



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Επίδραση της Εποχιακής Μεταβολής και Διαφόρων Μεθόδων
Συντήρησης στο Προφίλ των Λιπαρών Οξέων και των
Καροτενοειδών του Διθύρου *Callista Chione***

**ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Επίδραση της Εποχιακής Μεταβολής και Διαφόρων Μεθόδων
Συντήρησης στο Προφίλ των Λιπαρών Οξέων και των
Καροτενοειδών του Διθύρου *Callista Chione***

ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ

A.M.: 51205

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Προεστός Χαράλαμπος, Λέκτορας, Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Προεστός Χαράλαμπος, Λέκτορας, Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Σινάνογλου Ι. Βασιλεία, Επίκουρος Καθηγήτρια, Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης
Τροφίμων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Αθήνας

Ζαμπετάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Τμήμα
Χημείας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 10/10/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Γυαλιστερή *Callista chione* (L.1758) είναι ένα εμπορικά σημαντικό δίθυρο μαλάκιο, άφθονο στα μεσογειακά ύδατα. Όπως και άλλα μαλάκια, οι *Callista chione* διανέμονται ζωντανές και πολύ συχνά καταναλώνονται ωμές. Μέχρι και σήμερα, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην βιολογική συμπεριφορά και το ρυθμό ανάπτυξης του μαλακίου, στη δυναμική του πληθυσμού σε σχέση με την περιοχή και στο αποτέλεσμα του σχεδιασμού των καλαθιών αλίευσης ως προς το μέγεθος και την ποιότητα του αλιεύματος. Καμία προηγούμενη μελέτη δεν έχει εξετάσει τη σύστασή της ή την επίδραση της επεξεργασίας και της αποθήκευσης στα θρεπτικά συστατικά του μαλακίου. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να χαρακτηριστεί το προφίλ των λιπιδίων, των λιπαρών οξέων και των καροτενοειδών της *C. chione* και να διερευνηθούν οι πιθανές διακυμάνσεις τους μετά από μαρινάρισμα και κατάψυξη υπό κενό, σε περίοδο τεσσάρων και έξι μηνών, καθώς και σε διαφορετικές εποχές του έτους. Έτσι, ζωντανά δείγματα εκτρεφόμενων *C. chione* εμβαπτίστηκαν σε βραστό (100 °C) νερό για 4 λεπτά και η σάρκα τους, είτε συσκευάστηκε υπό κενό αέρος σε πλαστικές σακούλες και καταψύχθηκε (-18 °C) ή χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή μαριναρισμένων προϊόντων τα οποία συσκευάστηκαν σε γυάλινα βάζα και αποθηκεύθηκαν στους 4 °C. Το ολικό λίπος εκχυλίστηκε από τις νωπές και προβρασμένες γυαλιστερές, καθώς και από τα δείγματα των κατεψυγμένων και μαριναρισμένων προϊόντων που αποθηκεύτηκαν για 4 και 6 μήνες, και αναλύθηκε για τον προσδιορισμό των ουδετέρων και πολικών λιπιδίων, των λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων και των καροτενοειδών. Από την ανάλυση των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία (GC-FID) ταυτοποιήθηκαν 40 λιπαρά οξέα (FA). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) ήταν κυρίαρχα, ακολουθούμενα από τα πολυακόρεστα (PUFA) και τα μονοακόρεστα (MUFA) λιπαρά οξέα. Τα σημαντικότερα SFA που προσδιορίστηκαν σε όλα τα δείγματα της *C. chione* ήταν το παλμιτικό (C16:0), το μυριστικό (C14:0) και το στεατικό (C18:0) οξύ. Το Ελαϊκό οξύ (C18:1 ω-9) και το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1 ω-7) κυριαρχούσαν μεταξύ των MUFA, ενώ το εικοσαπεντενοϊκό οξύ (C20:5 ω-3) και το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (C22:6 ω-3) ήταν τα κύρια PUFA. Ο βρασμός και η αποθήκευση υπό κατάψυξη, προκάλεσε σημαντική ($P < 0,05$) αύξηση της αναλογίας ω-3/ω-6, η οποία συνοδεύτηκε από ελάττωση στις αναλογίες MUFA/SFA, PUFA/SFA και DHA/EPA. Σημαντικές αλλαγές στο προφίλ των λιπαρών οξέων προκλήθηκε επίσης από τη διαδικασία του μαριναρίσματος, η οποία φάνηκε να έχει τη μεγαλύτερη αρνητική επίδραση στα θρεπτικά συστατικά του διθύρου. Επίσης, κατά το

μαρινάρισμα, παρατηρήθηκαν και οι σημαντικότερες μεταβολές στα ολικά ουδέτερα και πολικά λιπίδια, με τα πολικά να μειώνονται σημαντικά ενώ αντίστοιχα τα ουδέτερα να αυξάνονται σημαντικά. Στα καροτενοειδή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των ποσοστών της Ασταξανθίνης μετά από κάθε κατεργασία, δεδομένο που ίσως οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Ασταξανθίνη βρίσκεται συμπλοκοποιημένη με την πρωτεΐνη α-κρουστακυανίνη. Με αυτά τα δεδομένα δύναται να υποτεθεί πως ο προβρασμός και η κατάψυξη δεν έχουν δυσμενή επίδραση στο προφίλ των λιπαρών οξέων και των λιπιδικών συστατικών της *C. Chione*, καθώς και στα πιθανά οφέλη για την υγεία που προκύπτουν από αυτά.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Μέθοδοι Συντήρησης, Εποχιακή μεταβολή, προφίλ λιπαρών οξέων και Καροτενοειδών

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *Callista chione*; Δίθυρα μαλάκια; Συντήρηση τροφίμων; λιπίδια; Λιπαρά οξέα; Καροτενοειδή

ABSTRACT

The brown Venus clam *Callista chione* (L. 1758) is a commercially important bivalve mollusc, naturally occurring in Mediterranean estuarine waters. Dense beds of the animal may develop in productive areas. Like other molluscan shellfish, *C. chione* are distributed live and most frequently eaten raw. So far, most studies have focused on biological behaviour and growth rate, population dynamics in relation to harvesting area, and the effect of dredge design on the size and quality of the catch. Apparently, no study has examined compositional aspects or the influence that processing and storage may have on nutritionally important constituents of the bivalve. The aim of the present study was to characterize the fatty acid and Carotenoid profile of raw *C. chione* and to investigate changes in marinated and vacuum-packed, frozen meats, over a storage period of four and six months and in different seasons of the year. Live specimens of farmed *C. chione* were processed in boiling (100°C) water for 4 min and the cooked meats were either vacuum-packed in plastic bags and frozen (-18°C) or used for preparing a marinade semi-preserve that was packed in glass jars and stored at 4°C. Total lipids were extracted from the raw and boiled meats, as well as from the samples of the frozen and marinated products stored at 4 and 6 months, and were analysed by gas chromatography. Data from the GC-FID analysis revealed the presence of 40 fatty acids (FA). Saturated fatty acids (SFA) were predominant, followed by polyunsaturated (PUFA) and monounsaturated (MUFA) fatty acids. The major SFA identified in raw and processed *C. chione* were palmitic (C16:0), myristic (C14:0) and stearic acids (C18:0). Oleic (C18:1 ω -9) and palmitoleic (C16:1 ω -7) acids predominated among MUFA, while eicosapentaenoic (C20:5 ω -3) and docosahexaenoic (C22:6 ω -3) were the major PUFA. Parboiling and frozen storage caused a significant ($P < 0.05$) increase in the ω -3/ ω -6 ratio, which was accompanied by a decrease in the MUFA/SFA, PUFA/SFA and DHA/EPA ratios. Significant changes in the fatty acid profile were induced also by the marinating process, which appeared to have the highest negative impact to the nutrients of the bivalve. Moreover, during marination process, it was observed the most significant changes at the neutral and polar lipids. Polar lipids were reduced significant while neutral lipids were increased. Amongst carotenoids, it was observed a significant increase of Astaxanthine after each process, leading to the conclusion that Astaxanthine may be complexed to the

protein a-croustacyanine. Thus, it may be assumed that parboiling and freezing have no adverse effect on the fatty acid profile and the lipid classes of *C. chione* as well as to the potential health benefits arising there from.

SUBJECT AREA: Preservation methods, Seasonal variation, fatty acid and Carotenoid profile

KEYWORDS: *Callista chione*; bivalve mollusk; food preservation; lipids; fatty acids; Carotenoids

Στην Γυναίκα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών και στο Εργαστήριο Ιχθυρών του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών.

Επιβλέπον της μεταπτυχιακής μου εργασίας ήταν ο κ. Προεστός Χαράλαμπος, Λέκτορας του τμήματος Χημείας, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την καθοδήγηση, τη διαρκή παρακολούθηση, τις χρήσιμες υποδείξεις και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Βλαδίμηρο Λουγκοβόη Καθηγητή του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών, για την πολύτιμη βοήθεια του στον σχεδιασμό της πειραματικής πορείας, την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων, για τις σημαντικές πληροφορίες που μου έδωσε όσον αφορά τον οργανισμό που μελετήθηκε, καθώς και για την παραχώρηση του εργαστηρίου για την εκπόνηση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ την κα Ειρήνη Στρατή, εργαστηριακό συνεργάτη του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών για την πολύτιμη βοήθεια της στον προσδιορισμό των καρτενοειδών, καθώς και την κα Βασιλική Κυρανά, εργαστηριακό συνεργάτη του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών για την βοήθεια της στην εκπόνηση των πειραμάτων.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο και τεράστιο ευχαριστώ στην κα Βασιλεία Σινάνογλου, Επίκουρο Καθηγήτριας του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών, για την άριστη συνεργασία και την ανελλιπής βοήθεια, καθοδήγηση και υποστήριξή της, χωρίς την οποία η περάτωση της εν λόγω εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Αθήνα, 2014
Παπαϊωάννου Χρήστος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	23
1.1 Είδη και κατάταξη των μαλακίων	23
1.2 Τα δίθυρα μαλάκια	24
1.2.1 Γενικά	24
1.2.2 Χαρακτηριστικά	26
1.2.3 Αναπαραγωγή	32
1.2.4 Διατροφή	35
1.3 Οικονομικό Ενδιαφέρον	37
1.3.1 Περιοχές καλλιέργειας Διθύρων Στον Κόσμο	37
1.3.2 Συστήματα καλλιέργειας	39
1.3.3 Περιοχές καλλιέργειας Στην Ελλάδα	41
1.4 Ενδιαφέρον στην τεχνολογία τροφίμων	43
1.4.1 Βιοδραστικές Πρωτεΐνες, Πεπτίδια και Αμινοξέα στα Θαλάσσια Δίθυρα	45
1.4.2 Πιθανά οφέλη για την υγεία, βιολογικές ιδιότητες των μεταβολίτων των πρωτεασών	46
1.4.2.1 Αντιμικροβιακά Πεπτίδια (AMPs)	46
1.4.2.2 Πεπτίδια με αντιοξειδωτικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες	46
1.4.2.3 Άλλες βιοδραστικές ιδιότητες των πρωτεϊνών των θαλάσσιων διθύρων	47
1.4.3 Βιοδραστικά Λιπίδια και μη πολικά συστατικά στα Θαλάσσια Δίθυρα	47
1.4.4 Υδατάνθρακες με βιοδραστικές ιδιότητες	48
1.4.5 Βιοτοξίνες που επιρρεάζουν τα θαλάσσια δίθυρα	49
1.5 Η <i>Callista Chione</i>	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Λιπαρά Τροφίμων	52
2.1 Ονοματολογία	53
2.2 Συστατικά των λιπαρών υλών στα τρόφιμα	55
2.2.1 Λιπαρά οξέα	55
2.2.2 Ακυλγλυκερόλες	56
2.2.3 Στερόλες και Στερολικοί Εστέρες	57
2.2.4 Κήροι	58
2.2.5 Φωσφογλυκερίδια ή Φωσφολιπίδια	58
2.2.6 Αιθερ (φώσφο) Γλυκερίδια ή Πλασματογόνα	59
2.2.7 Γλυκερογλυκολιπίδια ή Γλυκοζυλγλυκολιπίδια	59
2.2.8 Σφιγγολιπίδια	59
2.3 Λιπαρά οξέα διθύρων	59
2.4 Καροτενοειδή στα θαλάσσια δίθυρα	60
2.4.1 Χημική δομή και κατάταξη καροτενοειδών	61
2.4.2 Βιολογικές δράσεις Καροτενοειδών	63
2.4.3 Πηγές Καροτενοειδών	64
2.4.4 Καροτενοειδή στα δίθυρα	66
2.4.5 Μέθοδοι προσδιορισμού καροτενοειδών	70
2.4.5.1 Προφυλάξεις κατά την ανάλυση των καροτενοειδών	71
2.4.5.2 Γενική Διαδικασία Ανάλυσης Καροτενοειδών	73
2.5 Σκοπός της εργασίας	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Πειραματικό Μέρος	81
3.1 Πειραματικός Σχεδιασμός	81
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	82
3.2.1 Συλλογή και επεξεργασία του δείγματος	82
3.2.2 Τεχνολογική επεξεργασία δείγματος	83

3.2.2.1 Θερμική επεξεργασία – Προβρασμός	83
3.2.2.2 Μαρινάρισμα	84
3.2.2.3 Κατάψυξη υπό κενό	85
3.2.3 Προσδιορισμός υγρασίας	85
3.2.4 Προσδιορισμός pH	86
3.2.5 Μελέτη των λιπιδίων	87
3.2.5.1 Εκχύλιση ολικών λιπιδίων με τη μέθοδο Blight-Dyer	87
3.2.5.2 Σταθμικός προσδιορισμός	88
3.2.6 Χρωματογραφικές μέθοδοι για το διαχωρισμό και την ανάλυση των Λιπιδίων	89
3.2.6.1 Iatroscaan (TLC / FID) Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση	89
3.2.6.2 Αεριοχρωματογραφική ποιοτική και ποσοτική ανάλυση (αερίου - υγρού)GLC	95
3.2.6.3 Φασματοφωτομετρική ανάλυση ολικών Καροτενοειδών	100
3.2.6.4 HPLC – DAD ανάλυση καροτενοειδών	101
3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση	102
3.3.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	102
3.3.2 Λιπιδικά Συστατικά	104
3.3.3 Λιπαρά οξέα	112
3.3.4 Καροτενοειδή	127
3.4 Μελλοντική έρευνα	130
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σύγκριση δημοσιεύσεων που μελετούν τα βιοδραστικά συστατικά των διθύρων	44
Σχήμα 2 : Σύγκριση δημοσιεύσεων που δηλώνουν τις βιοδραστικές ιδιότητες των μορίων των διθύρων	44
Σχήμα 3: συσσώρευση και ο μεταβολισμός των καροτενοειδών στην θαλάσσια πανίδα μέσω της τροφικής αλυσίδας ...	66
Σχήμα 4 : Χρωματογράφημα από Ιatroscaп ανάλυση. Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης n-:DE:FA, 60:15:1.5 by vol. Διαχωρισμός μίγματος πρότυπων ουδέτερων λιπιδίων.....	94
Σχήμα 5: Χρωματογράφημα από Ιatroscaп ανάλυση. Πολικό σύστημα ανάπτυξης C:M:W, 50:20:2 by vol. Διαχωρισμός μίγματος πρότυπων πολικών λιπιδίων.....	95
Σχήμα 6 : Πρότυπο χρωματογράφημα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων Supelco TM 37 Component FAME Mix C4-C24, 100mg Neat, Catalog No: 18919-1AMP (Merck, Darmstadt, Germany).....	98
Σχήμα 7 : θερμοκρασίες θάλασσας του μήνες του έτους 2014	103
Σχήμα 8: Σύγκριση πολικών και ουδέτερων λιπιδίων μετά την κατεργασία του μαριναρίσματος	106
Σχήμα 9: Σύγκριση πολικών και ουδέτερων λιπιδίων μετά από κατάψυξη υπό κενό	108
Σχήμα 10: Σύγκριση των επιδράσεων των μεθόδων συντήρησης στα λιπιδικά συστατικά	109
Σχήμα 11: Αναλογίες Ακόρεστων (SFA), Μονοακόρεστων (MUFA) και Πολυακόρεστων (PUFA) Λιπαρών Οξέων, μετά από μαρινάρισμα.....	117
Σχήμα 12: Αναλογίες συνολικών ω-3, συνολικών ω-6, DHA (C22:6 ω-3), EPA (C20:5 ω-3) και λινελαϊκού οξέως (C18:2 ω-6) μετά από την διεργασία του μαριναρίσματος.....	118
Σχήμα 13: Αναλογίες MUFA/SFA, PUFA/SFA, ω-3/ω-6, DHA/EPA μετά την διεργασία του μαριναρίσματος	119
Σχήμα 14: Αναλογίες Ακόρεστων (SFA), Μονοακόρεστων (MUFA) και Πολυακόρεστων (PUFA) Λιπαρών Οξέων, μετά από Κατάψυξη υπό κενό.....	120
Σχήμα 15: Αναλογίες MUFA/SFA, PUFA/SFA, ω-3/ω-6, DHA/EPA μετά την διεργασία του μαριναρίσματος	121
Σχήμα 16: Αναλογίες συνολικών ω-3, συνολικών ω-6, DHA (C22:6 ω-3), EPA (C20:5 ω-3) και λινελαϊκού οξέως (C18:2 ω-6) μετά από την διεργασία της κατάψυξης υπό κενό.....	121
Σχήμα 17: Αναλογίες Ακόρεστων (SFA), Μονοακόρεστων (MUFA) και Πολυακόρεστων (PUFA) Λιπαρών Οξέων, κατά τις εποχές του Έτους.....	124
Σχήμα 18: Αναλογίες συνολικών ω-3, συνολικών ω-6, DHA (C22:6 ω-3), EPA (C20:5 ω-3) και λινελαϊκού οξέως (C18:2 ω-6) κατά τις εποχές του Έτους.....	125
Σχήμα 19: Αναλογίες MUFA/SFA, PUFA/SFA, ω-3/ω-6, DHA/EPA κατά τις εποχές του Έτους	125

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ 1: Το κέλυφος των διθύρων	27
Εικ 2: Δομή όστρακου διθύρων, φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκόπιου	28
Εικ 3 : Τα Δίθυρα a) <i>Venerupis decussate</i> b) <i>Spondylus spinosus</i> c) <i>Chama asperella</i>	29
Εικ 4: Ανατομία του κελύφους	30
Εικ 5: Το νευρικό σύστημα των διθύρων μαλάκιων	31
Εικ 6: Ανατομία ενός τυπικού δίθυρου	32
Εικ 7: Ο κύκλος αναπαραγωγής των θαλάσσιων διθύρων μαλάκιων	33
Εικ 8: Παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση καλλιέργειας Διθύρων	37
Εικ 9: Παραγωγή θαλάσσιων διθύρων ανα ήπειρο	38
Εικ 10: Παραγωγή θαλάσσιων διθύρων στην Ελλάδα και την ευρύτερη Ευρώπη	38
Εικ 11. Καλλιέργεια μυδιών με πλωτό σύστημα	41
Εικ 12: Κύριες περιοχές καλλιέργειας στην Ελλάδα	42
Εικ13: Μονάδες υδατοκαλλιέργειας	42
Εικ 14: Ονοματολογία ανθρακικών αλυσίδων	53
Εικ 15: Συστηματική, Εμπειρική και Συντομογραφική ονοματολογία των λιπαρών οξέων	55
Εικ 16: Κύριες Στερόλες	57
Εικ 17: δομές φωσφογλυκεριδίων και η ονοματολογία	58
Εικ 18: Δομές καροτενοειδών	62
...	
Εικ 19: Μεταβολίτες των καροτενοειδών Διατοξανθίνης, Αλλοξανθίνης και Διαδινόξανθίνης στα δίθυρα	67
Εικ 20: Οι μεταβολικές οδοί της Φυκοξανθίνης στα δίθυρα μαλάκια	68
Εικ 21: Μεταβολικά μονοπάτια της Περιδινίνης στα δίθυρα	69
Εικ 22: Νέα είδη καροτενοειδών στα μύδια <i>Corbicula</i>	70
Εικ 23: Η δειγματοληψία θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική για τον πληθυσμό που πρέπει να μελετηθεί	74
Εικ 24: Αριστερά: Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (HPLC). Δεξιά: Χρωματογραφία ανοιχτής στήλης (OCC).....	76
Εικ 25: Αριστερά: Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Δεξιά: Φασματογράφος Μάζας (MS).....	79
Εικ 26: Υγρασιόμετρο υπερύθρων ακτίνων (IR)	86
Εικ 27: Μετρητής pH Μοντέλο Consort P601	86
Εικ 28: Iatroscan MK-6 (TLC/FID-FPD Analyser) (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)	90
Εικ 29 : Τοποθέτηση δείγματος στα Chromarods	92
Εικ 30 : Ανάπτυξη των Chromarods	92
Εικ 31 : Καύση των Chromarods με φλόγα υδρογόνου	92
Εικ 32: Μήκη κύματος απορρόφησης α-κρουστακυανίνης και Ασταξανθίνης	128

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Εδώδιμα δίθυρα της μεσογείου	26
Πίνακας 2 : Ιatroscaп ανάλυση μίγματος πρότυπων ουδέτερων λιπιδίων σε ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης Ι H:DE:FA, 60:15:1.5 by vol.....	94
Πίνακας 3: Ιatroscaп ανάλυση μίγματος πρότυπων πολικών λιπιδίων σε πολικό σύστημα ανάπτυξης Ι 50:20:2 by vol.....	94
Πίνακας 4 : Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) που αναλύθηκαν, χρόνοι έκλουσης (Rt) αυτών και παράγοντες ποσοτικοποίησης (RF).....	99
Πίνακας 5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σάρκας Γυαλιστερής, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης.	102
Πίνακας 6: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σάρκας Γυαλιστερής, σύγκριση εποχών συγκομιδής	103
Πίνακας 7: Ολικών Λιπιδίων της Γυαλιστερής	104
Πίνακας 8: Σύγκριση των Ολικών Λιπιδίων μεταξύ της νωπής και προβρασμένης Γυαλιστερής	105
Πίνακας 9: Σύγκριση των Ολικών Λιπιδίων μεταξύ της νωπής, προβρασμένης και μαριναρισμένης Γυαλιστερής	107
Πίνακας 10: Σύγκριση των Ολικών Λιπιδίων μεταξύ της νωπής, προβρασμένης και κατεψυγμένης Γυαλιστερής.....	108
Πίνακας 11: Σύσταση επιμέρους ουδέτερων και πολικών λιπιδίων % των ολικών λιπιδίων, σύγκριση εποχιακής μεταβολής.....	111
Πίνακας 12: Σύσταση λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, της νωπής γυαλιστερής σε σύγκριση με την προβρασμένη, μαριναρισμένη και κατεψυγμένη.....	112
Πίνακας 13: Σύσταση ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης.....	115
Πίνακας 14: Σύσταση λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, σύγκριση εποχών συγκομιδής.....	122
Πίνακας 15: Σύσταση ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, σύγκριση εποχών συγκομιδής.....	126
Πίνακας 16: mg Καροτενοειδών ανά g λίπους, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης	127
Πίνακας 17: mg Καροτενοειδών ανά g λίπους, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης	128

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Είδη και κατάταξη των μαλακίων

Τα μαλάκια είναι το δεύτερο σε αριθμό είδος μετά τα αρθρόποδα. Αριθμούν περίπου 80.000 είδη, τα $\frac{3}{4}$ των οποίων είναι γαστερόποδα με 1650 περίπου γένη. Μετά έρχονται τα δίθυρα με 420 περίπου γένη και τέλος τα κεφαλόποδα με 150 γένη περίπου.

Εξελικτικά διακρίνονται σε 6 ομοταξίες:

1. Μονοπλακοφόρα
2. Αμφίνευρα
3. Γαστερόποδα
4. Σκαφόποδα
5. Δίθυρα και
6. Κεφαλόποδα

Τα τελευταία είναι και τα περισσότερο διαφοροποιημένα με όστρακο είτε εξωτερικά (Ναυτίλος) είτε εσωτερικά (Σουπιά) ή και χωρίς καθόλου όστρακο (Χταπόδι).

Τα δίθυρα με την σειρά τους διακρίνονται σε 6 τάξεις, σύμφωνα με τους Moore (1969), Clarkson (1979) και Bames(1980):

1. Παλαιοταξόδοντα
2. Κρυπτόδοντα
3. Πτεριόμορφα
4. Ετερόδοντα
5. Παλαιοετερόδοντα και
6. Ανωμαλοδέσματα

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η *Callista Chione* ή αλλιώς Γυαλιστερή, η οποία κατατάσσεται στην οικογένεια Veneridae, της υπεροικογένειας Veneroidea, της τάξης των Ετερόδοντων.

1.2 Τα δίθυρα μαλάκια

1.2.1 Γενικά

Τα δίθυρα μαλάκια χαρακτηρίζονται από ένα κέλυφος με δύο ξεχωριστές θύρες, οι οποίες κινούνται γύρω από ένα κλείθρο και προστατεύουν ένα μέρος ή ολόκληρο το σώμα τους. Συνδέονται με τον ελαστικό σύνδεσμο, ο οποίος μπορεί να είναι εξωτερικός, εσωτερικός ή και μικτός και συγκρατούνται με τους προσαγωγούς μύες.

Οι θύρες είναι ίσες και συμμετρικές στα ισόθυρα (π.χ. Μύδια) ενώ είναι ασύμμετρες και άνισες στα ανισόθυρα (π.χ. Χτένια). Ανοίγουν παθητικά με τον ελαστικό σύνδεσμο της ραχιαίας και ως εκ τούτου για να διατηρηθούν κλειστές χρησιμοποιούν τους προσαγωγούς μύες που βρίσκονται εσωτερικά του κελύφους. Οι προσαγωγοί μύες διαθέτουν ένα μηχανισμό (catch-fibre mechanism) έτσι ώστε να μπορούν να κρατάνε τις θύρες κλειστές χωρίς την συνεχή δαπάνη ενέργειας[1, 2].

Ζουν στην θάλασσα, σε υφάλμυρα και γλυκά νερά. Εισέρχονται στην άμμο με την βοήθεια του ποδιού, κολυμπούν ελεύθερα ανοιγοκλείνοντας τις θυρίδες τους, μπορούν να βρεθούν προσκολλημένα σε επιφάνειες με την βοήθεια του βύσσου (Πρωτεϊνικής φύσεως ίνες που εκκρίνονται από το πόδι) ή με την μία θυρίδα, ενώ ορισμένα δύναται να ανοίξουν τρύπες σε πέτρες και ξύλα. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 1 χιλιοστό έως και 120 εκατοστά του μέτρου. Χαρακτηριστικό είναι το γιγαντιαίο κοχύλι *Tridacna gigas* των κοραλλιογενών υφάλων του νοτίου Ειρηνικού ωκεανού με μήκος μεγαλύτερο των 137 εκατοστών και βάρους 264 κιλών.

Το πόδι διαστέλλεται από την πίεση του αίματος και συχνά παίρνει τη μορφή τσεκουριού. Αυτό εξυπηρετεί στο σκάψιμο αμμωδών ή λασπωδών υποστρωμάτων και για το λόγο αυτό τα δίθυρα ονομάζονται επίσης και Πελεκύποδα.

Ο μανδύας διαιρείται σε δύο μεγάλους συμμετρικούς πλευρικούς λοβούς, οι οποίοι εκκρίνουν τις δύο θυρίδες του οστράκου. Η εξωτερική επιφάνεια του κάθε λοβού προσκολλάται στην εσωτερική επιφάνεια της αντίστοιχης θυρίδας και τα όρια της αποτυπώνονται με μια γραμμή που ονομάζεται μανδουακό αποτύπωμα.

Συχνά οι δύο μανδύες των δίθυρων ενώνονται μεταξύ τους, αφήνοντας μόνο ένα διάκενο για το πόδι και μικρές οπές διαμέσου των οποίων μπορεί να ρέει νερό. Σε αυτές τις περιοχές ο μανδύας σχηματίζει δύο σιφώνια, ένα για την εισπνοή και ένα για την εκπνοή. Οι σίφωνες μπορεί να εξέλθουν από το όστρακο και είναι άλλοτε χωρισμένοι και άλλοτε ενωμένοι.

Τα σημεία προσκόλλησης των μυών που προκαλούν τη συστολή των σιφώνων σχηματίζουν στη μανδουακή γραμμή μια εγκόλπωση, όταν οι σίφωνες είναι μεγάλοι (κολπωτά), ενώ σε αντίθετη περίπτωση είναι συνεχής (άκολπα)[3].

Ο μανδύας που περιβάλλει το σώμα τους και εκκρίνει το όστρακο, οριοθετεί μια ευρύχωρη μανδουακή κοιλότητα, μεγαλύτερη των άλλων μαλακίων. Τα όργανα που περικλείονται από τον μανδύα και το πεπτικό σύστημα έχουν αναπτυχθεί εις βάρος της κεφαλής, η οποία απουσιάζει παντελώς στα ελασματοβράχια, ενώ λιγότερο έχουν αναπτυχθεί το γεννητικό, κυκλοφορικό και απεκκριτικό σύστημα.

Τα περισσότερα από τα αισθητήρια όργανα έχουν αποσυρθεί από το εμπρός άκρο του κελύφους. Το χείλος του μανδύα εξυπηρετεί ως σημείο επαφής με το περιβάλλον, έτσι αναπτύσσει άφθονα όργανα αφής και σε μερικές περιπτώσεις μάτια όπως στα κτένια.

Τα βράγχια των διθύρων είναι καλά ανεπτυγμένα και έχουν ελασματοειδή δομή, εξού και ο όρος «ελασματοβράγχια». Εκτός από την αναπνευστική τους λειτουργία, τα βράγχια χρησιμοποιούνται και για την παγίδευση της τροφής από το φιλτράρισμα του νερού. Το στόμα και ο απεκκριτικός σωλήνας βρίσκονται στα δύο άκρα του ζώου και το οπίσθιο τμήμα του εντέρου περνά διαμέσου του περικαρδίου και της κοιλίας.

Αν και τα περισσότερα είδη δίθυρων είναι γονοχωριστικά, δηλαδή χωρίζονται σε θηλυκά και αρσενικά, σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί ερμαφροδιτισμός, παράγουν δηλαδή αυγά και σπέρμα. Έχει επίσης παρατηρηθεί η αλλαγή του γένους κατά τον κύκλο ζωής τους. Στα γονοχωριστικά είδη υπάρχει συνήθως ίση κατανομή στα αντίθετα φύλλα.

Τα ελασματοβράχια αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ομάδα υδρόβιων μαλακίων στην οποία περιλαμβάνονται είδη με μεγάλο τεχνολογικό και εμπορικό ενδιαφέρον. Ένα ποσοστό 20% περίπου των ειδών της κλάσης αυτής ζουν στα γλυκά νερά[4].

Γενικά τα δίθυρα είναι βρώσιμα, με μόνη εξαίρεση ίσως το αγκαθωτό μύδι *Spondylous*. Εγκυμονεί πάντα δε ο κίνδυνος της δηλητηρίασης από κατανάλωση τους καθώς συσσωρεύουν βακτήρια στα βράγχια τους χωρίς να προσβάλλονται τα ίδια (πχ. Το βακτήριο του τύφου).

Τα ποιο διαδεδομένα εδώδιμα δίθυρα στην μεσόγειο συνοψίζονται στον πίνακα 1[5]:

Πίνακας 1: Εδώδιμα δίθυρα της μεσογείου

<i>Arca noae</i>	: καλόγνωμη
<i>Mytilus galloprovincialis</i>] : μύδια
<i>Modilus barbatus</i>	
<i>Ostrea edulis</i>] : στρείδια
<i>Crassostrea angulata</i>	
<i>Pecten jacobaeus</i>] : κτένια
<i>Aequipecten opercularis</i>	
<i>Chlamys varia</i>	
<i>Procteopecten glaber</i>	
<i>Cerastoderma edule</i>] : αχιβάδες
<i>Acanthocardia tuberculata</i>	
<i>Ensis ensis</i>] : σωλήνες
<i>Solen vagina</i>	
<i>Pinna nobilis</i>	: πίννα
<i>Callista chione</i>	: γυαλιστερή
<i>Venus gallina</i>	: χάβαρα
<i>Venus verrucosa</i>	: κυδώνια
<i>Donax trunculus</i>] : κοχύλια
<i>Donax aemistriatus</i>	

1.2.2 Χαρακτηριστικά

Εξωτερική δομή

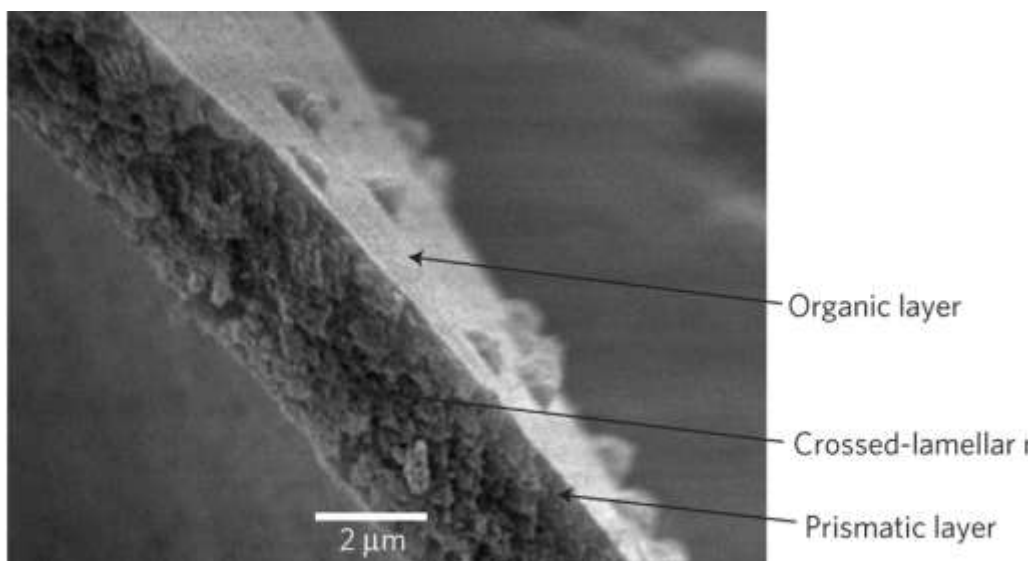
Το κέλυφος των δίθυρων, όπως και στα περισσότερα μαλάκια, εκκρίνεται από τον μανδύα και αποτελείται από ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃). Λαμβάνουν τα απαραίτητα ιόντα ασβεστίου από το περιβάλλον τους, από το θαλασσινό νερό για παράδειγμα στην περίπτωση για τα θαλάσσια δίθυρα μαλάκια, μεταφέρονται μέσω του αίματος προς το μανδύα και στη συνέχεια στο υγρό μεταξύ μανδύα και κελύφους. Σε αυτό το στάδιο

σχηματίζεται ανθρακικό ασβέστιο και απορροφάται από μια πρωτεΐνη, υπεύθυνη για την σκλήρυνση του και τον σχηματισμό του κελύφους, που ονομάζεται Κοχιολίνη. Η πρωτεΐνη αυτή εκκρίνεται από τον μανδύα του δίθουρου στον χώρο μεταξύ του μανδύα και του κελύφους. Η σύνθεση της πρωτεΐνης αυτής καθορίζεται από τον ρυθμό της ανάπτυξης των κρυστάλλων του CaCO_3 . Το ανθρακικό ασβέστιο μπορεί να κρυσταλλωθεί σε διάφορες μορφές, εκ των οποίων ο ασβεστίτης και ο αραγωνίτης βρίσκονται σε πολλά μαλάκια με κοχύλια.[6]

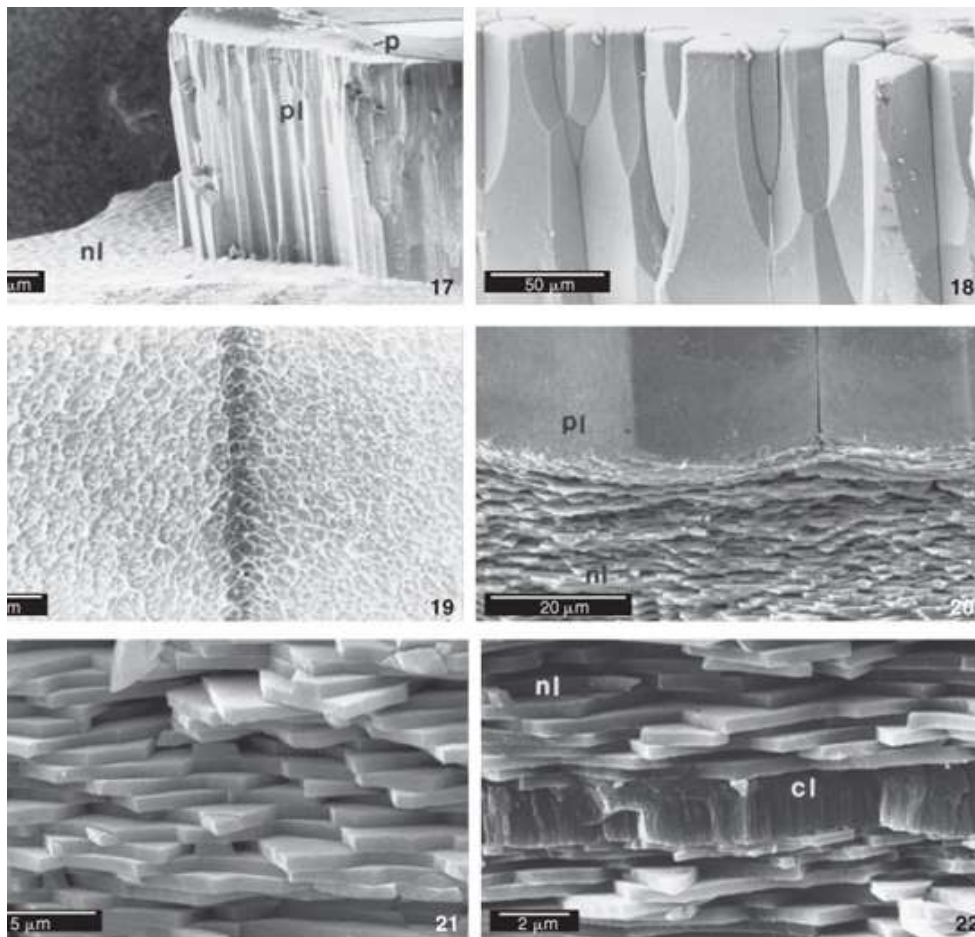
Το εξωτερικό στρώμα του κελύφους αποτελείται από το περίοστρακο. Το περίοστρακο είναι οργανικής φύσεως, αποτελείται από Κοχιολίνη και καλύπτει το σύνολο του κελύφους. Εκκρίνεται από την εσωτερική επιφάνεια του εξώτερου μανδύα και χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στο οποίο αποτίθεται το CaCO_3 , όταν αυτό εκκρίνεται από την εξωτερική επιφάνεια του ίδιου μανδύα.

Τα ενδιάμεσα στρώματα του κελύφους αποτελούνται κυρίως από πρίσματα ασβεστίτη, και σπανιότερα από αραγωνίτης, τα οποία διατάσσονται κάθετα προς την επιφάνεια του κελύφους. Η πιο συνηθισμένη δομή του κρυσταλλοποιημένου CaCO_3 στα θαλάσσια δίθουρα μαλάκια είναι η δομή των διασταυρούμενων πεταλίων (crossed-lamellar matrix) και αποτελείται σχεδόν πάντα από αραγωνίτη.

Τέλος μπορεί να παρατηρηθεί και δομή μαργαριτοειδούς διάταξης η οποία συνήθως συναντάται στο εσωτερικό του κελύφους. Η δομή αυτή αποτελείται από πετάλια διευθετημένα παράλληλα προς την εσωτερική επιφάνεια του περιβλήματος.(εικ 1,2)



[7]Εικ 1: Το κέλυφος των διθύρων



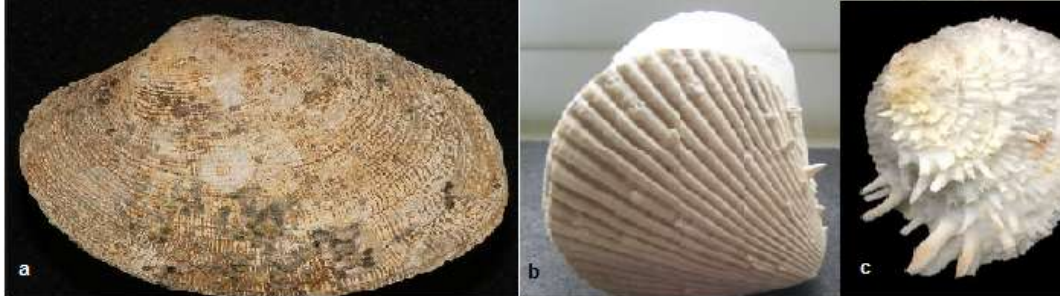
[8] Εικ 2: δομή οστράκου διθύρων, φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Το κέντρο ανάπτυξης της κάθε θυρίδας είναι η κορυφή. Ακριβώς από κάτω βρίσκεται ο σπόνδυλος, μια ανασηκωμένη κυρτή περιοχή που μερικές φορές φέρει το περίγραμμα ενός μικρού οστράκου, αρχικά σχηματισμένου από το ζώο, που ονομάζεται προδισκοκόγχη.(εικ 3)

Οι κορυφές των δύο θυρίδων μπορεί να βρίσκονται κοντά ή μακριά η μια με την άλλη και η μεταξύ τους περιοχή ονομάζεται κύρια περιοχή. Αυτή μπορεί να περιορίζεται σε μία περιοχή στο εμπρόσθιο μέρος του διθύρου και ονομάζεται μηνίσκος και σε μια παρόμοια λίγο μεγαλύτερη περιοχή στο πίσω μέρος του, που ονομάζεται θυρεός. Ο μηνίσκος και ο θυρεός είναι δυνατό να υπάρχουν σε μία μόνο θυρίδα, και στις δύο ή να απουσιάζουν εντελώς.

Η εξωτερική επιφάνεια του οστράκου είναι συχνά έντονα διακοσμημένη και χρωματισμένη. Ο διάκοσμος μπορεί να αποτελείται από ακτινωτές γραμμές, ραβδώσεις ή πτυχές, απλές ή κυματοειδής, μεταξύ των οποίων μπορεί να υπάρχουν αυλάκια. Τα χαρακτηριστικά του οστράκου μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά χαρακτηριστικά τα σημαντικότερα από τα οποία είναι ο αριθμός των πτυχών ή ραβδώσεων, το πάχος τους, τα μεταξύ τους

αυλάκια και η μορφή τους. Η εξωτερική επιφάνεια μπορεί ακόμη να φέρει ανάγλυφες ομοκεντρικές γραμμές ή ραβδώσεις (εικ 3b), ακανόνιστα ομοκεντρικά λεπίδια (εικ 3c) ή να έχουν δικτυωτή μορφή (εικ 3a).

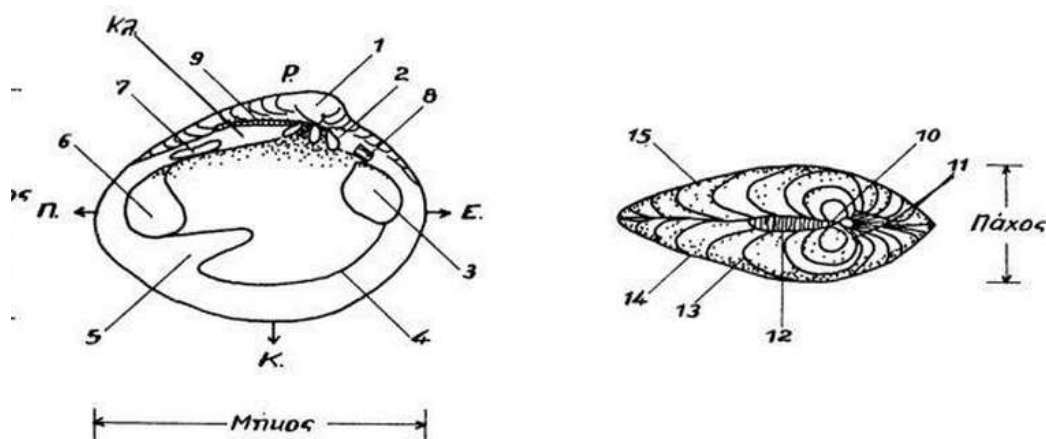


3 : Τα Δίθυρα a) *Venerupis decussate* b) *Spondylus spinosus* c) *Chama aspe*

Προεξοχές ή δόντια βρίσκονται συχνά κατά μήκος του εσωτερικού του ραχιαίου χείλους των θυρίδων, αν και μερικά είδη διθύρων δεν έχουν καθόλου. Το σχήμα, η θέση καθώς και οι υποδοχές στις οποίες ταιριάζουν τα δόντια είναι επίσης πολύ σημαντικά για τον χαρακτηρισμό των διθύρων. Τα δόντια βρίσκονται σε μια μικρή κάθετη προεξοχή της ραχιαίας γραμμής που ονομάζεται κλείθρο. Αν βρίσκονται κάτω από τις κορυφές και αποκλίνουν από αυτές λέγονται καρδινάλια ή κύρια δόντια, ενώ αν είναι σε μικρή απόσταση από τις κορυφές λέγονται πλευρικά δόντια. Όταν ένας μεγάλος αριθμός μικρών δοντιών και υποδοχέων βρίσκονται κατά μήκος του κλείθρου τότε ονομάζεται ταξόδοντο κλείθρο.

Το εσωτερικό του οστράκου στα περισσότερα είδη είναι άσπρο και στην επιφάνεια του υπάρχουν αποτυπώματα διαφόρων σημείων εδραίωσης του ζώου. Τα σημαντικότερα είναι τα αποτυπώματα των προσαγωγών μυών, και η μανδουακή γραμμή ή το μανδουακό αποτύπωμα (εικ 4). Το μανδουακό αποτύπωμα είναι η περιοχή εδραίωσης των λοβών του μανδύα στο εσωτερικό κάθε θυρίδας και χαρακτηρίζεται από μια φαρδιά γραμμή.

Στο πίσω μέρος της μανδουακής γραμμής μπορεί να υπάρχει μια εγκόλπωση που δείχνει την θέση των σιφώνων μέσα στο όστρακο και ονομάζεται μανδουακή εγκόλπωση.



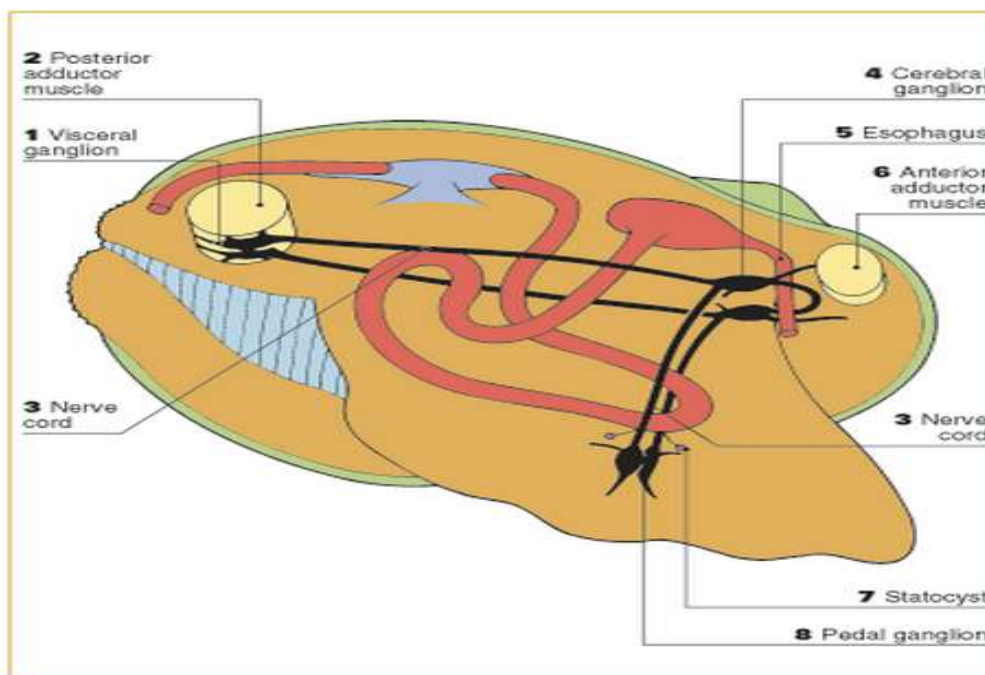
- κλ. Κλείθρο
- Ξ. Μπροστινό μέρος οστράκου
- 1 Πίσω μέρος οστράκου
- λ. Σπόνδυλος
- 2. Καρδινάλιο ή κύριο δόντι
- 3. Μπροστινό μυικό αποτύπωμα
- 4. Μανδουακό αποτύπωμα ή μανδουακή γραμμή
- 5. Μανδουακή εγκόλπωση
- δ. Πίσω μυικό αποτύπωμα
- 7, 8. Πλευρικά δόντια και κοιλότητες
- θ. Ελαστικός σύνδεσμος
- ρ. Ραχιαίο μέρος οστράκου
- κ. Κοιλιακό μέρος οστράκου
- δ. Σπόνδυλος
- 1. Μηνίσκος
- 2. Θυρεός
- 3. Γραμμές προσαυξήσεως
- 4. Δεξιά θυρίδα
- 5. Αριστερή θυρίδα

Εικ 4: Ανατομία του κελύφους

Εσωτερική οργάνωση [9]

Ο πεπτικός σωλήνας είναι καλά ανεπτυγμένος και περιλαμβάνει την στοματική κοιλότητα, τον οισοφάγο, το στομάχι, τον πεπτικό αδένα, το έντερο και την απεκκριτική κοιλότητα. Το στομάχι καταλαμβάνει το μεσαίο, ευρύτερο τμήμα του πεπτικού σωλήνα και περιβάλλεται από τον πεπτικό αδένα, ο οποίος εκκρίνει τα πεπτικά ένζυμα. Τέλος το έντερο περνάει από την αορτή της καρδιάς και απολήγει στην απεκκριτική κοιλότητα.

Καθότι τα δίθυρα μαλάκια δεν διαθέτουν κεφαλή, το νευρικό σύστημα είναι λιγότερο ανεπτυγμένο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5, το νευρικό σύστημα αποτελείται από τρία ζεύγη νευρικών γαγγλίων ενωμένα μεταξύ τους με νευρικές ίνες. Υπάρχει το σπλαχνικό γάγγλιο, το οποίο ελέγχει την κίνηση του οπίσθιου προσαγωγού μυ. Στο αντίθετο άκρο, υπάρχει το εγκεφαλικό γάγγλιο, το οποίο ελέγχει το πρόσθιο προσαγωγό μυ. Τέλος, υπάρχει το πεταλοειδές γάγγλιο, το οποίο ελέγχει την κίνηση του ποδιού και βρίσκεται στην βάση του.[10]



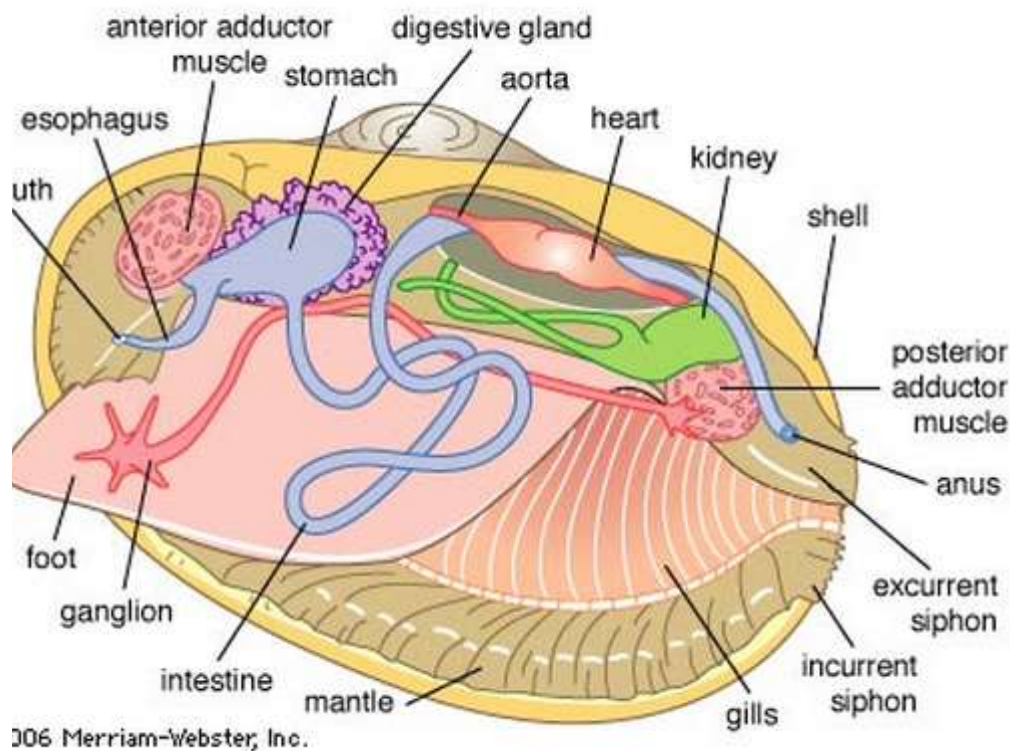
Εικ 5: Το νευρικό σύστημα των δίθυρων μαλάκιων

Το κυκλοφορικό σύστημα στα δίθυρα μαλάκια περιλαμβάνει την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία. Η καρδιά βρίσκεται στην περικαρδιακή κοιλότητα και αποτελείται από δύο κόλπους και μία κοιλία. Η αορτή ξεκινώντας από την κοιλία διευρύνεται (αρτηριακή λυχνία) και διαιρείται σε δύο κύριες αρτηρίες, η μια τροφοδοτεί τον μανδύα (μανδυακή αρτηρία) και η άλλη είναι υπεύθυνη για την ηπατική και γαστρεντερική κυκλοφορία (σπλαχνική αρτηρία). Υπάρχουν επίσης πολλές διακλαδώσεις που οδηγούν σε όλα τα όργανα και στον μανδύα.

Πριν από την επιστροφή του αίματος στην καρδιά διέρχεται μέσω των νεφρών, τα οποία με την σειρά τους καθαρίζουν τα όποια υπολείμματα της μεταβολικής του διεργασίας. Ακολούθως το καθαρό αίμα φέρεται στα βράγχια όπου και οξυγονώνεται και στην συνέχεια οδηγείται στους κόλπους. Αξιοσημείωτο είναι ότι σαν αναπνευστική χρωστική στο αίμα

περιέχεται η αιμοκυανίνη, και η οξυγόνωση της οδηγεί από το άχρωμο Cu(I) στο μπλε χρώμα του Cu(II).

Η αναπνοή πραγματοποιείται μέσω των βράγχιων τα οποία βρίσκονται μέσα στην μανδουακή κοιλότητα και σε κοντινή απόσταση με την καρδιά. Τέλος το αππεκρικό σύστημα αποτελείται από νεφρίδια τα οποία βρίσκονται στην περικαρδιακή κοιλότητα και εκβάλλουν στη μανδουακή κοιλότητα.[11]



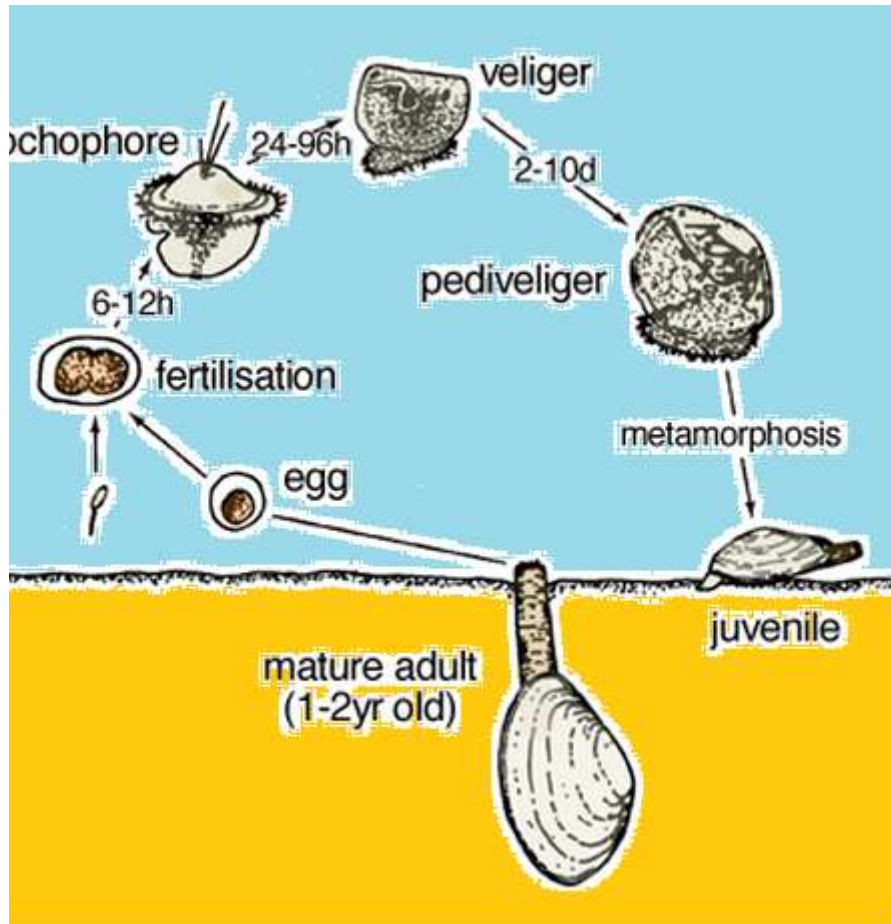
Εικ 6: Ανατομία ενός τυπικού δίθυρου

1.2.3. Αναπαραγωγή

Περισσότερο από το 95 % των δίθυρων έχουν ξεχωριστά φύλα, δηλαδή κάθε άτομο διατηρεί είτε αρσενικά είτε θηλυκά χαρακτηριστικά. Επιπλέον υπάρχουν και περιπτώσεις ερμαφροδιτισμού ή και αλλαγής γένους κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

Τα δίθυρα δεν παρουσιάζουν σεξουαλικό διμορφισμό, έτσι δεν υπάρχουν εξωτερικά χαρακτηριστικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του φύλου του δείγματος. Προκειμένου να εκτιμηθεί εάν ένα δείγμα είναι ένα αρσενικό ή θηλυκό θα πρέπει να παρατηρήσουμε τα εσωτερικά όργανα του, πράγμα που σημαίνει σχεδόν πάντα τη θανάτωση του ζώου.

Οι φάσεις της αναπαραγωγής συνθέτουν ένα κύκλο που μπορεί να λάβει χώρα μία ή περισσότερες φορές κατά τη διάρκεια ενός χρόνου ανάλογα με το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. (Εικ. 7)[12]



Εικ 7: Ο κύκλος αναπαραγωγής των θαλάσσιων δίθυρων μαλάκιων

Στο φυσικό περιβάλλον η αναπαραγωγή λαμβάνει χώρα όταν τα άτομα και των δύο φύλων είναι ώριμα, δηλαδή όταν έχουν φτάσει τη βιολογική κατάσταση στην οποία τα ενήλικα ζώα παράγουν γαμέτες. Η αναπαραγωγή απαιτεί τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες διαφέρουν από είδος σε είδος. Οι πιο σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι η θερμοκρασία και η διαθέσιμη τροφή. Γενικά τα θηλυκά δίθυρα δύναται να παράγουν εκατομμύρια αυγά, μεγέθους 50-100 μm .

Ο κύκλος αναπαραγωγής αρχίζει το φθινόπωρο και στις αρχές του χειμώνα όταν αναπτύσσονται τα πρώτα ωκύτταρα και τα ενήλικα θηλυκά επιτυγχάνουν το μέγιστο βάρος τους. Κάθε θηλυκό απελευθερώνει τα αυγά καθ' όλη τη διάρκεια της άνοιξης και του

καλοκαιριού που ακολουθεί, με τον Ιούλιο να είναι ο μήνας όπου ολοκληρώνεται η γονιμοποίηση.

Τα πιο σημαντικά στάδια στον κύκλο αναπαραγωγής των διθύρων περιγράφονται ακολούθως:

Ωοτοκία – Γονιμοποίηση

Όταν τα θαλάσσια δίθυρα είναι μεταξύ ενός και δύο ετών, θεωρούνται ώριμα και δύναται να αναπαραχθούν. Για να επιτευχθεί η αναπαραγωγή τους, οι αρσενικοί και οι θηλυκοί γαμέτες απελευθερώνονται από τον σίφωνα εκπνοής και η γονιμοποίηση των αυγών λαμβάνει χώρα εντός της υδάτινης στήλης. Σε ορισμένα είδη διθύρων η γονιμοποίηση δύναται να πραγματοποιηθεί στο εσωτερικό του θηλυκού ατόμου, στους ζύγωτες, και εν συνεχεία να αποβάλλονται στην περιβάλλοντα υδάτινη στήλη.[13]

Τριχοφόρο - Προνύμφη

Μετά την γονιμοποίηση των αυγών και σε χρονικό διάστημα 6 με 12 ωρών, τα γονιμοποιημένα αυγά μετατρέπονται σε πλαγκτονικά τριχοφόρα (planktonic trochophore) και εν συνεχεία (24 με 69 ώρες) σε προνύμφες που περιβάλλονται από μανδύα, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αναπνοή τους και την ικανότητά τους να κολυμπούν. Οι προνύμφες έχουν την δυνατότητα να κολυμπούν, αλλά συνήθως η πορεία τους καθορίζεται από τα ρεύματα που επικρατούν στα θαλάσσια ύδατα, με συνέπεια να ταξιδεύουν μέχρι και χιλιόμετρα. Αυτός είναι ένας θεμελιώδης παράγοντας για την επιβίωση των διθύρων, δεδομένου ότι οι προνύμφες που εξαπλώνονται έχουν περισσότερες πιθανότητες να συναντήσουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη τους, δεδομένου ότι στα επόμενα στάδια της ωρίμανσης τα περισσότερα είδη δεν μπορούν να μετακινηθούν. Κατά την περίοδο αυτή, όπως και στην ενήλικη ζωή του, τα δίθυρα τρέφονται με φυτοπλαγκτόν που φιλτράρονται από το νερό. Αυτή η φάση της ωρίμανσης μπορεί να διαρκέσει από μερικές μέρες έως και μήνες, ανάλογα το είδος του δίθυρου. Πριν την επόμενη και τελευταία φάση της ανάπτυξης του, η προνύμφη αρχίζει και αναπτύσσει το πόδι και ονομάζεται ποδο-προνύμφη (pedilevenger).

Μεταμόρφωση

Όταν οι προνύμφες εγκατασταθούν στον βυθό, χάνουν τον μανδύα που τους έδινε την δυνατότητα να κολυμπούν και το μετα-προνυμφιακό δίθυρο έχει την ικανότητα να σκάψει με το πλήρως ανεπτυγμένο και λειτουργικό πόδι του. Σε αυτήν την φάση το δίθυρα ονομάζονται Ιουβελίνοι (Juvelins). Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μόνο εάν οι προνύμφες βρουν κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη τους. Όταν τα μεταμορφωμένα μαλάκια φτάσουν στην ωρίμανση, ο κύκλος αρχίζει ξανά από την αρχή, προκειμένου να εξασφαλισθεί η διαιώνιση του είδους.

Ο φυσικός κύκλος αναπαραγωγής των διθύρων μπορεί επίσης να λάβει χώρα και υπό εργαστηριακές συνθήκες, έτσι πολλά δίθυρα που είναι οικονομικά ενδιαφέροντα, αναπαράγονται σε εργαστήρια για την διάθεση νεαρών σε ιχθυοτροφία.[14]

1.2.4. Διατροφή

Τροφή

Όλα τα δίθυρα τρέφονται με σωματίδια που αιωρούνται στο νερό ή αποτίθενται στον πυθμένα της θάλασσας. Τα σωματίδια αυτά είναι κυρίως μονοκύτταρα άλγη (φυτοπλαγκτόν), αλλά επίσης και ζωντανοί ή νεκροί μικροοργανισμοί ζωικής ή φυτικής προελεύσεως.

Προκειμένου να συλλεχτεί η απαραίτητη τροφή από τα δίθυρα, απαιτείται το φιλτράρισμα μεγάλου όγκου νερού από τους σίφουνες, αναπτύσσοντας έτσι ρεύματα στο περιβάλλον νερό και αναγκάζοντας το να εισέλθει στην κοιλότητα του μανδύα.

Τα σωματίδια παγιδεύονται από βλενώδεις εκκρίσεις και στη συνέχεια κατευθύνονται προς την κεφαλική περιοχή. Εκεί τα μεγαλύτερα ή ανεπιθύμητα σωματίδια εκδιώκονται ως συσσωματώματα σωματιδίων και βλέννας με συστολή του σίφωνα εκπνοής, ενώ η τροφή εισέρχεται στην στοματική κοιλότητα.

Η κίνηση των βλεφαρίδων, οι οποίες υπάρχουν σε αφθονία στην μανδουακή και βραγχιακή επιθήλιο, δημιουργεί ρεύματα που επιτρέπουν την εισαγωγή νερού από το σίφωνα

εισπνοής, το πέρασμά του μέσα από τους ελασματικούς πόρους και την εκβολή του μέσω του σίφωνα εκπνοής. Η βλέννα που καλύπτει τα βράγχια και τον μανδύα συγκρατεί τα μικροσωματίδια που υπάρχουν στο νερό, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται από την κίνηση των βλεφαρίδων στις χειλικές προσακτιδες (labial palps). Οι χειλικές προσακτιδες είναι εξωγκώματα εκατέροθεν της στοματικής κοιλότητας που συμβάλουν στην διαλογή της τροφής από το εισερχόμενο νερό, έτσι επιτυγχάνεται η συλλογή των θρεπτικών σωματιδίων και η απόθεση τους στην στοματική κοιλότητα, όπως επίσης και η εκδίωξη των ανόργανων σωματιδίων π.χ. άμμο μέσω του σίφωνα εκπνοής.

Ο μηχανισμός της κίνησης των βλεφαρίδων λειτουργεί όσο το μαλάκιο είναι βυθισμένο στο νερό. Όταν το ζώο εκτίθεται στον αέρα, κατά την άμπωτη, την απομάκρυνσή του από το νερό ή όταν βυθίζονται σε ιζήματα βάθους 10-12 cm, οι θύρες του κλείνουν και συσσωρεύεται διοξείδιο του άνθρακα στην μανδουακή του κοιλότητα. Η πτώση του pH αναστέλλει την βλεφαριδική δραστηριότητα μέχρι τελικά να σταματήσει. Μόλις όμως το δίθυρο επανατοποθετηθεί στο νερό οι βλεφαρίδες αρχίζουν να κινούνται και πάλι συνεχίζοντας έτσι το φιλτράρισμα του νερού και την συλλογή τροφής.

Πέψη

Η πέψη είναι κυρίως ενδοκυτταρικής φύσεως. Στο πεπτικό σύστημα των διθύρων, μετά την κοιλότητα του στόματος, ακολουθεί ο οισοφάγος και εν συνεχεία το στομάχι. Το στομάχι περικλείεται από ένα πεπτικό αδέν, ο οποίος είναι το κύριο όργανο της ενδοκυτταρικής πέψης. Τα κύτταρα αυτού του οργάνου απορροφούν την αλεσμένη τροφή, που προέρχεται από το στομάχι και την πετούν με ενδοκυτταρικά ένζυμα.

Το έντερο διέρχεται από πόδι, στη συνέχεια διασχίζει το περικάρδιο και τέλος καταλήγει στην οπίσθια μανδουακή κοιλότητα. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του εντέρου μαλακίων είναι η παρουσία ενός βλεφαριδωτού εκκολπώματος, του οποίου τα κύτταρα εκκρίνουν μια πρωτεϊνική κρυσταλλική στήλη. Οι βλεφαρίδες του εκκολπώματος μετακινούν την στήλη αυτή προς το στομάχι, στην περιοχή που ονομάζεται γαστρική ασπίδα, όπου και η διαλυμένη τροφή αναμιγνύεται με το περιεχόμενο του στομάχου. Η πρωτεϊνική στήλη εν συνεχεία απελευθερώνει ένζυμα υπεύθυνα για την πέψη των υδατανθράκων της τροφής. Έτσι λέγω αυτού του μηχανισμού πέψης είναι δυνατό να χαρακτηρίσουμε την πέψη των υδατανθράκων εξωκυτταρικής φύσεως, ενώ η πέψη των πρωτεϊνών και των λιπιδίων είναι ενδοκυτταρικής φύσεως και λαμβάνει χώρα στον πεπτικό αδέν.

Ο πεπτικός αδένας του στομάχου εκκρίνει λευκοκύτταρα, τα οποία διασπούν τα φυτοπλαγκτόν και τα άλλα σωματίδια που εισέρχονται στο στομάχι με φαγοκύτωση. Τέλος τα θρεπτικά συστατικά της τροφής μεταφέρονται μέσω των λευκοκυττάρων στους διάφορους ιστούς του διθύρου.

1.3. Οικονομικό ενδιαφέρον

1.3.1 Περιοχές καλλιέργειας Διθύρων Στον Κόσμο

Τα Δίθυρα καλλιεργούνται σε πολλές περιοχές στον κόσμο (Εικ. 8), κυριότερες από τις οποίες είναι η Κίνα, η Ισπανία, η Ολλανδία, η Δανία, η Ιταλία και η Ελλάδα.



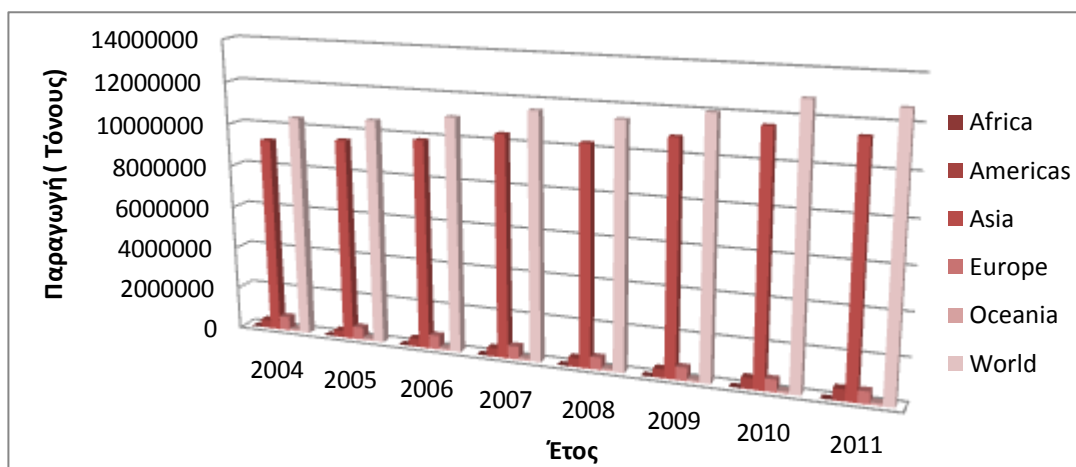
Εικόνα 8: Παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση καλλιέργειας Διθύρων (FAO Fishery Statistics 2011)

Με βάση τα στοιχεία του έτους 2011 (FAO 2014) η παγκόσμια παραγωγή θαλάσσιων διθύρων μαλάκιων ανέρχεται περίπου στους 12.700.000 t. (Εικ.9).

Aquaculture: Quantity (t)

Land Area	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Africa	1 057	871	1 040	965	1 436	1 474	1 539	1 288
Americas	391 081	319 016	380 770	407 808	431 705	416 737	523 435	551 748
Asia	9 281 109 F	9 560 961 F	9 848 823 F	10 408 735	10 286 918	10 840 235	11 579 502	11 410 918
Europe	664 913	598 185	661 235	621 609	586 670	618 737	587 880	585 810
Oceania	102 418	112 633	115 138	120 180	120 228	110 245	116 075	120 176
Grand total	10 440 578 F	10 591 666 F	11 007 006 F	11 559 297	11 426 956	11 987 428	12 808 431	12 669 941

© FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service - 15/01/2014



Εικ 9: Παραγωγή θαλάσσιων διθύρων ανα ήπειρο

Η ίδια πηγή αναφέρει ότι η συνολική ευρωπαϊκή παραγωγή είναι λίγο μικρότερη από 600.000 t, και η Ελλάδα παρουσιάζει περίπου το 4% της ευρωπαϊκής παραγωγής (Εικ. 10).

Aquaculture: Quantity (t)

Land Area	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Europe								
Greece	28 803	26 065	28 317	22 199	21 099	22 390	17 148	20 081 F
Europe	664 913	598 185	661 235	621 609	586 670	618 737	587 880	585 810
Grand total	664 913	598 185	661 235	621 609	586 670	618 737	587 880	585 810

© FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service - 15/01/2014

Εικ 10: Παραγωγή θαλάσσιων διθύρων στην Ελλάδα και την ευρύτερη Ευρώπη

1.3.2 Συστήματα καλλιέργειας

Όντας εμπορεύσιμα παγκοσμίως ως φρέσκα, κατεψυγμένα ή επεξεργασμένα τρόφιμα, τα θαλάσσια δίθυρα είναι διαδεδομένα στο νότιο και στο Βόρειο ημισφαίριο. Η υδατοκαλλιέργεια τους είναι χωρισμένη σε δύο κλάδους, στην υδατοκαλλιέργεια βυθού και στην υδατοκαλλιέργεια σχοινιού. Στο φυσικό τους περιβάλλον τα δίθυρα πρέπει να προσαρμοστούν σε παραμέτρους όπως αλατότητα, έκθεση σε κύματα, υπόστρωμα, ζώνη, υψόμετρο, θερμοκρασία και ποιότητα νερού. Τα περισσότερα είδη έχουν ανοχή σε ένα ευρύ φάσμα αλατότητας, παρόλα ταύτα σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, η ανάπτυξή τους περιορίζεται σε μικρά γενικά μεγέθη.[15] Ο πιο περιοριστικός παράγοντας για τα θαλάσσια δίθυρα είναι η θερμοκρασία, καθώς μερικά είδη προτιμούν ψυχρότερα νερά ενώ μερικά θερμότερα νερά. Επιπλέον, η συγκέντρωση σε ενεργούς μεταβολίτες εξαρτάται από την εποχή, τον κύκλο ζωής τους και το μέρος που εγκαθίστανται.[16]

Η καλλιέργεια διθύρων είναι μια μη εντατική μορφή εκτροφής που στηρίζεται στις φυσικές διαδικασίες για την προμήθεια γόνου και τροφής.[17] Η επιλογή της μεθόδου καλλιέργειας ανά τον κόσμο εξαρτάται από τη θέση, το κόστος και την λειτουργία της εγκατάστασης. Σήμερα τα πιο διαδεδομένα συστήματα εκτροφής που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

Καλλιέργεια βυθού

Βασικό χαρακτηριστικό αυτής της καλλιέργειας είναι η συγκομιδή του γόνου από φυσικά αποθέματα και η μεταφορά του, σε περιοχές που προορίζονται για τη καλλιέργειά του. [18] Στην καλλιέργεια βυθού δραστηριοποιούνται οι παραγωγοί στην Ολλανδία, στη Γερμανία, και σε μικρότερο βαθμό στην Ιρλανδία και τη Μ. Βρετανία. Συνολικά, αυτού του είδους η καλλιέργεια αντιπροσωπεύει το 15 % της συνολικής παραγωγής.[19]

Καλλιέργεια σε στήλη ύδατος

Το 85 % της παγκόσμιας καλλιέργειας εφαρμόζεται με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Η μέθοδος αυτή συγκεντρώνει κάποια βασικά πλεονεκτήματα, όπως η καλύτερη πρόσβαση στην τροφή που μεταφέρεται από τα ρεύματα και την προστασία των διθύρων από τους θηρευτές.[19]

Καλλιέργεια σε πάσαλο (pole)

Είναι η πιο παλιά από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην Ευρώπη και προέρχεται από την Γαλλία. Πραγματοποιείται με τη βύθιση ξύλινων πασσάλων στον πυθμένα της θάλασσας πάνω στους οποίους τυλίγονται ελικοειδείς αρμαθίες με τα όστρακα (στα γαλλικά bouchot). Τοποθετούνται στη μεσοπαραλιακή ζώνη έτσι ώστε να είναι 2-3 m πάνω από το πυθμένα. Η έκταση αυτής της καλλιέργειας μπορεί να έχει μήκος πάνω από 50 m και να περιλαμβάνει μέχρι και 125 πασσάλους. [20]

Καλλιέργεια σε σχεδίες (raft)

Το σύστημα αυτό βασίζεται στην κατασκευή σχεδίας με πλωτήρες από πλαστικό ή ξύλο επενδυμένο με τσιμέντο ή fiberglass για προστασία. Το πλαίσιο αποτελείται από παράλληλες ξύλινες δοκούς από ευκάλυπτο και έτσι κατασκευάζεται μια τετράγωνη σχεδία 20 m από όπου κρέμονται 500 σχοινιά, τοποθετημένα σε απόσταση 50 cm μεταξύ τους πάνω σε δοκούς που απέχουν 50 cm μεταξύ τους. Μια τέτοια κατασκευή παράγει περίπου 60 t/έτος.[19] [21]

Οι κατασκευές αυτές επειδή τοποθετούνται σε περιοχές με μεγάλο εύρος παλίρροιας χρειάζονται βάθος νερού αρκετά μέτρα μεγαλύτερο από το μήκος των αρμαθιών, έτσι ώστε κατά την άμπωτη να μην ακουμπούν οι αρμαθίες στον βυθό και γίνονται ευάλωτες στους θηρευτές.

Καλλιέργεια σε πλωτό σύστημα (longline)

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται σε Νέα Ζηλανδία, Ιταλία, Σουηδία, Αμερική και στην χώρα μας με τις κατάλληλες προσαρμογές. Αποτελείται από ένα οριζόντιο σχοινί από πολυπροπυλένιο που επιπλέει στην επιφάνεια ή 1,5-3 m κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας με την βοήθεια πλωτήρων, (Εικ. 11) από όπου κρέμονται σχοινιά με μύδια, σε απόσταση 50 cm μεταξύ τους. Σε ισχυρά ρεύματα, τοποθετούνται βαρίδια στα σχοινιά για να διατηρούνται κάθετα. Ο αριθμός και το μέγεθος των πλωτήρων εξαρτάται από το βάρος που πρόκειται να σηκώσουν (π.χ. ένα σχοινί μήκους 200 m και διαμέτρου 18-30 mm στηρίζεται σε 25-30 πλωτήρες που έχουν απόσταση μεταξύ τους 0,5-1,5 m). Τα κάθετα σχοινιά είναι μήκους 4-6 m και διαμέτρου 14-18 mm. Τοποθετούνται κατά μήκος των σχοινιών ξύλινες σφήνες

μήκους 25 mm κάθε 25-40 cm, για να εμποδίσουν τα μύδια να «χυθούν», πρακτική που ακολουθείται και στις σχεδίες.[19]



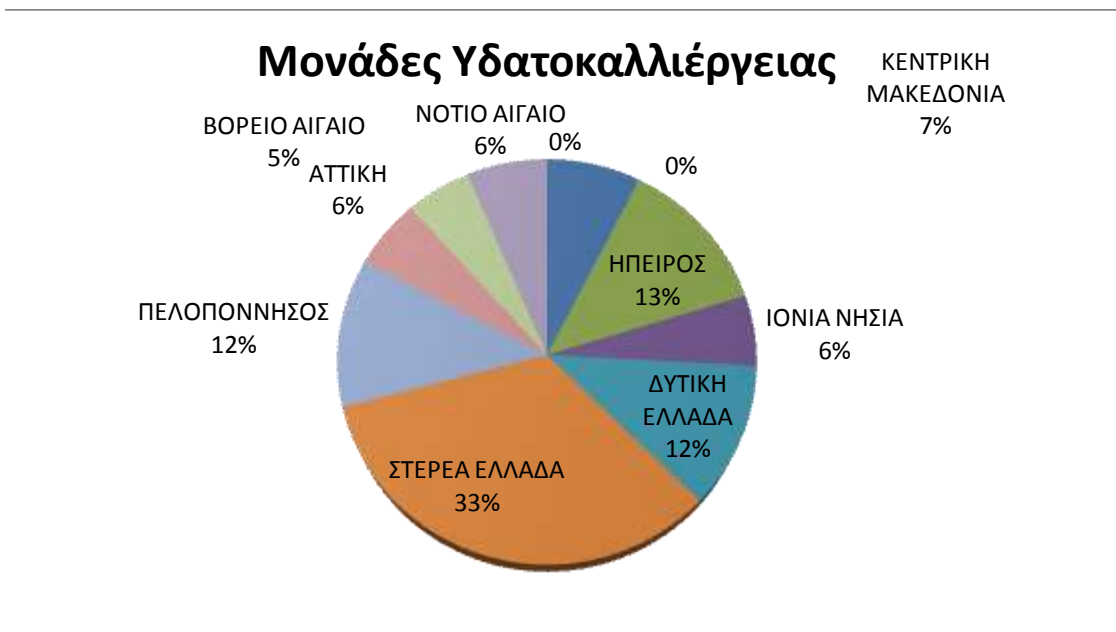
Εικ 11. Καλλιέργεια μυδιών με πλωτό σύστημα [22]

1.3.3 Περιοχές καλλιέργειας Στην Ελλάδα

Η καλλιέργεια οστράκων έχει μια μακρά ιστορία από τον 4ο αιώνα π.χ. στην Ελλάδα. Σήμερα συναντάται κυρίως στην Αλεξανδρούπολη, στον Αμβρακικό, στο Πόρτο-Λάγος, στο Μαλιακό, στο Σαρωνικό και στο Στρυμονικό και κυρίως στους Κόλπους Θεσσαλονίκης και Θερμαϊκού (Εικ. 11).



Εικ 12: Κύριες περιοχές καλλιέργειας στην Ελλάδα. (1) Αλεξανδρούπολη, (2) Πόρτο Λάγος, (3) Στρυμονικός, (4) Θεσσαλονίκη και Θερμαϊκός, (5) Αμβρακικός, (6) Μαλιακός, (7) Σαρωνικός. [23]



Εικ13: Μονάδες υδατοκαλλιέργειας (ΕΣΥΕ 2012)

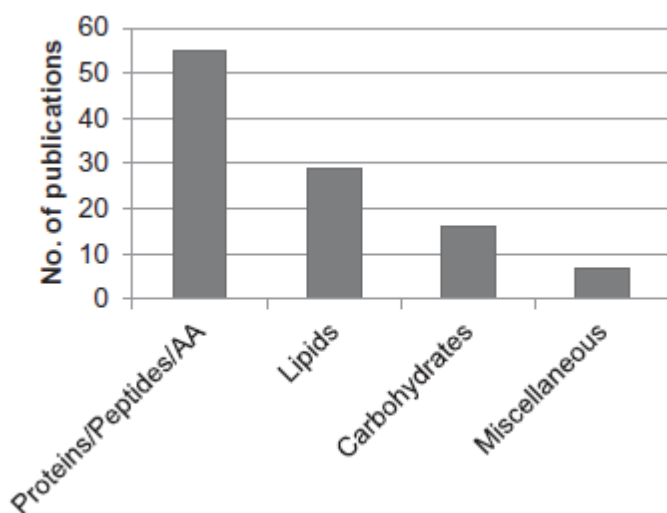
Η Ελληνική παραγωγή μυδιών άρχισε να αυξάνει από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, δηλαδή μια εικοσαετία αργότερα από ότι στην Ευρώπη. Από τους 28.000 τόνους μυδιών

που αποτελούν την ελληνική παραγωγή το 80-90% της παραγωγής αυτής εξάγεται κυρίως, στην Ιταλία.

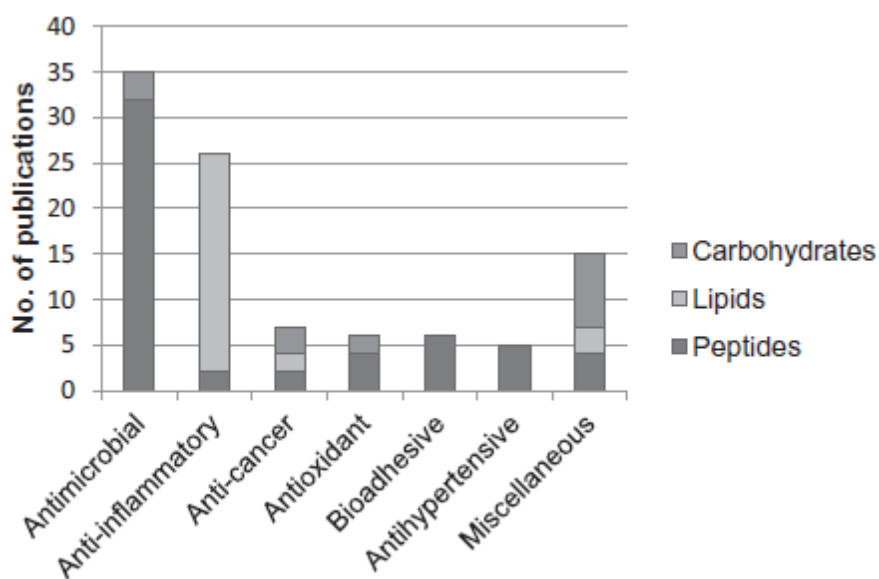
1.4 Ενδιαφέρον στην τεχνολογία τροφίμων

Η κατανάλωση θαλασσιών διθύρων, ως διάσημου θαλασσινού εδέσματος, έχει αυξηθεί ραγδαία την τελευταία δεκαετία. Επιπλέον το γεγονός ότι τα συστατικά τους προάγουν την καλή υγεία του ανθρώπινου οργανισμού, έχει αποτελέσει βάση για εκτεταμένες επιστημονικές έρευνες. Συγκεκριμένα, η βιοδραστικότητα τους έχει αποδοθεί στα Τρία κύρια συστατικά τους, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες. Από την ομάδα των πρωτεϊνών το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στα πεπτίδια των διθύρων πχ. Αυτών που λαμβάνονται από διεργασίες βιομετατροπής, όπως η ζύμωση. Από την ομάδα των λιπιδίων, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), τα οποία είναι πολύ γνωστά για την αντιμετώπιση της ρευματοειδής αρθρίτιδας. Τέλος οι υδατάνθρακες και κυρίως οι πολυσακχαρίτες.[24]

Λαμβάνοντας υπόψη την στενή σχέση μεταξύ διατροφής και υγείας, τα βιοδραστικά συστατικά των διθύρων έχει αποδειχτεί ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παρασκευή λειτουργικών τροφίμων (ή αλλιώς nutraceuticals). Ως λειτουργικά τρόφιμα ορίζονται τα τρόφιμα που διαθέτουν κάποια ειδική ευεργετική ιδιότητα, επιπλέον των διατροφικών του στοιχείων.[25] Επιπλέον, ο σχετικά υψηλός όγκος αποβλήτων που προκύπτει στην υδατοκαλλιέργεια ή στην επεξεργασία των διθύρων, αποτελεί στόχος για πολλούς ερευνητές ως ανεξερεύνητη πηγή βιοδραστικών μορίων.[26] Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν ερευνηθεί οι βιοδραστικές ιδιότητες των διθύρων και έχουν παρασκευαστεί αρκετά διαιτητικά συμπληρώματα τα οποία περιέχουν εκχυλίσματα από δίθυρα μαλάκια. Παραδείγματος Χάριν το συμπλήρωμα *Lyprinol*[®], ένα συμπλήρωμα διατροφής από το εκχύλισμα των λιπαρών οξέων του μυδιού *Perna canaliculus*, με αντιφλεγμονώδες και αντί-αρθρικές ιδιότητες.



Σχήμα 1: Σύγκριση δημοσιεύσεων που μελετούν τα βιοδραστικά συστατικά των διθύρων



Σχήμα 2 : Σύγκριση δημοσιεύσεων που δηλώνουν τις βιοδραστικές ιδιότητες των μορίων των διθύρων

1.4.1 Βιοδραστικές Πρωτεΐνες, Πεπτίδια και Αμινοξέα στα Θαλάσσια Δίθυρα

Τα δίθυρα περιέχουν ένα μεγάλο μέρος μυϊκού ιστού με υψηλό επίπεδο πρωτεϊνών. Το κύριο Βιοδραστικό πρωτεϊνικό μακρομόριο είναι η Περνίνη (60kDa). Αποτελείται από 497 αμινοξέα και μοιάζει με το πεπτίδιο της αντιθρομβίνης που προέρχεται από τις βδέλλες. Ωστόσο, η αντιθρομβωτική δράση που βρέθηκε για την πρωτεΐνη αυτή είναι σχετικά χαμηλή.[27]

Για να ανεδείχθη σημαντική βιοδράση, οι σύνθετες πρωτεΐνες πρέπει ως συνήθως να διασπαστούν σε μικρότερες αλυσίδες αμινοξέων (πεπτίδια). Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους κατεργασίας όπως ζυμώσεις ή γαστρεντερική χώνευση. Κατά την ζύμωση, τα Βιοδραστικά πεπτίδια ή τα αμινοξέα, παρασκευάζονται ενζυμικά από πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή βιοδραστική δράση ή και καθόλου. Η βιοχημική κατεργασία της ζύμωσης εξαρτάται από το pH, την θερμοκρασία και τον χρόνο και ονομάζεται υδρόλυση ή πρωτεόλυση. Το σπάσιμο των πρωτεϊνών σε μικρότερα τμήματα μπορεί να επιτευχθεί από ενδογενή ή/και από εξωγενή ένζυμα, τα οποία μπορεί να απενεργοποιηθούν με θέρμανση ώστε να τερματιστεί η διεργασία. Αν και θεωρείτε ο πιο οικονομικός τρόπος επεξεργασίας, οι ενδογενείς πρωτεάσες, οι οποίες προϋπάρχουν στα τρόφιμα όπως η σάρκα των δίθυρων, απαιτούν μεγάλο χρονικό διάστημα για την παραγωγή των επιθυμητών βιοδραστικών πεπτιδίων. Για παράδειγμα η παραγωγή της μπλε σως από τα μύδια απαιτεί από 6 έως 12 μήνες ζύμωση[28]. Ως συνήθως η αυτοπρωτεόλυση λαμβάνει μέρος σε υφάλμυρο διάλυμα (πάνω από 20% NaCl, w/w) ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση από μικροοργανισμούς. Το μειονέκτημα αυτών των προϊόντων είναι η μεγάλη περιεκτικότητα σε άλας, το οποίο είναι ανεπιθύμητο από καταναλωτές με καρδιοαναπνευστικές ασθένειες.

Τα εμπορικά ένζυμα, παρόλο το υψηλό κόστος τους, προτιμούνται λόγω των μικρών χρόνων αντίδρασής τους. Επιπλέον, η χρήση των εμπορικών ενζύμων επιφέρει καλύτερη ρύθμιση και έλεγχο στο σπάσιμο των πρωτεϊνών, στο μοριακό βάρος και στην σύνθεση των παραγόμενων πεπτιδίων.

1.4.2 Πιθανά οφέλη για την υγεία, βιολογικές ιδιότητες των μεταβολίτων των πρωτεασών

Γενικά, τα Βιοδραστικά πεπτίδια που προκύπτουν από τα θαλάσσια δίθυρα περιλαμβάνουν 5-40 κατάλοιπα αμινοξέων. Αναλόγως την αλληλουχία των αμινοξέων, προκύπτουν διάφορες βιολογικές επιδράσεις, όπως αντιμικροβιακές ιδιότητες, αντιυπερτασικές ιδιότητες και αντιθρομβωτικές ιδιότητες.[28, 29]

1.4.2.1 Αντιμικροβιακά Πεπτίδια (AMPs)

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, παράγονται από τα ίδια τα δίθυρα ως μέρος του ανοσοποιητικού τους συστήματος και κατέχουν αντιψυκτικές, αντιβακτηριδιακές και αντιιικές ιδιότητες. [30, 31] Προσδένονται στους μικροοργανισμούς, στα κυτταρικά τοιχώματα ή σε μεμβρανικά κατάλοιπα με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, προωθώντας έτσι την διάλυση τους μέσω διάφορων διεργασιών.[32] Σύμφωνα με την δευτερεύων δομή τους, τα AMPs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες: (i) Γραμμικά πεπτίδια με α-έλικα, (ii) Πεπτίδια πλούσια σε Κυστεΐνη, που περιέχουν δομές β-sheet και δυσουλφιδικούς δεσμούς, και (iii) Πεπτίδια με υψηλή περιεκτικότητα σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. [33]

Δεδομένου της αντίστασης που εμφανίζουν ή αναπτύσσουν ορισμένα είδη μικροοργανισμών ακόμη και στις πιο σύγχρονες θεραπείες, τα AMPs των θαλάσσιων διθύρων μπορούν κάλλιστα να θεωρηθούν ως μια πολύτιμη πηγή θεραπευτικών. Αξίζει να σημειωθεί πως τα AMPs έχουν προταθεί ως φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες για την θεραπεία των μεταδιδόμενων ασθενειών στα θαλάσσια είδη υδατοκαλλιέργειών. Επιπλέον, τα AMPs εμφανίζονται πολύ υποσχόμενα για χρήση ως φυσικά προσθετικά στα τρόφιμα που καταναλώνονται από ανθρώπους. Ωστόσο, χρειάζεται επιπλέον μελέτη για την αντιμετώπιση αρνητικών παραγόντων, όπως η πικρή γεύση, πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά του τροφίμου ή την πρόκληση αλλεργιών.[34, 35]

1.4.2.2 Πεπτίδια με αντιοξειδωτικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες

Πολλές από τις μελέτες που εξετάζουν τα πεπτίδια, που παράγονται με ζύμωση ή άλλες διεργασίες από τα δίθυρα, εστιάζουν στην μελέτη της συμβολής τους στην καλή υγεία του ανθρώπου. Οι κύριες επιδράσεις συμπεριλαμβάνουν αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές

ιδιότητες, καθώς και την ιδιότητα να συλλέγουν ελεύθερες ρίζες από τον οργανισμό. Παραδείγματος χάριν, Κορεάτες ερευνητές ταυτοποίησαν ένα αντιυπερτασικό και δύο αντιοξειδωτικά πεπτιδία από την σάλτσα του ζυμωμένου *M. Edulis*. [28] Το πεπτιδίο με την αντιυπερτασική ιδιότητα (65kDa, N-τελικό αμινοξύ) ξεπερνά την δραστικότητα του ενζύμου ACE και εμφανίζει IC₅₀ 19,34 µg/ml. [28] Το ένζυμο ACE έχει την ιδιότητα να μετατρέπει την Αγκιοτενσίνη I σε Αγκιοτενσίνη II, η οποία με την σειρά της αυξάνει την πίεση του αίματος.

1.4.2.3 Άλλες βιοδραστικές ιδιότητες των πρωτεϊνών των θαλάσσιων διθύρων

Επιπλέον των AMPs, των αντιοξειδωτικών και αντιυπερτασικών πεπτιδίων, τα δίθυρα διαθέτουν μια πλειάδα πρωτεϊνικών μορίων με βιοδραστικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, από το *M. Edulis* έχει απομονωθεί ένα ολιγοπεπτιδίο με δοσοεξαρτώμενη αντιπηκτική ιδιότητα. [36] Αυτό το ολιγοπεπτιδίο ονομάζεται MEAP (*M. edulis* anticoagulant peptide), έχει μοριακό βάρος 2.5 kDa και έχει την ιδιότητα να αυξάνει τον χρόνο θρόμβωσης του αίματος.

Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη ανέδειξε τις αντιφλεγμονώδες ιδιότητες εκχυλισμάτων *M. Galloprovincialis*, τα περιέχουν δεκαπέντε απαραίτητα και μη αμινοξέα. [37]

1.4.3 Βιοδραστικά Λιπίδια και μη πολικά συστατικά στα Θαλάσσια Δίθυρα

Τα λιπίδια των θαλάσσιων διθύρων έχουν μέχρι στιγμής την μεγαλύτερη ικανότητα και απήχηση για την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων και διαιτητικών συμπληρωμάτων. Από τα πιο γνωστά συμπληρώματα που περιέχουν λιπίδια διθύρων, με αντιφλεγμονώδες και αντιαρθρικές ιδιότητες, είναι τα Seastone[®] και Lyprinol[®].

Οι κύριες λιπιδικές κλάσεις που συναντώνται στα δίθυρα είναι κυρίως στερόλικοί εστέρες, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα (κορεσμένα και ακόρεστα), καροτενοειδή, στερόλες και πολικά λιπίδια.

Η εικόνα 16 συνοψίζει τα κύρια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που συναντούνται στο λίπος του *P. Canalicus* και αποτελούν μερικά από τα συστατικά του Lyprinol[®]. Τα PUFAs διακρίνονται στις κατηγορίες ω-3 και ω-6. Τα ω-6 είναι κυρίως φυτικής προέλευσης, ενώ τα ω-3 βρίσκονται κυρίως στα ψάρια και στα οστρακοειδή. Από βιοδραστική άποψη, τα ω-3

λιπαρά οξέα προερχόμενα από τα ψάρια και τα οστρακοειδή, παρουσιάζουν υψηλότερη βιολογική δραστικότητα από τα φυτικής προελεύσεως.[38]

Οι αντιφλεγμονώδες ιδιότητες του λίπους των μυδιών *P.Canalicula*, συσχετίζεται με την ικανότητα του να αναστέλλει την παραγωγή των μεσολαβητών, επιδρώντας στα ένζυμα κλειδιά του σηματοδωτικού καταρράκτη του Αραχιδονικού οξέως (AA). [39] Λόγω της δομικής τους ομοιότητας με το AA, τα PUFAs του μυδιού, όπως π.χ. τα EPA και DHA, δρουν ως ανταγωνιστικά υποστρώματα για τα ένζυμα κλειδιά, μειώνοντας έτσι την εξέλιξη της φλεγμονής. Εν αντιθέσει με την συμβατική θεραπεία των αντιφλεγμονώδων φαρμάκων, η χρήση προϊόντων από λίπη διθύρων δεν προκαλούν παρενέργειες. Έτσι, τα λίπη αυτά μπορεί να θεωρηθούν κατάλληλα για την αντιμετώπιση χρόνιων νοσημάτων.

Οι μελέτες που σχετίζονται με την βιοδραστικότητα των θαλάσσιων λιπιδίων, συνήθως πραγματοποιούνται με εκχυλίσματα των λιπαρών συστατικών και όχι με την χρήση μεμονωμένων συστατικών τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην χημική αστάθεια που τα χαρακτηρίζει, όπως πχ κατά την απομόνωση των λιπαρών οξέων. Σε μια πρόσφατη μελέτη [40] απομονώθηκαν από το μύδι *P. Canaliculus* ασταθής ουρανικά λιπαρά οξέα με αντιφλεγμονώδες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έπειτα από ημισυνθετική σταθεροποίηση τους, οι φουρανικοί αιθυλεστέρες εμφάνισαν ακόμη μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδες δράση.[40]

Ακόμη ένα παράδειγμα απομονωμένου λιπαρού συστατικού είναι η Λυσολεκθίνη. Αυτό το υδρόφιλο φωσφολιπίδιο ανήκει στις φωσφατίδυλοχολίνες και εμφανίζει αντιισταμινική και αντιφλεγμονώδες δράση.[41]

1.4.4 Υδατάνθρακες με βιοδραστικές ιδιότητες

Ανάμεσα στις τρεις κυριότερες κατηγορίες βιοδραστικών μεταβολίτων, η κατηγορία των υδατανθράκων έχει μελετηθεί πολύ λίγο, για αυτόν τον λόγο και η βιβλιογραφία είναι αρκετά περιορισμένη.

Από το μύδι *Crenomytilus grayanus* έχει απομονωθεί η μυτιλάνη, μια βιογλυκάνη με ανοσορυθμιστική δράση. Η μυτιλάνη είναι ένα σύμπλοκο από 95% πολυσακχαρίτη και 5% πρωτεΐνη, συνδεδεμένα μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές δυνάμεις, και εμφανίζει τις ιδιότητες της λεκτίνης. [42]

Σε μία άλλη μελέτη απομονώθηκε ένα γλυκογόνο από το μύδι *P. Canaliticus*, το οποίο εμφανίζει δοσοεξαρτώμενη αντιφλεγμονώδες δράση. [43]

Πρόσφατα, σε μια μελέτη απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ο πολυσακχαρίτης MP-1 από το *M. Coruscus*. Αυτό το μόριο εμφανίζει αναστολή της περοξειδωσης των λιπιδίων, τα οποία εμπλέκονται στην καταστροφή των ιστών κατά την υπατική δυσλειτουργία. Η παρατηρούμενη βιοδραστικότητα του MP-1 δύναται να βρει φαρμακευτικές εφαρμογές και στους ανθρώπους. [44]

1.4.5 Βιοτοξίνες που επιρρεάζουν τα θαλάσσια δίθυρα

Εκτός από τις θεμιτές επιδράσεις που φέρουν τα συστατικά των διθύρων, πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι πιθανές επιβλαβής Βιοτοξίνες που μπορεί να είναι παρούσες. Τα δίθυρα τρέφονται με το φιλτράρισμα του περιβάλλοντος ύδατος. Μπορούν να φιλτράρουν μέχρι και οχτώ λίτρα νερού την ώρα και τρέφονται ξεχωρίζοντας την τροφή όταν το νερό διέρχεται από τα βράγχια του διθύρου. Διαλέγουν τα βρώσιμα σωματίδια, στηριζόμενα στο μέγεθός τους, και απορρίπτουν τα υπόλοιπα πριν εισέρθουν στο πεπτικό σύστημα. Ένα μεγάλο μέρος των βρώσιμων σωματιδίων αποτελείται από ευκαριωτικά μικροάλλη, κυρίως διατομικά και δινωμαστιγιά. Στα θαλάσσια περιβάλλοντα υπάρχει μια μικρή αλλά αρκετά σημαντική ομάδα μικροάλλη, τα λεγόμενα επιβλαβή μικροφύκια (HAB - Harmful Algal Bloom), τα οποία προκαλούν βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό. [45] Τα δίθυρα δεν κάνουν γενικά διακρίσεις στα είδη της άλλη που πέπτουν, έτσι είναι πολύ πιθανό ανάμεσα στα άλλη που καταναλώνουν να πέπτουν και μερικά είδη HAB, τα οποία περιέχουν μόρια τοξικά για τον άνθρωπο.

Οι τοξίνες των HAB έχουν καταταχθεί ανάλογα με την δράση τους στον ανθρώπινο οργανισμό και τα συμπτώματα που προκαλούν, τα οποία συγκροτούν συγκεκριμένα σύνδρομα τροφικής δηλητηρίασης. Έτσι έχουμε:

- Τοξίνες Παραλυτικού Συνδρόμου, (PSP- Paralytic Shellfish Poisons)
- Τοξίνες Συνδρόμου Αμνησίας, (ASP- Amnesic Shellfish Poisons)
- Τοξίνες Διαρροϊκού Συνδρόμου, (DSP- Diarrhetic Shellfish Poisons)
- Τοξίνες Νευρικού Συστήματος, (NSP- Neurotoxic Shellfish Poisons)
- Τοξίνες Συνδρόμου Σιγκουάτερας, (CFP- Ciguatera fish Poisons)
- Τοξίνες Αζασπιροξέων, (AZP- Azaspiracid Shellfish Poisons)

Επιπλέον υπάρχουν είδη τοξινών, τα οποία παρουσιάζουν δυσμενείς οξείες ή χρονιές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Χαρακτηριστικά είναι οι ομάδες των κυκλικών ιμίνων, η ομάδα των πεκτεροτοξίνων (PIX) και των ιεστοτοξίνων (YTX).[46] Σε αυτές τις ομάδες υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός τοξινών που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την δομή, την διαλυτότητα και τον τρόπο δράσης τους. Επιπλέον, στα θαλάσσια δίθυρα εντοπίζετε ένα ευρύ φάσμα μεταβολίτων, λόγω βιοτροποποίησης από ενζυματικές αντιδράσεις. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενειών που προκύπτουν από τις τοξίνες των HAB, είναι οξείας φύσεως, αν και ορισμένα είδη όπως τα ASP, δύναται να προκαλέσουν και χρόνια νοσήματα.

Μέχρι και σήμερα δεν υπάρχει κάποιος πρακτικός τρόπος απομάκρυνσης αυτών των τοξινών από τα θαλάσσια δίθυρα, εκτός του να βιοδιασπαστούν μέσα στο ίδιο το δίθυρο μέσω διάφορων μεταβολικών οδών. Αυτή η διεργασία όμως μπορεί να λάβει από μερικές εβδομάδες μέχρι και μερικούς μήνες, και εξαρτάται από τα επίπεδα των τοξινών και τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Συνοψίζοντας, ο όγκος των παραπροϊόντων ή αποβλήτων που προκύπτουν από τις εταιρίες υδατοκαλλιέργειας, αποτελεί μια πολύ καλή πηγή βιοδραστικών συστατικών για την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής. Ωστόσο υπάρχουν και προκλήσεις όπως η αντιμετώπιση της σταθερότητας τους, της πικρής τους γεύσης, πιθανές αλλεργιογόνες επιδράσεις, όπως επίσης και η απαίτηση διεπιστημονικής γνώσης για την παρασκευή συνταγών κατάλληλων προς βρώση.

1.5 Η *Callista Chione*

Η *Callista chione* (Linnaeus, 1758) ή αλλιώς Γυαλιστερή, ανήκει στην οικογένεια της Veneridae της υπεριοικογένειας Veneroidea, της τάξης των Ετερόδοντων, της ομοταξίας των διθύρων. Συναντάται στον Ατλαντικό ωκεανό και στην Μεσόγειο από την Βόρειο Δυτική Μ. Βρετανία έως το Μαρόκο.



Εξαπλώνεται επίσης στην ανατολική μεσόγειο και κυρίως στις χώρες Αίγυπτος, Λίβανος, Συρία, Ισραήλ, Κύπρος και στην θάλασσα του Μαρμαρά. Κατοικεί στα επιφανειακά στρώματα, αρκετά καθαρής άμμου από 0 έως 128 μέτρα βάθος, ενώ υπάρχουν και αναφορές για τα 215 μέτρα.[47, 48]

Οι περισσότερες από τις μελέτες που αφορούν αυτό το είδος των διθύρων μαλάκιων είναι σχετικές με την ανάπτυξή τους.[49] Επίσης, επειδή η *C.chione* είναι ένα εμπορεύσιμο είδος, μεγάλο μέρος των ερευνών που διεξήχθησαν στα ύδατα της Μεσογείου, έχουν σχέση με την παρακολούθηση των μολύνσεων από πρωτόζωα [50] και βαρέα μέταλλα.[51] Τέλος, μερικές μελέτες ασχολήθηκαν με το μέγεθος και το σχεδιασμό που κάδου βυθοκόρησης (dredge) και την επίδρασή του στο μέγεθος των ατόμων που συλλέχθηκε, καθώς και στην ζημιά που προκλήθηκε κατά την συλλογή τους.[52]

Η Γυαλιστερή είναι οικονομικά σημαντική στις χώρες Γαλλία, Πορτογαλία, Ισπανία και Ιταλία, και αποτελεί μεγάλο μέρος της αλιείας που πραγματοποιείται με κάδους βυθοκόρησης. Αν και δεν αποτελεί πολύ διαδεδομένο είδος προς πώληση, η *Callista chione* τα τελευταία χρόνια εκμεταλλεύεται ευρέως, ως συνέπεια της υπερεκμετάλλευσης των πιο διαδεδομένων διθύρων *Ensis siliqua*, *Spisula solida*, *Chamelea gallina* και *Venus strialula*.

Παρά το γεγονός ότι η Γυαλιστερή είναι πολύ κοινός «κάτοικος» της αμμώδης Θρακικής θάλασσας, μέχρι και σήμερα δεν υπάρχει κάποιος συστηματικός τρόπος αλιείας κατά μήκος της Δυτικής Μεσογείου. Η συλλογή της γίνεται κυρίως περιστασιακά από δύτες και συνήθως περισυλλέγεται κατά την αλιεία άλλων διθύρων.[49]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Λιπαρά Τροφίμων

Προσπαθώντας να δοθεί ακριβής ορισμός για τα λιπίδια, η W.W.Christie [53] ορίζει τα λιπίδια ως "μια ευρεία ποικιλία φυσικών προϊόντων, όπως τα λιπαρά οξέα και τα παράγωγα τους, τα στεροειδή, τα τερπένια, τα καροτενοειδή και τα χολικά οξέα, τα οποία διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες, όπως διαιθυλαιθέρα, εξάνιο, βενζόλιο, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη". Αντίστοιχα ο M. Kates [54] αναφέρει ως λιπίδια " Τα μόρια που είναι (α) αδιάλυτα στο νερό, (β) διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, όπως χλωροφόρμιο, αιθέρα ή βενζόλιο, (γ) περιέχουν ομάδες υδρογονάνθρακα μακράς αλυσίδας στα μόριά τους και (δ) είναι παρόν ή προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς". Τέλος, σύμφωνα με τους M. I. Gurr και A. T. James [55], τα λιπίδια χαρακτηρίζονται ως " Οι χημικά ετερογενής ομάδες μορίων, που έχουν την κοινή ιδιότητα της αδιαλυτότητας στο νερό, αλλά διαλύονται σε μη-πολικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο, τους υδρογονάνθρακες ή τις αλκοόλες". Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ορισμός για το συνολικό λίπος των τροφίμων που χρησιμοποιείται από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και είναι "Το άθροισμα βάρους των λιπαρών οξέων και του βάρους ενός μορίου τριγλυκεριδίου για κάθε τρία λιπαρά οξέα".[56]

Η ταξινόμηση των λιπιδίων σε κλάσεις είναι δυνατή με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες ή με βάση τη δομή τους. Βασιζόμενοι στις φυσικές τους ιδιότητες έχουμε τα έλαια και τα λίπη, αν σε θερμοκρασία δωματίου βρίσκονται υπό την μορφή υγρού ή στερεού αντίστοιχα. Με βάση την πολικότητα τους έχουμε τα πολικά και ουδέτερα λιπίδια. Τέλος έχουμε τα απαραίτητα και μη απαραίτητα λιπαρά οξέα, αναλόγως της διατροφικής τους σημασίας για τον άνθρωπο.

Με βάση τη δομή τους, τα λιπίδια μπορούν να ταξινομηθούν ως παράγωγα, απλά ή σύνθετα. Τα παράγωγα λιπίδια περιλαμβάνουν τα λιπαρά οξέα και τις αλκοόλες. Τα απλά λιπίδια, συνθέτονται από τα λιπαρά οξέα και τις αλκοόλες. Περιλαμβάνουν τις ακυλγλυκερίνες, τις αιθέρακυλγλυκερίνες, τις στερόλες και τους εστέρες τους, και τέλος τους εστέρες των Κήρων. Τα σύνθετα λιπίδια περιλαμβάνουν τα γλυκεροφωσφολιπίδια (φωσφολιπίδια), τα γλυκερογλυκολιπίδια (γλυκολιπίδια) και τα σφιγγολιπίδια.

2.1 Ονοματολογία

Όσον αφορά την ονοματολογία τους, έχει συσταθεί από την Διεθνή Ένωση Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) και από την Διεθνή Ένωση Βιοχημείας (IUB) κανόνες ονοματολογίας [57-59], ωστόσο αρκετά συχνά χρησιμοποιούνται εμπειρικές ονομασίες για χάριν ευκολίας και τη αποφυγή μακροσκελών χημικών ονομασιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η βιταμίνη K1 που μπορεί περιγραφεί και ως 2-μεθυλ-3-φυτύλιο-1,4-ναυθοκινόνη.

Τα λιπαρά οξέα, κατά IUPAC, ονομάζονται σύμφωνα με τον αριθμό των ανθράκων που συντελούνται. Για παράδειγμα, ένα καρβοξυλικό οξύ με 18 άνθρακες ονομάζεται δεκαοκτανοϊκό οξύ. Στην εικόνα 16 παραθέτονται τα ονόματα των πιο κοινών ανθρακικών αλυσίδων.

Carbon number	Name	Carbon number	Name
1	Methane	19	Nonadecane
2	Ethane	20	Eicosane
3	Propane	21	Henicosane
4	Butane	22	Docosane
5	Pentane	23	Tricosane
6	Hexane	24	Tetracosane
7	Heptane	25	Pentacosane
8	Octane	26	Hexacosane
9	Nonane	27	Heptacosane
10	Decane	28	Octacosane
11	Hendecane	29	Nonacosane
12	Dodecane	30	Triacontane
13	Tridecane	40	Tetracontane
14	Tetradecane	50	Pentacontane
15	Pentadecane	60	Hexacontane
16	Hexadecane	70	Heptcontane
17	Heptadecane	80	Octacontane
18	Octadecane		

Εικ 14: Ονοματολογία ανθρακικών αλυσίδων

Οι διπλοί δεσμοί συμβολίζονται με το Δ, το οποίο αντιπροσωπεύει την απόσταση του διπλού δεσμού από την καρβοξυλομάδα, ενώ η γεωμετρία των διπλών δεσμών ορίζεται με τον cis-trans συμβολισμό. Για την θέση του διπλού δεσμού χρησιμοποιείται ευρέως και ο συμβολισμός ω ή n, ο οποίος αντιπροσωπεύει την απόσταση του διπλού δεσμού από την μεθυλομάδα του λιπαρού οξέως. Στον συμβολισμό αυτό θεωρείται ότι ο δεσμός έχει

γεωμετρία *cis* και ότι στα πολυακόρεστα, ανάμεσα στους διπλούς δεσμούς, μεσολαβεί μια μεθυλομάδα.

Εκτός από την ονοματολογία που έχει προταθεί από την IUPAC, συχνά χρησιμοποιείται η εμπειρική ονοματολογία των λιπαρών οξέων. Η εμπειρική ονοματολογία έχει εισαχθεί με τα χρόνια για ορισμένα λιπαρά οξέα και ορισμένες φορές χρησιμοποιούνται συχνότερα από αυτήν της IUPAC. Παραδείγματος χάριν το ολεϊκό οξύ χρησιμοποιείται πολύ συχνότερα από το *cis* – 9 – οκταδεκανοϊκό οξύ. Τα ονόματα αυτά έχουν προκύψει από το όνομα του ζωικού ή φυτικού οργανισμού στον οποίο έχουν βρεθεί για πρώτη φορά, π.χ. το μυριστικό οξύ έχει ταχτοποιηθεί από το έλαιο των σπόρων της οικογένειας *Myristicaceae*. Στην εικόνα 17 συνοψίζονται η συστηματική, η εμπειρική και η συντομογραφική ονοματολογία των λιπαρών οξέων.

Systematic name	Common name	Shorthand
Methanoic	Formic	1:0
Ethanoic	Acetic	2:0
Propanoic	Propionic	3:0
Butanoic	Butyric	4:0
Pentanoic	Valeric	5:0
Hexanoic	Caproic	6:0
Heptanoic	Enanthic	7:0
Octanoic	Caprylic	8:0
Nonanoic	Pelargonic	9:0
Decanoic	Capric	10:0
Undecanoic	—	11:0
Dodecanoic	Lauric	12:0
Tridecanoic	—	13:0
Tetradecanoic	Myristic	14:0
Pentadecanoic	—	15:0
Hexadecanoic	Palmitic	16:0
Heptadecanoic	Margaric	17:0
Octadecanoic	Stearic	18:0
Nonadecanoic	—	19:0
Eicosanoic	Arachidic	20:0
Docosanoic	Behenic	22:0
Tetracosanoic	Lignoceric	24:0
Hexacosanoic	Cerotic	26:0
Octacosanoic	Montanic	28:0
Tricontanoic	Melissic	30:0
Dotriacontanoic	Lacceroic	32:0

Systematic name	Common name	Shorthand
<i>c</i> -9-Dodecenoic	Lauroleic	12:1 ω 3
<i>c</i> -5-Tetradecenoic	Physeteric	14:1 ω 9
<i>c</i> -9-Tetradecenoic	Myristoleic	14:1 ω 5
<i>c</i> -9-Hexadecenoic	Palmitoleic	16:1 ω 7
<i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13-Hexadecatrenoic	—	16:3 ω 3
<i>c</i> -4, <i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13-Hexadecatetraenoic	—	16:4 ω 3
<i>c</i> -9-Octadecenoic	Oleic	18:1 ω 9
<i>c</i> -11-Octadecenoic	<i>cis</i> -Vaccenic (Asclepic)	18:1 ω 7
<i>t</i> -11-Octadecenoic	Vaccenic	^a
<i>t</i> -9-Octadecenoic	Elaidic	^a
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Octadecadienoic	Linoleic	18:2 ω 6
<i>c</i> -9- <i>t</i> -11-Octadecadienoic acid	Ruminic ^b	^a
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Octadecatrenoic	Linolenic	18:3 ω 3
<i>c</i> -6, <i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Octadecatrenoic	γ -Linolenic	18:3 ω 6
<i>c</i> -6, <i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Octadecatetraenoic	Stearidonic	18:4 ω 3
<i>c</i> -11-Eicosenoic	Gondoic	20:1 ω 9
<i>c</i> -9-Eicosenoic	Gadoleic	20:1 ω 11
<i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14-Eicosatrienoic	Dihomo- γ -linolenic	20:3 ω 6
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11-Eicosatrienoic	Mead's	20:3 ω 9
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14-Eicosatrienoic	Arachidonic	20:4 ω 6
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14, <i>c</i> -17-Eicosapentaenoic	Eicosapentaenoic (EPA)	20:5 ω 3
<i>c</i> -13-Docosenoic	Erucic	22:1 ω 9
<i>c</i> -11-Docosenoic	Cetoleic	22:1 ω 11
<i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13, <i>c</i> -16, <i>c</i> -19-Docosapentaenoic	DPA	22:5 ω 3
<i>c</i> -4, <i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13, <i>c</i> -16, <i>c</i> -19-Docosahexaenoic	DHA	22:6 ω 3
<i>c</i> -15-Tetracosenoic	Nervonic (Selacholeic)	24:1 ω 9

^aShorthand nomenclature cannot be used to name *trans* fatty acids.

^bOne of the conjugated linoleic acid (CLA) isomers.

Εικ 15: Συστηματική, Εμπειρική και Συντομογραφική ονοματολογία των λιπαρών οξέων

2.2 Συστατικά των λιπαρών υλών στα τρόφιμα

2.2.1 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα μπορούν να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, στα κορεσμένα (SFA), στα μονοακόρεστα (MUFA) και στα πολυακόρεστα (PUFA). Το απλούστερο κορεσμένο λιπαρό οξύ είναι το μεθανοϊκό ή μυρμηκικό οξύ. Τα οξέα Μεθανοϊκό, αιθανικό, και προπανοϊκό δεν συναντούνται συνήθως στα φυσικά λίπη γ'αυτό και συχνά παραλείπονται από τους ορισμούς των λιπιδίων, ωστόσο βρίσκονται μη εστεροποιημένα σε πολλά προϊόντα τροφίμων.

Από τα μονοακόρεστα το πιο συχνά εβρισκόμενο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό οξύ (18:01 ω -9), ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 100 μονοακόρεστα λιπαρά οξέα στη φύση. Η πιο κοινή θέση του διπλού δεσμού στα μονοένια είναι η Δ-9.

Ο καλύτερος τρόπος για να περιγραφούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) είναι να συγκαταλεχθούν σε οικογένειες, λόγω του μεταβολισμού τους στον οργανισμό, που επιτρέπει την ενδομετατροπή ενός λιπαρού οξέως σε κάποιο άλλο της ίδιας οικογένειας,

αλλά όχι την μετατροπή του σε κάποιο άλλο διαφορετικής οικογένειας. Από αυτά τα ω-6 και ω-3 λιπαρά οξέα είναι τα πιο πολυσυζητημένα. Η σημαντικότητα των ω-6 λιπαρών οξέων για τον ανθρώπινο οργανισμό έχει γίνει γνωστή από τα τέλη του 1920. Στα σημάδια έλλειψης των ω-6 λιπαρών οξέων από τον οργανισμό περιλαμβάνονται η μειωμένη ανάπτυξη, η αυξημένη απώλεια νερού από την επιδερμίδα, η καθυστέρηση στην επούλωση των πληγών και η διαταραχή στην αναπαραγωγή [60, 61]. Τα ω-3 λιπαρά οξέα αναγνωρίστηκαν ως απαραίτητα για τον οργανισμό πολύ αργότερα από τα ω-6 και περίπου την δεκαετία του '70.

Οι πιο πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στην αναλογία των ω-6 και ω-3 λιπαρών οξέων παρά στην κάθε οικογένεια μεμονωμένα. Έχει βρεθεί ότι υπερβολικά μεγάλες ποσότητες ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και κατά συνέπεια πολύ υψηλή αναλογία ω-6/ω-3, όπως διαπιστώνεται στις Δυτικές διατροφικές συνήθειες σήμερα, συμβάλλει στην παθογένεση πολλών χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων, του καρκίνου και των φλεγμονώδων και αυτοάνοσων νόσων. Αντιθέτως αυξημένες ποσότητες ω-3 λιπαρών και κατά συνέπεια χαμηλή αναλογία ω-6/ω-3, δρουν κατασταλτικά. Συγκεκριμένα αναλογία 4/1 των ω-3/ω-6 λιπαρών οξέων, συνδέεται με μια μείωση της τάξεως του 70% στη συνολική θνησιμότητα. Αναλογία 2-3/1 καταστέλλει την φλεγμονή σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, ενώ αναλογία 5/1 έχει ευεργετική επίδραση σε ασθενείς με άσθμα. Αντιθέτως αναλογία 10/1 βρέθηκε να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις.[62] Γενικά, η βέλτιστη δόση ή αναλογία ω-3/ω-6 ποικίλλει από 1/1 έως 4/1 ανάλογα με την ασθένεια που εξετάζεται, δεδομένου ότι πολλές από τις διαδεδομένες χρόνιες ασθένειες του δυτικού πολιτισμού είναι εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες.

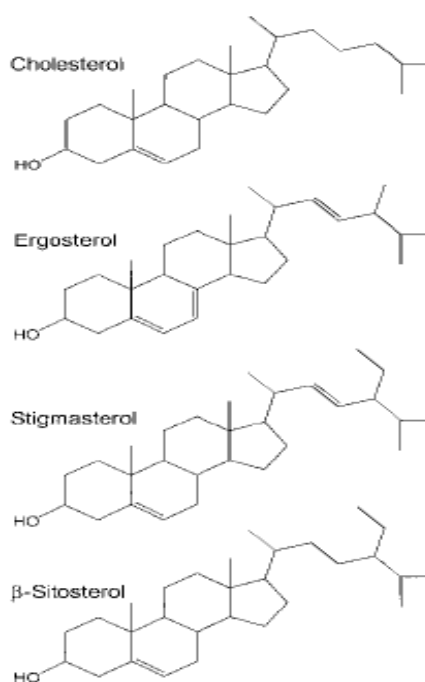
Αναφορικά εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες λιπαρών οξέων στην φύση δύναται να συναντηθούν και trans λιπαρά οξέα, τα οποία προκύπτουν κυρίως από βακτήρια και υδρογόνωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Εξίσου σημαντικά αλλά λιγότερο διαδεδομένα είναι τα Ακετυλενικά, Διακλαδούμενα, Κυκλικά, Ύδροξυ, Έποξυ και Φουρανικά λιπαρά οξέα.

2.2.2 Ακυλγλυκερόλες

Οι ακυλγλυκερόλες είναι το κυρίαρχο συστατικό των ελαίων και λιπών εμπορικής σημασίας. Η γλυκερόλη δύναται να εστεροποιηθεί με ένα, δύο, ή και τρία λιπαρά οξέα, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα την ορολογία μονοακυλογλυκερόλες, διακυλογλυκερόλες, τριακυλογλυκερόλες ή μονο-, δι-και τριγλυκερίδια.

2.2.3 Στερόλες και Στερολικοί Εστέρες

Τα στεροειδή είναι μια κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιλαμβάνει τις στερόλες, ενώσεις εξαιρετικής σημασίας στη χημεία των λιπιδίων και των τροφίμων. Ο ακόλουθος ορισμός έχει προταθεί από τους W.R. Nes και M.L. McKean [63]: " Κάθε υδροξυλιωμένο στεροειδές που διατηρεί μερικά ή όλα από τα άτομα άνθρακα του σκουαλενίου στην πλευρική αλυσίδα του όταν αναταράσσεται με ίσους όγκους αιθέρος και ύδατος" . Έτσι, σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό, οι στερόλες θεωρούνται υποσύνολο των στεροειδών, αποκλείοντας τις στεροειδείς ορμόνες και τα χολικά οξέα. Οι στερόλες μπορούν να προέρχονται από το φυτικές ή ζωικές πηγές και ονομάζονται φυτοστερόλες ή ζωοστερόλες αντίστοιχα. Η κυρίαρχη ζωοστερόλη είναι η χοληστερόλη, γνωστή για την σημασία της στην λειτουργία των κυττάρων καθώς και στην διατροφή[64, 65]. Αντίστοιχα στις φυτοστερόλες υπάρχει μια πλειάδα στερολών, για παράδειγμα σε ένα είδος καλαμποκιού (*Zea mays*) έχουν εντοπιστεί 65 διαφορετικές στερόλες [66]. Μερικές από τις σημαντικότερες στερόλες των τροφίμων παρουσιάζονται στην Εικόνα 18. Πιστεύεται ότι οι φυτοστερόλες, λόγω της δομικής ομοιότητας με την Χοληστερόλη, αναστέλλουν την εντερική απορρόφηση μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της χοληστερόλης και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) στο πλάσμα του αίματος.[67, 68] Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαιτητικές φυτοστερόλες μπορεί να προστατεύουν από την εμφάνιση καρκίνου.[69, 70]



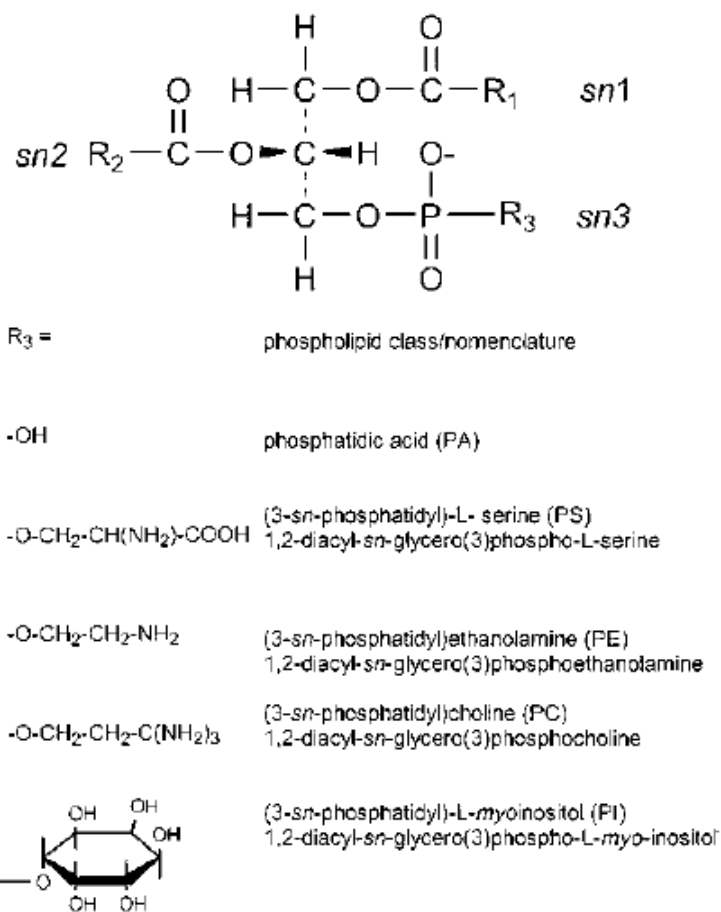
Εικ 16: Κύριες Στερόλες

2.2.4 Κήροι

Οι κηροί είναι εστέρες λιπαρών οξέων και μακράς αλυσίδας αλκοολών. Οι απλοί κήροι είναι εστέρες λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας (16:0, 18:0, 18:1ω9) και μακράς αλυσίδας αλειφατικών αλκοολών, ενώ οι σύνθετοι σχηματίζονται από διόλες ή οξέα αλκοολών. Βρίσκονται στην επιφάνεια των ζώων, των φυτών και των εντόμων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της απώλειας ύδατος. Στα τρόφιμα οι σημαντικότεροι κηροί, που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα, είναι το κερύ των μελισσών, του φυτού Κανδελίλλα και του φοίνικα Καρναούμπα.

2.2.5 Φωσφογλυκερίδια ή Φωσφολιπίδια

Τα φωσφογλυκερίδια αποτελούνται από γλυκερίνη, λιπαρά οξέα, φωσφορικό, και συνήθως μια οργανική βάση. Μερικές συνηθισμένες δομές φωσφογλυκεριδίων και η ονοματολογία τους παρουσιάζονται στην Εικ.20.



Εικ 17: δομές φωσφογλυκεριδίων και η ονοματολογία

2.2.6 Αιθερ (φώσφο) γλυκερίδια ή Πλασμαλογόνα

Τα πλασμαλογόνα σχηματίζονται όταν ένας βινύλιο-αιθερικός δεσμός σχηματίζεται σε ένα φωσφολιπίδιο ή μια ακυλγλυκερίνη. Οι 1-αλκενυλ-2,3-διακυλγλυκερίνες ονομάζονται ουδέτερα πλασμαλογόνα..

2.2.7 Γλυκερογλυκολιπίδια ή Γλυκοζυλγλυκολιπίδια

Τα γλυκερογλυκολιπίδια ή γλυκολιπίδια σχηματίζονται όταν ένα μόριο γλυκερόλης είναι συνδεδεμένο μέσω της θέσης sn-3 με ένα μόριο υδατάνθρακα. Ο υδατάνθρακας είναι συνήθως ένας μονο- ή δισακχαρίτης, και λιγότερο συχνά ένα τρι-ή τετρασακχαρίτης. Η Γαλακτόζη είναι το πιο κοινό μόριο υδατάνθρακα σε φυτικά γλυκερογλυκολιπίδια.

2.2.8 Σφιγγολιπίδια

Τα γλυκοσφιγγολιπίδια είναι μια κατηγορία λιπιδίων που περιέχουν μακριές αλειφατικές αλυσίδες (βάση), λιπαρά οξέα, και διάφορες άλλες ενώσεις, όπως φωσφορικό οξύ και μονοσακχαρίτες. Αν και έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 50 βάσεις, η πιο συνηθισμένη είναι η σφιγγοσίνη,. τα κεραμίδια αποτελούνται από σφιγγοσίνη και ένα λιπαρό οξύ. Η σφιγγομυελίνη είναι ένα παράδειγμα σφιγγοφωσφολιπιδίου. Τα λιπίδια αυτά είναι συναντούνται στις κυτταρικές μεμβράνες και τον εγκέφαλο, και δρουν ως αντιγονικές θέσεις επί των κυτταρικών επιφανειών.

2.3 Λιπαρά οξέα δίθυρων

Τα δίθυρα, με εξαίρεση τα Σκαλοπίνια που έχουν την ιδιότητα να κολυμπούν, παραμένουν για όλη τους την ζωή σε μία τοποθεσία. Έτσι τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για την επιβίωση τους προκύπτουν κυρίως από την κατανάλωση των περιβάλλοντων φυτοπλαγκτόν. Η διατροφική αξία των μικροάλγων για τα δίθυρα καθορίζεται από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα που περιέχουν και συγκεκριμένα το Εικοσαπεντενοϊκό οξύ (EPA) 20:5 ω-3 και το Δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) 22:6 ω-3. Τα πολυακόρεστα αυτά λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα διότι τα περισσότερα είδη διθύρων δεν μπορούν να τα παράγουν από μικρότερες πρόδρομες ενώσεις.

Εκτός από την εμπορική τους αξία και την χρησιμότητά τους ως τροφή για διάφορα οστρακόδερμα, τα δίθυρα είναι επίσης πολύ σημαντικά καθώς περιέχουν σημαντικές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, θεωρούνται έτσι σημαντικά για την δομή, την δυναμική και τον έλεγχο των βιολογικών λειτουργιών, που σχετίζονται με τις κυτταρικές μεμβράνες. Επιδημιολογικές, κλινικές και διατροφικές έρευνες έχουν αναδείξει ότι κατανάλωση θαλασσινών επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην πρόληψη και αντιμετώπιση κλινικών διαταραχών, συμπεριλαμβανόμενων καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη, αρθρίτιδα, άσθμα, κατάθλιψη, παχυσαρκίας και ορισμένων τύπου καρκίνου. [71-75]

Εξετάζοντας την σύσταση των λιπαρών οξέων στα πιο εμπορεύσιμα γένη διθύρων, όπως Μύδια [76], Στρείδια [77], Σκαλοπίνια[78], Γυαλιστερές[79] και hard clam[80], παρατηρείται αρχικά οι αναλογίες των ακόρεστων (SFA), μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων, με τα πολυακόρεστα να κυριαρχούν, ακολουθούμενα από τα ακόρεστα και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

2.4 Καροτενοειδή στα θαλάσσια δίθυρα

Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα κίτρινων και πορτοκαλόχρωων λιποδιαλυτών χρωστικών πολύ διαδεδομένων στην φύση. Βρίσκονται στα φύλλα φυτών, όπου η παρουσία της χλωροφύλλης σκεπάζει συνήθως το κόκκινο ή το κίτρινο χρώμα, καθώς και σε μεγάλο αριθμό φρούτων. Επίσης, βρίσκονται στα καρότα, τις γλυκοπατάτες και σε πολλά κίτρινα, κόκκινα και πορτοκαλί λουλούδια.

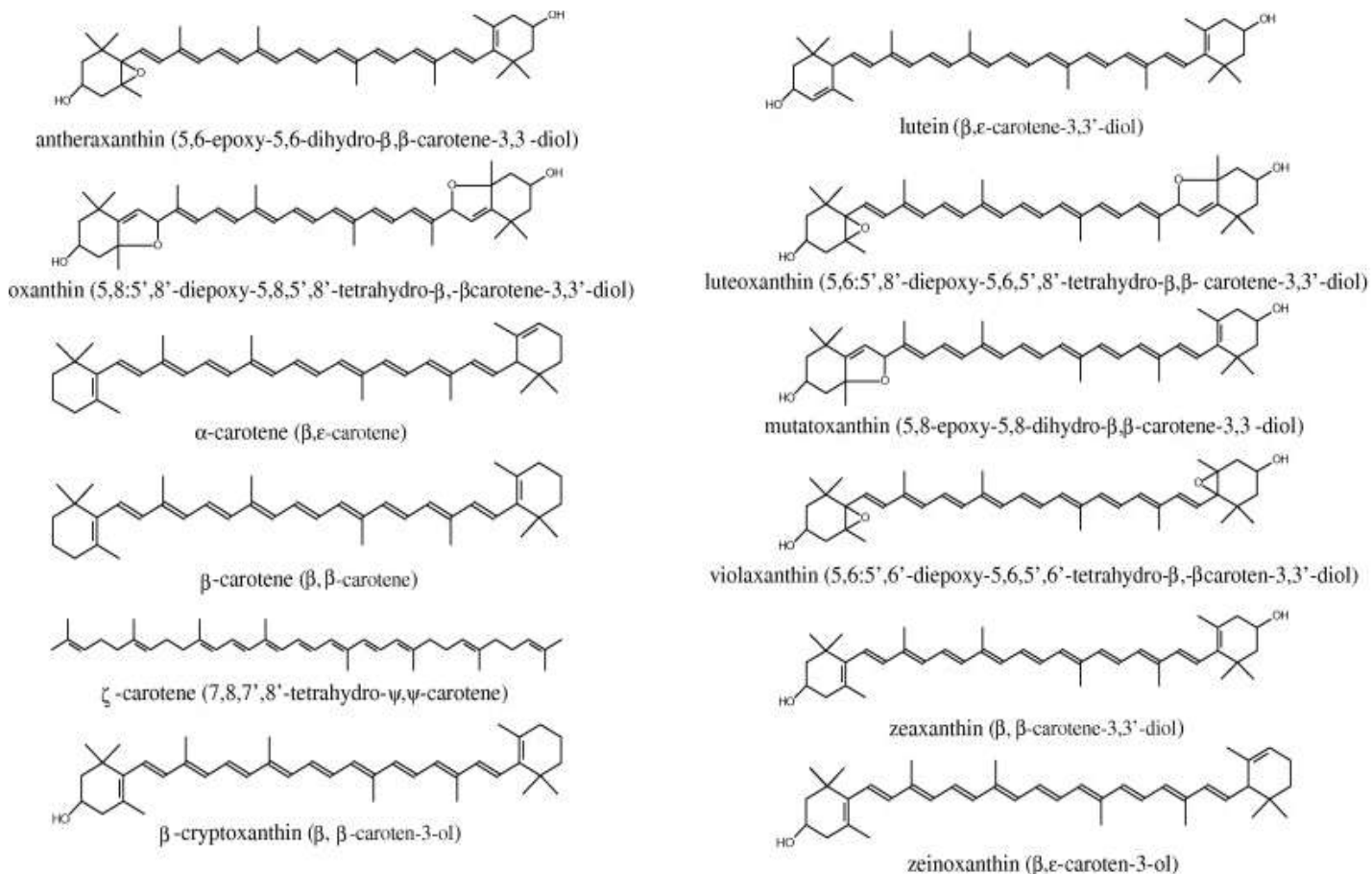
Αν και η συνηθέστερη πηγή καροτενοειδών αποτελούν τα φυτά, αυτά συναντώνται και στην πανίδα σε μικροποσότητες. Τα καροτενοειδή δεν συντίθενται στα ζώα αλλά προσλαμβάνονται από την διατροφή τους και μεταφέρονται στα λιπίδια του αίματος, του γάλακτος, των αυγών καθώς και στο αποθεματικό λίπος. Αξίζει να σημειωθεί ότι λιγότερο από το 10% των καροτενοειδών λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις για την βιταμίνη Α στα θηλαστικά όπως επίσης ότι ο προσδιορισμός των επιπέδων τους στους ιστούς αντικατοπτρίζει τις διατροφικές επιλογές ενός ατόμου.

Τα καροτενοειδή αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές ομάδες φυσικών χρωστικών εξαιτίας της δομικής ποικιλομορφίας και των πολυάριθμων λειτουργιών τους. Η χαρακτηριστική δομή, προσδίδει σε αυτά ξεχωριστές ιδιότητες που αποτελούν την βάση για τα διάφορες βιολογικές δράσεις σε όλους τους οργανισμούς.

2.4.1 Χημική δομή και κατάταξη καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή αποτελούνται από 8 ομάδες ισοπρενίου, δηλαδή από 40 άτομα άνθρακα, με εξαίρεση καροτενοειδή που έχουν βρεθεί σε μερικά είδη βακτηρίων όπου έχουν μεγαλύτερη αλυσίδα. Διακρίνονται στα καροτένια και στα υδροξυλιωμένα παράγωγα τους, που ονομάζονται ξανθοφύλλες. Στα άκρα των καροτενοειδών ενώσεων υπάρχουν κυκλικές ομάδες, κυκλοεξάνια ή κυκλοπεντάνια και μπορούν να πάρουν cis ή trans γεωμετρικές δομές. Μπορούν να μετατραπούν από την μια γεωμετρική δομή στην άλλη με την επίδραση ακτινοβολίας, θερμότητας ή χημικής επεξεργασίας. Η ισομερής μορφή καθορίζει το σχήμα του μορίου και τις ιδιότητες που, όπως την διαλυτότητα και την απορροφητικότητα. Οι trans μορφές εμφανίζονται πιο άκαμπτες και έχουν μεγαλύτερη τάση να κρυσταλλώνουν ή να συσσωματώνονται, ως εκ τούτου οι cis μορφές μπορούν να απορροφούνται και να μεταφέρονται ευκολότερα.

Μια άλλη κατηγορία καροτενοειδών έχει το οξυγόνο σε καρβονυλική ή καρβοξυλική ομάδα και δύναται να έχουν αριθμό ανθράκων μικρότερο του 40. Αυτό συμβαίνει στην κροκετίνη, χρωστική που απαντά στον κρόκο του αυγού. Συγγενής στην κροκετίνη είναι η κροκίνη, στην οποία τα καρβοξύλια είναι οστεοποιημένα με το σάκχαρο γεντιοβιόζη.



Εικόνα 18: Δομές καροτενοειδών

Σε γενικές γραμμές, τα καροτενοειδή είναι υδρόφοβα μόρια και είναι διαλυτά μόνο σε οργανικούς διαλύτες. Η προσθήκη των ομάδων υδροξυλίου στις τελικές ομάδες προκαλεί αύξηση της πολικότητας του καροτενοειδούς, η οποία επηρεάζει τη διαλυτότητα του στους διάφορους οργανικούς διαλύτες. Κατά την κατεργασία φρούτων και λαχανικών, λόγω της δυσδιαλυτότητας τους οι απώλειες στο νερό είναι μικρές. Υφίσταται όμως αυτοξειδωσις γι'αυτό και οι σημαντικότερες απώλειες παρατηρούνται κατά την ξήρανση. Τα καροτενοειδή υφίστανται επίσης συζευγμένη αυτοξειδωσις με τα λιπίδια και είναι γενικά πιο σταθερά παρουσία πολυακόρεστων οξέων, πιθανόν γιατί τα λιπίδια δέχονται πιο εύκολα τις ελεύθερες ρίζες. Τέλος μπορούν να δράσουν ως προοξειδωτικά ή αντιοξειδωτικά, ανάλογα με το σύστημα στο οποίο επιδρούν.

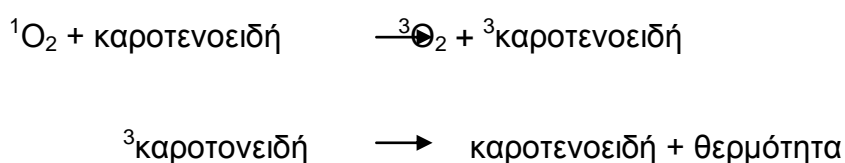
2.4.2 Βιολογικές δράσεις καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης Α και πρόσφατα έχει μελετηθεί ο ρόλος τους στην πρόληψη και προστασία έναντι παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και ο καταρράκτης[81, 82].

Άλλες βιολογικές λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στα καροτενοειδή είναι η διέγερση της ανοσολογικής απάντησης[81], διαφοροποίηση των κυττάρων και ρύθμιση του πολλαπλασιασμού τους, διέγερση της κυτταρικής επικοινωνίας και τέλος ρύθμιση του καρκινικού μεταβολισμού.

Σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όπως τα φυτά, τα καροτενοειδή είναι γνωστό ότι ασκούν λειτουργικό ρόλο εξαιτίας της ικανότητάς τους να μεταφέρουν ενέργεια κατά τη φωτοσύνθεση. Η παραπάνω λειτουργία αποσκοπεί στην προστασία των κυττάρων και των ιστών από βλάβες που σχετίζονται με φωτοχημικές αντιδράσεις, όπως η προκαλούμενη από το φως οξειδωση της χλωροφύλλης καθώς και άλλων μορίων στα φυτά και στους μικροοργανισμούς[83].

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι λειτουργίας των καροτενοειδών ως αντιοξειδωτικά. Ο πρώτος από αυτούς περιγράφει σαφώς την ικανότητα τους να απαλείφουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Οι ελεύθερες ρίζες είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνες για την οξειδωση νουκλεϊκών οξέων, αμινοξέων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η γενική αρχή της αντίδρασης των καροτενοειδών με ρίζες οξυγόνου είναι:



Λόγο της φύσης τους τα πολυενικά μόρια χάνουν το πλεόνασμα της ενέργειάς τους ενώ βρίσκονται σε κατάσταση διέγερσης (3 καροτενοειδή), μέσω δονήσεων και περιστροφικών αλληλεπιδράσεων με τον διαλύτη, επαναφέροντας το καροτενοειδές στην αρχική του κατάσταση, ώστε να είναι διαθέσιμο για νέο κύκλο αντιδράσεων. Εκτιμάται ότι κάθε μόριο καροτενοειδούς μπορεί να εξουδετερώσει περίπου χίλια μόρια ρίζας οξυγόνου, πριν αλληλεπιδράσουν και παράγουν προϊόντα όπως καρβονύλια και εποξειδία. Αξιοσημείωτη

είναι και η ικανότητα των καροτενοειδών να παρεμβαίνουν σε αντιδράσεις οξειδωσης όπως π.χ. στα στάδια έναρξης της οξειδωσης των λιπών.

Η λήψη καροτενοειδών επηρεάζει τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως αναστολή ανάπτυξης καρκινικών σειρών, αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε βακτήρια, επιδράσεις στην γενοτοξικότητα, επιδράσεις στην κακοήγη εξαλλαγή, επιδράσεις στην κυτταρική επικοινωνία κ.α.

Τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών ερευνών που υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο των καροτενοειδών στην πρόληψη χρόνιων νοσημάτων δεν είναι απόλυτα συνεπή. Αυτό οφείλετε στις διαφορές των πληθυσμιακών μελετών και στον σχεδιασμό των μεθόδων μελέτης που καθορίζουν την έκθεση στα συστατικά και την έκβαση της νόσου. Η υπόθεση ότι αυτές οι αντιοξειδωτικές ουσίες προστατεύουν από διάφορες ασθένειες είναι ωστόσο βάσιμη δεδομένου του ρόλου των οξειδωτικών βλαβών στην αιτιοπαθογένεια των συγκεκριμένων νόσων.

Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι μια δίαιτα πλούσια σε φρούτα και λαχανικά εμφανίζεται ευεργετική, ακίνδυνη και εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών συστατικών όπως τα καροτενοειδή. Οι δίαιτες που είναι πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο θανάτου από καρκίνο και καρδιαγγειακά νοσήματα[84]. Αν και αρκετές βάσεις δεδομένων παρέχουν εκτιμήσεις της ημερήσιας πρόσληψης καροτενοειδών, οι τιμές τους αυτές διαφέρουν σημαντικά λόγω της ευαισθησίας και της ειδικότητας των διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αυτών των φυτοχημικών [85].

2.4.3 Πηγές καροτενοειδών [84, 85]

Αν και τα καροτενοειδή περιέχονται σε πολλά τρόφιμα, τα έντονα χρωματιστά φρούτα και λαχανικά αποτελούν τις κυριότερες πηγές τους. Αναλυτικότερα αναφέρεται ότι το λυκοπένιο αποτελεί την κύρια χρωστική σε φρούτα με κόκκινη σάρκα, στην τομάτα, το καρπούζι, την παπάζια και το γκουάβα, και στο ροζ ή κόκκινο γκρέιπφρουτ.

Το ζ-καροτένιο συνήθως συναντάται παντού αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η φυτοΐνη και η φυτοφλουΐνη πιθανόν να είναι ευρύτερα διαδεδομένες από ότι αναγράφεται. Καθότι είναι άχρωμες και η παρουσία τους αγνοείται πολλές φορές.

Το Δικυκλικό β-καροτένιο είναι το πιο διαδεδομένο στα τρόφιμα όπου συνοδεύεται από το α- και γ- καροτένιο σε μικρότερες όμως συγκεντρώσεις. Το α-καροτένιο συναντάται σε

μεγάλες συγκεντρώσεις στο καρότο και σε κάποιες ποικιλίες κολοκύθας. Λιγότερο συχνά συναντάται το δ-καροτένιο.

Τα υδροξυ παράγωγα του λυκοπενίου, η λυκοξανθίνη και η λυκοφίλλη, απαντώνται σπάνια και σε μικρές ποσότητες στην τομάτα. Η ρουμπιξανθίνη παράγεται από το γ-καροτένιο και είναι η κύρια χρωστική των rose hips. Οι ξανθοφύλλες α-κρυπτοξανθίνη και ζεινοξανθίνη είναι ευρέως διαδεδομένα καροτενοειδή σε χαμηλές όμως συγκεντρώσεις. Η β-κρυπτοξανθίνη αποτελεί χρωστική πολλών φρούτων με πορτοκαλί σάρκες αλλά εμφανίζεται και ως δευτερεύουσα χρωστική ουσία.

Η λουτεΐνη υπάρχει σε φυτικούς ιστούς σε μεγαλύτερα επίπεδα από την Ζεαξανθίνη, και είναι το κυρίαρχο καροτενοειδές στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και στα κίτρινα λουλούδια. Η Ζεαξανθίνη βρίσκεται σε σημαντικές συγκεντρώσεις μόνο στο καλαμπόκι, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η Ζεαξανθίνη μετατρέπεται εύκολα σε βιολαξανθίνη.

Η ύπαρξη ασυνήθιστων καροτενοειδών έχει επίσης αναφερθεί. Σημαντικά παραδείγματα αποτελούν η καψανθίνη και η καφαρουμπίνη, η κυριότερη χρωστική του κόκκινου πιπεριού. Άλλα κλασσικά παραδείγματα μοναδικών καροτενοειδών είναι η μπιξίνη, η κύρια χρωστική του anatto και η κροκετίνη το κύριο χρωμοφόρο συστατικό του σαφράν. Αν και τα πράσινα φύλλα περιέχουν και μη εστεροποιημένα υδροξυ-καροτενοειδή τα περισσότερα καροτένια σε ώριμα φρούτα εστεροποιούνται με λιπαρά οξέα. Η Ασταξανθίνη είναι το κύριο καροτενοειδές των ψαριών, σολομου και πέστροφας, και των περισσότερων καρκινοειδών (γαρίδες, αστακοί, καβούρι).

Πολλά από τα καροτενοειδή που βρίσκονται σε φυσικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται και ως χρωστικές τροφίμων. Έκτος από τα φυσικά καροτενοειδή χρησιμοποιούνται και συνθετικά για την χρώση των τροφίμων, όπως το β-καροτενιο με κίτρινο έως πορτοκαλί χρώμα και η β-άρο-8-καροτενάλη με πορτοκαλί έως κόκκινο χρώμα.

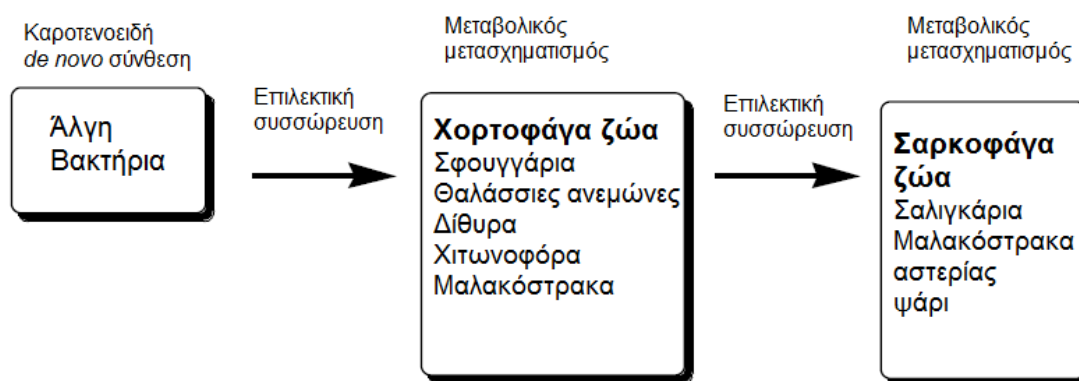
Τα τρόφιμα στα οποία χρησιμοποιούνται τα καροτενοειδή ως χρωστικές είναι κυρίως λιπαρές ύλες, και η πρώτη ύλη είναι διαλυμένη σε έλαιο. Η αραίωση του διαλύματος είναι πολύ μικρή γιατί έτσι εξασφαλίζεται σταθερότητα έναντι οξειδωσης. Η νομοθεσία που καλύπτει την χρώση των τροφίμων από μίγματα καροτενοειδών είναι η οδηγία 2004/47/EK της επιτροπής της 16^{ης} Απριλίου 2004.

2.4.4 Καροτενοειδή στα δίθουρα

Από την εποχή που έχει ανακαλυφθεί η δομή του β-καροτενίου από τους Kuhh και Karrer το 1928, έχουν αναφερθεί περίπου 750 φυσικά καροτενοειδή. Η Βελτίωση των αναλυτικών οργάνων, όπως επίσης και η ανάπτυξη νέων τεχνικών, έχουν καταστήσει δυνατή την διαλεύκανση της δομής μέχρι και των πολύ μικρών καροτενοειδών στη φύση [86].

Η θαλάσσια πανίδα περιέχει διάφορα καροτενοειδή που δείχνουν διαρθρωτική ποικιλομορφία [86]. Μεταξύ των 750 προαναφερθέντων καροτενοειδών που βρίσκονται στη φύση, περισσότερα από 250 είναι θαλάσσιας προέλευσης. Ειδικότερα τα αλλενικά καροτενοειδή, εκτός της Νεοξανθίνης και τα παράγωγά της, όπως επίσης και όλα τα ακετυλενικά καροτενοειδή προέρχονται από τα θαλάσσια φύκη και ζώα.

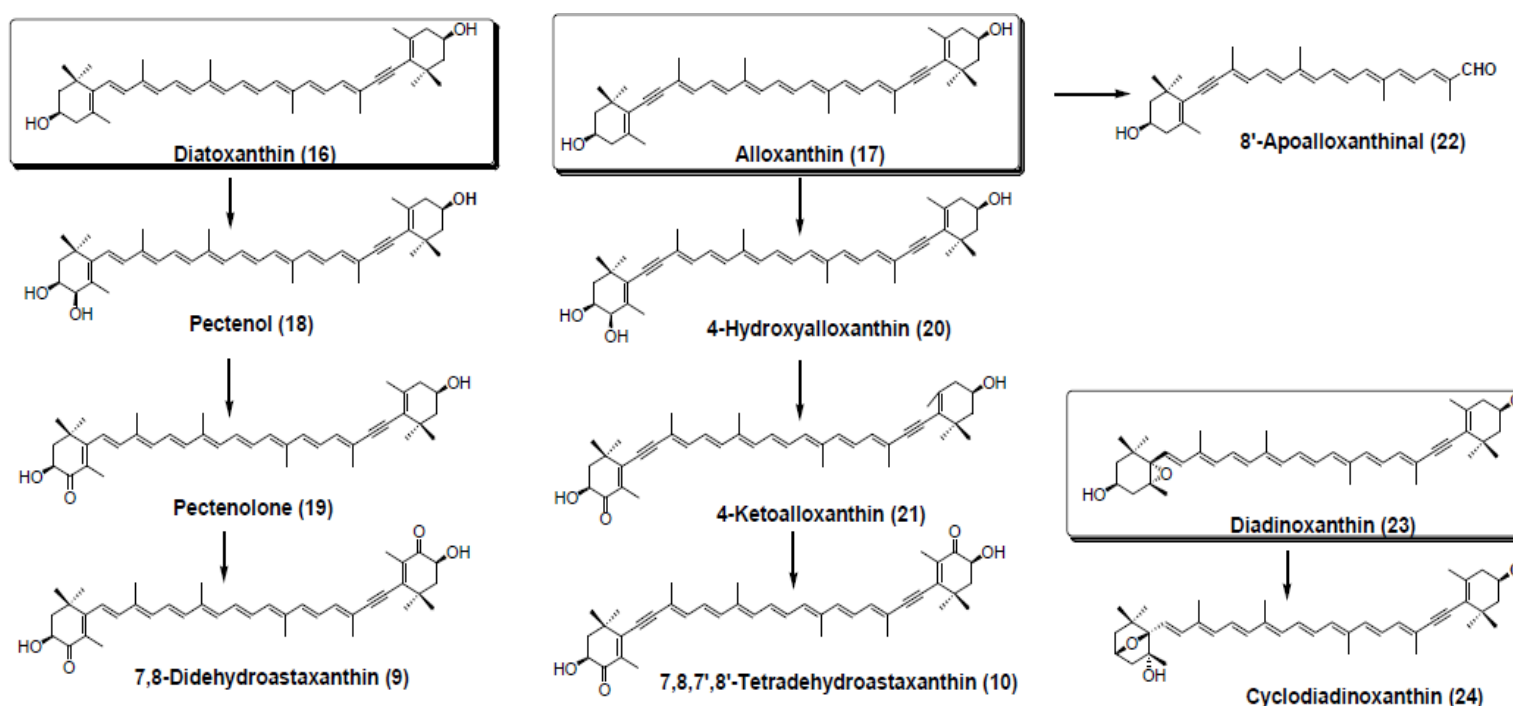
Σε γενικές γραμμές τα ζώα δεν συνθέτουν καροτενοειδή *de novo*, έτσι τα καροτενοειδή που έχουν βρεθεί στην πανίδα είτε έχουν άμεσα συσσωρευτεί από τρόφιμα ή έχουν μερικώς τροποποιηθεί μέσω διάφορων μεταβολικών αντιδράσεων όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. Οι κύριες μεταβολικές οδοί των καροτενοειδών στα ζώα είναι η οξειδωση, η αναγωγή, η οξειδωτική διάσπαση των διπλών δεσμών και η διάσπαση των έποξυ δεσμών.



Σχήμα 3: συσσώρευση και ο μεταβολισμός των καροτενοειδών στην θαλάσσια πανίδα μέσω της τροφικής αλυσίδας

Τα δίθουρα μαλάκια (γυαλιστερές, στρείδια, χτένια, μύδια, κ.λπ.) περιέχουν διάφορα καροτενοειδή που δείχνουν διαρθρωτική ποικιλομορφία. Τα Δίθουρα συσσωρεύουν καροτενοειδή τρέφοντας με μικροάλγη (μικροφύκη) και από μετασχηματισμούς των καροτενοειδών μέσω διάφορων μεταβολικών οδών. Πολλά από τα καροτενοειδή που

εμφανίζονται στα δίθυρα μαλάκια είναι μεταβολίτες των καροτενοειδών Φυκοξανθίνης, Διατοξανθίνης, Διαδινοξανθίνης και Αλλοξανθίνης[87], που προέρχονται από μικροφύκη. Από αυτούς, οι οξειδωτικοί μεταβολίτες της Διατοξανθίνης (16) και της Αλλοξανθίνης (17), όπως η Πεκτενόλη (18), η Πεκτενολόνη (19), η 4-υδροξυαλλοξανθίνη (20) και η 4-κετοαλλοξανθίνη (21), ανιχνεύονται κυρίως σε χτένια και κοχύλια[87]. Η 8'-αποαλλοξανθινάλη (22), η οποία είναι οξειδωτικό προϊόν διάσπασης της Αλλοξανθίνης, ανιχνεύεται επίσης σε δίθυρα μαλάκια [88]. Ένα 3,6-εποξυ παράγωγο της Διάδινοξανθίνης (23), η κυκλοδιαδινοξανθίνη (24), έχει απομονωθεί από το στρείδι [89] (Εικόνα 19).



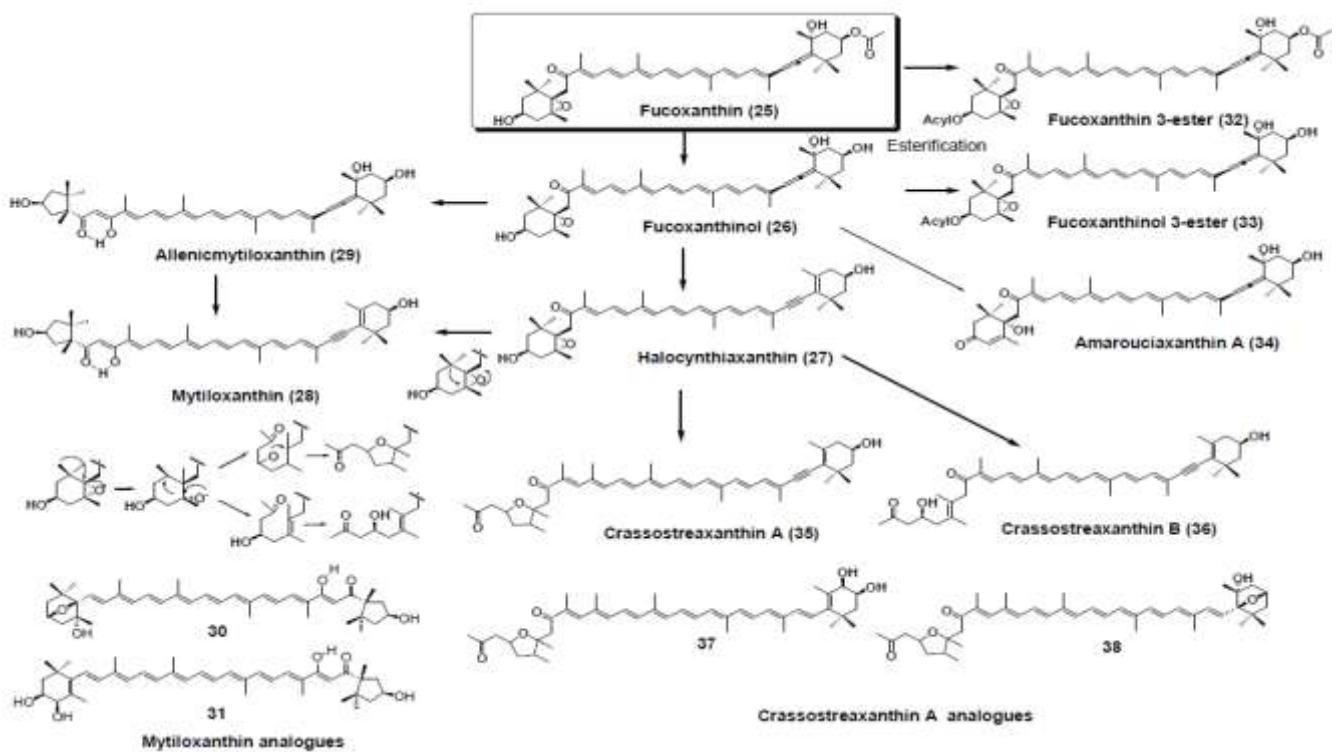
Εικ 19: Μεταβολίτες των καροτενοειδών Διατοξανθίνης, Αλλοξανθίνης και Διαδινοξανθίνης στα δίθυρα

Η Φυκοξανθίνη (25) και οι μεταβολίτες της Φυκοξανθινόλης (26) και της Αλοκυθιαξανθίνης (27) βρίσκονται ευρέως σε στρείδια και μύδια. Η Μυτιλοξανθίνη (28), η οποία έχει μια ομάδα ενόλης στον C-8' στην αλυσίδα πολυενίου και μια 3'-υδροξυ-6'-οξο-κ-τελική ομάδα, είναι ένα χαρακτηριστικό καροτενοειδές στα θαλάσσια μύδια και στρείδια. Επιπλέον, τρία αναλογα της Μυτιλοξανθίνης τα οποία περιέχουν μία αλλενική ομάδα στο τελικό άκρο τους (29), μία 3,6-εποξυ τελική ομάδα (30), και μια 3,4-διυδροξυ-β-τελική ομάδα (31) απομονώθηκαν από το στρείδι [89, 90]. Η ένωση 29, ονομάζεται αλλενική

Μυτιλοξανθίνη και θεωρείτε ότι είναι ένα μεταβολικό ενδιάμεσο από τον μετασχηματισμό της Φυκοξανθινόλης σε Μυτιλοξανθίνη.

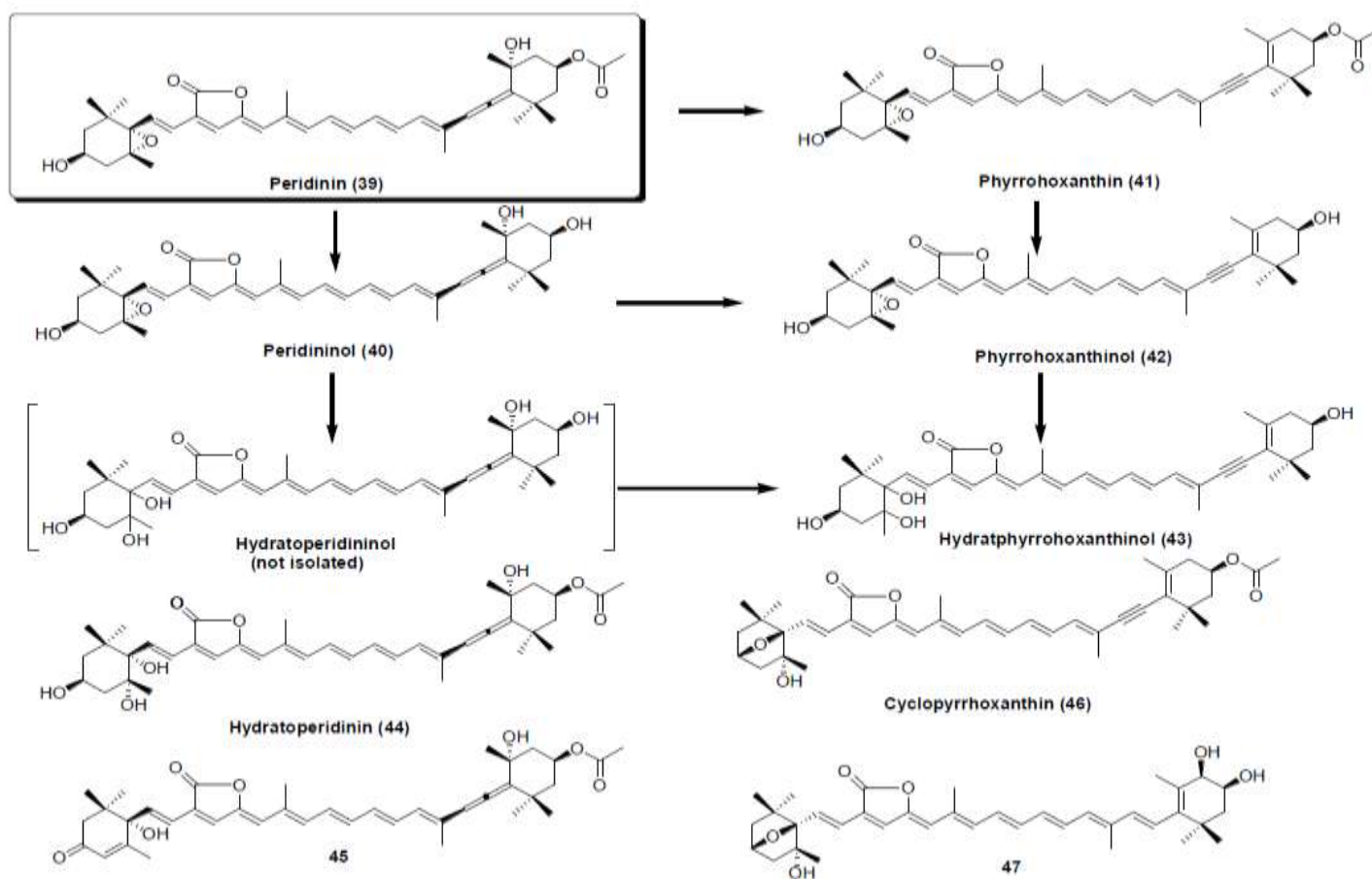
Ορισμένα βρώσιμα μύδια έχουν ένα λαμπρό πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα λόγω της παρουσίας των καροτενοειδών. Ο Φυκοξανθίνη 3-εστέρας (32) και Ο Φυκοξανθινόλη 3-εστέρας (33) βρέθηκαν σε σημαντικές ποσότητες κατά την ανάλυση των καροτενοειδών στα δίθυρα *Macra chinensis* [91], *Ruditapes philippinarum* και *Meretrix petechialis* [92]. Η Αμαρουκιαξανθίνη Α (34) και ο εστέρας της έχουν επίσης αναγνωριστεί ως σημαντικά καροτενοειδή στα *Paphia amabilis* και *Paphia amabilis* [93, 94].

Άλλοι μεταβολίτες της Φυκοξανθίνης, η Κρασσοστρεαξανθίνη Α (35) και η Κρασσοστρεαξανθίνη Β (36), έχουν απομονωθεί από το ιαπωνικό στρείδι *Crassostrea gigas* [95]. Περαιτέρω μελέτες των καροτενοειδών στα θαλάσσια ζώα αποκάλυψαν ότι η Κρασσοστρεαξανθίνη Α, η Κρασσοστρεαξανθίνη Β και τα 3-οξικά τους είναι ευρέως διαδεδομένα στα θαλάσσια δίθυρα [89, 90]. Επιπλέον, τα δύο ανάλογα της Κρασσοστρεαξανθίνης Α, το 37 και το 38, απομονώθηκαν από το στρείδι σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Οι μεταβολικές οδοί της Φυκοξανθίνης στα δίθυρα μαλάκια φαίνεται στην εικόνα 20.



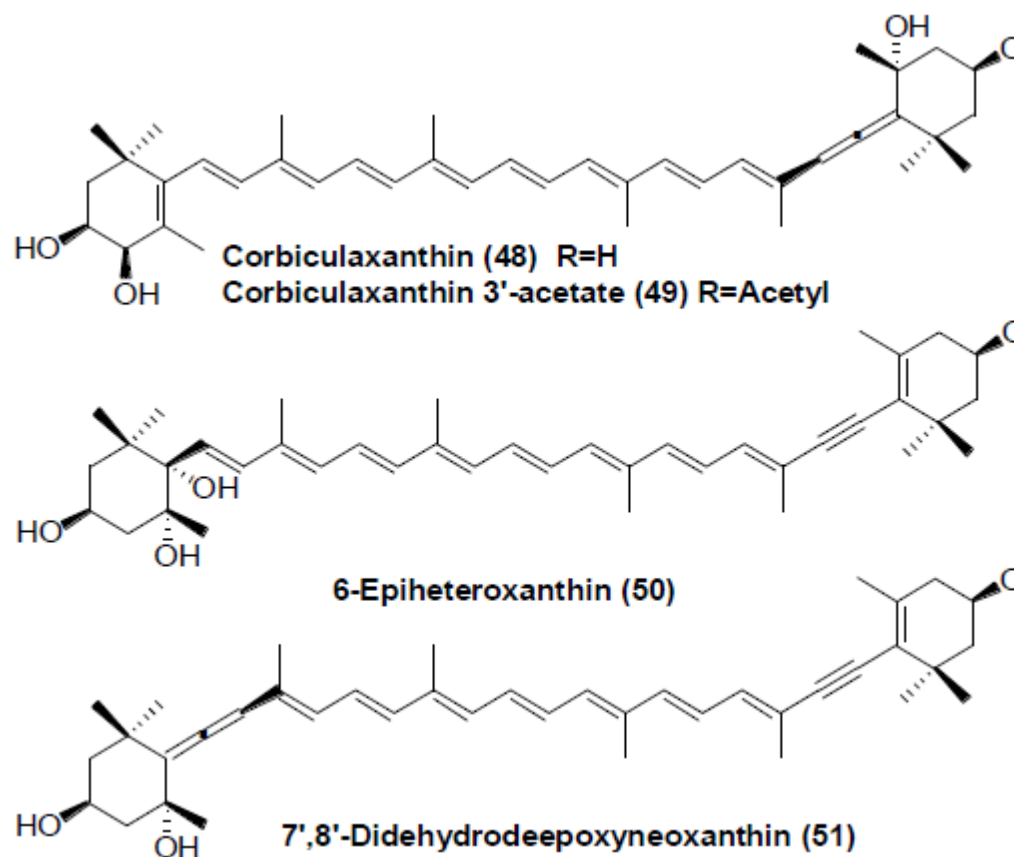
Εικ 20: Οι μεταβολικές οδοί της Φυκοξανθίνης στα δίθυρα μαλάκια

Τα δίθυρα τρέφονται επίσης με δινομαστιγωτά. Η Περιδινίνη (39), ένα χαρακτηριστικό καροτενοειδές των δινομαστιγωτών με σκελετική δομή 37 ανθράκων, και οι μεταβολίτες της (40-43) βρέθηκαν επίσης σε ορισμένα δίθυρα μαλάκια. Πρόσφατα, απομονώθηκαν από τα δίθυρα *Crassostrea gigas*, *Paphia amabilis* [94], και *Corbicula japonica* [93, 96] τέσσερα νέα καροτενοειδή με 37 άνθρακες (44-47). Όπως και στην περίπτωση της Φυκοξανθίνης, οι μεταβολικές μετατροπές της Περιδινίνης στα δίθυρα μαλάκια είναι η υδρόλυση της ομάδας ακετυλίου, η μετατροπή του αλλενικού δεσμού σε ένα ακετυλενικό δεσμό, και η υδρολυτική διάσπαση του έποξυ δακτυλίου όπως φαίνεται στην εικόνα 22.



Εικ 21: Μεταβολικά μονοπάτια της Περιδινίνης στα δίθυρα

Υπάρχουν πολλές αναφορές για τα καροτενοειδή των θαλάσσιων οστρακοειδών, ωστόσο υπάρχουν λίγες εκθέσεις σχετικά με τα καροτενοειδή για τα οστρακοειδή που βρίσκονται σε υφάλμυρο ή γλυκό νερό. Τέσσερα νέα καροτενοειδή, η Κορβικουλαξανθίνη (48), η Κορβικουλαξανθίνη 3-αιθύλιο (49), η 6-Επιετεροξανθίνη (50), και η 7,8-Διυδροεποξυνεοξανθίνη (51), απομονώθηκαν από το υφάλμυρο μύδι *Corbicula japonica* και του γλυκού νερού μαλάκιο *Corbicula Sandai* (εικόνα 23).



Εικ 22: Νέα είδη καροτενοειδών στα μύδια *Corbicula*

Τα καροτενοειδή που βρέθηκαν στα δίθυρα μαλάκια παρέχουν το κλειδί για την κατανόηση της τροφικής αλυσίδας, καθώς και των μεταβολικών μονοπατιών. Η Ασταξανθίνη και οι εστέρες της έχουν βρεθεί σε σημαντικές ποσότητες στα διάφορα είδη χταποδιών και σουπιών, αποτελούνται από τρία οπτικά ισομερή και προήλθαν από τα ζωοπλαγκτόν [97].

2.4.5 Μέθοδοι προσδιορισμού καροτενοειδών [98-101]

Η τάση τα τελευταία χρόνια προς την ανάλυση των καροτενοειδών δεν οφείλεται μόνο στην πρόοδο και στην ανάπτυξη αναλυτικών οργάνων και μεθόδων, αλλά κυρίως στην αντίληψη του ρόλου και των ιδιοτήτων που αποδίδεται σε αυτές τις ενώσεις, οι οποίες ποικίλουν από τον χρωματισμό τους και την ιδιότητα τους ως προβιταμίνη Α έως και την πιθανή προστατευτική δράση τους έναντι των εκφυλιστικών ασθενειών. Ο προσδιορισμός

της συνολικής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή, με την μέθοδο της απορρόφησης στο ορατό δίνει ανεπαρκείς πληροφορίες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο ως εκτίμηση της συνολικής περιεκτικότητας σε χρωστική. Έτσι ήταν απαραίτητο να αναπτυχθούν νέοι τρόποι εργασίας για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών μεμονωμένα, βασιζόμενοι στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και βιοδραστικότητες τους.

Αναλύοντας τα καροτενοειδή μεμονωμένα ωστόσο, είναι εγγενώς δύσκολο λόγω των πολλών παραγόντων που συνδράμουν :

- Υπάρχουν πολλά φυσικά καροτενοειδή. Περισσότεροι από 600 φυσικά καροτενοειδή είναι γνωστά, συμπεριλαμβανομένης της τεράστιας ποικιλίας των καροτενοειδών στα φύκη, στους μύκητες και στα βακτηρίδια. Ο αριθμός των καροτενοειδών που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι πολύ μικρότερος, αλλά η σύνθεση των καροτενοειδών στα τρόφιμα δύναται να είναι πολύ πολύπλοκη.
- Η σύνθεση των καροτενοειδών των τροφίμων ποικίλλει ποιοτικά και ποσοτικά. Έτσι, η αναλυτική διαδικασία πρέπει να προσαρμόζεται στην σύνθεση των καροτενοειδών του εκάστοτε δείγματος τροφίμων.
- Οι συγκεντρώσεις των καροτενοειδών στις τροφές ποικίλει. Ως συνήθως, από ένα έως τέσσερα κύρια καροτενοειδή είναι παρόντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Υπάρχουν επίσης και καροτενοειδή σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή ίχνη, των οποίων ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, και η ποσοτικοποίηση αυτών είναι μια τεράστια πρόκληση για τους αναλυτές των τροφίμων
- Τα καροτενοειδή λόγω της ακορεστότητας τους είναι ευπαθή σε ισομερισμούς και οξειδώσεις, αντιδράσεις που μπορούν εύκολα να συμβούν κατά την διάρκεια της ανάλυσης.

Λόγω αυτών των παραγόντων, ένα σημαντικό κομμάτι των σημερινών δεδομένων για τα καροτενοειδή στα τρόφιμα, εξακολουθούν να είναι αμφίβολα.

2.4.5.1 Προφυλάξεις κατά την ανάλυση των καροτενοειδών[102, 103]

Το κύριο πρόβλημα στην ανάλυση των καροτενοειδών είναι η αστάθεια τους. Έτσι, όποια και αν είναι η αναλυτική μέθοδος που θα επιλεγεί, θα πρέπει να λαμβάνονται προληπτικά μέτρα για την αποφυγή απωλειών. Αυτά περιλαμβάνουν την ολοκλήρωση της ανάλυσης

στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα, τον αποκλεισμό του οξυγόνου, την προστασία από το φως, αποφυγή υψηλής θερμοκρασίας, αποφυγή επαφής με οξέα και χρήση υψηλής καθαρότητας διαλυτών που είναι απαλλαγμένοι από επιβλαβείς προσμίξεις.

Το οξυγόνο, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με το φως και την θερμότητα, είναι ιδιαίτερα καταστροφικό. Η παρουσία ακόμη και ίχνη οξυγόνου στα αποθηκευμένα δείγματα όπως επίσης υπεροξειδίων σε διαλύτες (π.χ., διαιθυλαιθέρα και τετραϋδροφουράνιο), ή οποιοσδήποτε οξειδωτικός παράγοντας ακόμη και σε ακατέργαστα εκχυλίσματα των καροτενοειδών μπορεί να οδηγήσει γρήγορα σε λεύκανση και το σχηματισμό προϊόντων, όπως τα εποξυ καροτενοειδή και τις αποκαροτενάλες. Το οξυγόνο μπορεί να αποκλειστεί σε διάφορα βήματα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης όπως επίσης και κατά την αποθήκευση, με τη χρήση κενού και ατμόσφαιρα αζώτου ή αργού. Διάφορα αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, ιδιαίτερα όταν η ανάλυση είναι παρατεταμένη. Αυτά μπορούν να προστεθούν κατά τη διάρκεια της χώνευσης του δείγματος, της σαπωνοποίησης ή να προστεθούν σε διαλύτες και πρότυπα διαλύματα.

Η έκθεση στο φως, ιδιαίτερα σε άμεσο φως του ήλιου ή την υπεριώδη ακτινοβολία, προκαλεί *trans-cis* φωτοϊσομερισμό και φωτοαποσύνθεση των καροτενοειδών. Έτσι η ανάλυση των καροτενοειδών πρέπει να γίνει με χαμηλό φωτισμό. Οι διάφανες στήλες και τα δοχεία που περιέχουν καροτενοειδή θα πρέπει να είναι τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο και κατά την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας οι δεξαμενές ανάπτυξης θα πρέπει να φυλάσσονται στο σκοτεινό χώρο ή να είναι καλυμμένες με σκούρο ύφασμα ή αλουμινόχαρτο. Η χρήση πολυκαρβονικών ασπίδων στους λαμπτήρες των φώτων στα εργαστήρια, επιτρέπουν την χρήση συνηθισμένου φωτός, απορροφώντας ακτινοβολία από 375-390 nm έως και μικρότερα μήκη κύματος. Ωστόσο, η κάλυψη των φιαλών, στηλών, κλπ., πρέπει να γίνεται όποτε είναι δυνατόν.

Λόγω της ευαισθησίας των καροτενοειδών στην θερμότητα, θέρμανση θα πρέπει να γίνεται μόνο όταν είναι απολύτως απαραίτητο. Τα εκχυλίσματα και κλάσματα των καροτενοειδών θα πρέπει να συλλέγονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασία κάτω των 40 °C, και η εξάτμιση του διαλύτη θα πρέπει να γίνεται με ρεύμα αζώτου ή αργό. Θα πρέπει να αποφεύγεται η εξάτμιση μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα διότι αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση των καροτενοειδών, και ιδιαίτερα του λυκοπένιου [104]. Επιπλέον, μέρος των καροτενοειδών (ειδικά τα περισσότερο πολικά), μπορεί να προσκολληθούν στα γυάλινα τοιχώματα, δυσκολεύοντας την ποσοτική τους απομάκρυνση από την φιάλη.

Τα καροτενοειδή μπορούν να αποσυντεθούν, να αφυδατωθούν ή να ισομεριστούν παρουσία οξέων. Τα 5,6-Εποξυκαροτενοειδή, όπως η Βιολαξανθίνη και η Νεοξανθίνη, μπορούν εύκολα να υποστούν αναδιάταξη προς τα 5,8-εποξειδία τους. Τα περισσότερα καροτενοειδή είναι σταθερά έναντι αλκαλίων. Ένας παράγοντας εξουδετέρωσης (π.χ. ανθρακικό ασβέστιο, ανθρακικό μαγνήσιο ή ανθρακικό νάτριο) μπορεί να προστεθεί κατά τη διάρκεια της εκχύλισης για να εξουδετερώσει τα οξέα που ελευθερώνονται από το τρόφιμο.

Ο Διαιθυλαιθέρας και το τετραϋδροφουράνιο θα πρέπει να ελέγχονται για υπεροξειδία, τα οποία μπορεί να αφαιρεθούν με απόσταξη σε ανηγμένη σκόνη σιδήρου ή υδρίδιο ασβεστίου. Επειδή στο τετραϋδροφουράνιο συσσωρεύονται εύκολα υπεροξειδία, συνήθως σταθεροποιείται με το αντιοξειδωτικό Βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο, αλλά και πάλι υπάρχει ένα χρονικό περιθώριο για τη χρήση του.

Το χλωροφόρμιο πρέπει καλύτερα να αποφεύγεται, διότι είναι δύσκολο να αφαιρεθούν όλα τα ίχνη του υδροχλωρικού οξέος. Επιπλέον, είναι γενικά σταθεροποιημένο με αιθανόλη 1%, η οποία μπορεί

επηρεάσει τις ιδιότητές του ως διαλύτης για την χρωματογραφία. Το Βενζόλιο, αν και είναι εξαιρετικός διαλύτης, θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται λόγω της τοξικότητάς του. Έτσι το χλωροφόρμιο μπορεί να αντικατασταθεί από το διχλωρομεθάνιο και το βενζόλιο από το τολουόλιο.

Τα κλάσματα ή τα εκχυλίσματα θα πρέπει να διατηρούνται ξηρά υπό ατμόσφαιρα αζώτου ή αργού ή θα πρέπει να έχουν διαλυθεί σε έναν διαλύτη, όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας ή το εξάνιο, και να διατηρηθούν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή χαμηλότερα, όταν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα. Αφήνοντας τα καροτενοειδή σε διαλύτες, όπως το κυκλοεξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, τον διαίθυλο αιθέρα ή την ακετόνη, μπορεί να προκληθεί σημαντική αποικοδόμηση.[105]

2.4.5.2 Γενική Διαδικασία Ανάλυσης Καροτενοειδών

Η ανάλυση των καροτενοειδών αποτελείται από τα εξής στάδια:

- δειγματοληψία και προετοιμασία του δείγματος,
- εκχύλιση,
- συλλογή σε διαλύτη συμβατό με το επακόλουθο στάδιο της χρωματογραφίας,
- σαπωνοποίηση και πλύση,
- συμπύκνωση ή εξάτμιση του διαλύτη,

- χρωματογραφίας διαχωρισμός και
- ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση.

Σφάλματα μπορούν να εισέλθουν σε κάθε ένα από τα παραπάνω στάδια. Οι πιο συνηθισμένες πηγές σφαλμάτων στην ανάλυση των καροτενοειδών είναι: τα δείγματα δεν είναι αντιπροσωπευτικά των παρτίδων των προς ανάλυση τροφίμων, η μη ποσοτική εκχύλιση, η απώλεια των καροτενοειδών κατά την έκλυση με νερό, η μερική ανάκτηση των καροτενοειδών που προσκολλώνται στα τοιχώματα των δοχείων έπειτα όταν το διάλυμα των καροτενοειδών φέρνεται μέχρι ξηρού, ελλιπής χρωματογραφικός διαχωρισμός, λάθος κατά την ταυτοποίηση, λάθη κατά την ποσοτικοποίηση και τους υπολογισμούς και ο ισομερισμός και η οξείδωση των καροτενοειδών κατά την ανάλυση ή την αποθήκευση των δειγμάτων τροφίμων πριν από την ανάλυση.

Η ορθή δειγματοληψία και προετοιμασία του δείγματος, ώστε το προς ανάλυση δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό και ομοιογενές, είναι υψίστης σημασίας. Επιπλέον, τα αποτελέσματα θα πρέπει να συνοδεύονται και πληροφορίες σχετικές με το δείγμα του τροφίμου, όπως η ποικιλία, η εποχή που συλλέχθηκε και η γεωγραφική προέλευση. Τέλος επειδή η συγκέντρωση των καροτενοειδών είναι εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους του δείγματος, οι οποιεσδήποτε αλλαγές στο βάρος των τροφίμων κατά την αποθήκευση μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα.



Εικ 23 : Η δειγματοληψία θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική για τον πληθυσμό που πρέπει να μελετηθεί

Η λυοφιλοποίηση θεωρείται ο πιο κατάλληλος τρόπος για τη διατήρηση βιολογικών δειγμάτων που πρέπει να αποθηκευθούν πριν από την ανάλυση των καροτενοειδών. Ωστόσο, κατά την διάρκεια της επεξεργασίας αυτής λαμβάνει χώρα υποβάθμιση των καροτενοειδών [106], διότι το δείγμα καθίσταται περισσότερο πορώδη, αυξάνοντας έτσι την έκθεση των καροτενοειδών στο οξυγόνο κατά την αποθήκευση.

Για την παρασκευή ενός ομοιογενούς και αντιπροσωπευτικού δείγματος προς ανάλυση και για να διευκολυνθεί η εκχύλιση, τα δείγματα ομογενοποιούνται και θα πρέπει να ακολουθεί αμέσως η εκχύλιση, διότι ο τραυματισμός του ιστού απελευθερώνει ένζυμα (π.χ. λιποξυγενάσες), τα οποία καταλύουν την οξειδωση των καροτενοειδών. Η έκπλυση του δείγματος, η ομογενοποίηση, και η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη συνήθως διεξάγονται ταυτόχρονα.

Μια επιτυχής εκχύλιση θα πρέπει να απελευθερώνει όλα τα καροτενοειδή από τη μήτρα των τροφίμων και να τα φέρει σε διάλυμα χωρίς να προκληθεί κάποιου είδους αλλοίωση. Επειδή τα καροτενοειδή βρίσκονται σε ποικιλία τροφίμων, η διαδικασία εκχύλισης θα πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με το προς ανάλυση δείγμα. Ο διαλύτης που θα επιλεγεί θα πρέπει να εξάγει αποτελεσματικά όλο το φάσμα των καροτενοειδών που υπάρχει στο δείγμα. Τα καροτενοειδή συνήθως προέρχονται από βιολογικά δείγματα, τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι αναμιγνύοντας τα με οργανικό διαλύτη, όπως ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη ή μίγματα αυτών, επιτυγχάνεται η καλύτερη δυνατή διείσδυση του διαλύτη. Η ακετόνη χρησιμοποιείται ευρέως, με την ανάπτυξη όμως την αναλυτικής τεχνικής του HPLC, το τετραϋδροφουράνιο αποτελεί πιο διαδεδομένο διαλύτη εκχύλισης. Τέλος, επειδή οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση θα πρέπει να απομακρυνθούν με εξάτμιση για την παραλαβή των καροτενοειδών, οι διαλύτες θα πρέπει να έχουν χαμηλά σημεία ζέσεως ώστε να αποφευχθεί η παρατεταμένη θέρμανση.

Η σαπωνοποίηση είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για την απομάκρυνση των χλωροφυλλών και των ανεπιθύμητων λιπιδίων, τα οποία παρεμποδίζουν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και συντομεύουν τον χρόνο ζωής της στήλης στην HPLC. Η σαπωνοποίηση υδρολύει τους εστέρες των καροτενόλων, διευκολύνοντας τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση, διότι αναλύονται οι ελεύθερες καροτενόλες έναντι των εστέρων των καροτενόλων, οι οποίοι διαχωρίζονται δύσκολα από μίγμα εστέρων. Ωστόσο, η σαπωνοποίηση παρατείνει το χρόνο της ανάλυσης, και μπορεί να προκαλέσει την αποδόμηση των καροτενοειδών. Η έκταση της αποδόμησης εξαρτάται από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν και είναι μεγαλύτερη όσο

υψηλότερη είναι η συγκέντρωση των αλκαλίων και όσο πιο ζεστή η σαπωνοποίηση[107, 108].

Αν και οι προβιταμίνες Α (α-καροτένιο, β-καροτίνη, γ-καροτίνη και β-κρυπτοξανθίνη) μπορεί να αντισταθούν την σαπωνοποίηση, η λουτεΐνη, η βιολαξανθίνη και άλλα διυδροξυ-, τριυδροξυ- και εποξυκαροτενοειδή μειώνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της σαπωνοποίησης και το μετέπειτα στάδιο της πλύσης [109]. Κατά συνέπεια η σαπωνοποίηση θα πρέπει, να αποφεύγεται κατά την αναλυτική πορεία όποτε είναι δυνατόν.

Κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό ο όγκος που θα εισαχθεί στο χρωματογραφικό σύστημα θα πρέπει να είναι ο μικρότερος δυνατός. Έτσι το διάλυμα των καροτενοειδών, αφού κλασματοποιηθεί το ασαπωνοποιημένο δείγμα ή αφού εκπλυθεί το σαπωνοποιημένο δείγμα, ξηραίνεται με θειικό νάτριο και στη συνέχεια συμπυκνώνεται για την χρωματογραφία ανοιχτής στήλης (OCC) ή εξατμίζεται μέχρι ξηρού ώστε να παραληφθεί από την κινητή φάση ή άλλον κατάλληλο διαλύτη για την χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (HPLC) .



Εικ 24: Αριστερά: Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (HPLC). Δεξιά: Χρωματογραφία ανοιχτής στήλης (OCC)

Στην χρωματογραφική ανάλυση των καροτενοειδών ο βαθμός του διαχωρισμού τους εξαρτάται κυρίως από τις πληροφορίες που επιθυμείται να συλλεχθούν. Έτσι το πλεονέκτημα της HPLC έναντι άλλων χρωματογραφικών μεθόδων γίνεται εμφανή όταν η

ανάλυση έχει ως στόχο τον πλήρη διαχωρισμό σε όλο φάσμα των καροτενοειδών του δείγματος[110].

Τα καροτενοειδή βρίσκονται στη φύση, κυρίως στην πιο σταθερή trans διαμόρφωση τους, αν και κατά τις αναλύσεις εμφανίζονται και μικροποσότητες από τα cis ισομερή τους. Δεδομένου ότι τα cis ισομερή έχουν διαφορετική βιολογική δραστηριότητα από εκείνη των trans ομολόγων τους η αναγκαιότητα του διαχωρισμού, της αναγνώρισης και της ποσοτικοποίησης των ισομερών cis εκτός από τα trans καροτενοειδή έχει αυξηθεί και ιδιαίτερα στα πράσινα λαχανικά και σε θερμικά επεξεργασμένα ή μαγειρεμένα τρόφιμα [111].

Τα δείγματα των τροφίμων περιέχουν συνήθως τόσο το μη πολικά καροτένια και όσο και τις περισσότερες πολικές ξανθοφύλλες. Έτσι όποια και αν είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται, η χρωματογραφική ανάλυση θα πρέπει έχει την ικανότητα να αντιμετωπίσει αυτό το εύρος πολικότητας.

Η χρωματογραφία ανοιχτής στήλης (OCC) είναι η κλασική μέθοδος διαχωρισμού καροτενοειδών και χρησιμοποιείται για την ποσοτική τους ανάλυση. Χρησιμοποιείται επίσης και για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό καροτενοειδών για να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα στη HPLC. Στην OCC δύναται να εφαρμοστεί και χαμηλή πίεση με αδρανές αέριο στην κορυφή της στήλης για την μείωση του χρόνου του διαχωρισμού και ονομάζεται flash χρωματογραφία στήλης. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της OCC είναι η απλή και σχετικά οικονομική στήλη (δηλ., γυάλινη στήλη γεμισμένη με το προσροφητικό υλικό), ωστόσο η επαναληψιμότητα και η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού των καροτενοειδών εξαρτώνται αποκλειστικά από τον αναλυτή, ιδιαίτερα όσον αφορά την συσκευασία της στήλης, την προσαρμογή των όγκων και τις αναλογίες του διαλύτη έκλουσης.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, αν και είναι αποτελεσματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων, δεν είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των καροτενοειδών. Τα καροτενοειδή είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε οξειδωση από τον αέρα όταν προσροφούνται επί της λεπτής στιβάδας. Τέλος η αέρια χρωματογραφία είναι επίσης ακατάλληλη, λόγω της θερμικής αστάθειας και της χαμηλής πιητικότητας των καροτενοειδών.

Η χρωματογραφική συμπεριφορά και το φάσμα απορρόφησης της υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας παρέχουν τις πρώτες πληροφορίες για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών. Τόσο η θέση του μέγιστου απορρόφησης (λ_{max}) και όσο και το σχήμα του φάσματος δίνουν πληροφορίες για το χρωμοφόρο.

Στην HPLC ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιοδίων (photodiode array detector) επιτρέπει την ανάκτηση των φασμάτων ηλεκτρονικά, καθιστώντας πιο εύκολη την χρήση τους. Τα φάσματα που λαμβάνονται, αποθηκεύονται και στη συνέχεια συγκρίνονται με φάσματα προτύπων που είναι αποθηκευμένα στην βιβλιοθήκη του φασματογράφου.

Η ταυτοποίηση των καρτενοειδών που βασίζεται αποκλειστικά στους χρόνους κατακράτησης και στα φάσματα απορρόφησης μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα, διότι οι χρόνοι κατακράτησης είναι δύσκολο να αναπαραχθούν. Παρουσία ακόμη και προτύπων καρτενοειδών η ταυτοποίηση μπορεί να μην είναι αποδεκτή, διότι διαφορετικά καρτενοειδή μπορούν να έχουν τον ίδιο χρόνο συγκράτησης σε ένα δεδομένο χρωματογραφικό σύστημα. Με την ίδια λογική, διαφορετικά καρτενοειδή μπορεί να έχουν την ίδια χρωμοφόρα ομάδα, παρουσιάζοντας έτσι το ίδιο φάσμα απορρόφησης. Για τους παραπάνω λόγους πλέον συνιστάται τα ακόλουθα ελάχιστα κριτήρια που πρέπει να πληρούνται για την ταυτοποίηση των καρτενοειδών:

- το ορατό ή υπεριώδες φάσμα απορρόφησης σε τουλάχιστον δύο διαφορετικούς διαλύτες πρέπει να είναι σε σύμφωνο με το φάσμα του πρότυπου χρωμοφόρου.
- Οι χρωματογραφικές ιδιότητες πρέπει να είναι όμοιες σε δύο διαφορετικά συστήματα, κατά προτίμηση TLC (R_F) και HPLC (T_R) και θα πρέπει να πραγματοποιείται και χρωματογραφία με πρότυπο δείγμα.
- Τέλος θα πρέπει να λαμβάνεται φάσμα από φασματομετρία μάζας (MS), το οποίο δίνει πληροφορίες για την μοριακή μάζα του προς ανάλυση συστατικού.

Η Φασματομετρία μάζας (MS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)[112] χρησιμοποιούνται ευρέως στη ταυτοποίηση των δομών των καρτενοειδών. Η MS έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση δομών διαφόρων καρτενοειδών σε φύκη, μύκητες και βακτήρια. Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί νεότερες τεχνικές ιονισμού στην φασματομετρία, όπως βομβαρδισμός ταχέων ατόμων και χημικού ιονισμού (CI) [113], η πρόσκρουση ηλεκτρονίων εξακολουθεί να είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη τεχνική.



Εικ 25: Αριστερά: Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Δεξιά: Φασματογράφος Μάζας (MS)

Η HPLC-MS [114] εφαρμόζεται στην ανάλυση των καροτενοειδών και θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματική σε δείγματα που προέρχονται από φυσικές πηγές, στα οποία τα καροτενοειδή είναι συνήθως σε ίχνη και μολυσμένα με ενώσεις παρεμβολής. Όταν το MS δεν συνδυάζεται με HPLC, για να περαστούν τα δείγματα στο MS απαιτείται καλός διαχωρισμός και καθαρισμός του δείγματος από OCC ή TLC.

Από την ανάλυση NMR λαμβάνονται οι περισσότερες πληροφορίες και δύναται να αποδειχθεί η δομή ενός καροτενοειδούς, συμπεριλαμβανομένης τη γεωμετρία του και των θέσεων των διπλών δεσμών. Με τις διάφορες βελτιώσεις στην οργανολογία του NMR κατά το παρελθόν, αυτό έχει γίνει ακόμη πιο αποτελεσματικό φασματοσκοπικό εργαλείο για τη διαλεύκανση της δομής των καροτενοειδών, καθώς υπάρχει διαθέσιμη μια πλειάδα δεδομένων $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ χημικών μετατοπίσεων για τα καροτενοειδή. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της δομής του β -μονοεποξυιδίου της κρυπτοξανθίνης στην παπάγια, του *cis*-ισομερούς του β -καροτενίου και του α -καροτένιου, των αποκαροτενοειδών στο φρούτο annatto, των καροτενοειδών της γκουάβα, και τα παράγωγα της κροκετίνης από το σαφράν και την γαρδένια.

Η ποσοτικοποίηση στην μέθοδο της ανοιχτής στήλης (OCC) γίνεται με συλλογή των διαχωρισμένων κλασμάτων των καροτενοειδών και υπολογισμός τους φασματοφωτομετρικά με χρήση του πίνακα συντελεστών απορρόφησης. Αντίστοιχα στην HPLC η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται μέσω εσωτερικής ή εξωτερικής βαθμονόμησης με χρήση προτύπων. Τα πρότυπα αυτά έχουν επίσης προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά. Σε αμφότερες τις μεθόδους της OCC και της HPLC, για να υπάρξει

ακριβή ποσοτικοποίηση απαιτείται πρώτα η ταυτοποίηση και ο βέλτιστος διαχωρισμός των καροτενοειδών.

Κλείνοντας παρά τις εγγενείς δυσκολίες και τα πιθανά λάθη που δύναται να προκύψουν κατά την ανάλυση των καροτενοειδών, μπορούν να ληφθούν αξιόπιστα και αναλυτικά στοιχεία σχετικά με την τα είδη και τις ποσότητες των καροτενοειδών στα τρόφιμα με προσεκτικούς χειρισμούς.

2.5 Σκοπός της εργασίας

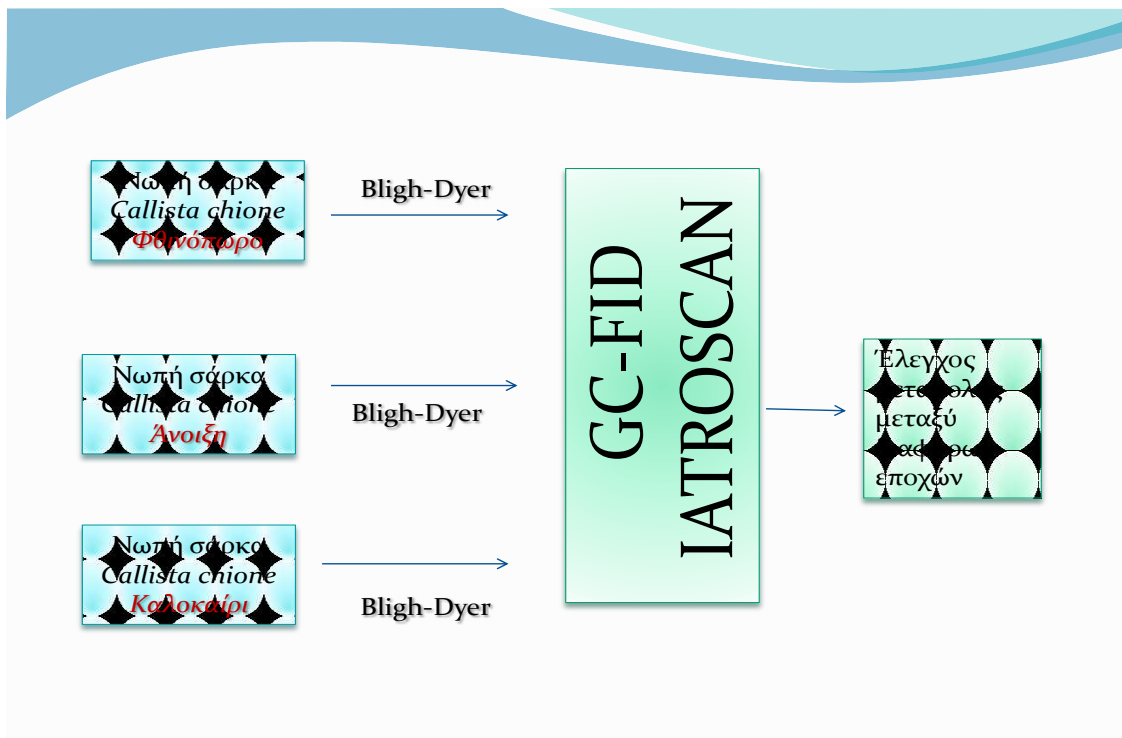
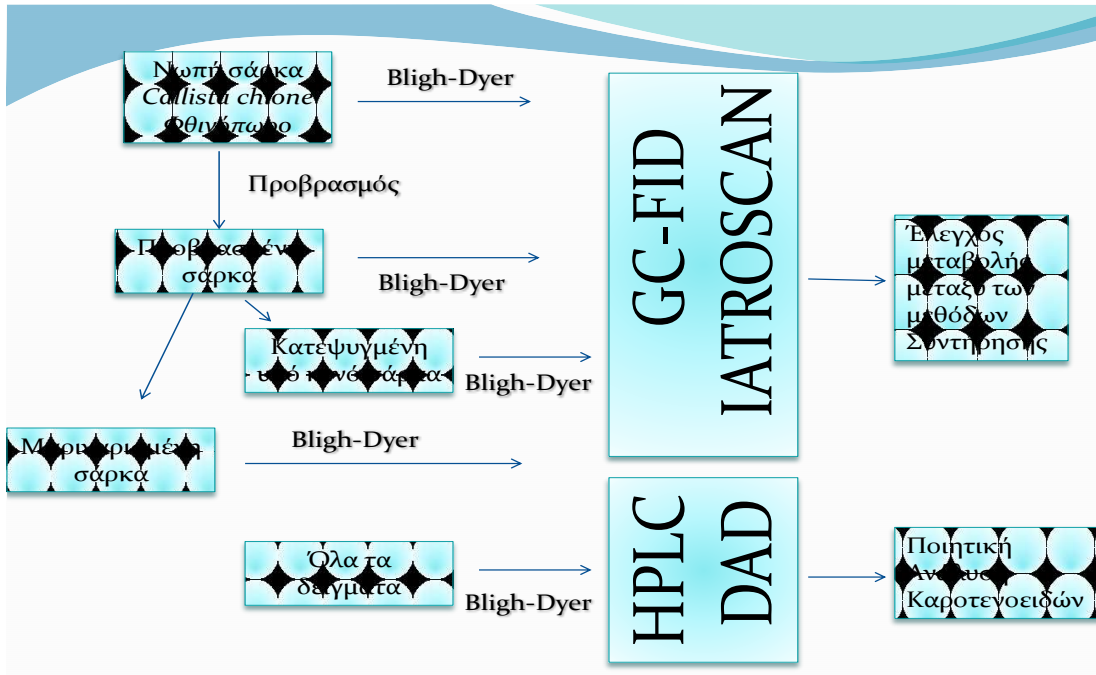
Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί το δίθυρο μαλάκιο *Callista chione* από την άποψη της χημείας και τεχνολογίας τροφίμων. Όπως προαναφέρθηκε, η βιβλιογραφία για τον συγκεκριμένο οργανισμό είναι περιορισμένη και διακυβεύεται κυρίως την βιολογική συμπεριφορά και το ρυθμό ανάπτυξης του μαλακίου, τη δυναμική του πληθυσμού σε σχέση με την περιοχή και το αποτέλεσμα του σχεδιασμού των καλαθιών αλίευσης ως προς το μέγεθος και την ποιότητα του αλιεύματος.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η σύσταση των λιπιδικών συστατικών, το προφίλ των λιπαρών οξέων και το προφίλ των καροτενοειδών της *Callista chione*, στην νωπή καθώς και έπειτα από επεξεργασία. Οι μέθοδοι επεξεργασίας που μελετήθηκαν είναι ο πορβρασμός, το μαρινάρισμα σε διάλυμα άλμης και η κατάψυξη, ενώ οι περίοδοι συντήρησης κυμαίνονται στους 4 και 6 μήνες. Η κατάψυξη υπό κενό μελετήθηκε ως πιθανή μέθοδος συντήρησης σε βιομηχανική κλίμακα ενώ το μαρινάρισμα για την ευκολία παρασκευής του ακόμη και σε οικιακό επίπεδο .

Επιπλέον μελετήθηκε η πιθανή εποχιακή μεταβολή στο προφίλ των λιπαρών οξέων και στην σύσταση των λιπιδικών συστατικών του, ως συνέπεια της διαφορετικής θερμοκρασίας του περιβάλλοντος ύδατος, καθώς και του κύκλου ζωής του δίθυρου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Πειραματικό Μέρος

3.1 Πειραματικός Σχεδιασμός



3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Συλλογή και επεξεργασία του δείγματος

Για το τεχνολογικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν 3 δειγματοληψίες νωπής γυαλιστερής του είδους *Callista chione*, που είχαν αλιευτεί τον Οκτώβριο από ιχθυοτροφείο στη Νέα Πέραμο. Παρελήφθησαν συνολικά 110 νωπές γυαλιστερές, συνολικού βάρους 5104,12 g. Για την μελέτη της εποχιακής μεταβολής πραγματοποιήθηκαν 2 επιπλέον δειγματοληψίες τον Απρίλιο (Άνοιξη) και τον Ιούνιο (Καλοκαίρι). Παρελήφθησαν 25 νωπές γυαλιστερές συνολικού βάρους 1972,10 g τον Απρίλιο και 15 νωπές γυαλιστερές συνολικού βάρους 1025,20 g τον Ιούνιο. Η επεξεργασία του δείγματος και οι χημικές αναλύσεις έγιναν στο εργαστήριο Ιχθυρών και στο εργαστήριο ενόργανης ανάλυσης τροφίμων του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι Αθηνών και στο εργαστήριο Τροφίμων του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Κατά την επεξεργασία του δείγματος μετρήθηκαν το μήκος, ύψος και πλάτος των δίθυρων, καθώς και το βάρος της σάρκας τους ώστε να υπολογισθεί η απόδοση σε σάρκα. Από το σύνολο των γυαλιστερών της πρώτης δειγματοληψίας, ένα μέρος διατηρήθηκε για ανάλυση σε νωπή σάρκα. Το υπόλοιπο δείγμα προβράστηκε και χωρίστηκε εκ νέου σε πέντε μέρη: ένα για ανάλυση απευθείας στην προβρασμένη σάρκα, δύο για μαρινάρισμα και αποθήκευση σε συντήρηση (4°C) για 4 και 6 μήνες και δύο σε κατάψυξη (-18°C) υπό κενό για 4 και 6 μήνες. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση λιπιδίων εις τριπλούν σε όλα τα δείγματα (6 σε συνολικό αριθμό) με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Στο εκχυλισμένο λίπος πραγματοποιήθηκε ανάλυση λιπιδικών συστατικών με IATROSCAN, ανάλυση εστέρων λιπαρών οξέων με GC-FID και φωτομετρικός καθώς και προσδιορισμός καροτενοειδών με HPLC-DAD.

3.2.2 Τεχνολογική επεξεργασία του δείγματος

3.2.2.1 Θερμική επεξεργασία – Προβρασμός

Όργανα - Υλικά

Μεταλλική μπασκέτα τηγανίσματος

Ηλεκτρική Εστία

Δοχείο Βρασμού

Λαβίδα

Νυστέρι

Ποτήρι Ζέσεως 500mL

Πορεία εργασίας:

- Ζύγιση του δείγματος
- Έκπλυση δείγματος σε τρεχούμενο νερό για την απομάκρυνση πιθανής άμμου
- Συλλογή σε μεταλλική μπασκέτα τηγανίσματος, δέκα τεμάχια ανα βρασμό, ώστε να μην έχουμε πτώση της θερμοκρασίας βρασμού
- Βρασμός σε υδρόλουτρο στους 100°C για 4 λεπτά
- Εμβαπτισμός σε παγωμένο νερό, περίπου 0°C για 1 λεπτό.
- Σε αυτό το σημείο ανοίγει το κέλυφος των γυαλιστερών και απομακρύνεται η σάρκα με την χρήση λαβίδας και νυστεριού. Συλλογή της σάρκας στο προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως των 500mL.
- Ζύγιση της σάρκας για υπολογισμό της απόδοσης

3.2.2.2 Μαρινάρισμα

Όργανα - Υλικά

- 1 μεταλλική μπασκέτα τηγανίσματος
- 1 λαβίδα
- 6 ποτήρια ζέσεως των 500mL
- 1 στραγγιστήρι
- 2 βάζα
- 1 προχοϊδα
- 1 κωνική φιάλη
- 1 πιπέτα Pasteur

Αντιδραστήρια:

- Ξύδι 6% σε οξικό οξύ
- Απιονισμένο Νερό
- NaCl
- Πορτοκαλί του Μεθυλίου (Δείκτης)
- NaOH

Προετοιμασία διαλυμάτων:

- 1) Διάλυμα Άλμης 3% (500 mL).
Σε 485ml νερού διαλύονται 15g αλάτι και αναδεύονται έως ότου διαλυθεί πλήρως.
- 2) Διάλυμα ξυδιού/νερού 1:2 με αλάτι 3% w/w (500 mL).
Αναμιγνύονται 162 mL ξυδιού με 323 mL νερού. Αφού αναμιχθούν πλήρως προσθέτονται 15 g αλάτι και αναδεύονται έως ότου διαλυθεί πλήρως
- 3) Διάλυμα ξυδιού/νερού 1:1 (2 διαλύματα των 103,50 mL για να έχουμε αναλογία σάρκας/διαλύματος 1.5:1) .
Αναμιγνύονται 51,75 mL ξυδιού με 51,75 mL νερού.

Πορεία εργασίας:

- Ζύγιση του δείγματος
- Εμβάπτιμός σε δ/μα άλμης 3% για 2-3 ώρες για απομάκρυνση της άμμου.
- Στράγγισμα του δείγματος και μεταφορά σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως των 500mL.
- Εμβάπτιση σε δ/μα ξυδιού/νερού 1:2 και 3% w/w αλάτι, σκεπάζεται και αφήνεται για 3 ημέρες.
- Ζύγιση επεξεργασμένου δείγματος (υπολογισμός αν έχει συγκρατήσει νερό)
- Στράγγισμα και μεταφορά του δείγματος σε δύο βάζα. Σε κάθε βάζο τοποθετείται 155,25 g δείγματος.
- Συμπληρώνουμε το βάζο με 103,5ml δ/τος ξυδιού/νερού 1:1. Θα πρέπει το δείγμα να επικαλύπτεται από το δ/μα
- Γίνεται προληπτικός έλεγχος του pH στο δείγμα. Θα πρέπει να διατηρείται μικρότερο του 4,2.

3.2.2.3 Κατάψυξη υπό κενό

Όργανα - Υλικά

Σακούλα πολυμερικού υλικού ανθεκτική στο κενό

Όργανο δημιουργίας κενού, Decosonic vacuum sealer

3.2.3 Προσδιορισμός υγρασίας

Αρχή μεθόδου

Το δείγμα θερμαίνεται με ακτίνες υπερύθρου (IR), προκαλώντας την εξάτμιση του περιέχοντος νερού. Ζυγίζοντας το βάρος του δείγματος κατά την αρχή του προσδιορισμού και μέχρι σταθερού βάρους κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσης, υπολογίζεται το ποσοστό υγρασίας που εμπεριέχεται στο δείγμα.

Όργανα – Υλικά

Ο προσδιορισμός υγρασίας πραγματοποιήθηκε με το υγρασιόμετρο υπέρυθρων ακτινών (IR) με ενσωματωμένο ζυγό ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων.



Εικ 26: Υγρασιόμετρο υπεράυθρων ακτίνων (IR)

Πορεία Εργασίας

- Ένδειξη οργάνου ON
- Έλεγχος ισορροπίας ζυγού
- Πίεση του πλήκτρου TARE
- Πίεση του πλήκτρου START και εισαγωγή ρυθμίσεων
- Επιλογή προγράμματος 7
- Τεμαχισμός του δείγματος και ομογενοποίηση
- Ζύγιση περίπου 3g δείγματος στον απευθείας στον ζυγό ακριβείας του οργάνου
- Πίεση του πλήκτρου START

3.2.4 Προσδιορισμός pH



Εικ 27: Μετρητής pH Μοντέλο Consort P601

Πορεία Εργασίας

- Ξέπλυμα του ηλεκτροδίου με απιονισμένο νερό
- Καλιμπράρισμα ηλεκτροδίου
- Πίεση πλήκτρου CAL
- Εμβαπτισμός του ηλεκτροδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH= 4 (buffer 1)
- Πίεση πλήκτρου CAL, αναμονή μέχρι σταθεροποίησης της ένδειξης “=”
- Εμβαπτισμός του ηλεκτροδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH= 7 (buffer 2)
- Πίεση πλήκτρου CAL, αναμονή μέχρι σταθεροποίησης της ένδειξης “=”
- Έκπλυση ηλεκτροδίου με απιονισμένο νερό
- Προετοιμασία δειγμάτων με αναλογία σάρκας:απιονισμένο νερό 5:1
- Εμβαπτισμός του ηλεκτροδίου στο δείγμα, χρόνος μέτρησης 2 λεπτά

3.2.5 Μελέτη των λιπιδίων

3.2.5.1 Εκχύλιση ολικών λιπιδίων με τη μέθοδο Bligh-Dyer

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε το 1959 από τους Bligh και Dyer και σκοπός της είναι η εκχύλιση των ολικών λιπιδίων από ένα δείγμα νωπού ιστού. Χρησιμοποιείται ευρέως για δείγματα ιχθύων. Στηρίζεται στην αρχή ότι τα ολικά λιπίδια του ιστού εκχυλίζονται στο μονοφασικό σύστημα χλωροφορμίου–μεθανόλης–νερού 1:2:0.8 (v/v/v). Το σύστημα μετατρέπεται, έπειτα, σε διφασικό με αναλογία χλωροφορμίου–μεθανόλης–νερού 1:1:0.9 (v/v/v) και παραλαμβάνονται τα λιπίδια από την κάτω χλωροφορμική φάση. [115]

Όργανα – Υλικά

Ηλεκτρικός αναμικτήρας (blender)

Φυγόκεντρος (HERMLE 2320)

Φυγόκεντρικοί σωλήνες (80 mL)

Αντιδραστήρια

Μεθυλική αλκοόλη (CH₃OH)

Χλωροφόρμιο (CHCl₃)

Άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄)

Απιονισμένο νερό (H₂O)

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα 20 g δείγματος ζυγίζονται απ' ευθείας στον υποδοχέα του ηλεκτρικού αναμικτήρα και προστίθενται 50 mL μεθυλικής αλκοόλης, 25 mL χλωροφορμίου και κατάλληλη ποσότητα νερού, ώστε ο συνολικός όγκος νερού στο μίγμα να φτάσει τα 20 mL. Στο στάδιο αυτό, η αναλογία H₂O: CH₃OH: CHCl₃ πρέπει απαραίτητως να είναι 4: 10: 5. Το μίγμα ομογενοποιείται για 2 min. Ακολουθεί προσθήκη επιπλέον ποσότητας 25 mL χλωροφορμίου και ομογενοποίηση του μίγματος για 1 min. Τέλος, προστίθενται 25 mL νερού και το μίγμα ομογενοποιείται εκ νέου για 30 s. Στο στάδιο αυτό διαπιστώνεται διαχωρισμός των φάσεων (υδατικής-χλωροφορμικής). Για την παραλαβή του χλωροφορμικού εκχυλίσματος, το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και φυγοκεντρείται για 10 min στις 2000-2500 στροφές/min (rpm). Η υδατική (άνω) στιβάδα απομακρύνεται με τη βοήθεια πιπέτας και απορρίπτεται. Το χλωροφορμικό εκχύλισμα (κάτω στιβάδα) παραλαμβάνεται προσεκτικά με σιφώνιο πληρώσεως και διηθείται μέσω ηθμού Whatman No.1, που περιέχει μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου. Το διήθημα συλλέγεται εντός φιάλης Erlenmeyer 100mL, η οποία κλείνει ερμητικά με πώμα Teflon.

3.2.5.2 Σταθμικός προσδιορισμός

Αρχή μεθόδου

Πρόκειται για σταθμικό προσδιορισμό με τον οποίον υπολογίζεται το ξηρό βάρος των λιπιδίων, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη και την απόκτηση σταθερού βάρους.

Όργανα – Υλικά

Ατμόλουτρο

Κλίβανος ξήρανσης (103 ± 2 °C)

Αναλυτική πορεία

Κλάσμα 10-20 mL από το διαυγές χλωροφορμικό εκχύλισμα φέρεται με σιφώνιο σε προζυγισμένη, στεγνή κωνική φιάλη 100 mL. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη σε ατμόλουτρο και ολοκλήρωση της ξήρανσης του δείγματος σε κλίβανο (103 ± 2 °C) για 30 min. Η φιάλη με το ιχθυέλαιο μεταφέρεται σε ξηραντήρα, και αφού αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος ζυγίζεται εκ νέου. Η διαφορά βάρους του φιαλιδίου, δηλαδή το βάρος πριν και μετά, αποτελεί το ξηρό βάρος των λιπιδίων.

3.2.6 Χρωματογραφικές μέθοδοι για το διαχωρισμό και την ανάλυση των Λιπιδίων

3.2.6.1 Iatroscan (TLC / FID) Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση

Αρχή μεθόδου

Το Iatroscan MK-6 (TLC / FID–FPD Analyser) (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) είναι ένα αυτόματο σύστημα ανίχνευσης λιπιδικών συστατικών. Διαχωρίζει τα λιπιδικά συστατικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) και ένα φωτομετρικό ανιχνευτή (F.P.D.). Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος για το διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιείται σε ράβδους λεπτής στιβάδας από χαλαζία, τα Chromarods. Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ποιότητα των διαχωρισμών, η ακρίβεια και η σαφήνεια των αποτελεσμάτων. [116]



Εικ 28: Iatroscan MK-6 (TLC/FID- FPD Analyser) (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)

Η ανάπτυξη των Chromagods πρέπει να γίνεται υπό σταθερή θερμοκρασία, καθώς η μεταβολή αυτής επηρεάζει την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, όπως και τη διαχωριστική ικανότητα. Τα Chromagods είναι ράβδοι χαλαζία λεπτής στιβάδας επιστρωμένες με κατάλληλο ανόργανο προσροφητικό υλικό (Silica-gel ή Alumina). Είναι τοποθετημένα καθ' όλην τη διάρκεια της πειραματικής διεργασίας σε μεταλλικό πλαίσιο χωρητικότητας δέκα ράβδων και με βαθμονόμηση του ύψους των ράβδων (1-100 mm).

Η συνολική συγκέντρωση του προς ανάλυση δείγματος εν διαλύσει θα πρέπει να κυμαίνεται από 10 έως 20 mg / mL (1-2% w/v). Το διάλυμα του δείγματος τίθεται στην κάθε ράβδο με μικροσύριγγα σε καθορισμένη απόσταση από τη βάση της ράβδου και ο όγκος που επιλέγεται για καλύτερο διαχωρισμό είναι 1.0 μ L (2-5 μ g/κορυφή ή συστατικό του δείγματος). Το σημείο θέσης της κηλίδας του διαλύματος του δείγματος σε κάθε ράβδο είναι καθορισμένο και επιλέγεται με την τοποθέτηση του μεταλλικού πλαισίου με τις

ράβδους σε κατάλληλη γυάλινη βάση που διαθέτει μια άσπρη γραμμή-οδηγό, βάση της οποίας τίθεται η κάθε κηλίδα.

Η ανάπτυξη γίνεται σε απόσταση καθορισμένη από τη βάση της ράβδου και πάντα μικρότερη από το άνω άκρο αυτής (10 cm). Η απόσταση ανάπτυξης δεν πρέπει να διαφοροποιείται σε κάθε μέτρηση, διότι όταν μεταβάλλεται επηρεάζει σημαντικά την απόσταση που διανύουν οι κηλίδες των συστατικών (R_f), όπως και το εμβαδό των κορυφών στο χρωματογράφημα (peak area). Όσο μεγαλύτερο είναι το μέτωπο του διαλύτη (απόσταση που διανύει η κινητή φάση) τόσο αυξάνεται το R_f κάθε συστατικού και μειώνεται το εμβαδόν των κορυφών, οπότε εξασφαλίζεται καλύτερη διαχωριστική ικανότητα.

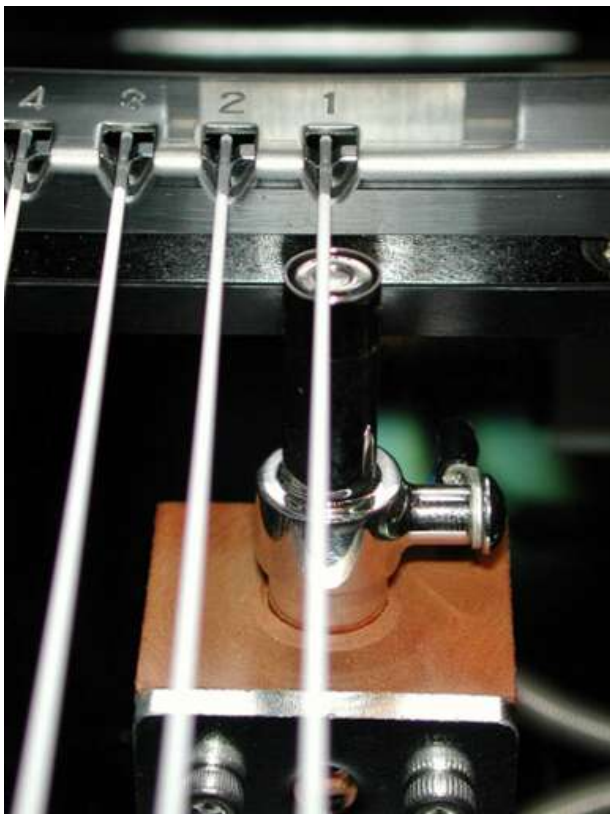
Η ευαισθησία του ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) εξαρτάται από την ταχύτητα ροής του αέρα και του υδρογόνου, όπως και από την ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα. Η βέλτιστη ροή αέρα και υδρογόνου είναι αντίστοιχα 2 L/min και 160 mL/min. Μικρότερη ροή υδρογόνου μειώνει τη θερμοκρασία της φλόγας και μπορεί να επιφέρει ατελή καύση ορισμένων συστατικών. Τέλος, η ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα μπορεί να κυμανθεί από 10 έως 60 s/ράβδο, επιλέγεται δε ως βέλτιστη η τιμή των 20-30 s/ράβδο (0.50-0.33 cm/s). [116]



Εικ 29 : Τοποθέτηση δείγματος στα Chromarods



Εικ 30 : Ανάπτυξη των Chromarods



Εικ 31 : Καύση των Chromarods με φλόγα υδρογόνου

Οργανολογία

- Iatroscan MK-6 (TLC / FID–FPD Analyser) (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokyo, Japan)
- Chromarods: Types SIII (Silica gel type)
- Ανιχνευτής: Hydrogen flame ionization detector (F.I.D.)
- Ροή υδρογόνου: 160 mL/min
- Ροή αέρα: 2 L/min
- Ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα: 30 s/ράβδος (0.33 cm/s)
- Πρότυπα διαλύματα λιπιδίων καθαρότητας (99%) σε χλωροφόρμιο
 - Εστέρες στερολών Φωσφατιδυλοχολίνη
 - Χοληστερόλη Φωσφατιδυλοσερίνη
 - 1,2 Διγλυκερίδια Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
 - Μονογλυκερίδια Σφιγγομυελίνη
 - Τριγλυκερίδια Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
 - Ελεύθερα λιπαρά οξέα Φωσφατιδυλοϊννοσίτης
 - Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

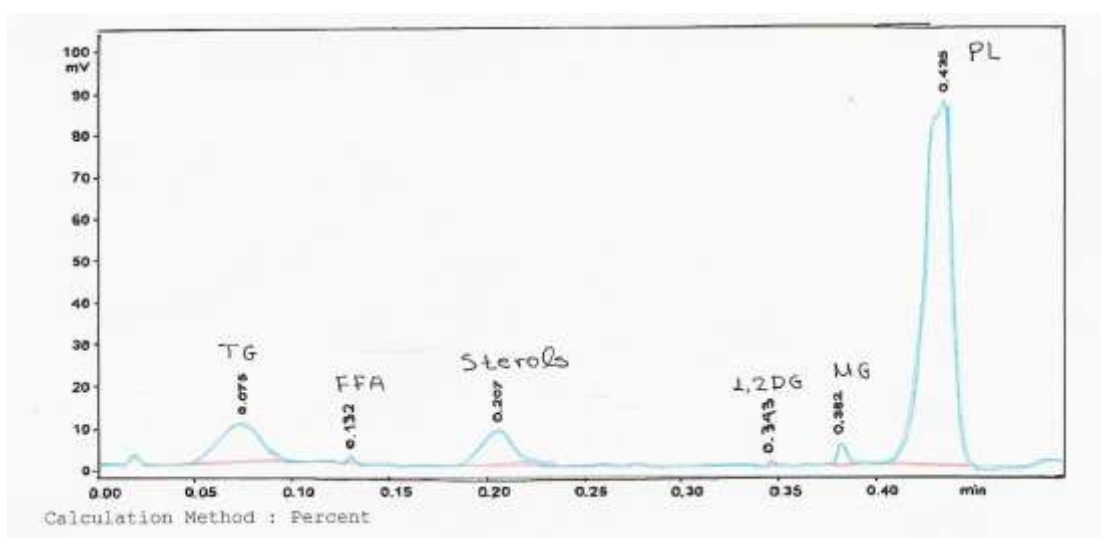
Αναλυτική πορεία

Λαμβάνονται μίγματα λιπιδίων (ολικά, ουδέτερα ή πολικά), εξατμίζονται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε χλωροφόρμιο/μεθανόλη (9:1 v/v) προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 10-20 mg/mL. Από κάθε δείγμα λιπιδίων λαμβάνονται 0.5-1.0 μL διαλύματος και τοποθετούνται με μικροσύριγγα σε απόσταση 1.00cm από το ένα άκρο της ράβδου. [117]

Λαμβάνονται διαλύματα πρότυπων λιπιδίων (εστέρες στερολών, χοληστερόλη, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, σφιγγομυελίνη, λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοϊννοσίτης καθαρότητας 99%) ίδιας συγκέντρωσης. Οι ράβδοι τοποθετούνται στη συνέχεια σε κορεσμένο θάλαμο με κατάλληλο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη, οι ράβδοι ανασύρονται από το θάλαμο και αφήνονται μέχρι πλήρους εξάτμισης των διαλυτών. Μια ράβδος (η πρώτη συνήθως)

λαμβάνεται κενή ώστε να χρησιμοποιηθεί για λευκό προσδιορισμό. Ακολουθεί τοποθέτηση των ράβδων στο θάλαμο του Iatroscaan και καύση των διαχωρισμένων λιπιδίων με φορά από το μέτωπο του διαλύτη προς το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων. Για δείγματα ολικών λιπιδίων επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός τους σε ουδέτερα και πολικά λιπίδια με τα παρακάτω συστήματα διαλυτών ανάπτυξης (Σχήματα και Πίνακες). [116]

- Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης n-εξανίου–δισαιθυλαιθέρα–φορμικού οξέος (n-H:DE:FA), 60:15:1.5 (v/v/v)



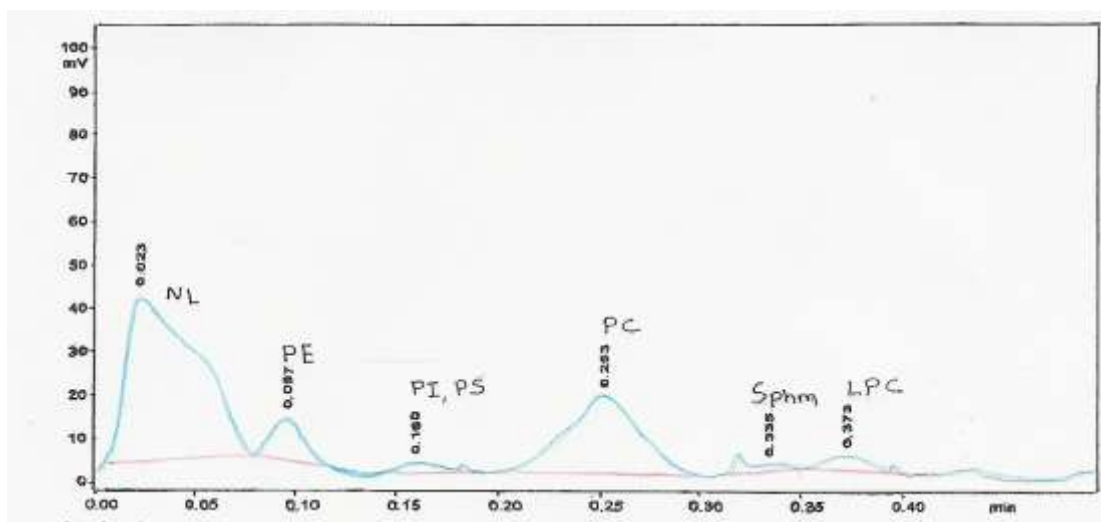
Σχήμα 4 : Χρωματογράφημα από Iatroscaan ανάλυση. Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης n-:DE:FA, 60:15:1.5 by vol. Διαχωρισμός μίγματος πρότυπων ουδέτερων λιπιδίων

Πίνακας 2 : Iatroscaan ανάλυση μίγματος πρότυπων ουδέτερων λιπιδίων σε ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης n-H:DE:FA, 60:15:1.5 by vol.

Χρόνος έκλουσης (min)						
Sterol Esters	TG	FFA	Sterols	1,2-DG	MG	PL
0.02-0.04	0.07-0.10	0.11-0.12	0.20-0.24	0.31-0.34	0.36-0.39	0.42-0.45

Απόσταση ανάπτυξης: 10 cm

- Πολικό σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου–μεθανόλης–νερού (C:M:W), 50:20:2 (v/v/v)



Σχήμα 5: Χρωματογράφημα από Iatroscaan ανάλυση. Πολικό σύστημα ανάπτυξης C:M:W, 50:20:2 by vol. Διαχωρισμός μίγματος πρότυπων πολικών λιπιδίων

Πίνακας 3: Iatroscaan ανάλυση μίγματος πρότυπων πολικών λιπιδίων σε πολικό σύστημα ανάπτυξης C:M:W, 50:20:2 by vol.

Χρόνος έκλουσης (min)						
PE	PI	PS	I-PE	PC	Sphm	I-PC
0.09-0.11	0.11-0.14	0.14-0.18	0.22-0.23	0.26-0.28	0.34-0.35	0.38-0.39
Απόσταση ανάπτυξης: 10 cm						

3.2.6.2 Αεριοχρωματογραφική ποιοτική και ποσοτική ανάλυση (αερίου - υγρού)GLC

Αρχή μεθόδου

Τα λιπαρά οξέα των λιπιδικών δειγμάτων μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες τους μέσω εστεροποίησης σε αλκαλικό περιβάλλον. Για τη μετατροπή των ουδέτερων λιπιδίων, και κυρίως των κηρών, σε μεθυλεστέρες εφαρμόζεται η οξυκαταλυόμενη μεθανόλυση. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η πτητικότητα των λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια, οι μεθυλεστέρες εισάγονται στον αέριο χρωματογράφο και καθώς διαπερνούν τη στήλη κατανέμονται ανάμεσα στο υλικό της στατικής φάσης και του φέροντος αερίου (ήλιο, He). Η κατανομή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων εξαρτάται

από την πτητικότητα και τη συγγένειά τους με τη στατική φάση. Πραγματοποιείται, λοιπόν, έκλουση των μεθυλεστέρων από τη στήλη, και στην περίπτωση που αυτή είναι πολική διαχωρίζει τα cis-trans ισομερή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, τα υδρόξυ-, ίσο- και αντίσο- λιπαρά οξέα κατά σειρά ελαττώμενης πτητικότητας και αυξανόμενης συγγένειας προς τη στατική φάση, σε μικρό χρόνο ανάλυσης, συνήθως 20-60 min. Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων γίνεται με σύγκριση των χρόνων κατακράτησής τους (retention, Rt) με τους χρόνους κατακράτησης των προτύπων των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων. Παρέχεται, λοιπόν, η δυνατότητα προσδιορισμού της σχετικής αναλογίας των λιπαρών οξέων στο μετρούμενο δείγμα μέσω του ανιχνευτή F.I.D., του οποίου το σήμα εξαρτάται από τα ιόντα που παράγονται κατά την καύση των συστατικών του δείγματος σε φλόγα υδρογόνου-αέρα και από την ύπαρξη δραστικών ομάδων (π.χ. υδροξύλιο, αμινομάδα) στις ουσίες.

Εστεροποίηση σε ήπιο αλκαλικό περιβάλλον

Δείγμα λιπιδίων έως 50mg (συνήθως 20-30 mg, ανάλογα με τη συγκέντρωση των λιπιδίων στο δείγμα) εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Κατόπιν, προστίθενται 0.75mL n-εξανίου με το εσωτερικό πρότυπο του λαυρικού οξέος στον ίδιο διαλύτη και 0.1mL καυστικού καλίου 2.0N σε μεθανόλη. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για 2min σε κυκλοαναδευτήρα. Έπειτα, προστίθενται 0.2g θειικού νατρίου (αφυδατικό μέσο) και το σύστημα αφήνεται για περίπου 25min προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων. Στο υπερκείμενο (φάση εξανίου) λαμβάνονται οι μεθυλεστέρες, ενώ στο ίζημα παραμένουν η γλυκερίνη και άλλα αδιάλυτα συστατικά του δείγματος. [117]

Αντιδραστήρια

- n-εξάνιο καθαρότητας 95%
- Διάλυμα KOH 2.0 M σε μεθανόλη
- Άνυδρο στερεό Na₂SO₄

Πρότυπα αντιδραστήρια

- Μεθυλεστέρας του λαυρικού οξέος καθαρότητας >99%

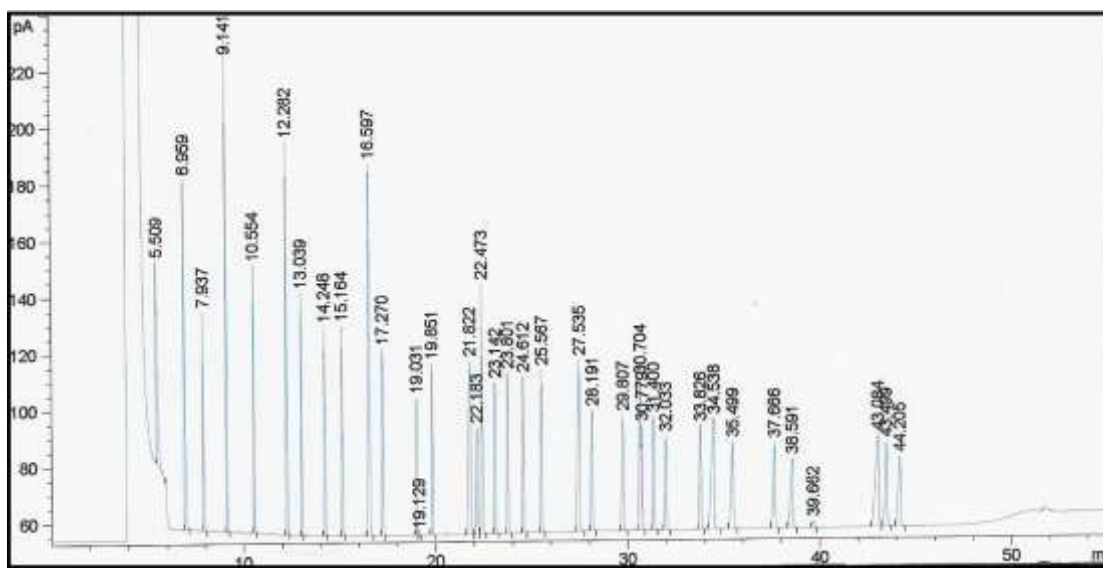
- Supelco TM 37 Component FAME Mix C4-C24, 100mg Neat, Catalog No: 18919-1AMP (Merck, Darmstadt, Germany)
- Supelco PUFA No.1, Marine Source, 100mg Neat, Catalog No: 47033
Metal standards (titrisol) (Merck, Darmstadt, Germany)

Οργανολογία

- Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 Series Gas Chromatograph με ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) εφοδιασμένος με split/splitless εισαγωγή. Ο αεριοχρωματογράφος περιέχει τα βασικά μέρη του συστήματος, δηλαδή το φούρνο με θέση για δύο στήλες, δύο χώρους εισαγωγής του δείγματος αντιστοίχως (injectors) και τον ανιχνευτή (detector).
- Στήλη: DB-23 capillary column (60m×0.25 mm i.d., 0.15 μm film) [50%-Cyanopropyl-methylpolysiloxane], υψηλής πολικότητας, σχεδιασμένη για την ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES), με εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα των cis- και trans- FAME ισομερών.
- Οβίδα αερίου ηλίου (He) (φέρων αέριο), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.
- Οβίδα αερίου υδρογόνου (H₂) (καύσιμο), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.
- Οβίδα ατμοσφαιρικού αέρα (οξειδωτικό), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.
- Μικροσύριγγα Hamilton, 1 μL
- Η/Υ με το υποστηρικτικό λογισμικό Hewlett Packard (Agilent) ChemStation Software
- Καταγραφέας HP

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα

Η θερμοκρασία προγραμματίστηκε στους 100°C για 0 min. Στη συνέχεια αυξήθηκε από τους 100°C έως τους 150°C με ρυθμό 10°C/ min και διατηρήθηκε σταθερή στους 150°C για 0min, μετά αυξήθηκε από τους 150°C στους 195°C με ρυθμό 2°C/ min και διατηρήθηκε στους 195°C για 5min. Ακολούθησε αύξηση από τους 195°C στους 210°C με ρυθμό 1°C/ min. Διατηρήθηκε στους 210°C για 0min και τέλος, αυξήθηκε από τους 210°C στους 240°C με ρυθμό 10°C/ min όπου διατηρήθηκε σε αυτήν τη θερμοκρασία για 5min. Η ανάλυση διήρκησε περίπου 55min. [116]



Σχήμα 6 : Πρότυπο χρωματογράφημα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων Supelco TM 37 Component FAME Mix C4-C24, 100mg Neat, Catalog No: 18919-1AMP (Merck, Darmstadt, Germany). [118]

Παρατίθεται πίνακας με τους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων που αναλύθηκαν, οι χρόνοι έκλουσης αυτών και οι παράγοντες ποσοτικοποίησης.

Πίνακας 4 : Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) που αναλύθηκαν, χρόνοι έκλουσης (Rt) αυτών και παράγοντες ποσοτικοποίησης (RF) [116]

A/A	FAME	Rt (min)	RF (10 ⁻⁶) SR 2:1
1	C4:0	4.200 – 4.405	0.37369 ± 0.00613
2	C6:0	4.580 – 4.760	0.37436 ± 0.00628
3	C8:0	5.438 – 5.808	0.38637 ± 0.00043
4	C10:0	6.897 – 7.158	0.35074 ± 0.00134
5	C11:0	7.877 – 8.088	0.34422 ± 0.00189
6	C12:0	9.064 – 9.251	0.33555 ± 0.00149
7	C13:0	10.484 – 10.641	0.32852 ± 0.00054
8	C14:0	12.168 – 12.398	0.32561 ± 0.00068
9	C14:1	12.954 – 13.131	0.32998 ± 0.00015
10	Iso- C15:0	13.556 – 13.685	0.33555 ± 0.00149
11	C15:0	14.148 – 14.354	0.33183 ± 0.00018
12	C15:1 ω-5	15.064 – 15.274	0.32497 ± 0.00054
13	C16:0	16.400 – 16.791	0.32226 ± 0.00096
14	Iso- C16:0	16.978 – 17.162	0.33555 ± 0.00149
15	C16:1 ω-9 cis	17.212 – 17.394	0.32717 ± 0.00102
16	iso- C17:0	18.485 – 18.688	0.33555 ± 0.00149
17	cyclo- C17:0	18.705 – 18.855	0.33555 ± 0.00149
18	C17:0	18.948 – 19.100	0.41283 ± 0.00352
19	C17:1 ω-7	19.728 – 19.994	0.31718 ± 0.00197
20	C18:0	21.573 – 22.000	0.33312 ± 0.00352
21	C18:1 ω-9 trans	22.000 – 22.285	0.32846 ± 0.00342
22	C18:1 ω-9 cis	22.285 – 22.668	0.32299 ± 0.00323
23	C18:1 ω-7 cis	22.749 – 22.909	0.33555 ± 0.00149
24	C18:2 ω-6 trans	23.011 – 23.301	0.32597 ± 0.00337
25	C18:2 ω-6 cis	23.671 – 23.951	0.32122 ± 0.00311
26	C18:3 ω-6 cis	24.488 – 24.764	0.32818 ± 0.00318
27	C18:3 ω-3 cis	25.434 – 25.721	0.29582 ± 0.00282
28	C18:4 ω-3 cis	26.305 – 26.515	0.33555 ± 0.00149
29	C19:0	27.336 – 27.492	0.33555 ± 0.00149
30	C20:0	27.492 – 27.653	0.34611 ± 0.00491
31	C20:1 ω-9 cis	28.042 – 28.485	0.33910 ± 0.00490
32	C20:2 ω-6 cis	29.660 – 29.867	0.32028 ± 0.00444
33	C20:3 ω-6 cis	30.528 – 30.660	0.33346 ± 0.00356
34	C20:4 ω-6 cis	31.235 – 31.508	0.34295 ± 0.00620
35	C20:3 ω-3 cis	31.888 – 32.037	0.33598 ± 0.00527
36	C21:0	32.964 – 33.282	0.37696 ± 0.00544
37	C20:5 ω-3 cis	33.675 – 34.151	0.33962 ± 0.00476
38	C22:0	34.329 – 34.598	0.36969 ± 0.00904
39	C22:1 ω-9 cis	36.285 – 36.361	0.34866 ± 0.00589
40	C22:2 ω-6 cis	37.633 – 37.753	0.34738 ± 0.00604
41	C23:0	37.979 – 38.308	0.38454 ± 0.00781
42	C22:4 ω-6 cis	38.527 – 38.743	0.33555 ± 0.00149
43	C22:5 ω-6 cis	39.855 – 40.198	0.33555 ± 0.00149
44	C22:5 ω-3 cis	40.386 – 40.822	0.33555 ± 0.00149
45	C24:0	42.544 – 42.703	0.40016 ± 0.00753
46	C22:6 ω-3 cis	43.255 – 44.162	0.34295 ± 0.00620
47	C24:1 ω-9 cis	44.162 – 44.392	0.35047 ± 0.00748

3.2.6.3 Φασματοφωτομετρική ανάλυση ολικών καροτενοειδών

Αρχή μεθόδου

Στα θαλάσσια δίκτυρα τα κυριότερα καροτενοειδή που παρατηρούνται είναι η Ασταξανθίνη, η Κανθαξανθίνη, η Λουτεΐνη και η Ζεαξανθίνη. Ο φασματομετρικός προσδιορισμός των καροτενοειδών αυτών πραγματοποιείται στα μήκη κύματος που απορροφά το κάθε μόριο και είναι τα μήκη κύματος 478 nm, 472 nm, 447 nm και 453 nm αντίστοιχα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπων καμπυλών αναφοράς.

Όργανα – Υλικά

Φασματοφωτόμετρο HITACHI U-3210

Ογκομετρικές φιάλες 20 mL

Ακετόνη

Πρότυπες καμπύλες αναφοράς

Ασταθανθίνη : $Y = 0.167X + 0.0096$

Κανθαξανθίνη : $Y = 0.1838X + 0.0081$

Ζεαξανθίνη : $Y = 0.296X + 0.019$

Λουτεΐνη : $Y = 0.2202X + 0.015$

Αναλυτική πορεία

- Ζύγιση 1 mg δείγματος σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας
- Μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη 20 mL και συμπλήρωση με ακετόνη έως την χαραγή της φιάλης
- Επιλογή προγράμματος στο φασματοφωτόμετρο
- Ορισμός μήκους κύματος
- Μηδενισμός φασματοφωτόμετρου με χρήση ακετόνης ως τυφλού
- Φωτομέτρηση δειγμάτων για κάθε μήκος κύματος
- Μηδενισμός φασματοφωτόμετρου με χρήση ακετόνης ως τυφλού, μετά από κάθε μέτρηση
- Υπολογισμός συγκέντρωσης με χρήση των πρότυπων καμπύλων

3.2.6.4 HPLC – DAD ανάλυση καροτενοειδών

Για την ταυτοποίηση των διάφορων καροτενοειδών, τα λιπίδια της *Callista chione* αναλύθηκαν περαιτέρω με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα λιπιδικά δείγματα ξηράθηκαν με αέριο άζωτο και αναδιαλύθηκαν σε διάλυμα ακετόνης–εξανίου (2:3, κατά όγκο). Έπειτα, τα δείγματα φιλτραρίστηκαν μέσω μιας μεμβράνης 0.45μm, ώστε να αφαιρεθούν σωματιδιακά κατάλοιπα πριν την ένεση. Εγχύθηκαν 20μL διαλύματος για την HPLC ανάλυση. [119] Το σύστημα της HPLC που χρησιμοποιήθηκε (Hewlett Packard Series 1100, Waldbronn, Germany) αποτελείται από έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HP 1100 Series Diode Array Detector), μια τεταρτοταγή αντλία (HP 1100 Quaternary Pump), ένα μικροαπαερωτή κενού (Agilent 1100 Series Micro Vacuum Degasser) , και έναν εγχυτήρα δείγματος (Rheodyne model 7010 Sample Injector). Το σύστημα είναι, επίσης, εξοπλισμένο με μια στήλη C30 (250×4.6 mm I.D., 5 μm σωματιδίου) της YMC (Tokyo, Japan). [119]

Χρησιμοποιήθηκε μια κινητή φάση ακετονιτριλίου (A), 1-βουτανόλης (B) και μεθυλενοχλωριδίου (C), με την παρακάτω σειρά έκλουσης: 69.3% A, 29.7% B και 1.0% αρχικά, αυξήθηκε σε 4% C σε 10min, 12% C σε 20 min, 30% C σε 40min και επέστρεψε στο 1% C σε 50 min. Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε στα 2 mL/min.

Η ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με ένα ChemStation με LC 3D λογισμικό (Agilent Technologies 1999–2000, Waldbronn, Germany). [119]

Ο προσδιορισμός των σημαντικότερων καροτενοειδών του δείγματος έγινε συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης και τα φάσματα απορρόφησης με τα πρότυπα αναφοράς και τα χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης, όπως περιγράφονται στη βιβλιογραφία. Τα καροτενοειδή υπολογίστηκαν σε επί τοις εκατό ποσοστά. [119]

Στατιστική ανάλυση

Σε όλες τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD). Οι τιμές αυτές επεξεργάστηκαν στατιστικά (δοκιμή t) με τουπολογιστικό πρόγραμμα στατιστικής SPSS v.21.0.

3.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.3.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Κατά την αρχική δειγματοληψία το φθινόπωρο συλλέχθηκαν 2.049 kg νωπής Γυαλιστερής 25 συνολικών τεμαχίων. Η απόδοση τους σε σάρκα υπολογίστηκε σε 25.75% . Το ολικό τους λίπος προσδιορίστηκε σε 0.92% η υγρασία στο 80.55% και το pH τους στο 7.02. Κατά τον προβρασμό παρατηρήθηκε μείωση στο ποσοστό του λίπους και αύξηση της υγρασίας χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές οι αλλαγές.

Κατά την διαδικασία του μαριναρίσματος παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού του λίπους στους 4 μήνες και αύξηση σε 1.12 στους 6 μήνες συντήρησης. Το ποσοστό της υγρασίας τους βρέθηκε ελαφρώς αυξημένο σε σχέση με την νωπή και την προβρασμένη. Τέλος το pH μειώθηκε σημαντικά ($P<0.05$) σε 3.82 και 3.78 στους 4 και 6 μήνες αντίστοιχα.

Κατά την κατάψυξη υπό κενό παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της υγρασίας στους 4 μήνες συντήρησης σε 76.32% ενώ το pH της σάρκας μειώνεται σημαντικά ($P<0.05$) και στους δύο χρόνους συντήρησης, περίπου στο ~5.

Πίνακας 5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σάρκας Γυαλιστερής, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης.

Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά	Νωπή	Προβρασμένη	Μαριναρισμένη (4 Μήνες)	Κατεψυγμένη (4 Μήνες)	Μαριναρισμένη (6 Μήνες)	Κατεψυγμένη (6 Μήνες)
Λίπος (%)	0.92±0.14ab	0.73±0.10b	0.78±0.03a	0.75±0.07a	1.12±0.10a	0.81±0.05a
Υγρασία (%)	80.55±0.36ac	81.52±1.10ac	83.57±0.59c	76,32±2,08b	82..00±1.79ac	80.07±0.38a
PH	7.02±0.03a	7.08±0.15a	3.82±0.08b	5.73±0.08c	3.78±0.04b	5.01±0.07c

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% .

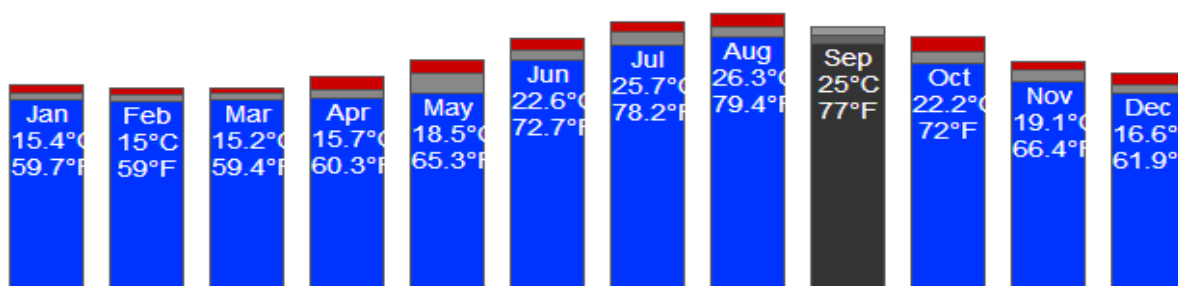
Στις διαφορετικές εποχές του έτους βρέθηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά στο ολικό λίπος. Το φθινόπωρο έχει την χαμηλότερη τιμή του 0.92% ενώ το καλοκαίρι αγγίζει το 2.46% του ολικού του βάρους. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την βιβλιογραφία [120, 121] καθώς τα δίθυρα μαλάκια δείχνουν σημαντική διακύμανση των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους κατά την διάρκεια του έτους, η οποία οφείλεται στα διαφορετικά στάδια της ζωής του, όπως η ανάπτυξη, η ωρίμανση και η αναπαραγωγή του.

Πίνακας 6: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σάρκας Γυαλιστερής, σύγκριση εποχών συγκομιδής.

Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο
Λίπος (%)	1.71±0.05b	2.46±0.40c	0.92±0.14a
Υγρασία (%)	73.97±0.92b	74.19±0.81b	80.55±0.36a
PH	7.05±0.03a	7.04±0.02a	7.02±0.03a

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Η περιεκτικότητα σε λίπος στα θαλάσσια δίθυρα, έχει άμεση σχέση με την αποθήκευση ενέργειας, όπως επίσης και με την διαθέσιμη τροφή και την θερμοκρασία του ύδατος. Παρατηρώντας τις θερμοκρασίες της θάλασσας τις περιόδους της συγκομιδής παρατηρείται ότι το φθινόπωρο που βρέθηκε το χαμηλότερο ποσοστό λίπους έχουμε και την υψηλότερη θερμοκρασία ύδατος, σε σχέση με τις άλλες εποχές αλιείας.



Σχήμα 7 : θερμοκρασίες θάλασσας του μήνες του έτους 2014

3.3.2 Λιπιδικά Συστατικά

Νωπή Γυαλιστερή

Με τη μέθοδο της ανάλυσης του Iatroscan (TLC / FID) έγινε ποιοτική μελέτη των ολικών λιπιδίων της σάρκας της Γυαλιστερής, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7: Ολικών Λιπιδίων της Γυαλιστερής (mg/g Νωπής σάρκας)

Νωπή Σάρκα Γυαλιστερής			
NL	2.22±0.03	PL	6.98±0.04
TG	1.21±0.03	PE	2.70±0.09
Chol	1.02±0.02	PnL	1.09±0.08
		PC	3.19±0.03

NL: Ουδέτερα Λιπίδια, **TL:** Ολικά Λιπίδια, **PL:** Πολικά Λιπίδια, **TG:** Τριγλυκερίδια, **FFA:** Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα, **Chol:** Χοληστερόλη, **MG:** Μονογλυκερίδια, **PE:** Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, **PnL:** Φωσφόνολιπίδια, **PC:** Φωσφατιδυλοχολίνη.

Η μελέτη της σύστασης των ολικών λιπιδίων της νωπής σάρκας της Γυαλιστερής έδειξε ότι τα Πολικά λιπίδια (PL) αποτελούν το 75.82% ενώ τα Ουδέτερα (NL) το 24.18% των ολικών λιπιδίων (TL).

Στα πολικά λιπίδια, η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) είχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση (3.19 mg/g Νωπής σάρκας), ακολουθεί η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) και τα Φωσφόνολιπίδια (PnL) με συγκεντώσεις 2.70 και 1.09 mg/g Νωπής σάρκας, αντίστοιχα.

Στα ουδέτερα λιπίδια, κυριαρχούν τα Τριγλυκερίδια (TG) με συγκέντρωση 1.21 και ακολουθεί η χοληστερόλη με συγκέντρωση 1,02 mg/g Νωπής σάρκας. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πολικά λιπίδια χρησιμοποιούνται κυρίως ως πηγή ενέργειας ενώ τα πολικά αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών δομών [122]. Έτσι τα τριγλυκερίδια αποτελούν την κυριότερη αποθήκη ενέργειας για το δίθυρο, ενώ η Χοληστερόλη αποτελεί το κυριότερο λιποειδές των μυών του (πόδι και προσαγωγούς μύες). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η ανίχνευση Φωσφόνολιπιδίων τα οποία θεωρούνται εξαιρετικά σταθερά σε σχέση με τα φωσφολιπίδια.

Θερμικά επεξεργασμένα - Προβρασμένα Γουαλιστερά

Κατά την διεργασία του προβρασμού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα συνολικά ποσοστά των πολικών και ουδέτερων λιπιδίων.

Πίνακας 8: Σύγκριση των Ολικών Λιπιδίων μεταξύ της νωπής και προβρασμένης Γουαλιστεράς (mg/g Νωπής σάρκας)

Δείγματα	Νωπή	Προβρασμένη
NL	2.22±0.03a	1.75±0.02a
HC	0.00±0.00a	0.07±0.00b
TG	1.21±0.03a	0.83±0.00b
Chol	1.02±0.02a	0.85±0.01b
PL	6.98±0.04a	5.55±0.02a
PE	2.70±0.09a	2.20±0.01a
PnL	1.09±0.08a	0.81±0.01a
PC	3.19±0.03a	2.37±0.00b
LPC	0.00±0.00a	0.18±0.00b

HC: Υδρογονάνθρακες, **LPC:** λύσο-Φωσφατίδυλοχολίνη Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

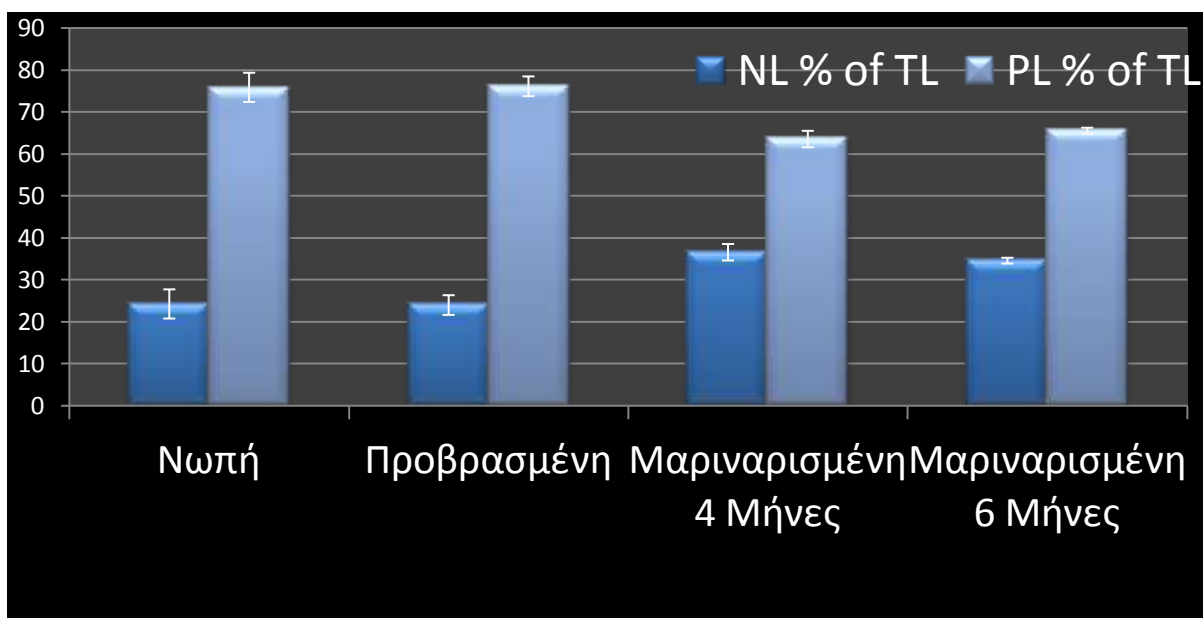
Στα επιμέρους ουδέτερα λιπίδια παρουσιάστηκε μικρή μείωση στο ποσοστό των τριγλυκεριδίων (TG) από 1.21 σε 0.83 mg/g Νωπής σάρκας, με ταυτόχρονη εμφάνιση υδρογονανθράκων (HC) σε συγκέντρωση 0.07 mg/g Νωπής σάρκας. Αυτό είναι λογικό, καθώς η θέρμανση προκαλεί την δημιουργία πτητικών μορίων όπως η ακεταλδεΐδη, η προπενάλη και η προπανάλη, τα οποία προκύπτουν κυρίως από την οξείδωση των ω -3 λιπαρών οξέων. Οι διαλδεΐδες είναι επίσης παραπροϊόντα της περοξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και εντοπίζονται συχνά σε έλαια που έχουν υποστεί θέρμανση [123]. Συνεπώς, πιθανόν με τον προβρασμό να έχουμε οξείδωση των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων με αποτέλεσμα την μείωσή τους και κατά συνέπεια την εμφάνιση υδρογονανθράκων.

Στα πολικά λιπίδια παρατηρείται αντίστοιχα σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της Φωσφατίδυλοχολίνης (PC), από 3.19 σε 2.37 mg/g Νωπής σάρκας και ταυτόχρονη εμφάνιση λύσο-Φωσφατίδυλοχολίνης (LPC) σε συγκέντρωση 0.18 mg/g Νωπής σάρκας.

Η λύσο-Φωσφατυδιλοχολίνη (LPC) προκύπτει από την υδρόλυση την ακυλομάδας στην θέση SN-1 της φωσφατίδυλοχολίνης.

Μαριναρισμένη σάρκα Γυαλιστερής

Κατά την διεργασία του μαριναρίσματος παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ($P<0.05$) της συγκέντρωσης των ουδέτερων λιπιδίων από 2.22 σε 2.85 και 3.86 mg/g Νωπής σάρκας, για τους 4 και 6 Μήνες συντήρησης αντίστοιχα. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($P<0.05$) στην αναλογία των πολικών λιπιδίων από 6.98 σε 4.95 και 5.34 mg/g Νωπής σάρκας, για τους 4 και 6 Μήνες συντήρησης αντίστοιχα.



Σχήμα 8: Σύγκριση πολικών και ουδέτερων λιπιδίων μετά την κατεργασία του μαριναρίσματος

Η ανάλυση των ουδέτερων λιπιδίων έδειξε σημαντική ($P<0.05$) αύξηση του ποσοστού των τριγλυκεριδίων σε σχέση με την νωπή σάρκα. Παράλληλα, μετά την κατεργασία, βρέθηκαν ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), τα οποία στους 6 μήνες συντήρησης αυξάνονται σημαντικά ($P<0.05$) ως προς τους 4 μήνες συντήρησης, από 0.12 σε 0.29 mg/g Νωπής σάρκας. Παράλληλα, η εμφάνιση μονογλυκεριδίων (MG) περίπου στην μισή ποσότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων (0.05 και 0.14 mg/g Νωπής σάρκας στους 4 και 6 μήνες αντίστοιχα) ενισχύει το συμπέρασμα ότι το περιεχόμενο οξικό οξύ στο διάλυμα του μαριναρίσματος προκαλεί υδρόλυση των εστερικών δεσμών μεταξύ της γλυκερίνης και των λιπαρών οξέων.

Πίνακας 9: Σύγκριση των Ολικών Λιπιδίων μεταξύ της νωπής, προβρασμένης και μαριναρισμένης Γυαλιστερής (mg/g Νωπής σάρκας)

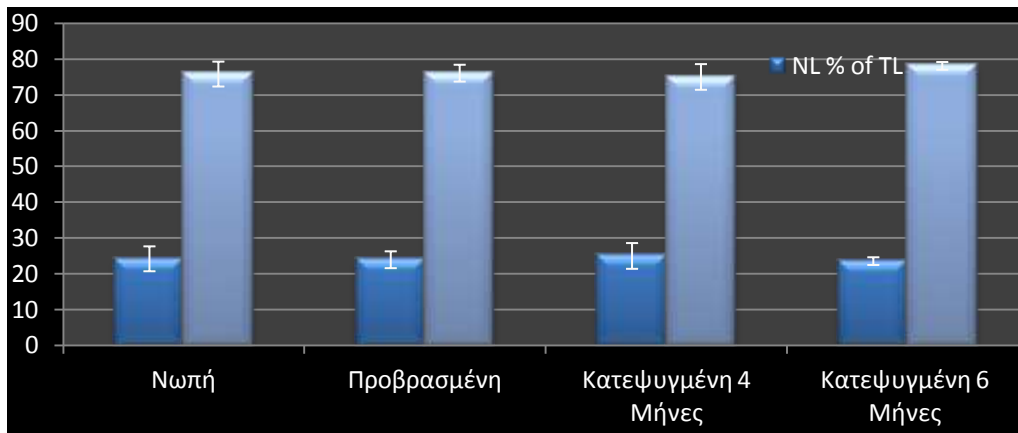
Δείγματα	Νωπή	Προβρασμένη	Μαριναρισμένη (4 Μήνες)	Μαριναρισμένη (6 Μήνες)
NL	2.22±0.03a	1.75±0.02b	2.85±0.02a	3.86±0.01c
HC	0.00±0.00a	0.07±0.00b	0.00±0.00a	0.00±0.00a
TG	1.21±0.03a	0.83±0.00b	1.68±0.03a	1.93±0.01b
FFA	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.12±0.00b	0.29±0.00c
Chol	1.02±0.02a	0.85±0.01b	0.98±0.01a	1.50±0.01c
MG	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.05±0.00b	0.14±0.00c
PL	6.98±0.04ac	5.55±0.02ab	4.95±0.20b	5.34±0.01c
PE	2.70±0.09a	2.20±0.01a	0.76±0.01b	0.62±0.00b
PnL	1.09±0.08ab	0.81±0.01a	1.44±0.02b	2.62±0.01c
PC	3.19±0.03a	2.37±0.00b	2.32±0.01b	3.61±0.03a
i-PC	0.00±0.00a	0.18±0.00b	0.44±0.00c	0.48±0.01c

γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Στα πολικά λιπίδια παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού της Φωσφατίδουλοαιθανολαμίνης (PE), στους 4 και 6 Μήνες αντίστοιχα. Εικάζεται ότι πιθανόν η μείωση αυτή να οφείλεται στην παρουσία του οξικού οξέως στο διάλυμα της άλμης. Τα φωσφονολιπίδια (PnL) φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά ($P<0.05$) και δεδομένου ότι είναι εξαιρετικά σταθερά, πιθανόν η αύξηση των ποσοστών της επί των ολικών λιπιδίων να οφείλεται στην μείωση των αντίστοιχων ποσοστών της PE. Η PC μειώνεται ελαφρώς μετά την κατεργασία του μαριναρίσματος, ενώ παρατηρείται εμφάνιση LPC στους 4 και 6 μήνες συντήρησης.

Κατεψυγμένη υπό κενό σάρκα Γυαλιστερής

Κατά την κατάψυξη υπό κενό δεν παρατηρήθηκε σημαντική ($P<0.05$) μεταβολή του συνόλου των ουδέτερων και πολικών λιπιδίων συγκριτικά με αυτά του ολικού λίπους της νωπής και προβρασμένης γυαλιστερής.



Σχήμα 9: Σύγκριση πολικών και ουδέτερων λιπιδίων μετά από κατάψυξη υπό κενό

Μετά από 4 μήνες κατάψυξης δεν βρέθηκε σημαντική μεταβολή στις συγκεντρώσεις των επιμέρους ουδετέρων και πολικών λιπιδίων, εκτός από την ανίχνευση ελεύθερων λιπαρών οξέων και μονογλυκεριδίων σε μικρές συγκεντρώσεις, γεγονός που πιθανόν σημαίνει έναρξη υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων. Σημαντική ελάττωση ($P < 0.05$) παρατηρήθηκε στο ποσοστό των τριγλυκεριδίων μετά από 6 μήνες κατάψυξης, συγκριτικά με αυτό στη νωπή γυαλιστερή. Παράλληλα βρέθηκε σημαντική αύξηση στο ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων και μονογλυκεριδίων, μετά από 6 μήνες κατάψυξης συγκριτικά με τη νωπή και την καταψυγμένη 4 μηνών γυαλιστερή, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σταδιακή υδρόλυση των τριγλυκεριδίων με την αύξηση του χρόνου κατάψυξης.

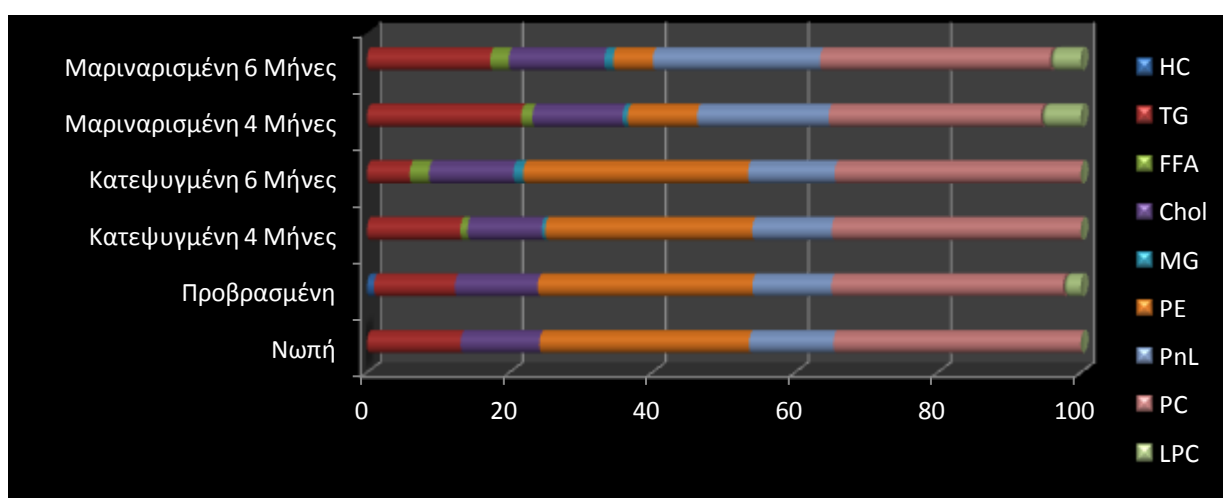
Πίνακας 10: Σύγκριση των Ολικών Λιπιδίων μεταξύ της νωπής, προβρασμένης και κατεψυγμένης Γυαλιστερής (mg/g Νωπής σάρκας)

Δείγματα	Νωπή	Προβρασμένη	Κατεψυγμένη (4 Μήνες)	Κατεψυγμένη (6 Μήνες)
NL	2.22±0.03a	1.75±0.02b	1.87±0.02b	1.91±0.01b
HC	0.00±0.00a	0.07±0.00b	0.00±0.00a	0.00±0.00a
TG	1.21±0.03a	0.83±0.00b	0.98±0.03b	0.49±0.02c
FFA	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.08±0.00b	0.22±0.00c
Chol	1.02±0.02a	0.85±0.01b	0.78±0.02b	0.96±0.01a
MG	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.04±0.00b	0.11±0.00c
PL	6.98±0.04a	5.55±0.02b	5.63±0.02b	6.33±0.01ab
PE	2.70±0.09a	2.20±0.01a	2.18±0.01a	2.55±0.01a
PnL	1.09±0.08a	0.81±0.01b	0.83±0.02b	0.98±0.01ab
PC	3.19±0.03a	2.37±0.00b	2.62±0.03ab	2.79±0.01ab
i-PC	0.00±0.00a	0.18±0.00b	0.00±0.00a	0.00±0.00a

γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P < 0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Η ανάλυση των πολικών λιπιδίων έδειξε μη σημαντικές ($P>0.05$) διακυμάνσεις στα ποσοστά των επιμέρους πολικών λιπιδίων μετά από 4 και 6 μήνες κατάψυξης, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στην αναλογική αύξηση των ποσοστών τους λόγω της σημαντικής ελάττωσης του ποσοστού των τριγλυκεριδίων.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους συντήρησης, παρατηρήθηκε και στις δύο μεθόδους εμφάνιση ελεύθερων λιπαρών οξέων και μονογλυκεριδίων. Στην διεργασία του μαριναρίσματος, στους 4 μήνες συντήρησης, βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα ($P<0.05$) FFA και MG σε σχέση με την κατάψυξη υπό κενό στους 4 μήνες κατάψυξης, ενώ στου 6 μήνες συντήρησης κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα.



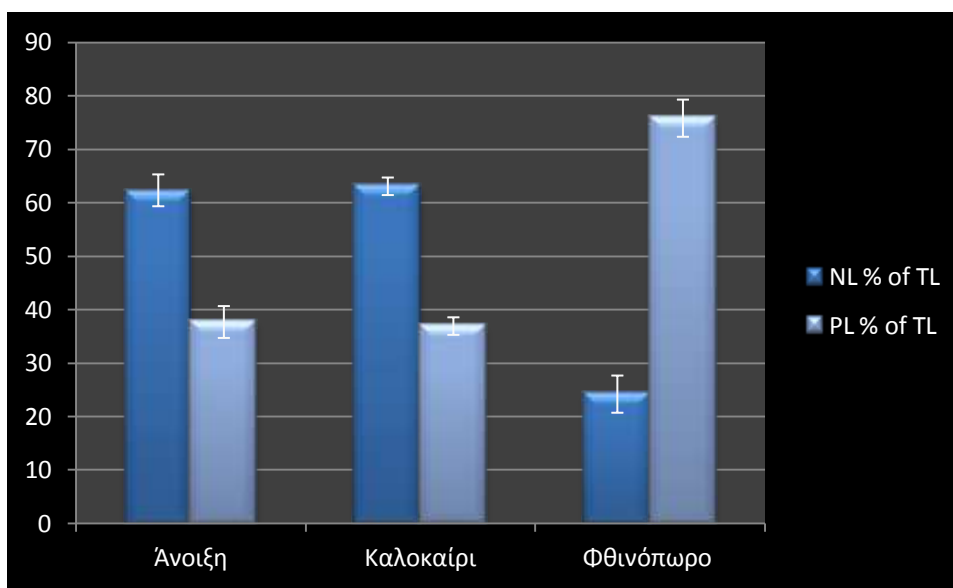
Σχήμα 10: Σύγκριση των επιδράσεων των μεθόδων συντήρησης στα λιπιδικά συστατικά

Η φωσφατιδυλοχολίνη δεν παρουσίασε σημαντική διακύμανση στην κατάψυξη, μειώθηκε όμως σημαντικά ($P<0.05$) στο μαρινάρισμα με παράλληλη εμφάνιση λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, ένδειξη που ενισχύει την υπόθεση της υδρόλυσης της φωσφατιδυλοχολίνης.

Τέλος κατά το μαρινάρισμα παρουσιάσθηκε σημαντική μείωση της φωσφατιδυλοαιθυλοδιαμίνης ($P<0.05$), ενώ κατά την κατάψυξη διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα με της νωπής.

Εποχιακή μεταβολή Γυαλιστερής

Στην μελέτη της εποχιακής μεταβολής, για τις εποχές Άνοιξη και Καλοκαίρι, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις στα ποσοστά των Ουδέτερων και Πολικών λιπιδίων. Στο δείγμα του φθινοπώρου, παρατηρήθηκε αναστροφή της αναλογίας ουδέτερων και πολικών λιπιδίων με τα πολικά να αγγίζουν το 75.82% ενώ τα ουδέτερα μόλις το 24.18%.



Όπως προαναφέρθηκε, τα ουδέτερα λιπίδια χρησιμοποιούνται κυρίως ως πηγή ενέργειας ενώ τα πολικά αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών δομών [122]. Ο κύκλος της αποθήκευσης ενέργειας, όπως και ο βιοχημικός κύκλος των δίθυρων μαλακίων σχετίζεται άμεσα με την αναπαραγωγική δραστηριότητά τους [124]. Σύμφωνα με τον Gabbott [125], οι εποχιακές μεταβολικές διεργασίες στα μαλάκια προκύπτουν ως αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ στην διαθεσιμότητα της τροφής, στις περιβαλλοντικές συνθήκες, στην ανάπτυξη και στον γαμετογονικό τους κύκλο. Γενικά, η ενέργεια αποθηκεύεται με την μορφή υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεΐνης πριν την γαμετογέννεση, παρουσία άφθονης τροφής. Το περιεχόμενο λίπος αυξάνεται κατά την ανάπτυξη των γονάδων την Άνοιξη και μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας το Καλοκαίρι, με την χαμηλότερη περιεκτικότητα να εντοπίζεται την περίοδο ηρεμίας το Φθινόπωρο. Λαμβάνοντας υπόψη όσα προαναφέρθηκαν, η αντιστροφή της αναλογίας Πολικών και Ουδέτερων λιπιδίων το Φθινόπωρο είναι λογική, καθώς τα ουδέτερα λιπίδια πιθανόν να έχουν χρησιμοποιηθεί από το δίθυρο για να καλύψει τις ενεργειακές του

ανάγκες κατά την ωτοκία το Καλοκαίρι, συνεπώς την περίοδο ηρεμίας (Φθινόπωρο) το ποσοστό των πολικών λιπιδίων εμφανίζεται κατά πολύ μεγαλύτερο ($P<0.05$) σε σχέση με τις άλλες εποχές.

Πίνακας 11: Σύσταση επιμέρους ουδέτερων και πολικών λιπιδίων % των ολικών λιπιδίων, σύγκριση εποχιακής μεταβολής. (mg/g Νωπής σάρκας)

Δείγματα	Νωπή Άνοιξης	Νωπή Καλοκαιριού	Νωπή Φθινοπώρου
NL	10.66±0.03b	15.52±0.02c	2.22±0.03a
TG	10.01±0.03b	12.63±0.01c	1.21±0.03a
Chol	0.65±0.01b	2.88±0.01c	1.02±0.02a
PL	6.44±0.03a	9.08±0.02b	6.98±0.04a
PE	2.87±0.1a	4.22±0.01b	2.70±0.09a
PnL	0.34±0.00b	1.39±0.00a	1.09±0.08a
PC	3.23±0.02b	3.48±0.00b	3.19±0.03b

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Τα παραπάνω συμπεράσματα ενισχύονται και από την διακύμανση του ποσοστού των τριγλυκεριδίων, τα οποία μειώνονται σημαντικά ($P<0.05$) από την Άνοιξη, στο Καλοκαίρι και το Φθινόπωρο, δεδομένου ότι τα τριγλυκερίδια είναι η κύρια πηγή ενέργειας ανάμεσα στα λιπιδικά συστατικά.

3.3.3 Λιπαρά οξέα

Νωπή Γυαλιστερή

Στο δείγμα της νωπής γυαλιστερής ταυτοποιήθηκαν 40 λιπαρά οξέα με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC-FID), από τα οποία κυρίαρχα είναι τα κορεσμένα (SFA) σε ποσοστό 43.67%, ακολουθούν τα πολυακόρεστα (PUFA) σε ποσοστό 38.73% και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) σε αναλογία 17.58% επί των ολικών λιπαρών οξέων. Οι αναλογίες των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων κυμαίνονται αναλόγως της εποχής, της διατροφής, της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος ύδατος, της ταξονομίας καθώς και από το στάδιο του αναπαραγωγικού κύκλου του διθύρου [126].

Πίνακας 12: Σύσταση λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, της νωπής γυαλιστερής σε σύγκριση με την προβρασμένη, μαριναρισμένη και κατεψυγμένη.

Λιπαρά Οξέα	Νωπή	Προβρασμένη	Μαριναρισμένη (4 μήνες)	Κατεψυγμένη (4 μήνες)	Μαριναρισμένη (6 μήνες)	Κατεψυγμένη (4 μήνες)
C14:0	3.30±0.28a	4.20±0.31ab	7.13±0.85c	4.75±0.43ab	7.33±0.02c	4.99±1.03b
C15:0	0.54±0.01a	0.73±0.05b	0.83±0.03c	0.70±0.03b	0.85±0.03c	0.78±0.02bc
C16:0	24.36±0.35a	28.22±0.47b	31.06±0.76c	26.51±0.15ab	32.08±0.35c	28.43±1.86b
iso-C16:0	0.44±0.02a	0.42±0.03a	0.51±0.19a	0.29±0.25a	0.34±0.05a	0.42±0.01a
iso-C17:0	0.78±0.04a	1.07±0.01bd	1.37±0.07cd	1.14±0.20d	1.50±0.01c	1.05±0.04bd
anteiso-C17:0	0.76±0.10a	1.09±0.03b	0.90±0.03ac	0.90±0.06ac	0.93±0.03c	1.09±0.05b
Cyclo- C17:0	1.09±0.17a	1.62±0.02b	0.66±0.04cd	0.88±0.03ac	0.63±0.03d	1.62±0.10b
C17:0	1.26±0.34a	1.87±0.03b	1.27±0.07a	1.44±0.07ab	1.40±0.10a	1.86±0.14b
C18:0	5.51±0.02abd	5.95±0.33b	4.10±0.39ce	4.83±0.27de	4.29±0.19ce	5.55±0.18ab
C19:0	1.09±0.01ac	1.18±0.01ad	0.87±0.10bc	1.18±0.10ad	0.91±0.01c	1.33±0.11d
C20:0	1.88±0.07a	1.50±0.04bc	1.41±0.23bc	1.70±0.01ac	1.23±0.03b	1.61±0.11ac
C21:0	0.34±0.03a	0.34±0.01a	0.33±0.03a	0.41±0.01b	0.34±0.03a	0.30±0.00a
C22:0	0.27±0.07a	0.00±0.00b	0.14±0.12ab	0.03±0.06b	0.11±0.02b	0.02±0.04b
C23:0	0.74±0.04a	0.65±0.04a	0.33±0.03b	0.63±0.08a	0.25±0.04b	0.73±0.10a
C24:0	1.33±0.05a	1.16±0.06a	0.74±0.09b	1.17±0.09a	0.63±0.08b	1.22±0.19a
Σω:0 (SFA)	43.68±1.01a	49.99±0.66bc	51.66±1.03b	46.57±0.68ac	52.83±0.58b	51.01±2.61b
C14:1	0.79±0.04a	1.01±0.12ab	1.10±0.18b	0.91±0.02ab	1.08±0.04b	1.12±0.10b

C15:1 ω-5	0.07±0.02a	0.00±0.00a	0.08±0.05a	0.00±0.00a	0.06±0.03a	0.08±0.05a
C16:1 ω-7 cis	4.43±0.35a	5.44±0.27a	10.73±1.06b	6.98±0.08c	12.22±0.49b	5.06±0.49a
C17:1 ω-7 cis	0.36±0.04ab	0.43±0.01b	0.24±0.03c	0.35±0.01a	0.28±0.05ac	0.49±0.03b
C18:1 ω-9 trans	0.20±0.04ab	0.27±0.04ab	0.34±0.03a	0.09±0.15b	0.30±0.05a	0.27±0.04ab
C18:1 ω-9 cis	10.06±1.09a	5.87±0.34b	8.78±1.18ac	6.29±0.18b	7.01±0.50bc	5.69±0.19b
C18:1 ω-7 cis	1.90±0.25a	1.62±0.02b	2.53±0.15c	2.10±0.12a	2.67±0.02c	1.60±0.07b
C20:1 ω-9 cis	0.68±0.01abc	0.64±0.01abc	0.51±0.08a	0.78±0.15b	0.49±0.01ac	0.80±0.12b
C22:1 ω-9 cis	2.28±0.11a	2.25±0.16a	1.05±0.09b	2.02±0.02a	0.93±0.06b	2.47±0.43a
C22:1 ω-11 cis	1.20±0.09a	1.06±0.05a	0.54±0.06b	0.95±0.03a	0.46±0.04b	1.20±0.23a
C24:1 ω-9 cis	0.04±0.08ab	0.00±0.00a	0.12±0.05b	0.00±0.00a	0.05±0.01ab	0.01±0.02a
Σω:1 (MUFA)	17.58±1.30a	13.14±0.16b	15.29±1.14c	13.48±0.19bc	13.34±0.44bc	13.72±0.45bc
C18:2 ω-6 cla	0.23±0.01a	0.10±0.09ab	0.13±0.01ab	0.05±0.08b	0.11±0.01ab	0.15±0.02ab
C18:2 ω-6 cis	3.45±0.41a	1.41±0.01bc	1.84±0.14b	1.71±0.03b	1.92±0.22b	1.15±0.08c
C18:3 ω-6 cis	0.34±0.03a	0.40±0.15a	0.36±0.07a	0.22±0.19a	0.35±0.01a	0.53±0.39a
C18:3 ω-3 cis	0.76±0.02a	0.54±0.02b	0.73±0.08a	0.74±0.02a	0.80±0.01a	0.44±0.06b
C18:4 ω-3 cis	0.38±0.08a	0.52±0.04abc	0.49±0.08abc	0.56±0.06bc	0.62±0.04c	0.45±0.06ab
C20:3 ω-6 cis	1.40±0.10a	1.53±0.08a	1.41±0.12a	1.75±0.01b	1.45±0.04a	1.53±0.02a
C20:4 ω-6 cis	0.25±0.01a	0.23±0.01a	0.28±0.02a	0.39±0.09b	0.30±0.01ab	0.24±0.02a
C20:3 ω-3 cis	3.22±0.06a	3.28±0.15a	1.92±0.19b	3.03±0.11a	2.08±0.16b	3.27±0.31a
C20:5 ω-3 cis	4.43±0.31a	4.77±0.06a	4.55±0.55a	5.94±0.018b	5.06±0.60ab	4.17±0.19a
C22:2 ω-6 cis	0.50±0.03ac	0.38±0.02ab	0.38±0.03ab	0.51±0.10c	0.37±0.02b	0.35±0.03b
C22:4 ω-6 cis	0.35±0.01ace	0.40±0.02abc	0.57±0.14bc	0.44±0.11c	0.01±0.01d	0.19±0.04de
C22:5 ω-6 cis	2.01±0.15a	1.73±0.17ab	0.61±0.07c	1.50±0.11b	0.72±0.11c	1.80±0.28ab
C22:5 ω-3 cis	1.78±0.01a	1.67±0.05a	0.91±0.07c	1.54±0.01a	0.76±0.09c	1.85±0.30a
C22:6 ω-3 cis	15.20±0.01a	14.44±0.48a	8.15±0.92b	14.58±0.42a	7.06±0.66b	14.10±1.54a
Σω:n (PUFA)	38.73±0.29a	36.87±0.82ab	33.05±1.83c	39.95±0.84a	33.82±1.01bc	35.28±2.27ac
MUFA/SFA	0.40±0.04a	0.26±0.00b	0.30±0.02b	0.29±0.00b	0.25±0.01b	0.27±0.02b
PUFA/SFA	0.89±0.01a	0.74±0.03b	0.64±0.05b	0.86±0.03a	0.64±0.03b	0.69±0.08b

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P < 0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% .

Στα SFA κυριαρχεί το Παλμιτικό οξύ (C16:0, 24.36 %) ακολουθούμενο από το Στεατικό (C18:0, 5.51%) και το Μυριστικό οξύ (C14:0, 3.30%). Σύμφωνα με τον παγκόσμιο

οργανισμό υγείας (World Health Organization) η κατανάλωση παλμιτικού οξέως αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων.[127]

Αντίστοιχα στα MUFA επικρατέστερα λιπαρά οξέα είναι το Ελαϊκό (C18:1 ω-9, 10.06%) και το Παλμιτολεϊκό οξύ (C16:1 ω-7, 4.43%). Η κατανάλωση Ελαϊκού οξέως σχετίζεται με την μείωση της Χαμηλής πυκνότητας σε λιποπρωτεΐνη Χοληστερόλης (LDL) και με την αύξηση της υψηλής πυκνότητας σε λιποπρωτεΐνες χοληστερόλη (HDL).[128] Επίσης, το Ελαϊκό οξύ θεωρείται υπεύθυνο για την μείωση της πίεσης του αίματος που προκαλείται από την κατανάλωση ελαιόλαδου.[129]

Τέλος, στα PUFA συναντάται σε μεγαλύτερη αναλογία το Εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ ή DHA (C22:6 ω-3, 15.20%), ακολουθούμενο από το Εικοσαπεντενοϊκό οξύ ή EPA (C20:5 ω-3, 4.43%) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2 ω-6, 3.45%). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα DHA και EPA είναι ευρέως διαδεδομένα στο λίπος των θαλασσινών. Σε μία μελέτη βρέθηκε ότι έλαια ψαριών με μεγαλύτερο ποσοστό σε DHA από EPA, ελαττώνουν τα επίπεδα των κυτοκινών που προκαλούν φλεγμονή, οι οποίες σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές και αυτοάνοσες ασθένειες.[130] Το DHA μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων [131], σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου του Αλτσχάιμερ [132] και της νόσου του Parkinson[133] και τέλος μπορεί να προστατεύσει θύματα εγκεφαλικού επεισοδίου από εγκεφαλική βλάβη και αναπηρία, καθώς επίσης συμβάλει στην ταχύτερη ανάκαμψη. Το EPA είναι το πιο σημαντικό απαραίτητο λιπαρό οξύ από την οικογένεια των ω-3, διότι είναι η πρόδρομη ένωση για όλα τα ω-3 εικοσανοειδή.[134]

Τα συνολικά ω-3 λιπαρά οξέα συνιστούν το 25.78% ενώ τα ω-6 λιπαρά οξέα το 8.30% επί των ολικών λιπαρών οξέων, με κυρίαρχα τα DHA και λινελαϊκό αντίστοιχα. Η μεταξύ τους αναλογία ω-3/ω-6 βρέθηκε περίπου ~3,05 και ως εκ τούτου χαρακτηρίζεται ως απολύτως επιθυμητή για την ανθρώπινη διατροφή. Επιπλέον βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη από την συνιστώμενη αναλογία για μια ισορροπημένη δίαιτα (0.25-1)[135], η οποία επιπλέον συμβάλει στην αντιμετώπιση πολλών χρόνιων νοσημάτων. [136]

Πίνακας 13: Σύσταση ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης.

Λιπαρά Οξέα	Νωπή	Προβρασμένη	Μαριναρισμένη (4 μήνες)	Κατεψυγμένη (4 μήνες)	Μαριναρισμένη (6 μήνες)	Κατεψυγμένη (4 μήνες)
C18:3 ω-3 cis	0.76±0.02a	0.54±0.02b	0.73±0.08a	0.74±0.02a	0.80±0.01a	0.44±0.06b
C18:4 ω-3 cis	0.38±0.08a	0.52±0.04abc	0.49±0.08abc	0.56±0.06bc	0.62±0.04c	0.45±0.06ab
C20:3 ω-3 cis	3.22±0.06a	3.28±0.15a	1.92±0.19b	3.03±0.11a	2.08±0.16b	3.27±0.31a
C20:5 ω-3 cis	4.43±0.31a	4.77±0.06a	4.55±0.55a	5.94±.018b	5.06±0.60ab	4.17±0.19a
C22:5 ω-3 cis	1.78±0.01a	1.67±0.05a	0.91±0.07c	1.54±0.01a	0.76±0.09c	1.85±0.30a
C22:6 ω-3 cis	15.20±0.01a	14.44±0.48a	8.15±0.92b	14.58±0.42a	7.06±0.66b	14.10±1.54a
Σω:3	25.78±0.46a	25.23±0.38a	16.75±1.65b	26.39±0.66a	16.37±1.53b	24.28±2.14a
C18:2 ω-6 <i>cla</i>	0.23±0.01a	0.10±0.09ab	0.13±0.01ab	0.05±0.08b	0.11±0.01ab	0.15±0.02ab
C18:2 ω-6 cis	3.45±0.41a	1.41±0.01bc	1.84±0.14b	1.71±0.03b	1.92±0.22b	1.15±0.08c
C18:3 ω-6 cis	0.34±0.03a	0.40±0.15a	0.36±0.07a	0.22±0.19a	0.35±0.01a	0.53±0.39a
C20:3 ω-6 cis	1.40±0.10a	1.53±0.08a	1.41±0.12a	1.75±0.01b	1.45±0.04a	1.53±0.02a
C20:4 ω-6 cis	0.25±0.01a	0.23±0.01a	0.28±0.02a	0.39±0.09b	0.30±0.01ab	0.24±0.02a
C22:2 ω-6 cis	0.50±0.03ac	0.38±0.02ab	0.38±0.03ab	0.51±0.10c	0.37±0.02b	0.35±0.03b
C22:4 ω-6 cis	0.35±0.01ace	0.40±0.02abc	0.57±0.14bc	0.44±0.11c	0.01±0.01d	0.19±0.04de
C22:5 ω-6 cis	2.01±0.15a	1.73±0.17ab	0.61±0.07c	1.50±0.11b	0.72±0.11c	1.80±0.28ab
Σω:6	8.30±0.52a	6.09±0.27bcd	5.44±0.18c	6.53±0.23d	5.12±0.04bc	5.79±0.62bcd
ω-3/ω-6	3.12±0.25a	4.15±0.12b	3.07±0.20a	4.04±0.06b	3.20±0.32a	4.20±0.19b

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Θερμικά επεξεργασμένη - Προβρασμένη Γουαλιστερή

Στο δείγμα της θερμικά επεξεργασμένης Γουαλιστερής ταυτοποιήθηκαν 40 λιπαρά οξέα. Τα SFA (49.99%) παραμένουν κυρίαρχα ακολουθούμενα από τα PUFA (36.87%) και τα MUFA (13.14%). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($P<0.05$) των MUFA και αύξηση των SFA με τις αντίστοιχες αναλογίες της νωπής Γουαλιστερής, ενώ παρατηρείται μια μικρή μείωση στα PUFA αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά.

Στα SFA κυρίαρχο λιπαρό οξύ εξακολουθεί να είναι το Παλμιτικό αγγίζοντας το 28.22 % των συνολικών λιπαρών οξέων, αυξημένο σημαντικά ($P<0.05$) ως προς το ποσοστό του στην νωπή σάρκα. Ακολουθούν το Στεατικό και το Μυριστικό οξύ με ποσοστά 5.95 και 4.20 των συνολικών λιπαρών οξέων, αντίστοιχα. Σημαντικές στατιστικά ($P<0.05$) διαφορές

παρατηρήθηκαν στα ποσοστά του Πενταδεκανοϊκού οξέος (C15:0) και του Βεχενικού οξέος (C22:0) μεταξύ της νωπής και θερμικά επεξεργασμένης Γυαλιστερής. Αξίζει να σημειωθεί ότι το Βεχενικό οξύ πιστεύεται πως αυξάνει τα επίπεδα της χοληστερόλης στον άνθρωπο.[137]

Από τα MUFA ξεχωρίζουν το Ελαϊκό (5.87%) και το Παλμιτολεϊκό (4.44%) οξύ. Το Ελαϊκό παραμένει κυρίαρχο στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, παρουσιάζει όμως στατιστικά ($P < 0.05$) σημαντική ελάττωση συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό του στη νωπή σάρκα. Από τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, σημαντική διαφορά παρουσιάζει μόνο το *cis*-βαξενικό οξύ (C18:1 ω -7).

Το DHA και το EPA παραμένουν τα κυρίαρχα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με 14.44 και 4.77% των ολικών λιπαρών οξέων. Σημαντική μείωση ($P < 0.05$) παρουσιάζεται μόνο στο ποσοστό του λινελαϊκού οξέος συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό του στη νωπή σάρκα.

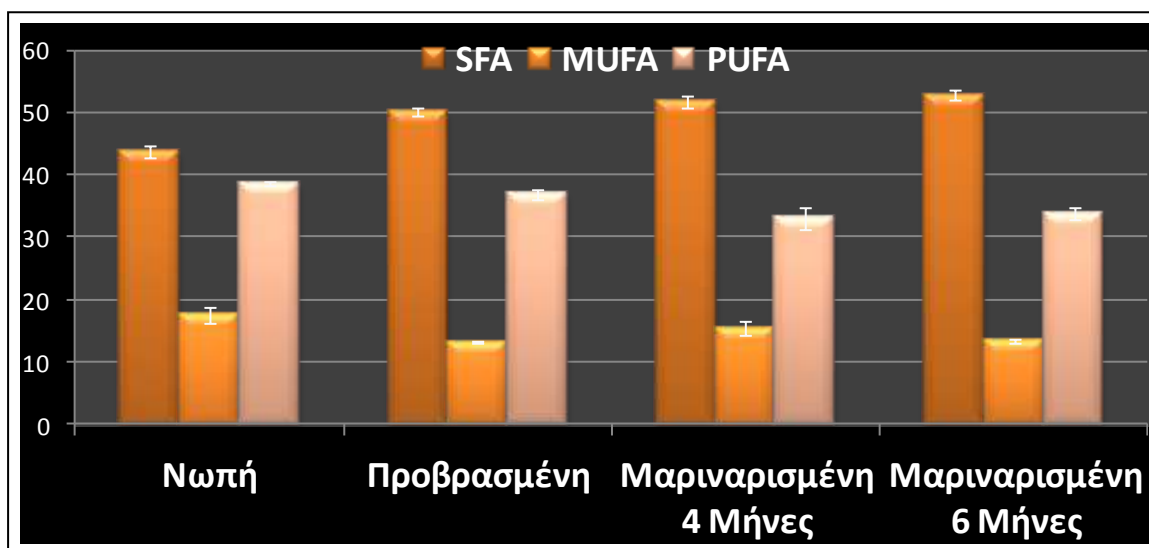
Τα συνολικά ω -3 λιπαρά οξέα συνιστούν το 25.23%, ενώ αντίστοιχα τα ω -6 το 6.09% των ολικών λιπαρών οξέων. Η αναλογία ω -3/ ω -6 βρέθηκε σημαντικά ($P < 0.05$) μεγαλύτερη από την αντίστοιχη αναλογία στο ολικό λίπος της νωπής σάρκας και πολλαπλάσια από τη συνιστώμενη αναλογία 0.25-1, που είναι όπως προαναφέρθηκε απαραίτητη για την πρόληψη και αντιμετώπιση πολλών χρόνιων νοσημάτων.

Συμπερασματικά, ο προβρασμός της νωπής σάρκας δεν προκαλεί σημαντικές μεταβολές στο προφίλ των λιπαρών οξέων. Απεναντίας αυξάνει σημαντικά ($P < 0.05$) και την αναλογία ω -3/ ω -6. Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπόψη και συνυπολογίζοντας την μείωση του πιθανού μικροβιακού φορτίου κατά την θερμικά επεξεργασία, ο προβρασμός αποτελεί αποδεκτό μέσο συντήρησης.

Μαριναρισμένη σάρκα Γυαλιστερής

Στην μαριναρισμένη σάρκα της Γυαλιστερής ταυτοποιήθηκαν 40 λιπαρά οξέα. Τα SFA διατηρούν την πρώτη θέση και παρατηρείται σημαντική ($P < 0.05$) αύξηση των ποσοστών σε σχέση με το λίπος της νωπής και προβρασμένης σάρκας, αποτελώντας πάνω από το 50% των ολικών λιπαρών οξέων. Επιπλέον αυξανόμενου του χρόνου συντήρησης τους, στους 4 και 6 μήνες, παρατηρείται μια μικρή αύξηση στα ποσοστά των SFA από 51.66% σε 52.83% επί των ολικών λιπαρών οξέων. Ακολουθούν τα PUFA με ποσοστό 33.05% και 33.82% για τους δύο χρόνους συντήρησης αντίστοιχα, εμφανώς μειωμένα σε σχέση με την Προβρασμένη και την νωπή. Τέλος, σε μικρότερο ποσοστό εμφανίζονται τα MUFA

15.29% στους 4 μήνες και 13.34% στους 6 μήνες συντήρησης, με στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P<0.05$) με τα αντίστοιχα ποσοστά της νωπής (17.58%).



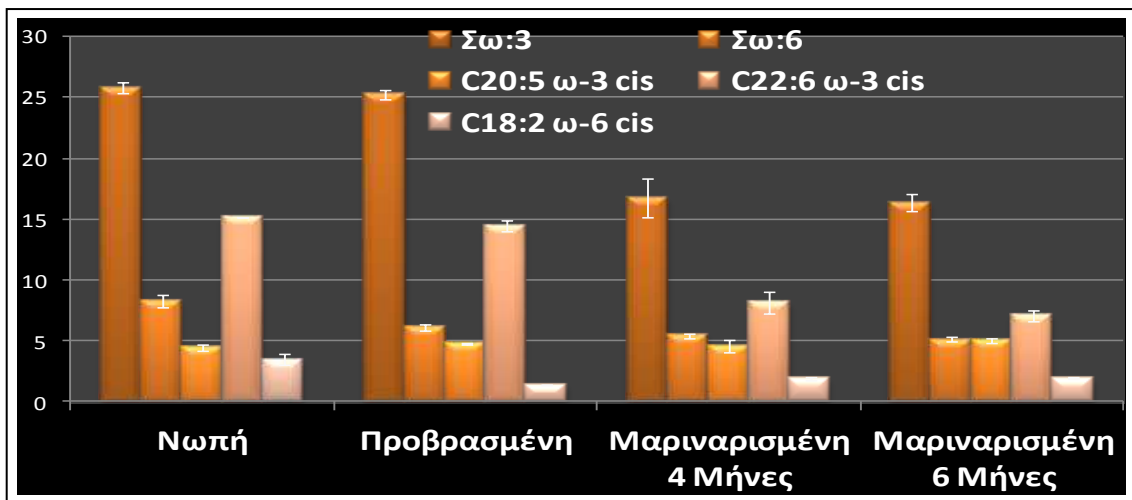
Σχήμα 11: Αναλογίες Ακόρεστων (SFA), Μονοακόρεστων (MUFA) και Πολυακόρεστων (PUFA) Λιπαρών Οξέων, μετά από μαρινάρισμα

Παρατηρείται ότι το μαρινάρισμα επιφέρει σημαντική μείωση στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και κατά συνέπεια αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Δεδομένου ότι η σάρκα της μαριναρισμένης γυαλιστερής δεν είχε άμεση επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, καθώς διατηρούταν εμβαπτισμένη στο διάλυμα άλμης, πιθανολογείται ότι το οξικό οξύ συνέβαλε στην μείωση των επιπέδων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και κατά συνέπεια αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω προαγωγής οξειδώσεων των διπλών δεσμών των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

Το Παλμιτικό οξύ κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό στα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ακολουθούμενο από το Μυριστικό οξύ και το Στεατικό οξύ. Παρουσιάζεται σημαντική μείωση ($P<0.05$) στο ποσοστό του Στεατικού οξέος και σημαντική αύξηση ($P<0.05$) στο ποσοστό του Μυριστικού οξέος, ως προς την νωπή και Προβρασμένη σάρκα, καθιστώντας το Στεατικό οξύ τρίτο σε ποσοστό επί του ολικού λίπους, έναντι της δεύτερης θέσης που κατείχε στην νωπή. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0.05$) παρουσιάζουν επίσης το iso-Μαργαρικό οξύ (iso-C17:0), το Πενταδεκυλικό οξύ (C15:0) και το Βεξενικό οξύ (C22:0) ως προς την νωπή σάρκα.

Στα Μονοακόρεστα το Ελαϊκό και το Παλμιτελαϊκό οξύ κυριαρχούν, με το Ελαϊκό οξύ να έχει μειωθεί ελαφρώς σε σχέση με της νωπής σάρκας, ενώ παρατηρείται σημαντική

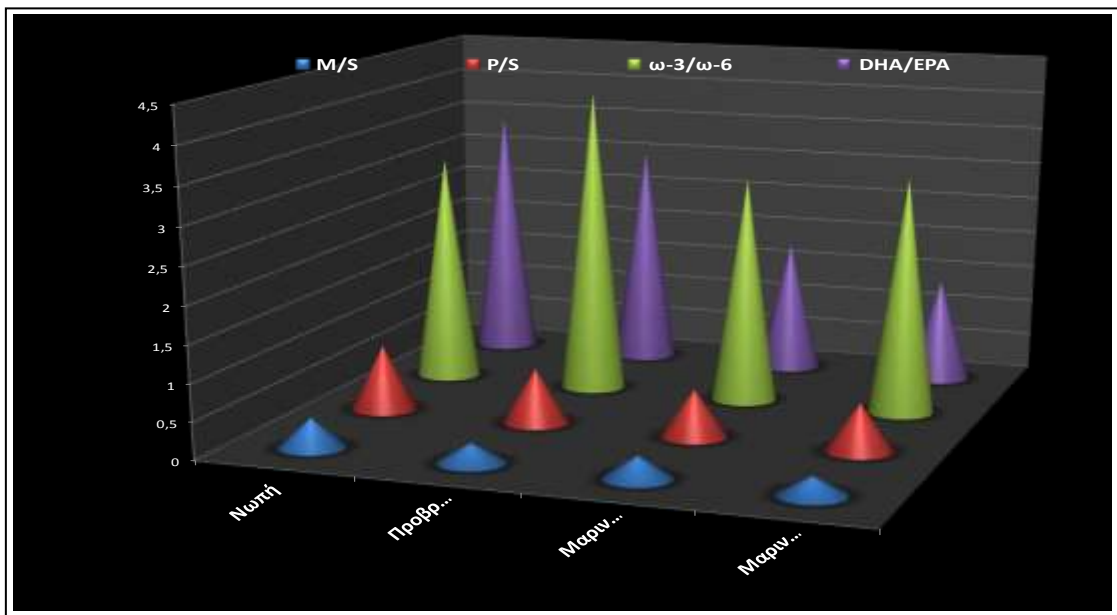
αύξηση ($P<0.05$) του Παλμιτελαϊκού οξέος, το οποίο αυξάνεται αυξανόμενου του χρόνου συντήρησης, από τους 4 στους 6 μήνες.



Σχήμα 12: Αναλογίες συνολικών ω-3, συνολικών ω-6, DHA (C22:6 ω-3), EPA (C20:5 ω-3) και λινελαϊκού οξέως (C18:2 ω-6) μετά από την διεργασία του μαριναρίσματος

Στα PUFA το DHA διατηρεί την κυρίαρχη σημαντικά μειωμένο ($P<0.05$) ως προς την νωπή και την Προβρασμένη σάρκα. Το EPA παραμένει σταθερό και κατά την διεργασία του μαριναρίσματος. Σημαντική διαφορά ($P<0.05$) παρουσιάζει μόνο το ποσοστό του C22:5 ω-6 ως το αντίστοιχο ποσοστό του στην Προβρασμένη και την νωπή.

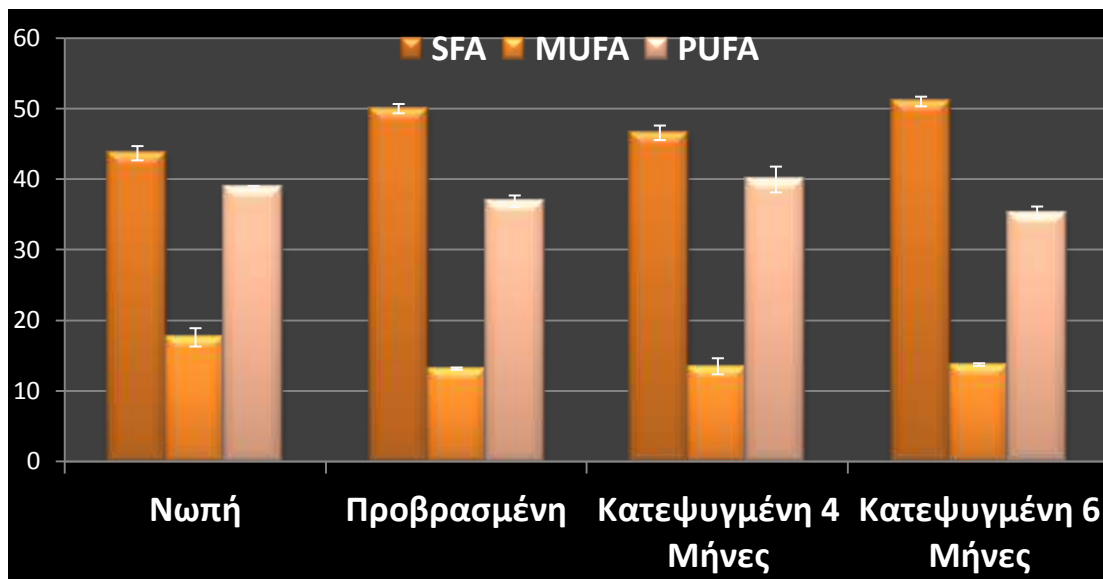
Τα συνολικά ω-3 και ω-6 παρουσιάζονται σημαντικά μειωμένα ως προς την νωπή και Προβρασμένη σάρκα, η αναλογία ω-3/ω-6 όμως είναι περίπου στο 3:1, άνω του επιθυμητού 0.25-1 και ελαττωμένη σημαντικά ($P<0.05$) ως προς την αντίστοιχη αναλογία της προβραρισμένης σάρκας. Έχει διαπιστωθεί ότι αναλογία PUFA/SFA άνω του 0.45 καθώς και τιμές PI 80-90 μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων καθώς και τον κίνδυνο οξειδωτικού στρες. [138] Στην νωπή παρατηρείται αναλογία PUFA/SFA 0.89 ενώ παρατηρείται σημαντική μείωση ($P<0.05$) κατά τον προβρασμό (0,74) και το μαρινάρισμα (0.64), αποτέλεσμα της μείωσης των ποσοστών των MUFA και της αύξησης των SFA. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα δεν επιρρεάζουν άμεσα το προφίλ των λιποπρωτεϊνών στον ορό του αίματος, παρόλα ταύτα αναλογία 1-1.5 MUFA/SFA είναι επιθυμητή.[139] Στις νωπές γυαλιστερές βρέθηκε αναλογία MUFA/SFA 0.40, ενώ παρατηρείται σημαντική μείωση ($P<0.05$) κατά τον προβρασμό (0.26) και το μαρινάρισμα (0.30 και 0.25).



Σχήμα 13: Αναλογίες MUFA/SFA, PUFA/SFA, ω-3/ω-6, DHA/EPA μετά την διεργασία του μαρινarίσματος

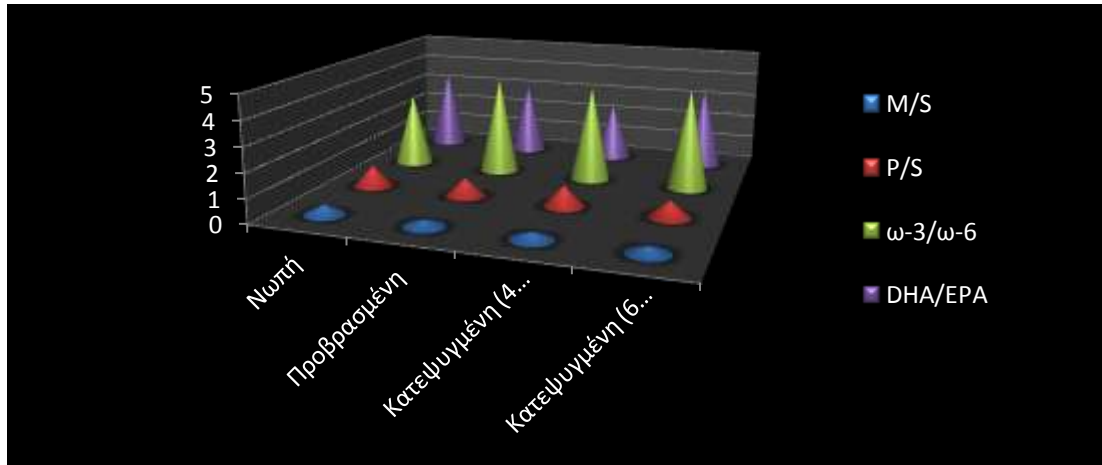
Κατεψυγμένη υπό κενό σάρκα Γαλιστερής

Στην κατεψυγμένη σάρκα γαλιστερής στους 4 και 6 μήνες ταυτοποιήθηκαν 40 λιπαρά οξέα. Τα SFA διατηρούν την κυρίαρχη θέση με 46.57% και 51.01% στους 4 και 6 μήνες αντίστοιχα. Τα PUFA ακολουθούν με 39.95 % και 35.28%, ενώ τα MUFA καταλαμβάνουν την τελευταία θέση με 13.48% και 13.72% επί του ολικού λίπους. Παρατηρείται ότι με αύξηση του χρόνου συντήρησης από τους 4 μήνες στους 6 μήνες, τα ποσοστά των πολυακόρεστων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων επιδέχονται μια όχι σημαντική μείωση ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μία σημαντική αύξηση ($P < 0.05$) στους 6 Μήνες συντήρησης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε οξειδώσεις των λιπαρών οξέων κατά την παραμονή τους στην κατάψυξη υπό κενό.



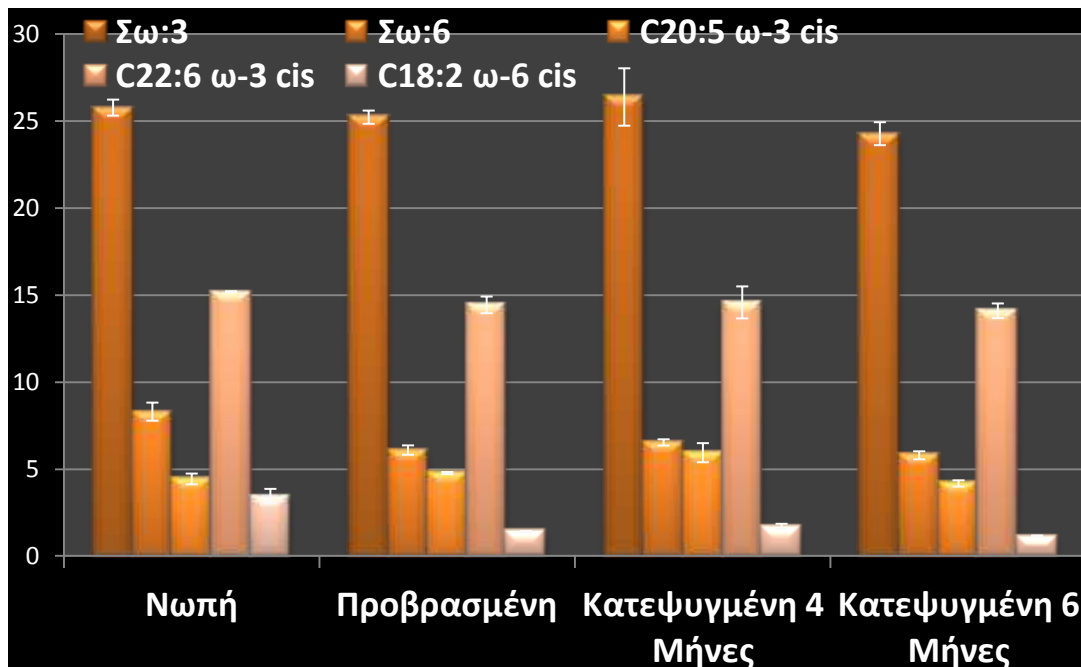
Σχήμα 14: Αναλογίες Ακόρεστων (SFA), Μονοακόρεστων (MUFA) και Πολυακόρεστων (PUFA) Λιπαρών Οξέων, μετά από Κατάψυξη υπό κενό

Στα ακόρεστα λιπαρά οξέα το Παλμιτικό οξύ κυριαρχεί με ποσοστά 26.51% και 28.43% επί των ολικών λιπαρών οξέων στους 4 και 6 μήνες αντίστοιχα, ενώ το Μυριστικό και το Στεατικό κυμαίνονται στα ίδια ποσοστά (~4%). Παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση ($P<0.05$) του ποσοστού του Παλμιτικού οξέως σε σχέση με την νωπή σάρκα, είναι όμως και σημαντικά μικρότερο ($P<0.05$) από τα αντίστοιχα ποσοστά στην μαριναρισμένη σάρκα. Από τα μονοακόρεστα, στους 4 μήνες συντήρησης στην κατάψυξη, ξεχωρίζουν το Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1 ω-7 cis) με 6.97% επί των ολικών λιπαρών οξέων και σε μικρότερο ποσοστό το Βαξενικό οξύ (C18:1 ω-9 cis) με 6.29% επί των ολικών λιπαρών οξέων. Αντίστοιχα, στους 6 μήνες το Βαξενικό οξύ (C18:1 ω-9 cis) παραμένει στα ίδια επίπεδα ενώ το Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1 ω-7 cis) μειώθηκε σημαντικά ($P<0.05$) σε 5.06%. Στα πολυακόρεστα το DHA και το EPA κρατούν τις κυρίαρχες θέσεις, με αναλογίες 14.59% και 14.10% για το DHA και 5.94% και 4.17% για το EPA στους 4 και 6 μήνες αντίστοιχα. Σημαντική διαφορά ($P<0.05$) ως προς τις αντίστοιχες αναλογίες της προβρασμένης σάρκας παρατηρούνται μόνο στο EPA σε συντήρηση υπό κατάψυξη στους 4 Μήνες.



Σχήμα 15: Αναλογίες MUFA/SFA, PUFA/SFA, ω -3/ ω -6, DHA/EPA μετά την διεργασία του μαριναρίσματος

Τα ω -3 και ω -6 λιπαρά οξέα παρουσιάζουν μείωση με την αύξηση του χρόνου συντήρησης, από 26.39% σε 24.28% και από 6.53% σε 5.79% αντίστοιχα, χωρίς να παρουσιάζουν όμως σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) από την προβρασμένη σάρκα γαλιστερής. Ο μεταξύ τους λόγος ω -3/ ω -6 κυμαίνεται άνω του επιθυμητού επιπέδου (0.25 – 1), περίπου ~4.0 .



Σχήμα 16: Αναλογίες συνολικών ω -3, συνολικών ω -6, DHA (C22:6 ω -3), EPA (C20:5 ω -3) και λινελαϊκού οξέως (C18:2 ω -6) μετά από την διεργασία της κατάψυξης υπό κενό

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους συντήρησης της σάρκας Γυαλιστερής, μαρινάρισα και κατάψυξη υπό κενό, παρατηρείται ότι η κατάψυξη επιτυγχάνει καλύτερη συντήρηση των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, αυξανόμενου του χρόνου συντήρησης. Τα ποσοστά των DHA και EPA διατηρούνται στα επίπεδα της προβρασμένης κατά την κατάψυξη υπό κενό στους 4 μήνες, επιδέχονται όμως μείωση στους 6 μήνες συντήρησης. Αντιθέτως, στο μαρινάρισα παρατηρείται σημαντική μείωση μόνο στο DHA ως προς την προβρασμένη, στους 4 και 6 μήνες συντήρησης. Σημαντική διαφορά παρουσιάζεται στον λόγο ω-3/ω-6, όπου παρατηρείται ότι κατά το μαρινάρισα η αναλογία είναι μικρότερη της από της κατεψυγμένης, διατηρείται όμως ανώτερη της επιθυμητής 0.25-1. Λαμβάνοντας υπόψη τις μεταβολές στα λιπαρά οξέα και στους δείκτες ποιότητας λαδιού, η κατάψυξη υπό κενό φαίνεται να είναι ιδανικός τρόπος βραχυχρόνιας (4 μήνες) συντήρησης για την σάρκα της γυαλιστερής, ενώ το μαρινάρισα φαίνεται να είναι ιδανικό για μεγαλύτερους χρόνους συντήρησης (6 μήνες). Απαιτείται περαιτέρω έρευνα ως προς την επίτευξη ασφάλειας (микροβιολογικό φορτίο, ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών) κατά τις δύο μεθόδους συντήρησης, όπως επίσης και οργανοληπτικό έλεγχο για την διαπίστωση αποδοχής από το πιθανό αγοραστικό κοινό.

Εποχιακή μεταβολή Γυαλιστερής

Στα νωπά δείγματα γυαλιστερής στις εποχές Άνοιξης (Απρίλιος), Καλοκαιριού (Ιούνιος) και Φθινοπώρου (Οκτώβριος) ταυτοποιήθηκαν 40 λιπαρά οξέα.

Πίνακας 14: Σύσταση λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, σύγκριση εποχών συγκομιδής.

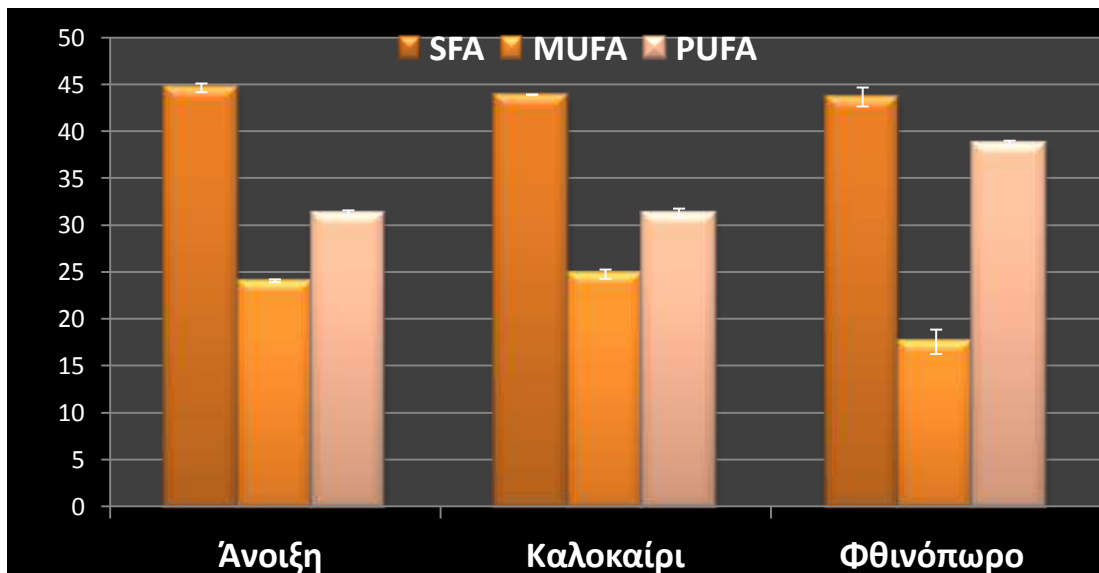
Λιπαρά Οξέα	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο
C14:0	10.61±0.28b	6.99±0.06c	3.30±0.28a
C15:0	0.30±0.03b	0.36±0.01c	0.54±0.01a
C16:0	24.34±0.19b	25.82±0.22c	24.36±0.35a
iso-C16:0	0.53±0.67b	0.71±0.08c	0.44±0.02a
iso-C17:0	0.72±0.08a	0.75±0.01a	0.78±0.04a
anteiso-C17:0	0.24±0.02b	0.00±0.00c	0.76±0.10a

Cyclo- C17:0	0.24±0.04b	0.69±0.03c	1.09±0.17a
C17:0	0.70±0.04b	0.77±0.02ab	1.26±0.34a
C18:0	2.66±0.06b	3.34±0.26c	5.51±0.02a
C19:0	0.72±0.03b	0.70±0.05b	1.09±0.01a
C20:0	1.20±0.06b	1.34±0.14b	1.88±0.07a
C21:0	1.20±0.04b	0.95±0.09c	0.34±0.03a
C22:0	0.07±0.06b	0.19±0.06ab	0.27±0.07a
C23:0	0.12±0.02b	0.20±0.01c	0.74±0.04a
C24:0	1.01±0.08b	1.11±0.09b	1.33±0.05a
Σω:0 (SFA)	44.66±0.46a	43.91±0.04a	43.68±1.01a
C14:1	0.82±0.06a	0.89±0.03a	0.79±0.04a
C15:1 ω-5	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.07±0.02a
C16:1 ω-7 cis	16.02±0.02b	15.23±0.75b	4.43±0.35a
C17:1 ω-7 cis	0.18±0.04b	0.28±0.02c	0.36±0.04a
C18:1 ω-9 trans	0.24±0.02a	0.28±0.03a	0.20±0.04ab
C18:1 ω-9 cis	2.34±0.04b	2.85±0.11b	10.06±1.09a
C18:1 ω-7 cis	2.81±0.13b	3.26±0.06c	1.90±0.25a
C20:1 ω-9 cis	0.68±0.06a	0.70±0.05a	0.68±0.01a
C22:1 ω-9 cis	0.50±0.01b	0.67±0.01c	2.28±0.11a
C22:1 ω-11 cis	0.50±0.06b	0.63±0.04b	1.20±0.09a
C24:1 ω-9 cis	0.00±0.00a	0.01±0.02a	0.04±0.08ab
Σω:1 (MUFA)	24.08±0.15b	24.79±0.49b	17.58±1.30a
C18:2 ω-6 cla	0.13±0.01b	0.12±0.02b	0.23±0.01a
C18:2 ω-6 cis	0.87±0.02b	1.02±0.08b	3.45±0.41a
C18:3 ω-6 cis	0.30±0.06a	0.19±0.01b	0.34±0.03a
C18:3 ω-3 cis	0.96±0.08b	0.84±0.09ab	0.76±0.02a
C18:4 ω-3 cis	2.03±0.01b	1.29±0.04c	0.38±0.08a
C20:3 ω-6 cis	1.19±0.02b	1.33±0.07ab	1.40±0.10a
C20:4 ω-6 cis	0.41±0.06b	0.40±0.03b	0.25±0.01a
C20:3 ω-3 cis	1.15±0.03b	1.68±0.02c	3.22±0.06a
C20:5 ω-3 cis	14.81±0.31b	13.19±0.11c	4.43±0.31a
C22:2 ω-6 cis	0.64±0.02b	0.57±0.02c	0.50±0.03a

C22:4 ω-6 cis	0.16±0.02b	0.10±0.01c	0.35±0.01a
C22:5 ω-6 cis	0.45±0.01b	0.60±0.03b	2.01±0.15a
C22:5 ω-3 cis	0.29±0.01b	0.37±0.02c	1.78±0.01a
C22:6 ω-3 cis	7.87±0.09b	6.91±0.25c	15.20±0.01a
Σω:n (PUFA)	31.26±0.33b	31.30±0.48b	38.73±0.29a
MUFA/SFA	0.54±0.01ab	0.56±0.01b	0.50±0.03a
PUFA/SFA	0.70±0.01b	0.71±0.01b	0.79±0.02a

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

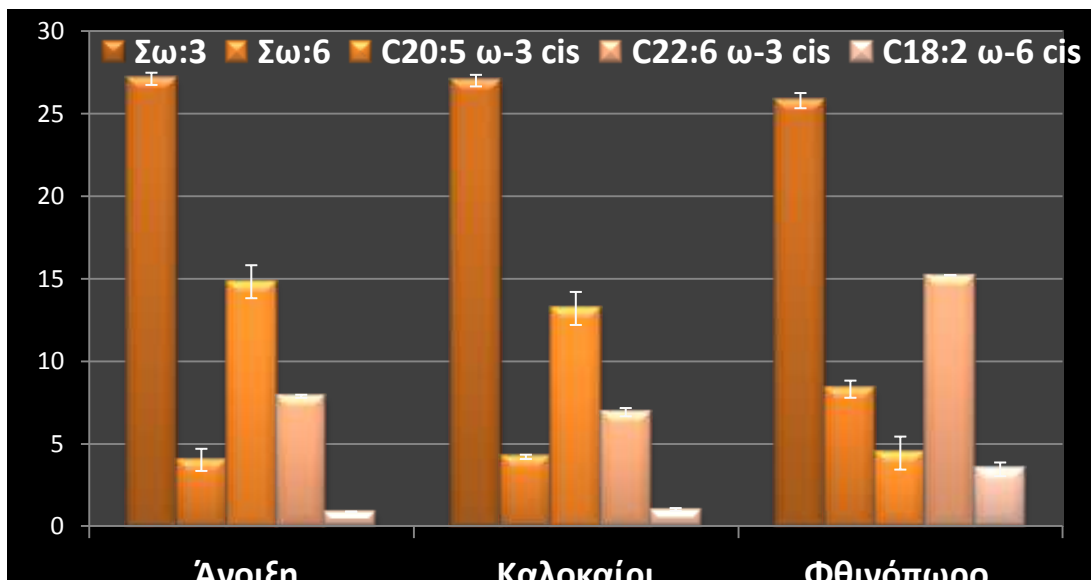
Σε όλα τα δείγματα κυριαρχούν τα SFA, ακολουθούμενα απο τα PUFA και τα MUFA. Στα SFA ξεχωρίζουν το Παλμιτικό οξύ, το Μυριστικό οξύ και το Στεατικό οξύ.



Σχήμα 17: Αναλογίες Ακόρεστων (SFA), Μονοακόρεστων (MUFA) και Πολυακόρεστων (PUFA) Λιπαρών Οξέων, κατά τις εποχές του Έτους

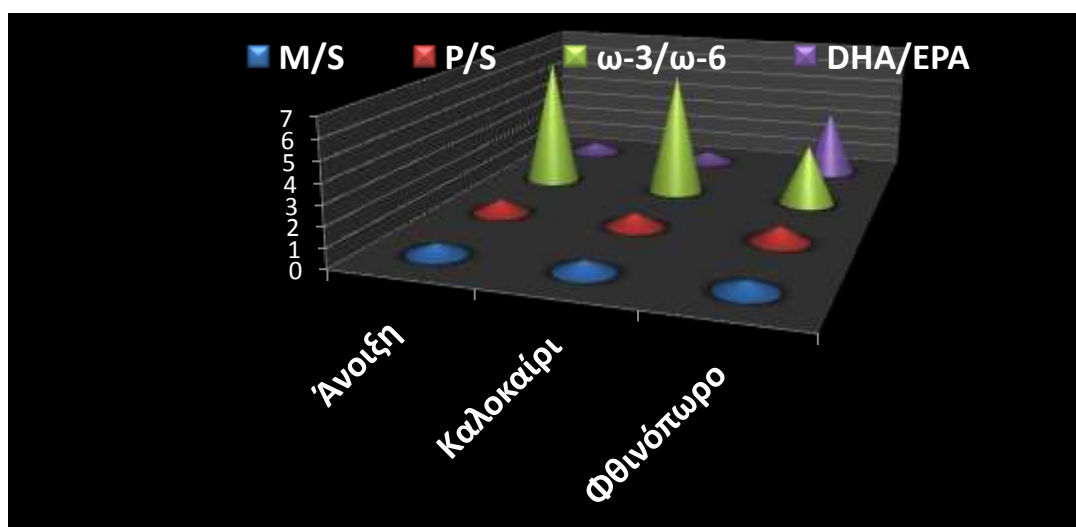
Το μυριστικό οξύ παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ($P<0.05$) μεταξύ των εποχών και φαίνεται να μειώνεται από την άνοιξη προς το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Το Ελαϊκό (C18:1 ω-9 cis) και το Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1 ω-7 cis) κυριαρχούν ανάμεσα στα MUFA σε όλα τα δείγματα. Παρουσιάζονται όμως σημαντικές διαφορές ($P<0.05$) μεταξύ των εποχών, με το ποσοστό του Ελαϊκού οξέως να αυξάνεται σημαντικά και το ποσοστό του Παλμιτελαϊκού οξέως να μειώνεται σημαντικά ($P<0.05$) το Φθινόπωρο. Το DHA και το EPA ξεχωρίζουν στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των νωπών δειγμάτων. Το ποσοστό του EPA

παρουσιάζει σημαντική μείωση ($P < 0.05$) από ~15.00% την άνοιξη σε ~4.00% το Φθινόπωρο, ενώ το DHA αυξάνεται σημαντικά ($P < 0.05$) από ~8.00% την άνοιξη σε ~15.00% το Φθινόπωρο.



Σχήμα 18: Αναλογίες συνολικών ω-3, συνολικών ω-6, DHA (C22:6 ω-3), EPA (C20:5 ω-3) και λινελαϊκού οξέως (C18:2 ω-6) κατά τις εποχές του Έτους

Τα ω-3 λιπαρά οξέα παρουσιάζουν σημαντική μείωση τον Οκτώβριο, ενώ αντιθέτως τα ω-6 λιπαρά οξέα εμφανίζουν σημαντική αύξηση ($P < 0.05$). Η αναλογία ω-3/ω-6 ξεπέρασε κατά πολύ το επιθυμητό 0.25 - 1 τις εποχές Άνοιξη (6.74) και Καλοκαίρι (6.43), ενώ το φθινόπωρο η αναλογία μειώνεται σημαντικά ($P < 0.05$) σε 3.12.



Σχήμα 19: Αναλογίες MUFA/SFA, PUFA/SFA, ω-3/ω-6, DHA/EPA κατά τις εποχές του Έτους

Πίνακας 15: Σύσταση ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων % των ολικών λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων, σύγκριση εποχών συγκομιδής.

Λιπαρά Οξέα	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο
C18:3 ω-3 cis	0.96±0.08b	0.84±0.09ab	0.76±0.02a
C18:4 ω-3 cis	2.03±0.01b	1.29±0.04c	0.38±0.08a
C20:3 ω-3 cis	1.15±0.03b	1.68±0.02c	3.22±0.06a
C20:5 ω-3 cis	14.81±0.31b	13.19±0.11c	4.43±0.31a
C22:5 ω-3 cis	0.29±0.01b	0.37±0.02c	1.78±0.01a
C22:6 ω-3 cis	7.87±0.09b	6.91±0.25c	15.20±0.01a
Σω:3	27.10±0.37b	26.99±0.35b	25.78±0.46a
C18:2 ω-6 cla	0.13±0.01b	0.12±0.02b	0.23±0.01a
C18:2 ω-6 cis	0.87±0.02b	1.02±0.08b	3.45±0.41a
C18:3 ω-6 cis	0.30±0.06a	0.19±0.01b	0.34±0.03a
C20:3 ω-6 cis	1.19±0.02b	1.33±0.07ab	1.40±0.10a
C20:4 ω-6 cis	0.41±0.06b	0.40±0.03b	0.25±0.01a
C22:2 ω-6 cis	0.64±0.02b	0.57±0.02c	0.50±0.03a
C22:4 ω-6 cis	0.16±0.02b	0.10±0.01c	0.35±0.01a
C22:5 ω-6 cis	0.45±0.01b	0.60±0.03b	2.01±0.15a
Σω:6	4.02±0.67b	4.20±0.13b	8.30±0.52a
ω-3/ω-6	6.74±0.19b	6.43±0.11b	3.12±0.25a

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P < 0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

3.3.4 Καροτενοειδή

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ολικών καροτενοειδών, εκφρασμένα ως mg Ασταξανθίνης, Κανθαξανθίνης ή Λουτεΐνης ανά g λίπους, στα δείγματα της σάρκας της γυαλιστερής, παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις ($P<0.05$) στα ολικά καροτενοειδή μετά την κατεργασία του μαριναρίσματος. Κατά την κατάψυξη υπό κενό τα ολικά καροτενοειδή παρουσίασαν μια μικρή αύξηση σε σχέση με την προβρασμένη.

Πίνακας 16: mg Καροτενοειδών ανά g λίπους, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης

Καροτενοειδή	Νωπή	Προβρασμένη	Μαριναρισμένη (4 Μήνες)	Κατεψυγμένη (4 Μήνες)	Μαριναρισμένη (4 Μήνες)	Κατεψυγμένη (6 Μήνες)
Ασταξανθίνη	1.00±0.19a	0.79±0.08ac	0.37±0.06b	0.69±0.16abc	0.56±0.06bc	0.85±0.10ac
Κανθαξανθίνη	1.00±0.09a	0.79±0.07a	0.35±0.08b	0.75±0.21a	0.25±0.03b	0.84±0.11a
Λουτεΐνη	0.76±0.15a	0.61±0.07a	0.31±0.02b	0.58±0.15ab	0.81±0.11a	0.73±0.10a

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Η επιμέρους ανάλυση των καροτενοειδών έδειξε σημαντικές μεταβολές κατά το μαρινάρισμα. Η Ασταξανθίνη παρουσιάζει μια μικρή αύξηση στους 4 Μήνες συντήρησης, από 0.21 mg σε 0.23 mg ανά g λίπους, ενώ παρουσιάζει σημαντική αύξηση ($P<0.05$) στους 6 Μήνες συντήρησης (0.25 mg/g λίπους). Η Κανθαξανθίνη μειώνεται σημαντικά ($P<0.05$) από 0.29 mg σε 0.12 mg ανά g λίπους στους 4 Μήνες, ενώ στους 6 Μήνες συντήρησης δεν ανιχνεύεται. Τα Καροτενοειδή Λουτεΐνη, Ζεαξανθίνη, Κρυπτοξανθίνη και β-καροτένιο δεν ανιχνεύονται μετά την κατεργασία του μαριναρίσματος, αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα οξέα προκαλούν την ισομερίωση των Καροτενοειδών από all-trans στην cis δομή τους οι οπαίες είναι βιολογικά λιγότερο δραστικές και απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος [140].

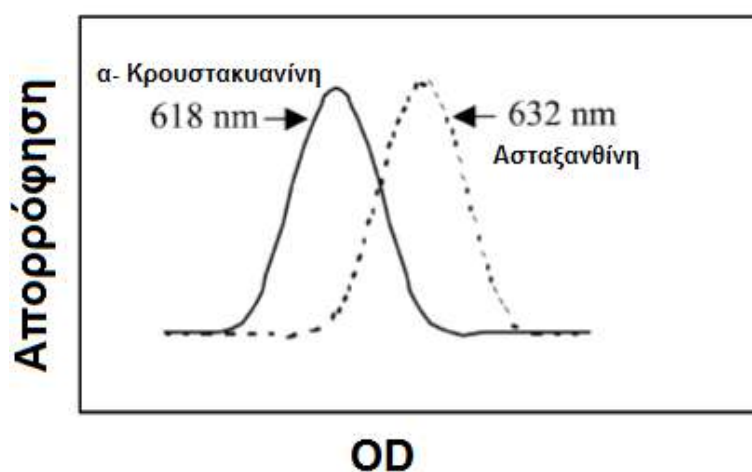
Κατά την κατάψυξη υπό κενό παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ($P<0.05$) στην ποσότητα της Ασταξανθίνης, από 0.21 mg, σε 0.42 mg ανά g λίπους στους 4 Μήνες και 0.50 mg ανά g λίπους στους 6 Μήνες παραμονής στην κατάψυξη. Η Κανθαξανθίνη μειώνεται σημαντικά ($P<0.05$) κατά την κατάψυξη από 0.29 mg, σε 0.07 mg ανά g λίπους στους 4 Μήνες και 0.09 mg ανά g λίπους στους 6 Μήνες.

Πίνακας 17: mg Καροτενοειδών ανά g λίπους, σύγκριση των μεθόδων συντήρησης

Καροτενοειδή	Νωπή	Προβρασμένη	Μαριναρισμένη (4 Μήνες)	Κατεψυγμένη (4 Μήνες)	Μαριναρισμένη (6 Μήνες)	Κατεψυγμένη (6 Μήνες)
All-trans Λουτεΐνη	0.13±0.01a	0.06±0.01b	Δ.Α.	0.06±0.01b	Δ.Α.	0.05±0.01b
All-trans Ζεαξανθίνη	0.08±0.01a	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
All-trans Ασταξανθίνη	0.21±0.01a	0.36±0.02b	0.23±0.01ad	0.42±0.02c	0.25±0.01d	0.50±0.03e
All-trans Κανθαξανθίνη	0.29±0.02a	0.13±0.01b	0.12±0.01b	0.07±0.01c	Δ.Α.	0.09±0.01c
β-Κρυπτοξανθίνη	0.11±0.01a	0.11±0.01a	Δ.Α.	0.08±0.01b	Δ.Α.	Δ.Α.
b-Καροτένιο	0.17±0.02a	0.13±0.01b	Δ.Α.	0.12±0.01b	Δ.Α.	0.19±0.02a

Δ.Α.: Δεν Ανιχνεύθηκε. Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P < 0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Οι ποσότητες των καροτενοειδών μεταβάλλονται κατά τις διάφορες επεξεργασίες αναλόγως του συστήματος στο οποίο συμμετέχουν (αντιοξειδωτικά, μέταλλα, καροτενοπρωτεΐνες κλπ.), και αυτός είναι ο λόγος που στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διαφορετικά αποτελέσματα κατά τις επεξεργασίες, όπως μείωση, μη σημαντικές αλλαγές ή ακόμη και αύξηση των ποσοτήτων τους. Υπάρχουν και αναφορές για δράση ενζύμων τα οποία καταλύουν την αποικοδόμηση συγκεκριμένων καροτενοπρωτεϊνών [141], όπως αυτών που είναι υπεύθυνες για την αλλαγή του χρώματος κατά την θερμική επεξεργασία των θαλασσινών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μπλε καβούρια τα οποία κατά την θερμική επεξεργασία αλλάζουν από μπλε σε κοκκινωπό χρώμα. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι οι ξανθοφύλλες βρίσκονται συμπλοκοποιημένες με συγκεκριμένη πρωτεΐνη, η οποία κατά την θέρμανση αποδιατάσσεται και επιτρέπει το κοκκινωπό χρώμα των ξανθοφύλλων να εμφανιστεί.



Εικ 32: Μήκη κύματος απορρόφησης α-κρουστακυανίνης και Ασταξανθίνης

Το πιο γνωστό παράδειγμα των πρωτεϊνών αυτών, είναι η α-κρουστακυανίνη, υπεύθυνη για το μπλε χρώμα του αστακού, η οποία εμπεριέχει την Ασταξανθίνη σε στιχομετρική αναλογία αλλά όχι ομοιοπολικά συνδεδεμένη [142]. Οι Buchwald και Jencks [143] αναφέρουν ότι τα καρκινοειδή περιέχουν τριών ειδών κρουστακυανίνες (α-, β- και γ-κρουστακυανίνη), οι οποίες εμπεριέχουν Ασταξανθίνη.

Η α-κρουστακυανίνη απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος από την ασταξανθίνη, έτσι η αξιοσημείωτη αύξηση που παρατηρείται στην ποσότητα της Ασταξανθίνης, κατά τις επεξεργασίες του μαριναρίσματος και της κατάψυξης, πιθανόν να οφείλεται στην αποδιοργάνωση των πρωτεϊνών αυτών, απελευθερώνοντας Ασταξανθίνη.

3.5 Μελλοντική Έρευνα

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το μαρινάρισμα προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην σύσταση των λιπαρών οξέων και των καρροτενοειδών, επιπλέον ο προβρασμός και η κατάψυξη υπό κενό φέρουν αρνητικές επιδράσεις στα λιπαρά οξέα, τα διατηρούν όμως σε ικανοποιητικά επίπεδα ώστε αν ισχυριστούμε ότι συμβάλουν στην καλή υγεία του ανθρώπου μέσω της διατροφής.

Στο μέλλον ενδιαφέρον θα ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των μεθόδων συντήρησης στις πρωτεΐνες, καθώς και στα ελεύθερα αμινοξέα των γυαλιστερών, δεδομένου ότι μεγάλος αριθμός αυτών έχουν βρεθεί να έχουν βιοδραστικές ιδιότητες.

Επίσης, η ανίχνευση και ταυτοποίηση μορίων με πιθανή βιοδραστική δράση, καθώς και ο υπολογισμός της ημερήσιας συνιστώμενης πρόσληψης, θα έδινε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τα πιθανά από την κατανάλωσή τους.

Κατά την παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν φωσφόνολιπίδια στην σάρκα της γυαλιστερής. Τα φωσφόνολιπίδια είναι εξαιρετικά σταθερά μόρια και έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί η δομή τους.

Τέλος, εκτός από την επίδραση των μεθόδων συντήρησης στην ποιότητα της σάρκας της γυαλιστερής, θα πρέπει να διερευνηθεί η ασφάλεια όσον αφορά τα πιθανά παθογόνα βακτήρια που δύναται να αναπτυχθούν κατά την συντήρηση με τις προαναφερθείσες μεθόδους.

4. Αναφορές

1. Baguet, F. and G. Dumont, *The muscular membrane and the relaxation effect of serotonin in a Lamellibranch smooth muscle (ABRM)*. Arch Int Physiol Biochim, 1973. **81**(4): p. 769-70.
2. Akira Yamada, M.Y., Kazuhiro Oiwa, *Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state in vitro*. Journal of Muscle Research and Cell Motility, 2013. **34**(2): p. 115-123.
3. poutiers, J.M., *Fisches Fao d'Identification des Espèces pour les Besoins de la Pêche*. Mediterranee at Mer Noire, 1987. **1**: p. 37.
4. Δ.Π., Π., *Αλιεύματα*. 1990, Αθήνα: ΙΩΝ.
5. Chevallier H., J.G.e.A.L., *Mollusques marines des cotes se France commercialises pour la consommation*. 1975. **5**.
6. Marin, F., et al., *Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution*. Curr Top Dev Biol, 2008. **80**: p. 209-76.
7. N. Bednaršek, G.A.T., D. C. E. Bakker, S. Fielding, E. M. Jones, H. J. Venables, P. Ward, A. Kuzirian, B. Lézé, R. A. Feely & E. J. Murphy, *Extensive dissolution of live pteropods in the Southern Ocean*. nature geoscience, 2012. **5**: p. 881-885.
8. Claudia T. Callil, M.C.D.M., *Ultrastructural analysis of the shells of Anodontites trapesialis (Lamarck) and Anodontites elongatus (Swainson) (Mollusca, Bivalvia, Etherioidea) from the Mato Grosso Pantanal Region, Brazil*. Revista Brasileira de Zoologia, 2005. **22**(3).
9. Βλαδίμηρος, Λ., *Τεχνολογία & Ποιότητα χθυρών*. 2002, Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων.
10. Cofrancesco, A.F., *Nervous System and Sense Organs in Bivalves*. 2002: Zebra Mussel Research Program.
11. George B. Stefano, E.J.C., *Norepinephrine: Its presence in the central nervous system of the bivalve mollusc, Mytilus edulis*. Journal of Experimental Zoology, 1980. **214**(2): p. 209-213.
12. Himmelman, C.J.L.J.H., *Reproductive cycle of the bivalve Lima scabra (Pterioidea: Limidae) and its association with environmental conditions*. Revista de Biología Tropical, 1999. **47**(3).
13. Ginzburg, *Fertilization of the eggs of bivalve mollusks with different insemination conditions*. Sov J Dev Biol, 1975. **5**(4): p. 300-8.
14. Honkoop, P.J., *Physiological costs of reproduction in the Sydney rock oyster Saccostrea glomerata. How expensive is reproduction?* Oecologia, 2003. **135**(2): p. 176-83.
15. C., A.-V.P., *The effects of reduced salinity on the shell growth of small Mytilus edulis*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1984. **1**(64): p. 171-182.
16. Freitas, L., M.J. Fernandez-Reiriz, and U. Labarta, *Fatty acid profiles of Mytilus galloprovincialis (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2002. **132**(2): p. 453-61.
17. Inglis G.J., H.B.J., Ross A.H., *An overview of factors affecting the carrying capacity of coastal embayments for mussel culture*, M.f. Environment, Editor. 2000. p. 31.

18. <http://www.blueseedproject.com/index.php/44/shellfish-farming>.
19. BE, S., *Molluscan shellfish farming*. 2002, Oxford: Blackwell Publishing.
20. E.M., G., *Genetics of Mytilus*. In *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*, ed. E.M. Gosling. Vol. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, no. 25. 1992, Amsterdam: Elsevier Science Publ.
21. J, M., *The cultivation of the European mussel, Mytilus edulis Linnaeus*. *Oceanography and Marine Biology an Annual Review*, 1972(10): p. 437-460.
22. <http://www.dfompo.gc.ca/aquaculture/multimedia/fig9.jpg>.
23. Galinou-Mitsoudi S., G.A., Petridis D., Papatthanasiou E, *Mussel endobionts in Greek cultures : First occurrence and effects*. In: CAFTEM2002: 1-11, Jun 2002., 2000.
24. Grienke, U., J. Silke, and D. Tasdemir, *Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health*. *Food Chem*, 2014. **142**: p. 48-60.
25. Lordan, S., R.P. Ross, and C. Stanton, *Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases*. *Mar Drugs*, 2011. **9**(6): p. 1056-100.
26. Kim, S.-K.M., E., *Bioactive compounds from marine processing byproducts- A review*. *Food Research International*, 2006. **39**(4): p. 383-393.
27. Scotti, P.D., et al., *Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, Perna canaliculus (Bivalvia: Mytilidae)*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001. **128**(4): p. 767-79.
28. Je, J.Y., et al., *Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, Mytilus edulis*. *Bioresour Technol*, 2005. **96**(14): p. 1624-9.
29. Jung, W.-K., & Kim, S.-K., *solation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, Mytilus edulis*. *Food Chemistry*, 2009. **117**(4): p. 687-692.
30. Mitta, G., et al., *Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem*, 1999. **265**(1): p. 71-8.
31. Yasin, B., et al., *Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000. **19**(3): p. 187-94.
32. Jenssen, H., P. Hamill, and R.E. Hancock, *Peptide antimicrobial agents*. *Clin Microbiol Rev*, 2006. **19**(3): p. 491-511.
33. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. *Nature*, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
34. Cho, M.J., et al., *Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates*. *J Agric Food Chem*, 2004. **52**(19): p. 5895-901.
35. Kim, S.K., T.S. Vo, and D.H. Ngo, *Potential application of marine algae as antiviral agents in medicinal foods*. *Adv Food Nutr Res*, 2011. **64**: p. 245-54.

36. Jung, H., et al., *QCM and AFM analysis of anticoagulant activities of sulfonated polymers against fibrin formation*. Langmuir, 2009. **25**(12): p. 7032-41.
37. Badiu, D.L., et al., *Amino acids from Mytilus galloprovincialis (L.) and Rapana venosa molluscs accelerate skin wounds healing via enhancement of dermal and epidermal neoformation*. Protein J, 2010. **29**(2): p. 81-92.
38. Chan, E.J. and L. Cho, *What can we expect from omega-3 fatty acids?* Cleve Clin J Med, 2009. **76**(4): p. 245-51.
39. McPhee. S., H., L.D., Wright, P.F., Wynne, P.M. Kalafatis, N. Harney, D.W., *Anti-cyclooxygenase effects of lipid extracts from the New Zealand green-lipped mussel Perna Canaliculus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 2007. 346-356.
40. Wakimoto, T., et al., *Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from the green-lipped mussel Perna canaliculus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(42): p. 17533-7.
41. Kosuge, T., et al., *Isolation of an anti-histaminic substance from green-lipped mussel (Perna canaliculus)*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1986. **34**(11): p. 4825-8.
42. Ovodova, R.G., et al., *The structure of mytilan, a bioglycan-immunomodulator isolated from the mussel Crenomytilus grayanus*. Carbohydr Res, 1992. **223**: p. 221-6.
43. Miller, T.E., et al., *Anti-inflammatory activity of glycogen extracted from Perna canaliculus (NZ green-lipped mussel)*. Agents Actions, 1993. **38 Spec No**: p. C139-42.
44. Xu, H., et al., *Characterization and protection on acute liver injury of a polysaccharide MP-I from Mytilus coruscus*. Glycobiology, 2008. **18**(1): p. 97-103.
45. Anderson, D.M., A.D. Cembella, and G.M. Hallegraef, *Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management*. Ann Rev Mar Sci, 2012. **4**: p. 143-76.
46. UNESCO, *Report of the joint FAO/IOC/WHO ad hoc expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs*. Oslo, Norway, 26–30 September 2004, 2005.
47. Metaxatos, A., *Population dynamics of the venerid bivalve Callista chione (L.) in a coastal area of the eastern Mediterranean*. Journal of Sea Research, 2004. **52**(4): p. 293-305.
48. Y.Goto, P.G.T., *European Seashells*. Vol. 2. 1993, Germany: Verlag Christa Hemmen.
49. Richardson, P.K.L.a.C.A., *Growth of the smooth clam, Callista chione (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Veneridae) from the Thracian Sea, northeastern Mediterranean*. 2014, University of Thrace.
50. Canestri-Trotti, G., et al., *Monitoring of infections by protozoa of the genera Nematopsis, Perkinsus and Porospora in the smooth venus clam Callista chione from the North-Western Adriatic Sea (Italy)*. Dis Aquat Organ, 2000. **42**(2): p. 157-61.
51. Valli G, M.N.M.M., *Riproduzione, biometria e contenuto di metalli in Callista chione (L.) (Mollusca: Bivalvia) del Golfo di Trieste nel corso di*

- un ciclo annuale. Bolletino de la Societa Adriatica. di Scienze, 1994. (II)(LXXV): p. 441-464.*
52. M.B. Gaspar, M.D.D., A. Campos, C.C. Monteiro, M.N. Santos, A. Chicharo & L. Chicharo, *the influence of dredge design on the catch of Callista chione (Linnaeus, 1758)* Hydrobiologia, 2001(465): p. 153-167.
 53. Christie, W.W., *Lipid Analysis*. 1982, New York: Pergamon Press.
 54. Kates, M., *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. 1986, New York: Elsevier.
 55. James, M.I.G.A.T., *Lipid Biochemistry and Introduction*. 1971, Ithaca, NY: Cornell University Press.
 56. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm064894.htm>.
 57. Nomenclature., I.-I.C.o.B., *The nomenclature of lipids*. lipids, 1977. **12**: p. 455-468.
 58. Nomenclature, I.-I.C.o.B., *Nomenclature of phosphoruscontaining compounds of biological importance*. Chem. Phys. Lipids, 1978. **21**: p. 141-158.
 59. Nomenclature, I.-I.C.o.B., *The nomenclature of lipids*. Chem. Phys. Lipids, 1978. **21**: p. 159-173.
 60. J. F. Mead, R.B.A.-S., D. R. Howton, and G. Popjak., *Lipids: Chemistry, Biochemistry and Nutrition*. 1986, New York: Plenum Press.
 61. Chapkin, R.S., *Reappraisal of the essential fatty acids. In: Fatty Acids in Foods and Their Health Implications (C. K. Chow, ed.)*. 1992, New York: Dekker.
 62. Simopoulos, A.P., *The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids*. Biomed Pharmacother, 2002. **56**(8): p. 365-79.
 63. McKean, W.R.N.a.M.L., *Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids*. 1977, Baltimore: University Park Press.
 64. J.T Real , F.J.C., I Martínez-Usó , A.B García-García , J.F Ascaso and R Carmen *Importance of HDL cholesterol levels and the total/ HDL cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolaemia*. European Heart Journal, 2000. **22**(6): p. 465-471.
 65. Cooper, R.A., *Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells*. Journal of Cellular Biochemistry, 2004. **8**(4): p. 413-440.
 66. Guo, D.A., M. Venkatramesh, and W.D. Nes, *Developmental regulation of sterol biosynthesis in Zea mays*. Lipids, 1995. **30**(3): p. 203-19.
 67. Wong, N.C., *The beneficial effects of plant sterols on serum cholesterol*. Can J Cardiol, 2001. **17**(6): p. 715-21.
 68. De Smet, E., R.P. Mensink, and J. Plat, *Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: suggested mechanisms from past to present*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(7): p. 1058-72.
 69. Bradford, P.G. and A.B. Awad, *Phytosterols as anticancer compounds*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(2): p. 161-70.
 70. Awad, A.B., H. Williams, and C.S. Fink, *Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells*. Nutr Cancer, 2001. **40**(2): p. 157-64.

71. Hartweg, J., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(1): p. CD003205.
72. Landgraf, R., *PUFA supplementation and hypertension in type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **683**: p. 331-6.
73. Zhukov'ska, A.S., A.M. Shysh, and O.O. Moibenko, [*Study of the impact of omega-3 PUFA on fatty acid composition of heart, respiration and swelling of mitochondria of the heart in diabetes*]. Fiziol Zh, 2012. **58**(2): p. 16-26.
74. Puri, B.K., *Cardiovascular disease and depression: the PUFA connection*. Int J Clin Pract, 2008. **62**(3): p. 355-7.
75. Barros, R., et al., *Dietary intake of alpha-linolenic acid and low ratio of n-6:n-3 PUFA are associated with decreased exhaled NO and improved asthma control*. Br J Nutr, 2011. **106**(3): p. 441-50.
76. Khan, M.A., C.C. Parrish, and F. Shahidi, *Effects of mechanical handling, storage on ice and ascorbic acid treatment on lipid oxidation in cultured Newfoundland blue mussel (Mytilus edulis)*. Food Chemistry, 2006. **99**(3): p. 605-614.
77. Lira, G.M., et al., *Influence of seasonality on the chemical composition of oysters (Crassostrea rhizophorae)*. Food Chem, 2013. **138**(2-3): p. 786-90.
78. Philippe Soudant a, Y.M.b., Jeanne Moal a, Rem5 Robert a, Claudie Qu6r6 a, Jean Ren6 Le Coz a, Jean Fransois Samain a**, *Effect of food fatty acid and sterol quality on Pecten maximus gonad composition and reproduction process*. Aquaculture, 1996. **143**: p. 361-378.
79. Orban, E., et al., *Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, Chamelea gallina, from the Adriatic sea*. Food Chemistry, 2007. **101**(3): p. 1063-1070.
80. Karnjanapratum, S., et al., *Chemical compositions and nutritional value of Asian hard clam (Meretrix lusoria) from the coast of Andaman Sea*. Food Chem, 2013. **141**(4): p. 4138-45.
81. Oliver, J. and A. Palou, *Chromatographic determination of carotenoids in foods*. J Chromatogr A, 2000. **881**(1-2): p. 543-55.
82. Ge, X.X., et al., *Carotenoid intake and esophageal cancer risk: a meta-analysis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(3): p. 1911-8.
83. Rock, C.L., *Carotenoids: biology and treatment*. Pharmacol Ther, 1997. **75**(3): p. 185-97.
84. Krinsky, N.I. and E.J. Johnson, *Carotenoid actions and their relation to health and disease*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(6): p. 459-516.
85. Rao, A.V. and L.G. Rao, *Carotenoids and human health*. Pharmacol Res, 2007. **55**(3): p. 207-16.
86. Maoka, T., *Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants*. Arch Biochem Biophys, 2009. **483**(2): p. 191-5.
87. Tsushima, M., T. Maoka, and T. Matsuno, *Structures of carotenoids with 5,6-dihydro-beta-end groups from the spindle shell Fusinus perplexus*. J Nat Prod, 2001. **64**(9): p. 1139-42.
88. Maoka, T., et al., *Identification of carotenoids in the freshwater shellfish Unio douglasiae nipponensis, Anodonta lauta, Cipangopaludina*

- chinensis laeta*, and *Semisulcospira libertina*. J Oleo Sci, 2012. **61**(2): p. 69-74.
89. Maoka, T., et al., Structures of five new carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas*. J Nat Prod, 2001. **64**(5): p. 578-81.
 90. Maoka, T., et al., Structure of new carotenoids with a 3,4-dihydroxy-beta-end group from the oyster *Crassostrea gigas*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2005. **53**(9): p. 1207-9.
 91. Maoka, T., et al., Characterization of fucoxanthin and fucoxanthinol esters in the Chinese surf clam, *Macra chinensis*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(4): p. 1563-7.
 92. Maoka, T., et al., Carotenoids in clams, *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix petechialis*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(9): p. 5784-8.
 93. Maoka, T., et al., Carotenoids in three species of *Corbicula* Clams, *Corbicula japonica*, *Corbicula sandai*, and *Corbicula* sp. (Chinese Freshwater *Corbicula* Clam). J Agric Food Chem, 2005. **53**(21): p. 8357-64.
 94. Maoka, T., et al., New C37 skeletal carotenoid from the clam, *Paphia amabilis*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(24): p. 12069-72.
 95. Tsushima, M., Y. Fujiwara, and T. Matsuno, Novel marine di-Z-carotenoids: *cucumariaxanthins A, B, and C* from the sea cucumber *Cucumaria japonica*. J Nat Prod, 1996. **59**(1): p. 30-4.
 96. Maoka, T., et al., Structure of new carotenoids from corbicula clam *Corbicula japonica*. J Nat Prod, 2005. **68**(9): p. 1341-4.
 97. Matsuno, T., et al., Comparative biochemical studies of carotenoids in fishes--XXIX. Isolation of new luteins, lutein F and lutein G from marine fishes. Comp Biochem Physiol B, 1986. **85**(1): p. 77-80.
 98. Fu, W., et al., UPLC-UV-MS(E) analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae. Anal Bioanal Chem, 2012. **404**(10): p. 3145-54.
 99. Meier, S., et al., A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. BMC Syst Biol, 2011. **5**: p. 77.
 100. Sandmann, G., A nitromethane-based HPLC system alternative to acetonitrile for carotenoid analysis of fruit and vegetables. Phytochem Anal, 2010. **21**(5): p. 434-7.
 101. Weber, R.W., H. Anke, and P. Davoli, Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (*Basidiomycota*, *Fungi*). J Chromatogr A, 2007. **1145**(1-2): p. 118-22.
 102. Gandul-Rojas, B., M. Roca, and M.I. Minguez-Mosquera, Chlorophyll and carotenoid degradation mediated by thylakoid-associated peroxidative activity in olives (*Olea europaea*) cv. *hojiblanca*. J Plant Physiol, 2004. **161**(5): p. 499-507.
 103. Morimoto, S., et al., Post-harvest degradation of carotenoid glucose esters in saffron. Planta Med, 1994. **60**(5): p. 438-40.
 104. Colle, I., et al., Effect of thermal processing on the degradation, isomerization, and bioaccessibility of lycopene in tomato pulp. J Food Sci, 2010. **75**(9): p. C753-9.

105. Mojaat, M., et al., *Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of beta-carotene from Dunaliella salina*. J Biotechnol, 2008. **133**(4): p. 433-41.
106. Moya, S.Y., et al., *[Effect of ripening and drying on pro-vitamin A carotenoid content in pepper (Capsicum annuum var. Anaheim)]*. Arch Latinoam Nutr, 1994. **44**(1): p. 41-6.
107. Larsen, E. and L.P. Christensen, *Simple saponification method for the quantitative determination of carotenoids in green vegetables*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(17): p. 6598-602.
108. Toomey, M.B. and K.J. McGraw, *Modified saponification and HPLC methods for analyzing carotenoids from the retina of quail: implications for its use as a nonprimate model species*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(9): p. 3976-82.
109. Riso, P. and M. Porrini, *Determination of carotenoids in vegetable foods and plasma*. Int J Vitam Nutr Res, 1997. **67**(1): p. 47-54.
110. Luterotti, S., et al., *Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods*. Food Chem, 2013. **140**(1-2): p. 390-7.
111. Rodriguez-Amaya, D.B., et al., *Assessment of provitamin A determination by open column chromatography/visible absorption spectrophotometry*. J Chromatogr Sci, 1988. **26**(12): p. 624-9.
112. Tode, C., T. Maoka, and M. Sugiura, *Application of LC-NMR to analysis of carotenoids in foods*. J Sep Sci, 2009. **32**(21): p. 3659-63.
113. Kaiser, P., et al., *LC-MS method for screening unknown microbial carotenoids and isoprenoid quinones*. J Microbiol Methods, 2012. **88**(1): p. 28-34.
114. Chiste, R.C. and A.Z. Mercadante, *Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit Caryocar villosum*. J Agric Food Chem, 2012.
115. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
116. Sinanoglou, V.J., Strati, I.F., Bratakos, S.M., Proestos, C., Zoumpoulakis, P., Miniadis-Meimaroglou, S., *On the combined application of Iatroscan-TLC-FID and GC-FID to identify total, neutral and polar lipids and their fatty acids extracted from foods*. . ISRN Chromatography, ID 859024, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/859024>., 2013.
117. Sinanoglou, V.J.a.M.-M., S., *Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods*. Food Research International, 31(6-7):467–473., 1998.
118. Sinanoglou, V.J., et al., *Effects of gamma radiation on microbiological status, fatty acid composition, and color of vacuum-packaged cold-stored fresh pork meat*. J Food Prot, 2009. **72**(3): p. 556-63.
119. Sinanoglou, V.J., Strati, I.F. and Miniadis-Meimaroglou, S., *Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study*. Food Chemistry, 124(3): 971–977., 2011b.
120. Sowmyashree Shetty, N.C.T., Reema Orison Lobo, Nannu Shafakatullah, *Seasonal changes in the biochemical composition of freshwater bivalves, Parreysia spp. From Tungabhadra river,*

- Karnataka. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR), 2013. **4**(5): p. 94-99.
121. Buron, J., *Reproductive Cycles of the Bivalve Molluscs Atactodea striata (Gmelin), Gafrarium tumidum Röding and Anadara scapha (L.) in New Caledonia*. Aust. J. Mar. Freshwater Res, 1992. **43**, 393-402.
 122. Pazos, A.J., et al., *Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of Pecten maximus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003. **134**(2): p. 367-80.
 123. Alejandro Ruiz-Rodriguez, F.R.M., Aurelio Ocana , Cristina Soler-Rivas, *Effect of domestic processing on bioactive compounds*. Phytochem Rev, 2007: p. 7:345–384.
 124. C. Ruiz, M.A., F. Sedano, O. G. Martin, J. L. Sanchez., *Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of Crassostrea gigas (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1992(155: 249-262).
 125. P.A. Gabbott, B.L.B., *Biochemical effects of temperature and nutritive stress on Mytilus edulis_L*. J. Mar. Biol. Assoc., 1973: p. UK 53, 269–286.
 126. Su, X.Q., Antonas K., Nichols P.D., *Seasonal variations of total lipid and fatty acid contents in the muscle of two Australian farmed abalone species*. journal of food lipids, 2006. **13**: p. 411-423.
 127. WHO Technical Report Series 916, R.o.a.J.W.F.E.C., World Health Organization, *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. 2003: Geneva. p. p. 88 (Table 10).
 128. Haban, P., E. Zidekova, and J. Klvanova, *Oleic acid serum phospholipid content is linked with the serum total- and LDL-cholesterol in elderly subjects*. Med Sci Monit, 2000. **6**(6): p. 1093-7.
 129. Teres, S., et al., *Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 13811-6.
 130. Chase, H.P., et al., *Effect of docosahexaenoic acid supplementation on inflammatory cytokine levels in infants at high genetic risk for type 1 diabetes*. Pediatr Diabetes, 2014.
 131. Pauwels, E.K. and M. Kostkiewicz, *Fatty acid facts, Part III: Cardiovascular disease, or, a fish diet is not fishy*. Drug News Perspect, 2008. **21**(10): p. 552-61.
 132. Samieri, C., et al., *Relationship between diet and plasma long-chain n-3 PUFAs in older people: impact of apolipoprotein E genotype*. J Lipid Res, 2013. **54**(9): p. 2559-67.
 133. Bousquet, M., et al., *Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease*. FASEB J, 2008. **22**(4): p. 1213-25.
 134. Chen IC, C.F., Wei CI, Porteir KM, O'Keefe SF, *Differentiation of cultured and wild sturgeon (Acipenser oxyrinchus desotoi) based on fatty acid composition*. . J. Food Sci, 1995: p. 60(3): 631-635.
 135. Raes, K., et al., *Effect of diet and dietary fatty acids on the transformation and incorporation of C18 fatty acids in double-muscled*

- Belgian Blue young bulls*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(19): p. 6035-41.
136. Simopoulos, A.P., *Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects*. World Rev Nutr Diet, 2003. **92**: p. 1-22.
137. Cater, N.B. and M.A. Denke, *Behenic acid is a cholesterol-raising saturated fatty acid in humans*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(1): p. 41-4.
138. Kang, M.J., et al., *The effects of polyunsaturated:saturated fatty acids ratios and peroxidisability index values of dietary fats on serum lipid profiles and hepatic enzyme activities in rats*. Br J Nutr, 2005. **94**(4): p. 526-32.
139. Hayes, K.C., *Dietary fat and heart health: in search of the ideal fat*. Asia Pac J Clin Nutr, 2002. **11 Suppl 7**: p. S394-400.
140. Gayathri GN, P.K., Prakash J, Srinivasan K, *Influence of antioxidant spices on the retention of β -carotene in vegetables during domestic cooking processes*. Food Chem, 2004: p. 84:35–43.
141. EJ, J., *The role of lycopene in health and disease*. Nutr Clin Care, 2000: p. 3:35–43.
142. Weesie, R.J., et al., *Protein-chromophore interactions in alpha-crustacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, Homarus gammarus. A study by ^{13}C magic angle spinning NMR*. FEBS Lett, 1995. **362**(1): p. 34-8.
143. Buchwald, M. and W.P. Jencks, *Properties of the crustacyanins and the yellow lobster shell pigment*. Biochemistry, 1968. **7**(2): p. 844-59.