



Manual for collagen production from locally sourced fish residues

Extraction procedures for collage

 **Interreg
Italia-Malta**
Bythos

Fondo Europeo di Sviluppo Regionale
European Regional Development Fund



Abstract

Bythos has produced a manual for the extraction of collagen from fish residues sourced from local fish processing plants


STEBICEF – Dipartimento di scienze e tecnologie biologiche, chimiche e farmaceutiche dell'Università di Palermo

Dipartimento STEBICEF Sez. Biologia animale

Via Archirafi, 18 90123 – Palermo Italia – Tel. +39 091 23891804

www.BythosEU.com

 @BythosEU

 Page: BythosEU

 bythosEU



Manual for collagen extraction from locally sourced fish residues

MOLECOLE BIOATTIVE DAL MARE RIFIUTI DI LAVORAZIONE: USI CORRENTI E PRODOTTI

Molecole bioattive

Collagene

Uno dei biomateriali di maggiore interesse che può essere estratto dagli scarti ittici è sicuramente il collagene. Questa è una proteina fibrosa che trova applicazione principalmente il campo biomedico e cosmetico. Finora la gran parte del collagene commerciale deriva dagli allevamenti bovini, suini e dagli scarti del pollame. Tuttavia, a causa delle malattie che negli ultimi anni hanno colpito queste specie animali, insieme anche ad altre ragioni ideologiche e religiose, si cerca un'alternativa valida per la produzione di collagene.

Collagene idrolizzato

Il collagene idrolizzato, o idrolizzato di collagene, è una molecola proteica ottenuta mediante un processo di idrolisi che trova la sua origine nel collagene puro, il quale viene lavorato sino ad essere ridotto in piccoli frammenti, con un peso molecolare talmente ridotto da poter essere assimilabile dall'uomo. L'idrolizzazione del collagene avviene a partire dal collagene di tipo I estratto dalle ossa e dalla pelle di animali come i cavalli, i conigli, i bovini, anche se ultimamente si predilige il collagene ottenuto dalla cartilagine di squalo oppure il collagene vegetale. La necessità di produrre collagene idrolizzato è divenuta prioritaria quando gli studi hanno dimostrato l'importanza del collagene sia per le ossa che per la pelle umana; esso, a sua volta, si divide in 4 categorie:

- Collagene di tipo I è il 90% del totale, alla base di tendini, ossa, pelle e cornea.
- Collagene di tipo II o del tessuto cartilagineo
- Collagene di tipo III, tipico delle pareti e dei vasi sanguigni, ma presente anche nel derma
- Collagene di tipo IV reperibile all'interno della membrana basale

Dal punto di vista nutrizionale il collagene idrolizzato, spesso di origine marina, può essere annoverato tra gli integratori proteici di alta qualità, soprattutto per la ricchezza in alcuni amminoacidi come la glicina, la prolina, l'idrossiprolina, la lisina e l'idrossilisina, fondamentali nella sintesi del collagene stesso.

Macroscopicamente simile ad una gelatina, il collagene idrolizzato deve le sue proprietà farmacocinetiche principalmente al processo di idrolisi condotto chimicamente attraverso l'uso di acidi o basi o enzimi.

Il frutto di questa digestione è una miscela di peptidi di differente peso molecolare, pertanto contraddistinti da altrettanto diverse funzioni biologiche e caratteristiche farmacocinetiche.

Più precisamente, peptidi di piccole dimensioni, circa 2 Kda, si sono rivelati utili, soprattutto per uso topico, nel prevenire il danneggiamento dei capelli, potendo permeare agevolmente la struttura capillifera e proteggendola dagli agenti irritanti; peptidi di 5 – 15 Kda, invece, grazie alle ottime proprietà surfattanti, si sono rivelati particolarmente preziosi per mantenere le proprietà qualitative della pelle, evitando la dispersione di acqua dalla stessa e mantenendo così un ottimo stato di idratazione cutanea.

Bio-applicazioni del collagene idrolizzato

Le ricerche condotte negli ultimi anni, soprattutto quelle che si sono concentrate durante il millennio in corso, hanno evidenziato come l'utilizzo del collagene idrolizzato possa essere la soluzione ai disturbi dell'osteoartrite. L'idrolizzato di collagene, infatti, può essere considerato un integratore proteico incompleto, vista l'assenza di amminoacidi essenziali quali l'isoleucina, il triptofano, e la metionina; di contro, contiene quelli necessari ad attivare la sintesi del collagene all'interno dell'organismo, in particolar modo idrossiprolina e prolina. Questi due amminoacidi sono deputati alla creazione del collagene all'interno dell'organismo, e ingerendoli attraverso il collagene idrolizzato riescono a raggiungere il sangue, e da qui le ossa, le cartilagini, i tendini, le articolazioni che ne hanno bisogno per tornare in forma. Introdotto nell'organismo umano, il collagene idrolizzato riesce ad essere digerito, e soprattutto ad attraversare le pareti intestinali: ciò gli consente di essere biodisponibile ed assorbito dalle cartilagini e dalle strutture muscolo-scheletriche che ne sono carenti. Oltre a fungere da riserva immediatamente disponibile, questo integratore funziona da attivatore dei processi produttivi di collagene nuovo; è quindi in grado di agevolare l'organismo a ripristinarne la produzione.

Quali benefici possono essere ottenuti utilizzando l'idrolizzato di collagene?

L'idrolizzato di collagene avvantaggia chi soffre di patologie come l'artrosi o l'osteoartrite, previene e contrasta le rughe, ed ha effetti positivi sia in chi intende seguire una dieta ipocalorica, che una dieta specifica per sportivi. Scopriamo quindi tutti i benefici che l'idrolizzato di collagene conduce, valutando caso per caso.

L'idrolizzato di collagene e le ossa

Il collagene idrolizzato è divenuto uno dei punti di riferimento per chi vuole prevenire o contrastare i disturbi articolari, come l'osteoartrite, perché favorisce la mobilità e la resistenza dei legamenti. La patologia di cui sopra insorge a seguito della rottura della cartilagine e del tessuto osseo adiacente, quindi è un disturbo che colpisce maggiormente gli anziani. Anziché affrontare il dolore e la perdita di mobilità attraverso gli antidolorifici, si consiglia l'uso di collagene idrolizzato perché esso è in grado di rigenerare la cartilagine danneggiata e favorire la sintetizzazione naturale di nuovo collagene.

L'idrolizzato di collagene e l'artrosi

A livello articolare, l'artrosi è forse uno dei disturbi più frequenti e diffusi, che colpisce uomini e donne a partire dai 50-60 anni d'età. Le cause alla base dell'insorgere dell'artrosi riguardano il logoramento delle cartilagini, che provocano dolori insopportabili. Le zone del corpo più colpite dall'artrosi sono le ginocchia e le mani, ovvero quelle parti del corpo che più spesso vengono usate, e che quindi, più velocemente

mostrano i segni di cedimento. Integrare la propria alimentazione con l'idrolizzato di collagene, è utile non solo a rigenerare e ripristinare i corretti livelli di cartilagine fra le singole ossa, ma anche a spingere il proprio corpo a ricominciare a produrre il collagene puro autonomamente.

Collagene idrolizzato e muscoli

A seguito dell'avanzare dell'età il tono muscolare comincia a cedere e ci si sente più affaticati e stanchi; il fenomeno della stanchezza muscolare, tipico della terza età, è definito sarcopenia, ed è dovuto ad una serie di fattori, tra cui la cui il logorio delle cartilagini, l'assenza di esercizio fisico e una cattiva alimentazione. Infatti, non fornendo al proprio corpo la giusta quantità di nutrienti, ed in particolar modo la giusta dose di proteine, si cominciano a vedere i propri muscoli deperire e divenire sempre meno tonici ed in forma. In questo caso l'uso dell'idrolizzato di collagene è indispensabile per restituire al corpo la dose di amminoacidi necessaria a mantenere i muscoli forti e robusti. La robustezza e la tonicità dei muscoli è indispensabile anche per coloro i quali hanno subito traumi muscolari, ai quali il collagene idrolizzato potrà portare benefici in termini di ripresa più rapida e resistenza.

Industria alimentare

La crescente richiesta da parte dei consumatori di ridurre i preservanti chimici ha stimolato la ricerca di nuovi antimicrobici naturali. In questo contesto, chitina e chitosano trovano vaste applicazioni, per le loro attività antimicrobiche e di agglutinazione contro batteri, lieviti e funghi. Questi polimeri sono stati studiati anche per ulteriori attività, tra cui quelle antiossidanti e quelle nutrizionali. Infine, sono stati proposti anche altri impieghi di questi polisaccaridi per esempio per l'immobilizzazione di enzimi e di microrganismi. I film di rivestimento a base di chitosano mostrano resistenza a lungo tempo e elevata flessibilità, proprietà meccaniche comparabili a quelle di materiali sintetici.

Non solo chitina e chitosano, ma anche gli oligomeri derivati da queste molecole mostrano attività batteriostatiche (flocculazione delle colonie batteriche e successiva morte per mancanza di nutrienti e ossigeno) e possono quindi essere impiegati per la conservazione degli alimenti. Inoltre, i derivati chito-oligomeri hanno maggiore solubilità in acqua rispetto a chitina e chitosano, e per questo trovano maggiori applicazioni.

Nell'ultimo decennio, c'è stato un aumento significativo in la produzione commerciale di prodotti marini trasformati [1] con un concomitante aumento della produzione di rifiuti. Nel 2010 la produzione ittica globale, sia pescata sia allevata, ha superato i 145,1 milioni di tonnellate [2]. Nel 2010, il volume di produzione dei rifiuti globali era circa 24 milioni di tonnellate (16.54%) del raccolto totale.

Gli organismi marini sono arricchiti con molecole bioattive che sono stati utilizzati per realizzare prodotti utili per la salute umana. I prodotti preparati dai rifiuti sono descritti nella (Tabella 1) e include acidi grassi, proteine (incluso il collagene), carotenoidi e carboidrati.

Tabella 1 - Molecole bioattive da gli scarti ittici: uso corrente e prodotti

Rifiuti	Molecole bioattive	Prodotti specifici ed applicazioni	Referenze
Rifiuti dalla lavorazione dei pesci	Collagene	Utilizzato nelle preparazioni farmaceutiche e cosmetiche. Inoltre, utilizzato nei budelli alimentari nell'industria della carne (ad esempio salsicce)	[3]
Rifiuti dalla lavorazione dei crostacei	Chitin, chitosan e loro derivatives	Utilizzati come cibo e ingrediente per cibi funzionali.	[4]
Rifiuti dalla lavorazione dei crostacei	Astaxantina	Integratore e colorante alimentare	[5,6]
In quasi tutti gli organismi ittici e dalla loro lavorazione	Omega-3: EPA, DHA	Inseriti nei prodotti nutraceutici, indicate per le malattie cardiovascolari e favoriscono la guarigione da artrite e ipertensione. Utilizzato anche come ingrediente nelle formule per l'infanzia	[7]
Cartilagine da squali e rifiuti dalla lavorazione dei crostacei	Chondroitin sulfate, glucosamine	Integratore alimentare, indicato per migliorare le articolazioni e alleviare i sintomi legati alle artriti	[8]

Questi prodotti dimostrano come i problemi associati con l'estrazione e il riutilizzo del trattamento dei rifiuti possono essere superati consentendo l'estrazione di preziose molecole provenienti da rifiuti da lavorazione di organismi ittici.

La lavorazione di crostacei marini per usi alimentari e il successivo uso dei loro rifiuti come fonte di acidi grassi, astaxantina e chitina dimostrano il loro valore aggiunto. La raccolta globale di gamberi boreali (*Pandalus borealis*) nel 2010 è stato tra 315,511 e 446,909 tonnellate e il 50-60% del peso del raccolto è stato costituito da gusci, teste e code [5]. I gamberi boreali sono generalmente liberati dal guscio, cotti e

congelati prima della vendita generando rifiuti utilizzati produrre olio di gambero ricco di acidi grassi omega-3. L'olio ha anche un colore rosso vivo attribuito alla presenza dell'astaxantina, un carotenoide approvato dalla FDA come integratore alimentare. Anche i gamberi marini di profondità (*Acanthephyra purpurea*) possono essere un naturale fonte di astaxantina [6].

La chitina, un polisaccaride composto da N-acetil-glucosamina, è recuperato dai rifiuti di lavorazione dei crostacei marini. Il guscio dei crostacei è la fonte commerciale più importante di chitina a causa dell'alto contenuto di chitina e dell'abbondanza di questi rifiuti [9]. Recentemente, il chitosano, una forma deacetilata della chitina (composta da glucosamina), ha attratto l'attenzione a causa della sua solubilità in condizioni acide, dell'attività antimicrobica, biodegradabilità, biocompatibilità e formazione del film [10]. Chitina e chitosano sono ampiamente applicati in diverse attività industriali come il trattamento delle acque [11], l'agricoltura [12], cibo e industrie cosmetiche [13] e farmaceutiche [14]. L'uso della chitina nell'industria alimentare è legata principalmente alle sue proprietà funzionali di legare acqua e grasso [15] avendo proprietà emulsionanti [16].

I gusci di crostacei sono anche una fonte di glucosamina che insieme al condroitin solfato compongono i nutraceutici mirati a migliorare la salute delle articolazioni e alleviare i sintomi associato con l'artrite. Il condroitin solfato è un glicosaminoglicano che svolge un ruolo chiave in diversi processi biologici come l'infiammazione, l'elasticità della cartilagine articolare, la regolazione dello sviluppo cellulare, la proliferazione cellulare e la differenziazione [17]. Il condroitin solfato e la glucosamina da fonti marine sono stati introdotti come nutraceutici per il trattamento dell'osteoartrite [18] e ha proprietà antinfiammatorie e condroprotettiva [19,20]. Inoltre, la glucosamina e il condroitin solfato sono usati nelle industrie alimentari e cosmetiche e in altre aree cliniche [21,22].

Un gruppo di organismi marini come spugne, cetrioli di mare (oloturie), calamari, molluschi e principalmente materiale cartilagineo di pesci (squalo, salmone, raggi, ecc.) e i loro scarti di lavorazione sono ben documentati come potenziali fonti di glicosaminoglicano [23,24]

Le industrie stanno iniziando ad adottare nuove tecnologie per recuperare tutte le sostanze bioattive, tuttavia, la maggior parte dei rifiuti di lavorazione degli organismi ittici sono scartate [25]. Ricerche recenti dimostrano che esiste un sostanziale divario di conoscenze e tecnologie legate alla lavorazione e trattamento dei rifiuti marini con metodi di conservazione che garantiscono qualità del cibo e di tutti i processi che estraggono molecole a valore aggiunto [1]. Questa mancanza di conoscenza e di know-how impediscono la conversione della biomassa massa e l'utilizzo dei rifiuti, ed in particolare gli scarti dei crostacei, uno dei più abbondanti rifiuti di lavorazione marina.

Da oggi vengono recuperati acidi grassi, carotenoidi e chitina rifiuti di lavorazione dei crostacei marini a diverse applicazioni agrochimiche [26,27]. Tuttavia, il volume dei rifiuti di lavorazione dei gamberi e le pratiche di smaltimento inadeguate sta causando grandi preoccupazioni ambientali che impediscono grandi dimensioni utilizzo [1]. Nel 2007, la produzione di gamberi (da allevamento e da pesca) è stata la seconda per quantità sul mercato globale, rappresentando il 16.5% del commercio della pesca. I rifiuti derivanti dalla lavorazione di gamberetti è quindi da considerare uno dei principali sottoprodotti del mercato globale della

pesca [28]. La loro utilizzazione ne trarrebbe vantaggio da ulteriori attività di sviluppo e adozione più diffusa di tecnologie innovative.

Altro vantaggio sull'utilizzazione dei rifiuti di lavorazione dei gamberi sono le proteine che possiedono una significativa proprietà antimicrobica [28], potenti attività antiossidanti nei concentrati di proteine e carotenoidi [38]. Inoltre, sono stati sviluppati cracker a basso costo arricchiti con proteine di gamberi che potrebbero servire come fonte di proteine per le popolazioni che soffrono di malnutrizione. Altre ricerche sono state eseguite su i glicosaminoglicani solfati derivati da invertebrati e crostacei che possiedono attività antitrombotica, anticoagulante simile ai loro analoghi di mammiferi [29,30].

In tutto il mondo ogni anno vengono prodotte grandi quantità di rifiuti di lavorazione del pesce. Viscere, testa, ossa e lische, acqua salmastra e gli scarichi delle lavorazioni rappresentano oltre il 70% del peso totale di alcuni animali acquatici [31]. Le viscere di pesce, la componente più abbondante dei rifiuti, presentano proteasi digestive con ampi intervalli di pH e temperatura, [32,33]. Il recupero di queste proteasi potrebbe costituire una soluzione alla gestione dei questi rifiuti e potrebbe anche aiutare nella produzione di proteasi a basso costo per applicazioni industriali [31]. La domanda di proteasi dei pesci nelle industrie alimentari è in aumento. Attualmente la tripsina è l'enzima più importante generato dai viscere del pesce in quanto esibisce un'elevata attività proteolitica su un ampio range di pH e temperatura anche a basse concentrazioni [28]. Molti di questi enzimi sono ritenuti adatti per varie attività legate alla preparazione del cibo [28]. Per l'utilizzazione degli scarti ittici si devono però fare alcune considerazioni come la stagionalità, la disponibilità, variazioni della qualità dei rifiuti e bioattività di enzimi, deperibilità della materia prima e costi elevati che possono essere associato all'estrazione e alla purificazione degli enzimi [34]. Per questi motivi, è necessario determinare gli enzimi più adatti e identificare le condizioni ottimali per la loro estrazione e utilizzazione commerciale. In effetti, se questi requisiti vengono soddisfatti, gli sviluppi commerciali potrebbero determinare una produzione di enzimi su larga scala in modo economicamente conveniente [35]. I rifiuti di lavorazione marina sono anche ricchi di altre proteine e peptidi bioattivi. Sebbene siano stati ottenuti numerosi peptidi bioattivi da specie acquatiche, solo poche fonti di molluschi e crostacei sono state studiate correttamente. La composizione dell'idrolizzato di testa da *L. vannamei* liofilizzato contiene il 44% di proteine comprendenti il 41% di amminoacidi essenziali. I residui di testa dei gamberi sono anche ricchi di proteine (50-65% di peso secco) e forniscono amminoacidi essenziali quando sono utilizzati come fonte proteica nei mangimi per animali acquatici, pollame e bestiame [36]. Per questi motivi, i flussi di rifiuti alimentari stanno guadagnando popolarità tra le industrie cosmetiche, farmaceutiche, alimentari e nutraceutiche di tutto il mondo.

Acquisizione e caratterizzazione delle varie tipologie di scarto dei prodotti ittici

Gli scarti derivanti dall'utilizzazione dei prodotti ittici sono stati raccolti direttamente presso alcune aziende di trasformazione della Sicilia.

Questi, dopo il conferimento sono stati drenati per permettere una maggiore durata dei campioni riducendo la diffusione e la rapida crescita dei batteri. Poi sono stati posti in un contenitore coibentato contenente panetti di ghiaccio per mantenere la temperatura non superiore ai 4°C. La bassa temperatura è necessaria per impedire il rapido deterioramento del pesce dovuto all'azione dei batteri delle superfici e del tubo digerente e alla rottura autolitica causata dall'azione enzimatica nei tessuti e nel tratto. Il deterioramento batterico e autolitico ha come conseguenza la rottura delle frazioni lipidiche e proteiche.

Una volta portati presso il Laboratorio della Sezione di Biologia animale ed Antropologia biologica del Dipartimento STEBICEF in via Archirafi, 18 Palermo, ciascun campione è stato inserito in un sacchetto di plastica per alimenti e conservato a -20°C fino all'utilizzo.

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-BIOLOGICA DELLE MOLECOLE BIOATTIVE E CONTROLLO DI QUALITÀ

Il Dipartimento STEBICEF ha messo a punto i protocolli per la preparazione degli estratti crudi. Questi sono stati analizzati e caratterizzati chimicamente per determinare il contenuto molecolare. Il Dipartimento STEBICEF ha effettuato lo studio delle attività degli estratti (antimicrobiche, antiossidanti, antiinfiammatorie ecc.) e ha proceduto alla preparazione dei protocolli per la purificazione delle molecole ritenute più opportune. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – IZS ha esaminato gli estratti per la presenza di contaminanti.

Il collagene

Il collagene è una proteina abbondante nei vertebrati e costituisce il 30% delle proteine animali totali [61]. Il collagene è stato tradizionalmente isolato dai mammiferi, come i bovini e i suini, e ampiamente utilizzato nelle industrie alimentari, cosmetiche, biomediche e farmaceutiche [61]. Tuttavia, lo sviluppo dell'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) e della crisi dell'afta epizootica (FMD) ha provocato ansia tra gli utilizzatori di collagene e prodotti derivati dal collagene provenienti da animali terrestri negli ultimi anni [62]. Inoltre, il collagene ottenuto dal maiale non può essere utilizzato come componente di alcuni alimenti per motivi religiosi, inoltre non è facile distinguere tra le due fonti. Pertanto, vi è una forte necessità di sviluppare una fonte alternativa di collagene da non mammiferi [63]. Gli organismi marini sono una ricca fonte di metaboliti strutturalmente nuovi e biologicamente attivi. Finora, molti composti chimicamente unici di origine marina con diversa attività biologica sono stati isolati e alcuni di essi sono studiati e/o sviluppati come nuovi prodotti farmaceutici [64].

Sebbene fino ad oggi siano stati identificati fino a 27 diversi tipi di collagene, il collagene di tipo I è il collagene più diffuso nel tessuto connettivo.

Le molecole di collagene interstiziale sono composte da tre catene intrecciate nella cosiddetta tripla elica di collagene. Questa particolare struttura, principalmente stabilizzata dal legame idrogeno intra- e intercatena, è il prodotto di una ripetizione quasi continua della sequenza Gly-X-Y, dove X è per lo più prolina e Y è per lo più idrossiprolina [65]. Solo le regioni N- e C-terminali molto corte, chiamate telopeptidi (15 e 26 amminoacidi), non formano strutture a tripla elica poiché sono in gran parte costituite da residui di lisina e idrossilina (Hyl), così come i loro derivati aldeidici, in collegamenti incrociati covalenti intra- e intermolecolari [66] (Figura 1). Da quattro a otto molecole di collagene sono stabilizzate e rinforzate nella sezione trasversale da legami covalenti per costituire l'unità di base delle fibrille di collagene. Pertanto, la tipica natura forte e rigida di pelli, tendini e ossa è dovuta alla struttura di base formata da molte di queste fibrille di collagene reticolate.

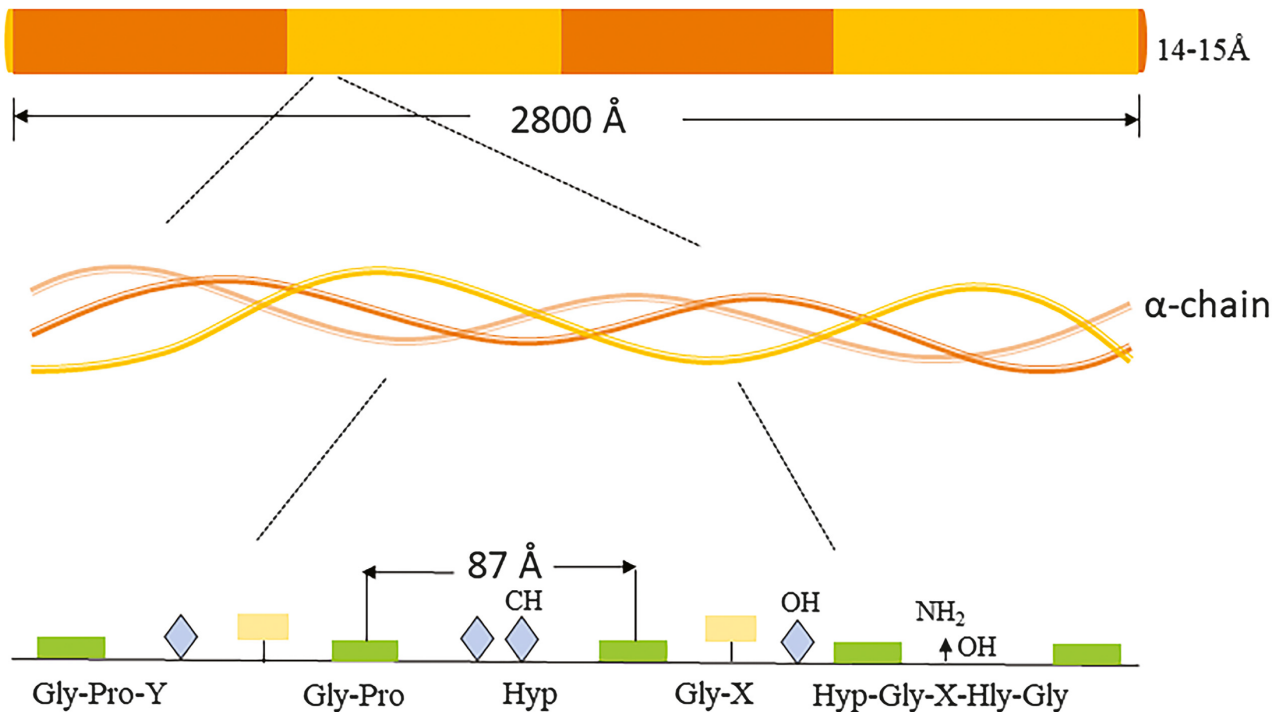


Figura 1 - Struttura del collagene

Il collagene nativo insolubile deve essere pre-trattato prima di poter essere convertito in una forma adatta all'estrazione, che normalmente viene fatta riscaldando in acqua a temperature superiori a 45 ° C. Un pre-trattamento chimico spezzerà i legami non covalenti in modo da disorganizzare la struttura proteica, producendo quindi un adeguato gonfiore e solubilizzazione del collagene [67]. Il successivo trattamento termico scinde l'idrogeno e i legami covalenti per destabilizzare la tripla elica, con conseguente transizione da elica a bobina e conversione in gelatina solubile [68,69].

Gli idrolizzati proteici di pesce provenienti da varie fonti sono stati ampiamente studiati e descritti da diversi ricercatori [70–76]. Il collagene è spesso usato come ingredienti e additivi di alimenti funzionali e nutraceutici. Ma il collagene è difficile da assorbire attraverso l'assunzione orale a causa del suo elevato peso molecolare. Un modo per risolvere questo problema è idrolizzare il collagene con proteasi

appropriate. Il processo di idrolisi enzimatica può produrre piccoli frammenti di peptidi di collagene. Inoltre, una parte della sua bioattività è aumentata [77] e la sua antigenicità è diminuita dopo l'idrolisi [78]. Collageni contenenti lisca di pesce giallo e scarti di pelle di suino sono stati usati come materie prime per la produzione di idrolizzati e peptidi proteici [71].

Le proprietà bioattive dei peptidi derivati dal collagene, e anche la loro resistenza alla digestione proteolitica nello stomaco, li rendono potenziali ingredienti degli alimenti nutraceutici [79]. I peptidi bioattivi contengono solitamente 2-20 residui di aminoacidi per molecola [80]; più si abbassa il peso molecolare, maggiori sono le possibilità che possa attraversare la barriera intestinale ed esercitare un effetto biologico (Roberts et al., 1999).

L'interesse per i nutraceutici sta crescendo rapidamente in tutto il mondo in quanto sono un'alternativa sicura ai farmaci, il cui uso a volte è limitato da reazioni di tossicità o intolleranza. Gli idrolizzati di collagene e collagene potrebbero essere nutraceutici interessanti per le loro interessanti proprietà bioattive.

L'attività di ricerca si è focalizzata sull'ottimizzazione dei parametri di processo per l'estrazione di collagene da diverse matrici

Tutte le procedure preparative sono state eseguite a 4 ° C. La pelle, le ossa e le ossa sono state estratte con 0,1 N di NaOH per rimuovere le proteine non collagene, quindi lavate con acqua distillata e liofilizzate.

Le proteine totali da ciascun estratto sono state valutate tramite il metodo standard descritto da Laemmly 1970 .

Estrazione del collagene dalla pelle

La pelle è stata estratta con 10% di alcool butilico per 1 giorno, lavata con acqua distillata e liofilizzata. La materia insolubile è stata estratta con acido acetico 0,5 M per 3 giorni e l'estratto è stato centrifugato a 20.000 g per 1 ora. Il residuo è stato riestratto con la stessa soluzione per 2 giorni e l'estratto è stato centrifugato nelle stesse condizioni. Ogni soluzione viscosa è stata miscelata e salata aggiungendo NaCl ad una concentrazione iniziale di 0.9 M, seguita dalla precipitazione del collagene per aggiunta di NaCl (concentrazione α di 2.6 M) a pH neutro (in Tris \pm HCl 0.05 M, pH 7.5). Il precipitato risultante è stato ottenuto per centrifugazione a 20.000 g per 1 ora e sciolto in acido acetico 0.5 M, dializzato contro acido acetico 0.1 M, acqua distillata e quindi liofilizzato.

Collagene osseo

L'osso insolubile è stato decalcificato con 0.5 M di acido etilendiamminotetracetico (EDTA) (pH 7.4) per 5 giorni cambiando la soluzione di EDTA una volta al giorno. Dopo aver lavato il residuo con acqua distillata, il grasso è stato rimosso con alcool butilico al 10%. Il residuo è stato quindi lavato con acqua distillata e liofilizzato. Le seguenti procedure sono state eseguite essenzialmente come descritto per la pelle (

Figura 3).

Estrazione del collagene dalle pinne

La materia insolubile è stata estratta con acido acetico 0.5 M per 3 giorni e l'estratto è stato centrifugato a 20.000 g per 1 ora. La soluzione è stata divisa in due frazioni, acido solubile e acido insolubile. Il collagene nella frazione solubile in acido è stato precipitato con l'aggiunta di NaCl a una concentrazione di 0.8 M, seguita da un'ulteriore precipitazione del collagene mediante aggiunta di NaCl (concentrazione α di 2.5 M) a pH neutro (in 0.05 M Tris \pm HCl, pH 7.5). Il precipitato risultante è stato ottenuto per centrifugazione a 20.000 g per 1 ora e sciolto in acido acetico 0.5 M, dializzato contro acido acetico 0.1 M e quindi liofilizzato (collagene solubile in acido, ASC). D'altra parte, la frazione insolubile in acido è stata lavata con acqua distillata e decalcificata con 0.5 M EDTA (pH 7.4) per 5 giorni cambiando la soluzione di EDTA una volta al giorno. Dopo che la materia risultante è stata lavata con acqua distillata, il grasso è stato rimosso con alcool butilico al 10% per 1 giorno, lavato con acqua distillata e liofilizzato. Le seguenti procedure sono state eseguite essenzialmente come descritto per la pelle. Il precipitato risultante

è stato ottenuto per centrifugazione a 20.000 g per 1 ora e sciolto in acido acetico 0.5 M, dializzato contro acido acetico 0.1 M e liofilizzato (collagene insolubile in acido AIC).

Estrazione del collagene dalle squame di pesce

Processo di demineralizzazione

Le squame di pesce sono state raccolte da tonno. Inizialmente, le scaglie di pesce sono state lavate due volte in 10% in peso di soluzioni di NaCl per rimuovere le proteine sulla superficie per 48 ore. La demineralizzazione è stata ottenuta con 0.5 mol/l di EDTA, seguita dall'estrazione di collagene con Tris-HCl tamponato a pH 7.5 per 24 - 48 h 4°C. Dopo aver centrifugato la sospensione a 10.000 \times g, il residuo è stato lavato tre volte con acqua distillata.

Isolamento di collagene solubilizzati con acido e pepsina

L'estrazione del collagene dalle squame del tonno è stata condotta a una temperatura relativamente bassa di 4°C per ridurre la frammentazione della catena [81]. Il collagene solubile in acido è stato estratto dalle scaglie completamente demineralizzate con soluzioni HCl da 0.01 mol/l per 48 ore. Dopo separazione del collagene insolubile (IC) con una centrifuga a 10.000 \times g, le fibre di collagene solubilizzate con acido sono state ottenute dalla soluzione aggiustata a pH 7,0 per 24 ore. Le fibre sono state purificate tre volte mediante lavaggio con acqua distillata. Il residuo è stato lavato di nuovo con acqua distillata per estrarre PSC.

Analisi degli aminoacidi

La composizione amminoacidica del collagene è stata eseguita con un analizzatore di aminoacidi (HITACHI L8800). Cinque milligrammi dei campioni liofilizzati di collagene di tipo I dal derma di maiale (Nitta Gelatin Co.) e il collagene estratto dalle squame di pesce sono stati sciolti in soluzioni di HCl 6 mol/l e idrolizzati a 100°C per 22 ore. I solventi sono stati rimossi per evaporazione. Dieci millilitri di 0.02 mol/l delle soluzioni di HCl sono stati quindi aggiunti ai residui seguiti dal filtraggio con filtri a membrana da 0.45 μ m (Tabella 1).

Tabella 2 - Composizione amminoacidica del collagene di squame di tonno

Amminoacido	Amminoacidi/1000
Hydroxyproline	73
Asparticacid	43
Threonine	24
Serine	41
Glutamicacid	71
Proline	107
Glycine	346
Alanine	133
Half-cystine	0
Valine	19
Methionine	15
Isoleucine	7
Leucine	18
Tyrosine	3
Phenylalanine	13
Hydroxylysine	7
Lysine	26
Histidine	7
Arginine	49

Elettroforesi su gel SDS-poliacrilammide (SDS-PAGE).

SDS-PAGE è stata eseguita con il metodo di Weber e Osborn (1969). Il campione di collagene è stato sciolto in fosfato di sodio 0,02 M (pH 7.2) contenente SDS all'1% e urea 3.5 M. L'elettroforesi è stata eseguita su gel al 3,5% in fosfato di fosfato 0.1 M (pH 7.2) contenente 0.1% di SDS (

Std kDa

220 –

170 –

116 –

76 –

70 –

Figura 2).

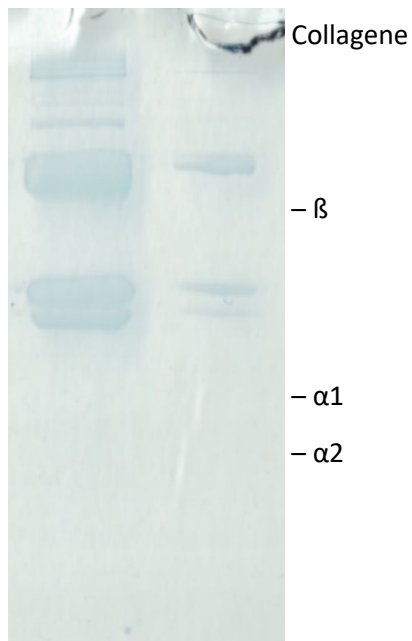


Figura 2 - SDS-PAGE del collagene estratto dalle squame di tonno. Std = marker dei pesi molecolari

Std kDa

220 –

170 –

116 –

76 –

70 –

Collagene

– β

– $\alpha 1$

– $\alpha 2$

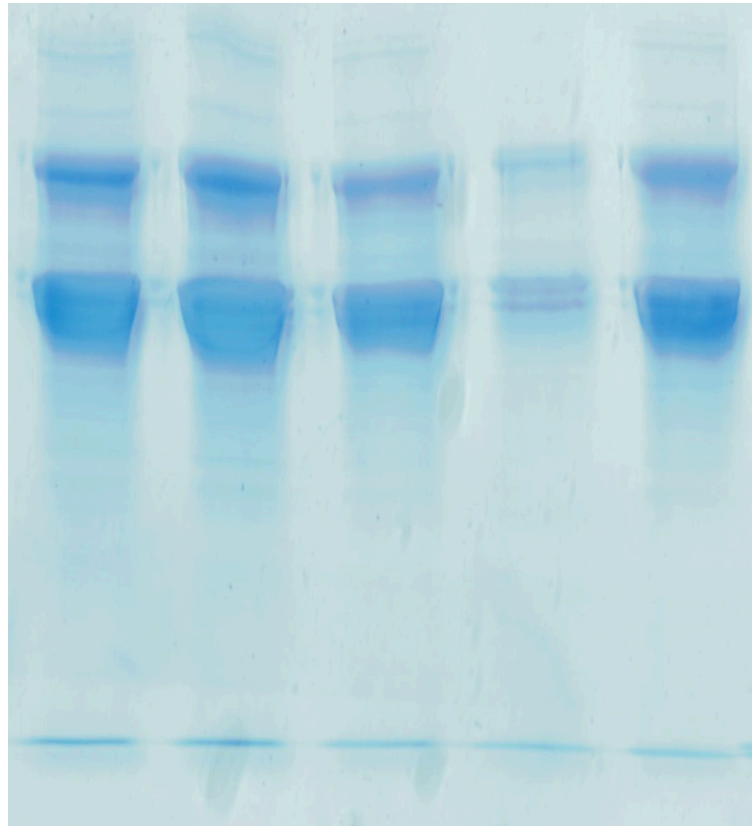


Figura 3 - SDS-PAGE del collagene estratto dalla pelle di salmone. Std = marker dei pesi molecolari

Determinazione delle attività biologiche delle molecole presenti negli scarti

Controllo qualità

Presso i laboratori di chimica del dipartimento STEBICEF sono state svolte le indagini qualitative per accertare la presenza, negli estratti preparati da scarti ittici, di contaminanti come metalli pesanti, IPA, PCB, fatlati, diossine e antibiotici.

I primi campioni sottoposti ad analisi sono state le frazioni grasse (olio di pesce) estratte dal muscolo e dalla intera testa di salmone.

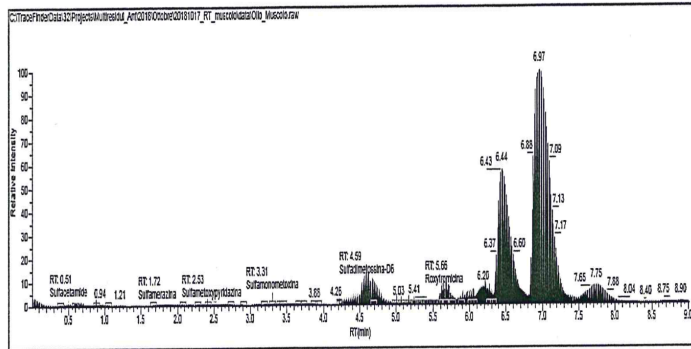
I risultati sono mostrati nelle seguenti immagini

Quantitation Report

Lab Name: Residui E6
Instrument: TSQ Vantage 277
User: COMPUTER
Batch: 20181017_RT_muscolo

Method: 20181017_RT_muscolo_Antibiotici_Multiresiduo
Antibiotici_Multiresiduo
Call File: 20181017_RT_muscolo.calk

Vial Pos	Sample ID	File Name	Level	Sample Name	File Date	Comment
C:15		Olio Muscolo	N/A		10/18/2018 12:33:10 PM	



Internal Standards	RT	Quan Peak	Response	Injected Conc Units	Calculated Conc Units	Flags
Norfloracin-D5	3.37	281.336 m/z	110	25,000	25,000	
Demeclociolina	3.51	430.100 m/z	184	25,000	25,000	
Sulfadimetossina-D6	4.59	156,000 m/z	69049	25,000	25,000	
Penicilina G-D7	5.88	160,000 m/z	7773	25,000	25,000	
Roxitromicina	5.66	157,942 m/z	36930	25,000	25,000	

Surrogates	RT	Quan Peak	Response	Curve Type	Average RF/ Response Ratio	Injected Conc Units	Calculated Conc Units	Flags
------------	----	-----------	----------	------------	-------------------------------	---------------------	-----------------------	-------

Target Compounds	RT	Quan Peak	Response	Curve Type	Average RF/ Response Ratio	Injected Conc Units	Calculated Conc Units	Flags
------------------	----	-----------	----------	------------	-------------------------------	---------------------	-----------------------	-------

Flag Legend: LOD<I-LOQ;|=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated; Bordered cell = Manually integrated.

Quantitation Report

Lab Name: Residui E6
 Instrument: TSQ Vantage 277
 User: COMPUTER
 Batch: 20181017_RT_muscolo

Method: 20181017_RT_muscolo_Antibiotici_Multiresiduo
 Antibiotici_Multiresiduo
 Call File: 20181017_RT_muscolo.caik

Vial Pos	Sample ID	File Name	Level	Sample Name	File Date	Comment
C:15		Olo_Muscolo	NA		10/18/2018 12:33:10 PM	
	Sulfaguanidina	0.71 156.000 mz	2027	Linear	0.000 6.543	6.543
	Sulfafazolo	N/F 108.128 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfadiazina	N/F 108.137 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfapiridina	N/F 156.105 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfamerazina	1.72 156.078 mz	721	Linear	0.000 0.716	0.716
	Minociclina	N/F 441.100 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Epitetraciclina	N/F 410.100 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfameter	N/F 108.100 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfametazina	2.38 108.088 mz	280	Linear	0.000 -1.374	-1.374
	Pipemidic Acid	N/F 217.000 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfabenzamide	N/F 108.000 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfamethizole	N/F 156.020 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Marbofloxacina	N/F 320.400 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfamoxypyridazina	2.53 156.000 mz	1663	Linear	0.000 -2.83	-2.83
	EpyOxytetraciclina	N/F 201.204 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Tetraciclina	N/F 410.100 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfaclopiridazina	N/F 156.076 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Enoxacin	N/F 303.400 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Ofloxacin	N/F 318.200 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Oxytetraciclina	N/F 201.200 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfamethoxazole	N/F 155.980 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Norfloxacin	N/F 233.238 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfamonometoxina	3.31 156.000 mz	2017	Linear	0.000 -4.106	-4.106
	Ciprofloxacina	N/F 288.237 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfadoxin	N/F 156.118 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Enrofloxacin	3.59 316.289 mz	186	Linear	0.000 0.166	0.166
	Danarofloxacin	N/F 283.252 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Lomefloxacina	N/F 266.100 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfisoxazole	N/F 156.030 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Orbitoxacin	N/F 332.170 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Epicioortetraciclina	N/F 98.100 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Difloxacin	N/F 299.204 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sarafloxacin	N/F 299.284 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfafenazolo	N/F 158.239 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Clotetraciclina	N/F 275.000 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Cinoxacina	N/F 245.300 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfadimetossina	N/F 156.118 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F

Flag Legend: LOD<J-LOQ)=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated;
 Bordered cell = Manually integrated.

Quantitation Report

Lab Name: Residui EB
 Instrument: TSQ Vantage 277
 User: COMPUTER
 Batch: 20181017_RT_muscolo

Method: 20181017_RT_muscolo_Antibiotici_Multiresiduo
 Antibiotici_Multiresiduo
 Call File: 20181017_RT_muscolo.call

Vial Pos	Sample ID	File Name	Level	Sample Name	File Date	Comment
C:15		Olio_Muscolo	NA		10/18/2018 12:33:10 PM	
	Oxolinic Acid	4.82 244.230 mz	14155	Linear	0.000	-5.856 -5.856
	Sulfachinosalina	N/F 156.100 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Doxiciclina	5.29 428.364 mz	2665	Linear	0.000	-9.913 -9.913
	Nalidivac Acid	5.17 187.156 mz	1653	Linear	0.000	1.968 1.968
	Oleandomycin	5.23 544.000 mz	4260	Linear	0.000	4.831 4.831
	Piperacilina	N/F 397.700 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Flumequinina	N/F 244.230 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Penicillina G	5.39 217.000 mz	9291	Linear	0.000	31.287 31.287
	Tylosina	N/F 174.400 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Nadifloxacin	5.53 343.300 mz	10629	Linear	0.000	-5.242 -5.242
	Penicillina V	5.5 114.000 mz	5306	Linear	0.000	50.733 50.733
	Josamicina	N/F 174.128 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Oxacillina	5.73 144.000 mz	3479	Linear	0.000	34.338 34.338
	Claythromycin	N/F 158.220 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Dicloxicilina	N/F 160.000 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Nalidivac	5.91 115.000 mz	28768	Linear	0.000	151.037 151.037

Flag Legend: LOD<L<LOQ)=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated;
 Bordered cell = Manually Integrated.

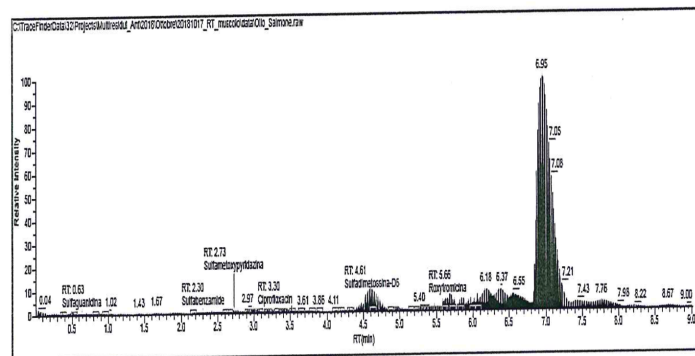
Figura 4 – Analisi qualitativa dell'olio di salmone da muscolo

Quantitation Report

Lab Name: Residui E6
Instrument: TSQ Vantage 277
User: COMPUTER
Batch: 20181017_RT_muscolo

Method: 20181017_RT_muscolo_Antibiotici_Multiresiduo
Antibiotici_Multiresiduo
Call File: 20181017_RT_muscolo.calk

Vial Pos	Sample ID	File Name	Level	Sample Name	File Date	Comment
C:16		Olio_Salmone	N/A		10/18/2018 12:43:03 PM	



Internal Standards	RT	Quan Peak	Response	Injected Conc Units	Calculated Conc Units	Flags
Norfloxacina-D5	NF	281.336 m/z	NF	NF	NF	
Demeclociclina	3.44	430.100 m/z	158	25.000	25.000	
Sulfadimetossina-D6	4.61	156.000 m/z	32197	25.000	25.000	
Penicillina G-D7	NF	180.000 m/z	NF	NF	NF	
Roxitromicina	5.66	157.942 m/z	28669	25.000	25.000	

Surrogates	RT	Quan Peak	Response Curve Type	Average RF/ Response Ratio	Injected Conc Units	Calculated Conc Units	Flags
------------	----	-----------	---------------------	----------------------------	---------------------	-----------------------	-------

Target Compounds	RT	Quan Peak	Response Curve Type	Average RF/ Response Ratio	Injected Conc Units	Calculated Conc Units	Flags
------------------	----	-----------	---------------------	----------------------------	---------------------	-----------------------	-------

Flag Legend: LOD<1<LOQ)=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated; Bordered cell = Manually integrated.

Quantitation Report

Lab Name: Residui EB
 Instrument: TSQ Vantage 277
 User: COMPUTER
 Batch: 20181017_RT_muscolo

Method: 20181017_RT_muscolo_Antibiotici_Multiresiduo
 Antibiotici_Multiresiduo
 Call File: 20181017_RT_muscolo.calk

Vial Pos	Sample ID	File Name	Level	Sample Name	File Date	Comment
C:16		Olio_Salmone	NA		10/18/2018 12:43:03 PM	
	Sulfaguanidina	0.63 156.000 mz	1537	Linear	0.000 6.461	6.461
	Sulfafazolo	NIF 108.128 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfadiazina	NIF 108.137 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfafiridina	NIF 156.105 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfamerazina	NIF 156.078 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Minociclina	NIF 441.100 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Epitetraciclina	NIF 410.100 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfameter	NIF 108.100 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfametazina	NIF 108.088 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Pipamidic Acid	NIF 217.000 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfabenzamide	2.3 108.000 mz	149	Linear	0.000 -1.39	-1.39
	Sulfamethizole	NIF 156.020 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Marbofloxacina	NIF 320.400 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfametroxipiridazina	2.73 156.000 mz	1741	Linear	0.000 -2.826	-2.826
	EpyOxletetraciclina	NIF 201.204 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Tetraciclina	NIF 410.100 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfaclopiridazina	NIF 156.076 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Enoxacin	NIF 303.400 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Ofloxacina	3.09 318.200 mz	1291	Linear	0.000 2.316	2.316
	Oxletetraciclina	NIF 201.200 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfamethoxazole	3.03 155.980 mz	1478	Linear	0.000 -6.962	-6.962
	Norfloxacina	NIF 233.238 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfamonometoxina	3.31 156.000 mz	534	Linear	0.000 -4.194	-4.194
	Ciprofloxacina	3.3 288.237 mz	3243	Linear	0.000 3.855	3.855
	Sulfadoxin	NIF 156.118 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Enrofloxacina	NIF 316.289 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Danafloxacina	NIF 283.252 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Lomefloxacina	3.53 265.100 mz	239	Linear	0.000 1.829	1.829
	Sulfosozole	NIF 156.030 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Orbitfloxacina	NIF 352.170 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Epilortetraciclina	NIF 98.100 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Difloxacina	NIF 299.204 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sarafloxacina	NIF 299.264 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Sulfafenazolo	4.28 158.239 mz	4998	Linear	0.000 -2.669	-2.669
	Clozetetraciclina	NIF 275.000 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF
	Cinoxacina	4.18 245.300 mz	1174	Linear	0.000 -10.579	-10.579
	Sulfadimetossina	NIF 156.118 mz	NIF	Linear	0.000 NIF	NIF

Flag Legend: LOD<L<LOQ=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated; Bordered cell = Manually integrated.

Quantitation Report

Lab Name: Residui E6
 Instrument: TSQ Vantage 277
 User: COMPUTER
 Batch: 20181017_RT_muscolo

Method: 20181017_RT_muscolo_Antibiotici_Multiresiduo
 Antibiotici_Multiresiduo
 Call File: 20181017_RT_muscolo.calk

Vial Pos	Sample ID	File Name	Level	Sample Name	File Date	Comment			
C:16		Olio Salmone	N/A		10/18/2018 12:43:03 PM				
		Oxolinic Acid	NIF	244.230 mz	NIF	Linear	0.000	NIF	
	5.04	Sulfachinossalina	156.100 mz	1761	Linear	0.000	2.187	2.187	
	5.06	Doxiciclina	428.364 mz	1014	Linear	0.000	-9.953	-9.953	
	5.42	Nalidixic Acid	187.156 mz	7012	Linear	0.000	2.042	2.042	
	5.49	Oleandomycin	544.000 mz	1187	Linear	0.000	4.575	4.575	
	NIF	Piperacillina	397.700 mz	NIF	Linear	0.000	NIF	NIF	
	5.54	Flumequinina	244.230 mz	28391	Linear	0.000	-2.591	-2.591	
	5.61	Penicillina G	217.000 mz	2481	Linear	0.000	9.29	9.29	
	5.66	Tylosina	174.400 mz	2065	Linear	0.000	4.482	4.482	
	NIF	Nadifloxacinina	343.300 mz	NIF	Linear	0.000	NIF	NIF	
	5.38	Penicillina V	114.000 mz	1069	Linear	0.000	-44.32	-44.32	
	NIF	Josamicina	174.128 mz	NIF	Linear	0.000	NIF	NIF	
	NIF	Oxacillina	144.000 mz	NIF	Linear	0.000	NIF	NIF	
	NIF	Claythromycin	158.220 mz	NIF	Linear	0.000	NIF	NIF	
	NIF	Dicloxicillina	160.000 mz	NIF	Linear	0.000	NIF	NIF	
	5.53	Nafillina	118.000 mz	751	Linear	0.000	21.308	21.308	

Flag Legend: LOD<J<LOQ)=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated;
 Bordered cell = Manually integrated.

Figura 5 – Analisi qualitativa dell'olio da testa di salmone

Riferimenti bibliografici

- [1] M.. Islam, S. Khan, M. Tanaka, Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments, *Mar. Pollut. Bull.* 49 (2004) 103–110. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.01.018.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations., *Aquaculture development. 4, Ecosystem approach to aquaculture.*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. <http://www.fao.org/docrep/013/i1750e/i1750e00.htm> (accessed November 12, 2018).
- [3] L.S. Senaratne, P.-J. Park, S.-K. Kim, Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 191–197. doi:10.1016/j.biortech.2005.02.024.
- [4] F. Shahidi, R. Abuzaytoun, Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects, in: *Adv. Food Nutr. Res.*, 2005: pp. 93–135. doi:10.1016/S1043-4526(05)49003-8.
- [5] G. Jiao, J. Hui, I. Burton, M.-H. Thibault, C. Pelletier, J. Boudreau, N. Tchoukanova, B. Subramanian, Y. Djaoued, S. Ewart, J. Gagnon, K. Ewart, J. Zhang, G. Jiao, J. Hui, I. Burton, M. Thibault, C. Pelletier, J. Boudreau, N. Tchoukanova, B. Subramanian, Y. Djaoued, S. Ewart, J. Gagnon, K. Ewart, J. Zhang, Characterization of Shrimp Oil from *Pandalus borealis* by High Performance Liquid Chromatography and High Resolution Mass Spectrometry, *Mar. Drugs*. 13 (2015) 3849–3876. doi:10.3390/md13063849.
- [6] EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request from the European Commission on the safety of use of colouring agents in animal nutrition PART I. General Principles and Astaxanthin, 2005. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/291.pdf (accessed November 12, 2018).
- [7] L. Sijtsma, M. de Swaaf, Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 146–153. doi:10.1007/s00253-003-1525-y.
- [8] G. Sibi, D. Centre, K. Dhananjaya, K. Ravikumar, H. Mallesha, R. Venkatesha, D. Trivedi, K. Prasad Bhusal, K. Gowda, Preparation of Glucosamine Hydrochloride from Crustacean Shell Waste and It's Quantitation by RP-HPLC, *J. Sci. Res.* 8 (2013) 63–67. doi:10.5829/idosi.aejr.2013.8.2.7381.
- [9] Y. Kim, R.-D. Park, Progress in bioextraction processes of chitin from crustacean biowastes, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 58 (2015) 545–554. doi:10.1007/s13765-015-0080-4.
- [10] F. Devlieghere, A. Vermeulen, J. Debevere, *Food microbiology.*, Academic Press, 1984. <https://biblio.ugent.be/publication/299055> (accessed November 12, 2018).

- [11] L. Da Sacco, A. Masotti, L. Da Sacco, A. Masotti, Chitin and Chitosan as Multipurpose Natural Polymers for Groundwater Arsenic Removal and As₂O₃ Delivery in Tumor Therapy, *Mar. Drugs*. 8 (2010) 1518–1525. doi:10.3390/md8051518.
- [12] D. Campaniello, A. Bevilacqua, M. Sinigaglia, M. Corbo, Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries, *Food Microbiol.* 25 (2008) 992–1000. doi:10.1016/j.fm.2008.06.009.
- [13] R. Sánchez, G. Stringari, J. Franco, C. Valencia, C. Gallegos, Use of chitin, chitosan and acylated derivatives as thickener agents of vegetable oils for bio-lubricant applications, *Carbohydr. Polym.* 85 (2011) 705–714. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.049.
- [14] B. Aam, E. Heggset, A. Norberg, M. Sørli, K. Vårum, V. Eijsink, Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine, *Mar. Drugs*. 8 (2010) 1482–1517. doi:10.3390/md8051482.
- [15] J. Zhang, W. Xia, P. Liu, Q. Cheng, T. Tahi, W. Gu, B. Li, Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications, *Mar. Drugs*. 8 (2010) 1962–1987. doi:10.3390/md8071962.
- [16] M. Rodríguez, L. Albertengo, E. Agulló, Emulsification capacity of chitosan, *Carbohydr. Polym.* 48 (2002) 271–276. doi:10.1016/S0144-8617(01)00258-2.
- [17] L. Zhao, M. Liu, J. Wang, G. Zhai, Chondroitin sulfate-based nanocarriers for drug/gene delivery, *Carbohydr. Polym.* 133 (2015) 391–399. doi:10.1016/J.CARBPOL.2015.07.063.
- [18] J. Reginster, V. Gillot, O. Bruyere, Y. Henrotin, Evidence of nutraceutical effectiveness in the treatment of osteoarthritis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 2 (2000) 472–477. doi:10.1007/s11926-000-0023-9.
- [19] M. Iovu, G. Dumais, P. du Souich, Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate, *Osteoarthr. Cartil.* 16 (2008) S14–S18. doi:10.1016/j.joca.2008.06.008.
- [20] M. Vallières, P. du Souich, Modulation of inflammation by chondroitin sulfate, *Osteoarthr. Cartil.* 18 (2010) S1–S6. doi:10.1016/j.joca.2010.02.017.
- [21] X.H. Zou, Y.Z. Jiang, G.R. Zhang, H.M. Jin, N.T.M. Hieu, H.W. Ouyang, Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1588–1595. doi:10.1016/j.actbio.2008.12.001.
- [22] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnol. Lett.* 29 (2006) 17–25. doi:10.1007/s10529-006-9219-z.
- [23] A. Kinoshita-Toyoda, S. Yamada, S.M. Haslam, K.-H. Khoo, M. Sugiura, H.R. Morris, A. Dell, K. Sugahara, Structural Determination of Five Novel Tetrasaccharides Containing 3-O-Sulfated d-Glucuronic Acid and Two Rare Oligosaccharides Containing a β-d-Glucose Branch Isolated from

Squid Cartilage Chondroitin Sulfate E⁺, (2004). doi:10.1021/BI049622D.

- [24] N. Seno, K. Meyer, Comparative biochemistry of skin the mucopolysaccharides of shark skin, *Biochim. Biophys. Acta.* 78 (1963) 258–264. doi:10.1016/0006-3002(63)91636-6.
- [25] T. Ezejiofor, U. Enebaku, C. Ogueke, Waste to Wealth-Value Recovery from Agro-food Processing Wastes Using Biotechnology: A Review, 2014. www.sciencedomain.org (accessed November 12, 2018).
- [26] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632. doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2006.06.001.
- [27] I. Younes, S. Sellimi, M. Rinaudo, K. Jellouli, M. Nasri, Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities, *Int. J. Food Microbiol.* 185 (2014) 57–63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029.
- [28] L. Davidi, Y. Levin, S. Ben-Dor, U. Pick, Proteome Analysis of Cytoplasmatic and Plastidic β -Carotene Lipid Droplets in *Dunaliella bardawil*, *Plant Physiol.* 167 (2015) 60–79. doi:10.1104/pp.114.248450.
- [29] A.S. Brito, D.S. Arimatéia, L.R. Souza, M.A. Lima, V.O. Santos, V.P. Medeiros, P.A. Ferreira, R.A. Silva, C. V. Ferreira, G.Z. Justo, E.L. Leite, G.P.V. Andrade, F.W. Oliveira, H.B. Nader, S.F. Chavante, Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 9588–9595. doi:10.1016/j.bmc.2008.09.020.
- [30] D. Sahoo, S. Sahoo, P. Mohanty, S. Sasmal, P.L. Nayak, Chitosan: a New Versatile Bio-polymer for Various Applications, *Des. Monomers Polym.* 12 (2009) 377–404. doi:10.1163/138577209X12486896623418.
- [31] S. Klomklao, Digestive proteinases from marine organisms and their applications, n.d. <http://www.sjst.psu.ac.th> (accessed November 13, 2018).
- [32] K. Jellouli, A. Bougatef, L. Manni, R. Agrebi, R. Siala, I. Younes, M. Nasri, Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 939–948. doi:10.1007/s10295-009-0572-5.
- [33] N. El Hadj-Ali, R. Agrebi, B. Ghorbel-Frikha, A. Sellami-Kamoun, S. Kanoun, M. Nasri, Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 515–523. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2006.05.007.
- [34] B.K. Simpson, Digestive Proteinases from Marine Animals : McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, Canada, (2000) 217–240. doi:10.1201/9781482289916-11.
- [35] A. Sila, R. Nasri, A. Bougatef, M. Nasri, Digestive Alkaline Proteases from the Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Characterization and Potential Application as Detergent Additive and in the

Deproteinization of Shrimp Wastes, *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 21 (2012) 118–133.
doi:10.1080/10498850.2011.587149.

- [36] T.B. Cahú, S.D. Santos, A. Mendes, C.R. Córdula, S.F. Chavante, L.B. Carvalho, H.B. Nader, R.S. Bezerra, Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste, *Process Biochem.* 47 (2012) 570–577.
doi:10.1016/J.PROCBIO.2011.12.012.
- [37] N. Rubio-Rodríguez, S. Beltrán, I. Jaime, S.M. de Diego, M.T. Sanz, J.R. Carballido, Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 1–12. doi:10.1016/J.IFSET.2009.10.006.
- [38] Y. Zhong, T. Madhujith, N. Mahfouz, F. Shahidi, Compositional characteristics of muscle and visceral oil from steelhead trout and their oxidative stability, *Food Chem.* 104 (2007) 602–608.
doi:10.1016/J.FOODCHEM.2006.12.036.
- [39] V. Fournier, F. Destailats, B. Hug, P.-A. Golay, F. Joffre, P. Juanéda, E. Sémon, F. Dionisi, P. Lambelet, J.-L. Sébédio, O. Berdeaux, Quantification of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization by gas–liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1154 (2007) 353–359. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.099.
- [40] V.T. Crexi, M.L. Monte, L.A. de S. Soares, L.A.A. Pinto, Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera, *Food Chem.* 119 (2010) 945–950. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.050.
- [41] S.-M. Lee, A.K.M. Asaduzzaman, B.-S. Chun, Characterization of Lecithin Isolated from Anchovy (*Engraulis japonica*) Residues Deoiled by Supercritical Carbon Dioxide and Organic Solvent Extraction, *J. Food Sci.* 77 (2012) C773–C778. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02764.x.
- [42] C.H.S. Ruxton, S.C. Reed, M.J.A. Simpson, K.J. Millington, The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence, *J. Hum. Nutr. Diet.* 17 (2004) 449–459.
doi:10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x.
- [43] C.P. Zuta, B.K. Simpson, H.M. Chan, L. Phillips, Concentrating PUFA from mackerel processing waste, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80 (2003) 933–936. doi:10.1007/s11746-003-0799-5.
- [44] I. Adeoti, K. Hawboldt, *Biomass and bioenergy.*, Pergamon, 2014.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143170432> (accessed November 15, 2018).
- [45] C. (Charles) Paquot, A. Hautfenne, F. International Union of Pure and Applied Chemistry. Applied Chemistry Division. Commission on Oils, Standard methods for the analysis of oils, fats, and derivatives, Blackwell Scientific Publications, Oxford [Oxfordshire] ;, 1987.
<https://searchworks.stanford.edu/view/1663309> (accessed November 15, 2018).
- [46] W. Horwitz, Association of Official Analytical Chemists., Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists., The Association, 1970.

<https://searchworks.stanford.edu/view/4706329> (accessed November 15, 2018).

- [47] W. Horwitz, G.W. Latimer, Association of Official Analytical Chemists International, Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, 2006.
https://www.researchgate.net/publication/292783651_AOAC_2005 (accessed November 15, 2018).
- [48] M. Bohnet, Wiley InterScience (Online service), Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, n.d.
- [49] J.K. Chan, V.M. Bruce, B.E. McDonald, Dietary α -linolenic acid is as effective as oleic acid and linoleic acid in lowering blood cholesterol in normolipidemic men, *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 1230–1234. doi:10.1093/ajcn/53.5.1230.
- [50] P. Sanderson, P. Yaqoob, P.C. Calder, Effects of Dietary Lipid Manipulation upon Graft vs Host and Host vs Graff Responses in the Rat, *Cell. Immunol.* 164 (1995) 240–247. doi:10.1006/CIMM.1995.1167.
- [51] L.A. Ferrara, A.S. Raimondi, L. d'Episcopo, L. Guida, A. Dello Russo, T. Marotta, Olive oil and reduced need for antihypertensive medications., *Arch. Intern. Med.* 160 (2000) 837–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737284> (accessed November 16, 2018).
- [52] J.M. Kremer, D.A. Lawrence, W. Jubiz, R. DiGiacomo, R. Rynes, L.E. Bartholomew, M. Sherman, Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects., *Arthritis Rheum.* 33 (1990) 810–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2363736> (accessed November 16, 2018).
- [53] A. Linos, E. Kaklamanis, A. Kontomerkos, Y. Koumantaki, S. Gazi, G. Vaiopoulos, G.C. Tsokos, P. Kaklamanis, The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis--a case control study., *Scand. J. Rheumatol.* 20 (1991) 419–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1771399> (accessed November 16, 2018).
- [54] M. Solanas, A. Hurtado, I. Costa, R. Moral, J.A. Menéndez, R. Colomer, E. Escrich, Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet., *Int. J. Oncol.* 21 (2002) 745–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239612> (accessed November 16, 2018).
- [55] N.R. Simonsen, J. Fernandez-Crehuet Navajas, J.M. Martin-Moreno, J.J. Strain, J.K. Huttunen, B.C. Martin, M. Thamm, A.F. Kardinaal, P. van't Veer, F.J. Kok, L. Kohlmeier, Tissue stores of individual monounsaturated fatty acids and breast cancer: the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer, *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 134–141. doi:10.1093/ajcn/68.1.134.
- [56] J.M. Martin-Moreno, W.C. Willett, L. Gorgojo, J.R. Banegas, F. Rodriguez-Artalejo, J.C. Fernandez-Rodriguez, P. Maisonneuve, P. Boyle, Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk., *Int. J. Cancer.* 58 (1994) 774–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927867> (accessed November 16, 2018).

- [57] G. Assmann, G. de Backer, S. Bagnara, J. Betteridge, G. Crepaldi, A. Fernandez-Cruz, J. Godtfredsen, B. Jacotot, R. Paoletti, S. Renaud, G. Ricci, E. Rocha, E. Trautwein, G.C. Urbinati, G. Vareia, C. Williams, Olive Oil and the Mediterranean Diet: Implications for Health in Europe, *Br. J. Nurs.* 6 (1997) 675–677. doi:10.12968/bjon.1997.6.12.675.
- [58] L. Lipworth, M.E. Martínez, J. Angell, C.-C. Hsieh, D. Trichopoulos, Olive Oil and Human Cancer: An Assessment of the Evidence, *Prev. Med. (Baltim).* 26 (1997) 181–190. doi:10.1006/pmed.1996.9977.
- [59] ISO/IEC 17025:2005 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, n.d. <https://www.iso.org/standard/39883.html> (accessed November 16, 2018).
- [60] ISO 13904:2016 - Animal feeding stuffs -- Determination of tryptophan content, n.d. <https://www.iso.org/standard/59955.html> (accessed November 16, 2018).
- [61] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> (accessed November 22, 2018).
- [62] A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, M. Tanaka, Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*), *Food Chem.* 93 (2005) 475–484.
- [63] M. Sadowska, I. Kołodziejska, C. Niecikowska, Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Chem.* 81 (2003) 257–262.
- [64] R. Ely, T. Supriya, C.G. Naik, Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 309 (2004) 121–127.
- [65] A. Asghar, R.L. Henrickson, Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems, in: *Adv. Food Res.*, Elsevier, 1982: pp. 231–372.
- [66] J.F. Bateman, S.R. Lamande, J.A.M. Ramshaw, Collagen superfamily, *Extracell. Matrix.* 2 (1996) 22–67.
- [67] G. Stainsby, Gelatin gels, *Adv. Meat Res.* (1987).
- [68] M.C. Gómez-Guillén, J. Turnay, M.D. Fernández-Díaz, N. Ulmo, M.A. Lizarbe, P. Montero, Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study, *Food Hydrocoll.* 16 (2002) 25–34.
- [69] M. Djabourov, J.-P. Lechère, F. Gaill, Structure and rheology of gelatin and collagen gels, *Biorheology.* 30 (1993) 191–205.
- [70] M. Gómez-Guillén, M. López-Caballero, A. Alemán, Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin, *Citeseer.* (n.d.). <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.908.5033&rep=rep1&type=pdf>

(accessed November 19, 2018).

- [71] K. Jayathilakan, K. Sultana, K. Radhakrishna, A.S. Bawa, Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review., *J. Food Sci. Technol.* 49 (2012) 278–93. doi:10.1007/s13197-011-0290-7.
- [72] H.G. Kristinsson, B.A. Rasco, Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40 (2000) 43–81. doi:10.1080/10408690091189266.
- [73] V. Klompong, S. Benjakul, D. Kantachote, F. Shahidi, Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type, *Food Chem.* 102 (2007) 1317–1327. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2006.07.016.
- [74] M. Ovissipour, A. Abedian, A. Motamedzadegan, B. Rasco, R. Safari, H. Shahiri, The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera, *Food Chem.* 115 (2009) 238–242. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2008.12.013.
- [75] N. Bhaskar, N.S. Mahendrakar, Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 4105–4111. doi:10.1016/J.BIORTECH.2007.09.006.
- [76] B. Li, F. Chen, X. Wang, B. Ji, Y. Wu, Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry, *Food Chem.* 102 (2007) 1135–1143. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2006.07.002.
- [77] J. Huo, Z. Zhap, Study on Enzymatic Hydrolysis of *Gadus morrhua* Skin Collagen and Molecular Weight Distribution of Hydrolysates, *Agric. Sci. China.* 8 (2009) 723–729. doi:10.1016/S1671-2927(08)60271-0.
- [78] K. Suetsuna, H. Ukeda, H. Ochi, Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein, *J. Nutr. Biochem.* 11 (2000) 128–131. doi:10.1016/S0955-2863(99)00083-2.
- [79] T. Nagai, N. Suzuki, Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins, *Food Chem.* 68 (2000) 277–281. doi:10.1016/S0308-8146(99)00188-0.
- [80] A. Pihlanto-Leppälä, Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides, *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2000) 347–356.
- [81] B.G. Frushour, J.L. Koenig, Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin, *Biopolym. Orig. Res. Biomol.* 14 (1975) 379–391.

