



Euroopa Merendus- ja Kalandusfondi rakenduskava 2014-2020

projekti nr. 811019790012

“Efektiivne kalajääkide kasutamine uudsete toormaterjalide saamiseks, mida on võimalik kasutada nii kanga kui haavakatete valmistamiseks”

LÕPPARUANNE

Tartu

2022

## Sisukord

1	Sissejuhatus.....	4
2	ŽELATIIN .....	5
2.1	ŽELATIINI VALMISTAMINE.....	5
2.1.1	Kalajääkide valik.....	5
2.1.2	Kalajääkide hoiustamine .....	6
2.1.3	Materjali eelpuhastamine.....	7
2.1.4	Želatiini ekstraheerimine. ....	11
2.1.5	Želatiinilahuse filtreerimine .....	12
2.1.6	Želatiini kuivatamine.....	14
2.1.7	Želatiini peenestamine.....	16
2.1.8	Želatiini saagis .....	17
2.1.9	Ülevaade želatiinipartiide valmistamismeetoditest .....	18
2.1.10	Želatiini ekstraheerimisjääkide kasutamise uuring.....	23
2.2	ŽELATIINI KARAKTERISEERIMINE .....	25
2.2.1	Želatiinide vesilahuste valmistamine ja füsikokeemiline karakteriseerimine .....	25
2.2.2	Želatiini partiide ja kontrollželatiinide IR spektrid ja analüüs.....	29
2.2.3	Želatiinipulbri valmistamise reprodutseeritavus .....	30
2.2.4	Želatiinipulbri omadused (partiid 11, 13, 18-1, 19-1).....	32
2.3	ŽELATIINIST HAAVAKATTEMATERJALI VALMISTAMINE .....	35
2.3.1	Elektrospinnimine .....	35
2.3.2	Elektrospinnitud haavakatete omadused .....	38
2.3.3	Haavakatete prototüübid.....	41
2.4	ŽELATIINIST KANGA VALMISTAMINE .....	42
2.4.1	Želatiini karakteriseerimine ja väikesemahuline ketruskatse.....	42
2.4.2	Suuremahuline ketruskatse ja lõpptoote valmistamine.....	44
3	KITIIN JA KITOSAAN.....	49
3.1	KITIINI JA KITOSAANI VALMISTAMINE .....	49
3.1.1	Algmaterjali kogumine .....	49
3.1.2	Kitiini väljapuhastamine.....	49
3.1.3	Kitiinist kitosaani valmistamine .....	53
3.2	KITIINI JA KITOSAANI KARAKTERISEERIMINE .....	56
4	KOKKUVÕTE .....	57
5	Tulemuste avalikustamine .....	58
6	Tänu sõnad.....	59
7	Viidatud kirjandus .....	60

8	Summary .....	61
9	LISA 1. Kalaželatiini alternatiivsed kasutusvõimalused.....	63

# 1 Sissejuhatus

Kala- ja koorikloomajäägid sisaldavad väärtuslikke biopolümeere, millest käesolevas projektis käsitletakse kollageeni ja kitiini. Projekti eesmärgiks oli välja selgitada, kas on võimalik kala- ja koorikloomajääkidest saada kvaliteetset toorainet, mida on võimalik kasutada haavakatete ja nahalaadse tekstiili tootmiseks. Kalajääkidest eraldasime želatiini (kollageenne biopolümeer), mille omadusi hinnati haavakattematerjali ning nahalaadse tekstiili valmistamise seisukohast. Samuti andsime hinnangu vähijääkidest eraldatud kitiini ja sellest toodetud kitosaani kvaliteedile.

Projektis osalesid juhtorganisatsioonina Eesti Maaülikool ning partneritena Tartu Ülikool ning Gelatex Technologies OÜ; samuti tegime koostööd Eesti kalatöötlemisettevõtetega projektiks vajalike kalajääkide kogumiseks. Eesti Maaülikooli töörühm (projekti vastutav täitja Anu Kisand; Kairi Käiro, Maidu Silm, Rihard Reissaar; nõustajana prof. Rajeev Bhat) viis läbi kalajääkidest toormaterjalide eraldamine, Tartu Ülikooli Farmaatsia Instituudi teadurid ja üliõpilased Karin Kogermanni juhtimisel viisid läbi saadud toormaterjalide karakteriseerimise ning neist toormaterjalidest haavakattematerjalide valmistamisega seotud uuringud, Gelatex Technologies OÜ meeskond Märte-Erik Martensi juhtimisel viis läbi želatiinist nahalaadse tekstiilmaterjali valmistamisega seotud uuringud. Toormaterjalipartiide valmistamine Eesti Maaülikoolis toimus tihedas koostöös projektipartneritega: tuginedes partnerite tagasisidele varasemate partiide karakteriseerimis- ja töötlemistulemuste kohta optimeeriti järgnevatel partiide valmistamise meetodeid.

Käesolevas projekti lõpparuandes käsitleme nii kala- ja koorikloomajääkidest toormaterjalide valmistamise etappe kui ka saadud materjalide omadusi ning kasutatavust haavakatete ja nahalaadse kanga tootmisel.

Loodame, et käesoleva projekti tulemused julgustavad bio- ning ringmajandusest huvitatud osapooli kaasa mõtlema kalajäätmete väärdamise edendamise suunas.

Projekti läbiviimiseks vajaliku toetuse eraldas Maaeluministerium Euroopa Merendus- ja Kalandusfondi rakenduskava 2014-2020 meetme 1.1 „Kalapüügi innovatsioonitoetus” vahenditest rakendusüksuse PRIA kaudu. Projekt kestis 29.10.2019-15.02.2022.

## 2 ŽELATIIN

### 2.1 ŽELATIINI VALMISTAMINE

#### 2.1.1 Kalajääkide valik

Kogusime kalajääke erinevalt ettevõtetelt: AS Japs, OÜ Võrtsukala, OÜ Latikas; lisaks viisime esimesed katsed läbi Eesti Maaülikoolis laboris fileeritud ahvenanahkadega (Joonised 1-3). Kõige sobilikumaks osutusid kalafileerimise jäägid ettevõttelt OÜ Latikas. Nende kalajääkide eeliseks oli:

1. Sarnase koostisega jäägid, mis oli oluline Želatiini eraldamise meetodite väljatöötamiseks. Kui kalajääkide erinevad partiid oluks väga erineva koostisega, takistanuks see käesolevas projektis Želatiini eraldamise meetodite optimeerimist, kuna ei oleks selgust, kas toodetud želatiinipartii omaduste muutumine tuleneb varieeruva koostisega algmaterjalist või laborimeetodites tehtud muudatustest. AS Japs kalatöötlusjääkide koostis sõltus sellest, kas neilt sooviti parasjagu osta kalafileesid nahaga või ilma; sellest tulenevalt võivad mõnes kalajäägipartiiis olla vaid peamiselt sisikond, pead-sabad ja selgroog, kuid mitte želatiinirikkaid kalanahku. Želatiinivaesemate kalajääkide kasutamisel tuleks lisaks teha suuremaid kulutusi mittesoojitava osa (mitteželatiinsete valkude, rasvade, mineraalainete) eemaldamiseks enne želatiini väljaekstraheerimist.
2. Kalanaha koostise stabiilsus kalaliigi põhiselt. Uurimistöö käigus otsustasime jääda ühe kalaliigi nahkade juurde, mitte erinevat liiki kalanahkade segu juurde, sest ka erinevate kalaliikide nahkades võib želatiinisaldus ning –omadused varieeruda ning seegi oleks võinud hakata edaspidi takistama želatiini eraldusmeetodite kohandamist. Kalatöötlemisettevõttelt OÜ Latikas oleks küll olnud võimalik fileerimisprotsessist saada eraldi erinevate kalaliikide nahku (nt. ka koha, ahven, haug), kuid osade kalaliikide fileerimisjääkide teke on hooajalisem ning korruga tekkis neid väiksemas koguses. Latikanahajääke tekkis pidevamalt ja suuremates kogustes, mis tagas meile piisava koguse ühtlast algmaterjali. Samuti on latikal suured tugevad soomused, mis osutus kalanahkade töötlemisel ja loputamisel-sõelumisel eeliseks.



Joonis 1. Peipsi ahvena nahad



Joonis 2. Fileerimisjääkidenähtena kalatööstuses üle jäävad latikanahad (OÜ Latikas).



Joonis 3. AS Japs kalajäägid, ei sisalda kalanahku

3. Kalajääkide kvaliteet. OÜ Latikal olid võimalused kalanahkade kiireks jahutamiseks suurtes külmkappides ning nende hoidmiseks jahedas kuni nende üleandmiseni ülikooli töötajatele. Seetõttu olid need kalajäägid värsked ning roiskumismärkideta, mis andis neile eelise projekti kaasatud väike-ettevõtte (OÜ Võrtsukala) poolt tarnitud kalajäägipartii ees.

### 2.1.2 Kalajääkide hoiustamine

Projekti alguses koguti erinevaid kalajääke esimeste želatiinikatsepartiide jaoks: kalatööstuse AS Japs segajäägid; OÜ Võrtsukala kalanahad, ahvenanahad (Peipsist püütud ahvenad pärinesid OÜ Latika kalapoest, fileerisime ise), OÜ Latikas saadud latikanahad fileerimisjäädikena.

Kalajäägid külmutasime  $-18^{\circ}\text{C}$  juures, et oleks tagatud materjali värskus kogu katseperioodi jooksul.



Joonis 4. Peipsi ahvena nahad tükeldatud.



Joonis 5. Võrtsjärvest püütud latikate nahkade tükeldamine

AS Japs kalajäägid purustasime kutteri abil, ahvenanahad ja OÜ Võrtsukalalt saadud latikanahad aga tükeldasime enne sügavkülmutamist, et oleks võimalik materjali ekstraheerida kuni 1 l mahuga laborinõudes (joonised 4, 5, 6). Hiljem suurematele katsepartiidele (kuni 2 kg kalajääke) üle minnes kasutasime suuremaid katsenõusid ja nende katsete kalajääke (latikanahku) hoiustamiseks eelnevalt ei tükeldatud. Seevastu laoti latikanahad plastkastidesse kihiti küpsetuspaberiga (iga küpsetuspaberikihi vahele kahe-kuni neljakordne kalanahkade kiht), et oleks võimalik katsepartiide jaoks võtta sügavkülmikust välja vajalik kogus kalanahku ilma, et oleks vaja kogu kastitait üles sulatada (joonis 7). Proovisime vahelihina kasutada ka alumiiniumfooliumit, kuid see ei sobinud, kuna külmunud kalanahkade liigutamisel foolium rebenes kergesti. Küpsetuspaber sobis väga hästi, ettevaatlikult nurkadest küpsetuspaberit tõstes oli võimalik ilma paberit katki rebimata tõsta üles kogu kalanahakiht. Siiski leidsime, et parem on ladustada ühele küpsetuspaberile kahekordne kiht kalanahku, sest neljakordne kiht moodustab liiga raske ja monoliitse külmunud kihi (kalanahad külmuvad omavahel nii tihedalt kokku, et neid ei ole võimalik üksteisest külmunud olekus eraldada). Sellise raske kihi tõstmisel kipub küpsetuspaber nurkadest rebenema enne kui kogu külmunud kiht üles kerkib. Kuigi selline materjali kihiti säilitamine oli vajalik teadusuuringu jaoks, ei ole seda

tõenäoliselt vaja teha juhul, kui želatiini soovitakse toota suuremas mahus. Sel juhul oleks otstarbekas kas kalajäätmeid pärast nende tekkimist kohe puhastusprotsessi suunata või siis jahutada/külmutada need suuremate kogustena.



Joonis 6. Võrtsjärve latika nahkade tükid sügavkülmutatult.



Joonis 7. Latikanahkade asetamine plastkastidesse kihiti kühsetuspaberiga ladustamiseks sügavkülmikus

Kui kalamaterjal purustatakse väga peeneks, tekib täiendavaid probleeme kalajäätmeid puhastamise etapis. Nimelt on vaja želatiini saamiseks erinevate puhastusetappide käigus eemaldada kalajäätmeid mitteželatiinsed valgud, rasvad ja mineraalained. See tähendab, et ebasoovitavad ühendid jäävad töötlemislahusesse ning eemaldatakse koos lahusega, tahked kalajäätmeid tuleb aga kokku koguda edasise töötlemise jaoks. Liiga peeneks purustatud kalajäätmeid materjal näeb välja pastalaadne ja selle eraldamiseks ebasoovitavast lahusest oleks vaja vastavalt ka peene poorisuurusega filtermaterjali. Taoline filtermaterjal aga ummistub väga kergesti kalapasta osakestega, lahus ei tule sellest enam läbi ning samuti on väga raske filtermaterjalilt nii peenikesi osakesi kokku koguda. Seetõttu leiame antud projekti kogemuse põhjal, et kõige parem on kasutada suuremaid kalajäätmeid ning pigem tagada tõhus puhastamine piisavalt pika puhastusaja, intensiivse segamise ning vajadusel puhastusetapi kordamise teel (valgu- ja rasvarikkad kalajäätmeid võivad vajada vähemalt kaht puhastuskorda nende ainete eemaldamiseks).

### 2.1.3 Materjali eelpuhastamine

Nagu eelvalt mainitud, on enne želatiini ekstraheerimist vaja kalajäätmeid puhastada mitteželatiinsetest valkudest, lipiididest ja mineraalainetest. Toetusime vastavate meetodite valikul

Kittiphattanabawon jt. (2010) poolt kasutatud meetodikale kalajääkidest kollageense materjali eraldamiseks.

Kasutasime selleks kahte järjestikust etappi:

- 1) Puhastusetappi mitteželatiinsete valkude ja lipiidide (õlide ja rasvade) eemaldamiseks 0,1 M NaOH toatemperatuuril 2 h vältel ("Deproteiniseerimisetapp", joonis 8); naatriumhüdroksiidi lahuse ja kalajääkide kaalusuhe 10:1. Selle etapi järgselt loputasime kalajääke kraaniveega (kolmel korral, igal korral loputusvee ja kalajääkide kaalusuhe 10:1).
- 2) Puhastusetappi mineraalainete eemaldamiseks 1 M HCl abil toatemperatuuril 1 h vältel ("Demineeraliseerimisetapp", joonis 9); soolhappelahuse ja kalajääkide kaalusuhe 10:1. Selle etapi järgselt loputasime kalajääke destilleeritud veega (kolmel korral, igal korral loputusvee ja kalajääkide kaalusuhe 10:1).

Puhastusetappide käigus segati kalajääke vastavas lahuses. Esimestes väikesemahulistes katsetes tükeldatud ahvenanahkadega kasutasime segamiseks magnetsegajaid (joonised 8-9), kuid üle 1 l mahuga laborinõude puhul jäi olemasoleva seadme võimsus väikeseks ega suutnud suhteliselt paksu kalanahatükkide segu ringlema tõmmata.



Joonis 8 Ahvenanahatükid 0,1 M NaOH lahuses. Lahus on hägune valgu- ja lipiidijääkide tõttu.



Joonis 9 Ahvenanahatükid 1M HCl lahuses. Lahus on selge, kalanahatükid punduvad.

Järgmisena kasutasime 30 l polüpropüleenist (PP) pangesid. PP on kemikaalidele vastupidav materjal, mis talub hästi nii aluselisi kui happelisi lahuseid. Esimeses sellise mahuga katses segasime materjali käsitsi. Kalajääkide segamisel NaOH lahuses tekkis rohekashall ebameeldivalt lõhnav lahus (joonis11), mille segamise ajal tuli paigaldada nõu kohale õhuimur.

Järgnevates katsetes kasutasime Eesti Maaülikoolis koostatud elektrilist seadet, mis võimaldas 20 l mahuga suspensiooni segamist 30 l panges, mis oli protsessi ajal kaanega kaetud. Seade koosnes mootorist ja roostevabast materjalist valmistatud, labadega segamisvardast. Seade kinnitati tugevdusaluse abil pange plastikkaane peale (joonis 10). Seade osutus väga efektiivseks ning ülejäänud želatiinipartiide valmistamisel jäädi selle segamisviisi juurde. Kui algselt tükeldasime iga latikanaha kuni kümneks tükiks enne puhastusprotsesse, siis töö käigus ilmnis, et elektrilisel segajal pole



probleeme ka poolitatud või tervete kalanahkade segamisega. Seetõttu loobusime latikanahkade tükeldamisest. Kuna kasutasime kalanahkade ja lahuse suhet 1:10, siis 30 l panges oli paras töödelda 20 l lahusest ja 2 kg kalanahkadest koostatud segu. 2 kg kalajääke on meile fileerimisjäädikena tarnitud latikanahkade puhul umbes 40-44 kalanahka.

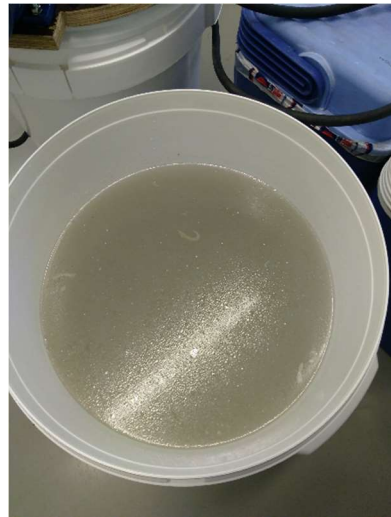


Joonis 10. Seade kuni 30 l kalajäägisuspensiooni segamiseks

Lisaks meie poolt välja valitud algetoodikale (Kittiphattanabawon jt. 2010), milles deproteineerimine viidi läbi ühe etapina, katsetati eelpuhastuse parendamiseks selle valgu- ja lipiidieemaldusprotsessi kordamist. Meie hinnangul ei eemaldunud esimestes želatiinivalmistamise katsetes ühekordse puhastusetapi mõjul osa lipiidsest (ja tõenäoliselt ka valgulisest) materjalist. Loputamise käigus ja ka järgnevas demineraliseerimisprotsessis võis lahuse pinnal näha endiselt õlililgakeste sarnaseid kogumeid (Joonised 11-12), suurepoorilise filtri kasutamisel (poorisuurusega üle 8  $\mu\text{m}$ ) olid väiksed õlililgakesed nähtavad isegi lõpplahuses. Valgu- ja lipiidijääkide eemaldamise tõhustamiseks kasutasime alates želatiinipartiist nr. 4 (Tabel 1) kahte üksteisele järgnevat deproteineerimisetappi, mõlema järel viidi läbi kolmekordne loputamine kuuma kraaniveega.



Joonis 11. Latikanahkade deproteineerimine 30 l panges.



Joonis 12. Õlitilgad loputusvee pinnal pärast esmast deproteineerimist.

Ka loputusvee temperatuur (külm või kuum kraanivesi, vastavalt 15-17 °C ja 46-48 °C) mõjutab lipiidsete osakeste eemaldamise efektiivsust (kuuma vee puhul efektiivsem). Samuti tekkisid loputusvee temperatuurist olenevalt erinevused eelpuhastuse läbinud materjalis: kui külma loputusvee puhul võisid kalanahad koos soomustega jääda terveteks või suuremateks tükkideks (joonis 13), siis kuum vee puhul soomustest lahene nahk sisuliselt lagunes, kadus (järele jäid vaid väikesed tumedad osakesed), valdavalt jäid alles lahtised soomused (Joonis 14). Kuna peenikesed nahajäägid moodustasid väga väikese osa võrreldes soomustega, siis loobusime nende kokkukogumisest (loputusveest peenevõrgulisele polüpropüleenisõelale kogumisest). Eraldasime jääkmaterjali loputusveest suure 9 l mahuga polüpropüleenisõelaga, mille aukude läbimõõt oli ca 5 mm. Nahast alles jäänud peenemad osakesed läksid sõelaukudest läbi ja sõelale jäi peamiselt soomusemass. Selle suunasime edasi demineraliseerimisetappi.

Meie kasutasime kalanahkade 1 kg märgkaalu kohta 10 kg lahust, mis oli taolistes katsetes kasutatud suhe teaduskirjanduse põhjal. Kuna käesolevas projektis oli eesmärgiks eelkõige kindlaks teha, milline on meie kalajääkidest toodetava želatiini parim võimalik kvaliteet ja kas see sobib järgnevateks rakendusteks, keskendusime eelkõige materjali puhtusele. Suuremamahulises tootmises on oluline keskenduda ka ressursisäästlikkusele. Selles perspektiivis peaks läbi katsetama selle, kas eelpuhastuseks vajalik leelise- ja happelahuse kogus võiks olla ka väiksem. Kui kasutada kahte valgu- ja rasvaeemaldusetappi ühe asemel, siis tõenäoliselt on mõlemas etapis võimalik lahuse kogust vähendada. Eeldame, et kui ühe 1 kg kalanahkade kohta kasutada 10 kg lahust, siis jagades selle koguse kahte järjestikusse etappi on puhastumine efektiivsem kui sama koguse kasutamisel ühes etapis. Kindlasti sõltub vajalik lahusekogus ka kasutatavate kalajääkide valgu- ja lipiidisisaldusest.



Joonis 13. Juhul, kui deproteineerimise järel on kalanahku loputatud külma kraaniveega, jäävad želatiini eraldamisprotsessi lõpuks alles nii eraldunud soomused kui ka soomustega kalanahatükikesed.



Joonis 14. Juhul, kui deproteineerimise järel on kalanahku loputatud kuuma kraaniveega, jäävad nahast alles vaid peenikesed osakesed, valdava materjali moodustavad lahtised soomused.

#### 2.1.4 Želatiini ekstraheerimine.

Želatiini väljaekstraheerimiseks deproteineeritud ja demineraliseeritud kalajääkidest viisime läbi kaks üksteisele järgnevat etappi:

- 1) Eeltötlus 0,2 M äädikhappega toatemperatuuril (äädikhappelahuse ja kalajääkide kaalusuhe 10:1) 15-30 min jooksul. Sellele järgnes kalajääkide kolmekordne loputamine destilleeritud veega, igal korral loputusvee ja kalajääkide kaalusuhe ca 10:1.
- 2) Kalajääkide inkubeerimine destilleeritud vees kõrgel temperatuuril želatiini ekstraheerumiseks kalajääkidest lahusesse (Joonis 15, 16). Varieerisime nii ekstraheerumistemperatuuri kui -aega (täpsemalt välja toodud Tabelis 1).



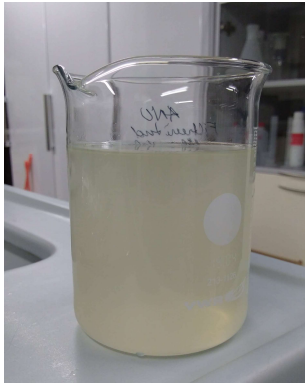
Joonis 15. Kalasoomusemass ahjus destilleeritud vees inkubeerumas (želatiini ekstraheerimise etapp)



Joonis 16. Želatiini ekstraheerimiseks 70°C, 60°C ja 45°C juures 6 h jooksul inkubeeritud kalanahad

### 2.1.5 Želatiinilahuse filtreerimine

Oluline roll saadava želatiini puhtuses on sellel, kuidas želatiinilahust puhastatakse. Pärast kalajääkidest želatiini ekstraheerimist on vaja kalajäägid lahusest eemaldada sõela või võrgu abil, seejärel aga tuleb järelejäänud želatiinilahus filtreerida läbi väiksema poorisuurusega filtri. Projekti käigus katsetati filtreerimist läbi polüpropüleensõela (võrkjas), peenesilmalise võrgu (korduvkasutatav kohvifilter), läbi polüpropüleenist filterkoti (100 µm ja 5 µm, vastavalt IKM Testing Filter Bag WE100P2 (100 µm) ja WE5P2 (5 µm) tootjalt IKM Testing) ning vaakumfiltratsiooni läbi tselluloosfiltrite ("Белая лента", poorisuurus 8-12 µm; Whatman Grade nr. 4, 20-25 µm) ja kõige peenema filtrina 0,7 µm poorisuurusega klaasfiiberfiltri (Whatman GF/F). Tselluloos- ja klaasfiiberfiltrite kasutamisel koos vaakumfiltratsiooniseadmega viisime läbi ka eelfiltreerimise läbi peene võrgu või filterkottidest lõigatud materjali, et vältida filtrite ummistumist (joonis 18). Võrkude, filterkottide ja tselluloosfiltrite kasutamise järel võis želatiinilahus jääda siiski üsna hägune ja kergelt värvunud (joonis 17). Selge ja värvitu želatiinilahuse saime juhul, kui kasutasime 0,7 µm poorisuurusega filtrit (joonis 19).



Joonis 17. Hägune ja kergelt värvunud želatiinilahus pärast filtreerimist läbi tselluloosifiltri "Белая лента".

Kõige puhtama, värvituma ja selgema želatiinilahuse saavutasime GF/F filtri kasutamisel, kuid seda filtritüüpi oli võimalik kasutada vaid tõhusalt eelpuhastatud kalajääkide korral.



Joonis 18. Vaakumfiltreerimine läbi klaasfiiberfiltri koos eelpuhastamisega läbi filterkoti materjalist eelfiltri



Joonis 19. Pärast filtreerimist läbi Whatman GF/F filtri saadud läbipaistev värvitu želatiinilahus

Kui kalajääkide eelpuhastuse käigus oli läbi viidud kaks järjestikust deproteineerimisetappi ja neile järgnenud loputused kuuma kraaniveega, sai želatiinilahust probleemideta filtreerida läbi 0,7  $\mu\text{m}$  GF/F filtri, lahusel puudus ebameeldiv lõhn, lahus oli selge ning peaaegu värvitu.

Ühekordse valgu- ja rasvaemaldusetapi ning/või külma veega loputamise puhul, s.t. kui lahuse eelpuhastamine polnud efektiivne, oli lahus enne filtreerimist silmaga nähtavalt hägune, sageli ka

värvunud. Sellise želatiinilahuse filtreerimine läbi nii peene poorisuurusega filtri oli äärmiselt aja- ja materjalikulukas: vaid paarikümne milliliitrise mahuga želatiinilahuse filtreerimine võttis aega üle 10 minuti ning seejärel tuli 47 mm läbimõõduga GF/F filter välja vahetada. Ühe partii valmistamise käigus puhul saime reeglina aga ca 4 liitrit želatiinilahust, mis vajas läbifiltreerimist. Seega, kuna filtreerimisetapp läbi peene poorisuurusega filtri on hädavajalik lahuse puhtuse saavutamiseks, tuleks panustada aega ja energiat pigem materjali tõhusale eelpuhastamisele, et filtreerimisetapp ei hakkaks ajaliselt kogu protsessi pidurdama. Ka maksumuselt on tõenäoliselt palju kulukam investeerida filtritesse kui materjali puhastamise enne filtreerimisetappi.

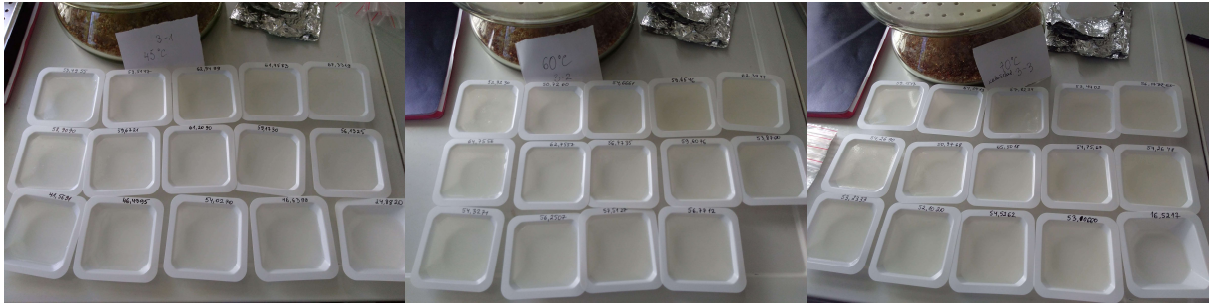
### 2.1.6 Želatiini kuivatamine

Želatiinilahusest kuiva želatiinipulbri saamiseks tuleb lahus kuivatada. Kuivatamiseks katsetasime erinevaid meetodeid: lüofiliseerimine; kuivatamine õhukese kihina toatemperatuuril ( $22 \pm 2$  °C) pideva õhu ülevoolu tigmustes (tõmbekapi all); kuivatamine laboriahjus ca 70°C juures ja kuivatamine 42-49°C juures kondensatsioonkuivatis.

Esimeste želatiinipartiide puhul ja ka algmaterjali muutmise korral (ahvenanahk, latikanahk) kontrollisime enne kuivatamist želatiinilahuse geelistumist (tardumist), asetades želatiinilahuse õhukese kihina laia pinnaga PP alustele külmikusse (2-8 °C). Külmikus tardusid želatiinid hästi (joonis 20), hoolimata lahuse suhtelisest madalast želatiinikontsentratsioonist (ca 2,5%). Madal kontsentratsioon oli ühe põhjusena tingitud inkubeeritud soomuste ja vee kaalusuhtest (1:4) želatiini väljaekstraheerimise etapis. Kui olime veendunud, et kasutatava meetodikaga saadav želatiinilahus tardub 4-6 kraadi juures, siis järgnevates etappides želatiini enne kuivatamist enam külmikus ei jahutatud, filtreeritud želatiinilahus suunati koheselt kuivatusprotsessi. Siiski geelistati külmikus kõik need želatiinikogused, mille puhul katsetati lahuse külmuivatamist, kuna tardunud geeliga aluseid oli ohutum asetada sügavkülmikusse; eelnev külmutamine on hädavajalik etapp materjali lüofiliseerimisel (joonis 21).



Joonis 20. Külmkapis geelistunud kalaželatiini lahus



Partii 3-1. 45°C juures 6 h jooksul inkubeeritud kalanahkadest saadud želatiinilahus jahutatult ja geelistunult  
 60°C juures 6 h jooksul inkubeeritud kalanahkadest saadud želatiinilahus jahutatult ja geelistunult  
 70°C juures 6 h jooksul inkubeeritud kalanahkadest saadud želatiinilahus jahutatult ja geelistunult

Joonis 21. Erinevatel temperatuuridel inkubeerimise järel saadud jahutatud ja geelistunud želatiinilahused. Lahused on sellest etapis valmis järgneva külmutamiseks, et proove oleks võimalik kuivatada lüofilisaatoris.

Lüofiliseerimisel ehk külmutamisel kuivatatakse külmutatud materjal lüofilisaatoris ca -55°C juures vaakumi tingimustes (Joonised 22-24). Lüofiliseeritud želatiin on õhuline, suuremahuline.



Joonis 22. Lüofilisaator



Joonis 23. Kaalualustel eelkülmutatud želatiiniproovide kuivatamine lüofilisaatoris



Joonis 24. Lüofiliseeritud želatiin on õhuline ja kerge.

Laboratoorses kuumutuskapis kuivatatakse õhukese kihina laiale polüpropüleenalusele asetatud želatiinilahust 70°C juures (Joonis x). Kuna kuumutuskapis puudub intensiivne ventilatsioon, siis madalama temperatuuri kasutamisel oleks kuivamine võtnud nii palju aega, et oleks jõudnud hakata tekkima ebasoovitavad muutused želatiini omadustes. Täheleanduv, et ka 70°C kuivatusviisi puhul kipub želatiin muutuma kollakamaks ja väga kõvaks, eriti kohtades, kus želatiinilahust oli paksemalt (Joonised 27, 28).

Kuivatamine kondensatsioonkuivatis (Joonis 26) võimaldas kasutada madalamat temperatuuri (katsetasime temperatuuridel 41-49 °C), siiski oli tagatud kiire kuivamine. Kondensatsioonkuivatis on intensiivne ventilatsioon, proovist eraldub niiskus sooja kuiva õhku, millest niiskus pidevalt eemaldatakse niiskusekondensaatori abil. Madalamal temperatuuril on kuivatamine õhukese kihina

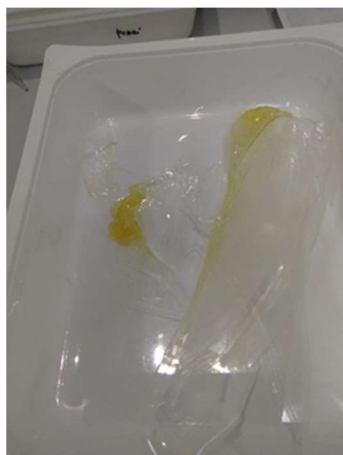
ja kiiresti oluline, et ei tekiks mikroobidele soodsat kasvukeskkonda – želatiin on valk, mis on soblik toiduallikas paljudele mikroobidele.



Joonis 25. Želatiini kuivatamine kuumutuskapis



Joonis 26. Želatiini kuivatamine kondensatsioonkuivatis



Joonis 27. 70°C juures kuivanud želatiini värvuse muutus.



Joonis 28. Erinevate kuivatusviiside mõju želatiinilehtede värvusele (kollakam – kuumkapis 70°C juures kuivatatud želatiin; värvusetu – kondensatsioonkuivatis kuni 49°C kuivatatud želatiin)

Kondensatsioonkuivatis kuivatamine osutus otstarbekamaks kui külmkuivatamine, kuna külmkuivatamine on energiamahukam ning kuivatatava materjali kogused suhteliselt väikesed. Samuti on kondensatsioonkuivatis kuivatatud materjal suurema tihedusega ning kergemini purustatav. Külmkuivatatud materjal on õhuline, seda saab jahvatusveskisse panna vaid väikese koguse kaupa. Materjalis on jahvatamise lõpuks staatilist elektrit, mistõttu ei saa seda jahvatusseadme pindadelt kokku koguda ning seega tekib materjali kadu.

### 2.1.7 Želatiini peenestamine

Kuivatatud želatiini purustamiseks katsetati erinevaid meetodeid. Lüofiliseeritud želatiinibrikettide purustamine uhmril ei andnud tulemust, sest õhulised vetruvad briketid käitusid penoplastilaadselt, need ei murdunud ega purunenud. Samuti oli komplitseeritud taoliste brikettide purustamine



kohviveskis, kuna kerge materjal tõuseb pigem lõiketeradest kõrgemale kaane alla, kuhu liibub elektrostaatiliselt hõõrdumise tagajärjel. Sellist materjali on ka raske saada kätte veski pindadelt, see liibub ka tõstmislusika külge. Siiski, vähendades jahvatuskambri mahtu, oli võimalik selle meetodiga lüofiliseeritud materjali jahvatada (joonis 29). Saadud želatiinimass oli õhuline ja kohev ning nõuab hoiustamiseks suurema mahuga nõusid (joonis 31). Suuri želatiinilehti (saadud kuumutuskapis või kondensatsioonkuivatis kuivatamisel) on raske tükeldada nii väikeseks, et neid saaks purustada kohviveskis; lisaks tekib taas probleem elektrostaatikaga hõõrdumisel kohviveski plastikosade vastu. Efektivsemaks osutus želatiinilehtede purustamine klaaspurgis roostevaba nuimikseriga, vältides nii plastikpindadega kokkupuudet (joonis 30). Siiski ka selle purustamisviisi puhul tuli želatiinilehed murda esmalt peenemateks ribadeks, et need purki mahuksid. Murdmise käigus võis aga tekkida arvestatav materjalikadu, kui osad tükikesed siiski lahti murdmisel eemale kukkusid. Soovituslik oleks kasutada laboratoorset veskit, nt. Retsch Grindomix 200 nugalõikuril on olemas jahvatuskambri mahu vähendamise lisatarvikud, see on efektiivne seade erinevate materjalide laboratoorses mahus jahvatamiseks, võimaldades jahvatada peeneks ka kõvemat materjali – meie projekti vajadusi silmas pidades nii želatiinilehtede tükke kui kitiinset materjali.



Joonis 29. Kohviveskis purustatud lüofiliseeritud želatiin.



Joonis 30. Želatiini purustamine nuimikseriga.



Joonis 31. Suuremas purgis lüofiliseeritud ja kohviveskis purustatud želatiin; väiksemas purgis kondensats. kuivatis moodustunud želatiinilehed nuimikseriga purustatud. Mõlemas purgis on sama kaaluga želatiinimass.

### 2.1.8 Želatiini saagis

Käesolevas aruandes defineerime saagise kui kuiva želatiini protsendi kalajäägi märgkaalust. Želatiini saagise arvutused viidi täpsemalt läbi mõnede želatiinipartiide puhul. Partii 1 puhul (partiide valmistamise parameetrid on toodud Tabelis 1) oli fileerimisel tekkinud ahvenanahkadest saadav želatiini saagis 2,33 %. Pärast projekti eesmärkidega sobiva valmistusviisi väljavalimist (alates 8. želatiinipartiist kasutatud protsessiparameetrid, Tabel x) oli latikanahkadest saadav želatiinisaagis  $5 \pm 0,25$  %. Seega 2 kg latikanahkade märgkaalu kohta saime reeglina 95-105 g kuiva želatiini (joonis 32). Sealjuures ei kogutud kokku želatiinijääke želatiinilahusest väljasõelatud materjalist (antud projektis keskendusime eelkõige želatiini kvaliteedi ja rakendatavuse hindamisele, seega polnud

lisaenergia ja -aja kulutamine želatinisaagise maksimeerimiseks siin oluline). Samuti tekkisid erinevatel partiidel varieeruvad väikesed kaod kuivatatud želatiini purustamisel – tööstuslikul tootmisel saab need kaod elimineerida. Seega võib arvestada, et 1 kg latikanahade kohta on võimalik saada vähemalt 55 g kuiva želatiini. Valmistamismeetodi optimeerimisel võib olla võimalik saagist ulatuses veelgi tõsta.



Joonis 32. Kondensatsioonkuivatis kuivatatud želatiinilehed nuimikseriga purustatult. Partiid 14, 15 ja 16. Saagised varieeruvad ligikaudu 100 g juures 2 kg kalanahkade kohta.

### 2.1.9 Ülevaade želatiinipartiide valmistamismeetoditest

Kasutatud protsessiparameetritest erinevate želatiinipartiide puhul annab ülevaate Tabel 1. Esimeste partiide puhul kasutati erinevaid protsessiparameetreid, et saadud želatiinide omaduste põhjal otsustada, milline valmistamismeetod osutub sobivaimaks järgnevate rakenduste nõudeid silmas pidades. Sobivuse hindamisel võrreldi kalajääkidest valmistatud želatiini omadusi kommertsiaalsete kontrollželatiinide omadustega. Alates partiist nr. 8 leiti parameetrid olevat sobivad selliste omadustega želatiini valmistamiseks, mida saab kasutada järgnevates rakenduskatsetes fiibriliste materjalide tootmiseks. Seetõttu valmistati järgnevad partiid samasuguse meetodika alusel. Ühesugune meetodika võimaldas hilisemas karakteriseerimises võrrelda želatiinipartiide omaduste

varieeruvust (protsessi korratavust) kui ka optimeerida fiibrilise materjali valmistamise protsessiparameetreid.

Tabel 1. Želatiinipartiide valmistamise parameetrid. \* - pärast äädikhappetöötlust toimunud ca 12 h leotamine dest. vees (partiid 18, 19).

Partii	Vari- ant	Partii valmist. algus	Kalanahk (liik, päritolu)	Eel- puhast 0,1 M NaOH 2 h	De- mineral. 1 M HCl 1 h	CH <sub>3</sub> COOH 0,2 M	Ekstrah. Dest. vees		Filtreeri- mine	Kuivatami ne	Peenest.
							Inkub. aeg (min)	Aeg (h)			
1		19.05.2020	Ahven (Peipsi)	1 x	+	15	8	45	metallsöel (teesöel)	Toatemp. tõmbkapp	Ei peenest.
2	1	26.05.2020	Ahven (Peipsi)	1x	+	15	6	45	Paberfilter 7-20 µm	lüofilis.	Ei peenest. Lüofiliseeritud briketid
	12										
	18										
3	1	18.06.2020	Latikas, (Vörtsj.)	1x	+	15	6	45	Paberfilter 7-20 µm	lüofilis. 2x	kohviveski
	60										
	70										
4	1	10.08.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	15	16	70	Paberfilter 7-20 µm	lüofilis.	kohviveski
2	70°C, kuum.kap p										
5	1	17.08.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	15	16	70	Paberfilter Whatman G4 20-25 µm	Kond.kuiv ati 41 °C	saumikser
	2								Paberfilter 7-20 µm		
6	1	31.08.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Filterkott (PP) 5 µm	Kond.kuiv ati 49°C	saumikser

7	1	15.10.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30 (NB! 0,4 M CH <sub>3</sub> COOH)	19	75	Filterkott (PP) 5 µm	70°C, kuum.kap p	saumikser
8	1	29.10.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. kuivati 49°C	saumikser
9	1	2.11.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
10	1	10.11.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
11	1	7.12.2020	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
12	1	4.01.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
13	1	18.01.21	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
14	1	1.02.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
15	1	15.02.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
16	1	1.03.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser

17	1	22.03.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
18	1	5.04.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16 *	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
19	1	19.04.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16 *	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
20	1	3.05.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
21	1	18.05.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
22	1	31.05.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
23	1	18.08.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
24	1	31.08.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
25	1	6.09.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser
26	1	4.10.2021	Latikas, (Peipsi)	2x	+	30	16	75	Whatman GF/F 0,7 µm	Kond. Kuivati 49°C	saumikser

### 2.1.10 Želatiini ekstraheerimisjäädete kasutamise uuring

Ekstraheerimisprotsessi lõpuks jäi järele praktiliselt vaid töödeldud kalasoomuste mass. Kalanahk oli töötluste käigus peaaegu täiesti lagunenu. Soomused on eelnevate töötluste käigus puhastatud valkudest, lipiididest ning mineraalainetest. Protsessist ülejäänud soomusemass sisaldab mõnevõrra želatiinijääke, mis jäi soomustele pärast želatiinilahuse väljafiltreerimist. Antud laboratoorses protsessis polnud želatiinijäädete väljaloputamine soomustelt vajalik, kuid želatiini suuremahulisel tootmisel võib olla otstarbekas ka need želatiinijäägid kokku koguda.

Protsessist järelejäänud soomusemassi potentsiaalseks kasutamiseks püstitasime kaks hüpoteesi:

- 1) Želatiinijääke sisaldav soomusemass sobib lämmastikku sisaldava tugivahena lisandiks taimede kasvusubstraati
- 2) Protsessist järele jäänud deproteineeritud ja demineraliseeritud ning želatiinijäädetest puhastatud soomusematerjal on kitiinise iseloomuga, nagu viidatud teaduskirjanduses (Ssekatawa jt. 2021)

Vastavalt hüpoteesidele viisime läbi kaks uurimust:

- 1) Taimkatse salatkressiga uurimaks taimekasvusubstraati lisatud želatiinijääke sisaldava soomusemassi mõju taimekasvule.
- 2) Loputatud ja kuivatatud soomuste karakteriseerimine võrdluses kitiinise materjaliga (tulemused on aruandes toodud kitiiniuuringute peatükis).

#### Salatkressi kasvukatse

Kasvukatses kasutati taimeliigina salatkressi (*Lepidium sativum*). Salatkress on kasvusubstraadi omaduste esmaseks hindamiseks sobiv taimeliik: ta on kiire kasvuga (taimepadjand areneb välja umbes nädalaga) ning tal on hea indikaatorlus kättesaadavate toitainete omastamise kohta vastavalt taimepadjandi kõrgusele ning lehtede värvusvarjunditele.

Katses valiti kontrollsubstraadiks toitainevaene liivane substraat. Katsevariantidena lisati põhisevete kas ainult järvesetet, ainult kuivatatud soomuseid või korraga nii järvesetet kui ka soomuseid. Varasemate uuringute põhjal valisime järveseteks Kodijärve (hüpertroofne väikejärv Kodijärve asulas Tartumaal) toitainerikka sette.

Kokkusegatud substraate niisutati; järvesettelisandiga substraate niisutati tagasihoidlikumalt, sest järvesete sisaldas juba ise ca 95 % vett), substraadi pinnale külvati igasse kasvunõusse 1 g salatkressi seemneid. Taimedele tagati piisav valgustus taimekasvulampide abil. Esimesel kahel päeval kaeti kasvunõud läbipaistva kilega, et idanevad seemned ära ei kuivaks. Kasvunõusid kasteti regulaarselt ja jälgiti taimede arenemist nädala vältel (joonis 33).



Joonis 33. Salatkressi kasvukatse. Katsevariandid vasakult paremale: 1) kontrollkatse põhisubstraadiga, 2) põhisubstraat + järvesete, 3) põhisubstraat + želatiinijääkidega soomused, 4) põhisubstraat + järvesete + želatiinijääkidega soomused, 5) ja 6) – põhisubstraat + alternatiivne veesidumismaterjal.

Katse lõpuks oli selge, et soomuste lisamine on salatkressi taimede kasvu pärssinud. Ainult soomuselisandiga kasvusubstraadi puhul võiks põhjuseks olla toitainete vaegus, kuigi ka toitainevaesel substraadil või ainult vee olemasolul suudab tavaliselt salatkress seemnetega kaasas oleva toitainearvu arvel idaneda ning esimesi rohelisi võrseid kasvatada (see leidis kinnitust ka Petri tassil eraldi läbi viidud idanemiskontrollkatses). Soomuselisandiga liival aga seemed ei hakanud korralikult idanemagi. Sette- ja soomuselisandiga substraadil seemed küll idanesid ja tärkasid ka esimesed võrsed, kuid juba alates teisest-kolmandast päevast oli näha võrdete kasvu peatumist ja taimede kärbumist. Sealjuures olid tärganud võrsed hoopis tumedama rohelise tooniga kui vaid settelisandiga substraadil, mis viitas lämmastiku kättesaadavusele substraadist. Katse lõpuks oli tekkinud tugev taimepadjand settelisandiga substraadil, kuid soomuselisandiga kasvuvariantides puudus mõõdetav taimebiomass. Huvitaval kombel oli tugevam taimekasv olemas kontrollkatsevariandis põhisubstraadil, millele polnud üldse lisatud taimetoitaineid sisaldavaid lisandeid.

Kuivõrd esimesel paaril päeval suutsid idaneda ja tärkavad taimed kalasoomustes želatiinijääkidenä sisalduvat lämmastikku mingil määral omastada (taimelehtede värvusindikatsioon), siis oleksime oodanud, et vähemalt sette- ja soomuserikastusega kasvusubstraadil on taimedel olemas kõik vajalikud toiteelemendid ning see substraat on salatkressi kasvuks kõige parem. Kasvu tugev pidurdumine viitab aga inhibeerivale tegurile soomuselisandi puhul. Võimalik, et selleks on mõnevõrra alanenud pH: enne viimast ekstraheerimist destilleeritud vees töödeldi soomuseid lühidalt äädikhappega. Hoolimata järgnenud kolmekordsest loputusest destilleeritud veega oli ka hiljem destilleeritud vette ekstraheerunud želatiini lahus ikka veel kergelt happeline, pH 4-5. Sellest võib järeldada, et tõenäoliselt oli äädikhappe jälgkontsentratsioon alles ka želatiinijääkidega soomustes. Seega katse tulemused ei kinnitanud hüpoteesi, et želatiinieralduse protsessist üle jäävad želatiinijääkidega kalasoomused võiks oma lämmastikusisalduse tõttu olla heaks lisandiks taimede kasvusubstraadis.



## 2.2 ŽELATIINI KARAKTERISEERIMINE

Töö eesmärgiks oli välja selgitada kalajääkidest valmistatud želatiini füsikoemilised omadused ning selle sobivus kasutamiseks elektrosppinnitud haavakatetes.

### 2.2.1 Želatiinide vesilahuste valmistamine ja füsikoemiline karakteriseerimine

#### 2.2.1.1 Partiid 2-6

Selles etapis viidi läbi esmane füsikoemiline karakteriseerimine nii uuritavatele želatiinipartiidele (viskoossus, Bloom tugevus, elektrijuhtivus, pH) kui ka kontrollmaterjalidele (raskmetallide sisaldus, niiskussisaldus, viskoossus, Bloom tugevus, elektrijuhtivus, pH).

Esimeste želatiinipartiide tootmisel katsetati erinevaid valmistamismeetodeid. Erinevused seisnesid algmaterjali allikas (erinevad kalaliigid või nende veekoguline päritolu) või želatiinipartiide valmistamisviisi (eelpuhastusetappide, hüdroolüüsingimuste, filtreerimistehnikate, kuivatus- ja ka peenestamisviiside) poolest. Alates 8. partiist jäädi väljavalitud kalajääkide ning valmistamisviisi juurde ja kõik järgnevad partiid valmistati võimalikult samasugustel tingimustel. Kõikide želatiinipartiide valmistamise parameetrid on toodud Tabelis 1.

Esimeses etapis viidi želatiini karakteriseerimine läbi partiidega nr. 2-6:

Želatiinipartii	Partii valmistamistingimused
2-1, 2-2, 2-3	Peipsi ahvena nahast saadud proovid (hüdroolüüs 45°C juures ja varieeritud inkubatsiooniga (vastavalt 6 h, 12 h, 18 h)
3-1, 3-2, 3-3	Võrtsjärve latika nahast saadud proovid (hüdroolüüs 45°C, 60°C ja 70°C juures, inkubatsiooniga ei varieeritud (6 h), külmuivatatud proovid)
4-1, 4-2	Peipsi latika nahast saadud proovid (hüdroolüüs 70°C juures; esimene proov külmuivatatud, teine kuivatatud kuumakapis 70°C juures)
5-1	Peipsi latika nahast saadud proovid (hüdroolüüs 70°C juures, proovid kuivatatud kondensatsioonkuivatis 41°C)
6	Peipsi latika nahast saadud proovid (hüdroolüüs 75°C juures, proovid kuivatatud kondensatsioonkuivatis 49°C)

#### Vesilahuste valmistamine

Esmaseks karakteriseerimiseks valmistati želatiini vesilahused (6,67%; elektrijuhtivuse määramiseks 1%) ning määrati nende vesilahuste pH, elektrijuhtivuse, viskoossuse ning Bloom tugevuse väärtused. Kõik mõõtmised viidi läbi vastavalt GMIA juhendile STANDARD TESTING METHODS FOR EDIBLE GELATIN, mis on mõeldud želatiini tootjatele (uuendatud 2019 aastal; <http://www.gelatin-gmia.com>). Mõõtmised teostati nii uuritavatele Maaülikoolis toodetud želatiini algmaterjalidele kui ka kontrollproovidele (ostetud kindla kvaliteediga želatiinid otse tootjalt). Kontrollželatiinide tähistused

ja tooteinfo: „FG“ - Fish Gelatin (MM Ingredients)(kalaželatiin); „MG“ - Medella Pro Gelatine (Gelita) ja „GG“ Imigel (Gelita)(seaželatiin).

Kontrollproovide lahustumisega probleeme ei tekkinud, saadi küll erineva värvusega kui selged lahused, kuna želatiini allikad olid erinevad (kala- vs sea- ja veiseželatiin). FG (kalaželatiin) proovid olid läbipaistvamad (kergelt valge alatooniga) kui GG proovid (seaželatiin), mis olid kollase värvusega viskoossed lahused (joonis 34). Samas MG proov (mis oli ka seaželatiin, aga kõrgema puhtusastmega), oli sarnaselt FG valge alatooniga selge lahus.



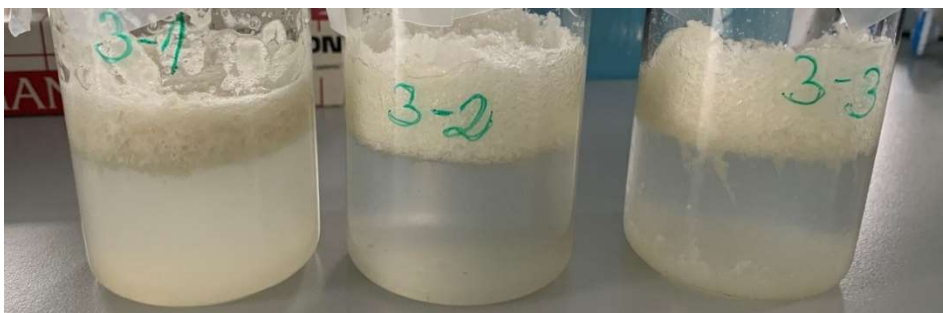
Joonis 34. Pundumise faasis kontrollproovide vesilahused, vasakult GG, MG ja FG.

Partiide 2-1, 2-2 ja 2-3 (Peipsi ahvena nahast saadud želatiiniproovid) proovide lahustamisel olid proovid üsna sarnased kalaželatiini (FG) kontrollproovidega (värvus, läbipaistvus), kuigi võrreldes kontrollproovidega jäid proovid veidi hägusemaks (joonis 35).



Joonis 35. Partiide 2-1, 2-2 ja 2-3 želatiiniproovide vesilahused pundumise faasis (Peipsi ahvena nahast saadud želatiiniproovid).

Partiide 3-1, 3-2 ja 3-3 (Võrtsjärve latika nahast saadud želatiiniproovid) proovide lahustamisel tekkisid probleemid ning kuni lõpuni välja jäid proovid siiski teatud osas lahustumatuks (joonis 36).



Joonis 36. Partiide 3-1, 3-2 ja 3-3 uuritavad želatiiniproovide vesilahused (Võrtsjärve latika nahast saadud želatiinid).

Partiide 4-1 ja 4-2 (Peipsi latika nahast saadud želatiin) lahuste valmistamisel probleeme ei esinenud, kõik proovid lahustusid ära. Lahused olid kollakamad võrreldes ahvena nahast saadud želatiinilahustega. Erinevusi täheldati proovide lahustumiskiiruses, külmuivatatud proovid lahustusid kiiremini võrreldes kuumkapis kuivatatud proovidega.

Peipsi latika naha želatiinipartiide 5-1 ja 6-1 proovide lahustumisele eelnenud pundumise faasi tulemused näitasid, et võrreldes eelmiste partiidega on lahustel erinev värvus. Need lahused olid kollakamad võrreldes ahvena nahast ja 4. partii latikanahast saadud želatiini lahustega, samas võrreldes MG kontrollprooviga siiski valgema alatooniga. Kui kogu proov oli lahustunud, olid uuritavad želatiiniproovid siiski hägusemad võrreldes kontrollproovidega.

#### Bloom tugevuse, pH, elektrijuhtivuse ja viskoossuse määramine

Uuritavate želatiiniproovide esmase karakteriseerimise käigus määrati Bloom tugevus kasutades tekstuurianalüsaatorit; pH ja elektrijuhtivus määrati kasutades pH meetrit ja elektrijuhtivuse määrajat. Viskoossuse määramiseks kasutati kas koonus-plaat reomeetrit või kapillaarviskosimeetrit. Mõõtmised viidi läbi ka kontrollželatiinidel, kõik kontrollproovide mõõtmistulemused kinnitavad tootjapoolseid etteantud väärtusi. Mõõtmiste tulemused:

- pH jäi 2.-6. partii želatiinide puhul vahemikku 4,1-6,1 (kontrollželatiinidel 5,2-5,4).
- Elektrijuhtivus oli 3.-6. partii proovidel vahemikus 190-260  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (vaid 2. partii proovidel oli see oluliselt kõrgem, üle 2000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Kontrollželatiinidel olid keskmised mõõdetud elektrijuhtivuse väärtused 63-149  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .
- Bloom tugevuse keskmised mõõteväärtused kontrollproovidel jäid vahemikku 144-285 g, olles vastavuses tootjate spetsifikatsioonidega. 2.-6. partii uuritavate želatiinide Bloom tugevus varieerus vahemikus 171-337 g. Sealjuures 2. partii (ahvenanahad) Bloom väärtused varieerusid 247-282 g (mida lühem ekstraheerimisaeg, seda kõrgem väärtus), 3. partii želatiinide (latikanahk) keskmine Bloom väärtus oli koguni 322 g. Järgnevate partiide (4, 5, 6) pikendatud ekstraktsiooniajad ja kõrgemad ekstraktsioonitemperatuurid (vt. Tabel 1) andsid keskmiseks Bloom väärtuseks 200,5.
- Viskoossuse keskmised mõõteväärtused kontrollproovidel olid 3,9-25,1 mPa\*s (60°C; nihkekiirus 100 s<sup>-1</sup>). Uuritavatest želatiinidest määrati viskoossus 2. partii proovidel: keskmised väärtused olid 42,2 (proov 2-1), 25,1 (proov 2-2) ja 14,8 mPa\*s (proov 2-3).

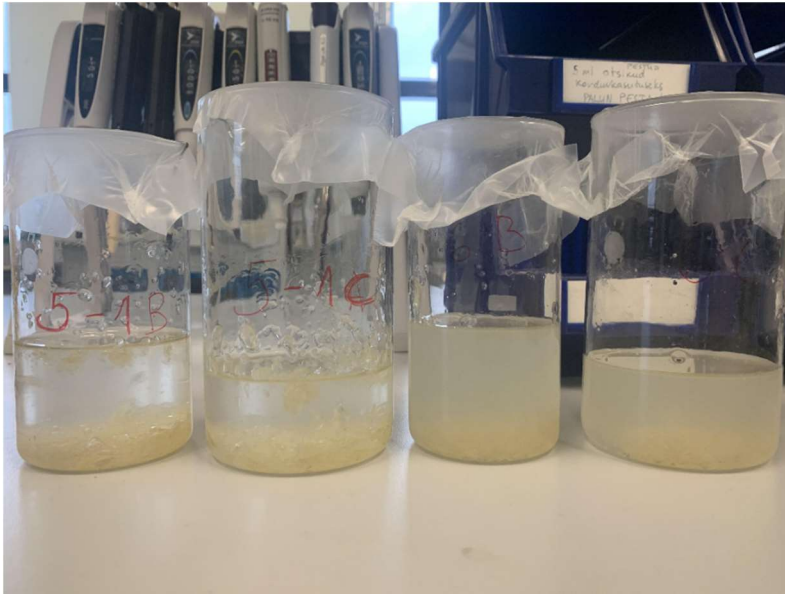
Tulemused näitasid, et hüdroolüüsi tingimuste muutmisel muutuvad ka želatiinivesilahuste omadused. Hüdroolüüsi aja pikendamine ning temperatuuri tõstmine alandas proovide viskoossust. Üldiselt partiide 5-1 ja 6 želatiinidel olid üsna sarnased omadused kontrollproovidega.

Kontrollproovidel mõõdeti ka niiskuse ja raskmetallide sisaldused, mis kõik vastasid tootja spetsifikatsioonidele (kui tootja oli selle üldse eraldi välja toonud). Niiskuse sisaldused määrati Karl Fischer tiitrimetriaat kasutades ja raskmetallide sisaldused kasutades induktiivsidestatud plasma massispektromeetriaat (ICP-MS). Kontrollproovidest mõõdetud niiskusesisalduse keskmised väärtused jäid vahemikku 9-13%.

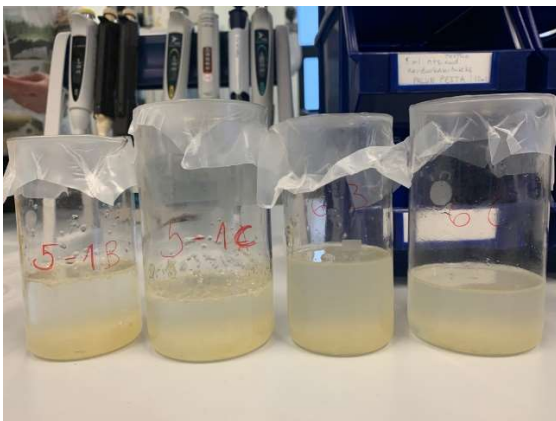
#### 2.2.1.2 Partiid 5-6, kordusmõõtmised

#### Lahuste valmistamine

Proovidest 5-1 ja 6-1 teostati ka kordusmõõtmised 1 kuu möödudes. Valmistatud 6.67% lahused olid kollaka värvusega ja hägused. Sealjuures 5-1 želatiin lahustus tunduvalt paremini ja kiiremini. 6 želatiin oli juba enne pundumist hägune (joonis 37), 5-1 želatiin muutus häguseks pundumise ajal (joonis 38). 6-1 želatiini ei õnnestunud lõpuni täielikult lahustada, ka pärast viskoossuse määramist, kui lahuse temperatuur jõudis 60 °C juurde. (lahuste valmistamisel kõikide kuumutamiste korral jäi lahuse temperatuur alla 40 °C, seejärel viime lahuse viskosimeetrisse ja seal tõuseb temperatuur 60°Cni, seejärel teostatakse mõõtmine). Samadest proovides 1 kuu varem teostatud analüüside puhul proovide lahustamisega probleeme polnud. Seega olid kuu ajaga materjali omadustes toimunud muutused.



Joonis 37: Pundumise alguses. Mõlema materjali puhul tekkis punduma pannes üsna kiiresti klombilaadne materjalikiht keeduklaasi põhja.



Joonis 38: Lahused pundumise lõpus. Häguseks on muutunud ka proovi 5-1 lahused. Vasakult alates 5-1 B, 5-1 C, 6-1 B, 6-1 C

#### pH, elektrijuhtivuse, viskoossuse ja Bloom tugevuse määramine

Proovide 5-1 pH kordusmõõtmiste väärtused jäid vahemikku 5,2-5,23 (1 kuu varem tehtud mõõtmisel 5,31); proovide 6-1 puhul vahemikku 4,83-4,88 (kuu varem 4,89).

Elektrijuhtivus määrati lahusest, mille želatiini kontsentratsioon oli 1%. Mõõtmine viidi läbi temperatuuril 30°C. Elektrijuhtivuse kordumõõtmiste väärtused jäid proovi 5-1 puhul vahemikku 207-217  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (1 kuu varem mõõdeti 190  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), proovi 6-1 puhul 223-225  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (kuu varem 229  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

Viskoossuse määramiseks valmistatud proovi lahust kuumutati pliidiil 60 °C juures ning viidi seejärel vesivanniga ümbritsetud viskoossuspipetti. Mõõtmist alustati, kui lahuse temperatuur oli 60 °C. Dünaamiline viskoossus on saadud arvutusel:

$$V = (A \cdot t - B/t) \cdot d,$$

kus  $t$  - läbivooluaeg;  $d$  – õli tihedus, 6,67% 60 °C želatiini korral 1,001;  $A$  ja  $B$  – pipetikonstandid (kalibreerimine standardõlidega teostatud 18.08.2020). Dünaamilise viskoossuse väärtused varieerusid proovi 5-1 puhul 5,7-5,9 mPa\*s (kuu varem 5,5), proovi 6-1 puhul 5,1-5,3 (kuu varem 5,3).

Bloom test viidi läbi 17h pärast lahuste valmistamist (ette nähtud ajavahemik on 16-18h). Proovid olid pärast valmistamist külmkapis 7,5°C juures, meetodika kohaselt viiakse määramine läbi 10°C juures. Bloom tugevuse väärtused olid proovi 5-1 puhul 184-186 g (kuu varem 184 g), proovi 6-1 puhul 187-191 g (1 kuu varem 213 g).

Kokkuvõttes mõõdetud parameetrid märkimisväärselt ei erinenud kuuajalise vahega teostatud mõõtmiste vahel. Kõige suurem kõikumine oli 5-1 proovi elektrijuhtivuse väärtustes ning 6-1 proovi Bloomi tugevuse väärtustes, pH ja viskoossus andsid mõlema proovi puhul reprodutseeritavad tulemused. Tulemused näitasid, et 5-1 proov oli suurema viskoossusega, kui 6-1 proov. Statistiliselt olulisi erinevusi ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA/t-test) nende proovide vahel esines ainult viskoossuse ja pH puhul. pH oli suurem LN 5-1 proovi puhul (aluselisem), kui LN6 puhul (veidi happelisem). Elektrijuhtivuses ning Bloomi tugevuse väärtustes statistiliselt olulisi erinevusi kahe proovi vahel ei tuvastatud.

## 2.2.2 Želatiini partiide ja kontrollželatiinide IR spektrid ja analüüs

IR spektrite põhjal on võimalik tuvastada želatiini olemasolu ning hinnata želatiinide lipiidide sisaldust. IR spektrite analüüs teostati proovidele 4-1, 4-2, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 10-1 ja 11-1 (valmistamistingimused Tabelis 1). Analüüs viidi läbi seadmega ATR-FTIR spektrofotomeeter (IRPrestige-21 spectrophotometer; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) koos Specac Golden Gate Single Reflection ATR kristalliga (Specac Ltd., Orpington, UK).

IR spektrid koguti lainearvude vahemikus 600 ja 4000  $\text{cm}^{-1}$ , iga spekter oli 60 mõõtmise keskmine väärtus. Spektrid koguti nii uuritavate proovide kui ka kontrollproovide pulbritest. Kõik spektrid analüüsimeks normaliseeriti.

Esmalt mõõdeti kontrollželatiinide IR spektrid. Kõik kontrollželatiinid andsid sarnased IR spektrid, olenemata proovide mikrobioloogilisest puhtusest ning ka želatiinide algmaterjalist (kala- vs seaželatiin) olid kõikide proovide IR spektrites näha lainearvudel 2925 ja 2854  $\text{cm}^{-1}$  lipiididele omaseid piike. IR spektrid ühtisid kirjanduses publitseeritud želatiini IR spektritega. Želatiini IR spektris on kaks teravat piiki lainearvudel 1638  $\text{cm}^{-1}$  ja 1541  $\text{cm}^{-1}$ , mis on seotud želatiinile omaste amiid I ja amiid II võnkumistega. Lisaks on želatiinile omane lai piik keskmise intensiivsusega lainearvude piirkonnas 3300–3600  $\text{cm}^{-1}$ , mis näitab aminohapete absorptsiooni. ([doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.06.002)).

Uuritavate želatiiniproovide puhul saadi kontrollželatiinidega sarnased IR spektrid. Lisaks sellele, et tuvastati želatiini olemasolu proovides oli IR spektrite põhjal võimalik erinevate partiide lipiidide

sisaldust hinnata. Kõige suurema lipiidide sisaldusega partiid olid 5-1 ja 6-1, järgnesid ülejäänud partiid. Proovide 5-1 ja 6-1 IR spektrites oli lisaks lainearvudel  $2925\text{ cm}^{-1}$  (asümmeetriline CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> venitus) ja  $2854\text{ cm}^{-1}$  (sümmeetriline CH<sub>2</sub> venitus) olevatele lipiididele omastele võnkumistele tuvastatav ka C=O venitus lainearvul  $1746\text{ cm}^{-1}$ . Lipiididest kõige puhtamad partiid olid 7-1, 8-1, 10-1 ja 11-1. Need partiid olid valmistamise käigus enam puhastatud (alates 8. partiist filtreeritud läbi nii peene poorisuurusega filtri nagu  $0,7\ \mu\text{m}$ ); puhtuse osas lipiididest olid need partiid täiesti võrreldavad kontrollproovidega.

### 2.2.3 Želatiinipulbri valmistamise reprodutseeritavus

Kõikide Maaülikoolist saadud želatiini partiidega tehti esmane karakteriseerimine, mis sisaldas järgmisi meetodeid/mõõtmisi:

- Želatiini 6,67% ja 1% vesilahuste valmistamine (6,67% lahust kasutati enamuse parameetrite määramiseks, va. elektrijuhtivuse)
- Viskoossus
- Bloomi tugevus
- pH
- elektrijuhtivus (1% vesilahuse puhul)
- värvus, hägusus (mitte kõigil partiidel)

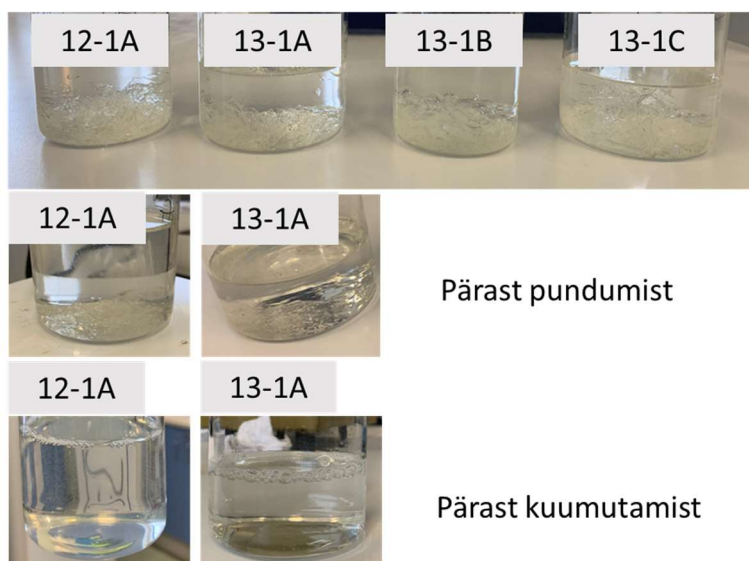
Kõik mõõtmised viidi läbi vastavalt GMIA juhendile STANDARD TESTING METHODS FOR EDIBLE GELATIN, mis mõeldud želatiini tootjatele (uuendatud 2019 aastal; <http://www.gelatin-gmia.com>). Mõõtmised teostati nii kontrollproovidele (ostetud kindla kvaliteediga želatiinid otse tootjatelt) ning ka uuritavatele želatiini algmaterjalidele, mis saadud Maaülikoolist.

Želatiini pulbri valmistamise reprodutseeritavust uuriti võrreldes omavahel samal meetodil valmistatud želatiinist tehtud vesilahuste omadusi. Kõiki proove säilitati 0% RH juures eksikaatoris.

Uuritavate želatiinide lahused (12-1 ja 13-1) käitusid sarnaselt. Pundumise alguses oli põhjas läbipaistev sade pundumise lõpul oli näha muidu läbipaistev ja selge lahus, aga põhjas lahustumatu pundunud sade ning kuumutamise lõpul olid kõik lahused selged ja läbipaistvad ja peaaegu värvusetud (joonis 39).

Visuaalne lahuste vaatlus näitas, et želatiinilahused on läbipaistvad ning peaaegu värvusetud, sellele saime kinnituse ka ultraviolet spektrikoopiaga neeldumise mõõtmistest. Želatiinilahuste (12-1, 13-1, 11-1 ja 8-1) selguse ja värvuse testide tulemused näitasid, et kõik uuritavate želatiinipartiide väärtused (11-1, 12-1 ja 13-1) olid väga sarnased kontroll kalaželatiini väärtustega ja ei erinenud üksteisest statistiliselt oluliselt (nii lahuse kollasus kui ka selgus olid väga sarnased). Samas partii 8-1 väärtused (nii hägusus kui kollasus) olid siiski veidi suuremad teistest želatiinipartiidest. Need tulemused näitasid, et partiist 13 saadud želatiinilahused olid puhtad ja kvaliteetsed (võrreldavad kontroll želatiini lahustega) ning seda algmaterjali otsustati ka edaspidistes katsetes kasutada.

## Pundumise alguses



Joonis 39. Kõik lahused pundumise alguses (vasakult: 12-1 A, 13-1 A, 13-1 B, 13-1 C), partiid 12-1 A ja 13-1 A pärast pundumist ning pärast kuumutamist.

### Želatiini lahuste füsikokeemilised omadused: pH, elektrijuhtivus, viskoossus, Bloom tugevus.

Želatiini partiide (12-1, 13-1, 17-1, 18-1, 19-1, 22-1) vesilahuste olulisemad füsikokeemilised omadused ning võrdluseks ka varasemate partiide (11-1 ja 8-1) ning kontrollželatiinide vesilahuste füsikokeemiliste omaduste väärtused näitasid, et 12-1, 13-1, 17-1, 18-1, 19-1, 22-1 partii 8-1 siiski erineb teistest želatiini partiidest väga suurel määral (11-1, 12-1 ja 13-1), pH oli sellel lahusel kõige aluselisem (pH 5,08), aga samas viskoossus (4,01 cP) ning Bloom tugevus (156 g) olid kõige väiksemad. Proovide omavahelist võrdlemist ja statistilist olulisust sai arvutada vaid 13-1 ja 11-1 proovide puhul, kuna 12-1 ja 8-1 proove oli saadud vaid ühes korduses.

Partiide 13-1 ja 11-1 füsikokeemilised omadused on küll väga sarnased, nende vesilahuste viskoossused ei erine statistiliselt oluliselt. Kuid pH, elektrijuhtivus ja Bloom tugevuse väärtused erinevad teineteisest siiski statistiliselt oluliselt. Samas võrreldes saadud tulemusi 12 ja 13 partiide vahel, siis need langevad enamuse väärtustelt kokku ja annavad väga reprodutseeritavad tulemused (v.a. elektrijuhtivus, kus olid suuremad erinevused).

Lisaks uuriti ka partiide 18-1 ja 19-1 füsikokeemilisi omadusi, mida kasutati pulbri säilivustestide läbiviimiseks. Nende kahe partii puhul on näha olulisi erinevusi võrreldes varasemate želatiini partiide (17-1 ja 13-1) füsikokeemiliste omadustega. Selgus, et nende partiide puhul kasutati veidi teistsugust valmistamisemeetodit, mis kahjuks oluliselt mõjutas saadud želatiini omadusi. Valmistamisel pärast äädikaga töötlemise etappi, loputuskordade järel, olid materjalid jäetud ca 3 h destilleeritud vette seisma (külmikusse). Meetodit kasutati, kuna see võimaldas segu happesust vähendada paremini, kui ainult loputused. Järgnevad etapid olid kõik vana protokoll järgi. Omadustest pH oli sama, kui varem, kuid oluliselt erinesid viskoossuse ning bloomi väärtused.

Erinevate želatiini partiide võrdlused näitasid, et Maaülikoolis kasutatav valmistamise meetod annab alates 11 partiist reprodutseeritavaid tulemusi, kuna saadud želatiini partiid on sarnaste omadustega. Väljatöötatud valmistamisemeetodid annavad kvaliteetse želatiini, mille omadused on täiesti võrreldavad kontrollželatiinide omadustega (värvus, selgus). Samas muutused valmistamise etappides võivad kaasa tuua ka suured muutused želatiini füsikokeemilistes omadustes ja selle käitumises (nt partiid 18 ja 19).

#### 2.2.4 Želatiinipulbri omadused (partiid 11, 13, 18-1, 19-1)

Mõistmaks želatiini omadusi uuriti erinevaid pulbri füsikokeemilisi omadusi (tuhajääk). Kõik need omadused aitavad lisaks mõõdetud vesilahuse parameetritele (viskoossus, Bloom, pH, elektrijuhtivus) saada aru želatiini pulbri käitumisest ja iseloomustavad tema kvaliteeti.

##### Vee ja raskmetallide sisaldus

Niiskuse sisaldused said määratud Karl Fischer tiitrimeetriat kasutades ja raskmetallide sisaldused kasutades induktiivsidestatud plasma massispektromeetriat (ICP-MS. Tabelis 2 on toodud kontrollželatiinide niiskuse sisalduse ja raskmetallide sisaldused.

Tabel 2. Tootja poolt kaasa antud kontroll želatiini proovide vee ja raskmetallide sisaldused (N=3).

Proov (tähis)	Niiskuse sisaldus tootja spetsifikatsioonides	Cr, Fe ja Žn sisaldused tootja spetsifikatsioonides
GG	9,62% ± 0,002%	NA
FG	NA	NA
MG	< 15%	Cr < 10 ICP-OES ppm; Fe < 30 ICP-OES ppm; Žn < 30 ICP-OES ppm

NA- info puudub

Kontrollželatiini proovidel mõõdetud niiskuse ja raskmetallide sisaldused vastasid tootja spetsifikatsioonidele (kui tootja on seda üldse eraldi välja toonud). Uuritava želatiini proovi (11-1) puhul olid veesisaldused ligikaudu poole madalamad (5%), kui kõikidel kontrollproovidel (10%). Viimane võib olla seotud väga efektiivse kuivatamise-etapiga enne, kui proovid jõudsid analüüsimisse. Raskmetallide sisaldused olid uuritava želatiini proovil kõik lubatud piirides. Küll oli märgata, et tsingi sisaldus oli uuritava želatiinis kõrgem, kui kontrollželatiinide puhul. Viimastes olid need väärtused tavaliselt alla detektsioonipiiri ning polnud võimalik täpselt kindlaks määrata.

##### Tuhajääk

Tuhajäägi määramine oli teostatud *European Pharmacopoeia Total ash* 01/2008:20416 meetodil ning näitas, et uuritava želatiini tuhajääk oli 13-1 partii puhul 0,02% ning 17-1 partii 0,10%. Need väärtused olid võrreldavad kontrollželatiinide tuhajäägi väärtustega: MG (0,03%), FG (0,01%) ja GG (0,26%).



## Termilised omadused

Termiliste omaduste uurimiseks viidi läbi nii termogravimeetriline analüüs (TGA) kui ka diferentsiaalse skaneeriva kalorimeetria (DSC) mõõtmised. Uuritavad proovid näitasid testitud tingimustes kõik sarnaseid termogramme, millest saab järeldada, et neil on ka sarnane termiline käitumine.

TGA termogrammil tuvastati kaks termilist nähtust, esimene oli kaalukadu 6-9%, mis algas temperatuuridel 45-50°C. Esimene kaalukadu oli vee eemaldumine proovist. Selle lõpp-punkt ning teise termilise nähtuse alguspunkt, kus kaalukadu kuni 67-70%-ni esialgsest temperatuuridel 190 kuni 220°C oli keerulisem tuvastada, kuna need kattusid omavahel termogrammil. Võib arvata, et teine kaalukadu on seotud lisaiinete lagunemisega proovis. Želatiini degradatsioon on tuvastatav 340 °C juures, mis on heas korrelatsioonis varem publitseeritud väärtustega ([DOI: 10.1590/1516-1439.310114](https://doi.org/10.1590/1516-1439.310114)).

DSC analüüsil oli võimalik tuvastada vaid vee eemaldumine struktuurist (vee evaporatsiooni näitav endoterm temperatuuridel toatemperatuur kuni 100 °C), mingeid muid termilisi nähtusi termogrammidel ei tuvastatud. Uuritava želatiini ning kontrollželatiinide termogrammid olid samasugused.

## Želatiini pulbri säilivustestid

Säilivustesti pandi želatiinipulbrid kohe pärast esmast karakteriseerimist (pH, viskoossus, Bloom tugevus, IR spekter). Säilivustestide eesmärgiks oli kindlaks teha, kuidas želatiini pulber erinevates keskkonnatingimustes käitub, ning selgitada välja pulbri säilitamiseks vajalikud tingimused. Säilivustestid viidi läbi kahes keskkonnas: toatemperatuuril ja madala niiskuse tingimustes (eksikaatoris silikageeli kohal, 0% RH) ning kiirendatud stabiilsustesti tingimustes (40 kraadi ja 75%RH). Kuna valmistatavad želatiini partiid olid sel ajal veel väikesed, siis läksid säilivustesti erinevate partiide želatiinid (18-1 kiirendatud säilivustesti ning 19-1 toatemperatuurile/0%RH). Nagu mainitud, siis just nende kahe partii želatiinide valmistamisel muudeti veidi valmistamise protokollid ning juba esialgse nullpunkti želatiini vesilahuste omadused olid veidi erinevad eelmistest partiidest. Katsed siiski viidi läbi ning tulemuste analüüsil võrreldi mõlema partii algse želatiini omadustega saadud säilimisproovide omadusi. Säilimise ajal toimuvaid muutusi vaadati 7 päeva (ehk 1 nädal), 1 kuu, 3 kuu ja kiirendatud säilivustestides ka 6 kuu möödudes.

Kiirendatud säilivustestides säilitati proove klaasist avatud vialides kuumakapis 40 °C ja 75% RH juures. 1 nädala pärast olid želatiiniproovid niiskunud vaid vialide üleväljal avatud osas ja olid moodustanud pinnale tugeva kaane, mida proovi eemaldamiseks oli vaja spaatliga survestada. Allpool oli proov kuiv/märgumata ja helbeline nagu katse alguses.

Pulbri valmistati vesilahused ning testiti nende omadusi nagu varasemalt. Pundumise lõpus täheldati, et želatiin oli ühtse suure massina anuma põhjas, varasemalt on näha pundunud helbeid/laaste, mitte ühtset massi. Järgmistes ajapunktides olid proovid terves ulatuses märgunud. Želatiin võttis kõrge niiskuse tingimustes endasse suure koguse niiskust, mida tuvastati nii vee sisalduse määramisel Karl Fischer tiitrimetriselt kui ka gravimeetriselt. Vee sisaldus oli tõusnud juba 1 nädala ajapunktis ligi 3,4 korda (algne veesisaldus  $4,9 \pm 0,002\%$ /vee sisaldus 1 nädala pärast  $16,5 \pm 0,11\%$ ), ning hiljem vee sisalduses enam suuri muutusi ei tuvastatud.

Toatemperatuuri ja madala niiskuse tingimustes želatiini kaal oli peaaegu muutumatu ajas, tuvastatav muutus oli ca 0,2 g ning ka veesisalduse muutused olid tunduvalt väiksemad (ca 1-2%). Veesisaldus nullpunktis oli ca 5% ning 1 nädala pärast oli vee sisaldus ca 6%. Eraldi sai kontrollitud ka ainult proovi ülaosast võetud pulbri vee sisaldust, see oli veidi suurem kogu segatud pulbri vee sisaldusest (ca 0,1%

kõrgem). Suurem standardhälve ( $\pm 0,09\%$ ) annab ka märku, et niiskus polnud proovis ühtlaselt jaotunud. Ka 1 ja 3 kuu proovides olid vee sisaldused veidi tõusnud

Kindlates tingimustes säilitatud želatiinipulbrite IR spektrid näitasid, et želatiini struktuuris säilitamise ajal suuri muutusi ei toimunud. Želatiinile iseloomulikud piigid IR spektris olid kõik tuvastatavad ka isegi 3 kuud ja 6 kuud pärast säilitamist ja samadel lainearvudel. Ja seda nii kõrge niiskuse ja temperatuuri, kui ka toatemperatuuri ja madala niiskuse tingimustes säilitamise järgselt. Küll aga täheldati mõningaid muutuseid piikide intensiivsustes kõrge niiskuse ja temperatuuri juures säilitatud proovide IR spektrites ja eriti lainearvul  $3275\text{ cm}^{-1}$  (N–H venituse (amiid A)) oli näha intensiivsuse kasvu ajas. Ka muude piikide intensiivsused veidi ajas muutusid, kuid kindlat trendi (piigi suurenemine või vähenemine) ei tuvastatud. Toatemperatuuri juures säilitatud proovi spektris olevad muutused olid seotud proovi mõõtmisega, kuna kogu spektri baasjoon oli muutunud (need muutused sai spektri eeltöötlemisega korrigeerida).

Želatiini füüsikalised omadused olid säilitamisel kõrge niiskuse ja temperatuuri tingimustes siiski muutunud ning seega oli muutunud ka sellest valmistatud vesilahuste füsikokeemilised omadused.

Statistiliselt oluliselt oli kõrge niiskuse ja temperatuuri juures vähenenud Bloomi tugevus ning suurenenud viskoossus. Sellised muutused on oodatavad arvestades, et valmistatud želatiin on väga hügrokoopne ning imas endasse väga suure hulga niiskust. Ka pH väärtus oli veidi säilimise ajal muutunud, kuid see muutus polnud toimunud kõikides proovides ühtemoodi. Peamiselt täheldati pH langust ajas.

Toatemperatuuri ja madala niiskuse tingimustes täheldati ka mõningaid muutusi želatiini vesilahuse omadustes (mis valmistatud säilitatud želatiiniga), just Bloomi tugevuses. Bloomi tugevus 3 kuu pärast oli statistiliselt oluliselt madalam kui katse alguspunktides. Viskoossuse ja pH muutused polnud statistiliselt olulised. Võrreldes kõrge niiskuse ja temperatuuri tingimustel säilitatud želatiini omadustega oli näha, et need tingimused võimaldasid želatiini esialgseid omadusi paremini alles hoida. Sellest võib järeldada, et želatiini on vaja säilitada suletud pakendites ning toatemperatuuril, et tekkivaid muutusi omadustes ära hoida või vähendada.

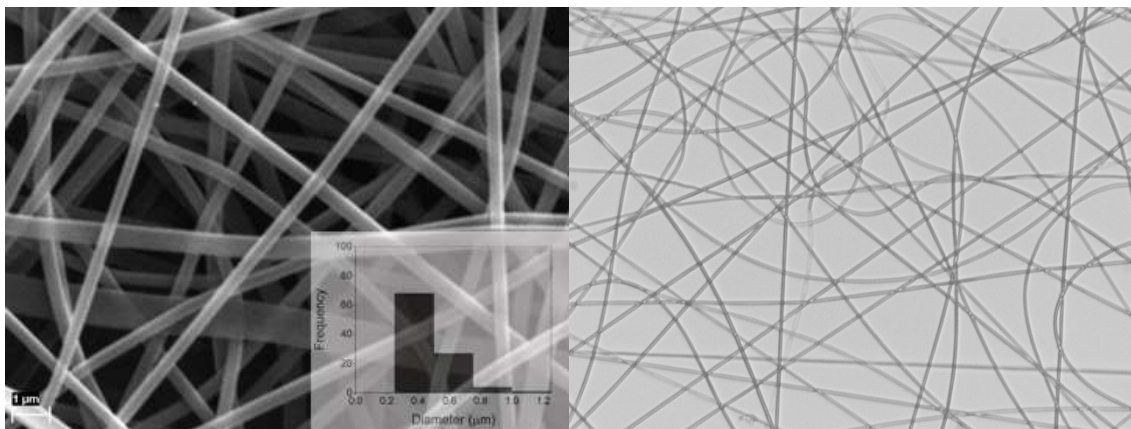
## 2.3 ŽELATIINIST HAAVAKATTEMATERJALI VALMISTAMINE

### 2.3.1 Elektrosppinnimine

#### 2.3.1.1 Partii 4 ja kontrollmaterjali elektrosppinnimine

Läbi viidi kontrollmaterjalide ja esimeste uuritavate algmaterjalide (kalaželatiin partiidest 4-1 ja 4-2) esmane elektrosppinnimine ning saadud elektrosppinnitud materjalide esmane karakteriseerimine. Selles etapis varieeriti algmaterjali kontsentratsiooni ning lahustit, samuti optimeeriti keskkonna- ja protsessiparameetreid konkreetsetele želatiiniproovidele sobiva meetodika kohandamiseks.

Esmased elektrosppinnimise testimised viidi läbi kontrollželatiinidega ning kahe erinevat lahustiga. Mõlemad lahustid sobisid kontrollželatiinide elektrosppinnimise läbiviimiseks, kuid oli vajalik optimeerida želatiini kontsentratsiooni. Elektrosppinnitud želatiini fiibrite keskmised diameetrid jäid vahemikku 243-684 nm.



Proov 4-1-9. Fiibrite keskmine diameeter:  $0.473 \pm 0.132 \mu\text{m}$ .

Joonis 40. SEM mikrograafid (vasakul) ja valgusmikroskoopia pildid (paremal) elektrosppinnitud želatiini fiibritest, mis valmistatud kasutades 4-1 uuritavat želatiini lahust. Keskmesed fiibri diameetrid määratud 100 fiibri keskmise väärtusena  $\pm$  SD (standardhälve).

Järgnevalt elektrosppinniti želatiinipartiide 4-1 ja 4-2 erinevate kontsentratsioonidega lahuseid, modifitseerides teisi protsessiparameetreid nagu kaugus kollektorist, pinge ja süstlapumba kiirus. Joonisel 40 on toodud näide poovist 4-1-9 elektrosppinnitud fiibril. Partiiga 4-1 kõige paremini õnnestunud elektrosppinnimise puhul oli tekkinud fiibrite keskmine diameeter 418 nm. Partii 4-2 puhul, mis andis viskoossema lahuse, saadi protsessi optimeerimisel siledad ja ühtlase fiibri suurusjaotusega nanokiud; kõige paremini õnnestunud elektrosppinnimise korral saadi fiibrid keskmise diameetriga 411 nm.

### 2.3.1.2 *Partiide 5-8 elektrospinnimine*

Oktoobris-detsembris 2020 viidi TÜ Farmaatsia Instituudis läbi proovide 5-1, 6-1, 7-1 ja 8-1 elektrospinnimise katsed seadmel NanoMC ESR200RD kahe erineva lahustiga.

Proovide 5-1 ja 6-1 puhul leiti, et kuigi lahusti modifitseerimisega oli võimalik kaotada lahuse geelistumine nõela otsas, jäi lahuse tilkumine elektrospinnimise käigus endiselt probleemiks. Nende proovide elektrospinnimise õnnestumiseks peaks lahuse kontsentratsioone ning lahusti koostist modifitseerima. 5-1 ja 6-1 proovide elektrospinnimine lahusti nr. 2 korral õnnestus edukalt teostada. Proovi 7-1 oli küll võimalik elektrospinnida, kuid esines tilkumist; vajalik oli lahuse kontsentratsiooni veelgi modifitseerida. Tulemused näitasid, et siiski oli see proov elektrospinnimiseks liiga madala viskoossusega. 8-1 proovide puhul oli elektrospinnimine väga hea. Leiti, et sellise kvaliteediga želatiiniproovist on testimisel kasutatud kontsentratsiooni korral võimalik edukalt ka suuremat elektrospinnitud maatriksit valmistada. Ka varasemalt määratud füsioloogilised omadused näitasid, et antud 8-1 partii korral võib oodata ka edukat elektrospinnimist.

### 2.3.1.3 *Partiide 13, 17 ja 22 elektrospinnimine*

Elektrospinnimist teostati kahel erineval meetodil: traditsiooniline elektrospinnimine ning ultraheli elektrospinnimine (USES). Testimist alustati kontrollproovidega ja traditsioonilise elektrospinnimise meetodiga ning järgnevalt kasutati ka uuritavaid želatiini lahuseid (kasutades erinevaid lahusteid ning želatiini kontsentratsioone). Biorelevantsetes keskkondades stabiilsete haavakatete saamiseks lisati želatiinilahusele juurde glükoosi, mille juuresolekul on võimalik efektiivsemalt želatiini matte ristsiduda Maillard reaktsiooni käigus kuumutamisel (170 kraadi, 3h). Kõikidele valmistatud katetele teostati nende morfoloogia uurimine ja füsioloogiline karakteriseerimine ning uuriti mattide määrgumismomente, stabiilsust vesikeskkonnas, ohutust eukarüootsetel rakkudel. Samuti testiti nende katete steriilsust ning steriliseerimist.

Traditsiooniline elektrospinnimine. Pärast elektrospinnimise tingimuste optimeerimist valiti välja sobivad protsessitingimused ning sobivaimad želatiini kontsentratsioonid ja lahustid (2 lahustit, edaspidi märgitud tähistega F1 ja F2), ning valmistati suured (A4) elektrospinnitud matid (peamiselt kasutati elektrospinnimiseks želatiini partiisid 13-1, 17-1 ja 22-1). Samuti elektrospinniti ka kommertsiaalsete želatiinidega matid, mida osades testides kasutati kontrollidena.

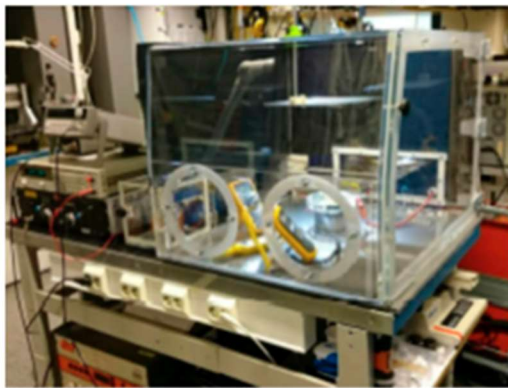
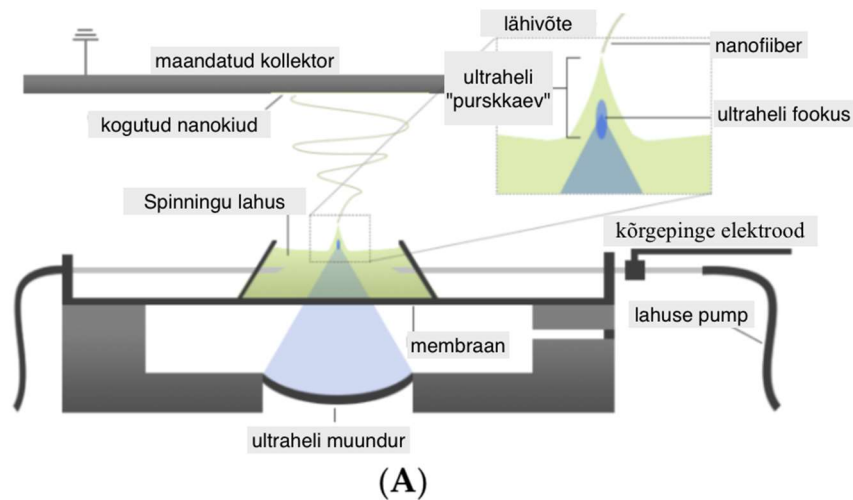
SEM fiibri diameetrite analüüs näitas, et ristseotud proovide keskmised fiibrite diameetrid olid suuremad kui ristsidumata proovidel. See oli täheldatav mõlema lahustiga elektrospinnitud mattidel, kuigi statistiliselt olulised erinevused esinesid vaid F1 formulatsiooni puhul, mille puhul oli näha, et esinesid kahe erineva suurusega fiibrite populatsioonid (väiksemad kui 0,4 µm ning suuremad kui 0,6 µm).

Lisaks olid lahustiga F1 valmistatud proovide fiibrite diameetrid omakorda suuremad kui lahustiga F2 valmistatud proovidel. F2 formulatsioonidel ei esinenud kahe erineva diameetrite suurusega populatsiooni nagu oli näha F1 formulatsioonide puhul. Kontrollželatiinidega elektrospinnitud mattidel kasutati vaid F2 formulatsiooni ning nende mattide fiibrite diameetrite ning uuritava želatiini mattide fiibrite diameetrite vahel erinevusi ei täheldatud.

Ultraheli-elektrospinnimine (USES). Uuriti želatiiniproovide (suurte mattide valmistamiseks kasutati partiisid 13-1 ja 17-1) ultraheli-elektrospinnimist ning täpsemalt võeti uurimise alla ultraheli parameetrite mõju fiibri morfoloogiale ultraheli – elektrospinnimisel. Selleks viidi läbi erinevad

katseseeriad (3 katseseeriat), kus muudeti USES parameetreid ning koguti želatiini fiibrid ning uuriti nende diameetreid.

Ultraheli-elektrospinnimiseks kasutati joonisel 41 olevat seadet.



Joonis 41. A) Ultraheli – elektrospinnimise (USES) skeem, (B) USES-süsteemi ja protsessikeskkonna foto (kliimakambris) ja (C) lähivõtte nanokiudude moodustumisest USES protsessis. Kohandatud (Hakkarainen et al. 2019).

Selgitati välja, et USES tehnoloogial on võimalik uuritavat želatiini valitud parameetritel edukalt elektrospinnida sobivaid kontsentratsioone ning F2 formatsiooni kasutades, kuid elektrospinnimise protsess ei olnud kõikide katseseeriade korral ühtlaselt stabiilne. Samuti oli näha, et nanofiibrite morfoloogia muutub, kui muuta ultraheli parameetreid. Ultraheli - elektrospinnimisel saadud želatiini fiibrid olid suures osas lintja struktuuriga, kuid on prooviti suhteliselt erinevad.

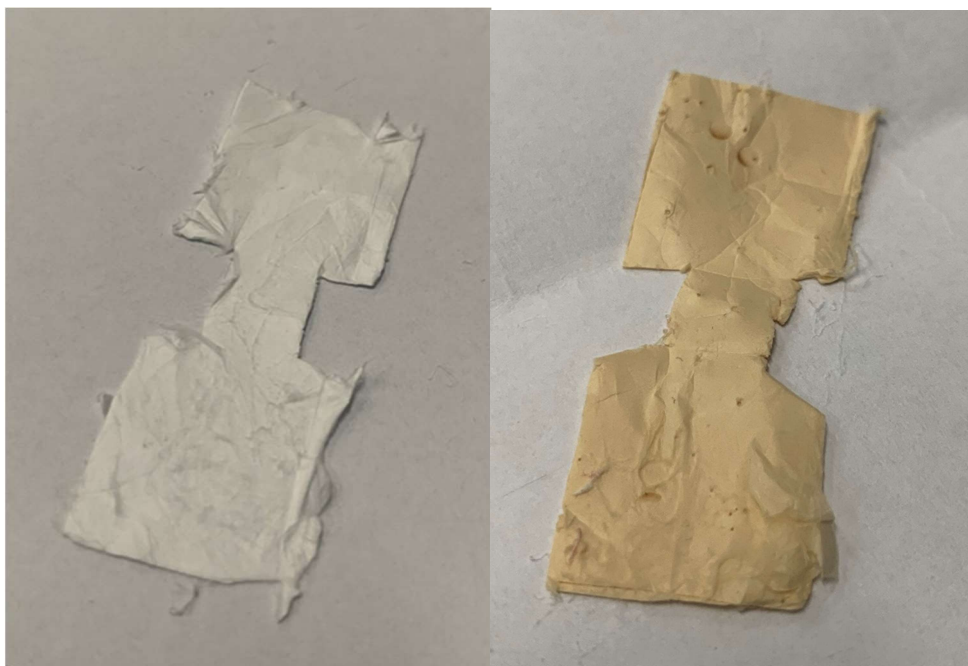
#### Elektrospinnitud mattide tahke faasi analüüs

Elektrospinnitud želatiini mattide tahke faasi analüüsil mõõdeti FTIR spektrid. FTIR spektrite analüüs võimaldas nii tuvastada želatiini kui ka glükoosi olemasolu proovides (võrrelda juba olemasoleva teaduskirjandusega), kui ka välja selgitada ristsidumise ning steriliseerimise mõju nendele mattidele vaadates muutusi FTIR spektrites. Glükoosi lisati mattidesse, et aidata kaasa ristsidumise protsessile nagu eelnevalt juba kirjeldatud. Lisaks määrati ka mattide termilised omadused (DSC) ning selgitati välja võimalikud interaktsioonid.

## 2.3.2 Elektropinnitud haavakatete omadused

### 2.3.2.1 Elektropinnitud mattide mehaanilised omadused, märgumisomadused ja vesi-keskkonnas stabiilsus

Juba elektropinnitud ristseotud ning ristsidumata mattide visuaalsel võrdlemisel oli näha suured erinevused. Ristseotud proov oli kollaka värvusega võrreldes ristsidumata prooviga, mille värvus oli valge (joonis 42).



Joonis 42. Ristsidumata (vasakul) ja ristseotud (paremal) želatiini elektropinnitud matid (F1) lõigatud välja mehaanilise tõmbetugevuse määramiseks.

Lisaks sellele oli ristsidumata proov väga kiuline, raske lõigata ning kippus käsitsedes lagunema. Ristseotud proov oli lihtsamini käsitletav. Kiudusid oli vähem, aga samuti eraldusid materjali terved kihid ning peab jälgima proovi terviklikkust mati käsitlemisel. Teostati tõmbetugevuse määramise testid, mis näitasid juba visuaalsel vaatlusel saadud tulemusi, et ristseotud matid on tunduvalt suurema mehaanilise vastupidavusega.

Tulemused näitasid, et nii maksimaalne koormus, jõud, kui mehaaniline pinge olid kõik statistiliselt oluliselt suuremad ristseotud mattidel võrreldes ristsidumata mattidega. Samas esinesid tulemuste väärtustes suur varieeruvus, kuna mõlemate mattide erinev käsitlemine testi ajal võib proovi omadusi juba muuta. Sarnased mehaanilised omadused ristsidumata ja ristseotud mattidel olid tuvastatavad ka teise uuritud formulatsiooni korral. Lisaks mainitud parameetritele arvatati ka Youngi moodul, tõmbetugevus ning katkevenivus.

Ristseotud proovide mehaaniliste mõõtmiste tulemusi võrreldi nii erinevaid uuritava želatiiniga formulatsioone omavahel kui ka kontrollželatiini ristseotud mattide tulemustega. Üldjoontes nende mattide mehaanilised omadused sarnanesid. F2 formatsiooniga uuritava želatiiniga matid olid elastsemad võrreldes F1 formulatsiooniga mattidega ning ka kontrollmattidega võrreldes. Kõige tugevamad olid kommertsiaalse kalaželatiiniga elektropinnitud matid. Kõige jäigemad olid aga just F1 elektropinnitud matid. Huvitavalt USES mattide puhul oli näha, et ristsidumine vähendas Youngi mooduli ja tõmbetugevuse väärtuseid, aga suurendas katkevenivuse väärtuseid. OÜ Gelatex

Technologies tehnoloogiaga toodetud matid näitasid USES mattidega ligikaudu võrdseid mehaaniliste omaduste väärtuseid (kuigi formulatsioonid (lahusti) ja valmistamise meetodid olid erinevad), ainult katkevenivus oli ligi kaks korda väiksem Gelatex mattidel võrreldes USES mattidega.

Kontaktnurga määramine kinnitas, et ristsidumata matid olid väga hüdrofiilsed ja lahustusid katse käigus ära, kuid ristseotud mattide puhul jäid matid ka katse lõppedes (5 min pärast) endiselt alles ning oli ka võimalik kontaktnurka erinevates ajapunktides määrata (keskmine väärtus F1 nullpunktis oli ligikaudu 126°, samas F2 puhul oli väärtus tunduvalt väiksem 88°). Kontaktnurga suurenemine peale ristseostumist ühtib kirjandusest leitavate tulemustega, mille kohaselt väheneb ristseostumisel polaarsete rühmade arv ja seega tõuseb ka proovi hüdrofoobsus. Seega huvitavalt kahe erineva formulatsiooni korral näitasid kontaktnurga väärtused katse alguses mattide erinevat märgumist (F1 matt oli hüdrofoobsem, kui F2 matt). Seega uuriti edasi ka mõlemate (F1, F2) elektropinnitud ristseotud mattide stabiilsust biorelevantsetes tingimustes (vesikeskkond, 37°C). Tulemused näitasid, et mattidel oli erinev vee imamisvõime (paisumisindeksite erinevus) ning samuti ka degradatsioonikäitumine. Samas mõlemad matid oli üle 70% endiselt alles pärast 2-nädalast vesikeskkonnas hoidmist, F2 matid isegi üle 85%.

### 2.3.2.2 Elektropinnitud mattide steriilsus, adhesiivsus ja ohutusuringud eukarüootsetel rakkudel

Kõikidele elektropinnitud ja ristseotud mattidele teostati steriliseerimise testimine, adhesiivsuse testimine ja ohutusuringud eukarüootsetel rakkudel.

#### Steriilsus

Steriilsust testiti nii algsetel želatiini pulbri proovidel, kontrollproovidel, kui ka valmistatud elektropinnitud mattidel. Steriilsust testiti vastavalt Euroopa farmakopöa nõuetele nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes, kasutades testimiseks *E. coli* bakterit.

Želatiini pulbri proovid näitasid, et osad partiid olid steriilsed (17-1 ja 19-1)(joonis 43), kuid ühes partiis (18-1) oli 1 proov kolmest läinud siiski kasvama ja test näitas seega, et proov ei ole steriilne. Kasvu täheldati just aeroobsetes tingimustes ning anaeroobsetes tingimustes kasv puudus.



Joonis 43. Ilma kasvuta želatiini proovid (17-1) vs positiivne kontroll.

Seega otsustati siiski ka testida valmistatud elektropinnitud mattide steriilsust ning samuti steriliseerida saadud elektropinnitud matte lõpliku haavaravi aplikatsiooni jaoks.

Tulemused elektropinnitud mattidega näitasid, et aeroobsetes tingimustes ükski elektropinnitud matt ei põhjustanud bakterite kasvu. Anaeroobsetes tingimustes aga näitasid kasvu proovid, mis olid valmistatud kontrollželatiinist (hea kvaliteediga Medella Pro želatiin) ning ka üks uuritavast želatiinist valmistatud elektropinnitud matt. Tundub, et selline kontaminatsioon võib matti sattuda ka elektropinnimise järel või ajal, ning ei pruugi olla seotud esialgse želatiini puhtusega, kuna Medella

Pro želatiin on just äärmiselt puhastatud želatiin. Katses olnud positiivsed ja negatiivsed kontrollid kõik töötasid vastavalt eeskirjadele.

### Steriliseerimine

Kõikidele mattidele, mida oli plaanis kasutada edaspidistes rakukatsetes oli tehtud kuumtöötlus 3 h 170 kraadi juures (et teostada želatiini ristsidumist). Kahjuks näitasid steriilsuse testid, et selline kuumutamine siiski ei suutnud kõiki matte steriliseerida. Seega kuumsteriliseerimine ei olnud piisav. Otsustati testida ka elektrospinnitud mattide autoklaavimist, kuid need katsed näitasid, et matid sellise kuumuse ja niiskuse tingimustes hakkasid lagunema ja kaotasid täielikult oma esialgsed omadused.

Järgmiseks viidi läbi mattide gamma steriliseerimine kasutades 50 kGy. Gamma steriliseerimine oli teostatud firma Steri poolt. Tulemused näitasid, et kõik gamma steriliseeritud elektrospinnitud matid olid steriilsed.

### Adhesiivsus

Testimaks elektrospinnitud ja kuumutamisel ristseotud želatiini mattide adhesiivsust, viidi läbi *ex vivo* sealimaskestall kaldpinna test kasutades optimeeritud testimistingimusi. Tulemused näitasid, et F2 formulatsioonidega mattidel oli kõike suurem adhesiivsus, nii uuritava želatiini, kui ka kontrollželatiinide puhul.

Teatavad erinevused mattide käitumises esinesid, kuid kõik matid omasid adhesiivseid omadusi.

### Ohutusuringud eukarüootsetel rakkudel

Elektrospinnitud želatiini mattide ohutusuringud viidi läbi inimese primaarsetel naha fibroblastidel (mittekommertsiaalne rakuliin), mis saadud TÜ Kliinikumi Nahakliinikust. Positiivse kontrollina kasutati töötlemata rakke, mis kasvasid plaadi kaevu põhjas. Rakkude elulemus tehti kindlaks MTS testiga. Testiti nii steriliseerimata, kui ka gamma steriliseeritud elektrospinnitud matte. Ning lisaks uuritavatele želatiini mattidele F1 ja F2 (traditsiooniline elektrospinnimine ja USES, F2) olid testimises ka kontrollželatiinidest valmistatud matid (traditsiooniline elektrospinnimine, F2) ning Gelatex meetodil valmistatud matid (lahustina puhastatud vesi).

Steriliseerimata ja steriliseeritud mattide analüüsid näitasid, et kõik uuritud materjalid valmistatud erinevates želatiinidest ja kasutatud erinevaid meetodeid olid primaarsetele fibroblastidele ohutud.

Lisaks võib märgata, et rakkudel meeldib nende mattide pinnale kinnituda ja seal kasvama hakata. Kõige enam meeldib rakkudele Medella Pro seaželatiini matt, järgnesid kalaželatiini matid (nii uuritav, kui kontrollmatt). Samuti meeldis rakkudele Gelatex ning USES elektrospinnitud kalaželatiini matid, kus oli täheldada suurem MTS aktiivsus võrreldes kontrolliga.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et ükski testitud materjal ei omanud eukarüootsetele rakkudele toksilist efekti. Osad matid olid nii tugevalt kleepunud fooliumile, et need pandi rakukatsetesse koos fooliumiga. Sel puhul testiti eraldi ka fooliumi mõju eukarüootsetele rakkudel testimistingimustes ning tõestati, et

fooliumi juuresolek ei mõjutanud katsetulemust, sest statistilist olulisust võrreldes matiga või kontrolliga ei leitud.

### *Antibakteriaalse raviainega elektrospinnimine ja nende antibakteriaalsete katete esmane karakteriseerimine*

Lisaks puhas želatiini elektrospinnimisele testiti ka koos antibakteriaalse raviainega elektrospinnimist. Selleks kasutati mõlemat formulatsiooni (F1, F2) ning lisati sinna antibiootikumi. Nendele elektrospinnitud mattidele teostati samuti kuumutamise ristsidumine ning siis morfoloogia uurimine

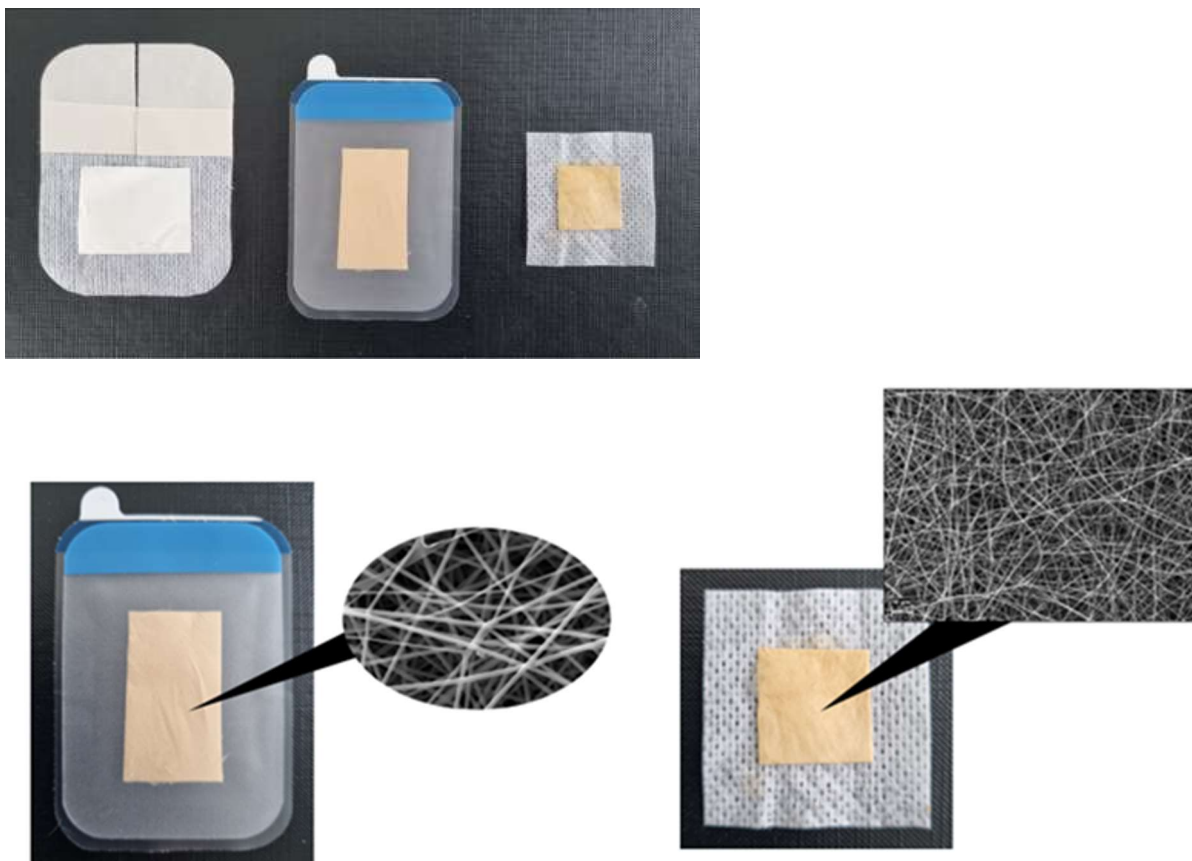


ning füsikoemiline karakteriseerimine. Tulemused näitasid, et raviaine lisamine ei muutnud eriti elektrospinnimist ning õnnestus saada hea kvaliteediga suured (A4) elektrospinnitud matid. Fibiirite morfoloogia oli ühtlane ning polnud tuvastada mingeid elektrospinnimise vigu.

Samuti polnud ristsidumine kuumutamisel muutnud fibiirite terviklikkust. Raviainet sisaldavate želatiini fibiirite diameeter oli väiksem, kui puhas želatiini fibiirite diameeter. Seekord oli näha F2 formulatsiooni puhul kahe erineva suurusega fibiireid. Füsiikoemiline karakteriseerimine võimaldas välja selgitada želatiini ja raviaine vahelised interaktsioonid ning samuti ristsidumise mõju materjalide tahke faasi omadustele. Tulemused võimaldasid kinnitada želatiini ja glükoosi vahel toimuvat Maillard reaktsiooni, mis leidis aset kuumal temperatuuril (170°C) 3 h jooksul. Edaspidised raviaine sisalduse uuringud annavad infot, kui palju elektrospinnimine ja ristsidumine muutsid raviaine stabiilsust.

### 2.3.3 Haavakatete prototüübid

TÜ Farmaatsia instituudis valmistati ka esimesed prototüübid haavakatetest, mis on valmistatud Peipsi latika nahkadest toodetud želatiinist (joonis 43).



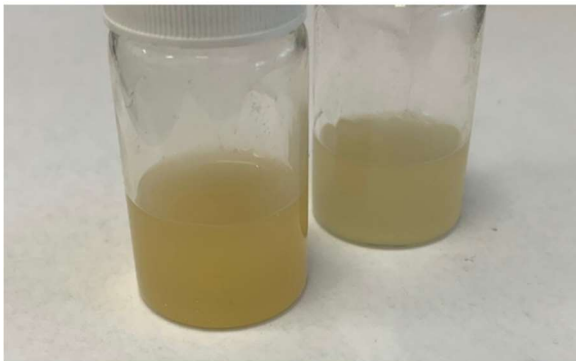
Joonis 44. Valmistatud kiulised ja ristseotud kalaželatiinil põhinevad haavakatted erinevatel adhesiivsetel kangastel.

## 2.4 ŽELATIINIST KANGA VALMISTAMINE

Ettevõtte Gelatex Technologies OÜ viis läbi uuringud selgitamaks välja, kas Eesti Maaülikooli poolt kalajääkidest valmistatud želatiin on sobiv nahasarnase tekstiilmaterjali valmistamiseks.

### 2.4.1 Želatiini karakteriseerimine ja väikesemahuline ketruskatse

Esimesteks uuringuteks kasutati želatiinipartiisid 5-1 (partiis kokku 47 g kuivatatud želatiini) ja 6 (partiis kokku 47 g kuivatatud želatiini). Esmaseks karakteriseerimiseks valmistati želatiinidest 5% vesilahus, et veenduda želatiini geelistumises. Selleks kaaluti 0,5g proovi klaasviaali, lisati 9,5 g vett ning segati vesivannil 60°C juures. Saadud lahused oli kollaka tooniga, kusjuures želatiin 6 oli sama kontsentratsiooni juures heledama tooniga (Joonis 45). Esmalt veenduti, et polümeer lahustis täielikult lahustuks, misjärel jahutati lahus toatemperatuurile. Mõlema proovi puhul toimus polümeeri täielik lahustumine ning mahajahutamisel lahuse geelistumine. Mõlemad valmistatud lahused olid kergelt hajutavad, mis annab aimu mikroosakeste olemasolust lahuses.



Joonis 45. 5% želatiini lahused. Vasakul proov nr 5-1, paremal proov nr 6

Fiibrilise materjali valmistamiseks kasutati Gelatex Technologies OÜ poolt välja töötatud ketrusseadet ning nanofiibrilise valmistamise tehnoloogiat, mille peamiseks eelisteks on suur tootlikus ja toodetud materjali kogumine pidevas protsessis („roll to roll“). Sarnaselt elektroketrusele on Gelatexi meetod lahusest-ketruse meetod, mis nõuab polümeeri eelnevat lahustamist täieliku lahuse saavutamiseni. Peale seda ketratakse lahus fiibriks ning kogutakse saadud materjal polüpropüleenist spunbond materjalile. Želatiini ketramiseks nanofiibriks on Gelatex välja arendanud meetodika, kus fiibrilise ketratakse vesilahusest kõrgematel temperatuuridel.

Tabel 3. Ülevaade želatiinipartiidega 5-1 ja 6 läbi viidud katsetest.

Lahuse nr	Želatiinipartii nr.	Lahuse kontsentratsioon (%)	Saadud fiibri diameeter	Kommentaar
1	5-1	5	-	Geelistumise katse
2	6	5	-	Geelistumise katse
3	5-1	30	10+ $\mu\text{m}$	Ilus fiiber, suur diam.
4	6	30	10+ $\mu\text{m}$	Ilus fiiber, suur diam.
5	6	27	1-10 $\mu\text{m}$	Nähtavalt väiksem diam.
6	6	28.5	$\sim 1 \mu\text{m}$	Kena fiiber
7	5-1	28.5	$\sim 1 \mu\text{m}$	Kena fiiber

Esmastes ketruskatsetes želatiinipartiidest 5-1 ja 6 saadi lumivalge ning ilma märgatavate defektideta fiiber (joonis 46). Võrreldes Gelita referentsželatiiniga oli ketruslahuse kontsentratsioon madalam (28.5% vs 33%). See annab aimu antud želatiinipartiide suuremast viskoosusest ning ka tõenäoliselt suuremast Bloomi tugevusest. Saadud fiibermattide kaalud oli 15.137g ja 31.7g (joonis 47). Saadud materjalid pakendati hermeetiliselt.



Joonis 46. Lahusest nr 6 ja 5-1 kdratud fiibermatid.



Joonis 47. Kalaželatiinist (partiidest 6 ja 5-1) kedratud fiibermatid pakendatult.

Kalaželatiinipartiidega 5-1 ja 6 läbi viidud uuringute tulemusel tekkisid järgnevad soovitusel ja tähelepanekud:

Proovidel esinev spetsiifiline lõhn annab aimu lisandite kohalolekust polümeeris. Lisandid võivad olla nii rasvad, rasvhappe jäägid, mineraalsed ühendid või lahustumatud kollageensed ühendid. Nende kõrvaldamiseks on soovitatav edaspidi kasutada želatiinilahuse puhastamiseks väiksemate pooridega filtrit. Samuti tasub uurida rasvühendite ekstraktsioonmeetodeid.

Lahuste hajutavus on tõenäoliselt tingitud mikroosakeste kohalolekust lahuses. Sarnaselt eelmisele punktile, on soovitatav kasutada peenemat filtrit.

Saadud proovid olid lahuse moodustumise omaduste poolest küllaltki sarnased. Selleks, et valida antud rakendusse sobivaim želatiin oleks vaja rohkem erinevate molekulmassidega želatiine, et valida sobivaim antud rakendusse.

Uuritud proovide puhul ei saanud katsetada želatiini rist-sidestamise omadusi, kuna polümeeride kogused olid väikesed ning ei olnud võimalik teha piisavalt ketruskatseid.

#### 2.4.2 Suuremahuline ketruskatse ja lõpptoote valmistamine

Etappideks, mida eelmiste kalaželatiinipartiide puhul veel ei katsetatud, oli saadud nanokiulise materjali töötlemine erinevate tehnikatega ning lamineerimine lõpptooteks. Järgnevalt kirjeldatakse vastavate protsesside läbiviimist ning protsesside õnnestumiseks vajalikke polümeeri omadusi võrdluses ettevõtte poolt kasutatava loomse želatiini omadustega.

##### Lahuse valmistamine ja fiibermaterjali ketrus

Suuremahulise elektroketruse katse jaoks Eesti Maaülikooli poolt valmistatud kalaželatiini kogus (hõlmas kolme želatiinipartiid) oli piisav juba suurema pindalaga materjalinäidise valmistamiseks, võimaldades näidata arendatud polümeeri kasutamist nanofiibrite valmistamiseks pooltööstuslikul skaalal. Võrreldes uuringute eelmises etapis kasutatud želatiinipartiidega olid kõik uued partiid

eeltoodud soovitude kohaselt parandatud kvaliteediga, želatiinilahused olid enne želatiini kuivatamist filtreeritud läbi 0,7 µm poorisuurusega filtri (Whatman GF/F).

Suurema koguse fiibermaterjali tootmiseks lahustati ~300g kalaželatiini (kogu materjal partiidest nr 14, 15, 16) vesilahuses temperatuuril 60 kraadi. Lahustumine võttis aega 2 tundi, mille jooksul lahustus kogu lahuses olev želatiin ning tulemuseks oli peaaegu värvitu, läbipaistev viskoosne polümeerilahus. Lahuse kontsentratsioon oli 18% ning lisaks želatiinile lisati ka vähesel määral ettevõtte poolt kasutatavat ristsidestamiseks ette nähtud ainet, mis lahustub vesilahuses sarnaselt želatiinile. Ketruslahusest võeti ~10g proov, mille geelistumisomadusi uuriti eraldiseisvalt. Kui tavaliselt geelistub želatiini vesilahus peale maha jahtumist toatemperatuuril, siis antud lahus ei geelistunud ka peale 2 päeva möödumist. Seda efekti täheldati ka lahusega, millele polnud lisatud ristsidestamiseks mõeldud lisandit. Selline efekt võib viidata lisanditele želatiinis või madalas molekulmassis.

Sellest hoolimata otsustati materjali kasutada juba samal päeval ketruseks. Polümeerilahus juhiti ketrusseadmesse ning sellest saadi edukalt fiiber. Kedratud fiiber oli valge värvusega ning soovitud õhulise tekstuuriga.

Käesolevas aruandes ei kirjeldata tootmisprotsessi parameetreid, kuna need on ettevõtte ärisaladus ning ei oma ka antud kontekstis olulist rolli. Oluline on, et antud želatiinikogusest õnnestus saada umbes 4 m<sup>2</sup> fiibrilist materjali, mille eritihedus oli 20-80 g/m<sup>2</sup> vahel. Võrreldes ettevõtte poolt kasutatava loomse želatiiniga, olid antud materjali ketrusomadused natukene kehvemad. See seisnes mõnevõrra suuremas defektide hulgas materjalis ning ka selles, et rohkem niiskust jäi materjali sisse järeltöötluses. Antud omadus tuleneb tõenäoliselt liiga kõrge želatiini molekulmassist Gelatexi tootmistehnoloogia jaoks. Tõenäoliselt saaks tulevikus tootmisparameetrite optimeerimisega ka defekte vähendada ning pikema kuivamisajaga jääkniiskust vähendada.

### Ristsidestamine

Saadud materjali ristsidestati termiliselt ~170°C kraadi juures 2 tundi, et muuta materjal vees lahustumatuks. Peale termilist töötlust säilitab materjal hüdrofiilsuse. See tähendab lihtsustatult, et materjal endiselt vees pundub ning peale kuivamist kaotab oma fiibrilise struktuuri. Ristsidestamise käigus muutub materjal värvuselt beežikaks (joonis 48). Antud protsessis läks kahjuks kaduma umbes 1 m<sup>2</sup> suurune fiibrilise materjali tükk, mis suure veesisalduse tõttu ei käitunud ristsidestamisel tavapäraselt. Nimelt kukkus fiibriline struktuur kokku ning antud materjali ei olnud võimalik enam järgnevates etappides kasutada.



Joonis 48. Ristsidestatud fiibriline materjal

### Materjali töötlemine ning lamineerimine

Järgnevas etapis otsustati materjali töödelda 2 erineva töötlemistehnikaga. Töötlemistehnikad on ettevõtte välja töötanud ettevõttesiseselt ning nende eesmärk on parendada želatiinist valmistatud fiibrilise materjali mehaanilisi omadusi, et materjal oleks kasutuskõlblik moe- ja tekstiilitööstuses. Kui enne töötlemist on materjal hüdrofiilne ning mehaaniliselt nõrk, siis töötlemistehnikad parandavad materjali hõrdekindlust, tõmbetugevust ning vastupidavust veele. Töötlust teostati kahe erineva töötlustehnikaga.

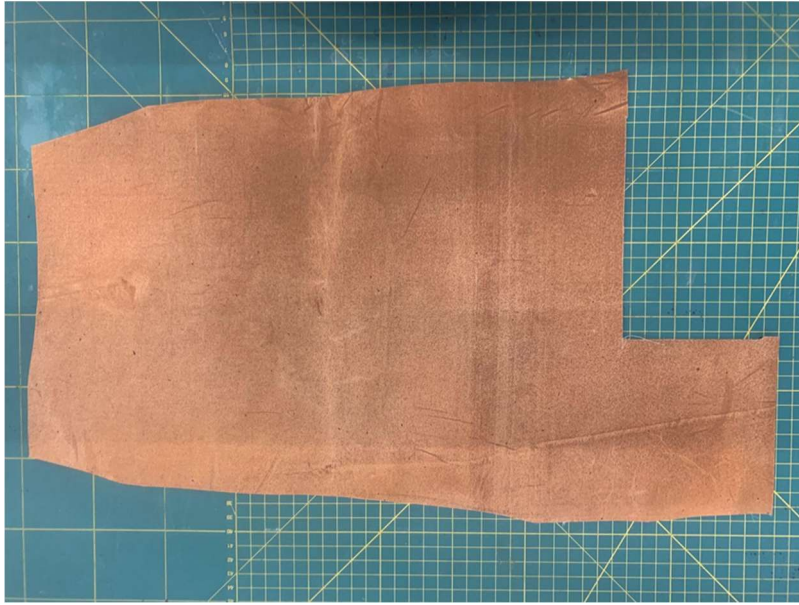
Esimese töötlemistehnika puhul jälgiti kalaželatiinist valmistatud materjali käitumist vastuseks töötlemistehnikale ning selgus, et Eesti Maaülikooli poolt kalajääkidest toodetud želatiini eelnevalt selgitatud erisused võrreldes ettevõtte poolt kasutatava želatiiniga ei omanud antud faasis negatiivset mõju. Tulemuseks olid ~30cm laiused materjalitükid, mida kasutati edasi lamineerimisfaasis (joonis 49).

Ka töötlustehnoloogia nr. 2 töötas uuritaval kalaželatiinmaterjalil hästi, kuigi selles faasis kaotati suur osa materjali. Materjali kao põhjusteks oli ebapiisavaks osutunud kogus fiibrilist materjali, mistõttu töötluste eel polnud võimalik testtöötlust teha. Pildid töödeldud materjalidest on toodud joonistel 49-50.



Joonis 49. Töötlemistehnikaga nr.1 töödeldud materjalid

Viimase sammuna lamineeriti mõlema töötlemistehnikaga töödeldud materjal puuvilla peale, et parandada veelgi lõppmaterjali rebimiskindlust ning tõmbetugevust. Mõned näidised lamineeriti ühepoolsest, mõned kahepoolsest, et oleks näha võimalikult palju erinevaid variante. Lõppetapina valmistati mõlemast materjalist kaarditaskud (Joonis 51)



Joonis 50. Töötlemistehnikaga nr.1 töödeldud ning lamineeritud materjal



Joonis 51. Erinevatest lamineeritud materjalidest valmistatud kaarditaskud. Kollakam kaarditasku on töötlemistehnikaga nr. 2 valmistatud materjalist ning beežikam töötlemistehnikaga nr. 1 töödeldud materjalist.

Kokkuvõtteks: saadud tulemused näitavad, et käesoleva projekti jooksul kalajääkidest toodetud želatiin sobis hästi fiibrilise materjali valmistamiseks OÜ Gelatex Technolgies poolt väljaarendatud ketrustehnoloogiaga. Kindlasti on pisidetaile, mida oleks tulevikus võimalik parandada, kuid üldine hinnang valmistatud polümeerile on positiivne. Kõik materjalinäidised ning ka lõpptooted, mis projekti jooksul valmistati, anti üle Eesti Maaülikoolile.



## 3 KITIIN JA KITOSAAN

Kitiin on polüsahhariid, mis oma levikult maailmas jääb alla vaid tselluloosile (Shaidi *et. al.* 1999). Seda toodavad peamiselt selgrootud veeloomad, putukad ja seened, kuid inimkasutuses olevat kitiini eraldatakse tänapäeval peamiselt selgrootute veeloomade (vähkide, krabide ja krevettide) välisskeletist (Rao jt. 2000, Cauchie 2002). Kitiinil ja sellest toodetud kitosaanil on väga paljusid kasutusalasid toidu- ja tervishoiutööstuses ning põllumajanduses (Park & Kim 2010, Shaidi jt. 1999; Shamshina 2020). Käesoleva projekti ühe osana katsetati kitiini ja kitosaani tootmist vähijääkidest.

### 3.1 KITIINI JA KITOSAANI VALMISTAMINE

#### 3.1.1 Algmaterjali kogumine

Analüüsides kasutatavad vähid olid püütud teaduspüügi käigus - haigustunnuste tõttu vähke veekokku tagasi ei lastud. Vähid ladustati sügavkülmikus kuni katsete alustamiseni.

#### 3.1.2 Kitiini väljapuhastamine

Kitiini eraldamiseks on kirjeldatud kahte peamist meetodit – bioloogilist ja keemilist (Younes jt. 2015). Keemilise töötlusmeetodi puhul kasutatakse erinevate protsessiosade jaoks kemikaale, bioloogilise töötlusmeetodi puhul erinevaid ensüüme. Bioloogiline töötlusmeetod on keemilise töötlusmeetodiga võrreldes kallim protsessis kasutatavate ensüümide kõrge hinna tõttu (Younes *et. al.* 2015). Käesolevas projektis kasutati kitiini väljapuhastamiseks keemilist meetodit, mille abil eemaldati algmaterjalist valgud, rasvad ning mineraalained.

Eelkatsetes kasutasime algmaterjalina purustamata vähke, et oleks võimalik töötluste järgnevate etappide jaoks välja sorteerida sobivamaid kitiinseid osi. Põhikatsetes purustasime kogu algmaterjali väiksemateks tükkideks, seda lihtsustas külmunud vähkide kasutamine (Joonis 52). Vähid purustati mehaaniliselt, muljudes materjali ca 10 cm<sup>2</sup> põhjapindalaga nuiaga). Saadud kogemuse põhjal oleks soovitatav algmaterjal enne purustamist siiski eelnevalt läbi loputada, sest pärast purustamist ei ole enam võimalik kergesti eraldada võõrmaterjali nagu vähkidega kaasa sattunud puulehed jms.



Joonis 52. Külmunud vähid enne purustamist.

#### 3.1.2.1 Deproteiniseerimine

Kitiin esineb koorikloomade välisskeletis tugevalt läbi põimununa valguliste lihas- ja kõõluskiududega (Horst jt. 1993). Kitiini väljapuhastamiseks algmaterjalist tuleb esmalt eemaldada valgud (deproteiniseerimine), selle protsessi käigus eemalduvad ka rasvad.

Algmaterjali deproteniseerimiseks asetati purustatud vähid 3,3 l mahuga keeduklaasidesse ning neile valati peale 1M NaOH lahus, mis oli eelnevalt viidud temperatuurini 80°C. Lahuse ja algmaterjali kaalusuhe oli 2,5:1. Seejärel asetati keeduklaasid 80°C ahju 6 tunniks. Seejärel koguti vähijäägid polüpropüleensõelale ning loputati mitmeid kordi destilleeritud veega, kuni materjali pH neutraliseerus. pH määramiseks kasutati pH test-ribasid. Peale neutraliseerumist asetati materjal destilleeritud vette, kus ta seisis ca 12 h (joonis 53), misjärel materjal kuivatati polüpropüleenalustel kondensatsioonahjus 45°C juures.



Joonis 53. Deproteiniseeritud vähijäägid destilleeritud vees.

Esimestes katsetes asetati lahused eelkuumutatud laboriahju, kuid lahuste temperatuur oli ahju asetamisel alla 80 °C. Temperatuuri kontrollimisel selgus, et nii suurtes keeduklaasides soojeneb lahus ebahühtlaselt, temperatuurierinevused olid tuvastatavad vedeliku ülemiste ja alumiste kihtide vahel. Oluline oleks vedelikku samaaegselt ka segada temperatuuri ühtlustamiseks. Üheks võimaluseks on magnetsegajaga või segistiga segamine siis, kui lahust samal ajal kuumutatakse plaadi peal. See võimalus töötaks eriti hästi selliste kuumutusplaatide puhul, milles temperatuuriandur kontrollib pidevalt lahuse temperatuuri ja annab automaatset tagasisidet temperatuurikontrollerile, et soovitud temperatuur püsiks. Temperatuurianduri tagasisideta, kasutades vaid kuumutusplaadi küttekeha reguleerimist, pole tegelik temperatuur lahuses siiski automaatselt kontrollitav, seda peaks siis käsitsi tegema. Teiseks võimaluseks on loksutusfunktsiooniga vesivanni kasutamine. Meie kogemusel osutus eelistatuks vesivann, sest suuremas vesivannis saab korraga töötlusse panna suurema vedelikumahu (rohkem kolbe) kui mahtunuks ühele kuumutusplaadile. Teiseks on vesivanni kolvid võimalik korgiga sulgeda – see on oluline, kui lahust on vaja kuumutada mitme tunni vältel kõrgel kuumusel (antud protsessis vähemalt 80 k80 °C); avatud nõu puhul (kasutades vardaga segajaid ja temperatuuriandurit) võiks aurumine selle aja jooksul olla väga suur ning lahus muutuks järjest kontsentreeritumaks.

### 3.1.2.2 Demineraliseerimine

Järgnevalt oli algmaterjalist vaja eemaldada mineraalained. Mineraalainete eemaldamiseks kasutatakse happelahust, tavaliselt HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH või HCOOH lahust (No ja Hur 1998; Percot jt. 2003, Younes jt. 2015). Käesolevas projektis kasutati mineraalide eemaldamiseks soolhappe (HCl) lahust. Demineraliseerimine toimub põhimõttel, et vähi kestades sisalduv kaltsiumkarbonaat (CaCO<sub>3</sub>) muudetakse reaktsiooni käigus vees lahustuvaks kaltsiumkloriidiks (CaCl<sub>2</sub>), protsessi kaasproduktiks on vesi ja süsihappegaas (CO<sub>2</sub>). Protsessi saab kirjeldada järgneva valemiga:



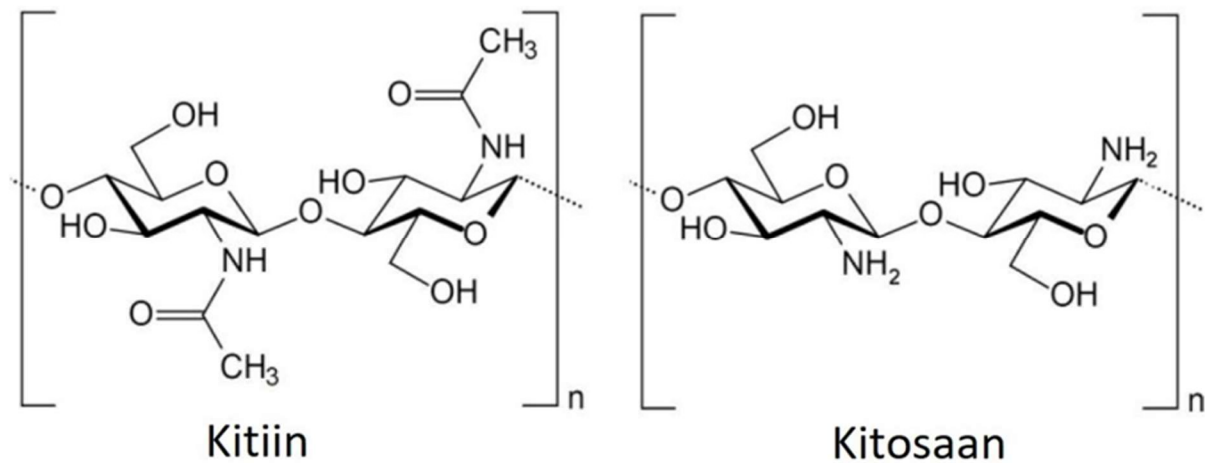
Eelnevalt purustati deproteineeritud materjal 0,5 kuni 2 mm suurusvahemikus osakeste fraktsioonini kasutades elektrilist kohviveskit. Purustatud materjal asetati keeduklaasi, sellele lisati väikeste koguste kaupa 1,5 M HCl lahust, protsess toimus toatemperatuuril. Lahust tuleb lisada osade kaupa, kuna gaaside eraldumine tekitab tugevat mullitamist, mis võib lühiajaliselt tõsta tekkinud vahu kõrgemale katsenõu ülaservast. Reaktsiooni lõppedes lasti katsematerjal keeduklaasi põhja vajuda, seejärel valati lahus materjali pealt ettevaatlikult ära (Joonis 54). Protsessi korrati kolm korda, viimasel korral lahust ära ei valatud, vaid jäeti materjal lahusesse 12 tunniks seisma. Kokku kulus lahust deproteineeritud materjaliga võrreldes ligikaudu 10 korda rohkem (kaalusuhe). Peale demineraliseerimist pesti materjali destilleeritud veega kuni lahuse pH neutraliseerus, misjärel kuivatati materjal 45°C juures kondensatsioonkuivatis polüpropüleenalustel.



Joonis 54. Purustatud deproteineeritud vähikestad soolhappelahuses

### 3.1.3 Kitiinist kitosaani valmistamine

Kitosaan tekib kitiini deatsetüleerimisel, s.t. kitiini molekulist eemaldatakse atsetüülrühmad. (joonis 55). Kitosaani deatsetüleerimisaste näitab, kui suur osa algse kitiini atsetüülrühmadest on eemaldatud.



Joonis 55. Kitiini ja kitosaani struktuur (Younes jt. 2015, muudetud).

Protsessi käigus toimub aluselises keskkonnas atsetüülgruppide eemaldamine (joonis X4) (Younes ja Rinaudo 2015). Kitosaani saab valmistada homogeense ja heterogeense deatsetüleerimise meetodil. Homogeense deatsetüleerimise käigus töödeldakse kitiini toatemperatuuril kõrge kontsentratsiooniga leeliselahuses suhteliselt pika aja jooksul (0,5 - 72h) (Younes *et. al.* 2015). Homogeense deatsetüleerimise puhul eemalduvad atsetüülrühmad piki kitiinimolekuli ühtlaste vahedega. Heterogeense deatsetüleerimise puhul kasutatakse kõrgemat temperatuuri ja protsess viiakse läbi lühema aja vältel (Younes ja Rinaudo 2015); protsessi tulemusel eemalduvad atsetüülgrupid ebaühtlaselt piki kitiini molekuli.

Kitiini heterogeenseks deatsetüleerimiseks kuumutasime väljapuhastatud vähikiitini 40% NaOH lahuses 90°C juures 3 tundi. Kitiin ja NaOH lahus olid kaalulises suhtes 1:10. Pärast kuumutamist loputati tahket materjali korduvalt destilleeritud veega kuni loputusvee neutraliseerumiseni. Et eemaldada viimsedki NaOH lahuse jäägid poorse struktuuriga katsematerjali osakekestest segati saadud kitosaani magnetsegaja abil destilleeritud vees veel 12h. Peale segamist oligi lahuse pH mõnevõrra tõusnud, mistõttu loputati materjal uuesti destilleeritud veega kuni saavutati loputusvees neutraalne pH. Neutraliseeritud kitosaan kuivatati kondensatsioonahjus 45°C juures polüpropüleenalusel. Saadud vähikitosaan oli helebeeži värvusega (joonis 56). Pigmentide täielikuks eemaldamiseks tuleks töötlemisprotsessi lisada ka depigmenteerimise protsess, mis antud projekti eesmärke silmas pidades ei olnud vajalik.



Joonis 56. Pildil vasakult paremale – deproteiniseeritud vähijäägid, purustatud ja demineraliseeritud materjal (kitiin) ning kitosaan.

Tabelis 4 on esitatud vähijääkide töötlusmeetodite kokkuvõtte ning kõikide materjalide alg- ja lõppkaalud. Lisaks kajastab tabel materjali saagist (lõppkaalu protsentuaalset väärtust algmaterjali kaalust).

Tabel 4. Kitiini puhastamise ning kitiini deatsetüleerimise protsessi parameetrid ning materjalide saagised.

Partii number	Algmaterjal	Algkaal (g)	Töötuse kirjeldus	Lahus	Temperatuur	Aeg	Lõppkaal (g)	Kaalu % algkaalust
1.1	Vähid	2488	deproteineerimine	1M NaOH	80°C	8h	415.8	16.71
1.1.2	Deproteineeritud vähikestad	162.3	demineraliseerimine	1.5M HCl	toatemp.	24h	40.6	25.02
1.1.2.1	Demineraliseeritud vähikestad	40	heterogeenne deatsetüleerimine	40% NaOH	90°C	4h	28.6	71.50
2.1	Vähid	2609	deproteineerimine	1M NaOH	80°C	8.5h	323.2	12.39
2.1.1	Deproteineeritud vähikestad	323	demineraliseerimine	1.5M HCl	toatemp.	24h	83.6	25.88
2.1.1.1	Demineraliseeritud vähikestad	27.8	heterogeenne deatsetüleerimine	40% NaOH	90°C	6h	20.50	73.74
2.1.1.2	Demineraliseeritud vähikestad	27.8	homogeenne deatsetüleerimine	40% NaOH	toatemp.	24h	15.8	56.83

## 3.2 KITIINI JA KITOSAANI KARAKTERISEERIMINE

### **Algainete kitiini (vähist, kalasoomustest) ja vähikitosaan pulbrite omadused**

#### Kitiini ja kitosaani vee- ja raskmetallide sisaldused

Niiskusesisaldus määrati Karl Fischer tiitrimetriat kasutades ja raskmetallide sisaldused kasutades induktiivsidedstatud plasma massispektromeetriat (ICP-MS).

Vähikitiini (partii 1.1.2) keskmine niiskusesisaldus oli 5,62%, vähikitosaanil (partii 1.1.2.1.) aga 4,33% (võrdluseks: Sigma kitiinil 5,79%, Chitoceuticals Kitosaan 90/100 aga 6,25%). Seega on saadud kitosaan isegi väiksema veesisaldusega, kui kontrollproov (4% vs 6%), samuti on ka Pb sisaldus temas väiksem, Cd sisaldus on mõlemas proovis sama. Nende nende omaduste põhjal on vähikitiinist saadud kitosaan sarnane kontrollina kasutatava kommertsiaalse kitosaaniga. Ainult kalasoomuste kitiinis on vee sisaldus tunduvalt suurem kui teistes uuritud proovides (ca 11%). Soomuste kitiini Pb ja Cd sisaldus on sarnane vähikitiini vastavatele sisaldustele, seega need väärtused on väiksemad kontrollkitiini vastavatest väärtustest.

#### Kitiini ja kitosaani tuvastamine ja analüüsimine

Selgitamaks välja, kas saadud proovides sisaldub kontrollmaterjalidega sarnane kitiin ja kitosaan ning millised on nende proovide omadused (amorfsus/kristallilisus) viidi läbi FT-IR ja XRD analüüsid. Eeldatav kitiin oli eraldatud nii vähijääkidest (kestadest), kui ka kalajääkidest (soomustest). Võrdlusanalüüsides kasutati kommertsiaalset kitiini (Sigma, krevettide kestadest). Kitosaani valmistati vähikitiinist ja kontrollina kasutati *Chitoceuticals* kitosaani (90/100, keskmise molekulmassiga).

XRD analüüsid näitasid, et vähijääkidest oli õnnestunud saada kitiini (partii 1.1.2). Saadud kitiini XRD difraktogramm näitas sarnaseid peegeldusi võrreldes kommertsiaalse Sigma kitiini difraktogrammiga. Kalasoomustest saadud kitiini difraktogramm oli teistsugune ning oli näha, et antud pulber oli palju amorfsem, kuna teravad peegeldused 10° ja 20° juures olid muutunud lamedaks meenutades amorfset halo.

Võrreldes uuritavat kitosaani (saadud vähikitiinist, partii 1.1.2.1) kommertsiaalse kitosaaniga oli näha, et peegeldused ei kattunud. Vajab veel täiendavat uurimist, kas see oli põhjustatud erinevast algmaterjalist (kitiinist), või pole tegu puhta kitosaaniga. Enamus kitiinile omased peegeldused on veel difraktogrammil märgata 13° ja 26° juures.

Täiendavalt koguti FTIR spektrid uuritavatest vähi ja kalasoomuste kitiini proovidest ning võrreldi neid kommertsiaalse Sigma kitiini spektriga. Spektrid kinnitasid juba XRD saadud tulemusi, et uuritava vähikitiini keemiline koostis on sarnane Sigma kitiinile. Kalasoomuste kitiini spektris esineb palju piikide erinevusi võrreldes Sigma kitiiniga, mis viitab erinevale keemilisele koostisele, eriti palju on neid erinevusi just IR spektri sõrmjäljepiirkonnas. Kitosaani FTIR spektreid ning kitosaani teisi omadusi (termilised omadused, deatsetüleerimisaste, molekulmass) on plaanis edasi uurida üliõpilase uurimistöös selgitamaks välja vähijääkidest kitosaani lahustuvusomadused ning elektrospinnitavus haavakatete valmistamiseks. Eelkatsetes on juba uuritud kitosaani kontrollproovide (kommertsiaalne kitosaan) süstlast väljavoolamist imiteerimaks elektrospinnimisel süstlast välja voolamist ning samuti nende kontrollkitosaani elektrospinnitavust valides välja ka sobivamad lahustid ning esmased elektrospinnimise tingimused.



## 4 KOKKUVÕTE

Projekti tulemusena selgitasime välja, et on võimalik toota Eesti kalatööstuse jääkidest toormaterjali, mille kvaliteet võimaldab valmistada nanokiulist materjali haavakatete ning nahalaadse kanga tootmiseks.

Projekti käigus valmistati kollageeni ja kitiini sisaldavast algmaterjalist (kalajäägid, vähikestad) kalaželatiini ning vähikitiini ja vähikitosani. Viidi läbi saadud toormaterjalide karakteriseerimine. Optimeeriti želatiini valmistamistingimusi, et saada nanofiibriliste materjalide tootmiseks sobiva kvaliteediga želatiini. Teostati uuringud väljatöötatud kalaželatiini rakendatavuse kohta nanokiuliste materjalide valmistamiseks ning nende materjalide omaduste ning kasutusvõimaluste kohta haavakatete ning nahalaadse kanga tootmiseks.

Projekti käigus Eesti kalatööstuse jääkidest toodetud želatiin on peaaegu värvusetu, lahustumisel annab selge lahuse, puudub ebameeldiv lõhn. Kalaželatiin on hea säilivusega, kui seda hoitakse kontrollitud tingimustel, eelkõige madala niiskusesisalduse juures.

Želatiini valmistamise parameetreid varieerides on võimalik toota erinevate omadustega želatiine (varieeritav viskoossus, Bloomi tugevus, pH, läbipaistvus, värvus, lahustuvus jm); seetõttu võib kalatööstuse jääkide väärindamine osutada perspektiivseks ka alternatiivsete želatiinil põhinevate rakenduste jaoks (Lisa 1).

## 5 Tulemuste avalikustamine

Uurimistööga seotud tulemusi on juba näidatud Tartu ülikooli Arstiteaduskonna päevade aastakonverentsil 2021 (teesid ilmunud Eesti Arst 2021;100(Lisa 1):1–48).

Tartu Ülikoolis on projekti teemadel tehtud 2 proviisoriõppe uurimistööd. Projekti tulemusena on oma uurimistöö juba kaitsnud novembris 2021 järgmised üliõpilased:

- Kristel Ild (“Želatiini ultraheli – elektros�innimine”), juhendaja Ivo Laidmäe.
- Laura Männaste (“Elektros�innitud biopolümeersete haavakatete disain ja valmistamine ning nende mukoadhesiivsuse hindamine”), juhendajad Kairi Tiirik, Karin Kogermann (kinnine kaitsmine)

Projekti tulemustest on plaanis kirjutada vähemalt kaks teaduspublikatsiooni, mis saadetakse rahvusvahelisse eel-retsenseeritud eriala ajakirja. Projektist saadud tulemusi on vajalik eelnevalt kontrollida nende patenteeritavuse suhtes, selle võimaluse korral antakse sisse enne patenditaotlus ja alles siis andmed publitseeritakse. Samuti on plaanis projekti tulemusi kajastada rahvusvahelistel farmatseutilise tehnoloogia-alastel konverentsidel 2022 aastal.

TÜ Farmaatsia Instituudis on plaanis jätkata Eesti Maaülikoolis valmistatud algmaterjalide uurimist (kitosaan, želatiin) hetkel juba käimasolevates üliõpilaste uurimistöödes (kaitsmised november 2022) ning võimalusel otsitakse lisarahastusi koostöö jätkamiseks jätkuprojektides. Tartu Ülikool on juba alustanud ka koostööd firma Gelatex Technologies OÜ-ga (käesoleva projekti teise partneriga), plaanis on jätkata ka seda koostööd liikumaks edasi reaalsete kliiniliselt oluliste haavakatete valmistamise poole.

Käesolevast projektist on ilmunud ka üks Tartu ülikooli pressiteade 19.05.20 (<https://maaelu.postimees.ee/6976704/tartu-teadlased-uurivad-kala-ja-koorikloomajaakide-kasutamisthaavaravis>).

## 6 Tänuõnad

Käesoleva lõpparuande koostamisse on panustanud kõik projekti läbiviimises osalenud osapooled: Eesti Maaülikool, Tartu Ülikool, OÜ Gelatex Technologies. Želatiini ja kitiini ning kitosaani karakteriseerimise ning haavakatete valmistamise peatükid tuginevad valdavalt Tartu Ülikooli poolt Eesti Maaülikoolile esitatud aruannetel; želatiinist kanga valmistamise peatükk aga OÜ Gelatex Technologies aruannetel.

Täname kõiki projektis osalenuid. Eesti Maaülikooli töörühm (Kairi Käiro, Maidu Silm, Rihard Reissaar, prof. Rajeev Bhat, projektijuht Anu Kisand) tänab projektipartnereid põhjaliku, pühendunud ja igakülgse toetava koostöö eest kogu projekti vältel: Tartu Ülikooli Farmaatsia Instituudi töörühm (vastutav täitja Karin Kogermann), OÜ Gelatex Technologies meeskond (vastutav täitja Märt-Erik Martnes).

Suur tänu OÜ Latikas töötajatele, kes kalajäätmete kogumise projektietapis nõustasid kalajääkide valikul, saatsid regulaarselt Eesti Maaülikoolile hoolikalt jahutatud fileerimisjääke ja tagasid kiire infovahetuse vastavalt kalajääkide tekkimisele.

Eesti Maaülikooli töörühm Hüdrobioloogia ja kalanduse õppetoolist on tänulik EMÜ Põllumajandus- ja keskkonnainstituudi teiste osakondade töötajatele vastutulelikkuse eest nende osakondade mõningate seadmete ja ruumide kasutamisel: Evelin Loit, Taimekasvatuse ja taimebioloogia õppetool; Tõnu Tõnutare ja Merrit Shanskiy, Mullateaduse õppetool. Suur tänu ka Toomas Tammele EMÜ Maaehituse ja veemajanduse õppetoolist.

Käesoleva projekti läbiviimist rahastas Euroopa Merendus- ja Kalandusfond rakenduskava 2014-2020 meetme 1.1 „Kalapüügi innovatsioonitoetus“ vahenditest.

## 7 Viidatud kirjandus

1. Cauchie, H.M. 2002. Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Hydrobiologia* 470, 63–95.
2. Horst M.N., Walker A.N., Klar E. The pathway of crustacean chitin synthesis. In: Horst M.N., Freeman J.A., editors. *The Crustacean Integument: Morphology and Biochemistry*. CRC; Boca Raton, FL, USA: 1993. pp. 113–149.
3. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010). Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. *Food Hydrocolloids*, 24(2-3), 164-171.
4. Li, T., Sun, M., & Wu, S. (2022). State-of-the-art review of electrospun gelatin-based nanofiber dressings for wound healing applications. *Nanomaterials*, 12(5), 784.
5. No H.K., Hur E.Y. Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin. *J. Agric. Food. Chem.* 1998;46:3844–3846.
6. Park, B.K., Kim, M. M. 2010. Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine. *Int. J. Mol. Sci*, 11, 5152-5164.
7. Percot A, Viton C, Domard A. Characterization of Shrimp Shell Deproteinization. *Biomacromolecules*. 2003 Sep-Oct; 4(5):1380-5.
8. Rao, M., Muñoz, J. & Stevens, W. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 808–813.
9. Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., Jeon Y-J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
10. Shamshina, J.L., Kelly, A., Oldham, T. et al. 2020. Agricultural uses of chitin polymers. *Environ Chem Lett* 18, 53–60.
11. Ssekatawa, K., Byarugaba, D. K., Wampande, E. M., Moja, T. N., Nxumalo, E., Maaza, M., ... & Kirabira, J. B. (2021). Isolation and characterization of chitosan from Ugandan edible mushrooms, Nile perch scales and banana weevils for biomedical applications. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.
12. Younes, Islem, and Marguerite Rinaudo. "Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications." *Marine drugs* vol. 13,3 1133-74. 2 Mar. 2015, doi:10.3390/md13031133

## 8 Summary



European Maritime and Fisheries Fund (EMFF) for 2014–2020

Project 811019790012

### Utilization of fish waste for production of raw materials applicable in wound dressing and textile industry

Fish processing industry results in considerable amount of waste materials as processing residuals. Instead of discarding, alternative use and refining of these waste materials would enhance the gross gain from the raw material, and, simultaneously, reduce the cost on waste treatment.

Among other constituents, fish industry processing residuals contain valuable biopolymers like polypeptide collagen and polysaccharide chitin, thus they could serve as source materials for gelatin and chitosan production. Gelatin is derived from collagen and can be used in multiple applications including nanomaterials, pharmacy, cosmetics, food industry etc. For example, electrospun nanofiber mats with antibacterial agents as drug delivery systems provide opportunities for the eradication of bacterial infections as well as wound healing (Preem et al, 2019). Gelatin is one of the most important natural biomaterials for the design and construction of electrospun nanofiber-based dressings, due to its excellent biocompatibility and biodegradability, and great exudate-absorbing capacity (Li et al., 2022). As another example of gelatine application, fabrication of leather-like textile based on gelatine nanofiber mats can be considered as environmentally sustainable alternative to direct skin processing involving toxic substances. Chitin, in turn, is a source material for production of chitosan, a compound with variety of emerging commercial applications in material industry, agriculture, biomedicine, pollution treatment etc.

The aim of the project was to elucidate the potential of selected residual byproducts of local fish industry for preparation of high-quality gelatin suitable for production of nanofiber materials for wound dressing and leather-like textile applications. Additionally, we conducted a minor study on chitin purification from crayfish shells, and subsequent chitin processing for chitosan yield.

In the course of current project we produced fish gelatin from the skin of freshwater bream (*Abramis brama*), originated from Lake Peipsi, Estonia. The bream skins were obtained as industrial fish filleting residues. Gelatin production parameters were optimized to gain high-quality gelatin suitable for production of nanofibers for both wound dressing application and production of textile material. Both the produced gelatin and resultant nanofiber materials were characterized for physical and chemical properties, while wound dressing material was additionally tested for pharmaceutical requirements.

Business card pockets were crafted as an example of an accessory made of leather-like gelatin-based textile and specimens of wound patch were fabricated to illustrate the potential wound dressing application of the fish gelatin produced from residual waste of Estonian fish industry.

Current report in Estonian presents the overview of the project outcomes. Detailed results will be published in international scientific journals. In Appendix of the report, an overview of the alternative applications and future scope and of the fish gelatin is presented in English.

The project was conducted by Estonian University of Life Sciences in cooperation with project partners University of Tartu (Institute of Pharmacy) and Gelatex Technologies OÜ. Project implementation period was 29.10.2019-15.02.2022. The project was funded by European Maritime and Fisheries Fund (EMFF) for 2014–2020.

## 9 LISA 1. Kalaželatiini alternatiivsed kasutusvõimalused.

Käesolevas projekti käigus valmistati latikanahkades pärinevast želatiinist haavakattematerjali ning nahalaadset tekstiili. Lisaks on kalaželatiinil mitmesuguseid alternatiivseid perspektiivseid kasutusalasid, mille on alljärgnevas inglisekeelses ülevaates kokku võtnud Eesti Maaülikooli Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetooli professor Rajeev Bhat.

### **Future scope and potential applications of using fish gelatin obtained from bream**

#### **(*Abramis brama* L.) wastes and by-products in Estonia**

Gelatin obtained from the fish skins (together with scales) of bream (a familiar European fish of the carp family, Cyprinidae, found in lakes and slow rivers) holds high promise to be commercially exploited in the near future. This is much applicable in today's world, specifically when the entire world is focusing on the application of circular economy concepts aimed towards reducing/reusing the wastes to obtain valued-added components. Owing to the unique properties, in this project we have confirmed on the possible use of gelatin obtained from bream fish in nanofibers production. However, with the exceptional functional properties of fish gelatin like resisting the enzymatic digestion in the gastrointestinal tract coupled with better absorption capacity, and with outstanding film-forming properties renders them as a useful raw material to be used in multiple fields like in food, pharma, or in biomedical applications. It is therefore envisaged that the fish gelatin obtained in this project to hold higher scope in the food, cosmetics, and/or pharmaceutical industrial applications in Estonia and beyond. Some of the opportunities and future scope of R & D works are discussed in the heading text.

The first and foremost advantage of extracting fish gelatin is from the regional economic perspectives as gelatin obtained from seafood (fish) industrial wastes or by-products can prove to be economically beneficial to the dependent industry and for the environment. Fish skin is a primary waste product of commercial fish-processing industries, and if discarded unsustainably then can be the main contributor to environmental pollution. It is opined that by efficiently valorizing these fish industrial wastes, the environment can be kept clean from being polluted (Badii and Howell, 2006). Of course fish skin is established to be a valuable waste as it contains appreciable amounts of collagen and gelatin (Nagai and Suzuki, 2000; Karim and Bhat, 2009).

The other added advantage to the consumers is that unlike traditionally extracted gelatin from bovine or pig wastes (bones or skin) used as raw material, which holds religious sentiments, gelatin from bream fish can be used by all religious groups without restrictions in Estonia and elsewhere (when exported). Besides, there have been reports on 'Bovine Spongiform Encephalopathy' (mad cow disease) in cattle that have restricted the use of mammalian gelatin in food or pharma applications (Choi & Regenstein, 2000; Karim & Bhat 2009a). So it would be worth promoting fish gelatin extracted in our project work for future commercial applications. Also, as per the EU regulations, fish wastes/by-products are classified as category 3 or low-risk wastes. So this would be an added advantage for producing gelatin from Estonian bream fish (*Abramis brama* L.).

Going ahead, the most important physical feature of gelatin is their gel strength (or Bloom value) and viscosity properties. Generally, commercial gelatins bloom value is categorized either as low

(<150), medium (150-220), or of high Bloom (220-300). In this present project, the bloom strength was around 300, and this is highly valued in the commercial market for food or pharmaceutical applications.

Future studies can be undertaken to mix different gelling systems like bream fish gelatin with other high bloom strength fish gelatins that can result in higher gel strength, gelling, and melting temperatures.

Earlier, improvement in gel strength in fish gelatin is reported on the use of ultraviolet and electron beam radiation, as a physical, non-thermal method of treatment (Benbettaïeb et al. 2016; Bhat & Karim, 2009b). These methods can also be investigated in the future for the fish gelatin obtained from bream (*Abramis brama* L.) wastes and by-products. Further, concerning physical features, it would be worth measuring and standardizing the color which are vital for commercialization. Color can depend on the fish species and extraction conditions, and in our present project the color was white and clear (transparent), thus offering it to be much easier for commercial applications. Also, future work needs to focus on generating data on ash contents, as high amounts of ash in fish gelatin is an indication of high mineral composition. Measuring turbidity is also a pre-requirement as this is an indication of contaminants, and if this is low then it indicates that contaminants are removed during the extraction procedure. In our present study, gelatin from bream fish had a viscosity of 4-4.5 (cP), with a pH of around 4. Future studies are required to improve the viscosity as high viscosity gelatin can fetch a better market price. The majority of the fish gelatin (obtained from cold-water fish) has low rheological properties when compared with mammalian gelatin. Hence, future studies can also focus on improving the rheological properties of bream fish gelatin extracted. In addition, one of the major technical complexities with using fish gelatin is the unpleasant fishy odor (smell) of the product. However, surprisingly, in our present project work, the fish gelatin obtained had a very mild (rather none) of the off-odor.

Generating information on the distribution of polypeptides that can affect gelation properties is also vital. Imino acids and other hydrophobic amino acids can result in better strength in gelatin. Good gelling properties of gelatin directly depends on the glycine and imino acid contents and if these are high, then this can be an indication for potential usage in food and/or in biomedical product applications. This can be confirmed by FT-Raman spectroscopy or via amino acid analysis for bream fish gelatin extracted in our present work. As majority of the fish gelatin contains bioactive antimicrobial peptides, bream fish gelatin extracted in this project work can also be investigated for the same, in the near future.

In food industries, the thermo-reversible gelling behaviour ('melt in mouth' texture) of fish gelatin is one of the major reason that can ensure their use for producing edible films. Previously is reported that edible protein films can be obtained from low-value fish or processing by-products of 'whiting' fish (*Merlangus merlangus*) (Azahrani et al., 2019). Fish gelatin has been explored for producing biodegradable packaging and coating material in the food industry (Bhat and Karim, 2009, 2014). Hence there is a lot of scopes to identify the potential issue of fish gelatin obtained in our present work to produce biodegradable packaging materials.

Soft gelatin capsules (for encapsulation) can be produced using fish gelatin with a bloom strength range of 155-210. In our present work, after modification, we were able to achieve a bloom strength of ~ 200, which holds much to be explored for microencapsulation. The potential use will be offering a reliable mode for the controlled release of essential oils, flavour, and aroma compounds (in food industries) or of medicines.

Fish gelatin obtained from bream can also be explored to produce confectionery products (like caramels, sugar-coated candies, or jelly/fruit gums), to control sugar crystallization, or for foam



formation/stabilization and emulsification. Further, gelatin extracted in this present work can be explored as an additive to enhance the elasticity and stability of food products. Generally, for producing meat-based sausage production, a bloom strength between 140-250 is required and this strength was also observed in our present work. Further, fish gelatin can be added with selected food products to enhance the protein and reduce the amount of carbohydrates or salt concentration. Fish gelatin can be exploited as an alternative to bovine gelatin and can be tried as a low-fat replacer or as a suitable binding agent in many food products. Fish gelatin can also be explored as a suitable ingredient to improve the emulsifying capacity in dairy products, bind whey and reduce exudation of watery whey like in yogurts, ice creams, or in creamy cheese. This is because gelatin can influence the overall texture and mouthfeel of the dairy product.

With regard to pharmaceutical applications, fish gelatin holds high promise too. As indicated earlier they can be used for making soft gels acting as a carrier of medicines. Generally, bovine gelatin is well-established material that can impart preventive/regenerative effects in the bones and cartilages. So also, gelatin is known to strengthen the connective tissues resulting in skin firmness and providing shiny hair. This aspect can also be tried with the gelatin obtained from bream fish. Further, to replace bovine gelatin in pharmaceuticals and by improving selected properties of bream fish gelatin these can be used as a reliable non-toxic, non-allergenic ingredient with GRAS status. Along with collagen, gelatin can also be used in developing skin creams (gelatin hydrolysates added) and for hair products. This is expected to improve the water-binding capacity, enrich skin health as well as minimize trans-epidermal water losses. Earlier, the use of nano-scale drug delivery using gelatin-based nano-gels has been successful (Kang et al. 2019).

Because of its reabsorbing capability, gelatin has been used to produce sponges for surgical and dental applications (Qureshi et al., 2020). Bovine gelatin finds extensive usage as a wound dressing material. A mixture of gelatin and alginate was developed by Türe (2019) used as a wound dressing material. So, these features can also be tried with the fish gelatin obtained in this present work of ours.

Earlier, porcine gelatin has been used as 'non-viral vector' for gene delivery for cancer gene therapy (Weir et al. 2004; Nezhadi et al. 2009). In this sense, fish gelatin obtained in our present work can be investigated as a reliable gene therapy vector also.

When used for edible purposes or while taken orally, it is duly opined that gelatin should be free of any contaminants like heavy metals (Johnston-Banks 1990). As there might be a possibility of occurrence of heavy metals in fish wastes and their by-products (if they were harvested from an unknown polluted environment), it would make it a necessity to investigate for the presence of any harmful heavy metals in the fish gelatin. This is one area that needs be explored in the future. This dataset generated can be used for confirming the non-toxic, non-allergenic nature of fish gelatin and clearing with GRAS status. Above all adopting eco-friendly green extraction/processing methods can also be an added advantage to the environment, dependent industry, and consumers.

In conclusion, extracting gelatin from bream fish (*Abramis brama* L.) wastes/byproducts with a sustainable and eco-friendly approach supports not only the circular bioeconomy concepts of the EU, but is also expected to benefit the local dependent industries in Estonia and elsewhere.

## References:

13. Arnesen, J. A., & Gildberg, A. (2002). Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Bioresource Technology*, 82(2), 191-194.
14. Arsyanti, L., Erwanto, Y., Rohman, A., & Pranoto, Y. (2018). Chemical composition and characterization of skin gelatin from buffalo (*Bubalus bubalis*). *International Food Research Journal*, 25(3), 1095-1099.
15. Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Brachais, C. H., & Debeaufort, F. (2016). Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Food Chemistry*, 195, 11-18.
16. Bhat R, Karim. A.A. (2014). Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents. *Journal of Food Science and Technology-Mysore, Springer* 51(7):1326–1333.
17. Bhat, R., Karim, A.A. (2009b). Ultraviolet irradiation improves gel strength fish gelatin. *Food Chemistry*, 113:1160-1164.
18. Choi, S.S., Regenstein, J.M. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *J Food Sci* 65(2):194–199.
19. Johnston-Banks FA (1990) Gelatin. In: Harris P (ed) *Food gels*. Elsevier Applied Science Publishers, London.
20. Kang, M. G., Lee, M. Y., Cha, J. M., Lee, J. K., Lee, S. C., Kim, J., . . . Bae, H. (2019). Nanogels derived from fish gelatin: Application to drug delivery system. *Marine Drugs*, 17(4). Available from <https://doi.org/10.3390/md17040246>.
21. Karim, A. A., & Bhat, R. (2009a). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food hydrocolloids*, 23(3), 563-576.
22. Lee, J. K., Patel, S. K. S., Sung, B. H., & Kalia, V. C. (2020). Biomolecules from municipal and food industry wastes: An overview. *Bioresource Technology*, 298. Available from <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122346>.
23. Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suares, J. C., Moreno-Hernández, J. M., & Pacheco-Aguilar, R. (2018). Seafood proteins. *Proteins in food processing* (2nd ed (pp. 445-475). Elsevier Inc. Available from <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00018-8>.
24. Nezhadi, S. H., Choong, P. F., Lotfipour, F., & Dass, C. R. (2009). Gelatin-based delivery systems for cancer gene therapy. *Journal of Drug Targeting*, 17(10), 731-738.
25. Preem, L., Bock, F., Hinnu, M., Putrinš, M., Sagor, K., Tenson, T., ... & Kogermann, K. (2019). Monitoring of antimicrobial drug chloramphenicol release from electrospun nano-and microfiber mats using UV imaging and bacterial bioreporters. *Pharmaceutics*, 11(9), 487.

26. Qureshi, D., Nayak, S. K., Anis, A., Ray, S. S., Kim, D., Hanh Nguyen, T. T., & Pal, K. (2020). Introduction of biopolymers: Food and biomedical applications. *Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications*, 1-45. Available from <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00001-1>
27. Türe, H. (2019). Characterization of hydroxyapatite-containing alginate–gelatin composite films as a potential wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, 123, 878-888.
28. Weir, B., Zhao, X., & Meyerson, M. (2004). Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell*, 6(5), 433–438.