

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN

Tecnologie Alimentari

TITOLO DELLA TESI

**VALORIZZAZIONE DI SCARTI ITTICI MEDIANTE PROCESSI  
BIOTECNOLOGICI**

Tesi in

82298 - Valorizzazione dei sottoprodotti dell'industria alimentare

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Lanciotti Rosalba

Correlatori:

Dott. Gottardi Davide

Dott.ssa Ciccone Marianna

Candidato: Ventriglia Mattia

Matricola N° 936184

Anno Accademico 2021/2022

Sessione unica



## INDICE

<b>CAPITOLO 1</b>	<b>5</b>
<b>L'INDUSTRIA ITTICA NEL MONDO</b>	<b>5</b>
<i>1.1 - La pesca e l'acquacoltura nel mondo</i>	5
<i>1.2 - Lavorazione e produzione della pesca e dell'acquacoltura</i>	8
<i>1.3 - Impatto della pandemia Covid 19 sul settore ittico</i>	11
<b>CAPITOLO 2</b>	<b>12</b>
<b>SCARTI E SOTTOPRODOTTI DELL' INDUSTRIA ITTICA</b>	<b>12</b>
<i>2.1 – Gli scarti della filiera ittica</i>	13
<i>2.2 – Legislazione per i sottoprodotti</i>	14
2.2.1 – I sottoprodotti di origine animale (SOA)	15
<i>2.3 – Prodotti bioattivi ottenibili dagli scarti dell'industria ittica</i>	18
2.3.1 – Composti azotati	19
2.3.2 – Chitina e Chitosano	24
2.3.3 – Composti lipidici	25
<i>2.4- Principali prodotti ottenuti dalla lavorazione ittica: farina e olio di pesce</i>	26
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>29</b>
<b>METODI DI ESTRAZIONE E UTILIZZI DEI COMPOSTI BIOATTIVI</b>	<b>29</b>
<i>3.1 – Produzione di idrolizzati proteici</i>	29
3.1.2 – Estrazione di amminoacidi	31
3.1.3 – Estrazione di peptidi	35
<i>3.2- Applicazioni industriali degli enzimi estratti dai pesci</i>	36
<i>3.3- Produzione di olio</i>	38
<i>3.4- Produzione di chitina e chitosano</i>	40
<b>CAPITOLO 4</b>	<b>41</b>
<b>METODI DI ESTRAZIONE GREEN</b>	<b>41</b>
<i>4.1 - Estrazione con ultrasuoni (ultrasound-assisted extraction, UAE)</i>	43
<i>4.2 - Estrazione con fluidi supercritici (supercritical fluid extraction, SFE)</i>	45
<i>4.3- Campi elettrici pulsati (pulsed electric field, PEF)</i>	48
<i>4.4- Estrazione assistita con microonde (microwave-assisted extraction, MAE)</i>	48
<b>CAPITOLO 5</b>	<b>51</b>
<b>VALORIZZAZIONE TRAMITE FERMENTAZIONE MICROBICA</b>	<b>51</b>
<b>CAPITOLO 6</b>	<b>58</b>
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>58</b>

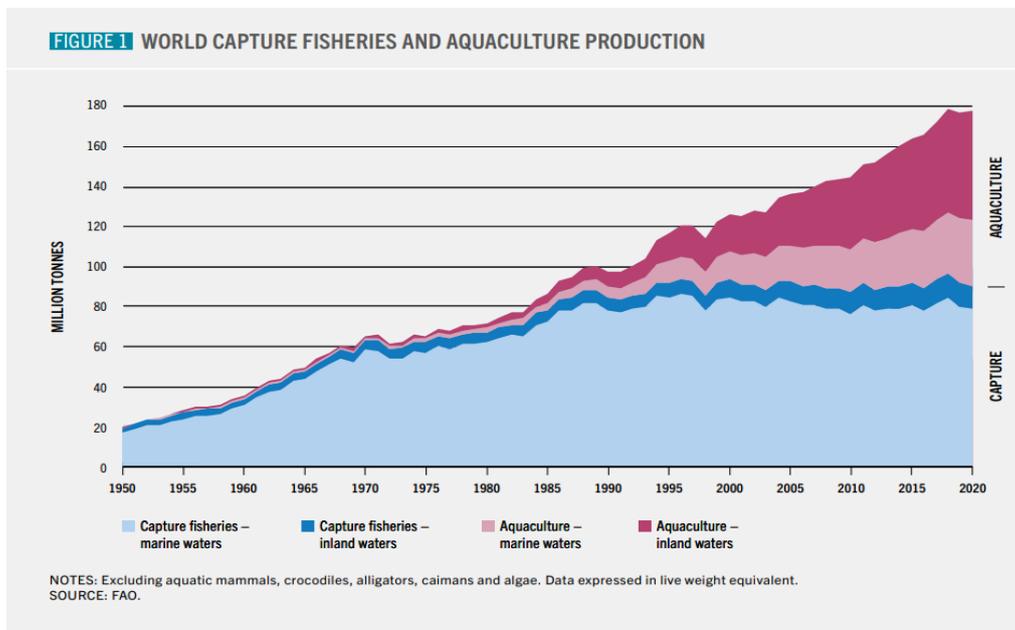
<b>CAPITOLO 7</b>	<b>60</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>60</b>
<b>7.1 - Fermentazioni microbiche su scarti di pesce</b>	<b>60</b>
7.1.1 – <i>Microrganismi selezionati per le fermentazioni</i>	60
7.1.2 - <i>Preparazione degli scarti di pesce</i>	60
7.1.3 - <i>Allestimento delle fermentazioni</i>	61
7.1.4 - <i>Termine delle fermentazioni ed estrazione degli idrolizzati</i>	62
<b>7.2 - Analisi microbiologiche</b>	<b>64</b>
<b>7.3 - Analisi chimiche</b>	<b>65</b>
7.3.1 - <i>pH</i>	65
<b>7.4 - Analisi delle proteine</b>	<b>65</b>
7.4.1 - <i>Concentrazione proteica</i>	65
7.4.2 - <i>Concentrazione dei peptidi</i>	66
<b>7.5 - Attività antiossidante</b>	<b>67</b>
7.5.1 - <i>Saggio DPPH</i>	67
7.5.2 – <i>Saggio ABTS</i>	68
<b>7.6 – Analisi dei composti volatili</b>	<b>70</b>
<b>7.7– Analisi statistica</b>	<b>71</b>
<b>CAPITOLO 8</b>	<b>71</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>71</b>
<b>8.1- Misura del pH</b>	<b>72</b>
<b>8.2- Analisi microbiologica</b>	<b>72</b>
<b>8.3 -Quantificazione del contenuto proteico e peptidico</b>	<b>74</b>
<b>8.4- Attività antiossidante</b>	<b>75</b>
<b>8.5- Composti volatili</b>	<b>78</b>
<b>CAPITOLO 9</b>	<b>87</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>87</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>89</b>

## CAPITOLO 1

### L'INDUSTRIA ITTICA NEL MONDO

#### 1.1 - La pesca e l'acquacoltura nel mondo

La produzione mondiale di animali acquatici nel 2020 è stata stimata in 178 milioni di tonnellate, di cui il 51% (90 milioni) attribuito alla pesca mentre il restante 49% (88 milioni) all'acquacoltura. Di tutta la produzione, il 63% (112 milioni, inclusi sia pesca (70%) che acquacoltura (30%)) è stato raccolto in acqua marine, mentre la restante parte (66 milioni) nelle acque interne (83% acquacoltura e 17% pesca) (Fig. 1.1). Il valore di tutta la produzione è stato stimato a 406 miliardi di dollari (FAO, 2022).



**Figura 1.1-** Produzione mondiale della pesca e dell'acquacoltura (FAO, 2022).

Di tutta la produzione, circa l'89% (157 milioni) è destinato al consumo umano mentre la restante parte è usata per produrre principalmente farine di pesce e olio (prodotti non-food).

Il consumo apparente è aumentato con tasso medio annuo del 3% nel periodo 1961-2019, circa il doppio della crescita annua della popolazione nello stesso periodo. Inoltre, il consumo pro-capite è aumentato del 1,4 % ogni anno, passando da 9 kg (peso vivo equivalente) nel 1961 a 20,2 kg nel 2019. Negli ultimi decenni, il consumo pro capite di alimenti acquatici è stato fortemente influenzato dall'aumento delle forniture, dal cambiamento delle preferenze dei consumatori, dai progressi tecnologici e dalla crescita del reddito.

Negli ultimi anni si è vista una situazione di stallo della produzione totale sia nella pesca che nell'acquacoltura. In particolare, dal 2018 al 2019 c'è stato un calo del 1% per poi incrementare di solo 0.2% nel 2020. Questo stallo è dovuto ad una diminuzione delle catture di pesca nel periodo 2018-2020 (-6.7%) causato da vari fattori, in particolare dalla diminuzione delle catture in Cina e dall'impatto che la pandemia COVID 19 ha avuto sul settore. Oltre alla pesca, anche l'acquacoltura ha avuto un calo di crescita negli ultimi due anni (3,3% nel 2018-2019 e 2,6% nel 2019-2020 contro una media del 4,6% all'anno nel periodo 2010-2018). Questo calo è dovuto ad una serie di fattori, tra cui l'impatto dei cambiamenti politici in Cina inerenti alla protezione ambientale e vari problemi legati al COVID-19 nel 2020 che, non solo hanno avuto un impatto sulla produzione per i mercati di esportazione, ma hanno anche ridotto la disponibilità di lavoratori e forniture; anche l'interruzione dei trasporti e del marketing, oltre alle misure sanitarie, hanno contribuito al calo. Per quanto riguarda la produzione nei singoli continenti, il maggiore produttore è l'Asia con circa il 70% della produzione totale mondiale, seguita poi dall'America (12%), Europa (10%), Africa (7%) e Oceania (1%). Per quanto riguarda l'Asia, solo la Cina contribuisce per il 35% della produzione mondiale (FAO, 2022). Ogni anno viene raccolto un gran numero di specie marine, che varia per ogni regione. Nel 2020, i pesci hanno rappresentato il 76% degli animali acquatici totali raccolti, con i pesci marini che rappresentano il 51% dei pesci totali pescati e il 39% degli animali acquatici totali, seguiti dai pesci di acqua dolce che rappresentano il 43% dei pesci totali e il 33% della produzione totale di animali acquatici. La restante parte dei pesci totali (6%) è rappresentata dalle specie diadrome. Oltre alle 178 milioni di tonnellate di animali acquatici del 2020 bisogna considerare anche le alghe, che ammontano a 36 milioni di tonnellate e derivano quasi totalmente (97%) dall'acquacoltura. I paesi asiatici sono i principali produttori di alghe (97% del totale), primi tra tutti la Cina che da sola fornisce il 58% del totale di alghe; seguita poi da Indonesia e Repubblica di Corea. Sommando la produzione di alghe con quella degli animali acquatici la produzione totale mondiale nel 2020 sale a 214 milioni di tonnellate, di cui il 75% derivante dall'Asia, seguita poi dall'America (10%), Europa (8%), Africa (6%) e Oceania (1%). Se si considerano anche le alghe, la percentuale di prodotto derivante dall'acquacoltura è maggiore rispetto alla parte pescata (già dal 2013) e rappresenta il 57% del totale. Nel 2020, la produzione derivante dalla pesca è stata di 90 milioni di tonnellate (escluse alghe), con un calo di circa il 4% rispetto ai tre anni precedenti. Questa diminuzione comprende sia la pesca in acque marine che quella in acque interne ed è dovuta principalmente a due fattori: l'interruzione delle operazioni di pesca dovuta alla pandemia e la riduzione continua delle catture in Cina (-10% rispetto ai tre anni precedenti). L'andamento globale della produzione da pesca negli ultimi decenni si è mantenuto abbastanza stabile; in particolare, dal 1980 ad oggi, la produzione si è mantenuta tra 86 milioni e 93 milioni di tonnellate.

La Cina rimane il primo produttore di catture nonostante la diminuzione delle sue catture di circa il 19,3% tra il 2015 e il 2020. I primi sette produttori di cattura (Cina, Indonesia, Perù, India, Federazione Russa, Stati Uniti d'America e Vietnam) rappresentavano quasi il 49% della produzione totale globale di cattura. Per quanto riguarda le **catture in acque marine**, la produzione mondiale nel 2020 è stata di circa 78.8 milioni di tonnellate, con un calo del 6.8% rispetto al 2018. Nel 2020, la produzione derivante dalla pesca in acque interne è stata di 11,5 milioni di tonnellate, con un calo del 5% rispetto al 2019. Questo calo è stato causato, come per la pesca in acque marine, dalla pandemia e dal calo delle catture in Cina. Nel caso della **pesca in acque interne**, l'India è il maggiore produttore con 1,8 milioni di tonnellate. Anche se la Cina continua ad essere tra i maggiori produttori mondiali, la sua produzione è calata del 33% dal 2017, passando da 2,2 milioni di tonnellate a 1,5 milioni nel 2020. Questo calo significativo è dovuto all'introduzione, da parte del Ministero dell'agricoltura, del divieto di pesca decennale nel fiume Azzurro (*Yangtze*), uno dei più importanti del paese. I maggiori produttori nel 2020 sono stati: India, Cina, Bangladesh, Myanmar e Uganda; solo loro 5 hanno contribuito al 52% della produzione mondiale. Le catture in acque interne sono più concentrate delle catture marine tra le principali nazioni produttrici dotate di importanti corpi idrici o bacini fluviali. Nel 2020, 13 paesi hanno prodotto oltre il 75% del totale delle catture interne, rispetto a 20 paesi per catture marine. Per lo stesso motivo, anche i principali produttori di catture di acque interne sono più concentrati geograficamente e sono particolarmente importanti in termini di contributo alle catture totali in Asia, dove le catture nelle acque interne forniscono un'importante fonte di cibo per molte comunità locali.

L'acquacoltura, a differenza della pesca, ha mantenuto il suo trend di crescita anche nel 2020 nonostante la pandemia; anche se con differenze tra i vari paesi. La produzione mondiale per l'acquacoltura è stata di 122.6 milioni di tonnellate, suddivise in:

- 87.5 milioni di animali acquatici destinati prevalentemente all'alimentazione umana;
- 35.1 milioni di alghe per uso alimentare e non;
- 700 tonnellate di conchiglie e perle per usi ornamentali.

Rispetto al 2018, c'è stato un incremento di 6.7 milioni di tonnellate. La produzione mondiale di animali dall'acquacoltura è cresciuta del 2,7% nel 2020 rispetto al 2019, con il più basso tasso di crescita annuale in oltre 40 anni. L'allevamento di pesci è rimasto stabile, con fluttuazioni minime (attorno a 66%) e rappresenta la quota maggiore di acquacoltura mondiale da decenni.

Nel 2020, il pesce d'allevamento ha raggiunto 57.5 milioni di tonnellate, di cui 49.1 milioni di tonnellate provenienti dall'acquacoltura interna e 8.3 milioni di tonnellate da acquacoltura in mare e

costiera in riva. La produzione di altre specie animali acquatiche d'allevamento ha raggiunto 17.7 milioni di tonnellate di molluschi, per lo più bivalvi, 11.2 milioni di tonnellate di crostacei, 525.000 tonnellate di invertebrati acquatici e 537.000 tonnellate di specie semiacquatiche, tra cui tartarughe e rane. La coltivazione globale di alghe, dominata dalle macroalghe marine, è cresciuta di mezzo milione di tonnellate nel 2020 rispetto al 2019. Alcuni dei principali paesi produttori tra cui Cina e Giappone hanno registrato una crescita nel 2020, mentre i raccolti di alghe sono diminuiti nel sud-est asiatico e nella Repubblica di Corea. Tutti gli altri continenti hanno registrato una crescita continua nel 2020. Cile, Cina e Norvegia, primi produttori, rispettivamente nelle Americhe, in Asia e in Europa, hanno registrato una crescita nel 2020, compensando la diminuzione della produzione verificatasi in alcuni paesi nelle rispettive regioni. La maggior parte dei principali paesi produttori di acquacoltura sono paesi in via di sviluppo altamente popolati in cui l'acquacoltura contribuisce per più della metà della produzione totale di pesca e acquacoltura, a beneficio della metà della popolazione mondiale.

I maggiori produttori per quanto riguarda l'acquacoltura sono:

- Asia 91%
- America 3,59%
- Europa 2,69%
- Africa 1,92%
- Oceania 0,19%

## **1.2 - Lavorazione e produzione della pesca e dell'acquacoltura**

I raccolti della pesca e dell'acquacoltura si trasformano in un'ampia gamma di prodotti con caratteristiche e sapori differenti a seconda della specie, del metodo di conservazione e della forma del prodotto. I notevoli miglioramenti nella lavorazione, nella refrigerazione, nella produzione e nell'uso del ghiaccio, nel congelamento, nella conservazione e nel trasporto hanno consentito una maggiore durata di conservazione, una distribuzione su lunghe distanze e una crescente varietà di prodotti. La quota della produzione ittica e acquacoltura di animali acquatici utilizzati per il consumo umano diretto è aumentata in modo significativo dal 67% negli anni '60 a circa l'89% nel 2020 (ovvero oltre 157 milioni di tonnellate dei 178 milioni di tonnellate della produzione totale di pesca e acquacoltura, esclusa quella relativa alle alghe). Il restante 11% (oltre 20 milioni di tonnellate) è stato utilizzato per scopi non alimentari; di questo, l'81% (oltre 16 milioni di tonnellate) è stato ridotto a farina e olio di pesce, mentre il resto (circa 4 milioni di tonnellate) è stato largamente utilizzato come

pesce ornamentale, per l'allevamento (es. avannotti o piccoli adulti per accrescimento), come esca, per usi farmaceutici, per *pet food*, o come materia prima per l'alimentazione diretta in acquacoltura e per l'allevamento di bestiame e animali da pelliccia. Nel 2020, il cibo acquatico vivo, fresco o refrigerato ha continuato a rappresentare la quota maggiore della produzione di pesca e acquacoltura utilizzata per il consumo umano diretto (44%) e spesso rappresenta la forma maggiormente preferita e più costosa di prodotti acquatici. Seguono i prodotti surgelati (35%), preparati e conservati (11%) e stagionati (10%). Il congelamento rappresenta il metodo principale di conservazione dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura a fini alimentari, rappresentando il 63% di tutta la produzione di animali acquatici trasformati per il consumo umano (escludendo quelli vivi, freschi o refrigerati). I metodi di utilizzo differiscono in modo significativo tra i continenti, le regioni, i paesi e persino all'interno dei paesi stessi. In Asia e in Africa, la quota di produzione alimentare acquatica conservata mediante salatura, affumicatura, fermentazione o essiccazione è superiore alla media mondiale. Circa i due terzi della produzione della pesca e dell'acquacoltura utilizzate per il consumo umano è congelato, preparato e conservato in Europa e Nord America. La quota di produzione della pesca e dell'acquacoltura utilizzata per l'ottenimento di farina e olio di pesce è più alta in America Latina, seguita da Asia ed Europa. Nel complesso, nelle economie più sviluppate, la lavorazione degli alimenti acquatici si è diversificata, in particolare, in prodotti ad alto valore aggiunto come i pasti pronti (*ready to eat*). Nel 2020, oltre il 50% della produzione di alimenti acquatici destinati al consumo umano nei paesi ad alto reddito era in forma congelata, seguita da circa il 26% in forma preparata e conservata e il 13% in forma stagionata. In molti paesi in via di sviluppo, la lavorazione dei prodotti acquatici si è evoluta da metodi tradizionali a processi più avanzati, a seconda della merce e del valore di mercato. Tuttavia, ci sono differenze significative a seconda delle infrastrutture e delle preferenze culturali dei paesi. I prodotti acquatici commercializzati in forma viva sono apprezzati principalmente nell'Asia orientale e sudorientale e nei mercati di nicchia di altri paesi, principalmente tra le comunità asiatiche di immigrati. In Cina e in alcuni paesi del sud-est asiatico, gli animali acquatici vivi sono oggetto di commercio e manipolazione da oltre 3000 anni e, in molti casi, le pratiche per la loro commercializzazione continuano a basarsi sulla tradizione e non sono formalmente regolamentate. La commercializzazione di animali acquatici vivi ha continuato a crescere negli ultimi anni anche grazie al miglioramento logistico e tecnologico. Tuttavia, il trasporto può essere impegnativo, poiché è spesso soggetto a rigorose normative sanitarie, standard di qualità e requisiti di benessere degli animali (in particolare in Europa e Nord America). Nel complesso, la continua espansione del consumo e della commercializzazione dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura è stata accompagnata da un significativo sviluppo degli standard di qualità e di sicurezza alimentare. Negli ultimi decenni, i settori della pesca e dell'acquacoltura sono diventati più

complessi e dinamici, con sviluppi guidati dall'elevata domanda da parte del settore del commercio al dettaglio, dalla diversificazione delle specie e da legami di approvvigionamento più forti tra produttori, trasformatori e rivenditori.

L'espansione delle catene di supermercati e della grande distribuzione in tutto il mondo ha accresciuto il loro ruolo di attori chiave nell'influenzare i requisiti e gli standard di accesso al mercato. Per soddisfare questi standard di sicurezza e qualità alimentare e garantire la protezione dei consumatori, sono state adottate misure di igiene e manipolazione sempre più rigorose a livello nazionale, livello regionale e internazionale, sulla base del “*Code of Practice for Fish and Fishery Product*” (FAO e OMS, 2020) e delle sue linee guida per i paesi sugli aspetti pratici dell'attuazione di un sistema di gestione della sicurezza basato sul sistema HACCP. Poiché i prodotti acquatici sono altamente deperibili, è necessaria una cura particolare nella raccolta e lungo tutta la filiera. Se non adeguatamente trattati dopo la raccolta, possono presto diventare inadatti al consumo e potenzialmente pericolosi per la salute a causa della crescita microbica, del cambiamento chimico, della degradazione degli enzimi endogeni e della contaminazione incrociata che porta a rischi per la sicurezza alimentare. Le corrette misure di manipolazione, lavorazione, conservazione, imballaggio e conservazione sono essenziali per prolungare la durata di conservazione, garantire la sicurezza alimentare, mantenere la qualità e le caratteristiche nutrizionali ed evitare perdite e sprechi. Inoltre, un migliore utilizzo può aiutare a ridurre la pressione sulle risorse acquatiche e promuovere la sostenibilità del settore. Anche le tecniche di conservazione e trasformazione sono essenziali per consentire la distribuzione e la commercializzazione dei prodotti acquatici a livello nazionale e a livello internazionale. Queste tecniche si basano sulla riduzione della temperatura (abbattimento e congelamento), trattamento termico (inscatolamento, bollitura e affumicatura), riduzione dell'acqua disponibile (essiccazione, salatura e affumicatura) e cambio dell'ambiente di conservazione (sottovuoto, confezionamento in atmosfera modificata e refrigerazione). In molti paesi è in corso un significativo sviluppo tecnologico nella lavorazione e confezionamento degli alimenti, con aumenti nell'utilizzo efficiente, efficace e redditizio delle materie prime e innovazione nella diversificazione dei prodotti per il consumo umano, nonché per la produzione di farina di pesce e olio di pesce e altri scopi.

### **1.3 - Impatto della pandemia Covid 19 sul settore ittico**

Nel marzo 2020, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha dichiarato la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) come una pandemia globale. Da allora, il mondo è stato scosso da una malattia che ha ucciso milioni di persone e fatto ammalare decine di milioni. Nel giro di poche settimane, l'economia mondiale ha subito una forte contrazione a causa delle misure attuate d'urgenza per prevenire la diffusione del virus. Ciò ha comportato gravi conseguenze per settori fortemente dipendenti dal commercio, compresi la pesca e l'acquacoltura. A livello regionale, gli organismi regionali per la pesca hanno segnalato, tra l'altro, un impatto negativo sulle attività relative al monitoraggio, controllo e sorveglianza delle attività di pesca, alla ricerca e alla gestione della pesca e dell'acquacoltura. La maggior parte dei paesi e delle regioni ha registrato forti cali della produzione, dell'occupazione e dei prezzi della pesca e dell'acquacoltura. Cina, Europa, Giappone e Stati Uniti d'America, i quattro grandi mercati per gli alimenti acquatici, sono stati duramente colpiti dalla pandemia. La chiusura delle frontiere, con restrizioni di viaggio e interruzione delle importazioni, ha colpito i paesi in via di sviluppo che dipendono dalle esportazioni di prodotti acquatici. La FAO stima che 3 miliardi di persone non possono permettersi una dieta sana. In effetti, la pandemia ha posto grandi sfide ai mezzi di sussistenza, all'occupazione, alla sicurezza alimentare e alla nutrizione. Le campagne di vaccinazione e le risposte politiche al COVID-19 hanno consentito la ripresa economica globale nel 2021, con un aumento della produzione, del commercio e del consumo di prodotti acquatici. L'intera catena del valore (*value chain*) della pesca e dell'acquacoltura è stata gravemente interrotta a causa dei blocchi. Nei paesi europei, nel breve termine, gli alimenti deperibili sono stati svenduti sottocosto e/o demoliti, mentre nel medio termine la capacità di stoccaggio è stata limitata dalla ridotta capacità di produzione e trasporto. In molti paesi, le restrizioni alla mobilità hanno completamente interrotto la filiera della pesca e dell'acquacoltura, almeno durante i primi mesi della pandemia prima che il settore venisse gradualmente riconosciuto come essenziale e venissero attuate iniziative per riportare il settore in carreggiata. Le restrizioni alla mobilità significavano che prodotti essenziali, come mangimi e sementi, non potevano raggiungere regolarmente le aziende agricole. Tutto ciò ha provocato la paralisi del settore, che ha subito sovraccarichi e costi di alimentazione e congelamento imprevisti con gravi impatti economici, e alcune unità produttive hanno chiuso le operazioni. Gli impatti della pandemia sui sistemi alimentari acquatici sono variati a seconda delle specie, dei mercati e della domanda dei consumatori, nonché della capacità di adattamento sia dei governi che dell'industria. In generale, le catene di approvvigionamento dominate dalle piccole e medie imprese (PMI) erano particolarmente vulnerabili alle restrizioni COVID-19. Nell'Asia meridionale e sudorientale, i risultati preliminari di un'indagine condotta da FAO e INFOFISH mostrano che la pandemia di COVID-19 e il blocco hanno avuto un forte impatto sulla pesca su

piccola scala e sugli agricoltori dell'acquacoltura in tutti i paesi. Le restrizioni hanno interrotto le catene di approvvigionamento e i mercati, ostacolato le operazioni commerciali, influito sull'occupazione, mantenuto alcune disuguaglianze come quella della partecipazione di genere e contribuito alla fluttuazione dei redditi delle famiglie e alla diminuzione delle entrate fiscali e dei guadagni in valuta estera per i governi. Nel complesso, il sistema alimentare acquatico è riuscito ad adattare e mantenere i flussi di prodotti e forniture, ma numerose imprese hanno cessato l'attività o si trovano in una posizione precaria.

## **CAPITOLO 2**

### **SCARTI E SOTTOPRODOTTI DELL' INDUSTRIA ITTICA**

## **2.1 – Gli scarti della filiera ittica**

La pesca contribuisce per oltre il 50% alla produzione ittica mondiale totale. Circa il 70% del pesce viene lavorato prima della vendita finale, producendo così un 20-80% di scarti di pesce a seconda del livello di lavorazione e del tipo di pesce. Tuttavia, Al Khawli et al. (2019), stimano la percentuale di scarti tra il 30 e l'85%: questo ampio range percentuale è dovuto al fatto che la quantità di scarti dipende dalla zona di pesca, dalla stagione, dalle dimensioni e dalle specie di pesce considerate. La composizione del pesce varia a seconda del tipo di specie, sesso, età, stato nutrizionale, periodo dell'anno e stato di salute. La maggior parte del pesce contiene il 15-30% di proteine, lo 0-25% di grassi e il 50-80% di umidità anche se queste percentuali variano in base alla specie presa in esame (Ghaly et al., 2013). L'espansione del settore ittico ha portato a quantità crescenti di sottoprodotti, che possono rappresentare fino al 70% del pesce trasformato, a seconda delle dimensioni, della specie e del tipo di lavorazione. I sottoprodotti sono solitamente composti da teste (che rappresentano il 9-12% del peso totale del pesce), visceri (12-18%), pelle (1-3%), ossa (9-15%) e squame (circa 5%). Storicamente, i sottoprodotti del pesce venivano spesso usati per la produzione di farina di pesce o scartati come rifiuti, con conseguenti perdite economiche e problemi ambientali. La lavorazione dei sottoprodotti spesso comporta notevoli sfide ambientali e tecnologiche a causa dell'elevata carica microbica ed enzimatica della materia prima e della sua suscettibilità alla rapida degradazione se non lavorata o conservata correttamente. Pertanto, la raccolta e il trattamento tempestivi dei sottoprodotti è fondamentale per il loro ulteriore trattamento. Lo sviluppo di nuovi ingredienti o nuovi prodotti in varie forme a base di sottoprodotti del pesce fornisce un'alternativa potenzialmente valida per aumentare il valore aggiunto dei prodotti, evitare perdite economiche, ridurre l'impatto ambientale e fornire ai consumatori alimenti nutrienti, economici e convenienti e con una shelf-life più stabile. I filetti sono le parti del pesce più pregiate in termini di proteine, ma teste, ritagli di filetto, lembi del ventre e parti dei visceri, come fegato e uova, sono fonti particolarmente buone di nutrienti come gli acidi grassi omega-3 a catena lunga, vitamine A, D e B12, oltre a minerali come ferro, zinco, calcio, fosforo e selenio. Applicando tecnologie di lavorazione a parti del pesce tradizionalmente non consumate, queste possono essere convertite in prodotti altamente nutrienti a basso costo come salsicce di pesce, paté, torte, snack, zuppe, salse e altri prodotti per il consumo umano. Questa potrebbe essere un'ottima opportunità per aumentare l'impatto nutrizionale delle risorse della pesca e dell'acquacoltura, nonché per ridurre la perdita e lo spreco di pesce (FAO, 2022).

Nonostante i grandi progressi nella lavorazione, refrigerazione e trasporto, ogni anno milioni di tonnellate di prodotti acquatici vengono perse o compromesse dal punto di vista nutrizionale. Nella pesca e nell'acquacoltura, si stima che ogni anno fino al 35% della produzione mondiale vada persa

o sprecata. Nella maggior parte delle regioni del mondo, si stima che la perdita totale e lo spreco di pesce siano compresi tra il 30% e il 35%. Molti paesi in via di sviluppo, in particolare le economie meno sviluppate, mancano ancora di infrastrutture, servizi e conoscenze per un'adeguata gestione e conservazione a bordo delle navi e a terra. L'impossibilità di accedere all'elettricità, all'acqua potabile, alle strade, al ghiaccio, alle celle frigorifere e al trasporto refrigerato rappresenta un problema grave. Un'efficace riduzione delle perdite e degli sprechi di pesce richiede l'applicazione di un approccio multidimensionale e multi-*stakeholder* (ovvero includere le parti interessate del settore nelle decisioni). Un approccio così ampio considera i fattori che influenzano le capacità nazionali nella prevenzione delle perdite, come le politiche e la legislazione di supporto, nonché le competenze, le conoscenze, i servizi, le infrastrutture e la tecnologia. Comprendere come questi diversi fattori interagiscono in un determinato contesto, influenzati da fattori legati a posizione, specie, clima e cultura, è importante per poter progettare soluzioni efficaci e sostenibili. Va inoltre sottolineato che la riduzione delle perdite e degli sprechi di pesce può portare a una riduzione della pressione sugli stock ittici e contribuire a migliorare la sostenibilità delle risorse nonché la sicurezza alimentare e nutrizionale.

## **2.2 – Legislazione per i sottoprodotti**

L'articolo 184-bis del Testo Unico Ambientale (D.lgs 3/04/2006 n.152), modificato dal D.lgs 3/12/2010 n.205 (norma di ricezione della direttiva 2008/98 CE), definisce come “sottoprodotto” una qualsiasi sostanza od oggetto che soddisfa tutte le seguenti condizioni:

- a) La sostanza o l'oggetto è originato da un processo di produzione, di cui costituisce parte integrante, e il cui scopo primario non è la produzione di tale sostanza od oggetto;
- b) È certo che la sostanza od oggetto sarà utilizzato, nel corso dello stesso o di un successivo processo di produzione o di utilizzazione, da parte del produttore o di terzi;
- c) La sostanza o l'oggetto può essere utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale;
- d) L'ulteriore utilizzo è legale, ossia la sostanza o l'oggetto soddisfa, per l'utilizzo specifico, tutti i requisiti pertinenti riguardanti i prodotti e la protezione della salute e dell'ambiente e non porterà a impatti complessivi negativi sull'ambiente o sulla salute umana.

Ulteriori specifiche sul riconoscimento, trasporto e utilizzo dei sottoprodotti sono contenute nel regolamento adottato dal Ministero dell'Ambiente attraverso un decreto del 2016 (D.lgs 13/10/2016 n. 264), dove si evidenzia anche il contributo del regime dei sottoprodotti alla dissociazione della crescita economica dalla produzione di rifiuti e la necessità di un quadro normativo e amministrativo

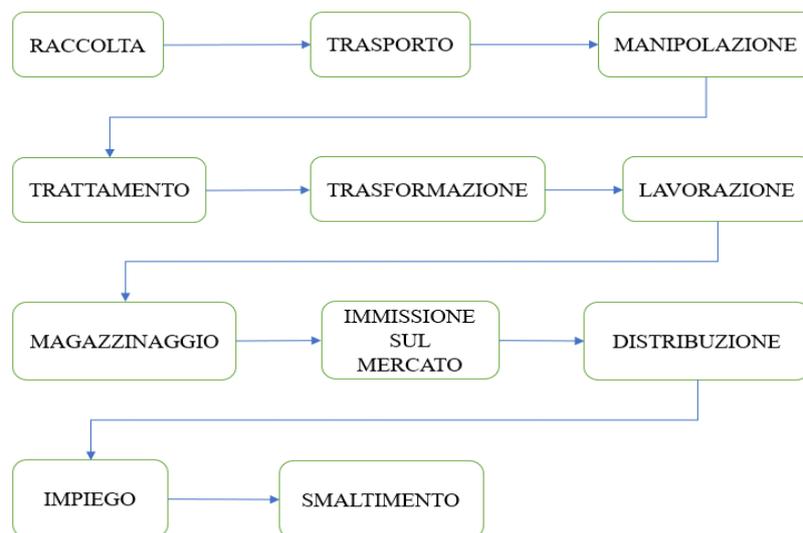
certo, imprescindibile per l'impiego dei sottoprodotti. Altro punto importante del decreto è la possibilità, del produttore e dell'utilizzatore del sottoprodotto, di iscriversi ad un elenco pubblico presso le Camere di commercio territoriali, andando a descrivere il tipo di sottoprodotto e il suo riutilizzo. In Emilia-Romagna, la legge regionale n. 16 del 2015 ha previsto, tra gli strumenti di prevenzione alla produzione di rifiuti, l'attivazione di un coordinamento permanente finalizzato alla individuazione, da parte delle imprese, dei sottoprodotti di cui all'articolo 184 bis del d.lgs. 152/2006. È stato pertanto costituito il **Coordinamento permanente dei sottoprodotti**, formato da rappresentanti della Regione Emilia-Romagna, di ARPAE Emilia-Romagna, del Tavolo Regionale dell'Imprenditoria, di Confindustria Emilia-Romagna e di Coldiretti Emilia-Romagna. Il coordinamento si propone di definire buone pratiche tecniche e gestionali che, nel rispetto delle normative vigenti, possano consentire di individuare, caso per caso da parte delle imprese, determinati sottoprodotti nell'ambito dei diversi cicli produttivi. Per attestare il riconoscimento dell'osservanza di tali buone pratiche, con deliberazione della Giunta regionale n. 2260/2016, è stato istituito l'**Elenco regionale dei sottoprodotti** a cui possono iscriversi le imprese il cui processo produttivo e le sostanze o gli oggetti da esso derivanti hanno i requisiti previsti dalla normativa vigente per la qualifica di sottoprodotti. Per iscriversi a questo elenco regionale, è necessario presentare una relazione che illustri le caratteristiche tecniche della sostanza e/o dell'oggetto, il processo produttivo da cui lo stesso origina, l'impianto o l'attività di destinazione e le modalità di gestione comprovante il rispetto di tutte le condizioni previste dalla normativa ed in particolare dall'articolo 184-bis del d.lgs. n. 152 del 2006 per la qualifica come sottoprodotto.

### *2.2.1 – I sottoprodotti di origine animale (SOA)*

La maggior parte dei sottoprodotti ittici rientra in una categoria a parte: i Sottoprodotti di Origine Animale (SOA). I SOA sono esclusi dal campo di applicazione della direttiva 2008/98 CE e dalle normative nazionali, ma sono regolamentati dal regolamento europeo 1069/2009.

Tale regolamento definisce i SOA come “*corpi interi o parti di animali, prodotti di origine animale o altri prodotti ottenuti da animali, non destinati al consumo umano, ivi compresi gli ovociti, gli embrioni e lo sperma*”.

Il regolamento indica ai Paesi membri di provvedere ad un sistema di controllo atto a garantire che i SOA siano raccolti, identificati, trattati, utilizzati o smaltiti nel rispetto del regolamento. Inoltre, gli Stati membri devono garantire il rispetto delle prescrizioni da parte degli operatori lungo tutta la catena dei sottoprodotti di origine animale, come schematizzato in figura 2.1.



**Figura 2.1** – Rappresentazione grafica della catena dei sottoprodotti di origine animale (SOA).

Il regolamento suddivide i SOA in tre categorie sulla base del loro rischio per la salute pubblica. Gli scarti della lavorazione del pesce rientrano nella categoria n.3, quella a minor rischio, e sono:

- *animali acquatici e parti di tali animali, eccetto i mammiferi marini, che non presentino alcun sintomo di malattie trasmissibili all'uomo o agli animali;*
- *sottoprodotti di animali acquatici provenienti da stabilimenti o impianti che fabbricano prodotti destinati al consumo umano;*
- *conchiglie e carapaci di crostacei e molluschi con tessuti molli o carni;*
- *invertebrati acquatici e terrestri, diversi dalle specie patogene per l'uomo o per gli animali;*

- *rifiuti di cucina e ristorazione non provenienti da mezzi di trasporto che effettuano tragitti internazionali.*

Per quanto concerne conchiglie, carapaci e rifiuti di cucina e ristorazione ci sono alcune eccezioni.

Infatti, ci sono dei casi in cui questi prodotti non rientrano nel campo di applicazione del regolamento, ovvero:

- *conchiglie e carapaci di crostacei e molluschi, privati dei tessuti molli e delle carni;*
- *rifiuti di cucina e ristorazione, tranne rifiuti: i) provenienti da mezzi di trasporto che effettuano tragitti internazionali; ii) destinati all'utilizzo nei mangimi; iii) destinati a sterilizzazione sotto pressione o alla trasformazione mediante i metodi di cui all'articolo 15, paragrafo 1, lettera b) o alla trasformazione in biogas o compost.*

L'articolo 14 indica le possibilità di smaltimento e uso dei sottoprodotti di categoria n.3, alcune di queste sono:

- smaltimento mediante incenerimento, dopo o senza trasformazione preliminare;
- smaltimento in una discarica autorizzata, dopo trasformazione;
- fabbricazione di mangimi e fertilizzanti organici;
- insilati, compostati o trasformati in biogas, se si tratta di materiali derivanti da animali acquatici;
- utilizzo a fini di ricerca o ad altri fini specifici.

Gli utilizzi per la fabbricazione di mangimi e per fini di ricerca sono regolamentati da articoli successivi.

È possibile anche usare o smaltire i SOA con metodi alternativi diversi da quelli elencati dal regolamento previa autorizzazione della Commissione europea e di EFSA che andrà a valutare potenziali rischi per la salute pubblica e degli animali. Durante il trasporto i SOA e prodotti derivati devono essere accompagnati da un documento commerciale o certificato sanitario che contengano informazioni sull'origine, destinazione, quantità e descrizione del prodotto. Lungo tutta la catena dei SOA e prodotti derivati viene istituito un sistema di rintracciabilità dove vengono registrati tutti i documenti commerciali o certificati sanitari e anche tutti gli operatori che sono entrati in contatto con i sottoprodotti.

Tutti gli stabilimenti che trattano i sottoprodotti di origine animali in qualsiasi maniera (sterilizzazione, smaltimento, incenerimento, trasformazione, ecc.) devono essere riconosciuti dall'autorità competente di ogni Stato e devono rispettare precisi criteri igienico-sanitari (art. 25).

Inoltre, ogni Stato deve elaborare un elenco nazionale in cui sono inseriti tutti gli stabilimenti riconosciuti, identificati da un numero e dall'attività da loro svolta. L'applicazione del regolamento descritto è strettamente legata al Regolamento (UE) n. 142/2011, il quale illustra metodi di trattamento, parametri di trasformazione, condizioni per manipolazione, trasporto, ecc. dei SOA. Costituisce quindi un più dettagliato punto di riferimento per gli operatori per l'attuazione del Regolamento (CE) 1069/2009.

### **2.3 – Prodotti bioattivi ottenibili dagli scarti dell'industria ittica**

I sottoprodotti della lavorazione del pesce possono essere convertiti in farina e utilizzati come sostituti della farina per aggiungere sostanze nutritive come proteine e calcio. La gelatina a base di pelle e ossa può essere ulteriormente trasformata in film commestibili e rivestimenti commestibili per applicazioni alimentari. La gelatina di pesce è un'alternativa a quella bovina e suina e può stabilizzare le emulsioni. Le lisce di pesce, oltre a fornire collagene e gelatina, sono anche un'ottima fonte di calcio e altri minerali come il fosforo, che possono essere utilizzati come mangimi o integratori alimentari. Utilizzando semplici tecnologie a basso costo, i sottoprodotti del pesce possono anche essere convertiti nel suddetto insilato di pesce. Oltre ai loro vari usi negli alimenti, i sottoprodotti ittici stanno guadagnando sempre più attenzione nelle applicazioni biotecnologiche e farmaceutiche in quanto offrono una fonte significativa e sostenibile di composti ad alto valore aggiunto, grazie all'alto contenuto di collagene, enzimi, peptidi, PUFA e minerali. Enzimi e peptidi bioattivi possono essere isolati dai visceri dei pesci e possono essere utilizzati in una vasta gamma di applicazioni come nell'industria della pelle, dei detersivi, alimentare e farmaceutica e nei processi di biorisanamento. I sottoprodotti di crostacei e bivalvi possono essere utilizzati in molti modi, affrontando anche il problema dello smaltimento dei rifiuti. La chitina, un polisaccaride estratto dai rifiuti del guscio dei crostacei, è una potenziale fonte di sostanze antimicrobiche. Il suo derivato, il chitosano, ha un'ampia gamma di applicazioni, in particolare nel settore del trattamento delle acque reflue, dei cosmetici, degli alimenti e bevande, dei prodotti agrochimici e farmaceutici. I gusci dei bivalvi, come cozze e ostriche, possono essere trasformati in carbonato di calcio o ossido di calcio, due composti chimici altamente versatili con ampie applicazioni industriali. Le conchiglie possono essere utilizzate anche nei cosmetici e nelle medicine tradizionali (polvere di perle), come integratore di calcio nei mangimi (polvere di conchiglie) e per l'artigianato e la gioielleria. Inoltre, le alghe vengono trasformate in additivi alimentari o integratori alimentari e sono una buona fonte di iodio e composti come fucoidano, fucoxantina e florotannini (Cai et al., 2021). Le alghe e le microalghe generano benefici socioeconomici per decine di migliaia di famiglie, principalmente nelle comunità costiere,

contribuendo alla salute umana, ai benefici ambientali e ai servizi ecosistemici. Generalmente ricche di fibre alimentari, micronutrienti e composti bioattivi e con alcune specie ad alto contenuto proteico, le alghe sono spesso viste come un alimento sano e ipocalorico.

**Tabella 2.1:** Composizione degli scarti ittici (Ghaly et al., 2013).

<b>Nutrient</b>	<b>Fish waste</b>
Crude protein (%)	57.92 ± 5.26
Fat (%)	19.10 ± 6.06
Crude fiber (%)	1.19 ± 1.21
Ash (%)	21.79 ± 3.52
Calcium (%)	5.80 ± 1.35
Phosphorous (%)	2.04 ± 0.64
Potassium (%)	0.68 ± 0.11
Sodium (%)	0.61 ± 0.08
Magnesium (%)	0.17 ± 0.04
Iron (ppm)	100.00 ± 42.00
Zinc (ppm)	62.00 ± 12.00
Manganese (ppm)	6.00 ± 7.00
Copper (ppm)	1.00 ± 1.00

Values in % or mg/kg (ppm) on a dry matter basis.

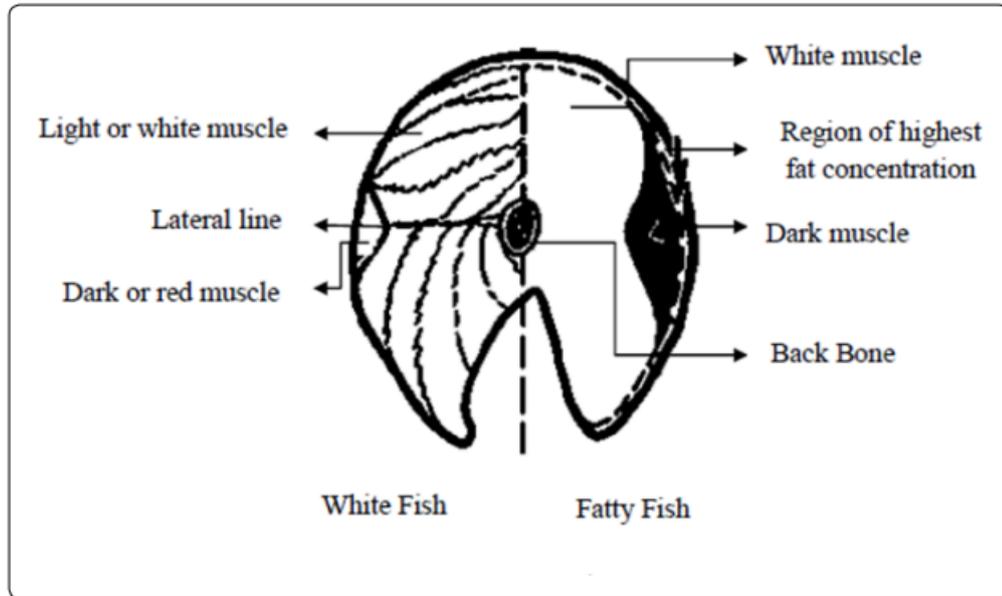
### 2.3.1 – Composti azotati

- **Proteine e amminoacidi**

Le proteine derivate dal pesce sono nutrizionalmente superiori rispetto a quelle di origine vegetale e hanno un migliore equilibrio degli aminoacidi essenziali nella dieta rispetto a tutte le altre fonti proteiche animali. Tuttavia, sono più sensibili al calore delle proteine muscolari dei mammiferi. Le proteine dei pesci di acqua fredda sono più suscettibili alla denaturazione al calore rispetto a quelle dei pesci d'acqua tropicale. I valori di T<sub>50</sub> (la temperatura richiesta per la denaturazione del 50% dei muscoli dei pesci) sono influenzati dal pH e ricadono nell'intervallo 29-35°C ad un pH di 7,0 e nell'intervallo 11-27°C ad un pH di 5,5. I muscoli dei pesci sono di due tipi: chiari e scuri. La quantità di muscolo scuro è bassa nei pesci bianchi; nel merluzzo, ad esempio, è presente una piccola striscia di muscolo scuro o rosso, appena sotto la pelle su entrambi i lati del corpo.

Nei pesci grassi, come aringhe e sgombri, la percentuale di muscoli scuri è alta e i muscoli contengono più vitamine e grassi come mostrato nella Figura 2.2 (Ghaly et al., 2013). Il muscolo chiaro è più abbondante e contiene circa il 18-23% di proteine. Circa il 70-80% dei muscoli dei pesci è costituito da proteine strutturali e il restante 20-30% è composto da proteine sarcoplasmatiche con circa il 2-3% di proteine del tessuto connettivo insolubili. Le

proteine miofibrillari sono le proteine alimentari primarie e costituiscono circa il 66-77% del contenuto proteico totale della carne di pesce. Le proteine del pesce contengono una composizione in amminoacidi ben bilanciata infatti sono costituite da circa 16-18 amminoacidi in base al tipo di specie e in base alle variazioni stagionali.



**Figura 2.2:** Tipologie di muscoli presenti nei pesci (Ghaly et al., 2013).

- ***Peptidi bioattivi***

I peptidi sono importanti prodotti naturali bioattivi presenti in molte specie marine. La scoperta dei ruoli biologici insieme al chiarimento dei meccanismi d'azione dei peptidi marini sostenerebbe l'uso dei peptidi come potenziali farmaci per il trattamento del cancro, del diabete o dell'ipertensione. L'ampio spettro di bioattività dei peptidi marini ha un alto potenziale nutraceutico e medicinale che attira l'attenzione dell'industria farmaceutica e nutraceutica, in quanto i peptidi possono essere utilizzati nel trattamento o nella prevenzione di varie malattie. I prodotti nutraceutici sono componenti di origine alimentare (presenti in natura o generati in vari modi) che, oltre al loro valore nutritivo esercitano un effetto fisiologico sul corpo. Di solito sono dichiarati per prevenire le malattie croniche, migliorare il sistema immunitario, gestire condizioni di stress, controllare il peso corporeo e regolare il livello di glucosio nel sangue. I peptidi bioattivi sono comunemente incorporati nei prodotti nutraceutici e si trasformano nella loro forma attiva dopo la digestione gastrointestinale. Successivamente vengono assorbiti attraverso l'intestino e trasportati dal sistema circolatorio per esercitare le loro diverse bioattività (Cheung, Ng & Whong, 2015). Esistono diversi modi per isolare tali peptidi da diverse fonti. Questi includono tecniche di estrazione con solvente, idrolisi acida,

alcalina ed enzimatica, ma anche processi di fermentazione. La rottura di proteine o polipeptidi avviene grazie all'idrolisi dei legami presenti nelle proteine con la formazione di piccoli peptidi costituiti da circa 2-20 aminoacidi. La resa dei peptidi, tuttavia, dipende dalla struttura proteica e dal ripiegamento dell'intera proteina, dal tipo di trattamento di scissione, dal grado di idrolisi, dalla specificità degli enzimi e da altre condizioni aggiuntive di idrolisi e fermentazione come concentrazione, temperatura e tempo. La scelta del solvente e delle loro proprietà influenza anche la quantità e la qualità dei piccoli peptidi isolati dagli organismi viventi. La bioattività specifica dei piccoli peptidi dipende in gran parte dalla sequenza e dalla composizione degli aminoacidi. In letteratura sono presenti molte ricerche in merito all'isolamento e caratterizzazione dei peptidi derivanti da scarti ittici, con lo scopo di andare a ricercare bioattività specifiche come antimicrobiche, antivirali, anticancerogene, antiossidanti, antipertensive, anticoagulanti, proprietà ansiolitiche, immunomodulanti e antidiabetiche (Behera et al., 2022).

- ***Enzimi***

Lo studio degli organismi acquatici ha portato alla scoperta di numerosi enzimi con proprietà catalitiche potenzialmente utili per diverse applicazioni biotecnologiche. Questi organismi che vivono in condizioni ambientali diverse e spesso ostili, incomparabili con gli habitat terrestri, hanno sviluppato enzimi con caratteristiche uniche, catturando l'interesse di molti ricercatori. Gli organi interni, inclusi stomaco, pancreas e intestino, sono i sottoprodotti dei pesci più importanti in termini di numero di enzimi trovati, molti dei quali sono attivi a freddo, presentano elevate attività catalitiche anche a concentrazioni relativamente basse e stabilità in un ampio range di pH. Le **proteasi** rappresentano il più grande gruppo di enzimi naturalmente presenti nei pesci. Questi enzimi catalizzano l'idrolisi dei legami peptidici, attraverso diversi meccanismi di azione. Sono indicati come esopeptidasi (o peptidasi), quando scindono l'amminoacido terminale della catena polipeptidica, e come endopeptidasi (o proteinasi), quando i legami peptidici che scindono sono interni. Le proteasi più ampiamente studiate disponibili nei pesci includono **pepsina, tripsina, chimotripsina e collagenasi**.

Le pepsine di pesce si trovano generalmente all'interno dello stomaco del pesce e hanno una maggiore attività in condizioni acide. Tuttavia, molte specie di pesci secernono almeno due pepsine diverse con pH ottimale diverso, comunemente denominate **pepsina I** e **pepsina II**. Gli enzimi disponibili nel pesce, estratti principalmente dalle viscere e dalla mucosa gastrica di diverse specie di pesci, come sardine, merluzzi, salmoni, squali, sgombri, tonni, trote e carpe, includono: la pepsina, la chimotripsina, la tripsina e le collagenasi.

La **pepsina** è un enzima proteolitico che si trova nello stomaco dei pesci che costituisce il 5% del peso del pesce. Viene utilizzato in vari processi di estrazione come l'estrazione della gelatina di collagene, e può essere utilizzato per digerire le proteine.

La **chimotripsina** è un'endoproteasi che idrolizza le proteine rompendo i legami peptidici centrali e producendo una miscela di peptidi e amminoacidi. La chimotripsina di pesce è costituita da due forme diverse: la **chimotripsina A** e la **chimotripsina B**. La chimotripsina di pesce ha una maggiore attività catalitica, una minore stabilità termica e differisce nella composizione amminoacidica dalla chimotripsina bovina (Ghaly et al., 2013).

La **tripsina** è un'importante proteasi pancreatica che viene sintetizzata come proenzima dalle cellule del pancreas e secreta nell'intestino. La tripsina di pesce è simile alla tripsina dei mammiferi per peso molecolare e composizione amminoacidica. La tripsina è coinvolta nell'idrolisi dei legami peptidici nelle estremità carbossiterminali dei residui di lisina e arginina e svolge un ruolo essenziale nella digestione delle proteine ingerite ed è anche responsabile della attivazione dei precursori di molte altre proteinasi digestive inclusa la chimotripsina. L'uso della tripsina di pesce sta aumentando enormemente, grazie alle caratteristiche uniche di questi enzimi, tra cui la stabilità e l'elevata attività catalitica in un'ampia gamma di valori di pH e temperatura (38-70°C; valore pH 8-11) (Coppola et al., 2021).

Le **collagenasi** sono enzimi in grado di idrolizzare la catena polipeptidica del collagene nativo, senza denaturare la proteina, e sono classificate come metallo-collagenasi e serina-collagenasi, con diversi ruoli fisiologici. Sono note, inoltre, per idrolizzare la tripla molecola di tropocollagene di tipo I, II e III. Mostrano attività simili alla tripsina e alla chimotripsina. Le collagenasi sono state isolate dai tessuti epiteliali, cartilaginei, ossei e dal tratto digerente di diversi pesci (Ghaly et al., 2013). Oltre alle proteasi, un'altra famiglia di enzimi ampiamente presenti nei pesci sono le **lipasi**. Questi enzimi catalizzano l'idrolisi dei legami esteri nei substrati, come trigliceridi, fosfolipidi, esteri del colesterolo ed esteri vitaminici. Le lipasi digestive sono state isolate e caratterizzate da diverse specie di pesci e sono contenute principalmente negli scarti del tratto gastro-intestinale (Coppola et al., 2021).

- ***Collagene e gelatina***

Gli scarti della pelle del pesce sono una buona fonte di collagene e gelatina, attualmente utilizzati nelle industrie alimentari, cosmetiche e biomediche. Il collagene e la gelatina sono

due forme diverse della stessa macromolecola in cui la gelatina è una forma parzialmente idrolizzata di collagene ottenuta tramite denaturazione termica. Il collagene e la gelatina estratti da fonti bovine sono più rischiose per via della malattia della mucca pazza o dell'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), mentre l'estrazione dalla pelle dei pesci elimina questo rischio. Infatti, la gelatina estratta tramite enzimi dalla pelle dei pesci ha migliori attività biologiche come quelle antiossidanti e antipertensive. La gelatina è formata da una sequenza ripetuta di glicina-prolina-alanina (Ghaly et al., 2013). Il collagene è un complesso proteico che costituisce il 20-30% delle proteine animali, ne esistono 28 tipologie e viene classificato in base alla struttura primaria e all'organizzazione molecolare. L'unità strutturale del collagene è il tropocollagene, una tripla alfa-elica formata dagli amminoacidi glicina-prolina-idrossiprolina. L'idrolisi parziale e la denaturazione termica del collagene portano alla produzione di gelatina. Generalmente per idrolisi acida e alcalina si ottengono due tipi di gelatina, di tipo A e B, rispettivamente. Durante la produzione di gelatina per idrolisi, i legami intermolecolari e intramolecolari delle fibre di collagene si rompono e le caratteristiche strutturali della gelatina dipendono dalla distribuzione del peso molecolare, dalla struttura e dalla composizione di ciascuna subunità. La composizione della gelatina è strettamente correlata al collagene di origine, tuttavia contiene molti residui di glicina, prolina ed idrossiprolina. Il collagene idrolizzato può essere ottenuto per azione enzimatica (alcalasi, papaina, pepsina e altri) in mezzi alcalini o acidi a temperatura di incubazione specifica, generalmente superiore a 40 °C. I peptidi ottenuti hanno un peso molecolare basso (0,3-8 KDa) e sono facilmente assorbibili dall'intestino e disponibili per i tessuti. La solubilità e attività biologica sono legate a parametri utilizzati per l'estrazione, come i tipi di enzimi utilizzati e il tipo di idrolisi. Le principali fonti di collagene commerciale sono la pelle di bovini e suini, le ossa di bovini e altri rifiuti animali di mammiferi. Il collagene è presente anche in animali marini come spugne, meduse, molluschi (cozze, calamari, seppie e polpi), echinodermi e pesci. Pertanto, i rifiuti di pesce potrebbero essere utilizzati per ottenere collagene più economico. Il collagene di pesce ha proprietà importanti, come ad esempio un più efficiente assorbimento nell'organismo (fino a 1,5 volte) e maggiore biodisponibilità rispetto al collagene suino e bovino.

Tuttavia, il collagene di pesce presenta svantaggi in termini di punto di fusione, resistenza meccanica, rigidità biomeccanica e alto tasso di degradazione. Inoltre, il problema principale relativo all'uso del collagene di pesce è lo sviluppo di un processo di estrazione sostenibile per il suo sfruttamento commerciale (Coppola et al., 2021). Il collagene è il biomateriale naturale più promettente utilizzato per costruire scaffold nell'ingegneria dei tessuti. Infatti, gli

scaffold svolgono un ruolo chiave nella promozione della rigenerazione cellulare, poiché sono coinvolti nei processi di adesione e differenziazione cellulare. Gli scaffold polimerici sintetici sono stati ampiamente utilizzati nella rigenerazione della cartilagine, tuttavia diverse limitazioni come la bassa biocompatibilità e l'alto tasso di reazioni immunitarie, riducono la loro ulteriore applicazione. Al contrario, gli scaffold naturali, tra cui collagene e gelatina, provenienti da un'ampia gamma di fonti marine possono possedere numerosi vantaggi, come la biosicurezza, una maggiore biocompatibilità e antigenicità debole. Inoltre, contengono residui di amminoacidi, che promuovono l'adesione e la differenziazione cellulare (Coppola et al., 2021). Il collagene è stato anche testato come componente di coating edibili per gli alimenti, spesso accoppiato al chitosano, in quanto riesce a preservare le qualità degli alimenti, agendo sulla crescita microbica (Liu et al., 2020).

### 2.3.2 – Chitina e Chitosano

La chitina è un lungo polisaccaride formato da monomeri di N-acetil- $\beta$ -D-glucosammina legati tra loro tramite legame  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). È il secondo polimero ad alto peso molecolare più abbondante in natura dopo la cellulosa, con cui condivide una struttura molto simile. Un prodotto derivato dalla chitina è il chitosano, ottenuto tramite deacetilazione della chitina. Sulla base della diversa disposizione delle catene nelle regioni cristalline, la chitina è stata classificata in tre forme,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ . Ciascuna di esse conferisce alla chitina proprietà specifiche, che potrebbero risentire anche dei diversi gradi di deacetilazione. Tutte queste combinazioni strutturali hanno portato a un'ampia gamma di possibili attività di interesse per diverse industrie biotecnologiche e di ingegneria dei tessuti. Per quanto riguarda la purificazione del prodotto, è difficile raggiungere un grado di purezza adatto a causa di alcuni composti che si trovano naturalmente all'interno della chitina, per i quali è difficile la completa eliminazione. Infatti, la chitina è spesso inclusa in una matrice complessa comprendente proteine e carbonato di calcio, con l'instaurazione di interazioni strette. Pertanto, la procedura comune impiegata per l'estrazione della chitina richiede la rimozione di questi componenti associati e segue due fasi chimiche: deproteinizzazione, per la rimozione delle proteine, e demineralizzazione, finalizzata alla rimozione della componente inorganica. In alcuni casi viene applicato un ulteriore passaggio di decolorazione/deodorizzazione per rimuovere i pigmenti. La procedura sperimentale di estrazione è una fase molto delicata e determinante per l'applicazione finale, poiché da essa dipendono i livelli di purezza e cristallinità. Finora la principale fonte di chitina e derivati erano i membri del phylum *Arthropoda*, inclusi crostacei e insetti, provvisti di un esoscheletro costituito prevalentemente da chitina. Recentemente, i rifiuti ittici hanno acquisito grande attenzione anche come potenziali fonti di

chitina e derivati, con particolare riguardo alle squame, ma l'uso di questo tipo di fonti è meno studiato (Coppola et al., 2021).

### 2.3.3 – *Composti lipidici*

- **Olio**

I sottoprodotti della lavorazione del pesce generalmente contengono olio e la sua quantità dipende generalmente dal contenuto di grasso delle specie ittiche specifiche. Generalmente, il pesce contiene il 2-30% di grassi. Quasi il 50% del peso corporeo generato come rifiuto durante la lavorazione del pesce sarebbe una grande potenziale fonte di olio di pesce di buona qualità che può essere utilizzato per il consumo umano o la produzione di biodiesel (Ghaly et al. 2013). La composizione dell'olio di pesce è abbastanza diversa dagli oli derivanti da altri animali o da quelli vegetali in quanto è composto principalmente da acidi grassi polinsaturi a lunga catena, in particolare EPA e DHA, che svolgono funzioni importanti per l'organismo. La sintesi da parte dell'organismo umano è molto bassa pertanto, l'approvvigionamento da fonti alimentari è essenziale. I pesci da cui si ottiene maggiormente olio sono: salmone, aringa, sgombro, acciughe e sardine. I pesci non sintetizzano autonomamente gli acidi grassi polinsaturi omega-3, ma li ottengono dalle alghe e microalghe di cui si nutrono (Coppola et al., 2021).

- **Vitamine A e Vitamina D:** In particolare vitamina D3, importante nella prevenzione di malattie come rachitismo infantile ed osteoporosi negli adulti (Valimaa et al., 2019).
- **Squalene:** Lo squalene è considerato un'importante molecola naturale, è un triterpene sintetizzato in piante, animali e batteri come precursore per la sintesi di metaboliti secondari come vitamine, steroli o ormoni. Inoltre, la migliore fonte di squalene è il fegato dello squalo di acque profonde. In media, dall'olio di fegato di squalo vengono solitamente estratti quasi 2300–8400 mg/100 g di squalene.

È stato riscontrato che lo squalene ha ampie applicazioni nell'industria alimentare e cosmetica, nonché nella prevenzione e nel trattamento delle malattie umane. Alcuni studi, infatti, riportano che lo squalene rinforza il sistema immunitario, ha effetti antitumorali contro il cancro alle ovaie, al seno, ai polmoni e al colon, riduce i danni alla pelle causati dai raggi UV, previene le malattie cardiovascolari, è un ottimo composto antiossidante, antibatterico e antimicotico. Migliora anche la

salute dell'apparato digerente grazie all'aumentata produzione di acidi biliari e aiuta nella normalizzazione della stitichezza e della diarrea. Inoltre, riduce al minimo gli effetti collaterali dei farmaci attraverso la sua azione disintossicante. Allo stesso tempo, lo squalene è anche consigliato da aggiungere alla dieta umana per le sue varie proprietà nutraceutiche (Ashraf et al., 2020).

#### 2.3.4 - Elementi minerali

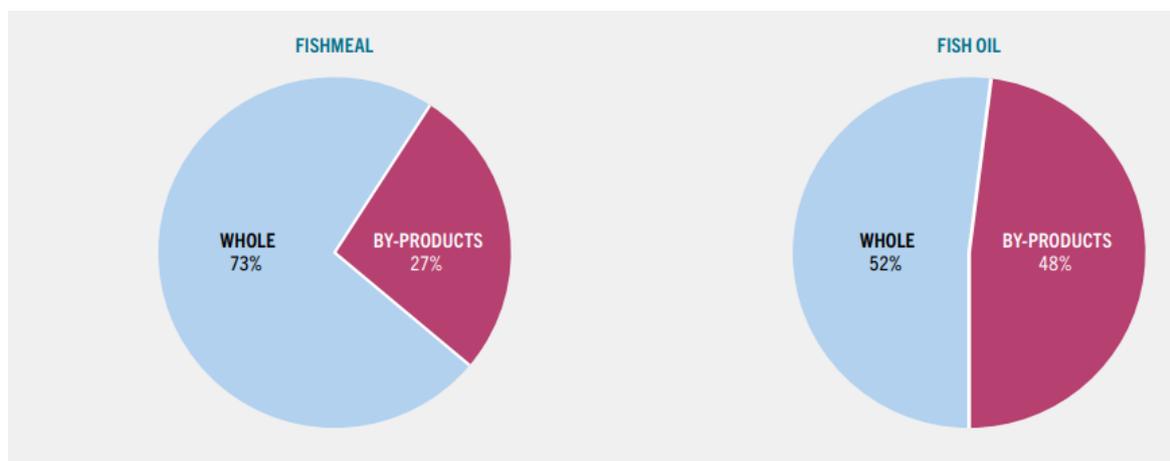
Le lisce dei pesci contengono il 60-70% di minerali, tra cui **calcio**, **fosforo** e **idrossiapatite**. Generalmente, il calcio è carente nella maggior parte delle diete regolari e per migliorare l'assunzione di calcio, il consumo di piccoli pesci interi può essere nutrizionalmente prezioso: le lisce ottenute dagli scarti di lavorazione possono essere utilizzate per fornire calcio. Affinché le ossa siano un alimento fortificato, dovrebbero essere convertite in forma commestibile ammorbidendo la loro struttura con trattamento con acqua calda, soluzioni calde di acido acetico o mediante cottura a vapore surriscaldato. Le lisce di pesce sono un'ottima fonte di idrossiapatite che può essere utilizzata come materiale da innesto osseo in applicazioni mediche e dentistiche in quanto non si rompe in condizioni fisiologiche, è termodinamicamente stabile a pH fisiologico e svolge un ruolo attivo nel legame osseo (Ghaly et al., 2013).

#### 2.4- Principali prodotti ottenuti dalla lavorazione ittica: farina e olio di pesce

Una parte significativa ma in diminuzione della produzione ittica mondiale viene trasformata in farina e olio di pesce. La farina di pesce è una farina ricca di proteine ottenuta dalla macinazione e dall'essiccazione di pesce o parti di pesce, mentre l'olio di pesce si ottiene pressando il pesce cotto e centrifugando il liquido estratto. Questi due ingredienti possono essere prodotti da pesce intero, ritagli di pesce o altri sottoprodotti della lavorazione del pesce. Un certo numero di specie diverse viene utilizzato come pesci interi: principalmente piccoli pesci pelagici, come l'acciuga peruviana (che rappresenta la proporzione maggiore), sardine, sgombri e aringhe. La produzione di farina e olio di pesce oscilla in base ai cambiamenti nelle catture di queste specie, in particolare l'acciuga, dominata dal fenomeno "El Niño", che influisce sull'abbondanza dell'animale. Secondo le stime della *Marine Ingredients Organization* (IFFO), nel 2020 circa l'86% della farina di pesce è stato utilizzato in acquacoltura, mentre il 9% è stato destinato all'allevamento di suini, il 4% ad altri usi (principalmente cibo per animali domestici) e l'1% al pollame. Nello stesso anno, circa il 73% dell'olio di pesce è stato destinato all'acquacoltura, il 16% al consumo umano e l'11% ad altri usi (inclusi *pet food* e biocarburanti). La crescente domanda di farina di pesce e olio di pesce ha portato ad un aumento dei

loro prezzi. Il fatto che l'offerta sia inferiore alla domanda e che il settore sia redditizio ha portato a pressioni per trovare prodotti alternativi. Sebbene la maggior parte del pesce intero utilizzato nella produzione di farina di pesce e olio di pesce provenga da risorse ben gestite, la sostenibilità di alcune attività di pesca resta fonte di grande preoccupazione in alcuni paesi in cui la produzione di farina di pesce è in aumento. È il caso di alcuni paesi dell'Africa occidentale, dove una quantità crescente di catture viene ridotta in farina di pesce a fini di esportazione, piuttosto che utilizzata per il consumo umano. In Senegal, ad esempio, il pesce intero utilizzato per decenni per il consumo umano diretto viene ora reindirizzato alla produzione di ingredienti marini. Ciò non solo aumenta la pressione sulle risorse ittiche, ma ha un impatto sulla sicurezza alimentare e sui mezzi di sussistenza. Una quota crescente di farina e olio di pesce viene prodotta utilizzando i sottoprodotti del pesce provenienti dalla cattura e dalla lavorazione dell'acquacoltura con un effetto positivo che impatta sulla riduzione dei rifiuti. Senza un aumento importante della materia prima che dovrebbe provenire da pesci interi selvatici (in particolare, piccoli pelagici), qualsiasi aumento della produzione di farina di pesce dovrà provenire da sottoprodotti del pesce e altre fonti come il krill. La farina di pesce da sottoprodotti ha un valore nutritivo diverso, essendo più povera di proteine ma più ricca di minerali rispetto alla farina di pesce ottenuta da pesce intero. È stimato che nel 2020 il 27% della produzione globale di farina di pesce e il 48% della produzione totale di olio di pesce sono stati ottenuti da sottoprodotti (FAO, 2022). Tuttavia, la farina e l'olio di pesce sono ancora considerati gli ingredienti più nutrienti e digeribili per il pesce d'allevamento, nonché la principale fonte di acidi grassi omega-3 nelle diete animali. La farina e l'olio di pesce sono sempre più utilizzati in modo selettivo in fasi specifiche della produzione, come per l'incubazione, per i riproduttori e per le diete di finissaggio, e la loro incorporazione nelle diete di accrescimento (*grower diets*) sta diminuendo. Per quanto riguarda il consumo umano diretto, l'olio di pesce è una delle principali fonti naturali degli acidi grassi polinsaturi a catena lunga omega-3, i quali svolgono un'ampia gamma di funzioni essenziali per la salute umana. A causa delle fluttuazioni nella produzione di farina e olio di pesce e delle relative variazioni di prezzo, molti ricercatori stanno cercando fonti alternative di acidi grassi polinsaturi (PUFA). Queste fonti alternative includono lo zooplancton marino, come il krill antartico (*Euphausia superba*) e il copepode (*Calanus finmarchicus*). L'olio di krill in particolare è commercializzato come integratore alimentare per l'uomo, mentre la farina di krill sta trovando una nicchia nella produzione di alcuni mangimi acquatici. Tuttavia, la lavorazione comporta sfide pratiche quali il contenuto di fluoro della materia prima, che deve essere ridotto, e l'alto costo dei prodotti a base di zooplancton. L'insilato di pesce, un idrolizzato proteico ricco che contiene elevate quantità di amminoacidi essenziali, è un'alternativa meno costosa alla farina e all'olio di pesce ed è sempre più utilizzato come additivo per mangimi, ad esempio, nell'acquacoltura e nell'industria del cibo per animali domestici. Utilizzando

un prodotto come questo, il pesce e parti del pesce non utilizzati per l'alimentazione umana, potrebbero essere facilmente conservati e trasformati in un prezioso ingrediente per il mangime per l'acquacoltura.



**Figura 2.3-** Quantità di materia prima utilizzata per la produzione di farina e olio di pesce (FAO, 2022).

## CAPITOLO 3

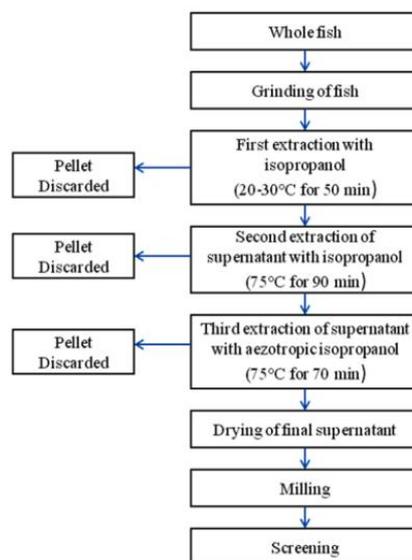
### METODI DI ESTRAZIONE E UTILIZZI DEI COMPOSTI BIOATTIVI

#### 3.1 – Produzione di idrolizzati proteici

Gli idrolizzati proteici sono prodotti contenenti una miscela di amminoacidi e peptidi solubili ottenuti generalmente per idrolisi chimica, enzimatica o mista di proteine di origine animale o vegetale; presentano naturalmente caratteristiche chimiche diverse a seconda dell'origine della materia prima e del processo di produzione. Possono avere molte applicazioni nell'ambito alimentare ma non solo. L'estrazione con solvente è la tecnica più usata per l'estrazione di proteine dagli scarti di pesce. Nel lavoro di Ghaly et al., (2013) sono riportati vari protocolli di estrazione mediante l'uso di solventi organici. A titolo di esempio, ne viene riportato uno:

1. Gli scarti di pesce vengono macinati e poi sottoposti a tre estrazioni con solvente come segue:
  - a. La prima estrazione viene effettuata a 20-30°C per 50 minuti con isopropanolo;
  - b. La seconda estrazione è eseguita sul surnatante ottenuto dalla prima estrazione, a 75°C per 90 minuti, con l'utilizzo di isopropanolo;
  - c. La terza estrazione è eseguita sul surnatante derivante dalla seconda estrazione a 75°C per 70 minuti, con isopropanolo azeotropico.
2. Il surnatante finale è raccolto, essiccato, tritato ed infine le particelle di ossa residue vengono eliminate.

Questo metodo presenta tuttavia alcuni svantaggi: scarsa funzionalità, alti costi di produzione, off-flavour e tracce di solvente nel prodotto finale.



**Figura 3.1-** Estrazione di proteine tramite solventi (Ghaly et al., 2013).

Oltre all'estrazione con solvente una tecnica utilizzata per estrarre proteine dagli scarti di pesce è l'estrazione enzimatica. Il trattamento enzimatico di vari biopolimeri negli alimenti (quali polisaccaridi, proteine e pectine) è un processo importante che consente di migliorare le proprietà fisiche, chimiche e organolettiche dell'alimento originario in relazione al valore nutritivo e alle caratteristiche di assorbimento intestinale. L'estrazione enzimatica delle proteine viene eseguita in condizioni di pH controllato senza degradarne le qualità nutrizionali per l'accettazione nell'industria alimentare e può essere ottenuta un'ampia gamma di prodotti per un'ampia gamma di applicazioni. Sebbene la lavorazione enzimatica sia stata ampiamente applicata a vari prodotti (es. carne di pollame e latte), ci sono pochi studi sulla produzione di idrolizzato proteico di pesce utilizzando enzimi. La maggior parte degli studi di ricerca condotti sul trattamento enzimatico delle proteine del pesce sembrano essere orientati al laboratorio o su piccola scala e hanno i loro limiti quando vengono trasferiti su scala industriale. Tuttavia, la produzione su larga scala di idrolizzati proteici di pesce viene effettuata in vari paesi, tra cui Francia, Giappone e altri paesi del sud-est asiatico. Il processo presenta diversi svantaggi, tra cui basse rese, alto costo iniziale degli enzimi, inattivazione degli enzimi dopo l'idrolisi sia per calore che per pH e l'impossibilità di riutilizzo degli enzimi. Gli enzimi utilizzati nell'industria alimentare per la preparazione dell'idrolizzato proteico di pesce sono principalmente **carboidrasi**, **proteasi** e **lipasi**. Le proteasi sono uno degli enzimi più utilizzati nell'industria alimentare. Sono derivate da fonti animali, vegetali e microbiche. Gli enzimi estratti da fonti vegetali includono **papaina**, **bromelina** e **cheratinasi**. Gli enzimi estratti da fonti animali includono **tripsina**, **chimo tripsina**, **pepsina** e **renina**.

A causa dell'incapacità delle proteasi vegetali e animali di soddisfare l'attuale domanda di mercato, vi è un aumento della domanda di proteasi microbiche. Le proteasi batteriche sono spesso utilizzate nella produzione di idrolizzato proteico. Lavorano prevalentemente a pH neutri o alcalini e sono prodotte dal genere *Bacillus*. Le proteasi neutre sono attive nell'intervallo di pH 5-8 e hanno una bassa tolleranza alla temperatura mentre le proteasi alcaline sono attive nell'intervallo di pH 7-10 e hanno un'ampia specificità. Anche in questo caso, il lavoro di Ghaly et al. (2013) cita vari metodi di estrazione tramite diversi enzimi ma il migliore sembra essere un'alcalasi sviluppata da Novo Nordisk per i prodotti detergenti. L'utilizzo di questo enzima fornisce un idrolizzato proteico con le migliori proprietà funzionali, alto contenuto proteico e una composizione amminoacidica comparabile con quella del muscolo del pesce. Le proteine del pesce contengono molti peptidi bioattivi che vengono facilmente assorbiti e possono essere utilizzati per varie attività metaboliche. Possono essere utilizzati come ingrediente funzionale in molti prodotti alimentari in quanto hanno proprietà come capacità di ritenzione idrica, assorbimento di olio, attività gelificante, capacità schiumogena e proprietà emulsionante. Vari prodotti nutraceutici sono già presenti sul mercato come, ad esempio, Seacure® e Amizate®. Inoltre, l'idrolizzato proteico di pesce può essere utilizzato come sostituto del latte in quanto ha un *protein efficiency ratio elevato (PER)* ed è conveniente rispetto al latte scremato in polvere. Grazie alla sua ricca composizione in amminoacidi, le proteine del pesce possono essere utilizzate come integratori nei prodotti da forno, nelle zuppe e negli alimenti per lattanti per aumentarne il contenuto proteico. Possono essere anche usate come fonte di azoto per la crescita di microrganismi per la produzione di lipasi extracellulari.

### 3.1.2 – Estrazione di amminoacidi

Gli amminoacidi possono essere estratti dalle proteine in vari modi: per via chimica (idrolisi acida o alcalina), biologica (enzimi) o anche tramite microonde. Lo scopo dell'idrolisi delle proteine è quello di liberare e recuperare gli amminoacidi senza alterare le loro proprietà. Vari fattori possono influenzare l'idrolisi delle proteine andando anche a influenzare la resa di amminoacidi: temperatura, tempo, metodo di idrolisi ed eventuali additivi aggiunti. L'idrolisi acida è il processo più comunemente usato per l'idrolisi delle proteine anche se è difficile da controllare. Viene normalmente effettuata utilizzando acido cloridrico e in alcuni casi acido solforico. Gli agenti utilizzati nell'idrolisi acida delle proteine sono mostrati nella Tabella 3.1. L'idrolisi acida convenzionale delle proteine di pesce viene effettuata utilizzando HCl 6 M per 20-24 h a 110°C sottovuoto. In queste condizioni, l'asparagina e la glutammina sono completamente idrolizzate rispettivamente ad acido aspartico e acido glutammico.

Il triptofano però viene completamente distrutto e la cisteina non può essere determinata direttamente dai campioni idrolizzati con acido. Tirosina, serina e treonina sono parzialmente idrolizzate. Di solito c'è una perdita del 5-10% nel recupero usando l'idrolisi acida. Il metodo convenzionale è stato successivamente modificato aggiungendo acido acetico al 50% per ridurre il tempo di idrolisi.

**Tabella 3.1-** Composti usati per l'idrolisi acida (Ghaly et al., 2013).

Hydrolysis agent	Hydrolysis Conditions	Additives	Specific Determination
6 M HCl	110°C, 24 h	0.02% Phenol	All residues except of Cys, Trp
6 M HCl or 4 M MSA	110°C, 24 h	0.2% Sodium azide	Cys
6 M HCl	110°C, 18 h	5% Thioglycolic acid, 0.1% phenol, 3,3'-dithiodipropionic acid	Cys
6 M HCl		3-Bromopropylamine	Cys
6 M HCl	145°C, 4 h	Samples previously oxidized with performic acid	Cys, Met, Lys
4 M MSA		3-(2-aminoethyl)indole	Trp, Methionine sulfoxide
4 M MSA	115°C, 22 h	Samples previously alkylated, tryptamine	All residues
4 M MSA	160°C, 45 min		All residues
4 M MSA or 5.7 M HCl	150°C, 90 min	Oxidation with performic acid 50°C, 10 min	All residues
3 M <i>p</i> -Toluenesulfonic acid			Methionine sulfoxide
12 M HCl-propionic acid (1:1)	150°C, 90 min		Resin-bound peptides
12 M HCl-propionic acid (1:1)	840 W, 1-7 min microwave		Resin-bound peptides
<i>p</i> -Toluenesulfonic acid	15 min, microwave		
DCI	medium power, 30 min microwave		Sensitive residues
2.5 M Mercaptoethanesulfonic acid	176°C, 12.5 min	S-Pyridylethylated samples	Cys, Trp
6 M HCl-TFA (6:3)	120°C, 16 h	Dithiodiglycolic acid, 1% phenol	Cys
HCl		Thioglycolic acid	Trp
HCl	110°C, 24 h	0.4% $\beta$ - Mercaptoethanol	Trp
HCl	166°C, 25 min or 145°C, 4 h	3% Phenol	Trp
HCl	145°C, 4 h	Tryptamine	Trp
6 M HCl	145°C, 4 h gas phase	Tryptamine[3-(2-aminoethyl)]indole	Trp
TFA-HCl (1:2)	166°C, 25-50 min	5% Thioglycolic acid	Trp, Met
7 M HCl, 10% TFA		10% Thioglycolic acid, indole	Trp

Durante l'idrolisi convenzionale i recuperi di amminoacidi sono molto bassi e, quindi, in presenza di acido organico è possibile raggiungere le regioni idrofobiche delle proteine. Il lavoro di Tsugita e Scheffler (1982) mostra come l'utilizzo di HCl accoppiato con alcuni acidi organici su dipeptidi formati da valina e isoleucina garantiscono una percentuale di recupero molto alta, in alcuni casi del 100%.

**Tabella 3.2** – Recupero di amminoacidi dal peptide Val-Glu (Tsugita & Scheffler, 1982).

Acid Mixture	Composition (v/v)	Recovery (%)
Formic acid: HCl	1:1	85
	1:2	95
Acetic acid: HCl	1:1	97
	1:2	100
	2:1	85
Trifluoroacetic acid: HCl	1:1	100
	1:2	100
	1:1	90
Propionic acid: HCl	1:1	90
	1:2	97

Oltre alla resa di recupero, la durata incide anche sul grado di racemizzazione dell'idrolizzato. Quando si utilizza l'idrolisi proteica convenzionale, la racemizzazione è 1,2-1,6 volte superiore rispetto all'idrolisi effettuata a temperature elevate di 160-180°C. A temperature più elevate, le proteine

vengono idrolizzate rapidamente in amminoacidi liberi e la loro racemizzazione è sempre più lenta di quella degli amminoacidi legati ancora ai polipeptidi. Durante l'idrolisi acida convenzionale le proteine vengono idrolizzate a una velocità molto più lenta e gli amminoacidi legati sono stati esposti al calore per un tempo più lungo causando racemizzazione. Per ridurre le perdite dovute all'idrolisi acida vengono aggiunti al campione alcuni agenti protettivi come fenolo, acido tioglicolico, mercaptoetanolo, indolo o triptamina. Questi agenti fanno in modo che determinati amminoacidi non vengono degradati e persi durante l'estrazione.

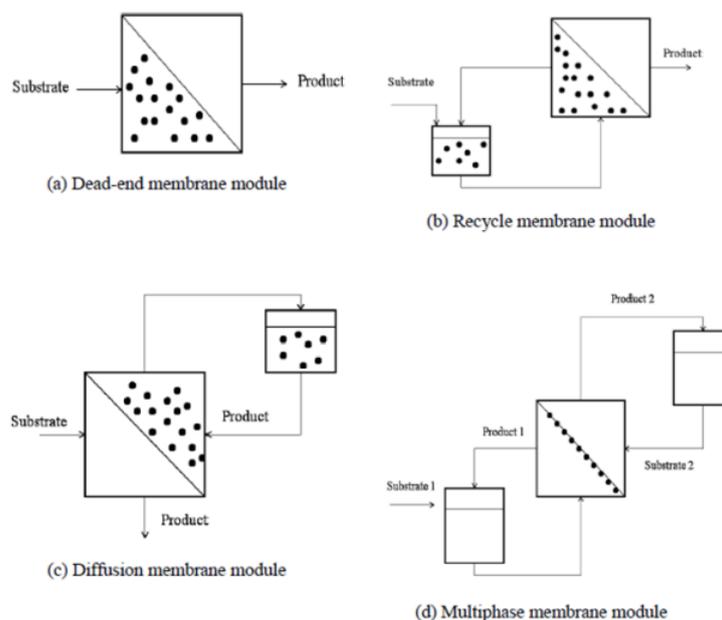
L'idrolisi delle proteine può essere effettuata anche con composti basici come l'idrossido di sodio, idrossido di potassio o idrossido di bario. Il trattamento alcalino è specificamente utilizzato per la determinazione del triptofano. Si applica anche ai campioni che hanno una percentuale maggiore di carboidrati come nel caso degli alimenti e della formulazione di soluzioni farmaceutiche che hanno una percentuale maggiore di monosaccaridi. Il principale svantaggio di questo metodo è che alcuni amminoacidi (serina, treonina, arginina e cisteina) vengono distrutti e tutti gli altri aminoacidi vengono racemizzati. Durante l'idrolisi basica avvengono anche altre reazioni indesiderate. Queste reazioni sono avviate dall'estrazione di idrogeno dal carbonio  $\alpha$  di un amminoacido che causa la racemizzazione degli L-amminoacidi per produrre D-amminoacidi, non assorbiti dall'uomo. Inoltre, l'idrolisi alcalina scinde anche i legami disolfuro con perdita di cisteina, serina e treonina e formazioni di composti quali lisinoalanina, oritinoalanina, lantionina e  $\beta$ -aminoalanina. Queste reazioni possono anche portare alla produzione di sostanze tossiche come la lisinoalanina e sono indesiderabili negli alimenti. L'idrolisi enzimatica delle proteine del pesce con enzimi appropriati come alcalasi, pronasi, collagenasi, pepsina, papaina, bromelina, chimotripsina e tripsina consente la preparazione di peptidi bioattivi costituiti da una lunghezza specifica di amminoacidi. Il principale vantaggio dell'idrolisi enzimatica delle proteine è che permette la quantificazione dell'asparagina e della glutammina e di altri residui sensibili, che normalmente vengono distrutti dall'idrolisi acida e alcalina, e non provoca racemizzazione durante la digestione.

Nel lavoro di Cheftel et al. (1971) sono stati usati vari enzimi (pronasi, pepsina, bromeina, ficina) per ottenere la completa solubilizzazione delle proteine. I risultati hanno indicato che la quantità di proteine idrolizzate dipendeva dal tipo di enzima utilizzato e dal tempo di idrolisi. I risultati hanno indicato che l'enzima pronasi è stato in grado di idrolizzare il 94% delle proteine in 23h.

Bhumiratana et al. (1977) hanno studiato la solubilizzazione enzimatica delle proteine del pesce in reattori a membrana in modalità batch, semi-batch e continua utilizzando una temperatura di tripsina di 50°C e un pH di 9,0. Per una completa idrolisi della proteina, è necessaria una combinazione di diverse proteasi con un tempo di incubazione più lungo. Pertanto, questo metodo non viene applicato per l'analisi seriale anche perché, a causa della presenza di numerosi legami peptidici e della loro

specificità accessibilità alla reazione enzimatica, l'idrolisi enzimatica è un processo complesso. La specificità degli enzimi non è l'unico fattore che influenza l'idrolisi, ma anche alcuni fattori ambientali come la temperatura e il pH svolgono un ruolo importante nell'idrolisi delle proteine. Tuttavia, l'applicazione diffusa di questo tipo di idrolisi è ostacolata dalla specificità relativa delle proteasi per alcuni residui.

Per superare gli inconvenienti dell'idrolisi enzimatica delle proteine, i reattori a membrana enzimatica (*enzymatic membrane reactor*) possono essere utilizzati per produrre aminoacidi. La configurazione per i reattori a membrana utilizzati per la produzione di aminoacidi include: una membrana senza uscita, reattori a membrana di riciclo, membrana di diffusione e membrana multifase. In un reattore senza uscita, la soluzione contenente enzimi viene spinta verso la membrana, il prodotto si ottiene dall'altro lato e gli enzimi vengono trattenuti (Fig. 3.2a). In un reattore a membrana di riciclo, il substrato contenente enzimi viene continuamente riciclato da e verso il reattore attraverso la membrana di filtrazione (Fig. 3.2b). Il reattore a membrana di diffusione consente la diffusione passiva delle molecole di substrato attraverso la membrana al compartimento adiacente contenente enzimi (Fig. 3.2c). Questi reattori vengono utilizzati solo per substrati a basso peso molecolare (poiché il substrato viene ridistribuito dopo la catalisi). I reattori multifase sono in grado di creare un contatto interfacciale tra l'enzima e il substrato sulla matrice della membrana attraverso la diffusione (Figura 3.2d). In questo tipo di reattore la membrana funge da supporto tra due fasi liquide e in alcuni casi può essere applicata una pressione positiva per evitare che le fasi si mescolino.



**Figura 3.2** – Tipologie di reattori a membrana enzimatica, (Ghaly et al., 2013).

Nell'idrolisi delle proteine indotta da microonde, il substrato può essere idrolizzato sia allo stato liquido che gassoso con HCl o altri reagenti. In questo metodo, l'assorbimento istantaneo dell'energia della radiazione comporta la riduzione del tempo complessivo di idrolisi da molte ore a pochi minuti, 1-30 min per l'idrolisi in fase liquida e 20-45 min per l'idrolisi in fase gassosa. Non ci sono rapporti in letteratura sull'uso di questo metodo con le proteine del pesce. Tuttavia, questo metodo è stato utilizzato con sieroalbumina bovina, caseina, gelatina e ha il potenziale per l'applicazione nell'idrolisi delle proteine del pesce.

Gli amminoacidi sono i costituenti delle proteine e hanno un ampio valore nutritivo, azione aromatizzante, azione medicinale e proprietà chimiche. Sono usati come additivi alimentari, in applicazioni farmaceutiche, mangimi e integratori alimentari. Gli amminoacidi come arginina, glicina, glutammato e istidina sono utilizzati dall'industria farmaceutica come eccipiente per lo sviluppo di farmaci. Il maggior utilizzatore di aminoacidi è l'industria degli aromi alimentari che utilizza glutammato monosodico, alanina, aspartato e arginina per migliorare il sapore degli alimenti. Il secondo maggior utilizzatore di aminoacidi è l'industria dei mangimi che utilizza lisina, metionina, treonina, triptofano e altri per migliorare la qualità nutrizionale dei mangimi. Gli amminoacidi possono anche essere utilizzati in varie applicazioni farmaceutiche come la purificazione e le formulazioni delle proteine e la produzione di antibiotici come la *Jadomycin* (Ghaly et al., 2013).

### 3.1.3 – Estrazione di peptidi

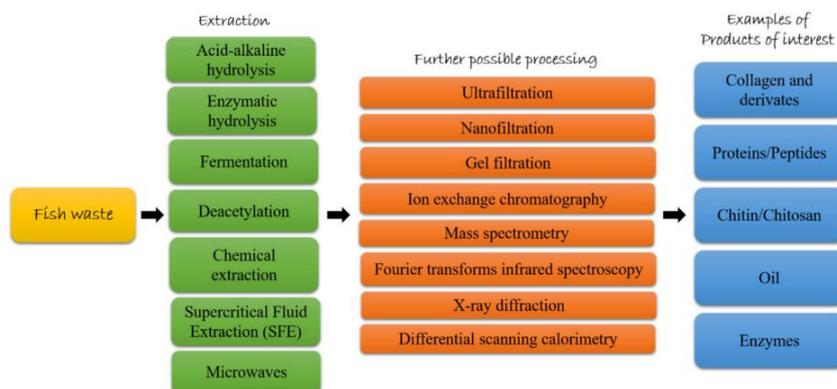
Gli organismi marini potrebbero essere un'eccellente fonte di peptidi e proteine bioattivi, che possono essere estratti sia da corpi interi che da specifici scarti come squame, ossa, testa, gonadi e viscere. Esistono varie metodologie di estrazione, le più usate sono: estrazione chimica (acida o alcalina), estrazione enzimatica o tramite fermentazione. La via enzimatica è la migliore per quanto riguarda l'industria alimentare e farmaceutica in quanto il prodotto finale non presenta residui di solventi. Dopo l'estrazione seguono le fasi di purificazione del prodotto, che può essere fatta in vari modi: filtrazioni (ultrafiltrazione, nanofiltrazione, filtrazione su gel) per separare i peptidi in base al peso molecolare, cromatografia a scambio ionico per separarli in base alla carica netta oppure tramite HPLC a fase inversa per separarli in base alla sola idrosolubilità e idrofobicità. I peptidi sono stati testati per innumerevoli attività, anche per la prevenzione e trattamento di alcune patologie. È stato constatato che la composizione amminoacidica del peptide e la sua idrofobicità influenza la sua bioattività. Le attività che sono state maggiormente testate sono: attività antimicrobica, antipertensiva, antiossidante e neuroprotettiva. Il lavoro di Coppola et al. (2021) cita molti studi in cui si evince che i peptidi derivanti da idrolizzati di pesce hanno attività antimicrobica verso molti

microrganismi, sia Gram+ che Gram-. Per quanto riguarda l'attività antiossidante e antipertensiva, un aspetto importante è la grandezza del peptide: peptidi a basso peso molecolare (circa < 3kDa) hanno un maggiore effetto antipertensivo mentre i peptidi a maggior peso molecolare (> 5kDa circa) una maggiore attività antiossidante. Un'altra attività interessante di alcuni peptidi è quella antidiabetica, in quanto alcuni peptidi sono in grado di aumentare la tolleranza al glucosio e quindi ridurre casi di iperglicemia.

### **3.2- Applicazioni industriali degli enzimi estratti dai pesci**

Gli organismi marini, compresi i pesci, sono un'ottima fonte di enzimi e potrebbero contribuire al numero totale di enzimi disponibili sul mercato mondiale. Le proteasi sono uno dei gruppi di enzimi industriali più interessanti, ampiamente utilizzati per diverse applicazioni, soprattutto nell'industria alimentare e come componenti di detergenti; circa il 60% del mercato totale degli enzimi riguarda l'uso di proteasi. I potenziali vantaggi dell'utilizzo degli enzimi includono lo sviluppo di processi industriali come alternative ai trattamenti meccanici o chimici che spesso causano danni al prodotto e ne riducono il recupero, garantendo un migliore controllo del processo e bassi fabbisogni energetici e costi. Inoltre, gli enzimi dai pesci, essendo estratti da animali commestibili, hanno il vantaggio in più di essere sicuri, per cui non sono necessari test tossicologici sulle materie prime. Le proteinasi dei pesci generalmente hanno un'elevata attività in un ampio intervallo di valori di pH e temperatura, il che le rende adatte a diverse applicazioni industriali, come nell'industria dei detersivi, alimentare, farmaceutica e agrochimica. In particolare, molti di questi enzimi sono stati isolati da pesci d'acqua fredda, quindi inattivati a temperature relativamente basse, il che è potenzialmente utile nelle applicazioni alimentari dove è desiderabile inattivare l'enzima con un trattamento termico blando. Ad esempio, la tripsina e la fosfatasi alcalina purificate da pesci d'acqua fredda hanno mostrato valori ottimali di temperatura di circa 30°C inferiore agli omologhi di pesci d'acqua calda o mammiferi. Un esempio di applicazione delle proteinasi è quello di Svenning et al. (1993) che ha dimostrato che la pepsina di merluzzo potrebbe essere utilizzata nella squamatura di pesci come nasello ed eglefino. La pepsina grezza del merluzzo bianco viene spesso utilizzata per la disincrostazione industriale. Le proteasi gastriche dei pesci sono attivate dal sale, poiché questi animali assorbono l'acqua salata durante l'alimentazione. Ciò rappresenta una caratteristica vantaggiosa in diverse applicazioni, come fermentazioni, insilati e salse di pesce, dove vengono utilizzate quantità significative di sale. Tra gli enzimi, la pepsina gioca un ruolo importante nella preparazione degli insilati. Ad esempio, le pepsine isolate dai visceri di merluzzo sono state utilizzate efficacemente per la produzione dell'insilato di visceri di merluzzo in condizioni acide. Le proteasi di pesce potrebbero essere utilizzate anche per la

rimozione della pelle dai pesci, come metodo alternativo ai trattamenti meccanici o chimici, che spesso comportano danni o riduzione del prodotto recuperato. È stato dimostrato che l'idrolisi delle proteine utilizzate nelle industrie alimentari potrebbe aumentare le rese nei processi di recupero, migliorare le proprietà funzionali o migliorare la metodologia di processo. In generale, nelle condizioni che caratterizzano i processi catalizzati da enzimi, il valore nutritivo di una proteina si conserva meglio rispetto alla tradizionale idrolisi acida o alcalina. Inoltre, l'autolisi tramite enzimi digestivi del pesce stesso è un metodo industriale semplice ed economico per preparare il concentrato proteico di pesce senza costi enzimatici coinvolti per il processo. La salsa di pesce preparata per autolisi del pesce è un condimento popolare grazie al suo sapore e gusto caratteristici. L'idrolisi enzimatica delle proteine alimentari offre un metodo rapido e riproducibile per la produzione di un gran numero di peptidi bioattivi dei pesci. Rispetto alle proteasi microbiche generalmente applicate, le proteasi endogene di pesce hanno specificità relativamente strette e uniche per questo state utilizzate anche per la preparazione di idrolizzati di pesce con diverse bioattività. Inoltre, il collagene marino è stato estratto da pinne, squame, pelli, ossa, testa e vesciche natatorie di carpe utilizzando collagenasi, pepsina di tonno o tripsina di merluzzo. Per quanto riguarda le lipasi, è stato riportato che le lipasi isolate dall'intestino del merluzzo bianco idrolizzano principalmente i PUFA rispetto agli acidi grassi a catena corta (Lie & Lambertsen, 1985). Grazie alla loro elevata affinità per gli acidi grassi a catena lunga e specificità per particolari acidi grassi, gli enzimi lipolitici dei pesci possono essere utilizzati nella sintesi di lipidi strutturati (Diaz-Lopez & Garcia-Carreno, 2000). Le lipasi digestive dei pesci potrebbero essere utilizzate anche per reazioni di interesterificazione dei lipidi, come la transesterificazione, con prodotti indesiderabili minimi o nulli, che generalmente rappresentano un problema nelle trasformazioni chimiche. Inoltre, l'uso di queste lipasi potrebbe essere utile per esteri speciali per prodotti per la cura personale e tensioattivi ecologici per applicazioni in detersivi o come emulsionanti alimentari (Kurtovic et al., 2009).



**Figura 3.3** – Schema riassuntivo dei principali metodi di estrazione e ulteriore lavorazione per ottenere prodotti ad alto valore aggiunto (Coppola et al., 2021).

### 3.3- Produzione di olio

L'olio di pesce può essere estratto dagli scarti e sottoprodotti tramite via chimica o enzimatica. I metodi chimici sono vari: Goldfisch, Folch, Bligh and Dyer e digestione acida.

- **Goldfisch:** il campione viene pre-essiccato e successivamente trattato con solventi quali esano o etere di petrolio per varie ore. Infine, il solvente viene fatto evaporare e si calcola la quantità di olio estratta.
- **Folch:** questo metodo prevede l'uso di una miscela cloroformio/metanolo in rapporto 2:1. Dopodiché tutta la miscela (contenente anche il campione) viene filtrata e lavata più volte usando sempre cloroformio/metanolo 2:1. Con l'aggiunta dell'acqua successivamente, si formano due fasi, quella inferiore, contenente l'olio, viene estratta e fatta evaporare per eliminare tutti i solventi. Infine, la quantità di olio è determinata gravimetricamente.
- **Bligh and Dyer:** il metodo è identico al Folch, ma con la differenza che, in questo metodo, la proporzione campione/solvente è minore. Infatti, nel metodo Folch è 1:20, nel Bligh and Dyer 1:3. Rispetto all'estrazione con etere di petrolio, con questo metodo l'estrazione di lipidi polari e non polari è maggiore e l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi è minore, come riportato nel lavoro di Ozogul et al., (2012).
- **Digestione acida:** in questo metodo, il campione viene riscaldato ad una temperatura di 80-110°C insieme ad una quantità di acido cloridrico. Successivamente viene aggiunta una miscela cloroformio/metanolo 1:1 oppure etere di petrolio. Infine, il solvente è fatto evaporare e il contenuto lipidico calcolato (Ghaly et al., 2013).

Per quanto riguarda il metodo enzimatico, questo prevede l'uso di vari enzimi commerciali quali **alcalasi, neutrase, protex, protamex, bromelina**. I campioni vengono prima trattati ad alta temperatura per inattivare gli enzimi endogeni, dopodiché vengono aggiunti gli enzimi selezionati e infine vi è un nuovo trattamento termico per inattivare anche quest'ultimi enzimi. Successivamente tutto il composto viene centrifugato per raccogliere la parte oleosa. Come descritto da Dauskas et al. (2005), uno dei problemi di questo metodo estrattivo è che alla fine dell'idrolisi l'olio si può trovare anche sotto forma di emulsione, una forma non desiderabile a seguito dell'aggiunta di acqua durante il processo, in quanto diminuisce la quantità di olio libero prodotto, causando una perdita di olio anche del 10%. Un altro problema è la formazione dello *sludge*. Questo è dovuto al fatto che, durante

l'inattivazione termica degli enzimi endogeni, le proteine si denaturano e precipitano, ma una piccola parte rimane in soluzione formando un complesso lipidico-proteico che porterà alla riduzione di olio libero. Le principali applicazioni dei composti lipidici sono come mangimi/integratori alimentari e produzione di biocarburanti. Gli acidi grassi omega-3 sono ben noti per avere attività benefiche, tra cui prevenzione dell'aterosclerosi, aritmie, riduzione della pressione sanguigna, riduzione delle malattie cardiovascolari e miglioramento della capacità di apprendimento. La ricerca medica ha fornito prove evidenti per indicare che una dieta ricca di pesce e omega-3 marini è collegata a un ridotto rischio di declino cognitivo e di malattia di Alzheimer e alcuni studi clinici suggeriscono che l'integrazione di n-3 PUFA estratti dal pesce migliorano il funzionamento delle capacità cognitive negli anziani con decadimento cognitivo da lieve a nullo. Considerando i benefici riconosciuti di EPA e DHA sulla salute umana, sono state studiate modalità alternative per fornire omega-3 ai consumatori. Uno degli approcci è quello di arricchire la carne di pollo con acidi grassi omega-3 derivanti da fonti marine sostenibili. Interessante è il lavoro di Muhammed et al. (2015), in cui hanno aggiunto alla dieta dei polli da carne diverse concentrazioni di olio di pesce ottenuto per fermentazione e ciò ha comportato l'incorporazione di EPA + DHA nell'animale, osservando una conseguente riduzione del colesterolo (variabile dal 9,2 al 16,6% rispetto a controllo) e di trigliceridi (da 1,5 a 3,1% rispetto al controllo) nel siero, nel fegato e nella carne. Diversi studi hanno anche dimostrato il potenziale dell'olio di pesce come antiossidante. Nello studio di Sellami et al. (2018) è stato estratto l'olio dal fegato di scarto di tre specie valutando la composizione dell'estratto e l'attività di *scavenging*. I profili degli acidi grassi hanno mostrato una predominanza di acidi grassi insaturi (UFA) superiore, per tutti i campioni, al 65% del contenuto totale di acidi grassi. Un fatto interessante è che questi oli contenevano anche carotenoidi e composti fenolici, mostrando un'attività antiossidante paragonabile a quella dell'olio d'oliva. L'olio di scarto di pesce è stato applicato con successo anche a livello microbiologico come substrato di crescita batterica e per indurre la produzione di enzimi batterici. In particolare, è noto che la produzione di lipasi microbica è fortemente influenzata dai componenti dei substrati come fonti di azoto, fonti di carbonio (come acidi grassi), trigliceridi e carboidrati che possono stimolare o reprimere la produzione di lipasi. È stato osservato come l'aggiunta di olio di fegato di merluzzo aggiunto al mezzo di crescita di *Staphylococcus epidermidis* CMST Pi1 ha dimostrato essere una fonte di trigliceridi adatta per aumentare la produzione di lipasi ad altri oli usati comunemente (Esakkiraj et al., 2010). D'altra parte, Inguglia et al. (2020) hanno caratterizzato qualitativamente e studiato gli effetti antimicrobici dell'olio di pesce estratto da campioni di rifiuti di salmone atlantico derivanti dai mercati ittici italiani e valutato il potenziale utilizzo di questi composti per il trattamento delle infezioni da agenti patogeni. Hanno dimostrato che la composizione di acidi grassi specifici degli oli era ricca in MUFA e PUFA,

con particolare riferimento agli acidi grassi omega-3, -6, -7, -9. L'estratto oleaginoso è stato testato contro due Gram+ e Gram-, rispettivamente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC15442 dimostrando un effetto inibitorio, presumibilmente attribuito alla loro azione di alterazione e destabilizzazione della membrana cellulare (Calo et al., 2015). Un'altra importante applicazione dell'olio proveniente dai rifiuti ittici è la produzione di combustibili ecocompatibili, in particolare il biodiesel. Gli oli di scarto sono potenzialmente vantaggiosi rispetto ai combustibili a base di petrolio e olio vegetale vergine a causa dell'utilizzo dei rifiuti e di una riduzione complessiva delle emissioni durante il ciclo di produzione di carburante, dello smaltimento e potere calorifico simile ai distillati di petrolio. In uno studio condotto da Martins et al. (2015) le caratteristiche fisico-chimiche del biodiesel a base di pesce ottenuto dall'olio di scarto di tilapia sono state verificate in conformità con i requisiti standard stabiliti dall'Agenzia nazionale brasiliana per il petrolio. Hanno confermato che il biodiesel ottenuto è conforme alle specifiche di massa specifica, viscosità cinematica, contenuto d'acqua, livello di acidità, punto di infiammabilità e stabilità all'ossidazione che dimostrano la potenzialità dell'utilizzo dell'olio residuo dai rifiuti di tilapia come materia prima di qualità nella produzione di biodiesel. Una recente applicazione dell'olio di scarto di pesce è stato il suo utilizzo come agente ingrassante nella lavorazione della pelle. Infatti, le proprietà fisiche e meccaniche della pelle lubrificata con grasso di olio di pesce solfato (olio di pesce convertito in ingrasso mediante un processo di solfatazione con acido solforico) erano migliori di quelle lavorate con l'agente ingrassante commerciale (Saranya et al., 2020).

### **3.4- Produzione di chitina e chitosano**

Le proprietà possedute dalla chitina e dal chitosano, come ad esempio la capacità di formare polioissalici e film, di chelare i metalli e le caratteristiche della struttura ottica, li rendono composti promettenti per l'utilizzo in numerosi campi, come quello medico, farmaceutico, alimentare, nutraceutico e cosmetico. Nel campo del biorisanamento, diversi derivati della chitina possiedono proprietà specifiche utili per il trattamento dei contaminanti, in quanto i diversi gruppi funzionali che hanno, potrebbero facilmente interagire con gli ioni di metalli pesanti aiutandone la rimozione in soluzione acquosa. È stato dimostrato che il chitosano estratto dalle squame dei pesci *Papuyu* migliora la rimozione del ferro nelle acque sotterranee, evidenziando una maggiore efficienza nel trattamento di coagulazione/flocculazione rispetto al chitosano commerciale dal guscio di gambero. Sono stati inoltre segnalati notevoli impieghi in campo medico e farmaceutico per le dimostrate attività biologiche quali antimicrobica, antiossidante, antitumorale, antitrombogenica, anticolesteremica e bioadesiva. Attività antibatteriche sono state riportate per il chitosano da diversi autori, e sono state

anche correlate al peso molecolare del chitosano suggerendo un'interazione con la permeabilità (Coppola et al., 2021). Le molte possibili conformazioni di chitina e chitosano (fibre, polveri, film, spugne, perline, gel, capsule) consentono lo sfruttamento del chitosano per la somministrazione di farmaci in diversi modi e per l'ingegneria tissutale e la medicazione delle ferite. Le proprietà benefiche, come la biocompatibilità, la biodegradabilità, la capacità filmogena e la barriera ai gas e agli aromi sono poi alla base dell'uso suggerito e provato per la conservazione degli alimenti, il confezionamento e come stabilizzanti del colore. Ciò è particolarmente vero per il chitosano, che ha mostrato una maggiore solubilità in vari solventi acidi e possiede attività antimicrobica contro molti microrganismi patogeni. I film ottenuti dal chitosano hanno mostrato flessibilità e resistenza e un'ottima capacità di formare barriere all'ossigeno, ideali quindi per la conservazione di frutta, verdura, uova e latticini, cereali, carne e prodotti ittici (Coma, 2008).

## **CAPITOLO 4**

### **METODI DI ESTRAZIONE GREEN**

Una definizione generale di chimica verde è *“l'invenzione, la progettazione e l'applicazione di prodotti e processi chimici per ridurre o eliminare l'uso e la generazione di sostanze pericolose”*.

L'estrazione verde si basa sulla scoperta e sulla progettazione di processi di estrazione che riducano il consumo di energia, consentano l'uso di solventi alternativi e prodotti naturali rinnovabili e garantiscano un estratto o prodotto di alta qualità (Chemat et al., 2012).

I sei principi dell'estrazione Green di prodotti naturali sono di seguito elencati:

- Selezione e utilizzo di materie prime rinnovabili;

- Utilizzo di solventi alternativi come acqua o agro-solventi;
- Ridurre il consumo di energia mediante il recupero energetico e l'utilizzo di tecnologie innovative;
- Produrre sottoprodotti e co-prodotti al posto di rifiuti per includerli nell'industria della bio-raffinazione e agro-raffinazione;
- Ridurre il numero di operazioni al fine di attuare processi sicuri e controllati, riducendo i costi e aumentando l'efficienza energetica;
- Il prodotto estratto deve risultare inalterato, biodegradabile e non contaminato.

Lo scopo è quello di minimizzare l'impatto ambientale ed economico della fase di estrazione in un impianto. L'estrazione è uno dei promettenti temi di innovazione che potrebbero contribuire alla crescita sostenibile delle industrie chimiche e alimentari. Infatti, le tecnologie di estrazione esistenti hanno notevoli ostacoli tecnologici e scientifici da superare: spesso un nuovo impianto richiede grandi investimenti economici e, inoltre, solventi e acque di processo hanno un elevato consumo di energia, in particolare nei settori alimentare, chimico e farmaceutico. Pertanto, la ricerca di alternative rispettose dell'ambiente e di tecniche, procedure e solventi più sicuri è attualmente oggetto di intensa attenzione. Utilizzando le tecniche di estrazione *green*, i processi completi possono ora essere completati in pochi minuti anziché in ore, con elevata riproducibilità, consumo ridotto di solvente, manipolazione semplificata, maggiore purezza del prodotto finale, eliminazione del post-trattamento delle acque reflue e consumo di solo una frazione di energia normalmente necessaria per un metodo di estrazione convenzionale (Chemat et al., 2020). Negli ultimi anni, l'interesse dei consumatori per gli alimenti funzionali è aumentato.

Ciò è dovuto sia alla volontà di volere un buon apporto di nutrienti sia ai loro benefici sulla salute o alle loro proprietà di prevenzione delle malattie. Di conseguenza, è molto importante sviluppare metodi di lavorazione che mirino a preservare non solo le caratteristiche nutritive e sensoriali, ma anche la bioattività di costituenti specifici.

Per quanto riguarda l'industria ittica, esistono vari metodi di estrazione *green* per ottenere composti bioattivi da scarti e sottoprodotti, i più studiati e applicati sono:

- Estrazione con ultrasuoni (UAE)
- Estrazione con fluidi supercritici (SFE)
- Estrazione tramite campi elettrici pulsati (PEF)
- Estrazione assistita con microonde (MAE)

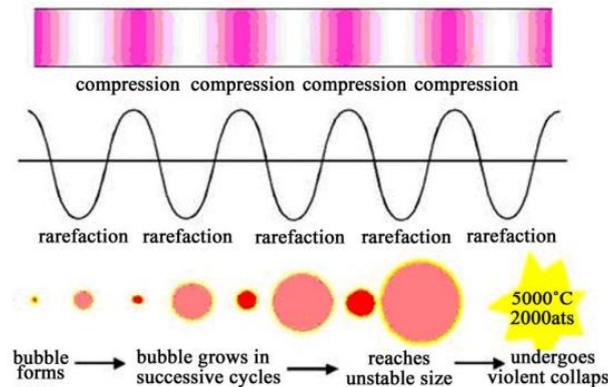
Sebbene queste tecnologie, nel corso degli ultimi 20 anni, siano state riconosciute come un'importante alternativa ai metodi di estrazione tradizionali, ad oggi necessitano comunque di

ulteriori ricerche per valutarne al meglio l'impatto ambientale ed economico (Ivanovs & Blumberga, 2017).

#### **4.1 - Estrazione con ultrasuoni (ultrasound-assisted extraction, UAE)**

Gli ultrasuoni (US) sono le onde di pressione con una frequenza di 20 kHz o più. Gli ultrasuoni sono una tecnologia emergente che può essere utilizzata per ridurre al minimo l'elaborazione, mantenere la qualità e la garanzia della sicurezza alimentare. Possono essere classificati in ultrasuoni a bassa ed alta energia. Questa tecnologia può essere applicata anche per il controllo di qualità di frutta e verdura fresca, formaggi, oli da cucina commerciali, pane e prodotti a base di cereali, prodotti alimentari a base di grassi ed emulsionati, gel alimentari e prodotti aerati e alimenti surgelati (Arvanitoyannis et al., 2017). Per quanto riguarda la sicurezza alimentare, gli ultrasuoni possono migliorare gli standard igienici della produzione alimentare. La cavitazione e i fenomeni correlati possono sciogliere le impurità e migliorare i processi di pulizia, abbreviando i tempi di applicazione e limitando l'uso di sostanze chimiche. Tuttavia, l'uso singolare degli ultrasuoni non è considerato sufficiente per inattivare efficacemente i microrganismi secondo gli standard dell'industria alimentare (Pyasena, Mohareb & McKellar, 2003). Gli ultrasuoni a bassa energia (bassa potenza e bassa intensità) sono caratterizzati da una frequenza superiore a 100 kHz e un'intensità inferiore a  $1\text{W}/\text{cm}^2$  e possono essere utilizzati per l'analisi e il monitoraggio non invasivi di numerosi materiali alimentari durante la lavorazione e la conservazione, con l'obiettivo di garantire standard di qualità e sicurezza. Gli ultrasuoni ad alta energia (alta potenza e alta intensità) sono caratterizzati da intensità superiori a  $1\text{W}/\text{cm}^2$  e frequenze tra 20 kHz e 500 kHz, che sono dirompenti e influenzano le proprietà fisiche, meccaniche o chimiche/biochimiche degli alimenti (Arvanitoyannis et al., 2017). Questa tecnologia è stata applicata al posto delle tradizionali operazioni di lavorazione degli alimenti per controllare la microstruttura e modificare le proprietà strutturali dei prodotti grassi (sonocristallizzazione) così come per emulsionare e modificare le caratteristiche funzionali di diverse proteine alimentari. Può essere utilizzata anche per disattivare o accelerare l'attività enzimatica, aumentare la durata e la qualità di prodotti alimentari e facilitare l'estrazione di diversi ingredienti bioattivi degli alimenti (Arvanitoyannis et al., 2017). Il principio su cui si basano gli ultrasuoni è la cavitazione. Quando la reazione avviene in condizioni ultrasoniche, le onde sonore attraversano la matrice e inducono il movimento molecolare attraverso una serie di cicli di compressione e rarefazione. A potenze sufficientemente elevate, il ciclo di rarefazione è in grado di separare le molecole e creare vuoti che sono effettivamente delle bolle. Alle frequenze ultrasoniche l'onda di compressione successiva non fa collassare completamente le bolle e le dimensioni crescono attraverso i cicli successivi mediante un processo noto come diffusione rettificata. Alla fine, le bolle diventano instabili e subiscono un

violento collasso in un processo noto come cavitazione acustica, come mostrato nella Figura 1 (Sana et al., 2012).



**Figura 4.1:** Rappresentazione del processo di cavitazione acustica (Sana et al., 2012).

L'utilizzo della tecnologia ad ultrasuoni nell'industria alimentare non è una novità. Al Khawli et al. (2019) rivelano che gli UAE possono essere utilizzati con successo per l'estrazione del collagene dai sottoprodotti del pesce (pelle e squame), riducendo i tempi di elaborazione e aumentando la resa. Nella lavorazione della pelle del branzino giapponese (*Lateolabrax japonicus*), per l'estrazione del collagene mediante UAE, è stato dimostrato che la resa di estrazione differiva in base a diversi fattori come la quantità di acido aggiunto, il trattamento, il tempo e l'ampiezza delle onde ultrasoniche (Kim et al., 2013). La combinazione degli ultrasuoni con altre tecnologie è stata studiata nella lavorazione di diversi sottoprodotti ittici al fine di migliorare l'efficienza di estrazione e la qualità dei composti bioattivi estratti. È stato anche dimostrato che la combinazione di diverse nuove tecnologie, come gli UAE con gli enzimi, migliora le rese di estrazione, facilitando un aumento delle collisioni tra enzima e substrato (Hayes & Tiwari, 2015). L'estrazione enzimatica assistita da ultrasuoni è considerata un metodo promettente per il miglioramento della resa di estrazione di olio da matrici marine. Bruno, Kudre & Bhaskar (2019) hanno valutato gli effetti dei pretrattamenti con UAE prima dell'estrazione enzimatica sulla resa di estrazione, sul profilo degli acidi grassi, sulla stabilità ossidativa e sulle proprietà reologiche dell'olio estratto dalle teste di *Labeo rohita* (Tabella 4.1). I risultati hanno mostrato maggiori recuperi di olio, maggiori contenuti di PUFA e maggiore stabilità ossidativa nei campioni sottoposti a un pre-trattamento con UAE prima dell'idrolisi enzimatica.

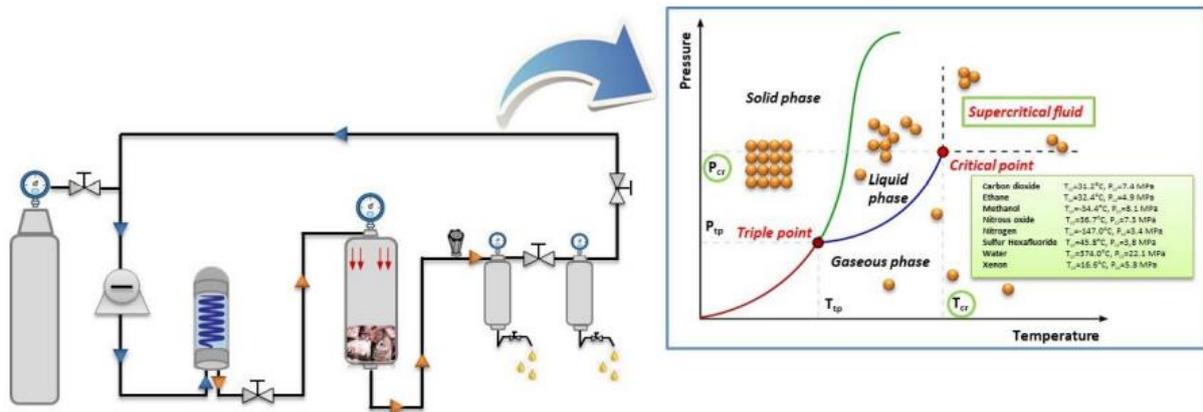
**Tabella 4.1:** Composti bioattivi ottenuti da scarti di pesci e crostacei tramite ultrasuoni, (Al Khawli et al., 2019).

By-Product	Source	Bioactive Compound and Product	Extraction Conditions	Main Effects
Head	<i>Labeo rohita</i>	Oil	UAE: 20 kHz, 40% amplitude, for 5, 10 and 15 min. Enzymatic hydrolysis: Protamex ratio of 1:100 ( <i>w/w</i> ), 2 h, 150 rpm, 55 °C.	Pretreatments with UAE improved the extraction yield of oil, showing higher oil recoveries (67.48% vs. 58.74 % for SFE and untreated samples, respectively).
Scales	Bighead carp ( <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> )	Gelatin	Temperature: 60, 70 and 80 °C Extraction time: 1 h	Improved technological properties: highest storage modulus (5000 Pa), gelation point (22.94 °C), and melting point (29.54 °C).
	Bighead carp ( <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> )	Gelatin	Temperature: 60 °C Extraction time: 1, 3 and 5 h	Extraction yield: 46.67% for ultrasound bath versus 36.39% for water bath.
Shells	Prawns ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	Chitin	Extraction time: 0, 1, and 4 h 0.25M NaOH at solid to liquid ratio of 1:40 ( <i>w/v</i> ) Power: 41 W/cm.	Decrease of the crystallinity indices and extraction yield of chitin as the time of sonication increased.
Skin	Japanese sea bass ( <i>Lateolabrax japonicus</i> )	Collagen	UAE: 20 kHz, 80% amplitude, 0.1 M acetic acid, 3 h.	UAE did not alter the major components of collagen ( $\alpha$ 1, $\alpha$ 2 and $\beta$ chains).
Whole fish	Mackerel	Proteins	ISP: Isoelectric solubilization precipitation. UAE: 40 kHz, 60% amplitude, 0.1 M NaOH, 10 min.	Significant increase of protein recovery, recovering more than 95% of total protein from mackerel by-products.

#### 4.2 - Estrazione con fluidi supercritici (supercritical fluid extraction, SFE)

SFE è un metodo di estrazione alternativo che ha attirato una crescente attenzione nelle industrie alimentari nell'ultimo decennio. Con la SFE, solventi organici non tossici vengono utilizzati a temperature e pressioni superiori o prossime alla loro pressione critica per separare i soluti da una matrice liquida o solida in condizioni pressurizzate. In queste condizioni i solventi hanno proprietà intermedie tra gas e liquidi, il che facilita l'estrazione dei composti target (Figura 4.2) (Al Khawli et al., 2019). L'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) è il solvente SFE più utilizzato nelle applicazioni alimentari, poiché è generalmente riconosciuto come sicuro (GRAS) sia da FDA che da EFSA (Herrero et al., 2010). La CO<sub>2</sub> non è solo economica e facilmente disponibile ad elevata purezza, ma manca anche di tossicità e infiammabilità. Ha una temperatura e una pressione critiche moderate (31,1 °C e 7,4 MPa) e può essere facilmente rimossa con una semplice riduzione della pressione. Inoltre, il suo maggiore coefficiente di diffusione e la minore viscosità consentono la rapida penetrazione attraverso i pori di matrici eterogenee, come i gas, aiutando a dissolvere il soluto come un liquido. L'efficienza del processo SFE è principalmente influenzata da pressione, temperatura di estrazione, tempo di estrazione, densità di CO<sub>2</sub>, portata di CO<sub>2</sub> e concentrazione di co-solvente. La selettività SFE si

ottiene regolando temperatura e pressione, con conseguente alterazione della densità. Questa selettività può essere regolata anche mediante l'uso di un co-solvente, per aumentare o diminuire la polarità della CO<sub>2</sub>. Il co-solvente più utilizzato è l'etanolo, perché soddisfa i requisiti della tecnologia verde.



**Figura 4.2:** Rappresentazione del meccanismo di estrazione tramite fluidi supercritici (Al Khawli et al., 2019).

Diversi composti naturali, come vitamine, aromi, pigmenti naturali e oli essenziali, particolarmente liposolubili ed antiossidanti, vengono estratti con SFE, evitando così l'uso di solventi organici e temperature elevate (Plaza & Rodriguez-Meizoso, 2013). Al giorno d'oggi, la grande richiesta di olio di pesce da parte dei consumatori, legata alla grande quantità di sottoprodotti ittici generati ogni anno, ha accresciuto l'interesse per l'estrazione di olio di pesce commestibile da sottoprodotti del pesce mediante SFE. Durante la SFE, i parametri di estrazione utilizzati (tempo di estrazione, portata di CO<sub>2</sub>, pressione e temperatura) giocano un ruolo chiave sulla resa estrattiva e sulla composizione lipidica dei prodotti funzionali ottenuti. L'SFE è stata applicata per estrarre una frazione oleosa dalla farina di pesce. La sua composizione si distingue per il maggior contenuto proteico e il profilo amminoacidico equilibrato, caratterizzato da una buona digeribilità. L'SFE ha permesso di ridurre il contenuto di grassi della farina di pesce prodotta senza influire sulla qualità delle proteine. Le condizioni di estrazione di pressione (10–40 MPa), temperatura (25–80 °C) e portate di CO<sub>2</sub> di 9,5 g/min hanno permesso di ottenere un prodotto con una riduzione del grasso del 90% e un colore più chiaro, dovuto all'estrazione anche di pigmenti come l'astaxantina. Infine, dopo l'estrazione, i residui dei sottoprodotti ittici possono essere utilizzati anche come fonte di altri ingredienti pregiati, come gli amminoacidi. I crostacei sono fonte di molti componenti bioattivi che possono essere usati nella

formulazione di alimenti, con potenziali effetti benefici per la salute. I gamberetti che producono molti scarti come teste, carapaci e code sono fonte di molti composti bioattivi quali lipidi, vitamine e pigmenti come l'astaxantina (Al Khawli et al., 2019). Amiguet et al. (2012) hanno studiato l'estrazione di olio da scarti di gamberetto boreale (*Pandalus borealis*) tramite SFE confrontandola con l'estrazione tramite acetone e n-esano. A seconda delle condizioni di estrazione utilizzate, sono state ottenute rese e qualità di estrazione diverse. L'uso di condizioni di bassa pressione (15 MPa e 50 °C) con portate di 3–5 L/min per 90 minuti ha mostrato un'elevata selettività per DHA ed EPA, mentre pressioni moderate (35 MPa e 40 °C) hanno mostrato un aumento dell'efficienza di estrazione ma rese inferiori rispetto a quelle ottenute con solventi organici (137 mg olio/g per SFE contro 206 mg olio/100 g e 178 mg olio/g per acetone e n-esano). Tuttavia, l'estratto ottenuto da SFE conteneva acidi grassi liberi totali più elevati (795 mg/g) e livelli simili di EPA (78 mg/g olio) e DHA (79,66 mg/g olio) all'estrazione con solventi, ma con tempi di estrazione inferiori (90 min contro 8 h, rispettivamente per l'estrazione SFE e Soxhlet). Un altro importante composto che può essere ottenuto dai sottoprodotti dei molluschi è l'astaxantina, un pigmento presente negli alimenti marini, come i pesci (salmone e trota) e i crostacei (gamberi e aragoste). SFE è un metodo selettivo e preciso che consente l'estrazione di astaxantina da campioni di crostacei, ottenendo rese fino al 98% di astaxantina sul totale dei carotenoidi estratti, contro l'84% ottenuto con metodi di estrazione convenzionali (Lopez et al., 2004).

Inoltre, si è visto che l'uso di un co-solvente (come l'etanolo) contribuisce all'aumento della resa e del recupero di olio e astaxantina rispetto all'uso di solo CO<sub>2</sub> supercritica, come evidenziato dal lavoro di Sanchez-Camargo et al. (2012). In generale, è stato osservato come la resa di olio aumenti con l'aumentare della percentuale di etanolo (5%, 10%, 15%) arrivando ad un recupero del 93% rispetto al recupero senza uso di etanolo. Questo aumento della resa di estrazione era dovuto al cambiamento di polarità della CO<sub>2</sub> causato dall'aggiunta dell'etanolo. In questo modo i composti polari come i fosfolipidi e i glicolipidi, che non potevano essere estratti dalla sola CO<sub>2</sub>, sono diventati solubili.

L'aggiunta progressiva di etanolo aumenta anche la resa e il recupero del pigmento astaxantina. Infatti, l'aumento della solubilità dell'astaxantina e di altri carotenoidi nel solvente supercritico (CO<sub>2</sub> + etanolo), dovuto al carattere leggermente polare di questo tipo di molecola, ha consentito la facile formazione di legami idrogeno con l'etanolo presente nella CO<sub>2</sub> e, inoltre, l'espansione dei pori della matrice, ha facilitato la liberazione dei pigmenti.

### **4.3- Campi elettrici pulsati (pulsed electric field, PEF)**

Il PEF è una tecnica innovativa che funziona attraverso l'applicazione di impulsi elettrici (con ampiezza che va da 10 kV/cm a 80 kV/cm) per pochi milli/microsecondi provocando l'effetto dell'elettroporazione, ovvero l'alterazione del potenziale di membrana delle cellule con formazione di micropori (Thirukumaran et al., 2022). Questa tecnologia può essere usata sia per accelerare diversi bioprocessi che per i suoi effetti antimicrobici. È importante sottolineare che i trattamenti PEF aiutano a trattenere i nutrienti sensibili al calore e le proprietà organolettiche. Negli ultimi anni diversi studi hanno riportato le prestazioni delle tecniche di estrazione PEF per il recupero degli ingredienti dalla biomassa dei rifiuti di pesce. Il trattamento PEF può essere utilizzato anche come pretrattamento prima di utilizzare il metodo convenzionale di estrazione con solvente. In uno studio condotto da Gulzar e Benjakul (2020), è stato riscontrato che un pretrattamento PEF seguito da estrazione con solvente riduce il valore del perossido rendendo gli enzimi ossidativi inattivi e instabili. Inoltre, il pretrattamento con PEF aumenta anche la resa di estrazione, dovuto al fatto che l'elettroporazione delle membrane cellulari permette al solvente di estrarre più componenti. In diversi studi vengono applicati i campi elettrici pulsati a visceri di pesce per l'estrazione di glicosamminoglicani, molecole molto importanti per la loro attività anticoagulante (Thirukumaran et al., 2022). Inoltre, è stata valutata l'impronta ecologica del PEF e la sua efficienza di estrazione per valorizzare i sottoprodotti del pesce, dimostrando come il trattamento PEF ha aumentato principalmente il recupero degli estratti antiossidanti.

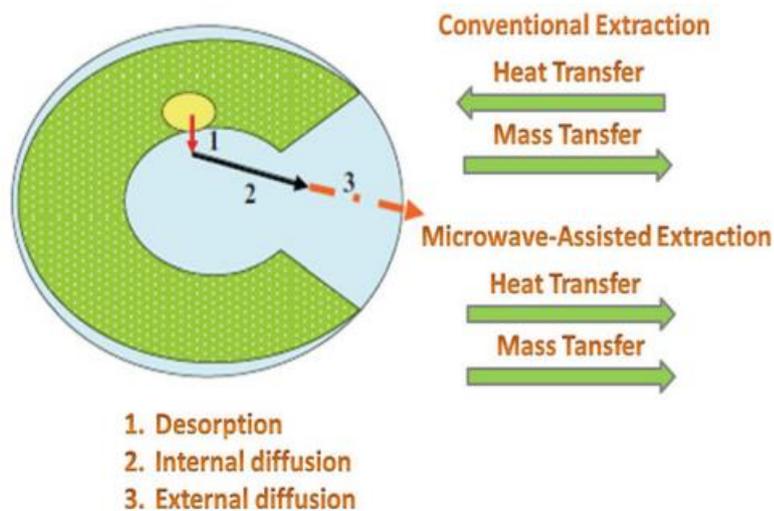
Grazie ai saggi di attività effettuati sul prodotto di scarto, si è potuto constatare come questa tecnica risulti essere una giusta scelta economica ed ecologica per l'estrazione di antiossidanti (Franco et al., 2020).

### **4.4- Estrazione assistita con microonde (microwave-assisted extraction, MAE)**

L'estrazione assistita con microonde è una tecnica di estrazione rapida ed efficiente basata sull'impiego di microonde per riscaldare la miscela campione/solvente allo scopo di facilitare e velocizzare l'estrazione dell'analita. A differenza delle fonti di calore tradizionali, che agiscono su una superficie, dalla quale il calore si diffonde verso gli strati interni del corpo per conduzione e convezione, una fonte di calore a microonde agisce sull'intero volume (se il mezzo è omogeneo) o su centri riscaldanti localizzati (punti caldi), costituiti dalle molecole polari presenti nel prodotto. Pertanto, mentre con il riscaldamento convenzionale è richiesto un certo tempo per riscaldare il recipiente prima che il calore venga trasferito alla soluzione, le microonde riscaldano direttamente la soluzione e il gradiente di temperatura viene mantenuto al minimo (Moret et al., 2014). Le microonde

(MW) sono una forma di energia elettromagnetica non ionizzante a frequenze comprese tra 300 MHz e 300 GHz. Questa energia viene trasmessa come onde e può penetrare nei biomateriali e interagire con le molecole polari, come l'acqua, e molecole elettricamente cariche per generare calore. Hanno lunghezze d'onda comprese tra 1 mm e 1 m con frequenze comprese tra 0,3 e 300 GHz. Nello spettro delle radiazioni elettromagnetiche si trovano tra la radiazione infrarossa e le onde radio. Le molecole dipolari come l'acqua, caratterizzate da un'estremità con carica elettrica positiva e un'altra con carica negativa, sono sensibili al campo elettrico alternato generato dalle microonde, che cambiando continuamente il proprio verso induce le molecole a ruotare (per allineare il proprio dipolo con quello del campo elettrico). Alla frequenza di 2.450 Mhz il dipolo si allinea e randomizza  $4,9 \times 10^9$  volte al secondo, forzando la molecola a muoversi rapidamente e quindi a riscaldarsi molto velocemente. Per effetto delle forze di attrito con le molecole vicine, infatti, questo movimento genera calore determinando un rapido riscaldamento. Il riscaldamento è generato non solo dal movimento delle molecole dipolari, ma anche dalla migrazione elettroforetica degli ioni (conduzione ionica) in presenza di un campo elettrico. La resistenza opposta dalla soluzione del campione a questo flusso di ioni determina anch'essa una frizione che riscalda ulteriormente la soluzione. In molte applicazioni si sfruttano contemporaneamente entrambi i fenomeni (rotazione del dipolo e conduzione ionica) (Moret et al., 2014; Sadeghi et al., 2017). Il fatto che sostanze chimiche diverse assorbano le microonde in maniera diversa implica che il riscaldamento generato nel mezzo circostante varia a seconda delle sostanze. Quindi per campioni con caratteristiche strutturali non omogenee, o contenenti specie chimiche con proprietà dielettriche diverse disperse in un ambiente omogeneo, è possibile produrre un riscaldamento selettivo di alcune aree o componenti del campione. Nell'estrazione assistita da microonde (MAE), l'energia delle microonde viene utilizzata per riscaldare i solventi a contatto con campioni solidi o liquidi e per promuovere la ripartizione degli analiti dalla matrice del campione nel solvente (l'estrattore). Si suppone che il meccanismo di estrazione delle molecole tramite microonde coinvolga tre fasi sequenziali schematizzate nella Figura 4.3, estrapolata dal lavoro di Sadeghi et al. (2017):

1. Separazione dei soluti dai siti attivi della matrice del campione a temperatura e pressione aumentate;
2. Diffusione del solvente attraverso la matrice del campione;
3. Il rilascio dei soluti dalla matrice del campione al solvente.



**Figura 4.3:** Fasi dell'estrazione tramite microonde (Sadeghi et al., 2017).

L'estrazione a microonde è considerata migliore rispetto ai metodi tradizionali di estrazione con solvente perché presenta numerosi vantaggi: velocità di estrazione più elevate, temperature più basse possibilità di automatizzare il processo. Tuttavia, l'estrazione a microonde presenta due principali inconvenienti come la generazione di calore, che può portare all'ossidazione degli acidi grassi insaturi e la sua bassa efficienza quando si utilizzano solventi volatili. Inoltre, molti fattori influenzano l'efficienza dell'estrazione: la dimensione delle particelle del campione, il solvente utilizzato, il tempo, la capacità e la frequenza delle microonde (Ivanovs & Blumberga, 2017).

In letteratura sono presenti vari studi in cui sono state applicate le microonde a scarti di pesce per ottenere composti ad alto valore.

A titolo di esempio, viene riportato il lavoro di Rahimi et al. (2017) in cui viene confrontata l'estrazione di olio tramite MAE e metodo Soxhlet. I risultati di questo studio indicano che il trattamento con microonde, sebbene per minor tempo, permette un'estrazione maggiore di olio rispetto al metodo Soxhlet. Infatti, l'estrazione con microonde ha permesso di ottenere 80,5mg di olio per grammo di campione quando il trattamento è stato di 10 minuti, mentre con il metodo Soxhlet si è ottenuta una quantità di 46,6mg/g, corrispondente al 58% della resa ottenuta con le microonde.

## **CAPITOLO 5**

### **VALORIZZAZIONE TRAMITE FERMENTAZIONE MICROBICA**

La fermentazione è un processo metabolico caratteristico dei lieviti e dei batteri, che consiste nell'ottenere energia dai composti organici in assenza di ossigeno. La fermentazione è stata utilizzata fin dall'antichità come metodo di conservazione per qualsiasi tipo di alimento, ma ora è di grande interesse per la nutrizione e la salute, poiché la fermentazione degli alimenti produce un aumento dei livelli di composti bioattivi, oltre a promuovere una diminuzione degli anti-nutrienti, attraverso la loro idrolisi. Gli effetti benefici del consumo di alimenti fermentati possono essere dovuti a microrganismi viventi ingeriti insieme al cibo fermentato, alcuni dei quali esibiscono un effetto probiotico, oppure possono derivare da composti sintetizzati durante la fermentazione come risultato del metabolismo batterico (Wilburn & Ryan, 2017). La fermentazione è una tecnica sicura, ecologica e redditizia, che consente di ottenere un'ampia varietà di composti, alcuni dei quali sono peptidi bioattivi o composti aromatici. Finora, il metodo di scelta dell'industria per ottenere i peptidi è stato

attraverso l'uso di acidi o basi per promuovere l'idrolisi delle proteine, principalmente perché è una procedura semplice ed economica (Marti-Quijal et al., 2020). Tuttavia, l'uso della fermentazione può fornire diversi benefici rispetto all'idrolisi assistita. Uno di questi è la capacità dei peptidi di proteggere il glutathione (GSH, un tripeptide con attività antiossidante) dall'ossidazione dovuta alla reazione di Fenton andando ad inattivare i radicali liberi idrossilici che si formano da tale reazione (Rajendran et al., 2018). Inoltre, con la fermentazione si producono proteine più digeribili, grazie al fatto che queste vengono idrolizzate in peptidi più piccoli. Questo può essere quindi un grande vantaggio per aumentare la qualità nutrizionale dei prodotti ittici che vengono usati come fonte proteica nei mangimi (Ozyurt et al., 2019). Nella Tabella 5.1 sono mostrati i diversi usi della fermentazione al fine di promuovere la valorizzazione dei sottoprodotti ittici. (Marti-Quijal et al., 2020).

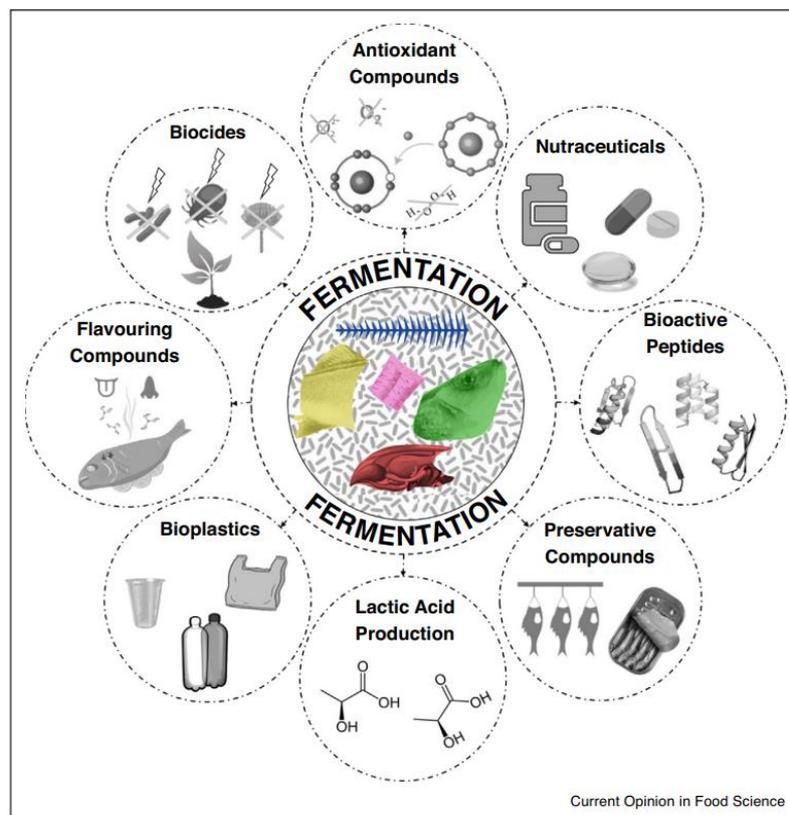
**Tabella 5.1:** Composti ottenibili dalla fermentazione degli scarti ittici (Marti-Quijal et al., 2020).

Raw material (fish)	Microorganism for fermentation	High-added value compounds
Viscera sauce (tuna)		Peptides inhibitors of angiotensin converting enzyme
Fish sauce (minnows/carps fish)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Peptide inhibitor of HMG-CoA reductase
Loins (sea bass)	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Reuterin (preservative)
Muscle (cod and albacore)	<i>Lactobacillus curvatus</i> and <i>Enterococcus faecium</i>	Preservatives compounds
Fish sauce (by-products)		Antioxidant peptides (preservatives)
Skin (turbot)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Antioxidant peptides (preservatives)
Heads (Rohu and Catla carps)	Lactic acid bacteria	Antioxidant peptides (preservatives)
Head, skin, viscera, fins (freshwater fish)	<i>A. oryzae</i> and <i>Aspergillus niger</i>	Glutamic acid, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal (flavoring compounds)
Fish sauce (anchovy)	<i>A. oryzae</i>	Flavoring compounds
Fish sauce (silver carp)	<i>A. oryzae</i>	Flavoring compounds
Skin, viscera, and muscle (ling, sardine, albacore, megrim, bass, rainbow trout, atlantic salmon)	Lactic acid bacteria	Bacteriocins
Skin, head, frame, and gut (sea bass)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> and <i>Streptococcus</i> spp.	Oil
Thorns (grass carp)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Calcium
Scales and intestine	<i>Bacillus subtilis</i>	Bioplastic
Fish waste (catfish and tilapia)	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Lactic acid

La fermentazione ha anche lo scopo di aumentare la conservazione del cibo producendo composti che vanno a prevenire la crescita di microrganismi patogeni o degradativi, andando così ad aumentarne la shelf-life dei prodotti alimentari (Marti-Quijal et al., 2020). È il caso dello studio di Angiolillo et al. (2018) in cui la fermentazione superficiale del glicerolo su filetti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) ad opera di *Lactobacillus reuteri* garantisce un'azione conservante grazie alla produzione di reuterina (3-idrossipropionaldeide), una molecola con attività antimicrobica. Un altro aspetto positivo della fermentazione è quello di contribuire al profilo aromatico del prodotto. Solitamente i prodotti a base di pesce fermentato hanno uno spiccato sapore umami, dovuto soprattutto all'alta concentrazione di acido glutammico e aspartico. Oltre a questo, durante la fermentazione si producono altre molecole aromatiche tipiche di questi prodotti, come il 2-metilbutanale e il 3-metilbutanale (Marti.Quijal et al., 2020). Inoltre, se la fermentazione viene fatta usando come microrganismi dei funghi filamentosi (ad esempio, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) il profilo aromatico del prodotto risulta più complesso e comprende decine di molecole volatili come aldeidi, acidi, alcoli, fenoli, chetoni, esteri e molte altre (Zhao et al., 2017). Altro aspetto importante è il tipo di microrganismo usato in quanto ogni specie/ceppo ha un sistema proteolitico unico che può influenzare la funzionalità dei peptidi prodotti (Bhandari et al., 2019).

La bioattività dei peptidi è diversa durante l'osservazione in vitro rispetto alle applicazioni nella vita reale poiché bisogna considerare anche la loro biodisponibilità, il loro assorbimento e la loro suscettibilità alla scomposizione in frammenti inattivi per azione di enzimi fisiologici. Per un efficace

effetto benefico sulla salute, è necessario che i peptidi resistano alle proteasi gastrointestinali e che vengano facilmente assorbiti nel siero sanguigno senza alcuna degradazione. Questa stabilità assicura che le sequenze peptidiche ingerite, che hanno mostrato bioattività in vitro, abbiano raggiunto in sicurezza i siti d'azione cellulari desiderati. Inoltre, si è visto come i peptidi di piccole dimensioni dimostrino una maggiore bioattività in vivo e possano essere facilmente assorbiti nella circolazione sanguigna grazie al loro trasporto attivo dovuto ai trasportatori peptidici intestinali (Bhandari et al., 2019). I microrganismi maggiormente utilizzati nelle fermentazioni sono batteri lattici (LAB), *Bacillus spp.*, lieviti e funghi filamentosi e ognuno ha un ruolo specifico nell'apportare una certa proprietà all'alimento fermentato (Kumari et al., 2021).



**Figura 5.2:** Possibili applicazioni dei composti ottenuti dalla fermentazione di scarti ittici, (Marti-Quijal et al., 2020).

Nonostante la grande quantità di composti utili che si producono durante la fermentazione, un particolare gruppo di molecole quali i **peptidi bioattivi**, è molto studiato per le innumerevoli possibili applicazioni sia in ambito alimentare che in quello farmaceutico. Sono formati da catene costituite da 2 a 20 amminoacidi, con varie funzioni benefiche per l'organismo umano, come quelle antipertensive,

antitumorali o antiossidanti. Normalmente sono inattivi quando sono all'interno della proteina originale, ma grazie al loro rilascio dovuto all'idrolisi possono esplicare la loro funzione ed inoltre, uno stesso peptide può svolgere funzioni diverse (Marti-Quijal et al., 2020). In particolare, si è visto come i peptidi bioattivi derivanti da fermentazione abbiano per lo più effetti antiossidanti, antimicrobici, antipertensivi, anticancerogeni e antidiabetici (Marti-Quijal et al., 2020; Kumari et al., 2021). Negli ultimi decenni sono stati pubblicati innumerevoli studi sui peptidi estratti tramite fermentazione e sono stati studiati i loro effetti sull'organismo umano.

I peptidi antiossidanti si formano durante l'idrolisi della proteina nativa dall'azione degli enzimi proteolitici prodotti dalla coltura starter. Queste molecole si trovano in molti prodotti fermentati, inclusi i prodotti a base di pesce (Kumari et al., 2021). I peptidi coinvolti nell'attività antiossidante devono essere in grado di indurre o prendere parte a reazioni di trasferimento di singoli elettroni. Pertanto, gli amminoacidi, che possono trasferire gli elettroni a un pH fisiologico, sono considerati in grado di partecipare ad attività antiossidanti. Esistono altri meccanismi seguiti dai peptidi per potenziare l'azione antiossidante, come la chelazione di metalli o la riduzione del ferro (Bhandari et al., 2019). Gli amminoacidi che possono contribuire all'attività antiossidante sono **istidina**, **cisteina**, **prolina**, **metionina** e altri amminoacidi aromatici. Gli amminoacidi aromatici, a volte chelano gli ioni metallici pro-ossidanti o eliminano il radicale ossidrilico  $\cdot\text{OH}$ . Ruthu et al. (2012) hanno provato ad ottenere degli idrolizzati proteici facendo fermentare scarti di teste di carpa tramite tre batteri lattici e hanno constatato che *Enterococcus faecium* NCIM5335 è il ceppo migliore per ottenere peptidi con attività antiossidante, con una  $\text{EC}_{50}$  di 5,1 mg. In uno studio più recente, Najafian e Babji (2018) hanno valutato l'attività antiossidante di un alimento tipico thailandese fermentato tramite *Lactiplantibacillus plantarum*. È stato constatato che la fermentazione apporta dei peptidi bioattivi con attività antiossidante di *radical scavenging*, andando quindi a donare elettroni ai radicali liberi per inattivarli (Tabella 5.2). I risultati hanno anche confermato che i peptidi antiossidanti erano inattivi all'interno delle sequenze della loro proteina madre, ma rilasciati dall'idrolisi enzimatica.

**Tabella 5.2:** Confronto delle attività antiossidanti del prodotto non fermentato (LF) e fermentato (LFF) (Najafian & Baji, 2018).

Sample	IC <sub>50</sub> (mg/ml)		
	DPPH radical scavenging activity	ABTS radical scavenging activity	Reducing power <sup>a</sup>
LF	– <sup>b</sup>	– <sup>b</sup>	0.06 ± 0.009
LFF	1.36 ± 0.66	2.24 ± 0.58	0.351 ± 0.008

L'uso eccessivo e incontrollato di antibiotici in medicina, nella produzione animale e nella conservazione dei prodotti alimentari ha causato l'emergere di agenti patogeni resistenti agli antibiotici convenzionali, che spesso portano al fallimento del trattamento, gravi esiti per i malati e aumento delle spese mediche. Così, la scoperta di nuovi composti antimicrobici è diventata una sfida importante per i ricercatori e industrie farmaceutiche. Pertanto, c'è grande interesse nel trovare nuovi e sicuri composti antibatterici da fonti naturali (Jemil et al., 2016). I peptidi antimicrobici sono i peptidi che agiscono contro un'ampia gamma di batteri, funghi, virus e protozoi in modo selettivo. La parete cellulare microbica è costituita da lipoproteine che fungono da principale bersaglio per dei peptidi. Infatti, tali molecole sono costituite principalmente da una struttura  $\alpha$ -elicoidale di natura cationica e anfipatica, mentre un numero minore sono peptidi  $\alpha$ -elicoidali e idrofobici. Questa parte cationica dei peptidi è responsabile dell'interazione elettrostatica con i fosfolipidi anionici della membrana cellulare microbica che porta alla formazione di pori. A causa di ciò, si verifica uno squilibrio ionico attraverso la membrana e quindi la lisi cellulare (Bhandari et al., 2019). La fermentazione, in particolare con batteri lattici, può aiutare a inibire la crescita di microrganismi patogeni in diversi modi. I microrganismi usati per la fermentazione possono idrolizzare i composti tossici prodotti dai patogeni oppure possono produrre molecole con azione antimicrobica, come le batteriocine (Marti-Quijal et al., 2020). È da tenere conto anche che ogni microrganismo patogeno risponde in modo diverso ai peptidi antimicrobici in quanto hanno caratteristiche strutturali e sensibilità diverse. Abd Rashid et al. (2022) hanno valutato l'attività antimicrobica dell'idrolizzato proteico derivante dalla fermentazione di sottoprodotti ittici ad opera di vari ceppi di *Lactocaseibacillus casei* contro diversi microrganismi patogeni ed in alcuni casi la loro crescita è stata inibita dell'80%. In uno studio precedente, Cho et al. (2005) sono riusciti ad isolare un nuovo peptide antimicrobico da scarti di pelle fermentata di *Raja kenoeji*, denominandolo *Kenoejinin I*. Questo peptide contiene ripetizioni di amminoacidi quali arginina e lisina che conferiscono una carica positiva al peptide, caratteristica importante per l'attività antimicrobica.

Tale peptide si è rivelato un antimicrobico non selettivo in quanto è stato in grado di inibire microrganismi con pareti cellulari diverse (batteri Gram +, Batteri Gram- e lieviti) con una minima concentrazione inibente (MIC) nell'ordine dei microgrammi. Interessante è anche il lavoro di Jemil

et al. (2016) che hanno caratterizzato e valutato l'attività antimicrobica di un estratto proteico ottenuto per fermentazione di *Salaria basilisca* ad opera di *Bacillus mojavensis* A21. È risultato che l'idrolizzato ha una notevole attività antimicrobica verso vari microrganismi, in particolare *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli*. I peptidi ottenuti tramite fermentazione microbica dagli scarti e sottoprodotti dell'industria ittica possono svolgere anche attività antipertensiva. L'ipertensione è una malattia cronica in cui la pressione arteriosa è costantemente superiore a 140/90 mmHg ed è un fattore di rischio per molte malattie anche mortali come ictus, infarto del miocardio e aneurisma. La pressione sanguigna è regolata dal sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA): quando la pressione scende al di sotto di un certo limite, l'enzima renina catalizza la produzione di angiotensina I che a sua volta viene convertita in angiotensina II dall'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE). L'angiotensina II è un potente vaso costrittore che provoca il restringimento dei vasi sanguigni e quindi l'aumento di pressione. Contemporaneamente, stimola anche la produzione di aldosterone che induce il rene a riassorbire più sodio e acqua e allo stesso tempo l'escrezione di potassio (per mantenere l'equilibrio elettrochimico). Il riassorbimento di acqua comporta un aumento del volume extracellulare e quindi l'aumento di pressione (Abuine et al., 2019). L'ACE-inibizione è il meccanismo su cui si basa la maggior parte dei farmaci noti in commercio come Captopril, Enalapril, Zofenopril, ovvero impedire la conversione dell'angiotensina I in angiotensina II. Tuttavia, l'uso di questi farmaci non è privo di effetti collaterali, che possono essere lievi come tosse ed eruzioni cutanee, ma anche gravi come ridotta funzionalità renale e anomalie fetali. Per valutare l'azione ACE-inibitoria di un peptide è importante conoscere le sue caratteristiche, ovvero la sequenza amminoacidica del peptide e la lunghezza della catena. Peptidi più corti come dipeptidi e tripeptidi potrebbero passare rapidamente attraverso le cellule epiteliali intestinali attraverso i trasportatori di peptidi per prevenire la digestione gastrointestinale, preservando così gli effetti ACE inibitori. Tali peptidi hanno tipicamente da 3 a 20 residui di amminoacidi a basso peso molecolare. Gli ultimi tre amminoacidi residui del C-terminale svolgono un ruolo discriminante nell'inibizione dell'ACE, con una maggiore presenza di amminoacidi aromatici idrofobici (tirosina, triptofano, prolina e fenilalanina) al C-terminale e di amminoacidi idrofobici ramificati (alanina, isoleucina, leucina e valina) all'N-terminale. Gli studi presenti in letteratura indicano che sono preferiti i dipeptidi contenenti amminoacidi voluminosi e idrofobici, mentre per i tripeptidi sono preferite le seguenti tre condizioni: (a) amminoacidi aromatici al C-terminale, (b) amminoacidi caricati positivamente nel mezzo e (c) amminoacidi idrofobici all'N-terminale (Chai et al., 2020).

In uno studio recente, Cheng et al. (2018) hanno valutato la capacità ACE inibitoria di un idrolizzato proteico ottenuto da *Ruditapes philippinarum* (vongola verace) tramite fermentazione ad opera di *Bacillus subtilis* subsp. *natto*. Dall'idrolizzato, dopo un processo di purificazione (ultrafiltrazione,

cromatografia di esclusione molecolare e LC-MS/MS) è stato isolato un peptide su cui è stata valutata l'attività ACE inibitoria. Il peptide si è rivelato essere quello con l'attività ACE inibitoria più alta, con una  $IC_{50}$  di 8,16  $\mu\text{mol/L}$ . Inoltre, è risultato essere resistente alla digestione gastrica dopo trattamento con enzimi proteolitici quali pepsina, tripsina e chimotripsina. L'effetto antipertensivo è stato riscontrato anche in uno studio *in vivo* andando a somministrare tale peptide a roditori. Tramite questo studio è stato dimostrato anche il fatto che i peptidi a peso molecolare minore sono i più attivi. Altro studio interessante è quello di Kim et al. (2016) in cui è stata valutata l'attività ACE inibitoria di peptidi presenti in salsa di acciughe, un alimento fermentato molto comune in Asia. Da questo prodotto sono stati isolati i due peptidi con maggiore attività ACE inibitoria, ovvero DGGP (Asp-Gly-Gly-Pro) e GCK (Gly-Cys-Lys), entrambi con una  $IC_{50}$  nell'ordine delle  $\mu\text{mol}$ . Questa loro maggiore attività è dovuta sia alla loro dimensione, in quanto peptidi piccoli sia alla loro composizione. Infatti, come dimostrato da studi precedenti, la presenza di amminoacidi idrofobici quali prolina e lisina nell'estremità C-terminale del peptide aumenta la capacità ACE inibitoria.

## **CAPITOLO 6**

### **SCOPO DELLA RICERCA**

La produzione ittica è in continua espansione, grazie all'aumento delle richieste del mercato e del miglioramento delle tecniche di pesca, allevamento, trasformazione e conservazione e questo comporta la generazione di enormi quantità di scarti, per i quali è importante trovare soluzione per una loro valorizzazione e recupero. Gli scarti derivanti dalla produzione ittica, infatti, possono essere utilizzati per l'estrazione di composti bioattivi come lipidi, pigmenti, minerali e soprattutto proteine e peptidi. Tra le varie metodologie disponibili, i processi biotecnologici, che utilizzano microrganismi selezionati per le loro attività enzimatiche, rappresentano sicuramente un fattore chiave per questo settore. Lo scopo di questo elaborato, condotto nell'ambito del progetto europeo NewTechAqua, è stato valutare e selezionare ceppi microbici, dotati di attività enzimatica (proteolitica e lipolitica), al fine di ottenere degli idrolizzati derivanti dalla fermentazione guidata degli scarti ittici. I processi fermentativi sono stati valutati sia utilizzando lo scarto tal quale che uno scarto arricchito in glucosio, per permettere una migliore crescita dei ceppi selezionati. I fermentati ottenuti sono stati caratterizzati per quanto riguarda la loro attività antiossidante e per la loro componente aromatica, per una possibile applicazione nella formulazione di nuovi prodotti alimentari.

## CAPITOLO 7

### MATERIALI E METODI

#### 7.1 - Fermentazioni microbiche su scarti di pesce

##### 7.1.1 – Microrganismi selezionati per le fermentazioni

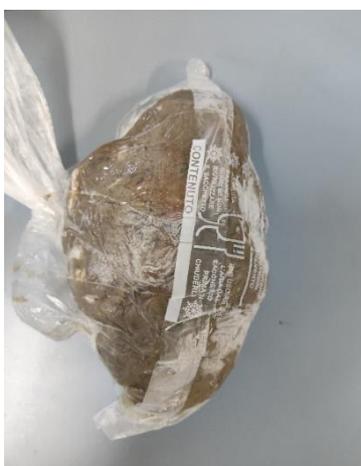
Per le fermentazioni sugli scarti di pesce omogeneizzato sono stati selezionati diversi microrganismi, tra cui lieviti, bacilli e batteri lattici, appartenenti alla collezione di colture del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna (Italia). In particolare, sono stati utilizzati ceppi di *Yarrowia lypolitica* (YL2 e YL4), isolati dal fiume PO e con forte attività proteolitica e lipolitica; un ceppo di *Bacillus subtilis* B5C isolato da pianta, batterio Gram+ dotato di forte attività proteolitica; un ceppo di *Lactocaseibacillus paracasei* PA13, batterio probiotico lattico omofermentante e un ceppo di *Lactiplantibacillus plantarum* LP82, batterio lattico omofermentante. I lieviti sono stati coltivati in brodo di Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD) per 48-72 ore a 30°C, il ceppo di *B. subtilis* in Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C per 24 ore, mentre i batteri lattici in De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 37 °C per 48 ore. I microrganismi sono stati rinfrescati due volte nei rispettivi terreni e quindi centrifugati a 5000 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso nello stesso volume di soluzione salina sterile (NaCl, 9 g/L) prima del loro utilizzo per valutare il potenziale enzimatico e l'attitudine alla fermentazione.

##### 7.1.2 - Preparazione degli scarti di pesce

Gli scarti di lavorazione, principalmente teste, lisce e code di cefalo (*Mugil cephalus*) sono stati ottenuti dalla ditta Ecopesce S.r.l. (Cesenatico, Italia) che opera nella produzione di prodotti ittici. I campioni (circa 4 kg) sono stati prelevati freschi dalla ditta e consegnati al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Campus di Cesena. Successivamente i campioni sono stati omogeneizzati attraverso un mixer (Vorwerk Bimby TM31). In figura 7.1 sono mostrati i campioni prelevati dalla ditta mentre in figura 7.2 sono mostrati gli stessi scarti dopo omogeneizzazione su cui sono stati condotti gli esperimenti. Dopo omogeneizzazione, i campioni sono stati divisi in sacchetti di circa 200 g e conservati a -20°C.



**Figura 7.1:** Scarti di cefalo interi ottenuti dalla ditta Ecopeisce S.r.l. (Cesenatico, Italia).



**Figura 7.2:** Scarti omogeneizzati e suddivisi nei sacchetti.

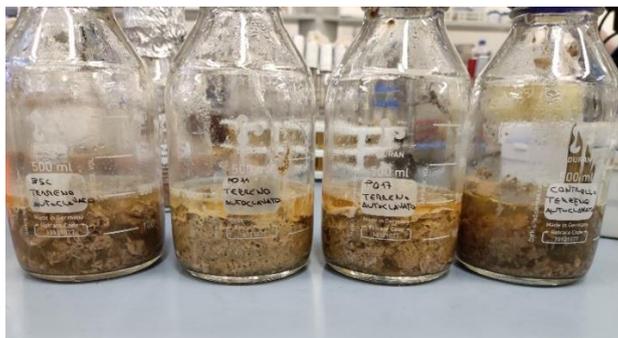
### 7.1.3 - Allestimento delle fermentazioni

In beute sterili sono stati aggiunti 100 g di scarti di pesce omogeneizzati e 100 mL di soluzione sterile (3% di glucosio e 4% di cloruro di sodio) o acqua distillata sterile. Gli scarti sono stati sterilizzati in autoclave a 121 °C per 15 min e in ogni beuta è stato inoculato 1 mL di sospensione microbica dei rispettivi ceppi di *Y. lipolytica* YL2 e YL4 e del ceppo di *B. subtilis* B5C. Inoltre, sono state preparate beute con 50 g di scarto di pesce omogeneizzato e 50 mL di soluzione sterile (3% di glucosio e 4% di sale) o acqua distillata sterile e dopo essere state autoclavate, sono stati inoculati per ogni beuta 500 µL di sospensione microbica dei rispettivi ceppi di *L. paracasei* PA13 e di *L. plantarum* LP82.

È stata preparata anche una beuta di controllo per ciascuna condizione descritta, senza nessun microrganismo inoculato. Di seguito, a titolo di esempio, vengono riportate le Figure 7.3 e 7.4 che mostrano rispettivamente alcuni campioni prima e dopo sterilizzazione in autoclave.



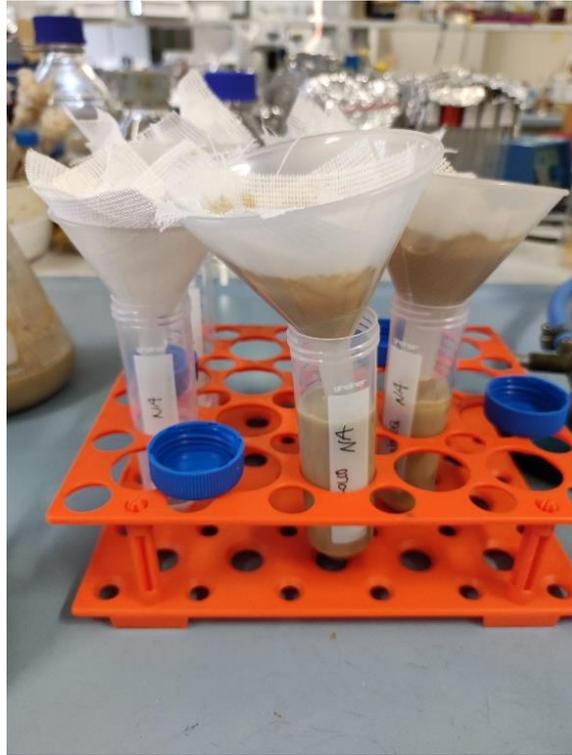
**Figura 7.3:** Campioni con gli scarti di pesce prima della sterilizzazione.



**Figura 7.4:** Campioni con gli scarti di pesce dopo la sterilizzazione.

#### *7.1.4 - Termine delle fermentazioni ed estrazione degli idrolizzati*

La fermentazione è stata condotta a temperatura ambiente per 96 ore. Un'aliquota dei campioni è stata prelevata per la quantificazione microbica. Gli idrolizzati liquidi sono stati separati dalla componente solida, filtrati tramite garze e raccolti in falcon sterili (Fig. 7.5). Successivamente sono stati centrifugati a 4000 rpm per 10 min, in modo tale da separare le varie fasi che componevano l'idrolizzato liquido (Fig. 7.6). Parte del surnatante è stato raccolto e conservato a -20 °C per le successive analisi di caratterizzazione, mentre la restante parte è stata liofilizzata per 90h usando un liofilizzatore Drywinner Heto freeze-dryer (Cambridge Biosystems, UK).



**Figura 7.5:** Separazione dell'idrolizzato liquido dagli scarti solidi tramite garze.



**Figura 7.6:** Centrifugazione dell'idrolizzato liquido. Si possono notare le tre fasi distinte: pellet (sul fondo), fase acquosa (in mezzo) e fase oleosa (in cima).

## 7.2 - Analisi microbiologiche

Per risalire alla carica microbica iniziale sugli scarti di pesce utilizzati per gli esperimenti successivi sono stati prelevati 10 g di scarto di pesce omogeneizzati in una busta sterile per Stomacher con 90 mL di soluzione salina (0,9% NaCl) sterile. Il sacchetto è stato posizionato in Stomacher per 120 secondi e successivamente sono state effettuate le diluizioni decimali seriali. Il campionamento è stato effettuato inoculando un'aliquota di 100 µL di ciascuna diluizione su terreni di coltura selettivi agarizzati per il piastramento superficiale e un'aliquota di 1 mL di ciascuna diluizione per la semina per inclusione. In particolare, sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura:

- **VRBA (Violet Red Bile Agar):** terreno selettivo per la crescita dei coliformi;
- **VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar):** terreno selettivo per la crescita di enterobatteri;
- **PCA+C (Plate Count Agar):** terreno non selettivo per la crescita di mesofili totali a cui sono stati aggiunti 0,2 g di antibiotico cicloesimide disciolto in 1 mL di etanolo. Questo antibiotico è una molecola impiegata per interferire ed inibire il processo di traduzione e di sintesi proteica negli eucarioti inducendone l'arresto della crescita e l'apoptosi cellulare;
- **YPD+C (Yeast Peptone Dextrose Agar):** terreno per la crescita di lieviti a cui è stato aggiunto l'antibiotico cloroanfenicolo (0,2 g/L), con azione battericida e batteriostatica nei confronti di alcuni ceppi batterici.

I terreni YPD+C e PCA+C sono stati incubati a 30°C rispettivamente per 48 e 24 ore, mentre i terreni VRBA e VRBGA entrambi a 37 °C per 24 ore. Al termine delle incubazioni sono state contate le colonie per poter determinare le unità formanti colonie (UFC) presenti.

Inoltre, per quantificare gli inoculi di ciascun microrganismo utilizzato, sono stati effettuati dei campionamenti allestendo delle diluizioni seriali decimali. In questo caso 100 µL di ciascuna diluizione sono stati trasferiti e piastrati con un'ansa sterile sul terreno agarizzato di YPD+C (per i ceppi di *Y. lipolytica*, YL2 e YL4), BHI (per il ceppo di *B. subtilis* B5C) e MRS (per i ceppi di *L. paracasei* PA13 e per il ceppo di *L. plantarum* LP82).

Durante la fase di fermentazione sono stati effettuati dei campionamenti a 24 h, 48 h e 72 h prelevando 1 mL di liquido dalle beute ed effettuando delle diluizioni decimali seriali in 9 mL di soluzione salina (0,9% NaCl) sterile. Per la semina per inclusione è stato inoculato 1 mL di ciascuna diluizione in piastra per i terreni VRBA, VRBGA e MRS+C (de Man, Rogosa, Shape Agar con aggiunta dell'antibiotico cicloesimide), mentre per la semina per spatolamento un'aliquota di 100 µL di ciascuna diluizione è stata distribuita su terreni agarizzati di PCA+C e YPD+C. Anche in questo caso, i terreni YPD+C e PCA+C sono stati incubati a 30°C rispettivamente per 48 e 24 ore, mentre i terreni VRBA e VRBGA entrambi a 37 °C per 24 ore.

Le piastre con terreno MRS+C, usato per valutare la crescita dei batteri lattici, è stato incubato a 37°C in giare per anaerobiosi. Al termine delle incubazioni sono state contate le colonie per poter determinare le unità formanti colonie (UFC) presenti.

### **7.3 - Analisi chimiche**

#### *7.3.1 - pH*

Il pH è stato misurato tramite pH-metro (SevenCompact, Mettler Toledo, USA), opportunamente tarato con standard pH 7 e 4. Per misurare il pH degli scarti omogeneizzati sono stati prelevati 5 g di scarti e disciolti in 5 mL di acqua distillata, mentre per misurare il pH dei liquidi di fermentazione sono stati prelevati 5 mL.

### **7.4 - Analisi delle proteine**

#### *7.4.1 - Concentrazione proteica*

La concentrazione proteica è stata misurata nella frazione solubile seguendo le istruzioni del kit di analisi delle proteine Bradford (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Questa tipologia di analisi spettrofotometrica si basa sul legame tra il colorante *Coomassie Brilliant Blue* presente nella soluzione Bradford che reagisce con i residui basici di amminoacidi come arginina, lisina ed istidina, causando un viraggio di colore da rosso scuro a blu. Il calcolo relativo alla concentrazione proteica è stato basato su una curva standard utilizzando l'albumina sierica bovina (BSA) e la concentrazione è stata espressa in milligrammo per millilitro (mg/mL).

Le cuvette sono state allestite nel seguente modo:

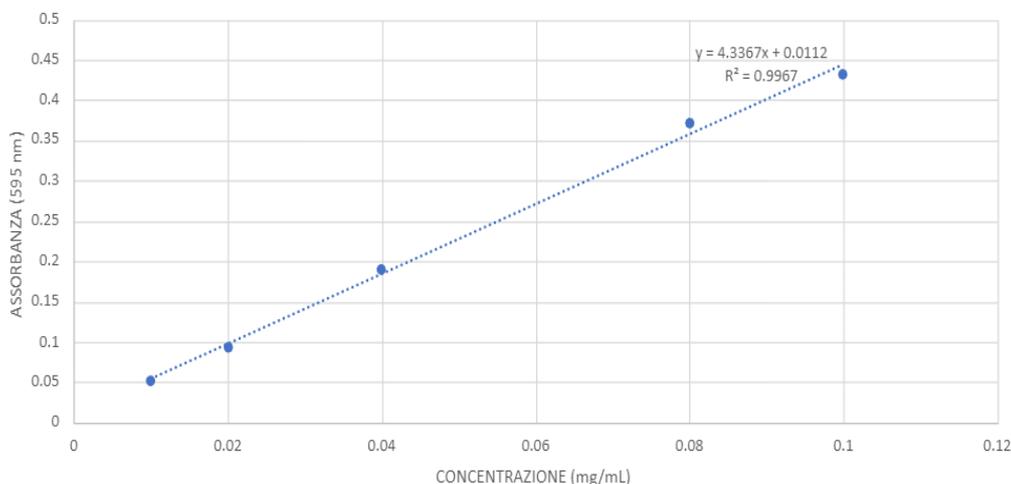
- Curva standard: alle soluzioni di BSA preparate (100 µL, 80 µL, 60 µL, 40 µL, 20 µL, 10 µL) è stato aggiunto 1 mL di soluzione Bradford;
- Campioni: 100 µL di campioni diluiti 1:100 con 1 mL di soluzione Bradford 1:4;
- Bianco: 100 µL di acqua distillata con 1 mL di soluzione Bradford 1:4.

Tutte le cuvette sono state tenute al buio per 5 min e successivamente è stata letta l'assorbanza a 595 nm con uno spettrofotometro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Giappone).

La formula usata per la quantificazione delle proteine è stata la seguente:

$$\text{Concentrazione} = \frac{\text{Abs campione} - a}{b} \quad (7.1)$$

dove  $\text{Abs}_{\text{campione}}$  è l'assorbanza del campione a 595 nm, mentre  $a$  e  $b$  sono rispettivamente il coefficiente angolare e l'intercetta all'origine della retta di taratura.



**Figura 7.7:** Curva standard ottenuta tramite soluzioni di BSA.

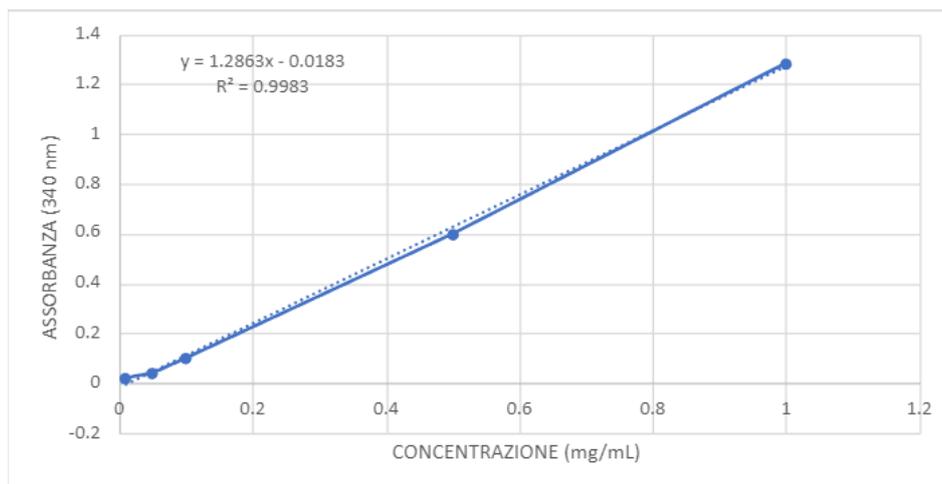
#### 7.4.2 - Concentrazione dei peptidi

Questo tipo di saggio è un'analisi spettrofotometrica per la quantificazione dei peptidi. Si basa sulla molecola OPA (o-phthalaldehyde) che, in presenza di mercaptoetanolo, si lega ai gruppi amminici degli amminoacidi. È stata preparata la soluzione OPA con 25 mL di tetraborato di sodio 0,1 M, 2,5 mL di dodecilsofato di sodio SDS al 20%, 40 mg di o-phthalaldehyde disciolta in 1 mL di metanolo, 100  $\mu\text{L}$  di  $\beta$ -mercaptoetanolo e il tutto è stato portato a volume di 50 mL con acqua distillata. Per la curva standard di taratura è stata preparata una soluzione con l'amminoacido serina a diverse concentrazioni (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,01 mg/mL). In ogni cuvetta sono stati inseriti 950  $\mu\text{L}$  di soluzione OPA e 50  $\mu\text{L}$  di campione diluito. L'assorbanza di ciascun campione è stata letta a 340 nm con uno spettrofotometro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Giappone).

La formula usata per la quantificazione delle proteine è stata la seguente:

$$\text{Concentrazione} = \frac{\text{Abs campione} - a}{b} \quad (7.2)$$

dove  $\text{Abs}_{\text{campione}}$  è l'assorbanza del campione a 340 nm, mentre  $a$  e  $b$  sono rispettivamente il coefficiente angolare e l'intercetta all'origine della retta di taratura.



**Figura 7.8:** Curva standard ottenuta tramite soluzioni di serina.

## 7.5 - Attività antiossidante

### 7.5.1 - Saggio DPPH

L'attività di scavenging dei radicali DPPH è stata determinata secondo il metodo di Molyneux et al. (2004) con lievi modifiche. I composti antiossidanti hanno la capacità di trasferire un atomo di idrogeno al radicale DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile). L'elettrone spaiato dell'atomo di azoto del DPPH viene ridotto all'idrazina corrispondente ricevendo un atomo di idrogeno dall'antiossidante. Più la concentrazione del composto antiossidante è alta, più la soluzione contenente DPPH si decolora poiché l'atomo di idrogeno dell'antiossidante si va a legare al radicale stabilizzandolo; perciò, via via la soluzione passa da un colore viola scuro a giallo. Per eseguire tale saggio, un'aliquota di 100  $\mu$ L di idrolizzato fresco (o una soluzione di 1 mg/ml di campione liofilizzato) e acido ascorbico come controllo positivo sono stati miscelati con 2,9 mL di DPPH 0,1 mM in metanolo. Soluzioni di acido ascorbico a diverse concentrazioni (1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 2,5 ppm) sono state utilizzate per costruire una curva standard di taratura. Per fare ciò è stata utilizzata una soluzione madre di acido ascorbico 2 mg/mL da cui sono state prelevate varie aliquote e diluite con acqua distillata in modo da avere le concentrazioni desiderate.

Le miscele sono state incubate al buio per 30 minuti e l'assorbance è stata misurata a 517 nm. Per il bianco, sono stati utilizzati 100  $\mu$ L di acqua distillata e 2,9 mL di soluzione DPPH.

Per questo metodo, l'attività di scavenging dei radicali liberi è stata calcolata con la seguente equazione:

$$Inibizione\ DPPH\ (\%) = \left( \frac{Abs\ controllo - Abs\ campione}{Abs\ controllo} \right) \times 100 \quad (7.3)$$

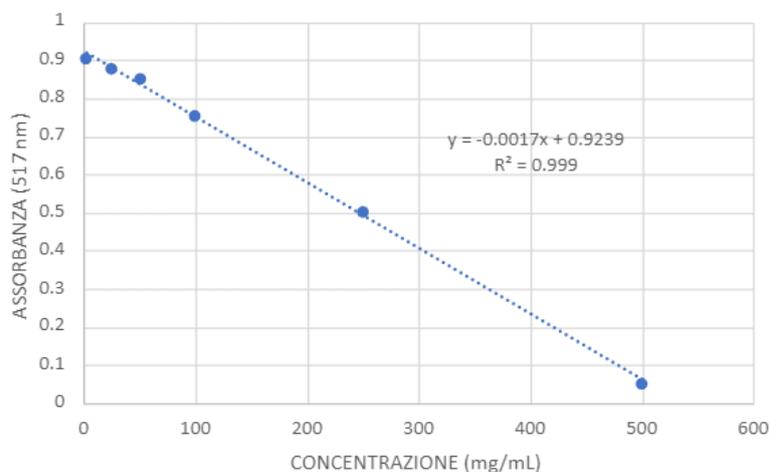
dove  $Abs_{controllo}$  è l'assorbanza della soluzione di DPPH eccetto il campione,  $Abs_{campione}$  è l'assorbanza del campione testato con la soluzione di DPPH.

La capacità antiossidante relativa a quella dell'acido ascorbico è stata calcolata utilizzando l'equazione generata con una curva standard dell'acido ascorbico come segue:

$$Equivalenti\ di\ acido\ ascorbico\ \left(\frac{mg}{mg}\right) = \left( \frac{Inibizione\ DPPH\ \% - b}{a} \right) \div concentrazione\ del\ campione \quad (7.4)$$

Dove  $a$  e  $b$  sono i due coefficienti della curva standard dell'acido ascorbico.

In base alle assorbanze e alle concentrazioni dello standard (acido ascorbico) si è costruita una retta di taratura che ha poi permesso di quantificare il potenziale antiossidante dei vari campioni (Fig. 7.9).



**Figura 7.9:** Retta di calibrazione ottenuta con le soluzioni di acido ascorbico.

Il saggio ABTS consente di determinare il potere antiossidante di matrici biologiche mediante la reazione tra il campione da analizzare con un radicale catione colorato e stabile, che in questo saggio viene generato tramite l'ossidazione dell'ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)) per mezzo di una soluzione di persolfato di potassio. I composti antiossidanti che sono in grado di trasferire uno o più atomi di idrogeno al radicale catione neutralizzandolo, determinano una decolorazione della soluzione che passa da blu-verde ad un colore molto più chiaro; con conseguente calo dell'assorbanza.

L'attività di scavenging dei radicali ABTS è stata determinata mediante saggio di decolorazione descritto da Re et al. (1999), con alcune modifiche. La soluzione di lavoro di ABTS è stata preparata mescolando una soluzione madre di 7 mM di ABTS e una soluzione di persolfato di potassio 2,6 mM in quantità uguali e facendo reagire per una notte a temperatura ambiente al buio. Per la preparazione della soluzione di ABTS 7 mM, 19,2 mg di ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)) sono stati solubilizzati in 5 mL di acqua distillata, mentre per la preparazione della soluzione di persolfato di potassio 2,6 mM sono stati solubilizzati 94,6 mg in 5 mL di acqua distillata. Quindi la soluzione di lavoro è stata diluita con etanolo in rapporto 1:100 per ottenere un'assorbanza di  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Successivamente, sono stati aggiunti 3 ml di soluzione di lavoro a 30  $\mu$ l di idrolizzati freschi o una soluzione di 1 mg/ml di campione liofilizzato. La correzione dell'assorbanza è stata quindi eseguita da un campione bianco preparato impiegando 30  $\mu$ l di etanolo/acqua 1/1 (v/v) al posto del campione. Le cuvette con i campioni e la soluzione di lavoro sono state incubate al buio per 5 minuti e l'assorbanza è stata misurata a 734 nm. Per la curva standard di taratura sono state preparate soluzioni di Trolox a diverse concentrazioni (400 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm). La percentuale di inibizione da ABTS+ ad ABTS è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

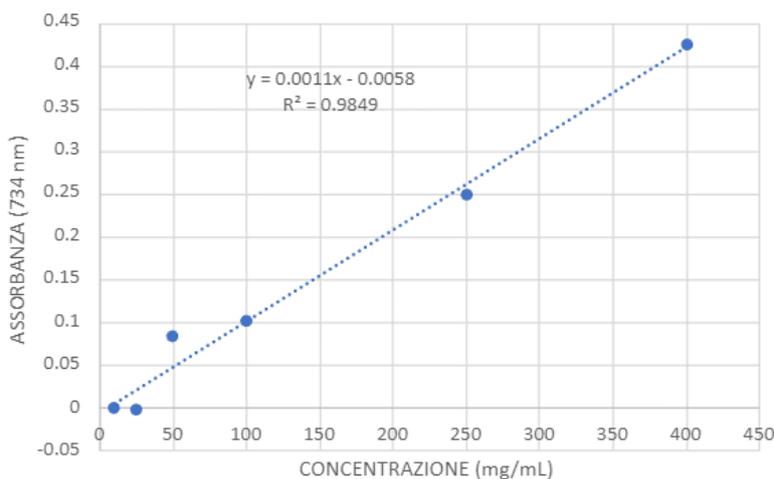
$$\text{Decolorazione ABTS (\%)} = \left( \frac{\text{Abs controllo} - \text{Abs campione}}{\text{Abs controllo}} \right) \times 100 \quad (7.5)$$

dove  $\text{Abs}_{\text{campione}}$  è l'assorbanza del campione testato con la soluzione ABTS, mentre  $\text{Abs}_{\text{controllo}}$  è l'assorbanza della soluzione ABTS senza campione.

La capacità antiossidante relativa a quella di Trolox è stata calcolata utilizzando l'equazione generata con una curva standard di Trolox come segue:

$$\text{Equivalenti di Trolox } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mg}}\right) = \left(\frac{\text{Decolorazione ABTS}-b}{a}\right) \div \text{concentrazione del campione} \quad (7.6)$$

Dove  $a$  e  $b$  sono i due coefficienti della curva standard di Trolox. Per stimare il  $\mu\text{mol}$  di Trolox/g di prodotto è stato utilizzato il peso molecolare del Trolox (250,29 g/mol).



**Figura 7.10:** Curva standard ottenuta con le soluzioni di Trolox.

## 7.6 – Analisi dei composti volatili

La microestrazione in fase solida (Solid Phase Micro Extracion, SPME) combinata alla gas cromatografia e spettrometria di massa (GC-MS) è una tecnica analitica che permette di valutare e quantificare i composti volatili di un campione sfruttando il principio della ripartizione dell'analita tra due fasi (fase mobile e fase stazionaria). I profili delle molecole volatili sono stati rilevati con la tecnica SPME/GC-MS. Una fibra DVB/CAR/PDMS (SUPELCO, Bellafonte, PA, USA) è stata utilizzata per eseguire la microestrazione in fase solida (SPME). Il campione (3 g) è stato posto in vial e incubato per 10 minuti a 45°C. Quindi la fibra è stata esposta allo spazio di testa del vial per 30 minuti a 45 °C. Le molecole volatili adsorbite sono state desorbite nella porta dell'iniettore del gascromatografo (GC) in modalità splitless a 250 °C per 10 minuti. Lo spazio di testa dei composti volatili è stato analizzato utilizzando gascromatografia (GC) 6890N, Network GC System con spettrometria di massa (MS) 5970 MSD (Agilent Hewlett–Packard, Ginevra, Svizzera).

La colonna utilizzata era J&W CP-Wax 52 CB (50m×320  $\mu\text{m}$ ×1,2 $\mu\text{m}$ ). La temperatura iniziale era di 40°C per 1 min e poi è aumentata di 4,5 °C/min fino a 65°C. Successivamente, la temperatura è aumentata di 10 °C/min fino a 230 °C ed è rimasta a questa temperatura per 17 minuti. I composti

sono stati identificati per confronto sulla base del database NIST 11 (National Institute of Standards and Technology). Il vettore di gas era elio a 1,0 mL/min di flusso.



**Figura 7.11:** Vial con inserita la fibra per la microestrazione.

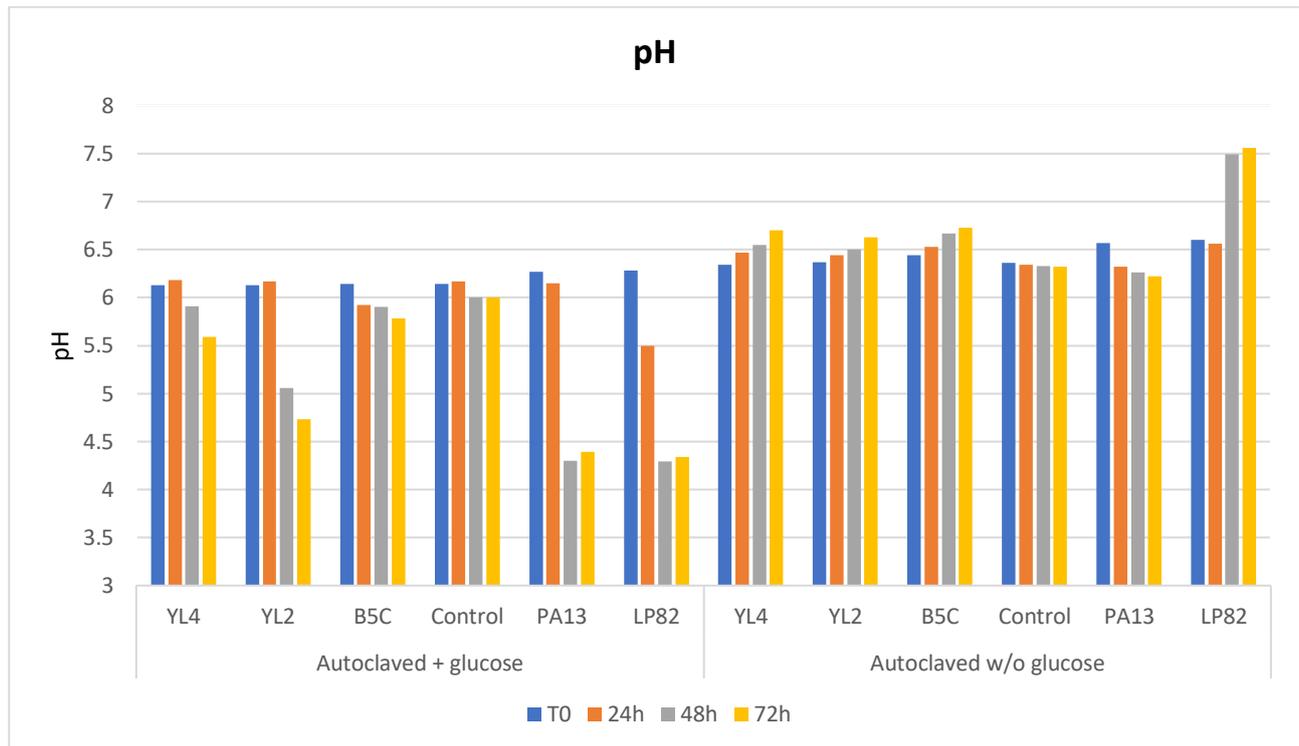
### **7.7– Analisi statistica**

La significatività dei dati (contenuto peptidico, grado di idrolisi, attività antiossidante) è stata valutata utilizzando ANOVA seguito da Tukey HSD Post-Hoc Test a  $p < 0,05$  eseguito con il software Statistica (v. 8.0; StatSoft, Tulsa, OK, USA). I profili delle molecole volatili sono stati analizzati utilizzando un'analisi dei componenti principali (PCA) con il software Statistica.

## **CAPITOLO 8**

### **RISULTATI**

## 8.1- Misura del pH



**Figura 8.1:** Andamento del pH durante le fermentazioni

L'andamento del pH per tutto il periodo di fermentazione è riportato in Fig. 8.1. Nei campioni autoclavati e arricchiti in glucosio si è assistito ad un'acidificazione progressiva nel tempo. In particolare, la maggiore acidificazione è avvenuta con i ceppi di batteri lattici PA13 e LP82 che hanno raggiunto valori di pH di 4.3. Nei campioni contenenti i ceppi di lievito YL4 e YL2 c'è stata sempre acidificazione ma solo dopo 48-72h. Questa acidificazione ad opera dei ceppi di *Y. Lipolytica* probabilmente è data dal fatto che tale lievito, in determinate condizioni (rapporto elevato C/N, in questo caso dovuto all'aggiunta di glucosio), riesce a produrre acido citrico, acidificando così tutto il sistema (Gottardi et al., 2021). Nessuna acidificazione è avvenuta nel controllo, mentre nel campione con B5C è stata minima. Nei campioni senza glucosio, non c'è stata acidificazione, al contrario in alcuni campioni come LP82, c'è stato un aumento del pH fino a 7.4.

## 8.2- Analisi microbiologica

**Tabella 8.1:** Carico microbico dei ceppi selezionati (espresso in log UFC/g) in beuta durante la fermentazione

		T0		T96h senza glucosio		T96h con glucosio	
		Log ufc/g	dvs	Log ufc/g	dvs	Log ufc/g	dvs
YPD	C	<1	-	<1	-	<1	-
	YL4	4.9	±0.2	6.0	±0.2	7.6	±0.1
	YL2	5.0	±0.1	6.6	±0.2	7.3	±0.3
	B5C	<1	-	<1	-	<1	-
	PA13	<1	-	<1	-	<1	-
	LP82	<1	-	<1	-	<1	-
PCA	C	<1	-	6.1	±0.1	7.1	±0.3
	YL4	<1	-	<1	-	5.6	±0.1
	YL2	<1	-	<1	-	5.8	±0.3
	B5C	6.4	±0.1	8.5	±0.3	8.7	±0.3
	PA13	<1	-	7.7	±0.2	9.1	±0.2
	LP82	<1	-	7.3	±0.2	7.4	±0.3
MRS	C	<1	-	6.0	±0.1	7.0	±0.1
	YL4	<1	-	<1	-	6.1	±0.2
	YL2	<1	-	<1	-	5.9	±0.3
	B5C	6.2	±0.4	8.9	±0.4	8.7	±0.2
	PA13	7.1	±0.4	6.8	±0.2	8.5	±0.2
	LP82	6.6	±0.2	6.5	±0.1	7.7	±0.2

Il campione utilizzato per la prova era composto da scarti di cefalo (*Mugil cephalus*). Da un campionamento della matrice di partenza è stata evidenziata la presenza di batteri mesofili (4.9 log UFC/g) e di lieviti (3.7 log UFC/g). Pertanto, è stato necessario procedere con la sterilizzazione del campione. Tale processo ha ridotto la carica microbica sotto il limite di quantificazione (1 log ufc/g). In Tab. 8.1 sono riportate anche le concentrazioni degli inoculi dei vari ceppi selezionati aggiunti al campione. Per i lieviti, la concentrazione iniziale ottenuta era di 4.9 e 5.0 log UFC/g per YL4 e YL2, rispettivamente, per il ceppo di *Bacillus* (B5C) 6.4 log UFC/g e per i batteri lattici PA13 e LP82 l'entità di inoculo era 7.1 log UFC/g e 6.6 log UFC/g, rispettivamente.

Si può ben notare come l'assenza di glucosio abbia giocato un ruolo importante nella crescita di alcuni microrganismi. In particolare, nei ceppi di *Y. lipolytica* è evidente la differenza di 1 log UFC/g tra i campioni senza glucosio, in cui la crescita massima è stata di circa 6.0 log UFC/g, e i campioni con glucosio, in cui la crescita ha raggiunto e superato i 7 log UFC/g. Andamento simile si è riscontrato nei ceppi di batteri lattici, in cui l'assenza di glucosio sembra che abbia addirittura inibito leggermente la crescita.

Per il ceppo di *Bacillus* B5C, invece, sembra che l'assenza o presenza di glucosio non abbia effetti sulla sua crescita, in quanto in entrambe le condizioni la sua concentrazione è aumentata di circa 2 log UFC/g.

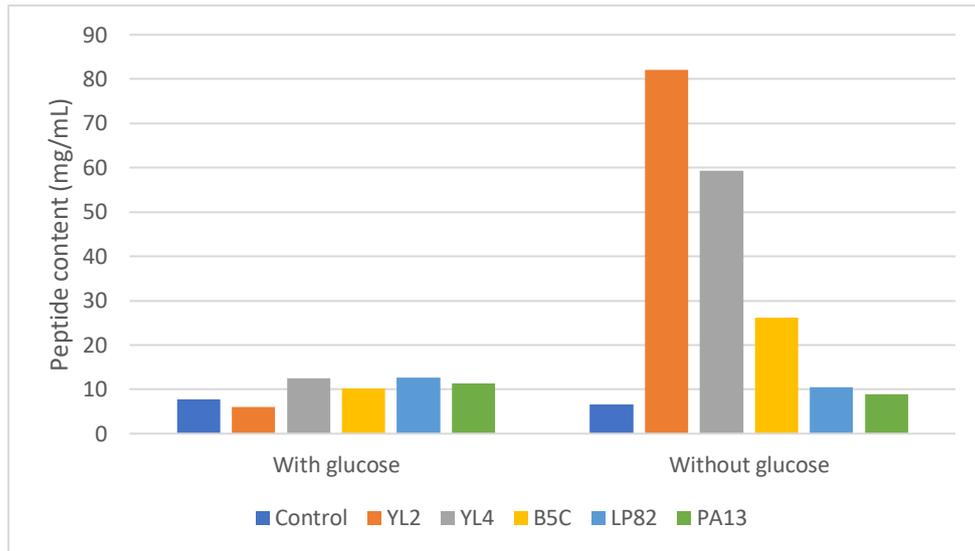
A fine fermentazione, in tutti i campioni addizionati con glucosio (controllo compreso), c'è stata una crescita di batteri mesofili e batteri lattici di diversa entità. Questo fenomeno era del tutto inaspettato ed è probabilmente causato dal fatto che, durante le fasi iniziali di macinatura degli scarti di pesce, siano rimasti alcuni pezzi di grandi dimensioni (come frammenti di testa, ossa, pinne, ecc.) che hanno poi ostacolato la trasmissione del calore durante il trattamento termico non consentendo quindi una sterilizzazione completa della matrice. A seguito di ciò, una parte di microflora indigena potrebbe essere sopravvissuta al trattamento ed essersi moltiplicata poi durante le fasi di fermentazione. Anche nei campioni senza glucosio ci sono state queste crescite anomale, tranne in quelli inoculati con i lieviti. Non sono, invece, state riscontrate crescite di lieviti indesiderate.

### **8.3 -Quantificazione del contenuto proteico e peptidico**

La quantificazione delle proteine è stata fatta con il saggio Bradford sul campione di scarto di pesce omogeneizzato per conoscere il contenuto proteico iniziale del prodotto. È risultato che lo scarto di pesce aveva un contenuto proteico di 0.69 g per grammo di scarto. A fine fermentazione è poi stato valutato il contenuto peptidico dei campioni tramite il saggio OPA. Dalla figura 8.2, si evince che in presenza di glucosio, c'è stato un aumento del contenuto di peptidi, rispetto al controllo, nei campioni inoculati con YL4, B5C, LP82 e PA13.

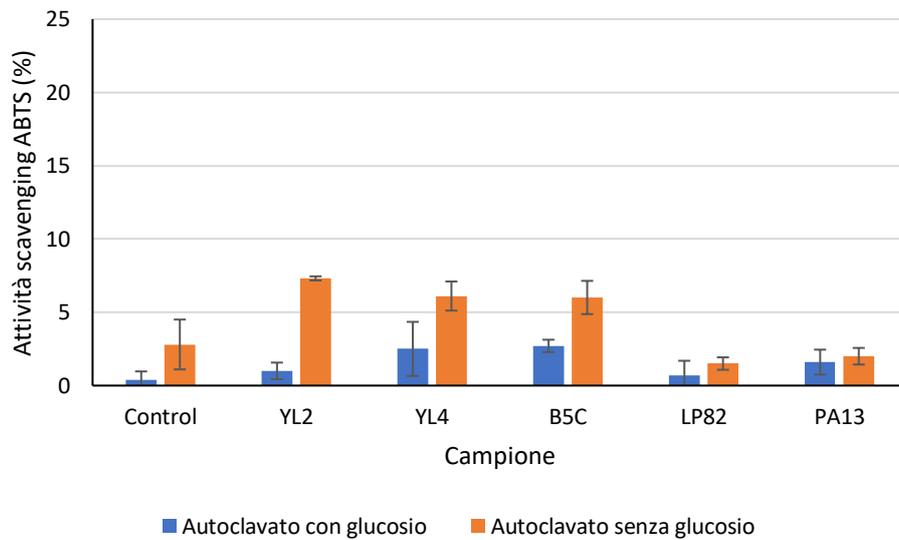
In assenza di glucosio, invece, i ceppi di *Y. lipolytica* hanno determinato il maggiore rilascio di peptidi (82.08 mg/ml). Quelli con un aumento inferiore, seppure significativo rispetto al controllo, sono stati quelli inoculati con i batteri lattici e *Bacillus*.

Questi risultati possono essere giustificati dalla maggiore concentrazione di proteine rispetto al glucosio, la quale favorisce la sintesi di proteasi da parte di *Yarrowia lipolytica* con un maggiore rilascio di peptidi. Tuttavia, il basso contenuto di peptidi nei batteri lattici può essere dato dalla crescita di altri microrganismi (come visto nella Tab. 7.1 su terreno PCA) oppure da un maggiore consumo di peptidi e amminoacidi liberati.

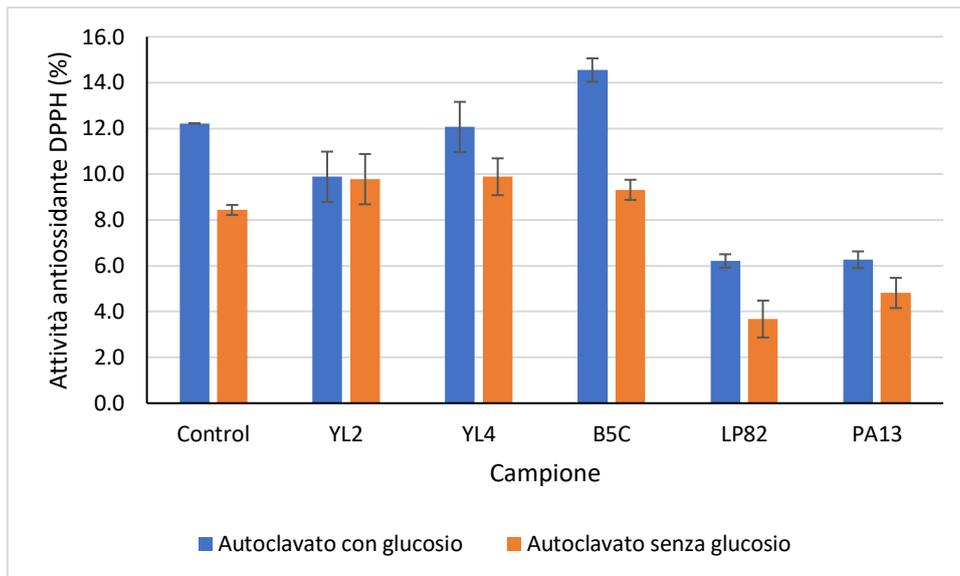


**Figura 8.2:** Concentrazione di peptidi negli idrolizzati ottenuti

#### 8.4- Attività antiossidante



**Figura 8.3:** Attività antiossidante dei campioni misurata tramite saggio ABTS



**Figura 8.4:** Attività antiossidante dei campioni misurata tramite saggio DPPH

L'attività antiossidante dei campioni è stata misurata tramite due saggi spettrofotometrici e i risultati sono riportati nelle Figure 8.3 (ABTS) e 8.4 (DPPH). Tali saggi, seppur misurano entrambi la stessa cosa, hanno delle differenze importanti da considerare: la soluzione ABTS è compatibile sia con solventi organici che acquosi, a differenza della soluzione DPPH che reagisce solo in solventi organici; questa è una grande limitazione per il saggio DPPH in quanto non è in grado di rilevare antiossidanti idrofobici. Inoltre, la soluzione ABTS è stabile a più valori di pH, a differenza della soluzione di DPPH che è più sensibile a pH acidi e questo potrebbe interferire con l'analisi a causa di possibili reazioni secondarie (Shalaby & Shanab, 2013).

Anche i pigmenti eventualmente presenti nei campioni possono interferire con le soluzioni di questi saggi. Infatti, più colore c'è in un campione, minore è la diminuzione dell'assorbanza e minore è l'attività antiossidante misurata. Queste interferenze nascono per la presenza di composti colorati (antociani, carotenoidi, ecc.) nei campioni o per la comparsa di prodotti di reazione secondari tra il cromogeno e i campioni in analisi. Pertanto, è consigliabile scegliere lunghezze d'onda lontane dalla regione del visibile per evitare queste interferenze. Nel caso del test ABTS il problema è meno grave in quanto il cromogeno presenta picchi di assorbanza a 730 e 842 nm. Nel caso del test DPPH invece il problema è più grave in quanto la soluzione non presenta picchi di assorbanza superiori a 515 nm. Pertanto, a lunghezze d'onda vicine alla regione visibile, l'attività antiossidante misurata è sottostimata a causa di interferenze del campione, come accade con la soluzione ABTS+ a 414 nm e con la soluzione DPPH a 515 nm (Arnao, 2000).

Dai risultati ottenuti, si nota come i due saggi abbiano dato risultati diversi. In particolare, i risultati del test DPPH sembrano essere più correlati alla presenza o meno di glucosio nei fermentati ottenuti, rispetto al contenuto peptidico. Infatti, si può vedere come nei campioni addizionati con glucosio il valore di attività antiossidante misurato con il test DPPH è più alto rispetto ai campioni senza glucosio; anche se nei campioni con glucosio il contenuto peptidico è minore. A seguito di ciò, si può ipotizzare che nei campioni con glucosio ci siano state altre molecole derivanti dal metabolismo del glucosio che hanno reagito con la soluzione DPPH, sovrastimando l'attività antiossidante.

Al contrario, i valori misurati tramite ABTS seguono molto bene il profilo di peptidi misurato tramite OPA, ovvero i campioni in cui c'è un contenuto peptidico maggiore sono quelli che hanno anche attività antiossidante più alta. Perciò, è presumibile che l'attività antiossidante è dovuta ai peptidi e non ad altro.

In base ai risultati raccolti, i microrganismi con attività antiossidante maggiore sono i ceppi di *Y. lipolytica* YL2 e YL4 e il ceppo *B. subtilis* B5C e questo andamento è correlabile con il contenuto peptidico ottenuto tramite saggio OPA.

He et al. (2013) hanno evidenziato come gli idrolizzati contenenti proteine derivanti da scarti di pesce abbiano spesso un'attività antiossidante superiore a quella degli antiossidanti sintetici comunemente utilizzati nell'industria alimentare (come il  $\alpha$ -tocoferolo e il butilidrossianisolo (BHA)), grazie alla presenza di amminoacidi come tirosina, triptofano, metionina, lisina, cisteina e istidina i quali fungono da donatori di protoni che reagiscono con gli elettroni spaiati dei radicali liberi. Durante la fermentazione ad opera di batteri e lieviti avviene l'idrolisi delle proteine, rilasciando peptidi ed amminoacidi che possono esplicare la loro attività antiossidante. Grazie a questo si concretizza la possibilità di utilizzare i fermentati da scarti di pesce al posto degli antiossidanti sintetici. Inoltre, questi idrolizzati possono essere utilizzati per aumentare la shelf-life dei prodotti in quanto riescono a prevenire e/o limitare l'ossidazione lipidica, scongiurando quindi la formazione di *off-flavour* e possibili composti tossici.

Da un altro studio (Kong et al., 2021) si è evidenziato come l'idrolizzato proteico di cefalo (*Mugil cephalus*) ha anche la capacità di chelare gli ioni ferro ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) andando a inibire le reazioni di Haber-Weiss e di Fenton che portano alla formazione di radicali idrossilici ( $\cdot OH$ ). Questa azione chelante è dovuta alla presenza di amminoacidi che contengono, nella loro catena laterale, gruppi carbossilici ed amminici in grado di catturare questi ioni.

Altri studi hanno evidenziato come i peptidi derivanti dall'idrolisi di proteine del pesce siano in grado anche di prevenire danni al DNA dovuti ai radicali liberi (Lee & Byun, 2019) e anche come questi peptidi abbiano attività antiossidante *in vivo* su ratti andando a ridurre il danno ossidativo a tessuti e

organi (Nazeer et al., 2012). Tutto questo grazie alla presenza di aminoacidi idrofobici come cisteina, metionina, triptofano, tirosina e prolina.

## 8.5- Composti volatili

Con l'analisi SPME-GC-MS degli idrolizzati ottenuti da scarti di pesce fermentati dai ceppi YL2 e YL4 di *Y. lipolytica*, dal ceppo B5C di *B. subtilis* e dai ceppi PA13 e LP82 di batteri lattici sono stati rilevati ed identificati più di 160 composti, come mostrato in Tabella 8.2. I composti sono stati suddivisi secondo l'appartenenza alle varie classi di molecole e sono stati numerati per poterli identificare meglio nei grafici ottenuti con l'analisi delle componenti principali (PCA).

**Tabella 8.2:** Composti volatili determinati sui campioni fermentati con i diversi microrganismi selezionati (YL4, YL2, B5C, LP82, PA13). I dati sono espressi in abbondanza relativa (%) rispetto al totale.

Molecola	Codice	Senza glucosio (%)							Con glucosio (%)					
		C	YL4	YL2	B5C	LP82	PA13	C	YL4	YL2	B5C	LP82	PA13	
ALCOLI	1-Butanol	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36
	1-Butanol, 3-methyl-	2	0.00	4.89	11.27	0.00	26.66	0.00	1.84	7.42	3.91	0.00	0.00	0.00
	1,3-Benzenediol, 4-ethyl-	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.20
	1-Hexanol	4	3.00	1.02	0.57	4.14	1.04	2.08	3.10	0.50	0.33	2.63	6.30	3.86
	1-Hexen-3-ol	5	0.00	3.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1-Nonanol	6	0.00	0.28	0.00	0.67	0.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39	0.56
	1-Octanol	7	0.71	0.72	0.50	0.91	0.87	1.09	0.00	0.00	0.00	0.51	1.17	0.93
	1-Octen-3-ol	8	7.38	6.00	3.62	2.72	6.70	7.10	4.34	3.10	1.33	3.46	6.78	3.81
	1-Pentanol	9	2.72	0.00	1.82	0.32	2.52	3.32	1.14	5.41	1.04	2.29	5.01	2.60
	1-Penten-3-ol	10	1.67	3.18	1.81	0.40	2.10	2.66	0.63	2.16	0.00	0.52	4.13	1.75
	1-Propanol	11	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1-Propanol, 3-(methylthio)-	12	0.00	0.74	0.98	0.17	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2,4-Decadien-1-ol	13	0.00	0.00	0.00	0.22	0.11	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.25	0.00
	2-Hepten-1-ol, (E)-	14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.05
	2-Hexanol	15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57	0.00	0.29	0.00
	2-Hexen-1-ol	16	0.28	0.68	1.02	0.00	0.19	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.94	0.18
	2-Octen-1-ol, (E)-	17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.08
	2-Penten-1-ol	18	1.90	0.78	0.48	1.60	0.69	2.11	1.72	0.97	0.38	0.72	2.13	1.21
	2-Furanmethanol	19	0.39	0.53	0.40	0.00	0.00	0.59	1.93	1.33	0.76	0.95	1.04	0.07
	3,4-Pentadien-1-ol, 2,2-dimethyl-	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10
	3,6,9,12-Tetraoxatetradecan-1-ol	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.18
	3-Hexanol, 5-methyl-	22	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	0.89	0.00	0.00	0.26	0.00
	3-Hexen-1-ol	23	0.00	0.57	0.15	0.00	1.19	0.08	0.00	0.71	0.00	0.00	0.23	1.16
	3-Pentanol, 2,4-dimethyl-	24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00
	3-Pentanol, 2-methyl-	25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	0.00	0.00	0.74	0.25	0.17
	3-Penten-1-ol, (E)-	26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00

	4-Hexen-1-ol, (Z)-	27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.48	0.00	0.00	0.00
	5-Octen-1-ol, (Z)-	28	1.72	1.21	1.04	1.89	0.90	1.84	0.87	0.41	0.00	0.40	0.92	1.34
	Benzyl alcohol	29	0.00	0.33	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.05
	Cyclohexanol, 2,6-dimethyl- Cyclohexanol, 3,5-dimethyl- OPPURE 3,4-Dimethylcyclohexanol	30	0.34	0.76	0.50	0.19	0.33	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
	Ethanol	32	0.00	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.72	1.62	0.81	0.00	0.00
	Phenol	33	0.63	0.00	0.00	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12
	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	34	0.00	2.80	0.00	1.24	0.00	0.00	0.00	7.61	2.94	0.00	0.00	0.00
	Phenol, 2-ethyl-4,5-dimethyl-	35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.29	0.00	0.36	0.44
	Phenol, 3-ethyl-	36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.58	0.00
	Phenol, 4-ethyl-	37	0.10	0.00	0.00	1.21	0.14	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37
	Phenylethyl Alcohol	38	0.00	20.99	27.91	0.75	6.51	0.00	0.39	5.51	2.10	0.00	0.11	0.07
	trans,cis-2,6-Nonadien-1-ol	39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00
CHETONI	3-Octanone	40	0.17	0.53	0.00	0.56	1.05	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28	0.26
	3-Octen-2-one	41	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06
	3-Pentanone	42	0.00	4.79	3.05	0.39	0.00	0.00	0.00	2.28	0.00	0.49	1.15	0.00
	3-Penten-2-one, 4-methyl- 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5- dihydroxy-6-methyl-	43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.11	1.08	0.00	0.00
	44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6-Octen-2-one, (Z)-	45	0.09	0.26	0.00	0.00	3.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	7-Octen-2-one	46	1.59	1.12	0.73	1.28	4.08	2.35	0.00	0.37	0.00	0.24	0.65	0.00
	Acetoin	47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	23.16	1.73	15.49	46.06	0.00	0.00
	Acetone	48	0.00	3.73	5.22	0.00	0.19	0.11	0.00	2.54	0.00	0.00	0.00	0.00
	Cyclopentanone, 2-ethyl-	49	0.00	0.50	0.57	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Methyl Isobutyl Ketone	50	0.27	0.56	0.20	0.00	0.43	0.19	0.86	2.04	1.18	0.94	0.46	0.10
	Nona-3,5-dien-2-one	51	1.26	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Hexanone, 5-methyl-	52	0.00	0.00	0.83	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	trans-3-Nonen-2-one	53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56
	3,5-Octadien-2-one	54	14.99	0.62	0.54	20.78	4.93	14.56	1.63	0.00	0.00	0.58	6.81	12.51
ALDEIDI	2,4-Decadienal	55	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.20
	2,4-Heptadienal, (E,E)-	56	1.70	0.43	0.64	1.11	0.13	2.71	0.00	0.00	0.00	0.00	4.90	5.78
	2,4-Hexadienal, (E,E)-	57	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.81	1.11
	2,4-Nonadienal, (E,E)-	58	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2,5-Octanedione	59	0.00	0.00	0.00	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Butenal	60	0.28	0.00	0.00	0.42	0.00	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	0.22
	2-Butenal, 2-methyl-	61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00	0.00	0.09
	2-Heptenal, 2-methyl-	62	0.21	0.42	0.29	1.22	1.82	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Hexenal, (E)-	63	2.23	0.27	0.47	2.39	0.39	2.99	0.00	0.00	0.00	0.00	1.82	1.37
	2-Hexenal, 2-methyl-	64	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Nonenal, (E)-	65	0.65	0.36	0.27	0.43	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21	0.48
	2-Octenal, (E)-	66	0.73	0.97	1.90	0.84	0.11	6.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Pentenal, (E)-	67	1.98	0.00	0.72	0.00	0.16	2.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29
	2-Pentenal, 2-ethyl-	68	1.52	0.00	0.00	0.15	0.00	2.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Pentenal, 2-methyl-	69	4.59	0.00	0.00	0.25	0.00	3.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3-Thiophenecarboxaldehyde	70	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.20
	5-Ethyl-2-furaldehyde	71	0.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49	0.42
	Benzaldehyde Benzaldehyde, 2,5- bis(trimethylsilyloxy)-	72	3.43	2.19	1.37	1.81	0.12	3.45	1.51	3.43	0.51	0.58	3.14	2.26
	73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85	0.43	0.00	0.00	0.00	0.96	0.00	0.00	0.00
	Benzaldehyde, 3,4-dimethyl-	74	0.37	0.30	0.00	0.32	0.00	0.22	0.56	0.90	0.35	0.00	0.20	0.11



	Cyclopentene, 1-isopropyl-2,3-dimethyl-	121	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Cyclopropane, 2-methylene-1-propionyl-	122	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.71	0.00
	Decane	123	0.13	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Decane, 3,6-dimethyl-	124	0.75	0.49	1.29	0.21	0.37	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.09
	Decane, 3,8-dimethyl-	125	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Decane, 4-methyl	126	0.57	0.79	0.88	0.00	0.00	0.00	1.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Diisopropyl methanephosphonate	127	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.79	0.00	0.00
	Dodecane	128	0.24	0.23	0.53	0.59	0.28	0.20	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00
	Dodecane, 3-methyl-	129	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	E,Z-3-Ethylidenecyclohexene	130	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37
	Heneicosane	131	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.72	0.00	0.00
	Hexadecane	132	1.77	0.83	0.51	11.26	5.68	1.86	2.72	7.82	3.73	0.66	1.21	4.96
	Nonane, 2-methyl-	133	0.09	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Octane, 4-methyl-	134	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10
	Octatriene, 1,3-trans-5-trans-	135	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Tetradecane	136	0.23	0.00	1.36	0.65	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	1.46	0.00	0.15
FURANI	(2-Penteny)furan	137	0.83	0.25	0.77	0.80	1.35	1.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-n-Butyl furan	138	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28
	Furan, 2-ethyl-	139	0.51	0.28	0.16	0.00	0.58	0.55	0.00	0.97	0.33	1.76	2.54	3.01
	Furan, 2-pentyl-	140	0.54	0.00	0.14	0.81	0.71	0.29	0.00	0.00	0.41	0.69	0.00	1.56
	Furan, 2-propyl-	141	0.14	0.00	0.00	0.24	0.28	0.26	0.00	0.00	0.00	0.27	0.57	0.58
	Furan, 3-methyl-	142	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50	0.44	0.00	0.44	0.00
	cis-2-(2-Penteny)furan	143	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.00	7.54
	trans-2-(2-Penteny)furan	144	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.33	0.00
ALTRI	1,3-Benzodioxole, 5-propyl-	145	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00
	1,4-Pentanediamine	146	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.79	0.00	0.99	0.00	0.00	0.00
	1-Octyl trifluoroacetate	147	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Acetylthiazole	148	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00
	2-Ethylacrolein	149	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00
	2-Mercapto-4-phenylthiazole	150	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00
	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	151	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	152	5.60	4.36	6.37	3.81	2.14	1.32	2.19	1.76	2.26	2.60	0.41	0.17
	Carane, 4,5-epoxy-, trans	153	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.48
	Chloroacetic acid, nonyl ester	154	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Diaziridine,1,3,3-trimethyl-	155	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00
	Diisopropyl methanephosphonate	156	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.79	0.00	0.00
	D-Limonene	157	0.43	0.00	0.48	0.00	0.51	0.30	0.37	0.00	0.00	0.00	0.48	0.93
	Heneicosane	158	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.72	0.00	0.00
	Indole	159	0.00	0.00	0.00	3.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16
	Methanamine, N-pentylidene-	160	0.00	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Methylamine, N,N-dimethyl-	161	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	N-Methyl-4-pyridinamine	162	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Octaethylene glycol monododecyl ether	163	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85	0.00	0.00	0.00
	Oxime-, methoxy-phenyl-_	164	0.60	0.00	0.24	0.00	0.20	0.38	0.61	0.72	3.02	0.00	0.19	0.00
	<i>Area totale</i>		6.0E+08	3.1E+08	3.9E+08	4.4E+08	5.6E+08	8.3E+08	1.5E+08	1.4E+08	1.7E+08	2.5E+08	6.1E+08	1.1E+09

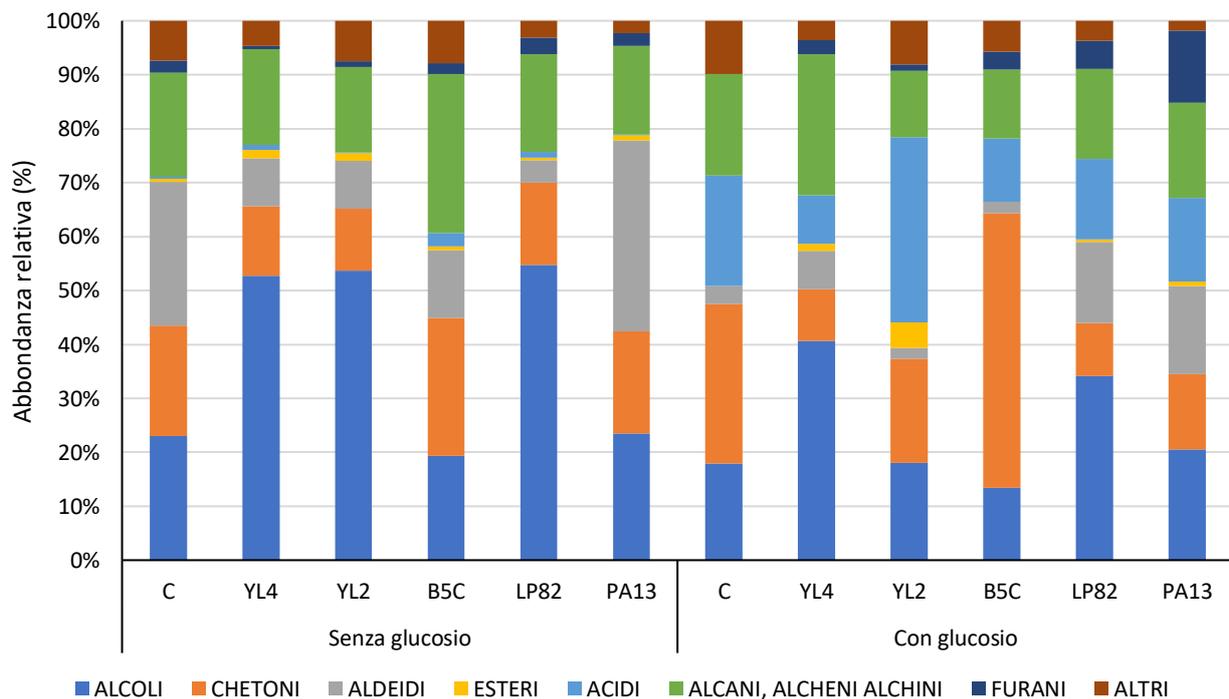
Si può notare come in tutti i campioni analizzati sono presenti molecole appartenenti a molte classi di composti (alcoli, chetoni, aldeidi, esteri, alcani, alcheni, alchini, furani e altri) in presenza più o

meno abbondante. Sommando le aree dei picchi dei cromatogrammi ottenuti tramite analisi SPME-GC-MS, relativi ai vari composti volatili in ogni campione, si è visto che a fine fermentazione, nei campioni senza glucosio, il ceppo PA13 ha prodotto il maggior numero di composti volatili (area totale:  $8,3 \cdot 10^8$ ), seguito poi dal campione di controllo ( $6,0 \cdot 10^8$ ), da LP82 ( $5,6 \cdot 10^8$ ), da B5C ( $4,4 \cdot 10^8$ ) ed infine dai ceppi YL2 e YL4 ( $3,9 \cdot 10^8$  e  $3,1 \cdot 10^8$ ; rispettivamente).

Nei campioni addizionati con glucosio, il microrganismo che ha prodotto maggiori composti volatili è stato PA13 ( $1,1 \cdot 10^9$ ) seguito poi dal ceppo LP82 ( $6,1 \cdot 10^8$ ), da B5C ( $2,5 \cdot 10^8$ ) ed infine dai ceppi YL2 e YL4 ( $1,7 \cdot 10^8$  e  $1,4 \cdot 10^8$ ; rispettivamente).

In entrambe le condizioni, i ceppi di batteri lattici si sono dimostrati i maggiori produttori di composti volatili. Nei campioni in cui la somma delle aree dei composti volatili rilevati tramite SPME-GC-MS è diminuita potrebbe essere avvenuta una perdita di questi a causa dell'utilizzo di molecole da parte del microrganismo durante la fermentazione, oppure anche per evaporazione.

La figura 8.5 mostra l'abbondanza percentuale delle varie classi di molecole nei campioni testati.



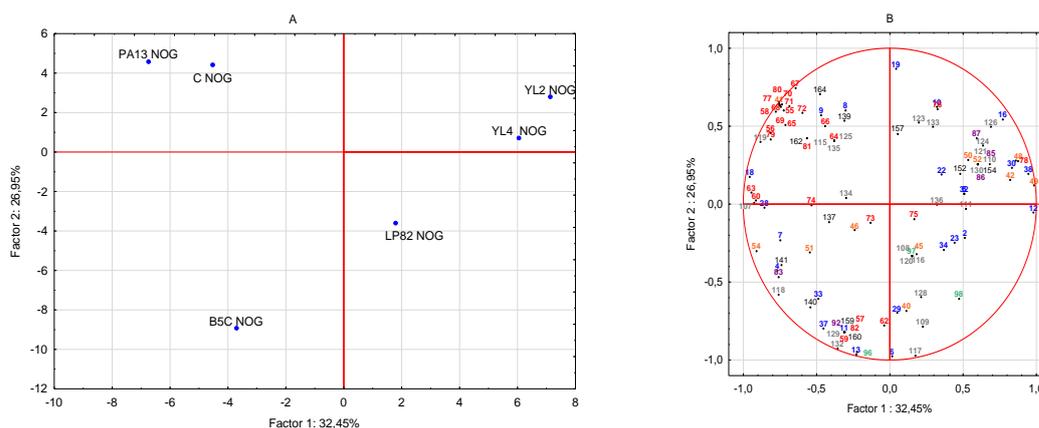
**Figura 8.5:** Classi di composti volatili rilevati e identificati nei campioni di scarto di pesce fermentato dai microrganismi selezionati. I risultati sono espressi in abbondanza relativa percentuale (%).

Da tale figura si può notare che nei campioni senza glucosio c'è un aumento dell'abbondanza di alcoli ed esteri nei fermentati con i lieviti (52,07% in YL2 e 49,44% in YL4) ed alcoli anche in quello con LP82 (51,10%), rispetto al controllo. Nel fermentato con B5C c'è una maggiore abbondanza di alcani,

alcheni ed alchini (27,99%), rispetto al controllo. In presenza di glucosio, nei fermentati con i lieviti si continua ad avere un rapporto maggiore di esteri e alcoli (soprattutto in YL4, con 38,38% di alcoli e 1,27% di esteri), rispetto al controllo. Il campione con B5C ha una maggiore abbondanza di chetoni (49,38%), i campioni fermentati con i batteri lattici LP82 e PA13 presentano invece una maggiore percentuale di furani ed alcoli rispetto al controllo.

L'elevata presenza di alcoli nei campioni senza glucosio inoculati con YL2 e YL4 è dovuta molto probabilmente al coinvolgimento della via metabolica "*Ehrlich pathway*" grazie alla quale *Yarrowia* può produrre alcoli superiori a partire da amminoacidi aromatici (Phe, Tyr, Trp) e/o ramificati (Val, Leu), oltre a produrre anche esteri (Celinska et al., 2019). Tuttavia, secondo dati di letteratura, questa via è perseguita quando c'è glucosio, non senza. In quel caso sarebbero maggiori gli acidi, sempre ottenuti dalla medesima via metabolica (Hazelwood et al., 2008). Bisogna però considerare che lo scarto del pesce contiene anche grandi quantità di lipidi, tra cui acidi grassi insaturi da cui si possono produrre alcoli (Ianni et al., 2020).

Per quanto riguarda gli altri composti identificati, è difficile ipotizzare da quale via metabolica e da quali microrganismi siano stati prodotti in quanto dipende da molti fattori. Tali composti derivano sia dal metabolismo primario che secondario del microrganismo, partendo da precursori come amminoacidi, acidi grassi, acetilCoA, piruvato, ecc. Un altro fattore importante è l'ambiente in cui si svolge la fermentazione: infatti, sono possibili delle reazioni tra alcuni composti e l'ossigeno, nel caso di fermentazioni aerobiche (ad esempio alcoli ossidati ad aldeidi o acidi carbossilici) oppure sono possibili reazioni tra i vari composti già formati per crearne altri (Korpi, Jarnberg & Pasanen, 2009). In Figura 8.6, è riportata l'analisi PCA dei composti volatili sui campioni fermentati con o senza glucosio. La componente 1 spiega il 32,45% della varianza e la componente 2 il 26,95%. In figura 8.6A è possibile notare che i campioni hanno formato 4 cluster: uno con il ceppo PA13 e il controllo (in alto a sinistra), uno con i due ceppi di *Y. lipolytica* YL2 e YL4 (in alto a destra), uno con il ceppo di batterio lattico LP82 (in basso a destra) e l'ultimo con il ceppo di *Bacillus* B5C (in basso a sinistra). Dalla formazione di questi cluster è possibile affermare che i composti volatili ottenuti dai fermentati con i ceppi di *Y. lipolytica* sono molto simili tra loro, stessa cosa vale anche per il cluster con PA13 e il campione di controllo.



**Figura 8.6:** Plot di casi (A) e variabili (B) ottenuti tramite elaborazione PCA relativa al totale delle molecole volatili caratterizzanti i campioni di scarto di pesce fermentato dai ceppi selezionati senza l'aggiunta di glucosio. La numerazione delle molecole nella figura B è quella riportata in tabella 8.2. Le classi principali di composti volatili sono state colorate diversamente: aldeidi in rosso, chetoni in arancione, alcoli in blu, esteri in viola, il gruppo alcani, alcheni, alchini in grigio e acidi in verde.

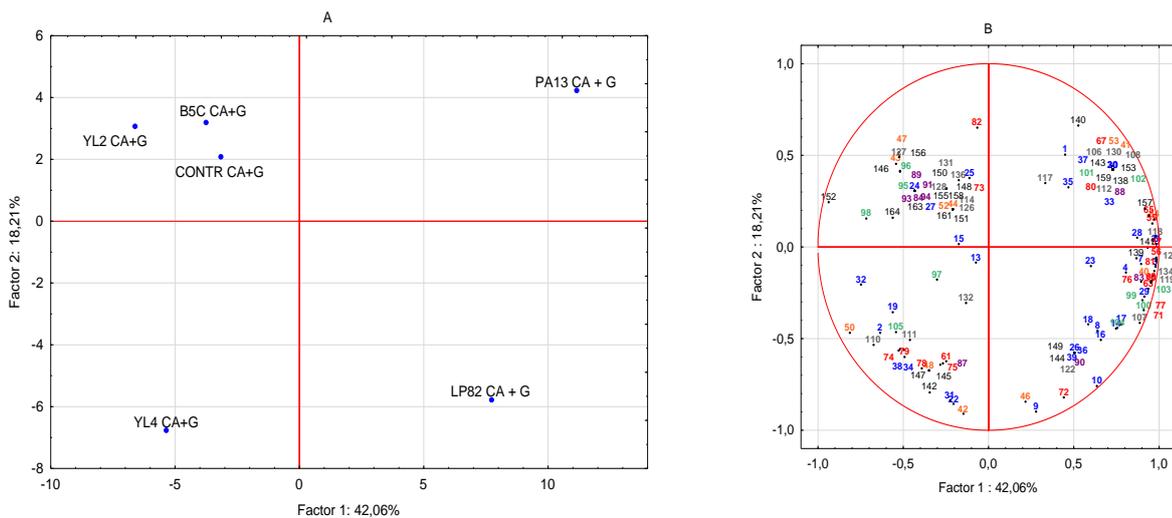
Nello specifico (Fig. 8.6B), si può notare come i campioni fermentati con i ceppi di *Y. lipolytica* siano caratterizzati dalla presenza di alcoli (2-hexen-1-ol, 2-furanmethanol, Ethanol), chetoni (Acetone, Cyclopentanone 2-ethyl-, Methyl Isobuthyl Ketone), esteri (Chloroacetic acid nonyl ester) e piccole tracce di aldeidi (Benzaldehyde 4-ethyl, Butanal 3-methyl). Queste molecole sono posizionate nel quadrante in alto a destra della Figura 8.6B, stessa posizione dei campioni fermentati con lieviti, come da Figura 8.6A.

Nel cluster di PA13 e del campione di controllo sono preponderanti le aldeidi (E-2-nonenal, E-2-octenal-, 2-pentenal 2-methyl) e in quantità minore gli alcoli (1-octen-3-ol, 1-pentanol).

Infine, nei cluster di B5C e LP82 alcoli, esteri ed aldeidi sono in maggioranza, con tracce minori di chetoni ed acidi.

Solitamente, gli alcoli non vengono avvertiti eccessivamente a livello aromatico a temperatura ambiente in quanto hanno una soglia di percezione alta, mentre gli esteri hanno una soglia di percezione talvolta dieci volte inferiore rispetto ai primi, che potrebbero essere i loro precursori. Però molto dipende dalla loro concentrazione e dalle altre molecole presenti nel campione con cui potrebbero interagire (Sun et al., 2016). È opportuno precisare che nei campioni sono state rilevate anche quantità importanti di alcani, alcheni ed alchini in tutti i campioni, ma questi composti generalmente non caratterizzano il profilo aromatico dei prodotti, tanto quanto lo fanno solitamente molecole appartenenti alle classi delle aldeidi, dei chetoni, degli alcoli, degli esteri e degli acidi.

I risultati dell'analisi PCA sui composti volatili dei campioni fermentati addizionati con glucosio sono riportati in Figura 8.7. In tale figura, la componente 1 spiega il 42,06% della varianza mentre la componente 2 ne spiega il 18,21%. In Figura 8.7A è possibile notare la presenza di 4 cluster suddivisi nel seguente modo: uno con il ceppo PA13 (in alto a destra), uno con il ceppo LP82 (in basso a destra), uno con il ceppo YL4 (in basso a sinistra) ed infine uno composto da YL2, B5C e il controllo (in alto a sinistra). Dai risultati ottenuti si può quindi affermare che i campioni fermentati con i ceppi YL2, B5C e il campione di controllo sono simili tra loro per quanto riguarda i composti volatili prodotti.



**Figura 8.7:** Plot di casi (A) e variabili (B) ottenuti tramite elaborazione PCA relativa al totale delle molecole volatili caratterizzanti i campioni di scarto di pesce fermentato dai ceppi selezionati con l'aggiunta di glucosio. La numerazione delle molecole nella figura B è quella riportata in tabella 8.2. Le classi principali di composti volatili sono state colorate diversamente: aldeidi in rosso, chetoni in arancione, alcoli in blu, esteri in viola, il gruppo alcani, alcheni, alchini in grigio e acidi in verde.

Analizzando più nello specifico (Fig. 8.7B) si può vedere come i cluster dei batteri lattici siano caratterizzati dall'elevata presenza di aldeidi, alcoli ed acidi e, in quantità minore, esteri e chetoni. Nel cluster di YL4 sono più presenti alcoli e chetoni rispetto alle aldeidi mentre nel cluster più numeroso (YL2, B5C, controllo) spiccano esteri, acidi ed alcoli.

Guardando nel dettaglio le molecole prodotte da tutti i campioni, ce ne sono diverse che hanno un impatto importante sul profilo aromatico; in particolare le aldeidi. Queste derivano sia dall'ossidazione degli acidi grassi liberati dalla fermentazione (Patrignani et al., 2011) sia dalla degradazione di *Strecker* in cui un amminoacido viene convertito in aldeide (Zhao et al., 2017).

Le aldeidi con un impatto sensoriale maggiore sono varie: E-2-hexenal, e 2,4-decadienal, Pentanal, Nonanal (derivanti dall'acido linoleico e linolenico) che sono in grado di conferire note fruttate e verdi (Patrignani et al., 2011). Altre, come il 2-methylbutanal e il 3-methylbutanal (derivanti da amminoacidi) contribuiscono all'aroma di pesce fermentato (Zhao et al., 2017).

Un'altra aldeide che partecipa al profilo aromatico di alimenti di pesce fermentati è la benzaldeide, apportando sentori di mandorla amara e zucchero bruciato (Zhao et al., 2017).

Un'altra classe di molecole presente in quantità determinante è quella degli alcoli. Normalmente questi non contribuiscono al profilo aromatico di un alimento a base di pesce fermentato in quanto il loro valore di soglia è molto alto. Tuttavia, sono stati rilevati due alcoli che invece hanno un impatto aromatico non indifferente, ovvero il 3-methyl-1-butanol (derivante dalla riduzione dell'aldeide 3-methylbutanal (Stahnke, 1994)) che dona note maltate, rancide e pungenti (Zhao et al., 2017) e il Phenylethyl Alcohol che invece apporta sentori dolci come il miele e sono entrambi caratteristici di prodotti a base di pesce fermentato (Zhao et al., 2017). Non è sorprendente trovare queste molecole nei campioni fermentati con i ceppi YL2 e YL4 in quanto è noto che gli alcoli possono essere prodotti da lieviti durante la fermentazione degli amminoacidi e come prodotti del metabolismo dei carboidrati (Olesen & Stahnke, 2000). Inoltre, Andrade et al. (2010) hanno mostrato che esiste una relazione positiva tra la carica del lievito e l'accumulo di alcoli.

Per quanto riguarda i chetoni, uno tra i più prodotti è stato l'acetoino, in particolare dal ceppo di *Bacillus subtilis*, che è caratteristico dei prodotti lattiero-caseari. L'acetoino è una molecola che viene prodotta dai microrganismi a partire dal piruvato e ha delle funzioni molto importanti all'interno della cellula microbica, tra cui evitare l'acidificazione, mantenere il rapporto NAD/NADH e viene anche stoccato come riserva di carbonio. L'elevata produzione di questa molecola da parte di vari ceppi di *Bacillus* è ben nota (Zhang et al., 2011) e negli ultimi anni si sta cercando di ottimizzare al meglio le condizioni di fermentazione per ottenere quantità maggiori di acetoino in quanto ha anche applicazioni in settori diversi da quello alimentare, come quello farmaceutico e cosmetico.

Il secondo chetone più abbondante nei campioni è il 3,5-octadien-2-one che dona il tipico odore sgradevole di pesce. Tale molecola si forma principalmente dall'ossidazione di uno dei due principali acidi grassi insaturi presenti nei pesci: l'acido docosaesaenoico (DHA) (Marsili & Laskonis, 2014).

## CAPITOLO 9

### CONCLUSIONI

Da questo studio si può affermare che gli scarti del pesce hanno un buon potenziale per essere utilizzati come fonte per la produzione di idrolizzati con caratteristiche positive applicabili in diversi settori. Gli idrolizzati ottenuti dalla fermentazione degli scarti di pesce ad opera dei ceppi YL2 e YL4 di *Yarrowia lipolytica*, del ceppo B5C di *Bacillus subtilis* e dei ceppi di batteri lattici PA13 e LP82 sono risultati interessanti sia per i composti aromatici che possono apportare, sia per la loro capacità antiossidante che potrebbe essere sfruttata per prolungare la shelf life dei prodotti nei quali l'idrolizzato può essere utilizzato come ingrediente innovativo. Tra i vari campioni, quelli fermentati con *Y. lipolytica* hanno presentato l'attività antiossidante maggiore, in modo particolare nei campioni ottenuti senza glucosio. L'attività misurata con ABTS era correlata alla quantità di peptidi misurati. Per quanto riguarda la componente volatile, i campioni fermentati con i lieviti, in assenza di glucosio, erano caratterizzati da una maggiore abbondanza di alcoli (principalmente alcol isoamilico e alcol feniletico) mentre quelli ottenuti da fermentazione con glucosio erano ricchi in acidi (tra cui acido acetico, acido butanoico, e acido isovalerico). Le fermentazioni eseguite con batteri, invece, hanno mostrato un simile profilo antiossidante solo con il ceppo B5C in assenza di glucosio, mentre per quanto riguarda i composti volatili, solo il ceppo LP82 presentava una maggior produzione di alcol isoamilico sempre in assenza di glucosio.

Gli idrolizzati ottenuti possono essere un'ottima alternativa rispetto a quelli sintetizzati artificialmente, in quanto sono naturali e sono sicuri per il consumo umano, poiché i microrganismi rilevati con i campionamenti, erano essenzialmente quelli inoculati. Per una loro migliore conservazione è necessario considerare uno step di liofilizzazione o spray-drying, confezionamento sottovuoto e stoccaggio al buio per evitare che perdano le loro caratteristiche come colore, aroma e attività antiossidante. Tuttavia, bisognerà valutare l'effetto di queste tecnologie sul prodotto finito.

Questa sperimentazione ha dimostrato la possibilità di valorizzare gli scarti ittici utilizzando dei processi biotecnologici poco impattanti sull'ambiente e sull'aspetto economico e l'opportunità di ottenere degli ingredienti ad alto valore aggiunto utilizzabili in formulazioni alimentari e mangimi. In particolare, l'utilizzo di microrganismi come quelli selezionati consente di recuperare o generare molecole utili ed ottenere prodotti puliti da eventuali residui organici che potrebbero rimanere nel caso in cui si utilizzino delle tecniche estrattive convenzionali, con solventi o acidi. Rispetto alle tecniche "green" che sfruttano le tecnologie emergenti, i metodi estrattivi basati sulla fermentazione sono meno costosi e più facili da applicare. I microrganismi che sono in grado di rilasciare enzimi sono favoriti in quanto possono idrolizzare o modificare le principali macromolecole che

compongono lo scarto (Arba, 2020). In futuro, sarà opportuno implementare le ricerche per ottimizzare le condizioni di produzione di ingredienti interessanti dagli scarti ittici e aumentare le rese di estrazione dei prodotti bioattivi, nell'ottica di un loro sfruttamento su larga scala a livello industriale, seguendo i principi dell'economia circolare.

## BIBLIOGRAFIA

- Abd Rashid, N. Y., Manan, M. A., Pa'ee, K. F., Saari, N., & Wong, F. W. F. (2022). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of fish protein hydrolysate produced from Malaysian fish sausage (Keropok Lekor) by-products by indigenous *Lactobacillus casei* fermentation. *Journal of Cleaner Production*, *347*, 131303.
- Abuine, R., Rathnayake, A. U., & Byun, H. G. (2019). Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fisheries and aquatic sciences*, *22*(1), 1-14.
- Al Khawli, F., Pateiro, M., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., Gullón, P., Kousoulaki, K., ... & Barba, F. J. (2019). Innovative green technologies of intensification for valorization of seafood and their by-products. *Marine Drugs*, *17*(12), 689.
- Amiguet, V. T., Kramp, K. L., Mao, J., McRae, C., Goulah, A., Kimpe, L. E., ... & Arnason, J. T. (2012). Supercritical carbon dioxide extraction of polyunsaturated fatty acids from Northern shrimp (*Pandalus borealis* Kreyer) processing by-products. *Food Chemistry*, *130*(4), 853-858.
- Andrade, M. J., Córdoba, J. J., Casado, E. M., Córdoba, M. G., & Rodríguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". *Meat Science*, *85*(2), 256-264.
- Angiolillo, L., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2018). A new method to bio-preserve sea bass fillets. *International journal of food microbiology*, *271*, 60-66.
- Arba, E. M. (2020). Estrazione enzimatica di prodotti ad alto valore aggiunto dagli scarti di lavorazione del tonno in scatola.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(11), 419-421.
- Arvanitoyannis, I. S., Kotsanopoulos, K. V., & Savva, A. G. (2017). Use of ultrasounds in the food industry—Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics of foods: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(1), 109-128.

Ashraf, S. A., Adnan, M., Patel, M., Siddiqui, A. J., Sachidanandan, M., Snoussi, M., & Hadi, S. (2020). Fish-based bioactives as potent nutraceuticals: Exploring the therapeutic perspective of sustainable food from the sea. *Marine drugs*, 18(5), 265.

Behera, A., Das, R., Patnaik, P., Mohanty, J., & Mohanty, G. (2022). A review on fish peptides isolated from fish waste with their potent bioactivities. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10(3), 1-0.

Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2019). A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139-150.

Bhumiratana, S., Hill Jr, C. G., & Amundson, C. H. (1977). Enzymatic solubilization of fish protein concentrate in membrane reactors. *Journal of Food Science*, 42(4), 1016-1021.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.

Bruno, S. F., Kudre, T. G., & Bhaskar, N. (2019). Impact of pretreatment-assisted enzymatic extraction on recovery, physicochemical and rheological properties of oil from *Labeo rohita* head. *Journal of Food Process Engineering*, 42(3), e12990.

Bucio, S. L., Sanz, M. T., Beltrán, S., Melgosa, R., Solaesa, Á. G., & Ruiz, M. O. (2016). Study of the influence of process parameters on liquid and supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil from rendered materials: Fish meal and oil characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 270-277.

C., Reantaso, M., Roubach, R., Tauati, M. & Yuan, X. 2021. *Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1229. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb5670en>.

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food control*, 54, 111-119.

Celińska, E., Borkowska, M., Biały, W., Kubiak, M., Korpys, P., Archacka, M., ... & Nicaud, J. M. (2019). Genetic engineering of Ehrlich pathway modulates production of higher alcohols in engineered *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research*, *19*(2), 122.

Chai, K. F., Voo, A. Y. H., & Chen, W. N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(6), 3825-3885.

Cheftel, C., Ahern, M., Wang, D. I., & Tannenbaum, S. R. (1971). Enzymatic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *Journal of agricultural and food chemistry*, *19*(1), 155–161. <https://doi.org/10.1021/jf60173a007>.

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International journal of molecular sciences*, *13*(7), 8615-8627.

Chemat, F., Vian, M. A., Fabiano-Tixier, A. S., Nutrizio, M., Jembrak, A. R., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Binello, A. & Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, *22*(8), 2325-2353.

Chen, Y., Gao, X., Wei, Y., Liu, Q., Jiang, Y., Zhao, L., & Ulaah, S. (2018). Isolation, purification and the anti-hypertensive effect of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from *Ruditapes philippinarum* fermented with *Bacillus natto*. *Food & function*, *9*(10), 5230-5237.

Cheung, R. C. F., Ng, T. B., & Wong, J. H. (2015). Marine peptides: Bioactivities and applications. *Marine drugs*, *13*(7), 4006-4043.

Cho, S. H., Lee, B. D., An, H., & Eun, J. B. (2005). Kenojeinin I, antimicrobial peptide isolated from the skin of the fermented skate, *Raja kenojei*. *Peptides*, *26*(4), 581-587.

CK Rajendran, S. R., Mohan, A., Khiari, Z., Udenigwe, C. C., & Mason, B. (2018). Yield, physicochemical, and antioxidant properties of Atlantic salmon visceral hydrolysate: Comparison of lactic acid bacterial fermentation with Flavourzyme proteolysis and formic acid treatment. *Journal of food processing and preservation*, *42*(6), e13620.

Coma, V. (2008). Bioactive chitosan-based substances and films. *Current research and developments on chitin and chitosan in biomaterial science, 1*.

Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Riccio, G., Rizzo, C., & de Pascale, D. (2021). Fish waste: From problem to valuable resource. *Marine drugs, 19*(2), 116.

D.lgs 3 aprile 2006 n. 152 (Testo Unico Ambientale).

D.lgs 3 dicembre 2010 n. 205, ricezione della direttiva 2008/98 CE.

Daukšas, E., Falch, E., Šližytė, R., & Rustad, T. (2005). Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry, 40*(8), 2659-2670.

Decreto 13 ottobre 2016 n. 264 recante criteri indicativi per agevolare la dimostrazione della sussistenza dei requisiti per la qualifica dei residui di lavorazione come sottoprodotti (Mministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare).

Deliberazione della Giunta regionale Emilia-Romagna n. 2260/2016.

Díaz-López, M., & García-Carreño, F. L. (2000). Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed products. *Seafood enzymes, 571-618*.

Direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive.

Esakkiraj, P., Rajkumarbharathi, M., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2010). Lipase production by *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp *Penaeus indicus*. *Annals of microbiology, 60*(1), 37-42.

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509.

Franco, D., Munekata, P. E., Agregán, R., Bermúdez, R., López-Pedrouso, M., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2020). Application of pulsed electric fields for obtaining antioxidant extracts from fish residues. *Antioxidants*, 9(2), 90.

Ghaly, A. E., Ramakrishnan, V. V., Brooks, M. S., Budge, S. M., & Dave, D. (2013). Fish processing wastes as a potential source of proteins. *Amino acids and oils: A critical review. J. Microb. Biochem. Technol*, 5(4), 107-129.

Gottardi, D., Siroli, L., Vannini, L., Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2021). Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 74-86.

Gulzar, S., & Benjakul, S. (2020). Impact of pulsed electric field pretreatment on yield and quality of lipid extracted from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by ultrasound-assisted process. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 619-630.

Hasegawa, M., Yagi, K., Iwakawa, S., & Hirai, M. (2001). Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 92(4), 459–466. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2001.tb01116.x>.

Hayes, M., & Tiwari, B. K. (2015). Bioactive carbohydrates and peptides in foods: An overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 22485-22508.

Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), 2259-2266.

He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), 289-297.

Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of chromatography. A*, *1217*(16), 2495–2511. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>.

Ianni, A., Bennato, F., Martino, C., Grotta, L., & Martino, G. (2020). Volatile flavor compounds in cheese as affected by ruminant diet. *Molecules*, *25*(3), 461.

Inguglia, L., Chiamonte, M., Di Stefano, V., Schillaci, D., Cammilleri, G., Pantano, L., Mauro, M., Vazzana, M., Ferrantelli, V., Nicolosi, R., & Arizza, V. (2020). *Salmo salar* fish waste oil: Fatty acids composition and antibacterial activity. *PeerJ*, *8*, e9299. <https://doi.org/10.7717/peerj.9299>.

Irawan, C., Arifin, Y. F., Marisa, R., & Asnia, M. (2018, July). Biopolymer of Chitosan from Fish Scales as Natural Coagulant for Groundwater Treatment. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 175, No. 1, p. 012028). IOP Publishing.

Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. (2018). A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(1), 2-16.

Ivanovs, K., & Blumberga, D. (2017). Extraction of fish oil using green extraction methods: A short review. *Energy Procedia*, *128*, 477-483.

Jemil, I., Abdelhedi, O., Mora, L., Nasri, R., Aristoy, M. C., Jridi, M., ... & Nasri, M. (2016). Peptidomic analysis of bioactive peptides in zebra blenny (*Salaria basilisca*) muscle protein hydrolysate exhibiting antimicrobial activity obtained by fermentation with *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, *51*(12), 2186-2197.

Kaiser, K., & Benner, R. (2005). Hydrolysis-induced racemization of amino acids. *Limnology and Oceanography: Methods*, *3*(8), 318-325.

Kim, H. J., Kang, S. G., Jaiswal, L., Li, J., Choi, J. H., Moon, S. M., ... & Ham, K. S. (2016). Identification of four new angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from fermented anchovy sauce. *Applied Biological Chemistry*, *59*(1), 25-31.

- Kim, H. K., Kim, Y. H., Park, H. J., & Lee, N. H. (2013). Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Fisheries Science*, 79(5), 849-856.
- Kong, L. M., Cui, S., Huo, Y. F., Zhu, Q., Wei, X. Y., & Zhou, T. (2021). Antioxidant activity and functional properties of grey mullet (*Mugil cephalus*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal*, 28(4).
- Korpi, A., Järnberg, J., & Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical reviews in toxicology*, 39(2), 139-193.
- Kumari, R., Sanjukta, S., Sahoo, D., & Rai, A. K. (2021). Functional peptides in Asian protein rich fermented foods: production and health benefits. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1-13.
- Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., & Simpson, B. K. (2009). Lipases from mammals and fishes. *Reviews in fisheries science*, 17(1), 18-40.
- Lee, J. K., & Byun, H. G. (2019). Characterization of antioxidative peptide purified from black eelpout (*Lycodes diapterus*) hydrolysate. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(1), 1-7.
- Legge regionale (Emilia-Romagna) 5 ottobre 2015 n.16 Disposizioni a sostegno dell'economia circolare, della riduzione della produzione dei rifiuti urbani, del riuso dei beni a fine vita, della raccolta differenziata e modifiche alla Legge regionale 19 Agosto 1996 n.31.
- Lie, Ø., & Lambertsen, G. (1985). Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morrhua*): fatty acid specificity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 80(3), 447-450.
- Liu, J., Shibata, M., Ma, Q., Liu, F., Lu, Q., Shan, Q., ... & Bao, J. (2020). Characterization of fish collagen from blue shark skin and its application for chitosan-collagen composite coating to preserve red porgy (*Pagrus major*) meat. *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), e13265.
- López, M., Arce, L., Garrido, J., Ríos, A., & Valcárcel, M. (2004). Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta*, 64(3), 726-731.

Madhumanchi, S., Suedee, R., Nakpheng, T., Tinpun, K., Temboot, P., & Srichana, T. (2019). Binding interactions of bacterial lipopolysaccharides to polymyxin B in an amphiphilic carrier 'sodium deoxycholate sulfate'. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 182, 110374. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110374>.

Marsili, R. T., & Laskonis, C. R. (2014). Odorant synergy effects as the cause of fishy malodors in algal marine oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(40), 9676-9682.

Martins, G. I., Secco, D., Rosa, H. A., Bariccatti, R. A., Dolci, B. D., de Souza, S. N. M., ... & Gurgacz, F. (2015). Physical and chemical properties of fish oil biodiesel produced in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 154-157.

Marti-Quijal, F. J., Remize, F., Meca, G., Ferrer, E., Ruiz, M. J., & Barba, F. J. (2020). Fermentation in fish and by-products processing: An overview of current research and future prospects. *Current Opinion in Food Science*, 31, 9-16.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26, 211-219.

Moret, S., Purcaro, G., Lanfranco S. Conte. (2014). *Il campione per l'analisi chimica: Tecniche innovative e applicazioni nei settori agroalimentare e ambientale*. Milano: Springer.

Muhammed, M. A., Domendra, D., Muthukumar, S. P., Sakhare, P. Z., & Bhaskar, N. (2015). Effects of fermentatively recovered fish waste lipids on the growth and composition of broiler meat. *British poultry science*, 56(1), 79–87. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.980719>.

Najafian, L., & Babji, A. S. (2018). Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from fermented fish (pekasam). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 2174-2183.

Nazeer, R. A., Kumar, N. S., & Ganesh, R. J. (2012). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*, 35(2), 261-268.

Nie, B. E., Ao, H., Long, T., Zhou, J., Tang, T., & Yue, B. (2017). Immobilizing bacitracin on titanium for prophylaxis of infections and for improving osteoinductivity: An in vivo study *Biointerfaces*.

Olesen, P. T., & Stahnke, L. H. (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat science*, *56*(4), 357–368. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(00\)00063-2](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(00)00063-2).

Ozogul, Y., Simşek, A., Balikçi, E., & Kenar, M. (2012). The effects of extraction methods on the contents of fatty acids, especially EPA and DHA in marine lipids. *International journal of food sciences and nutrition*, *63*(3), 326–331. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.627844>.

Özyurt, G., Ozogul, Y., Kuley Boga, E., Özkütük, A. S., Durmuş, M., Uçar, Y., & Ozogul, F. (2019). The effects of fermentation process with acid and lactic acid bacteria strains on the biogenic amine formation of wet and spray-dried fish silages of discards. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *28*(3), 314-328.

Patrignani, F., Vannini, L., Gardini, F., Guerzoni, M. E., & Lanciotti, R. (2011). Variability of the lipolytic activity and volatile molecules production by a strain of *Yarrowia lipolytica* in pork fat and its dependence on environmental conditions. *Meat science*, *89*(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.015>.

Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International journal of food microbiology*, *87*(3), 207-216.

Plaza, M., & Rodríguez-Meizoso, I. (2013). Advanced extraction processes to obtain bioactives from marine foods. *Bioactive compounds from marine foods: Plant and animal sources*, 343-371.

Qi, L., Xu, Z., & Chen, M. (2007). In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *43*(1), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.08.029>.

Rahimi, M. A., Omar, R., Ethaib, S., Mazlina, M. S., Biak, D. A., & Aisyah, R. N. (2017, June). Microwave-assisted extraction of lipid from fish waste. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 206, No. 1, p. 012096). IOP Publishing.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale).

Rubio-Rodríguez, N., Sara, M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2012). Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 238-248.

Ruthu, Murthy, P. S., Rai, A. K., & Bhaskar, N. (2012). Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. *Journal of food science and technology*, 51(9), 1884-1892.

Sadeghi, A., Hakimzadeh, V., Behnam Karimifar, B. "Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Food: A Review", *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, Vol. 7 No. 1, 2017, pp. 19-27. doi: 10.5923/j.food.20170701.03.

Sana, S., Rajanna, K., Reddy, K., Bhooshan, M., Venkateswarlu, M., Kumar, M. & Uppalaiah, K., "Ultrasonically Assisted Regioselective Nitration of Aromatic Compounds in Presence of Certain Group V and VI Metal Salts," *Green and Sustainable Chemistry*, Vol. 2 No. 3, 2012, pp. 97-111. doi: [10.4236/gsc.2012.23015](https://doi.org/10.4236/gsc.2012.23015).

Sánchez-Camargo, A. P., Meireles, M. Â. A., Ferreira, A. L., Saito, E., & Cabral, F. A. (2012). Extraction of  $\omega$ -3 fatty acids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste using supercritical CO<sub>2</sub><sup>+</sup> ethanol mixtures. *The Journal of Supercritical Fluids*, 61, 71-77.

Saranya, R., Tamil Selvi, A., Jayapriya, J., & Aravindhan, R. (2020). Synthesis of fat liquor through fish waste valorization, characterization and applications in tannery industry. *Waste and Biomass Valorization*, *11*(12), 6637-6647.

Sellami, M., Rebah, F. B., Gargouri, Y., & Miled, N. (2018). Lipid composition and antioxidant activity of liver oils from ray species living in Tunisian coasts. *Arabian Journal of Chemistry*, *11*(2), 233-239.

Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*.

Stahnke L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat science*, *38*(1), 39–53. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90094-9).

Sun, J., Yu, X., Fang, B., Ma, L., Xue, C., Zhang, Z., & Mao, X. (2016). Effect of fermentation by *Aspergillus oryzae* on the biochemical and sensory properties of anchovy (*Engraulis japonicus*) fish sauce. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(1), 133-141.

Svenning, R., Stenberg, E., Gildberg, A., & Nilsen, K. (1993). Biotechnological descaling of fish. *Infofish Int*, *6*(93), 30-31.

Thirukumaran, R., Priya, V. K. A., Krishnamoorthy, S., Ramakrishnan, P., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2022). Resource recovery from fish waste: Prospects and the usage of intensified extraction technologies. *Chemosphere*, *299*, 134361.

Tsugita, A., & Scheffler, J. J. (1982). A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. *European journal of biochemistry*, *124*(3), 585–588. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06634.x>.

Tu, Z. C., Huang, T., Wang, H., Sha, X. M., Shi, Y., Huang, X. Q., Man, Z. Z., & Li, D. J. (2015). Physico-chemical properties of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scales by ultrasound-assisted extraction. *Journal of food science and technology*, *52*(4), 2166–2174. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1239-9>.

Uddin, M. S., Ahn, H. M., Kishimura, H., & Chun, B. S. (2010). Production of valued materials from squid viscera by subcritical water hydrolysis. *Journal of Environmental Biology*, 31(5), 675-679.

Välimaa, A. L., Mäkinen, S., Mattila, P., Marnila, P., Pihlanto, A., Mäki, M., & Hiidenhovi, J. (2019). Fish and fish side streams are valuable sources of high-value components. *Food Quality and Safety*, 3(4), 209-226.

Wijaya, A., & Junianto. (2021). Review Article: Fish Bone Collagen. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 11(6), 33-39. <https://doi.org/10.9734/ajfar/2021/v11i630222>.

Wilburn, J. R., & Ryan, E. P. (2017). Fermented foods in health promotion and disease prevention: An overview. *Fermented foods in health and disease prevention*, 3-19.

Zhang, X., Yang, T. W., Lin, Q., Xu, M. J., Xia, H. F., Xu, Z. H., ... & Rao, Z. M. (2011). Isolation and identification of an acetoin high production bacterium that can reverse transform 2, 3-butanediol to acetoin at the decline phase of fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2785-2790.

Zhao, J., Jiang, Q., Xu, Y., & Xia, W. (2017). Effect of mixed kojis on physiochemical and sensory properties of rapid-fermented fish sauce made with freshwater fish by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(9), 2088-2096.

Zhao, J., Jiang, Q., Xu, Y., & Xia, W. (2017). Effect of mixed kojis on physiochemical and sensory properties of rapid-fermented fish sauce made with freshwater fish by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(9), 2088-2096.