για τα ASC και PSC, αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των κολλαγόνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για ψάρια *L. rohita*, *. catla* με τιμές $T_{max,1}= 88.68$ °C, $T_{max,2}= 334,43$ °C και $T_{max,3}= 636,53$ °C (Pati et al., 2010) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{max,1}= 174$ °C, $T_{max,2}= 411$ °C και $T_{max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.



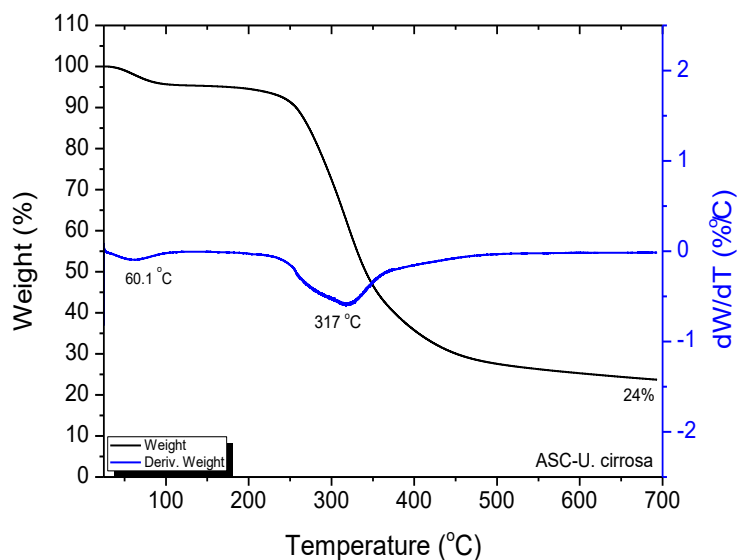


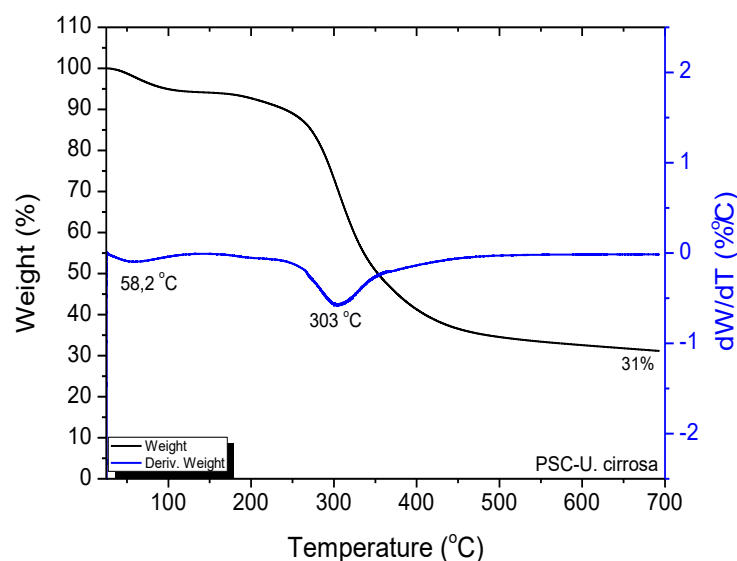
Διαγράμματα 32, 33: Θερμογράμματα TGA για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *S. aurata*.

- *U. cirrosa*

Τα θερμογράμματα TGA για το διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια που ανήκουν στο είδος, *U. cirrosa* φαίνονται στα διαγράμματα 34, 35. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 60.1 και 58.2 °C για τα ASC και PSC, αντίστοιχα, λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{\max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 1.9% και 2.1% αντιστοίχα. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης του κολλαγόνου αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του προσδεδωμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης του κολλαγόνου παρουσιάζει $T_{\max,2}$ στους 317 °C και 303 °C για το ASC και PSC, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 37% και 28.5%. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση του κολλαγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH_3 , CO_2 , H_2S , SO_2 (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση του κολλαγόνου από εκεί και μετά και μέχρι

τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 24% και 31% για τα ASC και PSC, αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των κολλαγόνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για ψάρια *L. rohita*, *L. catla* με τιμές $T_{max,1}= 88.68$ °C, $T_{max,2}= 334,43$ °C και $T_{max,3}= 636,53$ °C (Pati et al., **2010**) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{max,1}= 174$ °C, $T_{max,2}= 411$ °C και $T_{max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., **2019**). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.



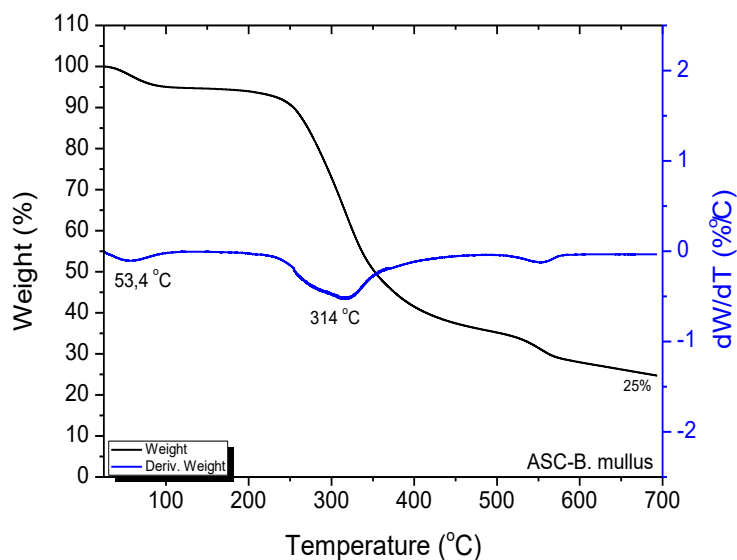


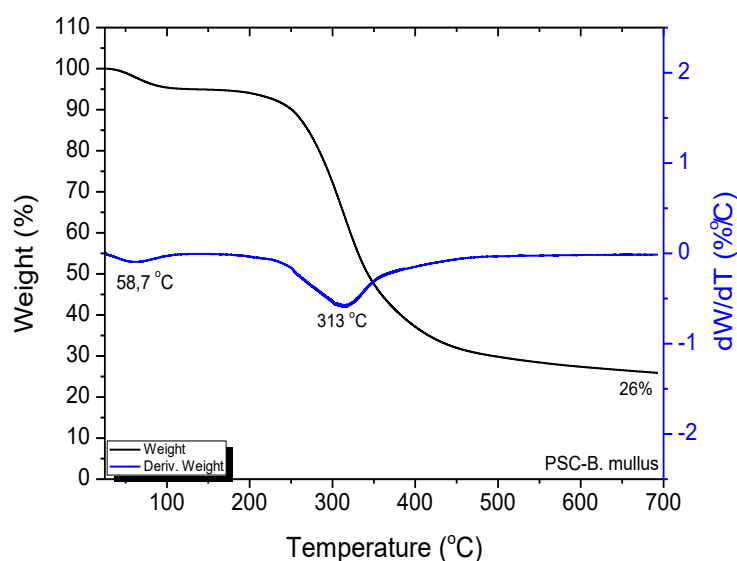
Διαγράμματα 34, 35: Θερμογράμματα TGA για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *U. cirrosa*.

- *B. mullus*

Τα θερμογράμματα TGA για το διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια που ανήκουν στο είδος, *B. mullus* φαίνονται στα διαγράμματα 36, 37. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 53.4 και 58.7 °C για τα ASC και PSC, αντίστοιχα, λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{\max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 1.8%. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης του κολλαγόνου αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του προσδεδεμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης του κολλαγόνου παρουσιάζει $T_{\max,2}$ στους 314 °C και 313 °C για το ASC και PSC, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 34.0% και 35.0%, αντίστοιχα. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση του κολλαγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH_3 , CO_2 , H_2S , SO_2 (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση του κολλαγόνου από εκεί και μετά και μέχρι

τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 25% και 26% για τα ASC και PSC, αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των κολλαγόνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για ψάρια *L. rohita*, *L. catla* με τιμές $T_{max,1}= 88.68$ °C, $T_{max,2}= 334,43$ °C και $T_{max,3}= 636,53$ °C (Pati et al., 2010) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{max,1}= 174$ °C, $T_{max,2}= 411$ °C και $T_{max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.



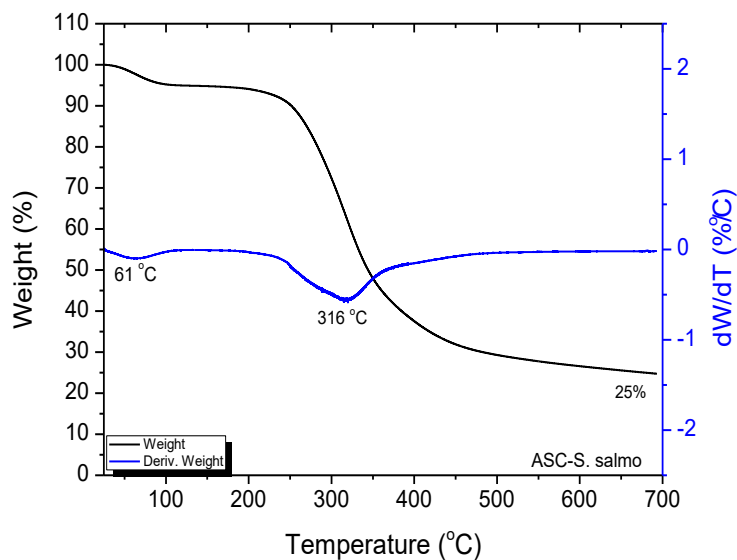


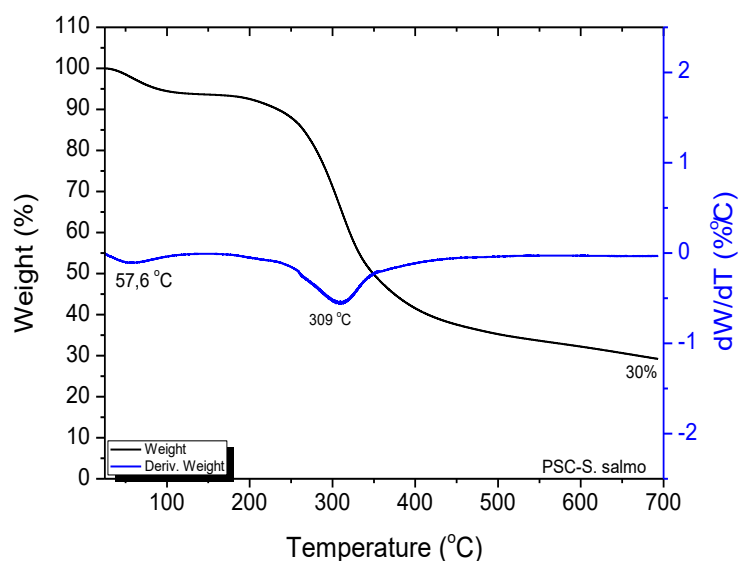
Διαγράμματα 36, 37: Θερμογράμματα TGA για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *B. mullus*.

- *S. salmo*

Τα θερμογράμματα TGA για το διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια που ανήκουν στο είδος, *S. salmo* φαίνονται στα διαγράμματα 38, 39. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 61 και 57.6 °C για τα ASC και PSC, αντίστοιχα, λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 2.1% και 2.3% αντίστοιχα. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης του κολλαγόνου αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του προσδεδεμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης του κολλαγόνου παρουσιάζει $T_{max,2}$ στους 316 °C και 309 °C για το ASC και PSC, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 36.10% και 34.20%. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση του κολλαγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH_3 , CO_2 , H_2S , SO_2 (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση του κολλαγόνου από εκεί και μετά και μέχρι

τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 25% και 30% για τα ASC και PSC, αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των κολλαγόνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για ψάρια *L. rohita*, *L. catla* με τιμές $T_{max,1}= 88.68$ °C, $T_{max,2}= 334,43$ °C και $T_{max,3}= 636,53$ °C (Pati et al., 2010) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{max,1}= 174$ °C, $T_{max,2}= 411$ °C και $T_{max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.



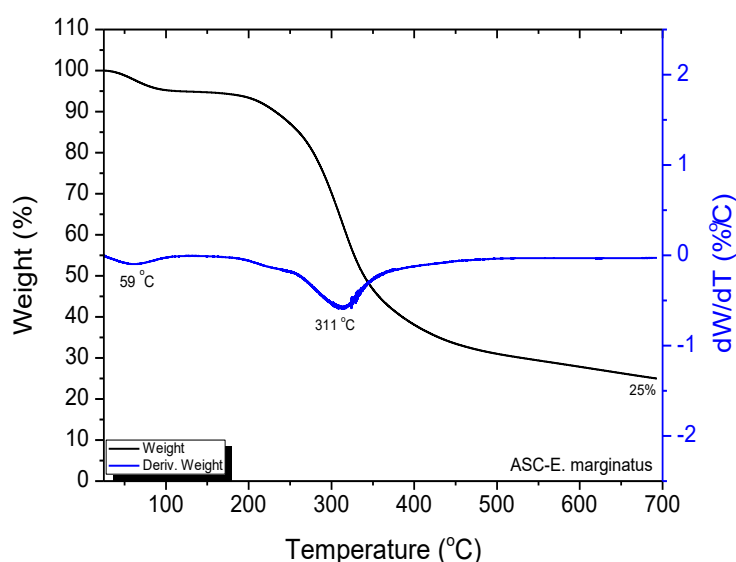


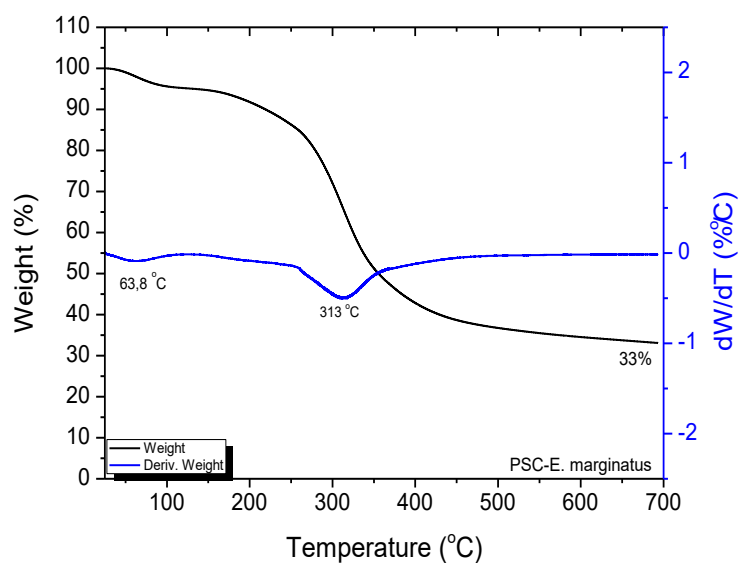
Διαγράμματα 38, 39: Θερμογράμματα TGA για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *S. salmo*.

- *E. marginatus*

Τα θερμογράμματα TGA για το διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια που ανήκουν στο είδος, *E. marginatus* φαίνονται στα διαγράμματα 40, 41. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 59 και 63.8 °C για τα ASC και PSC, αντίστοιχα, λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 2.0% και 2.1% αντίστοιχα. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης του κολλαγόνου αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του προσδεδεμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης του κολλαγόνου παρουσιάζει $T_{max,2}$ στους 311 °C και 313 °C για το ASC και PSC, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 35.9% και 34.2% αντίστοιχα. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση του κολλαγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH_3 , CO_2 , H_2S , SO_2 (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση του κολλαγόνου από εκεί και

μετά και μέχρι τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 25% και 33% για τα ASC και PSC, αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των κολλαγόνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για ψάρια *L. rohita*, *L. catla* με τιμές $T_{max,1}= 88.68$ °C, $T_{max,2}= 334.43$ °C και $T_{max,3}= 636.53$ °C (Pati et al., 2010) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{max,1}= 174$ °C, $T_{max,2}= 411$ °C και $T_{max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.

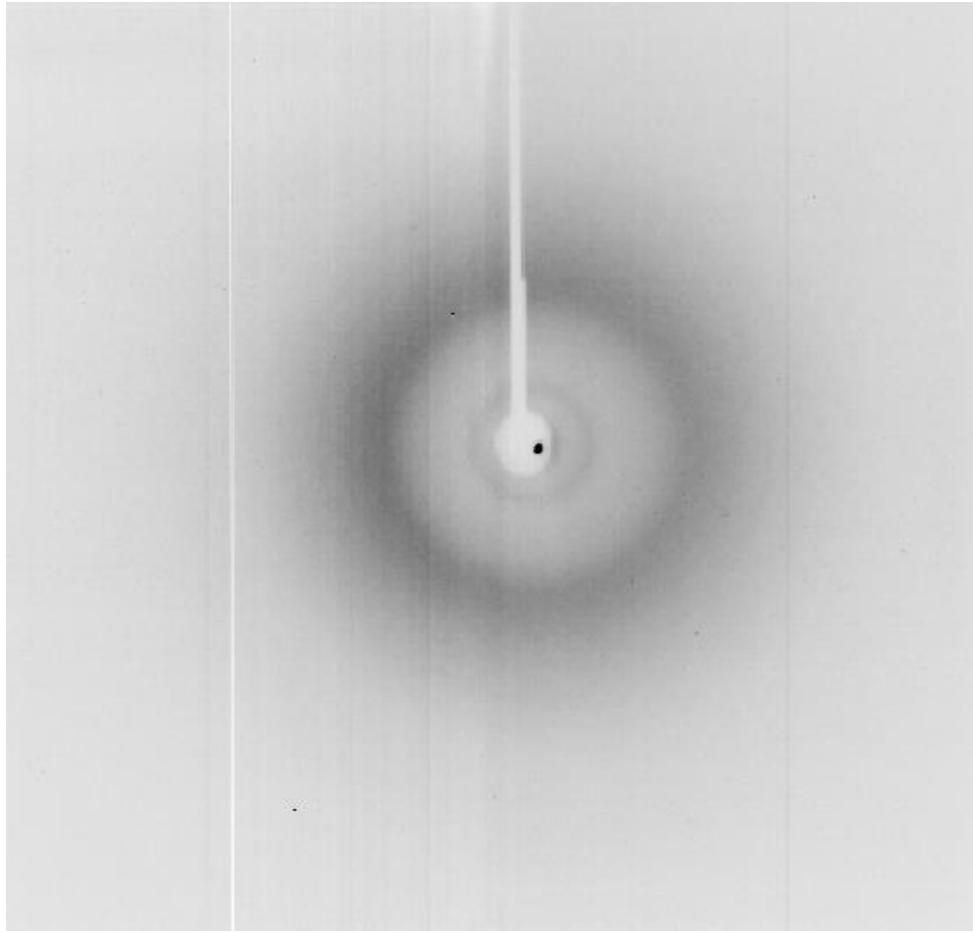




Διαγράμματα 40, 41: Θερμογράμματα TGA για διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνο που απομονώθηκαν από λέπια *E. marginatus*.

3.6 Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων-X (XRD)

Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα κολλαγόνου και ζελατίνης, αφού κονιοροποιήθηκαν, όσο ήταν δυνατόν, σε γουδί από αχάτη, τοποθετήθηκαν σε τριχοειδείς σωλήνες διαμέτρου 0,5 mm (εικ. 31). Κάθε τριχοειδής σωλήνας τοποθετήθηκε στην γωνιομετρική κεφαλή περιθλασιμέτρου Bruker D8-VENTURE γεωμετρίας-kappa με Cu Kα πηγή ακτίνων-X ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) και 2-D ανιχνευτή Photon100 και ακτινοβολήθηκε εκτελώντας πλήρη περιστροφή ($\varphi = 360^\circ$) για 180 s. Οι δακτύλιοι Debye που προέκυψαν (εικ. 30), ολοκληρώθηκαν με βήμα $0,05^\circ$ χρησιμοποιώντας το λογισμικό APEX3 της Bruker (Brucker et al., 2012) και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα αντίστοιχα διαγράμματα με τη βοήθεια του προγράμματος PROFEX (Dobelin N. Et al., 2015)



Εικόνα 30. Εικόνα περίθλασης από δείγμα *S. smarís* .

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας (CrI-Crystallinity Index) υπολογίστηκε για κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας το λογισμικό EVA της Bruker (Brucker et al., 2012) με βάση τα περιθλασιγράμματα που δίνονται στα αντίστοιχα διαγράμματα και την ακόλουθη εξίσωση που δίνεται από τους Nara και Komiya (Nara S. et al., 1983):

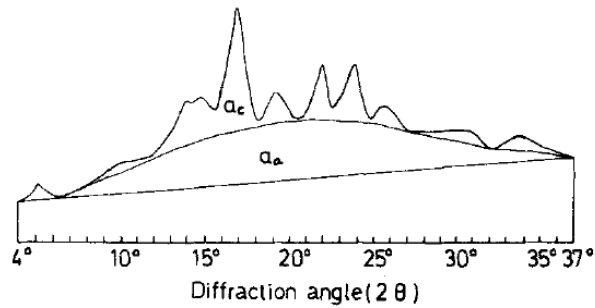
$$\text{CrI}(\%) = \frac{a_c}{a_a} \cdot 100\%$$

Όπου,

a_c : το εμβαδόν που ορίζεται από τη γραμμή βάσης* (baseline) και την καμπύλη της έντασης στο περιθλασίγραμμα (σχ. 11).

a_a : Εμβαδόν περιοχής που ορίζεται από την ευθεία γραμμή που ενώνει την ένταση στα όρια 2θ του περιθλασιγράμματος και την καμπύλη της έντασης στο περιθλασίγραμμα. Περιέχει και την περιοχή υποβάθρου (άμορφο) που ορίζεται από την ευθεία και τη γραμμή βάσης (σχ. 11).

* Γραμμή βάσης: Η ομαλή καμπύλη που ενώνει τα ελάχιστα της έντασης που αντιστοιχεί σε κρυσταλλικότητα (βλέπε Σχήμα 1)



Σχήμα 11. Καμπύλη της έντασης στο περιθλασίγραμμα.

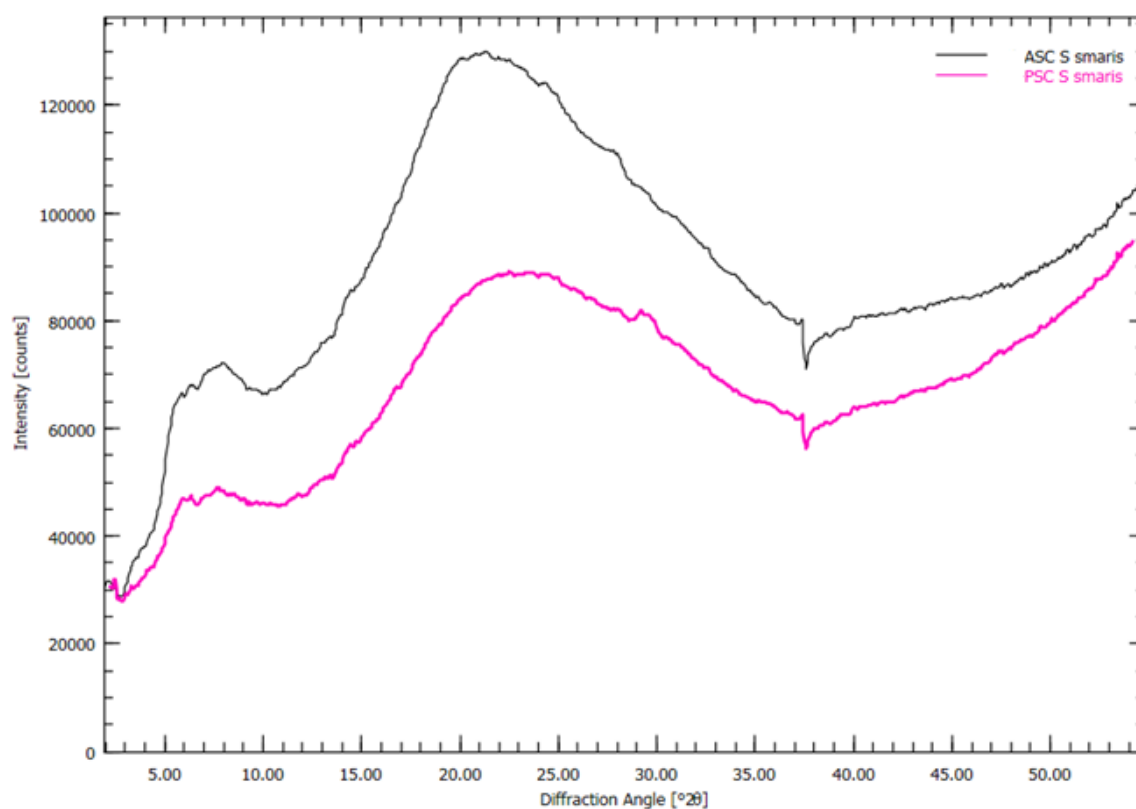


Εικόνα 31. Δείγματα κολλαγόνων (σκόνη) σε κυψελίδες χαλαζία.

- *S. smarís*

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού στο διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από ολικούς ιχθύς *S. smarís* φαίνονται στο διάγραμμα 42. Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2θ), $8,0^\circ$ και $20,67^\circ$ για το ASC και $7,78^\circ$ και $22,71^\circ$ για το PSC. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη

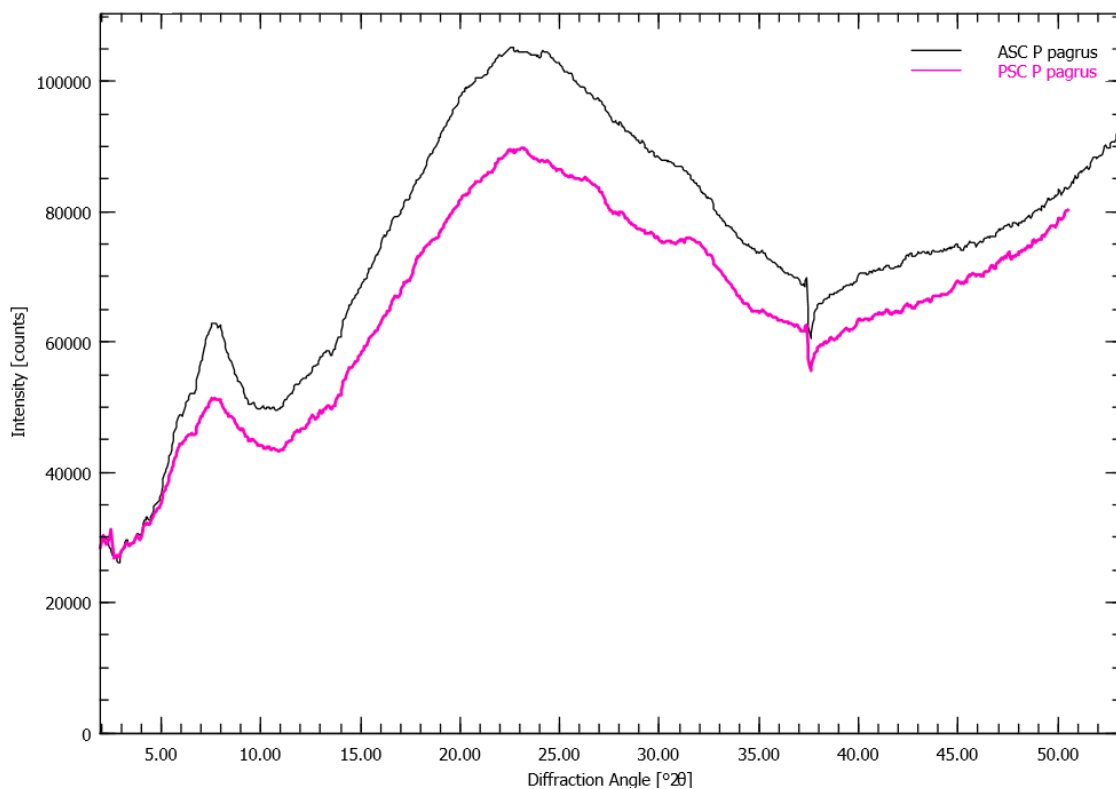
έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d \text{ (}\text{\AA}\text{)} = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν $11,05 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $4,30 \text{ \AA}$ για το ASC και $11,36 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,25 \text{ \AA}$ για το PSC, τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Muthumari et al., 2016; Zhang et al., 2011; Thuy Chinh et al., 2019). Τελικά το απομονωμένο κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης του κολλαγόνου και για το ASC είναι 25,30% και το PSC 49,40% (Chen et al., 2016).



Διάγραμμα 42: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για το δείγμα από το είδος *S. smaris*, λυοφιλοποιημένο δείγμα κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ και κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη.

- *P. pagrus*

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού στο διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *P. pagrus* φαίνονται στο διάγραμμα 43. Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2Θ), $7,76^\circ$ και $22,45^\circ$ για το ASC και $7,78^\circ$ και $22,62^\circ$ για το PSC. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d (\text{\AA}) = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{\AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν $11,39 \text{\AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,96 \text{\AA}$ για το ASC και $11,36 \text{\AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,93 \text{\AA}$ για το PSC τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Muthumari et al., 2016; Zhang et al., 2011; Thuy Chinh et al., 2019). Τελικά το απομονωμένο κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης του κολλαγόνου και για το ASC είναι 44,40% και το PSC 44,20% (Chen et al., 2016).

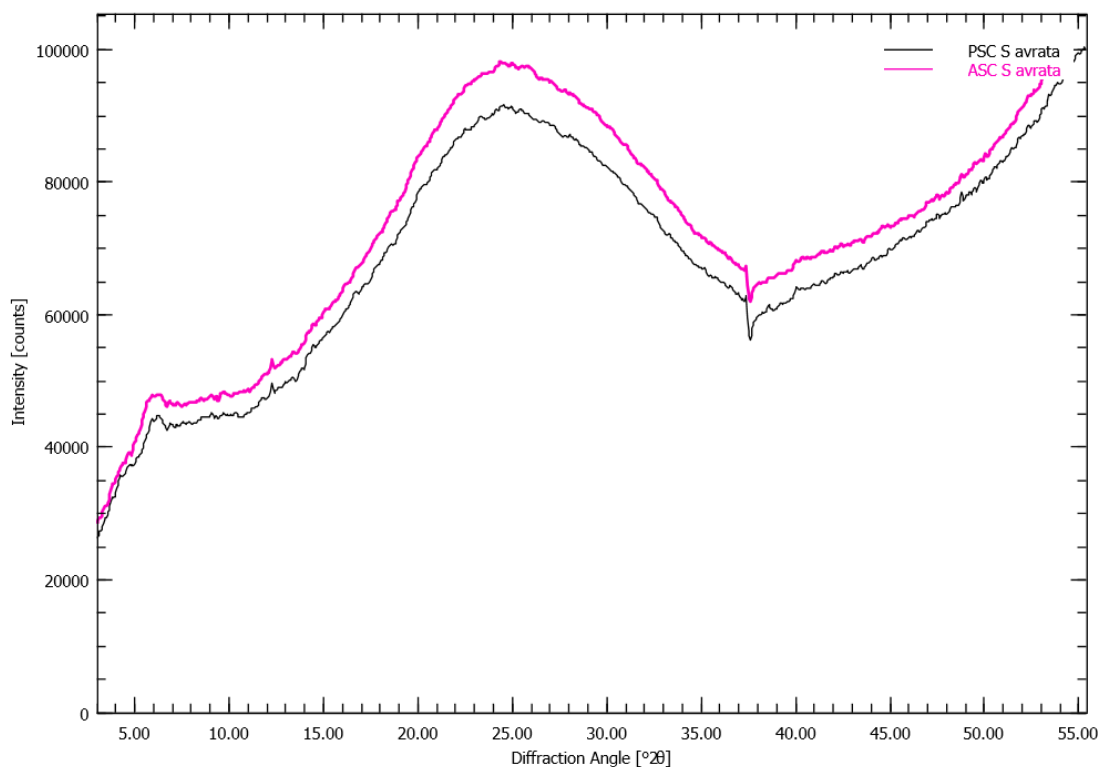


Διάγραμμα 43: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για το δείγμα από το είδος *P. pagrus*, λυοφιλοποιημένο δείγμα κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ και κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη.

- *S. aurata*

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού στο διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *S. aurata* φαίνονται στο διάγραμμα 44. Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2θ), $6,13^\circ$ και $24,11^\circ$ για το ASC και $6,29^\circ$ και $24,44^\circ$ για το PSC. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d \text{ (\AA)} = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν $14,42 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,69 \text{ \AA}$ για το ASC και $14,05 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,64 \text{ \AA}$ για το PSC, τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα

χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Muthumari et al., 2016; Zhang et al., 2011; Thuy Chinh et al., 2019). Τελικά το απομονωμένο κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης του κολλαγόνου και για το ASC είναι 42,20% και το PSC 47,30% (Chen et al., 2016).

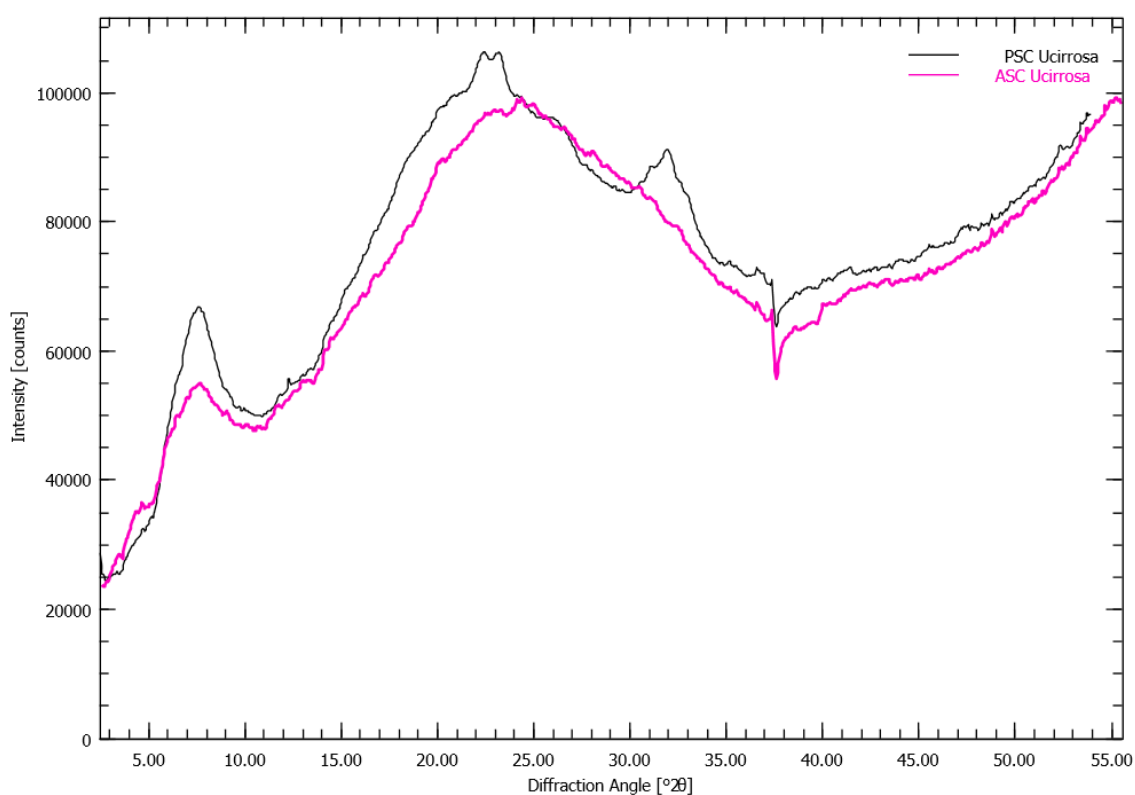


Διάγραμμα 44: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για το δείγμα από το είδος *S. aurata*, λυοφιλοποιημένο δείγμα κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ και κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη.

- *U. cirrosa*

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού στο διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *U. cirrosa* φαίνονται στο διάγραμμα 45. Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2θ), $7,63^\circ$ και $23,71^\circ$ για το ASC και $7,63^\circ$ και $22,88^\circ$ για το PSC. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d (\text{\AA}) = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{\AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των

επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν 11,58 Å και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν 3,75 Å για το ASC και 11,58 Å και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν 3,89 Å για το PSC, τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Muthumari et al., 2016; Zhang et al., 2011; Thuy Chinh et al., 2019). Τελικά το απομονωμένο κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης του κολλαγόνου και για το ASC είναι 44,20% και το PSC 41,90% (Chen et al., 2016).

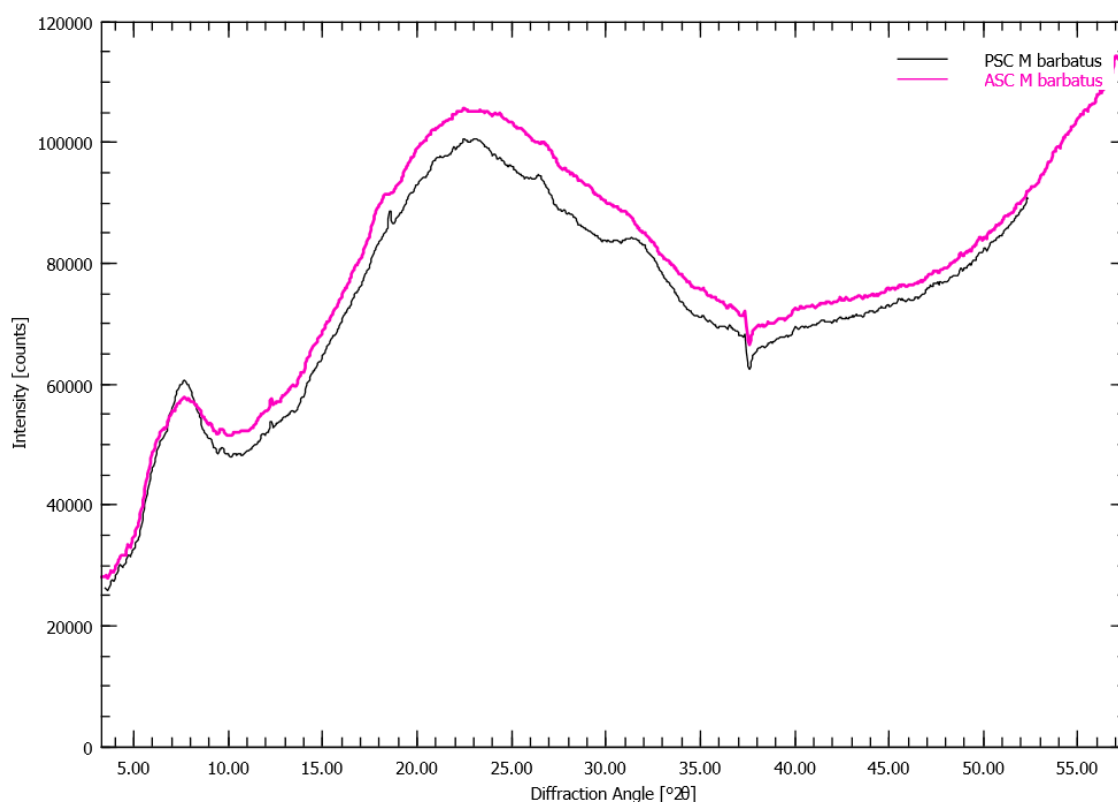


Διάγραμμα 45: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για το δείγμα από το είδος *U. cirrossa*, λυοφιλοποιημένο δείγμα κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ και κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη.

- *B. mullus*

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού στο διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *B. mullus* φαίνονται στο διάγραμμα 46.

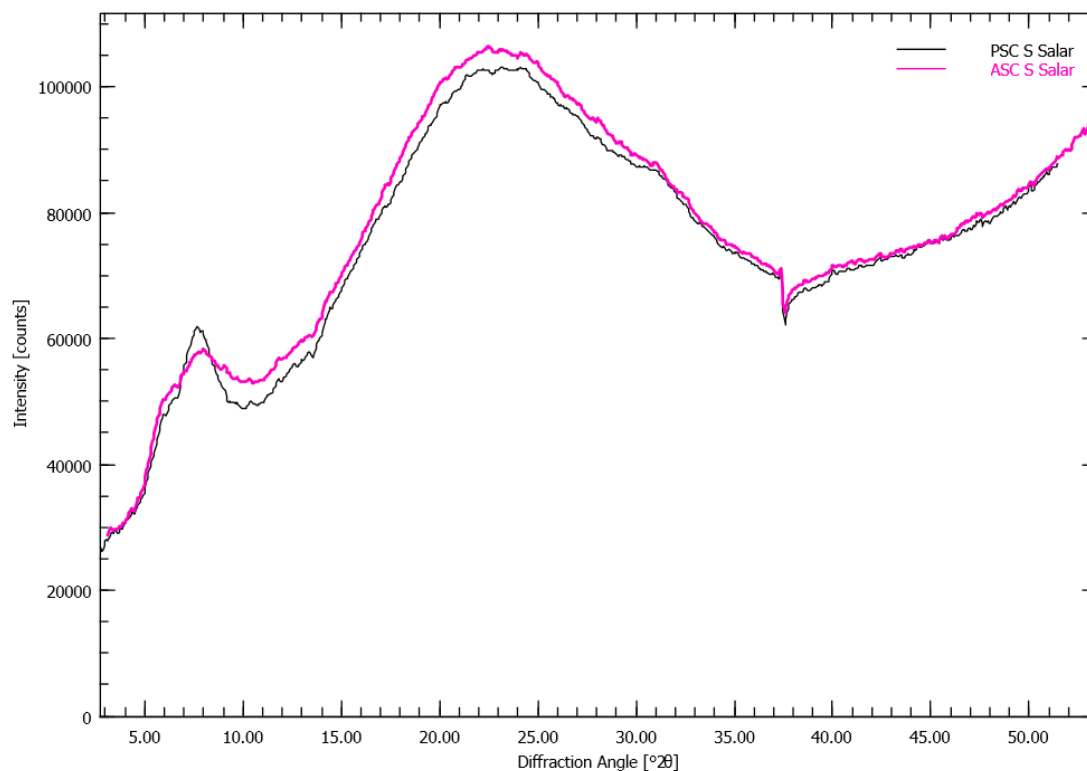
Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2θ), $7,93^\circ$ και $22,49^\circ$ για το ASC και $7,78^\circ$ και $22,50^\circ$ για το PSC. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d \text{ (\AA)} = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν $11,15 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,95 \text{ \AA}$ για το ASC και $11,36 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,95 \text{ \AA}$ για το PSC, τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Muthumari et al., 2016; Zhang et al., 2011; Thuy Chinh et al., 2019). Τελικά το απομονωμένο κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης του κολλαγόνου και για το ASC είναι 45,20% και το PSC 52,50% (Chen et al., 2016).



Διάγραμμα 46: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για το δείγμα από το είδος *B. mullus*, λυοφιλοποιημένο δείγμα κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ και κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη.

- *S. salmo*

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού στο διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *S. salmo* φαίνονται στο διάγραμμα 47. Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2Θ), $7,18^\circ$ και $22,07^\circ$ για το ASC και $7,95^\circ$ και $22,16^\circ$ για το PSC. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d (\text{\AA}) = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{\AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν $12,31 \text{\AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $4,30 \text{\AA}$ για το ASC και $11,12 \text{\AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $4,01 \text{\AA}$ για το PSC, τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Muthumari et al., 2016; Zhang et al., 2011; Thuy Chinh et al., 2019). Τελικά το απομονωμένο κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης του κολλαγόνου και για το ASC είναι 40,50% και το PSC 48,20% (Chen et al., 2016).

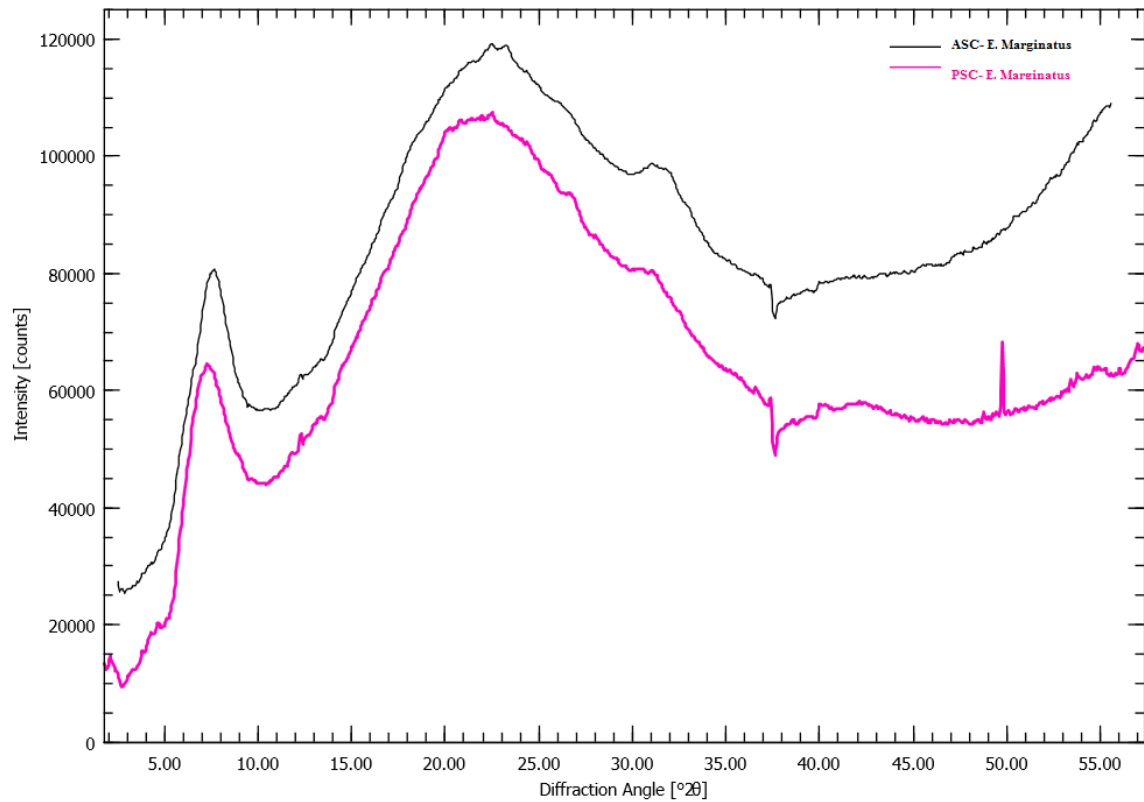


Διάγραμμα 47: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ για το δείγμα από το είδος *S. salmo*, λυοφιλοποιημένο δείγμα κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ και κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη.

- *E. marginatus*

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού στο διαλυτό σε οξύ και διαλυτό σε πεψίνη κολλαγόνου που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *E. marginatus* φαίνονται στο διάγραμμα 48. Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2Θ), $8,08^\circ$ και $22,71^\circ$ για το ASC και $7,51^\circ$ και $22,70^\circ$ για το PSC. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d \text{ (\AA)} = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν $10,94 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,92 \text{ \AA}$ για το ASC και $11,78 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,92 \text{ \AA}$ για το PSC, τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Muthumari et al., 2016; Zhang et al., 2011; Thuy Chinh et al., 2019). Τελικά το απομονωμένο

κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης του κολλαγόνου και για το ASC είναι 27,50% και το PSC 42,00% (Chen et al., 2016).



Διάγραμμα 48: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ για το δείγμα από το είδος *E. marginatus*, λυοφιλοποιημένο δείγμα κολλαγόνου διαλυτό σε οξύ και κολλαγόνου διαλυτό σε πεψίνη.

3.7 Περιεκτικότητα *E. marginatus* σε ζελατίνη.

Πίνακα 13: Παρουσιάζεται η επί τοις εκατό κατά βάρος περιεκτικότητα (% w/w) ζελατίνης σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες.

<i>E. marginatus</i>	Ζελατίνη (% νωπό βάρος)	Απόδοση (ξηρό βάρος)
Ζελατίνη 50 °C	0.21	0.39
Ζελατίνη 60 °C	1.25	2.33
Ζελατίνη 70 °C	3.81	7.11

Όσο αναφορά την ζελατίνη (πιν. 13), βλέπουμε να αυξάνεται η απόδοση αυξανόμενης της θερμοκρασίας εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα η υψηλότερη απόδοση ίση με 7.11% επιτυγχάνεται στους 70 °C, ενώ στους 60 °C υπολογίστηκε ίση με 2.33% και στους 50 °C ίση με 0.39%.

Σε σύγκριση με την βιβλιογραφία, όσο αναφορά την απόδοση σε ζελατίνη, οι K. Sockalingam et al., **2015**, εκχύλισαν ζελατίνη από λέπια *Oreochromis mossambicus* με απόδοση 11.88% (ξηρό βάρος) στους 65 °C. Έπειτα, οι Hanandyta Faradiella, et al., **2017**, εκχύλισαν ζελατίνη από λέπια *Lutjanus camphecanus* με απόδοση 11.80% (ξηρό βάρος) στους 80 °C με χρήση H₃PO₄ pH=6.98 και η εκχύλιση κράτησε 72 h και οι Benjamarorn Wonganu et al., **2020**, εκχύλισαν ζελατίνη από *Oreochromis niloticus* με απόδοση 4.60% (ξηρό βάρος) στους 60 °C και 15.70% (ξηρό βάρος) στους 60 °C με χρήση lime juice.

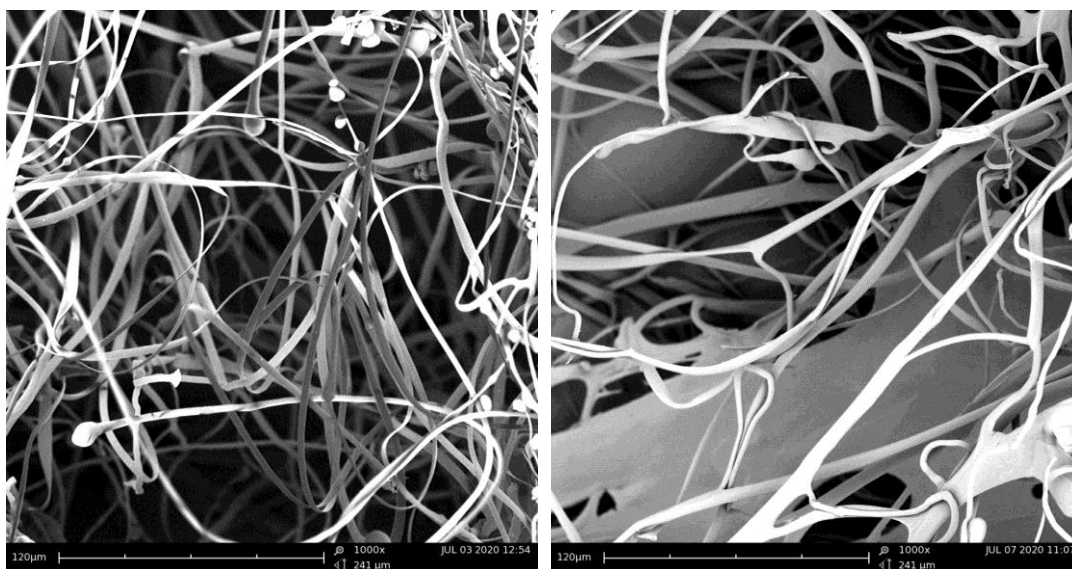


Εικόνα 31. Ζελατίνη από *E. marginatus*.

3.8 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, SEM ζελατίνης

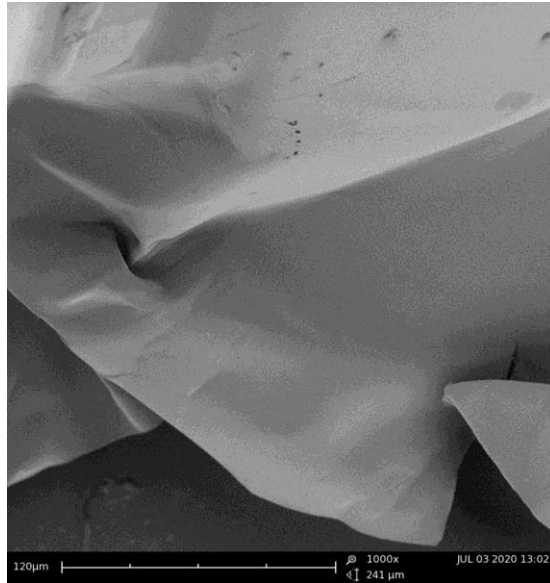
Τα δείγματα ζελατίνης που απομονώθηκαν από τα λέπια του ιχθύος *E. marginatus*, παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

Οι φωτογραφίες SEM (εικ. 32Α, 32Β, 32Γ), στους 50, 60 και 70 °C από λέπια που απομονώθηκαν και ανήκουν στο είδος *E. Marginatus*. Στην ζελατίνη που απομονώθηκε στους 50 °C, παρατηρούμε ένα δίκτυο ινών σε διαφορετικές διαμέτρους, πάχος και προσανατολισμό, έπειτα στους 60 °C παρατηρούμε αυτές οι ίνες να συνδέονται και να αρχίζουν να φτιάχνουν επίπεδα στρώματα και στους 70 °C τελικά να έχουν φτιαχτεί επίπεδα στρώματα. Αυτό συμβαίνει γιατί καθώς αυξάνουμε την θερμοκρασία το κολλαγόνο αρχίζει να χάνει την τριτοταγή δομή του διατηρώντας μόνο την πρωτοταγή και δευτεροταγή (Yang H. et al., 2008).



A.

B.



Γ.

Εικόνες 32A, 32B, 32Γ . Εικόνες SEM από δείγμα *E. marginatus* ζελατίνης, (A) στους 50 °C (μεγέθυνση 1000x) , (B) στους 60 °C (μεγέθυνση 1000x), (Γ) στους 70 °C (μεγέθυνση 1000x).

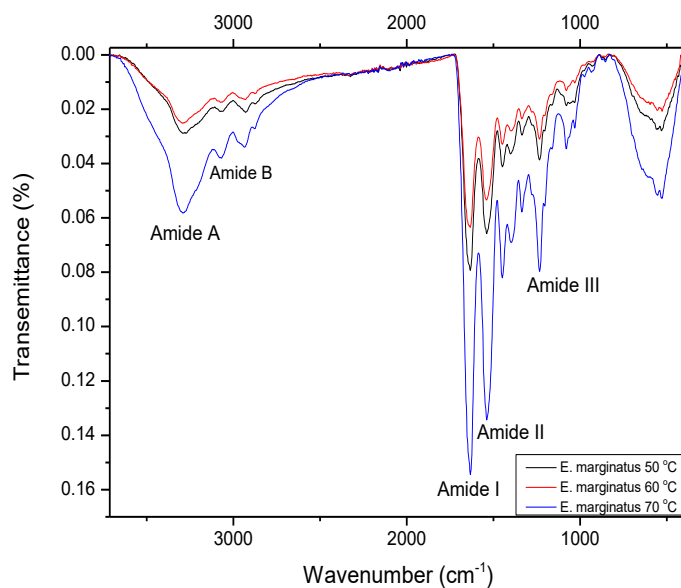
3.9 Χαρακτηρισμός ζελατίνης με φασματοσκοπία υπεράυθρου (IR)

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό με φασματοσκοπία IR είχαν προηγουμένως λυοφιλοποιηθεί, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία.

Τα FTIR φάσματα που αντιστοιχούν στη ζελατίνη που απομονώθηκαν από τα λέπια ιχθύ *E. marginatus*, σε θερμοκρασίες 50, 60 και 70 °C εμφανίζονται στο διάγραμμα 49. Η ζώνη απορρόφησης του Αμιδίου Α βρίσκεται συνήθως εντός του εύρους 3400-3440 cm^{-1} και συσχετίζεται συνήθως με τη δόνηση δεσμού του N-H. Όταν η -NH ομάδα του πεπτιδίου εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου, η θέση της απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (Doyle B.B. et al., **1975**). Στα δείγματά μας η ζώνη του αμιδίου Α βρέθηκε να είναι στα 3273 cm^{-1} για τους 50 °C, 3293 cm^{-1} για τους 60 °C και 3291 cm^{-1} για τους 70 °C, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εκτεταμένων δεσμών υδρογόνου. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου Β που σχετίζεται με την ασύμμετρη δόνηση της ομάδας -CH₂ και παρατηρείται συνήθως στα 3100-2950 cm^{-1} , βρέθηκε στα 3075 cm^{-1} για τους 50 °C και 60 °C και 3069 cm^{-1} για τους 70 °C

(Abe Y. et al. **1972**). Η κορυφή του αμιδίου I βρίσκεται συνήθως μεταξύ 1600 και 1700 cm^{-1} και σχετίζεται με την δόνηση δεσμού -C=O στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ή με δεσμό υδρογόνου σε συνδυασμό με -COO- . Συχνά η κορυφή του αμιδίου I συνδέεται με την ανάλυση της δευτερογενούς δομής των πρωτεϊνών μια που σπάνια μεταβάλλεται από την διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Η μέγιστη απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ 1645-1659 cm^{-1} για την διαμόρφωση της α -έλικας, η β -πτυχή εντοπίζεται στα από 1626 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , η β -στροφή στα 1691 και 1669 cm^{-1} , η τριπλή έλικα στα 1637-1638 cm^{-1} και 1633 cm^{-1} , πλευρική αλυσίδα στα 1608 cm^{-1} και μη οργανωμένη δομή στα 1647 cm^{-1} (Belbachir et al., **2009**; Petibois et al., **2006**). Στα δείγματά μας η δόνηση αυτή εμφανίζεται στα 1633 cm^{-1} και για τις τρεις θερμοκρασίες (Payne K. et al., **1988**). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου II, αντιπροσωπεύει τις κάμπεις -N-H συζευγμένες με τις δονήσεις -C-N , στο επίπεδο σύζευξης κάμπης από αμιδιικούς δεσμούς συμπεριλαμβανομένων ψαλιδοειδών δονήσεων (wagging) ομάδων -CH_2 από τις πλευρικές αλυσίδες της γλυκίνης και της προλίνης, αυτές οι τιμές βρίσκονται κοντά στα 1550-1450 cm^{-1} (Krimm S. et al., **1986**), στα δείγματα αυτές οι τιμές σημειώθηκαν στα 1539 cm^{-1} για τους 50 °C και 70 °C και 1541 cm^{-1} για τους 60 °C. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου III, εμφανίζεται συνήθως στα 1320–1220 cm^{-1} και οφείλεται στην δόνηση -NH με δόνηση -CN , τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελικοειδή ακεραιότητα του κολλαγόνου. Η τιμή αυτή βρέθηκε στα 1234 cm^{-1} και για τις τρεις θερμοκρασίες, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία δεσμών υδρογόνου (Krimm S. et al., **1986**).

Επιπλέον, οι κορυφές απορρόφησης στα 1448 cm^{-1} και για τις τρεις θερμοκρασίες, αντιστοιχούν σε δονήσεις των δακτυλίων πυρρολιδίνης που συναντώνται στην προλίνη και την υδροξυπρολίνη (Muyonga J. et al., **2004**). Η δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου διατηρείται κυρίως από περιορισμούς σχετικά με τις αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που επιβάλλεται από τους δακτυλίους πυρρολιδίνης της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της υδροξυπρολίνης βοηθά επίσης στη σταθεροποίηση τη δομή της τριπλής έλικας με σύνδεση αλυσίδας υδρογόνου μέσω γέφυρας με μόρια νερού, καθώς και άμεση σύνδεση υδρογόνου σε μια καρβοξυλική ομάδα.



Διάγραμμα 49: Φάσμα IR για το δείγμα από Ροφό, απεικονίζεται το μήκος κύματος συνάρτηση της αναλογίας για την ζελατίνη σε θερμοκρασίες 50 °C, 60 °C και 70 °C.

Πίνακας 14. Απορροφήσεις αμιδίων ζελατίνης σε διαφορετικές θερμοκρασίες

	Αμίδιο A	Αμίδιο B	Αμίδιο I	Αμίδιο II	Αμίδιο III
Ζελατίνη 50 °C	3273	3075	1633	1539	1234
Ζελατίνη 60 °C	3293	3075	1633	1541	1234
Ζελατίνη 70 °C	3291	3069	1633	1539	1234
^a <i>Katsuwonus pelamis</i> (scales)	3325	2977	1689	1484	1209
^b <i>Oreochromis niloticus</i> (skin)	3429	2929	1658	1542	1240

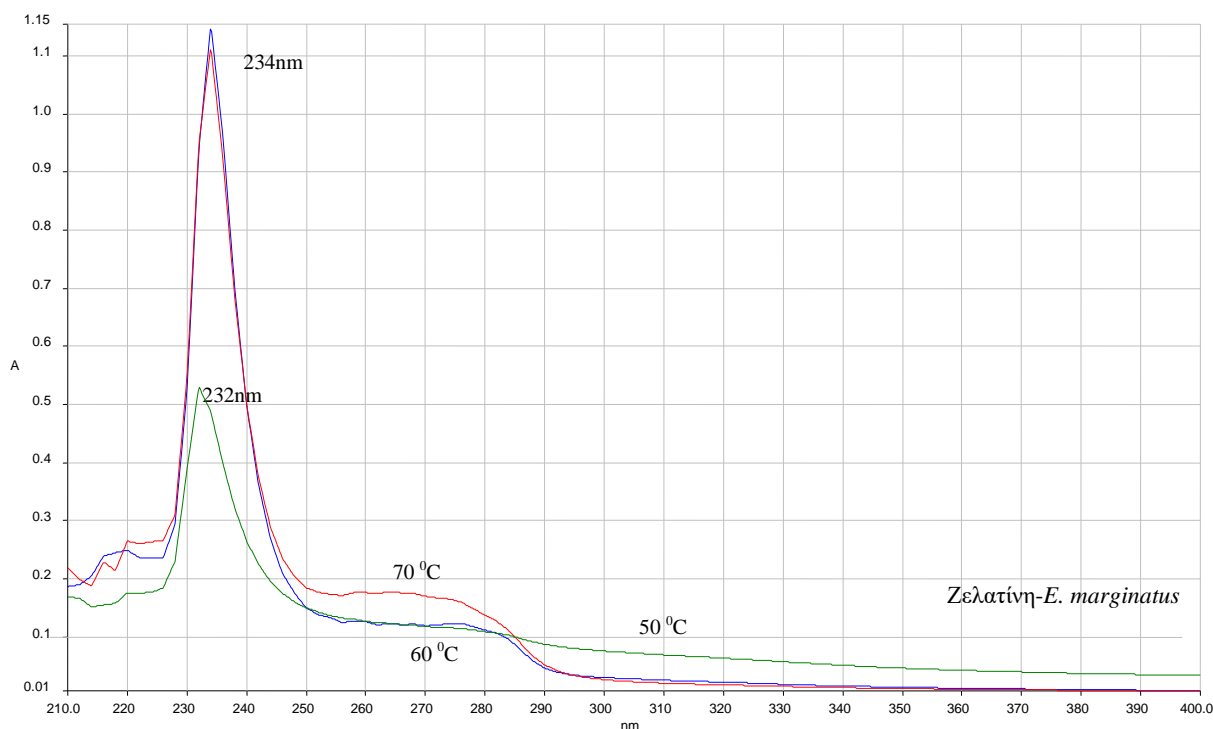
a: Qiu Yi-Ting et al., 2019, b: Bagus Sediadi et al., 2018

Συνολικά, οι συχνότητες των απορροφήσεων μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών μας που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές (πιν. 14). Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου A, φανερώνει πώς οι $-NH$ των πεπτιδίων συμμετέχουν σε δεσμούς H, δηλαδή στους $50\text{ }^{\circ}C$ έχουμε περισσότερους δεσμούς H με $-NH$ ομάδες πεπτιδίων και λιγότερες σε σύγκριση με την βιβλιογραφία. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου B σχετίζεται με τις ασύμμετρες δονήσεις μεταξύ των $-NH_3^+$ και $=C-H$, υψηλός αριθμός στη ζώνης αμιδίου B δείχνει αύξηση των ελεύθερων ομάδων $-NH_3^+$ (Yi-Ting Qiu et al., **2019**). Στους $70\text{ }^{\circ}C$ ήταν χαμηλότεροι από εκείνους στους 50 και $60\text{ }^{\circ}C$ αλλά και από της βιβλιογραφίας, που σημαίνει ότι έχει περισσότερες ελεύθερες ομάδες $-NH_3^+$, διότι δημιούργησε λιγότερους δεσμούς υδρογόνου σε σύγκριση με τα άλλα δείγματα. Παρατηρούμε πως σχεδόν σε όλα τα δείγματα βάση των αναφορών των Belbachir et al., **2009**; Petibois et al., **2006**, έχουμε υψηλής ποιότητας ζελατίνης σε τριπλές έλικες και αυτό φανερώνεται και από την απορρόφηση αμιδίου I. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου I, είναι η πιο σημαντική για την ζελατίνη τιμή γιατί δηλώνει τον βαθμό κουλουριάσματος, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την σταθεροποίηση της τριπλής ελικοειδούς δομής. Αυτό φανερώνει ότι, η κάμψεις δονήσεων $-C=O$ μειώνονται επειδή μειώνονται οι δεσμοί H μεταξύ των ομάδων $-N-H$ και αυτό οφείλεται στην παρατεταμένη εκπλύσεις με οξικό οξύ (Bagus Sediadi et al., **2018**). Στα δείγματα μας και στις τρεις θερμοκρασίες είναι ίδια τιμή. Ένας χαμηλός αριθμός κύματος της ζώνης αμιδίου II, υποδηλώνει ότι η ζελατίνη έχει υψηλότερη τάξη δομής επειδή σχηματίζει περισσότερους δεσμούς υδρογόνου από ομάδες $N-H$ (Yi-Ting Qiu et al., **2019**). Αυτό σημαίνει ότι η ζελατίνη στους $60\text{ }^{\circ}C$ έχει μεγαλύτερη τάξη δομής, δηλαδή περισσότερους δεσμούς H, σε σύγκριση με τις άλλες δύο και την ζελατίνη της βιβλιογραφίας. Η ζώνη απορρόφησης αμιδίου III σχετίζεται με τη δομή της τριπλής έλικας της ζελατίνης, όπου και στις τρεις θερμοκρασίες είναι ίδια τιμή και μεγαλύτερη από της βιβλιογραφίας, τιμές που υποδουλώνουν ότι οι τριπλές έλικες μετατρέπονται σε τυχαία πηνία κατά την διάρκεια της θέρμανσης (Yi-Ting Qiu et al., **2019**).

3.10 Φασματοφωτομετρία απορρόφησης UV-Vis, ζελατίνης

Το φάσμα απορρόφησης UV τριών δειγμάτων ζελατίνης στους 50, 60 και 70 °C ελήφθησαν σε φασματογράφο PerkinElmer instruments, Lambda 40. Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν ≈ 12 mg και διαλύθηκαν σε 5 mL διαλύματος CH₃COOH (0.5 M). Το υπεριώδες φάσμα μετρήθηκε σε μήκος κύματος μεταξύ 200 και 400 nm με ταχύτητα σάρωσης 240 nm/min με ένα διάστημα 2 nm, το τυφλό διάλυμα ήταν το CH₃COOH (0.5 M).

Το υπεριώδες φάσμα που ελήφθησαν για τις ζελατίνες που απομονώθηκαν από το είδος *E. marginatus* εμφανίζεται στο διάγραμμα 50. Γενικά, η απορρόφηση UV οφείλεται στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς και τις πλευρικές αλυσίδες τους. Η ζελατίνη εμφανίζει δύο ζώνες απορρόφησης λόγω του πεπτιδικού δεσμού και των πλευρικών αλυσίδων των αρωματικών ομάδων που υπάρχουν σε αυτήν ($\pi \rightarrow \pi^*$ μετάβαση) στα 232 nm για την θερμοκρασία 50 °C και 234 nm για τις θερμοκρασίες 60 και 70 °C λόγω των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων ($n \rightarrow \pi^*$ μετάβαση) στα 280 nm (Heredia A. et al., 2013). Η ένταση στα 230 nm, ωστόσο, αυξάνεται σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη στα 280 nm, ομοίως για τους ίδιους λόγους όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στα προηγούμενα δείγματα για το λόγω ότι η ζελατίνη δεν διαφέρει πολύ ως προς το κολλαγόνο παρά μόνο ότι η ζελατίνη είναι μετουσιωμένη και η τριτοταγής δομή έχει καταστραφεί.



Διάγραμμα 50: Φάσμα UV για το δείγμα από *E. marginatus*, για την ζελατίνη σε θερμοκρασίες 50, 60 και 70 °C.

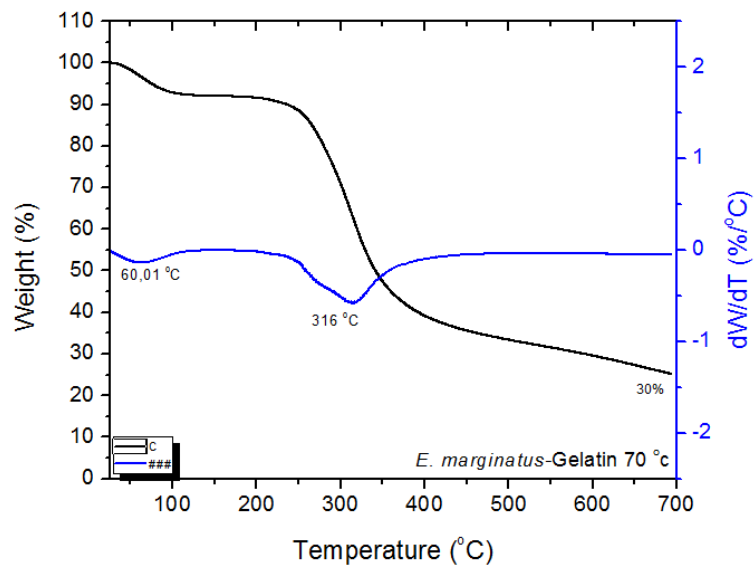
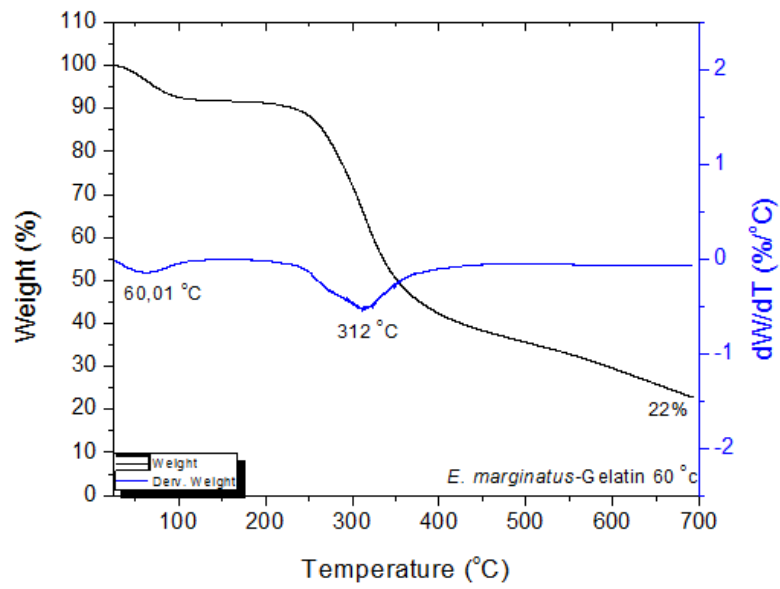
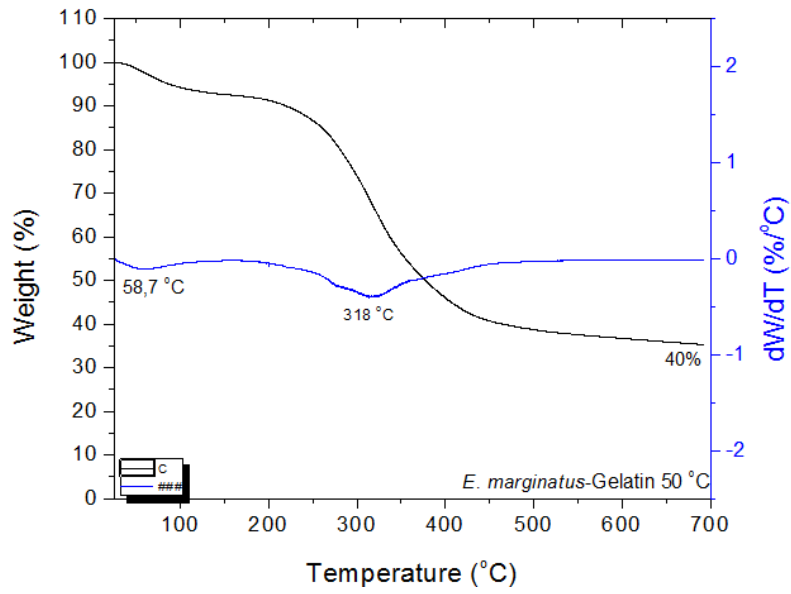
3.11 Θερμοβαρυστική ανάλυση TGA, ζελατίνης

Τα φάσματα θερμοβαρυστικών αναλύσεων της ζελατίνης στους 50, 60 και 70 °C μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας εξοπλισμό Discovery-series TA/ TGA 55. Σε ένα δίσκο υποδοχής δείγματος ζυγίστηκε λυοφιλοποιημένο δείγμα μάζας ≥ 7 mg και ακολούθησε θέρμανση του από τους 25 °C (θερμοκρασία δωματίου) μέχρι τους 700 °C, με αύξηση της θερμοκρασίας 10 °C /min.

Τα θερμογράμματα TGA της ζελατίνης στους 50, 60 και 70 °C, που απομονώθηκαν από λέπια που ανήκουν στο είδος *E. marginatus* φαίνονται στα διαγράμματα 51, 52 και 53. Αρχικά παρατηρείται ότι και τα δύο δείγματα παρουσιάζουν 2 στάδια αποσύνθεσης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην απώλεια νερού, όπου σε θερμοκρασία ίση με 58,7 °C (ζελατίνη-50 °C) και 60,0 °C (ζελατίνη-60 και 70 °C), λαμβάνει χώρα ο μέγιστος ρυθμός απώλειας βάρους ($T_{\max,1}$). Η απώλεια αυτή είναι 2.3%, 3.2% και 3.1% για τις τρεις ζελατίνες αντίστοιχα. Αυτό το στάδιο αποσύνθεσης της ζελατίνης αποδίδεται στην απομάκρυνση του προσροφημένου και του

προσδεδεμένου νερού. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τους 200 °C. Το επόμενο στάδιο αποδόμησης της ζελατίνης παρουσιάζει $T_{\max,2}$ στους 318 °C, 312 °C και 313 °C των ζελατίνων στους 50, 60 και 70 °C, αντίστοιχα και αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους ίση με 32.8%, 33.8% και 37.8%. Η απώλεια βάρους στο στάδιο αυτό αποδίδεται στην αποσύνθεση της ζελατίνης. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συμπεριλαμβάνει την θραύση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών προς σχηματισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως NH_3 , CO_2 , H_2S , SO_2 (Pati et al., 2010; Thuy Chint et al., 2019). Στους 500 °C έχει ουσιαστικά ολοκληρωθεί η αποσύνθεση της ζελατίνης από εκεί και μετά και μέχρι τους 700 °C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του βάρους. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα είναι 40%, 22% και 30% αντίστοιχα. Οι τιμές θερμοκρασίας του σημείου καμπής των ζελατίνων που απομονώσαμε ήταν μικρότερες από εκείνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για κολλαγόνα από ψάρια *L. rohita*, *L. catla* με τιμές $T_{\max,1}= 88.68$ °C, $T_{\max,2}= 334.43$ °C και $T_{\max,3}= 636.53$ °C (Pati et al., 2010) και επίσης μικρότερες και από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε διαλυτό σε οξύ κολλαγόνο που απομονώθηκε από λέπια *C. carpio* με τιμές $T_{\max,1}= 174$ °C, $T_{\max,2}= 411$ °C και $T_{\max,3}= 600$ °C (Thuy Chint et al., 2019). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες του νερού και του περιβάλλοντος διαβίωσης των ψαριών, που οδηγεί σε διαφορετική αμινοξική σύνθεση, αλληλουχίας αμινοξέων, μοριακό βάρος και επομένως και στην θερμική συμπεριφορά του κολλαγόνου.

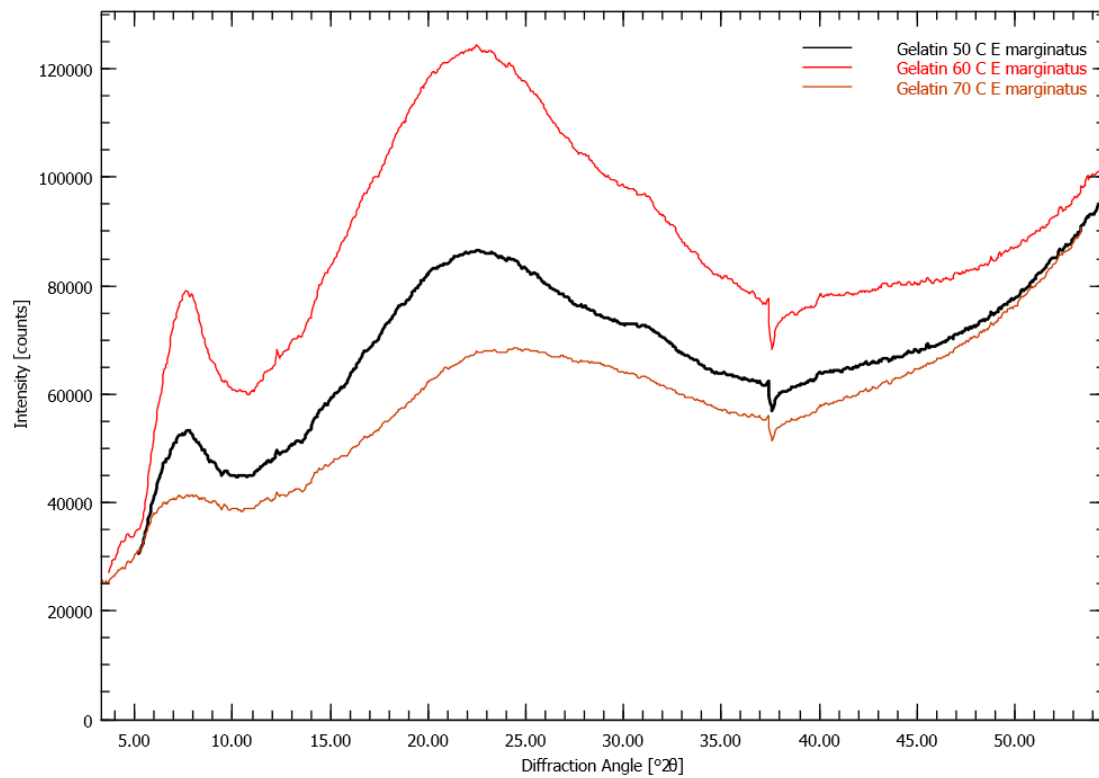
Οι αιτίες και λόγοι της απώλειας βάρους στην ζελατίνη είναι ίδιοι με του κολλαγόνου για το λόγο ότι η ζελατίνη είναι ένα παράγωγο του κολλαγόνου και η μόνη διαφορά είναι ότι η ζελατίνη έχει χάσει την τριτοταγής δομή της.



Διαγράμματα 51, 52, 53: Θερμογράμματα TGA για το δείγμα από *E. marginatus*, της ζελατίνης στους 50, 60 και 70 °C.

3.12 Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων-X (XRD), ζελατίνης

Τα περιθλασίγραμμα ακτίνων-X για τη διερεύνηση της κατανομής και του προσανατολισμού της ζελατίνης στους 50, 60 και 70 °C που απομονώθηκαν από λέπια ιχθύ *E. marginatus* φαίνονται στο διάγραμμα 54. Παρατηρούνται δύο κορυφές περίθλασης στις γωνίες περίθλασης (2θ), $8,07^\circ$ και $24,28^\circ$ στους 50 °C, $7,61^\circ$ και $22,45^\circ$ στους 60 °C και $7,71^\circ$ και $22,50^\circ$ στους 70 °C. Η πρώτη ήταν μικρή σε φάρδος σε σύγκριση με την δεύτερη. Οι κορυφές περίθλασης έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει διατεταγμένη δομή ή ένα διατεταγμένο απόσπασμα δομής. Από την εξίσωση Bragg: $d \text{ (\AA)} = \lambda / 2\sin\theta$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές (d) των επαναλαμβανόμενων αποστάσεων. Το d της αιχμηρής κορυφής ήταν $10,96 \text{ \AA}$ και εκείνο της ευρείας κορυφής ήταν $3,67 \text{ \AA}$ στους 50 °C, $11,61 \text{ \AA}$ και $3,96 \text{ \AA}$ στους 60 °C, $11,47 \text{ \AA}$ και $3,95 \text{ \AA}$ στους 70 °C, τα οποία σχετίζονταν με τη διάμετρο του μορίου κολλαγόνου τριπλής έλικας και της μονής αριστεράς αλυσίδας έλικα χαρακτηριστικά τα οποία αποδίδονται σε ένα άμορφο πολυμερές προϊόν (Asma et al., 2014). Τελικά το απομονωμένο κολλαγόνο έχει τριπλή ελικοειδή δομή. Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλικότητα, δηλαδή ο βαθμός δομικής τάξης της ζελατίνης και στους 50 °C είναι 37,40%, 60 °C είναι 37,20% και στους 70 °C 49,20% (Taokew et al., 2013).



Διάγραμμα 54: Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ από το είδος *E. marginatus*, λυοφιλοποιημένα δείγματα ζελατίνης στους 50, 60 και 70 °C.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι, χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα των Wang Lin et al. **2008**; Ikoma Toshiyuki et al. **2003**; Nagai Takeshi et al. **2000**, ο ιχθύς *S. smarís* (Μαρίδα) έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο διαλυτό σε οξύ (ASC), ίση με 2.07% (ξηρό βάρος). Όσον αφορά το διαλυτό σε πεψίνη (PSC) κολλαγόνο, χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα των Rajy et al., **2019**; Hamdam F.S. et al., **2019**, ο ιχθύς *S. salmo* (Σολωμός) παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό ίσο με 2.04% (ξηρό βάρος).

Η ανάλυση των διαφορετικών κολλαγόνων με SEM επιβεβαίωσε την ινώδη φύση του κολλαγόνου, ωστόσο, οι μορφολογικές δομές των ASC και PSC διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βαθμό της ινώδους και πορώδους φύσης τους. Μέσω των υπέρυθρων φασμάτων FT-IR, φαίνεται πως η δευτεροταγής δομή και η τριπλή ελικοειδής δομή των ASC και PSC διατηρήθηκαν άθικτα ακόμη και μετά την ενζυματική υδρόλυση με πεψίνη. Επίσης, ανάλυση του υπέρυθρου φάσματος των διαφορετικών κολλαγόνων δείχνει ότι με την μέθοδο εκχύλισης που ακολουθήθηκε παρελήφθησαν υψηλής ποιότητας προϊόντα. Συγκεκριμένα, οι χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης του κολλαγόνου, αμίδιο A, B, I, II και III, υποδεικνύουν κολλαγόνα υψηλής καθαρότητας και με τριπλή ελικοειδή δομή. Τα φάσματα UV-Vis των κολλαγόνων ASC και PSC παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στις τιμές ≈ 232 και 280 nm, τιμές που απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη. Όσο αναφορά την θερμική σταθερότητα των διαφορετικών κολλαγόνων, ο μέσος όρος της T μέγιστου ρυθμού απώλειας βάρους όλων των κολλαγόνων ήταν για το ASC, $T_{d,max1}=57$ °C και $T_{d,max1}=315$ °C και για το PSC, $T_{d,max1}=60$ °C και $T_{d,max1}=308$ °C. Τέλος, οι αναλύσεις περίθλασης ακτίνων X, έδειξαν ότι τα απομονωμένα κολλαγόνα διατηρούν την δομή τριπλής α -έλικας.

Τα αποτελέσματα από την ζελατίνη φανερώουν πως ο ιχθύς *E. marginatus* (Ροφός) έχει την υψηλότερη απόδοση σε ζελατίνη, ίση με 7.11% (ξηρό βάρος), όταν χρησιμοποιηθεί υψηλή θερμοκρασία εκχύλισης, ίση με 70 °C, . Η ανάλυση με SEM επιβεβαίωσε την μετουσιωμένη δομή της ζελατίνης. Μέσω των υπέρυθρων φασμάτων FT-IR, οι εκχυλισμένες ζελατίνες δίνουν προοπτικές υψηλής ποιότητας προϊόντων, λόγω ότι στις ζώνες απορρόφησης αμιδίου A, B, I, II και III, δείχνουν να έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Τα φάσματα UV-Vis. των ζελατίνων

δείχνουν απορρόφηση στις τιμές $\approx 232, 280$ nm, τιμές που απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη. Τέλος, οι αναλύσεις περίθλασης ακτίνων X, έδειξαν ότι οι ζελατίνες διατηρούν την βασική δομή του μητρικού κολλαγόνου.

Συμπερασματικά, μεγάλες ποσότητες λεπιών ιχθύων που απορρίπτονται ως απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημαντική πηγή κολλαγόνου ή ζελατίνης. Επομένως, και τα απόβλητα επεξεργασίας ιχθύων από επιλεγμένα είδη δίνονται να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική πηγή κολλαγόνου.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abe Y. et al., **1972**. Normal vibrations of crystalline polyglycine I, Biopolymers 11: 1817-1839.

Ahmed Raju et al., **2019**. Characterization of marine derived collagen extracted from the by products of big eye tuna (*Thunnus obesus*). International Journal of Biological Macromolecules, (135): 668–676.

Aichayawanich Sawanit et al., **2018**. Isolation and Characterization of Collagen from Red Cheek. International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 27–31.

Alves Ana L. et al., **2014**. Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen. Cosmetics, 4, 39.

Asara J.M. et al., **2007**. Protein sequences from mastodon and Tyrannosaurus rex revealed by mass spectrometry. Science 316: 280–85.

Asma Chetouani et al., **2014**. Physicochemical characterization of gelatin composite edibles films from polyion-complex hydrogels. J Chil. Chem. Soc., 59.

Antyszko M et al., **1996**. Collagen membranes of increased absorption as carriers of antiseptics. Polimery W Medycynie 26 (3–4): 21–28.

Bagus Sediadi et al., **2018**. The effect of soaking time in acetic acid solution to the physical characteristics of gelatin from nila fish (*Oreochromis niloticus*). AIP Conf. Proc. 2049: 030005-1–5.

Barnes, et al., **1988**. T.A. Respiratory Care Practice. Chicago: Year Book Medical Publisher, Inc..

Bateman J.F. et al., **1996**. Collagen superfamily, in: W.D. Comper (Ed.), Extracellular Matrix, Harwood Academic Press, Melbourne, pp. 22– 67.

Bates D.V. et al., **1971**. Respiratory Function in Disease. Philadelphia: W,B. Saunders Company.

Bauchot, M.-L. and J.-C. Hureau, et al., **1990**. Sparidae. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2. p. 790-812.

Belbachir Karima et al., **2009**. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy Anal Bioanal Chem, 395: 829–837

Ben-Tuvia, A. et al., **1990**. Mullidae. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2. p. 827-829.

Bender W. et al., **2011**. Harper’s Εικονογραφημένη Βιολογική Χημεία. Αθήνα: Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

Birk D.E. et al. **1988**. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma, *J. Cell Biol.* 106:999–1008.

Brazel D, et al. **1987**. Completion of the amino acid sequence of the $\alpha 1$ chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 nontriplet interruptions located within the collagenous domain. *Eur. J. Biochem.* 168:529–36

Brinckmann J. et al., **2005**. Collagens at a glance. *Top. Curr. Chem.* 247:1–6.

Bruker (**2012**). *Program name(s)*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Bruckner P. et al., **1994**, Structure and function of cartilage collagens, *Microsc. Res. Tech.* 28: 378– 384.

Bogue R. H. et al., **1923**. "Conditions Affecting the Hydrolysis of Collagen to Gelatin". *Industrial and Engineering Chemistry*. **15** (11): 1154–1159.

Buckley M. et al., **2008**. Comment on “Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry.” *Science* 319:33.

Burgoss C. et al., **1984**. *Techniques in Vis and UV Spectroscopy Series*. London: Chapman and Hall. 6. MARHALL, J., BOTHAM, M., RODWELL,

Carvalho, A.S.L. et al., **2003**. Heme and pH-dependent stability of an anionic hoseradish peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415, pp. 257-267.

Chao, L.N. and E. Trewavas, et al., **1990**. Sciaenidae. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2. p. 813-826.

Chen Sijin et al., **2016**. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocolloids* (52): 468-477.

Chinh Nguyen Thuy et al. **2019**. Characterization of Collagen Derived From Tropical Freshwater Carp Fish Scale Wastes and Its Amino Acid Sequence. *Natural Product Communications*, Volume: 14 issue:7.

Chuaychan Sira et al. **2015**. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Science and Technology* 63: 71-76.

Cohen-Solal L. et al., **1986**. Proline hydroxylation of collagens synthesized at different temperatures in vivo by two poikilothermic species, *Comp. Biochem. Physiol., B* 83:483–486.

C'úneo F. et al., **2010**. Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of post menopausal women with low mineral density. *Maturitas* 65 (3): 253–257.

Djabourov, M. et al., **1983**. Influence of thermal treatments on the structure and stability of gelatin gels. *Polymer*, 24 (5), p. 537–542.

Djabourov M. et al., **2013**. *Physical Gels from Biological and Synthetic Polymers*. Cambridge: Cambridge University Press.

Döbelin, N. et al., **2015**: a graphical user interface for the Rietveld refinement program *BGMN*, *Journal of Applied Crystallography* 48, 1573-1580.

Doyle B.B, et al., **1975**, Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides, *Biopolymers* 14: 937-957.

Ehrlich H. Chitin and collagen as universal and alternative templates in biomineralization. *Int. Geol. Rev.*, **2010**, 52, 661–699.

Exposito J. et al., **2002**. Evolution of collagen. *Anat. Rec.* 268, 302–316.

Hanandyta Faradiella et al., **2017**. The acid solvent experimental studies on gelatin producing by utilizing snapper fishes scales waste (*Lutjanus camphecanus sp.*). AIP Conference Proceedings, Volume 1823, Issue 1.

Ferraro Vincenza et al., **2013**. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues — A review. *Materials Science and Engineering C*, 33: 3111–3120.

Fleischmajer R. et al., **1990**. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules, *J. Struct. Biol.* 105:162– 169.

Fields G.B, et al., **1996**. Perspectives on the synthesis and application of triple-helical, collagenmodel peptides. *Biopolymers* 40: 345–57.

Fratzl P. (Ed). **2008**. Collagen: Structure and mechanics. Springer Science Business Media, LLC.

Hamdan, F. S. et al., **2019**. Isolation and characterization of collagen from fringe scale sardinella (*Sardinella fimbriata*) waste materials. *International Food Research Journal* 26 (1): 133 – 140.

Hatakeyama T., Liu Zhenhai, “Handbook of thermal analysis” (1998 Wiley).

Heemstra, P.C.,et al., **1990**. Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2. p. 768-772

Heemstra P.C. et al., **1993**. FAO Species Catalogue. Vol. 16. Groupers of the world (family Serranidae, subfamily Epinephelinae). 125 (16): 382 p.

Heredia A. et al., **2013**. Thermal, infrared spectroscopy and molecular modeling characterization of bone: An insight in the apatite-collagen type I interaction. *Adv. Biol. Chem*, 3, 215–223.

Haug I.J., et al., **2004**. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, p.203–213.

Hukmi N. M. M. et al., **2018**. Isolation and characterization of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC) extracted from silver catfish (*Pangasius sp.*) skin. *International Food Research Journal* 25 (5): 1785-1791.

Hulmes D.J. et al., **1981**. Molecular packing in collagen, *Nature* 293: 234– 239.

Ibrahim B. M. et al., **2013**. Fish bone waste utilization program for hydroxyapatite product: a case study of knowledge transfer from a university to coastal communities. *Journal of Environmental Research And Development*, 7 (3), pp. 1274-1281.

Ikoma Toshiyuki et al., **2003**. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32: 199–204.

Jeevithan E. et al., **2014**. Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties. *Marine Drugs* 12: 3852–3873.

Jeong Hee-Seok et al., **2013**. Isolation and Characterization of Collagen from Marine Fish (*Thunnus obesus*). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18: 1185-1191.

Joseph G. et al., **2008**. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 87: 1103–1111.

Junde Chen et al., **2016**. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). LWT - Food Science and Technology 66 (2016), 453-459.

Kiew et al., **2013**. The influence of Acetic Acid Concentration on the Extractability of Collagen from the Skin of *Hybrid Clarias* sp. And Its Physicochemical Properties: A Preliminary Study. Focusing on Modern Food Industry, 2 (3), pp. 123-128.

Kittiphattanabawon P. et al., **2005**. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chem. 89, 363–372.

Kittiphattanabawon et al., **2010**. Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). Food Chem. 119: 1519-1526.

Kittiphattanabawon Phanat et al., **2019**. Characteristics of acid and pepsin solubilized collagens from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale. Journal of Food and Agriculture. 31 (2): 95-101.

Kivirikko K.I. et al., **1973**. Further hydroxylation of lysyl residues in collagen by procollagen lysyl hydroxylase in vitro, Biochemistry 12: 4966– 4971.

Krimm S. et al., **1986**, Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins, Adv. Protein Chem. 38: 181-364.

Kristinsson H.G. et al., **2000**. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40 (1), pp. 43–81.

Kozłowska J. A. et al., **2015**. Northern pike (*Esox Lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. International Journal of Biological Macromolecules, Volume 81: 220-227.

Lee C. et al., **2001**. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 221 (1–2): 1–22.

Long-Yan Li et al., **2018**. Physicochemical and Antioxidant Properties of Acid and Pepsin-Soluble Collagens from the Scales of Miiuy Croaker (*Miichthys Miiuy*). *Mar. Drug*, 16: 394.

Mahboob S. et al., **2014**. Isolation and characterization of collagen from the waste material of two important freshwater fish species. *J Food Sci Technol*, 52(7): 4296-305.

Mahboob S. et al., **2014 a**. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24 (6): 1802-1810.

Mayne R. et al., **1989**, Cartilage collagens—what is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum.* 32-3:241– 246.

Mead J. et al., **1967**. Mechanical properties of lungs. *Physiological Reviews*, 41: 281–330.

Murad S. et al., **1981**. Grove D., Lindberg K.A., Reynolds G., Sivarajah A., Pinnell S.R. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2879-2882.

Muthukumara T. et al., **2014**. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113: 207– 212.

Muthumari K. et al., **2016**. Collagen Extract from Marine Finfish Scales as a Potential Mosquito Larvicide. *The Protein Journal*, volume 35: 391–400.

Muyonga J. et al., **2004**. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), Food Chem. 85: 81-89.

Nagai T. et al., **2000**. Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins. Food Chem 68 (3): 277–281.

Nagai T. et al., **2002**. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). Food Chem. 78 (2): 173–177.

Nara, S et al., **1983**, Studies on the Relationship Between Water-saturated State and Crystallinity by the Diffraction Method for Moistened Potato Starch. Starch/Stärke, 35: 407-410.

Niyibizi C. et al., **1989**. Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site, Connect. Tissue Res. 20: 247– 250.

Nomura Yoshihiro et al., **1996**. Preparation and Some Properties of Type I Collagen from Fish Scales. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, (60):12, 2092-2094.

Ogawa M. et al., **2003**. Biochemical properties of blackdrum and sheepshead seabream skin collagen. J. Agric. Food Chem. 51 (27): 8088–8092.

Olson O.P. et al., **1980**. Studies on formation and resorption of fish scales. Cell Tissue Res. 211, 303–316.

Osteoarthritis (OA), **2013**. Arthritis Research UK. [online] Available at: <http://www.arthritisresearchuk.org/arthritisinformation/conditions/osteoarthritis.aspx>.

Pallabi Pal. et al., **2016**. Accelerating full thickness wound healing using Collagen Sponge of Mrigal Fish (*Cirrhinus cirrhosus*). International Journal of Biological Macromolecules, S 0141-8130 (16): 30340-3.

Papaconstantinou et al., **1988**. Aspects of the life history and fishery of red pandora, *Pagelus erythrinus* (Sparidae) off Western Greece. *Cybium*, 12 (4): 267-280.

Pati Falguni et al., **2010**. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101: 3737–3742.

Page L.M. et al., **2011**. A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico. Boston: Houghton Mifflin Harcourt, 663p.

Pauling L. et al., **1951**. The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37:272–81.

Payne K. et al., **1988**, Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies, *Biopolymers* 27: 1749-1760.

Petibois Cyril et al., **2006**. Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Anal Bioanal Chem* 386: 1961–1966.

Pevzner PA. et al., **2008**. Comment on “Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry.” *Science* 321: 1040.

Plow EF et al., **2000**. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 21785.

Prabhu GA et al., **2004**. Utilization of pork collagen protein in emulsified and whole muscle meat products. *J Food Sci* 69 (5): C388–C392.

Prockop D.J. et al., **1998**. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling, *Matrix Biol.* 16:399–408.

Qiu Yi-Ting et al., **2019**. Gelatin and Antioxidant Peptides from Gelatin Hydrolysate of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Scales: Preparation, Identification and Activity Evaluation. *Mar. Drugs*, 17, 565.

Ramachandran GN, Kartha G. **1954**. Structure of collagen. *Nature* 174:269–70

Ramachandran GN, Kartha G. **1955**. Structure of collagen. *Nature* 176:593–95

Ramshaw JAM, et al., **1998**. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J. Struct. Biol.* 122:86–91.

Ramshaw J. et al., **2009**. Collagens as biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 20 (0): 3–8.

Rao K.P. et al., **1992**. Effect of crosslinking agent on the release of an aqueous marker from liposomes sequestered in collagen and chitosan gels. *J. Memb. Sci.*, 71, 161–167.

Regenstein J.M, et al., **2007**. Collagen and Gelatin from Marine By-Products. *Mazimising the Value of Marine By-Products*, 1st edn. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 279–303.

Rich A, Crick F.H. **1955**. The structure of collagen. *Nature*, 176, 915-916.

Rich A, Crick F.H. **1961**. The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.* 3: 483–506.

Rosert J. et al., **2002**. Type I collagen: structure, synthesis and regulation, *Principles in Bone Biology*, Academic Press, Orlando, pp. 189–210.

Ryan M.C et al., **1990**. Differential expression of a cysteine- rich domain in the amino- terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA, *J. Biol. Chem.* 265: 10334–10339.

Sadowska Maria et al., **2003**. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry* 81: 257–262.

Sampath Kumar et al., **2012**. Wound Healing Properties of Collagen from the Bone of Two Marine Fishes. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 18, 185–192.

Senaratne L.S. et al., **2006**. Isolation and characterization of collagen from brown backed toad fish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology* (97): 191–197.

Schuetz T. et al., **2013**. The microstructure of collagen type I gel cross-linked with gold nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 101: 118–25.

Schwartz M.A et al., **2001**. Integrin signaling revisited. *Trends in Cell Biology*, 11: 466.

Schweitzer M.H. et al., **2007**. Analyses of soft tissue from *Tyrannosaurus rex* suggest the presence of protein. *Science* 316: 277–80.

See S.F. et al., **2010**. Physiochemical properties of gelatins extracted form skins of different freshwater fish species. *International Food Research Journal*, 17, pp.809-816.

Shahidi F. et al., **1994**. Seafood processing by-products. *Seafoods chemistry, processing, technology and quality*. Glasgow: Blackie Academic Professional, pp. 11–26.

Sikorski Z. E. et al., **2001**. Chemical and Functional Properties of Food Proteins. Boca Raton: CRC Press. p. 242.

Skierka E, Sadowska M. et al., **2007**. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chem 105 (3): 1302–1306.

Silver D. et al., **1992**. Helical model of nucleation and propagation to account for the growth of type I collagen fibrils from symmetrical pointed tips: a special example of self-assembly of rod-like monomers, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:9860– 9864.

Slimane Emna Ben et al., **2018**. Collagen from Cartilaginous Fish By-Products for a Potential Application in Bioactive Film Composite. Mar Drugs, (6): 211.

Sockalingam K., et al., **2015**. Extraction and characterization of gelatin biopolymer from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) scales. AIP Conference Proceedings, volume 1669, Issue 1.

Somwangthanaroj A., **2010**. Rheology and Polymer Characterization, [pdf]. Available at: <<http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~sanongn1/rheology.pdf>> [Accessed 10 March 2015].

Stokes Debbie J. et al., **2008**. Principles and Practice of Variable Pressure Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM). Chichester: John Wiley & Sons.

Sujithra S., et al., **2013**. Isolation and determination of type I collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) WASTE. International Journal of Engineering and Technology (IJET) 5 (3): 2181-85.

Taokaew S., et al., **2013**. Biosynthesis and Characterization of Nanocellulose-Gelatin Films. Materials, 6, 782-794.

Thuy Le Thi Minh et al., **2016**. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry* (149): 264–270.

Veeruraj Anguchamy et al., **2013**. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*, 48: 1592–1602.

Veeruraj A. et al., **2015**. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*), *Food Hydrocoll.* 43: 708–716.

Veit G. et al., **2006**. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J. Biol. Chem.* 281: 3494–504.

Veis A. et al., **1988**. Collagen fibrillogenesis, in: M.E. Nimni (Ed.), *Collagen. Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, p. 113.

Von der Mark K. et al., **1981**. Localization of collagen types in tissues, *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 9 (1981): 265–324.

Von der Mark K. et al., **1999**, Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone, *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, Academic Press, Orlando, pp. 3–29.

Wang Lin et al., **2008**. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry* (108): 616–623.

Wang Lin et al., **2014**. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*, 38: 104-109.

Wang Yan et al., **2009**. Effect of EDTA, HCl, and Citric Acid on Ca Salt Removal from Asian (Silver) Carp Scales Prior to Gelatin Extraction. JOURNAL OF FOOD SCIENCE—Vol. 74, Nr. 6.

Werkmeister J.A. et al., **2000**. Immunology of collagen based biomaterials. In: DL Wise (ed.) Biomaterials and bioengineering handbook. Marcel Dekker, New York, pp. 739–759.

William Morrison et al., **2018**. Bones: All you need to know.

Wonganu, Benjamaporn, et al., **2020**. Application of Gelatin Derived from Waste Tilapia Scales to an Antibiotic Hydrogel Pad . E3S Web of Conferences 141.

Yang H. et al., **2008**. Effects of alkaline and acid pre-treatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. Food Hydrocolloids. 22 (8): 1541-1550.

Zhang Fengxiang et al., **2011**. Preparation and Characterization of Collagen from Freshwater Fish Scales. Food and Nutrition Sciences, (2): 818-823.

Zelechowska Elzbieta et al., **2010**. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Hydrocolloids, 24: 325–329.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Στεργιούδης Γ., «Ακτίνες X (XRD)», ΑΠΘ, **2007-2008**.

Κανελλόπουλος Χρήστος, **2017**. Περιθλασιομετρία ακτίνων X – Οδηγός εκτέλεσης και αποτίμησης ακτινοδιαγραμμάτων με χρήση του λογισμικού EVA της Bruker. Αθήνα.