



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ
(FOOD, NUTRITION & HEALTH)

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

In Vitro εκτίμηση βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου από ψητά υποπροϊόντα ψαριών

Λυδία Δ. Μπέλλου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Καψοκεφάλου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2024

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

In Vitro εκτίμηση βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου από ψητά υποπροϊόντα ψαριών

In vitro assessment of iron bioavailability from grilled fish by-products

Λυδία Δ. Μπέλλου

Εξεταστική Επιτροπή:

Καψοκεφάλου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α. (επιβλέπουσα)

Γαρδέλη Χρυσαιγή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

In Vitro εκτίμηση βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου από ψητά υποπροϊόντα ψαριών

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αξιοποίηση των αποβλήτων τροφίμων αποτελεί έναν στόχο για την Ευρωπαϊκή Ένωση, προκειμένου να μειωθεί η περιβαλλοντική και η οικονομική επιβάρυνση και να μεταβεί σε κυκλική οικονομία. Η Ελλάδα ανήκει στις 10 πρώτες χειρότερες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με τη σπατάλη τροφίμων. Λόγω της συνεχούς ανάπτυξης της ιχθυοκαλλιέργειας και της συνεχούς ζήτησης των προϊόντων της, δημιουργούνται καθημερινά μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, όπως κεφάλια, οστά, έντερα και κελύφη. Τα υποπροϊόντα αυτά αντιπροσωπεύουν το 30-70% του συνόλου των ψαριών και αποτελούν μία καλή πηγή μικρο- και μακροθρεπτικών συστατικών, αλλά τις περισσότερες φορές μένουν ανεκμετάλλευτα και καταλήγουν ως απόβλητα. Ο διατροφικός χαρακτηρισμός των υποπροϊόντων είναι απαραίτητος και για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, διότι τα υποπροϊόντα χρησιμεύουν ως πηγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ο σίδηρος ως μικροθρεπτικό συστατικό και βασικό στοιχείο διαφόρων μεταβολικών διεργασιών στον άνθρωπο ελέγχεται στην παρούσα μελέτη με την επιλογή του είδους *Sardina pilchardus* καταδεικνύεται η in vitro επίδραση των υποπροϊόντων της σαρδέλας στην απορρόφηση σιδήρου, ως προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η αξιοποίηση της επίδρασης των υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας ελεύθερης αλιείας στην απορρόφηση του σιδήρου. Τα δείγματα που τέθηκαν προς ανάλυση παραλήφθηκαν από την εταιρεία Κορνα, τα οποία συλλέχθηκαν το Δεκέμβριο του 2022.

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα τα οποία παραλήφθηκαν παρατηρείται θετική επίδραση των υποπροϊόντων σαρδέλας στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου με τον μοντέλο της in vitro πέψης.

Επιστημονική περιοχή: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: ψάρια; υποπροϊόντα; βιοδιαθεσιμότητα; σίδηρος; διατροφική σύσταση

In vitro assessment of iron bioavailability from grilled fish by-products

MSc Food, Nutrition & Health

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of Food Chemistry & Analysis

ABSTRACT

Valorization of food waste is an objective for the European Union in order to reduce environmental and economic burden and move to a circular economy. Greece belongs to the top 10 worst countries in the European Union in terms of food waste. Due to the continuous development of aquaculture and the constant demand for its products, large quantities of by-products are created daily, such as heads, bones, intestines, and shells. These by-products account for 30-70% of all fish and are a good source of micro- and macronutrients, but most of the time they go unexploited and end up as waste. The nutritional characterization of by-products is also necessary for the development of functional foods because by-products serve as a source of high added value compounds. Iron as a micronutrient and an essential element of various metabolic processes in humans is controlled in the present study with the selection of the species *Sardina pilchardus* demonstrating the in vitro effect of sardine by-products on iron absorption, as estimated bioavailability.

The purpose of this study is to exploit the effect of by-products (heads) of free-range sardines on iron absorption. The samples put forward for analysis were received by Konva, which were collected in December 2022.

From the analyzes performed and the results obtained, a positive effect of sardine by-products on the bioavailability of iron with the in vitro digestion model is observed.

Scientific area: Food Chemistry

Keywords: fish; by- products; bioavailability; iron; nutrition composition

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρία Κοινα για τη διάθεση των δειγμάτων υποπροϊόντων σαρδέλας, διότι χωρίς αυτά δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων και καθηγήτρια Δρ. Καψοκεφάλου Μαρία για την καθοδήγησή της, καθώς και για τις παρατηρήσεις της. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. Κανδυλιάρη Κατερίνα για τη συνεχή στήριξή της.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για τη στήριξή τους, την υποστήριξή τους, αλλά και την συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια όλων των σπουδών μου.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Στους γονείς μου

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	1
1.1 Σημασία αξιοποίησης αποβλήτων τροφίμων.....	1
1.2 Υποπροϊόντα ψαριών και αξιοποίησή τους.....	3
1.3 Ωφέλεια αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών.....	5
1.4 Διατροφική σύσταση	7
1.5 Ο ρόλος του σιδήρου στην ανθρώπινη υγεία.....	8
1.6 Βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου	9
1.6.1 Παράγοντες επίδρασης στη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου.....	10
1.6.2 Επίδραση άλλων μετάλλων και της ποσότητας σιδήρου	11
1.7 Σημασία διατροφικού χαρακτηρισμού υποπροϊόντων	13
1.8 Αντικείμενο και σκοπός μελέτης.....	14
Κεφάλαιο 2: Μεθοδολογία	15
2.1 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων	15
2.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Kjeldahl.....	16
2.3 Προσδιορισμός τέφρας.....	19
2.4 Προσδιορισμός υγρασίας	21
2.5 Προσδιορισμός λιπαρών υλών	23
2.6 Προσδιορισμός υδατανθράκων.....	24
2.7 Εκτίμηση βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου	24
2.7.1 Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς	28
2.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	28
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα.....	29
3.1 Διατροφική σύσταση	29
3.2 Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου.....	29
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση	32
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα.....	36
Βιβλιογραφία	37
Παραρτήματα	42
Παράρτημα 1: Αναλυτική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας	42
Παράρτημα 2: Καμπύλη προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου	45

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Ποσόστωση υποπροϊόντων ψαριών (FAO, 2022).....	5
Πίνακας 2: Διατροφική αξία ψαριών και υποπροϊόντων. (Πηγή: FAO, 2016).....	7
Πίνακας 3: Σύθεση σκελετού ψαριών (Πηγή: FAO, 2016).....	8
Πίνακας 4: Μέσοι όροι διατροφικής σύστασης των υποπροϊόντων (κεφάλια) από σαρδέλες.....	29

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Τεχνολογίες μετατροπής, προϊόντα και πιθανές διαδικασίες αξιοποίησης υποπροϊόντων. (Poritosh et al., 2023).....	2
Εικόνα 2:Σαρδέλα - <i>Sardina pilchardus</i>	15
Εικόνα 3: Δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας προς επεξεργασία.....	15
Εικόνα 4: Δείγματα υποπροϊόντων σαρδέλας μετά την επεξεργασία.	16
Εικόνα 5: Συσκευή χώνευσης για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας πρωτεϊνών.....	17
Εικόνα 6: Συσκευή απόσταξης Kjeldahl.	18
Εικόνα 7: Φλόγα λύχνου Bunsen, τρίγωνο από πυρίμαχο υλικό, το οποίο στηρίζεται πάνω σε τρίποδο.	20
Εικόνα 8: Πυριαντήριο με χωνευτήρια, ώστε τα δείγματα να μετατραπούν σε τέφρα.	20
Εικόνα 9: Ξηραντήρας με χωνευτήρια προκειμένου να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. .	21
Εικόνα 10: Χωνευτήρια με δείγμα υποπροϊόντων, ώστε να αποκτήσουν σταθερό βάρος.	22
Εικόνα 11: Κάψες πορσελάνης κατά τον προσδιορισμό υγρασίας.	22
Εικόνα 12: Συσκευές Mojonnier.....	23
Εικόνα 13: 6-well-plate πριν τοποθετηθούν στον επωαστήρα για την προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης.....	25
Εικόνα 14: Διεξαγωγή δοκιμής in vitro γαστρεντερικής πέψης σε 6-well-plate.	26
Εικόνα 15: Δοχείο 96 θέσεων (96-well plate) μετά τη μέτρηση δισθενούς σιδήρου.....	27
Εικόνα 16: Φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση ολικού και δισθενούς σιδήρου.	28

Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα ολικού διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (υπερκείμενες ενώσεις).....	30
Διάγραμμα 2: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα ολικού διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους (υπερκείμενες ενώσεις).....	30
Διάγραμμα 3: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα δισθενούς διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (υπερκείμενες ενώσεις).....	31
Διάγραμμα 4: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα δισθενούς διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους.....	31

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Σημασία αξιοποίησης αποβλήτων τροφίμων

Κάθε χρόνο το 1/3 της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων που αφορά σε ανθρώπινη κατανάλωση χάνεται, με το μεγαλύτερο ποσοστό σπατάλης να υπάρχει στα φρούτα και λαχανικά, το οποίο ισούται με το 45% και ακολουθούν τα ψάρια και τα θαλασσινά με το ποσοστό της σπατάλης να ισούται με το 35% παγκοσμίως. Πιο συγκεκριμένα, η Ελλάδα κατέχει την τέταρτη χειρότερη θέση από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με τη σπατάλη τροφίμων, η οποία ισούται με 196 κιλά για κάθε Έλληνα πολίτη κάθε χρόνο (Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας, 2020).

Η αξιοποίηση των αποβλήτων τροφίμων είναι καθοριστικής σημασίας για τη μείωση της περιβαλλοντικής και οικονομικής επιβάρυνσης και τη μετάβαση σε κυκλική οικονομία, ενώ παράλληλα έχουν γίνει μελέτες σε παγκόσμιο επίπεδο προκειμένου να δημιουργηθούν διάφορα νέα πιο αποτελεσματικά τελικά προϊόντα (Poritosh *et al.*, 2023).

Ωστόσο, οι οικονομικές, περιβαλλοντικές και κοινωνικές πτυχές τους είναι περιορισμένες. Σε παγκόσμιο επίπεδο, 1,3 δισεκατομμύρια τόνοι βρώσιμων τροφίμων χάνονται ή σπαταλούνται κάθε χρόνο, κατά τη διάρκεια των οποίων εκπέμπονται περίπου 3,3 δισεκατομμύρια τόνοι αερίων θερμοκηπίου. Οι επιπτώσεις των αποβλήτων τροφίμων τόσο οι περιβαλλοντικές, όσο και οι οικονομικές εξαρτώνται από τις πολλαπλές παραμέτρους των αλυσίδων τροφίμων και των συστημάτων διαχείρισης αποβλήτων. (Poritosh *et al.*, 2023)

Παρόλο που καταβάλλονται τεράστιες προσπάθειες για τη μείωση των αποβλήτων τροφίμων καθώς και την αξιοποίηση των αναπόφευκτων αποβλήτων τροφίμων για τη μείωση των περιβαλλοντικών και οικονομικών απωλειών, φαίνεται ότι η διεπιστημονική προσέγγιση και πρωτοβουλία, θα ήταν απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση αυτών καθώς και για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεών τους. (Poritosh *et al.*, 2023)

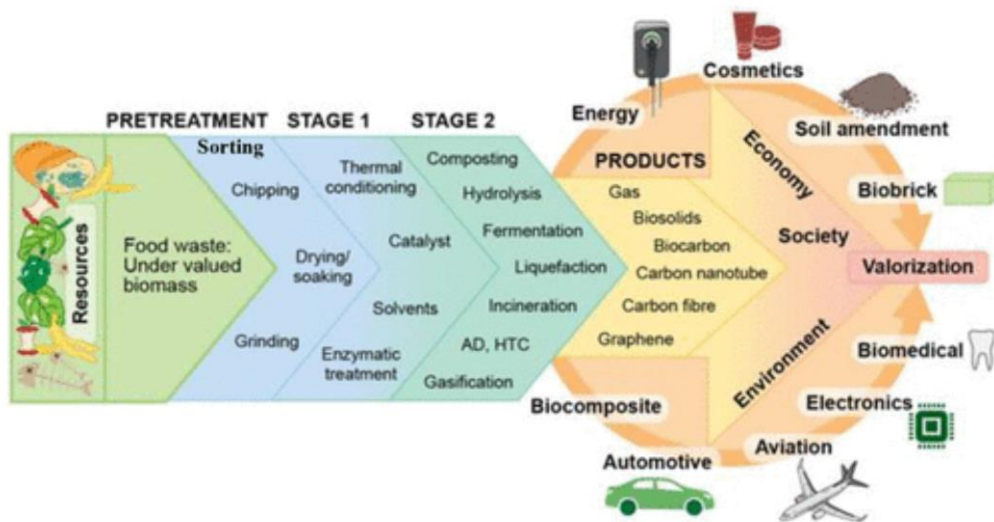
Μια κοινή προσπάθεια από τα ενδιαφερόμενα μέρη είναι το κλειδί για τη μείωση των αποβλήτων τροφίμων και την αποδοτική και αποτελεσματική αξιοποίηση τους, για τη βελτίωση της βιωσιμότητάς τους. Ωστόσο, κάθε πρωτοβουλία για τη μείωση της σπατάλης τροφίμων θα πρέπει να εξετάζει το ενδεχόμενο ενός ευρύτερου ελέγχου βιωσιμότητας για την αποφυγή κινδύνων για τις επενδύσεις και το περιβάλλον. (Poritosh *et al.*, 2023)

Τα απόβλητα τροφίμων παράγονται σε διάφορα στάδια της αλυσίδας εφοδιασμού των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, απόβλητα μπορούν να παραχθούν τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή, όπου μπορεί να είναι είτε βρώσιμα είτε μη βρώσιμα, όσο και κατά την επεξεργασία, την αποθήκευση, τη μεταποίησή τους, την πώληση και την κατανάλωσή τους.

Η σύνθεση των αποβλήτων τροφίμων ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό. Συνήθως, τα απόβλητα τροφίμων ζωικής προέλευσης είναι πλούσια σε ενέργεια συγκρινόμενα με τα υδαρή απόβλητα τροφίμων φυτικής προέλευσης (φρούτα και λαχανικά). Με αυτό δεδομένο, η επιλογή των τεχνολογιών αξιοποίησης των αποβλήτων τροφίμων εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε υγρασία και τη σύνθεση των αποβλήτων τροφίμων, για την αποφυγή ενεργοβόρων διεργασιών στην παραγωγή προϊόντων τελικής χρήσης προστιθέμενης αξίας για διάφορες εφαρμογές.

Η μετατροπή αποβλήτων τροφίμων ή υποπροϊόντων τους σε προϊόντα αξίας και οι αποτελεσματικές εφαρμογές τους, είναι γνωστή ως αξιοποίηση αποβλήτων τροφίμων. Για διαφορετικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές μετατροπής, για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Το παρακάτω σχήμα αντιπροσωπεύει τις ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνολογίες μετατροπής, προϊόντα και πιθανές εφαρμογές διαδικασίας αξιοποίησης.



Εικόνα 1: Τεχνολογίες μετατροπής, προϊόντα και πιθανές διαδικασίες αξιοποίησης υποπροϊόντων. (Poritosh et al., 2023)

Συνήθως, τα απόβλητα τροφίμων έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, η οποία παρέχει ευεργετικά αποτελέσματα σε ορισμένες από τις διαδικασίες μετατροπής τους όπως η αναερόβια πέψη, η ζύμωση, η υδρόλυση κ.λπ. Ωστόσο, μερικές φορές απαιτείται μείωση μεγέθους ή προεπεξεργασία (με υπερήχους, μικροκύματα, παλμικά ηλεκτρικά πεδία κ.λπ.) για τη βελτίωση της διαδικασίας μετατροπής και την εξαγωγή περισσότερων προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Τα απόβλητα τροφίμων έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, θρεπτικά συστατικά, έλαια, νερό και φυσικά οξέα. Ως εκ τούτου, παρουσιάζουν δυνατότητες προϊόντων ζύμωσης. Διάφορα προϊόντα προστιθέμενης αξίας καθώς και βιοενέργεια έχουν αναπτυχθεί από τα απόβλητα τροφίμων, με την απόδοσή τους να εξαρτάται από τα συστατικά τους.

Αποξηραμένα και αλεσμένα απορρίμματα/υποπροϊόντα τροφίμων, όπως πίτουρο σιταριού, ίνες πατάτας και ίνες μπιζελιού, χρησιμοποιήθηκαν με πολυμερείς μήτρες, και παρήγαγαν ένα βιοσύνθετο για βιώσιμους περιέκτες, δοχεία, μη υφασμένους ιστούς και μεμβράνες. Οι Fritsch et al. (2017) έχουν συνοψίσει διάφορες μεθόδους εξαγωγής που έχουν χρησιμοποιηθεί σε βέλτιστες συνθήκες για μέγιστες αποδόσεις φαινολικών ενώσεων από διαφορετικές φλούδες πατάτας, που κυμαίνονταν μεταξύ 10,3- 593,3 mg/100 g (ξηρής βάσης) ανάλογα με τις ποικιλίες πατάτας και των μεθόδων εκχύλισης. Η απόδοση των προϊόντων προστιθέμενης αξίας από απόβλητα τροφίμων παρατηρήθηκε να ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τον τύπο των αποβλήτων τροφίμων και των χρησιμοποιούμενων τεχνολογιών μετατροπής. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι οργανικές ενώσεις που εξάγονται από

διάφορα απόβλητα τροφίμων (ειδικά φρούτα και φυτικά υποπροϊόντα), μπορούν να επανεκτιμηθούν και να χρησιμοποιηθούν για την αναστολή διάβρωσης διαβρωτικών μέσων.

Επιπλέον, τα απόβλητα τροφίμων έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διατροφή των ζώων, που συνήθως θεωρείται μια οικονομικά αποδοτική μέθοδος αξιοποίησης από αλυσίδες εφοδιασμού τροφίμων. Ωστόσο, λόγω ρυθμιστικών ανησυχιών, σε αρκετές περιπτώσεις υφίστανται περιορισμοί. Αν και η χρήση αποβλήτων τροφίμων ως ζωοτροφής είναι η πιο οικονομικά αποδοτική επιλογή διαχείρισης, στην πράξη μόνο το 2,9% των αποβλήτων τροφίμων χορηγείται σε ζώα στις ΗΠΑ, ενώ το 55,9% αποστέλλεται σε χώρους υγειονομικής ταφής. Η βιομετατροπή των σπαταλημένων τροφίμων σε ανάπτυξη πρωτεϊνών με βάση τα έντομα είτε για τρόφιμα είτε για ζωοτροφές είναι ένας πιθανός τρόπος για την επίτευξη μιας κυκλικής οικονομίας. Η αποτελεσματική διαλογή των αποβλήτων τροφίμων στις πηγές τους, μπορεί να μειώσει την αποτέφρωση και την υγειονομική ταφή, παρέχοντας οικονομικά, περιβαλλοντικά και κοινωνικά οφέλη. Η τροποποίηση των αποβλήτων τροφίμων για την σίτιση ανθρώπων σε κατάσταση πείνας, παρέχει τα υψηλότερα περιβαλλοντικά οφέλη ανεξάρτητα από τους τύπους τροφίμων (Poritosh *et al.*, 2023).

1.2 Υποπροϊόντα ψαριών και αξιοποίησή τους

Τα ψάρια καταναλώνονται ως τρόφιμα σε φρέσκια κατάσταση. Μερικά από αυτά αξιοποιούνται και μετά τη συντήρησή τους. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης και της επεξεργασίας, ορισμένα μέρη των ψαριών απορρίπτονται ως απόβλητα. Αυτά τα απόβλητα γίνονται μια σημαντική πηγή για την παραγωγή υποπροϊόντων ψαριών, τα οποία με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διάφορων χρήσιμων υποπροϊόντων.

Η σάρκα των ψαριών περιέχει κατά μέσο όρο 15-20% πρωτεΐνη. Ορισμένα είδη ψαριών περιέχουν πολύ υψηλές ποσότητες σωματικού ελαίου. Λίγα είδη ψαριών όπως ο καρχαρίας και ο μπακαλιάρος είναι καλές πηγές ελαίου συκωτιού. Οι βιομηχανίες επεξεργασίας και φιλετοποίησης ψαριών παράγουν μεγάλες ποσότητες αλιευτικών αποβλήτων. Όλα αυτά είναι καλές πηγές υψηλής ποιότητας πρωτεΐνης, λίπους, μετάλλων κλπ.

Τα παραδοσιακά υποπροϊόντα αλιείας είναι ιχθυάλευρα, ιχθυέλαια σώματος και ήπατος, λέπια κ.λπ. Το συμπύκνωμα πρωτεΐνης ψαριών, η αλβουμίνη ψαριών, η κόλλα, η ζελατίνη, η ουσία μαργαριταριών, τα αμινοξέα, το δέρμα ψαριών κ.λπ. είναι μερικά άλλα υποπροϊόντα που γενικά επεξεργάζονται από ψάρια και απόβλητα ψαριών. Η χιτίνη και η χιτοζάνη που επεξεργάζονται από γαρίδες, καβούρια και άλλα απόβλητα καρκινοειδών είναι υποπροϊόντα υψηλής οικονομικής αξίας. Βιοχημικά και φαρμακευτικά προϊόντα όπως χολικά άλατα, ινσουλίνη, γλυκοζαμίνη κ.α. είναι μερικά άλλα αλιευτικά υποπροϊόντα μεγάλης σημασίας (TNAU Agritech Portal, no date).

Τα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων αποτελούν σημαντική πηγή περιβαλλοντικής μόλυνσης. Έχει διεξαχθεί έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων μετατροπής αυτών των αποβλήτων σε χρήσιμα προϊόντα (Perea *et al.*, 1993; Kristinsson and Rasco, 2000; Larsen *et al.*, 2000; Guerard *et al.*, 2001; Coello *et al.*, 2002; Laufenberg *et al.*, 2003). Πιθανώς, περισσότερο από το 50% του υπόλοιπου υλικού από τη συνολική αλίευση ψαριών δεν χρησιμοποιείται ως τροφή και περιλαμβάνει σχεδόν 32 εκατομμύρια τόνους αποβλήτων (Kristinsson and Rasco, 2000).

Λόγω της συνεχούς ανάπτυξης της ιχθυοκαλλιέργειας και της συνεχούς ζήτησης των προϊόντων της, δημιουργούνται καθημερινά μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, όπως κεφάλια, οστά, έντερα και κελύφη. Τα υποπροϊόντα αυτά αντιπροσωπεύουν το 30-70% του συνόλου των ψαριών και αποτελούν μία καλή πηγή μικρο- και μακροθρεπτικών συστατικών, αλλά τις περισσότερες φορές μένουν ανεκμετάλλευτα και καταλήγουν ως απόβλητα (FAO, 2020).

Προκειμένου να μειωθεί ο όγκος των υποπροϊόντων ψαριών από τις μονάδες επεξεργασίας ψαριών γίνονται πολλές προσπάθειες προκειμένου να χρησιμοποιούνται στα λιπάσματα, στις ζωοτροφές (ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια), στα βιοκαύσιμα/ βιοαέριο, στο ενσίρωμα ψαριών, σε διαιτητικά προϊόντα (χιτοζάνη), σε φαρμακευτικά προϊόντα (ω-3 λιπαρά οξέα), ακόμα και σε καλλυντικά (κολλαγόνο) (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008).

Η χρήση των υποπροϊόντων τροφίμων στις ζωοτροφές αποτελεί μία εναλλακτική λύση υψηλού ενδιαφέροντος επειδή αντιπροσωπεύει περιβαλλοντικό και δημόσιο όφελος εκτός από τη μείωση του κόστους της ζωικής παραγωγής. Τα εντόσθια των ψαριών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ένα συστατικό ζωοτροφών, διότι αντιπροσωπεύει μία πολύτιμη πηγή υψηλής ποιότητας πρωτεΐνης και ενέργειας.

Πιο συγκεκριμένα, τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια παρασκευάζονται είτε από ολόκληρα ψάρια, είτε από υπολείμματα ψαριών. Εκτιμάται ότι το 25 έως 35% του αυξανόμενου μεριδίου των ιχθυαλεύρων και των ιχθυελαιών παράγεται από τα υποπροϊόντα της επεξεργασίας ψαριών, τα οποία προηγουμένως συχνά απορρίπτονταν ή χρησιμοποιούνταν ως άμεση τροφή, για την παρασκευή ενσίρωσης ή σε λιπάσματα (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008).

Τα βιοκαύσιμα λαμβάνονται από τα έλαια και τα λίπη λαχανικών και ζώων και αποτελούν υποκατάστατο ή πρόσθετο του καυσίμου ντίζελ, το οποίο προέρχεται από το πετρέλαιο.

Ενσίρωση είναι η μέθοδος διατήρησης χλωρού χόρτου σε αναερόβιες συνθήκες. Το προϊόν της ενσίρωσης ονομάζεται ενσίρωμα και χαρακτηρίζεται από μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία και οργανικά οξέα, κυρίως γαλακτικό οξύ. Η μηδική (γνωστό και ως τριφύλλι) θεωρείται η «βασίλισσα» των χορτοδοτικών φυτών και η πλέον κατάλληλη τροφή για ενσίρωμα. Είναι μια άριστη χονδροειδής ζωοτροφή, η οποία πλεονεκτεί από τα άλλα χορτοδοτικά λόγω της υψηλής συγκέντρωσης πρωτεΐνης, της υψηλής μεταβολικής ενέργειας και πεπτικότητας και του χαμηλού ποσοστού ινωδών ουσιών.

Η ενσίρωση ψαριών παράγεται από ολόκληρο το ψάρι ή μέρη αυτού, στο οποίο προστίθενται οξέα, ένζυμα ή βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ. Η διαδικασία ενσίρωσης ψαριών μετατρέπει τα απόβλητα ψαριών σε ένα υγρό μείγμα υδρολυμένων πρωτεϊνών, λιπιδίων, μετάλλων και άλλων θρεπτικών ουσιών, εύπεπτο τόσο από χερσαία όσο και από υδρόβια ζώα. Η ενσίρωση ψαριών μπορεί να αποτελέσει βιώσιμη εναλλακτική λύση στα ιχθυάλευρα ως άφθονη πηγή ζωικής πρωτεΐνης για την παρασκευή σιτηρεσίων για κατοικίδια ζώα. Επιπλέον, μπορεί να είναι ένα εξαιρετικό λίπασμα.

Επίσης, η αξιοποίηση των υποπροϊόντων ψαριών συνδέεται με την Blue Fashion. Πρόκειται για έναν καινοτόμο τρόπο στήριξης των αλιευτικών κοινοτήτων, μειώνοντας παράλληλα τα απόβλητα και προσφέροντας βιώσιμες εναλλακτικές λύσεις στη βιομηχανία της μόδας. Η Blue Fashion στοχεύει στη δημιουργία βιώσιμων ειδών μόδας από θαλάσσιες πρώτες ύλες και υποπροϊόντα. Αυτές είναι βιολογικές εναλλακτικές λύσεις στα παραδοσιακά προϊόντα της βιομηχανίας μόδας και περιλαμβάνουν ρούχα, πορτοφόλια και παπούτσια από δέρμα ψαριού, λέπια ψαριών και ύφασμα φυκιών (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008).

Τα οφέλη από την επεξεργασία των ψαριών όχι μόνο οδηγούν σε μια πιο σταθερή διάρκεια ζωής του προϊόντος και μπορούν να μειώσουν την απώλεια ψαριών, αλλά η επεξεργασία ψαριών έχει επίσης τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσει υποπροϊόντα για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας και να μετατρέψει αυτό που κάποτε ήταν απόβλητο τόσο σε οικονομικά όσο και σε περιβαλλοντικά οφέλη (FAO, 2022).

1.3 Ωφέλεια αξιοποίησης υποπροϊόντων ψαριών

Η επέκταση της μεταποίησης της παραγωγής αλιείας και υδατοκαλλιέργειας έχει οδηγήσει σε αυξανόμενες ποσότητες υποπροϊόντων, τα οποία μπορεί να αντιπροσωπεύουν έως και το 70% των μεταποιημένων ψαριών, ανάλογα με το μέγεθος, το είδος και τον τύπο επεξεργασίας. Τα υποπροϊόντα αποτελούνται συνήθως από κεφάλια (που αντιπροσωπεύουν το 9-12% του συνολικού βάρους των ψαριών), σπλάχνα (12-18%), δέρμα (1-3%), οστά (9-15%) και λέπια (περίπου 5%) (FAO, 2022).

Πίνακας 1: Ποσόστωση υποπροϊόντων ψαριών (FAO, 2022).

Υποπροϊόντα ψαριών	Ποσοστό
Κεφάλια	9-12%
Οστά	9-15%
Σπλάχνα	12-18%
Δέρμα	1-3%
Λέπια	5%

Ιστορικά, τα υποπροϊόντα ψαριών συχνά τροφοδοτούσαν την παραγωγή ιχθυαλεύρων ή απορρίπτονταν ως απόβλητα, με αποτέλεσμα οικονομικές απώλειες και περιβαλλοντικά προβλήματα. Η επεξεργασία των υποπροϊόντων συνεπάγεται συχνά σημαντικές περιβαλλοντικές και τεχνικές προκλήσεις λόγω του υψηλού μικροβιακού και ενζυμικού φορτίου της πρώτης ύλης και της ευαισθησίας της σε ταχεία αποδόμηση, εκτός εάν υποστεί επεξεργασία ή αποθηκευτεί σωστά. Έτσι, η έγκαιρη συλλογή και επεξεργασία των υποπροϊόντων είναι ζωτικής σημασίας για την περαιτέρω επεξεργασία τους. Η ανάπτυξη νέων συστατικών ή νέων προϊόντων σε διάφορες μορφές που βασίζονται σε υποπροϊόντα ψαριών παρέχει μια δυνητικά έγκυρη εναλλακτική λύση για την αύξηση της προστιθέμενης αξίας των προϊόντων, την αποφυγή οικονομικών απωλειών, τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και την παροχή στους καταναλωτές θρεπτικών, χαμηλού κόστους και εύχρηστων τροφίμων με πιο σταθερή διάρκεια ζωής (FAO, 2022).

Τα φιλέτα είναι τα πιο πολύτιμα όσον αφορά την πρωτεΐνη, αλλά τα κεφάλια, τα οστά, ο κοιλιακός ιστός και μέρη των σπλάχνων, όπως το συκώτι και το αυγοτάραχο, είναι ιδιαίτερα καλές πηγές θρεπτικών συστατικών, όπως ωμέγα-3 λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, βιταμίνες Α, D και Β12, καθώς και μέταλλα όπως σίδηρος, ψευδάργυρος, ασβέστιο, φώσφορος και σελήνιο. Με την εφαρμογή τεχνολογιών επεξεργασίας σε μέρη των ψαριών που παραδοσιακά δεν καταναλώνονται, αυτά

μπορούν να μετατραπούν σε εξαιρετικά θρεπτικά προϊόντα με χαμηλό κόστος, όπως λουκάνικα ψαριών, πατέ, κέικ, σνακ, σούπες, σάλτσες και άλλα προϊόντα για ανθρώπινη κατανάλωση. Εάν τα προϊόντα αυτά είναι νόστιμα και τοπικά αποδεκτά, τότε αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει εξαιρετική ευκαιρία για την αύξηση των διατροφικών επιπτώσεων από τους πόρους αλιείας και υδατοκαλλιέργειας, καθώς και για τη μείωση της απώλειας και της σπατάλης ψαριών.

Μικρά οστά ψαριών με ελάχιστη ποσότητα κρέατος καταναλώνονται ως σνακ σε ορισμένες χώρες. Επιπλέον, αυτά τα υποπροϊόντα μπορούν να μετατραπούν σε αλεύρι και να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο αλεύρου σε ψωμί, αρτοσκευάσματα, κέικ και ζυμαρικά για να προσθέσουν θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες και ασβέστιο. Η ζελατίνη που παράγεται από δέρμα και οστά μπορεί να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία σε βρώσιμα φιλμ και βρώσιμα επιχρίσματα για εφαρμογές τροφίμων. Η ζελατίνη ψαριών είναι μια εναλλακτική λύση για τη ζελατίνη βοοειδών και χοίρων και μπορεί να σταθεροποιήσει τα γαλακτώματα. Τα οστά ψαριών, εκτός από την παροχή κολλαγόνου και ζελατίνης, είναι επίσης μια εξαιρετική πηγή ασβεστίου και άλλων μετάλλων όπως ο φώσφορος, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφές ή συμπληρώματα διατροφής. Χρησιμοποιώντας απλές τεχνολογίες χαμηλού κόστους, τα υποπροϊόντα ψαριών μπορούν επίσης να μετατραπούν στην προαναφερθείσα ενσίρωση ψαριών (FAO, 2022).

Εκτός από τις διάφορες χρήσεις τους στα τρόφιμα, τα υποπροϊόντα ψαριών κερδίζουν όλο και περισσότερο την προσοχή σε βιοτεχνολογικές και φαρμακευτικές εφαρμογές, καθώς προσφέρουν μια σημαντική και βιώσιμη πηγή βιοενώσεων υψηλής αξίας, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε κολλαγόνο, ένζυμα, πεπτίδια, PUFA και μέταλλα (Corpora *et al.*, 2021). Το κολλαγόνο ψαριών θεωρείται εναλλακτική λύση στο κολλαγόνο από βοοειδή και χοίρους και πρόσφατα αναγνωρίστηκε ως ένα πολλά υποσχόμενο βιοϋλικό με μεγάλες δυνατότητες σε φαρμακευτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές (Wijaya and Junianto, 2021).

Τα ένζυμα και τα βιοδραστικά πεπτίδια μπορούν να απομονωθούν από τα σπλάχνα των ψαριών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια σειρά εφαρμογών στη βιομηχανία δέρματος, απορρυπαντικών, τροφίμων και φαρμάκων, καθώς και σε διαδικασίες βιοαποκατάστασης. Το ιχθυέλαιο περιέχει μεγάλη ποσότητα PUFA μακράς αλυσίδας, τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν από το ανθρώπινο σώμα και παρέχουν ένα ευρύ φάσμα κρίσιμων λειτουργιών για την ανθρώπινη υγεία.

Τα υποπροϊόντα καρκινοειδών και δίθυρων κοχυλιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πολλούς τρόπους για την αύξηση της αξίας τους, αντιμετωπίζοντας παράλληλα ζητήματα διάθεσης αποβλήτων. Η χιτίνη, ένας πολυσακχαρίτης που εξάγεται από απόβλητα κελύφους καρκινοειδών, αποτελεί πιθανή πηγή αντιμικροβιακών ουσιών. Το παράγωγό της, η χιτοζάνη, έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, ιδίως στους τομείς της επεξεργασίας λυμάτων, των καλλυντικών, των ειδών προσωπικής υγιεινής, των τροφίμων, των ποτών, των αγροχημικών και των φαρμακευτικών προϊόντων. Τα κελύφη των δίθυρων κοχυλιών, όπως τα μύδια και τα στρείδια, μπορούν να μετατραπούν σε ανθρακικό ασβέστιο ή οξείδιο του ασβεστίου, δύο εξαιρετικά ευέλικτες χημικές ενώσεις με ευρείες βιομηχανικές εφαρμογές. Τα κελύφη μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε καλλυντικά και παραδοσιακά φάρμακα (σκόνη μαργαριταριών), ως συμπλήρωμα ασβεστίου σε ζωοτροφές (σκόνη κελύφους), καθώς και για χειροτεχνίες και κοσμήματα (Wijaya and Junianto, 2021).

Επιπλέον, τα φύκια μεταποιούνται σε πρόσθετα τροφίμων ή συμπληρώματα διατροφής και αποτελούν καλή πηγή ιωδίου, φουκοϊδάνης, φουκοξανθίνης και φλοροτανινών (Cai *et al.*, 2021). Τα φύκια και τα μικροφύκη παράγουν κοινωνικοοικονομικά οφέλη για δεκάδες χιλιάδες νοικοκυριά, κυρίως στις παράκτιες κοινότητες, συμβάλλοντας στην ανθρώπινη υγεία, τα περιβαλλοντικά οφέλη

και τις οικοσυστημικές υπηρεσίες. Γενικά πλούσια σε διαιτητικές ίνες, μικροθρεπτικά συστατικά και βιοδραστικές ενώσεις και με ορισμένα είδη να έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, τα φύκια θεωρούνται συχνά ως υγιεινά τρόφιμα χαμηλών θερμίδων (FAO, 2016).

1.4 Διατροφική σύσταση

Η επεξεργασία των υποπροϊόντων ψαριών μπορεί να διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη βελτίωση της ανθρώπινης διατροφής, κυρίως σε περιοχές που επικρατεί υποσιτισμός, διότι τα υποπροϊόντα αποτελούν πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών. Και λέγεται ότι αποτελούν πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών διότι περιέχουν υψηλά επίπεδα βασικών μικροθρεπτικών συστατικών, όπως βιταμίνες A, D, B και κυρίως B-12, καθώς και μέταλλα όπως ασβέστιο, σίδηρο, ψευδάργυρο, φώσφορο, ιώδιο και σελήνιο. Εκτός από τα μικροθρεπτικά συστατικά περιέχουν και υψηλές ποσότητες σε πρωτεΐνες, απαραίτητες για την ανάπτυξη και για υγιές ανοσοποιητικό σύστημα, και λιπίδια, κυρίως ω-3 λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Λόγω των θρεπτικών συστατικών που περιέχουν τα υποπροϊόντα, τα οποία αναφέρονται παραπάνω, μπορούν να γίνουν πιο προσιτά στους ανθρώπους (FAO, 2016).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η θρεπτική αξία των ψαριών και των υποπροϊόντων.

Πίνακας 2: Διατροφική αξία ψαριών και υποπροϊόντων. (Πηγή: FAO, 2016)

Ψάρια & υποπροϊόντα, πηγή θρεπτικών συστατικών	Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά /100 g	Καθημερινή ανάγκη για παιδιά
Βιταμίνη A: 250 εκατομμύρια βρέφη με ανεπάρκεια	5.000 µg	500 µg
Σίδηρος: 1,6 δισεκατομμύρια άνθρωποι με ανεπάρκεια	Αποξηραμένο περίβλημα τόνου: 35mg	8,9 mg (σε 10% βιοδιαθεσιμότητα)
Ιώδιο: Φυσική πηγή θαλασσινών, 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι με έλλειψη	Φιλέτα μπακαλιάρου: 250 µg Φύκια: >2 000 µg	120 µg
Ψευδάργυρος: 800.000 θάνατοι παιδιών ετησίως	Οστά ρέγγας: 19 mg	5,6 mg (μέτριας βιοδιαθεσιμότητας)

Τα ψάρια αποτελούν πηγή πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας που χρησιμεύει ως αναπόσπαστο συστατικό της διατροφής των ανθρώπων, ειδικά σε χώρες χαμηλού εισοδήματος. Μια εναλλακτική λύση στη χρήση υποπροϊόντων είναι η χρήση ολόκληρου του ψαριού. Μικρά είδη ψαριών, όπως οι σαρδέλες, οι αντζούγιες και οι αθερίνες τρώγονται συχνά ολόκληρες, πράγμα που σημαίνει ότι το δέρμα, το κεφάλι, τα οστά και τα σπλάχνα των ψαριών καταναλώνονται. Τέτοια μέρη σε μεγαλύτερα ψάρια συνήθως απορρίπτονται. Ωστόσο, ορισμένα είδη ψαριών έχουν υψηλότερη θρεπτική αξία από άλλα, όσον αφορά τις βιταμίνες, τα μέταλλα και τα απαραίτητα λίπη. Ένα γεύμα με ολόκληρα ψάρια μικρού μεγέθους ή τα υποπροϊόντα ψαριών συνεισφέρουν περισσότερο σε μέταλλα, ειδικά ασβέστιο και φώσφορο, από ένα γεύμα με φιλέτο μεγάλων ψαριών. Όπως και με τα ψάρια, τα υποπροϊόντα των ψαριών αλλοιώνονται γρήγορα και πρέπει να διατηρούνται βέλτιστα. Οι εγκαταστάσεις ψύξης και κατάψυξης των μονάδων επεξεργασίας πρέπει να χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση κεφαλιών, περιβλημάτων και τελικά άλλων υποπροϊόντων (FAO, 2016).

Τα υποπροϊόντα ψαριών, ιδίως όταν περιέχουν σπλάχνα, αλλοιώνονται πολύ γρήγορα και, ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να διατηρούνται το συντομότερο δυνατό μετά τη συγκομιδή. Αυτό μπορεί να μην είναι πάντοτε εφικτό λόγω ανεπαρκών εγκαταστάσεων μεταποίησης ή περιορισμένου χώρου που καθιστά την ανάκτηση των υποπροϊόντων μη κερδοφόρα. Οι μέθοδοι διατήρησης των υποπροϊόντων ψαριών είναι οι ίδιες με εκείνες των νωπών ψαριών. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται σε υψηλότερη θερμοκρασία. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να διατηρούνται υπό σκιά και ψύξη (για να επιβραδύνουν τις βακτηριακές και ενζυματικές δραστηριότητες), χρησιμοποιώντας καθαρό πάγο και καθαρό δοχείο, και να καλύπτονται, ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση από εξωτερικούς παράγοντες (FAO, 2016).

Ο ακόλουθος πίνακας δείχνει τη χημική σύνθεση, περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα, αμινοξέα και λιπίδια σε οστά από διάφορα είδη ψαριών.

Πίνακας 3: Σύνθεση σκελετού ψαριών (Πηγή: FAO, 2016)

Σύσταση	Γαύρος	Σολομός	Ρέγγα	Σκουμπρί
Πρωτεΐνη (g/100g)	39	47	44	59
Τέφρα (g/100g)	58	50	51	44
Ασβέστιο (g/100g)	19	14	16	14
Σίδηρος (mg/100g)	5	3	6	7
Ψευδάργυρος (mg/100g)	10	23	19	13
Ιώδιο (mg/100g)	0,4	0,3	0,1	0,2

Υπάρχουν διατροφικά οφέλη από την κατανάλωση υποπροϊόντων ψαριών. Για παράδειγμα, δέκα γραμμάρια σκόνης υποπροϊόντων από ραχοκοκαλιά τόνου θα κάλυπταν περισσότερο από το 100% των ημερήσιων αναγκών των παιδιών σε ωμέγα-3, ασβέστιο και φώσφορο και περισσότερο από το 40% των αναγκών τους σε σίδηρο. Έτσι, η κατανάλωση των υποπροϊόντων μπορεί να μειώσει τις διατροφικές ελλείψεις (FAO, 2016).

1.5 Ο ρόλος του σιδήρου στην ανθρώπινη υγεία

Ο ρόλος του σιδήρου για την υγεία του ανθρώπου έχει αναγνωριστεί από τα αρχαία χρόνια. Οι Έλληνες, οι Αιγύπτιοι και οι Ρωμαίοι ήταν από τους πρώτους που είχαν αναγνωρίσει τις φαρμακευτικές χρήσεις του σιδήρου.

Ωστόσο, το 1932 αναγνωρίστηκε με πειστικές αποδείξεις ότι χρειάζεται ανόργανος σίδηρος για τη σύνθεση αιμοσφαιρίνης. Για πολλά χρόνια, το ενδιαφέρον για τη θρεπτικότητα του σιδήρου επικεντρώθηκε στο ρόλο του, στο σχηματισμό αιμοσφαιρίνης και στη μεταφορά οξυγόνου. Σήμερα, αν και η χαμηλή πρόσληψη σιδήρου και η βιοδιαθεσιμότητά του είναι υπεύθυνα για τα μεγάλα ποσοστά αναιμίας στις ανεπτυγμένες χώρες, στις αναπτυσσόμενες χώρες ευθύνονται μόνο περίπου για το ήμισυ του ποσοστού της αναιμίας, όπου οι μολυσματικές και φλεγμονώδεις ασθένειες (ιδιαίτερα η ελονοσία), η απώλεια αίματος από παρασιτικές λοιμώξεις και άλλες ανεπάρκειες

θρεπτικών ουσιών (βιταμίνης A, ριβοφλαβίνης, φολικού οξέος και βιταμίνης B12) είναι επίσης σημαντικές αιτίες (Abbaspour *et al.*, 2014).

Ο σίδηρος είναι ένα βασικό στοιχείο διαφόρων μεταβολικών διεργασιών στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης DNA, της μεταφοράς ηλεκτρονίων και οξυγόνου. Σε αντίθεση με άλλα μέταλλα, τα επίπεδα σιδήρου στο ανθρώπινο σώμα ελέγχονται μόνο με την απορρόφηση. Ο μηχανισμός της απέκκρισης σιδήρου είναι μια ανεξέλεγκτη διαδικασία που επιτυγχάνεται μέσω της απώλειας ιδρώτα, της εμμήνου ρύσεως, της αποβολής των τριχών και των κυττάρων του δέρματος και του γρήγορου κύκλου εργασιών και απέκκρισης εντεροκυττάρων.

Στους ανθρώπους, ο σίδηρος ποσοτικά υπάρχει σε 35 mg/kg του βάρους μίας ενήλικης γυναίκας και σε 45 mg/Kg του βάρους ενός ενήλικα άνδρα. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει σε μεγαλύτερη ποσότητα σιδήρου δεσμευμένη στα ερυθροκύτταρα της αιμοσφαιρίνης, περίπου 60-70% (περίπου 2 g σιδήρου στους άνδρες και 1,5 g στις γυναίκες) και περίπου 10% στα μυϊκά κύτταρα ως μυοσφαιρίνη, στα κυτοχρώματα και στα ένζυμα που περιέχουν σίδηρο (περίπου 4-8g σιδήρου). Τέλος, το υπόλοιπο 20-30% που αποτελεί το πλεόνασμα σιδήρου αποθηκεύεται στις ενώσεις αποθήκευσης σιδήρου, ως φερριτίνη και αιμοσιδερίνη (Lieu *et al.*, 2001).

Ο σίδηρος βρίσκεται επίσης δεσμευμένος σε πρωτεΐνες (αιμοπρωτεΐνη) και μη αιμικά ένζυμα που εμπλέκονται σε αντιδράσεις οξειδωσης-αναγωγής και στη μεταφορά ηλεκτρονίων (κυτοχρώματα και καταλάση) (Lieu *et al.*, 2001).

Εκτός από τις απώλειες σιδήρου που οφείλονται σε κάποια αιμορραγία, όπως η εμμηνόρροια, ή σε εγκυμοσύνη, ο σίδηρος διατηρείται εξαιρετικά και δεν χάνεται εύκολα από το σώμα. Υπάρχουν ορισμένες υποχρεωτικές απώλειες σιδήρου από το σώμα οι οποίες προκύπτουν από τη φυσιολογική απολέπιση των κυττάρων από τις επιθηλιακές επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων του δέρματος, της ουρογεννητικής οδού και του γαστρεντερικού σωλήνα. Ωστόσο, οι απώλειες αυτές εκτιμάται ότι είναι πολύ περιορισμένες, περίπου 1 mg ανά ημέρα. Οι απώλειες σιδήρου μέσω αιμορραγίας μπορεί να είναι σημαντικές και η υπερβολική απώλεια αίματος από την εμμηνόρροια είναι η πιο συνηθισμένη αιτία έλλειψης σιδήρου στις γυναίκες (Abbaspour *et al.*, 2014).

1.6 Βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου

Ως βιοδιαθεσιμότητα (F) ορίζεται ο ρυθμός και ο βαθμός, με τον οποίο απορροφάται ένα δραστικό συστατικό ή ένα δραστικό μέρος μίας ουσίας και φθάνει στην κυκλοφορία. (Page and Maddison, 2008).

Επίσης, ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το ποσοστό του σιδήρου που απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό και χρησιμοποιείται για τις φυσιολογικές του λειτουργίες. (Merriam-Webster, no date).

Βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου ορίζεται η αναλογία του απορροφήσιμου από το έντερο προσλαμβανόμενου σιδήρου που χρησιμοποιείται μέσω κανονικών μεταβολικών οδών ή αποθηκεύεται. Η βιοδιαθεσιμότητα εκφράζεται ως το ποσοστό της πρόληψης και είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από τους παράγοντες της διατροφής του ξενιστή (Blanco-Rojas and Vaquero, 2020).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί υπάρχουν δύο τύποι διατροφικού σιδήρου ο αιμικός και ο μη αιμικός σίδηρος. Ο αιμικός σίδηρος, ο οποίος προέρχεται από την αιμοσφαιρίνη και τη μυοσφαιρίνη τροφίμων ζωικής προέλευσης (κρέας, πουλερικά, θαλασσινά) εκτιμάται ότι συνεισφέρει το 10-15% της συνολικής πρόσληψης σιδήρου σε πληθυσμούς κρεατοφάγων, αλλά, λόγω της υψηλότερης και πιο ομοιόμορφης απορρόφησής του (εκτιμάται σε 15-35%), θα μπορούσε να συνεισφέρει μέχρι και το 40% του συνολικού σιδήρου. Ο μη αιμικός σίδηρος, ο οποίος περιέχεται σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και όσπρια, απορροφάται συνήθως πολύ λιγότερο από τον αιμικό σίδηρο (2-20%) και επηρεάζεται από την παρουσία διαφόρων άλλων συστατικών τροφίμων.

Η χαμηλή πρόσληψη σιδήρου αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό των ανθρώπων με αναιμία στις ανεπτυγμένες χώρες και είναι υπεύθυνη για σχεδόν το ήμισυ των αναιμιών στις μη ανεπτυγμένες χώρες. Ένας λόγος για την έλλειψη επαρκούς απορρόφησης σιδήρου είναι ότι κατά την έκθεση σε οξυγόνο, ο σίδηρος σχηματίζει εξαιρετικά αδιάλυτα οξείδια, τα οποία δεν είναι διαθέσιμα για απορρόφηση στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα ανθρώπινα εντεροκύτταρα περιέχουν κορυφαία ένζυμα συνδεδεμένα με μεμβράνη, των οποίων η δραστηριότητα μπορεί να ρυθμιστεί και τα οποία λειτουργούν για να μειώσουν τα αδιάλυτα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) σε απορροφήσιμα σιδηρούχα (Fe^{2+}) (Blanco-Rojas and Vaquero, 2020).

1.6.1 Παράγοντες επίδρασης στη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, η οποία είναι η διαδικασία με την οποία ο σίδηρος απορροφάται και χρησιμοποιείται από το σώμα. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ευρέως σε διαιτητικούς και φυσιολογικούς παράγοντες.

Οι διαιτητικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου περιλαμβάνουν:

1. Πηγή και χημική μορφή διαιτητικού σιδήρου: Ο τύπος του σιδήρου (αιμικός ή μη) και η χημική του μορφή στα τρόφιμα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την απορρόφηση σιδήρου (Morck and Cook, 1981). Τα κρέατα, τα πουλερικά και τα ψάρια είναι πλούσια σε αιμικό σίδηρο, ενώ τα φυτικά τρόφιμα όπως τα λαχανικά, τα φρούτα και τα δημητριακά περιέχουν μη αιμικό σίδηρο (Piskin *et al.*, 2022).
2. Αναστολείς: Οι διαιτητικοί αναστολείς όπως το ασβέστιο, τα φυτικά άλατα και οι πολυφαινόλες μπορούν να μειώσουν την απορρόφηση σιδήρου. Για παράδειγμα, τροφές πλούσιες σε ασβέστιο όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα και οι εμπλουτισμένοι με ασβέστιο χυμοί μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφηση του μη αιμικού σιδήρου. (Piskin *et al.*, 2022).
3. Ενισχυτές: Το ασκορβικό οξύ, οι πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις μπορούν να ενισχύσουν την απορρόφηση σιδήρου. Για παράδειγμα, η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε σίδηρο με πηγές βιταμίνης C μπορεί να βελτιώσει την απορρόφηση σιδήρου. (Piskin *et al.*, 2022).

Οι φυσιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου περιλαμβάνουν:

1. Ατομική κατάσταση σιδήρου: Η κατάσταση σιδήρου ενός ατόμου, συμπεριλαμβανομένου του διατροφικού ιστορικού του και οποιασδήποτε προϋπάρχουσας ανεπάρκειας σιδήρου ή αναιμίας, μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση σιδήρου (Hurrell and Egli, 2010).
2. Παχυσαρκία: Η παχυσαρκία μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση σιδήρου, καθώς επηρεάζει την απορρόφηση και την κατανομή του σιδήρου στο σώμα (Hurrell and Egli, 2010).

3. Ηλικία και φύλο: Η ηλικία και το φύλο μπορούν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου, με ορισμένα στάδια ζωής και τα άτομα να είναι πιο ευαίσθητα σε ανεπάρκεια σιδήρου και αναιμία (Hunt JR., 2005).

Όταν καταναλώνεται ταυτόχρονα στο ίδιο γεύμα, οι διαιτητικοί παράγοντες μπορούν να ενισχύσουν σημαντικά ή να αναστείλουν την απορρόφηση σιδήρου. Η απορρόφηση του αιμικού σιδήρου ενισχύεται από άγνωστους παράγοντες στο κρέας, τα πουλερικά και τα ψάρια και αναστέλλεται από το ασβέστιο. Αυτοί οι δύο και αρκετοί άλλοι διαιτητικοί παράγοντες επηρεάζουν την απορρόφηση της μη αιμικής μορφής σιδήρου. Οι ενισχυτικές επιδράσεις του κρέατος, των πουλερικών και των ψαριών και του ασκορβικού οξέος, αυξάνονται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές παρουσία αναστολέων όπως το φυτικό οξύ και οι πολυφαινόλες. Το αλκοόλ ενισχύει την απορρόφηση του μη αιμικού σιδήρου, πιθανώς ενισχύοντας την έκκριση γαστρικού οξέος που προάγει την κατάσταση μειωμένου σθένους. Τα καροτένια έχουν αναφερθεί ως ενισχυτές της απορρόφησης μη αιμικού σιδήρου. Οι αναφορές ενίσχυσης από ρετινοειδή είναι αντιφατικές. Κιτρικό, μηλικό, και τρυγικό οξύ φαίνεται επίσης να ενισχύουν την απορρόφηση μη αιμικού σιδήρου, και ενώ αυτή η ενίσχυση απαιτεί 100 φορές μοριακή αναλογία, έχει προταθεί να είναι πρακτικής σημασίας όταν οι δίαιτες περιλαμβάνουν κιτρικό οξύ από εσπεριδοειδή, μηλικό οξύ από φυλλοβόλα φρούτα όπως δαμάσκηνα, ροδάκινα και μήλα ή τρυγικό οξύ από λευκό Κρασιά. (Hunt, 2005)

Οι αναστολείς της απορρόφησης μη αιμικού σιδήρου περιλαμβάνουν φυτικό οξύ (εξαφωσφορική ινοσιτόλη) σε δημητριακά ολικής αλέσεως, όσπρια, φακές και καρύδια, πολυφαινόλες δέσμευσης σιδήρου, όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και τα πολυμερισμένα παράγωγά τους σε τσάι, καφέ, κόκκινα κρασιά και μια ποικιλία άλλων δημητριακών, λαχανικών, μπαχαρικών, πρωτεΐνη σόγιας (προφανώς ανεξάρτητη από το φυτικό οξύ στη σόγια) και αυγά. Η εξαφωσφορική ινοσιτόλη είναι η κύρια μορφή φωσφορικών ινοσιτόλης στα τρόφιμα και είναι κυρίως τα εξα- και πενταφωσφορικά που αναστέλλουν την απορρόφηση του μη αιμικού σιδήρου. Η δοσοεξαρτώμενη αναστολή από το φυτικό οξύ είναι σχεδόν μέγιστη σε μοριακές αναλογίες φυτικού οξέος-σιδήρου μεγαλύτερες από ένα, και μερικές μειώσεις του φυτικού οξέος μπορεί να μην βελτιώσουν σημαντικά την απορρόφηση σιδήρου. Η περιεκτικότητα σε φυτικό οξύ μπορεί να μειωθεί από βλάστηση, ζύμωση και εμβάπτιση των αλεύρων δημητριακών, συμπεριλαμβανομένης της μαγιάς του ψωμιού, αλλά οι πηγές ασβεστίου στη ζύμη ψωμιού θα εμποδίσουν τον υποβιβασμό του φυτικού οξέος από τη φυτάση ζύμης (Hunt, 2005).

1.6.2 Επίδραση άλλων μετάλλων και της ποσότητας σιδήρου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, άλλα κατιόντα επιπρόσθετα του σιδηρούχου σιδήρου μπορούν να συνδεθούν με πρωτεΐνες μεταφοράς σιδήρου όπως το DMT-1, δυνητικά αναστέλλοντας την απορρόφηση σιδήρου. Το ασβέστιο αναστέλλει την απορρόφηση τόσο του αιμικού όσο και του μη αιμικού σιδήρου. Η αναστολή του μη αιμικού σιδήρου συμβαίνει όταν η περιεκτικότητα σε ασβέστιο ενός γεύματος υπερβαίνει τα 50 mg και είναι μέγιστη σε περίπου 300 mg. Ο ψευδάργυρος σε συμπληρωματικές ποσότητες μπορεί να αναστείλει την απορρόφηση σιδήρου. Αύξηση της δόσης του σιδήρου που καταναλώνεται μειώνει την αποτελεσματικότητα της απορρόφησης, αλλά αυξάνει την απόλυτη ποσότητα απορρόφησης (Hunt, 2005).

Οι παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου χωρίζονται σε φυσιολογικούς, όπως είναι το φύλο, η ηλικία, η κατάσταση τυχόν ασθένειας και οι διατροφικές συνήθειες και σε διατροφικούς, όπως είναι το κιτρικό και το ασκορβικό οξύ, τα βοηθούν στην απορρόφηση του

σιδήρου, το ασβέστιο (γαλακτοκομικά προϊόντα), τα φυτικά οξέα (τσάι) και οι ζωικές και φυτικές πρωτεΐνες (Abbaspour *et al.*, 2014).

Ενισχυτές της απορρόφησης σιδήρου

Η απορρόφηση του σιδήρου επηρεάζεται από ένα αριθμό διατροφικών παραγόντων. Το ασκορβικό και το κιτρικό οξύ αυξάνουν την πρόσληψη σιδήρου εν μέρει δρώντας ως ασθενείς χηλικοί παράγοντες για να βοηθήσουν στη διαλυτοποίηση του μετάλλου στο δωδεκαδάκτυλο. Ο σίδηρος μεταφέρεται εύκολα από αυτές τις ενώσεις στα κύτταρα τοιχώματος του βλεννογόνου. Η δοσοεξαρτώμενη ενισχυτική επίδραση του φυσικού ή του προστιθέμενου ασκορβικού οξέος στην απορρόφηση του σιδήρου έχει αποδειχθεί από έρευνες. Το ενισχυτικό αποτέλεσμα απορρόφησης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητά του να μειώνει τον σίδηρο, αλλά οφείλεται επίσης και στη δυνατότητά του ασκορβικού οξέος να δημιουργεί χηλικό σίδηρο. Το ασκορβικό οξύ θα υπερνικήσει την αρνητική επίδραση στην απορρόφηση του σιδήρου όλων των αναστολέων, που περιλαμβάνουν φυτικά, πολυφαινόλες, ασβέστιο και πρωτεΐνες των γαλακτοκομικών προϊόντων, και θα αυξήσει την απορρόφηση τόσο του φυσικού όσο και του ενισχυτικού. Στα φρούτα και τα λαχανικά, η ενισχυτική δράση του ασκορβικού οξέος συχνά ακυρώνεται από την ανασταλτική δράση των πολυφαινολών. Το ασκορβικό οξύ είναι ο μόνος ενισχυτής απορρόφησης στις χορτοφαγικές δίαιτες και η απορρόφηση σιδήρου από χορτοφαγικά και vegan γεύματα μπορεί να βελτιστοποιηθεί καλύτερα με τη συμπεριληψη λαχανικών που περιέχουν ασκορβικό οξύ. Το μαγείρεμα, η βιομηχανική επεξεργασία και η αποθήκευση αποδομούν το ασκορβικό οξύ και αφαιρούν την ενισχυτική του επίδραση στην απορρόφηση σιδήρου (Hurrell and Egli, 2010).

Η ενισχυτική επίδραση του κρέατος, του ψαριού ή των πουλερικών στην απορρόφηση σιδήρου από τα χορτοφαγικά γεύματα έχει αποδειχθεί, και 30 g μυϊκού ιστού θεωρούνται ισοδύναμα με 25 mg ασκορβικού οξέος. Οι Bjorn-Rasmussen and Hallberg (1979), ανέφεραν ότι η προσθήκη κοτόπουλου, βοείου κρέατος ή ψαριού σε ένα γεύμα καλαμποκιού αύξησε την απορρόφηση του μη αιμικού σιδήρου 2-3 φορές χωρίς καμία επίδραση της ίδιας ποσότητας πρωτεΐνης που προστέθηκε με την αλβουμίνη του αυγού (Abbaspour *et al.*, 2014).

Αναστολείς της απορρόφησης σιδήρου

Η κατάσταση του σιδήρου σε άτομα, επηρεάζει κυρίως την απορρόφηση του μη αιμικού σιδήρου, ενώ η απορρόφηση του αιμικού σιδήρου γενικά επηρεάζεται λιγότερο. Υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης του σιδήρου και της απορρόφησης σιδήρου και με τη χρήση της φερριτίνης ως δείκτη της κατάστασης σιδήρου η σχέση μπορεί να περιγραφεί μαθηματικά.

Οι ανεπάρκειες βιταμίνης A και ριβοφλαβίνης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν το μεταβολισμό και την απορρόφηση του σιδήρου. Μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι η διόρθωση της ανεπάρκειας ριβοφλαβίνης βελτίωσε την ανταπόκριση στα συμπληρώματα σιδήρου.

Το πεπτίδιο εψιδίνη, που παράγεται στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό, έχει αναγνωριστεί ως βασικός ρυθμιστής της ομοιόστασης του σιδήρου. Η έκφραση της εψιδίνης είναι αυξημένη στη χρόνια φλεγμονή και την παχυσαρκία και μπορεί να συμβάλει στην αυξημένη εξάπλωση της ανεπάρκειας σιδήρου που παρατηρείται σε υπέρβαρους πληθυσμούς.

Η αιμοχρωμάτωση είναι μια διαταραχή της υπερβολικής συσσώρευσης σιδήρου που επηρεάζει έως και 1 στα 150 άτομα σε πληθυσμούς βορειοευρωπαϊκής καταγωγής. Η επίδραση της διαταραχής στην απορρόφηση του σιδήρου έχει μελετηθεί σε άτομα ελέγχου και σε ομόζυγα και ετερόζυγα άτομα. Τα ομόζυγα άτομα εμφάνισαν αυξημένη απορρόφηση αιμικού και μη αιμικού σιδήρου, ενώ η απορρόφηση μη αιμικού σιδήρου σε ετερόζυγα άτομα από γεύματα με μέτρια περιεκτικότητα σε σίδηρο δεν έδειξε να διαφέρει από τα άτομα ελέγχου. Ωστόσο, αυξημένη απορρόφηση παρατηρήθηκε σε ετερόζυγα άτομα από γεύματα υψηλής εμπλουτισμού με σίδηρο (Hurrell and Egli, 2010).

1.7 Σημασία διατροφικού χαρακτηρισμού υποπροϊόντων

Ο διατροφικός χαρακτηρισμός των υποπροϊόντων είναι απαραίτητος για ποικίλους λόγους, όπως για την αξιοποίηση αποβλήτων, για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, για τη μείωση του υποσιτισμού, για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και για την προώθηση της κυκλικής οικονομίας. Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με την αξιοποίηση αποβλήτων τα υποπροϊόντα, τα οποία προκύπτουν από την επεξεργασία διαφόρων τροφίμων, παρέχουν πολύτιμα θρεπτικά συστατικά και συμβάλλουν στην ελαχιστοποίηση της σπατάλης τροφίμων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η παραγωγή και η επεξεργασία τροφίμων παράγει υψηλά επίπεδα αποβλήτων και υποπροϊόντων, προκαλώντας περιβαλλοντικές επιπτώσεις και σημαντικές δαπάνες (Torres-León *et al.*, 2018). Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε ο διατροφικός χαρακτηρισμός των υποπροϊόντων είναι απαραίτητος και για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, διότι τα υποπροϊόντα χρησιμεύουν ως πηγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Για παράδειγμα, ύστερα από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί ότι τα υποπροϊόντα λαβρακιού αποτελούν πλούσια πηγή πρωτεϊνών, μετάλλων και ακόρεστων λιπαρών οξέων (Munekata *et al.*, 2020). Βέβαια, τα υποπροϊόντα μπορούν να βοηθήσουν και στην αντιμετώπιση του υποσιτισμού στις αναπτυσσόμενες χώρες. Έχουν αναληφθεί πρωτοβουλίες εμπλουτισμού τροφίμων για την αξιοποίηση υπολειμμάτων και υποπροϊόντων στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Τα υποπροϊόντα, επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως εναλλακτικές πηγές πρώτων υλών σε διάφορες βιομηχανίες, μειώνοντας έτσι τη ζήτηση των πρωτογενών πρώτων υλών και προωθώντας με αυτόν τον τρόπο μία πιο βιώσιμη ανάπτυξη. Τέλος, ο διατροφικός χαρακτηρισμός των υποπροϊόντων συμβάλλει στην κυκλική οικονομία αξιοποιώντας στο έπακρο τα απόβλητα τροφίμων και τα υποπροϊόντα, μειώνοντας έτσι τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και ελαχιστοποιώντας τον υποσιτισμό και την πείνα (Torres-León *et al.*, 2018).

Συνοπτικά, ο διατροφικός χαρακτηρισμός των υποπροϊόντων είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική χρήση τους στην επεξεργασία τροφίμων, την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων και την αντιμετώπιση ζητημάτων υποσιτισμού και πείνας στις αναπτυσσόμενες χώρες. Συμβάλλει επίσης στην περιβαλλοντική βιωσιμότητα και προωθεί μια κυκλική οικονομία στη βιομηχανία τροφίμων (Torres-León *et al.*, 2018).

1.8 Αντικείμενο και σκοπός μελέτης

Λόγω της συνεχούς ανάπτυξης της αλιείας και της συνεχούς ζήτησης για αλιευτικά προϊόντα, καθημερινά παράγονται μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, όπως κεφάλια, οστά, έντερα και κελύφη. Αυτά τα υποπροϊόντα αντιπροσωπεύουν το 30-70% του συνόλου των αλιευμάτων και αποτελούν μια πολύτιμη πηγή μικρο- και μακροθρεπτικών συστατικών, αλλά συχνά παραμένουν αχρησιμοποίητα και καταλήγουν ως απόβλητα. Η περαιτέρω εκμετάλλευση και αξιοποίηση αυτών των υποπροϊόντων θα μπορούσε να έχει θετικές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα της αλιείας και να προσφέρει επιπλέον οφέλη για τον τομέα. Για τον λόγο αυτό, είναι σημαντικό να αναζητηθούν και να αναπτυχθούν νέες τεχνολογίες και διαδικασίες που θα επιτρέπουν τη μετατροπή αυτών των υποπροϊόντων σε χρήσιμα προϊόντα με υψηλή προστιθέμενη αξία (FAO, 2020).

Η παραγωγή ψαριών στην Ελλάδα μέσω της ιχθυοκαλλιέργειας αποτελεί έναν ανερχόμενο κλάδο της ελληνικής οικονομίας. Κατά τη διαδικασία μεταποίησης των ψαριών που προέρχονται από την ιχθυοκαλλιέργεια, παράγονται διάφορα υποπροϊόντα. Αυτά τα υποπροϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για την παραγωγή προϊόντων χαμηλής αξίας, όπως ζωοτροφές, βιοκαύσιμα και λιπάσματα, είτε να απορριφθούν, με αποτέλεσμα να επιβαρύνουν το περιβάλλον.

Η ανάπτυξη των προϊόντων με υψηλή προστιθέμενη και διατροφική αξία από τα υποπροϊόντα της ιχθυοκαλλιέργειας είναι ένα σημαντικό πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί. Αυτή η επιλογή συμβαδίζει με τη σύγχρονη σκέψη για την ελαχιστοποίηση των αποβλήτων τροφίμων και την αξιοποίησή τους μέσω της κυκλικής οικονομίας, προκειμένου να δημιουργηθούν νέα τρόφιμα για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών.

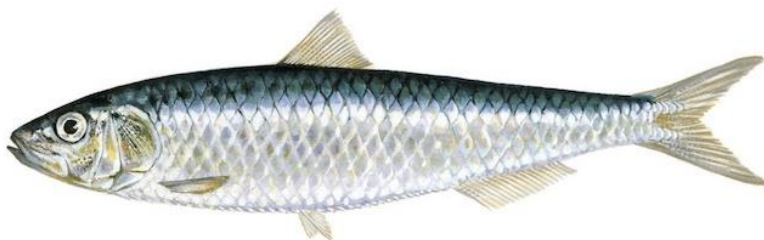
Στόχος της παρούσας μελέτης αποτελεί η μελέτη των υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας με σκοπό τη διερεύνηση δυνατότητας αξιοποίησής τους στην αύξηση της απορρόφησης σιδήρου στον άνθρωπο. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της *in vitro* πέψης προκειμένου να υπολογισθεί η προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου. Επίσης, στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, τέφρα, υγρασία, λιπαρές ύλες και υδατάνθρακες με τις μεθόδους του Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Κεφάλαιο 2: Μεθοδολογία

2.1 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Το ψάρι το οποίο επιλέχθηκε για την έρευνα είναι το *Sardina pilchardus* κοινώς σαρδέλα (WORMS, no date). Η μορφολογική περιγραφή της σαρδέλας είναι η ακόλουθη:

Σώμα υποκυλινδρικό, κοιλιά μάλλον στρογγυλεμένη (αλλά πιο συμπιεσμένη στα νεαρά άτομα). Οπίσθιο περιθώριο ανοίγματος βραγχίων ομαλά στρογγυλεμένο (χωρίς σαρκώδεις εκφύσεις). Τρεις έως πέντε διακριτές ραβδώσεις σώματος που ακτινοβολούν προς τα κάτω στο κάτω μέρος του οπίσθιου ιστού. Οι απολήξεις των κάτω βραγχίων δεν γίνονται πιο κοντές στη γωνία του πρώτου βραγχιακού τόξου, η επάνω σειρά δεν επικαλύπτει την κάτω. Οι τελευταίες 2 ακτίνες του πρωκτικού πτερυγίου μεγεθυμένες (EU Fish Commercial Names, 2024).



Εικόνα 2: Σαρδέλα - *Sardina pilchardus*.

Η συλλογή των δειγμάτων ψαριών πραγματοποιήθηκε το Δεκέμβριο του 2022 από την εταιρεία Κοπνα και έγινε άμεση ψύξη αυτών. Συλλέχθηκαν συνολικά 1,5kg από κεφάλια σαρδέλας ελεύθερης αλιείας με μέσο μέγεθος περίπου 0,018g. Έπειτα, ακολούθησε η απόψυξή τους, η άλμισή τους, ο αποκεφαλισμός τους και η απεντέρωσή τους. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των υποπροϊόντων και έγινε η αποστολή τους στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΓΠΑ) σε κουτιά από φελιζόλ με παγοκύστες.



Εικόνα 3: Δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας προς επεξεργασία.

Στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών το 1/3 των υποπροϊόντων επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο του ψησίματος στον αέρα στους 200°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, αφέθηκαν να φτάσουν σε

θερμοκρασία περιβάλλοντος και ομογενοποιήθηκαν με μύλο άλεσης (Retsch ZM 200, Retsch, Hann). Κατόπιν διατηρήθηκαν σε ερμητικά κλειστούς ουροσυλλέκτες στους -80°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.



Εικόνα 4: Δείγματα υποπροϊόντων σαρδέλας μετά την επεξεργασία.

Όλοι οι προσδιορισμοί διεξήχθησαν σύμφωνα με τις μεθόδους AOAC.

2.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Kjeldahl

Την πιο συνηθισμένη μέθοδο προσδιορισμού της συνολικής πρωτεΐνης ενός τροφίμου αποτελεί η μέθοδος Kjeldahl. Βασίζεται στην ολική μετατροπή των οργανικών αζωτούχων συστατικών των τροφίμων σε αμμωνιακά άλατα. Κατά τη μέτρηση συνπροσδιορίζεται και το μη πρωτεϊνικό άζωτο άλλων ενώσεων όπως των νουκλεϊκών οξέων, αλκαλοειδών, χρωστικών κ.λπ., καθώς και η αμμωνία και τα αμμωνιακά άλατα. Η ποσότητα της πρωτεΐνης προκύπτει πολλαπλασιάζοντας με κατάλληλο συντελεστή την περιεκτικότητα αζώτου στο δείγμα.

Αρχή της μεθόδου

Ορισμένη ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε σωλήνα καύσης (σωλήνας Kjeldahl). Οι πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα οργανικά συστατικά του τροφίμου χωνεύονται με πυκνό θειικό οξύ παρουσία καταλύτη και μετατρέπονται ποσοτικά σε αμμωνιακά. Η καύση διαρκεί έως ότου το χρώμα του δείγματος καταστεί κυανοπράσινο διαυγές.

Το προϊόν της χώνευσης καθίσταται αλκαλικό με περίσσεια NaOH και η παραγόμενη αμμωνία αποστάζεται μέσα σε διάλυμα βορικού οξέος. Τα σχηματιζόμενα βορικά ανιόντα ογκομετρούνται με

πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, παρουσία δείκτη μίγμα ερυθρού του μεθυλίου και πράσινου της βρωμοκρεσόλης. Από τον όγκο του πρότυπου διαλύματος οξέος που καταναλώθηκε βρίσκεται η περιεκτικότητα αζώτου στο δείγμα και πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα με κατάλληλο συντελεστή προκύπτει η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα έχουν ως εξής:

Χώνευση	$\text{Πρωτεΐνη} \xrightarrow[\text{θέρμανση, καταλύτης}]{\text{Θεικό οξύ}} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Εξουδετέρωση και Απόσταξη	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\text{NaOH} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{BO}_3^-$
Ογκομέτρηση	$\text{H}_2\text{BO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_3\text{BO}_3$

Καύση

Αρχικά, ζυγίζονται 0,5g δείγματος ψαριού και τοποθετούνται μέσα σε χαρτί ελεύθερο αζώτου, ώστε να μην επηρεαστεί ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης και στη συνέχεια στο σωλήνα καύσης. Προστίθεται μίγμα K_2SO_4 και CuSO_4 σε μορφή δισκίου, όπως και 12 mL πυκνό θειικό οξύ και 10 σταγόνες αντιαφριστικού παράγοντα. Η διαδικασία της καύσης ολοκληρώνεται όταν το δείγμα διαυγασθεί και αποκτήσει ένα κυανοπράσινο χρώμα.



Εικόνα 5: Συσκευή χώνευσης για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας πρωτεϊνών.

Απόσταξη

Εφόσον ολοκληρωθεί η διαδικασία, ο κάθε σωλήνας καύσης τοποθετείται στη συσκευή απόσταξης. Σε κωνική φιάλη τοποθετούνται 25mL διαλύματος βορικού οξέος με δείκτες μπλε της βρωμοκρεσόλης και ερυθρού του μεθυλίου. Η φιάλη τοποθετείται στην έξοδο της αποστακτικής συσκευής και η συσκευή τίθεται σε λειτουργία.

Ογκομέτρηση

Το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης ογκομετρείται με διάλυμα HCl 0,1M μέχρι την εμφάνιση ίχνους ροζ χροιάς.



Εικόνα 6: Συσκευή απόσταξης Kjeldahl.

Παράλληλα, εκτελείται και λευκός προσδιορισμός.

Η ποσότητα του αζώτου του δείγματος ως ποσοστό κατά μάζα υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\%N (w/w) = C_{HCl} \frac{(Vs - Vb)}{m} * 1,4007 ,$$

όπου C_{HCl} η συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος HCl (mol/L, εκφρασμένη με τέσσερα δεκαδικά ψηφία), V_s ο όγκος (mL) του πρότυπου διαλύματος υδροχλωρικού οξέος που καταναλώνεται στον προσδιορισμό του δείγματος, V_b ο όγκος (mL) του πρότυπου διαλύματος υδροχλωρικού οξέος που καταναλώνεται στον λευκό προσδιορισμό και m η μάζα του δείγματος (g).

Η τελική περιεκτικότητα σε άζωτο εκφράζεται με τρία δεκαδικά ψηφία.

Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό του ποσοστού πρωτεΐνης χρησιμοποιείται η σχέση:

$$\% \text{ πρωτεΐνη} = \% N * 6,25.$$

Ο συντελεστής 6,25 προκύπτει από το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες περιέχουν κατά μέσο όρο 16% άζωτο.

Η τελική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εκφράζεται με δύο δεκαδικά ψηφία.

2.3 Προσδιορισμός τέφρας

Τέφρα είναι το ανόργανο υπόλειμμα που απομένει μετά την τέλεια καύση ή πλήρη οξείδωση της οργανικής ύλης ενός τροφίμου. Η διαδικασία της αποτέφρωσης και τα είδη του εξοπλισμού είναι απαραίτητες γνώσεις ώστε να διασφαλιστούν αξιόπιστα αποτελέσματα. Υπάρχουν δύο είδη αποτέφρωσης: η ξηρή και η υγρή αποτέφρωση (οξείδωση). Στην ανάλυση των τροφίμων εφαρμόζεται συστηματικά η πρώτη. Στα προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά όπως το κρέας μπορεί να χρειάζεται να έχουν προξηρανθεί και να έχει εξαχθεί το λίπος πριν την αποτέφρωση. Η περιεκτικότητα σε τέφρα των τροφίμων μπορεί να εκφραστεί είτε επί νωπού βάρους (wet weight) ή επί ξηρού βάρους (dry wet basis).

Αρχή της μεθόδου

Ορισμένη ποσότητα δείγματος, ζυγισμένη με ακρίβεια τουλάχιστον 0,1 mg σε προ-πυρωμένο και προζυγισμένο χωνευτήριο, αποτεφρώνεται εντός ηλεκτρικού φούρνου σε θερμοκρασία 525 °C. Όταν ο φούρνος δεν διαθέτει διάταξη απαγωγής αερίων καύσης, είναι απαραίτητη η προγενέστερη απανθράκωση του δείγματος σε απαγωγό με τη χρήση φλόγας λύχνου Bunsen. Ως κριτήριο ολοκλήρωσης της αποτέφρωσης θεωρείται τόσο η σταθερότητα της μάζας του υπολείμματος της ξηρής καύσης όσο και το χρώμα του που πρέπει να είναι λευκό ή υπόλευκο.

Αρχικά, προπυρώνονται τα χωνευτήρια (AOAC Pt plate) στον ηλεκτρικό φούρνο στην ίδια θερμοκρασία της αποτέφρωσης των δειγμάτων (525°C) μέχρι σταθερού βάρους (συνήθως 15 min). Στη συνέχεια, τοποθετούνται στον ξηραντήρα μέχρι να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό (με ακρίβεια $\pm 0,1\text{mg}$).

Στη συνέχεια, 4g δείγματος ψαριού ζυγίζονται σε χωνευτήριο και καταγράφεται το βάρος δείγματος και χωνευτηρίου και έπειτα θερμαίνονται αργά πάνω από φλόγα λύχνου Bunsen, τοποθετημένο σε τρίγωνο από πυρίμαχο υλικό, το οποίο στηρίζεται πάνω σε τρίποδο, μέχρι να σταματήσει η διόγκωση και απανθρακωθεί το μεγαλύτερο μέρος της οργανικής ύλης. Η θέρμανση πρέπει να είναι ήπια (αναγωγική φλόγα) προκειμένου να αποφευχθεί αφρισμός ή βίαιη αποσύνθεση του δείγματος και πρόωρη ανάφλεξή του. Αν τυχόν το δείγμα αναφλεχθεί, σκεπάζεται με το κάλυμμα του χωνευτηρίου για να σβήσει η φλόγα.



Εικόνα 7: Φλόγα λύχνου Bunsen, τρίγωνο από πυρίμαχο υλικό, το οποίο στηρίζεται πάνω σε τρίποδο.

Αφού παύσει η έκλυση των πτητικών προϊόντων της αποσύνθεσης, το χωνευτήριο θερμαίνεται έντονα με τη χρήση οξειδωτικής φλόγας, μέχρις ότου απανθρακωθεί το δείγμα και αποκτήσει ένα υπόλευκο χρώμα και έπειτα τοποθετείται στο πυριαντήριο σε θερμοκρασία στους 525 °C έως ότου μετατραπεί σε τέφρα (λευκή- γκρι σκόνη).



Εικόνα 8: Πυριαντήριο με χωνευτήρια, ώστε τα δείγματα να μετατραπούν σε τέφρα.

Το χωνευτήριο απομακρύνεται από το φούρνο με τη βοήθεια πυράγρας.

Αφήνεται να κρυώσει και μεταφέρεται σε ξηραντήρα για 60 min, προκειμένου να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα ζυγίζεται με ακρίβεια $\pm 0,1$ mg.



Εικόνα 9: Ξηραντήρας με χωνευτήρια προκειμένου να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού της τέφρας χρησιμοποιείται η σχέση:

$$\% \text{Τέφρα (w/w)} = \frac{\text{μάζα τέφρας}}{\text{μάζα δείγματος}} * 100\%$$

2.4 Προσδιορισμός υγρασίας

Αρχή της μεθόδου

Ορισμένη ποσότητα δείγματος, τοποθετημένη σε προξηραμένο και προζυγισμένο φιαλίδιο ξήρανσης, θερμαίνεται για δύο ώρες σε θερμοκρασία 130 °C εντός πυριαντηρίου. Από την απώλεια της μάζας υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε υγρασία.

Αρχικά, τα χωνευτήρια (AOAC Pt Plate) προπυρώνονται στον ηλεκτρικό φούρνο στην ίδια θερμοκρασία αποξήρανσης του δείγματος (103 °C) μέχρι σταθερού βάρους (συνήθως 1 ώρα) και έπειτα ψύχονται στον ξηραντήρα και ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό (με ακρίβεια $\pm 0,1$ mg) μόλις φθάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Στη συνέχεια, ζυγίζονται 10g δείγματος ψαριού σε χωνευτήριο και καταγράφεται το βάρος δείγματος και χωνευτηρίου και το χωνευτήριο τοποθετείται στον ηλεκτρικό φούρνο στους 103 °C και αφήνεται όλο το βράδυ έως ότου αποκτήσει σταθερό βάρος.



Εικόνα 10: Χωνευτήρια με δείγμα υποπροϊόντων, ώστε να αποκτήσουν σταθερό βάρος.

Τέλος, την επόμενη ημέρα, το χωνευτήριο απομακρύνεται από το φούρνο με τη βοήθεια πυράγγρας και αφήνεται να κρυώσει και τοποθετείται σε ξηραντήρα για 60 min, προκειμένου να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα ζυγίζεται με ακρίβεια $\pm 0,1$ mg.



Εικόνα 11: Κάψες πορσελάνης κατά τον προσδιορισμό υγρασίας.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού της υγρασίας χρησιμοποιείται η σχέση:

$$\% \text{Υγρασία} = \frac{(\text{μάζα δείγματος} - \text{μάζα ξηρού δείγματος})}{\text{μάζα δείγματος}} * 100\%$$

2.5 Προσδιορισμός λιπαρών υλών

Αρχή της μεθόδου

Το λίπος και τα λιπαρά οξέα εξάγονται από τα τρόφιμα με υδρολυτικές μεθόδους. Προστίθεται πυρογαλλικό οξύ στα προϊόντα, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Το τριγλυκερίδιο, τριουνδεκανοΐνη, προστίθεται ως εσωτερικό πρότυπο. Το λίπος εξάγεται σε αιθέρα και στη συνέχεια μεθυλιώνεται σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων μετριούνται ποσοτικά με αέρια χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης έναντι εσωτερικού προτύπου C11:0. Το ολικό λίπος υπολογίζεται ως το άθροισμα των επιμέρους λιπαρών οξέων, εκφραζόμενο σε ισοδύναμα τριγλυκεριδίων. Τα κορεσμένα και μονοακόρεστα λίπη υπολογίζονται ως άθροισμα των αντίστοιχων λιπαρών οξέων. Τα μονοακόρεστα λίπη περιλαμβάνουν μόνο τη μορφή cis.

Προσδιορισμός (AOAC 948.15)

Αρχικά, ζυγίζονται 2g ομογενοποιημένου δείγματος σε συσκευή Mojonnier και προστίθενται 8mL π. HCl και θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 80 °C. Στη συνέχεια, αφήνονται να φθάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθενται 7mL αιθανόλης 95% και 25mL διαιθυλαιθέρα. Έπειτα, πωματίζονται με φελλό και αναδεύονται έντονα και τέλος προστίθενται 25mL πετρελαϊκού αιθέρα και επαναλαμβάνεται η έντονη ανάδευση και αφήνονται όλο το βράδυ σε ηρεμία.



Εικόνα 12: Συσκευές Mojonnier.

Παράλληλα, προζυγίζονται τα ποτήρια ζέσεως των 125mL μαζί με τα κομματάκια πορσελάνης και τοποθετούνται στο φούρνο στους 100 °C για 30 min και έπειτα αφήνονται να κρυώσουν σε ξηραντήριο και ζυγίζονται ξανά.

Την επόμενη ημέρα εκχυλίζεται με προσοχή όλη η ποσότητα διαλύματος λίπους – αιθέρα από τις συσκευές Mojonnier στα προζυγισμένα ποτήρια ζέσεως και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση του υγρού που υπάρχει στη συσκευή για δύο ακόμα φορές προσθέτοντας κάθε φορά 15mL διαιθυλαιθέρα και 15mL πετρελαϊκού αιθέρα ανακινώντας έντονα.

Τέλος, εξατμίζονται οι αιθέρες σε υδατόλουτρο στους 80 °C. Ακολουθεί ξήρανση στο φούρνο στους 100 °C μέχρι σταθερού βάρους και αφήνονται τα ποτήρια ζέσεως να κρυώσουν.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % λίπος από όξινη υδρόλυση.

2.6 Προσδιορισμός υδατανθράκων

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών υδατανθράκων αφαιρούνται το άθροισμα των εκατοστιαίων ποσοστών της περιεκτικότητας σε τέφρα, λίπος, υγρασία και πρωτεΐνη από το 100.

2.7 Εκτίμηση βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου

Όλα τα σκεύη, τα οποία χρησιμοποιούνται στην πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου πλένονται αρχικά με νερό ύδρευσης και σαπούνι και έπειτα ξεπλένονται με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τοποθετούνται όλο το βράδυ σε διάλυμα HCl 1M και την επόμενη ημέρα ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν.

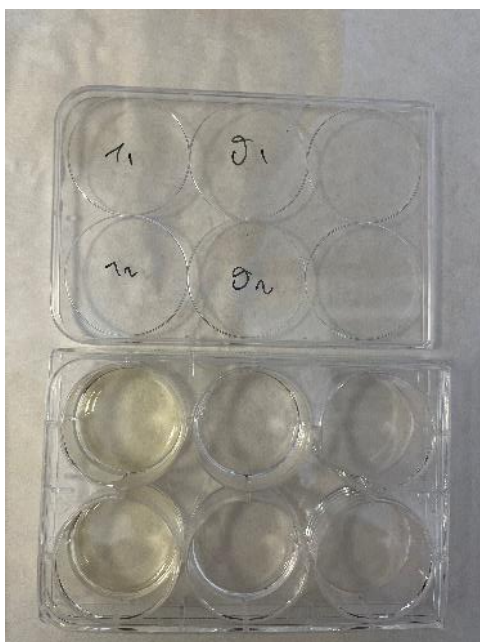
Ο πειραματικός σχεδιασμός της In Vitro πέψης ψητών υποπροϊόντων ψαριών βασίστηκε στην πειραματική διαδικασία των Argyri *et al.* (2009), με κάποιες διαφοροποιήσεις.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, σε πηγάδια 6-well-plate προστίθεται δείγμα υποπροϊόντων ψαριού, έτσι ώστε στο τελικό δείγμα να υπάρχουν 4g πρωτεΐνης/100mL δείγματος. Έπειτα, ρυθμίζεται το pH των δειγμάτων στο 2,8 προσθέτοντας HCl συγκέντρωσης 12M. Στη συνέχεια, προστίθεται HCl 0,01M, ώστε ο τελικός όγκος κάθε πηγαδιού να είναι 2mL. Στο τέλος, σε κάθε θέση του 6-well-plate προστίθενται 20μL FeCl₃.

Για το αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται διάλυμα (2mL) FeCl₃ με τελική συγκέντρωση 12mg/L αραιωμένο σε διάλυμα HCl 0,01M, ενώ για το ασκορβικό οξύ (θετικό δείγμα ελέγχου) χρησιμοποιείται όξινο διάλυμα (HCl 0,01M), το οποίο περιέχει ασκορβικό οξύ (AA) και FeCl₃ σε συγκέντρωση 240 mg/L και 12 mg/L αντίστοιχα.

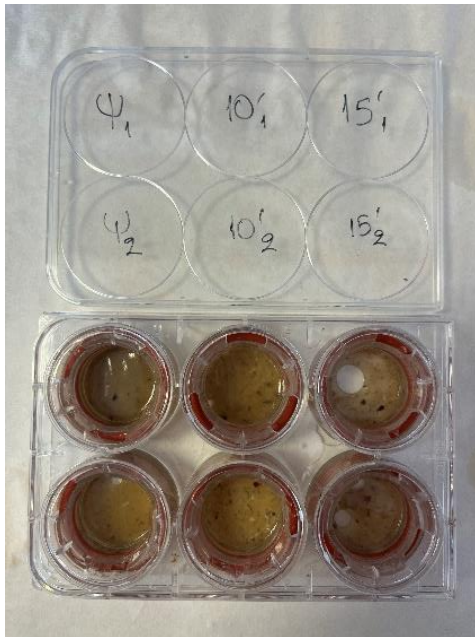
Στη συνέχεια, σε κάθε θέση του 6-well-plate που περιέχονται τα παραπάνω δείγματα, προστίθεται πεψίνη (0,1mL) με χρονική διαφορά και έπειτα τα πηγάδια καλύπτονται σε πλαστικό καπάκι. Ακολουθεί χειροκίνητη ανάδευση για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων. Τέλος, τοποθετούνται στον επωαστήρα για 2 ώρες (37 °C, 110RPM) με σκοπό την προσομοίωση της γαστρικής πέψης.



Εικόνα 13: 6-well-plate πριν τοποθετηθούν στον επωαστήρα για την προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης.

Εν συνεχεία, σε κάθε θέση του 6-well-plate τοποθετείται ένα κυλινδρικό ένθετο με μεμβράνη, το οποίο τοποθετείται με τέτοιο τρόπο ώστε να έρχεται σε άμεση επαφή με τη διαδικασία της πέψης που πραγματοποιείται στο 6-well-plate. Η μεμβράνη είναι δεμένη με ελαστικό δακτύλιο στην κορυφή του κυλινδρικού ενθέτου. Έπειτα, το ένθετο πληρώνεται με 2mL ρυθμιστικού διαλύματος PIPES με $\text{pH}=6,3$, με χρονική διαφορά και έτσι το PIPES διαχέεται μέσω της μεμβράνης ρυθμίζοντας το pH των δειγμάτων από 2,8 σε 6,3.

Μετά από 30 λεπτά στο κάτω μέρος του κάθε ένθετου προστίθενται 0,5mL του διαλύματος παγκρεατίνης - χολικών αλάτων, τα οποία είναι διαλυμένα σε NaHCO_3 0,1M, με χρονική διαφορά. Η επώαση συνεχίζεται για ακόμα 2 ώρες (37°C , 110RPM).



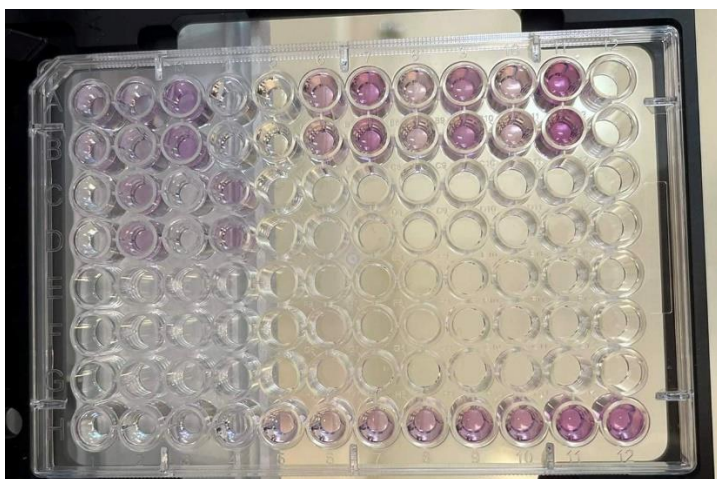
Εικόνα 14: Διεξαγωγή δοκιμής *in vitro* γαστρεντερικής πέψης σε 6-well-plate.

Στο τέλος του χρόνου επώασης σε κάθε θέση του 6-well-plate υπάρχουν στην επιφάνεια της μεμβράνης οι διαλυτές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (υπερκείμενες ενώσεις), ενώ στη βάση της κάθε θέσης οι αδιάλυτες και διαλυτές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους. Συλλέγονται οι υπερκείμενες ενώσεις, καθώς και οι ενώσεις της βάσης σε διαφορετικά Eppendorf και φυγοκεντρούνται στα 10.000 RPM για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης όλα τα δείγματα μεταφέρονται σε νέα Eppendorf.

Οι συγκεντρώσεις του ολικού σιδήρου (δισθενούς και τρισθενούς), αλλά και η συγκέντρωση του δισθενούς σιδήρου των υπερκείμενων ενώσεων και των ενώσεων της βάσης, οι οποίες προκύπτουν από τη φυγοκέντρωση των διαλυτών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (υπερκείμενες ενώσεις) της μεμβράνης και από τη φυγοκέντρωση των αδιάλυτων και διαλυτών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους, αντίστοιχα, μετρούνται με τροποποίηση της μεθόδου χρωμογονικής φερροζίνης.

Για τον υπολογισμό του δισθενούς διαλυτού σιδήρου σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf προστίθενται 0,5mL της υπερκείμενης φάσης, η οποία περιέχει τις διαλυτές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και 0,25mL μη-αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης (Non-reducing protein precipitant solution), όπως επίσης σε άλλο φιαλίδιο τύπου Eppendorf προστίθενται 0,5mL των ενώσεων της βάσης και 0,25mL μη-αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης (Non-reducing protein precipitant solution). Τα δείγματα αφήνονται όλο το βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη ημέρα, φυγοκεντρούνται στα 5.000 RPM για 10 λεπτά. Παράλληλα, παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 0,3M.

Για τη μέτρηση του δισθενούς σιδήρου λαμβάνεται 0,1mL από το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε πλακίδιο μικροκυψελίδων 96 θέσεων (96 well-plate). Έπειτα, σε κάθε θέση προστίθενται 0,225mL διαλύματος φερροζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes (200μL Hepes αναμιγνύονται με 25μL φερροζίνης). Μόλις προστεθεί το διάλυμα γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 562nm.

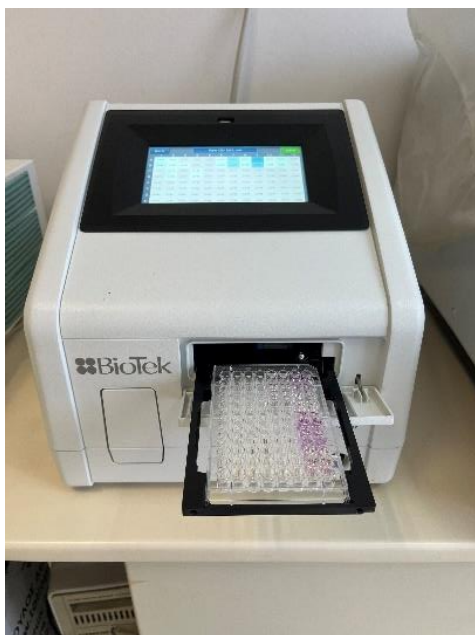


Εικόνα 15: Δοχείο 96 θέσεων (96-well plate) μετά τη μέτρηση διασθενούς σιδήρου.

Για τον υπολογισμό του ολικού διαλυτού σιδήρου σε φιαλίδια τύπου Eppendorf προστίθενται 0,5mL της υπερκείμενης φάσης, η οποία περιέχει τις διαλυτές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και 0,25mL αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης (reducing protein precipitant solution), όπως επίσης σε άλλο φιαλίδιο τύπου Eppendorf προστίθενται 0,5mL των ενώσεων της βάσης και 0,25mL αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης (reducing protein precipitant solution). Τα δείγματα αφήνονται όλο το βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη ημέρα, φυγοκεντρώνονται στα 5.000 RPM για 10 λεπτά. Παράλληλα, παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 0,3M.

Για τη μέτρηση του ολικού διαλυτού σιδήρου λαμβάνεται 0,1mL από το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε πλακίδιο μικροκυψελίδων 96 θέσεων (96 well-plate). Έπειτα, σε κάθε θέση προστίθενται 0,225mL διαλύματος φερροζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (200μL HEPES αναμιγνύονται με 25μL φερροζίνης). Προστίθεται το διάλυμα και μετά από μία ώρα γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 562nm.

Αναλυτικότερα τα βήματα που ακολουθήθηκαν παρατίθενται στο Παράρτημα 1.



Εικόνα 16: Φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση ολικού και δισθενούς σιδήρου.

2.7.1 Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του σιδήρου χρησιμοποιούνται τριχλωριούχος σίδηρος FeCl_3 ($M=270,33 \text{ g/mol}$), ρυθμιστικό διάλυμα Herpes 0,3M ($\text{pH}=7,5$), διάλυμα χρωμογονικής φερροζίνης και αναγωγικό διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεΐνης (reducing protein precipitant solution).

Σε ογκομετρικές φιάλες των 10mL, προστίθενται οι ποσότητες 0, 0,5, 1, 2, 5mg/L διαλύματος FeCl_3 και συμπληρώνονται με HCl 0,01M μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια, σε κάθε ογκομετρική φιάλη προστίθενται 0,5435mL (543,5μL) αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης (reducing protein precipitant solution) και έπειτα τα δείγματα μεταφέρονται σε Eppendorf και αφήνονται όλο το βράδυ. Έπειτα, φυγοκεντρώνονται στα 5.000 RPM για 10 λεπτά. Εν συνεχεία, 0,1mL από τα υπερκείμενα τοποθετούνται σε πλακίδιο μικροκυψελίδων 96 θέσεων (96 well-plate) και προστίθενται 0,225mL διαλύματος φερροζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα Herpes (200μL Herpes αναμιγνύονται με 25μL φερροζίνη). Τέλος, προσδιορίζεται αμέσως η απορρόφηση του Fe^{2+} στα 562nm.

Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις σιδήρου και απορροφήσεις στα 562nm της καμπύλης σιδήρου, καθώς επίσης και το γράφημα της πρότυπης καμπύλης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου, παρατίθενται στο παράρτημα 2.

2.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα StatGraphics Centurion XVII (έκδοση 17.2.00 32-bit). Μέσω της δοκιμασίας Shapiro- Wilk ελέγχθηκε η κανονική κατανομή όλων των μεταβλητών. Μέσω του t- test ελέγχθηκαν οι διαφορές μεταξύ των μεταβλητών για όσες μεταβλητές ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Για τις μεταβλητές, οι οποίες δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, οι διαφορές τους ελέγχθηκαν με το μη παραμετρικό Mann-Whitney test. Τέλος, η στατιστική διαφορά έγινε αποδεκτή και η μηδενική υπόθεση απορρίφθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p\text{-value} < 0,05$).

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Διατροφική σύσταση

Τα προς ανάλυση υποπροϊόντα (κεφάλια) σαρδέλας εκτέθηκαν και σε αναλύσεις σχετικές με το ποσοστό (%) πρωτεϊνών, τέφρας, υγρασίας, λίπους και υδατανθράκων. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων βρέθηκαν ίσα με $21,73 \pm 0,42$ για τις πρωτεΐνες, $24,94 \pm 0,17$ για την τέφρα, $7,00 \pm 3,99$ για την υγρασία, $10,24 \pm 0,46$ για το λίπος και $36,09 \pm 3,67$ για τους υδατάνθρακες. (Πίνακας 4)

Πίνακας 4: Μέσοι όροι διατροφικής σύστασης των υποπροϊόντων (κεφάλια) από σαρδέλες.

(g/100g)*	μ	σ
% Πρωτεΐνες	21,73	0,42
% Τέφρα	24,94	0,17
% Υγρασία	7,00	3,99
% Λίπος	10,24	0,46
% Υδατάνθρακες	36,09	3,67

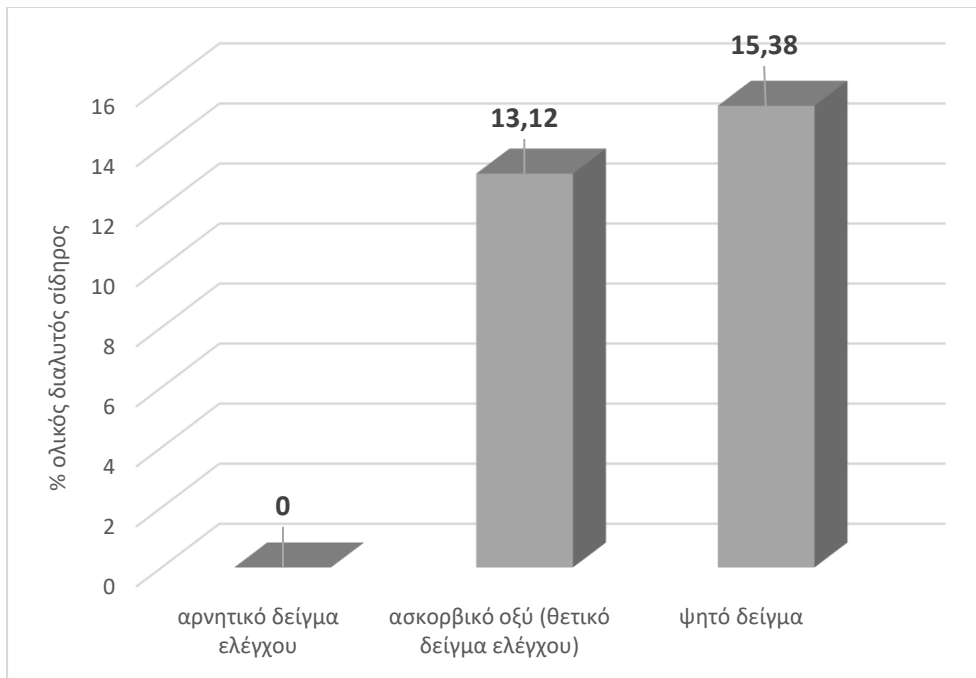
*Όπου μ είναι ο μέσος όρος και όπου σ είναι η τυπική απόκλιση. Οι υδατάνθρακες υπολογίζονται εκ διαφοράς.

3.2 Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου

Στην παρούσα μελέτη στις μετρήσεις του ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) το ποσοστό διασθενούς διαλυτού σιδήρου αντιστοιχεί σε 11.6%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για το αρνητικό δείγμα ελέγχου είναι μηδενικό.

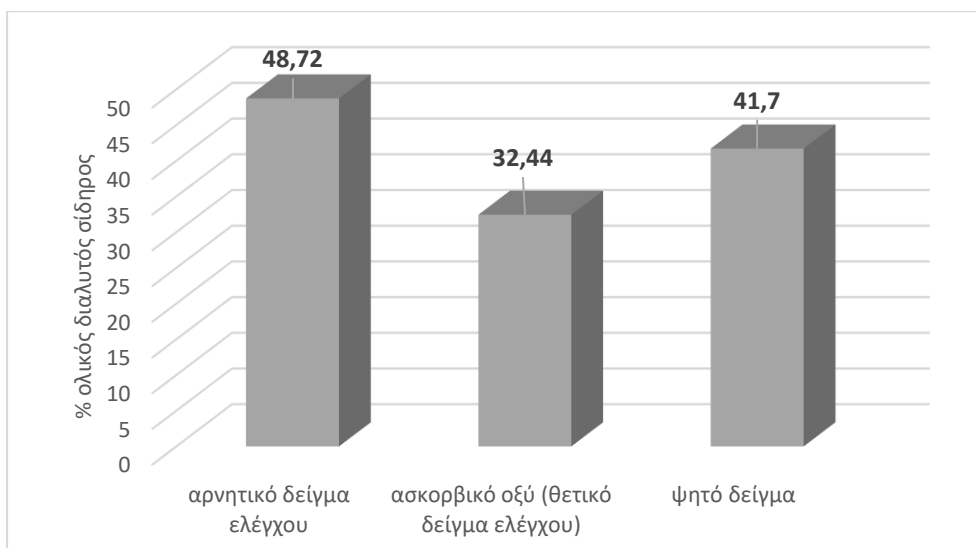
Στην παρούσα μελέτη στις μετρήσεις του ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) το ποσοστό ολικού διαλυτού σιδήρου αντιστοιχεί σε 13.1%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για το αρνητικό δείγμα ελέγχου είναι μηδενικό.

Η στατιστική ανάλυση που έγινε στα αποτελέσματα της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας του αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης στις υπερκείμενες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους έδειξε ότι βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρνητικού - ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) και αρνητικού - ψητού δείγματος ($p < 0,05$). Οι διαφορές μεταξύ ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) - ψητού δείγματος δεν εκτιμήθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p > 0,05$).



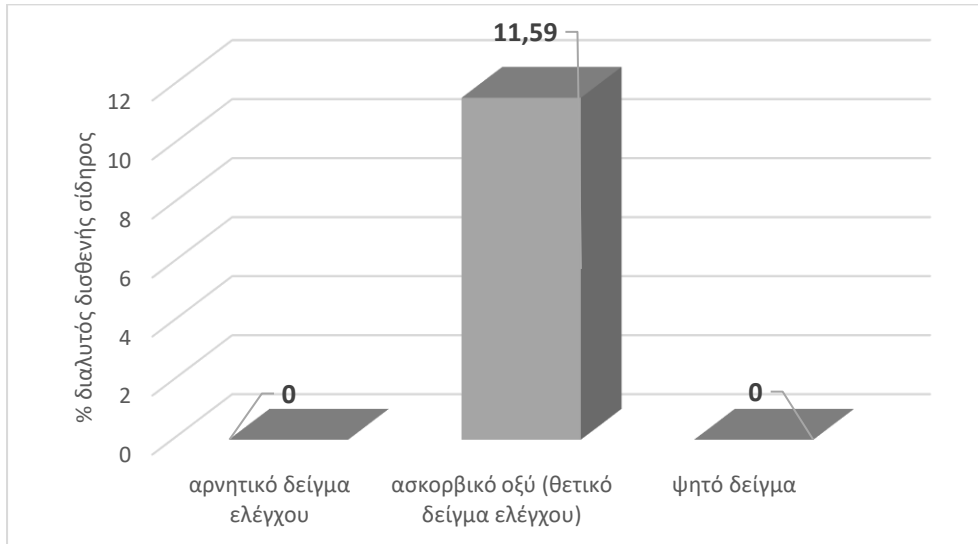
Διάγραμμα 1: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα ολικού διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων χαμηλού μοριακού θάρους (υπερκείμενες ενώσεις).

Η στατιστική ανάλυση που έγινε στα αποτελέσματα της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας του αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης στις ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους έδειξε ότι οι διαφορές μεταξύ αρνητικού – ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου), ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) - ψητού δείγματος και αρνητικού - ψητού δείγματος δεν εκτιμήθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p > 0,05$).



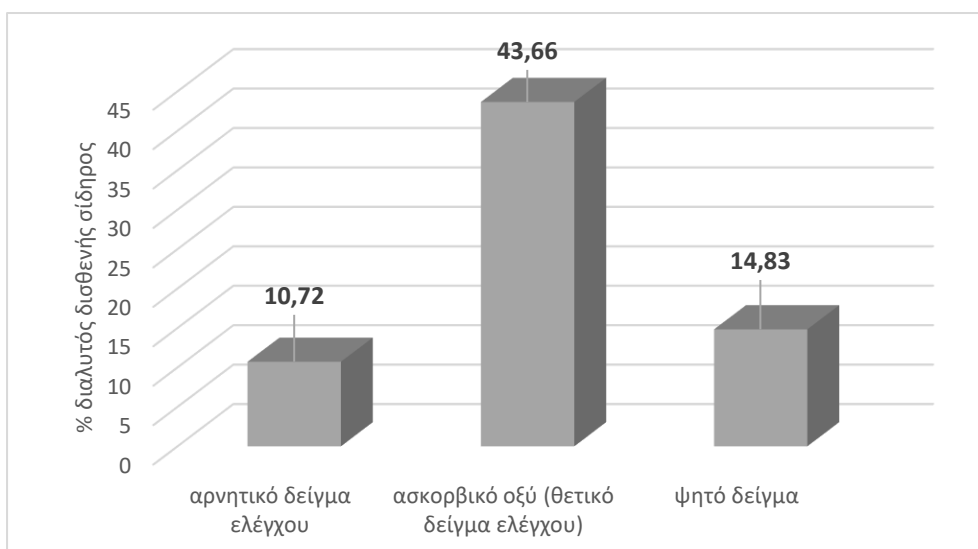
Διάγραμμα 2: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα ολικού διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων υψηλού μοριακού θάρους (υπερκείμενες ενώσεις).

Η στατιστική ανάλυση που έγινε στα αποτελέσματα της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας του μη-αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης στις υπερκείμενες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους έδειξε ότι βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρνητικού – ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου), ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) - ψητού δείγματος και αρνητικού - ψητού δείγματος ($p < 0,05$).



Διάγραμμα 3: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα δισθενούς διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (υπερκείμενες ενώσεις).

Η στατιστική ανάλυση που έγινε στα αποτελέσματα της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας του μη-αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης στις ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους έδειξε ότι βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρνητικού – ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) και ασκορβικού οξέος (θετικό δείγμα ελέγχου) - ψητού δείγματος ($p < 0,05$). Οι διαφορές μεταξύ αρνητικού – ψητού δείγματος δεν εκτιμήθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p > 0,05$).



Διάγραμμα 4: Προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα δισθενούς διαλυτού σιδήρου σε δείγματα υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας των διαλυτών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

Λόγω της συνεχούς ανάπτυξης της ιχθυοκαλλιέργειας και της συνεχούς ζήτησης των προϊόντων αυτής, δημιουργούνται καθημερινά μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, όπως κεφάλια, οστά, έντερα και κελύφη. Τα υποπροϊόντα αυτά αντιπροσωπεύουν το 30-70% του συνόλου των ψαριών και αποτελούν μία καλή πηγή μικρο- και μακροθρεπτικών συστατικών, αλλά τις περισσότερες φορές μένουν ανεκμετάλλευτα και καταλήγουν ως απόβλητα.

Η εκμετάλλευση των παραπροϊόντων της αλιείας μπορεί να υποστηρίξει τη βιωσιμότητα της υδατοκαλλιέργειας. Οι υψηλές αποδόσεις των παραπροϊόντων υποδηλώνουν ότι ένα μεγάλο μέρος των ψαριών απορρίπτεται και παραμένει αναξιοποίητο, με ποσοστά απόρριψης που κυμαίνονται ανάλογα με το είδος του ψαριού και την επεξεργασία, από 40 - 85% (Kandyliari *et al.*, 2020; Grigorakis, 2007; Shahidi and Kamil, 2001). Ο διατροφικός χαρακτηρισμός των υποπροϊόντων είναι απαραίτητος και για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, διότι τα υποπροϊόντα χρησιμεύουν ως πηγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Υπάρχει η αντίληψη της αγοράς ότι ψάρια μικρών μεγεθών, που ζυγίζουν λιγότερο από 1 κιλό, έχουν κατώτερη ποιότητα (Monfort, 2010). Το μέγεθος των ψαριών από μόνο του θεωρείται παράγοντας που συμβάλλει στην ποιότητα, κυρίως λόγω της γενικής αύξησης του ενδομυϊκού λίπους με την ανάπτυξη των ψαριών (Grigorakis, 2011). Επίσης η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και σίδηρο ψαριών σε σκόνη είναι υψηλή, και ως εκ τούτου θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως καλή και οικονομικά προσιτή πηγή αυτών των θρεπτικών συστατικών για τις φτωχές, ευάλωτες ομάδες (Lawrence *et al.*, 2017).

Οι νέες τάσεις στον τομέα των τροφίμων και της διατροφής περιλαμβάνουν τη χρήση νέων συστατικών και λειτουργικών τροφών, που μπορεί να έχουν αντίκτυπο στην πρόσληψη σιδήρου. Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να προβλεφθεί και να αξιολογηθεί η βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου. Ενώ οι *in vitro* μέθοδοι έχουν τους περιορισμούς τους, μπορεί να είναι επωφελείς για προκαταρκτικό έλεγχο πριν από την ανάληψη δαπανηρών μελετών σε ανθρώπους. Έχει επινοηθεί ένα νέο σύστημα για τη διευκόλυνση γρήγορων, οικονομικά αποδοτικών και αποδοτικών πειραματικών διαδικασιών που συμμορφώνονται με την *in vitro* μεθοδολογία διαλυτότητας που προτάθηκε αρχικά από τους Miller *et al.* (1981).

Η *in vitro* μέθοδος πέψης μιμείται τις διεργασίες που συμβαίνουν εντός του γαστρεντερικού σωλήνα, συμπεριλαμβανομένων των χημικών μετασχηματισμών των διατροφικών συστατικών. Επιτρέπει την εξέταση των χημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πεπτικών συστατικών και των διακυμάνσεων του pH που επηρεάζουν την απορρόφηση του σιδήρου και άλλων διατροφικών συστατικών. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος διαχωρίζει τα κλάσματα με βάση το μοριακό τους βάρος, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του βαθμού στον οποίο απορροφάται ο σίδηρος. Η πρόβλεψη της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου βασίζεται στη μέτρηση του διαλυτού σιδήρου (Argyri *et al.*, 2009).

Ο σίδηρος ως μικροθρεπτικό συστατικό και βασικό στοιχείο διαφόρων μεταβολικών διεργασιών στον άνθρωπο ελέγχεται στην παρούσα μελέτη με την επιλογή του είδους *Sardina pilchardus* και καταδεικνύεται η *in vitro* επίδραση των υποπροϊόντων της σαρδέλας στην απορρόφηση σιδήρου, ως προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα. Εξετάστηκε η επίδραση των υποπροϊόντων (κεφάλια) από ψητά δείγματα σαρδέλας στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου. Αυτό γίνεται λόγω του γεγονότος ότι το

ποσοστό διαλυτότητας που προκύπτει από την *in vitro* πέψη αποτελεί αξιόπιστη ένδειξη της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου.

Σύμφωνα με τους Karsokefalu and Miller (1991) παρατηρείται ότι ο δισθενής διαλυτός σίδηρος μπορεί να είναι καλύτερος δείκτης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου από τον ολικό διαλυτό σίδηρο. Αυτή η πληροφορία μπορεί να εξαχθεί από την ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης, που αξιολογεί την ποσοτική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας διαλυτότητας και απορρόφησης. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι ο δισθενής διαλυτός σίδηρος που μπορεί να απορροφηθεί, αιτιολογεί ένα μεγαλύτερο ποσοστό (75,4%) των συνολικών διακυμάνσεων στην απορρόφηση σιδήρου από ό,τι ο ολικός διαλυτός σίδηρος (67,2%). Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με προηγούμενες παρατηρήσεις (Argyri *et al.*, 2009) που υποδεικνύουν ότι ο διαλυτός σίδηρος μπορεί να είναι ένας πιο αξιόπιστος παράγοντας για την απορρόφηση του δισθενούς διαλυτού σιδήρου από τον ανθρώπινο οργανισμό από ότι ο ολικός διαλυτός σίδηρος.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η ερμηνεία αυτή έχει περιορισμούς που συνδέονται με το γεγονός ότι οι διαδικασίες *in vitro* έχουν τη δυνατότητα να προσομοιώνουν, αλλά όχι να αναπαράγουν φυσιολογικές συνθήκες. Οι *in vitro* μέθοδοι έχουν προκαλέσει συζητήσεις διότι, σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν μπορούν να προβλέψουν την έκταση της απόκρισης όπως αυτή μετράται στους ανθρώπους και, καμία φορά, η πρόβλεψη είναι προς τη λάθος κατεύθυνση της απόκρισης (Fairweather-Tait *et al.*, 2005). Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις (Karsokefalu *et al.*, 2005) και εδώ μπορεί να προβλεφθεί η επίδραση των διατροφικών αλληλεπιδράσεων στη βιοδιαθεσιμότητα σε σχέση με τους μάρτυρες. Έτσι, οι μέθοδοι *in vitro* αποδείχθηκαν χρήσιμες, ιδίως κατά τη διαλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων πριν από τις δοκιμές σε ανθρώπους, λαμβάνοντας υπόψη τα αναμφισβήτητα πλεονεκτήματα που μπορούν να προσφέρουν όσον αφορά την αποτελεσματικότητα, το κόστος, την προσέλευση και την ευελιξία στον πειραματικό σχεδιασμό.

Η θεματολογία της παρούσας μελέτης προέκυψε λόγω των συνθηκών που περιγράφονται παραπάνω, καθώς και του ρόλου του σιδήρου στην ανθρώπινη υγεία. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι άνθρωποι παρουσιάζουν αναιμία, είτε ζουν σε ανεπτυγμένες, είτε σε αναπτυσσόμενες χώρες, γεγονός που προκαλεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας (Abbasrour *et al.*, 2014). Το ενδιαφέρον αυτό σχετικά με την εύρεση μηχανισμών βελτιστοποίησης του ποσοστού σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό έχει οδηγήσει στην έρευνα για ενισχυτές βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου, προκειμένου να μειωθούν τα ποσοστά αναιμίας. Σε συνδυασμό με τον αυξανόμενο όγκο αποβλήτων τροφίμων και ειδικότερα υποπροϊόντων ψαριών, η παρούσα μελέτη εστιάζει στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων (κεφάλια) σαρδέλας, μέσω της *in vitro* αξιολόγησης της προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου.

Στην παρούσα μελέτη οι τιμές του δισθενούς διαλυτού σιδήρου (%) στο αρνητικό δείγμα ελέγχου βρέθηκαν μηδενικές, όπως και του ψητού υποπροϊόντος ψαριού που τέθηκε προς ανάλυση. Στο ασκορβικό οξύ (θετικό δείγμα ελέγχου) οι τιμές του δισθενούς διαλυτού σιδήρου (%) βρέθηκαν ίσες με $11,6 \pm 6,9$.

Σε ερευνητικό επίπεδο έχουν διεξαχθεί έρευνες για πεπτίδια γάλακτος και κρέατος που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου.

Η απορρόφηση του σιδήρου από το μητρικό γάλα είναι υψηλότερη από αυτή του αγελαδινού γάλακτος με την απορρόφηση σιδήρου από το αγελαδινό να φτάνει 10-15%. Η αιτία αυτής της διαφοράς που παρατηρήθηκε στη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου ανάμεσα στο μητρικό και στο

αγελαδινό γάλα, δεν έχει προσδιοριστεί, αλλά αρκετές διαφορές στη χημική σύνθεση έχουν προταθεί ως εξήγηση (Hallberg *et al.*, 1992).

Σε μελέτη της επίδρασης μη λιπαρού γάλακτος σε σκόνη στη βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου σε συνδυασμένο μοντέλο *in vitro* πέψης και μοντέλου κυττάρων Caco-2, αναφέρθηκε ότι ο σχηματισμός φερριτίνης σε κύτταρα Caco-2 με προσθήκη διαλυτού πυροφωσφορικού σιδήρου, ήταν διπλάσιος από αυτόν σε κύτταρα με προσθήκη θειικού σιδήρου. Διαπίστωσαν επίσης ότι μόνο το γάλα με χαμηλά λιπαρά σε σκόνη χωρίς σίδηρο αποδείχθηκε ότι αποτελεί χαμηλή πηγή βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου (Sachdeva *et al.*, 2015).

Παράλληλα παρατηρήθηκε ότι τα *in vitro* προϊόντα πέψης της καζεΐνης δεσμεύουν ισχυρά τον Fe και εμποδίζουν τη διαλυτότητά του, ενώ και ο ορός γάλακτος μείωσε αντίστοιχα τη διαλυτότητα του σιδήρου (Hurrell *et al.*, 1989), ενώ απομονωμένα πεπτιδικά κλάσματα δεσμεύουν τον σίδηρο και τον καθιστούν διαθέσιμο, είτε μέσω της αναγωγής του σιδήρου στην πιο διαλυτή και βιοδιαθέσιμη μορφή του, είτε με το σχηματισμό διαλυτών συμπλεγμάτων με διαλυτό σίδηρο (Argyri *et al.*, 2007).

Στη μελέτη των Storcksdieck, Bohnsmann and Hurrell (2007) προσδιορίστηκε ότι καθορισμένη ομάδα πεπτιδίων θα μπορούσαν να απομονωθούν, να χαρακτηριστούν και ίσως να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετο στα τρόφιμα, ως εναλλακτική λύση στο ασκορβικό οξύ, για να βελτιώσουν την απορρόφηση του σιδήρου από διαφορετικές πηγές κρέατος. Ταυτόχρονα, τα πεπτίδια που δεσμεύουν σίδηρο και παράγονται από την πέψη της πεψίνης και δεσμεύουν το σίδηρο σε διαλυτή μορφή στο στομάχι, αποτρέπουν την αλληλεπίδραση με αναστολείς απορρόφησης, όπως το φυτικό οξύ και οι πολυφαινόλες. Ο σίδηρος παραμένει συνδεδεμένος με τα πεπτίδια στο δωδεκαδάκτυλο και δεν εκτίθεται σε υψηλό pH.

Μελέτη που έγινε σε δείγματα υποπροϊόντων τροφίμων αγροβιομηχανίας Βραζιλίας, τα οποία επιλέχθηκαν λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε σίδηρο, διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα ολικού σιδήρου στα δείγματα είναι παρόμοια (ή υψηλότερη) με τα φυτικά τρόφιμα που συνήθως συνιστώνται ως πηγές σιδήρου, όπως τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και τα φασόλια. Η βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου (όπως μετρήθηκε με τη φερριτίνη) ήταν χαμηλή σε σύγκριση με άλλα δείγματα και θετικούς ελέγχους, όπου τα επίπεδα τανινών της φλούδας του jackfruit ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμής και τα επίπεδα φυτικού οξέος ήταν επίσης χαμηλά, ενώ τα επίπεδα σιδήρου ήταν μέτρια (Chiocchetti *et al.*, 2018).

Τα απόβλητα περιλαμβάνουν κυρίως τριμμένα μυϊκά μέρη (15-20%), δέρμα και πτερύγια (1-3%), οστά (9-15%), κεφάλια (9-12%), εντόσθια (12-18%) και κλίμακες (5%) [40]. Στην παρούσα μελέτη, αυτά τα ποσοστά υπολογίστηκαν ως 1-2% για τα τριμμένα μέρη, 5-9% για τα οστά, 6-7% για το δέρμα, 2-3% για τις κλίμακες, 5-7% για τα έντερα και 17-19% για τα κεφάλια. Οι μικρές παραλλαγές μπορούν να αποδοθούν στα διάφορα είδη ψαριών καθώς και στην επεξεργασία, δηλαδή χειρωνακτική ή μηχανική (Kandyliari *et al.*, 2020)

Τα συστατικά των απορριμμάτων ψαριών και οστρακοειδών περιέχουν σημαντικά επίπεδα πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας (10–23% (w/w)) που αντιπροσωπεύει μια πηγή για βιολειτουργική εξαγωγή πεπτιδίων.

Με βάση στοιχεία για πιθανά οφέλη για την υγεία, τα πεπτίδια που προέρχονται από τη θάλασσα έχουν πολλά υποσχόμενες εφαρμογές ως φυσικά λειτουργικά συστατικά τροφίμων ή θεραπευτικά συστατικά.

Αυτή τη στιγμή, υπάρχουν αρκετά προϊόντα που προέρχονται από θαλάσσιες πρωτεΐνες διαθέσιμα στην αγορά. Ωστόσο, για να χρησιμοποιηθούν θαλάσσια βιοενεργά πεπτίδια ή πρωτεϊνικά υδρολύματα ως λειτουργικά συστατικά τροφίμων που προωθούν την υγεία, πρέπει να εξεταστούν πτυχές όπως η μεγάλη κλίμακα παραγωγής, η συμβατότητα με διάφορους τύπους τροφίμων, η γαστρεντερική σταθερότητα, η βιοδιαθεσιμότητα και η μακροπρόθεσμη σταθερότητα.

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες από τις βιολογικές επιδράσεις των θαλάσσιων υδρολυμάτων πρωτεΐνης και των πεπτιδίων έχουν εξεταστεί *in vitro* ή σε ζώα με περιορισμένο αριθμό μελετών σε ανθρώπους (Harnedy and FitzGerald, 2012).

Από μελέτη δειγμάτων εντοσθίων έχει διαπιστωθεί η θετική επίδραση στην βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου που πιθανώς να οφείλεται σε πρωτεΐνες και, επομένως, σε αμινοξέα (Storcksdieck, Bonsmann and Hurrell, 2007)

Σε μελέτη που εξέτασε την απορρόφηση του σιδήρου από μαύρα φασόλια όταν αυτά συνδυάστηκαν με φιλέτο ψαριού, παρατηρήθηκε αύξηση περίπου δύο φορές, φθάνοντας σε ποσοστό 4,7%. (Martinez-Torres and Layrisse, 1970).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν θετική επίδραση στην προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου, σε σχέση με την αντίστοιχη επίδραση μελετών για το γάλα.

Επίσης, συγκριτικά με μελέτη που έχουν γίνει σε φρούτα παρατηρείται ότι τα υποπροϊόντα ψαριών έχουν θετική επίδραση στην προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου με μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης, ενώ τα λαχανικά παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό απορρόφησης.

Σε μελέτες που έχουν γίνει για την προβλεπόμενη βιοδιαθεσιμότητα σιδήρου σε κρέας και σε μαύρα φασόλια, τα ποσοστά αυτής στα περισσότερα δείγματα είναι υπερδιπλάσια από τα ποσοστά της παρούσας μελέτης.

Παρόλα αυτά θα είχε ενδιαφέρον τα υποπροϊόντα σαρδέλας και ειδικότερα τα κεφάλια μετά από επεξεργασία (ψήσιμο και ομογενοποίηση) να μπορέσουν να αποτελέσουν νέους ενισχυτές της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου, στοχεύοντας στην ανάπτυξη νέων πρωτοποριακών προϊόντων, τα οποία θα μπορούν να ενισχυθούν με τα συγκεκριμένα υποπροϊόντα. Με αυτή τη διαδικασία εμπλουτισμού τα νέα αυτά προϊόντα θα μπορούσαν να συμβάλλουν θετικά στην αύξηση του σιδήρου στους καταναλωτές τους.

Βέβαια, προκειμένου να υλοποιηθεί ένα τέτοιο έργο χρειάζεται πρώτα να πραγματοποιηθούν ποικίλες μελέτες σχετικές με τον τρόπο παρασκευής, αλλά και κατανάλωσης του συγκεκριμένου προϊόντος.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα υποπροϊόντα του ψαριού είναι μια σημαντική και θρεπτική πηγή πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων και μετάλλων. Η σύνθεσή τους είναι παρόμοια με άλλα διατροφικά προϊόντα που συνιστώνται για κατανάλωση. Κάθε κατηγορία υποπροϊόντων έχει διαφορετικά διατροφικά χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα η αξιοποίησή τους να εξαρτάται από τα επιθυμητά ειδικά διατροφικά χαρακτηριστικά που επιθυμούμε να διαμορφώσουμε στα προϊόντα μας. Τα κεφάλια σαρδέλας δεν αποτελούν καλή πηγή λιπιδίων σχετιζόμενα με τα λοιπά υποπροϊόντα σαρδέλας (Kandyliari *et al.*, 2020). Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στα διάφορα είδη ψαριών και τις συνθήκες εκτροφής τους. Για μια λεπτομερή και ακριβή αξιολόγηση, είναι σημαντικό να υπάρχει συστηματική πληροφόρηση για τα διάφορα είδη ψαριών και τα υποπροϊόντα τους.

Βιβλιογραφία

- Abbaspour, N., Hurrell, R. and Kelishadi, R. (2014) 'Review on iron and its importance for human health', *Journal of Research in Medical Sciences*, 19 (2), pp. 164-174.
- Argyri, K., Birba, A., Miller, D. D., Komaitis, M. and Kapsokefalou, M. (2009) 'Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: New developments', *Food Chemistry*, 113(2), pp. 602–607.
- Argyri, K., Miller, D.D., Glahn, R.P., Zhu, L. and Kapsokefalou, M. (2007) 'Peptides Isolated from in Vitro Digests of Milk Enhance Iron Uptake by Caco-2 Cells', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), pp. 10221–10225.
- Arvanitoyannis, I.S. and Kassaveti, A. (2008) 'Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses', *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), pp. 726–745.
- Björn-Rasmussen, E., and Hallberg, L. (1979) 'Effect of Animal Proteins on the Absorption of Food Iron in Man', *Annals of Nutrition and Metabolism*, 23(3), pp. 192–202.
- Blanco-Rojo, R. and Vaquero, M.P. (2020) 'Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review', *Digital.CSIC*, Available at: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/203709/3/ironrevie.pdf> (Accessed: 7 January 2024).
- Cai, J., Lovatelli, A., Aguilar-Manjarrez, J., Cornish, L., Dabbadie, L., Desrochers, A., Diffey, S., Garrido Gamarro, E., Geehan, J., Hurtado, A., Lucente, D., Mair, G., Miao, W., Potin, P., Przybyla, C., Reantaso, M., Roubach, R., Tauati, M. and Yuan, X. (2021) 'Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development', *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, 1229, p.48.
- Chiocchetti, G.M., De Nadai Fernandes, E.A., Wawer, A.A., Fairweather-Tait, A., Christides, T. (2018) 'In Vitro Iron Bioavailability of Brazilian Food-Based by-Products', *Medicines*, 5, 45.
- Coello, N., Montiel, E., Concepcion, M. and Christen, P. (2002) 'Optimization of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*', *Bioresource Technology*, 85, pp. 207–211
- Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Riccio, G., Rizzo, C., and de Pascale, D. (2021) 'Fish Waste: From Problem to Valuable Resource', *Marine Drugs*, 19(2), 116.
- Ems, T., St Lucia, K., and Huecker, MR., 'Biochemistry, Iron Absorption', *National Library of Medicine / National Center for Biotechnology Information*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448204/> (Accessed: 7 January 2024).
- EU Fish Commercial Names (2024) *Sardina pilchardus*. Available at: https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species/sardina-pilchardus_en (Accessed: 29 December 2023).
- FAO, (2016). *Fish and their by-products*. Available at: <https://www.fao.org/3/ca4263en/ca4263en.pdf> (Accessed: 20 December 2023).

- FAO, (2020) *Food Loss and Waste in Fish Value Chains, Fish By-Products Utilization, Getting More Benefits from Fish Processing*. Available at: <https://www.fao.org/flw-in-fish-value-chains/resources/articles/fish-by-products-utilization-getting-more-benefits-from-fish-processing/en/> (Accessed: 20 December 2023).
- FAO, (2022) *The state of world fisheries and aquaculture 2022, utilization and processing of fisheries and aquaculture production*. Available at: <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/sofia/2022/utilization-processing-fisheries-production.html#:~:text=The%20development%20of%20new%20ingredients%20or%20new%20products,and%20convenient%20food%20with%20a%20more%20stable%20shelf-life> (Accessed: 20 December 2023)
- Bering, S., Bukhave, K., Glahn, R., Hambidge, M., Hunt, J., Lonnerdal, B., Miller, D., Mohktar, N., Nestel, P., Reddy, M., Sandberg, A.S., Sharp, P., Teucher, B., and Trinidad, P.T. (2005) 'The Usefulness of in vitro Models to Predict the Bioavailability of Iron and Zinc: A Consensus Statement From the HarvestPlus Expert Consultation', *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 75(6), pp. 371–374.
- Fritsch, C., Staebler, A., Happel, A., Cubero Márquez, M. A., Aguiló-Aguayo, I., Abadias, M., Gallur, M., Cigognini, I.M., Montanari, A., and López, M. J. (2017) 'Processing, Valorization and Application of Bio-Waste Derived Compounds from Potato, Tomato, Olive and Cereals: A Review', *Sustainability*, 9 (8), 1492.
- Grigorakis, K. (2007) 'Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review', *Aquaculture*, 272, pp. 55–75.
- Grigorakis, K. (2011) 'Tailorizing quality: effects of aquaculture handling techniques and nutrition on fish quality' In Alasalvar, S., Shahidi, F., Miyashita, K., and Wanasundara, U. (eds) *Seafood Quality, Safety and Health Effects*, U.K.: WILEY-BLACKWELL Publishing, pp. 82–95.
- Guerard, F., Dufosse, L., De La Broise, D. and Binet, A. (2001) 'Enzymatic hydrolysis of proteins from yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, pp. 1051–1059.
- Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune, M., and Gleerup, A. (1992) 'Bioavailability in Man of Iron in Human Milk and Cow's Milk in Relation to Their Calcium Contents', *Pediatric Research*, 31(5), pp. 524–527.
- Harnedy, P.A. and FitzGerald, R.J. (2012) 'Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review', *Journal of Functional Foods*, 4, pp. 6–24.
- Hunt, J. R. (2005) 'Dietary and Physiological Factors That Affect the Absorption and Bioavailability of Iron', *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 75 (6), pp. 375–384.
- Hurrell, R.F., Lynch, S.R., Trinidad, T.P., Dassenko, S.A. and Cook, J. D. (1989) 'Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49 (3), pp.546–552.
- Hurrell, R. and Egli, I. (2010) 'Iron bioavailability and dietary reference values', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91 (5), pp. 1461S-1467S.

- Ikem, A., and Egiebor, N.O. (2005) 'Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America)', *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(8), pp. 771–787.
- Kandyliari, A., Mallouchos, A., Papandroulakis, N., Prakash Golla, J., Lam, T.T., Sakellari, A., Karavoltsos, S., Vasiliou, V. and Kapsokefalou, M. (2020) 'Nutrient Composition and Fatty Acid and Protein Profiles of Selected Fish By-Products', *Foods*, 9, 190.
- Kapsokefalou, M., Alexandropoulou, I., Komaitis, M. and Politis, I. (2005) 'In vitro evaluation of iron solubility and dialyzability of various iron fortificants and of iron-fortified milk products targeted for infants and toddlers', *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, pp. 293–302.
- Kapsokefalou, M., and Miller, D.D. (1991) 'Effects of Meat and Selected Food Components on the Valence of Nonheme Iron during In Vitro Digestion', *Journal of Food Science*, 56(2), pp. 352–355.
- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. (2000) 'Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, pp. 43–81.
- Larsen, T., Thilsted, S.H., Kongsback, K. and Hanse, M. (2000) 'Whole small fish as a rich calcium source', *British Journal of Nutrition*, 83, pp. 191–196.
- Laufenberg, G., Kunz, B. and Nystroem, M. (2003) 'Transformation of vegetable waste into value added products', *Bioresource Technology*, 87, pp. 167–198.
- Lawrence A., Glover-Amengor M., Atikpo M.O., Atter A. and Toppe J. (2017) 'Nutrient content of fish powder from low value fish and fish byproducts', *Food Science & Nutrition*, 5, pp. 367-833.
- Lieu, P. T., Heiskala, M., Peterson, P. A., and Yang, Y. (2001) 'The roles of iron in health and disease', *Molecular Aspects of Medicine*, 22(1-2), pp. 1–87.
- Martinez-Torres, C. and Layrisse, M. (1970) 'Effect of Amino Acids on Iron Absorption from a Staple Vegetable Food', *Blood*, 35(5), pp. 669–682.
- Merriam-Webster (no date) *Merriam-Webster Dictionary / Bioavailability*. Available at: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/bioavailability> (Accessed: 19 December 2023)
- Miller, D.D., Schrickler, B.R., Rasmussen, R.R. and Van Campen, D. (1981) 'An in vitro method for estimation of iron availability from meals', *American Journal of Clinical Nutrition*, 34 (10), pp. 2248–2256.
- Monfort, M.C. (2010) 'Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. Studies and Reviews' *General Fisheries Commission for the Mediterranean, No.89, Rome, FAO*. Available at: <http://www.fao.org/docrep/013/i1675e/i1675e.pdf> (Accessed 19 December, 2023).
- Morck, T.A. and Cook, J.D. (1981) 'Factors affecting the bioavailability of dietary iron', *Cereals Food World*, 26(12), pp. 667-672.

- Munekata, P.E.S., Pateiro, M., Domínguez, R., Zhou, J., Barba, F.J. and Lorenzo, J.M. (2020) 'Nutritional Characterization of Sea Bass Processing By-Products', *Biomolecules*, 10 (2), 232.
- Page, S.W. and Maddison, J.E. (2008) 'Principles of clinical pharmacology', *Small Animal Clinical Pharmacology*, pp. 1–26.
- Perea, A., Ugalde, U., Rodriguez, I. and Serra, J.L. (1993) 'Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: application in industrial whey bioconversion processes', *Enzyme and Microbial Technology*, 15, pp. 418–423.
- Piskin, E., Cianciosi, D., Gulec, S., Tomas, M. and Capanoglu, E. (2022) 'Iron Absorption: Factors, Limitations, and Improvement Methods', *ACS Omega*, 7 (24), pp. 20441-20456.
- Popović, A.R., Relić, D.J., Vranić, D.V., Babić-Milijašević, J.A., Pezo, L.L. and Đinović-Stojanović, J.M. (2018) 'Canned sea fish marketed in Serbia: their zinc, copper, and iron levels and contribution to the dietary intake', *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69(1), pp. 55–60.
- Poritosh, R., Amar, K., Mohanty, Dick, P. and Misra, M. (2023) 'A Review on the Challenges and Choices for Food Waste Valorization: Environmental and Economic Impacts', *ACS Environmental Au*, 3 (2), pp. 58-75.
- Santos H., May T. and Bueno A. (2023) 'Eating more sardines instead of fish oil supplementation: Beyond omega-3 polyunsaturated fatty acids, a matrix of nutrients with cardiovascular benefits', *Frontiers in Nutrition*, 10:1107475.
- Sachdeva, B., Kaushik, R., Arora, S. and Kapila, S. (2015) 'Bioavailability of iron in multiple fortified milk', *Journal of Food Science Technology*, 52(9), pp.6017–6023.
- Shahidi, F. and Janak Kamil, Y.V. (2001)'Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry', *Trends in Food Science & Technology*, 12(12), pp. 435–464.
- Storcksdieck, S., Bonsmann, G. and Hurrell, R.F. (2007) 'Iron-Binding Properties, Amino Acid Composition, and Structure of Muscle Tissue Peptides from in vitro Digestion of Different Meat Sources', *Journal of Food Science*, 72(1), pp. S019–S029.
- TNAU Agritech Portal (no date) '*Tamil Nadu Agricultural University Agritech Portal Fisheries Harvest and Post Harvest BY-PRODUCTS*'. Available at: https://agritech.tnau.ac.in/fishery/fish_byproducts.html (Accessed: 19 December 2023)
- Torres-León, C., Ramírez-Guzman, N., Londoño-Hernandez, L., Martinez-Medina, G.A., Díaz-Herrera, R., Navarro-Macias, V., Alvarez-Pérez, O.B., Picazo, B., Villarreal-Vázquez, M., Ascacio-Valdes, J. and Aguilar C.N. (2018) 'Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries', *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2:52.
- Wijaya, A., Junianto, J.,Subiyanto, S. and Pratama, R.I. (2021) 'Effect of collagen concentration of tilapia fish bones on the quality of skin cream', *Berkala Perikanan Terubuk*, 49 (3), pp. 1131-1141.
- WORMS (no date) '*Walbaum (1792). Sardina pilchardus*'. Available at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=126421> (Accessed: 15 December 2023)

Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας (no date) *Συμμαχία για τη Μείωση Σπατάλης Τροφίμων*.
Available at: https://ypen.gov.gr/wp-content/uploads/legacy/Files/ypourgeio/Grafeio%20Tyrou/20200929_Leaflet_Alliance.pdf (Accessed: 29 December 2023).

Παραρτήματα

Παράρτημα 1: Αναλυτική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας

Αντιδραστήρια stock

- 0,01M HCl: σε ογκομετρική φιάλη των 500mL ζυγίζονται 416μL π. HCl και προστίθεται απιονισμένο H₂O μέχρι τη χαραγή
- 0,1M HCl: σε ογκομετρική φιάλη των 500mL ζυγίζονται 4,16mL π. HCl και προστίθεται απιονισμένο H₂O μέχρι τη χαραγή
- 1M HCl: σε ογκομετρική φιάλη των 100mL ζυγίζονται 8,33mL π. HCl και προστίθεται απιονισμένο H₂O μέχρι τη χαραγή
- 0.1M NaHCO₃: σε ογκομετρική φιάλη των 250mL ζυγίζονται 2,1g NaHCO₃ και προστίθεται απιονισμένο H₂O μέχρι τη χαραγή
- Χρωμογονική φερροζίνη: σε ογκομετρική φιάλη των 100mL ζυγίζονται 0,5g φερροζίνης και προστίθεται απιονισμένο H₂O μέχρι τη χαραγή
- Αναγωγικό διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεΐνης(Reducing protein precipitant solution): σε ογκομετρική φιάλη των 100mL αναμιγνύονται 10g CCl₃COOH με 5g NH₂OH·HCl και προστίθεται απιονισμένο H₂O μέχρι τη χαραγή
- Μη-αναγωγικό διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεΐνης(Non-reducing protein precipitant solution): σε ογκομετρική φιάλη των 100mL αναμιγνύονται 10g CCl₃COOH με 10mL π. HCl και προστίθεται απιονισμένο H₂O μέχρι τη χαραγή
- Hepes 0,3M. αναμιγνύοντας 1,79g Hepes σε 25mL H₂O και το pH ρυθμίζεται στο 7,5 με μερικές σταγόνες πυκνού HCl 12M.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, τίθεται σε λειτουργία ο επωαστήρας στους 37 °C, 110RPM και τοποθετούνται σε αυτόν οι μεμβράνες σε απιονισμένο νερό χωρίς να κοπούν για μία ώρα. Στη συνέχεια, προετοιμάζεται η πεψίνη και τοποθετείται και αυτή στον επωαστήρα. Το διάλυμα της πεψίνης παρασκευάζεται με την ανάμιξη 0,4g πεψίνης και 10mL διαλύματος HCl 0,1M.

Έπειτα, σε πηγάδια 6-well-plates προστίθενται 0,4g δείγματος ψαριού και 1,6mL HCl 0,01M(εις τριπλούν), ώστε ο τελικός όγκος κάθε πηγαδιού να είναι 2g (πρέπει να υπάρχουν 4g Πρωτεΐνης/100g δείγματος) και ακολουθεί χειροκίνητη ανάδευση για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων. Το pH των δειγμάτων ρυθμίζεται στο 2,8 με τη βοήθεια πεχάμετρου προσθέτοντας σταγόνες HCl 12M. Στο τέλος, σε κάθε θέση του 6-well-plate προστίθενται 20μL FeCl₃.

Για το αρνητικό δείγμα χρησιμοποιείται διάλυμα (2mL) FeCl₃ με τελική συγκέντρωση 12mg/L αραιωμένο σε διάλυμα HCl 0,01M. Για το ασκορβικό οξύ (θετικό δείγμα ελέγχου) χρησιμοποιείται όξινο διάλυμα (HCl 0,01M), το οποίο περιέχει ασκορβικό οξύ (AA) και FeCl₃ σε συγκέντρωση 240 mg/L και 12 mg/L αντιστοίχως. Από τα παραπάνω μεταφέρονται (εις τριπλούν) 2mL σε θέση του 6-well-plate.

Στη συνέχεια, σε κάθε πηγάδι που περιέχεται δείγμα προστίθενται 0,1mL πεψίνης με χρονική διαφορά 30''και έπειτα τα πηγάδια καλύπτονται σε πλαστικό καπάκι. Ακολουθεί χειροκίνητη

ανάδευση για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων. Τέλος, τοποθετούνται στον επωαστήρα για 2 ώρες στους 37 °C, 110RPM με σκοπό την προσομοίωση της γαστρικής πέψης.

Όσο τα δείγματα βρίσκονται στον επωαστήρα, κόβονται οι μεμβράνες (περίπου 3cm) και τοποθετούνται σε κυλινδρικό ένθετο, το οποίο στη συνέχεια δένεται με λάστιχο στην κορυφή. Εφόσον τοποθετηθεί η μεμβράνη ξεπλένονται όλα τα κυλινδρικά ένθετα με απιονισμένο νερό και τοποθετούνται ξανά στο ποτήρι ζέσεως με νέο απιονισμένο νερό στον επωαστήρα.

Εν συνεχεία, προετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα PIPES 0,15M με pH=6,3, με το οποίο πληρώνεται με 2mL το κάθε ένθετο στην πάνω πλευρά, με χρονική διαφορά 30'' και πάλι ακολουθεί χειροκίνητη ανάδευση. Έτσι, το PIPES διαχέεται μέσω της μεμβράνης ρυθμίζοντας το pH των δειγμάτων από 2,8 σε 6,5. Το ρυθμιστικό διάλυμα PIPES παρασκευάζεται με την ανάμιξη 2,5975g Pipes σε 50mL απιονισμένου H₂O και το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνού HCl 12M.

Μετά από 30 λεπτά προστίθεται κάτω από το ένθετο με τη μεμβράνη 0,5mL διαλύματος παγκρεατίνης - χολικών αλάτων με χρονική διαφορά 30'' και ακολουθεί και πάλι χειροκίνητη ανάδευση προς αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων και το 6-well-plate καλύπτεται με το πλαστικό καπάκι και τοποθετείται ξανά στον επωαστήρα για ακόμα 2 ώρες (37°C, 110RPM). Το διάλυμα παγκρεατίνης – χολικών αλάτων παρασκευάζεται με την ανάμιξη 0,04g παγκρεατίνης και 0,24g χολικών αλάτων σε 20mL NaHCO₃ 0,1M.

Έπειτα, γράφονται τα Eppendorf και στο τέλος του χρόνου επώασης με πιπέτα Pasteur συλλέγεται όλο το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις διαλυτές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους σε ένα Eppendorf και το όλο υποκείμενο, το οποίο περιέχει τις αδιάλυτες και διαλυτές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους σε άλλο Eppendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000 RPM για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης όλα τα δείγματα μεταφέρονται σε καινούρια Eppendorf.

Για τον υπολογισμό του δισθενούς σιδήρου σε κάθε Eppendorf προστίθενται 0,5mL του υπερκείμενου και 0,25mL μη-αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης στο καθένα (Non-reducing protein precipitant solution), ενώ για τον υπολογισμό του ολικού διαλυτού σιδήρου σε κάθε Eppendorf προστίθενται 0,5mL του υπερκείμενου και 0,25mL αναγωγικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεΐνης στο καθένα (reducing protein precipitant solution). Τέλος, αφήνονται όλο το βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.

Την επόμενη ημέρα, φυγοκεντρούνται τα Eppendorf στα 5.000 RPM για 10 λεπτά. Παράλληλα, παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 0,3M, αναμιγνύοντας 1,79g HEPES σε 25mL H₂O και το pH ρυθμίζεται στο 7,5 με μερικές σταγόνες πυκνού HCl 12M.

Οι συγκεντρώσεις του ολικού σιδήρου (δισθενούς και τρισθενούς), αλλά και η συγκέντρωση του δισθενούς σιδήρου των υπερκείμενων φάσεων, οι οποίες προέκυψαν από τη φυγοκέντρηση των διαλυτών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους της μεμβράνης, μετρήθηκαν με τροποποίηση της μεθόδου χρωμογονικής φερροζίνης.

Για τη μέτρηση του δισθενούς σιδήρου λαμβάνεται 0,1mL (εις διπλούν) από το υπερκείμενο και μεταφέρονται σε πλακίδιο μικροκυψελίδων 96 θέσεων (96 well-plate). Έπειτα, σε κάθε θέση προστίθενται 0,225mL διαλύματος φερροζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (200μL HEPES αναμιγνύονται με 25μL φερροζίνης). Κατευθείαν προστίθεται το διάλυμα και γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 562nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.

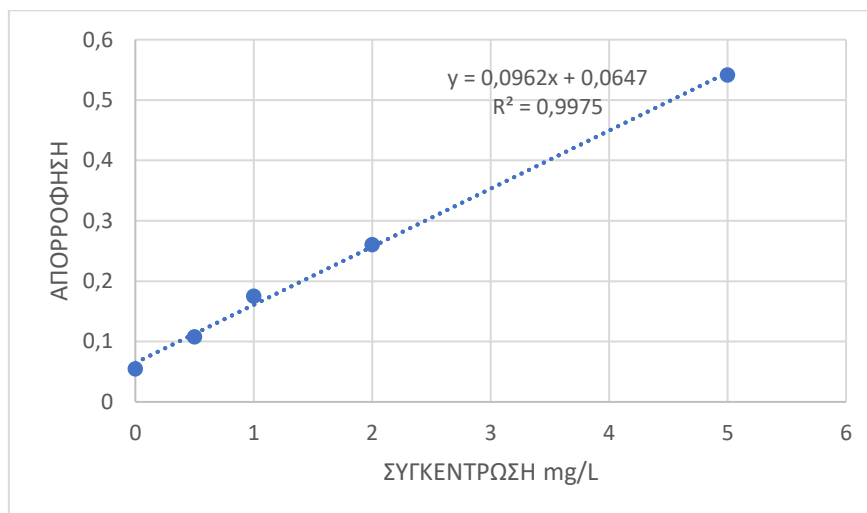
Για τη μέτρηση του ολικού διαλυτού σιδήρου λαμβάνεται 0,1mL (εις διπλούν) από το υπερκείμενο και μεταφέρονται σε πλακίδιο μικροκυψελίδων 96 θέσεων (96 well-plate). Έπειτα, σε κάθε θέση προστίθενται 0,225mL διαλύματος φερροζίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes (200mL Hepes αναμιγνύονται με 25μL φερροζίνης). Προστίθεται το διάλυμα και μετά από μία ώρα γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 562nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.

Παράρτημα 2: Καμπύλη προβλεπόμενης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου

Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνονται οι συγκεντρώσεις σιδήρου (mg/L) που χρησιμοποιήθηκαν, οι επαναλήψεις που έγιναν σε κάθε συγκέντρωση, καθώς και οι απορροφήσεις στα 562nm.

Πίνακας συγκέντρωσης σιδήρου και απορρόφησης στα 562nm της καμπύλης σιδήρου.

Συγκέντρωση σιδήρου mg/L	Απορρόφηση 562nm
0	0,055
0,5	0,108
1	0,176
2	0,261
5	0,542



Γράφημα Πρότυπης καμπύλης βιοδιαθεσιμότητας σιδήρου.